



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102018000002411
Data Deposito	05/02/2018
Data Pubblicazione	05/08/2019

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N	15	67

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N	15	113

Titolo

DOMINI STRUTTURALI DI MOLECOLE DI RNA ANTISENSO CHE AUMENTANO LA TRADUZIONE

DESCRIZIONE

del brevetto per invenzione industriale dal titolo:

"DOMINI STRUTTURALI DI MOLECOLE DI RNA ANTISENSO CHE AUMENTANO LA TRADUZIONE"

di 1) 82% SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
- SISSA

di nazionalità italiana

con sede: VIA BONOMEA 265

TRIESTE (TS)

2) 18% TRANSSINE TECHNOLOGIES CO., LTD

di nazionalità giapponese

con sede: 52-35, SAWATARI, KANAGAWA-KU, YOKOHAMA-SHI

KANAGAWA 230-0045 (GIAPPONE)

Inventori: GUSTINCICH Stefano, ZUCHELLI Silvia, PODBEVŠEK Peter, PLAVEC Janez, CARNINCI Piero, TAKAHASHI Hazuki, YAMAZAKI Toshio, OHYAMA Takako, SHARMA Harshita

* * *

Campo tecnico dell'invenzione

La presente invenzione si riferisce a molecole di acido nucleico funzionale comprendenti una sequenza di legame al bersaglio comprendente una sequenza inversa complementare a una sequenza di mRNA bersaglio per cui la traduzione proteica deve essere potenziata; e una sequenza regolatoria avente strutture bidimensionali comprendenti domini specifici a forcina e ad ansa interni e/o strutture

specifiche tridimensionali.

Tecnica anteriore

Grandi progetti genomici come ENCODE e FANTOM hanno dimostrato che la maggior parte del genoma viene trascritto, ma meno del 5% dell'RNA trascritto codifica per proteine. Di fatto, RNA non codificanti lunghi (lncRNA) ed elementi trasponibili (TE) sembrano rappresentare la maggior parte della produzione trascrizionale. Negli ultimi dieci anni, un numero crescente di studi ha svelato le funzioni degli lncRNA. Nel complesso, sta diventando evidente che gli lncRNA agiscono principalmente come molecole regolatorie, nel nucleo e nel citoplasma, attraverso un ampio repertorio di meccanismi. Nonostante questo processo, soltanto una porzione ridotta di lncRNA annotati è stata funzionalmente convalidata.

Recentemente, è stata identificata una nuova classe funzionale di lncRNA antisenso (AS), che aumenta la traduzione di mRNA codificanti proteine con parziale sovrapposizione. Questi RNA sono anche chiamati SINEUP, poiché sono RNA antisenso che contengono elementi SINE che inducono il potenziamento delle traduzioni proteiche.

Uchl1 antisenso (AS), un lncRNA antisenso all'ortologo murino del gene Uchl1/PARK5 umano, può essere considerato l'elemento rappresentativo di SINEUP poiché è stato scoperto aumentare la sintesi proteica di UchL1 che agisce

a livello post-trascrizionale. L'attività di AS Uchl1 dipende dalla combinazione di due domini funzionali: all'estremità 5', la regione con sovrapposizione, indicata come "Dominio di legame", detta la specificità di AS Uchl1 rispetto all'mRNA di Uchl1 ; all'estremità 3', la regione senza sovrapposizione contiene un elemento SINE B2 invertito inserito, che agisce come "Dominio effettore" e innesca il potenziamento della traduzione del mRNA bersaglio legato.

Più di 30 lncRNA antisense promuovono il potenziamento della traduzione di mRNA con parziale sovrapposizione. Scambiando il Dominio di legame, è possibile reindirizzare l'attività di AS Uchl1 verso un mRNA bersaglio desiderato.

Queste molecole naturali e sintetiche sono state denominate SINEUP, poiché richiedono che un elemento SINE B2 potenzi la traduzione e sono illustrati in WO 2012/133947. AS Uchl1 può essere considerato l'elemento rappresentativo di questa nuova classe di lncRNA, in cui un elemento trasponibile inserito è sfruttato come dominio di RNA funzionale per ottenere un potenziamento proteico.

L'elemento SINE B2 invertito è un esempio di dominio di lncRNA ben definito. Studi evolutivi hanno indicato che le sequenze primarie di elementi SINE, come lncRNA in generale, sono di difficile conservazione. La conservazione parziale all'interno di elementi SINE è osservata soltanto

in corrispondenza di A e B box, che, in SINE non inseriti, rappresentano promotori interni per la RNA polimerasi III. In modo interessante, nonostante la scarsa identità di sequenza, almeno elementi SINE B2 murini mostrano una conservazione funzionale poiché un certo numero di sequenze di SINE B2 ha dimostrato di agire come dominio effettore in SINEUP naturali e chimerici. Inoltre è stato identificato un elemento SINE umano ed è stato dimostrato che funziona come SINEUP (Schein A. et al., Sci Rep. (2016), 6:33605).

Ne consegue che è stato ipotizzato che la funzionalità di dominio di un SINE inserito risieda in motivi su base strutturale invece che su base di sequenza.

È stato ipotizzato che il ripiegamento dell'RNA fornisca le informazioni funzionali a lncRNA e TE inseriti. Le sequenze di RNA possono ripiegarsi per formare strutture secondarie e terziarie complesse che sono difficili da prevedere quando è nota soltanto la sequenza nucleotidica primaria. Metodi computazionali per identificare sistematicamente moduli di struttura secondaria di lncRNA sono ancora insoddisfacenti. Gli algoritmi correnti sono in grado di prevedere correttamente circa il 50-70% di coppie di basi note. In modo più importante in assoluto, un valore di precisione del 50-70% nel modello di previsione della struttura secondaria è il risultato della media tra le regioni in cui il modello è corretto e regioni di profonda

incoerenza. Ne consegue che misurare l'effettiva struttura di molecole di RNA in soluzione è l'unico metodo disponibile per poter comprendere le funzioni dell'RNA. Sono disponibili metodi basati sulla modificazione chimica di residui idro-accessibili (footprinting chimico) e basati sulle caratteristiche magnetiche di acidi nucleici (NMR). Più di recente, è stato sviluppato un nuovo approccio biochimico, chiamato icSHAPE (in vivo click selective 2'-hydroxyl acylation and profiling experiment), che consente la prima visione complessiva di strutture secondarie di RNA in cellule viventi per tutte e quattro le basi.

In considerazione di quanto precede, vi è la necessità di identificare se strutture molecolari bidimensionali o tridimensionali specifiche contribuiscono alla funzione di lncRNA al fine di essere in grado di sfruttare efficacemente ed efficientemente queste molecole in un'ulteriore ricerca e nell'ambiente clinico. In particolare, gli lncRNA rappresentano uno strumento ideale per un'ampia gamma di attività di ricerca, dallo studio della funzione genica alla produzione di proteine industriale e per applicazioni *in vivo*, come il trattamento di aplousufficienze.

Sommario dell'invenzione

È uno scopo della presente invenzione identificare la struttura secondaria e terziaria dell'elemento SINE B2

invertito derivato da AS Uchl1 murino, di altri SINE murini e di SINE da specie evolutivamente distanti che sono inseriti in lncRNA funzionali antisenso con parziale sovrapposizione a un gene codificante proteina e attività di potenziamento della traduzione. L'identificazione di motivi nella struttura secondaria e terziaria di queste molecole e la loro combinazione appropriata permetterebbe la progettazione di elementi SINE con aumentata funzione di potenziamento della traduzione.

In aggiunta, l'identificazione di questi motivi e della loro combinazione appropriata può consentire la progettazione di sequenze funzionali più brevi. Di fatto, per applicazioni terapeutiche, il rilascio di SINEUP RNA è una sfida cruciale. Le molecole di RNA sono altamente instabili in organismi viventi. Modificazioni chimiche e/o incapsulamento in nanoparticelle lipidiche sono state ampiamente usate per superare l'instabilità naturale degli RNA. Tuttavia, questi metodi di rilascio si sono dimostrati efficienti per molecole di RNA lungo. La progettazione di varianti più corte del dominio effettore SINE B2 invertito che conserva soltanto elementi strutturali discreti e attivi "pulisce" il dominio effettore da sequenze "non essenziali" per ottenere la molecola di SINEUP RNA attiva più corta.

Questo scopo è raggiunto mediante la molecola di acido

nucleico funzionale come definita nella rivendicazione 1 o 2.

Un altro scopo della presente invenzione è di fornire una molecola di acido nucleico funzionale come definita nella rivendicazione 12.

Breve descrizione dei disegni

La Figura 1 correlata all'Esempio 1 mostra il footprinting chimico della sequenza di SINE B2 invertito da AS Uchl 1 naturale.

La Figura 2 correlata all'Esempio 2 mostra la struttura secondaria della sequenza di SINEB2 invertita da AS Uchl 1 naturale.

La Figura 3 correlata all'Esempio 3 mostra strutture in soluzione di frammenti con estremità terminali delete di RAN di SINE B2 invertito.

La Figura 4 correlata all'Esempio 4 mostra che il primo dominio a forcina (SL-1) contribuisce all'attività di AS Uchl1 mediante Western blot e qRT-PCR.

La Figura 5 correlata all'Esempio 5 mostra che il primo dominio a forcina (SL-1) è richiesto per il potenziamento della traduzione della molecola di acido nucleico di AS Uchl1 in una linea cellulare epatocellulare

umana e con Uchl1-FLAG sovraespresso mediante Western blot e qRT-PCR.

La Figura 6 correlata all'Esempio 6 mostra che il primo dominio a forcina (SL-1) contribuisce all'attività di potenziamento della traduzione del lncRNA antisenso che si sovrappone con l'mRNA di GFP (SINEUP-GFP) in cellule HEK 293T/17 mediante Western blot e qRT-PCR.

La Figura 7 correlata all'Esempio 7 mostra la determinazione della struttura in soluzione del frammento di SINE B2 invertito(38 nt) mediante NMR.

La Figura 8 correlata all'Esempio 8 mostra una regione aromatica-anomerica di uno spettro 2D NOESY NMR ($\tau_m=250$ ms) di invSINEB2/38.

La Figura 9 correlata all'Esempio 9 mostra la mappa di connettività di segnali NMR usati per ricostruire in modo appropriato la struttura 3D del frammento di SINE B2 invertito da 38nt.

La Figura 10 correlata all'Esempio 10 mostra una struttura 3D ad alta risoluzione della regione SL-1 del dominio effettore SINE B2 invertito.

La Figura 11 correlata all'Esempio 11 mostra sequenze correlate sul SINE B2 invertito e l'effetto di queste

delezioni sull'attività del SINE B2 invertito (Western blot e qRT-PCR).

La Figura 12 correlata all'Esempio 12 mostra sequenze mutate sul SINE B2 invertito e l'effetto di queste mutazioni sull'attività del SINE B2 invertito (Western blot e qRT-PCR).

La Figura 13 correlata all'Esempio 13 mostra sequenze mutate su una versione più corta del SINE B2 invertito e l'effetto di queste mutazioni sull'attività del SINE B2 invertito.

La Figura 14 correlata all'Esempio 14 mostra che gli elementi SINEB2 da differenti AS lncRNA murini possono agire come Dominio effettore in miniSINEUP e potenziare l'espressione della proteina GFP in HEK293T (Western blot).

La Figura 15 correlata all'Esempio 15 mostra un allineamento di sequenze ClustalW di elementi SINEB2 da differenti AS lncRNA murini.

La Figura 16 correlata all'Esempio 16 mostra sequenze di SINE da specie evolutivamente distanti che agiscono come dominio effettore in molecole di acido nucleico funzionale antisense con attività di potenziamento della traduzione (Western blot e qRT-PCR).

La Figura 17 correlata all'Esempio 17 mostra la correlazione tra un'attività di potenziamento della traduzione più potente di sequenze di SINE da specie evolutivamente distanti e strutture più complesse.

La Figura 18 correlata all'Esempio 18 mostra l'analisi di motivi strutturali 2D di sequenze di SINE da specie evolutivamente distanti.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Nella presente invenzione, è illustrata - tra le altre cose - la struttura secondaria e terziaria dell'elemento trasponibile SINE B2 invertito derivato da AS Uchl1 come dominio effettore rappresentativo dei SINEUP.

Mutanti di delezione sono usati per dimostrare gli elementi strutturali necessari all'attività di SINEUP.

Inoltre la struttura di sequenze di SINE B2 da lncRNA antisenso con funzione di potenziamento della traduzione (SINEUP naturali) è determinata in cellule viventi.

La relazione struttura-funzione è anche definita sulla base della caratterizzazione biochimica dell'attività di SINEUP e profili di icSHAPE di SINE attivi e inattivi.

Sono illustrati motivi di attività a base strutturale di sequenze di SINE B2.

È illustrata anche l'attività di potenziamento della traduzione di domini effettori funzionali di sequenze di

SINE derivate da specie evolutivamente distanti la cui sequenza primaria non è conservata e i cui elementi strutturali secondari sono noti.

In particolare, esperimenti funzionali indicano che una struttura ad ansa di forcina terminale corta, anche indicata come primo dominio a forcina (SL-1), è il determinante strutturale chiave per l'abilità di SINEUP di potenziare la traduzione di mRNA con sovrapposizione parziale e anche elementi strutturali aggiuntivi sono importanti per l'attività potenziata e discriminano quei SINE che sono più attivi da quelli che sono meno attivi.

Di fatto, una molecola di acido nucleico funzionale della presente invenzione comprende una sequenza di legame al bersaglio comprendente una sequenza inversa complementare a una sequenza di mRNA bersaglio per cui la traduzione proteica deve essere potenziata, e una sequenza regolatoria avente una struttura bidimensionale comprendente un primo dominio a forcina (SL-1) comprendente uno stelo avente da 8 a 12 nucleotidi appaiati e un'ansa comprendente da 5 a 9 nucleotidi. La sequenza regolatoria ha azione di potenziamento della traduzione proteica.

Secondo l'invenzione, è stato dimostrato che, fintanto che è conservata la struttura secondaria, le basi della sequenza primaria possono variare in larga misura.

La sequenza di legame al bersaglio deve avere soltanto

fino a circa il 60% di similarità con una sequenza inversa complementare all'mRNA bersaglio. Infatti, la sequenza di legame al bersaglio può anche presentare un elevato numero di mancati appaiamenti e conservare l'attività. Di fatto, gli miRNA possono influenzare i loro corrispettivi mRNA senso anche avendo un elevato numero di mancati appaiamenti. Questo concetto è stato già dimostrato in WO 2012/133947.

Preferibilmente, lo stelo del primo dominio a forcina (SL-1) è ricco di G/C, per cui per "sequenza ricca di G/C" si intende una sequenza avente più del 50% di G e C, e preferibilmente più del 75% di G e C.

Preferibilmente, l'ansa del primo dominio a forcina (SL-1) è ricca di A/U, per cui per "sequenza ricca di A/U" si intende una sequenza avente più del 50% di A e U, e preferibilmente più del 75% di A e U.

Lo stelo del primo dominio a forcina (SL-1) ha preferibilmente 10 nucleotidi appaiati e l'ansa del primo dominio a forcina (SL-1) ha preferibilmente 7 nucleotidi.

Una molecola di acido nucleico funzionale della presente invenzione comprende una sequenza di legame al bersaglio comprendente una sequenza inversa complementare a una sequenza di mRNA bersaglio per cui la traduzione proteica deve essere potenziata, e una sequenza regolatoria avente una struttura bidimensionale comprendente un primo

dominio a forcina (SL-1) avente una sequenza con almeno il 50% di identità con la SEQ ID NO:1, preferibilmente almeno il 75% di identità con la SEQ ID NO:1, più preferibilmente almeno il 90% di identità con la SEQ ID NO:1.

Nell'elemento trasponibile SINE B2 invertito esemplificato derivato da AS Uchl1, il primo dominio a forcina (SL-1) comprende SEQ ID NO:1, ovvero i nucleotidi 64 a 92 della SEQ ID NO:5 (quest'ultima essendo la sequenza completa dell'elemento trasponibile SINE B2 invertito derivato da AS Uchl1).

Preferibilmente, lo stelo del primo dominio a forcina (SL-1) ha una struttura tridimensionale a elica di tipo A, come dimostrato mediante NMR ad alta risoluzione.

La struttura bidimensionale della sequenza regolatoria comprende anche preferibilmente un secondo dominio a forcina (SL-2) e un quarto dominio ad ansa interno (IL-4), il secondo dominio a forcina (SL-2) comprendendo uno stelo con 2 a 4 nucleotidi appaiati e un'ansa comprendente da 6 a 10 nucleotidi e il quarto dominio ad ansa interno (IL-4) comprendente da 14 a 24 nucleotidi.

Lo stelo del secondo dominio a forcina (SL-2) è preferibilmente ricco di G/C. L'ansa del secondo dominio a forcina (SL-2) e/o il quarto dominio ad ansa interno (IL-4) sono/è preferibilmente ricco di A/U.

Lo stelo del secondo dominio a forcina (SL-2) ha

preferibilmente 3 nucleotidi appaiati e l'ansa del secondo dominio a forcina (SL-2) ha preferibilmente 8 nucleotidi. Il quarto dominio ad ansa interno (IL-4) comprende preferibilmente da 16 a 22 nucleotidi.

Una molecola di acido nucleico funzionale secondo la presente invenzione comprende preferibilmente una sequenza regolatoria avente una struttura bidimensionale comprendente una sequenza con almeno il 50% di identità con la SEQ ID NO:2, preferibilmente almeno il 75% di identità con la SEQ ID NO:2, più preferibilmente almeno il 90% di identità con la SEQ ID NO:2.

Nell'elemento trasponibile SINE B2 invertito esemplificato derivato da AS Uchl1, la sequenza regolatoria comprende la SEQ ID NO:2, ovvero i nucleotidi da 52 a 112 della SEQ ID NO:5.

La struttura bidimensionale della sequenza regolatoria comprende anche preferibilmente un terzo dominio ad ansa interno (IL-3) comprendente da 6 a 14 nucleotidi, preferibilmente da 7 a 13 nucleotidi.

La struttura bidimensionale della sequenza regolatoria comprende anche preferibilmente un terzo dominio a forcina (SL-3) comprendente uno stelo con 1 a 3 nucleotidi appaiati e un'ansa comprendente da 3 a 5 nucleotidi.

La molecola di acido nucleico funzionale della presente invenzione comprende preferibilmente una sequenza

regolatoria avente una struttura bidimensionale comprendente una sequenza con almeno il 50% di identità con la SEQ ID NO:3, preferibilmente almeno il 75% di identità con la SEQ ID NO:3, più preferibilmente almeno il 90% di identità con la SEQ ID NO:3.

Nell'elemento trasponibile SINE B2 invertito esemplificato derivato da AS Uchl1, la sequenza regolatoria comprende la SEQ ID NO:3, ovvero i nucleotidi da 36 a 133 della SEQ ID NO:5.

La struttura bidimensionale della sequenza regolatoria comprende preferibilmente anche un secondo dominio ad ansa interno (IL-2) comprendente da 6 a 12 nucleotidi, preferibilmente da 7 a 11 nucleotidi. Il secondo dominio ad ansa interno (IL-2) è preferibilmente asimmetrico e/o ricco di A/U.

La molecola di acido nucleico funzionale della presente invenzione comprende preferibilmente una sequenza regolatoria avente una struttura bidimensionale comprendente una sequenza con almeno il 50% di identità con la SEQ ID NO:4, preferibilmente almeno il 75% di identità con la SEQ ID NO:4, più preferibilmente almeno il 90% di identità con la SEQ ID NO:4.

Nell'elemento trasponibile SINE B2 invertito esemplificato derivato da AS Uchl1, la sequenza regolatoria comprende la SEQ ID NO:4, ovvero i nucleotidi da 22 a 150

della SEQ ID NO:5.

La struttura bidimensionale della sequenza regolatoria comprende preferibilmente anche un primo dominio ad ansa interno (IL-1) comprendente da 6 a 12 nucleotidi, preferibilmente da 7 a 11 nucleotidi.

La molecola di acido nucleico funzionale della presente invenzione comprende preferibilmente una sequenza regolatoria avente una struttura bidimensionale comprendente una sequenza con almeno il 50% di identità con la SEQ ID NO:5, preferibilmente almeno il 75% di identità con la SEQ ID NO:5, più preferibilmente almeno il 90% di identità con la SEQ ID NO:5.

Nell'elemento trasponibile SINE B2 invertito esemplificato derivato da AS Uchl1, la sequenza regolatoria è la SEQ ID NO:5.

Un'altra molecola di acido nucleico funzionale secondo la presente invenzione comprende una sequenza di legame al bersaglio comprendente una sequenza inversa complementare a una sequenza di mRNA bersaglio per cui la traduzione proteica deve essere potenziata; e una sequenza regolatoria comprendente una sequenza avente almeno il 50%, preferibilmente almeno il 75%, più preferibilmente almeno il 90% di identità con una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID

NO:15, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:22, e SEQ ID NO:23.

Un'analisi icSHAPE mostra che il numero di nucleotidi appaiati negli steli illustrati sopra e il numero di nucleotidi nelle anse illustrate sopra possono variare al di là degli intervalli illustrati.

Esempi

Esempio 1

Questo esempio dimostra l'accessibilità ad agenti chimici (DMS e CMCT) di ciascun nucleotide nella sequenza di SINE B2 invertito da AS Uchl1 naturale. L'accessibilità ad agenti chimici è strettamente dipendente dalla struttura locale della molecola.

La Figura 1 mostra un footprinting chimico del costrutto invSINEB2/183 RNA. Il riquadro di sinistra mostra un gel fluorescente con corsie di sequenziamento C e A con numerazione di nucleotidi. Le corsie di DMS con RNA di invSINEB2/183 trattato con concentrazioni di DMS crescenti con controlli positivi (+) e negativi (-). Il riquadro di destra mostra un gel fluorescente con corsie di sequenziamento G e U con numerazione di nucleotidi. Le corsie di CMCT con RNA di invSINEB2/183 RNA trattato con concentrazioni di CMCT crescenti con controlli positivi (+) e negativi (-). Gli esperimenti sono stati svolti come descritto in Tijerina P. et al., (2007), Nature Protocols 2:2608-2623.

Esempio 2

Questo esempio mostra la struttura bidimensionale del dominio effettore SINE B2 invertito del AS Uchl1 funzionale. La struttura è organizzata in forcine (SL1, SL2 and SL3), Anse interne (IL1, IL2, IL3 and IL4) e strutture a stelo interposte. La struttura è generata in base a dati dall'Esempio 1.

La Figura 2 mostra la struttura secondaria del dominio effettore SINE B2 invertito di AS Uchl1. I nucleotidi DMS reattivi sono mostrati in caratteri neri in cerchi con sfondo grigio e i nucleotidi CMCT reattivi sono mostrati in caratteri bianchi in cerchi con sfondo nero, rispettivamente. Anse interne e forcine sono etichettate rispettivamente come ILx e SLx. I nucleotidi non reattivi sono soltanto cerchiati. Il segmento sfumato in grigio corrisponde al sito di ibridazione del primer di DNA .

Esempio 3

Questo esempio dimostra che frammenti più corti della sequenza di SINE B2 invertito mantengono la struttura SL1 terminale.

