

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **237080**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **393170**

(51) Int.Cl.  
**C12N 15/113 (2010.01)**

(22) Data zgłoszenia: **04.12.2010**

---

(54) **Cząsteczka kwasu nukleinowego przeznaczona do selektywnego  
wzmocnienia syntezy białek**

---

(43) Zgłoszenie ogłoszono:  
**18.06.2012 BUP 13/12**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:  
**08.03.2021 WUP 05/21**

(73) Uprawniony z patentu:  
**MASTER ADAM, Inwałd, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:  
**ADAM MASTER, Inwałd, PL**

---

**PL 237080 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest cząsteczka kwasu nukleinowego przeznaczona do selektywnego wzmocnienia syntezy białek, znajdująca zastosowanie w następujących dziedzinach: biotechnologia, biochemia, biofizyka, chemia, fizyka, diagnostyka i medycyna, szczególnie medycyna molekularna i terapia genowa wykorzystująca preparaty medyczne zawierające kwasy nukleinowe, wprowadzane do komórek żywego ciała w celu selektywnego wzmocnienia syntezy białek.

### Opis stanu techniki.

Kontrola translacji, jawiąc się jako ważny cel nowych terapeutyków, odbywa się na poziomie post-transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów, gdzie stanowi istotny mechanizm decydujący o wydajności syntezy białek (Mathews et al. 2007).

Translacja jest procesem syntezy białek przebiegającym na matrycy informacyjnego RNA (mRNA), zawierającym zwykle trzy główne obszary: nieulegający translacji region 5' (ang.: UnTranslated Region – 5'UTR), sekwencję kodującą (CDS) oraz nieulegający translacji region 3' (ang.: 3' UnTranslated Region – 3'UTR) (patrz Rys. – 1.). Nieulegający translacji region 5' (5'UTR), znany również jako sekwencja liderowa mRNA, może zawierać: miejsce wiązania rybosomy w tym sekwencję Shine Dalgarno, sekwencję liderową białka rybosomalnego, wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu (ang.: internal ribosome entry site – IRES), i wiele regulacyjnych regionów (elementów cis) wiążących między innymi wszystkie wymagane czynniki inicjacji translacji (w tym np.: eukariotyczne: eIF4A, eIF4B eIF4E, eIF4F, eIF4G) (Mathews et al. 2007).

Ostateczna ilość białka komórkowego zależy od jego stabilności (zależnej od ubikwityny) jak również wydajności translacji, kontrolowanej przez kilka parametrów takich jak: a) szybkość syntezy, b) dostępność rybosomów, c) zależna od fosforylacji aktywność białek zaangażowanych w proces translacji, jak również d) poziom mRNA, określany szybkością transkrypcji i degradacji transkryptu w cytoplazmie (Van Der Kelen et al. 2009, Kasinath et al. 2009).

Poznanie kontroli translacji wymaga określenia czynników wpływających na szybkość syntezy białek w fazie inicjacji, elongacji i terminacji. Ponieważ inicjacja limituje szybkość syntezy białek (Lodish et al. 1971, Myasnikov AG et al., 2009), stąd głównym czynnikiem regulującym jej wydajność jest liczba zdarzeń inicjacji translacji w jednostce czasu. Procesy te kontrolują z kolei regulacyjne sekwencje cis pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowych struktur UTR w tym: sekwencja konsensusowa Kozak, alternatywne ramki odczytu (uORFs), rybo przełączniki, wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu (IRES), element wrażliwy na żelazo (IRE) i selenocysteinowa sekwencja insercyjna (SECIS element) (Abbott and Proud 2004), które rozpoznawane są przez czynniki trans takie jak białka wiążące się do mRNA, metabolity, czynniki translacyjne np. eIF4E, enzymy edytujące mRNA, mikro RNA (miRNA) jak również czynniki trans wiążące się do sekwencji IRES takie jak białkowe ITAF (Graff and Zimmer, 2003, Chatterjee and Pal, 2009).

Coraz większa ilość danych wskazuje również na metabolity (np. Glukozę) jako wydajne stimulatory sekwencji cis 5'UTR, zdolne do wzmocnienia translacji, jak to opisano na przykładzie alternatywnych form różnicowego składania transkryptu pierwotnego (wariantów splicingowych) proinsuliny (Shalev et al. 2002, Minn et al. 2005, Greenman et al. 2007).

Wynika stąd, że brak liniowej korelacji między mRNA i białkiem może wynikać ze wzmocniających lub osłabiających wpływów sekwencji cis lub czynników trans na alternatywne mechanizmy translacji, która może być inicjowana w sposób zależny od czapeczki 5'-7mG lub w sposób niezależny od czapeczki (zależny od IRES). Większość ludzkich cząsteczek RNA ulega translacji inicjowanej w sposób zależny od czapeczki (Preiss and Hentze 2003, Sonenberg and Dever 2003).

Alternatywny mechanizm inicjacji translacji niezależnie od 5'-m7G (zależny od IRES) włączany jest w pewnych fazach cyklu komórkowego takich jak mitoz (Pyronnet et al., 2001) i stan zintegrowanej odpowiedzi komórkowej na stres (ISR) wywołany czokiem cieplnym, infekcją wirusową, niedoborem surowicy lub aminokwasów jak również niedotlenieniem, obserwowanym także w guzach litych (Jang et al. 1988, Macejak and Sarnow 1991, Clemens 2001). Syntezie białek zależnej od sekwencji IRES może towarzyszyć reinicjacja translacji z alternatywnych ramek odczytu (uORFs), prowadząca do syntezy aktywnych izoform białkowych jak również nieaktywnych, dominujących mutantów negatywnych (Cornelis et al. 2000, Tinton et al. 2005).

Wykazano ostatnio, że osłabiona translacja z wewnętrznego miejsca wiązania rybosomu (IRES) syntazy pseudourydynowej (DKC1) zakłóca proces modyfikacji rRNA jak również transkryptu telome-razy, prowadząc do zwiększenia ryzyka wystąpienia raka (Yoon et al., 2006).

Z drugiej strony, mutacja (C2756T) sekwencji IRES w regionie 5'UTR transkryptu c-Myc (Paulin et al. 1996) prowadzi do zwiększonego wiązania czynników translacyjnych (Paulin et al. 1998) a w konsekwencji do wzmocnienia syntezy alternatywnej izoformy p64 (c-Myc-2) na drodze inicjacji translacji niezależnej od czapeczki, wskazując jednocześnie na nowy mechanizm kancerogenezy (Chappell et al., 2000) (patrz Rys. – 2.). Stephen i współpracownicy wykazali, że mutacja C2756T występuje w 42% przypadkach próbek szpiku kości, pobranych od pacjentów ze szpiczakiem mnogim (ang.: MM-multiple myeloma), której jednak nie stwierdzono w żadnej z 21 kontroli, co wskazuje na silną korelację między tą mutacją a chorobą (Stephen et al., 2000).

W niektórych rodzinnych przypadkach czerniaków złośliwych zaobserwowano mutację typu substytucja w rejonie 5'UTR genu CDKN2A, która powoduje powstanie nowego kodonu start AUG (uORF), hamującego translację prawidłowego białka a w konsekwencji zaburzenie punktu kontroli G1 cyklu komórkowego (Liu et al., 1999).

Te i wiele innych odkryć, wskazując na związek między chorobami a mutacjami/polimorfizmami pojedynczych nukleotydów (SNP), mogą ułatwić opracowanie nowej, kompleksowej terapii opartej o: 1) dobrze znaną, allelo-specyficzną technologię wyciszania zmutowanej kopii genu (Ohnishi et al. 2008), której towarzyszyć będzie 2) technologia wzmacniania syntezy białek z prawidłowego (nie zawierającego mutacji/SNP) allela, stosując opisaną w niniejszym wynalazku cząsteczkę kwasu nukleinowego (patrz Rys. – 2.). Połączenie wyciszającej i wzmacniającej cząsteczki jednocześnie wydaje się być najbardziej efektywną drogą zwalczania schorzeń genetycznych, zwłaszcza tych heterozygotycznych, umożliwiając selektywne zróżnicowanie poziomu ekspresji między dzikimi (niezmutowanymi) i zmutowanymi allelami w aplikacjach medycznych i biotechnologicznych.

