

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-520002

(P2004-520002A)

(43) 公表日 平成16年7月8日(2004.7.8)

|                                   |               |                   |
|-----------------------------------|---------------|-------------------|
| (51) Int.Cl. <sup>7</sup>         | F I           | テーマコード (参考)       |
| <b>C 1 2 N 15/09</b>              | C 1 2 N 15/00 | Z N A A 4 B O 2 4 |
| <b>B O 1 D 15/08</b>              | B O 1 D 15/08 | 4 B O 6 3         |
| <b>C O 7 K 1/22</b>               | C O 7 K 1/22  | 4 D O 1 7         |
| <b>C 1 2 Q 1/68</b>               | C 1 2 Q 1/68  | A 4 H O 4 5       |
| <b>G O 1 N 33/53</b>              | G O 1 N 33/53 | D                 |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 81 頁) 最終頁に続く |               |                   |

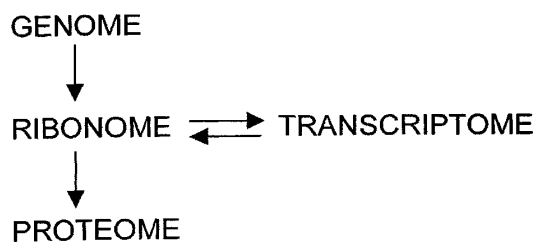
|               |                              |          |                       |
|---------------|------------------------------|----------|-----------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2001-549077 (P2001-549077) | (71) 出願人 | 502338236             |
| (86) (22) 出願日 | 平成12年12月28日 (2000.12.28)     |          | リボノミックス, インコーポレイテッド   |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成14年6月27日 (2002.6.27)       |          | アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27   |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2000/035583            |          | 709-3169, リサーチ トライア   |
| (87) 国際公開番号   | W02001/048480                |          | ングル パーク, ピー. オー. ボックス |
| (87) 国際公開日    | 平成13年7月5日 (2001.7.5)         |          | 13169                 |
| (31) 優先権主張番号  | 60/173,338                   | (74) 代理人 | 100078282             |
| (32) 優先日      | 平成11年12月28日 (1999.12.28)     |          | 弁理士 山本 秀策             |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      | (74) 代理人 | 100062409             |
|               |                              |          | 弁理士 安村 高明             |
|               |                              | (74) 代理人 | 100113413             |
|               |                              |          | 弁理士 森下 夏樹             |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 内因性のmRNAタンパク質 (mRNP) 複合体の単離および特徴付けの方法

## (57) 【要約】

細胞性mRNAタンパク質 (mRNP) 複合体は、生物学的サンプルをmRNP複合体の少なくとも1つの成分を結合する少なくとも1つのリガンドと接触させることによってインビボにおいて区別される。適切な生物学的サンプルは、少なくとも1つのmRNAタンパク質 (mRNP) 複合体を含み、そして細胞培養物、細胞抽出物、および組織全体 (腫瘍組織を含む) を含む。リガンドは、mRNP複合体に存在するRNA結合タンパク質またはRNA関連タンパク質を特異的に結合する抗体を含む。mRNP複合体は、リガンドに対して特異的な結合分子を用いてリガンドを結合することによって区別される。ここで、結合分子は、固体支持体に付着される。mRNP複合体は、固体支持体からmRNP複合体を取り外すことによって収集される。mRNP複合体を収集後、複体内で結合されたmRNAは、特徴付けられ、そして同定され得る。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

内因性の細胞性 mRNA タンパク質 (m R N P) 複合体を区別する方法であって、ここで、該方法が、以下：

内因性に生成される mRNA タンパク質 (m R N P) 複合体を有する生物学的サンプルを提供する工程；

該 m R N P 複合体を含む該生物学的サンプルを該 m R N P 複合体の少なくとも 1 つの成分を特異的に結合する少なくとも 1 つのリガンドと接触させる工程；

該リガンドに対して特異的な結合分子を用いて該リガンドを結合することによって該 m R N P 複合体を分離する工程であって、ここで該結合分子が固体支持体に付着される、工程 10

；および次いで、

該固体支持体から該 m R N P 複合体を取り外すことによって該 m R N P 複合体を収集する工程、

を包含する、方法。

## 【請求項 2】

前記生物学的サンプルが細胞培養物または細胞抽出物を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記生物学的サンプルが組織全体を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記生物学的サンプルが器官体全体を含む、請求項 1 に記載の方法。 20

## 【請求項 5】

前記生物学的サンプルが腫瘍を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記生物学的サンプルが腫瘍細胞または腫瘍細胞抽出物を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記生物学的サンプルがニューロンの集団を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記リガンドが抗体である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記リガンドが癌を有する被験体の血清を使用して単離された抗体である、請求項 1 に記載の方法。 30

## 【請求項 10】

前記リガンドが自己免疫障害を有する被験体の血清を使用して単離された抗体である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記結合分子が抗体である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記結合分子がプロテイン A、プロテイン G、およびストレプトアビジンからなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記 m R N P 複合体の成分が核酸である、請求項 1 に記載の方法。 40

## 【請求項 14】

前記 m R N P 複合体の成分が R N A である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記 m R N P 複合体の成分が m R N A である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 16】

前記 m R N P 複合体の成分が成熟 m R N A である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 17】

前記 m R N P 複合体の成分が R N A 結合タンパク質である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記m R N P複合体の成分がR N A関連タンパク質である、請求項1に記載の方法。

【請求項19】

前記R N A関連タンパク質が前記m R N P複合体と約 $10^{-6}$ ～約 $10^{-9}$ のK dで関連する、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記R N A関連タンパク質が前記m R N P複合体と約 $10^{-7}$ ～約 $10^{-9}$ のK dで関連する、請求項18に記載の方法。

【請求項21】

前記R N A関連タンパク質が前記m R N P複合体と約 $10^{-8}$ ～約 $10^{-9}$ のK dで関連する、請求項18に記載の方法。

【請求項22】

前記m R N P複合体の成分が炭水化物、脂質、およびビタミンからなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項23】

前記m R N P複合体から前記m R N Aを分離することによって該m R N P内に結合される該m R N Aを同定する工程、該m R N Aのc D N Aを得る工程、次いで該c D N Aを配列決定する工程をさらに包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項24】

前記同定する工程が、c D N Aマイクロアレイ上で実施される、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記リガンドが、H u A、H u B、H u CおよびH u Dからなる群より選択されるE L A V/H uタンパク質である、請求項1に記載の方法。

【請求項26】

前記リガンドが、前記m R N P複合体の少なくとも1つの成分に対して特異的な抗体であり、該m R N P複合体が免疫沈降によって分離される、請求項1に記載の方法。

【請求項27】

多数のリガンドが前記生物学的サンプルと接触され、多数のm R N P複合体を単離する、請求項1に記載の方法。

【請求項28】

前記m R N P複合体を前記リガンドと接触させる前に、該m R N P複合体を架橋させる工程をさらに包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項29】

前記m R N P複合体を前記リガンドと接触させた後に、該リガンドを該m R N P複合体と架橋させる工程をさらに包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項30】

m R N P複合体を結合するか、またはm R N P複合体に関連するタンパク質を単離する方法であって、ここで該方法が、以下：

目的のR N Aからc D N Aを得る工程；

タグ化D N Aが細胞において発現される場合、リガンドに対する結合パートナーをコードする該タグ化D N Aに、該c D N Aを連結する工程；

細胞において該c D N Aおよび該タグ化D N Aを発現させ、該リガンドに対する該結合パートナーを含むR N A融合分子を生成する工程；

該細胞の溶解物を該リガンドと接触させる工程であって、ここで該リガンドが固体支持体に付着され、そして該結合パートナーを結合し、それによって該R N A融合分子を該支持体に付着する、工程；

該支持体から該R N A融合分子を分離することによって該R N A融合分子を収集する工程；そして次いで、

目的の該R N Aを結合するかまたは該R N Aに関連する任意のタンパク質を分離する工程、

10

20

30

40

50

を包含する、方法。

【請求項 3 1】

目的の前記 R N A を結合しているかまたは該 R N A に関連している前記タンパク質を同定する工程をさらに包含する、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

インビボにおける細胞の遺伝子発現プロフィールを作製する方法であって、ここで該方法が以下：

請求項 1 に記載の細胞から多数の m R N P 複合体を区別する工程；

該 m R N P 複合体を単離する工程であって、ここで各 m R N P に結合される m R N A が該細胞の該 m R N A のサブセットを含む、工程；ならびに次いで、

該 m R N A の各サブセットを同定する工程であって、それによって該細胞の該遺伝子発現プロフィールが m R N A の各サブセットの存在および m R N A の各サブセットの同一性を含む、工程、

を包含する、方法。

【請求項 3 3】

細胞において遺伝子発現を調節する試験化合物の能力について該試験化合物をスクリーニングする方法であって、該方法が以下：

請求項 3 2 に記載の方法に従って細胞の第 1 の遺伝子発現プロフィールを作製する工程であって、ここで該細胞は試験化合物と接触している、工程；

請求項 3 2 に記載の方法に従って細胞の第 2 の遺伝子発現プロフィールを作製する工程であって、ここで、該細胞は該試験化合物と接触している、工程；および次いで、

該第 1 の遺伝子発現プロフィールと該第 2 の遺伝子発現プロフィールとの間の差異を、存在する場合、観察する工程であって、該第 1 の遺伝子発現プロフィールと該第 2 の遺伝子発現プロフィールとの間の差異の存在が、該試験化合物が該細胞において遺伝子発現を調節し得ること示す、工程

を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

（関連出願）

本願は、米国仮出願第 6 0 / 1 7 3 , 3 3 8 号（1 9 9 9 年 1 2 月 2 8 日出願）（これは、その全体が本明細書によって援用される）の利益を主張する。

【0 0 0 2】

（連邦政府の支援の陳述）

本発明は、国立衛生研究所からの助成金番号 R O 1 C A 7 9 9 0 7 の下での連邦政府の支援によってなされた。米国政府は、本発明に特定の権利を有する。

【0 0 0 3】

（発明の分野）

本発明は、概して、転写後調節および遺伝子発現のプロファイリング方法に関する。

【0 0 0 4】

（発明の背景）

多くの疾患が、遺伝学的に基づき、そして各個々の遺伝背景は、男性または女性の疾患に対する感受性に深い影響を有し得る。比較的新しい機能的ゲノムの分野によって、研究者らは、タンパク質をコードする遺伝子の知識に基づいてタンパク質の機能を決定する能力を得た。機能的ゲノムの主な目的は、薬物探索の適切な標的である遺伝子産物を同定することである。このような知識は、目的の標的が疾患において本質的な機能を有することが示される場合に、標的を確認するための基礎を導き得る。従って、成長および発達に関するゲノムの因果関係を理解するために細胞および組織の遺伝子発現状態のプロファイリングを可能にする方法を開発する必要性ある。

【0 0 0 5】

総細胞レベルでの包括的な遺伝子発現の理解には、転写、プレ m R N A プロセッシング、m

10

20

30

40

50

R N A代謝回転および翻訳の寄与を詳細に理解することが必要である。各細胞におけるこれら調節プロセスの総数はその特有の発現プロファイルの原因であるが、ほとんどの方法は、独立して、各プロセスをひとまとめにして評価することには利用可能ではない。

#### 【0006】

複雑な組織または腫瘍における遺伝子の発現状態は、一般的に、サンプル（例えば、全組織）からメッセンジャーRNAを抽出し、そしてcDNAライブラリー、マイクロアレイ、もしくは遺伝子発現の連続分析（SAGE）方法論を用いて発現された遺伝子进行分析することによって決定される。例えば、Dugganら（1999）Nature Genetics 21, 10-14.; Gerholdら（1999）Trends in Biochemical Sciences 24, 168-173; Brownら（1999）Nature Genetics 21, 38-41; Velculescuら（1995）Science 270, 484-487 Velculescuら（1997）Cell 88, 243-251を参照のこと。組織もしくは腫瘍内の任意の単細胞型の遺伝子発現プロファイルを決定するためか、またはこれらのメッセンジャーRNAを回収するために、組織はまず、微小に解剖されなければならない。少量の細胞物質のみが回収され、そしてこの細胞物質の純度および品質は損なわれるので、これは非常に困難である。

#### 【0007】

転写後事象は、転写事象と同じように有意にタンパク質発現の結果に影響を及ぼす。転写および転写後の調節は、一般的に関連している。転写活性化因子または転写抑制因子の発現を変えることは、細胞の発生に重要な意義を有する。従って、特定のmRNAの転写活性化に続くフィードバックループは、増殖シグナルまたは分化シグナルに応答して転写のプログラムを変更し得る。DNAアレイは、mRNAの安定状態レベル（すなわち、総mRNAまたは「トランスクリプトーム（transcriptome）」）を包括的にプロファイリングするのに非常に適している。しかし、転写後事象はmRNAの安定性および翻訳に影響を与えるので、多くの細胞タンパク質の発現レベルは、mRNAの安定状態レベルと直接相関しない（Gygiら（1999）Mol. Cell Biol. 19, 1720-1730; Fletcherら（1999）Mol. Cell Biol. 19, 7357-7368）。

#### 【0008】

多くのmRNAは、その転写後発現および局在を調節する配列を含む（Richter（1996）Translational Control, 編, J. W. B. Hersheyら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 481-504頁）。これらの調節エレメントは、プレ-mRNAのイントロンおよびエキソンの両方に存在し、同様に成熟転写物のコード領域および非コード領域の両方に存在する（JacobsonおよびPeltz（1996）Annu. Rev. Biochem. 65, 693-739; Wickensら（1997）Curr. Opin. Genet. Dev. 7, 220-232）。配列特異的調節モチーフの1つの例は、初期応答遺伝子（ERG）mRNAの3'非翻訳領域（UTR）に存在するAUリッチの不安定エレメント（ARE）であり、これらの多くは、増殖および分化に必須なタンパク質をコードする（Caputら（1986）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1670-1674; ShawおよびKamen（1986）Cell 46, 659-667; Schiavira（1992）Biochim. Biophys. Acta 1114, 95-106; ChenおよびShyu（1995）Trends Biochem. Sci. 20, 465-470）。AREを介した調節は、ほとんど理解されていないが、哺乳動物ELAV/Huタンパク質は、インビトロでARE配列エレメントに結合し、インビボで転写後mRNA安定性および翻訳に影響を与えることが示されている（Jainら（1997）Mol. Cell Biol. 17, 954-962; Levyら（1998）J. Biol. Chem. 273, 6417-6423; FanおよびSteitz（1998）EMBO J. 17, 5000-5008）。

7, 3448-3460; Pengら (1998) EMBO J. 17, 3461-3470; Keene (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 5-7)。

#### 【0009】

細胞性配列に基づくインビトロRNA選択方法が、Gaoら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11207-11211 (1994) および米国特許第5, 773, 246号、同第5, 525, 495号、および同第5, 444, 149号 (全てKeeneら) (これらの開示は、その全体が本明細書中に援用される) に報告される。一般的に、これらの方法は、メッセンジャーRNP (mRNP) 複合体中に存在する多数のmRNAを同定することが意図され、そして天然に存在するmRNAの大きなプール由来のmRNA配列のインビトロ結合および増幅を利用した。これらの研究は、細胞性mRNAの非翻訳領域に存在するAUリッチ配列エレメントに結合することが既知のタンパク質 (ELAVまたはHuタンパク質と称される) を使用した。これらの実験によって、構造的もしくは機能的に関連するmRNAが複数標的化RNA結合タンパク質 (すなわち、1つより多くの標的に特異的に結合するRNA結合タンパク質) を使用して明らかにされ得ることが、発見された。Levineら (1994) Molecular and Cellular Biology 13, 3494-3504; ならびにKingら (1993) Journal of Neuroscience 14, 1943-1952を参照し; AnticおよびKeene (1997) American Journal of Human Genetics 61, 273-278ならびにKeene (1999) Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 96, 5-7に概説される。しかし、これらの報告は、インビトロ適用に限定され、RNA結合タンパク質を用いてRNAを構造的サブセットまたは機能的サブセットに配分するためのインビボ方法は記載していない。インビトロ方法はタンパク質-RNA相互作用を決定するために使用されているが、これらの使用は特定の制限を有する。生化学方法が、注意深く制御される場合、一般的に確実であるが、RNA結合は、問題が多くあり得る。なぜなら、多くの相互作用は、低い親和性、低い特異性あるいは人為的産物の相互作用であり得るからである。RNA-タンパク質相互作用または全体的な系のレベルに対してそれらの機能的な関連を理解するために、インビボにおいてメッセンジャーRNP複合体をモニターするための信頼性のある方法を見出す必要がある。

#### 【0010】

エピトープタグ化されたELAV/Huタンパク質 (これは、前ニューロン細胞にトランスフェクトされている) の好首尾な免疫沈降が、報告されている。Anticら, Genes and Development 13, 449-461 (1999) を参照のこと。この免疫沈降には、神経フィラメントMタンパク質 (NF-M) をコードするメッセンジャーRNAの同定を可能にする核酸増幅が続く。

#### 【0011】

(発明の要旨)

本発明は、メッセンジャーRNAのクラスターまたはサブセットを通した遺伝情報の流れを利用する、遺伝子発現を決定するための新規のインビボ手段に関する。近年、複数の高分子事象を、これらの情報をコンピューター化で組織化する目標とともに、同時かつ並行に調べることは、呼称「-ome」が採られている。従って、ゲノムは、細胞の遺伝子全てを同定し、一方、トランスクリプトームは、ゲノムのメッセンジャーRNA相補体として規定され、そしてプロテオーム (proteome) は、ゲノムのタンパク質相補体として規定される (図1を参照のこと)。本発明者らは、トランスクリプトームのいくつかの物理的に組織化されたサブセットを規定し、そしてこれらを「リボノーム (ribonome)」の動的単位として規定する。本明細書中に記載されるように、リボノームは、RNA結合タンパク質 (例えば、調節RNA結合タンパク質) との関連に起因して、細胞中でクラスター化しているメッセンジャーRNA (mRNA) の多数の異なるサブセット

からなる。細胞性リボノームのmRNA成分を同定することによって、細胞性トランスクリプトームは、細胞または組織の遺伝子発現状態を規定するために一緒に使用され得る一連のサブプロファイルに破壊され得る（図2を参照のこと）。例えば、高スループット手段と組み合わせ、そしてRNAプロセッシングアレイと多重化することによって、本発明の方法は、複数の遺伝子転写物中で生じる変化を同時に決定する能力を提供する。

#### 【0012】

従って、本明細書中の1つの局面は、内因性の細胞性mRNA結合タンパク質（mRNP）複合体を区別するインビボ方法である。1つの実施形態において、この方法は、少なくとも1つ以上のmRNP複合体を含む生物学的サンプルを、このmRNP複合体の成分に特異的に結合するリガンドと接触させる工程を包含する。生物学的サンプルは、例えば、組織サンプル、全組織、全器官、細胞培養物、または細胞抽出物もしくは溶解物であり得る。mRNP複合体の成分は、RNA結合タンパク質、RNA関連タンパク質、mRNA自身を含むmRNP複合体と関連する核酸、またはmRNP複合体と関連する別の分子もしくは化合物（例えば、炭水化物、脂質、ビタミンなど）であり得る。リガンドは、例えば、この成分に特異的に結合する抗体、この成分に結合する核酸（例えば、アンチセンス分子、この成分に結合するRNA分子）、またはこの複合体の成分に結合する任意の他の化合物もしくは分子であり得る。次いで、mRNP複合体は、リガンドを（ここではmRNP複合体に結合する）、このリガンドを結合する結合分子に結合させることによって分離される。結合分子は、リガンドに直接的に結合しても（すなわち、リガンドに対して特異的な抗体であり得る）、リガンドに間接的に結合してもよい（すなわち、リガンド上のタグに対する抗体または結合パートナーであり得る）。結合分子は、当該分野で公知のように、固体支持体（例えば、ビーズまたはプレートまたはカラム）に付着される。従って、mRNP複合体は、リガンドおよび結合分子を介して固体支持体に付着される。次いで、mRNP複合体は、この複合体を固体支持体から取り外すことによって収集される（すなわち、この複合体は、適切な条件および溶媒を用いて固体支持体から洗浄して取り外される）。

10

20

#### 【0013】

次いで、mRNP複体内に結合したmRNAの同一性が、例えば、mRNAをこの複合体から分離し、このmRNAをcDNAに逆転写し、そしてこのcDNAを配列決定することによって、決定され得る。

30

#### 【0014】

従って、本発明の実施形態において、mRNP複合体は、エピトープタグの有りまたは無しで、mRNP複合体の直接的な免疫沈降によって単離され得るか、または他の生化学的な区別方法によって単離され得る。例えば、mRNP複合体に結合するかまたはmRNP複合体と関連している他のタンパク質は、mRNP複合体それに続いてこの複体内の結合したmRNAを収集するために、免疫沈降され得る。当業者は、本発明の方法の実施形態が、同時に（すなわち共に）、連続して、またはバッチ式の様式で、多数のmRNA複合体の同定を可能にすることを理解する。あるいは、この方法は、1つの生物学的サンプル（またはその一部）に対して多数回実行され得、この方法の工程は、異なるリガンドを利用する方法を各々反復することによって、連続様式で実施される。任意の記載された実施形態において、例えば、cDNAまたはゲノムマイクロアレイのグリッドが、本発明の方法によって単離されたmRNAをひとまとめに同定するために使用され得る。

40

#### 【0015】

mRNAの「サブセット」は、mRNP複合体を特異的に結合するかまたはmRNP複合体と特異的に関連する、複数のmRNA転写物またはメッセージとして規定される。言い換えると、サブセットは、特定のmRNP複体内に結合するかまたは特定のmRNP複合体に結合するその能力によって規定される。サブセットは、好ましくは、細胞の総mRNA集団の定量的画分または定性的画分である。さらに、mRNAサブセット内のサブセットは、本発明を用いて同定され得る。任意の特定の細胞または組織サンプルのmRNAサブセットの収集は、発現プロファイルであり、本明細書中において、この細胞または組

50

織に関して「リボノームプロフィール (ribonomic profile)」とも称される。発現プロフィールが、サンプル中の細胞型 (例えば、細胞が何の種または組織型であるか)、細胞の分化状態、細胞の病原性 (すなわち、この細胞が感染されているか否か、または細胞が有害な遺伝子 (例えば、癌遺伝子) を発現しているか否か、またはこの細胞が特定の遺伝子を欠くか否か)、mRNP複合体を単離するために使用される特定のリガンドなどに依存して、細胞サンプル間で異なることが理解される。従って、細胞の発現プロフィールは、細胞の同定因子として使用され得、当業者が異なる細胞のプロフィールを比較し、識別することを可能にする。

#### 【0016】

他に示されない限り、リボノームプロフィールは、細胞の全体的なmRNAプロフィールのパターン認識サブセットを提供する。細胞の増殖状態が変化する (すなわち、腫瘍化) 場合か、または細胞が病原体によって混乱された (すなわち、ウイルス感染) 場合、このプロフィールは変化し、そしてリボノームの混乱が、検出され得る。細胞が化合物 (すなわち、薬物) で処理される場合、リボノームパターンは、所望の変化または所望されない変化を示す。従って、この新規方法は、多数の因子の細胞に対する影響 (毒性、加齢、アポトーシス、病原および細胞分化を含む) を評価するための方法を提供する。

#### 【0017】

新規である本発明は、RNAを区別する以前の方法よりもいくつかの利点を有する。第1に、mRNP複合体の区別は、インビボで実行され得、一方、以前の方法は、インビトロ適用に制限されていた。この新規方法は、十分に確固としており、その結果、一旦目的のcDNAが単離されたmRNAサブセットから逆転写されると、この目的のcDNAを同定するために増幅 (例えば、PCRによるか、または代替的に、Anticra (1999) Genes Dev. 13, 449-461の方法に従う) をする必要はない。本発明は、Gaoら (前出) に示されるような反復工程の使用を必要としない。最後に、例えば、ハイブリダイゼーションが細胞の発現プロフィールを分析するために (例えば、マイクロアレイアッセイまたはRNAse保護アッセイ (RPA) において) 使用される場合、定量的な決定が本発明において可能である。

#### 【0018】

従って、特定の実施形態において、本発明は、当業者が、成熟遺伝子転写物の局在、活性、安定性、および生細胞のタンパク質成分への翻訳を決定するためにひとまとめにこの成熟遺伝子転写物を同定、モニター、および定量することを、好都合に可能にする。本明細書中に記載される方法は、内因性メッセンジャーRNA結合タンパク質を単離する方法、およびmRNP複合体中に含まれる細胞性mRNAのサブセットを同定する方法を、マイクロアレイまたは他の公知の手順を用いて提供することによって、機能的ゲノムに新規の手段を好都合に提供する。好ましい実施形態において、本発明の方法は、mRNA結合タンパク質およびmRNAサブセットを規定するための他のmRNP関連因子を用いることによって、増殖および分化のサイクルの間の機能的mRNAネットワークを研究しそしてこれらを決定する基礎を提供する。

#### 【0019】

mRNAサブセットのパターン (すなわち、発現プロフィール) は、特定の化合物 (すなわち、薬物) の存在下、または種々の疾患状態下で変更され得ることが、理解される。従って、特定の実施形態において、本発明の方法は、治療的用途がある化合物であり得る化合物をスクリーニングするため、およびこの化合物に対する適切な遺伝子標的を見出すために有用である。他の実施形態において、本発明の方法は、細胞の疾患状態を決定するのに有用であり、従って、疾患 (例えば、癌) の存在または疾患の素因を分類または診断するための手段が提供される。

#### 【0020】

遺伝子発現プロフィールはまた、複雑な組織 (例えば、腫瘍) に存在する異なる細胞型間で異なる。いくつかのmRNA結合タンパク質は、特定の腫瘍細胞においてのみ存在し、そして腫瘍は、1より多い細胞型を含み得る。腫瘍または組織内の各細胞型についての遺



伝子発現プロファイリングは、その組織の抽出物を作製し、そしてmRNP複合体の細胞特異的成分（例えば、mRNAに付着しているRNA結合タンパク質）をその抽出物から直接的に（すなわち、インビボで）免疫沈降することによって行われ得る。これらの免疫沈降したペレットは、その結合または会合した成分を含む、その同じ細胞中にのみ存在するmRNAを含む。従って、特定の実施形態において、本発明の方法は、複数の細胞型の遺伝子発現プロファイル（どの細胞型が、その同じ複雑な組織中に共存し得るか）を特徴付けそして区別するために使用され得る。これは、例えば、腫瘍細胞周辺の非腫瘍間質細胞および血液細胞におけるmRNAを分析する必要なく、これらの腫瘍細胞を腫瘍抽出物全体においてプロファイルするのを可能にし得る。このような特徴付けの結果は、例えば、処置の選択が、腫瘍に存在する組織の種類（例えば、内皮血管組織）に依存する場合の腫瘍に罹患している患者の適切な処置の過程の決定において有用であり得る。 10

#### 【0021】

別の実施形態において、本発明は、mRNP複合体と結合または会合するタンパク質を単離および必要に応じて同定するための方法を提供する。

#### 【0022】

あるいは、および別の実施形態において、本発明の方法は、細胞における遺伝子発現を調節する能力について、試験化合物をスクリーニングするために使用され得る。このような方法は、遺伝子発現における異常に関連する障害（癌を含むがこれらに限定されない）の処置および／または予防において使用され得る、推定の薬物をスクリーニングするのに有用である。 20

