

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. Oktober 2008 (16.10.2008)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2008/122314 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12N 15/63 (2006.01) A61K 31/713 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2007/053459

(22) Internationales Anmeldedatum:
10. April 2007 (10.04.2007)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **QIAGEN GMBH** [DE/DE]; Qiagen Str.1, 40724 Hilden (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BIELKE, Wolfgang** [DE/DE]; Thielenbrucher Allee 14, 51069 Köln (DE).
HAHN, Peter [DE/DE]; Am Kloster 16, 51515 Kürten (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,

CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich
- das Anmeldedatum der internationalen Anmeldung ist innerhalb von zwei Monaten seit Ablauf der Prioritätsfrist
- mit Informationen über einen oder mehrere für nichtig angesehene Prioritätsansprüche

(54) Title: RNA INTERFERENCE TAGS

(54) Bezeichnung: RNA-INTERFERENZ TAGS

(57) Abstract: The invention relates to a composition for inhibiting the expression of a target gene in a eukaryotic cell by RNA interference, the composition comprising a genetic construct and the target gene being introduced into the eukaryotic cell by means of said construct, and the construct having a first target gene and a first siRNA tag. The invention also relates to a composition for inhibiting the expression of one or more target genes in a eukaryotic cell by RNA interference. The composition comprises at least two genetic constructs and the target genes are introduced into the eukaryotic cell by means of said constructs, a) the first construct containing a first target gene and a first siRNA tag and b) the second construct containing a second target gene and a second siRNA tag, and the first and the second siRNA tag having different nucleic acid sequences. The invention finally relates to a method for inhibiting the expression of a target gene in a eukaryotic cell. Said method comprises the following steps: a) providing at least one eukaryotic cell, said cell being capable of RNA interference, b) transfecting the cells with a composition according to the invention and c) introducing at least one siRNA that is complementary to a siRNA tag of a transfected construct to inhibit the expression of the target gene that forms a transcription unit together with the siRNA tag.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine Zusammensetzung zur Inhibierung der Expression eines Zielgens in einer eukaryotischen Zelle mittels RNA-Interferenz, wobei die Zusammensetzung ein genetisches Konstrukt umfasst und das Zielgen mittels dieses Konstruktes in die eukaryotische Zelle eingebracht wird, und wobei das Konstrukt ein erstes Zielgen und ein erstes siRNA-Tag aufweist. Des Weiteren wird eine Zusammensetzung zur Inhibierung der Expression eines oder mehrerer Zielgene in einer eukaryotischen Zelle mittels RNA-Interferenz beschrieben, wobei die Zusammensetzung mindestens zwei genetische Konstrukte umfasst und die Zielgene mittels dieser Konstrukte in die eukaryotische Zelle eingebracht werden, und wobei a) das erste Konstrukt ein erstes Zielgen und ein erstes siRNA-Tag enthält und b) das zweite Konstrukt ein zweites Zielgen und ein zweites siRNA-Tag enthält, wobei das erste und das zweite siRNA-Tag eine unterschiedliche Nukleinsäuresequenz aufweisen. Schließlich wird auch noch ein Verfahren zur Inhibierung der Expression eines Zielgens in einer eukaryotischen Zelle beschrieben, das die folgenden Schritte umfasst: a) Bereitstellung mindestens einer eukaryotischen Zelle, wobei die Zelle zur RNA-Interferenz befähigt ist, b) Transfektion der Zellen mit einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung und c) Einführen mindestens einer siRNA, die komplementär zu einem siRNA-Tag eines transfizierten Konstruktes ist, um die Expression des mit dem siRNA-Tag eine Transkriptionseinheit bildenden Zielgens zu inhibieren.

WO 2008/122314 A1

RNA-Interferenz Tags

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Zusammensetzung zur Inhibierung der Expression eines oder mehrerer Zielgene in einer eukaryotischen Zelle mittels RNA-Interferenz sowie die
5 Verwendung entsprechender Zusammensetzungen und ein Verfahren zur Inhibierung der Expression eines oder mehrerer Zielgene in einer eukaryotischen Zelle mittels RNA-Interferenz.

Dem aus der Literatur als „RNA-Interferenz“ (RNAi) bekannten Phänomen liegt zugrunde,
10 dass kurze RNA-Moleküle (siRNA, small interfering RNA) in der Zelle mit Messenger-RNA (mRNA) in Wechselwirkung treten können (Literatur: Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C., Nature Feb 19, 1998; 391 (6669):744-745). Über einen komplexen Mechanismus, der von Enzymen gesteuert wird, kommt es zu einem Abbau (einer Degradation) der mRNA, wodurch die Expression der mRNA und damit auch die
15 Proteinexpression inhibiert wird (sog. „Gene Silencing“, d.h. Abschalten eines Gens bzw. Geninaktivierung).

Neben der siRNA wurden weitere kleine RNA Spezies entdeckt, beispielsweise die „micro-RNAs“ (miRNA) oder „short hairpin RNAs“ (shRNA), die ebenfalls mittels verwandter
20 Mechanismen eine Proteinexpression inhibieren können.

Es ist aus der WO 02/44321 bekannt, siRNA in Zellen einzubringen, um die Expression eines natürlich in den Zellen vorkommenden Gens zu inhibieren. In der WO 02/44321 wird ferner das Einbringen eines fremden Zielgens in eine Zelle offenbart. Die Expression des
25 eingebrachten Zielgens kann durch zusätzliches Einbringen von siRNA, die immer von der Sequenz des eingebrachten Zielgens abgeleitet ist, in der Expression inhibiert werden.

Es hat sich gezeigt, dass nicht jede beliebige Sequenz gleich gut für den Mechanismus der RNA-Interferenz geeignet ist. Einige Kriterien für die Zusammensetzung einer effizienten
30 siRNA sind erkannt worden. Reynolds et al., publizierten die Auswahlkriterien in Nat. Biotechnol. Mar. 2004, 22(3):326-330. Die elektronische Publikation erfolgte am 1. Februar 2004 unter dem Titel „*Rational siRNA design for RNA interference*“.

Gängige Praxis ist es, für jedes zu inhibierende Gen individuell aus dessen Sequenz spezifische siRNAs abzuleiten. Eine solche Vorgehensweise ist zeitaufwändig und wenig effizient, da häufig siRNAs abgeleitet werden, von denen sich erst im Versuch erweist, dass diese keine zufrieden stellende Inhibierung der Genexpression ermöglichen. Außerdem birgt
5 jede individuelle siRNA Sequenz das Risiko eigener, unspezifischer Genregulationsprofile, den so genannten „off-target“ Effekten.

Da der Stand der Technik ausschließlich Zusammensetzungen und Verfahren offenbart, bei denen jede siRNA individuell und aufwändig direkt von dem zu inhibierenden Gen abgeleitet
10 wird, liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, eine einfache, effiziente und universelle Inhibierung der Expression von in die Zelle eingebrachten Zielgenen mittels RNA Interferenz („RNAi“) zu ermöglichen.

Die vorliegende Erfindung ist daher darin zu sehen, dass die erfindungsgemäße
15 Zusammensetzung ein Konstrukt umfasst und das Zielgen mittels dieses Konstruktes in eine eukaryotische Zelle eingebracht wird, wobei das Konstrukt mindestens ein erstes Zielgen und mindestens ein zugehöriges, so genanntes „siRNA-Tag“ aufweist. Als siRNA-Tag wird hier ein genetisches Element definiert, das mit dem Zielgen eine Transkriptionseinheit bildet und spezifisch durch eine komplementäre siRNA erkannt wird. Damit werden die das siRNA-Tag
20 beinhaltenden Genkonstrukte der RNA-Interferenz oder einem anderen geninhibitorischen Prozess unterworfen. Erfindungsgemäß werden bevorzugt solche siRNA-Tags verwendet, von denen bekannt ist, dass sie in einer bestimmten Zelle besonders potent eine RNA-Interferenz zu bewirken vermögen und idealerweise minimale „off-target“-Effekte verursachen.

25 Die vorliegende Erfindung erlaubt insbesondere auch die gleichzeitige, aber voneinander unabhängige Regulation mehrerer eingebrachter Zielgene mittels spezifisch gestalteter siRNAs und ihren zugehörigen Zielsequenzen.

Diese Aufgabe löst die Erfindung durch die Zusammensetzung gemäß der unabhängigen
30 Ansprüche 1 und 2, der Verwendung gemäß des unabhängigen Anspruchs 37, sowie des Verfahrens gemäß des unabhängigen Anspruchs 38. Weitere vorteilhafte Aspekte, Details und Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen, der Beschreibung und den Figuren.