La Figura 3 mostra le strutture in soluzione di frammenti con estremità terminali delete di SINE B2 RNA invertito. La Figura 3A mostra la struttura 2D del dominio effettore invSINEB2/183 di AS Uchl1. Le regioni con estremità terminali rimosse sono indicate in quadrati. La

Figura 3B mostra la struttura schematica di frammenti con estremità terminali delete. Le posizioni dei nucleotidi sono indicate relativamente alla sequenza full-length. La Figura 3C mostra la regione di protoni imminici di SINE B2 invertito da AS Uchl1 murino. Segnali imino ^1H sono assegnati per ciascun frammento con estremità terminali delete. Sono mostrate le tracce dei frammenti #1 (SEQ ID NO:9), #2 (SEQ ID NO:8), #3 (SEQ ID NO:7) e #4 (SEQ ID NO:6). La struttura a stelo SL1 è osservata in tutti i frammenti.

Esempio 4

Questo esempio dimostra che SL1 è richiesto per l'attività del dominio effettore SINE B2 invertito in una molecola di acido nucleico funzionale (AS Uchl1) per il potenziamento della traduzione.

Cellule di neuroblastoma murino N2a (N° di Catalogo ATCC ATCC-CCL-131) sono state trasfettate con costrutti mutanti di AS Uchl1 e ΔSL1 . Nel costrutto mutante di ΔSL1 , sono deleti i nucleotidi 68-77 del SINE B2 invertito (SEQ ID NO:10). Nel mutante di ΔSL1 la struttura a forcina del SL-1 viene distrutta, ma è mantenuto il gruppo di SINE B2 invertito complessivo. Le cellule di controllo sono state trasfettate con un plasmide di controllo vuoto. 48 ore dopo la trasfezione, le cellule sono state lisate e processate per livelli di proteine e

RNA. È stato eseguito Western blot con anticorpo anti-UCHL1 (Figura 4A). È stata usata β -actina come controllo di carico. Il fattore moltiplicativo di induzione è stato calcolato su immagini di Western blot normalizzate a β -actina e relativamente a campioni di controllo vuoti. Espressioni di mRNA di Uchl1 (barre grigie) e AS Uchl1 (barre bianche) sono state monitorate mediante qRT-PCR usando primer specifici. I dati indicano una media \pm dev. st. I dati sono rappresentativi di N=5 repliche indipendenti. La Figura 4B mostra una rappresentazione grafica dell'attività di potenziamento della traduzione di AS Uchl1 e Δ SL1 sull'mRNA di Uchl1 endogeno in cellule N2a (N=5). *, $p=0,01$; NS, non significativo ($p>0,5$).

Sono stati svolti esperimenti come descritto in Zucchelli S. et al., (2015), *Front Cell Neurosci.* 9:174

Esempio 5

Questo esempio dimostra che SL-1 è richiesto per la funzione di potenziamento della traduzione della molecola di acido nucleico di AS Uchl1 in una linea cellulare epatocellulare umana e con mRNA sovraespresso. Di fatto, la delezione di SL-1 abolisce l'attività di AS Uchl1 quando testato con Uchl1-FLAG sovraespresso in cellule HepG2 umane (N° di catalogo ATCC ATCC-HB-8065).

La linea cellulare di epatociti umani HepG2 è stata trasfettata con un costrutto Uchl1-FLAG in combinazione con

costrutti mutanti di AS Uchl1 e Δ SL1. Le cellule di controllo sono state trasfettate con un plasmide di controllo vuoto. 48 ore dopo la trasfezione, le cellule sono state lisate e processate per quantità di proteine mediante Western blot. È stato svolto Western blot con anticorpo anti-FLAG per monitorare la proteina sovraespressa (Figura 5A). È stata usata β -actina come controllo di carico. Il fattore moltiplicativo di induzione è stato calcolato su immagini di Western blot normalizzate a β -actina e relativamente a campioni di controllo vuoti. L'attività di potenziamento della traduzione di AS Uchl1 è evidenziata in grassetto. Le cellule trattate come illustrato sopra sono state processate come illustrato sopra per la quantificazione dell'RNA (Figura 5B). Le espressioni dell'mRNA di Uchl1 (destra) e AS Uchl1 (sinistra) sono state monitorate mediante qRT-PCR usando primer specifici. I dati indicano una media \pm dev. st.

Esempio 6

Questo esempio dimostra che SL-1 è richiesto per la funzione di potenziamento della traduzione della molecola di acido nucleico funzionale sintetica che ha come bersaglio l'mRNA sovraespresso (SINEUP-GFP). Sono preferibilmente anche richiesti elementi strutturali aggiuntivi poiché StemDM mutante (che destabilizza lo stelo) ha diminuito, ma non abolito, l'attività di dominio

effettore.

La Figura 6 mostra che l'elemento strutturale di SL-1 contribuisce all'attività di SINEUP-GFP in cellule HEK 293T/17 (N° di Catalogo ATCC ATCC-CRL-11268). La Figura 6A è un'immagine zoomata della struttura a forcina terminale (SL-1) dal dominio effettore SINE B2 invertito. Un mutante di Δ SL1 è stato generato mediante delezione nel dominio effettore SINE B2 di SINEUP-GFP. Analogamente, mutazioni sito-dirette (G70A e G73A, cerchiare) sono state introdotte in SINEUP-GFP per generare il mutante di StemDM (SEQ ID NO:11). Nella Figura 6B le cellule HEK 293T/17 sono state trasfettate con un plasmide di espressione di eGFP in combinazione con un vettore vuoto (-), o SINEUP-GFP full-length (FL), mutanti di Δ SL1 o StemDM, come indicato. È stato svolto Western blot con anticorpo anti-GFP per monitorare una proteina sovraespressa. La β -actina è stata usata come controllo di carico. Il fattore moltiplicativo di induzione è stato calcolato su immagini di Western blot normalizzate a β -actina e relativamente a campioni di controllo vuoti. L'attività di potenziamento della traduzione di SINEUP-GFP è evidenziata in rosso. Nella Figura 6C, le cellule trattate come nella Figura 6B sono state usate per preparare l'RNA. Le espressioni dell'mRNA di GFP (grigio) e SINEUP-GFP (nero) sono state monitorate mediante qRT-PCR usando primer specifici. I dati indicano

una media \pm dev. st.

Esempio 7

Questo esempio dimostra che il frammento di SINE B2 invertito (38 nucleotidi) che copre la regione strutturale SL1 (SEQ ID NO:12) adotta una singola struttura in soluzione come determinato mediante NMR. In questo esperimento, i dati di NMR convalidano la struttura di SL-1 in un frammento più corto (come osservato mediante altre tecniche negli Esempi 1, 2 e 3).

La Figura 7A mostra regioni immino e aromatiche degli spettri ^1H NMR di RNA da 38 nt in $^2\text{H}_2\text{O}$ al 5%/H₂O al 95% acquisiti a 0 e 25 °C. Sono assegnati segnali Immino ^1H . La Figura 7B mostra la regione immino degli spettri ^{15}N HSQC NMR. I segnali osservati a 25 e 0 °C sono rispettivamente in grigio scuro e grigio chiaro. La Figura 7C mostra la struttura secondaria del costrutto SINEB2/38. Le coppie di basi con segnali immino osservabili a 25 e 0 °C sono ombreggiate rispettivamente in grigio scuro e grigio chiaro. Gli esperimenti sono stati effettuati come descritto in Sybren S. et al., (1998), Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 32:7280287, -387).

Esempio 8

Questo esempio dimostra che i segnali di NMR possono essere assegnati in uno spettro 2D NOESY NMR per ricostruire in modo appropriato la struttura 3D del

frammento da 38 nucleotidi SINE B2.

La Figura 8 mostra l'assegnazione di risonanze rilevanti. La regione aromatica-anomerica di uno spettro 2D NOESY NMR ($\tau_m=250$ ms) di invSINEB2/38. Il percorso sequenziale è rappresentato come una linea nera.

Esempio 9

Questo esempio dimostra la mappa di connettività di segnali NMR che è usata per ricostruire in modo appropriato la struttura 3D del frammento da 38 nt di SINE B2 invertito.

La Figura 9 mostra un diagramma di connettività NOE. Un diagramma di connettività NOE forte (linea in grassetto) media (linea continua) e debole (linea tratteggiata) per la molecola invSINEB2/38.

Esempio 10

Questo esempio dimostra la struttura 3D ad alta risoluzione della regione del dominio effettore SINE B2 invertito. La forcina adotta uno stelo a elica di tipo A. L'ansa mostra proprietà dinamiche in soluzione.

La Figura 10 mostra la struttura ad alta risoluzione di SL1. La Figura 10A mostra una vista laterale e la Figura 10B mostra viste dall'alto delle 10 strutture a energia più bassa della forcina da 29 nt (SEQ ID NO:1). Le Figure 10C e 10D sono strutture rappresentative di anse con orientamenti di basi G77, U78 e G79.

Esempio 11

Questo esempio dimostra che gli elementi strutturali aggiuntivi (regione IL3-SL3, IL4 e struttura a stelo basale) contribuiscono all'attività del dominio effettore SINE B2 invertito nella molecola di acido nucleico funzionale (in particolare, SINEUP-GFP).

La Figura 11A è una rappresentazione schematica delle sequenze delete di Δ SL1 (SEQ ID NO:10), di Δ polIII (SEQ ID NO:13) e di Δ Box (SEQ ID NO:14) annotate su una struttura secondaria di SINE B2 invertita. Nella Figura 11B, le cellule HEK 293T/17 sono state trasfettate con un plasmide di espressione di eGFP in combinazione con un vettore vuoto (-), o SINEUP-GFP full-length (FL), mutanti di Δ SL1, Δ polIII o Δ Box, come indicato. È stato svolto Western blot con anticorpo anti-GFP per monitorare una proteina sovraespressa. La β -actina è stata usata come controllo di carico. Il fattore moltiplicativo di induzione è stato calcolato su immagini di Western blot normalizzate a β -actina e relativamente a campioni di controllo vuoti. L'attività di potenziamento della traduzione di SINEUP-GFP è evidenziata in grassetto. Il contributo di mutanti strutturali è mostrato in rosso. Nella Figura 11C, le cellule trattate come nella Figura 11B sono state usate per preparare l'RNA. Le espressioni dell'mRNA di GFP (grigio) e SINEUP-GFP (nero) sono state monitorate mediante qRT-PCR

usando primer specifici. I dati indicano una media \pm dev. st.

Esempio 12

Questo esempio dimostra che nuove sequenze del dominio effettore sintetiche possono essere progettate in base a caratteristiche strutturali (struttura a stelo interposta alla base di IL-4, SL-2, SL-1). Queste sequenze possono potenziare l'attività di potenziamento della traduzione nella molecola di acido nucleico funzionale con mRNA sovraespresso. L'attività potenziata è ottenuta con una differente sequenza nucleotidica primaria, ma con la stessa struttura.

In particolare, le varianti basate sulla struttura del SINE B2 invertito mostrano un'attività di potenziamento della traduzione come dominio effettore nel SINEUP-GFP. La Figura 12A mostra una rappresentazione schematica di mutazioni basate sulla struttura annotate sulla struttura secondaria di SINE B2 invertito. Nei cerchi: mutazioni a singolo punto; nei quadrati: scambio di sequenze di elementi strutturali (base stelo e ansa). Nella Figura 12B, le cellule HEK 293T/17 sono state trasfettate con il plasmide di espressione di eGFP in combinazione con un vettore vuoto (-), o SINEUP-GFP full-length (FL) come controllo positivo. I costrutti SINEUP-GFP con mutazioni a base strutturale sono stati trasfettati come indicato. È

stato svolto Western blot con anticorpo anti-GFP per monitorare una proteina sovraespressa. La β -actina è stata usata come controllo di carico. La Figura 12C mostra l'aumento relativo nei livelli di proteine GFP (pannello sinistro) e livelli di mRNA di GFP invariati (pannello destro) in N=9 esperimenti, che sono stati svolti come in B. L'espressione di ciascun mutante strutturale SINEUP-GFP (AS GFP) è monitorata da qRT-PCR e inclusa nel pannello destro. Tutti i mutanti sono espressi allo stesso livello.

Esempio 13

Questo esempio dimostra che nove sequenze del dominio effettore sintetiche possono essere progettate sulla base di caratteristiche strutturali (struttura a fascio interposta alla base di IL-4, SL-2, SL-1) e ottenere l'attività di potenziamento della traduzione potenziata in una molecola di acido nucleico funzionale con mRNA sovraespresso. L'attività potenziata è ottenuta con una differente sequenza nucleotidica primaria, ma con la stessa struttura.

In particolare, una variante più corta e a base strutturale del SINE B2 invertito mostrano un'attività di potenziamento della traduzione aumentata come molecola di acido nucleico funzionale del dominio effettore avente come bersaglio l'mRNA endogeno.

La Figura 13A è una rappresentazione schematica di

mutazioni a base strutturale annotate sulla struttura secondaria di SINE B2 invertito (27-142 corrisponde a SEQ ID NO:21, 44-120 corrisponde a SEQ ID NO:7, 44-120 con A45C corrisponde a SEQ ID NO:22 e 44-120 A51C corrisponde a SEQ ID NO:23). Sono indicate mutazioni a singolo punto. La Figura 13B mostra l'attività di potenziamento della traduzione di molecole di acido nucleico funzionali aventi come bersaglio l'mRNA espresso in modo endogeno in cui il dominio effettore è una sequenza sintetica con caratteristiche strutturali migliorate.

Esempio 14

Questo esempio dimostra che le sequenze di SINE da RNA non codificanti lunghi antisense naturali sono domini effettori in molecole di acido nucleico funzionali per il potenziamento della traduzione di mRNA a sovrapposizione parziale.

In particolare, elementi di SINEB2 da lncRNA AS murini possono agire come Dominio effettore in miniSINEUP e potenziare un'espressione proteica in HEK293T (Riken Brc Cat. No. RCB2202).

La Figura 14A mostra sequenze di SINE B2 derivate da lncRNA antisense funzionali naturali che sono stati clonati in miniSINEUP-GFP per sostituire la sequenza di SINE B2 invertito naturale da AS Uchl1 come Dominio effettore. La sequenza con bersaglio GFP era di -40/+4 nucleotidi,

relativamente al codone AUG iniziale. Le sequenze sono nell'ordine: SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:50 a SEQ ID NO:62. La Figura 14B mostra un fattore moltiplicativo di induzione di proteine GFP in cellule HEK293T dopo la co-trasfezione con EGFP senso e miniSINEUP-GFP (24 ore dopo la trasfezione). Le immagini di Western blot e le corrispondenti intensità di banda delle GFP (normalizzate al livello di espressione di ACTB) sono calcolate usando un software ImageJ. Un vettore vuoto è usato come controllo negativo mentre AS Uchl1 (AS Uchl1 SINEB2 contenente miniSINEUP) come controllo positivo. Le etichette dei campioni indicano nomi di AS lncRNA da cui sono isolate sequenze di SINEB2. Sono state testate le sequenze di SINEB2 che rappresentano quattro sottofamiglie (in base all'annotazione RepeatMasker) vale a dire B3, B3A, Mm2, e Mm1t. Gli elementi SINEB2 sono dalla sottofamiglia B3 se non diversamente specificato. AS Uchl1 + AS Uxt-b indica AS Uchl1 SINEB2 e un secondo SINEB2 di AS Uxt combinato in ED. 3X indica tre ripetizioni di SINEB2 e la sequenza consenso di SINEB2/B3 è la sequenza consenso della sottofamiglia B3 presa dal database RepBase. n = 5; barre di errore \pm SEM; **** P<0,00005; *** P<0,0005; ** P<0,005; * P<0,05; test t di Student a due code

Esempio 15

Questo esempio dimostra che le sequenze di SINE attive

in molecole di acido nucleico funzionali per la funzione di potenziamento della traduzione hanno scarsa identità di sequenza. Questo esempio suggerisce una dipendenza dalla struttura della funzionalità del dominio effettore.

La Figura 15 mostra l'allineamento della sequenza ClustalW di elementi SINEB2 da differenti AS lncRNA murini. Sequenze di SINEB2 murine che sono state selezionate per la funzione di potenziamento della traduzione in SINEUP-GFP e miniSINEUP-GFP (esempio 14) sono allineate mediante il software ClustalW in MEGA5. Le sequenze sono nell'ordine: da SEQ ID NO:44 a SEQ ID NO:49 e da SEQ ID NO:52 a SEQ ID NO:62. Una distanza nell'allineamento è indicata da "-". Le basi sono evidenziate da quattro sfumature differenti di grigio. Gli A e B-box sono indicati da quadrati neri. L'allineamento mostra una variazione della sequenza all'interno di elementi della stessa famiglia di SINE.

Esempio 16

Questo esempio dimostra che le sequenze di SINE da specie evolutivamente distanti agiscono come dominio effettore in molecole di acido nucleico funzionali antisense con attività di potenziamento della traduzione.

Come mostrato nella Figura 16A, le sequenze SINE da specie evolutivamente distanti e con strutture secondarie definite (Sun Fen-Jie, et al., Trends in Genetics, 2011) sono state selezionate per l'analisi. Queste sequenze

mostrano una scarsa identità di sequenza mediante analisi di allineamento. L'elenco delle sequenze include sequenze di RNA corrispondenti alle sequenze di DNA mostrate nella Figura 16A (da SEQ ID NO:24 a SEQ ID NO:33). L'elenco delle sequenze include anche le sequenze di RNA invertite (da SEQ ID NO:34 a SEQ ID NO:43). Nella Figura 16B, le cellule HEK 293T/17 sono state trasfettate con un plasmide di espressione delle eGFP in combinazione con un vettore vuoto (-), o SINEUP-GFP con sequenza di SINE invertita originale (blu scuro, B2) o con i mutanti di scambio del Dominio effettore indicati, clonati in orientamento diretto e inverso, come indicato. L'autofluorescenza delle GFP è stata registrata usando un sistema di imaging automatico CeligoS. I dati indicano i risultati della fluorescenza di GFP normalizzata alle cellule trasfettate del vettore vuoto (pCDNA3.1) (N>7 repliche). I dati indicano una media \pm dev. st. Le colonne incorniciate mostrano condizioni in cui l'attività di SINEUP è potenziata in confronto al controllo positivo di SINE B2. Come mostrato nella Figura 16C, l'analisi qRT-PCR indica che un potenziamento delle proteine si verifica con livelli di mRNA di GFP stabili (post-trascrizionali). Dopo la misurazione Celigo S, gli RNA sono stati estratti e purificati. Gli mRNA di GFP e gli RNA di SINEUP-GFP sono stati analizzati mediante qRT-PCR con primer specifici. N=3, SINE B2 è impostato a 1.

Esempio 17

Questo esempio dimostra che l'attività di potenziamento della traduzione più potente di sequenze di SINE da specie evolutivamente distanti si correla con strutture secondarie più complesse (combinazioni di forcine).

Nella Figura 17A, le cellule HEK 293T/17 sono state trasfettate con un plasmide di espressione di eGFP in combinazione con un vettore vuoto (-), o SINEUP-GFP con sequenza di SINE invertita originale (SINE B2) o con i mutanti di scambio del Dominio effettore indicato. L'analisi Western blot è stata svolta con anticorpo anti-GFP per monitorare la proteina sovraespressa. La β -actina è stata usata come controllo di carico. Nella Figura 17B, le quantità di proteina GFP sono state calcolate mediante analisi di immagini, in seguito alla normalizzazione su controllo di β -actina. I dati da N=5 repliche sono stati rappresentati come media \pm dev. st. L'analisi statistica è stata svolta usando un test t (valori p mostrati). La Figura 17C mostra i SINE più attivi in assoluto da varie specie, con la loro struttura relativa. Le strutture SINE complessive sono rappresentate con linee (steli) e cerchi (anse di forcine). Occorre notare che tutti i SINE più attivi in assoluto condividono una struttura a forcina atipica conservata. Di fatto, questa struttura a forcina è

nota per essere un elemento chiave per l'attività di potenziamento della traduzione in SINE di specie evolutivamente distanti.

Esempio 18

Questo esempio dimostra che i motivi strutturali (motivo 1, IL-3/SL-3 e motivo 2, SL-1) sono condivisi tra le sequenze di SINE più potenti in molecole di acido nucleico funzionali.

La Figura 18 mostra l'analisi del motivo della struttura 2D delle sequenze di SINE da specie evolutivamente distanti che hanno attività di potenziamento della traduzione in molecole di acido nucleico funzionali. La Figura 18A mostra la struttura 2D dell'RNA del SINE B2 invertito dall'esempio 2 (SEQ ID NO:5). La Figura 18B mostra la struttura 2D prevista dell'RNA SINE consenso B2 (SEQ ID NO:30) determinata mediante RNA fold WebServer con impostazioni di default. La Figura 18C mostra la struttura 2D dell'RNA SmaI SINE (SEQ ID NO:27) usando sonde enzimatiche. Le regioni di riconoscimento putative per LINE RT sono racchiuse da linee tratteggiate (H Kawagoe-Takaki et al. Gene 365 (2006), 67-73). La Figura 18D mostra la struttura a stelo Motivo 1 (stelo intermedio, IL-3, SL-3) dalla struttura 2D di SINE B2 invertito e B2 SINE. Le strutture del Motivo 1 si diramano tra strutture ad ansa centrali. La Figura 18E mostra la struttura a stelo Motivo 2 (SL-1) dalla struttura 2D del SINE B2, B2 SINE e SmaI

SINE. Le strutture del Motivo 2 si diramano vicino alla struttura ad ansa di bordo.

Nuovamente si noterà che le tre strutture nelle Figure 18A, 18B e 18C condividono una struttura a forcina atipica conservata.

Vantaggi

L'identificazione degli elementi strutturali SINE B2 consente una strategia rivolta alla struttura per la selezione e la progettazione di varianti di SINEUP con attività aumentata e potenziale utilità negli esseri umani.

Dichiarazione secondo l'Art. 170bis(2) del codice della proprietà intellettuale italiana

Il materiale biologico che sta alla base dell'invenzione deriva da molecole sintetiche clonate ottenute usando informazioni ottenute da banche dati di sequenze online.

Il materiale biologico di origine umana usato nell'invenzione è stato acquisito in base alla normativa vigente. In particolare, le linee cellulari sono state regolarmente acquistate dalle fonti indicate nella descrizione di cui sopra.

Inoltre, tutto il materiale biologico contenente microrganismi o organismi geneticamente modificati usati nell'invenzione è stato trattato rispettando gli obblighi riguardanti tali modificazioni.

RIVENDICAZIONI

1. Molecola di acido nucleico funzionale comprendente:

- una sequenza di legame al bersaglio comprendente una sequenza inversa complementare a una sequenza di mRNA bersaglio per cui la traduzione proteica deve essere potenziata; e
- una sequenza regolatoria avente una struttura bidimensionale comprendente un primo dominio a forcina (SL-1) comprendente uno stelo avente da 8 a 12 nucleotidi appaiati e un'ansa comprendente da 5 a 9 nucleotidi.

2. Molecola di acido nucleico funzionale comprendente:

- una sequenza di legame al bersaglio comprendente una sequenza inversa complementare a una sequenza di mRNA bersaglio per cui la traduzione proteica deve essere potenziata; e
- una sequenza regolatoria avente una struttura bidimensionale comprendente un primo dominio a forcina (SL-1) avente una sequenza con almeno il 50% di identità con la SEQ ID NO:1.

3. Molecola di acido nucleico funzionale secondo la rivendicazione 2, in cui il primo dominio a forcina (SL-1) ha una sequenza con almeno il 75% di identità con la SEQ ID NO:1.

4. Molecola di acido nucleico funzionale secondo la

rivendicazione 3, in cui il primo dominio a forcina (SL-1) ha una sequenza con almeno il 90% di identità con la SEQ ID NO:1.

5. Molecola di acido nucleico funzionale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui lo stelo del primo dominio a forcina (SL-1) ha una struttura tridimensionale a elica di tipo A.