W rzeczywistości, kontrola translacji białek może odbywać się również jako wynik aktywności enzymów edytujących RNA, które działają wykorzystując dwa różne mechanizmy: edycję substytucyjną oraz inercyjno-delecyjną. Deaminaza cytydynowa zamienia nukleotyd C w sekwencji RNA na Uracyl, powodując utworzenie alternatywnych kodonów np.: przez konwersję kodonu CAA do kodonu stop: UAA, co decyduje o powstaniu białek o różnej długości. Działanie deaminazy cytydynowej jest niezbędne między innymi w hamowaniu infekcji wirusowych, różnicowaniu przeciwciał oraz powstawaniu różnych izoform białkowych takich jak apolipoproteina B-48 i B-100, syntetyzowanych z jednego transkryptu. Niekontrolowana jednak aktywność enzymów edytujących RNA prowadzić może do powstania białkowych dominantów negatywnych, źle sfałdowanych lub nawet niekompletnych peptydów lub zmian w sekwencji supresorów, które prowadzić mogą do kancerogenezy (Mukhopadhyay et al. 2002, Albesiano et al. 2003, Dorsett et al. 2008).

Okolo 90% komórkowych mRNA opatrzone jest krótkimi (10-200 nukleotydowymi) sekwencjami 5'UTR, które w obecności czynnika translacyjnego eIF4F ulegają wydajnej, zależnej od czapeczki 5' translacji (Pelletier and Sonenberg, 1985). W przypadku jednak pozostałej, niewielkiej frakcji cząsteczek mRNA posiadających długie i mocno ustrukturyzowane sekwencje 5'UTR, często z licznymi alternatywnymi ramkami odczytu (uORFs), poziom syntezy białek jest niewielki, chyba że cząsteczki te opatrzone są dodatkowo sekwencjami IRES, umożliwiającymi alternatywną, niezależną od czapeczki 5' syntezę białek (Willis 1999, Mamane et al. 2004).

Co więcej, podniesiona ekspresja czynnika translacyjnego eIF4E, w sposób nieproporcjonalny, selektywnie i mocno podnosi wydajność syntezy białek z cząsteczek RNA zawierających wspomniane powyżej, mocno ustrukturyzowane sekwencje 5'UTR, obecne np. w transkryptach c-Myc i cykliny D1 (Koromilas et al. 1992).

Ponadto, wykazano korelację między wysokim poziomem stosunku eIF4E/eIF4F a progresją złośliwego fenotypu wielu nowotworów, co zaobserwowano między innymi w agresywnych rakach tarczycy, ale nie stwierdzono w przypadku łagodnego raka brodawkowego tarczycy (Wang et al. 2001). Tak więc, obniżenie poziomu eIF4E lub wzmocnienie syntezy eIF4F mogłoby przywrócić właściwy stosunek tych czynników translacyjnych a przez to wpłynąć na wiele szlaków sygnałowych i cały proteom komórki.

Wykazano również, że poziom translacji syntetazy tymidylowej (TS), docelowego enzymu działania środka przeciwnowotworowego 5-fluorouracylu, której transkrypt w sekwencji 5'UTR zawiera trzy tandemowe powtórzenia typu STR, był czterokrotnie wyższy w rakach jelita grubego w porównaniu do translacji z transkryptów TS zawierających jedynie dwa powtórzenia STR (Kawakami et al. 2001). Zaobserwowane zjawisko wzmocnienia translacji TS, któremu dodatkowo nie towarzyszyła zmiana poziomu transkrypcji, wyjaśniono destabilizacją hamującej, II-rzędowej struktury szpilki do włosów w trój-tandemowym wariacie sekwencji UTR (Kawakami et al., 2001), co wskazuje na ogromny po-

tencjał regulacyjny sekwencji UTR na poziomie kontroli translacji. Potencjał ten został wykorzystany w niniejszym wynalazku do określenia podstawowych cech oligonukleotydów polinukleotydów oraz innych cząsteczek kwasu nukleinowego, koniecznych do wzmocnienia syntezy białek.

Technologie wyciszania ekspresji genów z zastosowaniem a) mikro RNA (miRNA, ang.: micro RNA), b) małych harpinowych RNA (shRNA, ang.: small hairpin RNA) jak również c) małych hamujących RNA nazywanych również krótkimi interferującymi RNA (siRNA, ang.: small inhibitory RNA określanych także jako short interfering RNA), należą do najbardziej znanych metod indukcji zjawiska zwanego interferencją RNA (RNAi), w którym czynniki trans takie jak krótkie aktywne kwasy nukleinowe (miRNA, shRNA, siRNA) prowadzą zwykle do obniżenia syntezy białek na post-transkrypcyjnym i pre-translacyjnym poziomie (Mathews et al. 2007).

miRNA to małe, endogenne, komórkowe cząsteczki RNA (~23n), wykazujące szereg podobieństw z opisaną w niniejszym wynalazku cząsteczką kwasu nukleinowego, która jednak w przeciwieństwie do naturalnie występujących miRNA jest zwykle 1) egzogenna, 2) sztuczna, 3) opracowana w celu wiązania się do regulatorowych elementów cis, tak by 4) selektywnie wzmocnić syntezę białek genu, allele lub jego fragmentu, co dotychczas nie było dostępne. Endogenne komórkowe miRNA 1) powstają z pierwotnych transkryptów genów pre-miRNA, a ich działanie opisuje się najczęściej jako nieselektywne, zależne od miRNA hamowanie inicjacji i elongacji translacji. Powszechnie uważa się, że wspomniane hamowanie syntezy białek jest następstwem wiązania się częściowo homologicznych cząsteczek miRNA do sekwencji 3'UTR genów docelowych (Nilsen 2007). Nieselektywne działanie cząsteczek miRNA wynikać może z 1) niepełnej homologii sekwencyjnej między miRNA a docelową cząsteczką matrycowego RNA, 2) wiązania się do co najmniej kilku mRNA w komórce, co wynikać może między innymi ze 3) słabych oddziaływań G:U zwiększających poziom komplementarności względem dowolnej cząsteczki RNA. Ludzki genom może kodować ok. 1000 cząsteczek miRNA (Bentwich et al. 2005) powszechnych w wielu typach komórek, które w przypadku ssaków mogą wiązać się z ok. 60% różnych genów (Friedman et al. 2009).

Tak więc jedna cząsteczka miRNA zwykle działa na więcej niż jedną cząsteczkę mRNA, a więc może wpływać na hamowanie różnych grup mRNA. Efekt cząsteczki miRNA, jako występującego naturalnie czynnika trans nie jest specyficzny i ani selektywny względem pojedynczego transkryptu, co można jednak uzyskać przez syntezę sztucznej, podobnej do miRNA cząsteczki kwasu nukleinowego (opisanej w niniejszym wynalazku), która w przeciwieństwie do miRNA mogłaby zwiększać wydajność translacji. Obecnie, miRNA-zależne technologie regulacji ekspresji genów związane są głównie z wyciszaniem genów (nie wzmocnianiem). Cząsteczki miRNA, stosowane najczęściej na sekwencje 3'UTR, pozyskiwane są zwykle na drodze izolacji lub syntezy zaprojektowanych uprzednio sekwencji, w oparciu o bazy danych naturalnie występujących cząsteczek miRNA, dostarczanych następnie do komórek jako cząsteczki syntetyczne lub alternatywnie jako część wektorowych systemów ekspresji miRNA.