#### 【0023】

本発明の前述および他の局面は、以下に示す本明細書中において詳細に説明される。

#### 【0024】

（好ましい実施形態の詳細な説明）

ここで、本発明を、添付の図面（ここでは、本発明の好ましい実施形態が示される）を参照してより十分に説明する。しかし、本発明は、異なる形態において具体化され得、そして本明細書中に示される実施形態に限定されるとみなされない。むしろ、これらの実施形態は、本開示が徹底的かつ完全であり、本発明の範囲を当業者に十分伝えるように提供される。

#### 【0025】

本明細書中の本発明の説明において使用される用語は、特定の実施形態を記載することのみを目的とし、本発明を限定することを意図されない。本発明の説明および添付の特許請求の範囲において使用されるように、単数形態「a」、「an」および「the」とは、他に明らかに示されない限り、複数形態もまた同様に含むことが意図される。他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中に言及される全ての刊行物、特許出願、特許および他の文献は、それらの全体が参考として援用される。 30

#### 【0026】

他に示されなければ、標準的な方法が、本発明に従って、クローニングした遺伝子、発現カセット、ベクターならびに形質転換された細胞および植物の産生に使用され得る。このような方法は、当業者に公知である。例えば、J. Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Edition (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989); F. M. Ausubelら、Current Protocols In Molecular Biology (Green Publishing Associates, Inc. and Wiley-Interscience, New York, 1991)を参照のこと。 40

#### 【0027】

ヌクレオチドおよびアミノ酸は、37 C. F. R. § 1. 822および確立された使用方法に従って、IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature 50

Commissionによって推奨される様式で、または（アミノ酸について）三文字コードで本明細書中に示される。例えば、Patent In User Manual, 99-102 (Nov. 1990)（米国特許商標局）を参照のこと。

#### 【0028】

ヌクレオチド配列は、5'から3'の方向に（左から右へ）一本鎖のみによって本明細書中に示される。本明細書中で使用される場合「核酸配列」とは、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチド、およびそれらのフラグメントをいい、そしてゲノム起源または合成起源のDNAまたはRNA（これらは、一本鎖または二本鎖であり得、そしてセンス鎖またはアンチセンス鎖を表し得る）をいう。用語「核酸」とは、一本鎖形態または二本鎖形態にある、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドならびにそれらのポリマーをいう。特に限定されない限り、この用語は、その参照核酸と同様の結合特性を有しそして天然に存在するヌクレオチドと同様の様式で代謝される、天然のヌクレオチドの公知のアナログを含む核酸を包含する。他に示されない限り、特定の核酸配列にはまた、それらの保存的に改変された改変体（例えば、縮重コドン置換）および相補的配列が暗に包含され、そして同様に、その配列も明らかに示される。2つの核酸は、その2以上の核酸の各々由来の配列が、子孫核酸において合わせられている場合に、「組換え」られている。

10

#### 【0029】

用語「核酸」または「核酸配列」はまた、遺伝子、cDNAおよび遺伝子にコードされるmRNAに関して使用され得る。用語「遺伝子」は、生物学的機能に関連する、DNAの任意のセグメントを言及するために広く使用される。従って、遺伝子は、コード配列および／またはそれらの発現に必要とされる調節配列を含む。遺伝子はまた、発現されないDNAセグメント（例えば、他のタンパク質の認識配列を形成する）を含む。遺伝子は、種々の供給源（目的の供給源からのクローニングあるいは既知または推定の配列情報からの合成を含む）から得られ得る。

20

#### 【0030】

本明細書中で使用される場合、核酸分子は、RNA（用語「RNA」は、全てのリボ核酸（プレmRNA、mRNA、rRNA、hnRNA、snRNAおよびtRNAを含むがこれらに限定されない）を包含する）；DNA；ペプチド核酸（PNA）（例えば、Nielsenらに対する米国特許第5,539,082号、およびArlinghausらに対する米国特許第5,821,060号に記載されるような）；ならびにそれらのアナログおよび改変形態であり得る。好ましくは、核酸は、RNAであり、そしてより好ましくは、核酸分子は、メッセンジャーRNA（mRNA）である。本発明の核酸分子は、線状または環状、遺伝子全体またはそのフラグメント、全長またはフラグメント化／消化されたもの、「キメラ」（そのセンス鎖において1種より多い核酸を含む）であり得、そして一本鎖または二本鎖であり得る。任意の供給源由来の核酸が、本発明において使用され得る；つまり、本発明の核酸としては、ゲノム核酸、合成核酸、プラスミドから得られた核酸、cDNA、組換え核酸、ならびに公知の化学的方法によって改変された核酸（本明細書中にさらに記載されるような）が挙げられるが、これらに限定されない。核酸はまた、インビトロ選択実験の産物（アダマーとも呼ばれる）および他のリガンドに結合するかまたは結合される能力について有用な他の核酸分子であり得る。D. Kenan, TIBS 19, 57-64 (1994)；L. Goldら、Annu. Rev. Biochem. 64, 763-798 (1995)；S. E. OsborneおよびA. D. Ellington, Chem. Rev. 97, 349-370 (1997)を参照のこと。

30

40

#### 【0031】

本発明の核酸は、細菌、ウイルス、真菌、植物および動物を含むが、これらに限定されない、任意の生物から得られ得、ここで、動物の核酸が好ましく、哺乳動物の核酸がより好ましく、そしてヒト核酸が最も好ましい。所望の場合、核酸は、当該分野で周知の、既知の核酸増幅方法のいずれか（例えば、PCR、RT-PCR、QC-PCR、SDAなど）に従って増幅され得る。本発明の核酸は、当該分野で公知の方法に従って精製され得、

50

そして好ましくは、当該分野で公知の方法に従って精製される。

#### 【0032】

上記に要約されるように、本発明は、細胞からmRNP複合体を区分化 (p a t i t i o n i n g) するためのインビボ方法に関する。本発明のmRNP複合体は、好ましくは、生物学的サンプル (例えば、組織サンプル、組織全体、器官全体 (例えば、脳、肝臓、腎臓全体など)、体液サンプル、細胞培養物、細胞溶解物、細胞抽出物など) 由来であり得る。好ましい実施形態において、この生物学的サンプルは、細胞の集団を含むかまたは細胞の集団から得られる。本明細書中で「細胞の集団」によって、少なくとも2つの細胞を意味され、ここで、少なくとも約 $10^3$ が好ましく、少なくとも約 $10^6$ が特に好ましく、そして少なくとも約 $10^8 \sim 10^9$ がとりわけ好ましい。この集団またはサンプルは、一次または二次培養物あるいは複合組織 (例えば、腫瘍) のいずれか由来の異なる細胞型の混合物を含み得るか、あるいは単一の細胞型のみを含み得る。好ましい実施形態において、増殖している細胞が使用される。あるいは、増殖していない細胞が使用され得る。

10

#### 【0033】

本発明の使用に好ましい細胞型としては、哺乳動物細胞 (動物 (げっ歯類、ウマ、ウシ、イヌ、ネコおよび霊長類) 細胞およびヒト細胞を含む) が挙げられるが、これらに限定されず、ここで、ヒト細胞が、好ましい。非哺乳動物 (例えば、鳥類、魚類、爬虫類) 由来および植物由来の細胞もまた、本発明の実施において使用され得る。細胞は、任意の型の腫瘍 (乳房、皮膚、肺、頸部、結腸直腸および脳/CNSの腫瘍など) 由来の腫瘍細胞であり得る。さらに、任意の器官の非癌性細胞 (肝臓細胞、ニューロン、筋肉細胞などを含む) が、使用され得る。

20

#### 【0034】

mRNAとは、「メッセージ」または「転写物」として、本明細書中で交換可能に称される。mRNAの「サブセット」は、特定のmRNA結合タンパク質複合体 (mRNP複合体) 内に特異的に結合する、複数のmRNAとして定義される。従って、サブセットは、特定のmRNP内または特定のmRNPに結合する、それらの能力によって規定される。mRNAサブセットは、好ましくは、この細胞の総RNA集団のうちのわずかなものであり得る。

#### 【0035】

上記で要約されるように、本発明の1つの局面は、内因性細胞mRNA結合タンパク質 (mRNP) 複合体を区分かするインビボ方法である。「内因性」とは、このmRNP複合体が細胞中 (すなわち、インビボまたはインサイチュ) で形成することを意味するものとして、本明細書中で使用される。このmRNP複合体は、その細胞において天然に形成し得、すなわち、このmRNP複合体の成分が、その細胞中に存在し、そしてこのmRNP複合体を形成する。あるいは、この複合体の1以上の成分が、例えば、感染または形質転換によって細胞内に導入されても、このmRNP複合体は、その細胞中で形成する。例えば、このmRNP複合体の成分であるRNP結合タンパク質が、(例えば) このタンパク質をコードする核酸を保持する発現ベクターを細胞に形質転換するかまたは感染させることによってこの細胞中に異所的に発現され、そしてそのタンパク質が結合するmRNP複合体が形成される場合に、mRNP複合体は、細胞中で内因的に形成する。

30

40

#### 【0036】

1つの実施形態において、この方法は、少なくとも1つのmRNP複合体を含む生物学的サンプルに、そのmRNP複合体の成分を特異的に結合するリガンドを接触させる工程を包含する。このmRNP複合体の成分は、RNA結合タンパク質、RNA会合タンパク質、このmRNA自体を含むmRNP複合体と会合する核酸、あるいはこのmRNP複合体と会合する別の分子または化合物 (例えば、炭水化物、脂質、ビタミンなど) であり得る。成分は、約 $10^{-6} \sim 10^{-9}$ のKdでこのmRNP複合体に結合するかまたは付着する場合に、mRNP複合体と「会合する (a s s o c i a t e)」。好ましい実施形態において、この成分は、約 $10^{-7} \sim 10^{-9}$ のKdでこの複合体に会合する。より好ましい実施形態において、この成分は、約 $10^{-8} \sim 10^{-9}$ のKdでこの複合体に会

50

合する。

#### 【0037】

このリガンドは、このmRNP複合体の成分を特異的に結合する任意の分子であり得る。例えば、リガンドは、この成分を特異的に結合する抗体、この成分を結合する核酸（例えば、アンチセンス分子、この成分を結合するRNA分子）、あるいはこの複合体のこの成分を特異的に結合する任意の他の化合物または分子であり得る。特定の実施形態において、リガンドは、mRNP複合体特異的抗体またはタンパク質の産生に関連することが公知の障害を有する被験体（すなわち、ヒトまたは動物被験体）の血清を使用して、得られ得る。これらの障害の例としては、自己免疫障害（例えば、全身性エリテマトーデス（「狼瘡」またはSLE））および多くの癌が挙げられる。特定の実施形態において、リガンドは、このリガンドの分離、観察または検出を容易にするための別の化合物または分子で、「タグ化」され得る。本発明の1つの実施形態において、リガンドは、当該分野で公知のように、「エピトープタグ化」される。適切なタグは、当該分野で公知であり、そしてこれらには、ビオチン、MS2タンパク質結合部位配列、U1snRNA 70k結合部位配列、U1snRNA A結合部位配列、g10結合部位配列（Novagen, Inc., Madison, Wisconsin, USAから市販される）、およびFLAG-TAG（登録商標）（Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, USA）が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0038】

次いで、このmRNP複合体を、そのリガンドを特異的に結合する結合分子に、そのリガンド（ここでは、mRNP複合体に結合されている）を結合させることによって分離する。この結合分子は、リガンドを直接結合し得るか（すなわち、リガンドに特異的な抗体またはタンパク質であり得る）、またはリガンドに間接的に結合し得る（すなわち、リガンド上のタグに対する抗体または結合パートナーであり得る）。適切な結合分子としては、プロテインA、プロテインG、ストレプトアビジンが挙げられるが、これらに限定されない。結合分子はまた、例えば、自己免疫障害または癌に罹患している被験体の血清を使用して得られ得る。特定の実施形態において、このリガンドは、そのFab領域を介してそのmRNP複合体の成分を結合する抗体であり、そして次いで、この結合分子は、この抗体のFc領域を結合する。結合分子は、当該分野で公知のような固体支持体（例えば、ビーズ、ウェル、ピン、プレートまたはカラム）に付着されている。従って、このmRNP複合体は、リガンドおよび結合分子を介して個体支持体に付着される。

#### 【0039】

次いで、mRNP複合体を、固体支持体からmRNP複合体を取り出すことによって回収する（すなわち、適切なストリンジェンシー条件下で、当業者によって決定され得る適切な溶媒を使用して、固体支持体から複合体を洗い流す）。

#### 【0040】

本発明の特定の実施形態では、mRNP複合体にリガンドを結合させる前に、mRNP複合体を、架橋によって安定化させ得る。本明細書中で使用される場合、架橋は、共有結合（例えば、mRNP複合体の成分を共に共有結合すること）を意味する。架橋は、一般的に非共有結合であるリガンドー標的結合または結合分子ーリガンド結合とは対照的であり得る。架橋は、物理的手段（例えば、熱または紫外線照射による）、または化学的手段（例えば、複合体を、ホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒドまたは他の公知の架橋剤と接触させることによる）によって実施され得る。この手段は、当業者に公知であるかまたは当業者によって決定可能である。他の実施形態では、リガンドは、mRNP複合体を結合した後に、mRNP複合体に架橋され得る。さらなる実施形態では、結合分子は、リガンドに結合した後に、このリガンドに架橋され得る。さらに他の実施形態では、結合分子は、固体支持体に架橋され得る。

#### 【0041】

当業者は、本発明の方法が、同時に（例えば、「ひとまとめに」）複数のmRNP複合体を同定することを可能にすることを理解する。例えば、生物学的サンプルを、異なるmR

N P 複合体成分に特異的な複数のリガンドと接触させ得る。サンプル由来の複数の m R N P 複合体は、種々のリガンドを結合する。次いで、この複数の m R N P 複合体を、適切な結合分子を使用して分離し得、このようにして、この複数の m R N P 複合体を単離する。次いで、この複合体中に含まれる m R N P 複合体と m R N A とを、本明細書中に記載される方法および当該分野において公知の方法によって特徴付け得、および／または同定し得る。あるいは、この方法は、多数の時間に 1 つのサンプルに対して実施され得、本発明の工程は、連続的な様式で実施され、各反復工程で異なるリガンドを利用する。

#### 【0042】

上記に示したように、m R N A のサブセットは、このサンプル中の R N A の構造的または機能的ネットワークに特徴的なパターン認識プロファイルを同定する。任意の特定の細胞または組織のサンプルに関する m R N A サブセットの収集物は、この細胞または組織についての遺伝子発現プロファイル、そしてより詳細には、リボノミック ( r i b o n o m i c ) 遺伝子発現プロファイルを構成する。リボノミック発現プロファイルは、サンプル中の細胞型 (例えば、その細胞がどの種または組織型であるか)、細胞の分化状態、細胞の生存能力 (すなわち、細胞が感染されているか否か、または細胞が有害な遺伝子 (例えば、オンコジーン) を発現しているか否か、または細胞が特定の遺伝子を欠いているかもしくは特定の遺伝子を発現させていないか否か)、m R N P 複合体を単離するために使用された特定のリガンドなどに依存して、細胞ごとに異なり得ることが理解される。従って、細胞のリボノミック発現プロファイルは、細胞についての識別子として使用され得、当業者が、異なる細胞のプロファイルまたはサブプロファイルを比較および識別することを可能にする。各リボノミックパターンにおいて存在する R N A によって同定される遺伝子は、特定の細胞周期、分化段階、アポトーシスもしくはストレス誘導、ウイルス感染、または癌と関連付けられ得る、異なるサブセットとを形成する。

#### 【0043】

c D N A を使用して、m R N P 複合体の成分に特異的なリガンド (1 つまたは複数) で区切られた m R N P 複合体を同定し得る。例えば、c D N A マイクロアレイ格子を使用して、ひとまとめに、m R N A サブセットを同定し得る。マクロアレイは、正確に整列された格子であり、ここにおいて、各標的核酸 (例えば、遺伝子) は、注意深くスポットされた c D N A のマトリクスに位置を有する。G e r h o l d ら (前出)、D u g g a n ら (前出)、および B r o w n ら (前出) を参照のこと。あるいは、ゲノムマイクロアレイ (例えば、標的核酸がイントロンおよびエキソンを含み得るマイクロアレイ) を使用し得る。従って、マイクロアレイにおいて試験される各遺伝子または標的核酸は、位置づけられ得る正確な所在 (a d d r e s s) を有し、そしてその結合が定量され得る。ナイロンまたはニトロセルロース上におけるシリコンチップまたは c D N A ブロットに基づくものの形態のマイクロアレイは市販されている。ガラススライドもまた、相補的 R N A 配列の検出のために、オリゴヌクレオチドまたは D N A でカスタマイズされ得る。これらのすべての場合において、ハイブリダイゼーションプラットフォームは、結合および洗浄のストリンジェンシーに基づいて、サンプル中の m R N A の同定を可能にする。これは、「ハイブリダイゼーションによる配列決定」と言及されている。マイクロアレイ技術は、分析の一方法であるが、これは、m R N A サブセット中の m R N A を同定および／または配列決定するための 1 つの方法にすぎない。代替的なアプローチとしては、ディファレンシャルディスプレイ、ファージディスプレイ／分析、S A G E、または単純に、m R N A 調製物からの c D N A ライブラリーの調製およびこのライブラリーのすべてのメンバーの配列決定が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0044】

当該分野において周知でありかつ一般的に利用可能な D N A 配列決定方法を使用して、本発明の任意の実施形態を実施し得る。この方法は、D N A ポリメラーゼ I のクレノウフラグメント、S E Q U E N A S E (登録商標) (U S B i o c h e m i c a l C o r p , C l e v e l a n d , O h i o)、T a q ポリメラーゼ (P e r k i n E l m e r)、熱安定性 T 7 ポリメラーゼ (A m e r s h a m , C h i c a g o , I l l )、またはポ

リメラーゼとブルーフリーディングエキソヌクレアーゼ（例えば、Gibco/BRL (Gaithersburg, Md.) によって販売される ELONGASE Amplification System において見られるもの）との組み合わせのような酵素を使用し得る。好ましくは、このプロセスは、Hamilton Micro Lab 2200 (Hamilton, Reno, Nev.), Peltier Thermal Cycler (PTC200; MJ Research, Watertown, Mass.) および ABI Catalyst ならびに 373 および 377 DNA 配列決定装置 (Perkin Elmer) のような機器を用いて自動化される。

#### 【0045】

好ましい実施形態では、本発明に従って単離された mRNA および／またはこの mRNA から得られた cDNA の増幅は、核酸の同定の間に実施されず、そして本発明によって必要も要求もされない。しかし、当業者は、好みにより、便宜のために同定についての被験体である核酸（例えば、マイクロアレイ分析および／または配列決定を介して同定された核酸）を増幅するため、および／または特定の市販のマイクロアレイまたはマイクロアレイ分析システムの仕様書／説明書に従うために選択し得る。従って、所望される場合、核酸は、当該分野において周知である多数の公知の任意の核酸増幅方法（例えば、PCR, RT-PCR, QC-PCR, SDA など）に従って増幅され得る。

#### 【0046】

本発明の方法は、実施者および本発明を実施する目的の必要に応じて、いくつかの様式で実施され得る。例えば、1つの実施形態では、目的の細胞型に固有の mRNA-結合タンパク質複合体を同定する。このような実施形態の例では、mRNP 複合体に特異的な抗体を使用して、この複合体をその関連の mRNA で免疫沈降し得る。次いで、RNA を同定して、その細胞型のリボニック発現プロファイルを形成し得るか、あるいは（例として）薬物スクリーニングのために単離し得る。転写後調節についての mRNA 候補を、細胞周期または発達事象の間の mRNA 安定性における変化について、サブセットとしてひとまとめに分析し得る。特定の実施形態では、この方法は、発達または細胞周期の変化を受けている細胞から核を単離する工程、公知技術に従って核流出アッセイを実施して転写した mRNA を得る工程、次いで、cDNA マイクロアレイを使用して、同一細胞中の全体的な mRNA レベルと転写した mRNA とを比較する工程によって実施され得る。従って、これらの方法は、ひとまとめに、定常状態の mRNA レベルに対する転写後効果から転写効果を識別する能力を提供する。

#### 【0047】

別の実施形態では、培養物中の細胞を、RNA-結合タンパク質 (RBP) または目的の細胞型のみにおける特定の mRNA と関連付けられる RNA 関連タンパク質 (RAP) を発現させるように形質転換する。RBP または RAP をコードする DNA は、組換えベクター（例えば、プラスミド、ウイルスベクター）によって保持され得、そして公知の手段によって細胞に形質転換され得、その後、RBP または RAP は、細胞において発現される。任意の RBP または RAP が、本明細書中にさらに記載されるように、使用され得る。タンパク質は、そのネイティブな形態であり得るか、またはタンパク質は、細胞からの容易な回収のためにタグ化（例えば、エピトープタグ化）され得る。RBP または RAP と結合するかまたは関連付けられる複数の RNA 標的のインビボでの検出は、必要に応じて、アクセス可能なエピトープを使用することによって実施され得るが、好ましくは、タグを伴わずに実施される。RBP または RAP におけるエピトープが、アクセス不能または不明である場合、異所的に発現された組換えタンパク質におけるエピトープタグが使用され得る。形質転換された細胞は、他の細胞型と混合され得るか、または動物もしくはヒト被験体中に移植され得る。タンパク質に特異的なリガンド（例えば、抗体）を使用して、形質転換細胞を含む組織の抽出物から、そのタンパク質を、その関連のメッセンジャー RNA により免疫沈降し得る。次いで、mRNA 複合体およびその関連の RNA は、その細胞型の発現プロファイルを形成するために同定され得るか、さもなければ分析される（例えば、薬物開発のため）。

## 【0048】

なお別の実施形態では、動物における特定の細胞型を、1以上の細胞型特異的遺伝子プロモーターで操作して、目的の細胞型においてRBPまたはRAPを発現させる。上述のように、遺伝子プロモーターおよびRBPまたはRAPは、1以上のベクター上に保持され得、そして細胞に形質転換され得、この細胞において、RBPまたはRAPが発現される。1つの実施形態では、このタンパク質に特異的なリガンド（例えば、抗体）を使用して、目的の細胞型を含む組織の抽出物から、このタンパク質を、その付着または関連付けられたメッセンジャーRNAで免疫沈降し得る。次いで、RNAを同定して、その細胞型の発現プロファイルを形成するか、または例えば、薬物開発のために単離する。

## 【0049】

本発明の実施において有用なRNA結合タンパク質（RBP）およびRNA関連タンパク質（RAP）は当該分野において公知であるか、あるいは、本明細書中に記載の方法によって同定および発見され得る。RNA結合タンパク質は、現在では、細胞の種々の調節および発達プロセス（例えば、RNAプロセッシングおよび区画化、RNA安定化、mRNA翻訳ならびにウイルス遺伝子発現）の制御に関与していると考えられている。RNA結合タンパク質としては、ポリA結合タンパク質（「RABP」、これは、総mRNA集団とは量的に異なる総mRNA集団のサブセットを生じる）および他の一般的なRNA結合タンパク質、ならびに特定の細胞型においてわずか1つかまたは少数のメッセンジャーRNAに付着したRNA結合タンパク質が挙げられる。他の有用なタンパク質は、RNAおよびRNA結合タンパク質と反応性の自己抗体である。

## 【0050】

有用なRNA結合タンパク質の例としては、Drosophila ELAV RNA-結合タンパク質の4つのELAV/Hu哺乳動物ホモログ（Good（1995）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 4557-4561; AnticおよびKeene, 前出）が挙げられる。HuA（HuR）は、偏在的に発現されるが、HuB, HuCおよびHuD（および、それらの個々の選択的にスプライシングされたアイソフォーム）は、ニューロン組織において優勢に見出されるが、これはまたいくつかの小細胞癌腫、神経芽腫および髄芽腫において腫瘍細胞特異的抗原として発現され得る（Keene（1999）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 5-7において概説される）。すべてのHuタンパク質が、3つのRNA認識モチーフ（RRM）を含み、これはAREに対するその結合特異性を付与する（AnticおよびKeene, 前出; Kenanら（1991）Trends Biochem. Sci. 16, 214-220; BurdおよびDreyfuss（1994）Science 265, 615-621）。Huタンパク質によるARE結合の証拠は、組換えHuBによってスクリーニングされた無作為化コンビナトリアルRNAライブラリーからのAU富化結合コンセンサス配列の同定から始まった（Levineら（1993）Mol. Cell Biol. 13, 3494-3504; Gaoら（1994）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11207-11211）。これらのおよび他の研究によって、Huタンパク質が、インビトロにおいて、いくつかのARE含有ERG mRNA（c-myc, c-fos, GM-CSFおよびGAP-43を含む）に結合することが実証された（Levineら（1993）Mol. Cell Biol. 13, 3494-3504; Gaoら（1994）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11207-11211; Kingら（1994）J. Neurosci. 14, 1943-1952; Liuら（1995）Neurology 45, 544-550; Maら（1996）J. Biol. Chem. 271, 8144-8151; Abeら（1996）Nucleic Acids Res. 24, 2011-2016; Chungら（1997）J. Biol. Chem. 272, 6593-6598; FanおよびSteitz（1998）EMBO J. 17, 3448-3460; Anticら（1999）Genes Dev. 13, 449-461）。

## 【0051】

10

20

30

40

50

A R E 含有 m R N A への H u タンパク質の結合は、m R N A 転写物の安定化および翻訳可能性の増加を生じ得る (J a i n ら (1997) M o l . C e l l B i o l . 17, 954-962; L e v y ら (1998) J . B i o l . C h e m . 273, 6417-6423; F a n および S t e i t z (1998) E M B O J . 17, 3448-3460; P e n g ら (1998) E M B O J . 17, 3461-3470)。ニューロン特異的 H u タンパク質は、ニューロンの分化を誘導するためのレチノイン酸 (R A) 処理後に、奇形癌細胞において生成される最も初期のニューロンマーカーの1つである (A n t i c ら, 前出; G a o および K e e n e (1996) J . C e l l S c i . 109, 579-589)。

#### 【0052】

10

1つの実施形態では、本発明を実施するために使用されるリガンドは、プレメッセンジャーRNAプロセッシングに関与する細胞性タンパク質のRNA認識モチーフ (R R M) ファミリーから選択されるRNA結合タンパク質である。このようなタンパク質の1つの例が、U l A s n R N P タンパク質である。R R M スーパーファミリーの200を超えるメンバーが、現在までに報告されており、この大半が、偏在的に発現され、そして系統発生的に保存されている (Q u e r y ら, C e l l (1989) 57:89-101; K e n a n ら, T r e n d s B i o c h e m . S c i . (1991) 16:214-220)。大半が、ポリアデニル化mRNAまたは核内低分子リボ核酸 (例えば、U1、U2など) 転移RNA、5 S RNA または 7 S RNA に対して結合特異性を有することが公知である。これらとしては、h n R N P タンパク質 (A, B, C, D, E, F, G, H, I, K, L), R R M タンパク質 C A r G, D T-7, P T B, K1, K2, K3, H u D, H U C, r b p 9, e I F 4 B, s x l, t r a-2, A U B F, A U F, 32 K D タンパク質, A S F / S F 2, U 2 A F, S C 35, および他の h n R N P タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。R R M ファミリーの組織特異的なメンバーは、さほど共通しておらず、これには、I M P, B r u n o, A Z P-R R M I, X16 (これは、プレB細胞 (p r e-B c e l l) において発現される), B j 6 (これは、パフ特異的な D r o s o p h i l a タンパク質である) および E L A V / H u (これは、ニューロン特異的である) が挙げられる。