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung ist somit geeignet zur Inhibierung der Expression (z.B. der ektopischen Expression) eines oder mehrerer Zielgene in einer eukaryotischen Zelle mittels RNA-Interferenz und betrifft auch die Verwendung entsprechender Zusammensetzungen sowie ein Verfahren zur Inhibierung der Expression eines oder mehrerer Zielgene in einer eukaryotischen Zelle mittels RNA-Interferenz.

Definitionen

- Unter siRNA im Sinne der vorliegenden Erfindung werden alle RNA Spezies verstanden, die zur RNA-Interferenz befähigt sind, d.h., die eine Inhibierung der Expression eines Transkriptes bewirken können. Die Inhibierung erfolgt üblicherweise durch sequenzspezifische Erkennung eines siRNA-Tags durch die siRNA. Eine siRNA weist vorzugsweise eine 100%-ige Homologie mit dem zugehörigen siRNA-Tag auf. Allerdings sind auch Beispiele bekannt, bei denen ein geringerer Grad an Homologie ausreichend für eine gewisse inhibierende Wirkung einer siRNAs sein kann. Diesem Phänomen kann auch eine Translationsinhibition zu Grunde liegen, wie sie auch für die Wirkungsweise der sogenannten micro-RNAs (miRNAs) beschrieben ist.

- siRNA-Tags sind Sequenzen, die komplementär zu einer siRNA sind. Sie bilden mit dem Zielgen eine Transkriptionseinheit und befinden sich im 5'-nicht-kodierenden oder im 3'-nicht-kodierenden Bereich des Transkriptes, und/oder sie überlappen mit dem kodierenden Bereich des Transkriptes. Dadurch, dass die siRNA-Tags eigenständige Sequenzen sind, bieten sie den Vorteil universell einsetzbar zu sein. Ein siRNA-Tag kann auch Bestandteil eines artifizielle oder natürlichen Promoters/Enhancers/Silencers sein. Den Fachkreisen ist das hier vermittelte Gene Silencing unter dem Stichwort „transkriptionelle Inhibition“ bekannt.

- Unter einem Zielgen wird eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die für eine funktionelle RNA (beispielsweise eine tRNA, rRNA usw.) oder ein Protein kodiert, deren/dessen Expression bzw. Translation mittels siRNA durch Abbau des Transkriptes unterbunden werden soll.

- Unter Zusammensetzung im Sinne der Erfindung wird eine wässrige Lösung enthaltend ein oder mehrere unterschiedliche rekombinante Nukleinsäuren verstanden. Die

Lösung enthält vorzugsweise weitere Bestandteile, welche die Transfektion der Nukleinsäure ermöglichen. Entsprechende Zusammensetzungen sind dem Fachmann aus dem Stand der Technik hinreichend bekannt.

5 Viele Fragestellungen in der Biologie können nicht durch Angabe absoluter Werte sinnvoll beantwortet werden. Oft ist es erheblich aussagekräftiger, beispielsweise die biologischen Auswirkungen einer Expression von Genen direkt zu vergleichen. Dazu besonders geeignet ist eine erfindungsgemäße Zusammensetzung zur Inhibierung der Expression eines Zielgens oder mehrerer Zielgene in einer eukaryotischen Zelle mittels RNA-Interferenz, die dadurch
10 gekennzeichnet ist, dass sie mindestens zwei genetische Konstrukte umfasst und die Zielgene mittels dieser Konstrukte in die eukaryotische Zelle eingebracht werden, wobei (a) das erste Konstrukt ein erstes Zielgen und ein erstes siRNA-Tag und (b) das zweite Konstrukt ein zweites Zielgen und ein zweites siRNA-Tag aufweisen, wobei sich das erste und das zweite siRNA-Tag voneinander unterscheiden.

15

Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher siRNA-Tags wird die Modulation der beiden zu vergleichenden Genexpressionen möglich. Dazu werden zwei unterschiedliche Zielgene auf den beiden verwendeten Konstrukten eingesetzt.

20 Vorteilhaft ist ferner die Verwendung desselben Zielgens auf zwei Konstrukten, um auf diese Weise Aussagen zu Dosiseffekten für das Gen und für die siRNA zu erhalten.

Ferner ist es möglich, mittels der erfindungsgemäßen Zusammensetzung durch zwei Konstrukte zwei Allele des gleichen Zielgens in einer Zelle zu studieren. Durch die
25 unterschiedlichen siRNA-Tags ist es möglich, die Expression beider Allele individuell zu modulieren und so Erkenntnisse über die Funktionen der unterschiedlichen Allele zu gewinnen, z.B. dominant negative Formen und Wildtyp-Varianten oder auch verschiedene Splicevarianten.

30 Die erfindungsgemäße Zusammensetzung ist nicht auf ein oder zwei Konstrukte beschränkt. Es können ein drittes Konstrukt, ein viertes Konstrukt und beliebig viele weitere Konstrukte zugefügt werden, die neben einem Zielgen immer ein siRNA-Tag umfassen. Damit wird es möglich, komplexe Wechselwirkungen von Genen zu untersuchen und durch Einbringen von siRNAs modulierend einzelne Zielgene oder Gruppen von Zielgenen in der Expression zu

inhibieren, um somit Hinweise auf die Wirkung der Zielgene oder auch der zellulären Gene zu erhalten.

Für eine einfache Kontrolle der Expression der Zielgene können diese auch mit einem Markergen fusioniert werden. Besonders vorteilhaft ist es, verschiedene Zielgene mit verschiedenen Markergenen so zu fusionieren, dass Fusionsproteine exprimiert werden, was einen spezifischen Nachweis der einzelnen Zielgene ermöglicht. Als Markergene zur Fusion bieten sich aus der Gruppe bekannter Markergene an: (Enhanced) Green Fluorescent Protein sowie Derivate davon ((E)GFP; YFP; CFP), ferner dsRed, Myc-Tag, E-Tag, FLAG-Tag, Glu-Glu-Tag, GST-Tag, HA-Tag, His-Tag, HSV-Tag, Luciferase, MBP, Protein C-Tag, S-Tag, T7-Tag, V5-Tag, VSV-g-Tag, Avidin/Streptavidin/Strep-Tag, Thioredoxin, His-patch Thioredoxin, β -Galactosidase, Chloramphenicolacetyltransferase, Cellulose Binding Domains (CBD's), Chitin Binding Domain, Staphylococcal Protein A, Streptococcal Protein G, neo, hyg, pac, zeo, gpt, ble, dhfr, hpt und npt II. Weitere Markergene zur Fusion, die einen Nachweis des Zielgens ermöglichen, können ebenfalls verwendet werden.

Vorzugsweise werden Markergene aus der Gruppe der Fluoreszenz erzeugenden Proteine verwendet, da deren Nachweis nicht aufwändig ist. Vorteilhaft an dieser Art des Nachweises ist, dass durch nicht-invasive Fluoreszenzmessung oder Fluoreszenzmikroskopie die Bestimmung an der lebenden Zelle möglich ist. Besonders bevorzugt ist, dass zwei unterscheidbare Markergene für verschiedene, Fluoreszenz erzeugende Proteine kodieren, die Fluoreszenz unterschiedlicher Wellenlänge erzeugen.

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung erlaubt Studien an unterschiedlichen eukaryotischen Zellen. Die Zellen können z.B. tierischen Ursprungs sein. Dabei können die Zellen *in vivo* im Tier verbleiben, einem Tier entnommen sein, einen tierischen Einzeller verkörpern oder auch aus einer Zellkultur mit tierischen Zellen entstammen. Bei den tierischen Zellen kann es sich z.B. um Zellen handeln, die von einem Säugetier stammen (sog. Säugerzellen).

30

Andererseits können die Zellen auch pflanzlichen Ursprungs sein. Die Zellen können *in vivo* in einer Pflanze verbleiben, einer Pflanze entnommen sein, einen pflanzlichen Einzeller verkörpern oder aber auch aus einer Zellkultur mit pflanzlichen Zellen entstammen.

Die Zelle kann des Weiteren eine Pilzzelle sein. Diese Zellen mykotischen Ursprungs umfassen alle zur RNA-Interferenz befähigten Pilze. Als Modellorganismus sind aus dem Stand der Technik z.B. Hefen bekannt. Aus der Literatur ist bekannt, dass z.B. *Saccharomyces spec.* nicht zur RNA-Interferenz befähigt ist. Dagegen ist bekannt, dass z.B. die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* der RNA-Interferenz zugänglich ist.

Erfindungsgemäß werden solche Sequenzen als siRNA-Tag ausgewählt, die entweder selbst nicht Bestandteil des zu inhibierenden Transkripts sind oder mit dieser nur teilweise überlappen. Überraschenderweise wurde gefunden, dass das siRNA-Tag nicht Bestandteil der kodierenden Sequenz sein muss, sondern es für eine effiziente RNA-Interferenz ausreichend ist, dass das siRNA-Tag lediglich überhaupt Bestandteil des Transkripts ist, das heißt, mit dem Zielgen eine Transkriptionseinheit bildet.