6. Molecola di acido nucleico funzionale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui la struttura bidimensionale della sequenza regolatoria comprende inoltre un secondo dominio a forcina (SL-2) e un quarto dominio ad ansa interno (IL-4), il secondo dominio a forcina (SL-2) comprendendo uno stelo con 2 a 4 nucleotidi appaiati e un'ansa comprendente da 6 a 10 nucleotidi e il quarto dominio ad ansa interno (IL-4) comprendendo da 14 a 24 nucleotidi.

7. Molecola di acido nucleico funzionale secondo la rivendicazione 6, comprendente inoltre un terzo dominio ad ansa interno (IL-3) comprendente da 6 a 14 nucleotidi.

8. Molecola di acido nucleico funzionale secondo la rivendicazione 7, comprendente inoltre un terzo dominio a forcina (SL-3) comprendente uno stelo con 1 a 3 nucleotidi appaiati e un'ansa comprendente da 3 a 5 nucleotidi.

9. Molecola di acido nucleico funzionale secondo la rivendicazione 8, comprendente inoltre un secondo dominio ad ansa interno (IL-2) comprendente da 6 a 12 nucleotidi.

10. Molecola di acido nucleico funzionale secondo la rivendicazione 9, comprendente inoltre un primo dominio ad ansa interno (IL-1) comprendente da 6 a 12 nucleotidi.

11. Molecola di acido nucleico funzionale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10, in cui la sequenza regolatoria comprende una sequenza avente almeno il 50% di identità con la SEQ ID NO:2.

12. Molecola di acido nucleico funzionale comprendente:

- una sequenza di legame al bersaglio comprendente una sequenza inversa complementare a una sequenza di mRNA bersaglio per cui la traduzione proteica deve essere potenziata; e

- una sequenza regolatoria comprendente una sequenza avente almeno il 50% di identità con una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:22, e SEQ ID NO:23.

13. Molecola di acido nucleico funzionale secondo la rivendicazione 12, in cui la sequenza regolatoria comprende una sequenza avente almeno il 75% di identità con una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:22, e SEQ ID NO:23.

14. Molecola di acido nucleico funzionale secondo la

rivendicazione 13, in cui la sequenza regolatoria comprende una sequenza avente almeno il 90% di identità con una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:22, e SEQ ID NO:23.

- p.i.: 1) 82% SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI
AVANZATI - SISSA
2) 18% TRANSSINE TECHNOLOGIES CO., LTD

Alessandra BOSIA

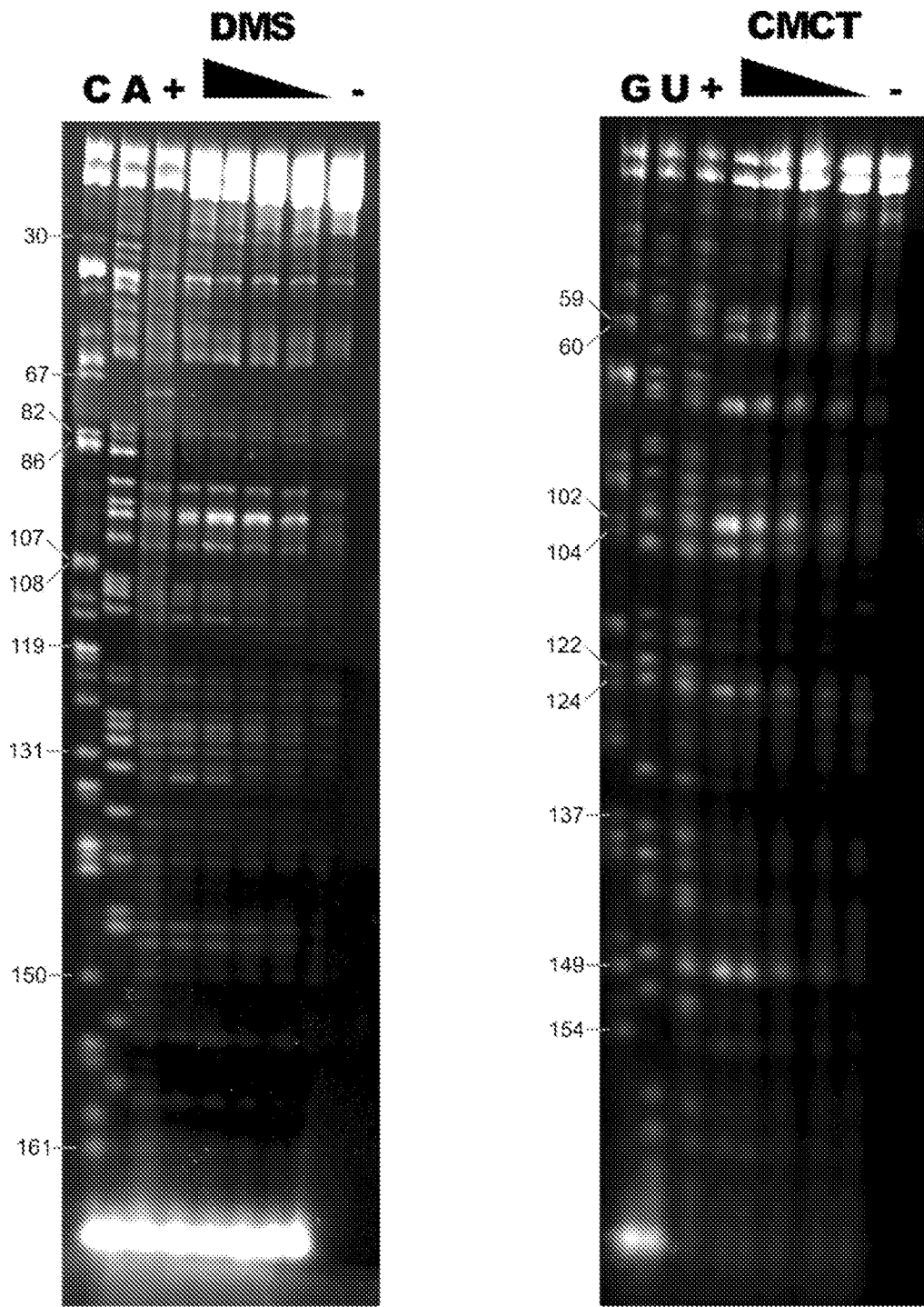


FIG. 1

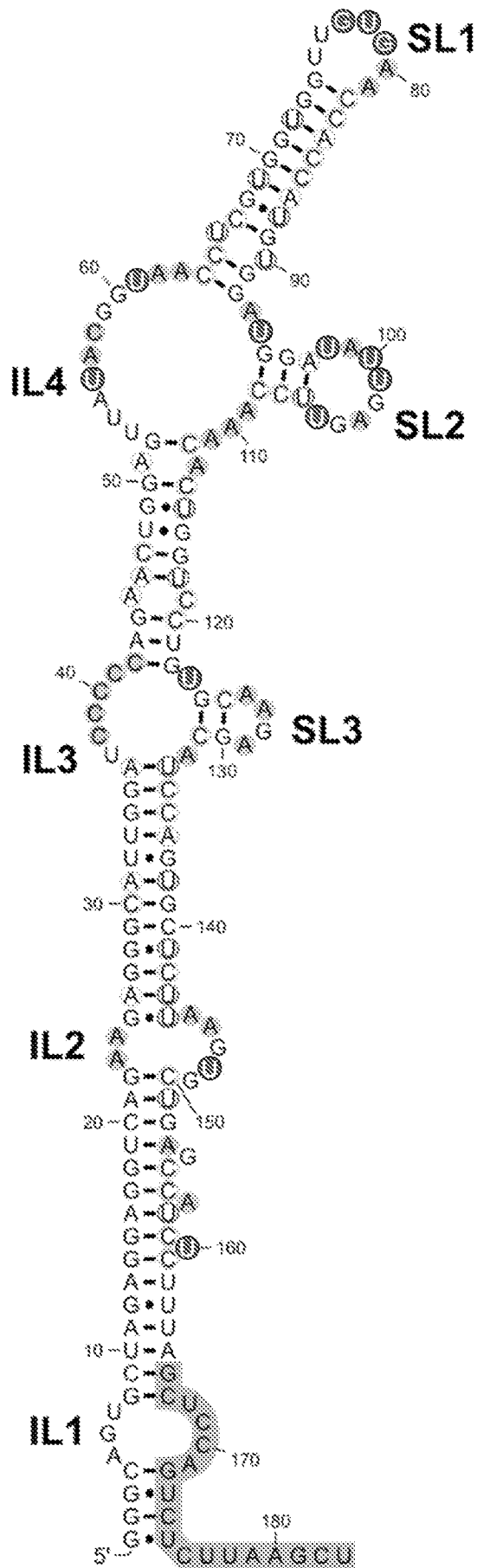


FIG. 2

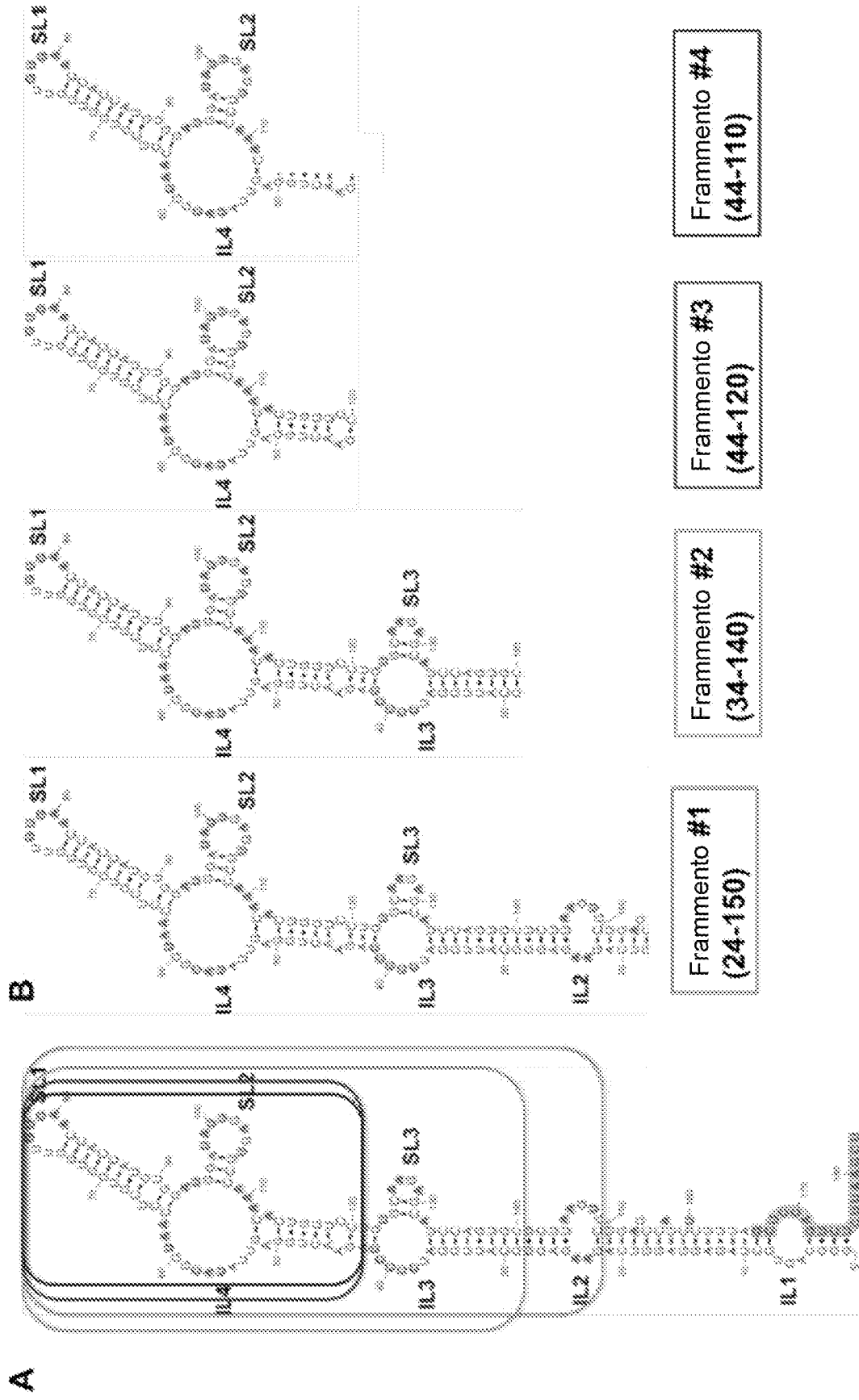


FIG. 3

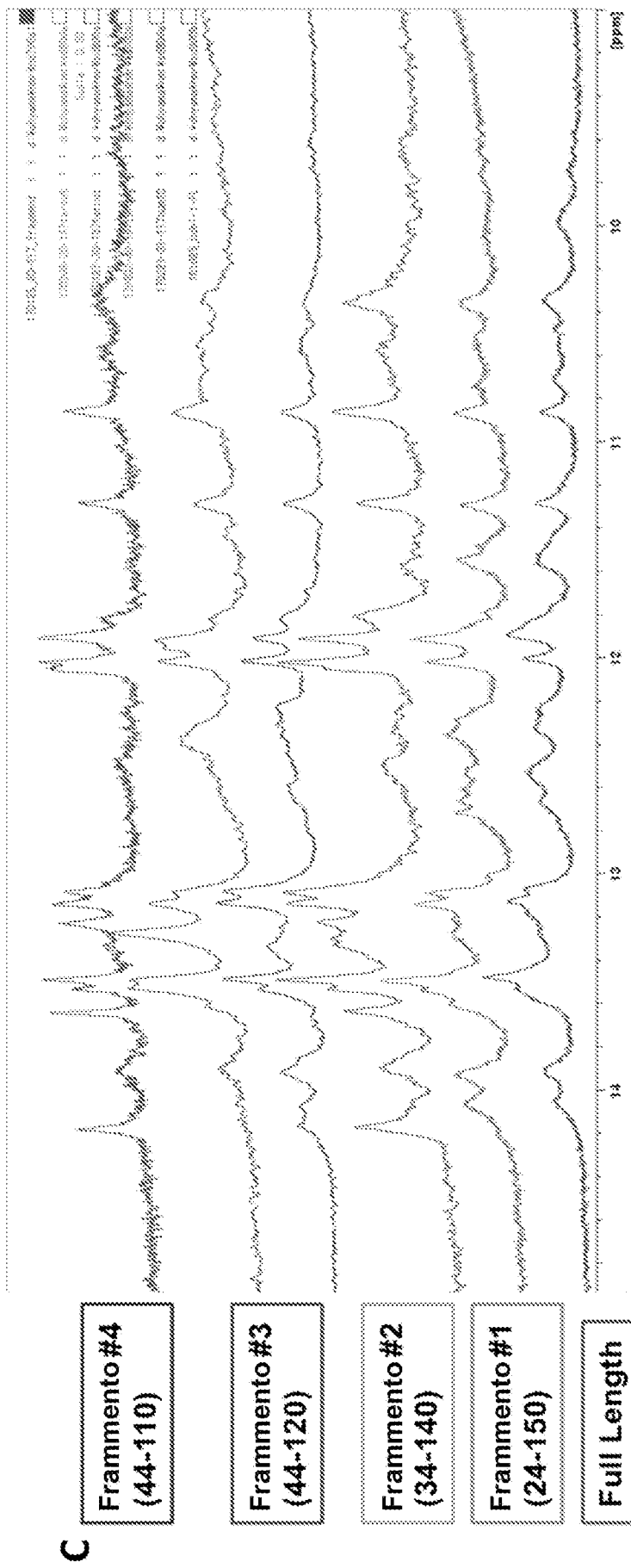


FIG. 3

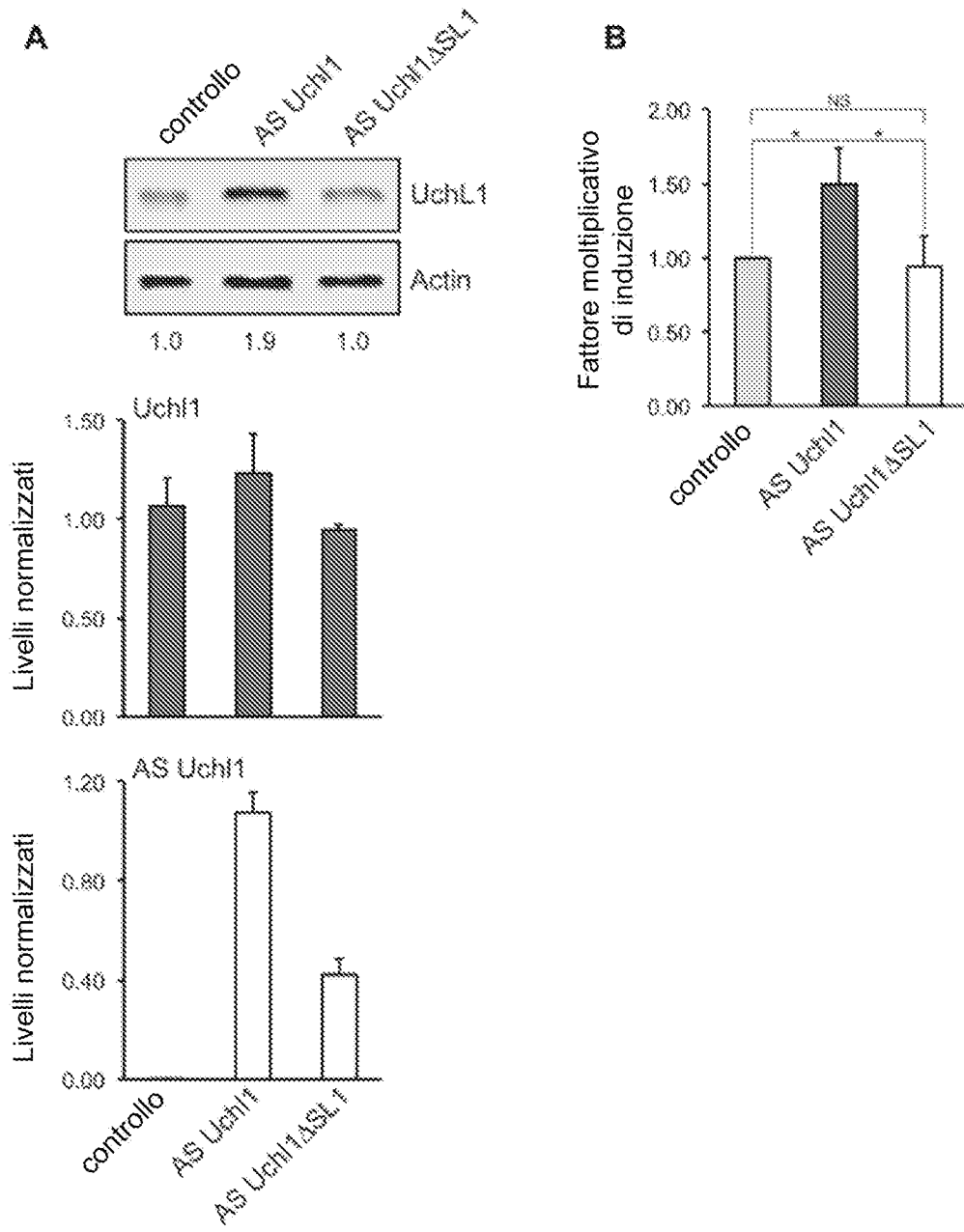
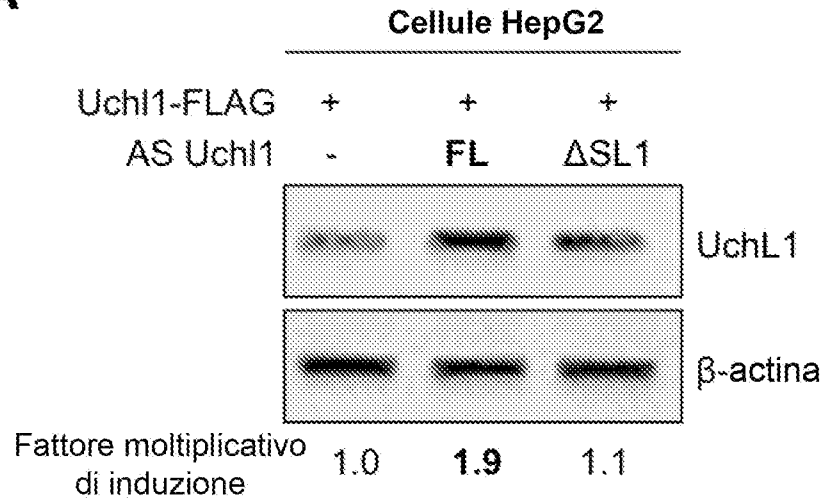
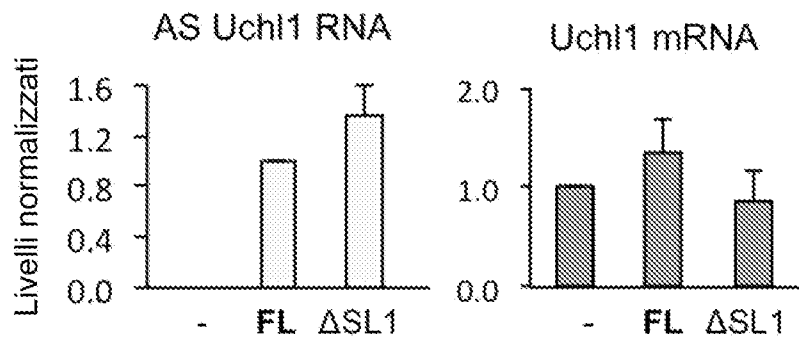
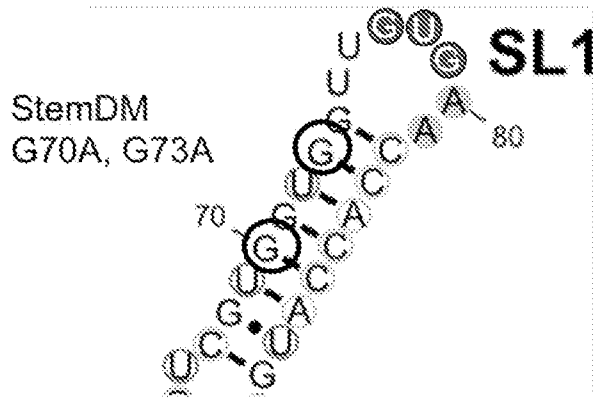