20

#### 【0053】

本発明の実施において有用なRNA結合タンパク質およびRNA関連タンパク質としては、自己免疫患者および癌患者の血清を使用して単離されるタンパク質が挙げられる。本発明の実施において有用なRNA結合タンパク質およびRNA関連タンパク質の非包括的なリストを、表1において以下に示す。

30

#### 【0054】

#### 【表1】



表 1  
RNA結合タンパク質およびRNA関連タンパク質

| SLBP                   | DAN         | TTP        |
|------------------------|-------------|------------|
| Hel-N1                 | Hel-N2      | eIF-4A     |
| eIF-4B                 | eIF-4G      | eIF-4E     |
| eIF-5                  | eIF-4EBP    | MNK1       |
| PABP                   | p62         | KOC        |
| p90                    | La          | Sm         |
| Ro                     | U1-70K      | AUF-1      |
| RNAse-L                | GAPDH       | GRSF       |
| Ribosomal Po,P1,P2/L32 | PM-Scl      | FMR        |
| Staufen                | Crab 95     | TIA-1      |
| Upf1                   | RNA BP1     | RNA BP2    |
| RNA BP3                | CstF-50     | NOVA-1     |
| NOVA-2                 | CPEBP       | GRBP       |
| SXL                    | SC35        | U2AF       |
| ASF/SF2                | ETR-1       | IMP-1      |
| IMP-2                  | IMP-3       | ZBP        |
| LRBP-1                 | Barb        | PTB        |
| uPAmRNA BP             | BARB1       | BARB2      |
| GIFASBP                | CYP mRNA BP | IRE-BP     |
| p50                    | RHA         | FN mRNA BP |
| AUF-1                  | GA mRNA BP  | Vigilin    |
| ERBP                   | CRD-BP      | HuA        |
| HuB                    | HuC         | HuD        |
| hnRNP A                | hnRNP B     | hnRNP C    |
| hnRNP D                | hnRNP E     | hnRNP F    |
| hnRNP G                | hnRNP H     | hnRNP K    |
| hnRNP L                | U2AF        |            |

新たな（すなわち、新規な、以前に知られていない）RNA結合タンパク質（RBP）およびRNA関連タンパク質の同定が、本発明の別の局面である。従って、本発明の1つの実施形態では、目的のRNA（「RNA Y」として図8に示される）は、新たなRBPまたはRAPを捕捉するための「餌（bait）」として使用される。好ましい実施形態では、RNA Yは、標準的な分子生物学的技術を使用して、最初にcDNAへと変換され、そして引き続き、本発明のリガンド（図8において、タンパク質「X」として図示されたリガンド）を結合する配列（例えば、RNA）をコードするDNAの別のフラグメント（本明細書中では、「タグ化DNA」と言及される）に対して3'末端または5'末端で連結される。換言すると、タグ化DNAは、リガンドの結合パートナーをコードする。有用なリガンドは、いくつかの実施形態では、mRNP複合体特異的抗体またはタンパク

質の産生に関連していることが公知の障害（自己免疫障害および癌を含む）を有している被験体（すなわち、ヒトまたは動物被験体）の血清から（すなわち、血清を使用することによって）獲得され得る。有用な結合パートナーとしては、リガンドに対する抗体が挙げられる。

#### 【0055】

得られたDNAキメラを、発現ベクター（例えば、プラスミド）中においてプロモーターに融合し、そして生細胞（例えば、細胞培養物中）において発現させて、RNA融合分子を生成する。代替的な実施形態では、発現ベクターを、ウイルス（好ましくは、組換えウイルス）によって、細胞中に感染させる。この培養物からの無細胞抽出物を調製し、そして固体支持体に固定されたリガンド（例えば、タンパク質X）と接触させる。インキュベーション期間の後、このリガンドおよび付着／会合したRNA融合分子、ならびにその関連のRBPまたはRAPを洗浄して、残留した細胞性物質を除去する。洗浄工程後、RBPまたはRAPを、RNA-タンパク質複合体から取り出し、そして分析する（例えば、微小配列決定の標準的な方法を使用して配列決定する）。

10

#### 【0056】

一旦、部分的なタンパク質配列が得られれば、対応する遺伝子は、cDNAおよびゲノム配列を含む公知のデータベースから同定され得る。好ましくは、遺伝子が単離され、タンパク質が発現され、そして抗体が、公知の技術を用いて組換えタンパク質に対して作製される。次いでこの抗体を用いて、内因性のRBPまたはRAPを回収し、そして同一性を確認する。続いて、この抗体をリボノミック（ribonomic）分析（以下の実施例を参照のこと）のために使用し、RNA Yとクラスター化している（すなわち結合している）細胞RNAのサブセットを決定し得る。さらに、RBPまたはRAPは、RNA Yによりコードされるタンパク質の翻訳を調節する能力について試験され得、そして薬物標的としてのバリデーションについて試験され得る。さらに、RNA Yとクラスター化した細胞RNAによりコードされるタンパク質は、本明細書中にさらに記載されるように、薬物標的としてのバリデーションについて試験され得る。

20

#### 【0057】

したがって、mRNP複合体と特異的に結合する抗体は、本発明の1つの局面である。mRNP複合体に対する抗体は、当該分野で周知の方法を用いて作製され得る。このような抗体として、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、単鎖、Fabフラグメント、およびFab発現ライブラリーにより生成されるフラグメントが挙げられ得るが、これらに限定されない。抗体およびこれらのフラグメントはまた、抗体ファージ発現提示技術（antibody phage expression display techniques）を用いて生成され得る。これは、当該分野において公知である。

30

#### 【0058】

抗体の生成のために、ヒツジ、ウサギ、ラット、マウス、ヒト、およびその他を含む種々の宿主が、mRNP複合体もしくは免疫原性の特性を有するこれらの任意のフラグメントまたは構成成分の注射により免疫され得る。宿主の種に基づき、種々のアジュバンドが、免疫応答を増大させるために用いられ得る。このようなアジュバンドとして、Freund's、無機質ゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、および表面活性物質（例えば、リゾレシチン、pluronicポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油、エマルジョン、キーホールリンペットヘモシニアン、およびジニトロフェノール）が挙げられるがこれらに限定されない。ヒトにおいて使用されるアジュバンドの中では、BCG（Bacilli Calmette-Guerin）およびCorynebacterium parvumが特に好ましい。

40

#### 【0059】

mRNP複合体の構成成分に対するモノクローナル抗体は、培養物中の継続的な細胞系により抗体分子の生成を提供する任意の技術を用いて調整され得る。これらとしては、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、およびEBVハイブリドーマ技術が挙げられるがこれらに限定されない（Kohler, G. ら（1975）Nature 2

50

56:495-497; Kozbor, D. ら (1985) J. Immunol. Methods 81:31-42; Cote, R. J. ら (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80:2026-2030; Cole, S. P. ら (1984) Mol. Cell. Biol. 62:109-120)。詳細には、この手順は次のようなものである：動物を、mRNP複合体もしくはこれらの免疫原性フラグメントまたは接合体を用いて免疫する。次いで、リンパ細胞（例えば、脾臓リンパ球）を、免疫された動物から獲得し、そして不死化細胞（例えば、ミエローマまたはヘテロミエローマ）と融合してハイブリッド細胞を生成する。このハイブリッド細胞をスクリーニングして、所望の抗体を産生する細胞を同定する。

#### 【0060】

10

抗体はまた、文献に開示されるように、リンパ球集団におけるインビボでの産生を誘導することによるか、もしくは免疫グロブリンライブラリーまたは高い特異性の結合剤のパネルをスクリーニングすることにより生成され得る (Orlandi, R. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 3833-3837 (1989); Winter, G. ら, (1991) Nature 349, 293-299 (1991))。

#### 【0061】

mRNP複合体に対する特異的な結合部位を含む抗体フラグメントもまた作製され得る。例えば、このようなフラグメントとして、抗体分子のペプシン消化により生成され得る F(a b')<sub>2</sub> フラグメントおよび F(a b')<sub>2</sub> フラグメントのジスルフィド架橋の還元により生成され得る Fab フラグメントが挙げられるがこれらに限定されない。あるいは、Fab発現ライブラリーが構築されて、所望の特異性を有するモノクローナル Fab フラグメントの迅速で容易な同定が可能にされ得る (Huse, W. D. ら (1989) Science 254:1275-1281)。

20

#### 【0062】

種々の免疫アッセイが、mRNPに対する所望の特異性を有する抗体を同定するためのスクリーニングに用いられ得る。確立された特異性を有するポリクローナル抗体かまたはモノクローナル抗体のいずれかを用いる競合結合アッセイまたは免疫放射線アッセイのための多くのプロトコルは、当該分野で周知である。代表的にこのような免疫アッセイは、mRNP複合体の構成成分とそれに特異的な抗体との間の複合体形成の測定に関する。2つの非干渉性のエピトープに反応するモノクローナル抗体を用いる2つの部位の、モノクローナルベースの免疫アッセイは好ましいが、競合結合アッセイもまた用いられ得る。

30

#### 【0063】

キット、もしくは種々のmRNP複合体に対する抗体またはこれらの構成成分（例えば、RNA結合タンパク質に対する抗体）がその中に固定されているカラムを含むデバイス（例えば、流体デバイス）は、本発明の別の局面である。この抗体は、公知の技術（例えば、沈降）に基づき、診断アッセイに適切な個体支持体（例えば、ラテックスまたはポリスチレンのような物質から作られたビーズ、プレート、スライド、またはウェル）に結合され得る。同様に抗体は、公知の技術に基づき、検出可能な基（例えば、放射性標識（例えば、<sup>35</sup>S、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I）、酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ）および蛍光標識（例えば、フルオレセイン）に結合され得る。好ましくは本発明のデバイスは、mRNA結合タンパク質に対する抗体とそのタンパク質自体との間の結合を検出する特異性を有する少なくとも1つの試薬を含む。この試薬はまた、補助的な試薬（例えば、緩衝試薬およびタンパク質安定化試薬（例えば、多糖類）など）を含み得る。このデバイスはさらに、必要な場合は、試験におけるバックグラウンドの干渉を減少させる試薬、制御する試薬、試験を実施するための装置などを含み得る。このデバイスは、試験を実施するための印刷された説明書をともに、単一の容器中に、代表的には多くのエレメントを含み、任意の適切な様式でパッケージされ得る。

40

#### 【0064】

本発明の特定の実施形態は、細胞または組織サンプルのリボノミックプロフィールに対する化合物の効果に基づき、治療、診断、または薬学的使用のための試験化合物をスクリー

50

ニングする方法に関する。このような実施形態の例として、細胞が試験化合物と接触しない（すなわち、この細胞は処理されない）条件下で細胞を増殖させる。次いでこの細胞型のリボノミックプロフィールが生成され、そしてmRNAサブセットが同定される。次いで未処理細胞のリボノミックプロフィールを、試験化合物で処理された同じ細胞型のリボノミックプロフィールと比較する。2つのプロフィールの間の任意の相違は、試験化合物が、細胞の特定の遺伝子の発現に対して（直接的にかまたは間接的に）効果を有することの指標であり、そして試験化合物が治療または診断使用のための候補であることの指標であり得る。あるいは、遺伝子発現をもたらす化合物の能力は、その遺伝子をさらなる試験の標的として同定し得る。プロフィールにおける「相違」とは、2つのプロフィールの間の発現における任意の改変または変化をいう。「改変」とは、発現における増加、発現における減少、存在する発現のタイプまたは種類における変化、完全な発現の停止（すなわち、発現の欠失）、または発現の誘因について言及し得る。用いられ得る適切な化合物として、タンパク質、核酸、低分子、ホルモン、抗体、ペプチド、抗原、サイトカイン、成長因子、（化学療法に関する）薬理学的薬剤、発癌性物質、または他の細胞（すなわち、細胞-細胞の接触）、が挙げられるがこれらに限定されない。細胞はまた、正常な遺伝子発現に対する環境的または生理的な因子（例えば、放射線、活動電位、など）の効果についてスクリーニングされ得る。

10

#### 【0065】

本発明の別の実施形態において、mRNP構成成分自体、その触媒性もしくは免疫原性フラグメントまたはそれらのオリゴペプチドは、種々の薬物スクリーニング技術のいずれかによって、化合物のライブラリーをスクリーニングするために用いられ得る。このようなスクリーニングに用いられるフラグメントは、溶液中で遊離しているか、個体支持体に添加されているか、細胞表面に保有されているか、または細胞内に位置し得る。mRNP複合体と試験される化合物との間の結合が測定され得る。

20

#### 【0066】

使用され得る薬物スクリーニングのための別の技術は、目的のタンパク質に対する適切な結合親和性を有する化合物の高スループットのスクリーニングを提供する。これについては、公開されたPCT出願WO 84/03564に記載される。1つの実施形態において、mRNP複合体に適用されるように、複数の異なる試験化合物が個体基質（例えば、プラスチックピンまたは他のいくつかの表面）上で合成されるか、または個体基質に添付される。この試験化合物は、mRNP複合体もしくはこれらのフラグメントおよび／または構成成分と反応し、そして洗浄される。次いで、結合したmRNP複合体またはこれらの構成成分は、当該分野で周知の方法で検出される。

30

#### 【0067】

要約すると、本発明は、細胞のリボノミックプロフィールを決定し、そして同一のものにおける変化を検出するための強力なインビボでの方法を提供する。本発明は多くの用途を有する。腫瘍の発達、成長の状態または発達の状態、生物システムの摂動（例えば、疾患）、薬物または毒素処置、および細胞加齢または死の状態のモニタリングが挙げられるが、これらに限定されない。本発明はまた、生物（例えば、植物、真菌、細菌、ウイルス、原生動物、または動物種）間のリボノミックプロフィールの識別における使用を見出す。

40

#### 【0068】

本発明は、転写および遺伝子発現に対する翻訳後の寄与とを識別し、RNP複合体を通じたRNAの動き（RNP複合体におけるRNAとタンパク質の組み合わせの相互作用を含む）を追跡するために用いられ得る。したがって、本発明は、RNAの安定性の調節を研究するために用いられ得る。本発明は、活性ポリゾームへの漸増mRNAを追跡することにより、mRNAの一連の、秩序だてられた発現を測定することにより、および複数のmRNAの同時の、協調的な発現を測定することにより、単一または複数の種でのmRNAの翻訳の活性を研究するために用いられ得る。本発明はまた、他の細胞成分と接触したときのRNA自体のトランス作用性機能を決定するために用いられ得る。これらおよび多くの他の用途は、本発明の明細書および請求の範囲の研究により、当業者に明らかにされる

50

。

#### 【0069】

次の実施例は、本発明を説明するために示されるのであって、これらの限定と解釈されるべきではない。

#### 【0070】

(実施例1)

(マルチプローブシステムにおけるRNase保護：物質および方法)

g10エピトープタグを用いるHuB (Hel-N1) の免疫沈降は、mRNAの同時免疫沈降を引き起こし、そしてこのmRNAをRT-PCRにより増殖し、そして配列決定してNF-Mタンパク質をコードすることを見出したことが以前に報告されている (Antic, 1999, 前出)。この実施例において、同じアプローチを拡張し、マルチプローブRNase保護アッセイに用いて、異なるmRNA結合タンパク質を含む種々の内因性mRNAタンパク質 (mRNP) 複合体の免疫沈降を迅速に最適化する。このマルチプローブシステムにおいて、mRNPペレット由来の多くのmRNAは、ポリアクリルアミドゲルの単一のレーンでアッセイされ得る。

#### 【0071】

(細胞培養および形質転換)

マウスP19胚癌細胞をATCCから獲得し、そしてフェノールレッド (Gibco-BRL 41061-029) を含まない、7.5%子ウシ血清、2.5%胎仔血清 (Hyclone) および100Uペニシリン/ストربتマイシンを補充した $\alpha$ -MEMを用いる単層培養で維持した。細胞を組織培養フラスコまたはプレート (0.1%ゼラチン (Sigma Chemicals) でプレコートし、使用前に除去した) で培養した。単層細胞培養物を37°C、5%CO<sub>2</sub>で維持した。

#### 【0072】

P19細胞を、SV40プロモーター駆動のpAlpha2-gene10-HuBプラスミドを用いて安定にトランスフェクトした。このプラスミドは、Hel-N2と命名された、gene10タグ付加された神経特異的HuBタンパク質を異所的に発現する (Gaoら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11207-11211)。トランスフェクトしたプラスミドを、0.2mg/ml G418 (Sigma Chemicals) を加えた培地を補充することにより維持した。これは、Hel-N1のRNA認識モチーフ (RRM) 2および3と連結するヒンジ領域から13のアミノ酸を欠損しているが、RRMは同一であり、そしてインビトロでの結合実験は、Hel-N1およびHel-N2のAUリッチのRNA結合特性における差異を示さなかった (Gaoら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11207-11211; Abeら (1996) Nucleic Acids Res. 24, 2011-2016; 公開していない結果)。

#### 【0073】

(抗体)

モノクローナル抗体-gene10 (g10) 抗体を、以前に記載されたように生成した (Gaoら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11207-11211; Anticら (1999) Genes Dev. 13, 449-461)。HuAと反応性のポリクローナル血清を、以前に記載されたように生成した (Levineら (1993) Mol. Cell. Biol. 13, 3494-3504; Atasoyら (1998) J. Cell Sci. 111, 3145-3156)。ポリA結合タンパク質 (PABP) に反応性の抗体を、親切にもMcGill University (カナダ) のDr. N. Sonenbergに提供していただいた。

#### 【0074】

(無細胞抽出物の調製)

細胞を、ラバースクレイパーを用いて組織培養プレートから回収し、そして冷PBSで洗浄した。この細胞を、およそ2ペレット容量のポリゾーム溶解緩衝液 (PLB; 100m

M KCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM HEPES (pH 7.0)、および0.5% NP-40、1 mM DTT、100 U/mL PNaase OUT (GIBCO-BRL)、0.2% バナジリリボスクレオシド複合体 (VRC) (GIBCO-BRL)、0.2 mM PMSF、1 mg/mL ペプスタチンA、5 mg/mL ペスタチン、および20 mg/mL ロイペプチン (使用時に新鮮なものを添加した) を含む) に懸濁した。次いで、溶解した細胞を凍結して、-100℃で保存した。使用時に、細胞溶解物を解凍し、そして卓上微量遠心管で12,000 rpm、4℃で10分間遠心分離した。上清を回収し、そして卓上微量遠心管で16,000 rpm、4℃で5分間、二度遠心分離してから氷上で保存するかまたは-100℃で凍結させた。このmRNP細胞溶解物は、およそ30~50 mg/mLの総タンパク質を含んでいた。

10

## 【0075】

(免疫沈降)

免疫沈降のために、プロテインAセファロースビーズ (Sigma Biochemicals) を、5% ウシ血清アルブミンを補充したNT2緩衝液 (50 mM Tris (pH 7.4)、150 mM NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub> および0.05% NP-40) 中で1.5 v/vに膨張させた。1.5 v/vの予め膨張させたプロテインAビーズのスラリーのアリコート300 μLを、免疫沈降反応ごとに用い、そして過剰な免疫沈降抗体 (代表的には5~20 μL、試薬に基づく) と4℃で一晩インキュベートした。抗体でコーティングされたプロテインAビーズを、氷冷NT2緩衝液で5回洗浄し、そして100 U/mL RNase OUT、0.2% VRC、1 mM DTT、および20 mM EDTAを補充したNT2緩衝液900 μLに再懸濁した。このビーズを穏やかにボルテックスし、そして100 μLのmRNP細胞溶解物を加えた。このビーズを直ちに遠心分離し、そして100 μLの上清を回収し、総mRNP細胞溶解物とした (本質的には、mRNP免疫沈降に用いられた溶解物の量の1/10である)。免疫沈降反応および総mRNP溶解物を表わすために回収されたアリコートを、0から2時間までの間、室温でタンブルした。インキュベーション後、プロテインAビーズを、氷冷NT2緩衝液で4回洗浄した後に、1 M 尿素を補充したNT2緩衝液で2回洗浄した。洗浄されたビーズを、0.1% SDSおよび30 μg プロテイナーゼKを補充した100 μLのNT2緩衝液に再懸濁し、そして55℃の水槽で30分間インキュベートした。プロテイナーゼK消化後、免疫沈降したRNAを、2回のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出およびエタノール沈殿で単離した。

20

30

## 【0076】

(RNase 保護アッセイ)

mRNP複合体を細胞溶解物およびRNA結合抽出物から免疫沈降した後、PharMingen Ribosquantアッセイ (San Diego, CA) を用い、製造者の説明書に従って、RNase 保護によりアッセイした (45014 K)。詳細には、抽出されたRNAを、L32、GAPDH、種々のマウスMyc関連タンパク質 (テンプレートセット45356 P) およびサイクリン (テンプレートセット45620 P) をコードするmRNAに特異的なテンプレートから生成された過剰な<sup>32</sup>P-標識リボプローブとハイブリダイズさせた。非二重鎖RNAを、RNase A+T1で処理することにより消化した。生じたフラグメントを、変性ポリアクリルアミド/尿素ゲル電気泳動により分離した。各mRNA種に対するリボプローブの長さは固有の大きさなので、サンプル中のすべての検出可能なmRNA種を単一のゲルレーンで分離し得た。保護されたリボプローブフラグメントを、24時間の露光後にホスホイメージングスクリーン (Molecular Dynamics) で可視化した。ホスホイメージを、Molecular Dynamics STORM860 Systemを用いて100ミクロンの解像度でスキャンし、Molecular Dynamics ImageQuant Software (V1.1) を用いて分析した。

40

## 【0077】

(実施例2)

50

(多重プローブ系におけるRNase保護：実験結果)

図3は、g10-HuB cDNAで安定してトランスフェクトしたマウスP19細胞の抽出物由来のHuBとポリA結合タンパク質(PABP)-mRNP複合体との免疫沈降を示す。ポリクロナルの予め出血させたウサギ血清を用いて(図3Aおよび3B、レーン3)か、またはこのアッセイで試験された多数の他のウサギ、マウス、および正常なヒト血清を用いて(データは示されていない)、免疫沈降したペレットにおいて、mRNAは検出されなかった。HuB-mRNP複合体と会合したmRNAのプロフィールは、n-myc、l-myc、b-myc、maxおよびcyclins A2、B1、C、D1、およびD2を含むが、sin3、cyclin D3、cyclin B2、L32またはGAPDH mPNAを含まない(図3Aおよび3B、レーン4)。対照的に、PABP-mRNP複合体から抽出されたmRNAのプロフィールは、総RNAのプロフィールに類似するが、濃縮したレベルのL32およびGAPDHを示し、減少したレベルのsin3 mRNAを示した(図3Aおよび3B、レーン5)。これらの細胞性RNA結合タンパク質と反応性の抗体は、mRNP複合体を免疫沈降し、そしてそれらが特異的に会合しているmRNAを回収するために使用され得ると結論付けられた。これらの結果は、細胞増殖および分化の間に転写後の遺伝子発現を調節する際のHuタンパク質の仮定の役割と一貫している(Jainら(1997) Mol. Cell. Biol. 17, 954-962; Levyら、(1998) J. Biol. Chem. 273, 6417-6423; FnaおよびSteitz(1998) EMBO J. 17, 3448-3460; Pengら、(1998) EMBO J. 17, 3461-3470; AnticおよびKeene(1997) Am. J. Hum. Genet. 61, 273-278; Levineら、(1993) Mol. Cell Biol. 13, 3494-3504; Gaoら、(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11207-11211; Kingら(1994) J. Neurosci. 14, 1943-1952; Liuら、(1995) Neurology 45, 544-550; Maら、(1996) J. Biol. Chem. 271, 8144-8151; Abeら、(1996) Nucl. Acids Res. 24, 2011-2016; Anticら、(1999) Genes Dev. 13, 449-461; Chungら、(1997) J. Biol. Chem. 272, 6593-6598; Akamatsuら、(1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 9884-9890; Sachsら、(1997) Cell 89, 831-838; Aranda-Abreuら、(1999) J. Neurosci. 19, 6907-6917)。

#### 【0078】

(実施例3)

(cDNAアレイを使用するRNA結合タンパク質と一緒に会合したmRNAサブセットの同定：材料および方法)

内因性mRNP複合体で会合したmRNAを同定するための能力をさらに拡大するために、この実施例は、増幅または反復性選択なしでmRNAサブセットを検出するための高度に特異的および感受性の方法としてのcDNAアレイフィルターの使用を記載する(図4)。

#### 【0079】

抗体。モノクロナル抗遺伝子10(g10)抗体を以前に記載されるように産生した(例えば、D. Tsaiら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 8864-8868(1992); Gaoら、(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11207-11211; Anticら、(1999) Genes Dev. 13, 449-461)。Huタンパク質と反応性のポリクロナル血清を以前に記載されるように産生した(Levineら、(1993) Mol. Cell Biol. 13, 3494-3504; Atasoyら、(1998) J. Cell Sci. 111, 3145-3156)。5'キャップ結合タンパク質(eIF-4E)に対する抗体をTransduction Laboratories(San Diego

10

20

30

40

50

、C A) から獲得した。ポリA結合タンパク質 (P A B P) と反応性の抗体は、M c G i l l U n i v e r s i t y (カナダ) のN. S o n e n b e r g 博士から親切に提供して下さった。

#### 【0080】

細胞培養物および分化。トランスジェニック細胞の調製を実施例1に記載のようであった。レチノイン酸 (R A) での化学処理を使用して、G a o およびK e e n e (1996) において記載されるように、 $0.5 \mu\text{M}$  R A (S i g m a C h e m i c a l s, S t . L o u i s, M O, U S A, N u m b e r R 2 6 2 5) とともに、60mmのペトリ皿に静置して (F i s h e r S c i e n t i f i c, P i t t s b u r g h, P A, U S A, N u m b e r 8-757-13A)、 $5 \times 10^5$  P19細胞を処理することによって、ニューロンの分化を誘導した。2日後、凝集塊を形成した細胞の25%を除去し、新しいペトリ皿に配置し、そして、新鮮な培地およびR Aで補充した。さらに2日後、細胞凝集をリン酸緩衝化生理食塩水 (P B S) で1度洗浄し、そしてトリプシン処理した。次いで、細胞を2つの100mmのゼラチンコート組織培養プレートに配置した。さらに4日後、細胞を回収した。R A処理したH u B (H e l - N 2) で安定してトランスフェクトしたP19細胞は、神経突起を成長し、そして、特徴的なニューロンマーカーおよび形態を示したが、終末分化せず、そして、有糸分裂インヒビターを有する死滅に感受性のままであった。無細胞抽出物および免疫沈降を実施例1に記載のようであった。