Wykazano, że wiele cząsteczek miRNA zaangażowanych w regulację wzrostu komórek i proliferację działa jak supresor nowotworów lub onkogen (Esquela-Kersher i Slack 2006), co również możliwości wykorzystania eRNA jako selektywnego wzmocniacza syntezy białek.

W porównaniu do siRNA- (małych hamujących RNA), ang.: small inhibitory RNA) zależnej degradacji mRNA w ciałkach-P, prowadzącej do odłączenia czapki i zniszczenia mRNA, zjawisku zależnego od miRNA hamowania translacji towarzyszy jedynie niewielka degradacja cząsteczek mRNA, które również mogą być przechowywane w ciałkach-P (Kedersha et al. 2005, Brengues et al. 2005). Filipowicz i współpracownicy wykazali, że ciała-P to rezerwuuar translacyjnie nieaktywnych cząsteczek mRNA, gromadzonych w celu ponownego ich wykorzystania w procesie recyklingu w translacji (Pillai et al. 2005, Eulalio et al. 2007).

Występujące w naturze lub sztuczne shRNA (krótkie harpinowe RNA, ang.: short hairpin RNA) jak również wspomniane wcześniej cząsteczki siRNA stanowią element ewolucyjnie konserwatywnej, komórkowej odpowiedzi obronnej, wywoływanej przez wprowadzane z zewnątrz dwuniciowe cząsteczki RNA (dsRNA, np. wirusowe dsRNA), które wewnątrz komórek rozcinane są zwykle na małe, interferujące, dwuniciowe cząsteczki RNA, wykazujące aktywność siRNA. Te dwuniciowe RNA (19–23 nukleotydowe dupleksy kwasów nukleinowych z niemal całkowitą komplementarnością względem docelowych cząsteczek RNA) mogą selektywnie oddziaływać z dowolnie wybranym miejscem pojedynczego transkryptu uruchamiając mechanizm jego niszczenia przez cięcie (Tijsterman et al. 2002 Sanchez et al. 2006). Cząsteczki siRNA charakteryzują się niemal idealną komplementarnością względem matrycowego RNA (mRNA) i zbudowane są z sensownej i antysensownej nici kwasu nukle-

inowego, której używają w procesie degradacji docelowego RNA (zwłaszcza centralnego jej regionu) prowadzącej do zahamowania translacji białek (cząsteczka miRNA zawiera mały, niekomplementarny fragment sekwencji w zakresie centralnej części tej cząsteczki, co skutkuje jedynie częściową represją mRNA. Podobnie jak w przypadku miRNA, obecnie stosowane, zależne od siRNA technologie regulacji ekspresji genów odnoszą się jedynie do wyciszania genów (nie wzmacniania), gdzie zwykle cząsteczki siRNA projektowane są na dowolny region sekwencji kodującej (CDS), dostarczane następnie do komórek jako cząsteczki syntetyczne lub część wektorowych systemów ekspresji siRNA. W celu zahamowania syntezy białek stosuje się również inne technologie wykorzystujące krótkie anty-sensowne cząsteczki kwasów nukleinowych (z pełną komplementarnością), niemniej jednak nie są one tak efektywne jak wcześniej opisana technologia siRNA (patrz Tabela 1.).

W przeciwieństwie do opisanych hamujących czynników trans, niewiele wiadomo na temat mechanizmu wzmacniania translacji, genetycznych metod zwiększania wydajności syntezy białek i **selektywnych** cząsteczek kwasów nukleinowych wzmacniających **pojedynczy** gen. Takie specyficzne oddziaływanie byłoby bardzo pomocne w biotechnologii jak również medycynie molekularnej, zwłaszcza w przypadku konieczności podniesienia ekspresji wybranych genów zaangażowanych w cykl komórkowy, apoptozę, różnicowanie, wzrost i proliferację, w fizjologicznych jak również patologicznych warunkach. Jak dotąd nie opracowano jednak technicznych ani przemysłowych rozwiązań umożliwiających selektywne wzmocnienie syntezy białek na poziomie translacji takich genów jak: TP53, BAX, CDKN2A, CDK4, RB1, NOD2, CHEK2, INBS1, MC1R, MSH2, MLH1, MSH6, BRCA1, BRCA2, APC, INS, GH1, IFNA1 TERT, COL1A1 i wielu innych wykazujących cechy supresorów i mutatorów lub genów, których ekspresja jest zbyt niska, zwłaszcza w warunkach patologicznych. Nie opracowano również selektywnych czynników trans, które można byłoby zastosować w pewnych technologiach wykorzystywanych np. w biologii medycznej i w produkcji biofarmaceutyków, gdzie specyficzność i wysoka wydajność syntezy białek stanowią najważniejsze parametry decydujące o przewadze konkurencyjnej danej biotechnologii na rynku.

Przeoglądając aktualną wiedzę na temat możliwości wzmacniania translacji natrafić można na informację, że niektóre miRNA (rozumiane tradycyjnie jako inhibitory translacji), wiążąc się do sekwencji 3'UTR nieoczekiwanie mogą także podnosić syntezę białek (Vasudevan 2007). Poznano również nową klasę sekwencji docelowych dla miRNA (nazwanych miBridges), zawierających podobne miejsca interakcji w regionie 5'UTR i 3'UTR, występujące w obrębie jednej cząsteczki RNA, co wskazuje, że ta sama cząsteczka miRNA może wiązać się nie tylko do 3'UTR (jak uważano wcześniej) ale także do 5'UTR (Lee et al 2009). Co więcej, specyficzna dla wątroby cząsteczka miRNA-122, która wiążąc się do sekwencji 3'UTR zwykle pośredniczy w post-transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów przez nieselektywne hamowanie translacji docelowych mRNA, może także stymulować translację wirusa HCV przez bezpośrednie oddziaływanie tej cząsteczki miRNA-122 z dwoma docelowymi miejscami w sekwencji 5'UTR genomu HCV (Henke et al 2008). Chociaż pojedyncza cząsteczka miRNA wiąże się zwykle do wielu docelowych cząsteczek mRNA, wykazując tym samym niską selektywność, badania powyżej przedstawione wykazały, że występująca w naturze cząsteczka miRNA-122, oddziałując z sekwencjami cis regionu 5'UTR, może wbrew oczekiwaniom wzmocnić wydajność translacji, co dla wirusa HCV jest niezbędne do utrzymania translacji i procesu zakażenia. Wykazano również, że występująca w naturze cząsteczka miRNA oznaczona jako mir-10a oddziałuje z regionem 5'UTR cząsteczek mRNA kodujących białka rybosomalne, czego wynikiem jest wzmocnienie translacji tych białek (Ørom et al. 2008). Co więcej, najnowsze badania wskazują na odkrycie nowego zjawiska – aktywacji RNA (RNAa) jako mechanizmu zależnej od promotora aktywacji transkrypcji uruchamianej przez nową klasę interferujących RNA nazwanych saRNA (ang.: small activating RNAs) (Huang et al. 2010). Zjawisko RNAa prowadzi do podniesienia ekspresji genów na poziomie transkryptomu, co potwierdzono jak dotąd dla różnych typów komórek ssaków (Li et al. 2006). Pomimo wymienionych powyżej odkryć, nie opisano dotąd cząsteczki umożliwiających specyficzne i selektywne wzmocnienie syntezy białek wybranych genów, lub ich fragmentów przez wzmocnienie wydajności translacji, co można osiągnąć stosując opisane w niniejszym wynalazku sztuczne i podobne do naturalnych kwasy nukleinowe, zaprojektowane na podstawie wybranych sekwencji, zwłaszcza matrycowych RNA i wykazujących co najmniej jedną z wymienionych właściwości: 1) aktywność czynnika trans, 2) zdolność do indukcji zjawiska interferencji RNA (RNAi) prowadzącego do wzmocnienia wydajności translacji, 3) zdolności do uruchamiania mechanizmu prowadzącego do odcinania regionów regulatorowych (np. odcięcia mocno sfałdowanych fragmentów 5'UTR z udziałem RNazy H), jak również 4) możliwości zmiany termodynamicznych parametrów docelowych cząsteczek RNA.

