



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0005548
(43) 공개일자 2021년01월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 2310/11 (2013.01)
- (21) 출원번호 **10-2020-7025572**
- (22) 출원일자(국제) **2019년02월05일**
심사청구일자 **없음**
- (85) 번역문제출일자 **2020년09월04일**
- (86) 국제출원번호 **PCT/IB2019/050914**
- (87) 국제공개번호 **WO 2019/150346**
국제공개일자 **2019년08월08일**
- (30) 우선권주장
102018000002411 2018년02월05일 이탈리아(IT)

- (71) 출원인
**스쿠오라 인타나찌오나레 수페리오레 디 스투디아
아반짜티-에스.아이.에스.에스.에이**
이탈리아 34136 트리에스테 비아 보노메아 265
트렌사인 테라퓨틱스 리미티드
영국 에스지8 5비유 로이스턴 미들 드리프트 1
- (72) 발명자
구스틴치크, 스테파노
이탈리아 34136 트리에스테 비아 보노메아 265 스
쿠오라 인타나찌오나레 수페리오레 디 스투디아 아
반짜티 - 에스아이에스에스에이 내
추켈리, 실비아
이탈리아 34136 트리에스테 비아 보노메아 265 스
쿠오라 인타나찌오나레 수페리오레 디 스투디아 아
반짜티 - 에스아이에스에스에이 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 이윤기

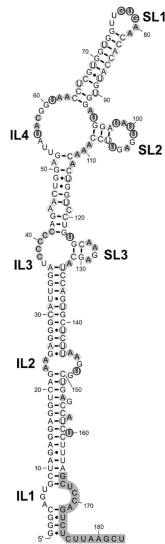
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 **번역을 상향-조절하는 안티센스 RNA 분자의 구조 도메인**

(57) 요약

단백질 번역이 증진되어야 하는 표적 mRNA 서열에 대해 역 상보성인 서열을 포함하는 표적 결합 서열; 및 특정 스텝-루프 및 내부 루프 도메인을 포함하는 2-차원 구조를 가지며, 번역 증진 효율을 나타내는 조절 서열을 포함하는 기능적 핵산 분자가 개시된다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12N 2310/531 (2013.01)

C12N 2310/532 (2013.01)

C12N 2320/11 (2013.01)

(72) 발명자

포드베브세크, 페테르

이탈리아 34136 트리에스테 비아 보노메아 265 스
쿠오라 인타나찌오나레 수페리오레 디 스투디 아반
짜티 - 에스아이에스에스에이 내

플라베크, 자네즈

이탈리아 34136 트리에스테 비아 보노메아 265 스
쿠오라 인타나찌오나레 수페리오레 디 스투디 아반
짜티 - 에스아이에스에스에이 내

카르닌치, 피에로

일본 230-0045 가나가와-켄 요코하마-시 가나가와
-쿠 사와타리 52-35 트랜사인 테크놀로지스 씨오.,
엘티디 내

다카하시, 하즈키

이탈리아 34136 트리에스테 비아 보노메아 265 스
쿠오라 인타나찌오나레 수페리오레 디 스투디 아반
짜티 - 에스아이에스에스에이 내

야마자키, 도시오

이탈리아 34136 트리에스테 비아 보노메아 265 스
쿠오라 인타나찌오나레 수페리오레 디 스투디 아반
짜티 - 에스아이에스에스에이 내

오야마, 다카코

이탈리아 34136 트리에스테 비아 보노메아 265 스
쿠오라 인타나찌오나레 수페리오레 디 스투디 아반
짜티 - 에스아이에스에스에이 내

샤르마, 하르시타

이탈리아 34136 트리에스테 비아 보노메아 265 스
쿠오라 인타나찌오나레 수페리오레 디 스투디 아반
짜티 - 에스아이에스에스에이 내

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 기능적 핵산 분자:

- 단백질 번역이 증진되어야 하는 표적 mRNA 서열에 대해 역 상보성인 서열을 포함하는 표적 결합 서열; 및
- 8 내지 12개의 쌍형성된 뉴클레오티드를 갖는 스템 및 5 내지 9개의 뉴클레오티드를 포함하는 루프를 포함하는 제1 스템-루프 도메인 (SL-1)을 포함하는 2-차원 구조를 갖는 조절 서열.

청구항 2

하기를 포함하는 기능적 핵산 분자:

- 단백질 번역이 증진되어야 하는 표적 mRNA 서열에 대해 역 상보성인 서열을 포함하는 표적 결합 서열; 및
- 서열식별번호: 1과 적어도 50% 동일성을 갖는 서열을 갖는 제1 스템-루프 도메인 (SL-1)을 포함하는 2-차원 구조를 갖는 조절 서열.

청구항 3

제2항에 있어서, 제1 스템-루프 도메인 (SL-1)이 서열식별번호: 1과 적어도 75% 동일성을 갖는 서열을 갖는 것인 기능적 핵산 분자.

청구항 4

제3항에 있어서, 제1 스템-루프 도메인 (SL-1)이 서열식별번호: 1과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 갖는 것인 기능적 핵산 분자.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 스템-루프 도메인 (SL-1)의 스템이 A-유형 나선 3-차원 구조를 갖는 것인 기능적 핵산 분자.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 조절 서열의 2-차원 구조가 제2 스템-루프 도메인 (SL-2) 및 제4 내부 루프 도메인 (IL-4) 또는 제4 스템-루프 도메인 (SL-4)을 추가로 포함하며, 상기 제2 스템-루프 도메인 (SL-2)은 2 내지 4개의 쌍형성된 뉴클레오티드를 갖는 스템 및 6 내지 10개의 뉴클레오티드를 포함하는 루프를 포함하고, 상기 제4 내부 루프 도메인 (IL-4)은 14 내지 24개의 뉴클레오티드를 포함하고, 상기 제4 스템-루프 도메인 (SL-4)은 3 내지 5개의 쌍형성된 뉴클레오티드를 갖는 스템 및 6 내지 10개의 뉴클레오티드를 포함하는 루프를 포함하는 것인 기능적 핵산 분자.

청구항 7

제6항에 있어서, 6 내지 14개의 뉴클레오티드를 포함하는 제3 내부 루프 도메인 (IL-3)을 추가로 포함하는 기능적 핵산 분자.

청구항 8

제7항에 있어서, 1 내지 3개의 쌍형성된 뉴클레오티드를 갖는 스템 및 3 내지 5개의 뉴클레오티드를 포함하는 루프를 포함하는 제3 스템-루프 도메인 (SL-3)을 추가로 포함하는 기능적 핵산 분자.

청구항 9

제8항에 있어서, 6 내지 12개의 뉴클레오티드를 포함하는 제2 내부 루프 도메인 (IL-2)을 추가로 포함하는 기능

적 핵산 분자.

청구항 10

제9항에 있어서, 6 내지 12개의 뉴클레오티드를 포함하는 제1 내부 루프 도메인 (IL-1)을 추가로 포함하는 기능적 핵산 분자.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 조절 서열이 서열식별번호: 2와 적어도 50% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 것인 기능적 핵산 분자.

청구항 12

하기를 포함하는 기능적 핵산 분자:

- 단백질 번역이 증진되어야 하는 표적 mRNA 서열에 대해 역 상보성인 서열을 포함하는 표적 결합 서열; 및
- 서열식별번호: 15, 서열식별번호: 16, 서열식별번호: 17, 서열식별번호: 18, 서열식별번호: 19, 서열식별번호: 20, 서열식별번호: 21, 서열식별번호: 15, 서열식별번호: 7, 서열식별번호: 22 및 서열식별번호: 23으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 50% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 조절 서열.

청구항 13

제12항에 있어서, 조절 서열이 서열식별번호: 15, 서열식별번호: 16, 서열식별번호: 17, 서열식별번호: 18, 서열식별번호: 19, 서열식별번호: 20, 서열식별번호: 21, 서열식별번호: 15, 서열식별번호: 7, 서열식별번호: 22 및 서열식별번호: 23으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 75% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 것인 기능적 핵산 분자.

청구항 14

제13항에 있어서, 조절 서열이 서열식별번호: 15, 서열식별번호: 16, 서열식별번호: 17, 서열식별번호: 18, 서열식별번호: 19, 서열식별번호: 20, 서열식별번호: 21, 서열식별번호: 15, 서열식별번호: 7, 서열식별번호: 22 및 서열식별번호: 23으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 것인 기능적 핵산 분자.

청구항 15

하기를 포함하는 기능적 핵산 분자:

- 단백질 번역이 증진되어야 하는 표적 mRNA 서열에 대해 역 상보성인 서열을 포함하는 표적 결합 서열; 및
- 서열식별번호: 7, 서열식별번호: 21, 서열식별번호: 17, 서열식별번호: 22, 서열식별번호: 65, 서열식별번호: 66 및 서열식별번호: 67로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 조절 서열.

청구항 16

제15항에 있어서, 조절 서열이 서열식별번호: 7, 서열식별번호: 21, 서열식별번호: 17, 서열식별번호: 22, 서열식별번호: 65, 서열식별번호: 66 및 서열식별번호: 67로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 기능적 핵산 분자.

청구항 17

하기를 포함하는 기능적 핵산 분자:

- 단백질 번역이 증진되어야 하는 표적 mRNA 서열에 대해 역 상보성인 서열을 포함하는 표적 결합 서열; 및
- 서열식별번호: 12와 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 조절 서열.

청구항 18

제17항에 있어서, 조절 서열이 서열식별번호: 12를 포함하는 것인 기능적 핵산 분자.

청구항 19

하기를 포함하는 기능적 핵산 분자:

- 단백질 번역이 증진되어야 하는 표적 mRNA 서열에 대해 역 상보성인 서열을 포함하는 표적 결합 서열; 및
- 하기 중 1종 이상을 포함하는 조절 서열:
 - GCU (모티프 1), AGGGC (모티프 3), UGGAU (모티프 4), UGGUGG (모티프 6) 또는 UGGA (모티프 7)와 75% 동일성을 갖는 RNA 서열에 의해 및 그의 혼성화된 역 상보성 RNA에 의해 형성된 모티프, 또는
 - AGGAGG (모티프 2)와 75% 동일성을 갖는 RNA 서열에 의해 및 그의 혼성화된 부분적 상보성 역 RNA에 의해 형성된 모티프, 또는
 - UGG (모티프 5)와 75% 동일성을 갖는 RNA 서열에 의해 및 그의 혼성화된 부분적 상보성 역 RNA에 의해 형성된 모티프.

청구항 20

하기를 포함하는 기능적 핵산 분자:

- 단백질 번역이 증진되어야 하는 표적 mRNA 서열에 대해 역 상보성인 서열을 포함하는 표적 결합 서열; 및
- 하기 중 1종 이상을 포함하는 조절 서열:
 - GCU (모티프 1), AGGGC (모티프 3), UGGAU (모티프 4), UGGUGG (모티프 6) 또는 UGGA (모티프 7)와 90% 동일성을 갖는 RNA 서열에 의해 및 그의 혼성화된 역 상보성 RNA에 의해 형성된 모티프, 또는
 - AGGAGG (모티프 2)와 90% 동일성을 갖는 RNA 서열에 의해 및 그의 혼성화된 부분적 상보성 역 RNA에 의해 형성된 모티프, 또는
 - UGG (모티프 5)와 90% 동일성을 갖는 RNA 서열에 의해 및 그의 혼성화된 부분적 상보성 역 RNA에 의해 형성된 모티프.

청구항 21

제20항에 있어서, 조절 서열이 적어도 UGGUGG (모티프 6)와 90% 동일성을 갖는 RNA 서열에 의해 및 그의 혼성화된 역 상보성 RNA에 의해 형성된 모티프를 포함하는 것인 기능적 핵산 분자.

청구항 22

하기를 포함하는 기능적 핵산 분자:

- 단백질 번역이 증진되어야 하는 표적 mRNA 서열에 대해 역 상보성인 서열을 포함하는 표적 결합 서열; 및
- 서열식별번호: 69, 서열식별번호: 70, 서열식별번호: 71, 서열식별번호: 72, 서열식별번호: 73, 서열식별번호: 74, 서열식별번호: 75, 서열식별번호: 76 및 서열식별번호: 77로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 조절 서열.

청구항 23

제22항에 있어서, 조절 서열이 서열식별번호: 72와 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 것인 기능적 핵산 분자.

청구항 24

제22항에 있어서, 조절 서열이 서열식별번호: 69, 서열식별번호: 70, 서열식별번호: 71, 서열식별번호: 72, 서열식별번호: 73, 서열식별번호: 74, 서열식별번호: 75, 서열식별번호: 76 및 서열식별번호: 77로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 기능적 핵산 분자.

청구항 25

제24항에 있어서, 조절 서열이 서열식별번호: 72를 포함하는 것인 기능적 핵산 분자.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 분자가 원형인 기능적 핵산 분자.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 따른 기능적 핵산 분자를 포함하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 특허 출원은 2018년 2월 5일에 출원된 이탈리아 특허 출원 번호 102018000002411의 우선권을 주장하며, 그의 개시내용은 참조로 포함된다.

[0003] 발명의 기술 분야

[0004] 본 발명은 단백질 번역이 증진되어야 하는 표적 mRNA 서열에 대해 역 상보성인 서열을 포함하는 표적 결합 서열; 및 특정 스템-루프 및 내부 루프 도메인을 포함하는 2-차원 구조 및/또는 특정 3-차원 구조를 갖는 조절 서열을 포함하는 기능적 핵산 분자에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 엔코드(ENCODE) 및 팬텀(FANTOM)과 같은 대형 게놈 프로젝트는 게놈의 대부분이 전사되기는 하지만 전사된 RNA 중 5% 미만이 단백질을 코딩하고 있다는 것을 제시한 바 있다. 실제로, 긴 비-코딩 RNA (lncRNA) 및 전위가능 요소 (TE)가 세포 전사 산물의 대부분을 차지하는 것으로 보인다. 지난 10년 동안, 점점 더 많은 수의 연구가 lncRNA 기능을 밝히고 있다. 종합적으로, lncRNA는 주로 광범위한 레퍼토리의 메카니즘을 통하여 핵 및 세포질에서 조절 분자로 작용한다는 것이 명백해지고 있다. 이와 같은 진전에도 불구하고, 주해된 lncRNA 중 일부분만이 기능적으로 검증되어 있다.

[0006] 최근에, 부분적으로 증첩되는 센스 단백질-코딩 mRNA의 번역을 증가시키는 신규한 기능성의 안티센스 (AS) lncRNA 클래스가 확인되었다. 이들 RNA는 SINEUP으로도 지칭되는데, 그들이 단백질 번역의 상향-조절을 야기하는 SINE 요소를 포함하고 있는 안티센스 RNA이기 때문이다.

[0007] 인간 Uchl1/PARK5 유전자의 마우스 오르토로그에 대해 안티센스인 lncRNA, 안티센스 (AS) Uchl1이 대표적인 SINEUP 구성원으로 간주될 수 있는데, 그들이 전사-후 수준에서 작용하는 Uchl1 단백질 합성을 증가시킨다는 것이 발견되었기 때문이다. AS Uchl1 활성은 2개의 기능적 도메인의 조합에 따라 달라지는데: "결합 도메인"으로 표시되는 5' 단부의 증첩 영역은 Uchl1 mRNA에 대한 AS Uchl1 특이성을 좌우하며; 3' 단부의 비-증첩 영역은 매립된 역전 SINE B2 요소를 포함함으로써, "이펙터 도메인"으로 작용하여 결합되는 표적 mRNA의 번역 상향-조절을 촉발한다.

[0008] 30종을 초과하는 안티센스 lncRNA가 부분적으로 증첩되는 mRNA의 번역 상향-조절을 촉진한다. 결합 도메인을 교환하는 것에 의하면, 선택된 표적 mRNA에 대한 AS Uchl1 활성을 재-설정하는 것이 가능하다.

[0009] 번역을 상향-조절하는데 그들이 SINE B2 요소를 필요로 하기 때문에, 이러한 천연 및 합성 분자는 SINEUP으로 명명된 바, WO 2012/133947에 개시되어 있다. AS Uchl1은 매립되어 있는 전위가능 요소가 기능적 RNA 도메인으로 활용되어 단백질 상향-조절을 달성하는 이와 같은 새로운 lncRNA 클래스의 대표적인 구성원으로 간주될 수 있다.

[0010] 역전 SINE B2 요소는 잘 알려져 있는 lncRNA 도메인의 예이다. 진화 연구는 lncRNA와 같은 SINE 요소의 일차 서열이 일반적으로 잘 보존되어 있지 않다는 것을 보여주고 있다. SINE 요소 내의 부분적 보존성은 비-매립 SINE에서 RNA 폴리머라제 III의 내부 프로모터 역할을 하는 A 및 B 박스에서만 관찰된다. 흥미롭게도, 저조한 서열 동일성에도 불구하고, 적어도 무린 SINE B2 요소는 기능적 보존성을 나타내는데, 수많은 SINE B2 서열이 천연 및 키메라 SINEUP에서 이펙터 도메인으로 작용하는 것으로 나타났기 때문이다. 인간 SINE 요소도 확인되어 있으며, SINEUP으로 작용하는 것으로 입증되었다 (Schein A. et al., Sci Rep. (2016), 6:33605).

- [0011] 이에 따라, 매립된 SINE의 도메인 기능성이 서열-기반이라기보다는 구조-기반의 모티프에 존재한다는 가설이 세워졌다.
- [0012] RNA 폴딩이 lncRNA 및 매립된 TE에 대한 기능적 신호를 제공한다는 가설이 세워졌다. RNA 서열은 폴딩되어 일차 뉴클레오타이드 서열만이 알려져 있을 때에는 예측하기 어려운 복잡한 이차 및 삼차 구조를 형성할 수 있다. lncRNA 이차 구조 모듈을 체계적으로 확인하기 위한 컴퓨팅 방법은 아직 만족스럽지 않다. 현재의 알고리즘은 알려져 있는 염기 쌍의 약 50-70%를 올바르게 예측할 수 있다. 가장 중요한 것은 이차 구조 예측 모델에서의 50-70% 정밀도 값이 모델이 올바른 영역과 심한 불일치 영역 사이의 평균에서 유래한다는 것이다. 따라서, 용액 중에서 RNA 분자의 실제 구조를 측정하는 것이 RNA 기능에 대한 이해를 얻는 유일한 가용한 방법이다. 수-접근성 잔기의 화학적 변형을 기반으로 하고 (화학적 풋프린팅) 핵산의 자기 특색을 기반으로 하는 (NMR) 방법이 가용하다. 더 최근에는, icSHAPE (in vivo click selective 2'-hydroxyl acylation and profiling experiment: 생체내 클릭 선택성 2'-히드록실 아실화 및 프로파일링 실험)로 지칭되는 신규한 생화학적 접근법이 개발되어 있어서, 4중 전체 염기의 살아있는 세포에서의 RNA 이차 구조에 대한 일차적인 전체적 고찰을 가능하게 한다.
- [0013] 상기로 볼 때, 추가적인 연구 및 임상 환경에서 해당 분자를 효과적이고도 효율적으로 활용할 수 있기 위해서는, 특정 2-차원 또는 3-차원 분자 구조가 lncRNA의 기능에 기여하는지 여부를 확인할 필요성이 있다. 특히, lncRNA는 유전자 기능의 연구에서 산업용 단백질 생산까지의 광범위한 연구 활동, 및 반수체기능부전의 치료와 같은 생체내 적용분야를 위한 이상적인 도구를 제시한다.

발명의 내용

- [0014] 단백질-코딩 유전자와 부분적으로 중첩되며 번역 상황-조절 활성을 갖는 기능적 안티센스 lncRNA에 매립되어 있는 마우스 AS Uchl1 유래의 역전 SINE B2 요소, 다른 마우스 SINE, 및 진화상 먼 종으로부터의 SINE의 이차 및 삼차 구조를 확인하는 것이 본 발명의 목적이다. 이러한 분자의 이차 및 삼차 구조 중 모티프, 및 그들의 적절한 조합의 확인은 증가된 번역 상황-조절 기능을 갖는 SINE 요소의 설계를 가능하게 한다.
- [0015] 또한, 이러한 모티프 및 그들의 적절한 조합의 확인은 더 짧은 기능적 서열의 설계를 가능하게 한다. 사실상, 치료 적용분야에 있어서, SINEUP RNA의 전달은 중요한 도전과제이다. RNA 분자는 살아있는 생물체 내에서 고도로 불안정하다. RNA의 천연적 불안정성을 극복하는데에는 화학적 변형 및/또는 지질 나노입자로의 봉입이 광범위하게 사용되어 왔다. 그러나, 이러한 전달 방법은 긴 RNA 분자에 대해서는 비효율적인 것으로 입증되어 있다. 별개이며 활성인 구조 요소만을 보유하는 역전 SINE B2 이펙터 도메인의 더 짧은 변이체의 설계는 "비-필수" 서열로부터 이펙터 도메인을 "클리닝"하여 가장 짧은 활성 SINEUP RNA 분자를 수득한다.
- [0016] 이와 같은 목적은 청구범위 제1항 또는 제2항에 정의되어 있는 바와 같은 기능적 핵산 분자에 의해 달성된다.
- [0017] 본 발명의 다른 목적은 청구범위 제12항, 제15항, 제17항, 제19항, 제22항에 정의되어 있는 바와 같은 기능적 핵산 분자, 및 청구범위 제26항에 정의되어 있는 바와 같은 조성물을 제공하는 것이다.
- [0018] 정의
- [0019] "미니SINEUP"이라는 용어는 결합 도메인 (표적 mRNA에 대한 상보성 서열), 스페이서 서열 (예시된 경우에는 21 nt 스페이서), 및 이펙터 도메인으로서의 임의의 SINE 또는 SINE-유래 서열로 구성되는 핵산 분자를 의미하는 것이다 (Zucchelli *et al.*, Front Cell Neurosci., 9: 174, 2015.).
- [0020] 특히, "미니SINEUP-GFP"라는 용어는 미니SINEUP의 결합 도메인이 EGFP mRNA에 대해 상보성인 서열이 되도록 설계된다는 것을 의미한다 (Zucchelli *et al.*, Front Cell Neurosci., 9: 174, 2015.).
- [0021] "기능적 핵산 분자"는 일반적으로 핵산 분자가 해당 표적 mRNA의 번역을 증진할 수 있다는 것을 의미한다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 실시예 1과 관련된 도 1은 천연 AS Uchl1으로부터의 역전 SINE B2 서열의 화학적 풋프린팅을 제시한다. 실시예 2와 관련된 도 2는 천연 AS Uchl1으로부터의 역전 SINEB2 서열의 이차 구조를 제시한다. 실시예 3과 관련된 도 3은 역전 SINE B2 RNA 말단-결실 단편의 용액 중 구조를 제시한다. 실시예 4와 관련된 도 4는 웨스턴 블롯 및 qRT-PCR에 의해 제1 스템-루프 도메인 (SL-1)이 AS Uchl1 활성화에 기

여한다는 것을 제시한다.

실시예 5와 관련된 도 5는 웨스턴 블롯 및 qRT-PCR에 의해 제1 스템-루프 도메인 (SL-1)이 인간 간세포 세포주에서의 과다발현되는 Uch11-FLAG을 사용한 AS Uch11 핵산 분자의 번역 상향-조절에 필요하다는 것을 제시한다.

실시예 6과 관련된 도 6은 웨스턴 블롯 및 qRT-PCR에 의해 제1 스템-루프 도메인 (SL-1)이 HEK 293T/17 세포에서의 GFP mRNA (SINEUP-GFP)와 중첩되는 안티센스 lncRNA의 번역 상향-조절 활성화에 기여한다는 것을 제시한다.

실시예 7과 관련된 도 7은 NMR에 의한 역전 SINE B2 단편 (38 nt)의 용액 중 구조의 결정을 제시한다.

실시예 8과 관련된 도 8은 invSINEB2/38의 2D NOESY NMR 스펙트럼 ($\tau_m=250$ ms)의 방향족-아노머 영역을 제시한다.

실시예 9와 관련된 도 9는 역전 SINE B2 38 nt 단편의 3D 구조를 적정하게 재구축하는데 사용되는 NMR 신호의 연결성 맵을 제시한다.

실시예 10과 관련된 도 10은 역전 SINE B2 이펙터 도메인 SL-1 영역의 고-해상도 3D 구조를 제시한다.

실시예 11과 관련된 도 11은 역전 SINE B2상의 결실된 서열, 및 역전 SINE B2 활성화에 대한 이러한 결실의 효과를 제시한다 (웨스턴 블롯 및 qRT-PCR).

실시예 12와 관련된 도 12는 역전 SINE B2상의 돌연변이된 서열, 및 역전 SINE B2 활성화에 대한 이러한 돌연변이의 효과를 제시한다 (웨스턴 블롯 및 qRT-PCR).

실시예 13과 관련된 도 13은 역전 SINE B2의 더 짧은 버전상의 돌연변이된 서열, 및 역전 SINE B2 활성화에 대한 이러한 돌연변이의 효과를 제시한다.

실시예 14와 관련된 도 14는 상이한 마우스 AS lncRNA로부터의 SINEB2 요소가 미니SINEUP에서 이펙터 도메인으로 작용하여 HEK293T에서 GFP 단백질 발현을 상향-조절할 수 있다는 것을 제시한다 (웨스턴 블롯).

실시예 15와 관련된 도 15는 상이한 마우스 AS lncRNA로부터의 SINEB2 요소의 클러스탈W(ClustalW) 서열 정렬을 제시한다.

실시예 16과 관련된 도 16은 번역 상향-조절 활성을 갖는 안티센스 기능적 핵산 분자에서 이펙터 도메인으로 작용하는 진화상 먼 종으로부터의 SINE 서열을 제시한다 (웨스턴 블롯 및 qRT-PCR).

실시예 17과 관련된 도 17은 진화상 먼 종으로부터의 SINE 서열의 더 강력한 번역 상향-조절 활성화와 더 복잡한 구조 사이의 상관관계를 제시한다.

실시예 18과 관련된 도 18은 진화상 먼 종으로부터의 SINE 서열의 2D 구조 모티프 분석을 제시한다.

실시예 19와 관련된 도 19는 HEK 293T/17 세포에서 제1 스템 루프 도메인 (SL-1)이면 GFP mRNA와 중첩되는 안티센스 lncRNA (59-96 SL1 SINEUP-GFP)의 번역 상향 조절 활성화에 충분하다는 것을 제시한다.

실시예 20과 관련된 도 20은 웨스턴 블롯에 의해 HEK 293T/17 세포에서 역전 SINE B2의 구조-기반인 더 짧은 버전이면 GFP mRNA와 중첩되는 안티센스 lncRNA (44-120 SINEUP-GFP)의 번역 상향 조절에 충분하다는 것을 제시한다.

실시예 21과 관련된 도 21은 HEK 293T/17 세포에서 역전 SINE B2의 구조-기반인 더 짧은 버전이면 내생 DJ-1 mRNA와 중첩되는 안티센스 lncRNA (44-120 SINEUP-DJ-1)의 번역 상향 조절에 충분하다는 것을 제시한다. 점 돌연변이를 포함하는 두 가지 변이체의 기능도 시험하였다.

도 22는 SINEUP-icSHAPE 실험의 도식적인 개관을 제시한다.

도 23은 HEK 293T/17 세포에서의 미니SINEUP-GFP 이펙터 도메인의 이차 (2D) 구조 및 그 안의 모티프를 제시한다.

도 24는 ExpaRNA를 사용한 (A) 긴 SINEUP-GFP 및 (B) 미니SINEUP-GFP에서의 AS Uch11 SINEB2의 2D 구조 비교를 제시한다.

도 25는 (A) 긴 SINEUP-GFP 및 (B) 미니SINEUP-GFP에서의 AS Uxt SINEB2-b 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다.

도 26은 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 및 (B) 긴 SINEUP-GFP 중 AS Txnip SINEB2의 2D 구조의

ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다.

도 27은 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 및 (B) 긴 SINEUP-GFP 중 AS Uxt SINEB2-b의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다.

도 28은 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 및 (B) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uxt SINEB2-b의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다.

도 29는 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 및 (B) 미니SINEUP-GFP 중 SINEB2/B3 컨센서스 (역 상보체)의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다.

도 30은 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 및 (B) 미니SINEUP-GFP 중 AS Nars2 SINEB2의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다.

도 31은 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 및 (B) 미니SINEUP-GFP 중 AS Abhd11 SINEB2의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다.

도 32는 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 및 (B) 미니SINEUP-GFP 중 AS Epb4.9 SINEB2의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다.

도 33은 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 및 (B) 미니SINEUP-GFP 중 AS Wfdc5 SINEB2의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다.

도 34는 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 및 (B) 미니SINEUP-GFP 중 AS Pgbd1 SINEB2의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다.

도 35는 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 및 (B) 미니SINEUP-GFP 중 AS Gsk3 β SINEB2의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다.

도 36은 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 및 (B) 미니SINEUP-GFP 중 AS Rhod SINEB2-Mm2의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다.

도 37은 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 및 (B) 미니SINEUP-GFP 중 AS Rhod SINEB2-B3A의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다.

도 38은 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 및 (B) 미니SINEUP-GFP 중 AS E4f1 SINEB2-Mm2의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다.

도 39는 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 및 (B) 미니SINEUP-GFP 중 AS E4f1 SINEB2-Mm1t의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다.

도 40 및 41은 AS-Uch11 SINEB2의 구조 동역학을 제시한다.

도 42는 어떻게 다양한 ED 길이 및 구조 모티프 조합의 합성 SINEUP가 GFP 단백질 발현을 상향-조절하는지를 제시한다.

도 43은 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 (icSHAPE-가이드됨) 및 (B) 미니SINEUP 071 ED (RNA폴드-예측)의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다.

도 44는 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 (icSHAPE-가이드됨) 및 (B) 미니SINEUP 072 ED (RNA폴드-예측)의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다.

도 45는 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 (icSHAPE-가이드됨) 및 (B) 미니SINEUP 073 ED (RNA폴드-예측)의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다.

도 46은 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 (icSHAPE-가이드됨) 및 (B) 미니SINEUP 074 ED (RNA폴드-예측)의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다.

도 47은 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 (icSHAPE-가이드됨) 및 (B) 미니SINEUP 075 ED (RNA폴드-예측)의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다.

도 48은 어떻게 AS Uch11로부터의 SINEB2의 구조 단편이 GFP 단백질 발현을 상향-조절하는지를 제시한다.

실시에 48과 관련된 도 49는 SINEUP-DJ-1이 원형 RNA로 발현될 때 활성이라는 것을 제시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 본 발명에서는 - 특히 - 대표적인 SINEUP 이펙터 도메인으로서의 AS Uch11 유래의 역전 SINE B2 전위가능 요소의 이차 및 삼차 구조가 개시된다.
- [0024] 결실 돌연변이체가 SINEUP 활성화에 필요한 구조 요소를 제시하는데 사용된다.
- [0025] 또한, 번역 상향-조절의 기능을 갖는 안티센스 lncRNA (천연 SINEUP)로부터의 구조 SINE B2 서열이 살아있는 세포에서 결정된다.
- [0026] 활성 및 비활성 SINE (후자는 제시되지 않음)의 SINEUP 활성 및 icSHAPE 프로파일의 생화학적 특성화를 기반으로 구조-기능 관계도 정의된다.
- [0027] SINE B2 서열의 구조-기반 활성 모티프가 개시된다.
- [0028] 일차 서열이 보존되지 않으며 이차 구조 요소가 알려져 있는 진화상 먼 종으로부터 유래된 SINE 서열의 기능성인 이펙터 도메인의 번역 상향-조절 활성이 또한 개시된다.
- [0029] 특히, 기능 실험은 제1 스템-루프 도메인 (SL-1)으로도 지칭되는 짧은 말단 헤어핀 루프 구조가 부분적으로 중첩되는 mRNA의 번역을 상향-조절하는 SINEUP의 능력에 있어서 핵심적인 구조 결정인자이며, 추가적인 구조 요소가 역시 증진된 활성화에 중요해서 덜 활성인 것들로부터 더 활성인 해당 SINE을 차별화한다는 것을 보여준다.
- [0030] RNA 분자의 일차 서열이 미리 결정된 이차 구조로 반드시 이어지는 않는다는 것, 그리고 조건에 따라 대안적인 분자 폴딩이 이루어질 수 있다는 것이 입증된다. 다시 말해서, RNA 분자의 일차 서열로부터 수득되는 이차 구조는 결코 일차 서열만으로부터 미리 결정되어 예측가능하지 않다.
- [0031] 또한, 이차 구조를 증진하도록, 및/또는 분자의 크기를 제한하도록 돌연변이된 SINE 서열 이펙터 도메인의 몇 가지 변이체가 제공된다. 이들 변이체는 이차 구조와 특히 관계가 있으며 거기에서 보존되어 있는 모티프를 확인하고, 기능에 필요한 최소한의 구조, 및 그와 같은 구조를 수득하기 위한 최적의 서열 및 조건에 도달하도록 그들을 조합하는 것에 의해 설계되었다.
- [0032] 실제로, 본 발명의 기능적 핵산 분자는 단백질 번역이 증진되어야 하는 표적 mRNA 서열에 대해 역 상보성인 서열을 포함하는 표적 결합 서열, 및 8 내지 12개의 쌍형성된 뉴클레오티드를 갖는 스템 및 5 내지 9개의 뉴클레오티드를 포함하는 루프를 포함하는 제1 스템-루프 도메인 (SL-1)을 포함하는 2-차원 구조를 갖는 조절 서열을 포함한다. 상기 조절 서열은 단백질 번역 증진 효율을 갖는다.
- [0033] 본 발명에 따르면, 이차 구조가 보존되는 한, 일차 서열의 염기는 광범위한 정도로 가변적일 수 있는 것으로 밝혀졌다.
- [0034] 표적 결합 서열은 표적 mRNA에 대해 역 상보성인 서열과 약 60% 유사성만을 가지면 된다. 사실상, 표적 결합 서열은 많은 수의 미스매치를 나타내면서도 활성을 유지할 수 있다. 실제로, miRNA는 많은 수의 미스매치가 있는 그의 센스 mRNA 파트너에도 영향을 줄 수 있다. 이와 같은 개념은 이미 WO 2012/133947에 제시된 바 있다.
- [0035] 표적 결합 서열 및 조절 서열은 바람직하게는 스페이서/링커 서열에 의해 연결된다.
- [0036] 바람직하게는, 제1 스템-루프 도메인 (SL-1)의 스템은 G/C 풍부하며, 여기서 "G/C 풍부 서열"은 50%를 초과하는 G 및 C, 바람직하게는 75%를 초과하는 G 및 C를 갖는 서열을 의미한다.
- [0037] 바람직하게는, 제1 스템-루프 도메인 (SL1)의 루프는 A/U 풍부하며, 여기서 "A/U 풍부 서열"은 50%를 초과하는 A 및 U, 바람직하게는 75%를 초과하는 A 및 U를 갖는 서열을 의미한다.
- [0038] 제1 스템-루프 도메인 (SL-1)의 스템은 바람직하게는 10개의 쌍형성된 뉴클레오티드를 가지며, 제1 스템-루프 도메인 (SL-1)의 루프는 바람직하게는 7개의 뉴클레오티드를 갖는다.
- [0039] 본 발명의 기능적 핵산 분자는 단백질 번역이 증진되어야 하는 표적 mRNA 서열에 대해 역 상보성인 서열을 포함하는 표적 결합 서열, 및 서열식별번호(SEQ ID NO): 1과 적어도 50% 동일성, 바람직하게는 서열식별번호: 1과 적어도 75% 동일성, 보다 바람직하게는 서열식별번호: 1과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 갖는 제1 스템-루프 도메인 (SL-1)을 포함하는 2-차원 구조를 갖는 조절 서열을 포함한다.