10

#### 【0081】

cDNAアレイ分析。cDNAアレイ分析を、ナイロン膜上に並んで2連にスポットした全597cDNAセグメントを含むA t l a s<sup>T M</sup> M o u s e A r r a y s (C l o n t e c h, I n c., P a l o A l t o, C A) を使用して行なった。cDNAアレイのプロベイングをC l o n t e c h A t l a s<sup>T M</sup> cDNA E x p r e s s i o n A r r a y s U s e r M a n u a l (P T 3 1 4 0-1) に記載されるように行なった。手短に言うと、H u Bで安定してトランスフェクトしたP19胚性癌細胞からRNAを抽出し、そして、逆転写プローブを生成するために使用した。アレイ上に示された遺伝子に相補的な、プールしたセットのプライマーを、逆転写プローブ合成のために使用し、これを、<sup>32</sup>P α-dATPで放射線標識した。放射線標識プローブをC H R O M A S P I N<sup>T M</sup>-200カラム (C l o n t e c h, I n c., P a l o A l t o, C A) を通過させることによって精製し、E x p r e s s H y b<sup>T M</sup> ハイブリダイゼーション溶液 (C h o n t e c h, I n c., P a l o A l t o, C A) を使用してアレイ膜と一晚インキュベートした。ハイブリダイゼーション後、アレイ膜を洗浄し、そして、ホスホイメージング (p h o s p h o r i m a g i n g) スクリーン (M o l e c u l a r D y n a m i c s, S u n n y v a l e, C a l i f o r n i a, U S A) 上で可視化した。

20

30

#### 【0082】

ホスホイメージをM o l e c u l a r D y n a m i c s S T O R M 860 S y s t e mを使用して100ミクロンの解像度で走査し、そして、ファイルとして保管した。イメージをA t l a s I m a g e<sup>T M</sup> 1.0および1.01ソフトウェア (C l o n t e c h, I n c. P a l o A l t o, C A) を使用して分析した。任意の所定の遺伝子についてのシグナルは、2つの2連のcDNAスポットからシグナルの平均として計算した。A t l a s I m a g e<sup>T M</sup> 1.0 ソフトウェアマニュアル (C l o n t e c h, I n c., P a l o A l t o, C A) において記載されるように、デフォルト外部バックグラウンド設定を、バックグラウンドベースのシグナル閾値と組み合わせて使用して、遺伝子シグナルの有意性を決定した。遺伝子についてのシグナルは、その調節された強度 (全シグナル-バックグラウンド) がそのときのバックグラウンドシグナルの2倍を超える場合、バックグラウンドを有意に超えると考えられた。多重cDNAアレイイメージの比較を、アレイ (全体的な正規化 (g l o b a l n o r m a l i z a t i o n)) 上のすべての遺伝子シグナルの平均を使用して行ない、アレイ間のシグナル強度を正規化した。レチノイン酸に応答するH u B m R N P複合体のmRNAプロフィールにおける変

40

50



化は、それらが4倍を超える場合（遺伝子発現変化の有意性を確立するために代表的に使用されるストリンジェンシーの2倍）、有意であると考えられる。cDNAアレイ画像およびオーバーレイをAdobe Photoshop（登録商標）5.0.2（San Jose, California, USA）を使用して調製した。

#### 【0083】

（実施例4）

（cDNAアレイを使用するRNA結合タンパク質と一緒に会合したmRNAサブセットの同定：実験結果）

結果。HuBでトランスフェクトしたP19細胞（トランスクリプトーム（transcriptome））の全体の遺伝子発現プロフィールを評価した後、HuBおよびPABP mRNA複合体、ならびにeIF-4E mRNA複合体を別々に免疫沈降し、そして、捕獲されたmRNAをcDNAアレイ上で同定した。これらのアレイの最初のアライメントをアレイ膜の底の6つのDNAスポットにハイブリダイズする放射線標識したλファージマーカールとのハイブリダイゼーション反応を加えることによって容易にした。一旦アライメントレジスタが確立されると、引き続くプロットは、配向についての与えられたλマーカールの使用を必要としない。

#### 【0084】

ウサギの予め出血させた血清での免疫沈降から作製されたアレイを、アレイの底部で観察された与えられたλマーカールを除き、基本的に盲検であった（図5A）。免疫沈降したHuB mRNA複合体およびeIF-4E mRNA複合体は各々、総細胞RNAにおいて検出される10%をわずかに超えるmRNAを含んだが、お互いにかかなり異なっていた（図5B、5C、および5E）。

#### 【0085】

HuBおよびeIF-4Eのように、PABPは、mRNA安定化および翻訳を容易にすることに関与する（Ross（1995）Microbiol. Rev. 59, 423-450；Ross（1996）Trends Genet. 12, 171-175；Wickensら、（1996）Translational control, Hershey編、J. W. B, Mthews, M. B. & Sonenberg, N. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 411-450頁；Sachsら、（1997）Cell 89, 831-838）。驚くことではないが、PABP mRNA複合体は、HuBまたはeIF-4E mRNA複合体について観察されるよりも多数のmRNAを含んでいた（図5D）。予想されるように、これらの細胞由来のPABP mRNA複合体中のmRNAのプロフィールは、トランスクリプトームのプロフィールと密接に類似していた。しかし、HuBおよびeIF-4E mRNA複合体において観察されるように、いくつかのmRNAは、総RNAと比較してPABP-mRNA複合体において濃縮または枯渇されている（図5Dおよび5E）。これらのmRNA複合体において検出されるmRNAのプロフィールおよび相対量は、高度に再現可能であるが、ホスホイメージ上で検出可能なmRNA種の絶対数は、プローブの特定の活性における差異の結果として時折変化する。

#### 【0086】

総RNAを使用することによって由来するcDNAアレイは、mRNA免疫沈降について使用される溶解物の量の10分の1を使用して作製されるので、総RNAにおいて観察されるmRNA複合体において検出された各mRNAの絶対量の比較は行なわれない。より正確な結果が、各マイクロアレイ内のお互いに対して各mRNA種の相対量を比較することによって獲得された。例えば、β-アクチンおよびリボソーマルタンパク質S29（図5、それぞれ、矢印aおよびb）をコードするmRNAの相対量は総細胞性RNAにおよそ等しいが、mRNA複合体の各々の間で劇的に変化する。この特徴の多数の他の例は、図4において容易に明らかである。これらの発見は、HuB、eIF-4E、およびPABP mRNA複合体において検出されるmRNAプロフィールが、お互いに別個でありトランスクリプトームのそれとは、離れていることを示す。

10

20

30

40

50

## 【0087】

(実施例5)

(レチノイン酸 (RA) に応答するmRNP複合体における変更)

HuBは主に、ニューロンの分化を調節する際に役割を果たすと考えられているニューロタンパク質であり、HuB-mRNP複合体において検出されるmRNA集団がRA (ニューロンの分化のインデューサー) に応答して変化するか否かを調査するために研究が行なわれた。HuBでトランスフェクトしたP19細胞をRAで処理し、ニューロン分化の開始を誘導し、HuB-mRNP複合体を免疫沈降し、次いで、会合したmRNAをcDNAアレイ上に同定した。RA処理の前および後にHuB-mRNPから抽出されたmRNAプロファイルの比較は、18のmRNAが、RA処理されたHuB-mRNPにおいて排他的に存在するか、または非常に濃縮されている(4倍以上)かのいずれかである10  
 であることを明らかにする(図6A、6B、および6C、赤い棒)。さらに、3つのmRNA (Tリンパ球活性化タンパク質、DNA結合タンパク質SATB1、およびHSP84) は、RA処理に応答して、4倍量以上減少する(図6C、青い棒)。HuB-mRNP複体のmRNAプロファイルにおいて観察される変化が独特であるか否かを決定するために、遍在的に発現されたELAVファミリーメンバーHuA (HuR) を、これらの処理細胞から免疫沈降させた。RAでの処理後にHuA-mRNPプロファイルに対する少数の変化が存在するが、それらは、HuBと比較して大して重要でない。

## 【0088】

RA処理に応答するHuB-会合mRNAプロファイルにおける変化は、単に総細胞性mRNAにおける変化を反映するのではない(図6G、6H、および6I)。HuB-mRNP複合体において検出された差次的に濃縮されたかまたは枯渇したmRNAの多数のサンプルが、図6Cおよび6Iを比較して明らかである。比較の目的のために、これは、代表的なスポットの再アライメントおよび拡大によって、図7において記載される。例えば、IGF-2 mRNAは、RA処理細胞由来の総RNAおよびHuB-mRNP複体のみで検出可能である(図7)。しかし、他のHuB-mRNP結合mRNA (例えば、インテグリンβ、サイクリンD2、およびHsp84) は、RA処理後、総RNAプロファイルにおけるそれらの変化に不釣り合いな量で、増加するかまたは減少する(図7)。総RNAおよびHuB-mRNPのmRNAプロファイルにおける変化間の不同性は、RA処理に応答するmRNP複合体を通して動的に流動するmRNAの区画化における変化から30  
 おそらく生じる。これらのmRNP複合体に由来するmRNAプロファイルが、動的であり、そして成長の状態、ならびに、レチノイン酸のような生物学的インデューサーに応答する細胞性環境における変化を反映し得る。

## 【0089】

(実施例6)

(RNA-結合タンパク質についての優先度インビボ標的配列優先度)

GenBankおよびESTデータベースを使用して、RA処理したHuB-mRNP複合体において濃縮されたmRNAから、3'UTR配列を同定した(表2)。

## 【0090】

(表2)

## 【0091】

(表2)

| 遺伝子            | 3'-UTR コンセンサス配列                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CD44           | UUUUCU <u>UUCCUUUUUUUUUU</u> UAUGUCAUUUUUUUA                                                                                                                                                                                                                                                     |
| IGF-2          | UAAAAACCAAA <u>UUUGAUU</u> GGCUCUAAACA<br>UAAAGAA <u>UUUAAUU</u> GGCUAAAAACAUA<br>CUAAAA <u>UUUAAUU</u> GGCUUAAAAA                                                                                                                                                                               |
| HOX 2.5        | UCACUCUU <u>UUUUUUU</u> AU<br>AAAU <u>UUUAAUA</u> AGUUA<br>AUCAGG <u>UUCAUUU</u> UGGUUGU                                                                                                                                                                                                         |
| インビトロ<br>J6    | AU <u>UUUAAUCU</u> GUUA<br>UUUUUGUUUUUCUCCCUUUUUUUAGUUUU UUUCAAA                                                                                                                                                                                                                                 |
| GADD45         | UAUUUUUUUUUCUUUUUUUUUUUUUGGU CUUUAU<br>UUAAAAUCUCAGAAGU <u>UUUAAUA</u> UAAAUUUU                                                                                                                                                                                                                  |
| ネキシン 1         | UUUCUGUAAAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU<br>AUUUUUAUAGUAGUU <u>UUUAAUGU</u> UUUUUAUGGAAAA<br>AUUUGCCUU <u>UUUAAUU</u> CUUUUU                                                                                                                                                                              |
| Egr-1          | UAUUUUUGUGGUUUUUUUUUU UACUUUGUACUU                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Zif 268        | UUUUUGUUUU UCCUU<br>UUU <u>UUUAAUUU</u> UCUGUAAUUUUUU                                                                                                                                                                                                                                            |
| ニューロン<br>カドヘリン | UUUUUUUUUAAAUUUUU <u>UUUAAUUU</u> UCUUUUU<br>UUUUUUUAUUUUCUGU <u>AAUUU</u> UUU<br>UUUUUAAUUUUUUUAAUU UUUUUU                                                                                                                                                                                      |
| インテグリン<br>α5   | AAUGG <u>UUUAAUA</u> UUAUGAU<br>UUGUUUAAUAU CUUCAAU                                                                                                                                                                                                                                              |
| SEF2           | UUCAAGCGCUUGANUU                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Cfzr           | UGCAUCGAUCCGUUGAUUUU ACUACU                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| インテグリン<br>β3   | UAUAAUUUU <u>UUAAUUU</u> UUUAAUUUUUU<br>UAUUUUUACCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU CCUGGU                                                                                                                                                                                                              |
| CTCF           | UUUAUGAAUGU <u>UUUAAUUU</u> GU<br>UCUUAAUUUU UUUCUUUUUUUUUUUUUUU                                                                                                                                                                                                                                 |
| TGF β 2        | UUUUUUUUUUCCUUUUAAUUU GUAAAUUGGUUUUUU<br>UUAAUGAUCAUUCAGAUUGUA <u>UUUAAUUU</u> GUUUCCUUU<br>UUCAAUUUUUU <u>UUUAAUA</u> ACUAUCUU<br>UUUUUUC-- <u>UUUAAUUU</u> GGUUUUUUUUMTP--<br>UGUCUUGUTCUGAGCA <u>UUUAAUUU</u> UCAAA<br>UUUCUGCUUG <u>UUUAAUUU</u> UACAA<br>UAUAAUAAUAGUUUAAUGU UUUGGAUGUUUGGU |
| サイクリン D2       | AUGUCUUGUUCUUUGUGUUUU UUAGGAU<br>(AU/GA) <u>UUUAAUUU</u> (UA/AG)                                                                                                                                                                                                                                 |
| インビトロコンセンサス配列  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

10

20

30

40

50

その 3' UTR 配列が利用可能な mRNA の多数は、インビトロで Hu タンパク質に結合することが以前に見出されているような同様のウリジレートリッチ (uridy late-rich) モチーフを含む (Levine ら、(1993) Mol. Cell Biol. 13, 3494-3504; Gao ら、(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11207-11211; King ら、(1994) J. Neurosci. 14, 1943-1952; Liu ら、(1995) Neurology 45, 544-550; Ma ら、(1997) Nucleic Acids Res. 25, 3564-3569; Fan ら、(1997) Genes Dev. 11, 2557-2568)。さらに、これらの mRNA の大部分は、ニューロン組織において発現されるか、または RA で誘導したニューロン分化後に上方制御されることが公知である (Beck ら、(1995) Neuron 14, 717-730; Colon and Rossant (1992) Development 116, 357-368; Graham ら、(1991) Development 112, 255-264; Hirsch ら、(1994) Dev. Dyn. 201, 108-120; Hunt ら、(1991) Development 112, 43-50; Janssen-Timmen ら、(1989) Gene 80, 325-336; Kondo ら、(1992) Nucleic

Acids Res. 20, 5729-5735; Konishiら、(1994) Brain Res. 649, 53-61; Neumanら、(1993) Eur. J. Neurosci. 5, 311-318; Okudaら、(1995) Genomics 29, 623-630; Soosaarら、(1994) Brain Res. Mol. Brain Res. 25, 176-180; Takechiら、(1992) Eur. J. Biochem. 206, 323-329; Telfordら、(1990) Mol. Reprod. Dev. 27, 81-92; Zwartkruisら、(1993) Exp. Cell Res. 205, 422-425; Tomaselliら、(1988) Neuron 1, 33-43; Redies (1995) Exp. Cell Res. 220, 243-256; Rossら (1996) J. Neurosci. 16, 210-219)。表3に示される配列アライメントは、HuBについてのコンセンサスRNA結合配列を誘導するためにインビトロ選択を使用するLevineら、((1993) Mol. Cell Biol. 13, 2494-3504) およびGaoら、((1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11207-11211)の以前の結果と一致している。本明細書中に記載の方法を使用して、他のRNA結合配列についてのインビボ標的配列優先度を区別することが可能である。

#### 【0092】

##### (実施例7)

(cDNAアレイ分析を使用する、内因性mRNP複合体を精製するためのそして一緒に会合したmRNAを同定するためのmRNA結合タンパク質の使用)

ハイスループット方法を使用してHubタンパク質のmRNA標的を同定するための初期の試みは、RT-PCR増幅およびインビトロ反復性選択およびニューロン組織由来の同定されたいくつかの構造的に関連したERG mRNAを必要とする(Gaoら、(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11207-11211; AndrewsおよびKeene (1999) Methods Mol. Biol. 118, 233-244)。これらのmRNAの大部分は、それらの3' UTRにARE様配列を含み、これは、ERG mRNAに特徴的である(Keene (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 5-7; Levineら、(1993) Mol. Cell Biol. 13, 3494-3504; Gaoら、(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11207-11211; Kingら、(1994) J. Neurosci. 14, 1943-1952)。Huタンパク質は、ERG mRNAを結合し得、そして、それらの安定性および／または翻訳活性化に影響し得ることが実証されている(Jainら、(1997) Mol. Cell Biol. 17, 854-962; Levyら、(1998) J. Biol. Chem. 273, 6417-6423; FanおよびSteitz (1998) EMBO J. 17, 3448-3460; Pengら、(1998) EMBO J. 17, 3461-3470; Keene (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 5-7; Levineら、(1993) Mol. Cell Biol. 13, 3494-3504; Gaoら、(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11207-11211; Kingら、(1994) J. Neurosci. 14, 1943-1952; Liuら、(1995) Neurology 45, 544-550; Hungら、(1997) J. Biol. Chem. 272, 6593-6598; Anticら、(1999) Genes Dev. 13, 449-461; Maら、(1997) Nucleic Acids Res. 25, 3564-3569; Aranda-Abreuら、(1999) J. Neurosci. 19, 6907-6917)。Gaoら((1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11207-11211)のインビトロアプローチは、ERG配列特徴を有するヒト脳および髄芽腫から別個のmRNAサブセットを生じた。このより直接的なインビボアプローチは、インビトロ結合およびPCR増幅についての必要性を取り除く。さらに、この新しいアプローチは、連鎖した構造的および機能的性質を有するmRNA転写の同定を可能とするが、そ

これらの多数は、インビトロ技術を使用して検出されない（そして検出され得ない）。さらに、認識可能なHuBタンパク質-RNA結合配列は、インビボで捕獲されたmRNAサブセット内に同定される（表2）。

#### 【0093】

前述の実施例は、本発明を例示するものであって、それを制限するものとして解釈されるべきではない。本発明は、上記の特許請求の範囲によって記載され、特許請求の範囲の等価物は、そこに含まれるべきである。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

図1は、ゲノムからプロテオームへの遺伝情報の流れ、ならびにリボノームおよびトランスクリプトームによって表される中間体レベルの略図である。トランスクリプトームは、ゲノムの総mRNA相補体を表すが、必ずしもタンパク質産生に直接的に相関しない。mRNAのプロセッシング、輸送および翻訳は、リボノームで起こり、ここでは、動的な調節工程が、そのプロテオームの結果を決定する。

##### 【図2】

図2は、mRNP複合体内にて結合されリボノームの一部を形成するmRNAとの、総細胞mRNA（トランスクリプトーム）の比較を図示する。トランスクリプトームに対して比較する場合、mRNP複合体を表すマイクロアレイは、別個でかつより限定されたmRNAのサブセットを含む。

##### 【図3】

図3Aおよび3Bは、mRNP複合体に会合するmRNAの、マルチプローブRNAse保護分析を示す。細胞溶解物由来のメッセンジャーRNP複合体を免疫沈降し、そしてそのペレット化されたRNAを抽出し、そしてRNAse保護によって定量する。図3Aおよび3Bは、それぞれ、mMy cおよびmCy c-1のマルチプローブテンプレートセットの例を示す。レーン：（1）未消化リボプローブ（リボプローブプラスミドテンプレートに起因するRNAse消化された産物よりもわずかに大きい）；（2）総細胞RNA；（3）ウサギ採血前血清コントロール；（4）HuB mRNPから抽出したmRNA；（5）PABP mRNPから抽出したmRNA。アスタリスク（\*）は、総RNA中に検出されなかった種のmRNAを示す。

##### 【図4】

図4は、DNAアレイを使用するRNAサブセットのリボノームプロファイリングを示す。RNA-タンパク質複合体は、2つの個体、種、細胞型、処置、発生段階などの細胞由来であり得る。mRNA-タンパク質複合体を分離し、複合体の免疫沈降を行い、プローブを、RNAテンプレートから逆転写し、そして遺伝子のDNAアレイを、RNP由来のプローブの各プールでプローブして、遺伝子発現のサブプロファイル（10）を作成する。次いで、サブプロファイルを、差し引きまたは相加によって比較して、遺伝子発現の全体画像（20）を作成する。この図は、マイクロアレイを使用して、異なるmRNPを分離し、そしてそれらに会合するmRNAを同定する、リボノームの概念を示す。総細胞プロファイルのサブプロファイル（mRNP1、mRNP2、...、mRNPn）は、相加物として示される。スタックされたmRNPサブプロファイルは、各々、単一の細胞型内の個々のmRNPを表し得るか、または各々、複雑な組織内または腫瘍内の個々の細胞のトランスクリプトームを表し得る。

##### 【図5】

図5は、例示的な実施例4（前出）の結果を示し、そしてcDNAアレイを使用して、mRNP複合体に会合するmRNAを示す。パネル：（A）採血前；（B）HuB mRNP複合体；（C）e1F-4E mRNP複合体；（D）PABP mRNP複合体；（E）総細胞RNA。この手順の特異性の例は、これらのmRNPプロファイル間のβ-アクトニンおよびリボソームタンパク質S29をコードするmRNA（それぞれ、矢印aおよびb）の差次的な量によって示される。このような特異性の他の例は、他のmRNAで容易に観察可能である（データは示さず）。

10

20

30

40

50

## 【図 6】

図 6 は、例示的な実施例 5（前出）の結果を示し、そしてレチノイン酸（RA）での処置前後の Hu B mRNP 由来の mRNA プロフィールの比較を示す。パネル：（A）未処理細胞から免疫沈降した Hu B mRNP から抽出した mRNA；（B）RA 処理した細胞から免疫沈降した Hu B mRNP から抽出した mRNA；（C）パネル A および B のコンピューターによる比較；（D）未処理細胞から免疫沈降した Hu A（Hu R）mRNP から抽出した mRNA；（E）RA 処理した細胞から免疫沈降した Hu A mRNP から抽出した mRNA；（F）パネル D および E のコンピューターによる比較；（G）未処理の細胞溶解物から抽出した mRNA の総相補体；（H）RA 処理した細胞溶解物から抽出した mRNA の総相補体；および（I）パネル G および H のコンピューターによる比較。パネル C、F および I について：緑色のバーは、ほぼ等しい量の mRNA を示す；赤色のバーは、RA 処理後に 4 倍以上で検出可能であった Hu B mRNP からの mRNA を表す；青色のバーは、RA 処理前に 4 倍以上で検出可能であった Hu B mRNP からの mRNA を表す。

10

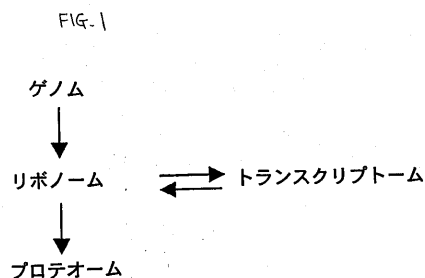
## 【図 7】

図 7 は、リボノームプロファイリングの図である。

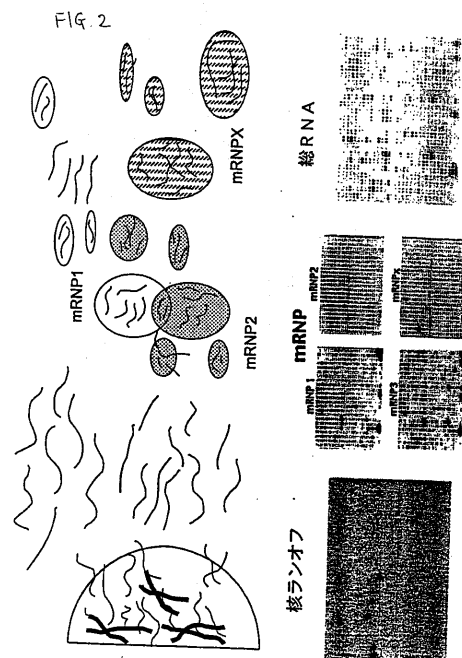
## 【図 8】

図 8 は、新規の RNA 結合タンパク質の同定のためのストラテジーを概略する図である。

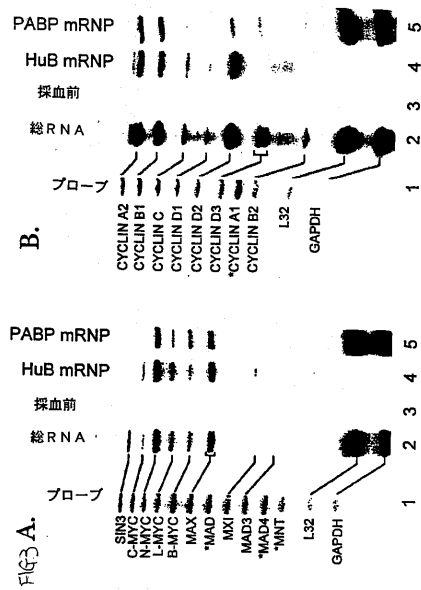
## 【図 1】



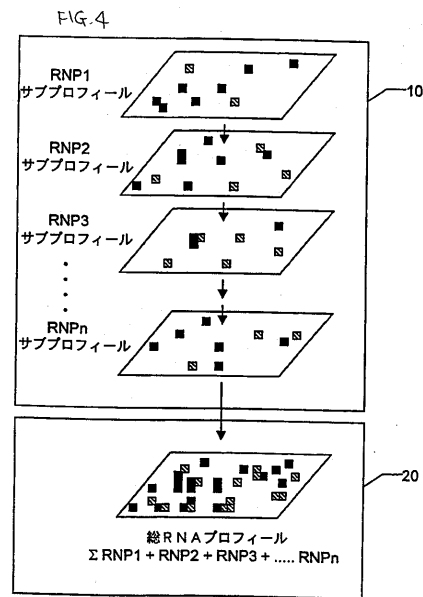
## 【図 2】



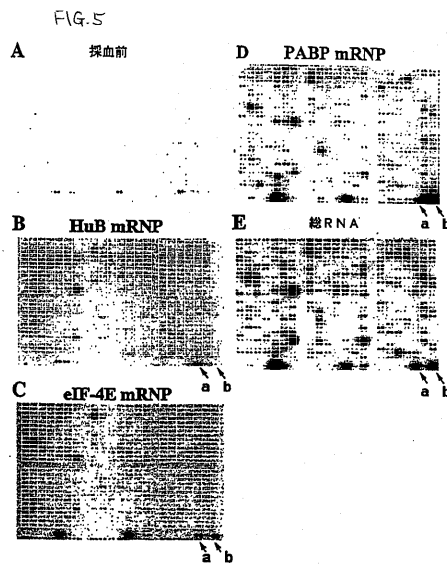
【 図 3 】



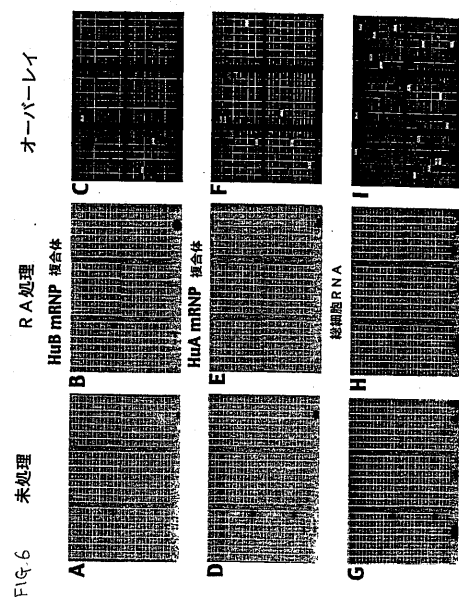
【図 4】



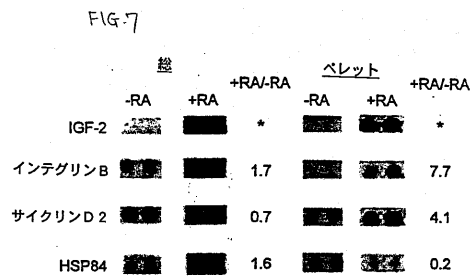
【図 5】



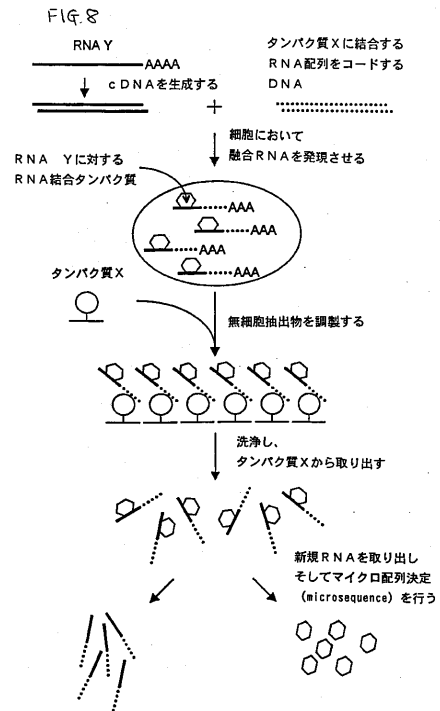
【図 6】



【図 7】



【図 8】





## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
5 July 2001 (05.07.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/48480 A1(51) International Patent Classification: G01N 33/53,  
C12Q 1/68

(21) International Application Number: PCT/US00/35583

(22) International Filing Date:  
28 December 2000 (28.12.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/173,338 28 December 1999 (28.12.1999) US(71) Applicant and  
(72) Inventor: KEEENE, Jack, D. [US/US]; 6300 Garrett Road,  
Durham, NC 27707 (US).(75) Inventors/Applicants (for US only): TENENBAUM,  
Scott, A. [US/US]; 3312 Park Overlook Drive, Durham,  
NC 27712 (US); CARSON, Craig [US/US]; 1329 Sed-  
wick Road, Durham, NC 27713 (US).(74) Agent: BISWAS, Sorojini, J.; Myers Bigel Sibley &  
Sajovec, P.O. Box 37428, Raleigh, NC 27627 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,  
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,  
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,  
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian  
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European  
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,  
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,  
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).Published:  
— With international search report.  
— Before the expiration of the time limit for amending the  
claims and to be republished in the event of receipt of  
amendments.For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: METHODS FOR ISOLATING AND CHARACTERIZING ENDOGENOUS mRNA-PROTEIN (mRNP) COMPLEXES

GENOME



RIBONOME



TRANSCRIPTOME



PROTEOME

(57) Abstract: Cellular mRNA-protein (mRNP) complexes are partitioned in vivo by contacting a biological sample with at least one ligand that specifically binds at least one component of a mRNP complex. Suitable biological samples comprise at least one mRNA-protein (mRNP) complex and include cell cultures, cell extracts, and whole tissue, including tumor tissue. Ligands include antibodies that specifically bind RNA-binding or RNA-associated proteins present in the mRNP complex. The mRNP complex is separated by binding the ligand with a binding molecule specific for the ligand, where the binding molecule is attached to a solid support. The mRNP complex is collected by removing the mRNP complex from the solid support. After collecting the mRNP complex, the mRNA bound within the complex may be characterized and identified. Subsets of the total mRNA population of a cell may accordingly be characterized, and a gene expression profile of the cell obtained.