Jednym z najważniejszych parametrów regionów regulatorowych mRNA (włączając w to sekwencje 5'UTR) jest wynikająca z sekwencji nukleotydów energia swobodna, która określa drugorzędową i trzeciorzędową strukturę pofałdowania tych regionów (Batey et al. 1999).

W przypadku wielu genów, proces różnicowego składania transkryptu pierwotnego (alternatywnego splicingu pre-mRNA) prowadzi do powstania kilku alternatywnych wariantów transkrypcyjnych, które w zależności od posiadanej sekwencji nukleotydowej, struktury drugorzędowej i regulatorowych elementów cis, mogą podlegać odmiennej i niezależnej regulacji, co w konsekwencji prowadzi do różnej, zależnej od wariantu ekspresji pojedynczego genu. Przykładem takiego genu może być pro insulina (Shalev 2002) lub gen SP-A1, gdzie wykazano, że każdy z czterech analizowanych wariantów 5'UTR wykazywał odmienny wpływ na syntezę markerowego białka reporterowego (Wang 2005).

Biorąc pod uwagę długość sekwencji UTR, obliczono że 90% komórkowych cząsteczek RNA opatrzonych jest krótkimi (10–200n) regionami 5'UTR. Takie mRNA ulegają wydajnej, zależnej od czapeczki 5' translacji, która wymaga obecności wielobiałkowego kompleksu eIF4F zawierającego czynniki inicjacji translacji eukariotycznej takie jak EIF4A, EIF4G, EIF4E (Pelletier and Sonenberg 1985).

Niewielka część komórkowego transkryptomu obejmuje cząsteczki RNA opatrzone mocno ustrukturyzowanymi regionami 5'UTR, zawierającymi często liczne alternatywne ramki odczytu (uORFs). Takie RNA ulegają translacji jedynie w niewielkim stopniu, chyba że zawierają wewnętrzne miejsca wejścia rybosomów (IRES) czemu dodatkowo towarzyszyć muszą warunki sprzyjające translacji zależnej od IRES (niezależnej od czapeczki) (Willis 1999, Stoneley et al. 2004).

Większość transkryptów genów lub ich fragmentów opatrzonych jest krótkimi (10–200 nukleotydowe) słabo pofałdowanymi sekwencjami 5'UTR, które zwykle czynią je mniej podatnymi na występującą w naturze regulację ekspresji na poziomie translacji. Sekwencje tych 5'UTR charakteryzuje: a) niewielka, bliska zeru energia swobodna Gibbs'a ( $\Delta G \rightarrow 0$ ), b) stan równowagi, który nie ma wpływu ani na tworzenie ani rozpad struktur drugorzędowych, c) większa szybkość translacji, d) ilościowo wyższy poziom określonych białek, e) dłuższy okres półtrwania, ale krótszy czas zajęcia rybosomu wynikający z zależności między translacją i degradacją, f) większa liczba transkryptów, g) zdolność do wydajnej translacji zależnej od czapeczki 7mG w normalnym stężeniu czynnika translacyjnego eIF4F, jak również h) zależna od sekwencji IRES zdolność do podnoszenia poziomu białka na drodze translacji niezależnej od czapeczki, zwykle w specyficznych warunkach takich jak: szok cieplny, podział komórki, stres komórkowy lub stres oksydacyjny obserwowany między innymi w guzach litych (Pelletier and Sonenberg 1985, Mathews et al. 2007).

Transkrypty zawierające długie (>200 nukleotydów, zwykle 500–1500n), mocno pofałdowane sekwencje 5'UTR stanowią ok. 10% naturalnie występujących cząsteczek matrycowego RNA, regulowanych głównie na poziomie translacji. Ten rodzaj regionów 5'UTR obfituje w sekwencje GC, utrudniając tym samym ich eksperymentalne wykrywanie. Długie nieulegające translacji regiony 5' stwierdzono między innymi w większości genów zależnych od cyklu komórkowego, których ustrukturyzowane formy 5'UTR stanowią dodatkowy mechanizm kontroli translacji, zapobiegając tym samym nadmiernej ekspresji genu. Pofałdowane sekwencje 5'UTR charakteryzuje a) mocno ujemna energia swobodna Gibbs'a ( $\Delta G \ll 0$ ), b) samorzutne tworzenie struktur drugorzędowych, c) niewielka szybkość translacji, d) niska lub niewykrywalna wydajność translacji, e) krótszy okres półtrwania ale dłuższy czas zajęcia rybosomu, f) mniejsza liczba transkryptów, g) duża liczba niecharakterystycznych otwartych ramek odczytu (uORFs) położonych w kierunku 5' od właściwego kodonu start, h) zdolność do wydajnej translacji zależnej od czapeczki 7mG w środowisku wysokiego stężenia czynnika translacyjnego eIF4E, któremu towarzyszy jednocześnie niski stosunek stężeń eIF4F/eIF4E, jak również i) zależna od obecności sekwencji IRES zdolność do podnoszenia poziomu syntezy białka na drodze translacji niezależnej od czapeczki, obserwowana zwykle w następstwie: szoku cieplnego, w trakcie podziału komórki, stresu komórkowego lub w guzach litych, jako efekt działania stresu oksydacyjnego. (Pelletier and Sonenberg 1985, Mathews et al. 2007).

Wartą podkreślenia jest obserwacja, że zwiększony poziom czynnika translacyjnego eIF4E, w sposób selektywny i nieproporcjonalnie mocniej podnosi wydajność translacji cząsteczek mRNA opatrzonych długimi i mocno ustrukturyzowanymi sekwencjami 5'UTR w porównaniu do krótkich, niefaldowanych wariantów transkrypcyjnych (Koromilas et al. 1992).

Wykazano również, że w trakcie skanowania transkryptów, czynnik eIF4E/F bierze udział w związanym ze złośliwością raka procesie prezentacji i lokalizacji alternatywnych ramek odczytu (uORFs) (Carter et al. 1999, Benedetti and Graff 2004).

Co więcej, zaobserwowano korelację między a) 3–10 krotnie podniesionym poziomem czynnika eIF4E, oznaczonym dla wielu raków i b) progresją nowotworową w kierunku złośliwego fenotypu (Kerekatte et al. 1995, Wang et al. 2001). Przedstawione powyżej dane prowadzić mogą do postawienia hipotezy, że długie, mocno ustrukturyzowane sekwencje UTR cząsteczek matrycowego RNA mogą stanowić pulę nieaktywnych translacyjnie transkryptów, rekrutowanych do syntezy białek jedynie w określonych warunkach, alternatywnie 1) na drodze translacji zależnej od sekwencji IRES, aktywowanej np. w niektórych typach tkanek lub w specjalnych warunkach takich jak niedotlenienie, obserwowane często w komórkach rdzenia guzów litych lub 2) na drodze translacji zależnej od czapeczki 5', aktywowanej np. w niektórych komórkach przerzutowych, zwłaszcza tych w których dochodzi do nadmiernej ekspresji czynnika eIF4E.

Tak więc pule nieaktywnych lub mało aktywnych translacyjnie transkryptów, opatrzonych zwykle sekwencjami o wysokim potencjale regulatorowym obecnym także w elementach cis krótkich nieustrukturyzowanych regionów regulatorowych, mogą być selektywnie rekrutowane i aktywowane przez interferujące cząsteczki eRNA niniejszego wynalazku. Opisana zdolność regulującej cząsteczki kwasu nukleinowego (nazwanej w skrócie eRNA) do wykorzystania dostępnego potencjału regulatorowego regulowanej cząsteczki matrycowego RNA umożliwia osiągnięcie efektu selektywnego wzmocnienia syntezy białek.