- [0040] AS Uch11 유래의 예시되는 역전 SINE B2 전위가능 요소에서, 제1 스템-루프 도메인 (SL-1)은 서열식별번호: 1, 즉 서열식별번호: 5의 뉴클레오티드 64 내지 92를 포함한다 (후자는 AS Uch11 유래의 역전 SINE B2 전위가능 요소의 완전한 서열임).
- [0041] 바람직하게는, 제1 스템-루프 도메인 (SL-1)의 스템은, 고-해상도 NMR에 제시된 바와 같이, A-유형 나선 3-차원 구조를 갖는다.
- [0042] 조절 서열의 2-차원 구조는 바람직하게는 제2 스템-루프 도메인 (SL-2) 및 제4 내부 루프 도메인 (IL-4) 또는 제4 스템-루프 도메인 (SL-4)을 추가로 포함하며, 상기 제2 스템-루프 도메인 (SL-2)은 2 내지 4개의 쌍형성된 뉴클레오티드를 갖는 스템 및 6 내지 10개의 뉴클레오티드를 포함하는 루프를 포함하고, 상기 제4 내부 루프 도메인 (IL-4)은 14 내지 24개의 뉴클레오티드를 포함하고, 상기 제4 스템-루프 도메인 (SL-4)은 3 내지 5개의 쌍형성된 뉴클레오티드를 갖는 스템 및 6 내지 10개의 뉴클레오티드를 포함하는 루프를 포함한다.
- [0043] 제2 스템-루프 도메인 (SL-2)의 스템은 바람직하게는 G/C 풍부하다. 제2 스템-루프 도메인 (SL-2) 및/또는 제4 내부 루프 도메인의 루프는 바람직하게는 A/U 풍부하다.
- [0044] 제2 스템-루프 도메인 (SL-2)의 스템은 바람직하게는 3개의 쌍형성된 뉴클레오티드를 가지며, 제2 스템-루프 도메인 (SL-2)의 루프는 바람직하게는 8개의 뉴클레오티드를 갖는다. 제4 내부 루프 도메인 (IL-4)은 바람직하게는 16 내지 22개의 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0045] 본 발명의 기능적 핵산 분자는 바람직하게는 서열식별번호: 2와 적어도 50% 동일성, 바람직하게는 서열식별번호: 2와 적어도 75% 동일성, 보다 바람직하게는 서열식별번호: 2와 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 2-차원 구조를 갖는 조절 서열을 포함한다.
- [0046] AS Uch11 유래의 예시되는 역전 SINE B2 전위가능 요소에서, 조절 서열은 서열식별번호: 2, 즉 서열식별번호: 5의 뉴클레오티드 52 내지 112를 포함한다.
- [0047] 조절 서열의 2-차원 구조는 바람직하게는 6 내지 14개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 7 내지 13개의 뉴클레오티드를 포함하는 제3 내부 루프 도메인 (IL-3)을 추가로 포함한다.
- [0048] 조절 서열의 2-차원 구조는 바람직하게는 1 내지 3개의 쌍형성된 뉴클레오티드를 갖는 스템 및 3 내지 5개의 뉴클레오티드를 포함하는 루프를 포함하는 제3 스템-루프 도메인 (SL-3)을 추가로 포함한다.
- [0049] 본 발명의 기능적 핵산 분자는 바람직하게는 서열식별번호: 3과 적어도 50% 동일성, 바람직하게는 서열식별번호: 3과 적어도 75% 동일성, 보다 바람직하게는 서열식별번호: 3과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 2-차원 구조를 갖는 조절 서열을 추가로 포함한다.
- [0050] AS Uch11 유래의 예시되는 역전 SINE B2 전위가능 요소에서, 조절 서열은 서열식별번호: 3, 즉 서열식별번호: 5의 뉴클레오티드 36 내지 133을 포함한다.
- [0051] 조절 서열의 2-차원 구조는 바람직하게는 추가적으로 6 내지 12개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 7 내지 11개의 뉴클레오티드를 포함하는 제2 내부 루프 도메인 (IL-2)을 포함한다. 제2 내부 루프 도메인 (IL-2)은 바람직하게는 비대칭이고/거나, A/U 풍부하다.
- [0052] 본 발명의 기능적 핵산 분자는 바람직하게는 서열식별번호: 4와 적어도 50% 동일성, 바람직하게는 서열식별번호: 4와 적어도 75% 동일성, 보다 바람직하게는 서열식별번호: 4와 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 2-차원 구조를 갖는 조절 서열을 포함한다.
- [0053] AS Uch11 유래의 예시되는 역전 SINE B2 전위가능 요소에서, 조절 서열은 서열식별번호: 4, 즉 서열식별번호: 5의 뉴클레오티드 22 내지 150을 포함한다.
- [0054] 조절 서열의 2-차원 구조는 바람직하게는 6 내지 12개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 7 내지 11개의 뉴클레오티드를 포함하는 제1 내부 루프 도메인 (IL-1)을 추가로 포함한다.
- [0055] 본 발명의 기능적 핵산 분자는 바람직하게는 서열식별번호: 5와 적어도 50% 동일성, 바람직하게는 서열식별번호: 5와 적어도 75% 동일성, 보다 바람직하게는 서열식별번호: 5와 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 2-차원 구조를 갖는 조절 서열을 포함한다.
- [0056] AS Uch11 유래의 예시되는 역전 SINE B2 전위가능 요소에서, 조절 서열은 서열식별번호: 5를 포함한다.

- [0057] 본 발명에 따른 또 다른 기능적 핵산 분자는 단백질 번역이 증진되어야 하는 표적 mRNA 서열에 대해 역 상보성인 서열을 포함하는 표적 결합 서열; 및 서열식별번호: 15, 서열식별번호: 16, 서열식별번호: 17, 서열식별번호: 18, 서열식별번호: 19, 서열식별번호: 20, 서열식별번호: 21, 서열식별번호: 15, 서열식별번호: 7, 서열식별번호: 22 및 서열식별번호: 23으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 75%, 보다 더 바람직하게는 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 조절 서열을 포함한다.
- [0058] icSHAPE 분석은 상기에서 개시된 스템에서의 쌍형성된 뉴클레오티드 수 및 상기에서 개시된 루프에서의 뉴클레오티드 수가 개시되어 있는 범위를 넘어 가변적일 수 있다는 것을 제시한다.
- [0059] 본 발명에 따른 또 다른 기능적 핵산 분자는 단백질 번역이 증진되어야 하는 표적 mRNA 서열에 대해 역 상보성인 서열을 포함하는 표적 결합 서열; 및 서열식별번호: 7, 서열식별번호: 21, 서열식별번호: 17, 서열식별번호: 22, 서열식별번호: 65, 서열식별번호: 66 및 서열식별번호: 67로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 75%, 보다 더 바람직하게는 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 조절 서열을 포함한다.
- [0060] 조절 서열은 바람직하게는 서열식별번호: 7, 서열식별번호: 21, 서열식별번호: 17, 서열식별번호: 22, 서열식별번호: 65, 서열식별번호: 66 및 서열식별번호: 67을 포함한다.
- [0061] 대안적인 실시양태에서, 기능적 핵산은 서열식별번호: 12와 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 75%, 보다 더 바람직하게는 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 조절 서열을 포함하며, 보다 더 바람직하게는 상기 서열은 서열식별번호: 12이다.
- [0062] 본 발명에 따른 또 다른 기능적 핵산 분자는 단백질 번역이 증진되어야 하는 표적 mRNA 서열에 대해 역 상보성인 서열을 포함하는 표적 결합 서열; 및 GCU (모티프 1), AGGGC (모티프 3), UGGAU (모티프 4), UGGUGG (모티프 6) 또는 UGGA (모티프 7)와 50%, 바람직하게는 75%, 보다 더 바람직하게는 90% 동일성을 갖는 RNA 서열에 의해 및 그의 혼성화된 역 상보성 RNA에 의해 형성된 모티프, 또는 AGGAGG (모티프 2)와 50%, 바람직하게는 75%, 보다 더 바람직하게는 90% 동일성을 갖는 RNA 서열에 의해 및 그의 혼성화된 부분적 상보성 역 RNA에 의해 형성된 모티프, 또는 UGG (모티프 5)와 50%, 바람직하게는 75%, 보다 더 바람직하게는 90% 동일성을 갖는 RNA 서열에 의해 및 그의 혼성화된 부분적 상보성 역 RNA에 의해 형성된 모티프 중 1종 이상을 포함하는 조절 서열을 포함한다.
- [0063] 보다 더 바람직하게는, 모티프는 각각 GCU (모티프 1), AGGGC (모티프 3), UGGAU (모티프 4), UGGUGG (모티프 6) 및 UGGA (모티프 7)에 의해 및 그의 혼성화된 역 상보성 RNA에 의해, AGGAGG (모티프 2)에 의해 및 그의 혼성화된 부분적 상보성 역 RNA에 의해, 및 UGG (모티프 5)에 의해 및 그의 혼성화된 부분적 상보성 역 RNA에 의해 형성된다.
- [0064] 상기 언급된 기능적 핵산 분자의 조절 서열은 바람직하게는 적어도 UGGUGG (모티프 6)와 90% 동일성을 갖는 RNA 서열에 의해 및 그의 혼성화된 역 상보성 RNA에 의해 형성된 모티프를 포함한다. 보다 바람직하게는, 상기 모티프는 UGGUGG이다.
- [0065] 상기 언급된 모티프의 바람직한 조합은 도 24 내지 39, 43 내지 47 및 48B에 제시되어 있다.
- [0066] 더 구체적으로, 상기 언급된 기능적 핵산 분자는 서열식별번호: 69, 서열식별번호: 70, 서열식별번호: 71, 서열식별번호: 72, 서열식별번호: 73, 서열식별번호: 74, 서열식별번호: 75, 서열식별번호: 76 및 서열식별번호: 77로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 50%, 바람직하게는 75%, 보다 더 바람직하게는 90% 동일성을 갖는 서열을 조절 서열로서 포함한다. 보다 더 바람직하게는, 상기 서열은 서열식별번호: 69, 서열식별번호: 70, 서열식별번호: 71, 서열식별번호: 72, 서열식별번호: 73, 서열식별번호: 74, 서열식별번호: 75, 서열식별번호: 76 및 서열식별번호: 77을 포함한다. 이들 중에서도, 바람직한 서열은 서열식별번호: 72로서, 이는 - 전체 길이 SINEUP 이펙터 도메인의 몇 가지 모티프의 결핍에도 불구하고 - 표적 RNA의 번역을 증가시키는 능력을 유지하는 최소한의 기능성인 서열의 예를 나타낸다.
- [0067] 본 발명에 따른 기능적 핵산 분자는 바람직하게는 원형 분자이다. 이와 같은 입체형태는 세포 내에서 더 많이 어렵게 분해되며 그에 따라 더 긴 시간 동안 활성으로 유지되는 훨씬 더 안정한 분자로 이어진다.
- [0068] 본 발명은 상기 언급된 기능적 핵산 분자를 포함하는 조성물에 관한 것이기도 하다. 바이러스 벡터 (AAV, 렌티 바이러스 등) 및 비-바이러스 벡터 (나노입자, 지질 입자 등)에 의해 상기 언급된 기능적 핵산 분자를 전달하는 것을 가능하게 하는 임의의 조성물이 포함된다.

- [0069] 실시예
- [0070] 실시예 1
- [0071] 본 실시예는 천연 AS Uch11으로부터의 역전 SINE B2 서열 중 각 뉴클레오티드의 화학 작용제 (DMS 및 CMCT)에 대한 접근성을 입증한다. 화학 작용제에 대한 접근성은 전적으로 분자의 국소적 구조에 따라 달라진다.
- [0072] 도 1은 invSINEB2/183 RNA 구축물의 화학적 풋프린팅을 제시한다. 좌측 패널은 뉴클레오티드 넘버링을 동반한 C 및 A 시퀀싱 레인이 있는 형광 겔을 제시한다. 양성 (+) 및 음성 (-) 대조군과 함께 점증 DMS 농도로 처리된 invSINEB2/183 RNA를 사용한 DMS 레인. 우측 패널은 뉴클레오티드 넘버링을 동반한 G 및 U 시퀀싱 레인이 있는 형광 겔을 제시한다. 양성 (+) 및 음성 (-) 대조군과 함께 점증 CMCT 농도로 처리된 invSINEB2/183 RNA를 사용한 CMCT 레인. 실험은 문헌 [Tijerina P. et al., (2007), Nature Protocols 2:2608-2623]에 기재되어 있는 바와 같이 수행하였다.
- [0073] 실시예 2
- [0074] 본 실시예는 기능적 AS Uch11의 역전 SINE B2 이펙터 도메인의 2-차원 구조를 제시한다. 상기 구조는 스템-루프 (SL1, SL2 및 SL3), 내부 루프 (IL1, IL2, IL3 및 IL4) 및 개재 스템 구조로 조직화된다. 상기 구조는 실시예 1로부터의 데이터를 기반으로 생성된다.
- [0075] 도 2는 AS Uch11 역전 SINE B2 이펙터 도메인의 이차 구조를 제시한다. 각각 DMS 반응성 뉴클레오티드는 회색 배경을 동반하여 원 내의 흑색 문자로 제시되며, CMCT 반응성 뉴클레오티드는 흑색 배경을 동반하여 원 내의 백색 문자로 제시되어 있다. 내부 루프 및 스템-루프는 각각 ILx 및 SLx로 표시하였다. 비-반응성 뉴클레오티드는 원으로만 표시되어 있다. 회색 음영처리 부분은 DNA 프라이머 혼성화 부위에 해당한다.
- [0076] 실시예 3
- [0077] 본 실시예는 역전 SINE B2 서열의 더 짧은 단편이 말단 SL1 구조를 유지한다는 것을 입증한다.
- [0078] 도 3은 역전 SINE B2 RNA 말단-결실 단편의 용액 중 구조를 제시한다. 도 3A는 AS Uch11 invSINEB2/183 이펙터 도메인의 2D 구조를 제시한다. 말단이 제거된 영역은 사각형 내에 표시되어 있다. 도 3B는 말단-결실 단편의 개략적 구조를 제시한다. 뉴클레오티드 위치는 전체-길이 서열에 대비하여 표시되어 있다. 도 3C는 마우스 AS Uch11로부터의 역전 SINE B2의 이미노 양성자 영역을 제시한다. 각 말단-결실 단편에 대해 이미노 ¹H 신호가 할당된다. 단편 #1 (서열식별번호: 9), #2 (서열식별번호: 8), #3 (서열식별번호: 7) 및 #4 (서열식별번호: 6) 트랙이 제시되어 있다. SL1 스템 구조는 모든 단편에서 관찰된다.
- [0079] 실시예 4
- [0080] 본 실시예는 번역 상황-조절을 위한 기능적 핵산 분자 (AS Uch11) 중 역전 SINE B2 이펙터 도메인의 활성화에 SL1이 필요하다는 것을 입증한다.
- [0081] 무린 신경모세포종 N2a 세포 (ATCC Cat No. ATCC-CCL-131)를 AS Uch11 및 ΔSL1 돌연변이체 구축물로 형질감염시켰다. ΔSL1 돌연변이체 구축물에는 매립된 역전 SINE B2의 뉴클레오티드 68-77이 결실되어 있다 (서열식별번호: 10). ΔSL1 돌연변이체에서, SL-1의 스템 루프 구조는 붕괴되나, 전체적인 역전 SINE B2 조립체는 유지된다. 대조군 세포는 빈 대조군 플라스미드로 형질감염시켰다. 형질감염 48시간 후, 세포를 용해시키고, 단백질 및 RNA 농도에 대해 처리하였다. 항-UCHL1 항체를 사용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다 (도 4A). β-액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다. β-액틴에 대해 정규화된 웨스턴 블롯 이미지상에서 빈 대조군 샘플에 대비하여 배수-유도를 계산하였다. 특이적 프라이머를 사용한 qRT-PCR에 의해 Uch11 mRNA (회색 막대) 및 AS Uch11 (백색 막대)의 발현을 모니터링하였다. 데이터는 평균 ± 표준 편차를 표시한다. 데이터는 N=5인 독립적 반복을 대표한다. 도 4B는 N2a 세포에서의 내생 Uch11 mRNA에 대한 AS Uch11 및 ΔSL1 번역 증진 활성화의 그래프 표시를 제시한다 (N=5). *, p=0.01; NS, 유의성 없음 (p>0.5).
- [0082] 실험은 문헌 [Zucchelli S. et al., (2015), Front Cell Neurosci. 9:174]에 기재되어 있는 바와 같이 수행하였다.
- [0083] 실시예 5
- [0084] 본 실시예는 SL-1이 인간 간세포 세포주에서의 과다발현되는 mRNA를 사용한 AS Uch11 핵산 분자의 번역 상황-조절 기능에 필요하다는 것을 입증한다. 실제로, 인간 HepG2 세포 (ATCC Cat No. ATCC-HB-8065)에서 과다발현되

는 Uchl1-FLAG를 사용하여 시험하였을 때, SL-1의 결실은 AS Uchl1 활성을 무효화시킨다.

[0085] 인간 간세포 HepG2 세포주를 AS Uchl1 및 ΔSL1 돌연변이체 구축물과 조합된 Uchl1-FLAG 구축물로 형질감염시켰다. 대조군 세포는 빈 대조군 플라스미드로 형질감염시켰다. 형질감염 48시간 후, 세포를 용해시키고, 웨스턴 블롯에 의해 단백질 양에 대해 처리하였다. 항-FLAG 항체를 사용하여 웨스턴 블롯을 수행함으로써 과다발현된 단백질을 모니터링하였다 (도 5A). β-액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다. β-액틴에 대해 정규화된 웨스턴 블롯 이미지상에서 빈 대조군 샘플에 대비하여 배수-유도를 계산하였다. AS Uchl1 번역 증진제 활성을 볼드체로 강조하였다. 상기에서 개시된 바와 같이 처리된 세포를 RNA 정량에 대해 처리하였다 (도 5B). 특이적 프라이머를 사용한 qRT-PCR에 의해 Uchl1 mRNA (우측) 및 AS Uchl1 (좌측)의 발현을 모니터링하였다. 데이터는 평균 ± 표준 편차를 표시한다.

[0086] 실시예 6

[0087] 본 실시예는 SL-1이 과다발현되는 mRNA를 표적화하는 합성 기능적 핵산 분자 (SINEUP-GFP)의 번역 상향-조절 기능에 필요하다는 것을 입증한다. 바람직하게는, 추가적인 구조 요소도 필요한데, 스템DM 돌연변이체 (스스템을 불안정화시킴)가 감소되지만 무효화되지는 않은 이펙터 도메인 활성을 가지기 때문이다.

[0088] 도 6은 SL-1 구조 요소가 HEK 293T/17 세포 (ATCC Cat No. ATCC-CRL-11268)에서의 SINEUP-GFP 활성에 기여한다는 것을 제시한다. 도 6A는 역전 SINE B2 이펙터 도메인으로부터의 말단 헤어핀 구조 (SL-1)의 확대 이미지이다. ΔSL1 돌연변이체는 SINEUP-GFP의 SINE B2 이펙터 도메인에서의 결실에 의해 생성시켰다. 유사하게, SINEUP-GFP에 부위-지정 돌연변이 (G70A 및 G73A, 원으로 표시)를 도입하여 스템DM 돌연변이체 (서열식별번호: 11)를 생성시켰다. 도 6B에서는, HEK 293T/17 세포를, 표시된 바와 같이, 빈 벡터 (-), 또는 SINEUP-GFP 전체-길이 (FL), ΔSL1 또는 스템DM 돌연변이체와 조합된 eGFP 발현 플라스미드로 형질감염시켰다. 항-GFP 항체를 사용하여 웨스턴 블롯을 수행함으로써, 과다발현되는 단백질을 모니터링하였다. β-액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다. β-액틴에 대해 정규화된 웨스턴 블롯 이미지상에서 빈 대조군 샘플에 대비하여 배수-유도를 계산하였다. SINEUP-GFP 번역 증진제 활성을 적색으로 강조하였다. 도 6C에서는, 도 6B에서와 같이 처리된 세포를 사용하여 RNA를 제조하였다. 특이적 프라이머를 사용한 qRT-PCR에 의해 GFP mRNA (회색) 및 SINEUP-GFP (흑색)의 발현을 모니터링하였다. 데이터는 평균 ± 표준 편차를 표시한다.

[0089] 실시예 7

[0090] 본 실시예는 SL1 구조 영역을 포괄하는 역전 SINE B2 단편 (38개의 뉴클레오티드) (서열식별번호: 12)이 NMR에 의해 결정하였을 때 용액 중에서 단일 구조를 취한다는 것을 입증한다. 본 실험에서는, NMR 데이터로서 (실시예 1, 2 및 3에서 다른 기술에 의해 관찰된 바와 같은) 더 짧은 단편에서의 SL-1의 구조를 검증한다.

[0091] 도 7A는 0 및 25 °C에서 획득된 5% ²H₂O/95% H₂O 중 38 nt RNA ¹H NMR 스펙트럼의 이미노 및 방향족 영역을 제시한다. 이미노 ¹H 신호가 할당된다. 도 7B는 ¹⁵N HSQC NMR 스펙트럼의 이미노 영역을 제시한다. 25 및 0 °C에서 관찰된 신호를 각각 짙은 회색 및 옅은 회색으로 제시되어 있다. 도 7C는 SINEB2/38 구축물의 이차 구조를 제시한다. 25 및 0 °C에서 관찰가능한 이미노 신호를 갖는 염기 쌍을 각각 짙은 회색 및 옅은 회색으로 음영처리하였다. 실험은 문헌 [Sybren S. et al., (1998), Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 32:287-387]에 기재되어 있는 바와 같이 수행하였다.

[0092] 실시예 8

[0093] 본 실시예는 NMR 신호가 2D NOESY NMR 스펙트럼에 할당됨으로써, 역전 SINE B2 38 nt 단편의 3D 구조를 적절하게 재구축할 수 있다는 것을 입증한다.

[0094] 도 8은 관련 공명의 할당을 제시한다. invSINEB2/38의 2D NOESY NMR 스펙트럼 (τ_m=250 ms)의 방향족-아노머 영역. 순차적 위크를 흑색 선으로 도시하였다.

[0095] 실시예 9

[0096] 본 실시예는 역전 SINE B2 38 nt 단편의 3D 구조를 적절하게 재구축하는데 사용되는 NMR 신호의 연결성 맵을 입증한다.

[0097] 도 9는 NOE 연결성의 도식을 제시한다. invSINEB2/38 분자에 대한 강함 (굵은 선), 중간 (실선) 및 약함 (단속선) NOE 연결성의 도식.

- [0098] 실시예 10
- [0099] 본 실시예는 역전 SINE B2 이펙터 도메인 SL-1 영역의 고-해상도 3D 구조를 입증한다. 헤어핀은 A-유형 나선 스템 형태를 취한다. 루프는 용액 중에서 동적인 특성을 나타낸다.
- [0100] 도 10은 SL1의 고-해상도 구조를 제시한다. 도 10A는 측면도를 제시하며, 도 10B는 29 nt 헤어핀 (서열식별번호: 1)의 10 최저 에너지 구조의 평면도를 제시한다. 도 10C 및 10D는 G77, U78 및 G79 염기의 배향을 포함한 대표적인 루프 구조이다.
- [0101] 실시예 11
- [0102] 본 실시예는 추가적인 구조 요소 (IL3-SL3 영역, IL4 및 기저 스템 구조)가 기능적 핵산 분자 (특히, SINEUP-GFP)에서 역전 SINE B2 이펙터 도메인 활성화에 기여한다는 것을 입증한다.
- [0103] 도 11A는 역전 SINE B2 이차 구조상에 주해되어 있는 ΔSL1 (서열식별번호: 10), Δpo1II (서열식별번호: 13) 및 ΔBox (서열식별번호: 14) 결실 서열의 개략적 표시이다. 도 11B에서는, HEK 293T/17 세포를, 표시된 바와 같이, 빈 벡터 (-), 또는 SINEUP-GFP 전체-길이 (FL), ΔSL1, Δpo1II 또는 ΔBox 돌연변이체와 조합된 eGFP 발현 플라스미드로 형질감염시켰다. 항-GFP 항체를 사용하여 웨스턴 블롯을 수행함으로써, 과다발현되는 단백질을 모니터링하였다. β-액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다. β-액틴에 대해 정규화된 웨스턴 블롯 이미지 상에서 빈 대조군 샘플에 대비하여 배수-유도를 계산하였다. SINEUP-GFP 번역 증진제 활성을 볼드체로 강조하였다. 구조 돌연변이체의 기여는 적색으로 제시되어 있다. 도 11C에서는, 도 11B에서와 같이 처리된 세포를 사용하여 RNA를 제조하였다. 특이적 프라이머를 사용한 qRT-PCR에 의해 GFP mRNA (회색) 및 SINEUP-GFP (흑색)의 발현을 모니터링하였다. 데이터는 평균 ± 표준 편차를 표시한다.
- [0104] 실시예 12
- [0105] 본 실시예는 구조적 특색 (IL-4, SL-2, SL-1을 기반으로 하는 개재 스템 구조)을 기반으로 새로운 합성 이펙터 도메인 서열이 설계될 수 있다는 것을 입증한다. 이러한 서열은 과다발현되는 mRNA를 사용하는 기능적 핵산 분자에서 번역 상향-조절 활성을 증진할 수 있다. 증진된 활성은 일차 뉴클레오티드 서열이 상이하나 구조는 동일한 것에 의해 수득된다.
- [0106] 특히, 역전 SINE B2의 구조-기반 변이체는 SINEUP-GFP에서 이펙터 도메인으로서 증가된 번역 상향-조절 활성을 나타낸다. 도 12A는 역전 SINE B2 이차 구조상에 주해된 구조-기반 돌연변이의 개략적 표시를 제시한다. 원안은 단일 점 돌연변이이며; 사각형 안은 구조 요소 (스템 및 루프-기반)의 서열 교환이다. 도 12B에서는, HEK 293T/17 세포를 빈 벡터 (-), 또는 양성 대조군으로서의 SINEUP-GFP 전체-길이 (FL)와 조합된 eGFP 발현 플라스미드로 형질감염시켰다. 구조-기반 돌연변이가 있는 SINEUP-GFP 구축물은 표시된 바와 같이 형질감염시켰다. 항-GFP 항체를 사용하여 웨스턴 블롯을 수행함으로써, 과다발현되는 단백질을 모니터링하였다. β-액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다. 도 12C는 GFP 단백질 수준의 상대적인 증가 (좌측 패널) 및 B에서와 같이 수행된 N=9 실험에서의 변하지 않는 GFP mRNA 수준 (우측 패널)을 제시한다. 각 SINEUP-GFP 구조 돌연변이체 (AS GFP)의 발현은 qRT-PCR에 의해 모니터링하여 우측 패널에 포함시켰다. 모든 돌연변이체는 동일한 수준으로 발현된다.
- [0107] 실시예 13
- [0108] 본 실시예는 구조적 특색 (IL-4, SL-2, SL-1을 기반으로 하는 개재 스템 구조)을 기반으로 새로운 합성 이펙터 도메인 서열이 설계되어 과다발현되는 mRNA를 사용하는 기능적 핵산 분자에서 증진된 번역 상향-조절 활성을 수득할 수 있다는 것을 입증한다. 증진된 활성은 일차 뉴클레오티드 서열이 상이하나 구조는 동일한 것에 의해 수득된다.
- [0109] 특히, 역전 SINE B2의 더 짧은 구조-기반 변이체는 내생 mRNA를 표적화하는 기능적 핵산 분자의 이펙터 도메인으로서 증가된 번역 상향-조절 활성을 나타낸다.
- [0110] 도 13A는 역전 SINE B2 이차 구조상에 주해된 구조-기반 돌연변이의 개략적 표시이다 (27-142는 서열식별번호: 21에 해당하며, 44-120은 서열식별번호: 7에 해당하고, A45G가 있는 44-120은 서열식별번호: 22에 해당하며, 44-120 A51C는 서열식별번호: 23에 해당함). 단일 점 돌연변이가 표시되어 있다. 도 13B는 이펙터 도메인이 개선된 구조적 특색을 갖는 합성 서열인 내생 발현 mRNA를 표적화하는 기능적 핵산 분자의 번역 상향-조절 활성을 제시한다. 조건에 따라서는, 대안적인 폴딩이 이루어짐으로써, 서열식별번호: 7과 같이 더 강력해질 수 있다.

- [0111] 실시예 14
- [0112] 본 실시예는 천연 안티센스인 긴 비-코딩 RNA로부터의 SINE 서열이 부분적으로 중첩되는 mRNA의 번역 상황-조절을 위한 기능적 핵산 분자에서 이펙터 도메인이 된다는 것을 입증한다.
- [0113] 특히, 상이한 마우스 AS lncRNA로부터의 SINEB2 요소가 미니SINEUP에서 이펙터 도메인으로 작용하여 HEK293T (Riken Brc Cat. No. RCB2202)에서 GFP 단백질 발현을 상황-조절할 수 있다.
- [0114] 도 14A는 이펙터 도메인으로서 AS Uch11으로부터의 원래의 역전 SINE B2 서열을 대체하기 위하여 미니SINEUP-GFP로 클로닝된 천연 기능적 안티센스 lncRNA 유래의 SINE B2 서열을 제시한다. GFP를 표적화하는 서열은 개시 AUG 코돈 대비 -40/+4 뉴클레오티드였다. 서열은 순서대로 하기이다: 서열식별번호: 44, 서열식별번호: 47, 서열식별번호: 50 내지 서열식별번호: 62. 도 14B는 센스 EGFP 및 미니SINEUP-GFP를 사용한 공동-형질감염 후 (형질감염 24 h 후)의 HEK293T 세포에서의 GFP 단백질 배수 유도를 제시한다. 웨스턴 블롯 이미지 및 상응하는 GFP 밴드 강도 (ACTB 발현 수준에 대해 정규화됨)는 이미지제이(ImageJ) 소프트웨어를 사용하여 계산된다. 빈 벡터를 음성 대조군으로 사용한 반면, AS Uch11 (AS Uch11 SINEB2 함유 미니SINEUP)은 양성 대조군으로 사용하였다. 샘플 표지는 SINEB2 서열이 단리된 AS lncRNA의 명칭을 표시한다. 4종의 서브-패밀리 (리피트마스커 (RepeatMasker) 주해 기반), 즉 B3, B3A, Mm2 및 Mm1t를 대표하는 SINEB2 서열을 시험하였다. 구체적으로 언급되지 않는 한, SINEB2 요소는 B3 서브-패밀리의 것이었다. AS Uch11 + AS Uxt-b는 ED에서 조합된 AS Uch11 SINEB2 및 AS Uxt의 제2 SINEB2를 의미한다. 3X는 SINEB2의 3개 반복부를 표시하며, SINEB2/B3 컨센서스는 RepBase 데이터베이스로부터 취득한 B3 서브-패밀리 컨센서스 서열이다. n = 5; 오차 막대 ± SEM; **** P<0.00005; *** P<0.0005; ** P<0.005; * P<0.05; 양측 스튜던트 t-검정.
- [0115] 도 14C는 SINEUP-GFP에서 ED로 시험된 SINEB2 서열을 제시한다.
- [0116] 도 14D는 이미지제이 소프트웨어를 사용하여 계산된 항-GFP 및 항-ACTB 항체를 사용한 웨스턴 블롯 이미지 및 상응하는 GFP 밴드 강도 (ACTB 발현 수준에 대해 정규화됨)를 제시한다. ACTB를 로딩 대조군으로 사용하였다. 여기에서, AS Uch11 SINEB2는 EGFP 개시 코돈 (+21 nt 스페이스 서열)에 대비한 -40/+32 BD 설계를 갖는 SINEUP-GFP, 및 AS Uch11로부터의 Alu 및 3' 테일 이외의 ED로서의 AS Uch11 SINEB2를 나타낸다. AS Txnip SINEB2 및 AS Uxt-SINEB2 b는 AS Uch11 SINEB2가 각각 AS Txnip 및 AS Uxt (SINEB2-b)로부터의 SINEB2 요소로 대체된다는 것 이외에는 동일한 설계에 따른다. AS Uch11_Δ5'-28nt는 동일하지만 더 짧은 BD (EGFP 개시 코돈 대비 -40/+4)를 갖는 AS Uch11 SINEB2이다. 동방향 = SINEB2의 동방향 배향; Δ = 결실. n = 3; 오차 막대 ± SEM; ** P<0.005; * P<0.05; 양측 스튜던트 t-검정.
- [0117] 실시예 15
- [0118] 본 실시예는 번역 상황-조절 기능을 위한 기능적 핵산 분자 중의 활성인 SINE 서열이 저조한 서열 동일성을 가지고 있다는 것을 입증한다. 본 실시예는 이펙터 도메인 기능성의 구조-의존성을 제안한다.
- [0119] 도 15는 상이한 마우스 AS lncRNA로부터의 SINEB2 요소의 클러스탈W 서열 정렬을 제시한다. SINEUP-GFP 및 미니SINEUP-GFP (실시예 14)에서의 번역 상황-조절 기능용으로 선택되었던 마우스 SINEB2 서열을 메가(MEGA)5 소프트웨어에서 클러스탈W에 의해 정렬하였다. 서열은 순서대로 하기이다: 서열식별번호: 44 내지 서열식별번호: 49 및 서열식별번호: 52 내지 서열식별번호: 62. 정렬 중 겹은 "-"로 표시되어 있다. 염기를 4종의 상이한 회색 음영으로 강조하였다. A 및 B-박스는 흑색 사각형으로 나타내어진다. 정렬은 SINE의 동일한 패밀리의 구성 원 내에서의 서열 가변성을 제시하고 있다.
- [0120] 실시예 16
- [0121] 본 실시예는 진화상 먼 종으로부터의 SINE 서열이 번역 상황-조절 활성을 갖는 안티센스 기능적 핵산 분자에서 이펙터 도메인으로 작용한다는 것을 입증한다.
- [0122] 도 16A에 제시된 바와 같이, 진화상 먼 종으로부터 유래하며 정해진 이차 구조를 갖는 SINE 서열 (Sun Fen-Jie, et al., Trends in Genetics, 2011)을 분석용으로 선택하였다. 정렬 분석에 의하면, 이들 서열은 저조한 서열 동일성을 나타낸다. 서열 목록은 도 16A에 제시된 DNA 서열 (서열식별번호: 24 내지 서열식별번호: 33)에 상응하는 RNA 서열을 포함한다. 서열 목록은 또한 역전 RNA 서열 (서열식별번호: 34 내지 서열식별번호: 43)도 포함한다. 도 16B에서는, HEK 293T/17 세포를 표시된 바와 같이 동방향 및 역방향 배향으로 클로닝된 빈 벡터 (-), 또는 원래의 역전 SINE 서열 (짙은 청색, B2) 또는 표시된 이펙터 도메인 교환 돌연변이체를 갖는 SINEUP-GFP와 조합된 eGFP 발현 플라스미드로 형질감염시켰다. 셀리고에스(CeligoS) 자동 영상화 시스템을 사용하여

GFP 자가형광을 기록하였다. 데이터는 빈 벡터 (pCDNA3.1) 형질감염 세포에 대해 정규화된 GFP 형광의 결과를 표시한다 (N>7 반복). 데이터는 평균 ± 표준 편차를 표시한다. 테두리가 있는 칼럼은 SINE B2 양성 대조군과 비교하였을 때 SINEUP 활성이 증진되는 조건을 제시한다. 도 16C에 제시된 바와 같이, qRT-PCR 분석은 안정적인 GFP mRNA 수준으로 단백질 상향-조절이 이루어진다는 것을 보여준다 (전사-후). 셀리고 S 측정 후, RNA를 추출하고, 정제하였다. 특이적 프라이머를 사용하여 GFP mRNA 및 SINEUP-GFP RNA를 qRT-PCR 분석하였다. N=3, SINE B2는 1로 설정됨.