Vorteilhaft ist die Verwendung von Sequenzen als siRNA-Tags, die nicht natürlich in der zu transfizierenden Zelle vorkommen. Dies können selbstverständlich auch solche Sequenzen sein, die nicht oder derzeit noch nicht in den zugänglichen Sequenz-Datenbanken verzeichnet sind. Weiterhin können auch Sequenzen Verwendung finden, die keine Entsprechung in der Natur haben, diese werden daher als artifizielle (oder künstliche) Sequenzen bezeichnet.

Vorzugsweise kann eine Wechselwirkung der gegen siRNA-Tags gerichteten siRNAs mit Genprodukten der zu transfizierenden Zielzelle dadurch vermieden werden, dass die Sequenz des siRNA-Tags und somit der siRNA von Nukleinsäuresequenzabschnitten abgeleitet wird, die selbst nicht in der zu transfizierenden Zielzelle vorkommen. Dazu ist es insbesondere bevorzugt, dass die erfindungsgemäßen siRNA-Tags aus dem Genom von Prokaryoten oder Archae-Bakterien abgeleitet werden. Besonders bevorzugt werden diese Nukleinsäuresequenzen aus dem Genom von Archae-Bakterien abgeleitet, beispielsweise aus den Gattungen *Thermotoga* (z.B. *Thermotoga maritima*, usw.), *Methanosarcina* (z.B. *Methanosarcina mazei*, usw.), *Pyrococcus* (z.B. *P.furiosus*, *P.horikoshii*, *P.woesei*, usw.), *Halobacterium* (z.B. *H.cutirubrum*, *H.denitrificans*, *H.halobium*, usw.), *Methanlobus* (z.B. *M.bombayensis*, *M.oregonensis*, *M.siciliae*, usw.), *Sulfolobus* (z.B. *S.acidocaldarius*, *S.brierleyi*, *S.hakonensis*, usw.) oder *Acidilobus* (z.B. *A.aceticus*). Dem Fachmann sind entsprechende weitere Archae-Gattungen bekannt.

Ganz besonders bevorzugt weisen die erfindungsgemäßen siRNA-Tags die in der Tabelle 1 angegebenen und in Figur 2 nochmals im Kontext gezeigten Sequenzen auf, wobei sich jedoch die Anwendung erfindungsgemäßer siRNA-Tags nicht auf diese beschränkt. Tabelle 1 zeigt somit eine Sequenzübersicht der drei hier beispielhaft verwendeten siRNA-Tags und der jeweils zugehörigen siRNAs.

Tabelle 1

Sequenzname	siRNA Sequenz	siRNA-Tag Sequenz
Sequenz 274	5'-GGGUAUCGACGAUUACAAAUU-3' 3'-GUCCCAUAGCUGCUAAUGUUU-5'	CAGGGTATCGACGATTACAAA [SEQ1]
Sequenz 1248	5'-GCGUUGAAAUAGCGUACAAdTT-3' 3'-dTTCGCAACUUUAUCGCAUGUU-5'	AAGCGTTGAAATAGCGTACAA [SEQ2]
Sequenz 2904	5'-GGAUACGCGGGACGUUAAAUU-3' 3'-GACCUAUGCGCCUGCAAUUU-5'	CTGGATACGCGGGACGTTTAA [SEQ3]

Das siRNA-Tag der erfindungsgemäßen Zusammensetzung kann sowohl 3'-stromabwärts („3'-downstream“) als auch 5'-stromaufwärts („5'-upstream“) des kodierenden Bereichs der in ihrer Expression zu inhibierenden mRNA liegen. Sowohl im Falle des 3'-stromabwärts wie im Falle des 5'-stromaufwärts gelegenen siRNA-Tags kann eine Überlappung des siRNA-Tags mit der Sequenz des kodierenden Bereichs gegeben sein. Für bestimmte Fragestellungen ist es sinnvoll, dass die Position des siRNA-Tags in einem Intron der ungespleißten mRNA liegt, beispielsweise um den selektiven Mechanismus der RNA-Interferenz selbst weiter zu erforschen.

Um die Aufreinigung und auch den Nachweis des durch das Zielgen kodierten Proteins zu erleichtern, wird das Zielgen vorzugsweise mit einem Peptid-Tag zur Proteinaufreinigung fusioniert. Beispielsweise wird das His-Tag zur Fusion mit für Proteine kodierenden Zielgenen verwendet, da dieses Tag klein ist und beispielsweise aus 6 Histidin-Aminosäuren besteht. Eine Aufreinigung über Nickel-NTA Säulen ist unkompliziert möglich. Diese Nickel-NTA Säulen sind kommerziell verfügbar. Die Zusammensetzung, die ein Tag zur Proteinaufreinigung enthält, ist kompatibel zu Fusionsprodukten aus Zielgen und Markergen. Neben dem His-Tag können zahlreiche andere Tags zur Proteinaufreinigung verwendet werden, beispielsweise sind HA-Tags, ERK-Tags, GFP und verwandte Fusions-Tags, Myc-

Tags, FLAG-Tags, GST-Tags, Strep-Tags, β -Gal-Tags, MBP-Tag und andere Tags ebenfalls geeignet.

Erfindungsgemäß werden die Zellen mit einem Konstrukt oder einer Mehrzahl von
5 Konstrukten transfiziert. Dabei kann jedes Konstrukt Bestandteil eines eigenen Vektors sein
oder es können sich zwei oder mehr Konstrukte auf einem Vektor befinden. Dadurch ist
sichergestellt, dass die zwei oder mehr Konstrukte in einem festen stöchiometrischen
Verhältnis in die Zelle eingebracht werden. Als Vektoren für die Konstrukte besonders
geeignet sind Plasmide. Auch Transposons oder virale Vektoren oder andere autonome
10 Nukleinsäuren lassen sich als Vektoren einsetzen. Im einfachsten Falle wird auf einen Vektor
verzichtet und das Konstrukt ist Teil einer amplifizierten Nukleinsäure, beispielsweise Teil
eines PCR-Produktes.

Erfindungsgemäß wird die Zusammensetzung, die mindesten ein Konstrukt umfasst,
15 verwendet, um eine Inhibierung der Expression eines eingebrachten Zielgens in einer Zelle zu
ermöglichen. Dazu wird die Zelle mit der Zusammensetzung transfiziert. Zeitgleich, vorher
oder nachträglich wird die Zelle mit einer siRNA transfiziert, die in Wechselwirkung mit dem
siRNA-Tag des Transkriptes des Konstruktes tritt und mittels RNA-Interferenz eine
Inhibierung der Expression des Zielgens bewirkt.

20

In einer alternativen Ausführungsform kann die eukaryotische Zelle, in die das Zielgen
eingebracht werden soll, auch in Form eines Lysats vorliegen.

Erfindungsgemäß umfasst das Verfahren zur Inhibierung der Expression eines Zielgens in
25 mindestens einer eukaryotischen Zelle folgende Schritte:

- (a) Bereitstellung mindestens einer eukaryotischen Zelle, wobei die Zelle zur RNA-
Interferenz befähigt ist,
- (b) Transfektion der mindestens einen eukaryotischen Zelle mit mindestens einer
erfindungsgemäßen Zusammensetzung und
- 30 (c) Einführen mindestens einer siRNA, die komplementär zu einem siRNA-Tag eines
transfizierten Konstrukts ist,
wodurch die Expression des Zielgens inhibiert wird.

Um das Transkript des Zielgens erfindungsgemäß in die Zelle einzubringen stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Einerseits kann die Zelle direkt mit einem erfindungsgemäßen Konstrukt in Form einer RNA, beispielsweise einer mRNA, selbst transfiziert werden. Andererseits kann die Zelle auch mit einem Nukleinsäureamplifikations-

5 Produkt, beispielsweise PCR-Produkt, oder Nukleinsäurefragment transfiziert werden, wobei diese einen Promotor aufweisen, der in der Zelle die Transkription der mRNA des Zielgens bewirkt. Vorzugsweise wird die Zelle jedoch mit einem Vektor transfiziert, wobei der Vektor einen Promotor umfasst, der in der Zelle aktiv ist und die Transkription des Zielgens bewirkt.

- 10 Wird die Zelle mit einem PCR-Produkt oder einem Vektor transfiziert, die einen Promotor umfassen, steht in einer Ausführungsform der Promotor unter der Kontrolle eines Effektors. Der Effektor-kontrollierte Promotor ermöglicht eine weitere Kontrolle der Expression.