#### **Streszczenie wynalazku.**

Przedmiotem wynalazku jest oligonukleotyd, polinukleotyd i cząsteczka kwasu nukleinowego, nazwane w skrócie „eRNA”, zgodnie z jego zdolnością do wzmacniania (ang. enhancing) syntezy białek i przez analogię do opisanych powyżej cząsteczek siRNA (ang. small inhibitory RNA).

Ta mała wzmacniająca cząsteczka RNA należy do chemicznie i strukturalnie zróżnicowanej grupy związków syntetyzowanych i/lub izolowanych jako a) cząsteczki sztuczne (nie występujące w naturze) i/lub b) podobne do naturalnych, które w przeciwieństwie do cząsteczek siRNA, miRNA, antysensów i innych pochodnych kwasów nukleinowych (znanych jako cząsteczki hamujące) mogą **selektywnie** wzmacniać syntezę białek i wydajność translacji, co było dotąd niemożliwe i stanowi ważną przewagę technologiczną tego wynalazku.

Co najmniej jeden z wymienionych poniżej sposobów opisuje działanie cząsteczki eRNA, która jako czynnik trans może wpływać na syntezę białek przez: a) selektywne wiązanie się do elementów cis i w konsekwencji zmieniać fizyko-chemiczne właściwości docelowych cząsteczek, umożliwiając w ten sposób zwiększenie poziomu syntezy białek, b) uruchamiać zjawisko interferencji RNA (RNAi) i/lub aktywacji RNA (RNAa), tu prowadzące do wzmocnienia syntezy białek przez aktywację enzymatycznej maszynerii post-transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów, c) umożliwiać odcięcie hamujących regionów sekwencji regulatorowych docelowej cząsteczki RNA, włączając w to możliwe zaangażowanie RNazy H w odcinanie fragmentów 5'UTR, d) umożliwiając wiązanie innych czynników trans, naturalnie występujących komórkowych kwasów nukleinowych, białek regulacyjnych i/lub metabolitów, e) zmieniając zależne od energii Gibbs'a tworzenie struktur drugorzędowych ( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ,  $dG = VdP - SdT$ ) docelowych miejsc mRNA, co ma wpływ na właściwości translacyjne docelowych transkryptów, prowadząc do wzmocnienia syntezy białek.

Projekt cząsteczki eRNA oparty jest o strukturę i charakterystyczne cechy opisane w rysunkach, tabelach i zastrzeżeniach tego wynalazku, gdzie preferencyjnie projektowanie ma na celu a) linearyzację struktury docelowego regionu regulatorowego 5'UTR i/lub b) zwiększenie stopnia pofałdowania sekwencji 3'UTR i/lub c) uwolnienie regulatorowej sekwencji ułatwiającej translację przez wiązanie eRNA z dystalnymi elementami cis blokującymi tą sekwencję, i/lub d) zablokowanie sekwencji utrudniających translację przez wiązanie eRNA z tymi sekwencjami i/lub e) uwolnienie domen funkcjonalnych takich jak sekwencje IRES oraz innych domen istotnych dla sprawnej syntezy białek.

Wspomniana powyżej selektywność cząsteczki eRNA oznacza bezpośredni efekt wzmocnienia syntezy wybranego, pojedynczego białka, któremu towarzyszyć może co najwyżej 20% wzmocnienia innego białka, którego sekwencja ma co najwyżej 80% zgodności z aktywnym fragmentem cząsteczki eRNA.

Aktywny fragment cząsteczki eRNA to część sekwencji eRNA bezpośrednio wiążącej się do cząsteczki docelowej z co najmniej 90% homologią sekwencji w jednym ciągu co najmniej 6-nukleotydów.

Cząsteczka eRNA zawiera co najmniej jeden fragment aktywny, której może towarzyszyć jedna lub większą ilość sekwencji pomocniczych, które nie wykazują homologii lub prezentują jedynie niewielkie podobieństwo względem cząsteczki docelowej.

Zależne od eRNA wzmocnienie syntezy białek oznacza co najmniej 20% zwiększenie wydajności syntezy względem kontroli niestymulowanej przez eRNA.

Przedmiotem tego wynalazku jest cząsteczka eRNA lub mieszanina cząsteczek eRNA, których wzmacniające właściwości w syntezie białek można otrzymać przez zaprojektowanie oligonukleotydu, polinukleotydu i/lub cząsteczki kwasu nukleinowego wpływającego na zmianę zależnego od energii Gibbs'a fałdowania regionów regulatorowych, zwłaszcza przez działanie na sekwencję 5'UTR, co prowadzi do wzmocnienia syntezy białek, któremu towarzyszy zwykle linearyzacja docelowych struktur RNA (minimalizacja  $\Delta G \rightarrow 0$  [kcal/mol]).

Celem wynalazku jest również dostarczenie cząsteczki eRNA lub mieszaniny cząsteczek eRNA, których wzmacniające właściwości w syntezie białek można otrzymać przez zaprojektowanie oligonukleotydu, polinukleotydu i/lub cząsteczki kwasu nukleinowego wpływającego na zmianę zależnego od energii Gibbs'a fałdowania regionów regulatorowych, zwłaszcza przez działanie na sekwencję 3'UTR, co prowadzi do wzmocnienia syntezy białek, któremu towarzyszy zwykle linearyzacja struktur RNA (maksymalizacja  $\Delta G \rightarrow \infty$  [kcal/mol]).

Innym przedmiotem tego wynalazku jest dostarczenie cząsteczki eRNA lub mieszaniny cząsteczek eRNA, których wzmacniające właściwości w syntezie białek można otrzymać przez zaprojektowanie oligonukleotydu, polinukleotydu i/lub cząsteczki kwasu nukleinowego zdolnego do wiązania się do elementów cis wewnątrz regionów regulatorowych docelowych cząsteczek RNA, co w konsekwencji może wpływać na: a) wydajność syntezy białek i/lub b) wydajność transkrypcji i/lub c) wydajność wiązania czynników trans i/lub c) wydajność enzymatycznej maszynerii aktywowanej przez mechanizmy post-transkrypcyjnej i translacyjnej kontroli.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest cząsteczka eRNA lub mieszanina cząsteczek eRNA, których wzmacniające właściwości w syntezie białek można otrzymać przez zaprojektowanie oligonukleotydu, polinukleotydu i/lub cząsteczki kwasu nukleinowego oddziałującego z innymi czynnikami trans takimi jak kwasy nukleinowe i/lub białka wiążące się do elementów cis RNA, zwiększającymi w konsekwencji wydajność syntezy białek.

Tak więc, wynalazek ten rozwiązuje techniczny problem braku możliwości selektywnego wzmacniania syntezy białek, uruchamianej z jednego lub większej liczby alleli chromosomów homologicznych, co najmniej jednego z genów lub fragmentów genów, wymienionych w zastrzeżeniach, sekwencjach i tabelach wynalazku, preferencyjnie co najmniej jednego z wymienionych genów: TP53, BAX, CDKN2A, MYC, CDK4, RB1, NOD2, CHEK2, INBS1, MSH2, MLH1, MSH6, BRCA1, BRCA2, APC, INS GH1, EGF, VEGF, IFNA1, IFNA2, IFNB, IFNG, IGF1 i wielu innych naturalnie występujących lub zmienionych genów lub fragmentów genów, których ekspresja jest zbyt niska i/lub pożądana jest wyższa ekspresja, zwłaszcza supresorów, genów mutatorowych, genów związanych z powstawaniem guza/raka, genów zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną jak również wariantów genetycznych tych genów, ich delecyjnych, inercyjnych i substytucyjnych form, stosowanych w biotechnologii przemysłowej, farmacji, biotechnologii medycznej i terapii genowej.