[0123] 실시예 17

[0124] 본 실시예는 진화상 먼 종으로부터의 SINE 서열의 더 강력한 번역 상향-조절 활성이 더 복잡한 이차 구조 (스택 루프의 조합)와 상관된다는 것을 입증한다.

[0125] 도 17A에서는, HEK 293T/17 세포를 빈 벡터 (-), 또는 원래의 역전 SINE 서열 (SINE B2) 또는 표시된 이펙터 도메인 교환 돌연변이체를 갖는 SINEUP-GFP와 조합된 eGFP 발현 플라스미드로 형질감염시켰다. 항-GFP 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행함으로써, 과다발현되는 단백질을 모니터링하였다. β-액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다. 도 17B에서는, 이미지 분석에 의해 β-액틴 대조군에 정규화하여 GFP 단백질의 양을 계산하였다. N=5 반복으로부터의 데이터를 평균 ± 표준 편차로 표시되어 있다. 통계 분석은 t-검정 (p 값이 제시되어 있음)을 사용하여 수행하였다. 도 17C는 그의 상대적 구조와 함께 다양한 종으로부터의 가장 활성인 SINE을 제시한다. 전체적인 SINE 구조는 선 (스택) 및 원 (헤어핀 루프)로 나타내어진다. 모든 가장 활성인 SINE이 보존된 정점의 스택 루프 구조를 공유한다는 것을 알아야 한다. 실제로, 이와 같은 스택-루프 구조는 진화상 먼 종의 SINE에서의 번역 상향-조절 활성에 핵심적인 요소인 것으로 보인다.

[0126] 실시예 18

[0127] 본 실시예는 더 강력한 기능적 핵산 분자의 SINE 서열 사이에서 구조 모티프 (모티프 1, IL-3/SL-3 및 모티프 2, SL-1)이 공유된다는 것을 입증한다.

[0128] 도 18은 기능적 핵산 분자에서 번역 상향-조절 활성을 갖는 진화상 먼 종으로부터의 SINE 서열의 2D 구조 모티프 분석을 제시한다. 도 18A는 실시예 2로부터의 역전 SINE B2 RNA (서열식별번호: 5)의 2D 구조를 제시한다. 도 18B는 디폴트 설정을 사용하여 RNA 폴드 웹서버(WebServer)에 의해 결정된 B2 컨센서스 SINE RNA (서열식별번호: 30)의 예측 2D 구조를 제시한다. 도 18C는 효소 프로빙을 사용한 SmaI SINE RNA (서열식별번호: 27)의 2D 구조를 제시한다. LINE RT의 추정상 인식 영역은 단축선에 의해 박스로 표시되어 있다 (H Kawagoe-Takaki et al. Gene 365 (2006), 67-73). 도 18D는 역전 SINE B2 및 B2 SINE의 2D 구조로부터의 스택 구조 모티프1 (중간 스택, IL-3, SL-3)을 제시한다. 모티프 1은 중간 루프 구조 사이의 스택을 구성한다. 도 18E는 역전 SINE B2, B2 SINE 및 SmaI SINE의 2D 구조로부터의 스택 구조 모티프2 (SL-1)을 제시한다. 모티프2는 가장자리 루프 구조에 가까운 스택을 구성한다.

[0129] 역시 도 18A, 18B 및 18C의 3종 구조가 보존된 정점 스택 루프 구조를 공유한다는 것을 알아야 한다.

[0130] 실시예 19

[0131] 본 실시예는 구조적 특색 (38 nt, 스택 루프 구조 SL1)을 기반으로 새로운 합성 이펙터 도메인 서열이 설계될 수 있다는 것, 그리고 그들이 과다발현되는 mRNA를 사용하는 기능적 핵산 분자에서 번역 상향-조절 활성을 보유한다는 것을 입증한다. 활성은 일차 뉴클레오타이드 서열이 상이하나 구조는 동일한 것에 의해 획득된다. 특히, 역전 SINE B2의 더 짧은 구조-기반 변이체는 내생 mRNA를 표적화하는 기능적 핵산 분자의 이펙터 도메인 (59-96 SL1 SINEUP-GFP)으로서 번역 상향-조절 활성을 나타낸다. 도 19A는 SL1을 강조하는 역전 SINE B2 이차 구조상에 주해된 구조 기반 돌연변이의 개략적 표시이다 (59-96 nt는 서열식별번호: 12에 해당함). 도 19B는 이펙터 도메인이 보존된 구조적 특색을 갖는 더 짧은 합성 서열 (38 nt SL1)인 내생 발현 GFP mRNA를 표적화하는 기능적 핵산 분자의 번역 상향-조절 활성을 제시한다. HEK 293T/17 세포를, 표시된 바와 같이, 빈 벡터 (-), 또는 1-183 SINEUP-GFP (서열식별번호: 5 포함), 1-183 SINEUP-GFP 폴리A (서열식별번호: 63) 및 SL1 59-96 폴리A SINEUP-GFP (서열식별번호: 64)와 조합된 eGFP 발현 플라스미드로 형질감염시켰다. 항-GFP 항체를 사용하여 웨스턴 블롯을 수행함으로써, 과다발현되는 단백질을 모니터링하였다. β-액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다. β-액틴에 대해 정규화된 웨스턴 블롯 이미지상에서 빈 대조군 샘플에 대비하여 배수-유도를 계산하였다. 4회의 독립적인 실험으로부터의 데이터를 도 19C에 제시되어 있다. SL1 SINEUP-GFP 번역 증진제 활성은 적색으로 표시되어 있다. 데이터는 평균 ± 표준 편차를 표시한다.

[0132] 본 실험은 HEK 293T/17 세포에서 제1 스택 루프 도메인 (SL-1)이면 GFP mRNA와 증첩되는 안티센스 lncRNA (59-

96 SL1 SINEUP-GFP)의 번역 상향 조절 활성화에 충분하다는 것을 제시한다.

[0133] 실시예 20

[0134] 본 실시예는 구조적 특색을 기반으로 새로운 합성 이펙터 도메인 서열이 설계될 수 있다는 것 (IL4, SL1 및 SL2 를 함유하며 서열식별번호: 7에 해당하는 44-120 nt SINEUP), 그리고 그들이 과다발현되는 mRNA를 사용하는 기능적 핵산 분자에서 번역 상향-조절 활성을 보유한다는 것을 입증한다. 활성화는 일차 뉴클레오티드 서열이 상이 하나 구조는 동일한 것에 의해 수득된다. 특히, 역전 SINE B2의 더 짧은 구조-기반 변이체는 내생 mRNA를 표적화하는 기능적 핵산 분자의 이펙터 도메인으로서 번역 상향-조절 활성을 나타낸다. 또한, 감축된 역전 SINE B2 요소 44-120을 갖는 SINEUP 내의 돌연변이 U78G는 유사한 번역 상향-조절 활성을 유지하는 반면, 삼중 돌연변이 GUG77-79CCC는 활성을 상당히 감소시킴으로써, 뉴클레오티드 77-79의 기능적인 중요성을 입증하고 있다. 도 20A는 야생형 및 돌연변이된 서열을 강조하는 감축된 역전 SINE B2 이차 구조상에 주해된 구조 기반 돌연변이의 개략적 표시이다 (U78G가 있는 44-120은 서열식별번호: 65에 해당하며; GUG77-79CCC가 있는 44-120은 서열식별번호: 66에 해당함). 도 20B는 이펙터 도메인이 77-79 뉴클레오티드 위치에서 야생형 또는 돌연변이된 서열을 갖는 더 짧은 합성 서열인 내생 발현되는 GFP mRNA를 표적화하는 기능적 핵산 분자의 번역 상향-조절 활성을 제시한다. HEK 293T/17 세포를 빈 벡터 (-), 또는 44-120 SINEUP-GFP, U78G가 있는 44-120 SINEUP-GFP 및 GUG77-79CCC가 있는 44-120 SINEUP-GFP와 조합된 eGFP 발현 플라스미드로 형질감염시켰다. 항-GFP 항체를 사용하여 웨스턴 블롯을 수행함으로써, 과다발현되는 단백질을 모니터링하였다. β-액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다. β-액틴에 대해 정규화된 웨스턴 블롯 이미지상에서 빈 대조군 샘플에 대비하여 배수-유도를 계산하였다. 44-120 SINEUP-GFP 활성화는 전체 역전 SINE B2 서열을 갖는 SINEUP-GFP 활성화, 및 U78G 돌연변이가 있는 감축된 44-120 이펙터 도메인을 갖는 44-120 SINEUP-GFP 양자와 유사하였다. 비교하자면, GUG77-79CCC가 있는 44-120 SINEUP-GFP는 감소된 활성을 나타내었다.

[0135] 본 실험은 HEK 293T/17 세포에서 역전 SINE B2의 구조-기반인 더 짧은 버전이면 GFP mRNA와 중첩되는 안티센스 lncRNA (44-120 SINEUP-GFP)의 번역 상향 조절에 충분하다는 것을 제시한다. 이는 또한 역전 SINE B2 서열의 뉴클레오티드 77-79가 번역을 상향-조절하는 능력에 중요하다는 것을 제시한다. 3중 전체 구조물이 기능성이었으며, 이차 구조는 최적의 방식으로 77-79 루프의 3개의 뉴클레오티드를 제공하였다. 이들 3개의 뉴클레오티드가 변형된다 할지라도, 분자는 기능을 유지한다.

[0136] 실시예 21

[0137] 본 실시예는 구조적 특색을 기반으로 새로운 합성 이펙터 도메인 서열이 설계될 수 있다는 것 (IL4, SL1 및 SL2 를 함유하며 서열식별번호: 7에 해당하는 44-120 nt SINEUP), 그리고 그들이 내생 발현되는 mRNA를 사용하는 기능적 핵산 분자에서 번역 상향-조절 활성을 보유한다는 것을 입증한다. 활성화는 일차 뉴클레오티드 서열이 상이 하나 구조는 동일한 것에 의해 수득된다. 특히, 역전 SINE B2의 더 짧은 구조-기반 변이체는 내생 mRNA를 표적화하는 기능적 핵산 분자의 이펙터 도메인으로서 번역 상향-조절 활성을 나타낸다. 또한, 감축된 역전 SINE B2 이차 구조상에 주해된 구조 기반의 돌연변이는 번역 활성화인자 능력을 증가시킬 수 있는 반면 (서열식별번호: 67에 해당하는, 감축된 역전 SINE B2 서열에 6개의 점 돌연변이 A45G; U48C; U66G; U88C; U90C; U115C를 가지며 44-120 SINEUP-DJ-1-강함으로 지칭되는 44-120 SINEUP-DJ-1 변이체), 감축된 역전 SINE B2 이차 구조상에 주해된 다른 구조 기반 돌연변이는 번역 상향-조절 능력을 변화없이 또는 더 낮게 유지할 수 있다 (서열식별번호: 68에 해당하는, 감축된 역전 SINE B2 서열에 5개의 점 돌연변이 G49A; U66A; G68A; G116A; C119A를 가지며 44-120 SINEUP-DJ-1-약함으로 지칭되는 44-120 SINEUP-DJ-1 변이체). 상기 2종 변이체의 설계를 뒷받침하는 이유는 44-120 SINEUP의 구조에 있어서, 2개의 dsRNA 연장부 (44-50과 114-120 및 64-74와 82-92)에 5개의 염기쌍 미스매치 (45-119; 48-116; 49-115; 66-90; 68-88)가 존재한다는 것이다. 44-120 SINEUP 강함에서는, 돌연변이체 염기 쌍이 G:C 쌍을 이루도록 설계되었다. 44-120 SINEUP 약함에서는, 돌연변이체 염기 쌍이 U:A 쌍을 이루도록 설계되었다. 다른 요인들 중에서도, 3 대 2인 수소 결합의 형성으로 인하여 G:C 쌍이 더 안정하기 때문에, 5개의 G:C 쌍을 갖는 돌연변이체 44-120 SINEUP은 강함으로 표시된 반면, 5개의 U:A 쌍을 갖는 돌연변이체 44-120 SINEUP은 약함으로 표시되었다.

[0138] 도 21A는 44-120 SINEUP-DJ-1-강함 및 44-120 SINEUP-DJ-1-약함의 감축된 역전 SINE B2 이차 구조상에 주해된 구조 기반 돌연변이의 개략적 표시이다. 돌연변이들의 위치는 화살표로 표시되어 있다. 도 21B는 이펙터 도메인이 더 짧은 합성 서열 (44-120 SINEUP-DJ-1), 또는 6개의 점 돌연변이에 의해 변형되거나 (44-120 SINEUP-DJ-1-강함) 또는 5개의 점 돌연변이에 의해 변형된 (44-120 SINEUP-DJ-1-약함) 동일한 서열인 내생 발현되는 DJ-1 mRNA를 표적화하는 기능적 핵산 분자의 번역 상향-조절 활성을 제시한다. HEK 293T/17 세포를 빈 벡터 (-

), 또는 44-120 SINEUP-DJ-1, 44-120 SINEUP-DJ-1-강함 및 44-120 SINEUP-DJ-1-약함과 조합된 eGFP 발현 플라즈미드로 형질감염시켰다. 항-DJ-1 항체를 사용하여 웨스턴 블롯을 수행함으로써, 과다발현되는 단백질을 모니터링하였다. β-액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다. β-액틴에 대해 정규화된 웨스턴 블롯 이미지상에서 빈 대조군 샘플에 대비하여 배수-유도를 계산하였다. 3회의 독립적인 실험으로부터의 데이터를 도 21C에 제시되어 있다. 44-120 SINEUP-DJ-1 활성은 44-120 SINEUP-DJ-1-약함과 유사하였던 반면, 44-120 SINEUP-DJ-1-강함은 통계적으로 유의한 방식으로 더 높았다. 데이터는 평균 ± 표준 편차를 표시한다.

[0139] 본 실험은 역전 SINE B2의 구조-기반인 더 짧은 버전이면 번역 상향 조절에 충분하다는 것을 제시한다 (44-120 SINEUP-DJ-1). 또한, 44-120 SINEUP-DJ-1-강함은 44-120 SINEUP-DJ-1 대비 더 높은 번역 활성화인자 활성을 나타낸다. 44-120 SINEUP-DJ-1-약함은 44-120 SINEUP-DJ-1 대비 유사하거나 더 낮은 번역 상향-조절 활성을 나타낸다.

[0140] 실시예 22

[0141] 도 23A는 미니SINEUP-GFP 중 AS Uchl1 SINEB2의 icSHAPE 데이터 가이드된 이차 구조를 제시한다. icSHAPE 강화 점수 데이터를 비엔나RNA(ViennaRNA)의 소프트 컨스트레인트 RNA폴드 도구로 사용하였다. 선형 맵핑법을 사용하여 쌍형성 가능성을 추론하였으며, 폴딩 알고리즘으로 가이드링 슈도 에너지를 통합하는데 문헌 [Zarringhalam et al. (2012)]에 기재되어 있는 방법을 선택하였다. 이차 구조를 도출하는데에는 포르나(forna) 서버를 사용하였다. 짙은 색 도트, icSHAPE 강화 점수 ≥ 0.8 ; 밝은 색 도트, 강화 점수 0.5-0.8. 강화 점수는 0 내지 1 규모의 척도이며, 여기서 1은 뉴클레오티드가 쌍형성되지 않은 상태일 가능성이 높음을 표시하며, 0은 쌍형성되는 경향을 표시한다. SINEB2의 B-박스 및 A-박스 영역은 선으로 표시되어 있다 (각각 도면의 높은 부분 및 도면의 낮은 부분). 2중 RNA에 공통인 정확한 매칭 서열-구조 모티프를 컴퓨팅하는 ExpaRNA 도구 (Heyne, S. et al. Bioinformatics, 2009, 25:2095-2102)를 사용하여, 본 연구에서 기능적으로 시험된 모든 SINEB2의 서열 및 icSHAPE-가이드된 2D 구조를 AS Uchl1 SINEB2의 이와 같은 구조 및 서열과 쌍형식으로 비교하였다. 다음에, 전체 쌍형식 비교로부터 이렇게 추론된 모티프 파일을 스크리닝함으로써, 모든 비교에서 적어도 이량체 길이의 하나 또는 다수 모티프에 존재하는 AS Uchl1 SINEB2의 위치를 추출하였다. 모든 SINEB2 중에서 공유된 유사한 서열 및 구조 모티프의 위치는 그의 해당 모티프 번호와 함께 사각형으로 표시되어 있다. 이량체 및 더 긴 모티프를 고려하여 공통 영역을 확인하였으며 SINEB2 서열이 고도로 가변적이었기 때문에, 대부분의 경우에서 부분적인 매치만을 발견할 수 있었다. 도 23B는 도 23A에 제시된 공통 서열 및 구조 모티프의 확대도를 제시한다. 모티프 2 및 3, 및 모티프 4, 5, 6 및 7이 유사하며, 각각 주로 AGG 및 UGG의 트리뉴클레오티드로 구성된다는 것을 알아야 한다. 그의 이웃 서열 및 구조, 및 SINEB2상에서의 위치를 기반으로 상이한 모티프 번호를 할당하였다. 그들의 유사한 서열 조성으로 인하여, 때로는 문제 서열의 하나의 지점이 다수의 모티프와 매칭하거나, 또는 하나의 모티프가 문제 서열의 다수의 위치와 매칭한다.

[0142] 실시예 23

[0143] 도 24는 ExpaRNA를 사용한 (A) SINEUP-GFP 및 (B) 미니SINEUP-GFP에서의 AS Uchl1 SINEB2의 2D 구조 비교를 제시한다. 상이한 음영처리 영역은 2중 RNA 사이의 서열 및 구조의 상응하는 정확 매치를 표시한다. 미니 SINEUP-GFP에서의 AS Uchl1 SINEB2 2D 구조가 거의 동일해서, 이와 같은 구조가 세포 내부에서 고도로 안정하고 우세하다는 것을 시사한다. 유일한 구조 변화 영역은 흑색 직사각형으로 표시되어 있다.

[0144] 실시예 24

[0145] 도 25는 (A) SINEUP-GFP 및 (B) 미니SINEUP-GFP에서의 AS Uxt SINEB2-b 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다. 상이한 음영처리 영역은 2중 RNA 사이의 서열 및 구조의 상응하는 정확한 일치치를 표시한다. 여기에서 전체 구조는 SINEUP과 미니SINEUP 사이에 상당히 다르지만 일부 영역에서는 구조가 보존되는데 (예컨대 - 박스포시된 영역), 이는 SINEUP 기능에 중요할 수 있다.

[0146] 실시예 25

[0147] 도 26은 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uchl1 SINEB2 및 (B) SINEUP-GFP 중 AS Txnip SINEB2의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 및 모티프 분석 결과를 제시한다. 상이한 음영처리 영역은 2중 RNA 사이의 정확 서열 및 구조 매치의 상응하는 고유 패턴을 표시한다. 모든 SINEB2 중에서 공유된 유사한 서열 및 구조 모티프의 위치는 그의 각 모티프 번호와 함께 사각형으로 표시되어 있다. 그들의 유사한 서열 조성으로 인하여, 일부 경우에서 모티프 2 및 3은 중첩될 수 있으며, 모티프 4, 5, 6 및 7도 마찬가지이다.

- [0148] 실시예 26
- [0149] 도 27은 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 및 (B) SINEUP-GFP 중 AS Uxt SINEB2-b의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 및 모티프 분석 결과를 제시한다. 상기와 동일한 것이 적용된다.
- [0150] 실시예 27
- [0151] 도 28은 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 및 (B) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uxt SINEB2-b의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 및 모티프 분석 결과를 제시한다. 상이한 음영처리 영역은 2종 RNA 사이의 정확 서열 및 구조 매치의 고유 상응하는 패턴을 표시한다. 상기와 동일한 것이 적용된다.
- [0152] 실시예 28
- [0153] 도 29는 미니SINEUP-GFP 중 (A) AS Uch11 SINEB2 및 (B) SINEB2/B3 컨센서스 (역 상보체)의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 및 모티프 분석 결과를 제시한다. 상기와 동일한 것이 적용된다.
- [0154] 실시예 29
- [0155] 도 30은 미니SINEUP-GFP 중 (A) AS Uch11 SINEB2 및 (B) AS Nars2 SINEB2의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 및 모티프 분석 결과를 제시한다. 상기와 동일한 것이 적용된다.
- [0156] 실시예 30
- [0157] 도 31은 미니SINEUP-GFP 중 (A) AS Uch11 SINEB2 및 (B) AS Abhd11 SINEB2의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 및 모티프 분석 결과를 제시한다. 상기와 동일한 것이 적용된다.
- [0158] 실시예 31
- [0159] 도 32는 미니SINEUP-GFP 중 (A) AS Uch11 SINEB2 및 (B) AS Epb4.9 SINEB2의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 및 모티프 분석 결과를 제시한다. 상기와 동일한 것이 적용된다.
- [0160] 실시예 32
- [0161] 도 33은 미니SINEUP-GFP 중 (A) AS Uch11 SINEB2 및 (B) AS Wfdc5 SINEB2의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 및 모티프 분석 결과를 제시한다. 상기와 동일한 것이 적용된다.
- [0162] 실시예 33
- [0163] 도 34는 미니SINEUP-GFP 중 (A) AS Uch11 SINEB2 및 (B) AS Pgbd1 SINEB2의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 및 모티프 분석 결과를 제시한다. 상기와 동일한 것이 적용된다.
- [0164] 실시예 34
- [0165] 도 35는 미니SINEUP-GFP 중 (A) AS Uch11 SINEB2 및 (B) AS Gsk3 β SINEB2의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 및 모티프 분석 결과를 제시한다. 상기와 동일한 것이 적용된다.
- [0166] 실시예 35
- [0167] 도 36은 미니SINEUP-GFP 중 (A) AS Uch11 SINEB2 및 (B) AS Rhod SINEB2-Mm2의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 및 모티프 분석 결과를 제시한다. 상기와 동일한 것이 적용된다.
- [0168] 실시예 36
- [0169] 도 37은 미니SINEUP-GFP 중 (A) AS Uch11 SINEB2 및 (B) AS Rhod SINEB2-B3A의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 및 모티프 분석 결과를 제시한다. 상기와 동일한 것이 적용된다.
- [0170] 실시예 37
- [0171] 도 38은 미니SINEUP-GFP 중 (A) AS Uch11 SINEB2 및 (B) AS E4f1 SINEB2-Mm2의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 및 모티프 분석 결과를 제시한다. 상기와 동일한 것이 적용된다.
- [0172] 실시예 38
- [0173] 도 39는 미니SINEUP-GFP 중 (A) AS Uch11 SINEB2 및 (B) AS E4f1 SINEB2-Mm1t의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 및 모티프 분석 결과를 제시한다. 상기와 동일한 것이 적용된다.

- [0174] 실시예 39
- [0175] 도 40은 AS-Uch11 SINEB2의 구조 동역학을 제시한다. SINEB2 RNA 구조를 더 작은 단편으로 분할하는 목적은 전체-길이 (FL)가 현행 NMR 자기력으로 분석하기에는 너무 크다는 것이다. ¹H NMR 스펙트럼의 이미노 양성자 신호를 올바르게 할당하기 위해서는, 구조가 분할되어야 한다. 분할된 RNA는 FL과 유사한 구조를 형성해야 한다. TM 및 C 및 MC2의 ¹H NMR 스펙트럼은 그들이 그렇다는 것을 시사한다. 또한, 이러한 구조는 화학적 풋프린팅 측정과 관련하여 NMR 수성 완충제 중에서 서로 다르게 형성된다 (도 2). 구조 동역학은 상이한 세포 구획과 같은 생리학적 조건에서 이루어질 수 있다 (Sun et al., bioRxiv 2018., <https://doi.org/10.1101/399386>).
- [0176] 도 40A는 RNA 폴드 프로그램에 의한 AS-Uch11으로부터의 FL SINEB2의 컴퓨팅 예측 구조 및 그 구조의 일부를 제시한다. FL을 3개의 구조 (TM, C 및 MC2)로 분할하였다.
- [0177] 도 40B는 NMR ¹H 스펙트럼을 사용한 잔기의 할당을 제시한다. MC2, C, TM 구조의 거의 모든 신호 피크가 FL 구조에 부합하였다. 이러한 결과는 MC2, C 및 TM이 FL 구조와 동일한 구조를 형성한다는 것을 시사한다.
- [0178] 도 40C는 5개의 스템 구조 (좌측의 점선 사각형으로 표시된 스템)가 핵 오버하우저(Nuclear Overhauser) 효과 분광법 (NOESY) (우측)에서 할당된다는 것을 제시한다.
- [0179] 실시예 40
- [0180] 도 41은 AS-Uch11 SINEB2의 구조 동역학을 제시한다.
- [0181] FL 및 C의 양 컴퓨팅 예측은 46-49 및 58-61에 스템 구조를 형성하는데 ((A)의 점선 원), 도 1 및 2에서의 화학적 풋프린팅로는 확인되지 않았던 것이다. 또한, 50-57에서의 루프 및 18-123에서의 단일 가닥 영역은 도 1 및 2에서의 화학적 풋프린팅로는 확인되지 않았었다. 그러나, ¹H NMR 스펙트럼 및 NOESY는 46-49 및 58-61에서의 스템 구조 (도 40B 및 40C)가 컴퓨팅 예측 구조와 동일하다고 확인해주었다. A51>C 돌연변이체 RNA 및 SINEB2 RNA의 일부를 사용하여 ¹H NMR 스펙트럼에 의해 46-49 및 58-61의 스템 구조가 루프 50-57 및 18-123에서의 단일 가닥 영역의 임의의 다른 구조화되지 않은 잔기와 연관되어 있는지 여부를 분석하였다. 다시 말해서, 화학적 풋프린팅 측정의 비결정된 구조가 NMR 완충제 조건에서 동시에 출현하여 서로 연관되는지 여부를 조사하였다.
- [0182] 본 실시예는 하기를 입증한다:
- [0183] a) RNA폴드 프로그램에 의한 FL 및 C 도메인 (34-122)의 컴퓨팅 예측 구조. C 구조는 FL 구조의 비폴딩 영역으로 분할되었다 (118-123). C 구조의 5개 잔기 (118-120)는 대향 잔기와 스템을 구성하였다.
- [0184] b) 3종 소형 RNA (34-120, 34-121 및 34-122) 및 FL의 ¹H NMR 스펙트럼. 34-120은 45-49 및 58-61의 스템을 나타내지 않았으나 (U61, G60, G49, U48 및 G59의 수직 선에서의 피크), 다른 3개 구조 (FL, 34-121 및 34-122)는 이러한 피크를 나타내었다. 도 41B는 118-123으로부터의 비폴딩 루프가 46-49 및 58-61에서 스템을 형성하는데 중요하다는 것을 제시한다. 도 41B는 단백질 합성을 증가시킨 A51C의 ¹H NMR 스펙트럼을 제시한다 (도 12). A51>C 돌연변이의 결과로서, U48 및 G59의 피크 (수직 선)에서 화학적 이동이 발생하였다. 추가적으로, FL에서의 2개의 비할당 피크 (U61 및 U48 좌측의 수직 선)가 사라졌다. 이러한 피크 이동은 A51에서의 돌연변이가 46-49에서의 스템의 결합 위치를 변화시킴으로써, 단백질 합성 기능을 증가시킨다는 것을 시사한다. 종합적으로, NMR 완충제의 수성 조건 (20 mM MES (pH 6.0), 50 mM NaCl, 8% D2O, 298 K)에서 50-57 및 118-123에서의 루프 구조는 46-49 및 58-61에서의 스템 구조 형성과 상호작용한다. 도 41은 SINEB2 구조가 엄격하지는 않으나, 일부 구조는 동적이라는 것을 시사한다. A의 원은 B의 원에 상응한다.
- [0185] 실시예 41
- [0186] 도 42는 어떻게 다양한 ED 길이 및 구조 모티프 조합의 합성 SINEUP가 GFP 단백질 발현을 상향-조절하는지를 제시한다.
- [0187] 센스 EGFP와 (A) SINEUP (n=3) 및 (B) 미니SINEUP (n=4)을 사용한 공동-형질감염 후 (형질감염 24 h 후) HEK293T/17 세포에서의 평균 GFP 단백질 배수 변화. 웨스턴 블롯 이미지 및 상응하는 GFP 밴드 강도 (ACTB 발현 수준에 대해 정규화됨)는 이미지제이 소프트웨어를 사용하여 계산하였다. 빈 벡터를 음성 대조군으로 사용한 반면, AS Uch11 (AS Uch11 SINEB2 함유 SINEUP 또는 미니SINEUP)을 양성 대조군으로 사용하였다. SINEUP ID 뒤의 괄호 안에 ED 길이를 기록하였다. 오차 막대 ± SD; **** P<0.00005; *** P<0.0005; ** P<0.005; * P<0.05; 양측 스튜던트 t-검정.