Die Sequenz der erfindungsgemäß eingesetzten siRNA-Tags umfasst bevorzugt eine Sequenz,

15 die nicht aus Eukaryoten bekannt ist. Erfindungsgemäße siRNA-Tags können daher von Prokaryoten abgeleitet sein oder artifizielle Sequenzen darstellen, die keine Entsprechung mit bekannten Sequenzen aus Datenbanken haben. Dadurch, dass die siRNA-Tags nicht Bestandteil der Sequenz der Zielgene sind, sind sie universell einsetzbar. Ein bedeutender Vorteil liegt darin, dass die siRNA-Tags auf dem Niveau der DNA vor oder hinter jede für

20 eine mRNA oder andere funktionelle Sequenz, wie beispielsweise tRNA, rRNA, usw., kodierende Sequenz kloniert werden können. Jedes siRNA-Tag stellt somit eine Kasette dar, die beispielsweise eine Komponente eines Klonierungsvektors sein kann.

Ein weiterer Vorteil der Erfindung besteht darin, dass Erfahrungen gesammelt werden

25 können, welche siRNA-Tags in welchen Zellen besonders potent eine RNA Interferenz bewirken. Genau diese siRNA-Tags können dann immer wieder für unterschiedliche Zielgene eingesetzt werden.

In der Zeichnung zeigen die

30

Figuren 1A und 1B eine beispielhafte Übersicht über die Funktion und Verwendung eines erfindungsgemäßen siRNA-Tags;

Figuren 2A und 2B beispielhafte, siRNA-Tag Sequenzen beinhaltende DNA-Kassetten, die zur Klonierung in ein Plasmid geeignet sind;

Figuren 3A bis 3C beispielhafte Immunfluoreszenzbilder eingesetzter pEGFP-Konstrukte mit siRNA-Tag, jeweils ohne und mit spezifischer siRNA; und die

Figur 4 ein Beispiel für ein selektives „Gene Silencing“ durch Co-Transfektion zweier Expressionsplasmide enthaltend erfindungsgemäße Konstrukte (hier mit für die fluoreszierende Proteine EGFP und DsRed codierenden Sequenzen) mit unterschiedlichen siRNA-Tags und den jeweiligen siRNAs.

Die Fig. 1A zeigt ein grundlegendes Schema des Prinzips, bei dem eine siRNA über ein mit dem Zielgen („Gene of Interest“) fusioniertes, komplementäres siRNA-Tag zu einer Reduktion der Expression des gesamten Konstruktes führt. Die Fig. 1B stellt beispielhaft die detaillierte Lokalisation eines siRNA-Tags im 3'-Bereich eines für ein Protein kodierenden Genkonstruktes dar. Hier erfolgte die Einführung des siRNA-Tags zwischen Translations-STOP-Codon-Signalen und einem Poly-A-Signal im 3'-untranslatierten Bereich (3'UTR). Ein siRNA-Tag kann hierbei Bestandteil eines größeren DNA-Konstrukts sein, das weitere funktionelle genetische Elemente enthält (Protein-Tag zur Aufreinigung oder Detektion eines Proteins, STOP-Codon-Sequenzen, Poly-A-Signalsequenzen, etc.) und als Transkriptionseinheit in das Konstrukt inkloniert wird.

Spezifisch für die drei beispielhaft validierten siRNAs wurden je drei unterschiedliche DNA-Kassetten entworfen, die neben der siRNA-Tag-Sequenz noch weitere Eigenschaften für die Klonierung und nachfolgende Expression der rekombinanten Produkte beinhalten (siehe Fig. 2). Diese DNA-Kassetten besitzen kohäsive Enden für die Ligation in die vorgesehenen Vektoren. Für die DNA-Kassetten in Fig. 2A ist für einen späteren Nachweis von Fusionsproteinen eine für einen His-Tag kodierende Sequenz vorhanden. In den in der Fig. 2B dargestellten DNA-Kassetten hingegen wurde auf die Einführung eines His-Tags verzichtet. Das dreifache Stoppsignal sowie ein Polyadenylierungssignal ergänzen die für eine korrekte Expression des späteren Genkonstruktes notwendigen Eigenschaften der DNA-Kassette.

Fig. 3 zeigt siRNA-Tag vermitteltes „Gene Silencing“ von pEGFP-Konstrukten (Plasmide codierend für EGFP). Verwendet wurden HeLa S3 Zellen, transfiziert mit pEGFP-Konstrukten, die entweder die siRNA-Tag Sequenz Nr. 247, 1248 oder 2904 (SEQ ID 1, 2 oder 3, siehe Tabelle 1) beinhalten, mit oder ohne die jeweils komplementären siRNAs. Die Fig. 3A und 3B sind einerseits Fluoreszenz- und Durchlicht-Fotos des gleichen Ausschnittes, der mit Licht der angegebenen Wellenlänge angeregt wurde, und andererseits Phasenkontrastaufnahmen zu Kontrollzwecken. Die angezeigten Klone sind ohne His-Tag (Fig. 3A) bzw. mit His-Tag (Fig. 3B). In Fig. 3C ist der immunologische Nachweis der Expression von Konstrukten mit His-Tag mittels Detektion der His-Tag aus Lysaten transfizierter Zellen gezeigt. Bei gleichzeitiger Co-Transfektion der komplementären siRNAs findet ein „Gene Silencing“ der Fusionsproteine statt. Als Kontrollen wurden mit pEGFP-Vektor transfizierte und nicht transfizierte Zellen verwendet.

Fig. 4 schließlich zeigt selektives „Gene Silencing“ durch Co-Transfektion zweier Expressionsplasmide mit unterschiedlichen siRNA-Tags und den jeweiligen siRNAs. Fluoreszenz- und Durchlicht-Fotos von HeLa-Zellen, transfiziert mit pDsRed 274, pEGFP 1248 und siRNAs der Sequenzen 274 bzw. 1248 (SEQ ID 1 und 2, siehe Tabelle 1). Die Aufnahmen stellen gleiche Ausschnitte dar, die mit Licht der jeweils angegebenen Wellenlänge angeregt worden waren.

Die vorliegende Erfindung beschreibt einen Ansatz, bei dem Tag-spezifische siRNA-Moleküle für die spezifische Geninaktivierung („Gene Silencing“) von Transkripten eingesetzt werden, ohne dass die Notwendigkeit besteht, für eine individuell Transkript, z.B. eine mRNA oder eine andere funktionelle RNA wie z.B. eine tRNA, rRNA, usw., eine spezifisch darauf abgestimmte siRNA zu gestalten und herzustellen. Das diesem Ansatz zugrunde liegende Prinzip lässt sich wie folgt beschreiben.

Das für die zu untersuchende funktionelle RNA codierende DNA-Fragment kann in einem eukaryotischen Expressionsplasmid kloniert werden, um beispielsweise eine rekombinante Expression eines kodierten Proteins zu ermöglichen oder die Effekte einer funktionellen RNA zu eruieren. Durch Fusion einer doppelsträngigen DNA, die ein siRNA-Tag für eine spezifische siRNA im Leseraster der zu untersuchenden funktionellen RNA enthält, ermöglicht die Co-Transfektion dieses modifizierten Vektors zusammen mit der spezifischen

siRNA eine Geninaktivierung der funktionellen RNA. Das doppelsträngige DNA-Molekül kann, neben der Erkennungsstelle für die siRNA (siRNA-Tag), weitere spezifische Eigenschaften aufweisen, wie beispielsweise kodierende Sequenzen für kurze Protein-Tags (z.B. His-Tag, Strep-Tag), STOP-Codons, Polyadenylierungssignale oder durch
5 Restriktionsenzyme erzeugte Überhänge zur direkten Klonierung des doppelsträngigen Moleküls. Schematisch ist dies in Figur 1 dargestellt.

Die in das genetische Konstrukt einzubauenden siRNA-Tags werden vorzugsweise von prokaryotischen, besonders bevorzugt von archaebakteriellen Gensequenzen abgeleitet, die
10 eine möglichst geringe, vorzugsweise keine Homologie zu eukaryotischen Gensequenzen aufweisen. Dies minimiert das Risiko, dass die gegen das siRNA-Tag gerichtete siRNA unspezifische Effekte hervorruft. Als besonders geeignet für die erfindungsgemäßen siRNA-Tags haben sich prokaryotische Gensequenzen herausgestellt, insbesondere Sequenzen aus Archae, beispielsweise aus den Gattungen *Thermotoga* (z.B. *Thermotoga maritima*, usw.),
15 *Methanosarcina* (z.B. *Methanosarcina mazei*, usw.), *Pyrococcus* (z.B. *P.furiosus*, *P.horikoshii*, *P.woesei*, usw.), *Halobacterium* (z.B. *H.cutirubrum*, *H.denitrificans*, *H.halobium*, usw.), *Methanobrevibacter* (z.B. *M.bombayensis*, *M.oregonensis*, *M.siciliae*, usw.), *Sulfolobus* (z.B. *S.acidocaldarius*, *S.brierleyi*, *S.hakonensis*, usw.) oder *Acidilobus* (z.B. *A.aceticus*). Dem Fachmann sind entsprechende weitere Archae-Gattungen bekannt.