Wynalazek przewiduje dostarczenie cząsteczki eRNA lub mieszaniny cząsteczek eRNA, których budowa strukturalna podobna jest do co najmniej jednego z wymienionych typów cząsteczek w tym: a) sensu/antysensu, b) sondy, c) miRNA/anty-miRNA, d) siRNA, e) rybozymu, f) dnazyimu, g) aptameru, i/lub h) innego regulatorowego czynnika trans, zdolnego do selektywnego wzmacniania syntezy białek.

Wynalazek przewiduje dostarczenie cząsteczki eRNA lub mieszaniny cząsteczek eRNA, syntetyzowanej sposobem technicznym z wykorzystaniem metod chemicznych i/lub biotechnologicznych i/lub biologii molekularnej w celu otrzymania sztucznej lub podobnej do naturalnej cząsteczki eRNA lub mieszaniny cząsteczek eRNA, wykazujących aktywność selektywnego wzmacniania syntezy białek i działających jak selektywny wzmacniacz syntezy (enhancer).

Wynalazek przewiduje dostarczenie cząsteczki eRNA lub mieszaniny cząsteczek eRNA, które chemicznie charakteryzuje co najmniej jedna z wymienionych cech: a) są sztuczne, zewnętrzne, b) podobne do naturalnie występujących, c) niemodyfikowane chemicznie (DNA, RNA, inne kwasy nukleinowe), d) modyfikowane chemicznie (takie jak: LNA, PNA PTO, O-2'-metyl-RNA, tio-pochodne kwasów rybonukleinowych jak również innych modyfikowanych cząsteczek), w każdym przypadku wykazujące aktywność selektywnych wzmacniaczy syntezy białek.

Wynalazek przewiduje dostarczenie cząsteczki eRNA lub mieszaniny cząsteczek eRNA, które są a) izolowane z tkanek i/lub b) płynów ciała i/lub c) zsyntetyzowane sposobem technicznym.

Wynalazek przewiduje dostarczenie cząsteczki eRNA lub mieszaniny cząsteczek eRNA, które wiążąc się do docelowej cząsteczki RNA, zwłaszcza do nieulegającego translacji regionu 5' (5'UTR) cząsteczki mRNA, wykazuje właściwości wzmacniania wydajności syntezy białek kodowanych przez a) geny opisane w zastrzeżeniach, wykresach, sekwencjach i tabelach wynalazku i/lub b) wielu innych naturalnie występujących i modyfikowanych genów lub ich fragmentów, których ekspresja jest zbyt niska lub pożądaną jest wyższy poziom ekspresji.

Wynalazek przewiduje zasady projektowania cząsteczki eRNA jak również przygotowywania mieszaniny cząsteczek eRNA, wykazujących właściwości wzmacniania syntezy białek i wysoki poziom selektywności względem docelowego allelu lub genu, a) preferencyjnie projektowanych na podstawie a.1) sekwencji genów jednego lub większej liczby alleli chromosomów homologicznych, w tym co najmniej jednej sekwencji opisanej w zastrzeżeniach, wykresach, sekwencjach lub tabelach wynalazku, i/lub a.2) sekwencji wielu innych modyfikowanych lub występujących w naturze genów lub ich fragmentów, których ekspresja jest zbyt niska lub pożądaną jest wyższy poziom ekspresji, b) preferencyjnie projektowanych jako typowe oligonukleotydy, polinukleotydy, miRNA, siRNA, cząsteczki sensów, antysensów, molekularnych sond, których sekwencja projektowana jest jednak na podstawie specjalnych, docelowych miejsc wiązania eRNA, opisanych w niniejszym wynalazku jako sekwencje regulatorowe, b.1) zwłaszcza wysoce ustrukturyzowane elementy cis, IRE, IRES, umiejscowione zwłaszcza w regionach 5'UTR i/lub b.2) słabo pofałdowane elementy cis sekwencji 3'UTR.

Wynalazek przewiduje dostarczenie cząsteczki eRNA lub mieszaniny cząsteczek eRNA, które mają zastosowanie w biologii medycznej, chemii medycznej, biotechnologii, farmacji, biochemii, biofizyce, bioinżynierii, biologii, chemii, fizyce, przemyśle, weterynarii, biologii roślin i zwierząt, medycynie molekularnej a zwłaszcza w preparatach medycznych zawierających materiał genetyczny dostarczany do wyizolowanych ex-vivo komórek jak również komórek żywego ciała w celu przeprowadzenia terapii chorób genetycznych, w tym nowotworów, chorób infekcyjnych i chorób dziedzicznych.

Wynalazek przewiduje, że cząsteczka eRNA lub mieszanina cząsteczek eRNA zawierających co najmniej jedną sekwencję, jej fragment lub pochodną, wykazuje co najmniej 80% identyczności sekwencji, zwłaszcza co najmniej ok. 90% podobieństwa sekwencji, szczególnie co najmniej 95% identyczności sekwencji względem cząsteczki kwasu nukleinowego, scharakteryzowanego przez unikatowe cechy i/lub zastosowania opisane w zastrzeżeniach, wykresach i tabelach niniejszego wynalazku.

Wynalazek przewiduje, że cząsteczka eRNA lub mieszanina cząsteczek eRNA obejmujących co najmniej jedną sekwencję lub jej fragment lub pochodną, wykazuje co najmniej 80% podobieństwa działania eRNA, scharakteryzowanego szczegółowo w zastrzeżeniach, wykresach i tabelach wynalazku, szczególnie zsyntetyzowanych zgodnie z założeniami wynalazku, zwłaszcza na podstawie sekwencji genów wymienionych w tabeli 2-A i tabeli 2-B.

Wynalazek przewiduje, że cząsteczka eRNA – DNA i/lub RNA i/lub pochodna kwasu nukleinowego, jest zdolna do hybrydyzacji w rygorystycznych warunkach z co najmniej jedną z sekwencji opisanych w tabeli 2-A i 2-B tego wynalazku.

**Przedmiot wynalazku przedstawiony w przykładach wykonania** jest uwidoczniony na rysunkach: Rys. 1, 2, 3, 4.

**Rysunek 1.** Kontrola translacji jest jednym z ważnych mechanizmów regulacji syntezy białek odbywających się na poziomie post- transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów, włączając w to zależną od allela translację z macierzystego (A.1) lub ojczystego (A.2) allela, wykazujących różnice w zakresie SNP (polimorfizmów pojedynczych nukleotydów) pokazanych na Rys 1.A.2 w postaci małych gwiazdek. mRNA, pełniąc funkcję matrycy syntezy białek, składa się z trzech regionów: nieulegającego translacji regionu 5' (5'UTR), sekwencji kodującej (CDS) i nieulegającego translacji regionu 3' (3'UTR), zawierających zwykle kilka regulatorowych elementów cis (np.: w zakresie 5'UTR: element odpowiedzi na żelazo – IRE, wewnętrzne miejsce wejścia rybosomu -IRES, element przesunięcia ramki odczytu, rybo-przełącznik, sekwencja liderowa białka rybosomalnego, alternatywne ramki odczytu -uORFs, specyficzne drugorzędowe i trzeciorzędowe struktury sfałdowanego RNA, struktura spinki do włosów, sekwencja kierująca wbudowywaniem selenocysteiny- SECIS, w zakresie 3'UTR: element bogaty w sekwencje AU, sygnał poliadenylacji, jak również inne sekwencje kwasów nukleinowych. Sekwencje cis znaleźć można również w DNA: operon, promotor, terminator, kasetta tata, element odpowiedzi hormonalnej -HRE i wiele innych sekwencji cis). Wszystkie te sekwencje regulatorowe mogą wiązać czynniki trans (takie jak: miRNA, zwykle rozumiane jako czynniki wiążące się do 3'UTR i hamujące syntezę, cząsteczka antysensu, sztuczna cząsteczka siRNA, białko regulacyjne, podjednostka rybosomu, polimeraza, odwrotna transkryptaza i wiele innych). Trójkątami wskazano

cząsteczkę kwasu nukleinowego zdolnego do selektywnego wiązania się do jednego lub większej ilości alleli genu lub jego fragmentu, selektywnie wzmacniającą syntezę wybranego białka (B., tutaj: jako sztuczne, podobne do miRNA oligonukleotydy, selektywnie wiążące się do 5'UTR mRNA alleli p53). Cząsteczka kwasu nukleinowego, która jest przedmiotem niniejszego wynalazku została oznaczona w skrócie jako eRNA, na podstawie jej zdolności do wzmacniania syntezy białek i przez analogię do opisanych powyżej cząsteczek siRNA.