WO 01/48480 A1

WO 01/48480

PCT/US00/35583

**METHODS FOR ISOLATING AND CHARACTERIZING ENDOGENOUS  
mRNA-PROTEIN (mRNP) COMPLEXES****RELATED APPLICATIONS**

This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/173,338, filed 28 December 1999, which is hereby incorporated in its entirety.

**5 STATEMENT OF FEDERAL SUPPORT**

This invention was made with government support under grant number RO1 CA79907 from the National Institutes of Health. The United States government has certain rights to this invention.

**10 FIELD OF THE INVENTION**

This invention relates generally to post-transcriptional regulation and methods of profiling gene expression.

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

15 Many diseases are genetically based, and the genetic background of each individual can have a profound effect on his or her susceptibility to disease. The relatively new field of functional genomics has provided researchers with the ability to determine the functions of proteins based upon knowledge of the genes that encode the proteins. A major goal of functional genomics is to identify gene products that  
20 are suitable targets for drug discovery. Such knowledge can lead to a basis for target validation if it is demonstrated that the target of interest has an essential function in a disease. Accordingly, a need exists to develop methods that allow profiling of the gene expression state of cells and tissues in order to understand the consequences of genetics on growth and development.

25 Understanding global gene expression at the level of the whole cell requires detailed knowledge of the contributions of transcription, pre-mRNA processing, mRNA turnover and translation. Although the sum total of these regulatory processes in each cell accounts for its unique expression profile, few methods are available to independently assess each process *en masse*.

WO 01/48480

PCT/US00/35583

The expression state of genes in a complex tissue or tumor is generally determined by extracting messenger RNAs from samples (e.g., whole tissues) and analyzing the expressed genes using cDNA libraries, microarrays or serial analysis of gene expression (SAGE) methodologies. See, e.g., Duggan, *et al.*, (1999) *Nature Genetics* **21**, 10-14.; Gerhold, *et al.*, (1999) *Trends in Biochemical Sciences* **24**, 168-173; Brown, *et al.*, (1999) *Nature Genetics* **21**, 38-41; Velculescu, *et al.*, (1995) *Science* **270**, 484-487; Velculescu, *et al.* (1997) *Cell* **88**, 243-251. In order to determine the gene expression profile of any single cell type within a tissue or tumor or to recover those messenger RNAs, the tissue must first be subjected to microdissection. This is very laborious, as only a small amount of cellular material is recovered and the purity as well as the quality of the cellular material is compromised.

Post-transcriptional events influence the outcome of protein expression as significantly as transcriptional events. The regulation of transcription and post-transcription are generally linked. Altering the expression of transcriptional activators or repressors has important consequences for the development of a cell. Therefore, feedback loops following translational activation of specific mRNAs may change the program of transcription in response to growth or differentiation signals. DNA arrays are well-suited for profiling the steady-state levels of mRNA globally (i.e., total mRNA or the "transcriptome"). However, because of post-transcriptional events affecting mRNA stability and translation, the expression levels of many cellular proteins do not directly correlate with steady-state levels of mRNAs (Gygi *et al.* (1999) *Mol. Cell Biol.* **19**, 1720-1730; Futcher *et al.* (1999) *Mol. Cell Biol.* **19**, 7357-7368).

Many mRNAs contain sequences that regulate their post-transcriptional expression and localization (Richter (1996) in *Translational Control*, eds. J.W.B Hershey, *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp. 481-504). These regulatory elements reside in both introns and exons of pre-mRNAs, as well as in both coding and noncoding regions of mature transcripts (Jacobson and Peltz (1996) *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 693-739; Wickens *et al.* (1997) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 220-232). One example of a sequence-specific regulatory motif is the AU-rich instability element (ARE) present in the 3'-untranslated regions (UTRs) of early-response gene (ERG) mRNAs, many of which encode proteins essential for growth and differentiation (Caput *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1670-1674; Shaw and Kamen (1986) *Cell* **46**, 659-667; Schiavi *et al.* (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1114**, 95-106; Chen and Shyu (1995) *Trends Biochem. Sci.* **20**, 465-470). Regulation via the ARE is poorly understood, but the mammalian ELAV/Hu proteins have been shown to bind to ARE sequence elements *in vitro* and to affect

WO 01/48480

PCT/US00/35583

post-transcriptional mRNA stability and translation *in vivo* (Jain *et al.* (1997) *Mol. Cell Biol.* **17**, 954-962; Levy *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 6417-6423; Fan and Steitz (1998) *EMBO J.* **17**, 3448-3460; Peng *et al.* (1998) *EMBO J.* **17**, 3461-3470; Keene (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5-7).

- 5        *In vitro* RNA selection methods based upon cellular sequences are reported in Gao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11207-11211 (1994) and U.S. Patent Nos. 5,773,246, 5,525,495 and 5,444,149, all to Keene *et al.*, the disclosures of which are incorporated herein in their entirety. Generally, these methods were intended to identify large numbers of mRNAs present in messenger RNP (mRNP)
- 10       complexes, and utilized *in vitro* binding and amplification of mRNA sequences from large pools of naturally-occurring mRNAs. These studies used proteins (referred to as ELAV or Hu proteins) known to bind to AU-rich sequence elements present in the untranslated regions of cellular mRNAs. These experiments led to the discovery that mRNAs which are structurally or functionally related may be revealed using multi-
- 15       targeted RNA binding proteins (*i.e.*, RNA binding proteins that specifically bind more than one target). See Levine, *et al.*, (1994) *et al.*, *Molecular and Cellular Biology* **13**, 3494-3504; and King, *et al.*, (1993) *Journal of Neuroscience* **14**, 1943-1952; reviewed in Antic and Keene (1997) *American Journal of Human Genetics* **61**, 273-278 and Keene (1999) *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **96**,
- 20       5-7. However, these reports are limited to *in vitro* applications, and do not describe *in vivo* methods for partitioning RNA into structural or functional subsets using RNA binding proteins. Although *in vitro* methods have been used to determine protein-RNA interactions, their use has certain limitations. Biochemical methods are generally reliable when carefully controlled, but RNA-binding can be problematic
- 25       because many interactions may be of low affinity, low specificity or even artifactual. In order to understand RNA-protein interactions and their functional implications on a global systems level it is necessary to find reliable methods to monitor messenger RNP complexes *in vivo*.

- The successful immunoprecipitation of epitope-tagged ELAV/Hu protein
- 30       which has been transfected into pre-neuronal cells has been reported. See Antic *et al.*, *Genes and Development* **13**, 449-461 (1999). This immunoprecipitation was followed by nucleic acid amplification that allowed for the identification of a messenger RNA encoding neurofilament M protein (NF-M).

# 35       SUMMARY OF THE INVENTION

      The present invention relates to a new, *in vivo* approach for the determination of gene expression that utilizes the flow of genetic information through messenger

WO 01/48480

PCT/US00/35583

RNA clusters or subsets. Recently, the practice of examining multiple macromolecular events simultaneously and in parallel with the goal of organizing such information computationally has taken the designation "-ome." Thus, the genome identifies all of the genes of a cell, while the transcriptome is defined as the messenger RNA complement of the genome and the proteome is defined as the protein complement of the genome (see **Figure 1**). The present inventors have defined several physically organized subsets of the transcriptome and defined them as dynamic units of the "ribonome". As described herein, the ribonome consists of a plurality of distinct subsets of messenger RNAs (mRNAs) that are clustered in the cell due to their association with RNA-binding proteins (e.g., regulatory RNA-binding proteins). By identifying the mRNA components of a cellular ribonome, the cellular transcriptome can be broken down into a series of subprofiles that together can be used to define the gene expression state of a cell or tissue (see **Figure 2**). In combination with, for example, high throughput approaches and by multiplexing RNA processing assays, the present inventive methods provide the ability to determine the changes that occur in multiple gene transcripts simultaneously.

Accordingly, one aspect of the invention is an *in vivo* method of partitioning endogenous, cellular mRNA-binding protein (mRNP) complexes. The method, in one embodiment, comprises contacting a biological sample that comprises at least one mRNP complex with a ligand that specifically binds a component of the mRNP complex. The biological sample may be, for example, a tissue sample, whole tissue, a whole organ, a cell culture, or a cell extract or lysate. The component of the mRNP complex may be a RNA binding protein, a RNA-associated protein, a nucleic acid associated with the mRNP complex including the mRNA itself, or another molecule or compound (e.g., carbohydrate, lipid, vitamin, etc.) that associates with the mRNP complex. The ligand may be, for example, an antibody that specifically binds the component, a nucleic acid that binds the component (e.g., an antisense molecule, a RNA molecule that binds the component), or any other compound or molecule that binds the component of the complex. The mRNP complex is then separated by binding the ligand (now bound to the mRNP complex) to a binding molecule that binds the ligand. The binding molecule may bind the ligand directly (*i.e.*, may be an antibody specific for the ligand), or may bind the ligand indirectly (*i.e.*, may be an antibody or binding partner for a tag on the ligand). The binding molecule will be attached to a solid support, such as a bead or plate or column, as known in the art. Accordingly, the mRNP complex will be attached to the solid support via the ligand and binding molecule. The mRNP complex is then collected by removing it from the

4

WO 01/48480

PCT/US00/35583

solid support (*i.e.*, the complex is washed off the solid support using suitable conditions and solvents).

The identity of the mRNA bound within the mRNP complex may then be determined, for example, by separating the mRNA from the complex, reverse

5 transcribing the mRNA into cDNA, and sequencing the cDNA.

In embodiments of the invention, therefore, the mRNP complex may be isolated by direct immunoprecipitation of the mRNP complexes, either with or without epitope tags, or by other biochemical partitioning methods. For example, other proteins bound to or associated with the mRNP complex may be immunoprecipitated

10 in order to recover the mRNP complex and subsequently the mRNAs bound within the complex. The skilled artisan will appreciate that embodiments of the inventive method allow for the identification of a plurality of mRNA complexes simultaneously (*i.e.*, concurrently), sequentially, or in batch-wise fashion. Alternatively, the method may be carried out on one biological sample (or portion thereof) numerous times, the

15 steps of the method being performed in a sequential fashion, with each iteration of the method utilizing a different ligand. In any of the described embodiments, cDNA or genomic microarray grids, for example, may be used to identify mRNAs isolated by the inventive method *en masse*.

A "subset" of mRNA is defined as a plurality of mRNA transcripts or

20 messages that specifically bind or associate with a mRNP complex. In other words, subsets are defined by their ability to bind within or to a particular mRNP complex. The subset will preferably be a quantitative or qualitative fraction of the total mRNA population of the cell. Furthermore, subsets within subsets of mRNAs may be identified using the invention. The collection of mRNA subsets for any particular cell

25 or tissue sample is an expression profile, also referred to herein as a "ribonomic profile," for that cell or tissue. It will be appreciated that expression profiles will differ from cell sample to cell sample, depending on the type of cell in the sample (*e.g.*, what species or tissue type the cell is), the differentiation status of the cell, the pathogenicity of the cell (*i.e.*, if the cell is infected or if it is expressing a deleterious

30 gene, such as an oncogene, or if the cell is lacking a particular gene), the specific ligand used to isolate the mRNP complex, etc. Thus, the expression profile of a cell may be used as an identifier for the cell, enabling the artisan to compare and distinguish profiles of different cells.

Stated otherwise, the ribonomic profile provides a pattern recognition subset

35 of the global mRNA profile of the cell. When the growth state of the cells changes (*i.e.*, tumorigenesis) or the cell is perturbed by a pathogen (*i.e.*, a viral infection), the profile will change, and a perturbation of the ribosome can be detected. If cells are

WO 01/48480

PCT/US00/35583

treated with compounds (*i.e.*, drugs) the ribonomic patterns will show desirable or undesirable alteration. Accordingly, the new method provides methods for evaluating the effect of numerous factors on a cell, including toxicity, aging, apoptosis, pathogenesis and cell differentiation.

5 The new invention has several advantages over previous methods of partitioning RNA. First, partitioning of mRNP complexes may be carried out *in vivo*, while previous methods were limited to *in vitro* applications. The new method is robust enough such that amplification (*e.g.*, by PCR, or alternatively according to the method of Antic *et al.* (1999) *Genes Dev.* 13, 449-461) is not necessary to identify  
10 cDNAs of interest once they are reverse transcribed from the isolated subset of mRNAs. The present invention does not require the use of iterative processes, such as those set forth in Gao *et al. supra*. Finally, quantitative determinations are possible with the present invention if, for example, hybridization is used to analyze the expression profile of the cell (*e.g.*, in microarray assays or RNase protection  
15 assays (RPA)).

In certain embodiments, therefore, the present invention advantageously allows the artisan to identify, monitor, and quantitate mature gene transcripts *en masse* in order to determine their localization, activity, stability, and translation into protein components of living cells. The methods described herein advantageously  
20 provide a novel approach to functional genomics by providing methods of isolating endogenous messenger-RNA binding proteins, and methods of identifying the subset of cellular mRNAs contained in mRNP-complexes, using microarrays or other known procedures. In preferred embodiments, the inventive method provides a basis for investigating and determining functional mRNA networks during growth and  
25 differentiation cycles by using mRNA-binding proteins and other mRNP-associated factors to define mRNA subsets.

It will be appreciated that patterns of mRNA subsets (*i.e.*, expression profiles) may be altered in the presence of certain compounds (*i.e.*, drugs) or under various disease conditions. Accordingly, in certain embodiments the inventive methods are  
30 useful for screening compounds that may be of therapeutic use, and for finding appropriate gene targets for the compounds. In other embodiments, the inventive method is useful for determining the disease state of a cell, thus providing means for classifying or diagnosing the presence or predisposition for disease (*e.g.*, cancer).

Gene expression profiles will also vary between differing cell types present in  
35 a complex tissue, such as a tumor. Some mRNA binding proteins are present only in certain tumor cells, and a tumor may comprise more than one cell type. Gene expression profiling for each cell type within a tumor or tissue may be carried out by

WO 01/48480

PCT/US00/35583

making an extract of the tissue and immunoprecipitating cell-type specific components of mRNP complexes (e.g., RNA-binding proteins that are attached to mRNA) directly from the extract (*i.e., in vivo*). The immunoprecipitated pellets will contain mRNAs that are only present in the same cells that contain the attached or associated component. Thus, in certain embodiments, the inventive methods may be used to characterize and distinguish the gene expression profiles of a plurality of cell types, which cell types may co-exist in the same complex tissue. This can allow the tumor cells to be profiled in whole tumor extracts without having to analyze mRNA in, for example, the non-tumor stromal cells and blood cells that surround tumor cells. The results of such characterization may be useful in determining, for example, the proper course of treatment for a patient suffering with a tumor, when the choice of treatment depends of the kind of tissue (e.g., endothelial vascular tissue) present in a tumor.

In another embodiment, the present invention provides methods for isolating and optionally identifying proteins that bind or associate with a mRNP complex.

Alternatively, and in another embodiment, the inventive method may be used to screen test compounds for their ability to modulate gene expression in a cell. Such methods are useful for screening putative drugs that may be used in the treatment and/or prevention of disorders associated with irregularities in gene expression, including but not limited to cancer.

The foregoing and other aspects of the present invention are explained in detail in the specification set forth below.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

**Figure 1** is a schematic illustrating the flow of genetic information from the genome to the proteome, and the intermediate levels represented by the ribonome and the transcriptome. The transcriptome represents the total mRNA complement of the genome, but does not necessarily correlate directly with protein production. The processing, transport and translation of mRNA occurs in the ribonome, where dynamic regulatory steps determine the proteomic outcome.

**Figure 2** graphically illustrates a comparison of the total cell mRNA (the transcriptome) with mRNA that has bound within mRNP complexes to form a part of the ribonome. The microarrays representing mRNP complexes contain discrete and more limited subsets of mRNAs, when compared to the transcriptome.

**Figures 3A and 3B** illustrate multi-probe RNase protection analysis of mRNAs associated with mRNP complexes. Messenger RNP complexes from cell lysates were immunoprecipitated, and the pelleted RNA was extracted and



WO 01/48480

PCT/US00/35583

quantitated by RNase protection. **Figure 3A** and **3B** show examples of mMyc and mCyc-1 multi-probe template sets, respectively. Lanes: (1) undigested riboprobe (slightly larger than RNase-digested product due to riboprobe plasmid template); (2) total cellular RNA; (3) rabbit pre-bleed serum control; (4) mRNAs extracted from HuB mRNPs; (5) mRNAs extracted from PABP mRNPs. An asterisk (\*) denotes mRNA species not detected in total RNA.

**Figure 4** illustrates ribonome profiling of RNA subsets using DNA arrays. The RNA-protein complexes can be derived from cells of two individuals, species, cell types, treatments, developmental stages, etc. mRNA-protein complexes are separated immunoprecipitations of complexes are conducted, probes are reverse-transcribed from the RNA template, and a DNA array of genes is probed with each pool of RNP-derived probes to generate subprofiles of gene expression (10). Subprofiles are then compared by subtraction or addition to generate an overall picture of gene expression (20). This figure depicts the ribonomic concept, in which different mRNPs are isolated and their associated mRNAs identified using microarrays. The subprofiles (mRNP1, mRNP2, ..., mRNPN) of the total cell profile are shown as additive. Stacked mRNP subprofiles can each represent individual mRNPs within a single cell type, or can represent each individual cell's transcriptome within a complex tissue or tumor.

**Figure 5** sets forth the results of illustrative Example 4, below, and shows mRNAs associated with mRNP complexes using cDNA arrays. Panels: (A) pre-bleed; (B) HuB mRNP complexes; (C) eIF-4E mRNP complexes; (D) PABP mRNP complexes; (E) total cellular RNA. An example of the specificity of the procedure is indicated by the differential abundance of the mRNAs encoding  $\beta$ -actin and ribosomal protein S29 among the mRNP profiles (arrows a and b, respectively). Other examples of such specificity are readily observable with other mRNAs (data not shown).

**Figure 6** sets forth the results of illustrative Example 5, below, and shows a comparison of the mRNA profiles from HuB mRNPs before and after treatment with retinoic acid (RA). Panels: (A) mRNAs extracted from HuB mRNPs immunoprecipitated from untreated cells; (B) mRNAs extracted from HuB mRNPs immunoprecipitated from RA-treated cells; (C) a computer-generated comparison of panels A and B; (D) mRNAs extracted from HuA (HuR) mRNPs immunoprecipitated from untreated cells; (E) mRNAs extracted from HuA mRNPs immunoprecipitated from RA-treated cells; (F) a computer-generated comparison of panels D and E; (G) total complement of mRNAs extracted from untreated cellular lysate; (H) total complement of mRNAs extracted from RA-treated cellular lysate; and (I) a computer-

WO 01/48480

PCT/US00/35583

generated comparison of panels G and H. For panels C, F, and I: green bars indicate mRNAs of approximately equal abundance; red bars represent mRNAs from HuB mRNPs that were detectable at four-fold or greater following RA treatment; blue bars represent mRNAs from HuB mRNPs that were detectable four-fold or greater in cells before RA treatment.

Figure 7 is a schematic of ribonomic profiling.

Figure 8 is a schematic outlining a strategy for the identification of new RNA-binding proteins.

#### DETAILED DESCRIPTION OF PREFERRED EMBODIMENTS

The present invention will now be described more fully with reference to the accompanying drawings, in which preferred embodiments of the invention are shown. This invention may, however, be embodied in different forms and should not be construed as limited to the embodiments set forth herein. Rather, these embodiments are provided so that this disclosure will be thorough and complete, and will fully convey the scope of the invention to those skilled in the art.

The terminology used in the description of the invention herein is for the purpose of describing particular embodiments only, and is not intended to be limiting of the invention. As used in the description of the invention and the appended claims, the singular forms "a", "an" and "the" are intended to include the plural forms as well, unless the context clearly indicates otherwise. Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety.

Except as otherwise indicated, standard methods may be used for the production of cloned genes, expression cassettes, vectors, and transformed cells and plants according to the present invention. Such methods are known to those skilled in the art. See e.g., J. Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Edition* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989); F. M. Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (Green Publishing Associates, Inc. and Wiley-Interscience, New York, 1991).

Nucleotides and amino acids are represented herein in the manner recommended by the IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission, or (for amino acids) by three letter code, in accordance with 37 C.F.R. §1.822 and established usage. See, e.g., *Patent User Manual*, 99-102 (Nov. 1990) (U.S. Patent and Trademark Office).

WO 01/48480

PCT/US00/35583

Nucleotide sequences are presented herein by single strand only, in the 5' to 3' direction, from left to right. "Nucleic acid sequence" as used herein refers to an oligonucleotide, nucleotide, or polynucleotide, and fragments thereof, and to DNA or RNA of genomic or synthetic origin which may be single- or double-stranded, and represent the sense or antisense strand. The term "nucleic acid" refers to deoxyribonucleotides or ribonucleotides and polymers thereof in either single- or double-stranded form. Unless specifically limited, the term encompasses nucleic acids containing known analogues of natural nucleotides which have similar binding properties as the reference nucleic acid and are metabolized in a manner similar to naturally occurring nucleotides. Unless otherwise indicated, a particular nucleic acid sequence also implicitly encompasses conservatively modified variants thereof (e.g. degenerate codon substitutions) and complementary sequences, and as well as the sequence explicitly indicated. Two nucleic acids are "recombined" when sequences from each of the two or more nucleic acids are combined in a progeny nucleic acid.

The terms "nucleic acid" or "nucleic acid sequence" may also be used in reference to genes, cDNA, and mRNA encoded by a gene. The term "gene" is used broadly to refer to any segment of DNA associated with a biological function. Thus, genes include coding sequences and/or the regulatory sequences required for their expression. Genes also include non-expressed DNA segments that, for example, form recognition sequences for other proteins. Genes can be obtained from a variety of sources, including cloning from a source of interest or synthesizing from known or predicted sequence information.

As used herein, a nucleic acid molecule may be RNA (the term "RNA" encompassing all ribonucleic acids, including but not limited to pre-mRNA, mRNA, rRNA, hnRNA, snRNA and tRNA); DNA; peptide nucleic acid (PNA, as described in, e.g., U.S. Patent No. 5,539,082 to Nielsen *et al.*, and U.S. Patent No. 5,821,060 to Arlinghaus *et al.*); and the analogs and modified forms thereof. Preferably, the nucleic acid is RNA, and more preferably the nucleic acid molecule is messenger RNA (mRNA). Nucleic acid molecules of the present invention may be linear or circular, an entire gene or a fragment thereof, full-length or fragmented/digested, "chimeric" in the sense of comprising more than one kind of nucleic acid, and may be single-stranded or double-stranded. Nucleic acid from any source may be used in the present invention; that is, nucleic acids of the present invention include but are not limited to genomic nucleic acid, synthetic nucleic acid, nucleic acid obtained from a plasmid, cDNA, recombinant nucleic acid, and nucleic acid that has been modified by known chemical methods, as further described herein. Nucleic acids may also be products of *in vitro* selection experiments (also called aptamers) and other nucleic

WO 01/48480

PCT/US00/35583

acid molecules useful for their ability to bind or be bound by other ligands. See D. Kenan, *TIBS* **19**, 57-64 (1994); L. Gold, *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 763-798 (1995); S.E. Osborne and A.D. Ellington, *Chem. Rev.* **97**, 349-370 (1997).

Nucleic acids of the present invention may be obtained from any organism, including but not limited to bacteria, viruses, fungi, plants and animals, with animal nucleic acid being preferred, mammalian nucleic acid being more preferred, and human nucleic acid being most preferred. If desired, the nucleic acid may be amplified according to any of the known nucleic acid amplification methods that are well-known in the art (e.g., PCR, RT-PCR, QC-PCR, SDA, and the like). Nucleic acids of the present invention may be, and preferably are, purified according to methods known in the art.