20 . Zur Überprüfung, ob eine bestimmte prokaryotische Sequenz mit einer bereits bekannten eukaryotischen Sequenz Homologien aufweist, gibt es verschiedene Verfahren der Bioinformatik, wie z.B. einen modifizierten Smith-Waterman-Algorithmus, der im vorliegenden Fall zum Einsatz kam.

25 Für die Versuche im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden beispielhaft drei siRNAs ausgewählt, die einerseits eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit dafür boten, zu den gewünschten Ergebnissen zu kommen und die andererseits gemäß Smith-Waterman-Algorithmus die geringste Übereinstimmung mit bekannten eukaryotischen Genen aufwiesen. Die Funktion dieser siRNAs wurde untersucht, indem synthetische, doppelsträngige (ds) DNA-Moleküle,
30 die über eine entsprechend komplementäre siRNA-Bindestelle (siRNA-Tag) verfügen, mit dem 3'-Ende der EGFP-Expressionskassette eines EGFP-Reporterplasmids (pEGFP-C1) fusioniert wurden.

Für die drei im Rahmen der vorliegenden Erfindung beispielhaft validierten siRNA-Moleküle (siehe Tabelle 1) wurden je drei unterschiedliche DNA-Kassetten entworfen, die neben der siRNA-Tag-Sequenz noch weitere Eigenschaften für die Klonierung und nachfolgende Expression der rekombinanten Produkte beinhalten (siehe Figur 2). Diese DNA-Kassetten besitzen kohäsive Enden für die Ligation in die vorgesehenen Vektoren. Für die DNA-Kassetten in Figur 2A ist für einen späteren Nachweis der Fusionsproteine eine für einen His-Tag kodierende Sequenz vorhanden. In den in der Figur 2B dargestellten DNA-Kassetten hingegen wurde auf die Einführung eines His-Tags verzichtet. Das dreifache STOP-Codon sowie ein Polyadenylierungssignal ergänzen die für eine korrekte Expression des späteren Genkonstruktes notwendigen Eigenschaften der DNA-Kassette.

Die gezeigten DNA-Kassetten (siehe Figur 2) wurden im Anschluss in das pEGFP-C1-Expressionsplasmid inkloniert, das unter Verwendung der Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI linearisiert worden war.

Rekombinante Klone wurden charakterisiert, indem sowohl das Insert selbst als auch der Vektor im Bereich der Grenzen des Inserts sequenziert wurden.

Nach der molekularen Charakterisierung des rekombinanten pEGFP-Plasmids, das die RNAs mit den siRNA-Tags exprimiert, können diese Konstrukte für die funktionelle Analyse der entsprechenden siRNAs verwendet werden.

In einem ersten Experiment wurden alle Konstrukte in transienten Transfektionsexperimenten verwendet, um die EGFP-Expression jedes Klons als Indikator für die korrekte Transkription und Translation der modifizierten Expressionskassette zu analysieren. Um dies zu überprüfen, wurden HeLa S3-Zellen mit den einzelnen rekombinanten Plasmiden pEGFP-274 (kodierend für EGFP - siRNA-Tag SEQ ID 1), pEGFP-1248 (kodierend für EGFP - siRNA-Tag SEQ ID 2), pEGFP-2904 (kodierend für EGFP - siRNA-Tag SEQ ID 3) transfiziert und die EGFP-Expression wurde 48 Stunden nach der Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Die Co-Transfektion der DNA-Konstrukte zusammen mit der entsprechenden, gegen das jeweilige siRNA-Tag gerichteten siRNA ermöglichte deren funktionelle Charakterisierung. 48 Stunden nach der Co-Transfektion zeigten die mit den DNA-Konstrukten und der spezifischen siRNA transfizierten Zellen eine signifikante Verminderung

der EGFP-Experssion, verglichen mit den Zellen, die mit dem Plasmid allein transfiziert worden waren (siehe Figur 3 a).

Im Fall der genetischen Konstrukte, die für eine C-terminale His-Tag-Fusion kodieren, wurde die korrekte Expression des EGFP-His-Fusionsproteins mittels Western-Blot untersucht. HeLa S3-Zellen wurden mit den Plasmiden pEGFP-274-hs (kodierend für EGFP - His-Tag - siRNA-Tag SEQ ID 1), pEGFP-1248-hs (kodierend für EGFP - His-Tag - siRNA-Tag SEQ ID 2), pEGFP-2904-hs (kodierend für EGFP - His-Tag - siRNA-Tag SEQ ID 3) oder pEGFP-C1 (Ausgangsplasmid ohne Insert) transfiziert. Die Co-Transfektion der DNA-Konstrukte zusammen mit der entsprechenden, gegen das jeweilige siRNA-Tag gerichteten siRNA ermöglichte auch in diesem Falle deren funktionelle Charakterisierung. 48 Stunden nach der Co-Transfektion zeigten die mit den DNA-Konstrukten und der spezifischen siRNA transfizierten Zellen eine signifikante Verminderung der EGFP-Experssion, verglichen mit den Zellen, die mit dem Plasmid allein transfiziert worden waren (siehe Figur 3 b). In einem weiteren Versuchsteil wurden 48 Stunden nach der Transfektion die Zellen lysiert, die Proteine extrahiert und mittels Western-Blot unter Verwendung von für das His-Tag spezifischen Penta-His monoklonalen Antikörpern daraufhin untersucht, ob sie das His-Tag exprimieren. Das EGFP-His-Fusionsprotein (mit einem Molekulargewicht von etwa 28 kDa) konnte nur in Zellen nachgewiesen werden, die mit rekombinanten EGFP-Konstrukten transfiziert waren, während in nicht-transfizierten Zellen und in pEGFP-C1 transfizierten Zellen das Fusionsprotein nicht auftrat. Co-Transfektionen der einzelnen pEGFP-Konstrukte mit der gegen das jeweilige siRNA-Tag gerichteten siRNA führten jeweils zu einem effizienten „Gene-Silencing“ Effekt (siehe hierzu den in Figur 3 C gezeigten Western-Blot).

Einer der wichtigsten Vorteile des erfindungsgemäßen Systems, welches Tag-spezifische siRNA einsetzt, ist die Möglichkeit, zwei oder mehr siRNA-Tag exprimierende Konstrukte, die auf einem oder mehr Vektoren, beispielsweise Plasmide, liegen, zusammen mit den entsprechend funktionell validierten siRNAs verwenden zu können. Dieses System ermöglicht die Co-Expression mehrerer rekombinanter Gene sowie die zielgerichtete Ausschaltung jeder dieser Komponenten durch Co-Transfektion mit der entsprechenden siRNA.

Ein wichtiges Experiment, mit dem die Co-Transfektion von zwei siRNA Tag-Reporterkonstrukten zusammen mit den jeweiligen Tag-spezifischen siRNAs, die auf das

exprimierte Gen gerichtet sind, untersucht wird, ist beispielhaft in Figur 4 dargestellt. Um das „Gene Silencing“ eines oder simultan beider Plasmid-Konstrukte in parallel transfizierten Zellen zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit den Plasmiden pDsRed 274 (kodiert für DsRed - siRNA-Tag SEQ ID 1) und pEGFP 1248 (kodiert für EGFP - siRNA-Tag SEQ ID 2) cotransfiziert. In separaten Ansätzen wurden zusätzlich mit diesen beiden Plasmiden entweder eine unspezifische Kontroll-siRNA oder eine der jeweils spezifischen Tag-siRNAs (Sequenz 274, spezifisch für siRNA-Tag SEQ ID 1, bzw. Sequenz 1248, spezifisch für siRNA-Tag SEQ ID 2) transfiziert. In einem weiteren Ansatz befanden sich beide spezifischen siRNAs zusammen mit den Plasmiden im Transfektionsansatz. Durch diese Experimente konnte die Spezifität der eingesetzten siRNA für das jeweilige siRNA-Tag dargestellt werden, welche die Grundlage der differenziellen Expressionskontrolle in Experimenten darstellt. Die Co-Transfektionen wurden nach einer Inkubation von 48 Stunden mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Wie in Figur 4 gezeigt, werden die Reportergene beider Plasmid-Konstrukte trotz Co-Transfektion einer nicht funktionellen Kontroll-siRNA in einer Zelle exprimiert (Spalte A). Die mit beiden Plasmiden transfizierten HeLa-Zellen zeigen auch bei gleichzeitiger Transfektion einer Kontroll-siRNA eine parallele Expression der Fluoreszenzproteine. Bei der selektiven Inhibition der DsRed-Expression durch die siRNA mit der Sequenz 274 (spezifisch für das siRNA-Tag SEQ ID 1, siehe Tabelle 1) ist eine starke Abnahme des Fluoreszenzsignals zu erkennen; die Expression des EGFP-Proteins wird unterdessen nicht beeinträchtigt (Spalte B). Umgekehrt wird die selektive Inhibition des EGFP-Proteins durch die siRNA mit der Sequenz 1248 (spezifisch für das siRNA-Tag SEQ ID 2, siehe Tabelle 1) gezeigt, ohne dass hier das DsRed-Signal verringert wird (Spalte C). Durch Co-Transfektion beider Plasmide mit den jeweiligen spezifischen siRNAs werden letztlich beide Reportergene so stark in ihrer Expression gehemmt, dass praktisch keine Fluoreszenzsignale von den Zellen mehr ausgehen (Spalte D).