**Rysunek 2.** Przykład zastosowania eRNA jako cząsteczki kwasu nukleinowego umożliwiającego wzmocnienie syntezy białka w sposób selektywny względem genu lub allelu [B.1., B.2.], Jednociowe lub dwunociowe eRNA pokazano pogrubioną linią prostą lub linią zawierającą pętlę zakończoną strzałką na 3' jej końcu (czerwone linie) [B.1., B.2., B.3., B.4.a., B.4.b., B.4.C., B.5.a., B.5.b., B.5.C., B.6.a-g., C.1.]. Naturalnie występujące cząsteczki miRNA i siRNA przedstawiono linią wykropkowaną zakończoną strzałką na 3' końcu sekwencji (niebieskie linie) [C.2., C. 3]. Mutacja C2756T obecna w sekwencji IRES 5'UTR transkryptu c-Myc [A.] conajmniej jednego z alleli, obserwowana w 42% próbek szpiku kostnego (Paulin et al., 1996) prowadzi do zwiększenia wydajności wiązania czynników translacyjnych (Paulin et al, 1998) a w konsekwencji do nasilenia inicjacji translacji białka c-Myc-2 w sposób niezależny od czapeczki [A.], co wskazuje na nowy mechanizm onkogenezy (Stephen et al., 2000). Nadekspresja c-Myc-2 może być selektywnie zredukowana przez zastosowanie poznanej wcześniej technologii wyciszania genów przez zastosowanie cząsteczek siRNA [C.2] selektywnie wiążących się do zmutowanego allele genu [C.] i/lub przez zastosowanie eRNA, jako środka przeciwnowotworowego o budowie przypominającej sztuczne miRNA [B.1.], sondę, antysens/sens [B.2.], umożliwiającego selektywną nadekspresję prawidłowego białka c-Myc-1 z prawidłowego (nie zmutowanego) allelu [B.]. eRNA przedstawione w punkcie [C.1] prezentuje możliwość wzmacniania syntezy białek w oparciu o zmutowany allel lub sztuczną sekwencję lub gen lub fragment genu, którego wydajność syntezy białek jest zbyt niska lub powinna być wyższa. Naturalnie występujące miRNA, wiążąc się do 3'UTR [C.3] może niespecyficznie hamować syntezę grupy białek w (miRNA wiążąc się zwykle do co najmniej kilku mRNA). Niepełna homologia sekwencji między eRNA i matrycowego RNA [B., C.] została przedstawiona jako centralnie położona pętla na liniach eRNA zakończonych strzałką na 3' jej końcu [B.1., B.3., B.4.a., B.4.b., B.4.C., B.5.a., B.5.b., B.5.C., C.1.], gdzie eRNA o strukturze szpilki do włosów [B.4.b] lub dwunociowe eRNA [B.5.b] zawierające dwie pętle, stanowią przykład pełnej lub niemal pełnej komplementarności obydwu nici eRNA względem siebie i jednocześnie niepełnej homologii sekwencyjnej względem docelowego RNA. Punkt [B.6.a-g] przedstawia eRNA, zakończone na 3' końcu sekwencją (3'(N)n) zawierającą n-nukleotydów, N-zasad (G, A, C, T,U lub modyfikowanych), zwłaszcza homologicznych do docelowej sekwencji i stosowanych w celu zwiększenia selektywności i/lub N-zasad sprzężonych z transfektantem i/lub cząsteczką ochronną i/lub modyfikowanymi nukleotydami stymulującymi pobieranie eRNA przez komórki (e.g.: tiofosforanowe nukleotydy DNA, tio-rybo-pochodne lub nukleotydy amino-NTP włączane do eRNA przez transferazę nukleotydów terminalnych).

**Rysunek 3.** Przykład sekwencji i struktur eRNA umożliwiających selektywne wzmacnianie syntezy białek [A., B., D-J.] lub wyciszanie genów [C] z geno- lub allelo-specyficzną selektywnością, zaprojektowanych na przykładzie genu MYC (c-Myc). Sekwencje wynalazku przedstawiono w dziale „lista sekwencji”.

- A. Sekwencja sztucznej, podobnej do miRNA cząsteczki eRNA, stosowanej w celu selektywnego wzmocnienia prawidłowego allela genu MYC.
- B. Sekwencja sztucznej, podobnej do miRNA cząsteczki eRNA, stosowanej w celu selektywnego wzmocnienia zmutowanego allela genu MYC.
- C. Sekwencja cząsteczki siRNA, stosowanej w celu selektywnego wyciszenia zmutowanego allela genu MYC (technologia wyciszania genów).
- D. Sekwencja podobnej do antysensu cząsteczki eRNA, zmodyfikowanej przez dodanie 3'(N)n końca zawierającego n-nukleotydów, N-zasad stosowanej w celu selektywnego wzmacniania lub jako transfektant/protektant.
- E. Sekwencja podobnej do sensu cząsteczki eRNA.
- F. Struktura podobnej do miRNA cząsteczki eRNA z centralnie położoną pętlą (niedopasowaniem względem sekwencji docelowego RNA).
- G. Struktura podobnej do miRNA, dwunociowej cząsteczki eRNA, zawierającej dwie centralnie położone pętle z pełną lub niemal pełną komplementarnością nici eRNA i jednocześnie niepełną homologią sekwencyjną względem docelowego RNA.

- H. Struktura podobnej do miRNA, dwuniciowej cząsteczki eRNA, zawierającej jedynie jedną centralnie położoną pętlę na nici antysensownej z częściową komplementarnością nici eRNA i jednocześnie wysoką homologią sekwencyjną nici sensownej względem docelowego RNA.
- I. Struktura podobnej do miRNA, dwuniciowej cząsteczki eRNA, zawierającej jedynie jedną centralnie położoną pętlę na nici sensownej z częściową komplementarnością nici eRNA i jednocześnie wysoką homologią sekwencyjną nici antysensownej względem docelowego RNA.
- J. Struktura spinki do włosów, podobnej do miRNA, dwuniciowej cząsteczki eRNA, zawierającej dwie centralnie położone pętle z pełną lub niemal pełną komplementarnością nici eRNA i jednocześnie niepełną homologią sekwencyjną względem docelowego RNA. Ta struktura spinki do włosów reprezentuje grupę harpinowych eRNA podobnych do powyżej zaprezentowanych dwuniciowych eRNA.