FIG. 4

A**B****FIG. 5**

A**B**

Cellule HEK 293T/17

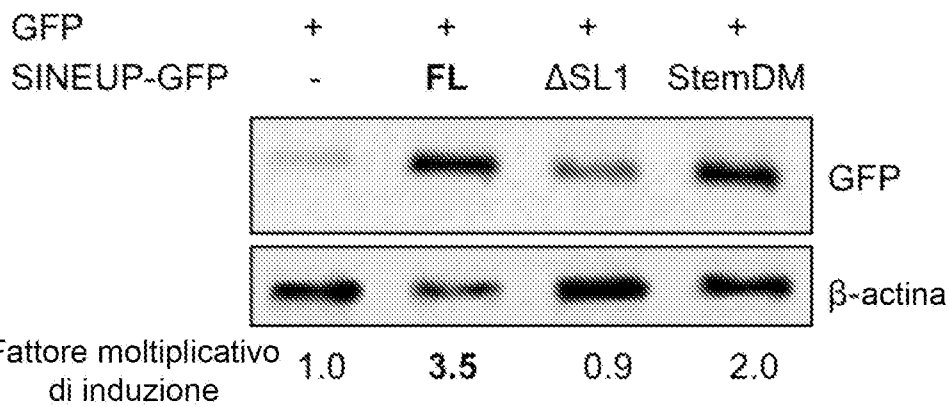
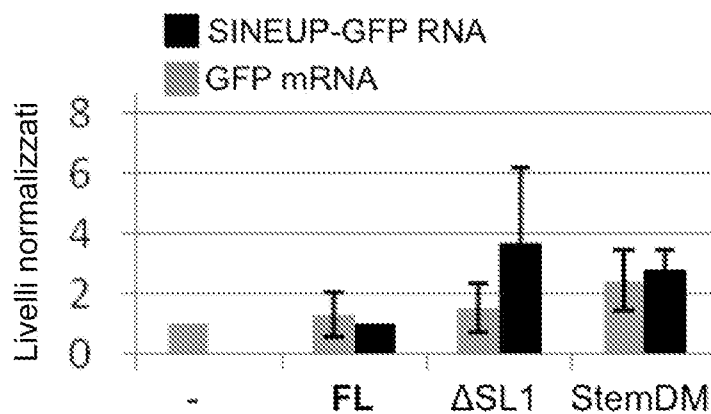
**C**

FIG. 6

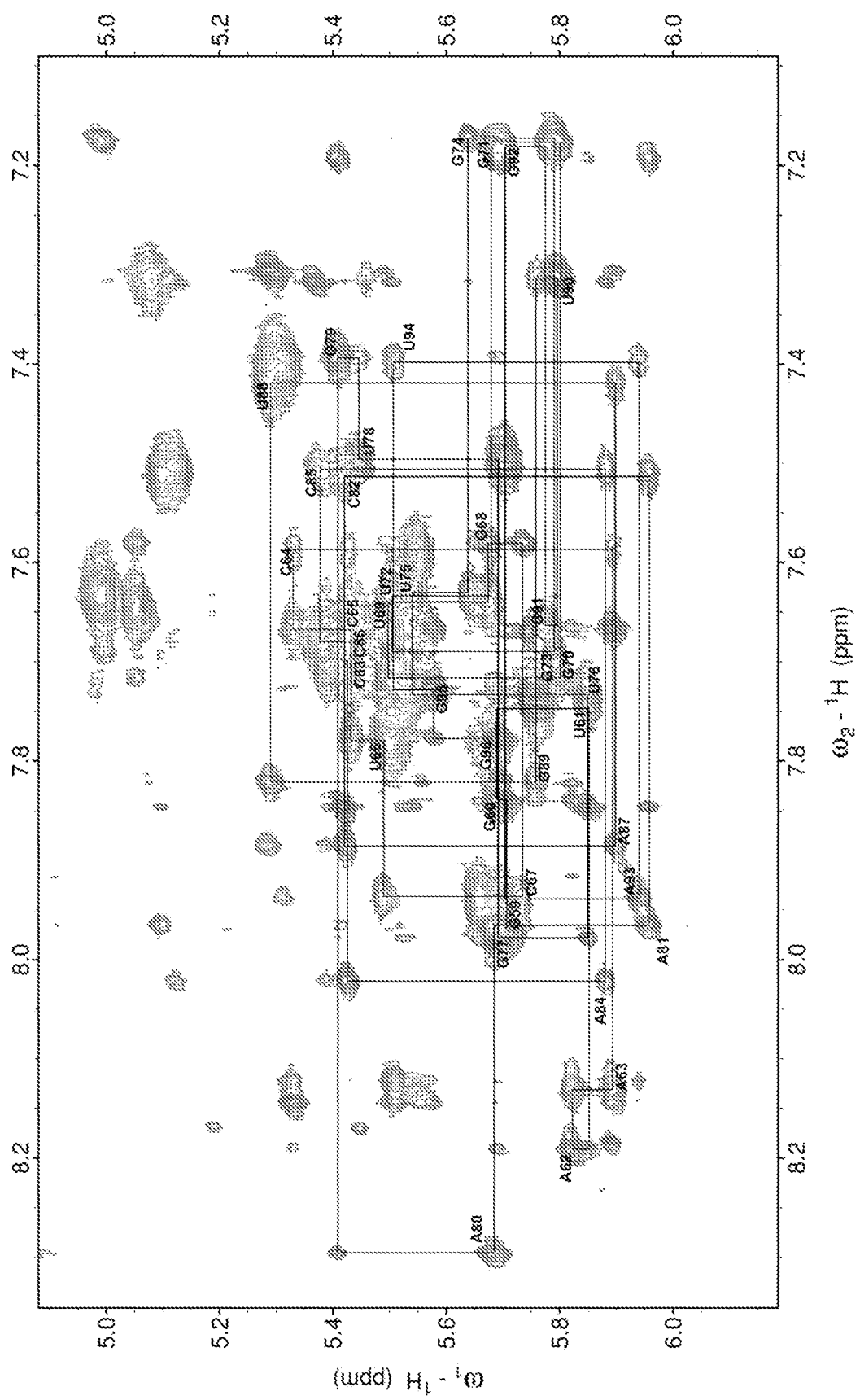


FIG. 8

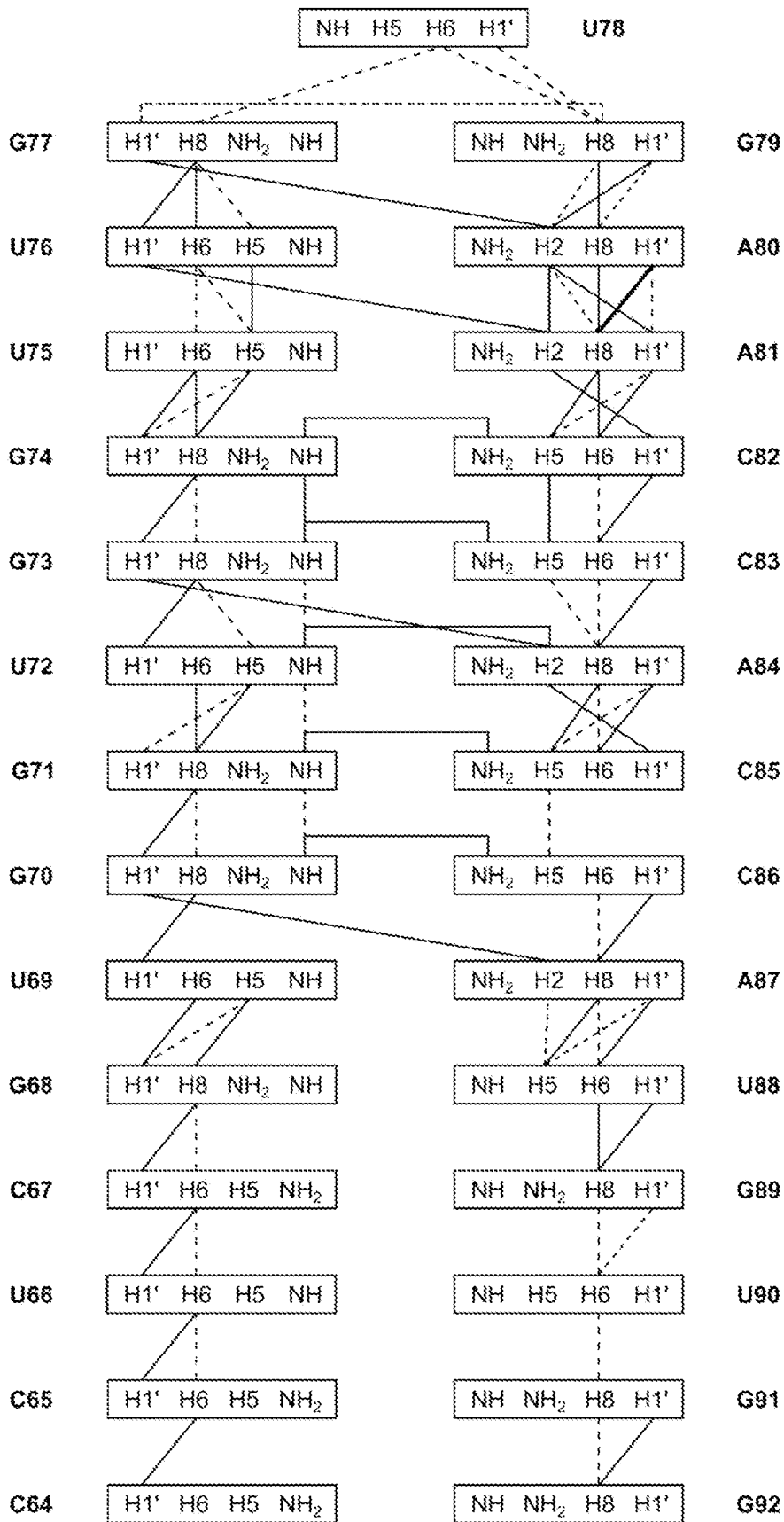


FIG. 9

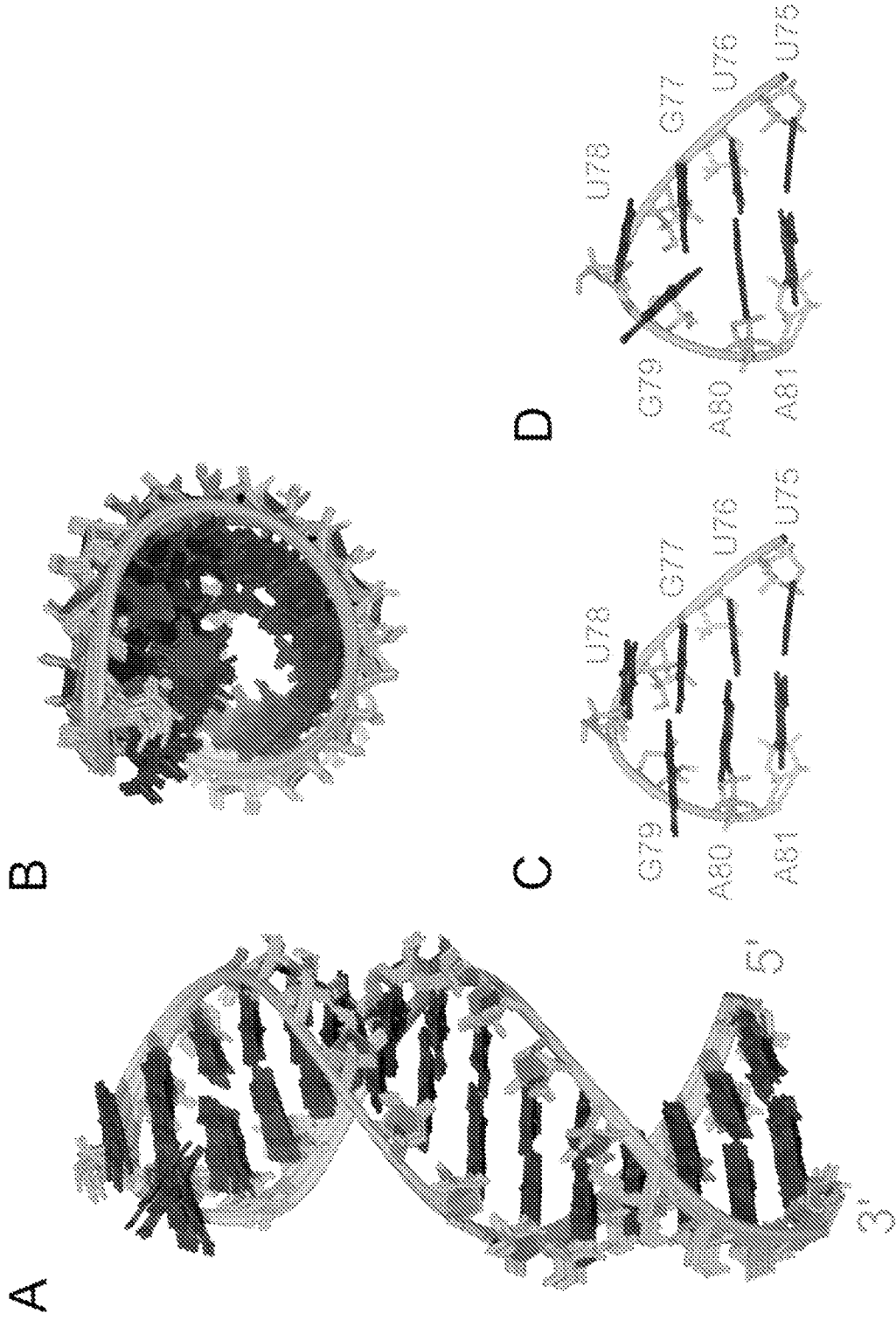


FIG. 10

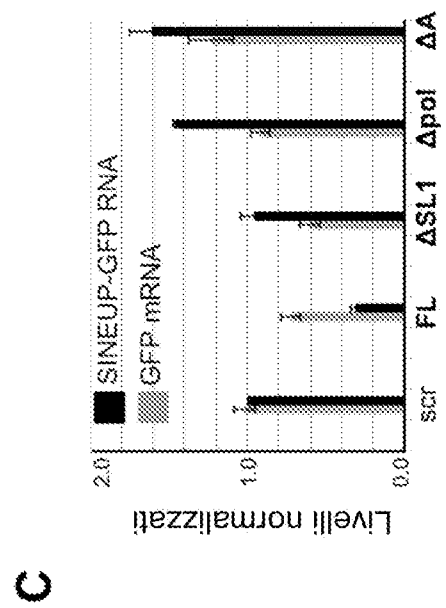
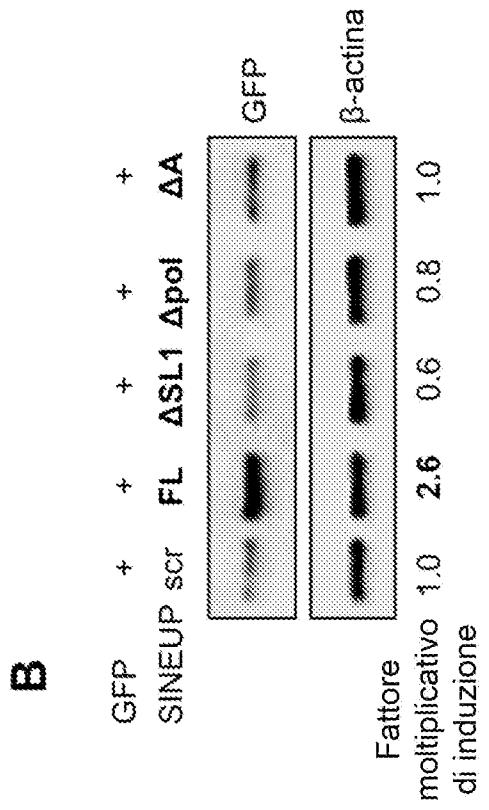
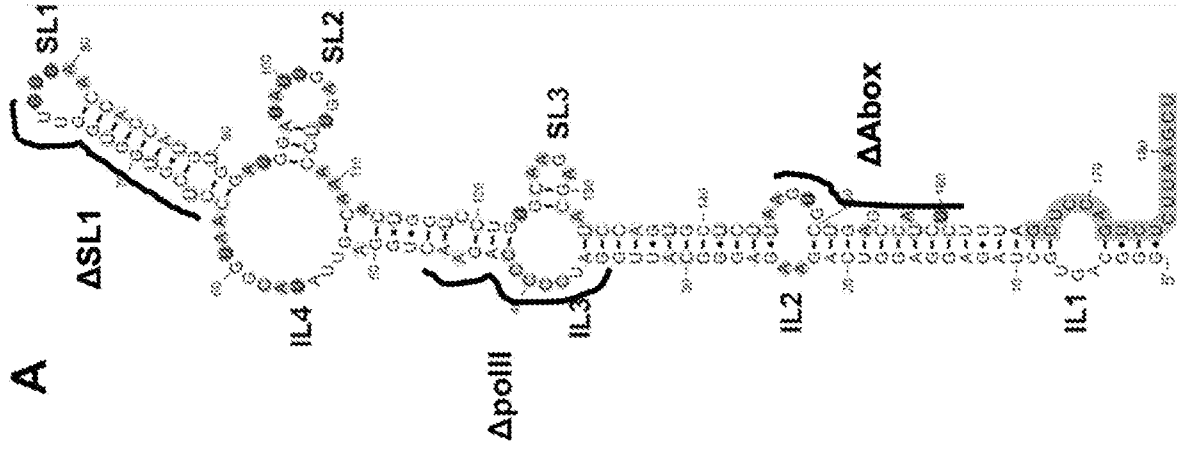


FIG. 11

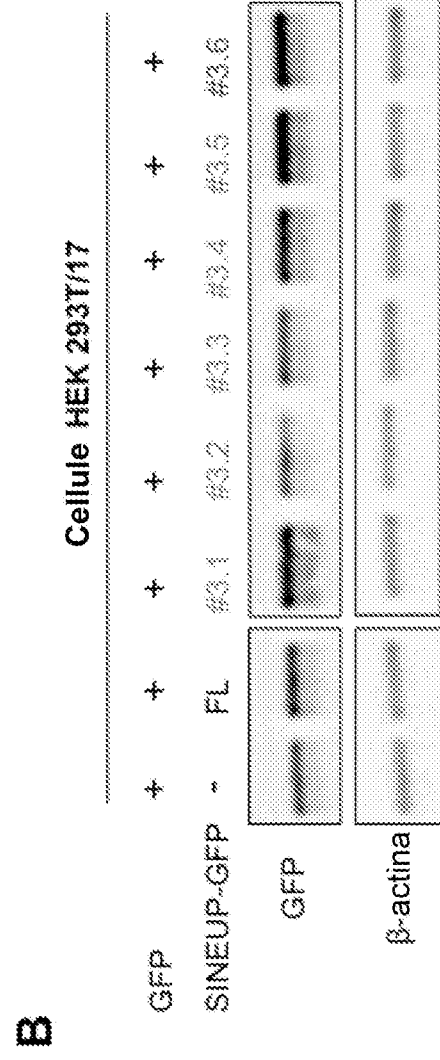
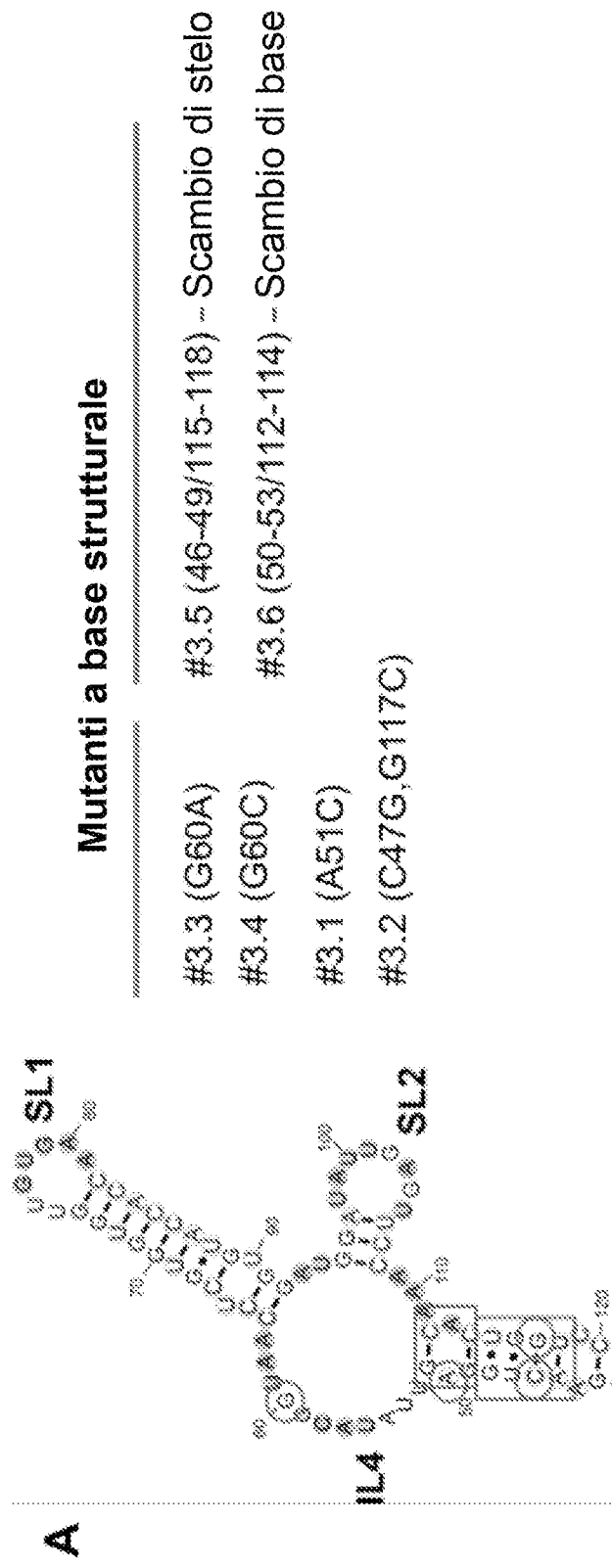


FIG. 12

C

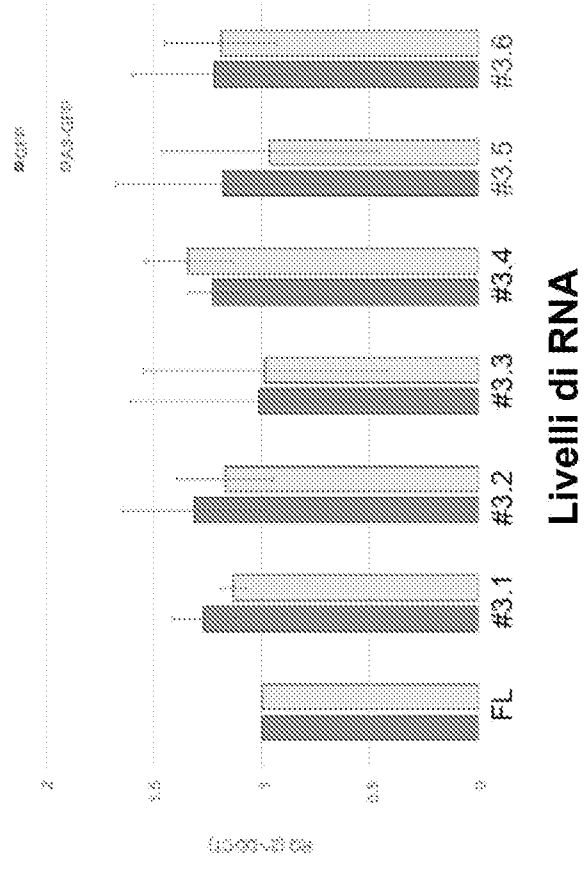
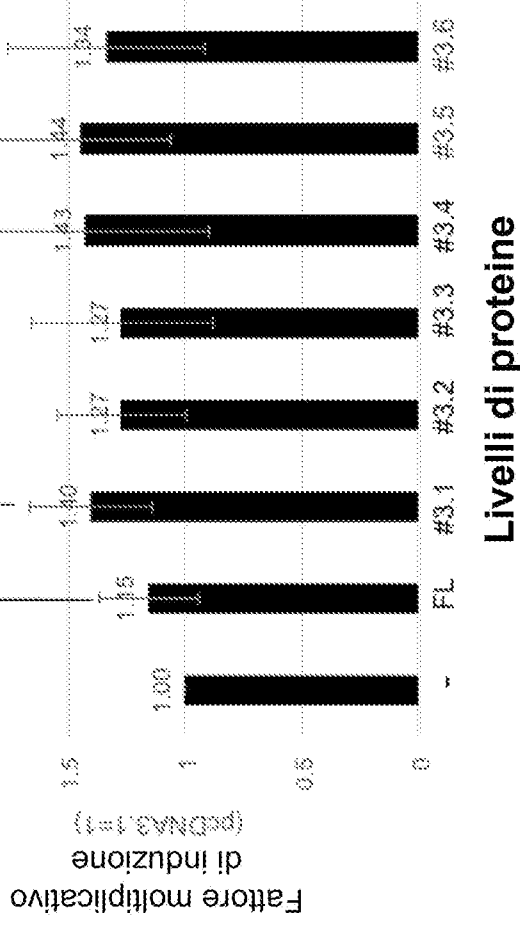