- [0188] 하기에서는, 구축물의 완전한 특색을 갖는 본 실험에서 시험된 구조 모티프 조합 (도 23에 기재되어 있는 모티프 기반)을 제시한다. 명료성을 이유로, 서열식별번호는 SINEUP과 상응하는 미니SINEUP에서 동일한 이펙터 도메인의 서열만을 표시한다.
- [0189] SINEUP 071/미니SINEUP 071 (206 nt): 5' 단부로부터 부분적 모티프 1, 부분적 모티프 2 및 3 (중첩), 완전한 모티프 6, 부분적 모티프 4 및 7
- [0190] SINEUP 071
- [0191] 수용자 플라스미드: pcDNA3.1(-)
- [0192] 클로닝 제한 부위: XhoI-HindIII
- [0193] 특색: BD= -40/+32 (+21 nt 스페이서)
- [0194] ED (서열식별번호: 69)= SacII 및 ClaI 제한 부위 사이; AS Uchl1, AS Uxt-b, 및 AS Txnip SINEB2 요소의 전체적인 서열 및 구조 정렬을 기반으로 하는 컨센서스 2D 구조 유래의 206 nt 길이 서열 (AS Uchl1로부터의 +Alu 및 3' 테일 영역)
- [0195] SINEUP 길이= 1380 nt
- [0196] 미니SINEUP 071
- [0197] 수용자 플라스미드: pcDNA3.1(-)
- [0198] 클로닝 제한 부위: XhoI-HindIII
- [0199] 특색: BD= -40/+4 (+21 nt 스페이서)
- [0200] ED= EcoRI 및 HindIII 제한 부위 사이; (서열식별번호: 69)
- [0201] SINEUP 길이= 289 nt
- [0202] SINEUP 072/미니SINEUP 072 (206 nt): 5' 단부로부터 부분적 모티프 2, 완전한 모티프 1, 부분적 모티프 4, 완전한 모티프 7
- [0203] SINEUP 072
- [0204] 수용자 플라스미드: pcDNA3.1(-)
- [0205] 클로닝 제한 부위: XhoI-HindIII
- [0206] 특색: BD= -40/+32 (+21 nt 스페이서)
- [0207] ED (서열식별번호: 70)= SacII 및 ClaI 제한 부위 사이; AS Uchl1 및 AS Uxt-b SINEB2 요소의 전체적인 서열 및 구조 정렬을 기반으로 하는 컨센서스 2D 구조 유래의 206 nt 길이 서열 (AS Uchl1로부터의 +Alu 및 3' 테일 영역)
- [0208] SINEUP 길이= 1380 nt
- [0209] 미니SINEUP 072
- [0210] 수용자 플라스미드: pcDNA3.1(-)
- [0211] 클로닝 제한 부위: XhoI-HindIII
- [0212] 특색: BD= -40/+4 (+21 nt 스페이서)
- [0213] ED= EcoRI 및 HindIII 제한 부위 사이; 서열식별번호: 70
- [0214] SINEUP 길이= 289 nt
- [0215] SINEUP 073/미니SINEUP 073 (156 nt): 5' 단부로부터 완전한 모티프 1, 부분적 모티프 2 및 3 (중첩), 부분적 모티프 4, 완전한 모티프 6, 부분적 7
- [0216] SINEUP 073

- [0217] 수용자 플라스미드: pcDNA3.1(-)
- [0218] 클로닝 제한 부위: XhoI-HindIII
- [0219] 특색: BD= -40/+32 (+21 nt 스페이서)
- [0220] ED (서열식별번호: 71)= SacII 및 ClaI 제한 부위 사이; AS Uch11 및 AS Uxt-b SINEB2 요소의 국소적인 서열 및 구조 정렬을 기반으로 하는 컨센서스 2D 구조 유래의 156 nt 길이 서열 (AS Uch11로부터의 +Alu 및 3' 테일 영역)
- [0221] SINEUP 길이= 1330 nt
- [0222] 미니SINEUP 073
- [0223] 수용자 플라스미드: pcDNA3.1(-)
- [0224] 클로닝 제한 부위: XhoI-HindIII
- [0225] 특색: BD= -40/+4 (+21 nt 스페이서)
- [0226] ED= EcoRI 및 HindIII 제한 부위 사이; 서열식별번호: 71
- [0227] SINEUP 길이= 239 nt
- [0228] SINEUP 074/미니SINEUP 074 (68 nt): 5' 단부로부터 부분적 1, 7, 6 (중첩), 부분적 2
- [0229] SINEUP 074
- [0230] 수용자 플라스미드: pcDNA3.1(-)
- [0231] 클로닝 제한 부위: XhoI-HindIII
- [0232] 특색: BD= -40/+32 (+21 nt 스페이서)
- [0233] ED (서열식별번호: 72)= SacII 및 ClaI 제한 부위 사이; AS Uch11, AS Uxt-b, 및 AS Txnip SINEB2 요소의 국소적인 서열 및 구조 정렬을 기반으로 하는 컨센서스 2D 구조 유래의 68 nt 길이 서열 (AS Uch11로부터의 +Alu 및 3' 테일 영역)
- [0234] SINEUP 길이= 1242 nt
- [0235] 미니SINEUP 074
- [0236] 수용자 플라스미드: pcDNA3.1(-)
- [0237] 클로닝 제한 부위: XhoI-HindIII
- [0238] 특색: BD= -40/+4 (+21 nt 스페이서)
- [0239] ED= EcoRI 및 HindIII 제한 부위 사이; 서열식별번호: 72
- [0240] SINEUP 길이= 151 nt
- [0241] SINEUP 075/미니SINEUP 075 (110 nt): 5' 단부로부터 완전한 모티프 1, 2, 3, 및 6
- [0242] 수용자 플라스미드: pcDNA3.1(-)
- [0243] 클로닝 제한 부위: XhoI-HindIII
- [0244] 특색: BD= -40/+32 (+21 nt 스페이서)
- [0245] ED (서열식별번호: 73)= SacII 및 ClaI 제한 부위 사이; 110 nt; Δ28-32, Δ42-60, Δ90-116, Δ131-135 AS Uch11 SINEB2 결실 돌연변이체 (AS Uch11로부터의 +Alu 및 3' 테일 영역)
- [0246] SINEUP 길이= 1284 nt
- [0247] 미니SINEUP 075
- [0248] 수용자 플라스미드: pcDNA3.1(-)

- [0249] 클로닝 제한 부위: XhoI-HindIII
- [0250] 특색: BD= -40/+4 (+21 nt 스페이서)
- [0251] ED= EcoRI 및 HindIII 제한 부위 사이; 서열식별번호: 73
- [0252] SINEUP 길이= 193 nt
- [0253] AS Uch11 및 AS Uch11_Δ5'-28nt (167 nt): 양성 대조군, 전체 7종 모티프
- [0254] 어느 것도 양성 대조군에 의해 유도되는 단백질 배수 변화를 증가할 수는 없었지만, 본 실험에서 시험된 모든 모티프 조합이 GFP 발현을 상향-조절한다. 이는 상이한 모티프가 SINEUP 활성화에 대해 조합 효과를 갖는다는 것을 시사한다. 실시예 22에서 설명된 바와 같이, 대부분의 모티프가 임의의 생략된 모티프를 보상하여 최소한 수준의 SINEUP 활성을 보장할 수 있는 유사한 서열 조성을 갖는다. 양성 대조군 (AS Uch11 SINEB2)으로부터 명백한 바와 같이, 최적의 SINEUP 효과는 해당 각 수준에서의 7종 모티프 전체에 의해 획득된다. 흥미롭게도, SINEUP 074 및 미니SINEUP 074가 짧은 ED 및 그에 따른 모티프 결핍에도 불구하고 GFP 단백질 발현을 증가시킴으로써, SINEUP 활성화에 필요한 최소한인 기능적 서열의 예 역할을 한다.
- [0255] 실시예 42
- [0256] 도 43은 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 (icSHAPE-가이드됨) 및 (B) 미니SINEUP 071 ED (RNA폴드-예측)의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다. 상이한 음영처리 영역은 2종 RNA 사이의 정확 서열 및 구조 매치의 고유 상응하는 패턴을 표시한다. 전체 SINEB2 사이에서 공유되는 유사한 서열 및 구조 모티프의 위치는 그의 각 모티프 번호와 함께 사각형으로 표시되어 있다. 그들의 유사한 서열 조성으로 인하여, 일부 경우에서 모티프 2 및 3은 중첩될 수 있으며, 모티프 4, 5, 6 및 7도 마찬가지로이다.
- [0257] 실시예 43
- [0258] 도 44는 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 (icSHAPE-가이드됨) 및 (B) 미니SINEUP 072 ED (RNA폴드-예측)의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다. 상기와 동일한 것이 적용된다.
- [0259] 실시예 44
- [0260] 도 45는 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 (icSHAPE-가이드됨) 및 (B) 미니SINEUP 073 ED (RNA폴드-예측)의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다. 상기와 동일한 것이 적용된다.
- [0261] 실시예 45
- [0262] 도 46은 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 (icSHAPE-가이드됨) 및 (B) 미니SINEUP 074 ED (RNA폴드-예측)의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다. 상기와 동일한 것이 적용된다.
- [0263] 실시예 46
- [0264] 도 47은 (A) 미니SINEUP-GFP 중 AS Uch11 SINEB2 (icSHAPE-가이드됨) 및 (B) 미니SINEUP 075 ED (RNA폴드-예측)의 2D 구조의 ExpaRNA 정확 패턴 매치 결과를 제시한다. 상기와 동일한 것이 적용된다.
- [0265] 실시예 47
- [0266] 도 48은 어떻게 AS Uch11로부터의 SINEB2의 구조 단편이 GFP 단백질 발현을 상향-조절하는지를 제시한다.
- [0267] (A) 센스 EGFP와 SINEUP (n=2)를 사용한 공동-형질감염 후 (형질감염 24 h 후) HEK293T/17 세포에서의 평균 GFP 단백질 배수 변화. 웨스턴 블롯 이미지 및 상응하는 GFP 밴드 강도 (ACTB 발현 수준에 대해 정규화됨)는 이미지제이 소프트웨어를 사용하여 계산하였다. 빈 벡터를 음성 대조군으로 사용하였다.
- [0268] 어느 것도 AS Uch11 SINEB2에 의해 유도되는 단백질 배수 변화를 증가할 수는 없었지만, 본 실험의 모든 구조 단편이 GFP 발현을 상향-조절하였다. 이들 단편은 AS Uch11 SINEB2 구조 (도 23)와 동일한 구조를 형성한다.
- [0269] 이는 상이한 모티프를 갖는 구조가 SINEUP 활성화에 대해 조합 효과를 갖는다는 것을 시사한다. 도 23에 설명되어 있는 바와 같이, 대부분의 모티프는 임의의 생략된 모티프를 보상하여 최소한 수준의 SINEUP 활성을 보장할 수 있는 유사한 서열 조성을 갖는다. 양성 대조군 (AS Uch11 SINEB2)으로부터 명백한 바와 같이, 최적의 SINEUP 효과는 해당 각 수준에서의 7종 모티프 전체에 의해 획득된다.
- [0270] (B) 이와 같은 AS Uch11 SINEB2 구조는 대안적인 구조로서 NMR 분광법 용액 중에서 확인된다. 다른 단편이 AS

Uch11 SINEB2의 더 짧은 구조로서 계속 형성되고 있다. 모티프 조합은 새로운 도 23에 해당한다.

- [0271] 하기에서는, 구축물의 완전한 특색을 갖는 구조 모티프 조합 (도 23에 기재되어 있는 모티프 기반)을 제시한다. 명료성을 이유로, 서열식별번호는 이펙터 도메인의 서열만을 표시한다.
- [0272] AS Uch11 SINEB2: 5' 단부로부터 완전한 모티프 1, 부분적 모티프 2, 완전한 모티프 3, 부분적 모티프 5, 완전한 모티프 6 및 완전한 모티프 7
- [0273] 24-150 (126 nt): 5' 단부로부터 완전한 모티프 3, 부분적 모티프 4, 부분적 모티프 5, 완전한 모티프 6 및 완전한 모티프 7
- [0274] 수용자 플라스미드: pcDNA3.1(-)
- [0275] 클로닝 제한 부위: XhoI-HindIII
- [0276] 특색: BD= -40/+32 (+21 nt 스페이서)
- [0277] ED (서열식별번호: 74)= SacII 및 ClaI 제한 부위 사이; AS Uch11 SINEB2 요소 유래의 126 nt 길이 서열 (AS Uch11로부터의 +Alu 및 3' 테일 영역)
- [0278] SINEUP 길이= 1300 nt
- [0279] C_34-122 (89 nt): 5' 단부로부터 부분적 모티프 4, 5 및 완전한 모티프 6 및 완전한 모티프 7
- [0280] 수용자 플라스미드: pcDNA3.1(-)
- [0281] 클로닝 제한 부위: XhoI-HindIII
- [0282] 특색: BD= -40/+32 (+21 nt 스페이서)
- [0283] ED (서열식별번호: 75)= SacII 및 ClaI 제한 부위 사이; AS Uch11 SINEB2 요소에 포함되어 있는 89 nt 길이 서열 (AS Uch11로부터의 +Alu 및 3' 테일 영역)
- [0284] SINEUP 길이= 1263 nt
- [0285] TM (72 nt): 5' 단부로부터 완전한 모티프 1, 완전한 모티프 2, 완전한 모티프 3, 완전한 모티프 4 및 부분적 모티프 6 (중첩)
- [0286] 수용자 플라스미드: pcDNA3.1(-)
- [0287] 클로닝 제한 부위: XhoI-HindIII
- [0288] 특색: BD= -40/+32 (+21 nt 스페이서)
- [0289] ED (서열식별번호: 76)= SacII 및 ClaI 제한 부위 사이; AS Uch11 SINEB2 요소에 포함되어 있는 72 nt 길이 서열 (AS Uch11로부터의 +Alu 및 3' 테일 영역)
- [0290] SINEUP 길이= 1246 nt
- [0291] MC2 (94 nt): 5' 단부로부터 완전한 모티프 3, 완전한 모티프 4, 부분적 모티프 5 및 완전한 모티프 7.
- [0292] 수용자 플라스미드: pcDNA3.1(-)
- [0293] 클로닝 제한 부위: XhoI-HindIII
- [0294] 특색: BD= -40/+32 (+21 nt 스페이서)
- [0295] ED (서열식별번호: 77)= SacII 및 ClaI 제한 부위 사이; AS Uch11 SINEB2 요소 유래의 94 nt 길이 서열 (AS Uch11로부터의 +Alu 및 3' 테일 영역)
- [0296] SINEUP 길이= 1268 nt
- [0297] 실시예 48
- [0298] 도 49는 원형 RNA로 발현될 때 SINEUP가 활성화라는 것을 제시한다. 원형 SINEUP-DJ-1 (circSINEUP-DJ-1)은 HEK 293T/17 세포에서 표적 DJ-1 mRNA 수준의 변화 없이 결합 도메인-의존성인 방식으로 내생 DJ-1 단백질 수준을 증가시킬 수 있다.

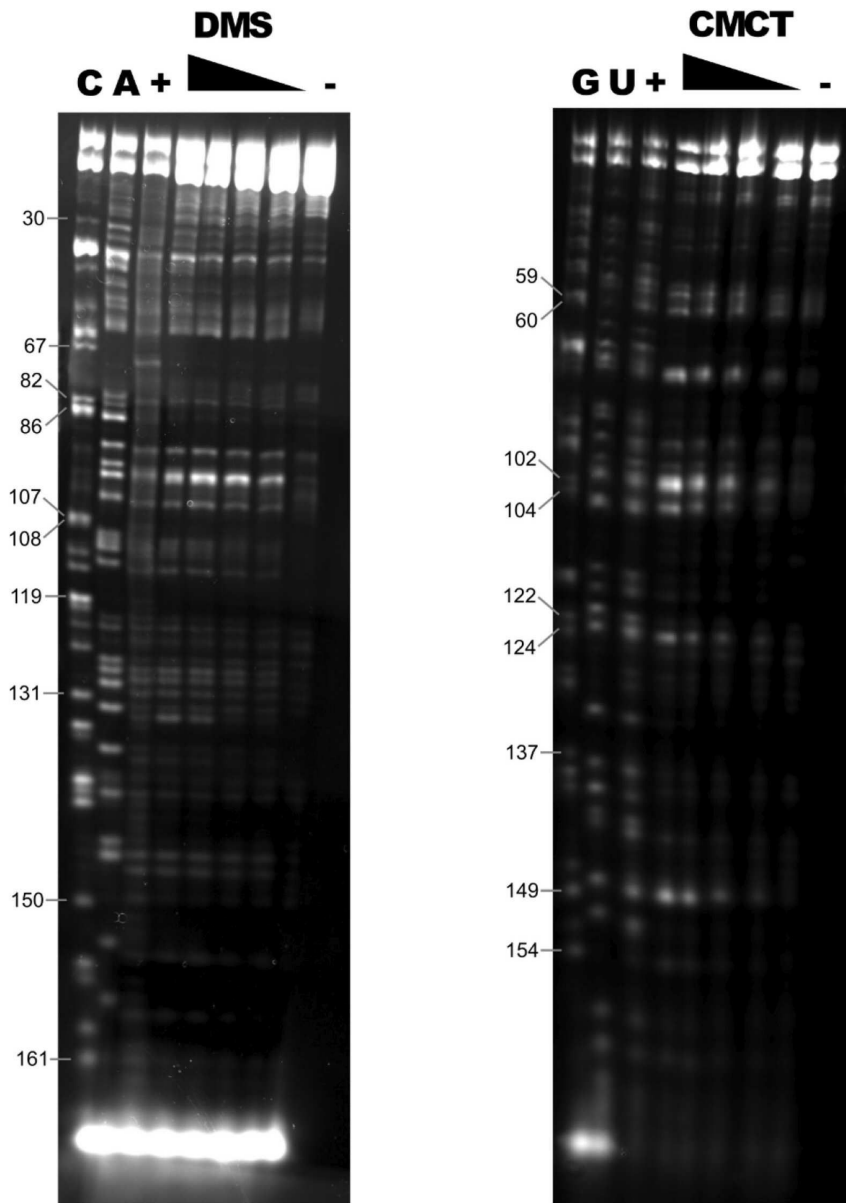
[0299] 본 실시예는 SINEUP 서열이 원형 RNA일 수 있다는 것, 그리고 그들이 내생 mRNA를 사용하는 기능적 핵산 분자에서 번역 상향-조절 활성을 보유한다는 것을 입증한다. 활성은 일차 뉴클레오티드 서열이 동일하나 선형 SINEUP-DJ-1의 5' 단부와 3' 단부가 공유로 라이게이션되는 것에 의해 취득된다. 도 49A는 DJ-1 mRNA의 정규 서열 역전 SINE B2 및 결합 도메인 양자를 포함하는 원형 SINEUP-DJ-1 RNA (circSINEUP-DJ-1)의 개략적 표시이다. 도 49B는 SINEUP이 원형의 형태로 존재하는 내생 발현 DJ-1 mRNA를 표적화하는 기능적 핵산 분자의 번역 상향-조절 활성을 제시한다. HEK 293T/17 세포를 빈 벡터, 또는 원형 SINEUP-DJ-1 및 DJ-1 mRNA에 대한 안티센스 서열이 결합되어 있는 원형 SINEUP-DJ-1 델타BD로 형질감염시켰다. 항-DJ-1 항체를 사용하여 웨스턴 블롯을 수행함으로써, 과다발현되는 단백질을 모니터링하였다. β -액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다. β -액틴에 대해 정규화된 웨스턴 블롯 이미지상에서 빈 대조군 샘플에 대비하여 배수-유도를 계산하였다. 도 49C는 원형 SINEUP-DJ-1 RNA 및 DJ-1 mRNA 수준을 정량하여 메카니즘이 전사-후라는 것을 입증하기 위한 실시간 qPCR 분석을 나타낸다.

[0300] 이전

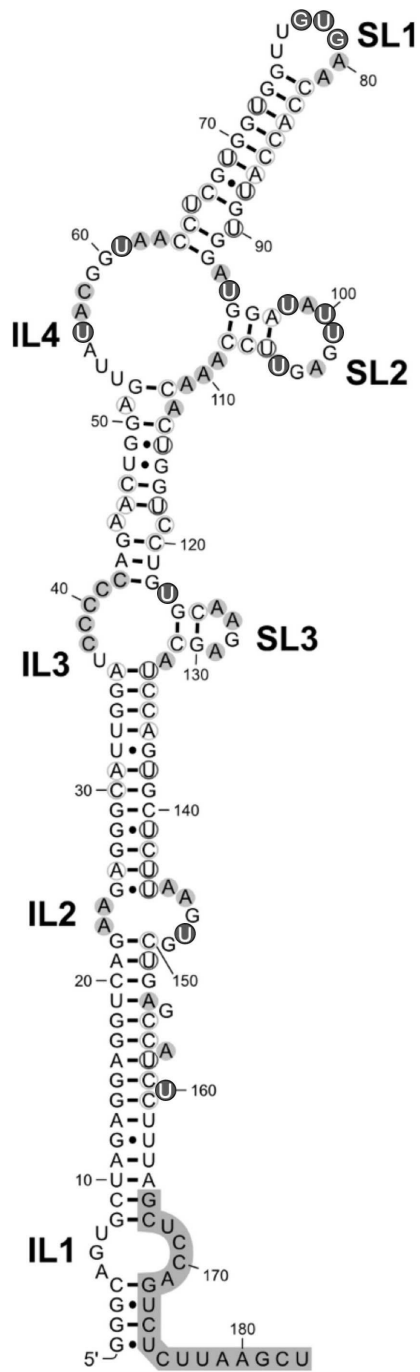
[0301] SINE B2 구조 요소의 확인은 인간에서 증가된 활성 및 잠재적인 효용을 갖는 SINEUP 변이체의 선택 및 설계를 위한 구조-유도 전략을 가능하게 한다. 특히, 더 짧은 SINEUP 변이체는 수많은 이유로 유리하며, 그 중에서도 생체내 전달 및 안정성 때문이다.