Patentansprüche

1. Zusammensetzung zur Inhibierung der Expression eines Zielgens in einer eukaryotischen Zelle mittels RNA-Interferenz, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung ein genetisches Konstrukt umfasst und das Zielgen mittels dieses Konstrukt in die eukaryotische Zelle eingebracht wird, wobei das Konstrukt ein erstes Zielgen und ein erstes siRNA-Tag aufweist.
2. Zusammensetzung zur Inhibierung der Expression eines oder mehrerer Zielgene in einer eukaryotischen Zelle mittels RNA-Interferenz, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung mindestens zwei genetische Konstrukte umfasst und die Zielgene mittels dieser Konstrukte in die eukaryotische Zelle eingebracht werden, wobei
 - a) das erste Konstrukt ein erstes Zielgen und ein erstes siRNA-Tag enthält und
 - b) das zweite Konstrukt ein zweites Zielgen und ein zweites siRNA-Tag enthält,wobei das erste und das zweite siRNA-Tag eine unterschiedliche Nukleinsäuresequenz aufweisen.
3. Zusammensetzung gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das erste Zielgen und das zweite Zielgen eine unterschiedliche Nukleinsäuresequenz aufweisen.
4. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass das erste Zielgen ein erstes Allel und das zweite Zielgen ein zweites Allel des gleichen Gens darstellen.
5. Zusammensetzung gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das erste Zielgen und das zweite Zielgen die gleiche Nukleinsäuresequenz aufweisen.
6. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Zusammensetzung ein drittes Konstrukt enthält, wobei das dritte Konstrukt ein drittes Zielgen und ein drittes siRNA-Tag aufweist, wobei sich die Sequenz des dritten siRNA-Tags von den Sequenzen des ersten und des zweiten siRNA-Tags unterscheidet.

7. Zusammensetzung gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet dass die Zusammensetzung ein viertes Konstrukt umfasst, das ein viertes Zielgen und ein viertes siRNA-Tag aufweist, wobei sich die Sequenz des vierten siRNA-Tags von den Sequenzen des ersten, zweiten und dritten siRNA-Tags unterscheidet.
8. Zusammensetzung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eines der Zielgene mit einem Markergen fusioniert ist, welches den Nachweis der Expression des durch das fusionierte Gen exprimierten Fusionsproteins ermöglicht.
9. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 2 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens zwei der Zielgene mit einem Markergen fusioniert sind, welches den Nachweis der Expression des durch das fusionierte Gen exprimierten Fusionsproteins ermöglicht.
10. Zusammensetzung gemäß Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Markergen aus der Gruppe der bekannten Markergene (Enhanced) Green Fluorescent Protein sowie Derivaten davon ((E)GFP; YFP; CFP), ferner dsRed, Myc-Tag, E-Tag, FLAG-Tag, Glu-Glu-Tag, GST-Tag, HA-Tag, His-Tag, HSV-Tag, Luciferase, MBP, Protein C-Tag, S-Tag, T7-Tag, V5-Tag, VSV-g-Tag, avidin/streptavidin/Strep-Tag, Thioredoxin, His-patch Thioredoxin, β -Galactosidase, Chloramphenicolacetyltransferase, Cellulose Binding Domains (CBD's), Chitin Binding Domain, Staphylococcal Protein A, Streptococcal Protein G, neo, hyg, pac, zeo, gpt, ble, dhfr, hpt und npt II ausgewählt ist.
11. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das erste Markergen und das zweite Markergen für Fluoreszenz erzeugende Proteine kodieren.
12. Zusammensetzung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die eukaryotische Zelle tierischen Ursprungs ist.

13. Zusammensetzung gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die eukaryotische Zelle eine Säugerzelle ist.
14. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet,
5 dass die eukaryotische Zelle pflanzlichen Ursprungs ist.
15. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die eukaryotische Zelle mykotischen Ursprungs ist.
- 10 16. Zusammensetzung gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die eukaryotische Zelle eine zur RNA-Interferenz befähigte Hefezelle ist.
17. Zusammensetzung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die eukaryotische Zelle in Form eines Lysats vorliegt.
- 15 18. Zusammensetzung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sich das mindestens eine siRNA-Tag aus einer Sequenz ableitet, die nicht Bestandteil der Sequenz des Zielgens ist.
- 20 19. Zusammensetzung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sich das siRNA-Tag von einer artifiziellen Nukleinsäure-Sequenz ableitet.
- 25 20. Zusammensetzung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sich das siRNA-Tag von einer nicht in der Zielzelle vorkommenden Nukleinsäure-Sequenz ableitet.
- 30 21. Zusammensetzung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sich das mindestens eine siRNA-Tag aus der Nukleinsäure-Sequenz von Organismen ableitet, die nicht zur RNA-Interferenz fähig sind.
22. Zusammensetzung gemäß Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass sich das mindestens eine siRNA-Tag aus einer Nukleinsäure-Sequenz eines Prokaryoten ableitet.

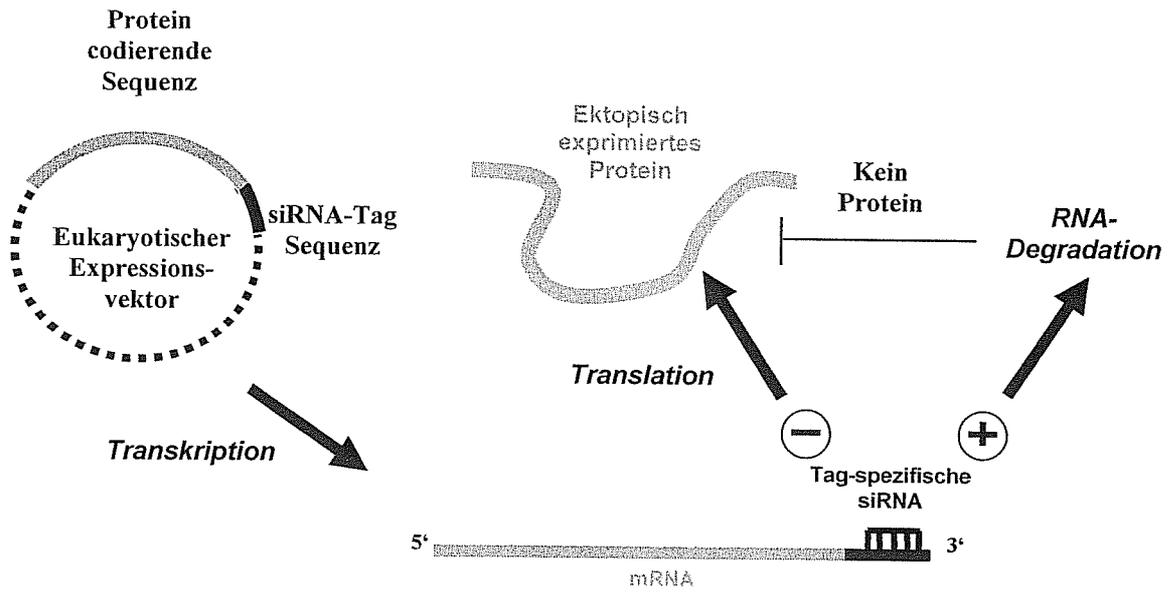
23. Zusammensetzung gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass sich das mindestens eine siRNA-Tag aus einer Nukleinsäure-Sequenz eines Archae-Bakteriums ableitet.
- 5
24. Zusammensetzung gemäß Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass das siRNA-Tag die Sequenz SEQ1 umfasst.
25. Zusammensetzung gemäß Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass das siRNA-Tag die Sequenz SEQ2 umfasst.
- 10
26. Zusammensetzung gemäß Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass das siRNA-Tag die Sequenz SEQ3 umfasst.
- 15
27. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass das siRNA-Tag Bestandteil eines Promotors, Enhancers oder Silencers ist.
28. Zusammensetzung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens eine siRNA-Tag downstream oder upstream des Zielgens liegt oder mit dem Zielgen überlappt, und dass das siRNA-Tag mit dem Zielgen eine zusammenhängende Transkriptionseinheit bildet.
- 20
29. Zusammensetzung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das siRNA-Tag in einem Intron des Zielgens liegt oder mit einem Intron überlappt.
- 25
30. Zusammensetzung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Konstrukt ein mit dem Zielgen fusioniertes Tag zur Proteinaufreinigung aufweist.
- 30
31. Zusammensetzung gemäß Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass das Protein-Tag zur Proteinaufreinigung aus der Gruppe His-Tags, HA-Tags, ERK-Tags, GFP- und verwandte Fusions-Tags, Myc-Tags, FLAG-Tags, GST-Tags, Strep-Tags, β -Gal-Tags und MBP-Tag ausgewählt ist.
- 35

32. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das mindestens eine Konstrukt auf einem Vektor liegt.
33. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 2 bis 31, dadurch gekennzeichnet,
5 dass zwei der Konstrukte auf zwei unterschiedlichen Vektoren vorliegen.
34. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 2 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens zwei der Konstrukte auf einem Vektor vorliegen.
- 10 35. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 32 bis 34, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Vektor ein Plasmid ist.
36. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 32 bis 34, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Vektor ein Transposon ist.
15
37. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 32 bis 34, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Vektor ein Virus ist.
38. Zusammensetzung gemäß Anspruch 1 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass das
20 mindestens eine Konstrukt Bestandteil eines PCR-Produktes ist.
39. Verwendung einer der Zusammensetzungen nach einem der Ansprüche 1 bis 38 zur Inhibierung der Expression mindestens eines Zielgens in einer eukaryotischen Zelle.
- 25 40. Verfahren zur Inhibierung der Expression eines Zielgens in mindestens einer eukaryotischen Zelle, dadurch gekennzeichnet, dass es folgende Schritte umfasst:
- a) Bereitstellung mindestens einer eukaryotischen Zelle, wobei die Zelle zur RNA-Interferenz befähigt ist,
30
- b) Transfektion der mindestens einen eukaryotischen Zelle mit einer Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 38, und

c) Einführen mindestens einer siRNA, die komplementär zu einem siRNA-Tag eines transfizierten Konstrukts ist.

- 5 41. Verfahren nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass die eukaryotische Zelle in Form eines Lysats vorliegt.
42. Verfahren nach Anspruch 40 oder 41, dadurch gekennzeichnet, dass die siRNA in Form einer Nukleinsäure in die Zelle eingebracht wird, die für diese siRNA kodiert, wobei die Synthese dieser siRNA unter der Kontrolle eines Promotors steht.
- 10 43. Verfahren nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, dass der Promotor unter der Kontrolle eines Effektors steht.
44. Verfahren nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, dass der Effektor transient appliziert wird, um eine zeitlich gesteuerte Synthese der siRNA zu bewirken.
- 15 45. Verfahren nach einem der Ansprüche 40 bis 44, dadurch gekennzeichnet, dass die siRNA die Sequenz 274, die Sequenz 1248 oder die Sequenz 2904 aufweist.
- 20 46. Verfahren nach einem der Ansprüche 40 bis 45, dadurch gekennzeichnet, dass durch ein zeitlich versetztes Einbringen von siRNA die Inhibierung der Zielgene gesteuert wird.
- 25 47. Verfahren nach Anspruch 46, dadurch gekennzeichnet, dass die Verwendung der Zusammensetzung zur transienten Erzeugung unterschiedlicher Expressionsmuster in einer Zelle oder mehreren Zellen verwendet wird.
48. Verfahren nach einem der Ansprüche 40 bis 47, dadurch gekennzeichnet, dass die Expression mindestens eines der Zielgene um mindestens 40% vermindert wird.
- 30 49. Verfahren nach Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, dass die Expression mindestens eines der Zielgene um mindestens 70% vermindert wird.

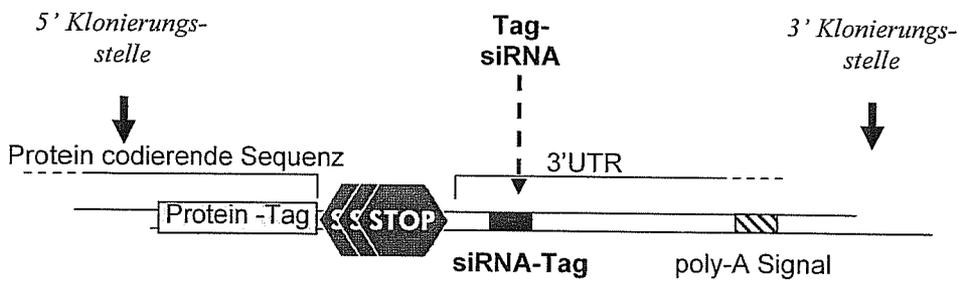
50. Verfahren nach den Anspruch 49, dadurch gekennzeichnet, dass die Expression mindestens eines der Zielgene um mindestens 90% vermindert wird.
51. Verfahren nach einem der Ansprüche 40 bis 50, dadurch gekennzeichnet, dass der
5 Grad der Inhibierung mindestens eines der Zielgene mittels der Quantifizierung des Signals eines fusionierten Markergens bestimmt wird.
52. Verfahren nach einem der Ansprüche 40 bis 51, dadurch gekennzeichnet, dass die
10 Transfektion der Zelle transient erfolgt.
53. Verfahren nach einem der Ansprüche 40 bis 52, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelle stabil transfiziert wird.