FIG. 12

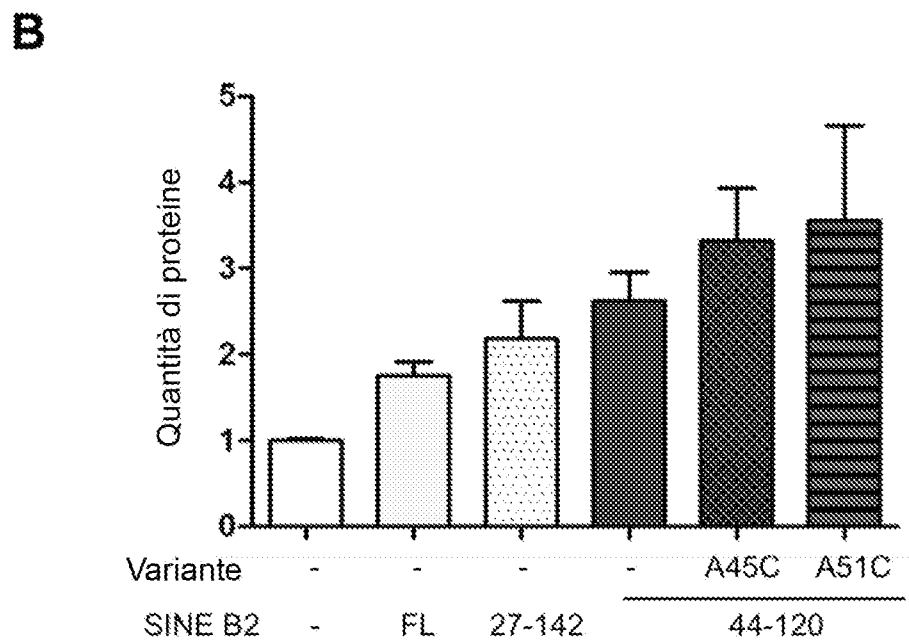
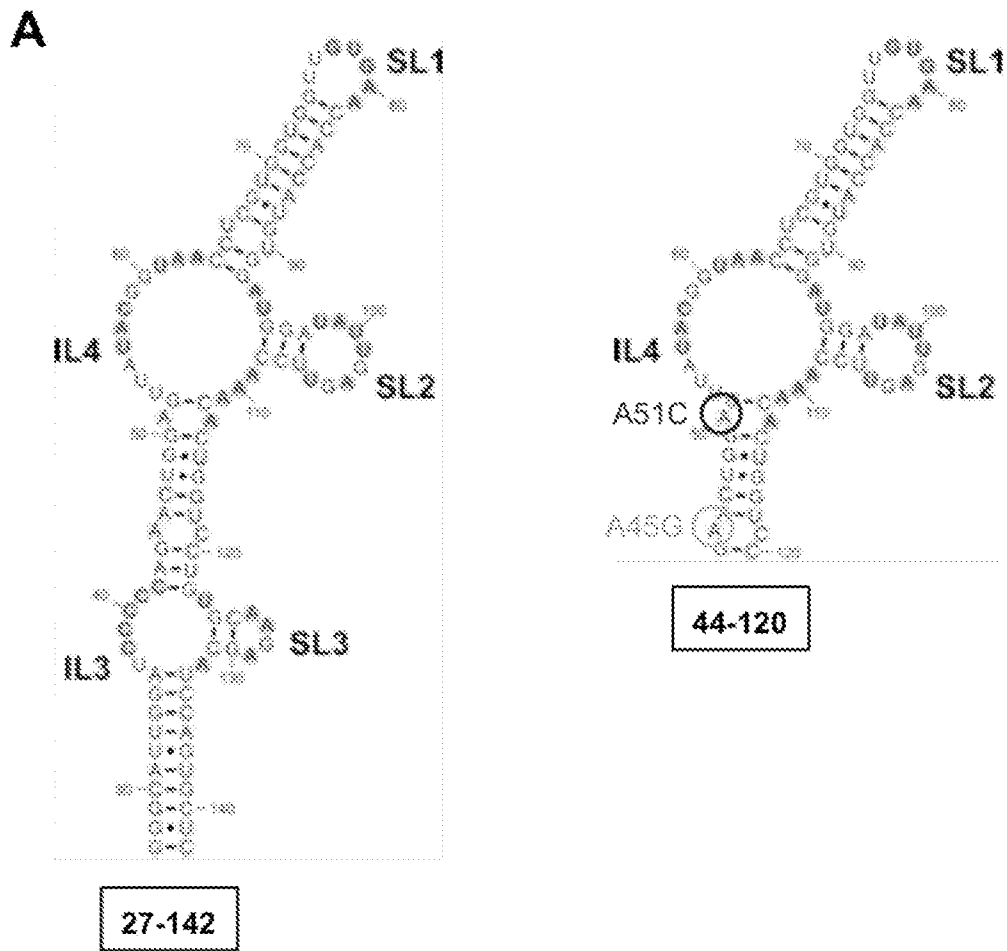


FIG. 13

A

S.No.	Descrizione	Dimensione di ED (bp)
1.	AS-Uchf1 SINEB2	267
2.	AS-Uchf1 SINEB2-b	187
3.	AS-Uchf1 SINEB2 + AS-Uchf1 SINEB2-b	357
4.	Three repeats of AS Uchf1	532
5.	SINEB2/B3 consensus sequence from RepBase	238

S.No.	SINEB2 da antisenso	Orientamento/classe o famiglia di ripetizioni appaiate	Dimensione di ED (bp)	N° di accesso
6.	AS Rhod2	C/SINEB2/B3	214	AK032194
7.	AS Abhd11	C/SINEB2/B3	200	AK041742
8.	AS Epp49	C/SINEB2/B3	214	AK046309
9.	AS Wfdc5	C/SINEB2/B3	205	AK042861
10.	AS Pgbp1	C/SINEB2/B3	221	AK038331
11.	AS Gsl3b	C/SINEB2/B3	191	AK143079
12.	AS Rhod	C/SINEB2/B2_Mm2	205	AK044206
13.	AS Rhod	C/SINEB2/B3A	190	AK044205
14.	AS E4f1	C/SINEB2/B2_Mm2	199	AK368105
15.	AS E4f1	C/SINEB2/B2_Mm1t	159	AK163105

B

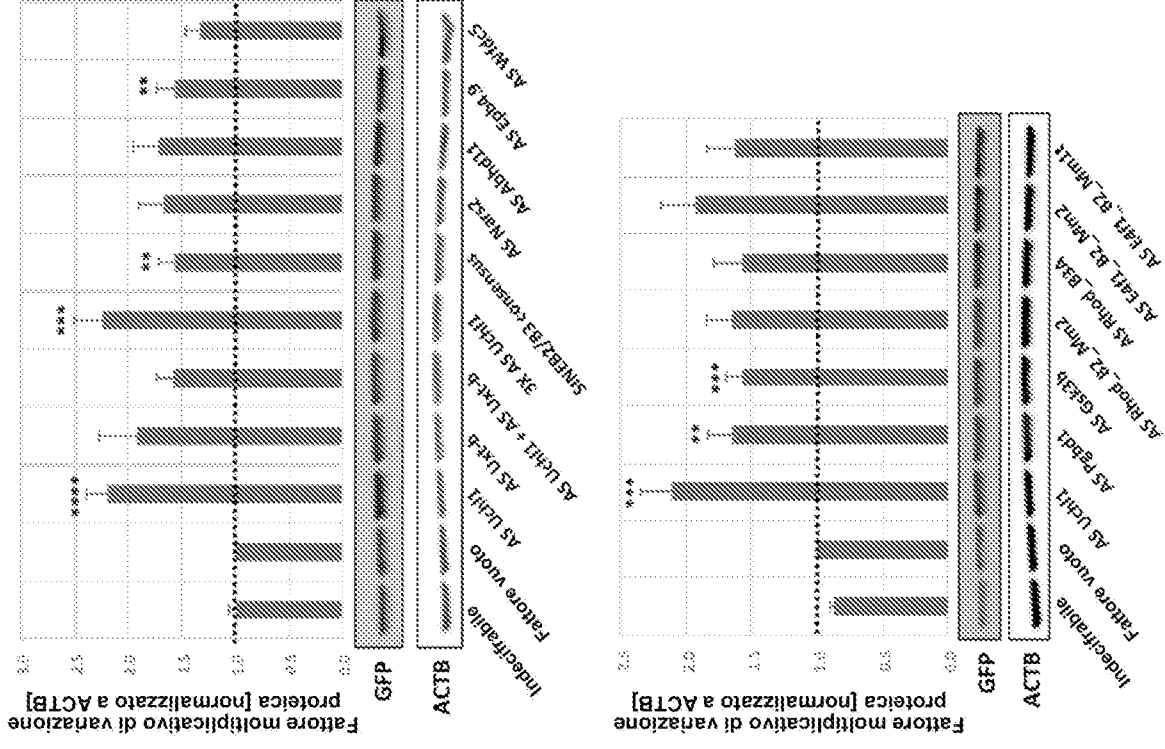


FIG. 14

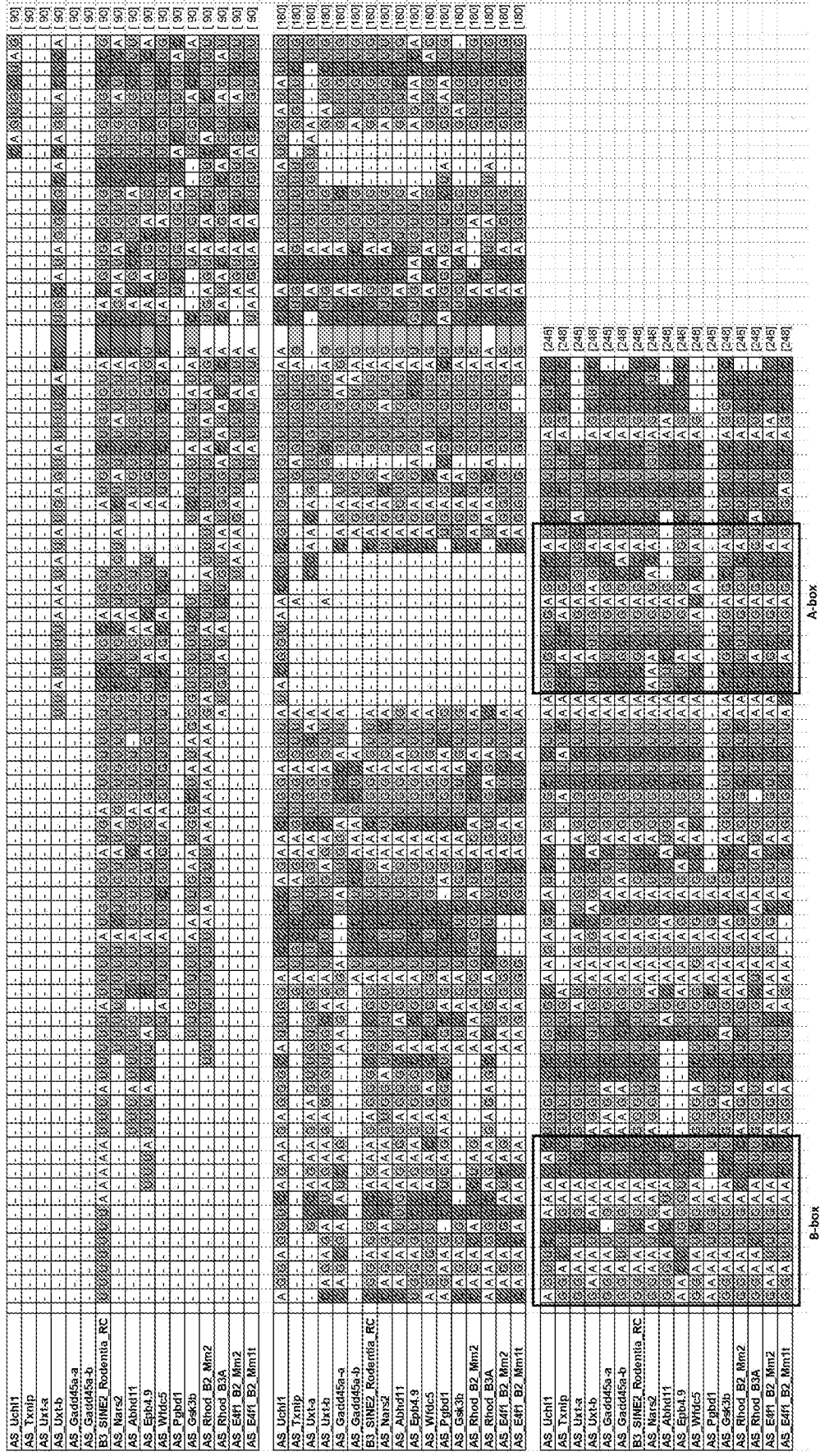


FIG. 15

A

Nome SINE	Lunghezza	Distribuzione	Sequenza
ID (BC1,...)	75	Ratto/Rodentia roditore	GGGGTGGGGATTAGCTCAGTGGTAGAGGGTTGCTTAGCAAGGCGAAGGCGCTGGGTTCSGTCTCAGCTCCG
SB8	95	Brassicaceae/Planta <i>brassicca</i>	GCCGGGACAGAATAGCCTAGTGGTACACTAGAGTGAACCTGGATCCCAAGGCACCTGGGTTGGAGTCCCTCGGGATTCCGGAGACCGCCCTGAC
p-SINE1	115	Riso/Planta riso	GAGAAAGCCCTGGGGTTCGGCTAGCTCCACAAGGTGGTGGCTAGCCACCTGGGTTCCGAAAGGCTACCCCTTCGAATTATTGATATAGTCTCTCCCTCCCTAATATTCGTTG
Sma1	140	Salmonidae/Osteichthyes salmone	GGTCTTCTGTAGCTCAGTTGGTAGAGCATGGGGCTTGTAAAGCCAGGGTAGTGGGTTCCGATTCCCGGACCACTACAGTAAATAATGATGACACATGACTGTAAGTCTCTTGGATAAAAAGCGTCTGCTAAATGSC
SB4	159	Arabidopsis/Planta <i>arabidopsis</i>	ACCACGGTCTGTTGGCCDAGTGGTAAATCTCCACAGGTGGAGGTCCTGGGTTCCAGAGCCAGCTTGGGAGGATCTTCTCCAAAAGAGATGAATTTAACTGGTGGTGGTCCGCTTAGGAGATGTAGGGCCCTTGGGCTTGAACCTCCAGATATTC
SB1	171	Brassicaceae/Planta <i>brassicca</i>	ACCAGGACCTCGTAGTCCAGTGGTACTACTCTCTTTGGGGAGGGAGGTTGGCTGTTCSACTCGGGGAGGGGGAGGGTCCCGCAGGGCCCTAACCGGTACAGGCACAGGCTGGCCCGGGCCCTAGGTGGGCTGGTCCGAAGGCTGGTCAACACTGGTTAATCA
B2	185	Certi roditori/ Mammalia roditore	GGGCTGGAGAGGCTGGTGGTGGTTAAAGGATCTAGAGTCTCTCAAGGCTGTGAGTTCCAMTCCAGGACACATGGTGGCTCAATACCTATCTGTAATGAGATCTGGCTCTGCTGTGATGAGAGCTAGAGTATAGGTTGACTTACAGTGGAGAAAGAAAGAAAGAAAGAGCTT
Hpa1	189	Salmonidae/Salmone noidei salmone	GGGGCGGAGGGTAACTAGTGGTTAGAGCTTGGACTAGTAAACCGAAAGGTTGCAAGTTCAAATCCCGAGCTGACAAGGTACAATCTGTGGTTCTGGCCCTGAAACAGGCAGTTAACCCACTGTTCCCTAGCCGTCATGAAAATAAGAAATTTGTTCTTAACTGACTTGGCTAGTTAAAATAAAGGT
ERE-B2	235	Cavalli/Mammalia cavalli	GGGGCCAGCCCGTGGCCGTGGTTAAGTTGGCCGCTCCGCTTCCGGCCCGCCGGGGTTGGCCGGTTCCGATCCGGGCGGACCTACACACTGTGAGGCTCATGCTGTGGCGGCTCCACATACAAATAGAGGAAGATTGGCACAGATGTTAGGCTCAGGGCCAAATCTTCTCAAGAAAAGAGAGGAGATTGGCAACASATGTTAGCTCAGGGGAAATCTCCCTCAGC
Ther-1 (MIR)	252	Vertebrata essere umano	GCAGTGTGGCCAGTGGATAGAGGACGGGACCTGGAGTCAGGAAGACCTGGGTTGCAATCCCGGCTCTGGCACCTTACTAGCTGTGACTTGGCCCTGGGCAAGTCACTTAACTCTCTGTGGCTCAGTTCTCCACTGTAAAATGGGATATAATAGCACCTACCTCACAGGGTTGTGTGAGGATTAATAATGAGATAATATATGTAAAGCCCTTAGAACACAGTGGCTGGCACATAGTAGCCCTATAATAAATGTT