도면

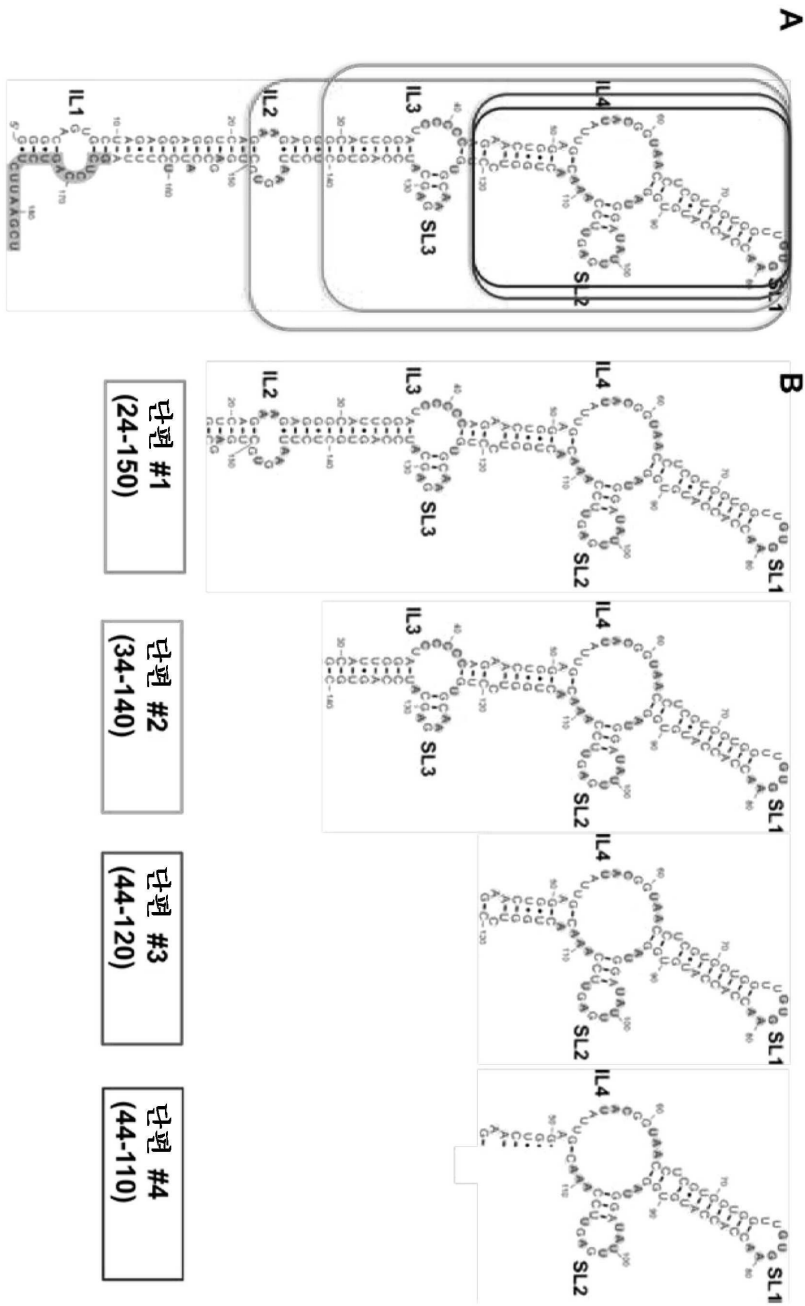
도면1



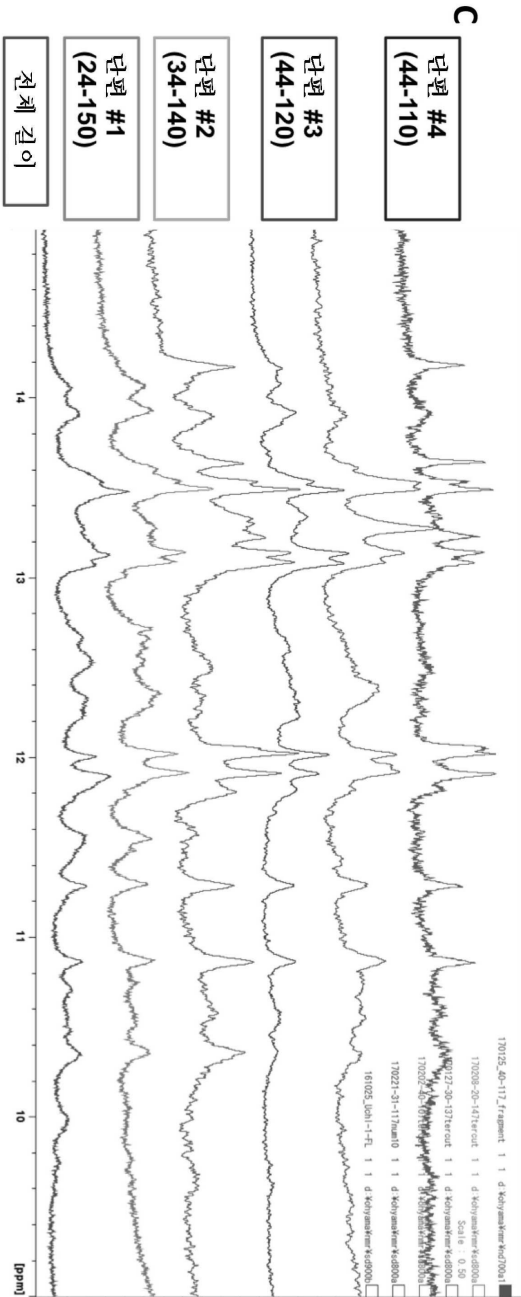
도면2



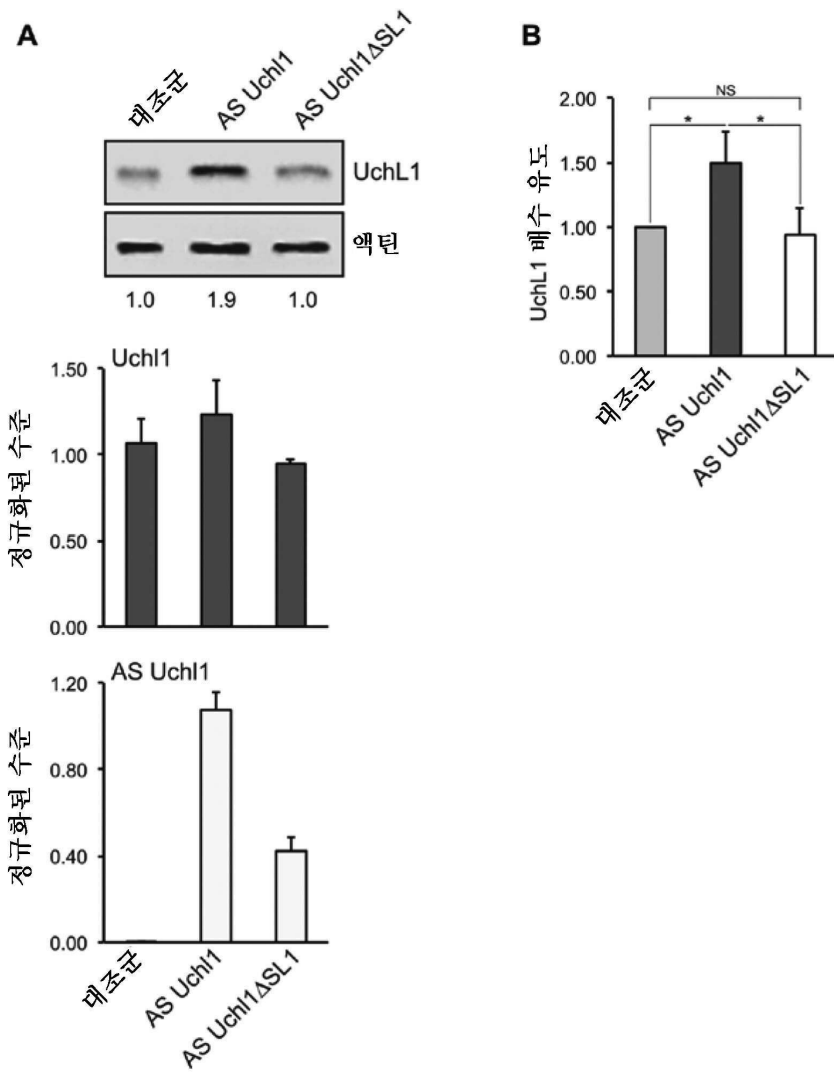
도면3i



도면3ii

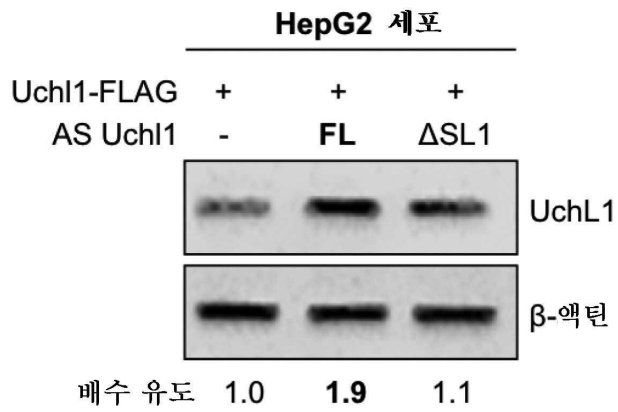


도면4

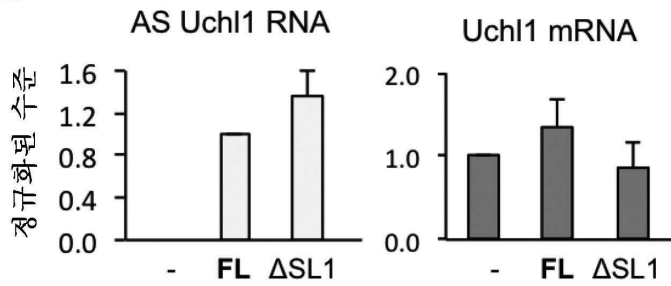


도면5

A



B

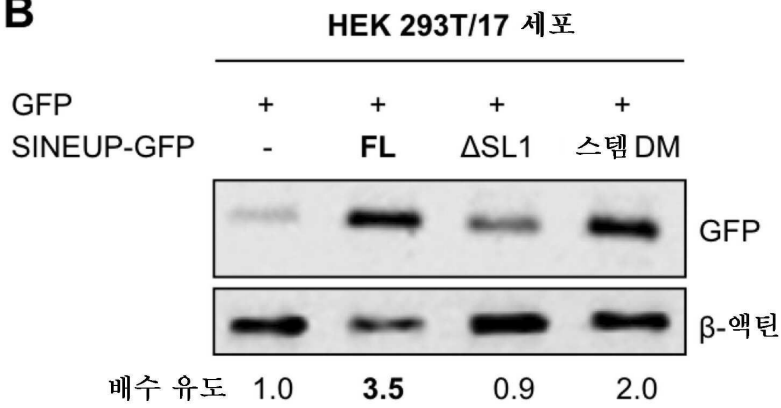


도면6

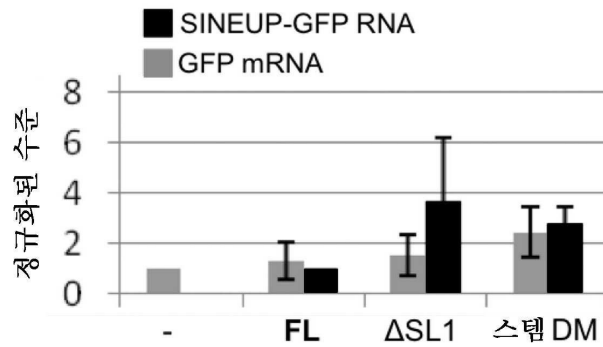
A



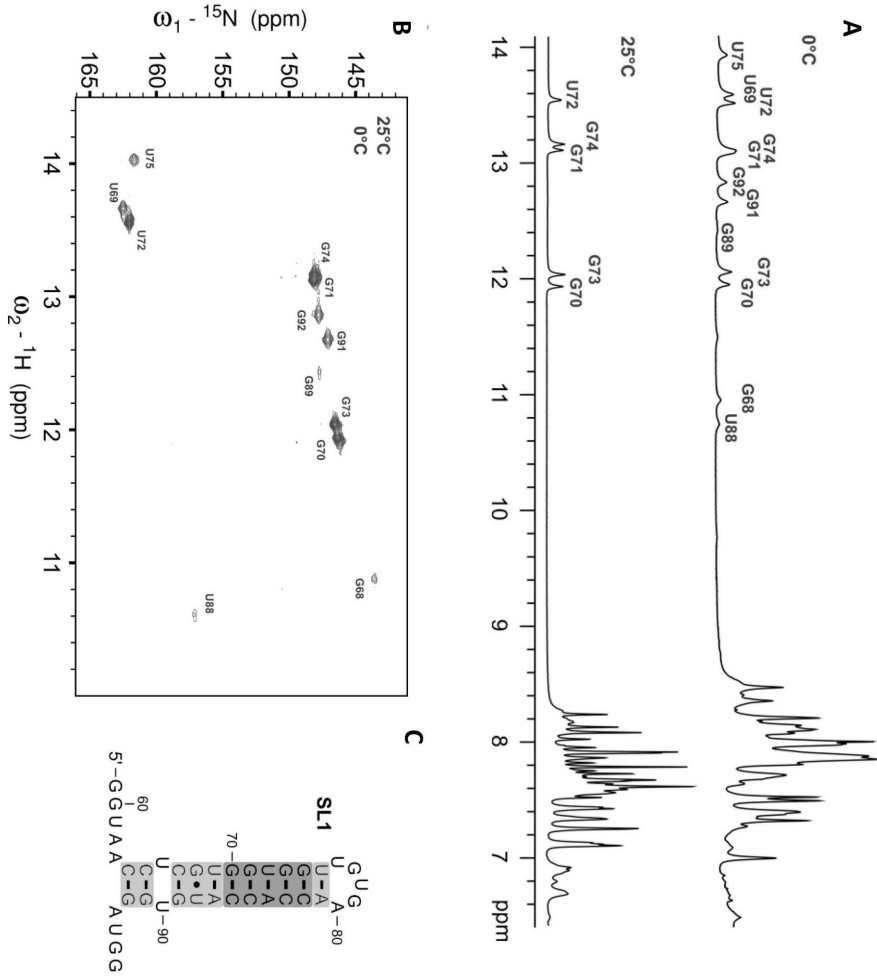
B



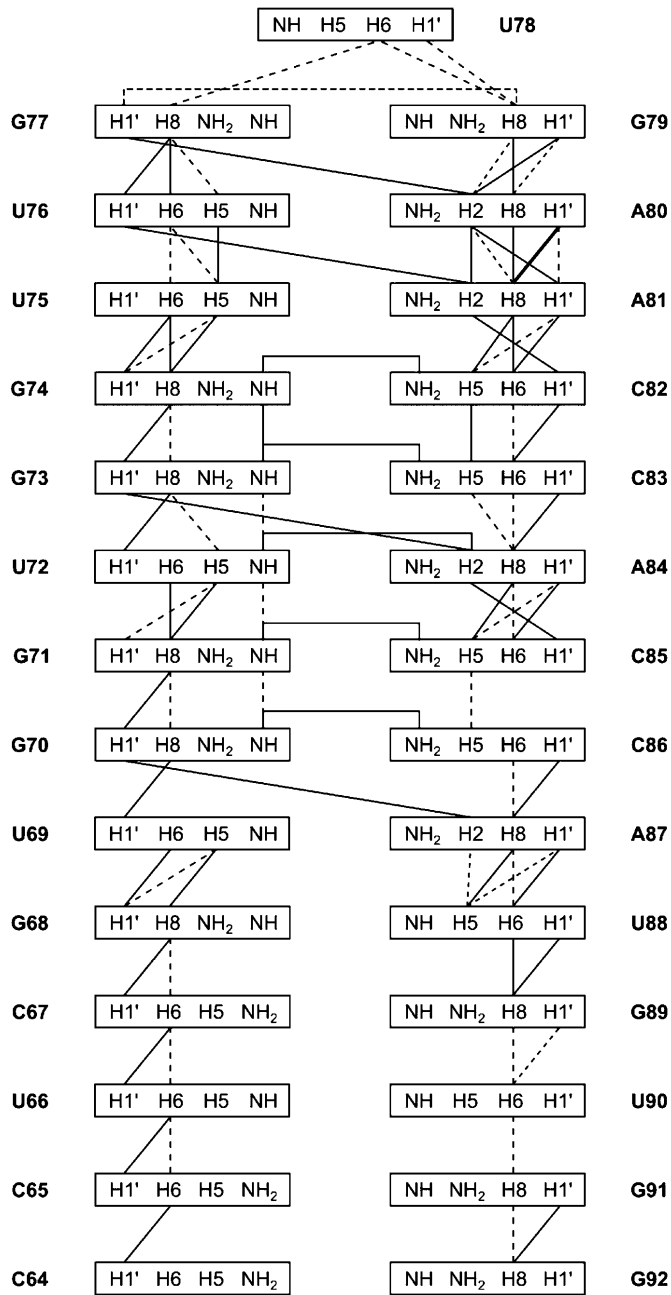
C



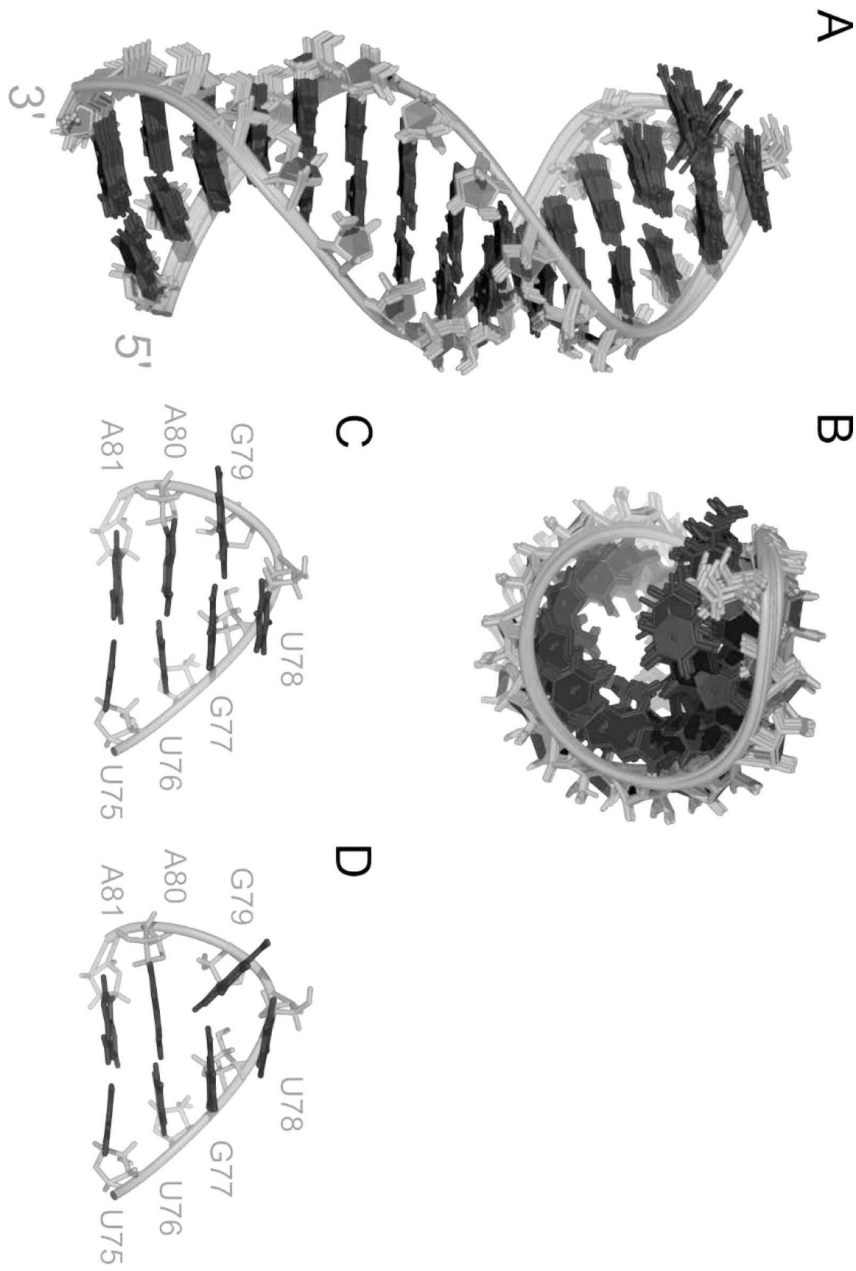
도면7



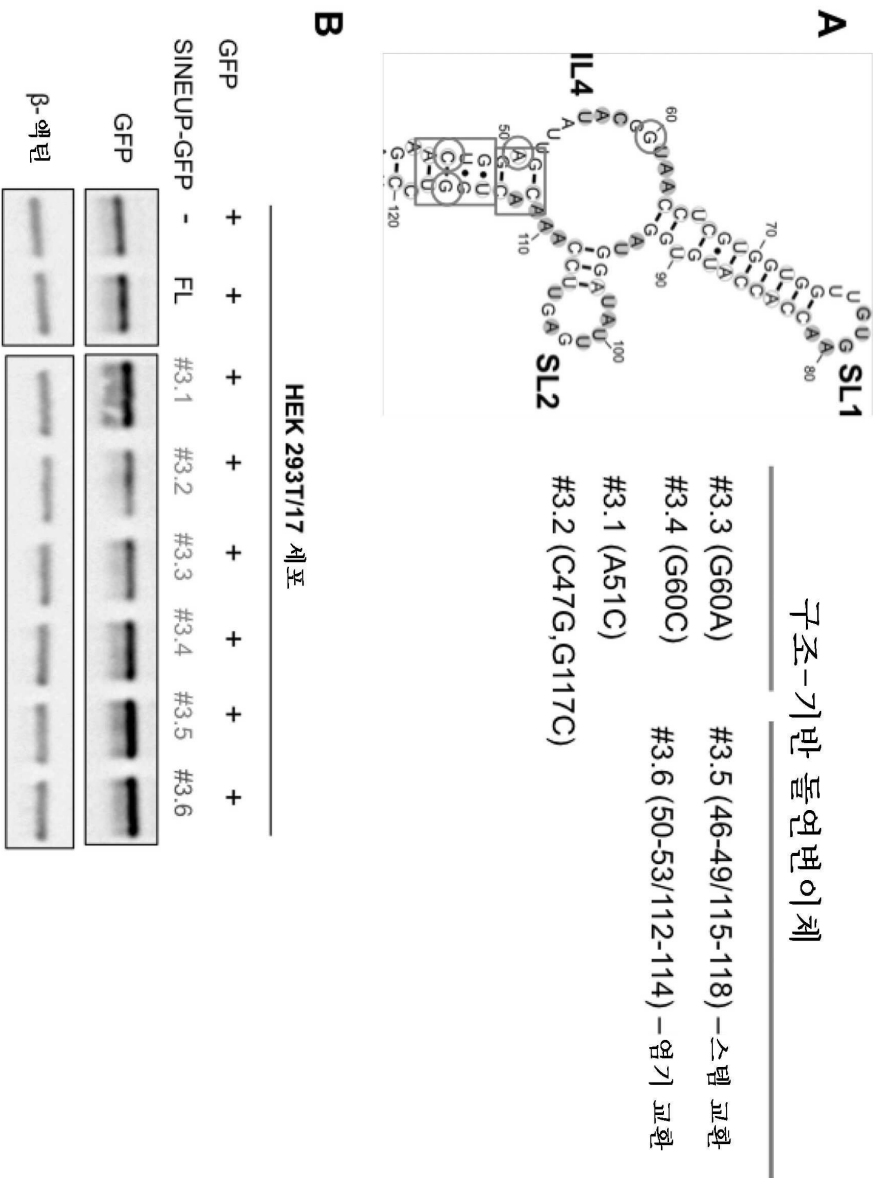
도면9



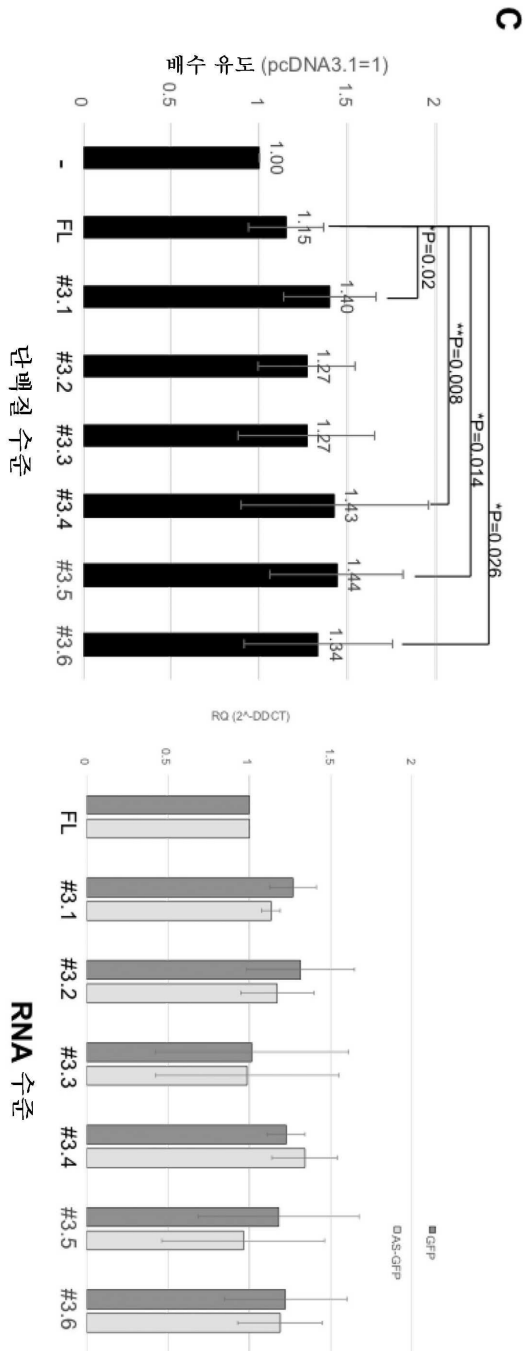
도면10



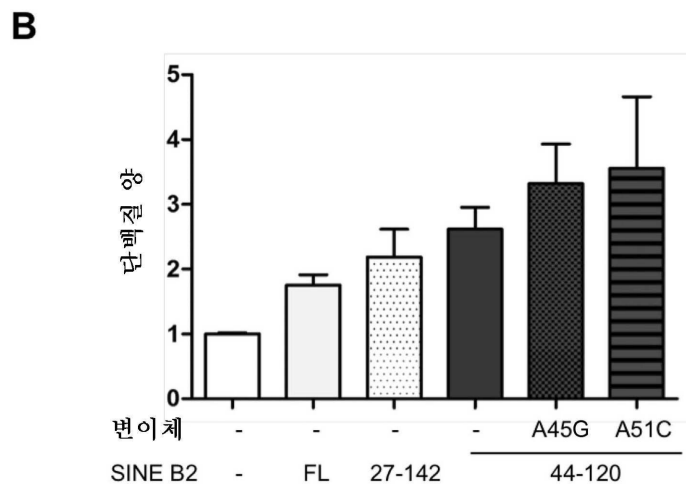
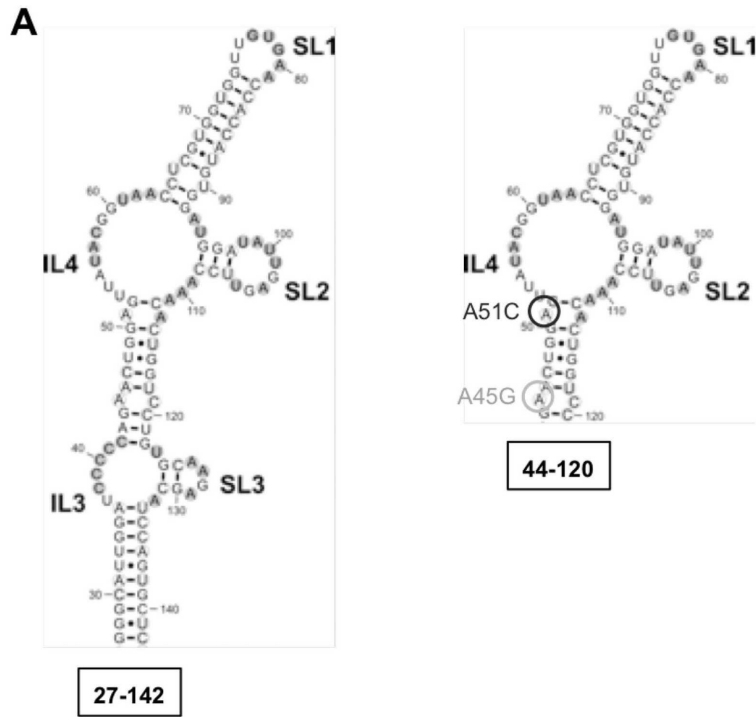
도면12i



도면12ii



도면13

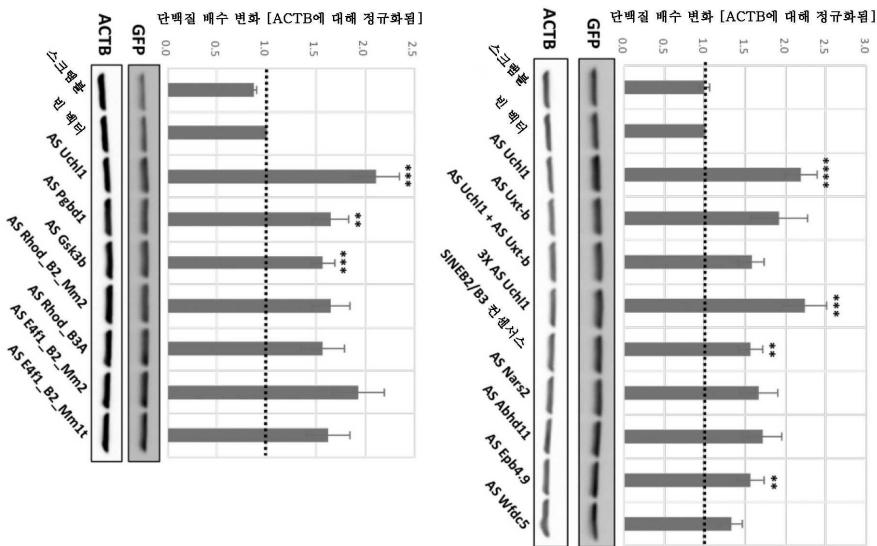


A

S.No.	설명	BD의 크기(bp)
1.	AS Uch11 SINEB2	167
2.	AS Uxt SINEB2-b	187
3.	AS Uch11 SINEB2 + AS Uxt SINEB2-b	357
4.	AS Uch11의 3개 반복부	532
5.	RepBase로부터의 SINEB2/B3 컨센서스 서열	228

S.No.	인터센스 로부터의 SINEB2	배향/반복부 틀라스 또는 케멀리/제형 반복부	BD의 크기(bp)	접근 번호
6.	AS Nar32	C/SINEB2/B3	214	AK032194
7.	AS Abhd11	C/SINEB2/B3	200	AK041742
8.	AS Epb4.9	C/SINEB2/B3	214	AK048309
9.	AS Wfd45	C/SINEB2/B3	205	AK042861
10.	AS Pgd1	C/SINEB2/B3	121	AK034331
11.	AS Gsk3b	C/SINEB2/B3	191	AK145079
12.	AS Rhod	C/SINEB2/B2_Mm2	205	AK044205
13.	AS Rhod	C/SINEB2/B3A	190	AK044205
14.	AS E4f1	C/SINEB2/B2_Mm2	169	AK163105
15.	AS E4f1	C/SINEB2/B2_Mm1t	159	AK163105

B

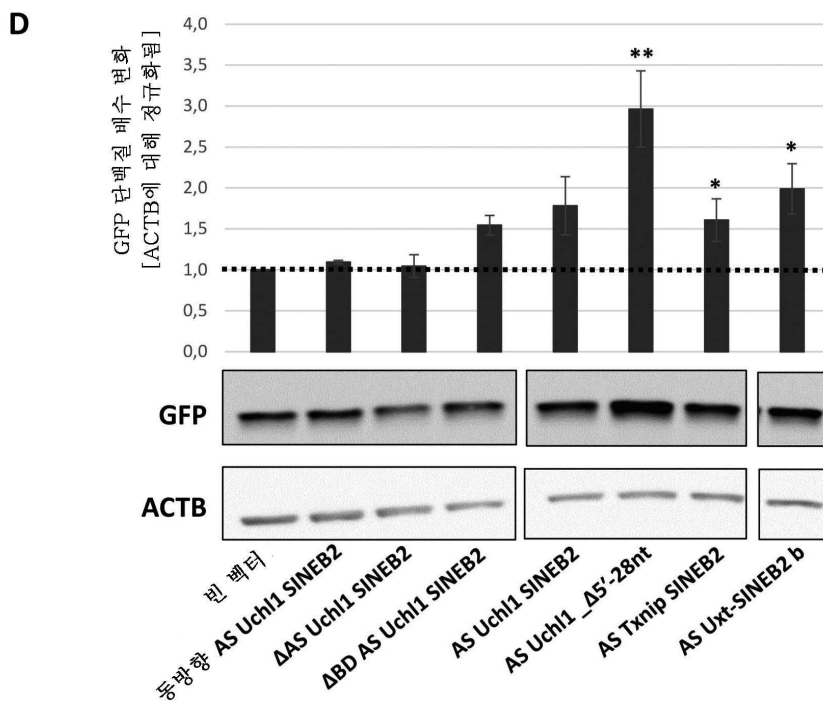


도면14i

도면14ii

C

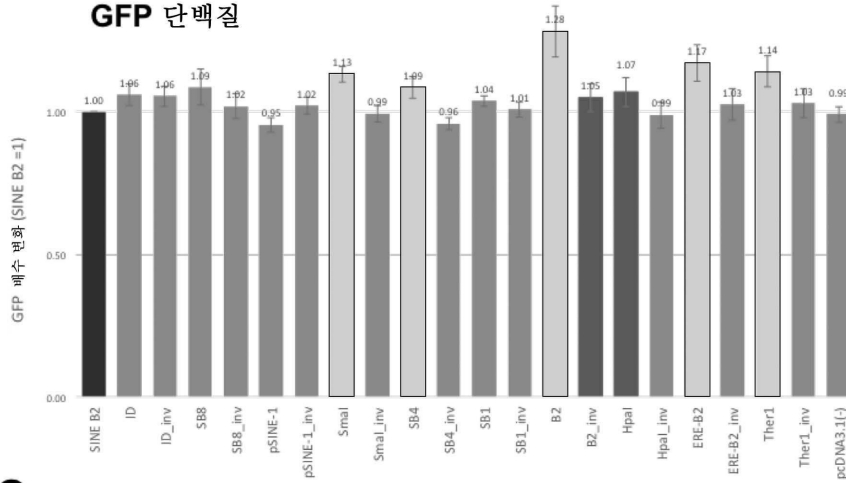
S.No.	안티센스 로부터의 SINEB2	배향/반복부 클래스 또는 패밀리/매칭 반복부	SINE의 길이 (bp)	접근 번호
1.	Uchl1	C/SINEB2/B3	167	AK078321
2.	Uxt	C/SINEB2/B3	SINEB2 b- 187	AK029359
3.	Txnip	C/SINEB2/B3	107	AK143784



도면16ii

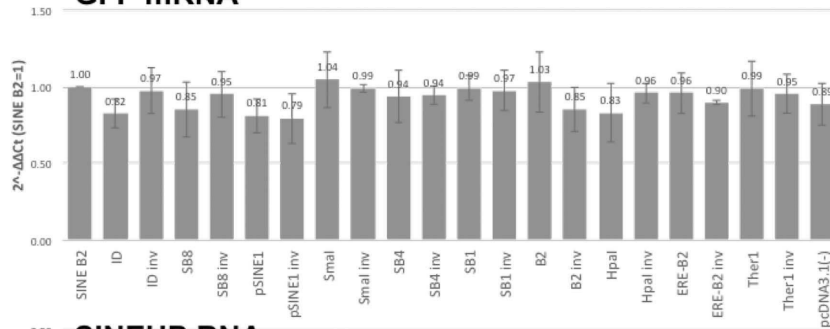
B

GFP 단백질

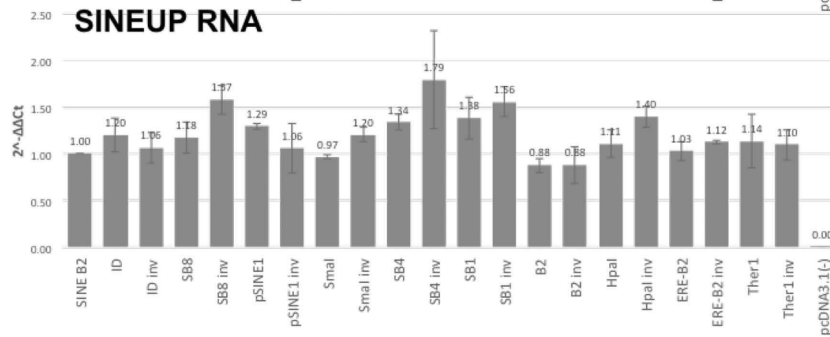


C

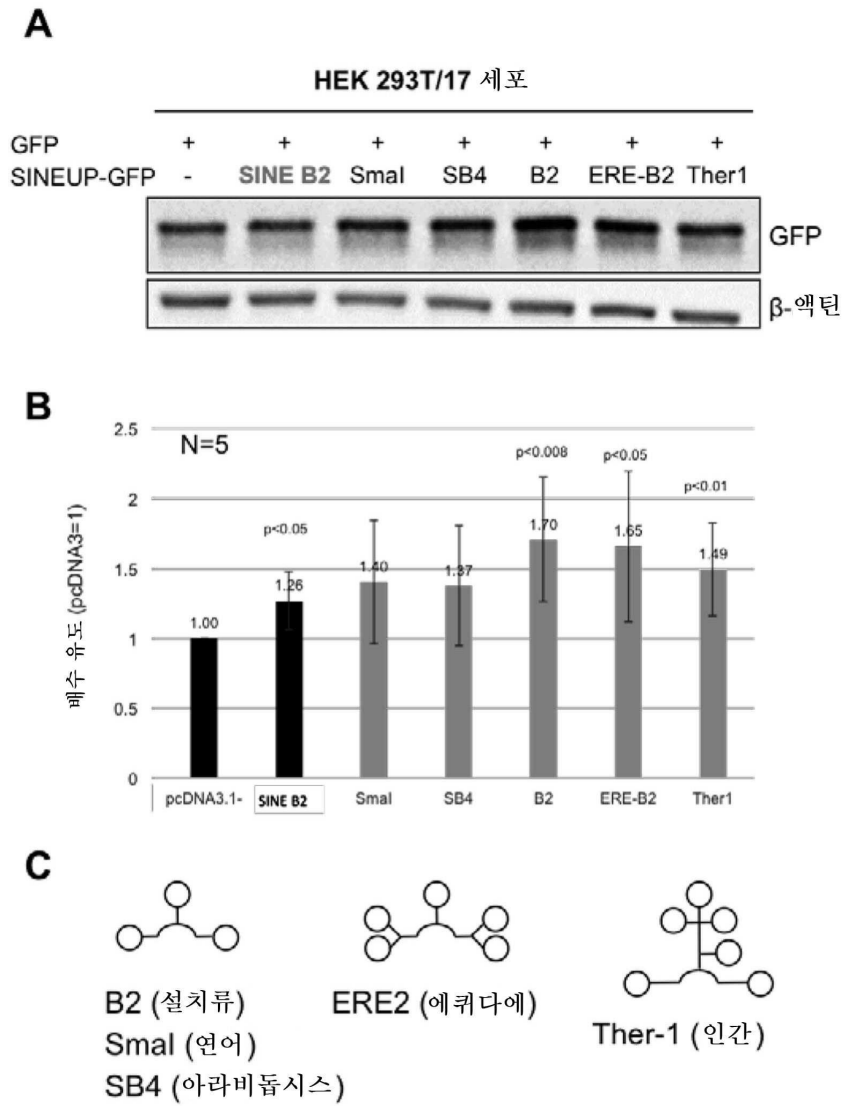
GFP mRNA



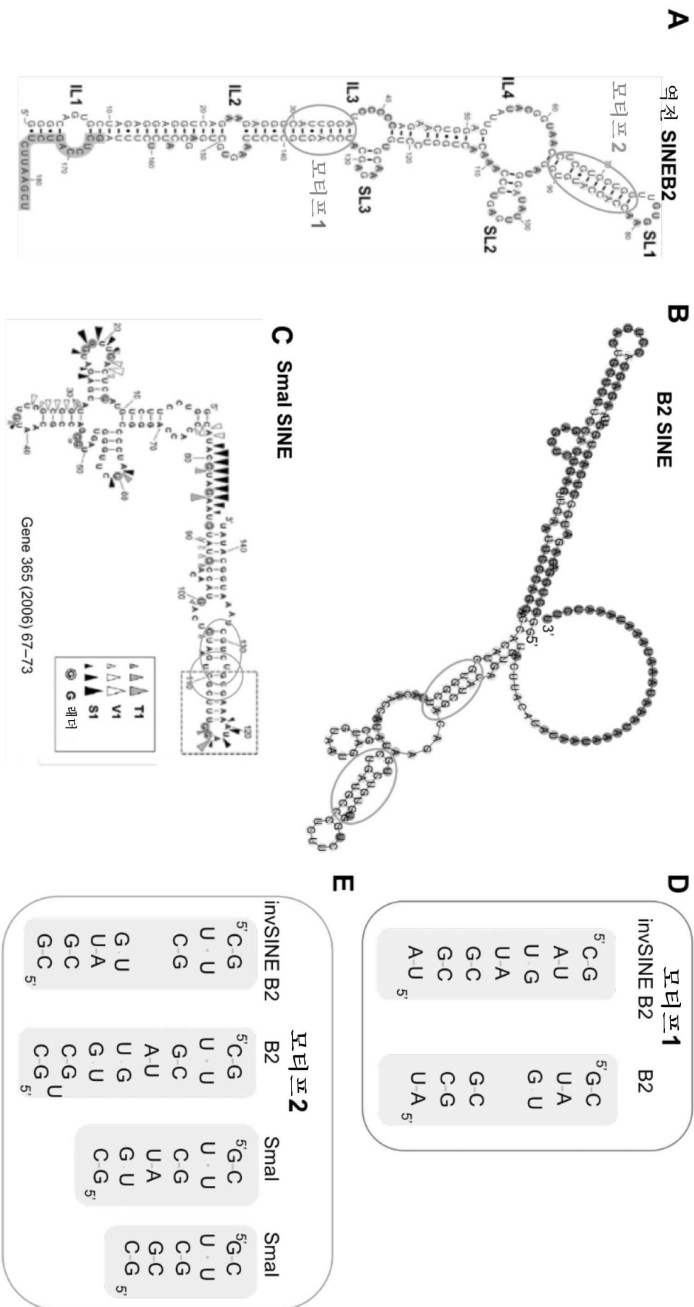
SINEUP RNA



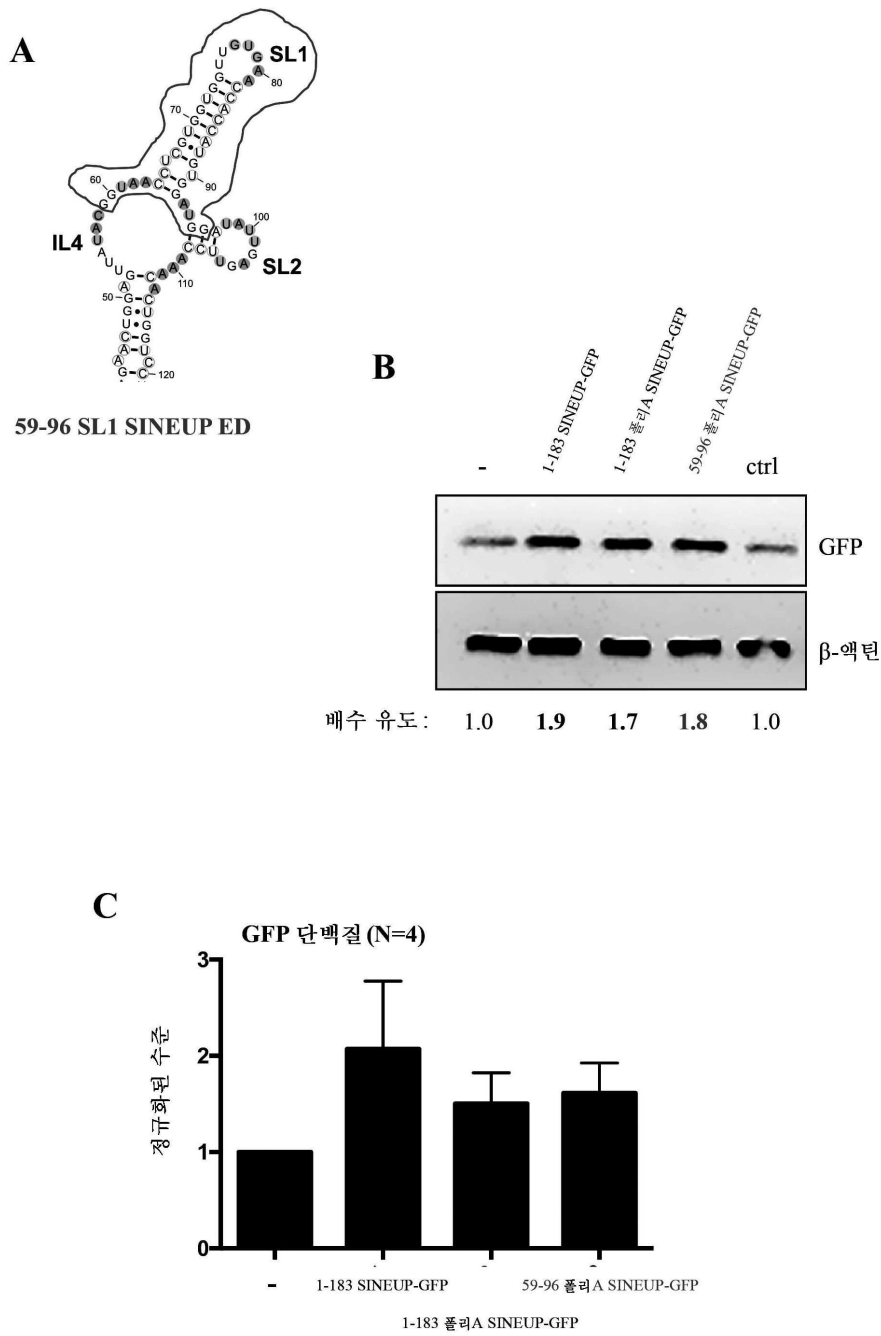
도면17



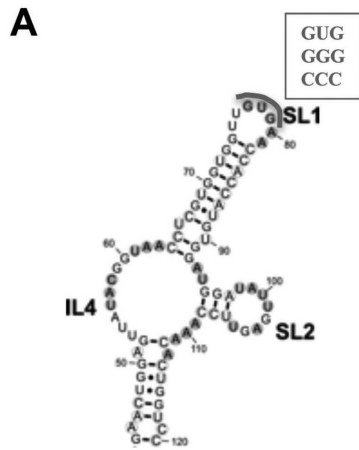
도면18



도면19



도면20



음성 대조군 : GFP o/l (ED 없음)
 양성 대조군 : SINEUP-GFP

44-120 SINEUP-GFP:

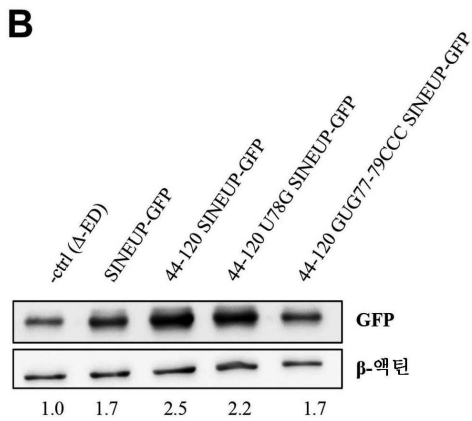
BD GFP -40/+4
 ED invB2(44-120) (wt: 77-79 GUG)

44-120 U78G SINEUP-GFP:

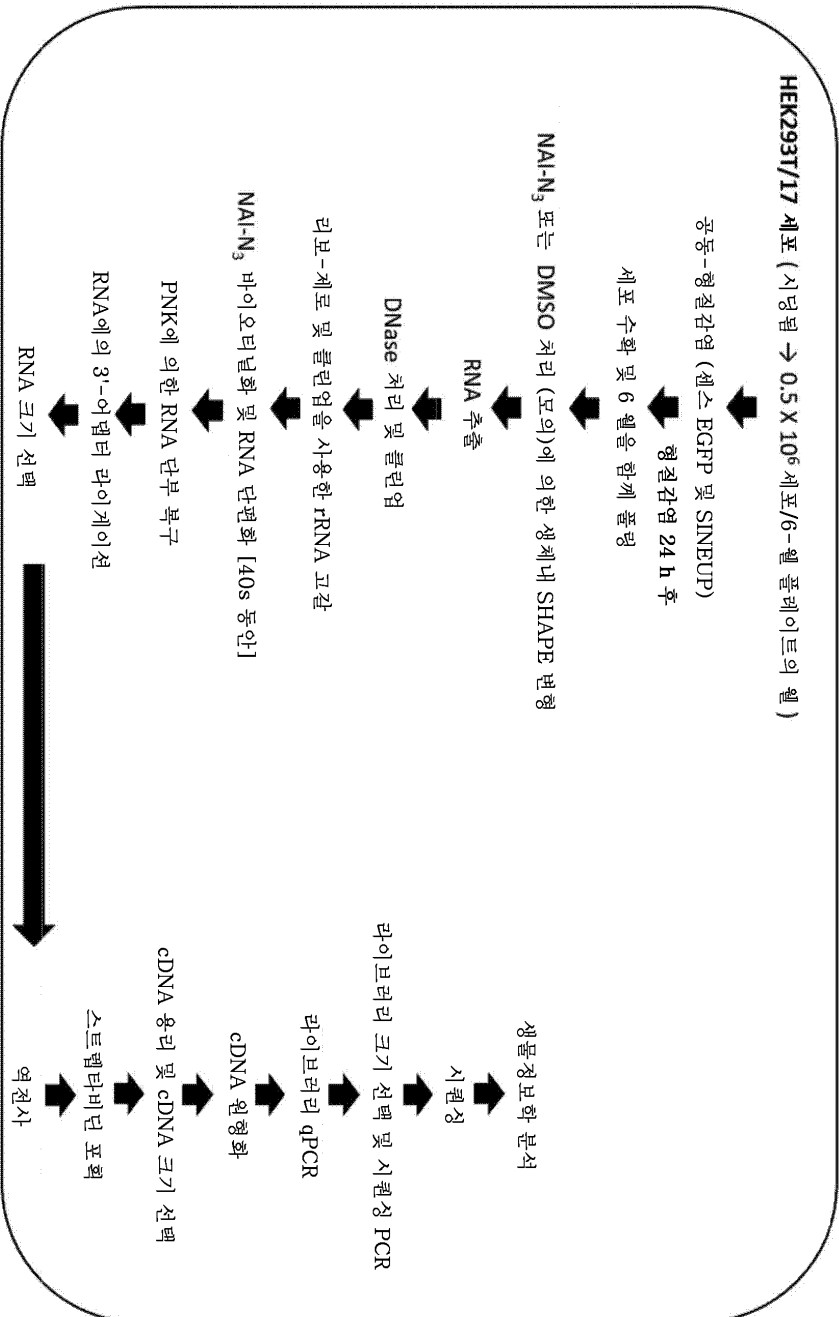
BD GFP -40/+4
 ED invB2(44-120) (U78G)

44-120 GUG77-79CCC SINEUP-GFP:

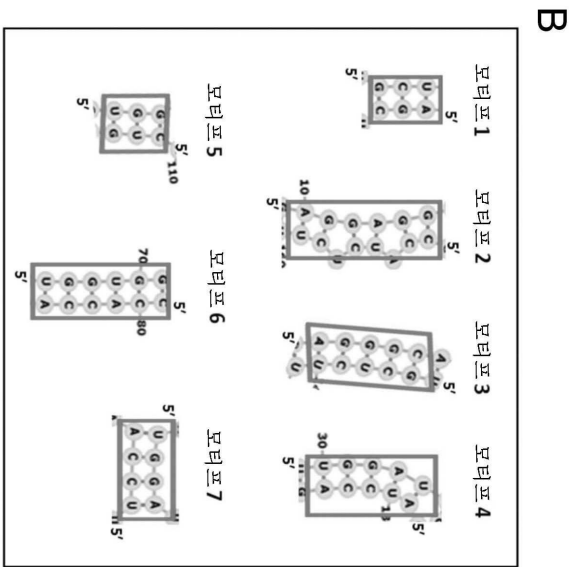
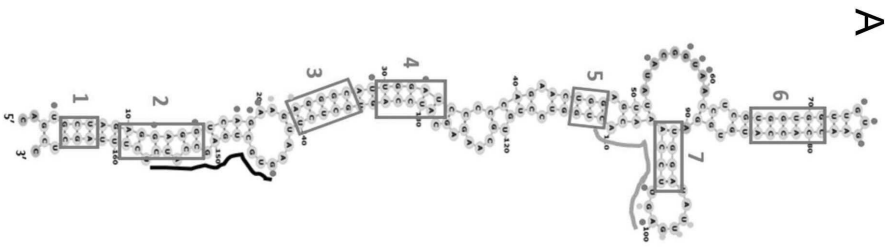
BD GFP -40/+4
 ED invB2(44-120) (GUG77-79CCC)



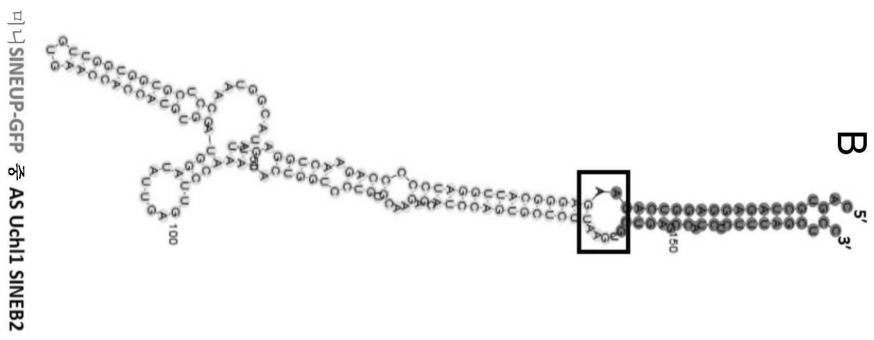
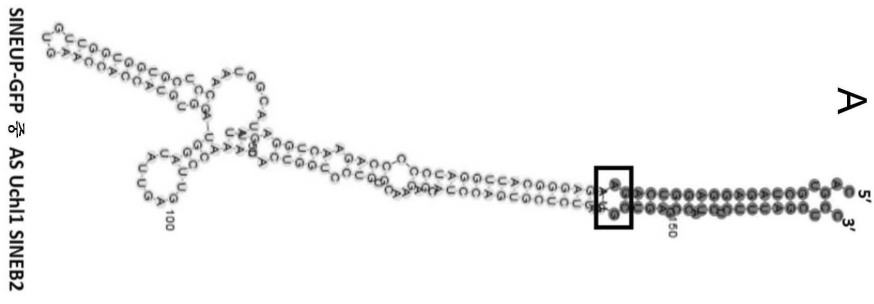
도면22



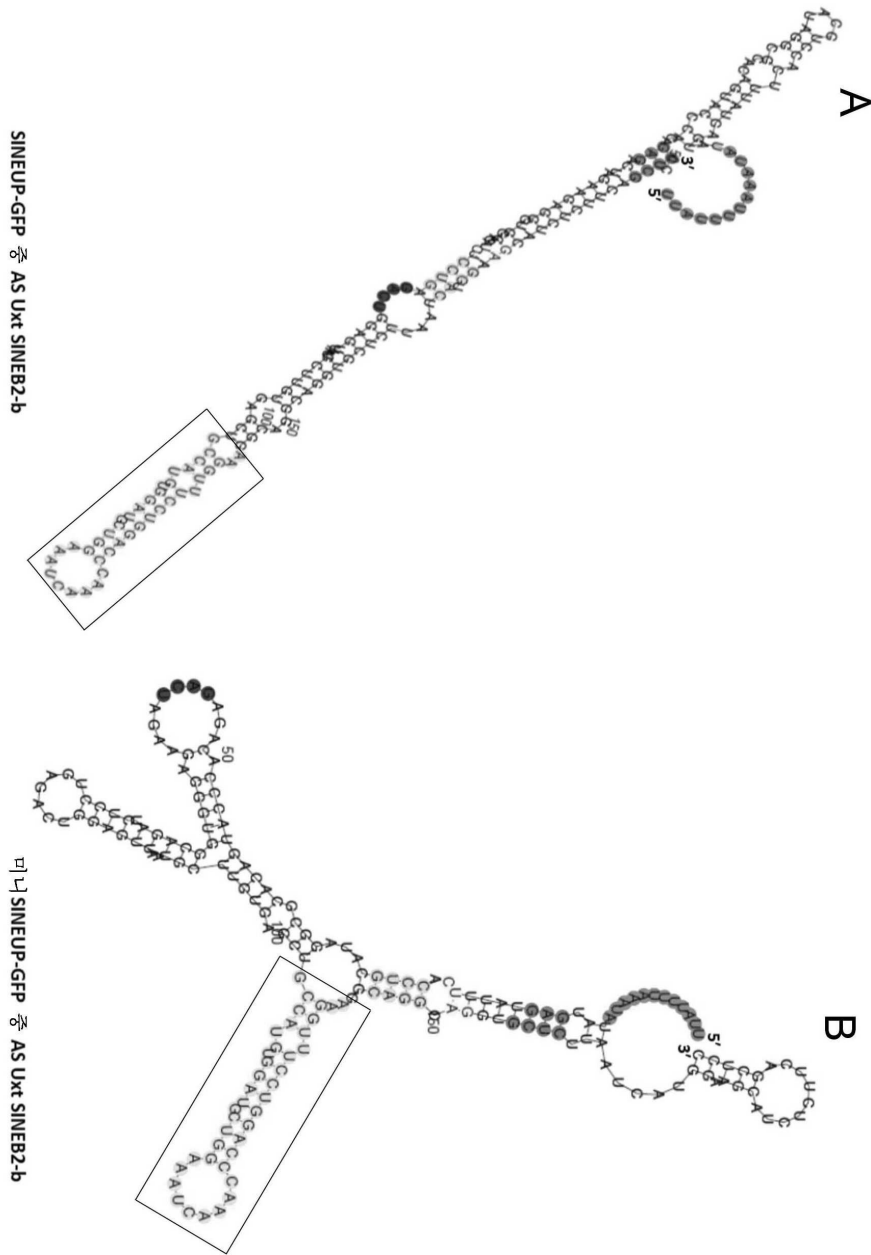
도면23



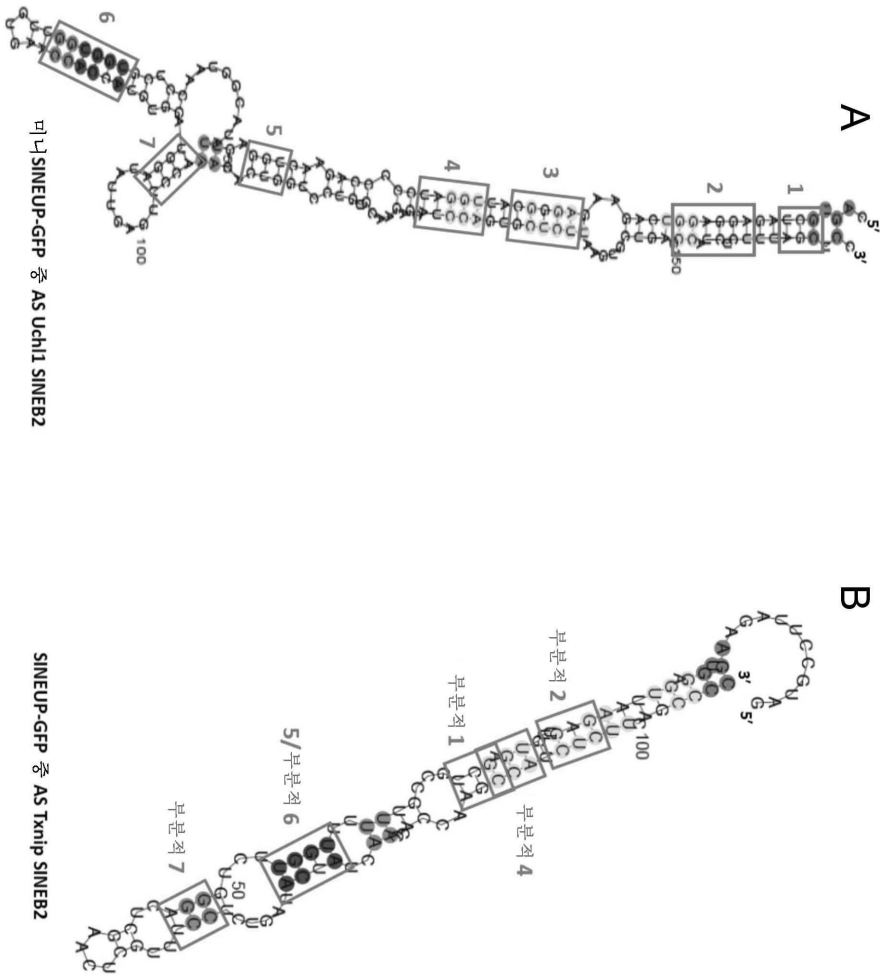
도면24



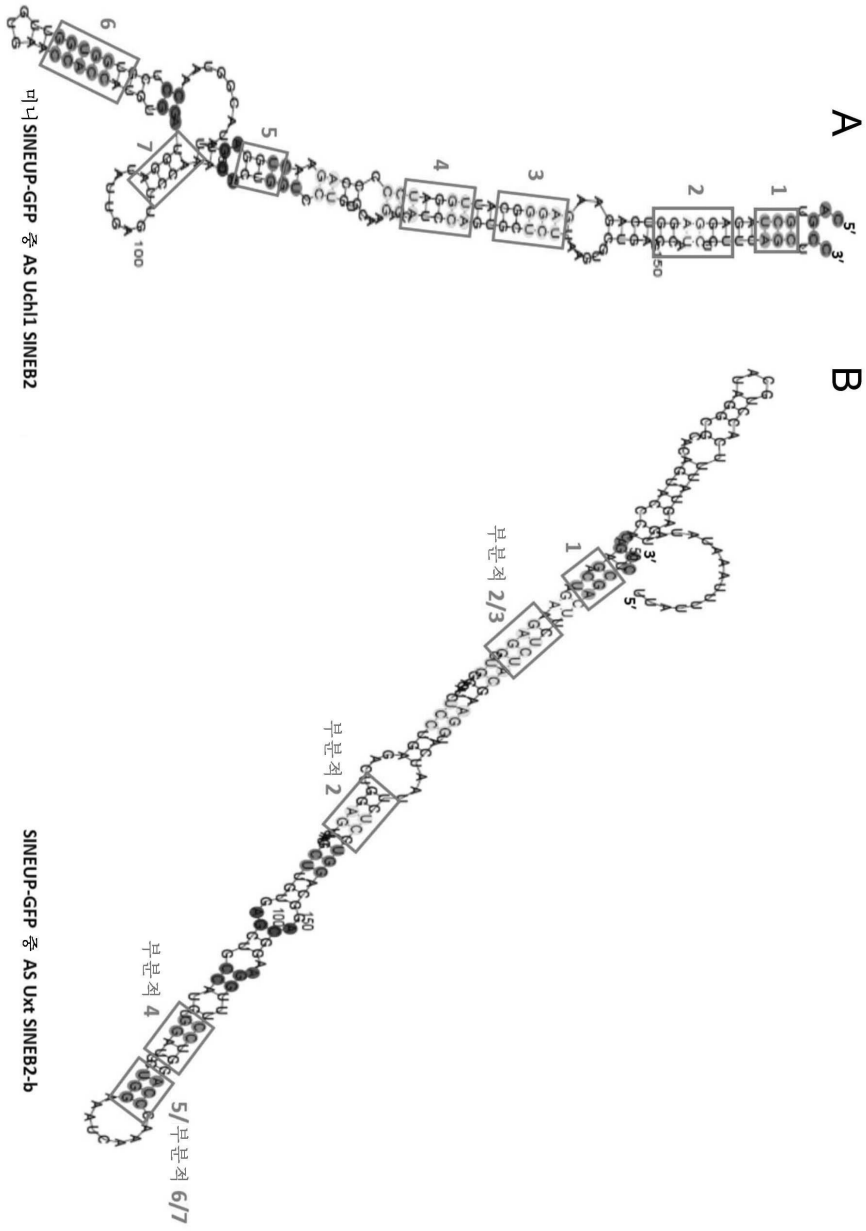
도면25



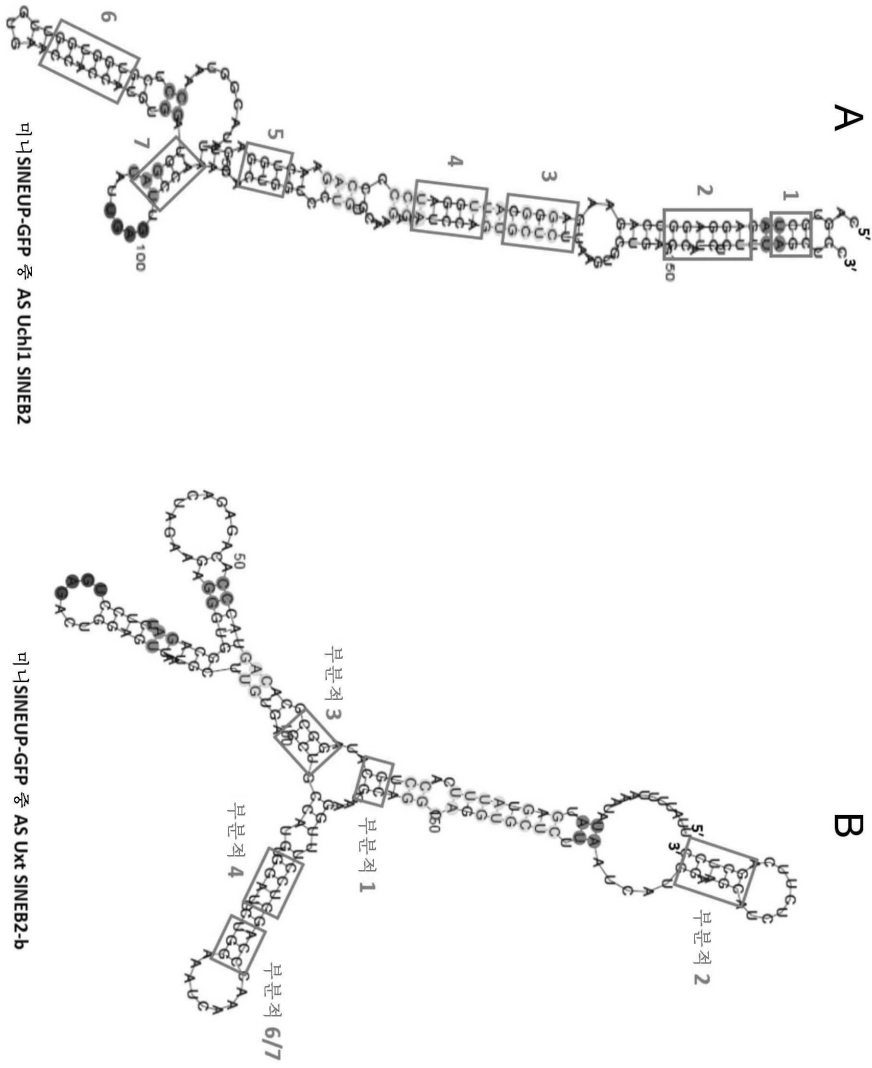
도면26



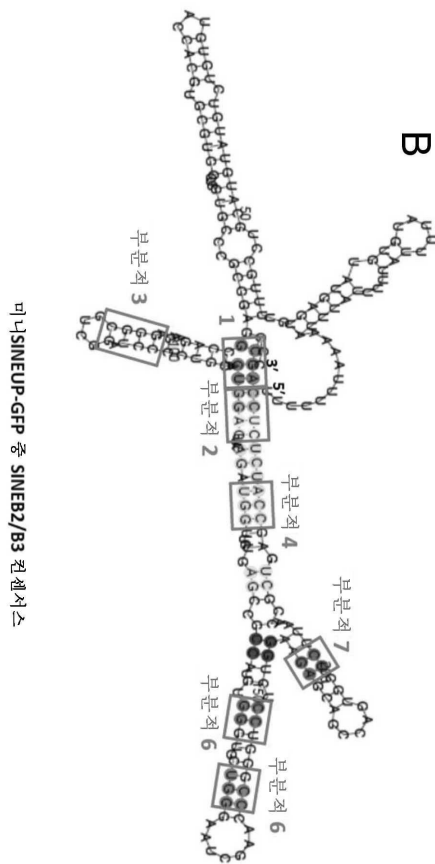
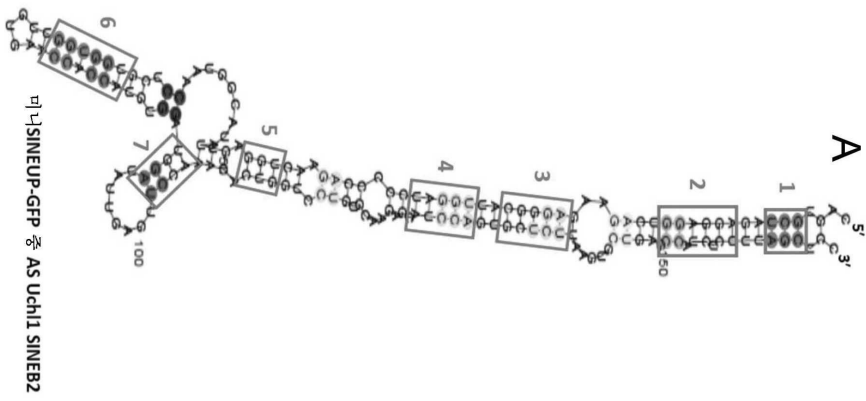
도면27



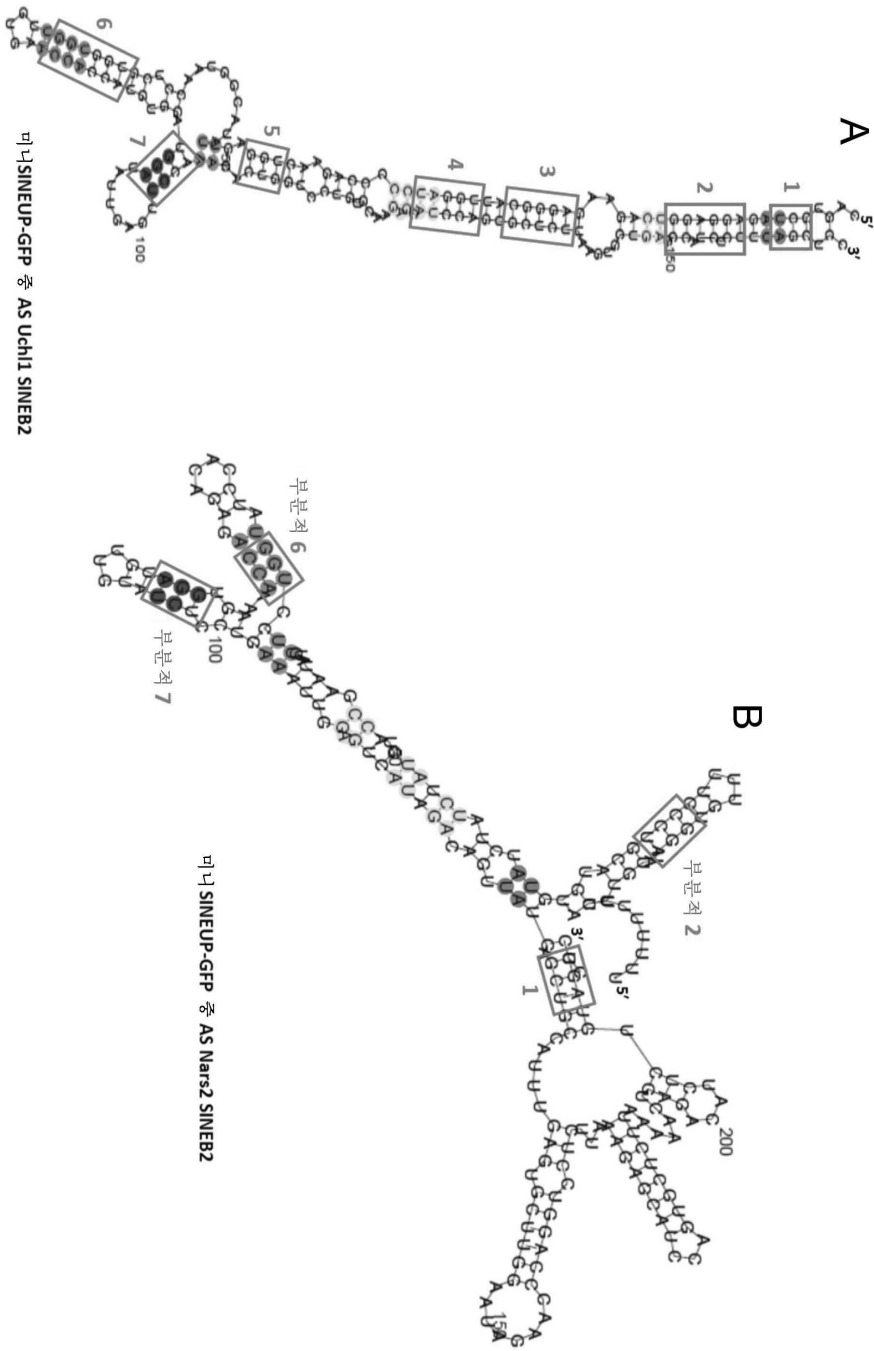
도면28



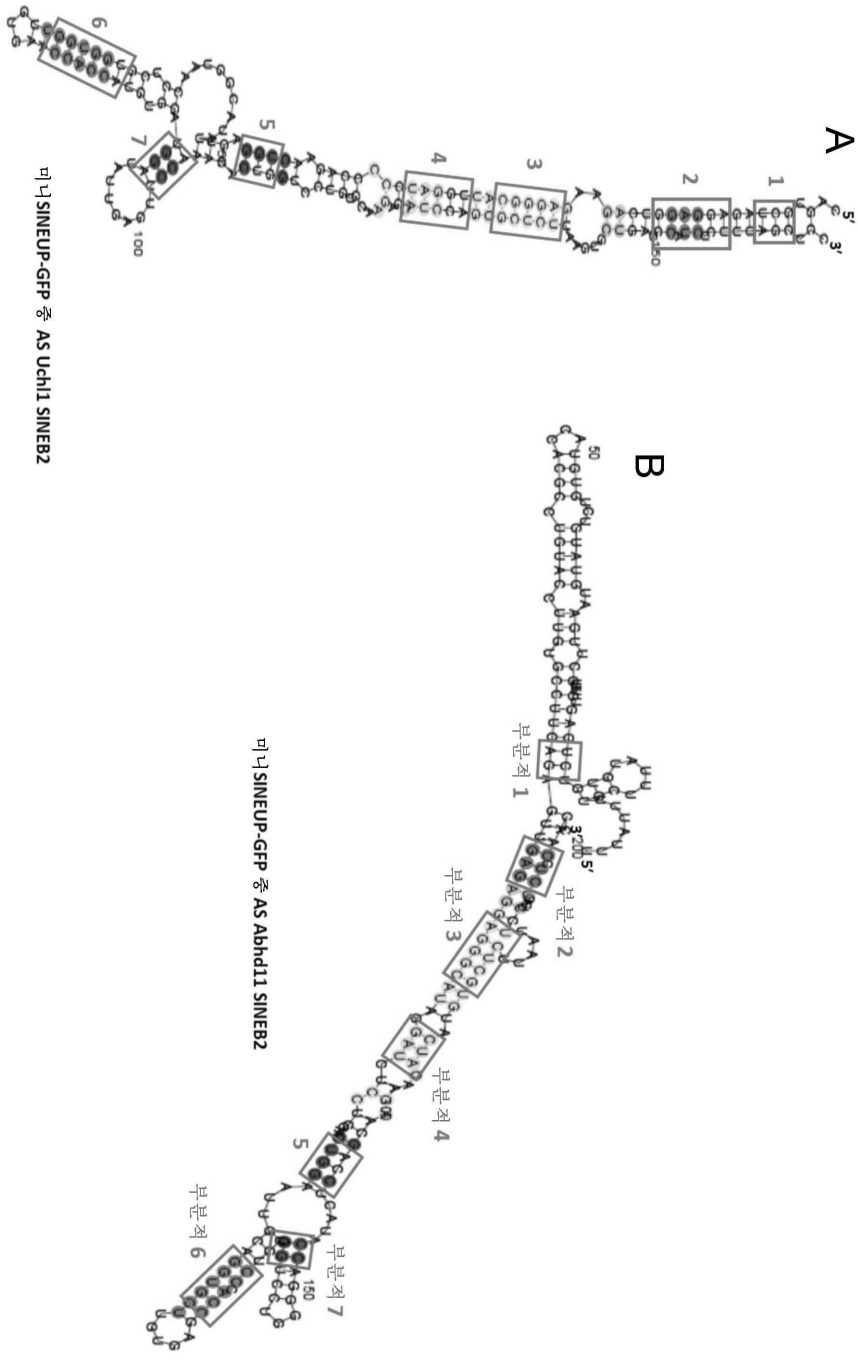
도면29



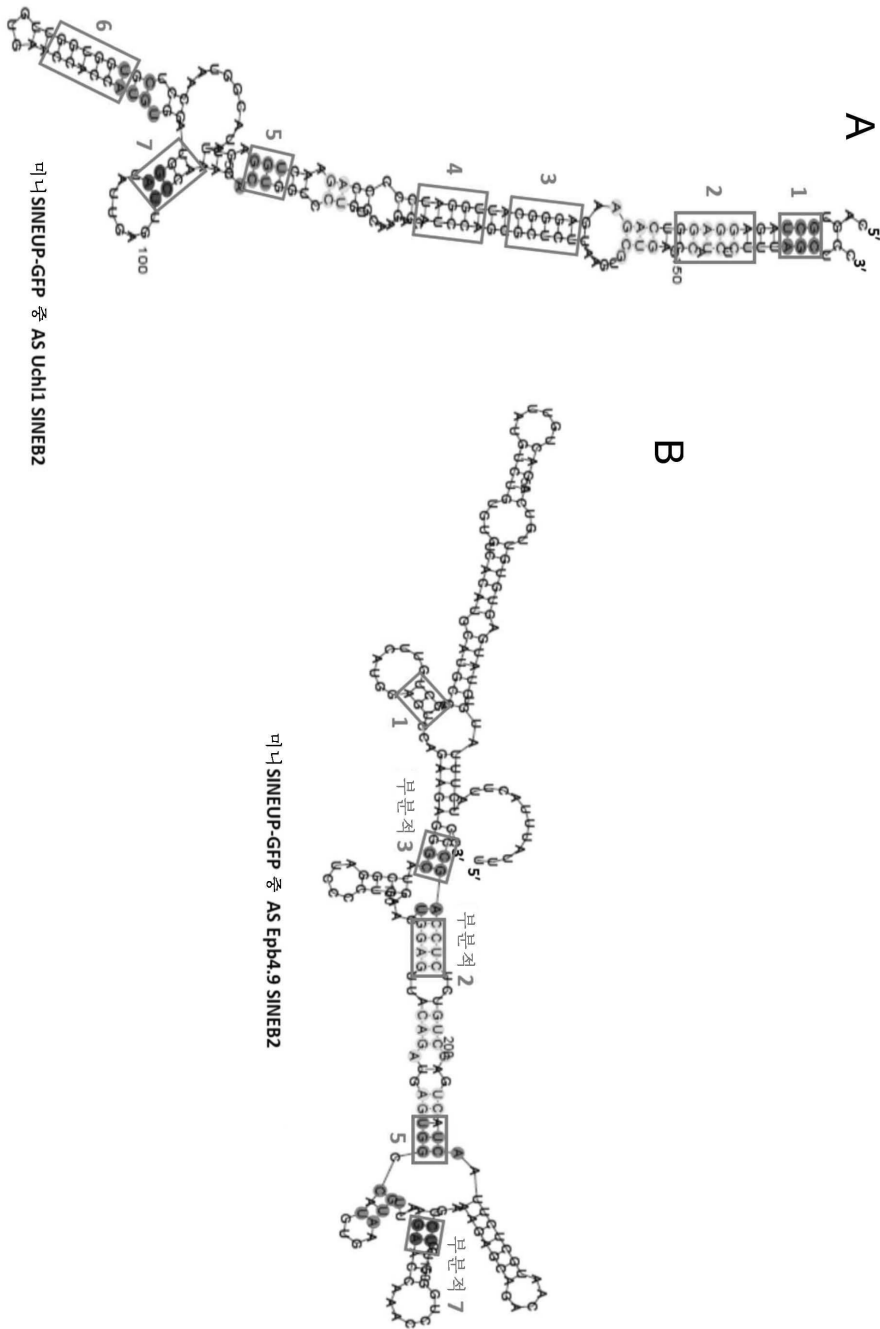
도면30



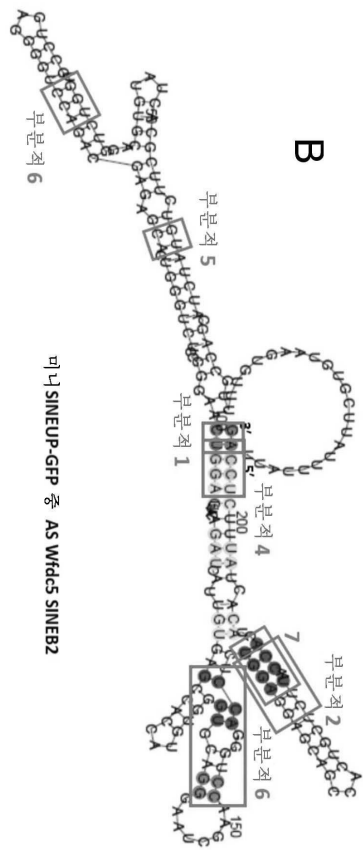
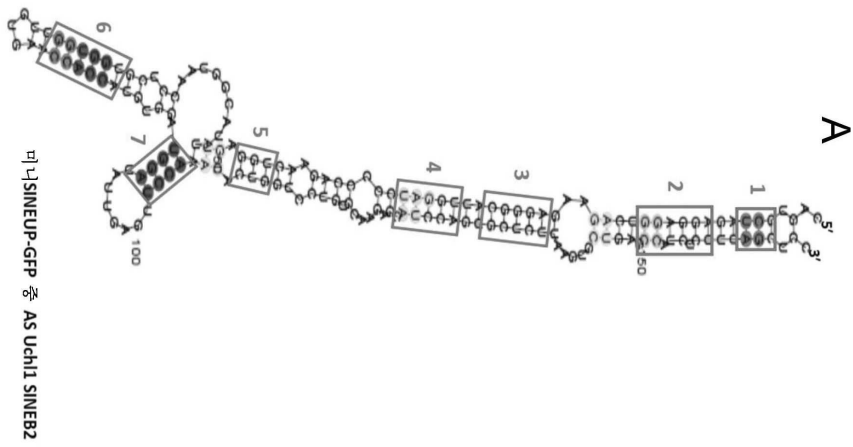
도면31