As summarized above, the present invention relates to *in vivo* methods for partitioning mRNP complexes from a cell. mRNP complexes of the present invention is preferably from a biological sample, such as a tissue sample, whole tissue, a whole organ (e.g., an entire brain, liver, kidney, etc.), bodily fluid sample, cell culture, cell lysate, cell extract or the like. In a preferred embodiment, the biological sample comprises or is obtained from a population of cells. By a "population of cells" herein is meant at least two cells, with at least about  $10^3$  being preferred, at least about  $10^6$  being particularly preferred, and at least about  $10^6$  to  $10^8$  being especially preferred. The population or sample can contain a mixture of different cell types from either primary or secondary cultures, or from a complex tissue such as a tumor, or may alternatively contain only a single cell type. In a preferred embodiment, cells that are proliferating are used. Alternatively, non-proliferating cells may be used.

Preferred cell types for use in the invention include, but are not limited to, mammalian cells, including animal (rodents, equines, bovines, canines, felines and primates), and human cells, with human cells being preferred. Cells from non-mammalian animals (e.g., avians, fish, reptiles) and from plants may also be used in the practice of the present invention. Cells may be tumor cells from tumors of any type, including breast, skin, lung, cervix, colorectal, and brain/CNS tumors, etc. Additionally, non-cancerous cells from any organ may be used, including liver cells, neurons, muscle cells, and the like.

mRNA is referred to herein interchangeably as a "message" or a "transcript". A "subset" of mRNA is defined as a plurality of mRNA that specifically binds within a particular mRNA binding protein complex (mRNP complex). Thus, subsets are defined by their ability to bind within or to a particular mRNP complex. The mRNA subset will preferably be a fraction of the total mRNA population of the cell.

WO 01/48480

PCT/US00/35583

As summarized above, one aspect of the invention is an *in vivo* method of partitioning endogenous cellular mRNA-binding protein (mRNP) complexes. "Endogenous" is used herein to mean that the mRNP complex forms in a cell (*i.e.*, *in vivo* or *in situ*). The mRNP complex may form in the cell naturally, *i.e.*, the components of the mRNP complex naturally occur in the cell and form the mRNP complex. Alternatively, the mRNP complex forms in a cell, even though one or more components of the complex is introduced into the cell by, *e.g.*, infection or transformation. For example, a mRNP complex endogenously forms in a cell when a RNA-binding protein that is a component of the mRNP complex is ectopically expressed in the cell by (for example) transforming the cell or infecting the cell with an expression vector that carries nucleic acid encoding the protein, and a mRNP complex in which the protein binds is formed.

The method, in one embodiment, comprises contacting a biological sample that comprises at least one mRNP complex with a ligand that specifically binds a component of the mRNP complex. The component of the mRNP complex may be a RNA binding protein, a RNA-associated protein, a nucleic acid associated with the mRNP complex including the mRNA itself, or another molecule or compound (*e.g.*, carbohydrate, lipid, vitamin, etc.) that associates with the mRNP complex. A component "associates" with a mRNP complex if it binds or otherwise attaches to the mRNP complex with a  $K_d$  of about  $10^{-6}$  to about  $10^{-9}$ . In a preferred embodiment, the component associates with the complex with a  $K_d$  of about  $10^{-7}$  to about  $10^{-9}$ . In a more preferred embodiment, the component associates with the complex with a  $K_d$  of about  $10^{-8}$  to about  $10^{-9}$ .

The ligand may be any molecule that specifically binds the component of the mRNP complex. For example, the ligand may an antibody that specifically binds the component, a nucleic acid that binds the component (*e.g.*, an antisense molecule, a RNA molecule that binds the component), or any other compound or molecule that specifically binds the component of the complex. In certain embodiments, the ligand may be obtained by using the serum of a subject (*i.e.*, a human or animal subject) that has a disorder known to be associated with the production of mRNP-complex specific antibodies or proteins. Examples of these disorders include autoimmune disorders such as systemic lupus erythematosus ("lupus" or SLE) and a number of cancers. In certain embodiments, the ligand may be "tagged" with another compound or molecule in order to facilitate the separation, observation or detection of the ligand. In one embodiment of the invention, the ligand is "epitope tagged," as described in the art. Suitable tags are known in the art and include but are not limited to biotin, the MS2 protein binding site sequence, the U1snRNA 70k binding

WO 01/48480

PCT/US00/35583

site sequence, the U1snRNA A binding site sequence, the g10 binding site sequence (commercially available from Novagen, Inc., Madison, Wisconsin, USA), and FLAG-TAG® (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, USA).

The mRNP complex is then separated by binding the ligand (now bound to the mRNP complex) to a binding molecule that specifically binds the ligand. The binding molecule may bind the ligand directly (*i.e.*, may be an antibody or protein specific for the ligand), or may bind the ligand indirectly (*i.e.*, may be an antibody or binding partner for a tag on the ligand). Suitable binding molecules include but are not limited to protein A, protein G, streptavidin. Binding molecules may also be obtained by using the serum of a subject suffering from, for example, an autoimmune disorder or cancer. In certain embodiments, the ligand is an antibody that binds the component of the mRNP complex via the Fab region of the antibody, and the binding molecule in turn binds the Fc region of the antibody. The binding molecule will be attached to a solid support, such as a bead, well, pin, plate or column, as known in the art. Accordingly, the mRNP complex will be attached to the solid support via the ligand and binding molecule.

The mRNP complex is then collected by removing it from the solid support (*i.e.*, the complex is washed off the solid support under appropriate stringency conditions, using suitable solvents that may be determined by skilled artisans).

In certain embodiments of the invention, the mRNP complex may be stabilized by cross-linking prior to binding the ligand thereto. Cross-linking, as used herein, means covalently binding (*e.g.*, covalently binding the components of the mRNP complex together). Cross-linking may be contrasted with ligand-target binding, or binding molecule-ligand binding, which is generally non-covalent binding. Cross-linking may be carried out by physical means (*e.g.*, by heat or ultraviolet radiation), or chemical means (*e.g.*, by contacting the complex with formaldehyde, paraformaldehyde, or other known cross-linking agents), which means are known or determinable by those skilled in the art. In other embodiments, the ligand may be cross-linked to the mRNP complex after binding the mRNP complex. In additional embodiments, the binding molecule may be cross-linked to the ligand after binding to the ligand. In yet other embodiments, the binding molecule may be cross-linked to the solid support.

The skilled artisan will appreciate the inventive method allows for the identification of a plurality of mRNP complexes simultaneously (*e.g.*, "*en masse*"). For example, a biological sample may be contacted with a plurality of ligands specific for different mRNP complex components. A plurality of mRNP complexes from the sample will bind the various ligands. The plurality of mRNP complexes can then be

WO 01/48480

PCT/US00/35583

separated using appropriate binding molecules, thus isolating the plurality of mRNP complexes. The mRNP complexes and the mRNAs contained within the complexes may then be characterized and/or identified by methods described herein and known in the art. Alternatively, the method may be carried out on one sample numerous  
 5 times, the inventive steps being performed in a sequential fashion, with each iteration of steps utilizing a different ligand.

As set forth above, a subset of mRNA identifies a pattern-recognition profile that is characteristic of the RNA structural or functional networks in that sample. The collection of mRNA subsets for any particular cell or tissue sample constitutes a  
 10 gene expression profile, and more specifically a ribonomic gene expression profile, for that cell or tissue. It will be appreciated that ribonomic expression profiles may differ from cell to cell, depending on the type of cell in the sample (*e.g.*, what species or tissue type the cell is), the differentiation status of the cell, the viability of the cell (*i.e.*, if the cell is infected or if it is expressing a deleterious gene, such as an  
 15 oncogene, or if the cell is lacking a particular gene or not expressing a particular gene), the specific ligands used to isolate the mRNP complexes, etc. Thus, the ribonomic expression profile of a cell may be used as an identifier for the cell, enabling the artisan to compare and distinguish profiles or subprofiles of different cells. The genes identified by the RNAs present in each ribonomic pattern form  
 20 distinct subsets that may be associated with a particular cell cycle, stage of differentiation, apoptosis or stress induction, viral infection, or cancer.

cDNAs may be used to identify mRNP complexes partitioned with a ligand or ligands specific for a component of the mRNP complex. cDNA microarray grids, for example, may be used to identify mRNA subsets *en masse*. Microarrays are  
 25 precisely aligned grids in which each target nucleic acid (*e.g.*, gene) has a position in a matrix of carefully spotted cDNAs. See Gerhold *et al. supra*, Duggan *et al. supra*, and Brown *et al. supra*. Alternatively, genomic microarrays (*e.g.*, microarrays wherein the target nucleic acids may contain introns and exons) may be used. Therefore, each gene or target nucleic acid being examined on a microarray has a  
 30 precise address that can be located, and the binding can be quantitated. Microarrays in the form of siliconized chips or those based upon cDNA blots on nylon or nitrocellulose are commercially available. Glass slides can also be customized with oligonucleotides or DNAs for detection of complementary RNA sequences. In all of these cases, the hybridization platforms allow identification of the mRNAs in a  
 35 sample based upon the stringency of binding and washing. This has been referred to as "sequencing by hybridization." Although microarray technology is one method of analysis, it is only one way to identify and/or sequence the mRNAs in the mRNA

WO 01/48480

PCT/US00/35583

subset. Alternative approaches include but are not limited to differential display, phage display/analysis, SAGE or simply preparing cDNA libraries from the mRNA preparation and sequencing all members of the library.

Methods for DNA sequencing which are well known and generally available in the art may be used to practice any of the embodiments of the invention. The methods may employ such enzymes as the Klenow fragment of DNA polymerase I, SEQUENASE® (US Biochemical Corp, Cleveland, Ohio), Taq polymerase (Perkin Elmer), thermostable T7 polymerase (Amersham, Chicago, Ill.), or combinations of polymerases and proofreading exonucleases such as those found in the ELONGASE Amplification System marketed by Gibco/BRL (Gaithersburg, Md.). Preferably, the process is automated with machines such as the Hamilton Micro Lab 2200 (Hamilton, Reno, Nev.), Peltier Thermal Cycler (PTC200; MJ Research, Watertown, Mass.) and the ABI Catalyst and 373 and 377 DNA Sequencers (Perkin Elmer).

In a preferred embodiment, amplification of the mRNA isolated according to the present invention, and/or the cDNA obtained from the mRNA is not carried out during the identification of the nucleic acid, and is not necessary or required by the present invention. However, the skilled artisan may choose to amplify the nucleic acid that is the subject of identification (e.g., the nucleic acid being identified via microarray analysis and/or sequencing) for convenience, as a matter of preference, and/or to comply with the specification/instructions of certain commercially available microarrays or microarray analysis systems. Thus, if desired, the nucleic acid may be amplified according to any of the numerous known nucleic acid amplification methods that are well-known in the art (e.g., PCR, RT-PCR, QC-PCR, SDA, and the like).

Methods of the present invention may be carried out in several ways, according to the needs of the practitioner and the purpose for which the invention is carried out. For example, in one embodiment, mRNA-binding protein complexes that are unique to a cell type of interest are identified. In an example of such an embodiment, an antibody that is specific for the mRNP complex can be used to immunoprecipitate the complex with its associated mRNAs. The RNAs may then be identified to form the ribonomic expression profile of that cell type, or alternatively may be isolated for (as an example) drug screening. The mRNA candidates for post-transcriptional regulation may be analyzed *en masse*, as a subset, for changes in mRNA stability during the cell cycle or developmental events. In certain embodiments, the methods may be carried out by isolating nuclei from cells undergoing developmental or cell cycle changes, performing nuclear run-off assays according to known techniques to obtain transcribing mRNAs, and then comparing



WO 01/48480

PCT/US00/35583

the transcribing mRNAs with the global mRNA levels in the same cells using cDNA microarrays. These methods thus provide the ability to distinguish transcriptional from post-transcriptional effects on steady state mRNA levels *en masse*.

In another embodiment, cells in culture are transformed to express a RNA-binding protein (RBP) or RNA-associated protein (RAP) that will associate with particular mRNAs only in a cell type of interest. DNA encoding the RBP or RAP may be carried by a recombinant vector (e.g., a plasmid, a viral vector) and transformed into the cell by known means, after which the RBP or RAP is expressed in the cell. Any RBP or RAP can be used, as described further herein. The protein may be in its native form, or it may be tagged (e.g., epitope tagged) for easy recovery from the cell. Detection of multiple RNA targets *in vivo* that are bound or associated with RBPs or RAPs may be carried out by using accessible epitopes, if necessary, but preferably is carried out without tags. In cases where the epitopes on the RBPs or RAPs are inaccessible or obscured, epitope tags on ectopically expressed recombinant proteins may be used. The transformed cell may be mixed with other cell types or may be implanted in an animal or human subject. A ligand (e.g., an antibody) that is specific for the protein can be used to immunoprecipitate the protein with its associated messenger RNAs from an extract of a tissue containing the transformed cell. The mRNA complexes and its associated RNAs may then be identified to form the expression profile of that cell type or is otherwise analyzed (e.g., for drug development).

In still another embodiment, a specific cell type in an animal is engineered with one or more cell-type specific gene promoters to express a RBP or RAP in the cell type of interest. As set forth above, the gene promoter and the RBP or RAP may be carried on one or more vectors and transformed into the cell, where the RBP or RAP is expressed. In one embodiment, a ligand (e.g., an antibody) that is specific for this protein can be used to immunoprecipitate the protein with its attached or associated messenger RNAs from an extract of a tissue containing the cell type of interest. The RNAs are then identified to form the expression profile of that cell type or isolated, e.g., for drug development.

RNA binding proteins (RBPs) and RNA-associated proteins (RAPs) useful in the practice of the present invention are known in the art, or may alternatively be identified and discovered by methods described herein. RNA binding proteins are now known to be involved in the control of a variety of cellular regulatory and developmental processes, such as RNA processing and compartmentalization, RNA stabilization, mRNA translation and viral gene expression. RNA binding proteins include poly A-binding protein ("PABP," which gives rise to a subset of the total mRNA population that is quantitatively different from the total mRNA population), and

WO 01/48480

PCT/US00/35583

other general RNA binding proteins, as well as RNA-binding proteins that are attached to only one or a few messenger RNAs in a particular cell type. Other useful proteins are autoantibodies reactive with RNA and RNA-binding proteins.

Examples of useful RNA binding proteins include the four ELAV/Hu  
 5 mammalian homologues of the *Drosophila* ELAV RNA-binding protein (Good (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4557-4561; Antic and Keene, *supra*). HuA (HuR) is ubiquitously expressed while HuB, HuC and HuD (and their respective alternatively-spliced isoforms) are predominantly found in neuronal tissue, but can also be expressed as tumor cell-specific antigens in some small cell carcinomas,  
 10 neuroblastomas, and medulloblastomas (reviewed in Keene (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5-7). All Hu proteins contain three RNA-recognition motifs (RRMs), which confer their binding specificity for AREs (Antic and Keene, *supra*; Kenan *et al.* (1991) *Trends Biochem. Sci.* **16**, 214-220; Burd and Dreyfuss (1994) *Science* **265**, 615-621). The evidence for ARE binding by Hu proteins began with the identification  
 15 of an AU-rich binding consensus sequence from a randomized combinatorial RNA library that was screened with recombinant HuB (Levine *et al.* (1993) *Mol. Cell Biol.* **13**, 3494-3504; Gao *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11207-11211). These and other studies demonstrated that Hu proteins bind *in vitro* to several ARE-containing ERG mRNAs including c-myc, c-fos, GM-CSF and GAP-43 (Levine *et al.*  
 20 (1993) *Mol. Cell Biol.* **13**, 3494-3504; Gao *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11207-11211; King *et al.* (1994) *J. Neurosci.* **14**, 1943-1952; Liu *et al.* (1995) *Neurology* **45**, 544-550; Ma *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 8144-8151; Abe *et al.* (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**, 2011-2016; Chung *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 6593-6598; Fan and Steitz (1998) *EMBO J.* **17**, 3448-3460; Antic *et al.* (1999) *Genes*  
 25 *Dev.* **13**, 449-461).

The binding of Hu proteins to ARE-containing mRNAs can result in the stabilization and increased translatability of the mRNA transcripts (Jain *et al.* (1997) *Mol. Cell Biol.* **17**, 954-962; Levy *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 6417-6423; Fan and Steitz (1998) *EMBO J.* **17**, 3448-3460; Peng *et al.* (1998) *EMBO J.* **17**, 3461-  
 30 3470). The neuron-specific Hu proteins are one of the earliest neuronal markers produced in teratocarcinoma cells following retinoic acid (RA)-treatment to induce neuronal differentiation (Antic *et al.*, *supra*; Gao and Keene (1996) *J. Cell Sci.* **109**, 579-589).

In one embodiment, the ligand used to carry out the invention is a RNA  
 35 binding protein selected from the RNA Recognition Motif (RRM) family of cellular proteins involved in pre-messenger RNA processing. One example of such a protein is the U1A snRNP protein. More than 200 members of the RRM superfamily have

WO 01/48480

PCT/US00/35583

been reported to date, the majority of which are ubiquitously expressed and conserved in phylogeny (Query et al, *Cell* (1989) 57: 89-101; Kenan et al, *Trends Biochem. Sci.* (1991) 16: 214-220). Most are known to have binding specificity for polyadenylate mRNA or small nuclear ribonucleic acids (e.g. U1, U2, etc.) transfer RNAs, 5S or 7S RNAs. They include but are not limited to hnRNP proteins (A, B, C, D, E, F, G, H, I, K, L), RRM proteins CArG, DT-7, PTB, K1, K2, K3, HuD, HUC, rbp9, eIF4B, xli, tra-2, AUBF, AUF, 32KD protein, ASF/SF2, U2AF, SC35, and other hnRNP proteins. Tissue-specific members of the RRM family are less common, including IMP, Bruno, AZP-RRM1, X16 which is expressed in pre-B cells, B16 which is a puff-specific *Drosophila* protein and ELAV/Hu, which are neuron specific.

RNA-binding and RNA-associated proteins useful in the practice of the present invention include those isolated using autoimmune and cancer patient sera. A non-comprehensive list of RNA-binding and RNA-associated proteins useful in the practice of the present inventions is set forth below in Table 1.

**Table 1**  
**RNA Binding and RNA Associated Proteins**

|                        |             |         |
|------------------------|-------------|---------|
| SLBP                   | DAN         | TTP     |
| Hel-N1                 | Hel-N2      | eIF-4A  |
| eIF-4B                 | eIF-4G      | eIF-4E  |
| eIF-5                  | eIF-4EBP    | MNK1    |
| PABP                   | p62         | KOC     |
| p90                    | La          | Sm      |
| Ro                     | U1-70K      | AUF-1   |
| RNAse-L                | GAPDH       | GRSF    |
| Ribosomal Po,P1,P2/L32 | PM-Scl      | FMR     |
| Staufen                | Crab 95     | TIA-1   |
| Upf1                   | RNA BP1     | RNA BP2 |
| RNA BP3                | CstF-50     | NOVA-1  |
| NOVA-2                 | CPEBP       | GRBP    |
| SXL                    | SC35        | U2AF    |
| ASF/SF2                | ETR-1       | IMP-1   |
| IMP-2                  | IMP-3       | ZBP     |
| LRBP-1                 | Barb        | PTB     |
| uPAmRNA BP             | BARB1       | BARB2   |
| GIFASBP                | CYP mRNA BP | IRE-BP  |

WO 01/48480

PCT/US00/35583

Table 1, continued.

|         |            |            |
|---------|------------|------------|
| p50     | RHA        | FN mRNA BP |
| AUF-1   | GA mRNA BP | Vigilin    |
| ERBP    | CRD-BP     | HuA        |
| HuB     | HuC        | HuD        |
| hnRNP A | hnRNP B    | hnRNP C    |
| hnRNP D | hnRNP E    | hnRNP F    |
| hnRNP G | hnRNP H    | hnRNP K    |
| hnRNP L | U2AF       |            |

The identification of new (*i.e.*, novel, previously unknown) RNA-binding proteins (RBPs) and RNA associated proteins, is another aspect of the invention.

- 5 Thus, in one embodiment of the invention, a RNA of interest (depicted in **Figure 8** as "RNA Y") is used as a "bait" to trap a new RBP or RAP. In a preferred embodiment, RNA Y is first converted to a cDNA using standard molecular biology techniques and is subsequently ligated at the 3' or 5' end to another fragment of DNA (referred to herein as the "tagging DNA") that encodes a sequence (*e.g.*, a RNA) that will bind a
- 10 ligand of the present invention (the ligand being illustrated as protein "X" in **Figure 8**). In other words, the tagging DNA encodes a binding partner of the ligand. Useful ligands may, in some embodiments, be obtained from (*i.e.*, by using) the serum of a subject (*i.e.*, a human or animal subject) that has a disorder known to be associated with the production of mRNP-complex specific antibodies or proteins, including
- 15 autoimmune disorders and cancer. Useful binding partners include antibodies to the ligand.

- The resulting DNA chimera is fused to a promoter in an expression vector (*e.g.*, a plasmid) and expressed in living cells (*e.g.*, in a cell culture) to produce a RNA fusion molecule. In an alternative embodiment, the expression vector is
- 20 infected into the cells by a virus, preferably a recombinant virus. A cell-free extract from the culture is prepared and contacted with the ligand (*e.g.*, protein X) which has been immobilized on a solid support. After an incubation period, the ligand and the attached/associated RNA fusion molecule and its associated RBPs or RAPs are washed to remove residual cellular material. After the wash step, the RBPs or RAPs
- 25 are removed from the RNA-protein complex and analyzed (*e.g.*, sequenced using standard methods of microsequencing).

Once partial protein sequence is obtained, the corresponding gene may be identified from known databases containing cDNA and genomic sequences.

WO 01/48480

PCT/US00/35583

Preferably, the gene is isolated, the protein is expressed, and an antibody is generated against the recombinant protein using known techniques. The antibodies are then used to recover and confirm the identity of the endogenous RBP or RAP.

Subsequently, the antibody can be used for ribonomic analysis (see examples

- 5 below) to determine the subset of cellular RNAs that cluster with (*i.e.*, associate with) RNA Y. Furthermore, the RBP or RAP may be tested for its ability to regulate the translation of the protein encoded by RNA Y, and may be tested for validation as a drug target. Likewise, proteins encoded by the cellular RNAs that cluster with RNA Y may be tested for validation as drug targets, as further described herein.

- 10 Antibodies that specifically bind mRNP complexes are thus an aspect of the invention. Antibodies to mRNP complexes may be generated using methods that are well known in the art. Such antibodies may include, but are not limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments, and fragments produced by a Fab expression library. Antibodies and fragments thereof may also be generated

- 15 using antibody phage expression display techniques, which are known in the art.

For the production of antibodies, various hosts including goats, rabbits, rats, mice, humans, and others, may be immunized by injection with the mRNP complex or any fragment or component thereof which has immunogenic properties.

Depending on the host species, various adjuvants may be used to increase an

- 20 immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's, mineral gels such as aluminum hydroxide, and surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol. Among adjuvants used in humans, BCG (*Bacilli Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum* are especially preferable.

- 25 Monoclonal antibodies to the components of the mRNP complex may be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, but are not limited to, the hybridoma technique, the human B-cell hybridoma technique, and the EBV-hybridoma technique (Kohler, G. *et al.* (1975) *Nature* **256**:495-497; Kozbor, D. *et al.*

- 30 (1985) *J. Immunol. Methods* **81**:31-42; Cote, R. J. *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**:2026-2030; Cole, S. P. *et al.* (1984) *Mol. Cell Biol.* **62**:109-120). Briefly, the

procedure is as follows: an animal is immunized with the mRNP complex or immunogenic fragments or conjugates thereof. Lymphoid cells (*e.g.* splenic lymphocytes) are then obtained from the immunized animal and fused with

- 35 immortalizing cells (*e.g.* myeloma or heteromyeloma) to produce hybrid cells. The hybrid cells are screened to identify those which produce the desired antibody.

WO 01/48480

PCT/US00/35583

Antibodies may also be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in the literature (Orlandi, R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 3833-3837 (1989)); Winter, G. *et al.*, (1991) *Nature* **349**, 293-299 (1991)).

Antibody fragments that contain specific binding sites for mRNP complexes may also be generated. For example, such fragments include, but are not limited to, the F(ab')<sub>2</sub> fragments which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and the Fab fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')<sub>2</sub> fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity (Huse, W. D. *et al.* (1989) *Science* **254**:1275-1281).

Various immunoassays may be used for screening to identify antibodies having the desired specificity for the mRNP. Numerous protocols for competitive binding or immunoradiometric assays using either polyclonal or monoclonal antibodies with established specificities are well known in the art. Such immunoassays will typically involve the measurement of complex formation between the component of the mRNP complex and its specific antibody. A two-site, non-competitive monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes is preferred, but a competitive binding assay may also be employed.

Kits or devices (e.g., fluidic devices) containing columns in which antibodies to various mRNP complexes or components thereof (e.g., antibodies to RNA-binding proteins) are immobilized are another aspect of the invention. The antibodies may be conjugated to a solid support suitable for a diagnostic assay (e.g., beads, plates, slides or wells formed from materials such as latex or polystyrene) in accordance with known techniques, such as precipitation. Antibodies may likewise be conjugated to detectable groups such as radiolabels (e.g., <sup>35</sup>S, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I), enzyme labels (e.g., horseradish peroxidase, alkaline phosphatase), and fluorescent labels (e.g., fluorescein) in accordance with known techniques. Devices of the present invention will preferably include at least one reagent specific for detecting the binding between an antibody to a mRNA-binding protein and the protein itself. The reagents may also include ancillary agents such as buffering agents and protein stabilizing agents, e.g., polysaccharides and the like. The device may further include, where necessary, agents for reducing background interference in a test, control reagents, apparatus for conducting a test, and the like. The device may be packaged in any suitable manner.

WO 01/48480

PCT/US00/35583

typically with all elements in a single container along with a sheet of printed instructions for carrying out the test.

Certain embodiments of the invention relate to methods of screening test compounds for therapeutic, diagnostic or pharmaceutical use, based upon each compound's effect on the ribonomic profile of a cell or tissue sample. In an example of such an embodiment, cells are grown under conditions where the cells have no contact with the test compound (*i.e.*, the cells are not treated). A ribonomic profile of the cell type is then produced, and the mRNA subsets identified. The ribonomic profile of the non-treated cells is then compared to a ribonomic profile of the same cell type that has been treated with the test compound. Any difference between the two profiles is an indication that the test compound has an effect (directly or indirectly) on the expression of certain genes of the cell, and may be an indication that the test compound is a candidate for therapeutic or diagnostic use. Alternatively, the ability of a compound to effect gene expression may identify the gene as a target for further testing. A "difference" in the profiles refers to any modulation or change in expression between the two profiles. "Modulation" can refer to an increase in expression, a decrease in expression, a change in the type or kind of expression present, a complete cessation of expression (*i.e.*, an absence of expression), or the instigation of expression. Suitable compounds that may be used include but are not limited to proteins, nucleic acids, small molecules, hormones, antibodies, peptides, antigens, cytokines, growth factors, pharmacological agents including chemotherapeutics, carcinogenics, or other cells (*i.e.* cell-cell contacts). Cells may also be screened for the effects of environmental or physiological factors such as radiation, action potentials, etc. on normal gene expression.

In another embodiment of the invention, an mRNP component itself, its catalytic or immunogenic fragments or oligopeptides thereof, can be used for screening libraries of compounds in any of a variety of drug screening techniques. The fragment employed in such screening may be free in solution, affixed to a solid support, borne on a cell surface, or located intracellularly. The binding between the mRNP complex and the compound being tested may be measured.