FIG. 16

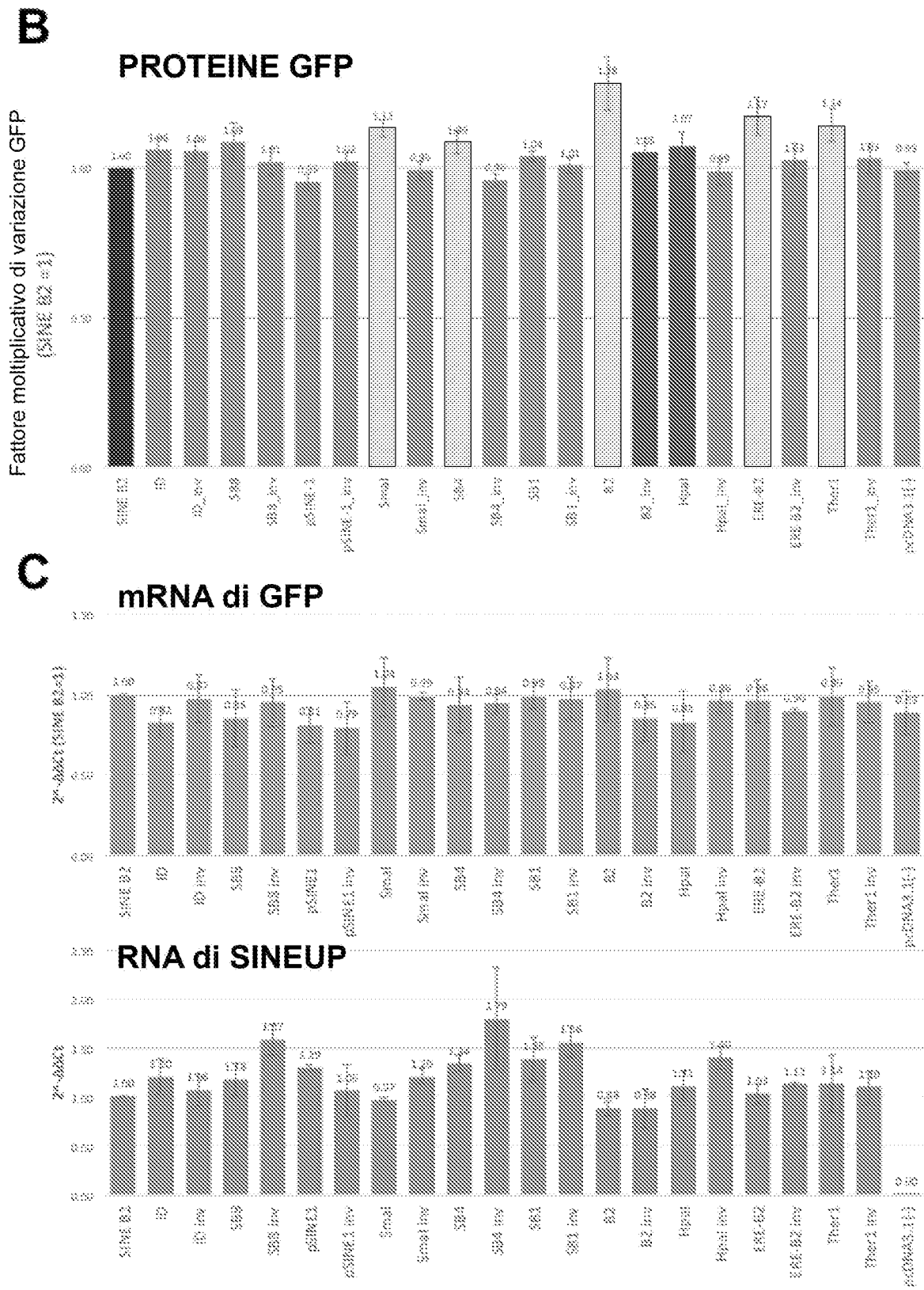


FIG. 16

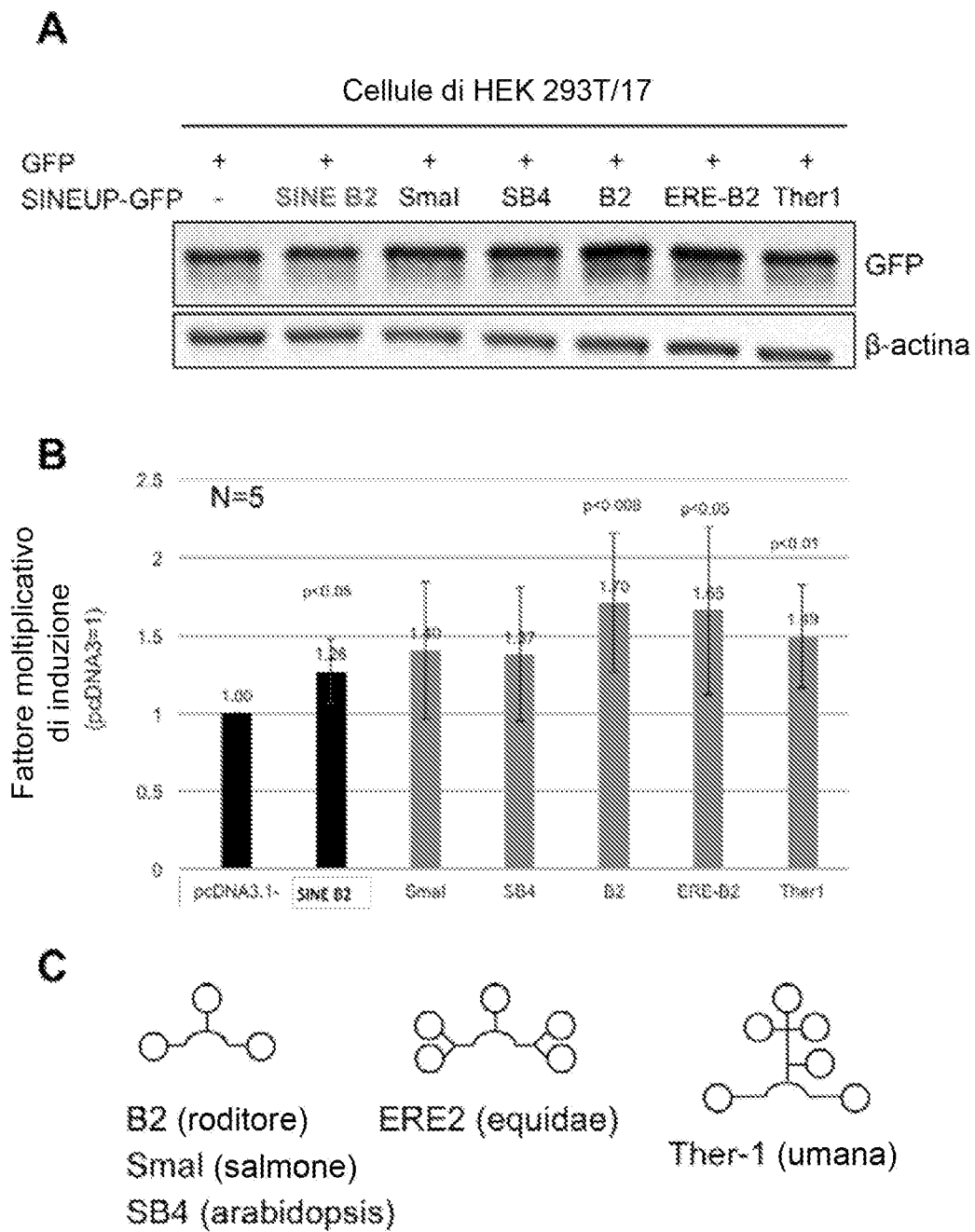


FIG. 17

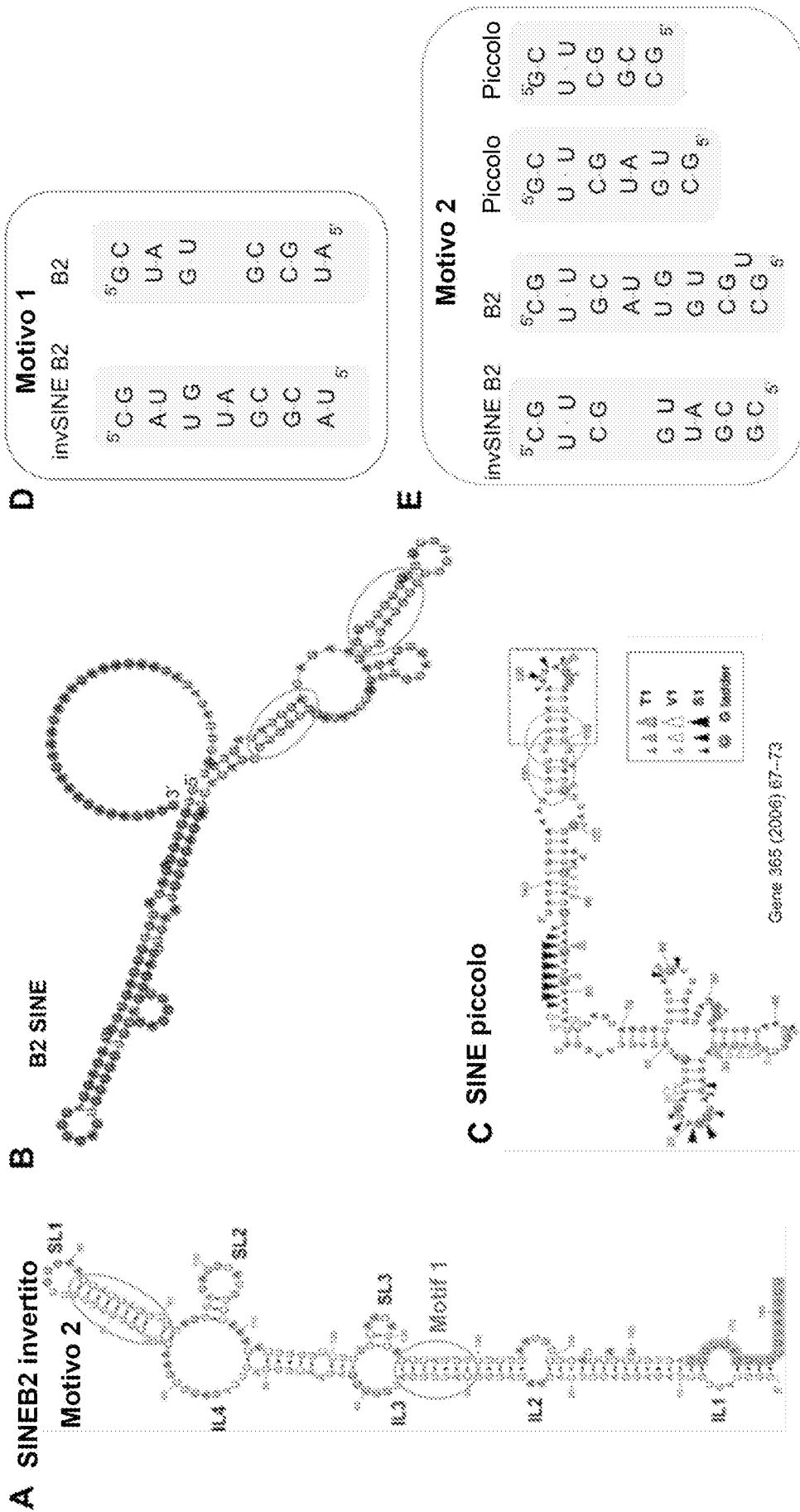


FIG. 18

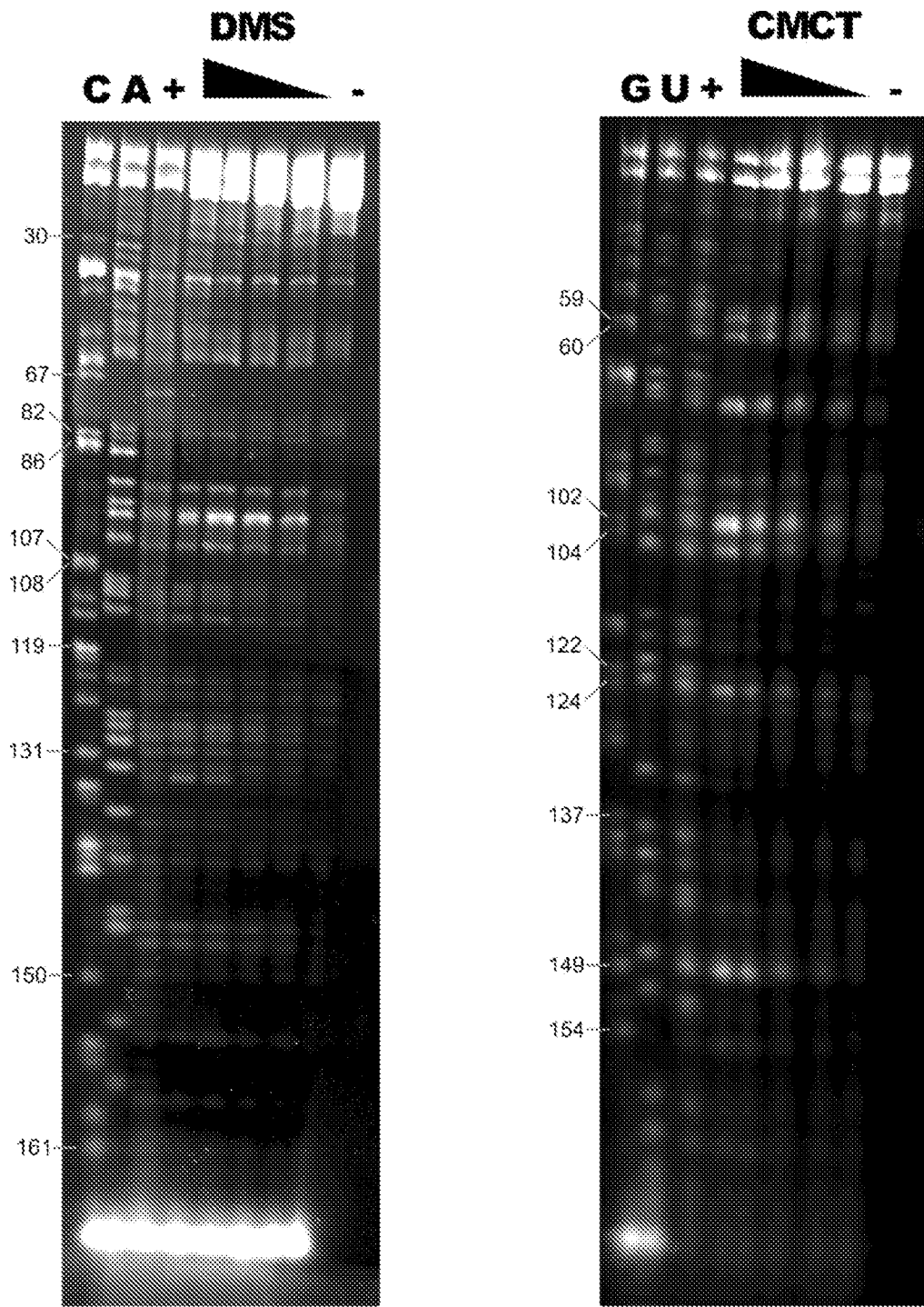


FIG. 1

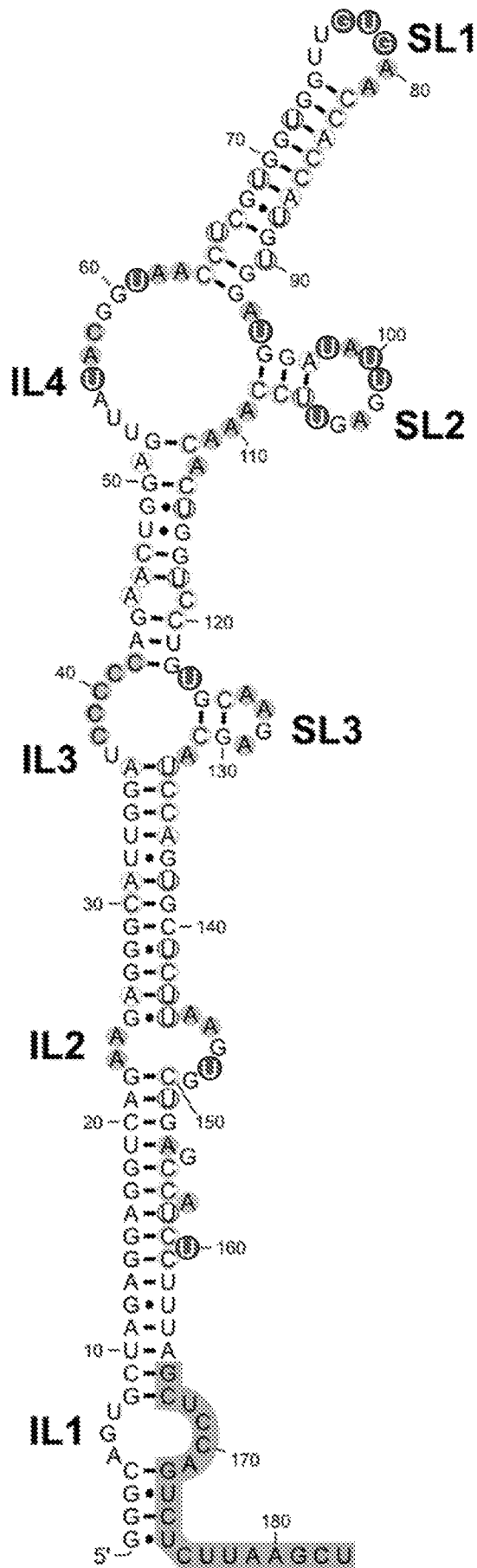


FIG. 2

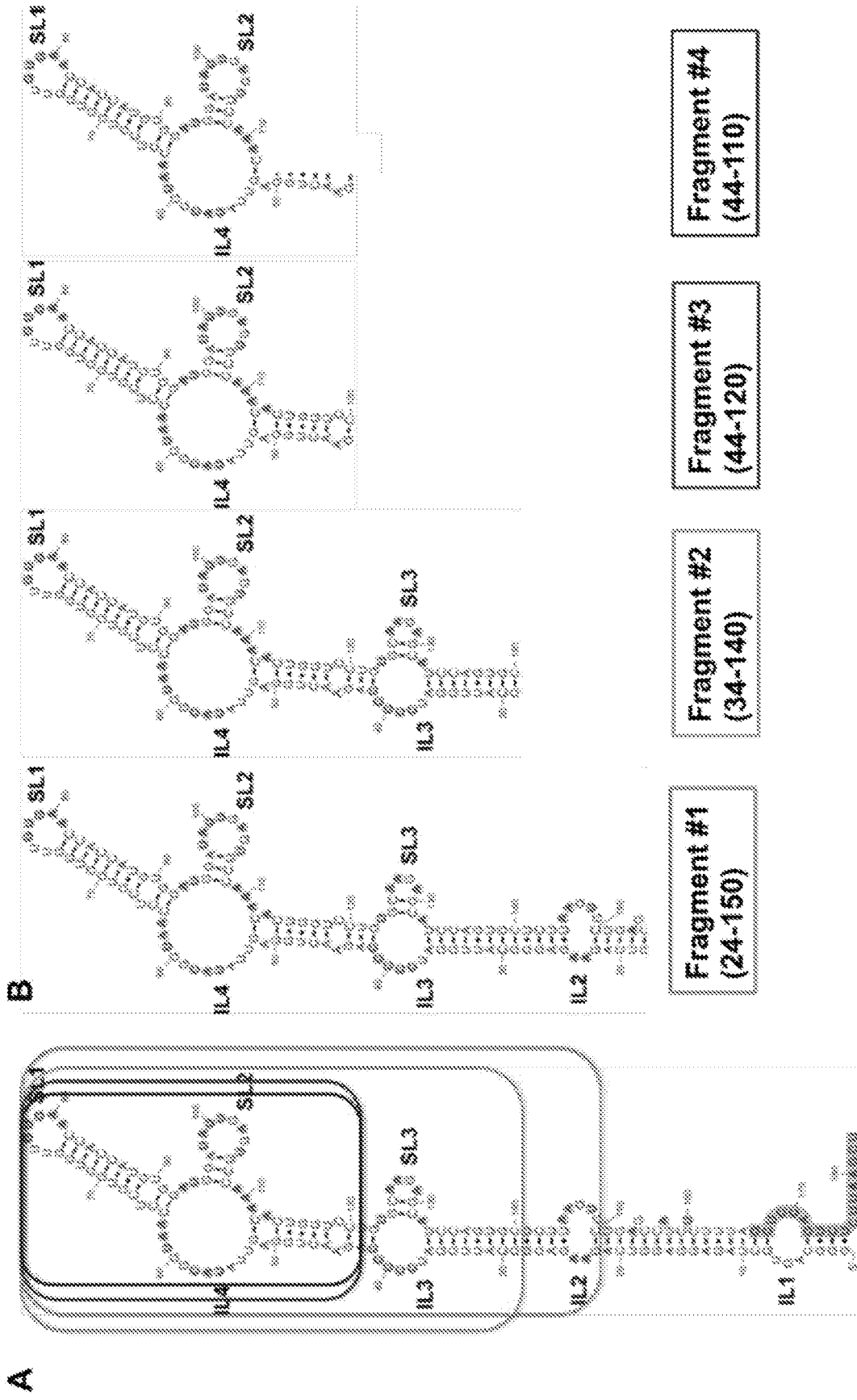


FIG. 3

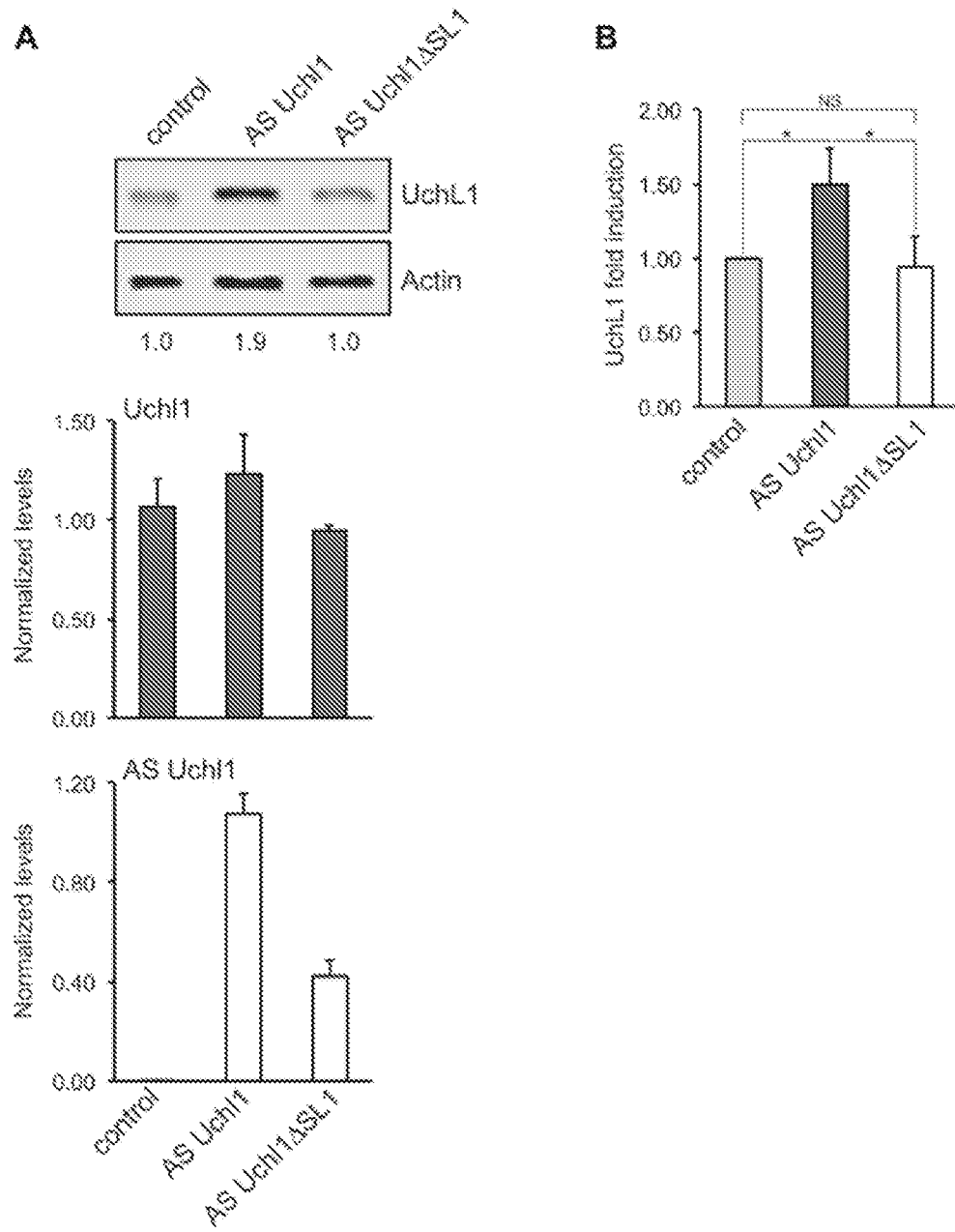
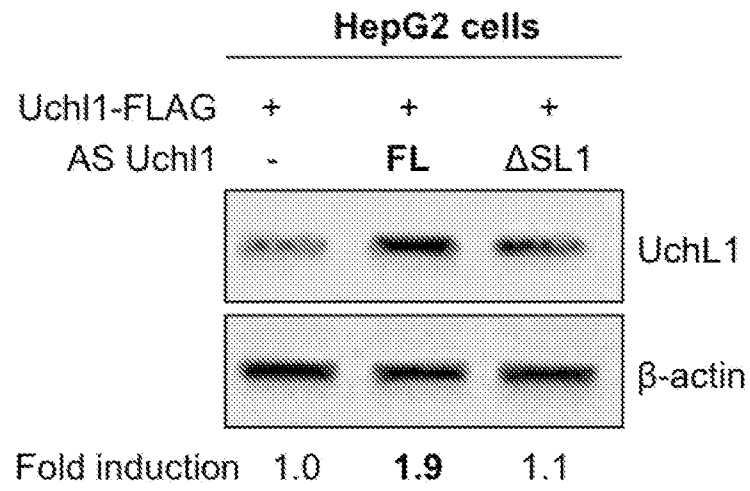
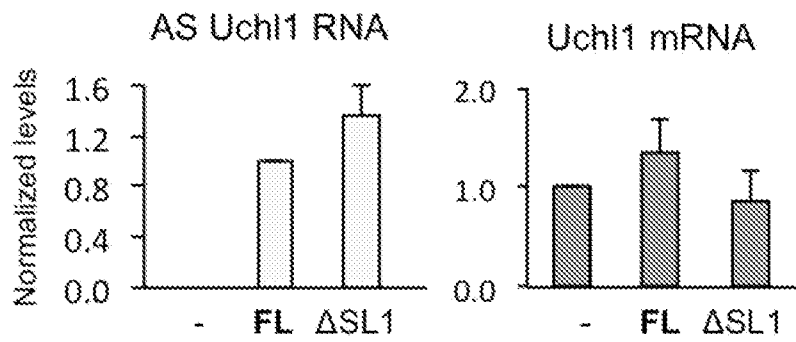