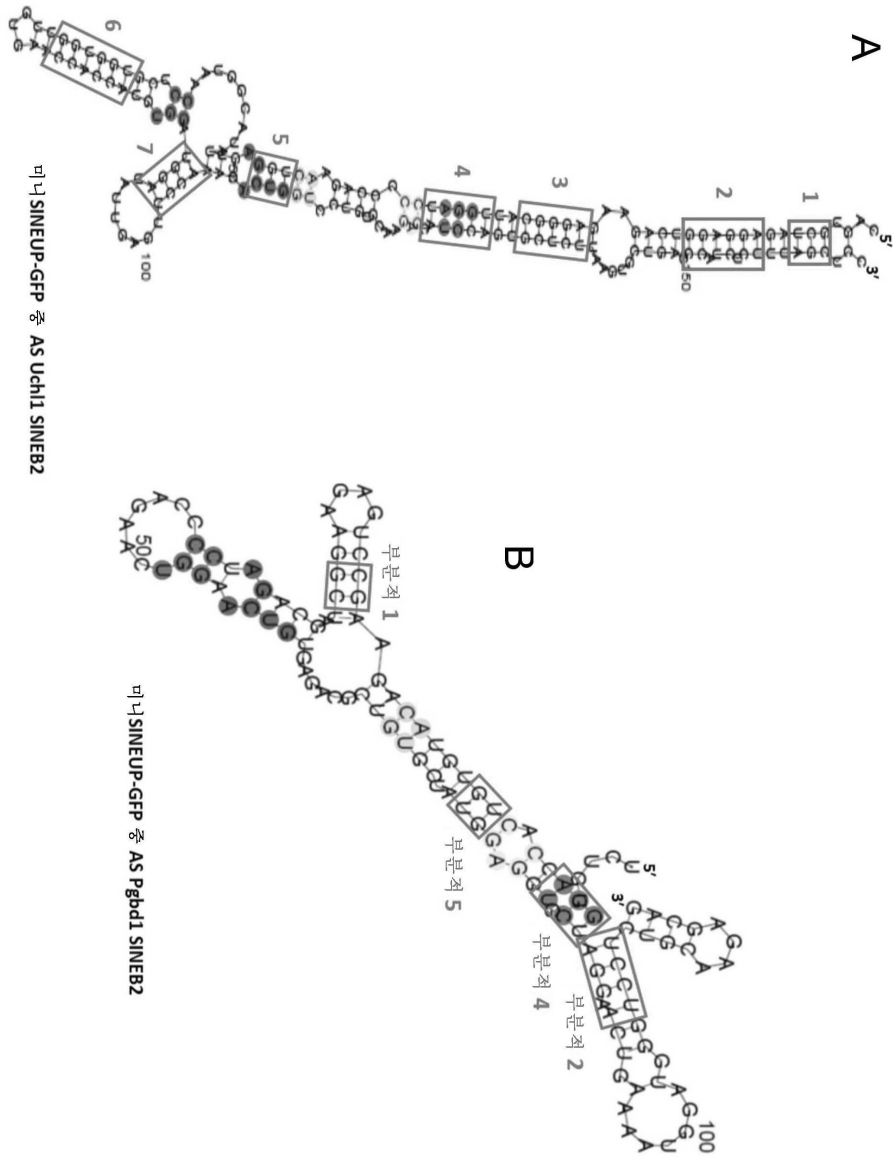
도면32



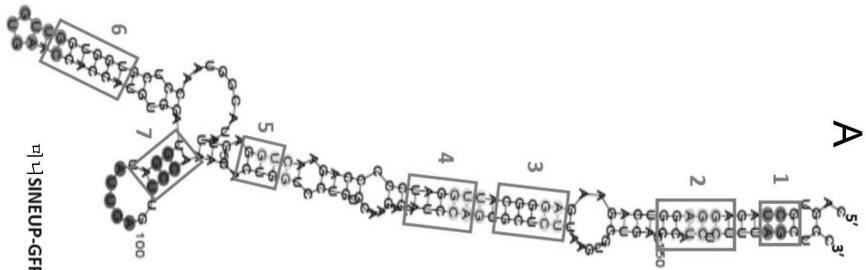
도면33



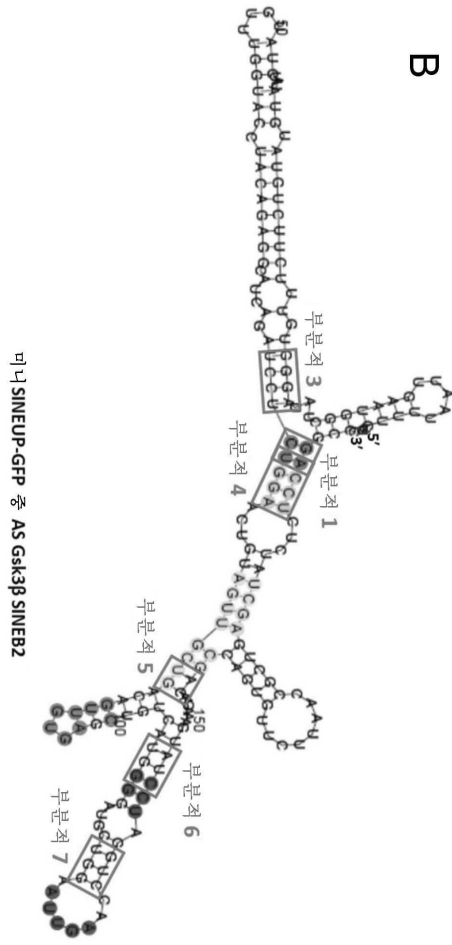
도면34



도면35

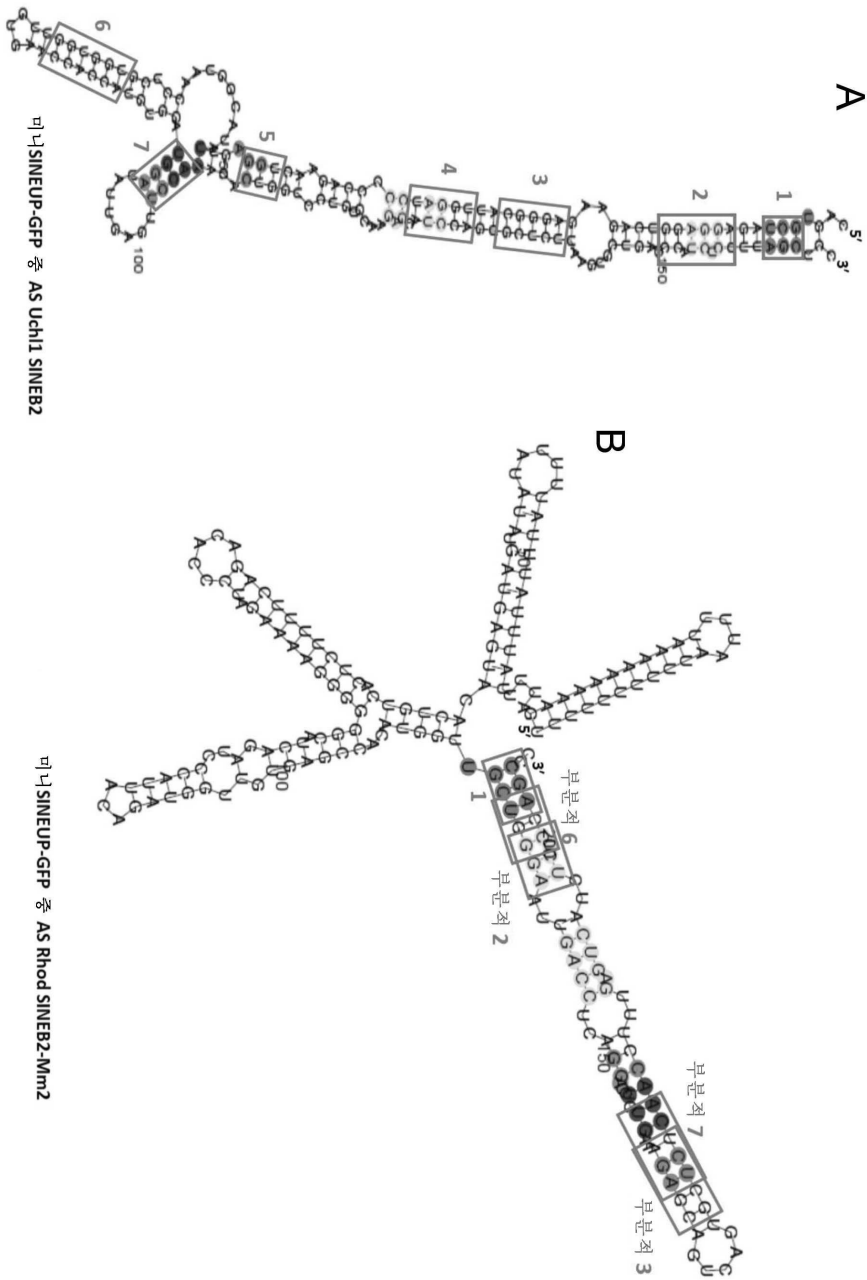


미나 SINEUP-GFP 중 AS Uchl1 SINEB2

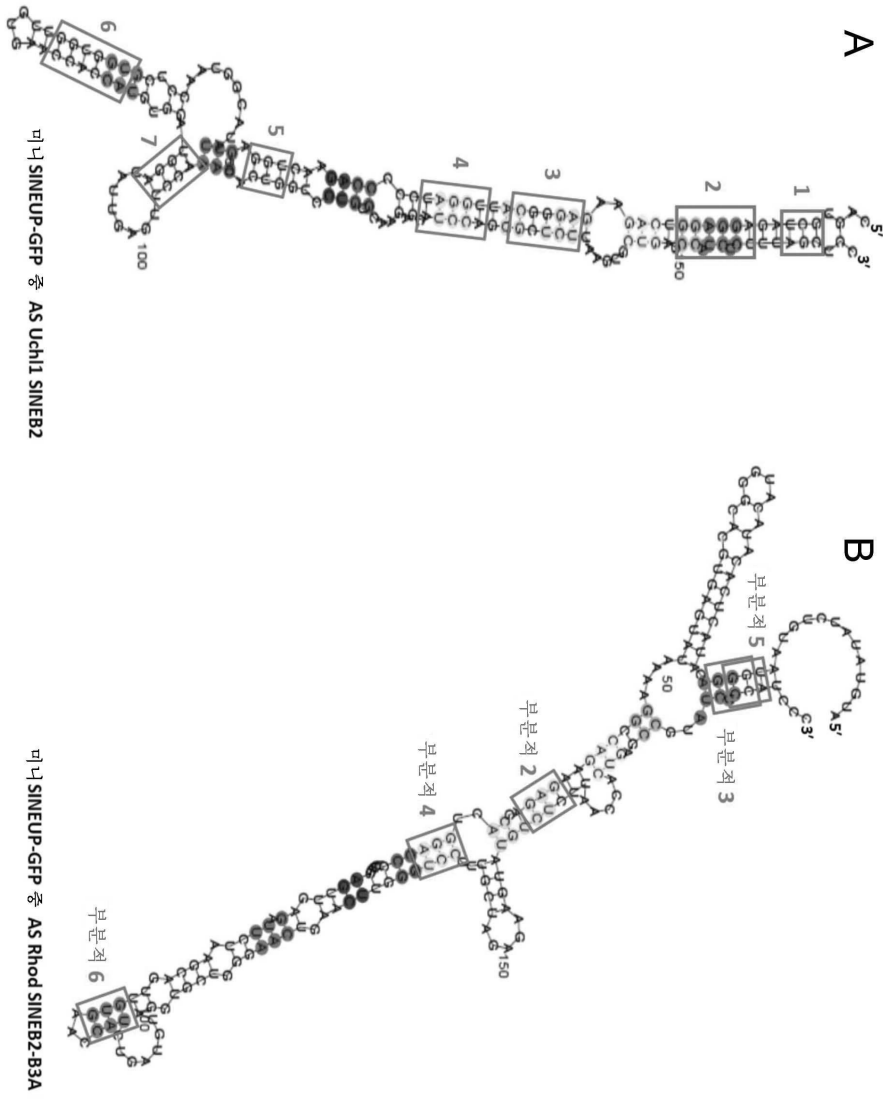


미나 SINEUP-GFP 중 AS Gsk3β SINEB2

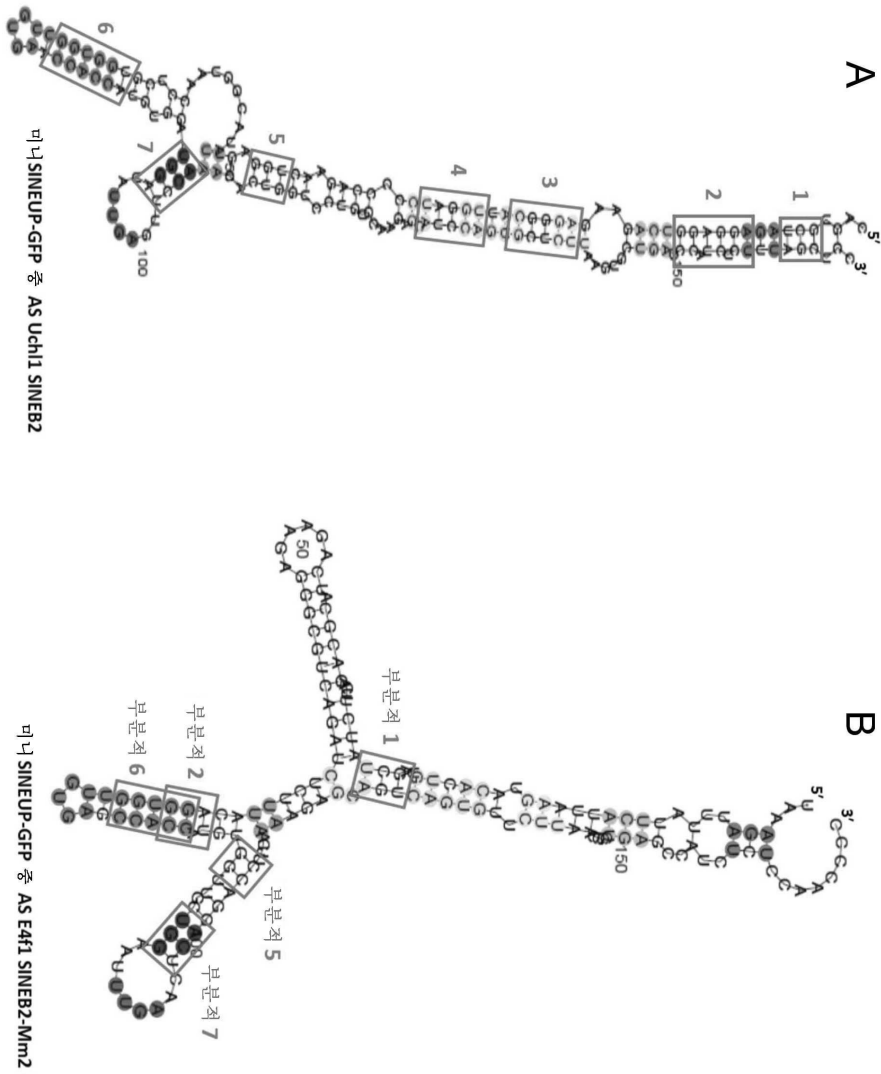
도면36



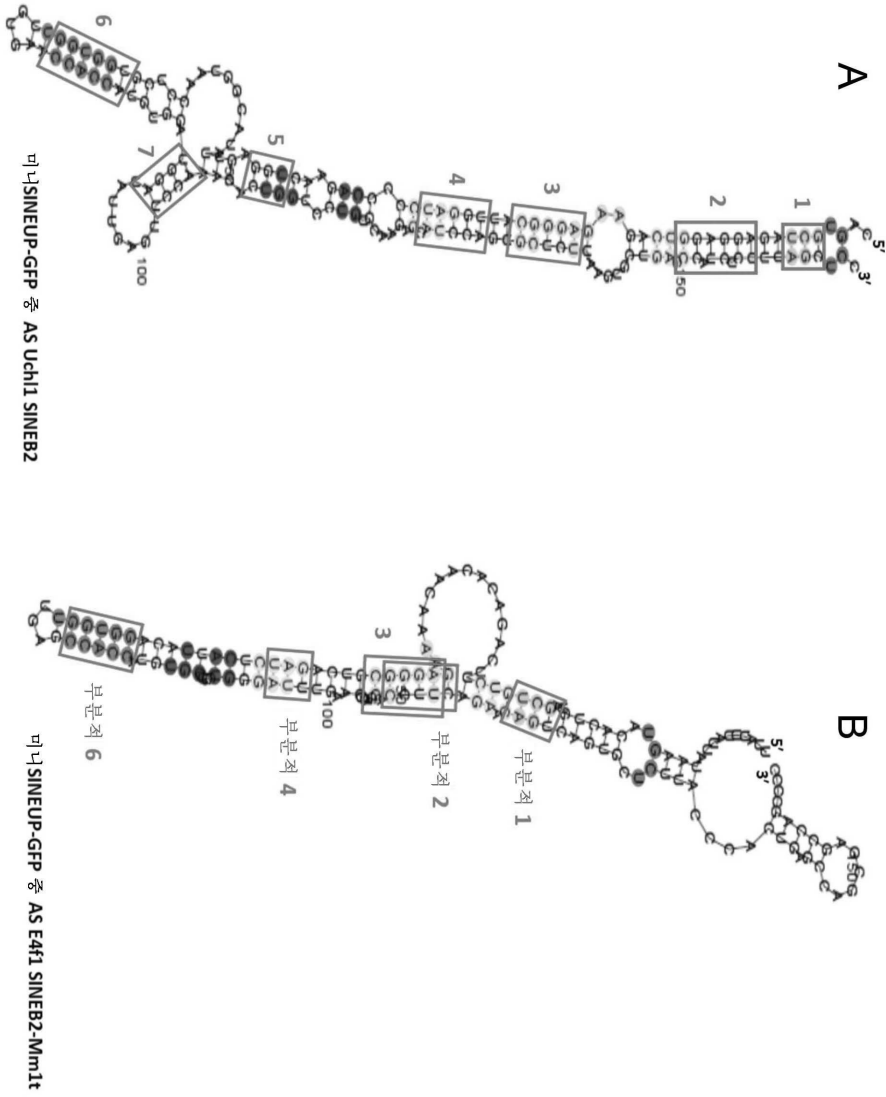
도면37



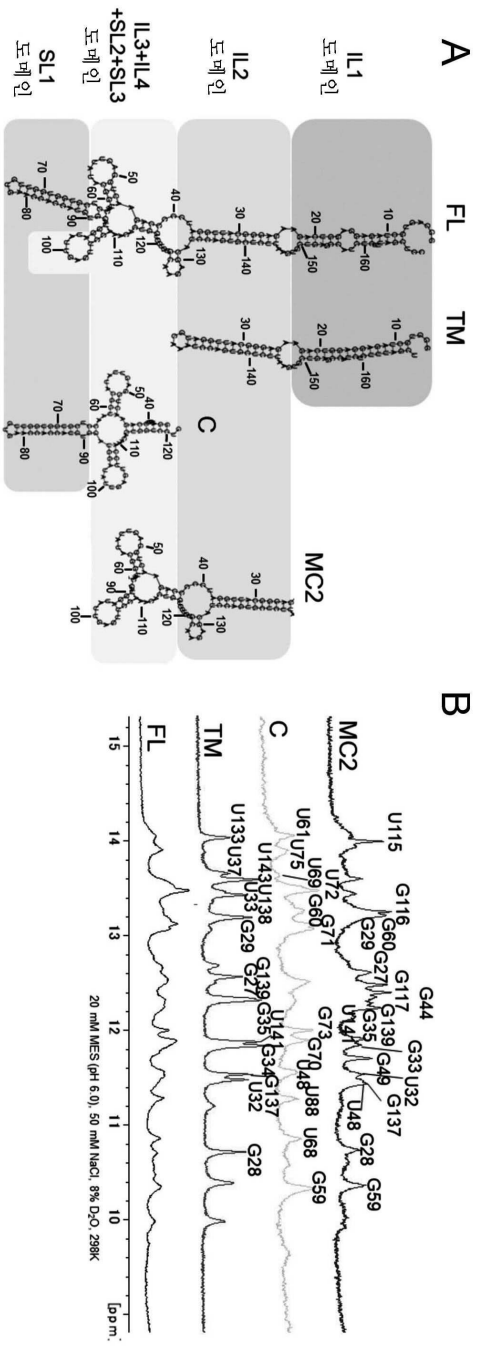
도면38



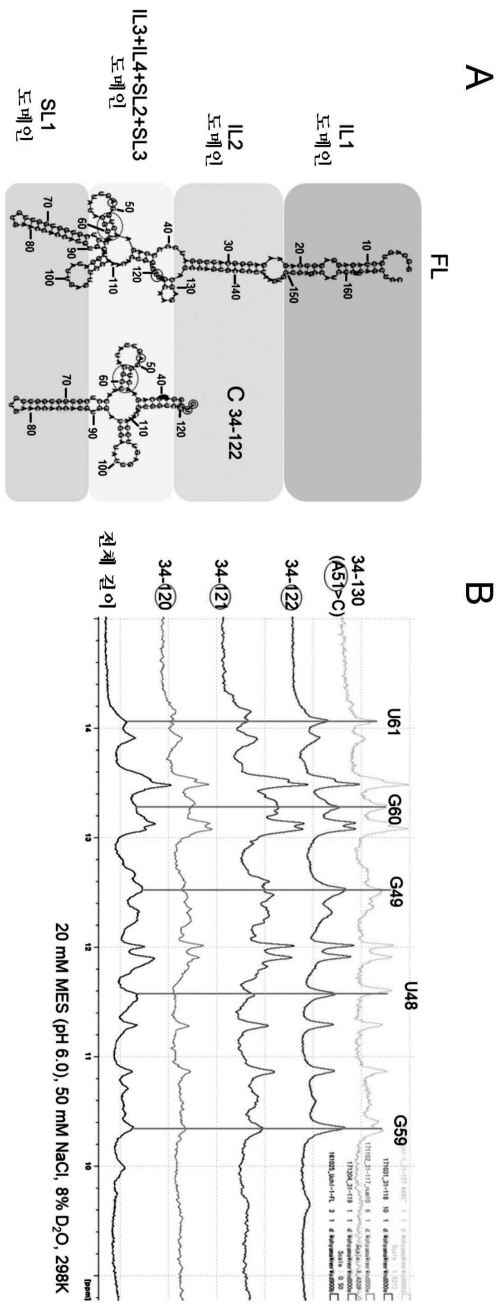
도면39



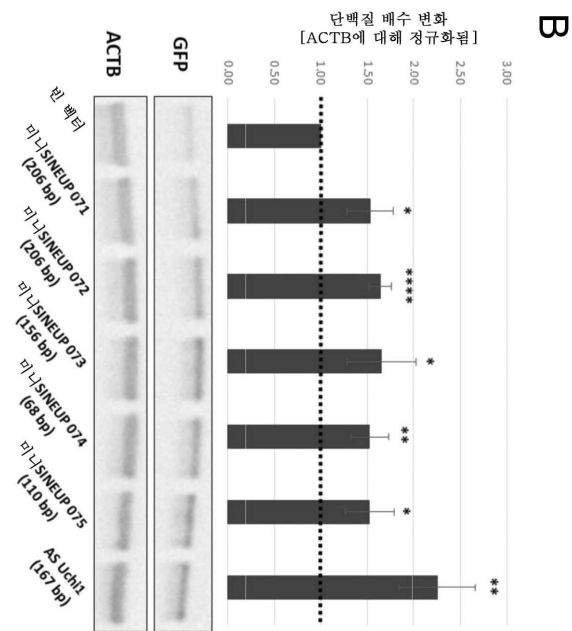
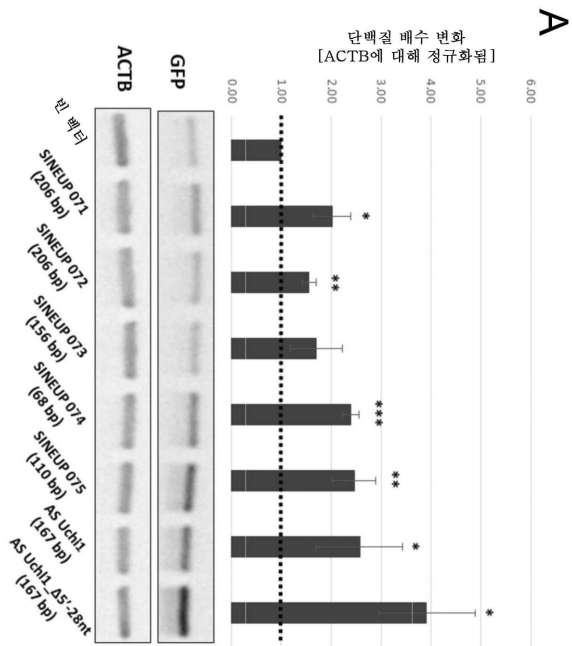
도면40i



도면41

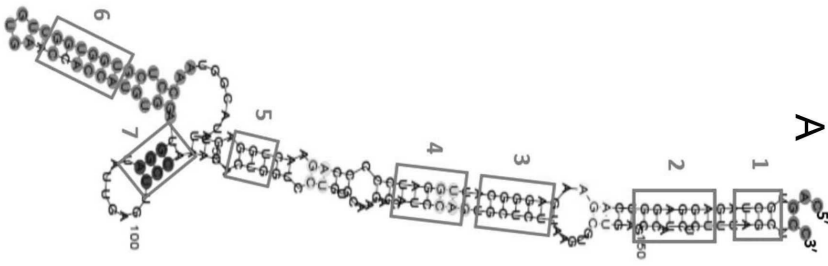


도면42

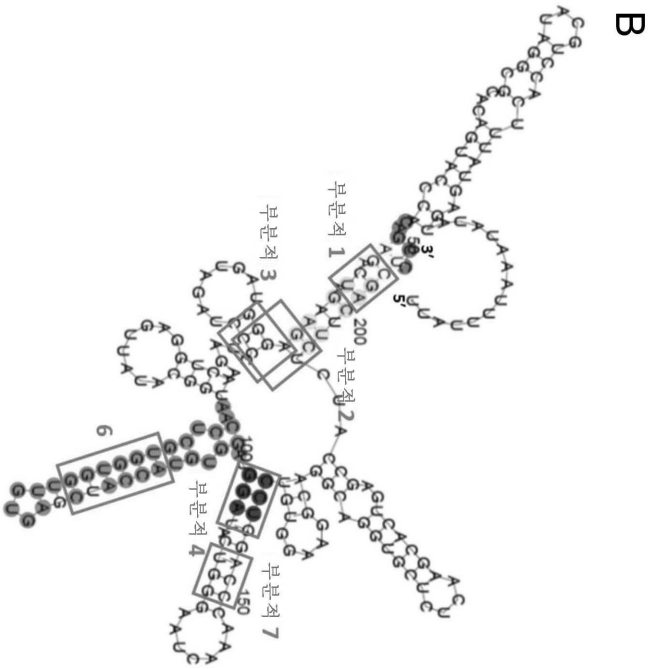


도면43

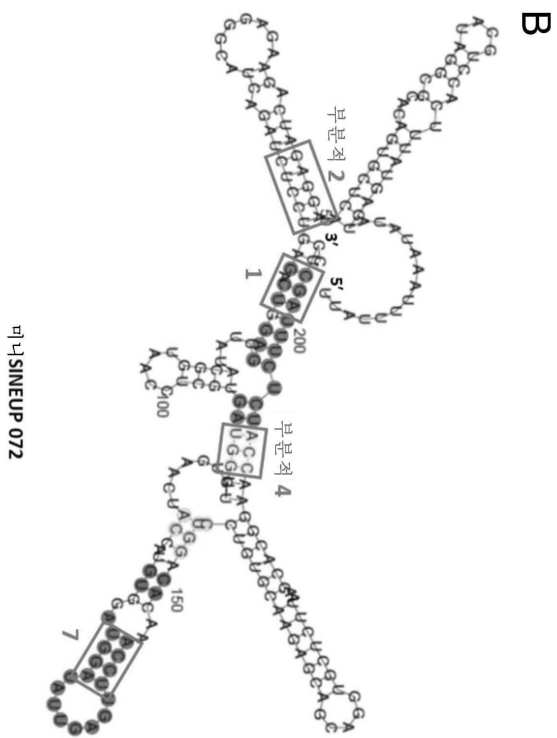
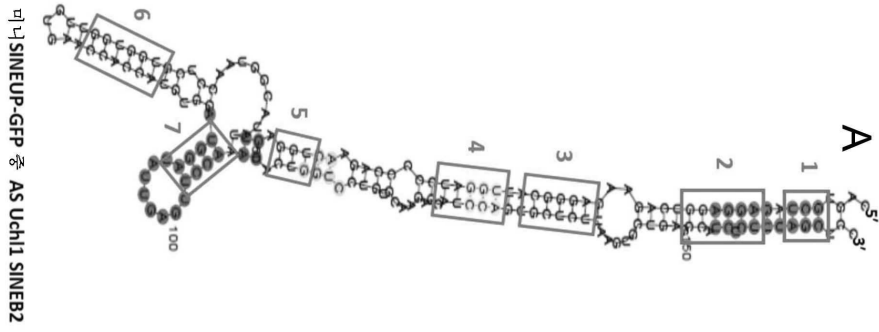
마녀 SINEUP-GFP 중 AS Uchi1 SINEB2



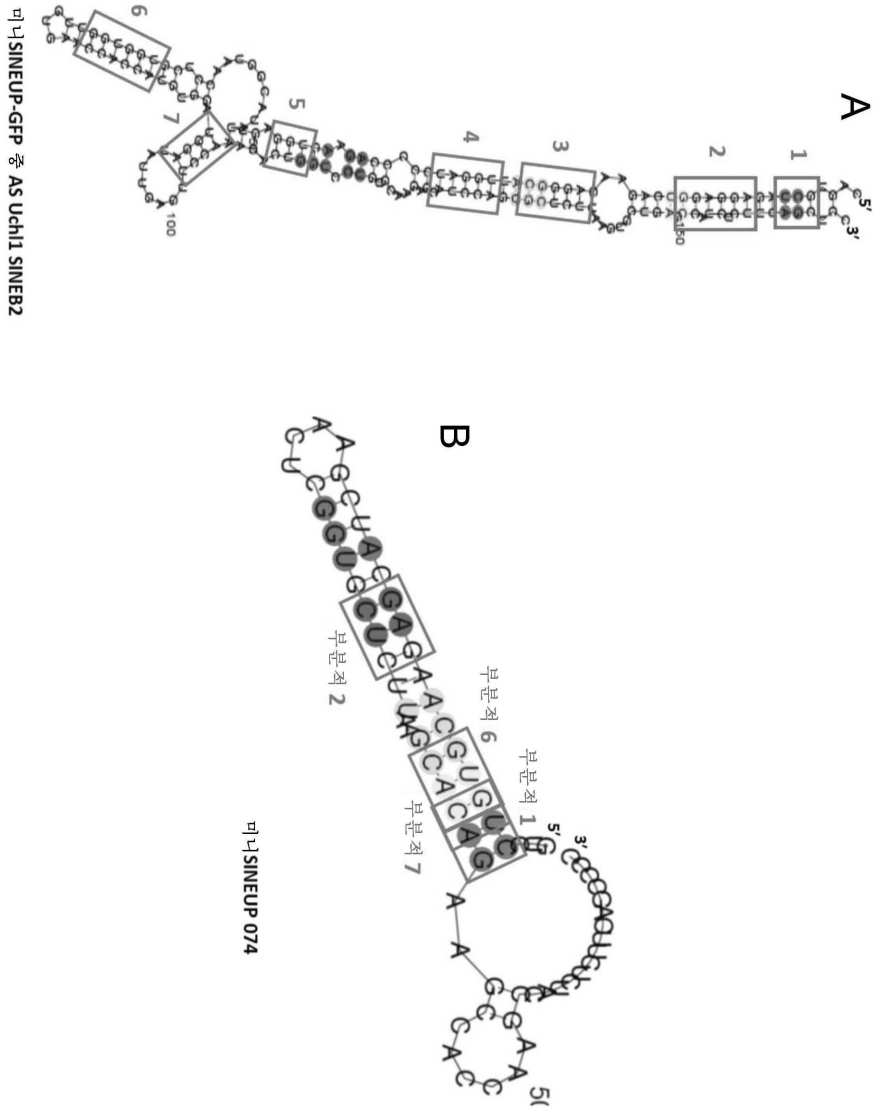
마녀 SINEUP 071



도면44

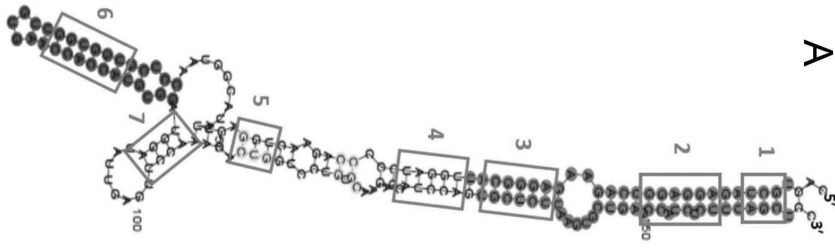


도면46

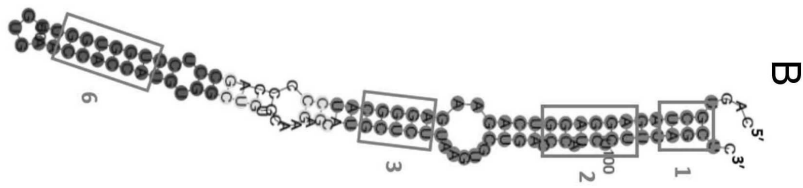


도면47

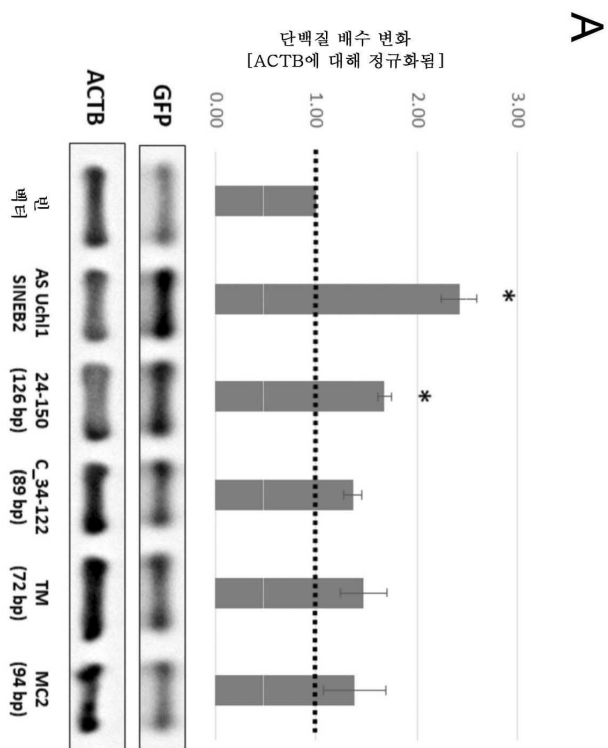
퍼니 SINEUP-GFP 중 AS Uchi1 SINEB2



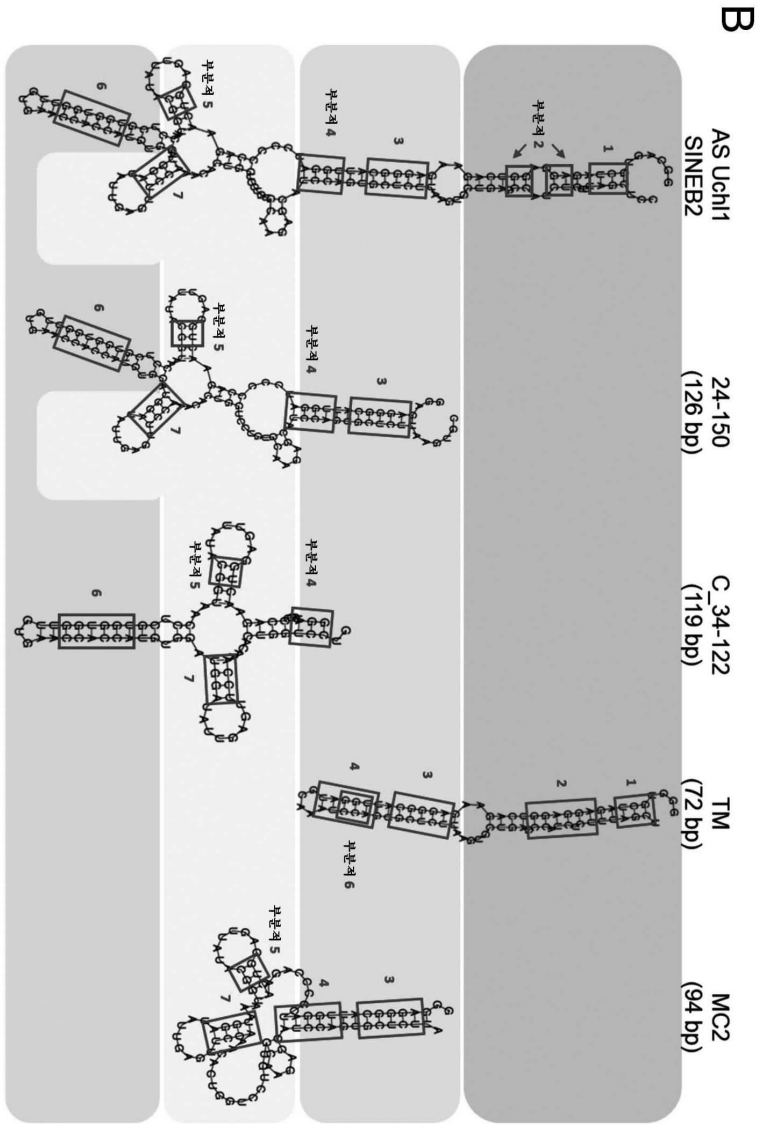
퍼니 SINEUP 075



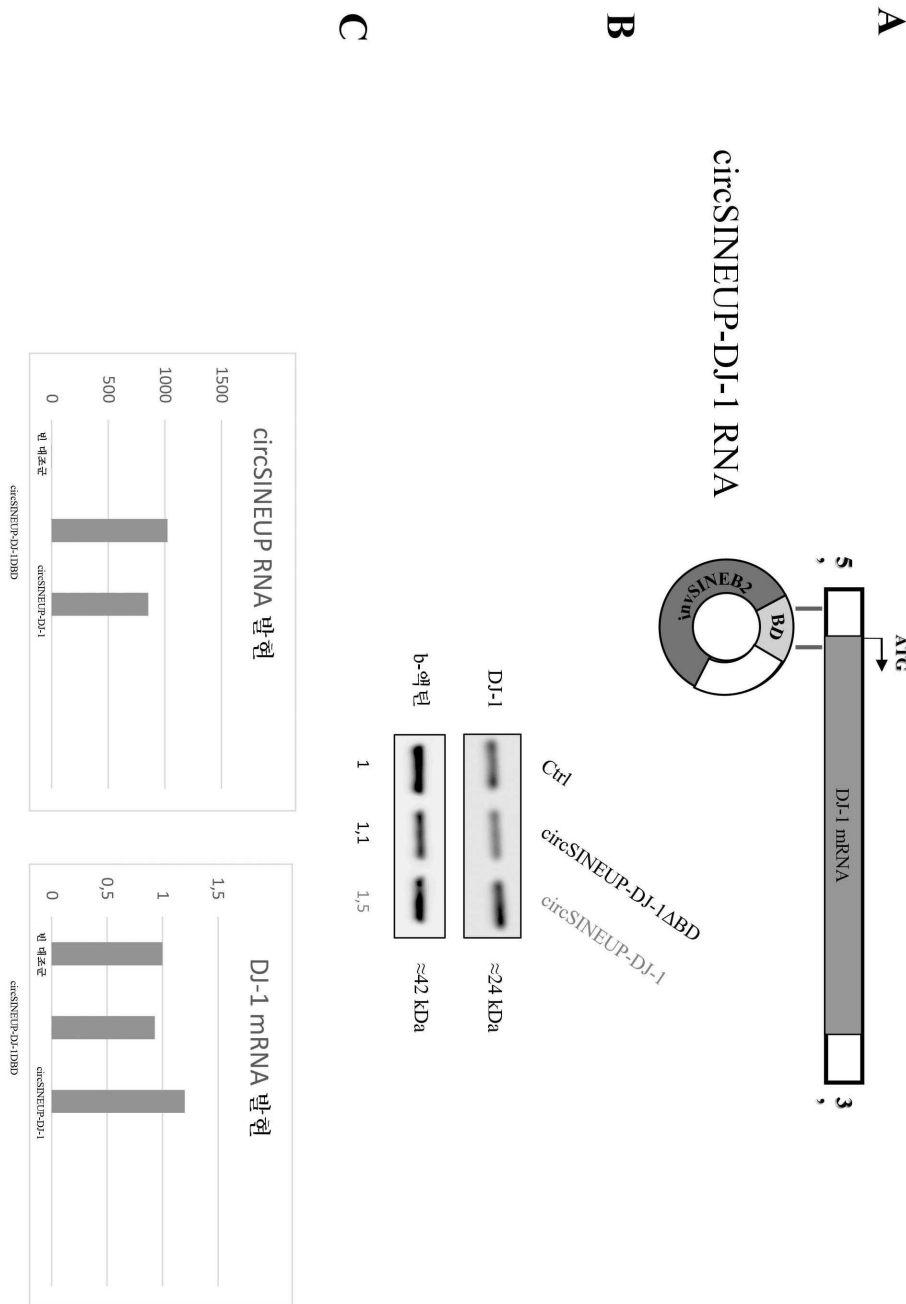
도면48i



도면48ii



도면49



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati

TransSINE Technologies Co. LTD

<120> Structural domains of antisense RNA molecules up-regulating translation

<130> 911-17

<160> 77

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1
 <211> 29
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <223> nt 64-92 of inverted SINE B2 transposable element derived from AS
 Uch11
 <400> 1
 ccucguggug guugugaacc accaugugg 29
 <210> 2
 <211> 61
 <212> RNA
 <213>
 > Mus musculus
 <220>
 <223> nt 52-112 of inverted SINE B2 transposable element derived from
 AS Uch11
 <400> 2
 guuauacggu aaccucgugg uggugugaa ccaccaugug gauggauuu gaguuccaaa 60
 c 61
 <210> 3
 <211> 98
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <223> nt 36-133 of inverted SINE B2 transposable element derived from
 AS Uch11
 <400> 3
 aucccccaga acuggaguua uacgguaacc ucgugguggu ugugaaccac cauguggaug 60
 gauauugagu uccaaacacu gguccugugc aagagcau 98
 <210> 4
 <211> 129
 <212> RNA
 <213> Mus musculus