Another technique for drug screening which may be used provides for high throughput screening of compounds having suitable binding affinity to the protein of interest as described in published PCT application WO84/03564. In one embodiment, as applied to the mRNP complex, a plurality of different test compounds are synthesized on or affixed to a solid substrate, such as plastic pins or some other surface. The test compounds are reacted with the mRNP complex, or

WO 01/48480

PCT/US00/35583

fragments and/or components thereof, and washed. The bound mRNP complex or component thereof is then detected by methods well known in the art.

In summary, the present invention provides powerful *in vivo* methods for determining the ribonomic profile of a cell and detecting changes in the same. The invention has numerous uses, including but not limited to the monitoring of tumor development, state of growth or state of development, perturbations of a biological system such as disease, drug or toxin treatment, and the state of cell aging or death. The invention also finds use in distinguishing ribonomic profiles amongst organisms such as plant, fungal, bacterial, viral, protozoan, or animal species.

The present invention can be used to discriminate between transcriptional and post-transcriptional contributions to gene expression and to track the movement of RNAs through RNP complexes, including the interactions of combinations of proteins with RNAs in RNP complexes. Accordingly, the present invention can be used to study the regulation of stability of RNAs. The present invention can be used to investigate the activation of translation of mRNAs as single or multiple species by tracking the recruitment of mRNAs to active polysomes, measuring the sequential, ordered expression of mRNAs, and measuring the simultaneous, coordinate expression of multiple mRNAs. The present invention can also be used to determine the trans-acting functions of RNAs themselves upon contacting other cellular components. These and numerous other uses will be made apparent to the skilled artisan upon study of the present specification and claims.

The following Examples are set forth to illustrate the present invention, and are not to be construed as limiting thereof.

25

**EXAMPLE 1****RNase Protection in a Multiprobe System: Materials and Methods**

It has previously been reported that HuB (Hel-N1) immunoprecipitation, using a g10 epitope tag, resulted in the co-immunoprecipitation of a mRNA, which once amplified by RT-PCR and sequenced, was found to encode NF-M protein (Antic, 1999, *supra*). In this example, the same approach is expanded to using a multiprobe RNase protection assay to rapidly optimize the immunoprecipitation of several endogenous mRNA-protein (mRNP) complexes containing different mRNA-binding proteins. In the multi-probe system, many mRNAs, from mRNP pellets, can be assayed in a single lane of polyacrylamide gel.

*Cell Culture and Transformation.* Murine P19 embryonal carcinoma cells were obtained from the ATCC and maintained in monolayer culture using  $\alpha$ -MEM without phenol red (Gibco-BRL 41061-029) supplemented with 7.5% Bovine Calf



WO 01/48480

PCT/US00/35583

Serum, 2.5% Fetal Bovine Serum (Hyclone) and 100U Penicillin/Streptomycin. Cells were grown in tissue culture flasks or plates that had been pre-coated with 0.1% gelatin (Sigma Chemicals) that was removed prior to use. Monolayer cell cultures were maintained in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

5 P19 cells were stably transfected with a SV40 promoter-driven pAlpha2-gene10-HuB plasmid that ectopically expressed a gene10-tagged neuron-specific HuB protein termed Hel-N2 (Gao *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11207-11211). The transfected plasmid was maintained by supplementing the medium with 0.2 mg/ml G418 (Sigma Chemicals). Although it lacks thirteen amino acids from the  
10 hinge region connecting RNA-recognition motifs (RRMs) 2 and 3 of Hel-N1, the RRM2s are identical and *in vitro* binding experiments have indicated no differences in the AU-rich RNA binding properties of Hel-N1 and Hel-N2 (Gao *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11207-11211; Abe *et al.* (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**, 2011-2016; unpublished results).

15 **Antibodies.** Monoclonal anti-gene 10 (g10) antibodies were produced as previously described (Gao *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11207-11211; Antic *et al.* (1999) *Genes Dev.* **13**, 449-461). Polyclonal sera reactive with HuA were produced as previously described (Levine *et al.* (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 3494-3504; Atasoy *et al.* (1998) *J. Cell Sci.* **111**, 3145-3156). Antibodies reactive with Poly A  
20 binding protein (PABP) were kindly provided by Dr. N. Sonenberg of McGill University (Canada).

**Preparation of Cell-Free Extracts.** Cells were removed from tissue culture plates with a rubber scraper and washed with cold PBS. The cells were resuspended in approximately two pellet volumes of polysome lysis buffer (PLB)  
25 containing 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES pH 7.0, and 0.5% NP-40 with 1 mM DTT, 100 U/mL RNase OUT (GIBCO-BRL), 0.2% vanadyl ribonucleoside complex (VRC)(GIBCO-BRL), 0.2 mM PMSF, 1 mg/mL pepstatin A, 5 mg/mL bestatin, and 20 mg/mL leupeptin added fresh at the time of use. The lysed cells were then frozen and stored at -100°C. At the time of use, the cell lysate was thawed  
30 and centrifuged at 12,000 rpm in a tabletop microfuge for 10 min at 4°C. The supernatant was removed and centrifuged a second time at 16,000 rpm in a tabletop microfuge for 5 min at 4°C before being stored on ice or refrozen at -100°C. The mRNP cell lysate contained approximately 30-50 mg/mL total protein.

**Immunoprecipitations.** For immunoprecipitation, Protein A sepharose beads  
35 (Sigma Biochemicals) were swollen 1:5 v/v in NT2 buffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.05% NP-40) supplemented with 5% bovine serum

WO 01/48480

PCT/US00/35583

albumin. A 300  $\mu$ L aliquot of 1:5 v/v pre-swollen Protein A bead slurry was used per immunoprecipitation reaction and incubated overnight at 4°C with excess immunoprecipitating antibody (typically 5-20  $\mu$ L, depending on the reagent). The antibody-coated Protein A beads were washed 5 times with ice-cold NT2 buffer and resuspended in 900  $\mu$ L of NT2 buffer supplemented with 100 U/mL RNase OUT, 0.2% VRC, 1 mM DTT, and 20 mM EDTA. The beads were briefly vortexed and 100  $\mu$ L of the mRNP cell lysate was added. The beads were immediately centrifuged and 100  $\mu$ L of the supernatant was removed to represent total cell mRNP lysate (essentially one-tenth the quantity of lysate used in the mRNP immunoprecipitations). The immunoprecipitation reaction and an aliquot removed to represent total cell mRNP lysate were tumbled at room temperature for a time period of from zero time to up to two hours. Following incubation, the Protein A beads were washed four times with ice-cold NT2 buffer followed by two washed with NT2 buffer supplemented with 1 M urea. Washed beads were resuspended in 100  $\mu$ L NT2 buffer supplemented with 0.1% SDS and 30  $\mu$ g proteinase K and incubated for 30 min in a 55°C water bath. Following proteinase K digestion, immunoprecipitated RNA was isolated with two phenol/chloroform/isoamyl alcohol extractions and ethanol precipitated.

*RNase Protection Assays.* After mRNP complexes were immunoprecipitated from cell lysates and the bound RNA extracted, it was assayed by RNase protection using the Pharmingen Riboquant assay (San Diego, CA) according to the manufacturer's instructions (45014K). Briefly, extracted RNA was hybridized with excess <sup>32</sup>P-labeled riboprobes generated from templates specific for mRNAs encoding L32, GAPDH, several murine Myc-related proteins (template set 45356P) and cyclins (template set 45620P). Non-duplexed RNA was digested by treatment with RNase A+T1. The resulting fragments were resolved by denaturing polyacrylamide/urea gel electrophoresis. Because the length of the riboprobe for each mRNA species was a unique size, all detectable mRNA species in a sample could be resolved in a single gel lane. Protected riboprobe fragments were visualized on a phosphorimaging screen (Molecular Dynamics) after 24 hours of exposure. Phosphorimages were scanned using the Molecular Dynamics STORM 860 System at 100 micron resolution and analyzed using Molecular Dynamics ImageQuant Software (V 1.1).

WO 01/48480

PCT/US00/35583

## EXAMPLE 2

## RNase Protection in a Multiprobe System: Experimental Results

Figure 3 shows an immunoprecipitation of HuB and Poly-A binding protein (PABP)-mRNP complexes from extracts of murine P19 cells stably transfected with g10-HuB cDNA. No mRNAs were detected in pellets immunoprecipitated with polyclonal pre-bleed rabbit sera (Figure 3A and 3B, lane 3), or with many other rabbit, mouse, and normal human sera tested with this assay (data not shown). The profiles of mRNAs associated with HuB mRNP complexes included *n-myc*, *1-myc*, *b-myc*, *max* and cyclins A2, B1, C, D1, and D2, but not *sin3*, cyclin D3, cyclin B2, L32 or GAPDH mRNAs (Figure 3A and 3B, lane 4). In contrast, the profiles of mRNAs extracted from PABP-mRNP complexes resembled the profiles of total RNA, but showed enriched levels of L32 and GAPDH and decreased levels of *sin3* mRNA (Figure 3A and 3B, lane 5). It was concluded that antibodies reactive with these cellular RNA-binding proteins could be used to immunoprecipitate mRNP complexes and to recover mRNAs with which they are specifically associated. These results are consistent with the postulate role of Hu proteins in regulating post-transcriptional gene expression during cell growth and differentiation. (Jain *et al.* (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17, 954-962; Levy *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 6417-6423; Fan and Steitz (1998) *EMBO J.* 17, 3448-3460; Peng *et al.* (1998) *EMBO J.* 17, 3461-3470; Antic and Keene (1997) *Am. J. Hum. Genet.* 61, 273-278; Levine *et al.* (1993) *Mol. Cell Biol.* 13, 3494-3504; Gao *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 11207-11211; King *et al.* (1994) *J. Neurosci.* 14, 1943-1952; Liu *et al.* (1995) *Neurology* 45, 544-550; Ma *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 8144-8151; Abe *et al.* (1996) *Nucl. Acids Res.* 24, 2011-2016; Antic *et al.* (1999) *Genes Dev.* 13, 449-461; Chung *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 6593-6598; Akamatsu *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9884-9890; Sachs *et al.* (1997) *Cell* 89, 831-838; Aranda-Abreu *et al.* (1999) *J. Neurosci.* 19, 6907-6917).

## EXAMPLE 3

Identification of mRNA Subsets Associated with RNA Binding Proteins  
En Masse Using cDNA Arrays: Materials and Methods

To further expand the ability to identify the mRNAs associated in endogenous mRNP complexes, this example describes the use of a cDNA array filter as a highly specific and sensitive method to detect a mRNA subset without amplification or iterative selection (Figure 4).

WO 01/48480

PCT/US00/35583

- Antibodies.* Monoclonal anti-gene 10 (g10) antibodies were produced as previously described (see D. Tsai *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8864-8868 (1992); Gao *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11207-11211; Antic *et al.* (1999) *Genes Dev.* **13**, 449-461). Polyclonal sera reactive with Hu proteins were produced as previously described (Levine *et al.* (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 3494-3504; Atasoy *et al.* (1998) *J. Cell Sci.* **111**, 3145-3156). Antibody against 5'cap binding protein (eIF-4E) was obtained from Transduction Laboratories (San Diego, CA). Antibodies reactive with Poly A binding protein (PABP) were kindly provided by Dr. N. Sonenberg of McGill University (Canada).
- Cell Culture and Differentiation.* Preparation of transgenic cells was as described in Example 1. Chemical treatment with retinoic acid (RA) was used to induce neuronal differentiation by treating  $5 \times 10^5$  P19 cells, placed in a 60 mm petri dish (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA, Number 8-757-13A), with 0.5  $\mu$ M RA (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA, Number R2625), as described in Gao and Keene (1996). After two days, 25% of the cells that had formed into clumps were removed, placed in new petri dishes, and supplemented with fresh medium and RA. Following an additional two days, cell aggregates were washed once with phosphate-buffered saline (PBS) and trypsinized. The cells were then plated into two 100 mm gelatin-coated tissue culture plates. Cells were harvested after an additional four days. The RA treated HuB (Hei-N2) stably transfected P19 cells grew neurites and displayed characteristic neuronal markers and morphology, but did not terminally differentiate and remained susceptible to killing with mitotic inhibitors. Cell-free extracts and immunoprecipitations were as described in Example 1.
- cDNA Array Analysis.* cDNA array analysis was performed using Atlas<sup>TM</sup> Mouse Arrays (Clontech, Inc., Palo Alto, CA) that contain a total of 597 cDNA segments spotted in duplicate, side-by-side on a nylon membrane. Probing of cDNA arrays was performed as described in the Clontech Atlas<sup>TM</sup> cDNA Expression Arrays User Manual (PT3140-1). Briefly, RNA was extracted from HuB stably transfected P19 embryonal carcinoma cells and used to produce reverse transcribed probes. A pooled set of primers, complementary to the genes represented on the array, was used for the reverse transcription probe synthesis, which was radiolabeled with <sup>32</sup>P  $\alpha$ -dATP. The radiolabeled probe was purified by passage over CHROMA SPIN<sup>TM</sup> 200 columns (Clontech, Inc., Palo Alto, CA) and incubated overnight with an array membrane using ExpressHyb<sup>TM</sup> hybridization solution (Clontech, Inc., Palo Alto, CA). Following hybridization, the array membrane was washed and visualized on a phosphorimaging screen (Molecular Dynamics, Sunnyvale, California, USA).

WO 01/48480

PCT/US00/35583

Phosphorimages were scanned using the Molecular Dynamics STORM 860 System at 100 micron resolution and stored as files. Images were analyzed using AtlasImage™ 1.0 and 1.01 software (Clontech, Inc., Palo Alto, CA). The signal for any given gene was calculated as the average of the signals from the two duplicate cDNA spots. As described in the AtlasImage™ 1.0 software manual (Clontech, Inc., Palo Alto, CA), a default external background setting was used in conjunction with a background-based signal threshold to determine gene signal significance. The signal for a gene was considered significantly above background if its adjusted intensity (total signal minus background) was more than two-fold the background signal. Comparisons of multiple cDNA array images were performed using an average of all the gene signals on the array (global normalization) to normalize the signal intensity between arrays. Changes in the mRNA profile of HuB mRNP complexes in response to retinoic acid treatment were considered significant if they were four-fold greater (twice the stringency typically used for establishing significance of a gene expression change). cDNA array images and overlays were prepared using Adobe Photoshop® 5.0.2 (San Jose, California, USA).

#### EXAMPLE 4

##### 20 Identification of mRNA Subsets Associated with RNA Binding Proteins En Masse Using cDNA Arrays: Experimental Results

*Results.* After assessing the overall gene expression profile of HuB transfected P19 cells (the transcriptome), HuB and PABP mRNA complexes, as well as eIF-4E mRNP complexes were separately immunoprecipitated and captured mRNAs were identified on cDNA arrays. The initial alignment of these arrays was facilitated by spiking the hybridization reaction with radiolabeled lambda phage markers that hybridized with six DNA spots on the bottom of the array membrane. Once the alignment register was established, subsequent blots did not require the use of spiked lambda markers for orientation.

Arrays generated from immunoprecipitations with rabbit pre-bleed sera were essentially blank with the exception of the spiked lambda markers observed at the bottom of the array (Figure 5A). Immunoprecipitated HuB mRNP and eIF-4E mRNP complexes each contained slightly more than 10% of the mRNAs detected in total cell RNA, but differed considerably from one another (Figure 5B, 5C, and 5E).

Like HuB and eIF-4E, PABP has been implicated in facilitating mRNA stabilization and translation (Ross (1995) *Microbiol. Rev.* 59, 423-450; Ross (1996) *Trends Genet.* 12, 171-175; Wickens *et al.* (1996) in *Translational control*, eds Hershey, J.W.B., Mathews, M.B. & Sonenberg, N., Cold Spring Harbor Laboratory

WO 01/48480

PCT/US00/35583

Press, Cold Spring Harbor, pp. 411-450; Sachs *et al.* (1997) *Cell* **89**, 831-838). Not surprisingly, PABP mRNPs contained many more detectable mRNAs than those observed in the HuB or eIF-4E mRNPs (**Figure 5D**). As expected, the profile of the mRNAs in the PABP mRNPs from these cells closely resembled that of the transcriptome. However, as was seen for HuB and eIF-4E mRNPs, some mRNAs were enriched or depleted in the PABP-mRNPs as compared to the total RNA (**Figure 5D and 5E**). The profiles and relative abundance of mRNAs detected in these mRNP complexes were highly reproducible, but the absolute number of mRNA species detectable on the phosphorimages occasionally varied as a result of differences in the specific activity of the probe.

Because the cDNA arrays derived using total RNA were generated using one-tenth the quantity of lysate used for mRNP immunoprecipitations, a comparison of the absolute quantities of each mRNA detected in mRNP complexes with those observed in the total RNA was not conducted. A more accurate result was obtained by comparing the *relative* abundance of each mRNA species to each other within each microarray. For example, the relative abundance of the mRNA encoding  $\beta$ -actin and ribosomal protein S29 (**Figure 5**, arrows a and b, respectively) are approximately equal to the total cellular RNA, but varied dramatically among each of the mRNP complexes. Many other examples of this distinction are readily apparent in **Figure 4**. These findings indicated that the mRNA profiles detected in HuB, eIF-4E, and PABP mRNP complexes are distinct from one another and from those of the transcriptome.

#### EXAMPLE 5

##### Alterations in mRNP complexes in response to retinoic acid (RA)

Since HuB is predominantly a neuronal protein believed to play a role in regulating neuronal differentiation, studies were conducted to investigate whether the mRNA population found in HuB mRNP complexes changes in response to RA, a chemical inducer of neuronal differentiation. HuB transfected P19 cells were treated with RA to induce the onset of neuronal differentiation, HuB mRNP complexes were immunoprecipitated, and then associated mRNAs were identified on cDNA arrays. Comparison of the mRNA profiles extracted from the HuB mRNPs before and after RA treatment revealed that eighteen mRNAs were either exclusively present or greatly enriched (four-fold or greater) in RA-treated HuB mRNPs (**Figure 6A, 6B, and 6C**, red bars). In addition, three mRNAs (T-lymphocyte activated protein, DNA-binding protein SATB1, and HSP84) decreased in abundance by four-fold or greater in response to RA treatment (**Figure 6C**, blue bars). To determine if the changes

WO 01/48480

PCT/US00/35583

observed in the mRNA profile of the HuB mRNA complexes were unique, the ubiquitously expressed ELAV family member HuA (HuR) was immunoprecipitated from these RA treated cells. Although there were a few changes to the HuA mRNP profile following treatment with RA, they were minor in comparison with HuB.

5 The changes in the HuB-associated mRNA profile in response to RA treatment did not merely reflect changes in the total cellular mRNA (Figure 6G, 6H, and 6I). Numerous examples of differentially-enriched or depleted mRNAs detected in HuB mRNP complexes are evident by comparing Figure 6C and 6I. For comparative purposes, this is depicted in Figure 7 by realignment and enlargement of representative spots. For example, IGF-2 mRNA was detectable only in total RNA and HuB mRNP complexes from RA-treated cells (Figure 7). However, other HuB-mRNP-bound mRNAs, such as integrin beta, cyclin D2, and Hsp84 increased or decreased in abundance disproportionately to their changes in the total RNA profile following RA treatment (Figure 7). The disparity between changes in the mRNA profiles of total RNA and HuB mRNPs possibly results from changes in compartmentalization of mRNAs that flux dynamically through mRNP complexes in response to RA treatment. It can be concluded that the mRNA profiles derived from these mRNP complexes are dynamic and can reflect the state of growth, as well as changes in the cellular environment in response to a biological inducer like retinoic acid.

#### EXAMPLE 6 In vivo Target Sequence Preferences For RNA-Binding Proteins

25 Using GenBank and EST databases, the 3' UTR sequences from mRNAs enriched in RA-treated HuB-mRNP complexes were identified (TABLE 2).

TABLE 2

| Gene      | 3'-UTR Consensus Sequence           |
|-----------|-------------------------------------|
| CD44      | UUUUCUAUCCUUUUUUUUUUAUUGUCAUUUUUUUA |
|           | UAAAAACCAAUUUGAUU GGCUCUAAACA       |
| IGF-2     | UAAAGAAUUUAAUU GGCUAAAAACAUA        |
|           | CUAAAAUUUAAUU GGCUUAAAAA            |
|           | UCACUCUUUUUUUU AU                   |
| HOX 2.5   | AAAUUUUUUA AGUUA                    |
|           | AUCAGGUUCAUUU UGGUUGU               |
| Inhibitor | AUUUUUUCU GUUA                      |
| J6        | UUUUUUUUUCUCCUUUUUUUAGUUU UUUCAAA   |
|           | UAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGGU CUUUUAU  |
| GADD45    | UUAAAAUCUCAGAAGUUUUUUUA UAAAUUUU    |
|           | UUCUGUAAAAUUUUUUUUU ACUGCUUUUUUUUU  |
| Nexin 1   | AUUUUUAUAGUUUUUUGU UUUUAUGGAAAA     |
|           | AUUUGCCUUUUUAAUU CUUUUU             |

WO 01/48480

PCT/US00/35583

|                                    |                                                                       |
|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| <b>Egr-1</b>                       | U A U U U U G U G G U U U U A U U U U U A C U U U G U A C U U         |
| <b>Zif 268</b>                     | U U U U G U U U U U C C U U                                           |
|                                    | U U U U U U A U U U U C U G U A U U U U U U                           |
| <b>Neuronal-<br/>Cadherin</b>      | U U U U U U U A A A U U U U U U A U U U U U C U U U U U U             |
|                                    | U U U U U U A U U U U C U G U A U U U U U U                           |
|                                    | U U U U U A A U U U U U A A U U U U U U U U                           |
| <b>Integrin<br/>alpha 5</b>        | A A U G G U U U A U U U U A U G A U                                   |
|                                    | U U G U U U A U U U C U U C A A U                                     |
| <b>SEF2</b>                        | U U C A A G C G C U U G A N U U                                       |
| <b>CFZr</b>                        | U G C A U C G A U C C G U U G A U U U A C U A C U                     |
| <b>Integrin<br/>beta</b>           | U A U A A U U U U U A A U U U U U A U U U U U U U U U U               |
|                                    | U A U U U U A C C U U U U U U U U U U U C U U U A A U U C C U G G U   |
| <b>CTCF</b>                        | U U A U G A A U G U U A U A U U U G U                                 |
|                                    | U C U U A A U U U U U U C U C U U U U U U U U U C U                   |
|                                    | U U U U U U U U U C C U U U A A U U U G U A A A U G G U U C U U U     |
|                                    | U U A A U G A U C A U U C A G A U G U A U A U A U U U G U U C C U U U |
|                                    | U U C A A U U U U U U U A U A U A C U A U C U U                       |
| <b>TGF beta 2</b>                  | U U U U U C - U U U A A U U G G U U U U U U M T P - - - -             |
|                                    | U G U C U U G U T C U G A G C A U U A U U U U U A C A A               |
|                                    | U U C U C G U C U U G U U A U U U U U A C A A                         |
|                                    | U A U A A A A A U A G U U A U G U U U U G G A U G U U U G G U         |
| <b>Cyclin D2</b>                   | A U G U C U U G U U C U U U G U G U U U U A G G A U                   |
|                                    | (A U / G A) U U U A U U U (U A / A G)                                 |
| <b>In Vitro Consensus Sequence</b> |                                                                       |

Many of the mRNAs for which 3' UTR sequences were available contained similar uridylylate-rich motifs as those previously found to bind to Hu protein *in vitro* (Levine *et al.* (1993) *Mol. Cell Biol.* **13**, 3494-3504; Gao *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11207-11211; King *et al.* (1994) *J. Neurosci.* **14**, 1943-1952; Liu *et al.* (1995) *Neurology* **45**, 544-550; Ma *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 3564-3569; Fan *et al.* (1997) *Genes Dev.* **11**, 2557-2568). Moreover, most of these mRNAs encode proteins that are expressed in neuronal tissues or are known to be up-regulated following RA-induced neuronal differentiation (Beck *et al.* (1995) *Neuron* **14**, 717-730; Colon and Rossant (1992) *Development* **116**, 357-368; Graham *et al.* (1991) *Development* **112**, 255-264; Hirsch *et al.* (1994) *Dev. Dyn.* **201**, 108-120; Hunt *et al.* (1991) *Development* **112**, 43-50; Janssen-Timmen *et al.* (1989) *Gene* **80**, 325-336; Kondo *et al.* (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 5729-5735; Konishi *et al.* (1994) *Brain Res.* **649**, 53-61; Neuman *et al.* (1993) *Eur. J. Neurosci.* **5**, 311-318; Okuda *et al.* (1995) *Genomics* **29**, 623-630; Soosaar *et al.* (1994) *Bran Res. Mol. Brain Res.* **25**, 176-180; Takechi *et al.* (1992) *Eur. J. Biochem.* **206**, 323-329; Telford *et al.* (1990) *Mol. Reprod. Dev.* **27**, 81-92; Zwartkrius *et al.* (1993) *Exp. Cell Res.* **205**, 422-425; Tomaselli *et al.* (1988) *Neuron* **1**, 33-43; Redies (1995) *Exp. Cell Res.* **220**, 243-256; Ross *et al.* (1996) *J. Neurosci.* **16**, 210-219). The sequence alignment shown in **TABLE 3** is consistent with the previous results of Levine *et al.* ((1993) *Mol. Cell Biol.*



WO 01/48480

PCT/US00/35583

13, 2494-3504) and Gao *et al.* ((1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11207-11211) who used *in vitro* selection to derive a consensus RNA-binding sequence for HuB. Using the methods described herein, it is possible to discern *in vivo* target sequence preferences for other RNA-binding proteins.

5

**EXAMPLE 7****Use Of mRNA Binding Proteins To Purify Endogenous mRNP Complexes And To Identify Associated mRNAs *En Masse* Using cDNA Array Analysis**

10 Earlier attempts to identify mRNA targets of the HuB protein using high-throughput methods required RT-PCR amplification and *in vitro* iterative selection and identified several structurally related ERG mRNAs from neuronal tissues (Gao *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11207-11211; Andrews and Keene (1999) *Methods Mol. Biol.* **118**, 233-244). Most of these mRNAs contained ARE-like  
15 sequences in their 3'-UTRs, which is a characteristic of ERG mRNAs (Keene (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5-7; Levine *et al.* (1993) *Mol. Cell Biol.* **13**, 3494-3504; Gao *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11207-11211; King *et al.* (1994) *J. Neurosci.* **14**, 1943-1952). It has been demonstrated that Hu proteins can bind ERG mRNAs and affect their stability and/or translational activation (Jain *et al.* (1997) *Mol. Cell Biol.* **17**, 954-962; Levy *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 6417-6423; Fan and Steitz (1998) *EMBO J.* **17**, 3448-3460; Peng *et al.* (1998) *EMBO J.* **17**, 3461-3470; Keene (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5-7; Levine *et al.* (1993) *Mol. Cell Biol.* **13**, 3494-3504; Gao *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11207-11211; King *et al.* (1994) *J. Neurosci.* **14**, 1943-1952; Liu *et al.* (1995)  
25 *Neurology* **45**, 544-550; Chung *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 6593-6598; Antic *et al.* (1999) *Genes Dev.* **13**, 449-461; Ma *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 3564-3569; Aranda-Abreu *et al.* (1999) *J. Neurosci.* **19**, 6907-6917). The *in vitro* approach of Gao *et al.* ((1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11207-11211) yielded a distinct mRNA subset from human brain and medulloblastoma cells with ERG sequence  
30 characteristics. This more direct *in vivo* approach obviates the need for *in vitro* binding and PCR amplification. Moreover, this new approach allows the identification of mRNA transcripts with linked structural and functional properties, many of which would not be detected (and could not be detected) using *in vitro* techniques. In addition, recognizable HuB protein-RNA binding sequences were  
35 identified within the *in vivo*-captured mRNA subset (TABLE 2).