FIG. 4

A**B****FIG. 5**

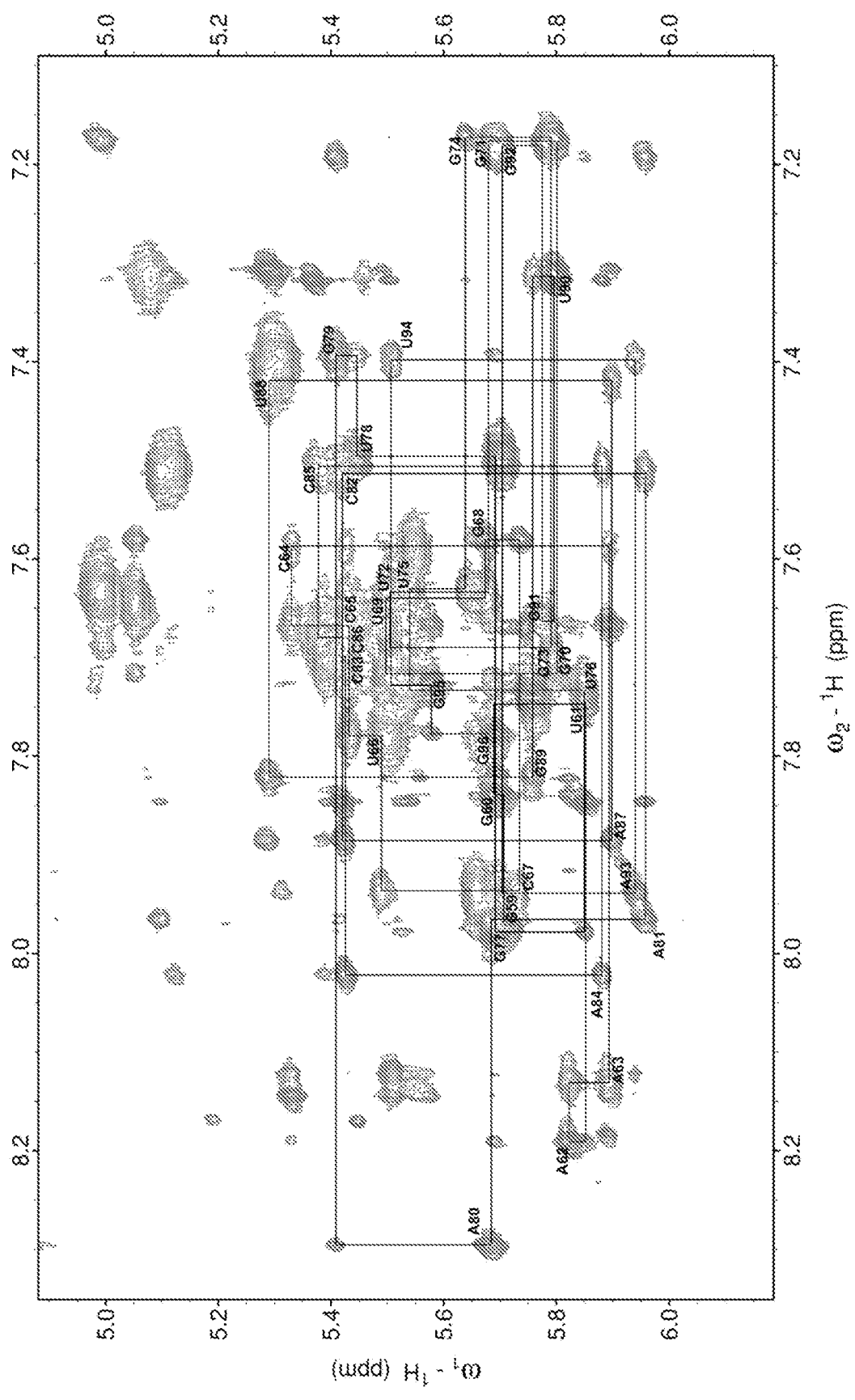


FIG. 8

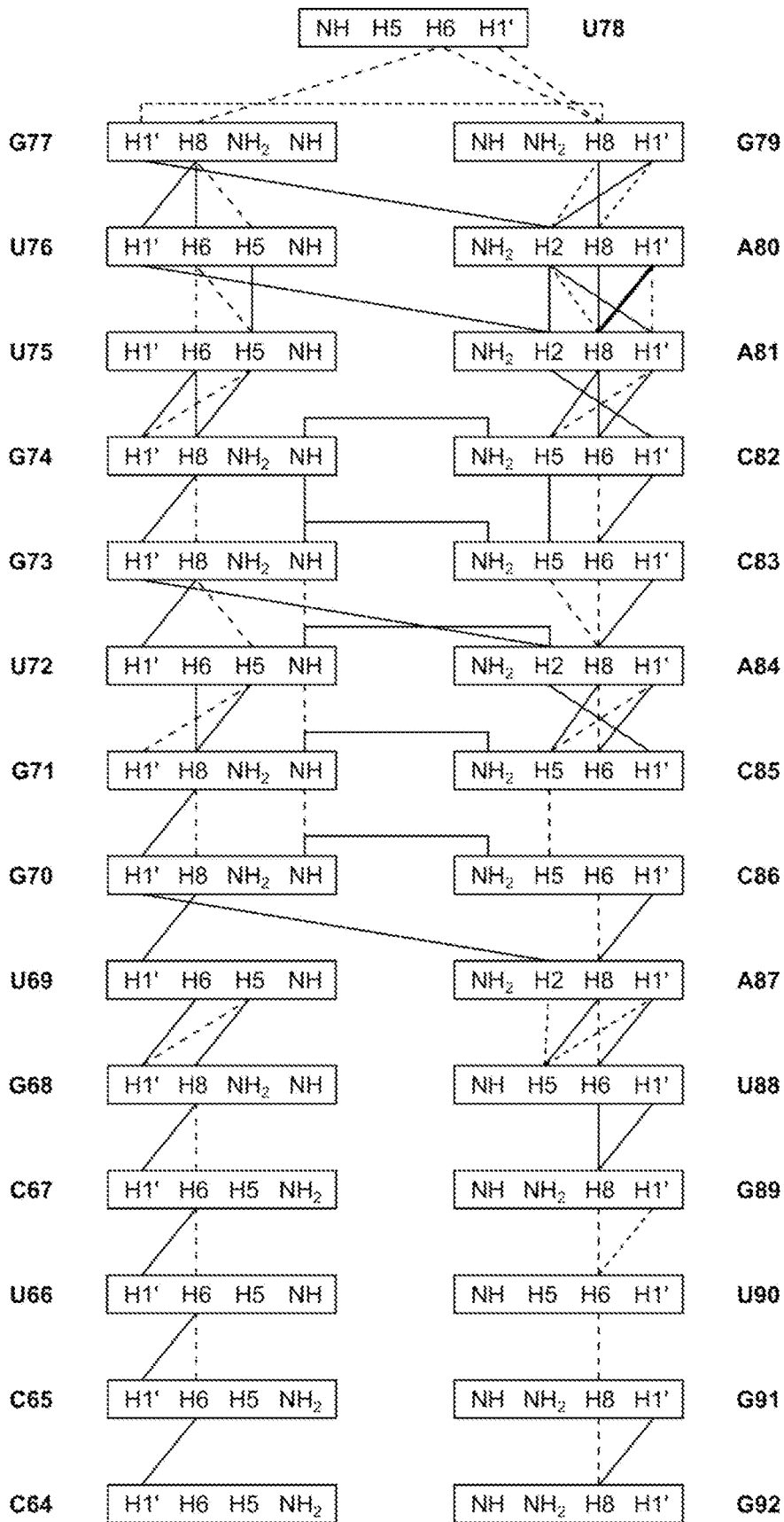


FIG. 9

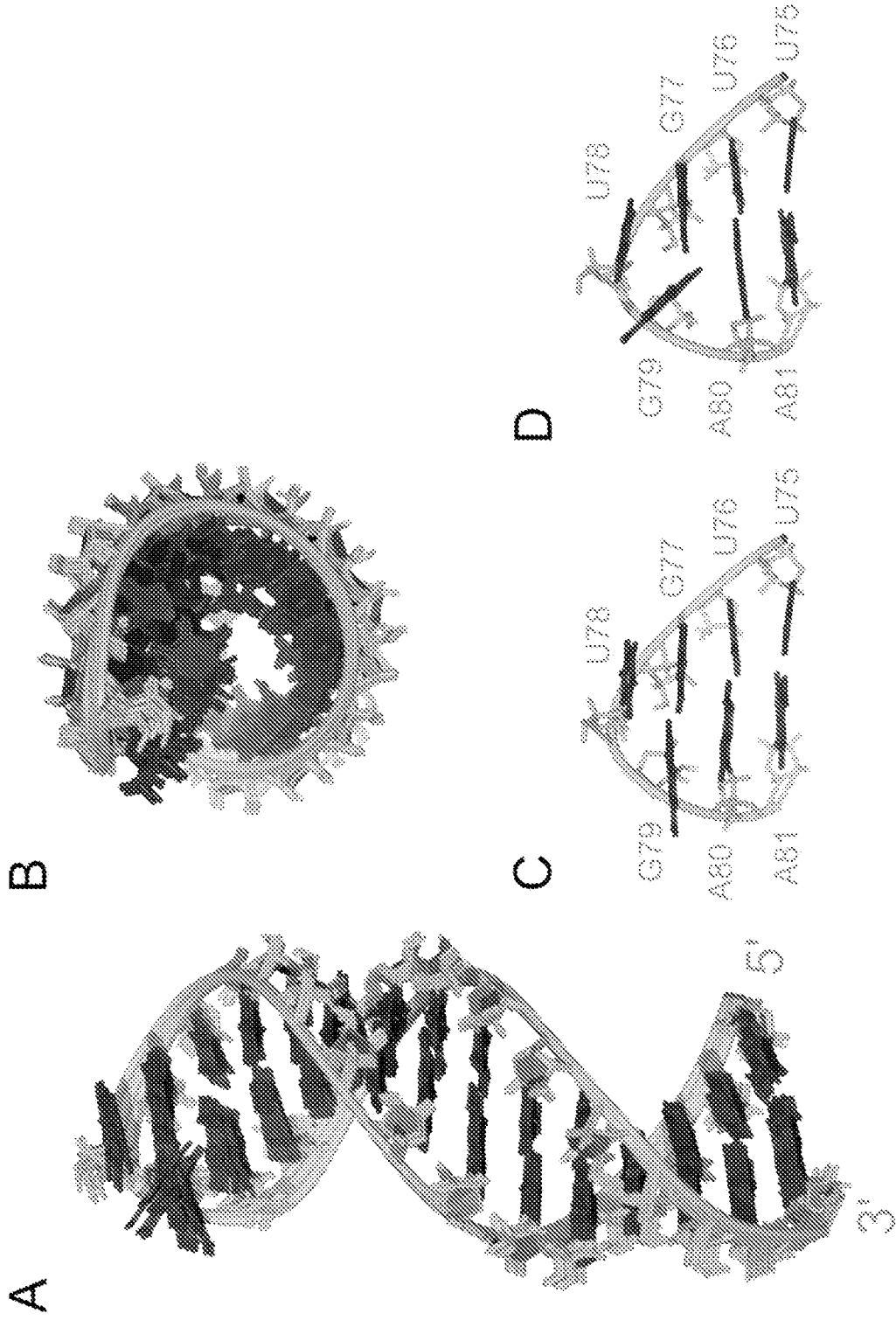


FIG. 10

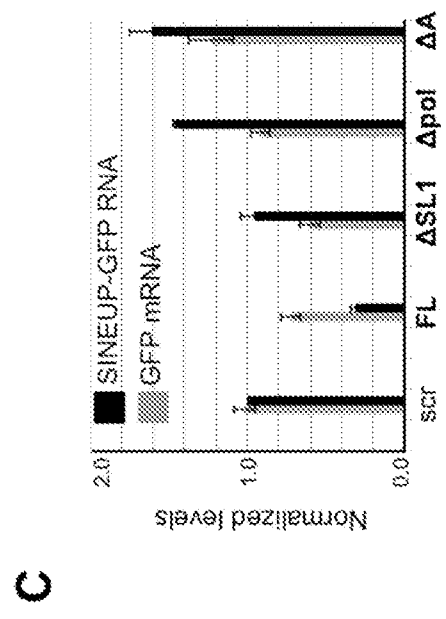
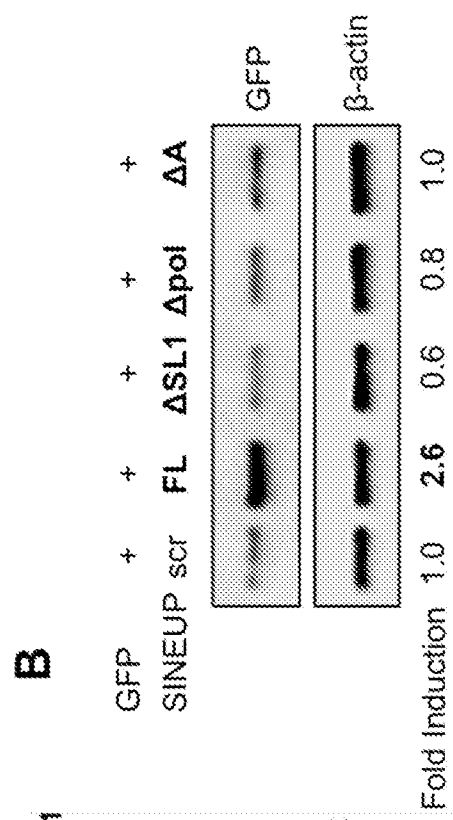
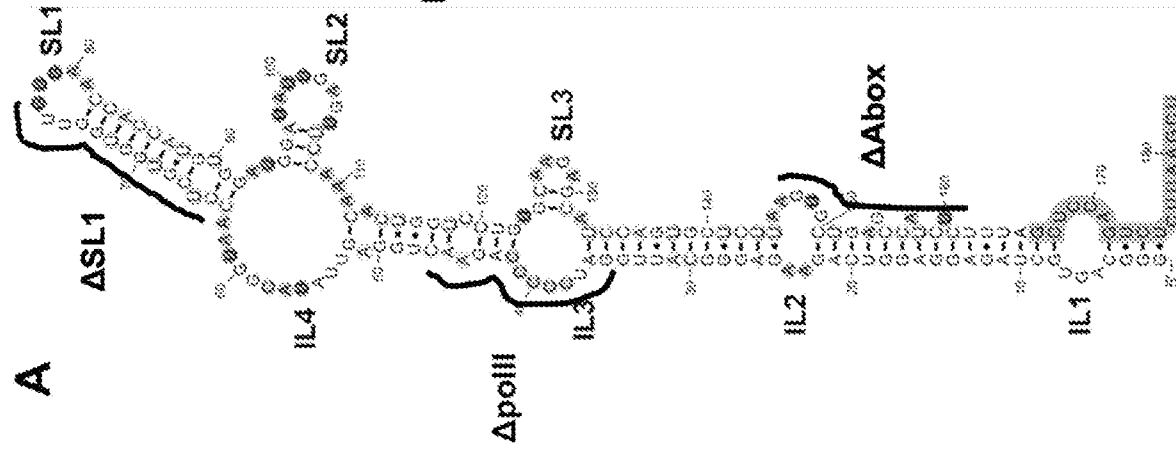


FIG. 11

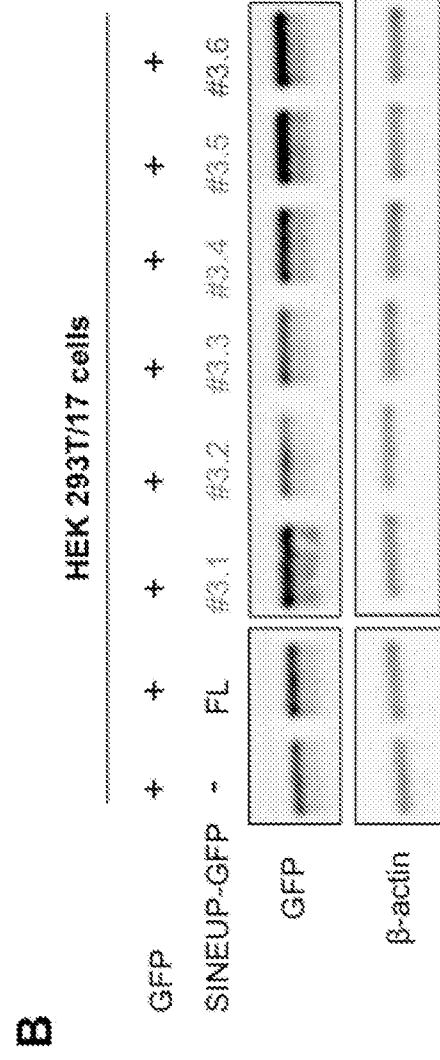
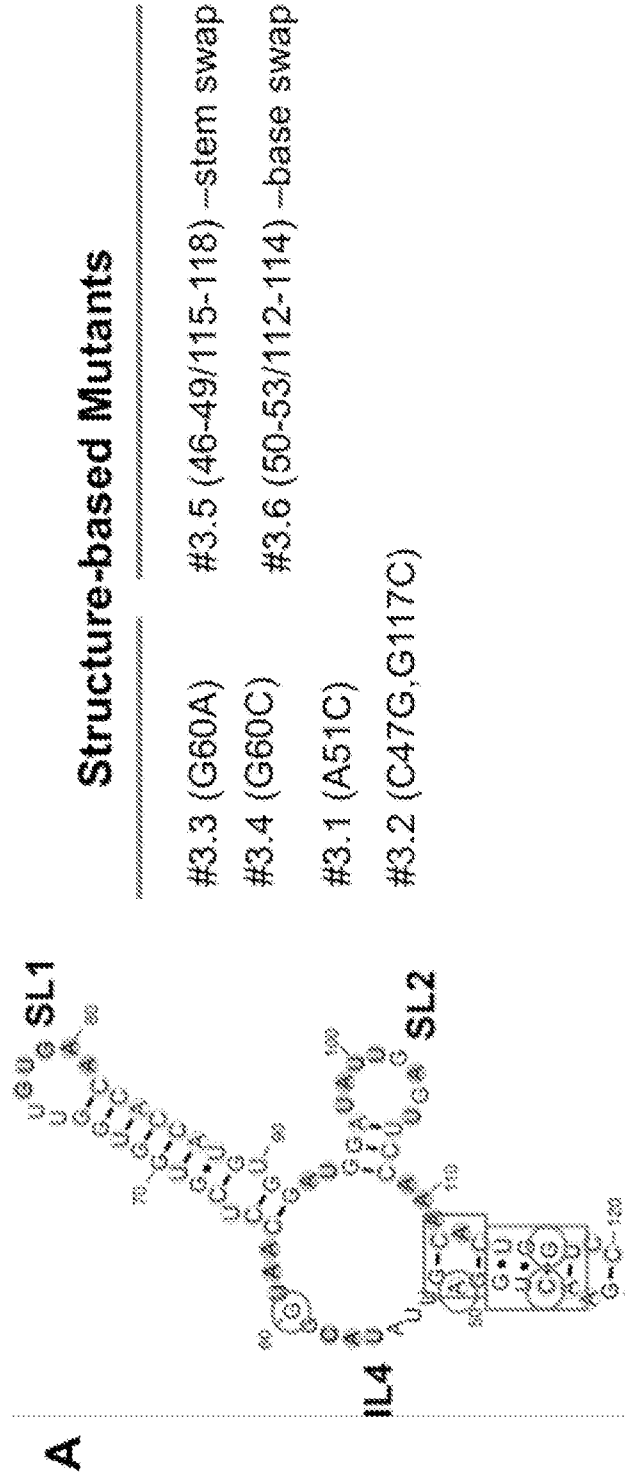


FIG. 12

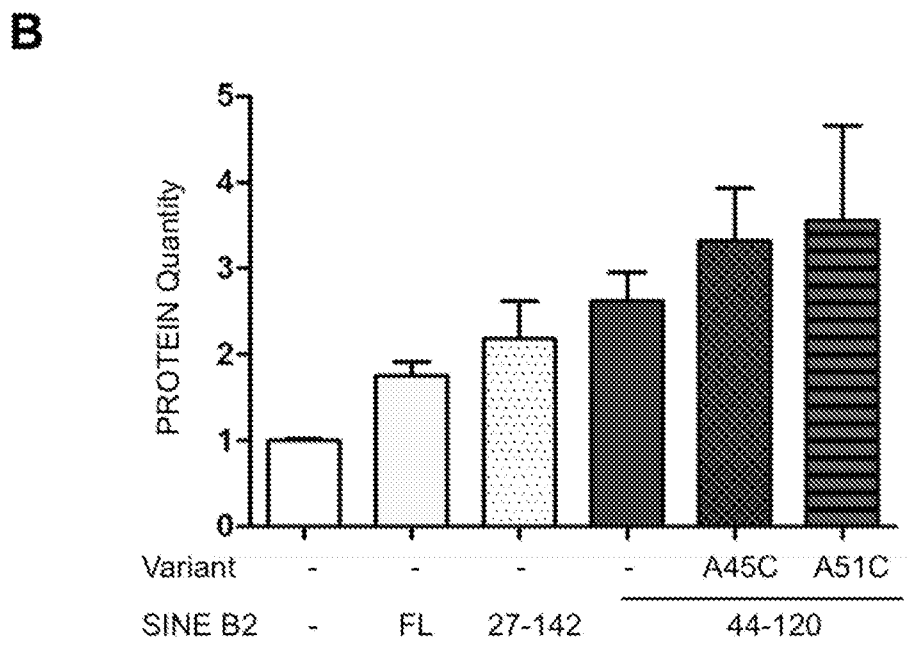
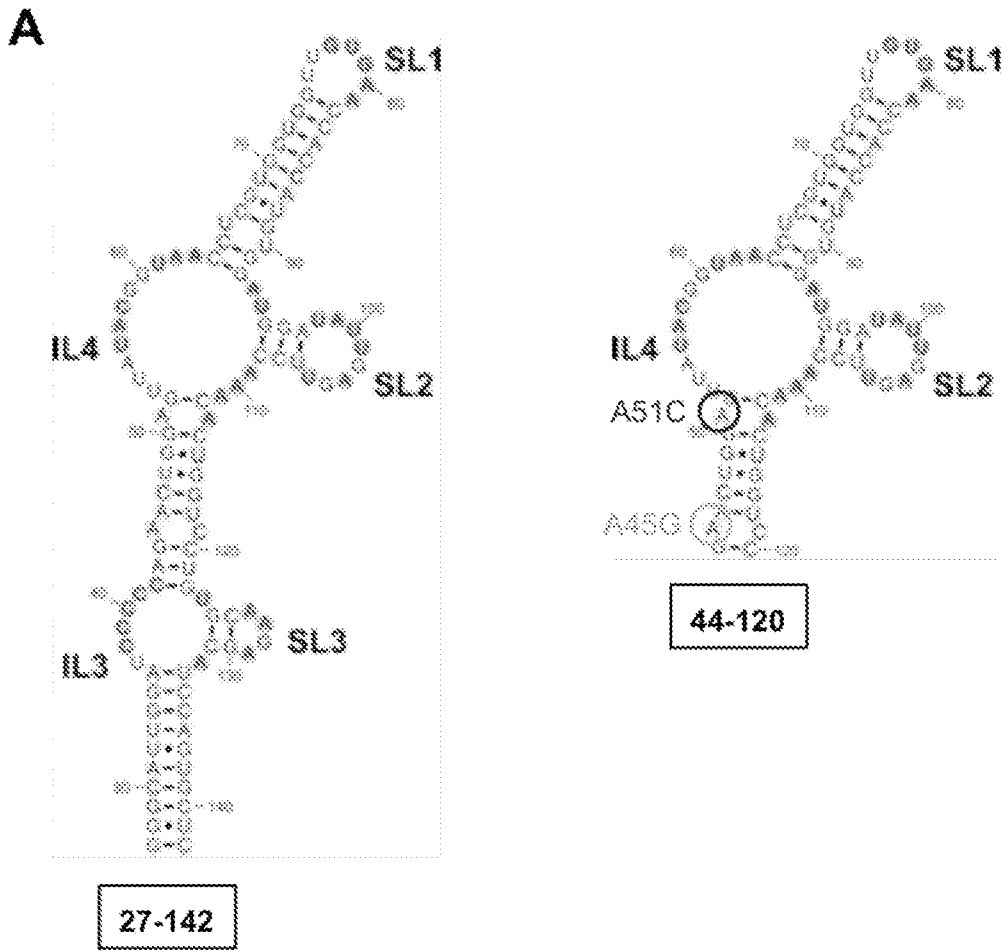


FIG. 13

A

S.No.	Description	Size of ED (bp)
1.	AS Uchl1 SINEB2	207
2.	AS Uchl1 SINEB2-b	187
3.	AS Uchl1 SINEB2 + AS Uchl1 SINEB2-b	357
4.	Three repeats of AS Uchl1	532
5.	SINEB2/B3 consensus sequence from RepBase	238

S.No.	SINEB2 from Antisense family/ Matching repeat	Orientation/ Repeat class or family/ Matching repeat	Size of ED (bp)	Accession Na.
6.	AS Rna2	C/SINEB2/B3	214	AK032194
7.	AS Abhd11	C/SINEB2/B3	200	AK041742
8.	AS Epp49	C/SINEB2/B3	214	AK046309
9.	AS Wfdc5	C/SINEB2/B3	205	AK042861
10.	AS Pgbp1	C/SINEB2/B3	221	AK034331
11.	AS Gsl3b	C/SINEB2/B3	191	AK143079
12.	AS Rhod	C/SINEB2/B2_Mm2	205	AK044206
13.	AS Rhod	C/SINEB2/B3A	190	AK044205
14.	AS E4f1	C/SINEB2/B2_Mm2	199	AK363105
15.	AS E4f1	C/SINEB2/B2_Mm1t	159	AK163105