<220>

<223> nt 22-150 of inverted SINE B2 transposable element derived from
AS Uchl1

<400> 4

gaagagggca uuggaucucc cagaacugga guuauacggu aaccucgugg ugguugugaa 60
ccaccaugug gauggauauu gaguuccaaa cacugguccu gugcaagagc auccagugcu 120
cuuaagugc 129

<210> 5

<211> 183

<212> RNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> nt 1-183 of inverted SINE B2 transposable element derived from AS

Uchl1

<400> 5

gggcagugcu agaggagguc agaagagggc auuggaucucc ccagaacugg aguuauacgg 60
uaaccucgug gugguuguga accaccaugu ggauggauau ugaguuccaa acacuggucc 120
ugugcaagag cauccagugc ucuuaagugc ugagccaucu cuuuagcucc agucucuuaa 180
gcu 183

<210> 6

<211> 67

<212> RNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> nt 44-110 of inverted SINE B2 transposable element derived from
AS Uchl1

<400> 6

gaacuggagu uauacgguaa ccucuggug guugugaacc accaugugga uggauauuga 60

guuccaa 67

<210> 7

<211> 77

<212> RNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> nt 44-120 of inverted SINE B2 transposable element derived from
AS Uchl1

<400> 7

gaacuggagu uauacgguaa ccucguggug guugugaacc accaugugga uggauauuga 60

guuccaaaca cuggucc 77

<210> 8

<211> 107

<212> RNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> nt 34-140 of inverted SINE B2 transposable element derived from

AS Uchl1

<400> 8

ggaucccca gaacuggagu uauacgguaa ccucguggug guugugaacc accaugugga 60

uggauauuga guuccaaaca cugguccugu gcaagagcau ccagugc 107

<210> 9

<211> 127

<212> RNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> nt 24-150 of inverted SINE B2 transposable element derived from

AS Uchl1

<400> 9

agagggcauu ggaucccca gaacuggagu uauacgguaa ccucguggug guugugaacc 60

accaugugga uggauauuga guuccaaaca cugguccugu gcaagagcau ccagugcucu 120

uaagugc 127

<210> 10

<211> 170

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> nt 1-67 and 78-183 of inverted SINE B2 transposable element

derived from AS Uchl1

<400> 10
 cagugcuaga ggaggucaga agagggcauu ggauccecca gaacuggagu uauacgguaa 60
 ccucugaacc accaugugga uggauuuuga guuccaaaca cugguccugu gcaagagcau 120
 ccagugcucu uaagugcuga gccaucucuu uagcuccagu cucuaagcu 170
 <210> 11
 <211> 180
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> stemDM mutant - G70A and G73A mutant of inverted SINE B2

transposable element derived from AS Uchl1

<400> 11
 cagugcuaga ggaggucaga agagggcauu ggauccecca gaacuggagu uauacgguaa 60
 ccucguagua guugugaacc accaugugga uggauuuuga guuccaaaca cugguccugu 120
 gcaagagcau ccagugcucu uaagugcuga gccaucucuu uagcuccagu cucuaagcu 180
 <210> 12
 <211> 38
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <223> nt 59-96 of inverted SINE B2 transposable element derived from AS
 Uchl1

<400> 12
 gguaaccucg uggugguugu gaaccaccu guggaugg 38

<210> 13
 <211> 167
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> nt 1-34 and 48-183 of inverted SINE B2 transposable element
 derived from AS Uchl1

<400> 13

cagugcuaga ggaggucaga agagggcatau guggaguauu acgguaaccu cgugguguu 60
 gugaaccacc auguggaugg auauugaguu ccaaacacug guccugugca agagcaucca 120
 gugcucuuaa gugcugagcc aucucuuuag cuccagucuc uuaagcu 167

<210> 14

<211> 165

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> nt 1-146 and 162-183 of inverted SINE B2 transposable element

derived from AS Uchl1

<400> 14

cagugcuaga ggaggucaga agagggcatau ggaucccca gaacuggagu uauacgguaa 60
 ccucuggug guugugaacc accaugugga uggauauuga guuccaaaca cugguccugu 120
 gcaagagcau ccagucucu uauuuuagcu ccagucucu aagcu 165

<210> 15

<211> 180

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> G60A mutant of inverted SINE B2 transposable element derived from

AS Uchl1

<400> 15

cagugcuaga ggaggucaga agagggcatau ggaucccca gaacuggagu uauacgauaa 60
 ccucuggug guugugaacc accaugugga uggauauuga guuccaaaca cugguccugu 120

gcaagagcau ccagucucu uaagucuga gccaucucu uagcuccagu cucuaagcu 180

<210> 16

<211> 180

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> G60C mutant of inverted SINE B2 transposable element derived from

AS Uchl1

<400> 16

cagugcuaga ggaggucaga agaggcatau ggaucccca gaacuggagu uauacgcuaa 60
 ccucguggug guugugaacc accaugugga uggauauuga guuccaaaca cugguccugu 120
 gcaagagcau ccagugcucu uaagugcuga gccaucucuu uagcuccagu cucuaaagcu 180

<210> 17

<211> 180

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A51C mutant of inverted SINE B2 transposable element derived from
 AS Uchl1

<400> 17

cagugcuaga ggaggucaga agaggcatau ggaucccca gaacuggcgu uauacgguaa 60
 ccucguggug guugugaacc accaugugga uggauauuga guuccaaaca cugguccugu 120
 gcaagagcau ccagugcucu uaagugcuga gccaucucuu uagcuccagu cucuaaagcu 180

<210> 18

<211> 180

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> C47G and G117C mutant of inverted SINE B2 transposable element

derived from AS Uchl1

<400> 18

cagugcuaga ggaggucaga agaggcatau ggaucccca gaaguggagu uauacgguaa 60
 ccucguggug guugugaacc accaugugga uggauauuga guuccaaaca cugcuccugu 120
 gcaagagcau ccagugcucu uaagugcuga gccaucucuu uagcuccagu cucuaaagcu 180

<210> 19

<211> 180

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 46-49/115-118 stem swap mutant of inverted SINE B2 transposable
 element derived from AS Uchl1

<400> 19

cagugcuaga ggaggucaga agagggcatau ggaucccca gauggugagu uauacgguaa 60

ccucuggug guugugaacc accaugugga uggauauuga guuccaaaca cgucaccugu 120

gcaagagcau ccagugcucu uaagugcuga gccaucucuu uagcuccagu cucuaagcu 180

<210> 20

<211> 180

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 50-53 and 112-114 base swap mutant of inverted SINE B2
transposable element derived from AS Uchl1

<400> 20

cagugcuaga ggaggucaga agagggcatau ggaucccca gaacugcacu auacgguaac 60

cucguggug uugugaacca ccauguggau ggauauugag uuccaaauga gugguccugu 120

gcaagagcau ccagugcucu uaagugcuga gccaucucuu uagcuccagu cucuaagcu 180

<210> 21

<211> 116

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> nt 27-142 of inverted SINE B2 transposable element derived from
AS Uchl1

<400> 21

gggcauugga uccccagaa cuggaguau acgguaaccu cgugguguu gugaaccacc 60

auguggaugg auauugaguu ccaaacacug guccugugca agagcauca gugcuc 116

<210> 22

<211> 77

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> nt 44-120 A45G mutant of inverted SINE B2 transposable element
derived from AS Uchl1

<400> 22

ggacuggagu uauacgguaa ccucuggug guugugaacc accaugugga uggauauuga	60
guuccaaaca cuggucc	77
<210> 23	
<211> 77	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> nt 44-120 A51C mutant of inverted sine B2 transposable element derived from AS Uchl1	
<400> 23	
gaacuggcgu uauacgguaa ccucuggug guugugaacc accaugugga uggauauuga	60
guuccaaaca cuggucc	77
<210> 24	
<211> 75	
<212> RNA	
<213> Rodentia	
<220>	
<223> SINE ID (BC1)	
<400> 24	
gggguugggg auuagcuca gugguagagc gcuugccuag caagcgcaag gcccugggu	60
cgguccucag cuccg	75
<210> 25	
<211> 95	
<212> RNA	
<213> Brassica	
<220>	
<223> SB8	
<400> 25	
gccgggacag aauagccuag ugguaacacu agagugaacu ggaucccaag gcaccugggu	60
ucgaguccuc ugggauuccg gagaccgcc gugac	95
<210> 26	
<211> 115	
<212> RNA	

<213> Oryza
 <220>
 <223> p-SINE1
 <400> 26
 gagaaacgcc cuggggucuu ccggcuagcu ccacaaggug gugggcuagc cgaccugggu 60
 ucgaagccuc accccuucua auuuuuugau auuagguccu ucccuaauau ucgug 115

<210> 27
 <211> 140
 <212> RNA
 <213> Salmonidae
 <220>
 <223> SmaI
 <400> 27
 gguccuucug uagcucaguu gguagagcau ggcgcuugua acgccagggu aguggguucg 60
 auucccgga ccaccuac guaaaaugu augcacacau gacuguaagu cgcuuuggau 120
 aaaagcgucu gcuaaauggc 140

<210> 28
 <211> 159
 <212> RNA
 <213> Arabidopsis
 <220>
 <223> SB4
 <400> 28
 accaacgugc uguuggcca gugguaaauc ucccaggugg aggugcuggg uucgaggcac 60
 guugggaggg aucucuucuc caaaagagau gaauuuuacc uggugugggu cccgccucua 120

ggagauguag ggccuuuggg cuugaacuuc cagauauuc 159

<210> 29
 <211> 171
 <212> RNA
 <213> Brassica
 <220>
 <223> SB1
 <400> 29

accaggacc ucguagucca gugguacuac cuccucuug gggaggggag gucggcuguu 60

cgacucgcg ggagggggag gcgugcccag ggccuaacc gguacaggca caggcuggcg 120

ccgggccuag gugguggcu ggucgaagc uggucaacac cugguuauc a 171

<210> 30

<211> 185

<212> RNA

<213> Rodentia

<220>

<223> B2

<400> 30

gggcuggaga gauggcucag ugguaagag caccugacug cucuuccaga gguccugagu 60

ucaauuccca gcaaccacau gguggcucac aaccaucugu aaugagaucu gaugcccucu 120

ucuggugugu cugaagacag cuacagugua cuuacauua auaaaauaa aaauaaauaa 180

aucuu 185

<210> 31

<211> 189

<212> RNA

<213> Salmonidae

<220>

<223> HpaI

<400> 31

ggggcggcag gguagccuag ugguuagagc guuggacuag uaaccgaaag guugcaaguu 60

caaauccccg agcugacaag guacaaaucu gucguucugc ccugaacaa ggcaguuaac 120

ccacuguucc uaggccguca uugaaaaua gaauuuguuc uuaacugacu ugccuaguua 180

aauaaaggu 189

<210> 32

<211> 235

<212> RNA

<213> Equus

<220>

<223> ERE-B2

<400> 32

ggggccagcc ccguggccua gugguuaagu ucggcgcgcu ccgcuucggc ggccccgggu 60

ucgccgguuc ggaucgccggg cgccggaccua caccacucgu caggccaugc uguggcggcg 120
 ucccacauac aaaaagagg aagauuggca cagauguuag cucagggcca aucuuccua 180
 agaaaaaga ggaagauugg caacagaugu uagcucaggg cgaaucuucc ucagc 235
 <210> 33
 <211> 252
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <223> Ther-1 (MIR)
 <400> 33
 gcaguguggc gcaguggaua gagcacggga ccuggaguca ggaagaccug gguucgaauc 60
 ccggcucugc cacuuacuag cugugugacc uugggcaagu cacuaaccu cucugugccu 120
 caguuccuc aucuguaaaa uggggauaau aauagcaccu accucacagg guuguuguga 180
 ggauuaaag agauaaaua uguaaagcgc uuagaacagu gccuggcaca uaguaagcgc 240
 uauuaaaug uu 252
 <210> 34
 <211> 75
 <212> RNA
 <213> Rodentia
 <220>
 <223> inverted SINE ID (BC1)
 <400> 34

 cggagcugag gaccgaacc agggccuugc gcuugcuagg caagcgcucu accacugagc 60
 uaaaucucca acccc 75
 <210> 35
 <211> 95
 <212> RNA
 <213> Brassica
 <220>
 <223> inverted SB8
 <400> 35
 gucacggcg gucuccgaa ucccagagga cucgaacca ggugccuugg gaucaguuc 60
 acucuagugu uaccacuagg cuauucuguc ccggc 95

<210> 36
 <211> 115
 <212> RNA
 <213> Oryza
 <220>
 <223> inverted p-SINE1
 <400> 36
 cacgaauuu agggaaggac cuaauaucaa auaauuagaa ggggugaggc uucgaacca 60

 ggucggcuag cccaccaccu uguggagcua gccggaagac cccagggcgu uucuc 115
 <210> 37
 <211> 140
 <212> RNA
 <213> Salmonidae
 <220>
 <223> inverted SmaI
 <400> 37
 gccauuuagc agacgcuuuu auccaaagcg acuuacaguc augugugcau acauuuuuac 60
 guaugggugg ucccgggaau cgaacccacu acccuggcgu uacaagcgcc augcucuacc 120
 aacugagcua cagaaggacc 140
 <210> 38
 <211> 159
 <212> RNA
 <213> Arabidopsis
 <220>
 <223> SB4
 <400> 38
 gaauaucugg aaguucaagc ccaaaggccc ucaucuccu agaggcggga cccacaccag 60

 guaaaauca ucucuuuugg agaagagauc ccucccaacg ugccucgaac ccagcaccuc 120
 caccugggag auuuaccacu gggccaacag cacguuggu 159
 <210> 39
 <211> 171
 <212> RNA
 <213> Brassica

<220>

<223> inverted SB1

<400> 39

ugauuaacca gguguugacc agccuucgac cagcccacca ccuaggcccg gcgccagccu 60
 gugccuguaac cgguuagggc ccugggcacg ccucuccuc cccgcgaguc gaacagccga 120
 ccucuccucc ccaaagagga gguaguacca cuggacuacg agguccuggg u 171

<210> 40

<211> 185

<212> RNA

<213> Rodentia

<220>

<223> inverted B2

<400> 40

aagauuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu guaaguacac uguagcuguc uucagacaca 60
 ccagaagagg gcaucagauc ucuuuacaga ugguugugag ccaccaugug guugcuggga 120
 auugaacuca ggaccucugg aagagcaguc aggugcucuu aaccacugag ccaucucucc 180
 agccc 185

<210> 41

<211> 189

<212> RNA

<213> Salmonidae

<220>

<223> inverted HpaI

<400> 41

accuuuuuuu aacuaggcaa gucaguuaag aacaaauucu uuuuuucaau gacggccuag 60
 gaacaguggg uuaacugccu uguucagggg cagaacgaca gauuuguacc uugucagcuc 120
 ggggauuuga acuugcaacc uuucgguuac uaguccaacg cucuaaccac uaggcuacce 180
 ugccgcccc 189

<210> 42

<211> 235

<212> RNA

<213> Equus

<220>

<223> inverted ERE-B2
 <400> 42
 gcugaggaag auucgcccug agcuaacauc uguugccaau cuuccucuuu uuucuugagg 60
 aagauuggcc cugagcuaac aucugugcca aucuuccucu auuuuguaug ugggacgccg 120
 ccacagcaug gccugacgag ugguguaggu ccgcgcccgg gaucpgaacc ggcgaacccc 180
 gggccgccga agcggagcgc gccgaacuua accacuagge cacggggcug gcccc 235

<210> 43

<211> 252

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> inverted Ther-1

<400> 43

aacauuuuau uagcgcuuac uaugugccag gcacuguucu aagcgcuuua cauauuuau 60
 cucauuuauu ccucacaaca acccugugag guaggugcua uuauuauccc cauuuuacag 120
 augaggaaac ugaggcacag agagguuaag ugacuugccc aaggucacac agcuaguaag 180
 uggcagagcc gggauucgaa cccaggucuu ccgacucce ggucgccguc ucuauccacu 240
 gcgccacacu gc 252

<210> 44

<211> 167

<212> RNA

<213>

> Mus musculus

<220>

<223> AS Uch11 SINEB2

<400> 44

cagugcuaga ggaggucaga agaggcrau ggaucccca gaacuggagu uauacgguaa 60
 ccucguggug guugugaacc accaugugga uggauauuga guuccaaaca cugguccugu 120
 gcaagagcau ccagugcucu uaagugcuga gccaucucuu uagcucc 167

<210> 45

<211> 107

<212> RNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> AS Txnip SINEB2
 <400> 45
 gaugccuuag aaguggaguu aagaguugug agcugccguu uuuugguucu gggacucgaa 60
 cucguuuccu cugauacuau caaccaccaa gccaucucuu cagcccc 107

<210> 46
 <211> 131
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <223> AS Uxt SINEB2 a
 <400> 46
 gccagaagaa guugugggau ucccuggaac uggagcaacc aacaguuugu gugcaccaug 60
 uggguaaugg gaaucgaacc uggguccucu auaagacugg ccagugcucu uaacuacuga 120
 ggugcauuuc u 131

<210> 47
 <211> 187
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <223> AS Uxt SINEB2 b
 <400> 47
 uuauuuuaaa uauaugagua uuucaccugc auaggcgcac aguaccaca gagacuagaa 60
 gaggguaggca gaucuccuga gacuggaguu aaugcuugug agcugccaug uggaugcugg 120

aaaucaaacc cagguccuuu ggaaggcagg caggugcucu uaucaugga agcaucucuu 180
 cagcucc 187

<210> 48
 <211> 131
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <223> AS Gadd45alpha SINEB2 a
 <400> 48
 cagcgacauc agaagaggau auuggaucucc auuacagaug guugaaggcc accaugucgu 60

ugcugggaau gaacucaaga ccucuggaag agcagucagu gcucuuaacc ucugagccau	120
cucuccagcc c	131
<210> 49	
<211> 114	
<212> RNA	
<213> Mus musculus	
<220>	
<223> AS Gadd45alpha SINEB2 b	
<400> 49	
aucuccuca aagcucaaga ugguuguaag ccaccugug auugcuggga uuugaacuca	60
agaccuccgg aagagcaauu agugucuua accgcugagc aaucucucca gccc	114
<210> 50	
<211> 357	
<212> RNA	
<213> Mus musculus	
<220>	
<223> AS Uch11 SINEB2 + AS Uxt SINEB2 b	
<400> 50	
gugcagugcu agaggagguc agaagagggc auuggaucucc ccagaacugg aguuaucgg	60
uaaccucgug gugguuguga accaccaugu ggauggauau ugaguuccaa acacuggucc	120
ugugcaagag cauccagugc ucuuaagugc ugagccaucu cuuuagcucc uuuuuuuuuu	180
uauaugagua uuaccucguc auaggcgcac aguaccaca gagacuagaa gaggguggca	240
gaucuccuga gacuggaguu aaugcuugug agcugccaug uggaugcugg aaaucaaacc	300
cagguccuuu ggaagcagg caggugcucu uaucaugga agcaucucu cagcucc	357
<210> 51	
<211> 532	
<212> RNA	
<213> Mus musculus	
<220>	
<223> 3x AS Uch11 SINEB2	
<400> 51	
gugcagugcu agaggagguc agaagagggc auuggaucucc ccagaacugg aguuaucgg	60
uaaccucgug gugguuguga accaccaugu ggauggauau ugaguuccaa acacuggucc	120

ugugcaagag cauccagugc ucuaaagugc ugagccaucu cuuuagcucc gugcgaauc 180

ggugcagugc uagaggaggu cagaagaggg cauuggauc cccagaacug gaguuauacg 240

guaaccucgu ggugguugug aaccaccaug uggauaggaua uugaguucca aacacugguc 300

cugugcaaga gcauccagug cucuaaagug cugagccauc ucuuuagcuc cgugcgaauc 360

cggugcagug cuagaggagg ucagaagagg gcauuggauc cccagaacu ggaguauac 420

gguaaccucg uggugguugu gaaccaccu guggauaggau auugaguucc aacacuggu 480

ccugugcaag agcauccagu gcucuuaagu gcugagccauc cucuuuagcu cc 532

<210> 52

<211> 228

<212> RNA

<213> Mus musculus

<

220>

<223> SINEB2/B3 consensus sequence from RepBase

<400> 52

uuuuuuuaaa aauuuuuuuu uauuuuauugu guaugagugu uuugccugca uguaugucug 60

uguaccacgu gcgugccugg ugcccgcgga ggccagaaga gggcgucgga uccccuggaa 120

cuggaguuaac agaugguugu gagccccauc gugggugcug ggaaucaac ccggguccuc 180

uggaagagca gccagugcuc uuaaccguc agccaucucu ccagcccc 228

<210> 53

<211> 214

<212> RNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> AS Nars2 SINEB2/B3

<400> 53

uuuuuuuac uuguauaggu guuuugccug cauguguauc uaucuaugua ccgaaauugu 60

uccugguauc cacagagacc aaaaguggau guuguauucuc cugaaauugg agucauagac 120

aguuaugagc ugccaauuga gugcuuggaa uagaaccag guccucuuaa agagcaucca 180

gugcucuuaa aaacugagac aucucuguag ccuc 214

<210> 54

<211> 200

<212> RNA

<213> Mus musculus
 <220>
 <223> AS Abhd11 SINEB2/B3
 <400> 54
 uuuuuuuugc uuuuuguguc ugaguguuug cuugaaugua ugucugugua ccacgccugu 60
 accuugugcc uucagaguug agaggagggc auaggaucuc cuggaacugg aauugcaggu 120
 gguugugagc cacccugugg guccugggga ccuacucca gcaagaacau caugugcucu 180

 uaaauuccuga gucucaacc 200
 <210> 55
 <211> 214
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <223> AS Ebp4.9 SINEB2/B3
 <400> 55
 uuuuuuuacu uaucuuuug uguaugagug uguugucaga cuguuuguc ugugugucac 60
 augcaugccu gcuguucaug gaguccagaa gagggcaucg gauccuccugg aacuggaguu 120
 acagaugagu ggccauguga auguuuagaa ccaaaccugg guccucugaa agagcagaca 180
 augcucuuaa cuacugagcu gucucuccag cccc 214
 <210> 56
 <211> 205
 <212> RNA

 <213> Mus musculus
 <220>
 <223> AS Wfdc5 SINEB2/B3
 <400> 56
 uuuuuuuuuu cguguaagug uuuugccagc aucuaugucu ucgcacuaug ugcaggucug 60
 gugccugagg gguccagacg agagcacugg gucuccggga acuggaguua cagaucauug 120
 ugagccacca ugugggugca gggaaucgaa ccugggaccu cuggaggagc agccacugcu 180
 cuuaaccacu acacuauuuc uccag 205
 <210> 57
 <211> 121
 <212> RNA

<213> Mus musculus
 <220>
 <223> AS Pgbd1 SINEB2/B3
 <400> 57
 ucuguggacc acuguguaca gaagccugag aagccuagca gaucuccaga acuggaacug 60

 ugagacgcug ugcuauggag gugcuaggaa cugaaaaugg auggguccuc ugcaagagca 120
 g 121
 <210> 58
 <211> 191
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <223> AS Gsk3b SINEB2/B3
 <400> 58
 uuguuuuuuu ugaauaggcua uaggguguuu cuucuguaug uauaucuaug uuugguaccu 60
 acagaggcau cagauccucu ggaacuguag uugcugacag uugugagcug ucauggggau 120
 gcuggaaug aaccuggauc cuaugaaaga acagccagug uucuuaccg cugagcuauc 180
 ucuccaggcc c 191

 <210> 59
 <211> 205
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <223> AS Rhod SINEB2_Mm2
 <400> 59
 uuuuuuuuuu aauuuuuuuu aaaaagauuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu gaugaguaca 60
 cugucacucu uuucagacac ccuagaaaag gggggcauca gaucuccauu cagaugguug 120
 ugagccacau gguugcuggg aauugaccuc aggaccucug aaagagcagu cagugcucuc 180
 aaccuuugag ucaucucucc agccc 205
 <210> 60
 <211> 190
 <212> RNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> AS Rhod SINEB2/B3A
 <400> 60
 augauauaucu gaaauugggac auacucacau acaugggcac gugaguauaa aaggccagaa 60

 gagagcacug gaccucugg aguugagauu cuaagcaguu gugaaccauc ugauguaggu 120
 gcugggaacu gaacuugggu ccuuugcuag agaaguaugu cucuuacca cugagccgua 180
 ucuccauccc 190
 <210> 61
 <211> 169
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <223> AS E4f1 SINEB2_Mm2
 <400> 61
 uaaagauuuu uucauuagu acacuguagc uaucuucaga cgcaucagaa gagggcguca 60
 gaucuuuuu caggugguug ugagccacca ugugguugcu ggaauuugaa cucaggaccu 120
 ucaaaagagc agucaguuu cuuaaccgcu gagccaucuc uccaacccc 169

 <210> 62
 <211> 159
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <223> AS E4f1 SINEB2_Mm1t
 <400> 62
 uuauuuuuu uaaguacacu guagcugucu ucagacaaa caaaagaggg cgucagaucu 60
 cauucaggu gguugagcca ccaugugguu gcugggauuu gaacucagga ccuucagaac 120
 agucagugcu cuuaccacu gagccagcga gccagcccc 159
 <210> 63
 <211> 308
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 1-183 SINEUP-GFP polyA

<400> 63
cucgagccag ugaacagcuc cucgcccuug cucaccaugg uggcgaccgg uagcgcuagc 60

ggaucugacg guucacuaga ugcggccgcc acugugcugg aaauccagug cuagaggagg 120
ucagaagagg gcauuggauc ccccagaacu ggaguauuac gguaaccucg uggugguugu 180
gaaccaccau guggauggau auugaguucc aaacacuggu ccugugcaag agcauccagu 240
gcucuuaagu gcugagccau cucuuuagcu ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 300
aaaagcuu 308

<210> 64
<211> 179
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 59-96 polyA SINEUP-GFP

<400> 64
cucgagccag ugaacagcuc cucgcccuug cucaccaugg uggcgaccgg uagcgcuagc 60

ggaucugacg guucacuaga ugcggccgcc acugugcugg aaauccgguaa ccucguggug 120
guugugaacc accaugugga uggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaagcuu 179

<210> 65
<211> 77
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 44-120 U78G SINEUP

<400> 65
gaacuggagu uauacgguaa ccucguggug guugggaacc accaugugga uggauauuga 60
guuccaaaca cuggucc 77

<210> 66
<211> 77
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 44-120 GUG77-79CCC SINEUP

<400> 66	
gaacuggagu uauacgguaa ccucguggug guucccaacc accaugugga uggauauuga	60
guuccaaaca cuggucc	77
<210> 67	
<211> 77	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> 44-120 SINEUP strong	
<400> 67	
ggaccggagu uauacgguaa ccgcguggug guugugaacc accacgcgga uggauauuga	60
guuccaaaca ccggucc	77
<210> 68	
<211> 77	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> 44-120 SINEUP weak	
<400> 68	
gaacuagagu uauacgguaa ccacauggug guugugaacc accaugugga uggauauuga	60
guuccaaaca cuaguuc	77
<210> 69	
<211> 206	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> SINEUP 071 and miniSINEUP 071 effector domain	
<400> 69	
uuuuuuuuuu uauaugagua uuucaccugc auaggcgcac aguaccaca gagacuagaa	60
gagguagua gaucuuuag aacuggaguu auacgguaac cucguggugg uugugagcua	120
ccauguggau ggauacuggg aaucuuuacc agguccugug gaaggcaggc aggugcucuc	180
aagcacugag ccaucucuuc agcucc	206
<210> 70	

<211> 206
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> SINEUP 072 and miniSINEUP 072 effector domain
 <400> 70
 uuauuuuaaa uauaugagua uuucaccugc auaggcgcac agugcucaag gagaucagaa 60
 gagggcauca gaucuccuga gacuggaguu auacgguaac cucgugaugg uugugaacua 120
 ccauguggau ggauauugag uuccaaacac agguccugug caagagcagc aggugcucuu 180
 aagcacggaa ccaucucuuu agcucc 206
 <
 210> 71
 <211> 156
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> SINEUP 073 and miniSINEUP 073 effector domain
 <400> 71
 gaggcuaгаа gagguauca gaucuccuga gacuggaguu auacgguaac cucguggugg 60
 uugugagcca ccauguggau ggauacugag aaccaaacc ugguccugug caagagcauc 120
 aggugcucuu aagcacggaa ccaucucuuc agcucc 156
 <210> 72
 <211> 68
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> SINEUP 074 and miniSINEUP 074 effector domain
 <400> 72
 guccugugca agagcaucga acucggugcu cuuaagcaca gaagccacca agccaucucu 60
 ucagcccc 68
 <210> 73
 <211> 110
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SINEUP 075 and miniSINEUP 075 effector domain
 <400> 73
 cagugcuaga ggaggucaga agagggauc cccagccuc guggugguug ugaaccacca 60
 uguggcugug caagagcaug cucuuagug cugagccauc uuuuuagcuc 110
 <210> 74
 <211> 126
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 24-150 effector domain
 <400> 74
 gagggcauug gaucacccag aacuggaguu auacgguaac cucguggugg uugugaacca 60
 ccauguggau ggauauugag uuccaaacac ugguccugug caagagcauc cagugcucuu 120
 aagugc 126
 <210> 75
 <211> 89
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> C_34-122 effector domain
 <400> 75
 ggaucccccga gaacuggagu uauacgguaa ccucguggug guugugaacc accaugugga 60
 uggauauuga guuccaaaca cugguccug 89
 <210> 76
 <211> 72
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> TM effector domain
 <400> 76
 ugcuaagagga ggucagaaga gggcauugga ugcaaaacca gugcucuuaa gugcugagcc 60
 aucucuuuag cu 72

<210> 77

<211> 94

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MC2 effector domain

<400> 77

gagggccauug gaucccccag aacuggaguu auacgguaac gauggauuu gaguuccaaa 60

cacugguccu gugcaagagc auccagugcu cuua 94