5

FIG. 1A

10



15

FIG. 1B

20



FIG. 2A



FIG. 2B

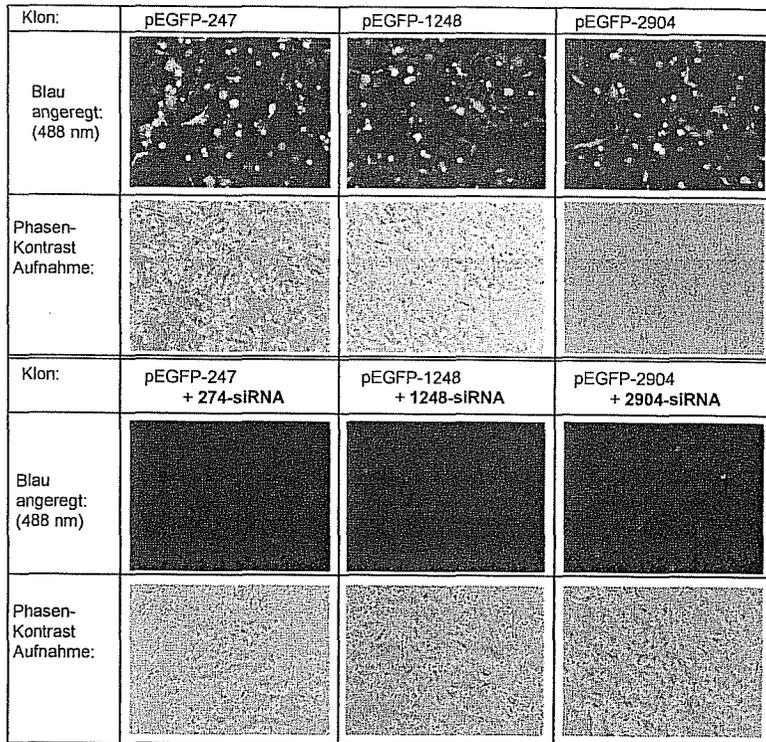


FIG. 3A

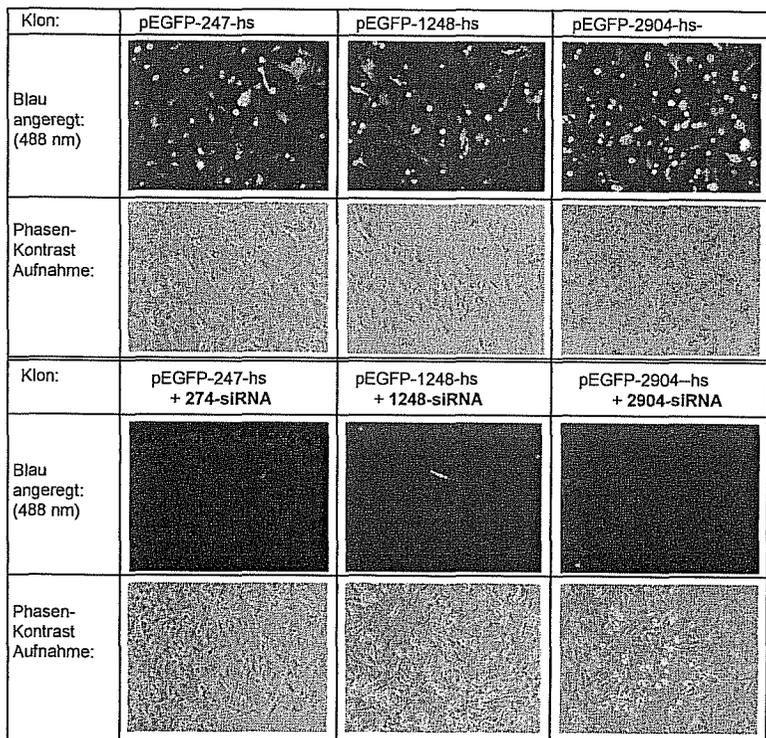


FIG. 3B

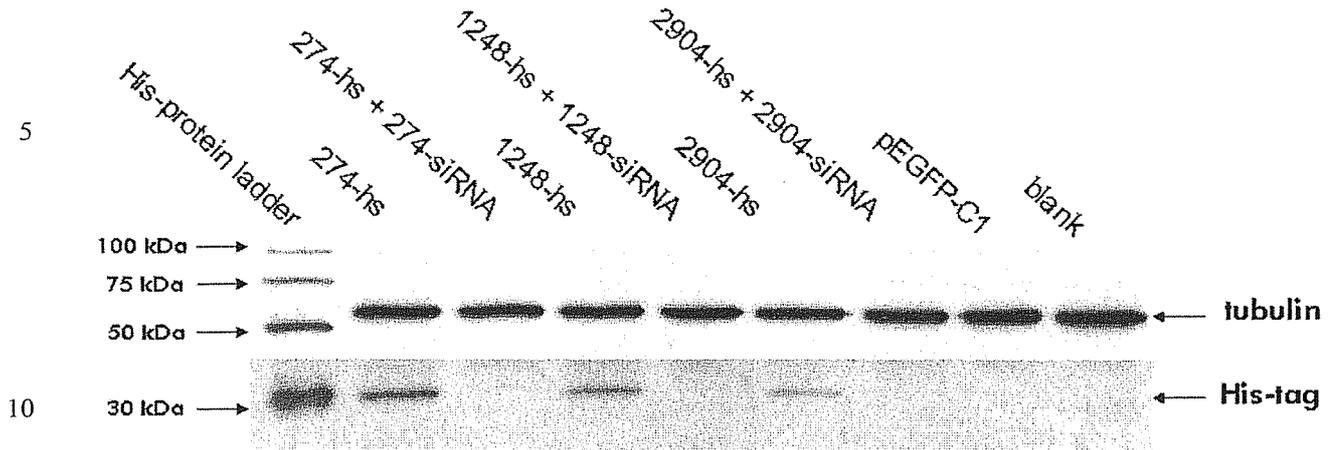


FIG. 3C

15

	Spalte A	Spalte B	Spalte C	Spalte D
	pEGFP 1248 + pDsRed 274 + Kontroll-siRNA	pEGFP 1248 + pDsRed 274 + 274-siRNA	pEGFP 1248 + pDsRed 274 + 1248-siRNA	pEGFP 1248 + pDsRed 274 + 274-siRNA + 1248 siRNA
Blau angeregt: (488 nm)				
Grün angeregt: (558 nm)				
Überlagerte Fluores- zenzen:				
Phasen- Kontrast Aufnahme:				

FIG. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/053459

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C12N15/63 C12N15/11 A61K31/713
 ADD. C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HAHN ET AL: "An siRNA-based system for differential regulation of ectopic gene expression constructs" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 128, no. 4, 6 March 2007 (2007-03-06), pages 762-769, XP005916237 ISSN: 0168-1656 the whole document	1-53
X	COLDWELL MARK J ET AL: "Specific isoforms of translation initiation factor 4GI show differences in translational activity" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 26, no. 22, November 2006 (2006-11), pages 8448-8460, XP002466436 ISSN: 0270-7306 the whole document	1,2,5, 8-13, 18-20, 30-33, 35,39, 40,42, 48-51

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 Januar 2008

Date of mailing of the international search report

11/02/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, Serge

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/053459

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2004/020631 A (OPTIGEN TECHNOLOGIES LTD [IE]; FARRAR GWENYTH JANE [IE]; HUMPHRIES PET) 11 March 2004 (2004-03-11)</p> <p>paragraph [0077] - paragraph [0090] paragraph [0119] page 69 - page 77; examples 2,3 page 90 - page 95; examples 9,10 claims</p>	<p>1-5,8, 10,12, 13,28, 32-40, 48-53</p>
A	<p>WO 2005/059132 A (NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS PHARMA GMBH [AT]; HALL JONATHAN [CH]; HUESK) 30 June 2005 (2005-06-30)</p>	
A	<p>HÜSKEN D ET AL: "mRNA fusion constructs serve in a general cell-based assay to profile oligonucleotide activity" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 31, no. 17, 1 September 2003 (2003-09-01), pages e1021-e10211, XP002322991 ISSN: 0305-1048</p>	
L	<p>DE 10 2006 016365 A1 (QIAGEN GMBH [DE]) 11 October 2007 (2007-10-11)</p>	<p>1-53</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/EP2007/053459

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004020631 A	11-03-2004	AU 2003271841 A1	19-03-2004
		CA 2496904 A1	11-03-2004
		EP 1532246 A2	25-05-2005
		US 2004234999 A1	25-11-2004
WO 2005059132 A	30-06-2005	AU 2004298527 A1	30-06-2005
		BR PI0417489 A	22-05-2007
		CA 2545675 A1	30-06-2005
		CN 1890370 A	03-01-2007
		EP 1694843 A1	30-08-2006
		JP 2007523632 T	23-08-2007
		KR 20060126499 A	07-12-2006
DE 102006016365 A1	11-10-2007	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2007/053459

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C12N15/63 C12N15/11 A61K31/713
ADD. C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12N A61K

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HAHN ET AL: "An siRNA-based system for differential regulation of ectopic gene expression constructs" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Bd. 128, Nr. 4, 6. März 2007 (2007-03-06), Seiten 762-769, XP005916237 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument	1-53
X	COLDWELL MARK J ET AL: "Specific isoforms of translation initiation factor 4GI show differences in translational activity" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Bd. 26, Nr. 22, November 2006 (2006-11), Seiten 8448-8460, XP002466436 ISSN: 0270-7306 das ganze Dokument	1,2,5, 8-13, 18-20, 30-33, 35,39, 40,42, 48-51



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *G* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
28. Januar 2008	11/02/2008
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Andres, Serge

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>WO 2004/020631 A (OPTIGEN TECHNOLOGIES LTD [IE]; FARRAR GWENYTH JANE [IE]; HUMPHRIES PET) 11. März 2004 (2004-03-11)</p> <p>Absatz [0077] - Absatz [0090] Absatz [0119] Seite 69 - Seite 77; Beispiele 2,3 Seite 90 - Seite 95; Beispiele 9,10 Ansprüche</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-5,8, 10,12, 13,28, 32-40, 48-53</p>
A	<p>WO 2005/059132 A (NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS PHARMA GMBH [AT]; HALL JONATHAN [CH]; HUESK) 30. Juni 2005 (2005-06-30)</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	
A	<p>HÜSKEN D ET AL: "mRNA fusion constructs serve in a general cell-based assay to profile oligonucleotide activity" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 31, Nr. 17, 1. September 2003 (2003-09-01), Seiten e1021-e10211, XP002322991 ISSN: 0305-1048</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	
L	<p>DE 10 2006 016365 A1 (QIAGEN GMBH [DE]) 11. Oktober 2007 (2007-10-11)</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-53</p>

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2007/053459

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2004020631 A	11-03-2004	AU 2003271841 A1 CA 2496904 A1 EP 1532246 A2 US 2004234999 A1	19-03-2004 11-03-2004 25-05-2005 25-11-2004
WO 2005059132 A	30-06-2005	AU 2004298527 A1 BR PI0417489 A CA 2545675 A1 CN 1890370 A EP 1694843 A1 JP 2007523632 T KR 20060126499 A	30-06-2005 22-05-2007 30-06-2005 03-01-2007 30-08-2006 23-08-2007 07-12-2006
DE 102006016365 A1	11-10-2007	KEINE	