B

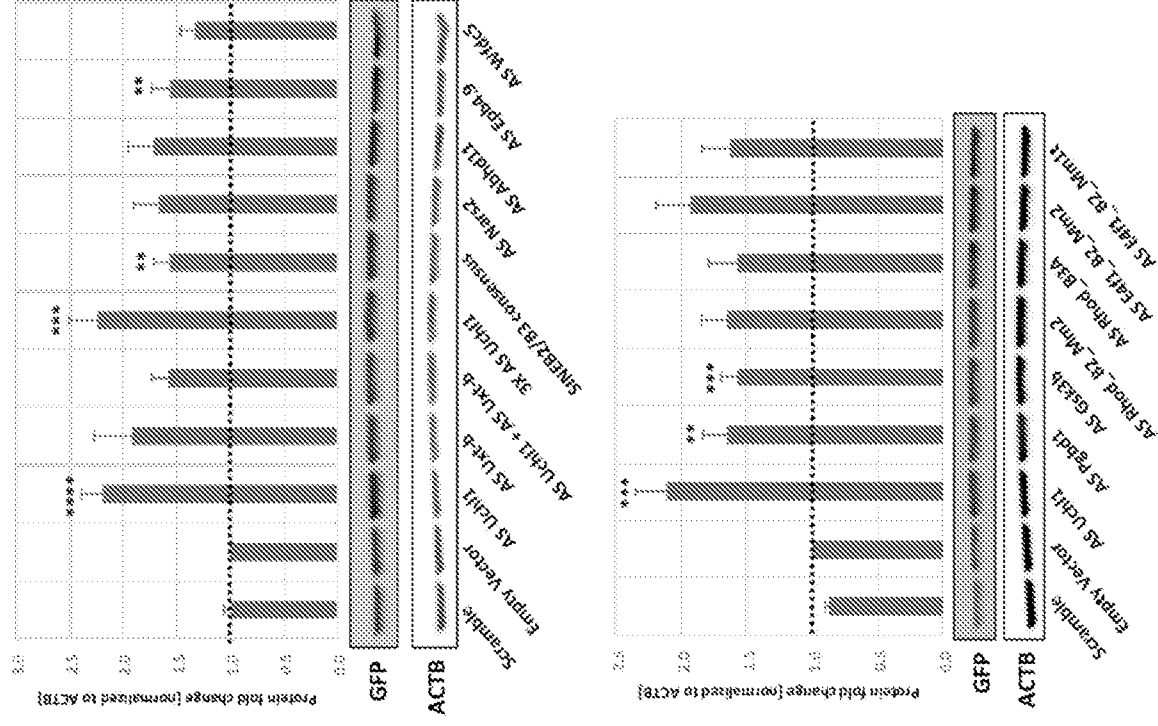


FIG. 14

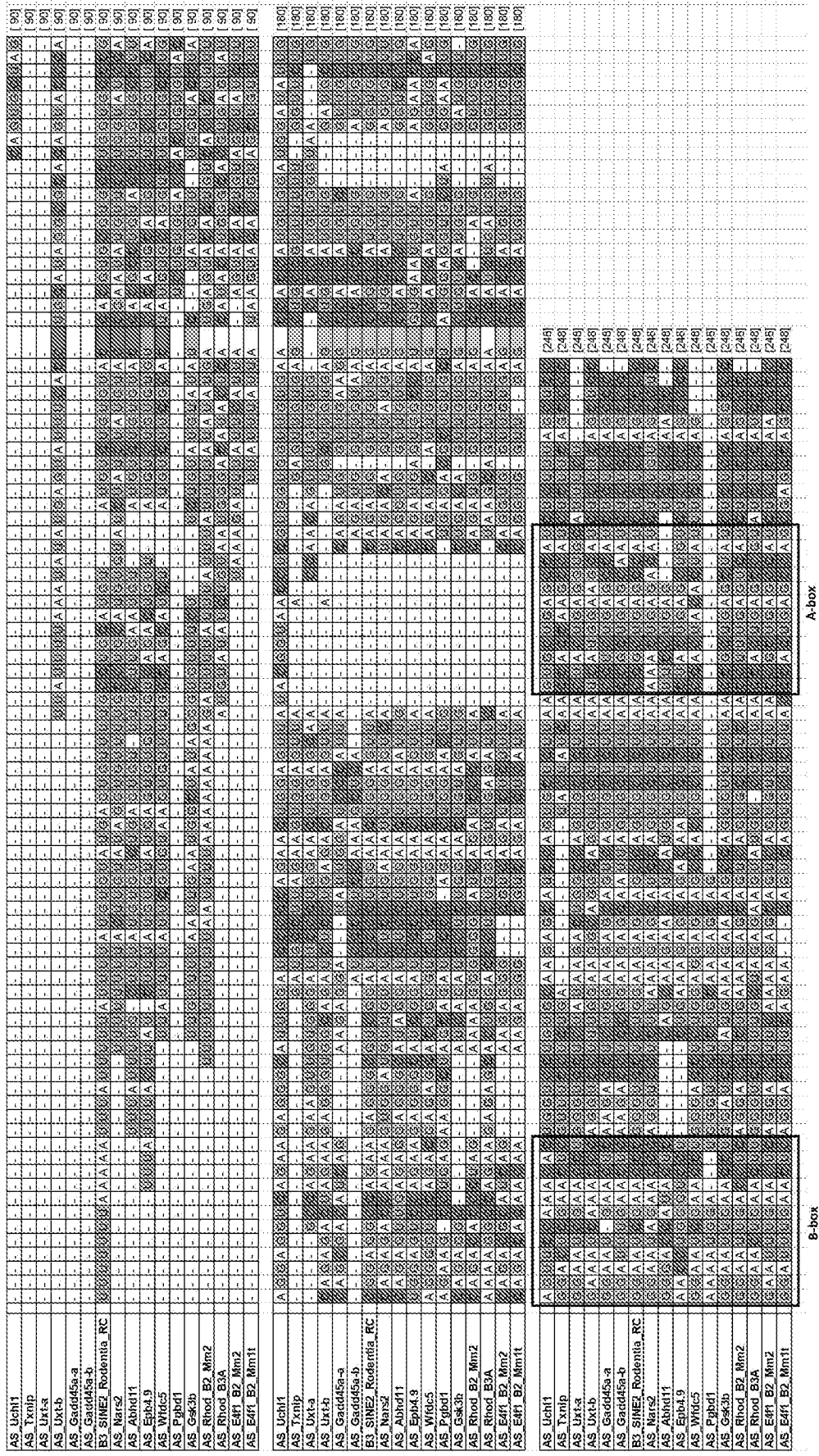
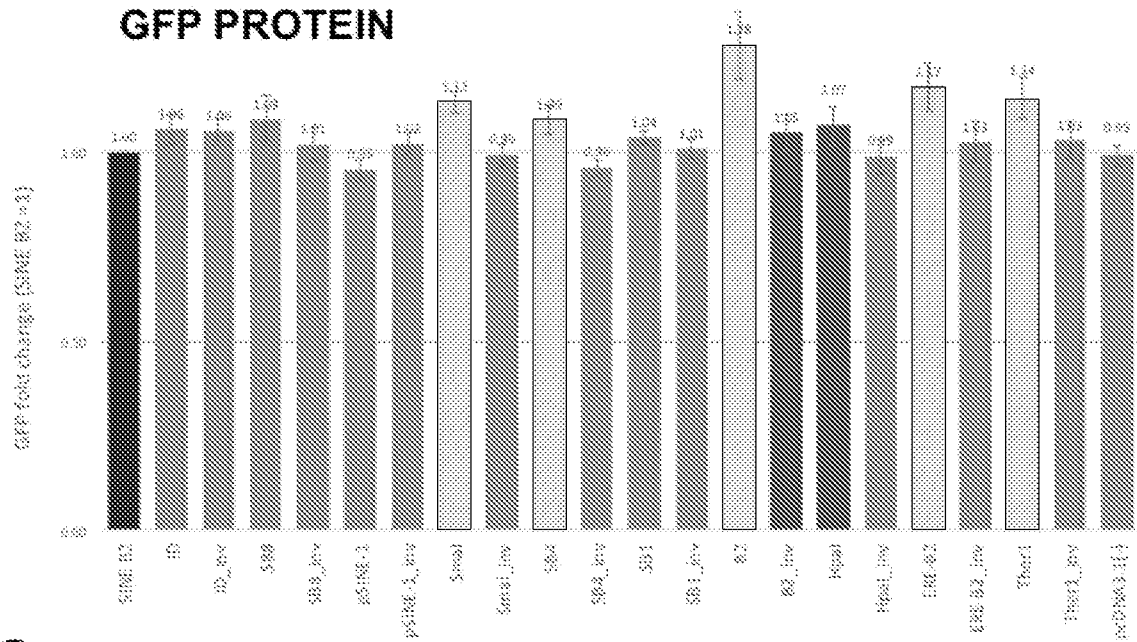
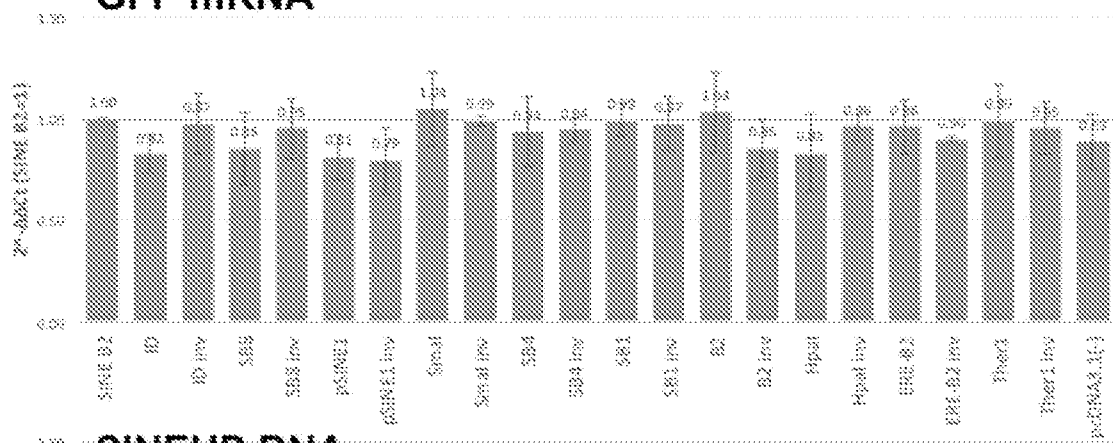
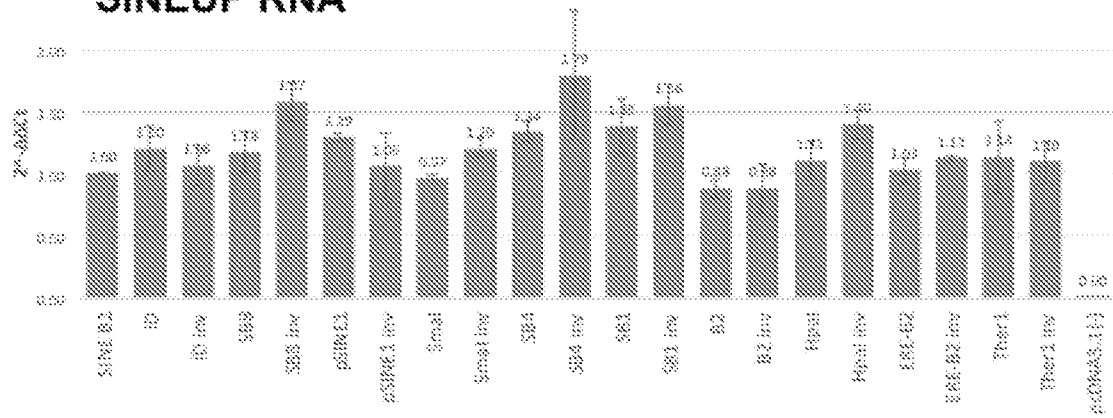


FIG. 15

A

SIME name	Length	Distribution	Sequence
ID (BC1,...)	75	Rat/Rodentia rodent	GGGGTGGGGATTAGCTCAGTGGTAGAGCGTTGCTTAGCAAGGCAAGGCCCCGGTTGGTCC TCAGCTCCG
SB8	95	Brassica/Planta brassica	GCCGGACAGAATAGCCTAGTGGTACACTAGAGTGAACCTCCAAAGSCACTGGGTGGAGT CCTCTGGGATCCGGAGACCGCCCTGAC
p-SINE1	115	rice/Planta rice	GAGAAAGCCCTGGGGTCTTCGGCTAGCTCCACAAGGTGGTGGCTAGCGACCTGGGTTCGAA GGCTCACCCCTCTAATTATTGATATAGTCTCTCCCTAATATGCTG
SmaI	140	Salmonidae/Osteic thyes salmon	GGTCTTCGTAGCTCAGTTGGTAGAGCATGGGCTGTGTAAGCCAGGGTAGTGGTTCGATTCCG GGACCACCATACGTAAAATGTAATGACACATGACTGTAAGTCTCTTGGATAAAAGCCCTGCTAA ATGGC
SB4	159	Arabidopsis/Planta arabidopsis	ACCAAGTCTCTGGGCTCAGTGGTAAATCTCCAGGTGGAGGCTGGTTCGAGGCCAGCTTGGG AGGGATCTCTCCAAAAGAGATGAATTAACCTGGTGGTGGTCCCTTAGGAGATGTAGGGC CTTTGGGCTTGAACCTCCAGATAATC
SB1	171	Brassica oleraceae/Planta brassica	ACCCAGGACCTGGTAGTCCAGTGGTACACTCCCTCTTGGGGAGGAGGTTGGCTGTTCSACTC GGGGGAGGGGGAGGCTGCCAGGGCTTAACCGGTACAGSCACAGGCTGGCCCGGGCTAG GTGGTGGCTGGTGGAGGCTGGTCAADACTGGTTAATCA
B2	135	Canine mammalia	GGCTTGGAGCAGTGGCTGGTGTAAAGGATCTGACTGTCTTTCAGAGGCTGTGACTTCAAT CTCAGGACACAGTGGTGGCTAAAGCTATCTGTAATGAGATCTGATGCCCTCTGTGCTGTGTA AGCAGCTAGAGTGTACTTACATGAGAGAAAGAAAGAAAGAAATCTT
HpaI	189	Salmonidae/Salmo noidei salmon	GGGCGGCAAGGGTAGCCTAGTGGTTAGAGCTTGGACTAGTAAACCAGAAAGGTTGCAAGTCAAT CCCCGAGCTGACAAGGTACAAMTGTGTGTTCTGCCCTGAAAGAGGAGTTAACCCACTGTTCCCTA GGCCGTCATTGAAAATAAGATTTGTTCTAAGTACTGCTAGTTAAATAAAGGT
ERE-B2	235	horses/Mammalia horses	GGGCGAGCCCGTGGCTGTGGTGAAGTTGCGCGCTCCGCTTGGCGCCCGGGGTTGGCC GGTTGGATCCGGGCGGACCTACACCCTGTGAGGCTGTGAGGCTGTGGCGGCTGCA-CATA-CA AATAGAGGAAGATTGGCACAGATGTAGCTCAGGSCCAATCTTCTCAAGAAAAAAGAGGAGAT GECACASATGTAGCTCAGGGGAATCTTCCCTCAGC
Ther-1 (MIR)	252	Vertebrata human	GCAGTGTGGCGAGTGGATAGAGCAGGGACCTGGAGTCAGGAAGACCTGGGTTGATCCCGGC TCTGCCACTTACTAGCTGTGTGACTTGGGCAAGTCACTTAACCTCTCTGTGCCCTCAGTTTCCCTCATCT GTAAAATGGGATAAATAGCACCTACCTCACAGGGTTGTGTGAGGATTAATAGAGATAATATG TAAGCCCTTAGAACACAGTGGCTGGC-CATAGTAGGCGCTATAATAATGTT

FIG. 16

B**GFP PROTEIN****C****GFP mRNA****SINEUP RNA****FIG. 16**

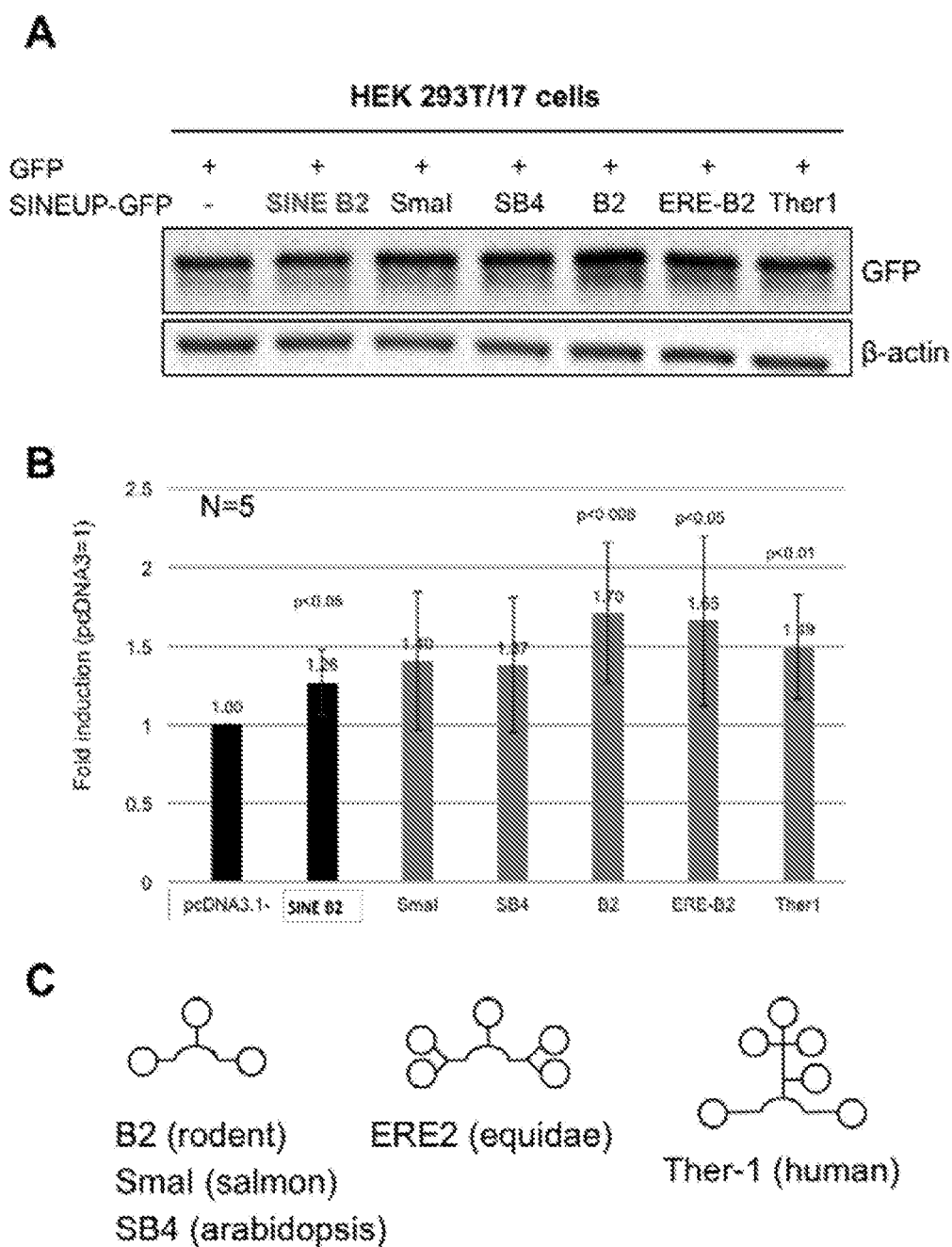


FIG. 17

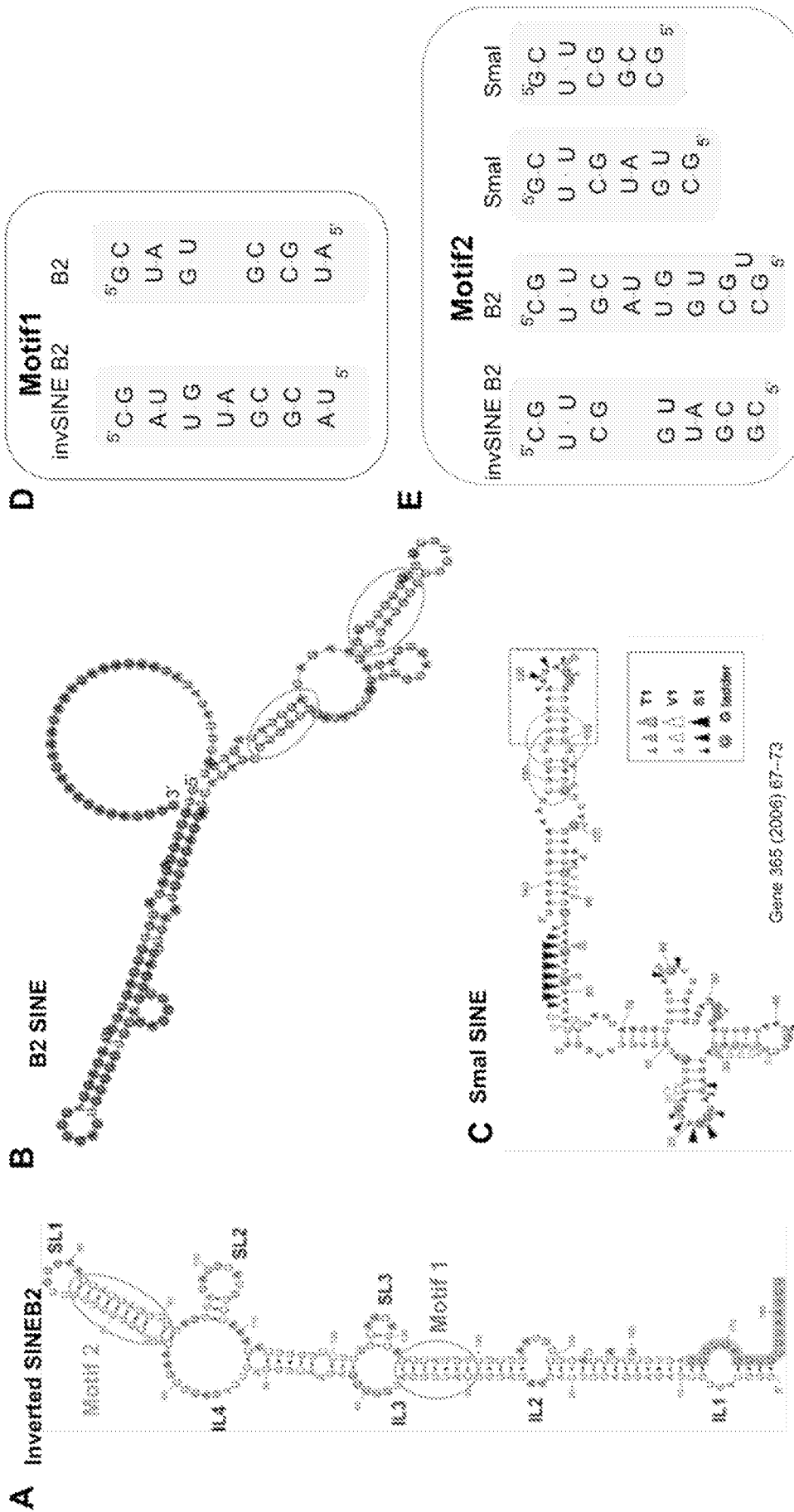


FIG. 18