The foregoing examples are illustrative of the present invention, and are not to be construed as limiting thereof. The invention is described by the following claims, with equivalents of the claims to be included therein.

WO 01/48480

PCT/US00/35583

## THAT WHICH IS CLAIMED IS:

1. A method of partitioning endogenous cellular mRNA-protein (mRNP) complexes, comprising:  
contacting a biological sample comprising a mRNA-protein (mRNP) complex with at least one ligand that specifically binds at least one component of the mRNP complex;  
5 separating the mRNP complex by binding the ligand with a binding molecule specific for the ligand, wherein the binding molecule is attached to a solid support; and then  
collecting the mRNP complex by removing the mRNP complex from the solid support.  
10
2. The method according to Claim 1, wherein the biological sample comprises a cell culture or a cell extract.
3. The method according to Claim 1, wherein the biological sample comprises whole tissue.
4. The method according to Claim 1, wherein the biological sample comprises a whole organ.
5. The method according to Claim 1, wherein the biological sample comprises a tumor.
6. The method according to Claim 1, wherein the biological sample comprises a tumor cell or a tumor cell extract.
7. The method according to Claim 1, wherein the biological sample comprises a population of neurons.
8. The method according to Claim 1, wherein the ligand is an antibody.
9. The method according to Claim 1, wherein the ligand is an antibody isolated using the serum of a subject with cancer.

WO 01/48480

PCT/US00/35583

10. The method according to Claim 1, wherein the ligand is an antibody isolated using the serum of a subject with an autoimmune disorder.
11. The method according to Claim 1, wherein the binding molecule is an antibody.
12. The method according to Claim 1, wherein the binding molecule is selected from the group consisting of Protein A, Protein G, and streptavidin.
13. The method according to Claim 1, wherein the component of the mRNP complex is nucleic acid.
14. The method according to Claim 1, wherein the component of the mRNP complex is RNA.
15. The method according to Claim 1, wherein the component of the mRNP complex is mRNA.
16. The method according to Claim 1, wherein the component of the mRNP complex is mature mRNA.
17. The method according to Claim 1, wherein the component of the mRNP complex is a RNA-binding protein.
18. The method according to Claim 1, wherein the component of the mRNP complex is a RNA-associated protein.
19. The method according to Claim 18, wherein the RNA-associated protein associates with the mRNP complex with a  $K_d$  of about  $10^{-6}$  to about  $10^{-9}$ .
20. The method according to Claim 18, wherein the RNA-associated protein associates with the mRNP complex with a  $K_d$  of about  $10^{-7}$  to about  $10^{-9}$ .
21. The method according to Claim 18, wherein the RNA-associated protein associates with the mRNP complex with a  $K_d$  of about  $10^{-8}$  to about  $10^{-9}$ .

WO 01/48480

PCT/US00/35583

22. The method according to Claim 1, wherein the component of the mRNP complex is selected from the group consisting of carbohydrates, lipids, and vitamins.
23. The method according to Claim 1, further comprising identifying the mRNA bound within the mRNP by separating the mRNA from the mRNP complex, obtaining a cDNA of the mRNA and then sequencing the cDNA.
24. The method according to Claim 23, wherein said identifying is carried out on a cDNA microarray.
25. The method according to Claim 1, wherein the ligand is an ELAV/Hu protein selected from the group consisting of HuA, HuB, HuC and HuD.
26. The method according to Claim 1, wherein the ligand is an antibody specific for at least one component of the mRNP complex, and the mRNP complex is separated by immunoprecipitation.
27. The method according to Claim 1, wherein a plurality of ligands is contacted with the biological sample to isolate a plurality of mRNP complexes.
28. The method according to Claim 1, further comprising cross-linking the mRNP complex prior to contacting the mRNP complex with the ligand.
29. The method according to Claim 1, further comprising cross-linking the ligand with the mRNP complex after contacting the mRNP complex with the ligand.
30. A method of isolating a protein that binds or associates with a mRNP complex, comprising:  
obtaining a cDNA from a RNA of interest;  
ligating the cDNA to a tagging DNA that encodes a binding partner for a  
5 ligand when the tagging DNA is expressed in a cell;  
expressing the cDNA and the tagging DNA in a cell to produce a RNA fusion molecule comprising the binding partner for the ligand;  
contacting a lysate of the cell with the ligand, wherein the ligand is attached to a solid support and binds the binding partner, thereby attaching the RNA fusion  
10 molecule to the support ;
- 35

WO 01/48480

PCT/US00/35583

collecting the RNA fusion molecule by separating the molecule from the support; and then  
separating any protein that has bound or associated with the RNA of interest.

31. The method according to Claim 30, further comprising identifying the protein that has bound or associated with the RNA of interest.

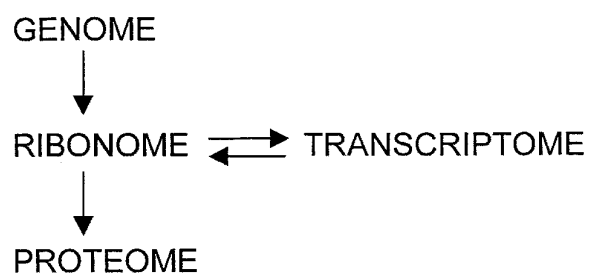
32. A method of generating a gene expression profile of a cell *in vivo*, comprising:  
partitioning a plurality of mRNP complexes from the cell according to Claim 1;  
isolating the mRNP complexes, wherein the mRNA bound to each mRNP  
5 comprises a subset of the mRNA of the cell; and then  
identifying the mRNAs of each subset, whereby the gene expression profile of the cell comprises the presence of each subset of mRNA and the identities of each subset of mRNA.

33. A method of screening a test compound for its ability to modulate gene expression in a cell, comprising:  
generating a first gene expression profile of a cell according to the method of Claim 32, wherein the cell has been contacted with a test compound;  
5 generating a second gene expression profile of a cell according to the method of Claim 32, wherein the cell has not been contacted with the test compound; and then  
observing the difference, if any, between the first and second gene expression profile, the presence of a difference between the first and second gene  
10 expression profile indicates that the test compound can modulate gene expression in the cell.

WO 01/48480

PCT/US00/35583

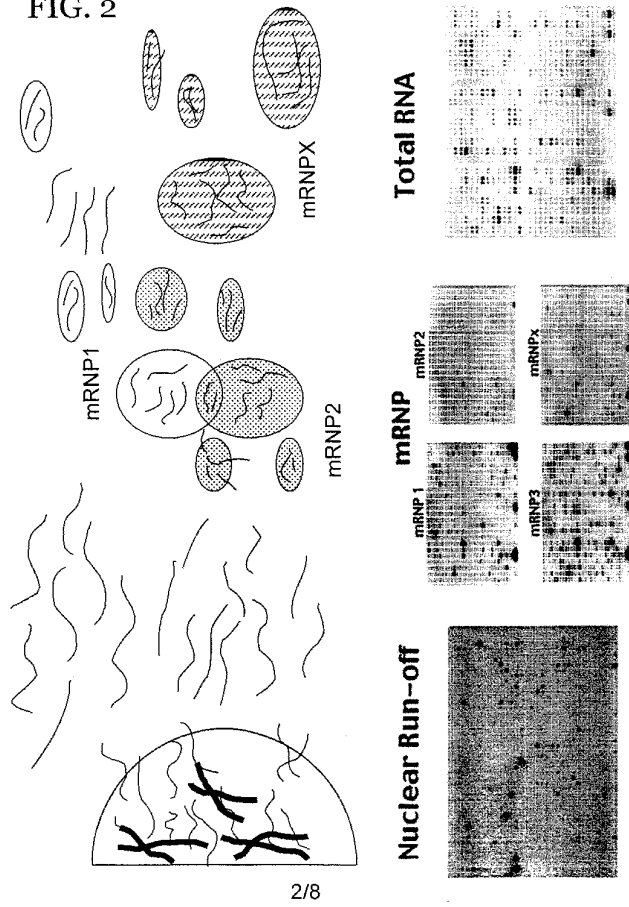
FIG. 1



WO 01/48480

PCT/US00/35583

FIG. 2



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/48480

PCT/US00/35583

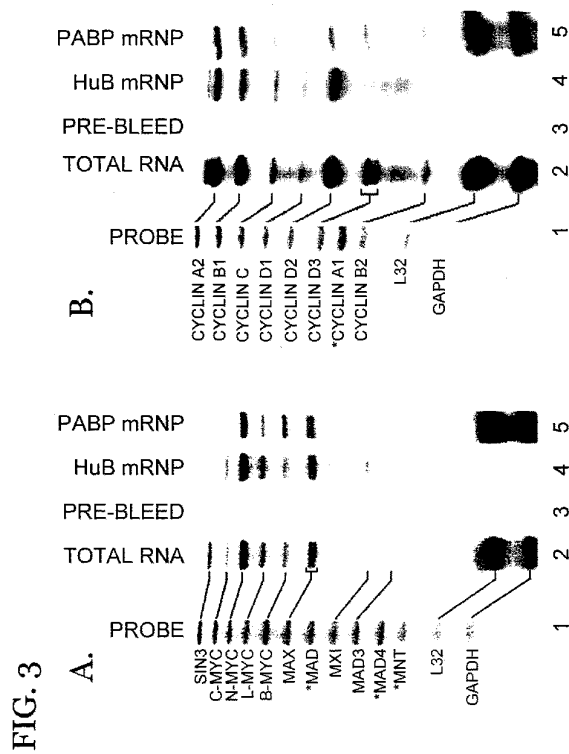
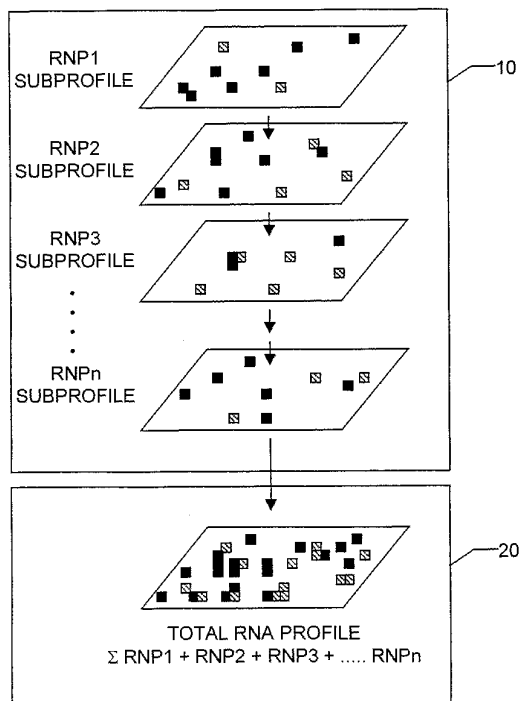




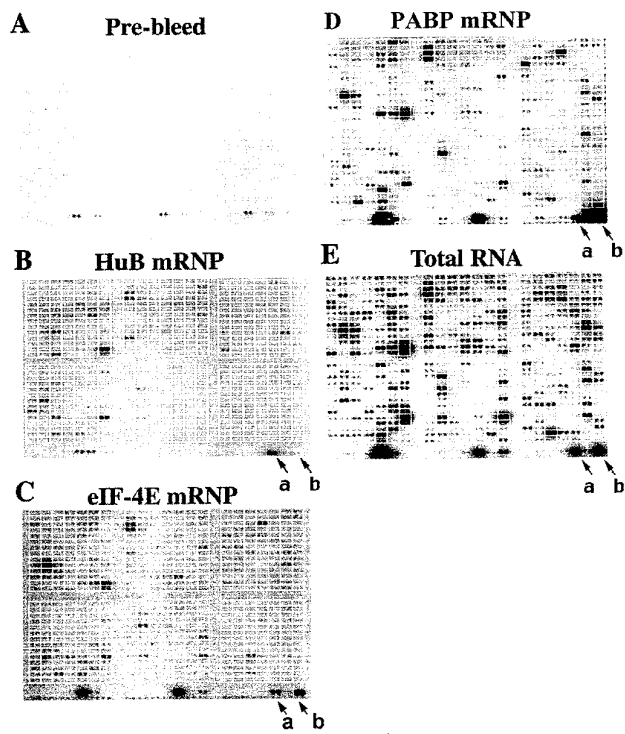
FIG. 4



WO 01/48480

PCT/US00/35583

FIG. 5

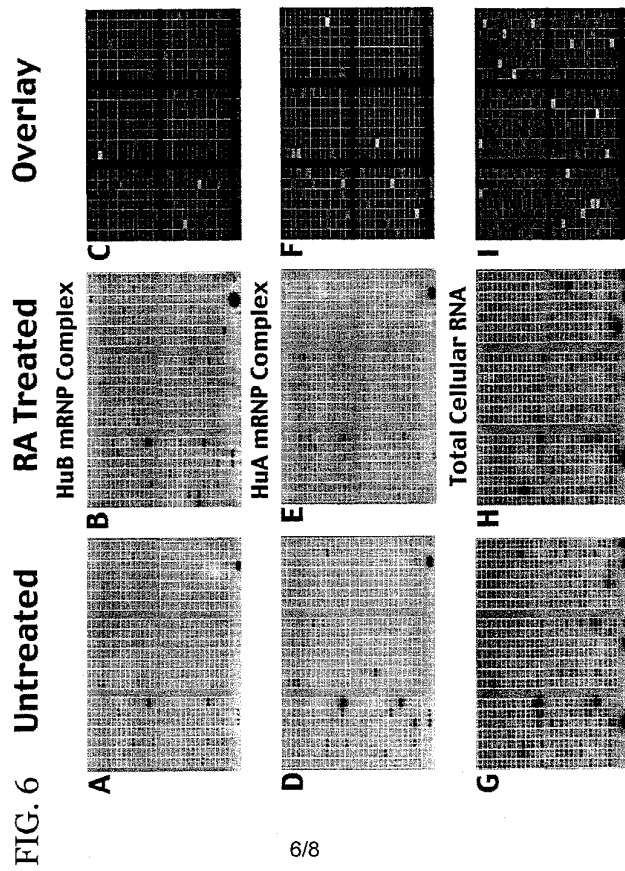


5/8

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/48480

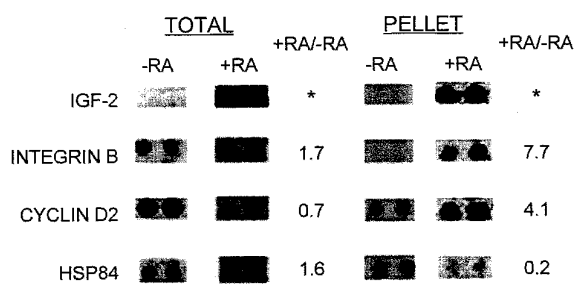
PCT/US00/35583



WO 01/48480

PCT/US00/35583

FIG. 7



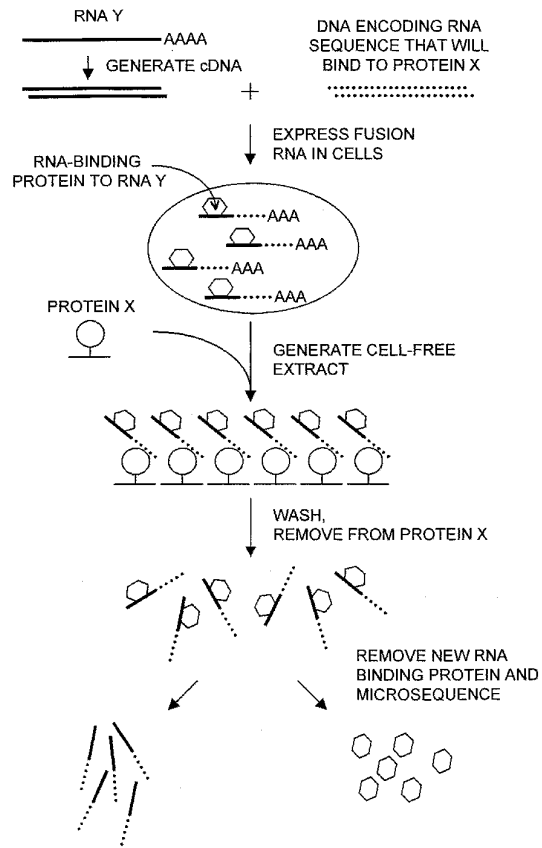
7/8

SUBSTITUTE SHEET (RULE 25)

WO 01/48480

PCT/US00/35583

FIG. 8



8/8

## 【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                    | International Application No.<br>PCT/US 00/35583                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC 7 G01N33/53 C12Q1/68                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                    |                                                                  |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                    |                                                                  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC 7 G01N C12Q                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                    |                                                                  |
| 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)<br>EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                    |                                                                  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                    |                                                                  |
| Category *                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                 | Relevant to claim No.                                            |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | US 5 773 246 A (GAO FENBIAO ET AL)<br>30 June 1998 (1998-06-30)<br>claims                                                                          | 30-32                                                            |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | US 5 541 291 A (KEENE JACK D)<br>30 July 1996 (1996-07-30)<br>abstract; claims                                                                     | 1-33                                                             |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | WO 94 06934 A (UNIV DUKE ;KEENE JACK D<br>(US); KENAN DANIEL J (US); TSAI DONALD E<br>( ) 31 March 1994 (1994-03-31)<br>abstract; claims; figure 1 | 1-29                                                             |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | US 5 444 149 A (KEENE JACK D ET AL)<br>22 August 1995 (1995-08-22)<br>abstract; claims<br>---<br>-/-                                               | 1-33                                                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                    |                                                                  |
| * Special categories of cited documents:<br>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>*E* earlier document but published on or after the international filing date<br>*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 (see specification)<br>*C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>*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<br>*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<br>*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<br>*&* document member of the same patent family |                                                                                                                                                    |                                                                  |
| Date of the actual completion of the international search<br>18 April 2001                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                    | Date of mailing of the international search report<br>31/05/2001 |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.O. Box 5818 Patenlaan 2<br>NL - 2280 LV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl<br>Fax: (+31-70) 340-3010                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                    | Authorized officer<br>GONCALVES M L F C                          |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No  
PCT/US 00/35583

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                       |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category *                                           | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Relevant to claim No. |
| A                                                    | US 5 866 680 A (BENTLEY REX O ET AL)<br>2 February 1999 (1999-02-02)<br>column 2 -column 3<br>-----                                                                                                                                                                                                                                                                        | 1-33                  |
| Y                                                    | US 5 525 495 A (GAO FENBIAO ET AL)<br>11 June 1996 (1996-06-11)<br>column 4, line 47 - line 52; claims<br>-----                                                                                                                                                                                                                                                            | 1-29                  |
| Y                                                    | US 5 561 222 A (KEENE JACK D ET AL)<br>1 October 1996 (1996-10-01)<br>column 2, line 66 -column 3, line 2<br>-----                                                                                                                                                                                                                                                         | 1-29                  |
| A                                                    | TSAI D E ET AL: "IN VITRO SELECTION OF AN<br>RNA EPITOPE IMMUNOLOGICALLY CROSS-REACTIVE<br>WITH A PEPTIDE"<br>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF<br>SCIENCES OF USA,US,NATIONAL ACADEMY OF<br>SCIENCE. WASHINGTON,<br>vol. 89, no. 19,<br>1 October 1992 (1992-10-01), pages<br>8864-8868, XP000306531<br>ISSN: 0027-8424<br>-----                                     |                       |
| P,X                                                  | TENENBAUM SCOTT A ET AL: "Identifying<br>mRNA subsets in messenger<br>ribonucleoprotein complexes by using cDNA<br>arrays."<br>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF<br>SCIENCES OF THE UNITED STATES,<br>vol. 97, no. 26,<br>19 December 2000 (2000-12-19), pages<br>14085-14090, XP000995310<br>December 19, 2000<br>ISSN: 0027-8424<br>page 14086 -page 14089<br>----- | 1-33                  |
| A                                                    | KEENE J: "Methods and compositions useful<br>in the diagnosis and treatment of<br>autoimmune diseases"<br>BIOTECHNOLOGY ADVANCES,GB,ELSEVIER<br>PUBLISHING, BARKING,<br>vol. 15, no. 2, 1997, page 525 XP004074350<br>ISSN: 0734-9750<br>abstract<br>-----                                                                                                                 | 1-33                  |
| A                                                    | CHAMBERS J C ET AL: "ISOLATION AND<br>ANALYSIS OF CDNA CLONES EXPRESSING HUMAN<br>LUPUS LA ANTIGEN"<br>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF<br>SCIENCES OF USA,US,NATIONAL ACADEMY OF<br>SCIENCE. WASHINGTON,<br>vol. 82, 1 April 1985 (1985-04-01), pages<br>2115-2119, XP002033252<br>ISSN: 0027-8424<br>page 2115<br>-----                                            | 1-33                  |

1

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 00/35583

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 5773246 A                              | 30-06-1998          | US 5525495 A               | 11-06-1996          |
|                                           |                     | US 5444149 A               | 22-08-1995          |
|                                           |                     | AU 4231693 A               | 13-12-1993          |
|                                           |                     | WO 9323531 A               | 25-11-1993          |
|                                           |                     | US 5698427 A               | 16-12-1997          |
| US 5541291 A                              | 30-07-1996          | US 4751181 A               | 14-06-1988          |
|                                           |                     | DE 3588082 D               | 28-03-1996          |
|                                           |                     | DE 3588082 T               | 02-10-1996          |
|                                           |                     | DE 3588177 D               | 09-04-1998          |
|                                           |                     | DE 3588177 T               | 29-10-1998          |
|                                           |                     | EP 0205579 A               | 30-12-1986          |
|                                           |                     | EP 0690307 A               | 03-01-1996          |
|                                           |                     | JP 2736322 B               | 02-04-1998          |
|                                           |                     | JP 9166596 A               | 24-06-1997          |
|                                           |                     | JP 2680811 B               | 19-11-1997          |
|                                           |                     | JP 62501314 T              | 21-05-1987          |
|                                           |                     | WO 8604093 A               | 17-07-1986          |
|                                           |                     | US 5721110 A               | 24-02-1998          |
| WO 9406934 A                              | 31-03-1994          | AU 4842693 A               | 12-04-1994          |
| US 5444149 A                              | 22-08-1995          | AU 4231693 A               | 13-12-1993          |
|                                           |                     | WO 9323531 A               | 25-11-1993          |
|                                           |                     | US 5525495 A               | 11-06-1996          |
|                                           |                     | US 5698427 A               | 16-12-1997          |
|                                           |                     | US 5773246 A               | 30-06-1998          |
| US 5866680 A                              | 02-02-1999          | US 5561222 A               | 01-10-1996          |
| US 5525495 A                              | 11-06-1996          | US 5444149 A               | 22-08-1995          |
|                                           |                     | US 5773246 A               | 30-06-1998          |
|                                           |                     | AU 4231693 A               | 13-12-1993          |
|                                           |                     | WO 9323531 A               | 25-11-1993          |
|                                           |                     | US 5698427 A               | 16-12-1997          |
| US 5561222 A                              | 01-10-1996          | US 5866680 A               | 02-02-1999          |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1998)



フロントページの続き

|                          |                |             |
|--------------------------|----------------|-------------|
| (51)Int.Cl. <sup>7</sup> | F I            | テーマコード (参考) |
| G O 1 N 33/566           | G O 1 N 33/53  | M           |
|                          | G O 1 N 33/566 |             |

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,S G,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 キーン, ジャック ディー.  
アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27707, ダラム, ギャレット ロード 6300

(72)発明者 テネンバウム, スコット エイ.  
アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27712, ダラム, パーク オーバールック ドライ  
ブ 3312

(72)発明者 カーソン, クレイグ  
アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27713, ダラム, セドウィック ロード 1329

F ターム(参考) 4B024 AA12 AA20 BA31 CA12 DA02 HA19  
4B063 QA18 QQ53 QR32 QR55 QS14 QS15 QS32  
4D017 AA20 BA03 CA12 DA10  
4H045 AA10 AA20 BA10 BA54 CA41 CA42 EA51 GA26

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                    |         |            |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | <无法获取翻译>                                                                                                                                                                                                                                                                           |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2004520002A5</a>                                                                                                                                                                                                                                                     | 公开(公告)日 | 2008-02-28 |
| 申请号            | JP2001549077                                                                                                                                                                                                                                                                       | 申请日     | 2000-12-28 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 卢武铉核糖核酸公司混合                                                                                                                                                                                                                                                                        |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 卢武铉核糖核酸结构，公司                                                                                                                                                                                                                                                                       |         |            |
| [标]发明人         | キーンジャックディー<br>テネンバウムスコットエイ<br>カーソンクレイグ                                                                                                                                                                                                                                             |         |            |
| 发明人            | キーン, ジャック ディー.<br>テネンバウム, スコット エイ.<br>カーソン, クレイグ                                                                                                                                                                                                                                   |         |            |
| IPC分类号         | C12N15/09 B01D15/08 C07K1/22 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/566                                                                                                                                                                                                                         |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/5008 C07H21/02 C12Q1/6804 C12Q1/6809 C12Q2600/158 G01N33/5023 G01N33/5308<br>G01N33/68 G01N33/6803 G01N33/6845 C12Q2522/101                                                                                                                                                 |         |            |
| FI分类号          | C12N15/00.ZNA.A B01D15/08 C07K1/22 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566                                                                                                                                                                                                   |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B024/AA12 4B024/AA20 4B024/BA31 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/HA19 4B063/QA18 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS14 4B063/QS15 4B063/QS32 4D017/AA20 4D017/BA03 4D017/CA12 4D017/DA10 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/BA10 4H045/BA54 4H045/CA41 4H045/CA42 4H045/EA51 4H045/GA26 |         |            |
| 代理人(译)         | 夏木森下                                                                                                                                                                                                                                                                               |         |            |
| 优先权            | 60/173338 1999-12-28 US                                                                                                                                                                                                                                                            |         |            |
| 其他公开文献         | JP2004520002A<br>JP5002105B2                                                                                                                                                                                                                                                       |         |            |

#### 摘要(译)

细胞mRNA蛋白 ( mRNP ) 复合物在体内通过使生物样品与至少一种结合mRNP复合物的至少一种组分的配体接触而区分。合适的生物样品含有至少一种mRNA蛋白 ( mRNP ) 复合物，包括细胞培养物，细胞提取物和整个组织 ( 包括肿瘤组织 )。配体包含特异性结合mRNP复合物中存在的RNA结合蛋白或RNA相关蛋白的抗体。mRNP复合物的特征在于配体与对配体特异的结合分子结合。其中结合分子与固体支持物连接。通过从固体支持物中除去mRNP复合物来收集mRNP复合物。在收集mRNP复合物后，可以表征和鉴定复合物内结合的mRNA。