**Rysunek 4.** Przykład efektywności i selektywności cząsteczki eRNA skierowanej na element cis sekwencji 5'UTR genu TP53. Materiały i metody: chemiczna synteza cząsteczek 2'-O-metylo-RNA; wprowadzenie eRNA (o budowie podobnej do sensu, antysensu, anty-miRNA, miRNA) lub siRNA (jako kontroli technologii eRNA), wszystkie zaprojektowane tak aby wiązać się do cząsteczek mRNA białka p53; lizat linii komórkowej HeLa; analiza western blot (średnia +/- błąd standardowy) poziomów białka (N = 30); analiza poziomów transkrypcji real-time PCR (N = 30); dane wyrażone jako gęstość optyczna (OD) białek. (A. p53, B.  $\beta$ -aktyny) znormalizowana do 100% kontroli (bez dodatku eRNA) i podzielona następnie przez znormalizowane dane transkrypcji w celu wyeliminowania efektów regulacyjnych eRNA na transkrypcyjnym i post-transkrypcyjnym poziomie, statystyka: ANOVA \*p < 0.001 wzgl. kontroli.

**A. Wydajność translacji białka p53.** Sekwencja sztucznej, podobnej do miRNA cząsteczki eRNA wzmacnia wydajność translacji 2,98-krotnie. Interesującą wydaje się być obserwacja, że cząsteczka eRNA podobna do sensu jak również antysensu może wzmocnić syntezę białek, zwłaszcza kiedy zostanie zaprojektowana w oparciu o element cis sekwencji 5'UTR. Inne, nie pokazane tutaj dane wskazują, że pełna lub niemal pełna homologia eRNA (o budowie podobnej do sensu/antysensu/sondy) z docelową sekwencją RNA działa bardziej efektywnie jako wzmacniacz syntezy białek w przypadku roślin, niższych organizmów i biotechnologii opartej o rośliny, podczas gdy niepełna homologia eRNA o budowie podobnej do miRNA jest najbardziej efektywna w komórkach ludzkich i ludzkich/zwierzęcych systemach biotechnologicznych syntezy białek (jak to pokazano na wykresach słupkowych).

**B. Translacja białka  $\beta$ -aktyny.** Sekwencja sztucznej cząsteczki eRNA podobnej do miRNA jak również innych rodzajów struktury eRNA, które zostały zaprojektowane by wiązać się do p53, nie ma wpływu na wydajność translacji  $\beta$ -aktyny, co wskazuje na wysoką selektywność eRNA.

#### **Opis preferowanych zastosowań.**

Powyższe oraz inne przedmioty, cechy i korzyści wynikające z tego wynalazku przedstawione zostały w kontekście zamieszczonych rysunków, sekwencji, tabel, opisów i zastrzeżeń.

W preferowanym zastosowaniu, cząsteczka eRNA posiada strukturę podobną do microRNA (miRNA), zwłaszcza zakończoną sekwencją dwóch nukleotydów TT na jej 3' końcu, zaprojektowaną na podstawie sekwencji 5'UTR supresora, zwłaszcza TP53, BRCA1, BRCA2, CDKN2A lub sekwencji cytokiny, szczególnie IFNA1, IFNA2, IFNB, IFNG, IL1, IL6, IL8, IL10 lub innych genów, szczególnie wymienionych w Tabeli – 2 tego wynalazku. Cząsteczka ta wytwarzana jest sposobem technicznym na drodze chemicznej syntezy i/lub w oparciu o biologiczne systemy wektorowe, otrzymywana jako oligonukleotyd i/lub polinukleotyd i/lub cząsteczka kwasu nukleinowego typu RNA i/lub DNA i/lub jej modyfikacja, szczególnie zawierająca pochodne tio-rybonukleotydów lub analogi oligonukleotydów z wiązaniami fosforotiolowymi (PTO), i/lub O-2'-metylo-RNA i/lub pochodne kwasów nukleinowych typu LNA – usztywnianych mostkiem metylenowym lub mieszaniną tych cząsteczek. eRNA znajduje zastosowanie szczególnie jako składowa preparatu medycznego wprowadzanego do żywego ciała ludzkiego lub zwierzęcego, zwłaszcza z wykorzystaniem ochronnego nośnika transfekującego, w szczególności pochodnej kwasu tłuszczowego i/lub kardiolipiny i/lub innej cząsteczki oligo/polinukleotydu sprzężonej z polikationem, zwłaszcza cząsteczki DNA lub jej pochodnej sprzężonej z co najmniej jednym z nośników takich jak: poliimina, poliimid, poliamina, nukleotyd kowalencyjnie związany z aminami (amine-NTP), selektywnie wiążący aptamer, selektywnie wiążące białko, selektywnie wiążący oligonukleotyd, liposom, nośnik pochodzenia wirusowego. W preferowanym zastosowaniu cząsteczka eRNA znajduje zastosowanie w terapii przeciw-nowotworowej, szczególnie działa-

jąc przez selektywne wzmocnienie genu supresora lub w terapii skierowanej przeciw mikroorganizmom, szczególnie działając przez wzmocnienie translacji genów odpowiedzi immunologicznej.

W innym preferowanym zastosowaniu, sztuczna cząsteczka eRNA posiada strukturę podobną do microRNA (miRNA), zaprojektowaną na podstawie sekwencji 5'UTR muratora, genu naprawy lub genu związanego z procesami starzenia, zwłaszcza MLH1, MLH3, MSH2, MSH6, PMS1, TERT, COL1A1-COL9A1, SIRT1 lub innych genów, szczególnie wymienionych w Tabeli – 2 tego wynalazku. Cząsteczka ta wytwarzana jest sposobem technicznym na drodze chemicznej syntezy i/lub w oparciu o biologiczne systemy wektorowe, otrzymywana jako oligonukleotyd i/lub polinukleotyd i/lub cząsteczka kwasu nukleinowego typu RNA i/lub DNA i/lub jej modyfikacja, szczególnie zawierająca pochodne tio-rybonukleotydów lub analogi oligonukleotydów z wiązaniami fosforotiolowymi (PTO), i/lub O-2'-metylo-RNA i/lub pochodne kwasów nukleinowych typu LNA lub mieszaninę tych cząsteczek. eRNA znajduje zastosowanie szczególnie jako składowa preparatu medycznego wprowadzanego do żywego ciała ludzkiego lub zwierzęcego, zwłaszcza z wykorzystaniem ochronnego nośnika transfekującego, w szczególności pochodnej kwasu tłuszczowego i/lub kardiolipiny i/lub innej cząsteczki oligo/polinukleotydu sprzężonej z polikationem, zwłaszcza cząsteczki DNA lub jej pochodnej sprzężonej z co najmniej jednym z nośników takich jak: poliimina, poliimid, poliamina, nukleotyd kowalencyjnie związany z aminami (amine-NTP), selektywnie wiążący aptamer, selektywnie wiążące białko, selektywnie wiążący oligonukleotyd, liposom, nośnik pochodzenia wirusowego. W preferowanym zastosowaniu cząsteczka eRNA znajduje zastosowanie w medycynie estetycznej, zwłaszcza przez wzmocnienie ekspresji genów takich jak kolageny, telomeraza lub inne geny biorące udział w procesach starzenia.

W kolejnym preferowanym zastosowaniu, cząsteczka eRNA posiada strukturę podobną do oligonukleotydu typu sens i/lub antysens, zaprojektowaną z pełnym lub prawie pełnym dopasowaniem do sekwencji genu rośliny, którego ekspresja jest zbyt niska lub pożąda się większej ekspresji tego genu. Cząsteczka ta wytwarzana jest sposobem technicznym na drodze chemicznej syntezy i/lub w oparciu o biologiczne systemy wektorowe i znajduje zastosowanie w biotechnologii roślin.

W innym preferowanym zastosowaniu, cząsteczka eRNA posiada kombinację strukturalnych i funkcjonalnych cech, przedstawionych szczegółowo w zastrzeżeniach, tabelach, rysunkach, opisach i sekwencjach niniejszego wynalazku.

T a b e l a 1

Porównanie najważniejszych właściwości wybranych cząsteczek kwasów nukleinowych, wykazujących aktywność czynników trans jak również indukujących zjawisko RNAi (interferencji RNA) lub aktywność związaną rozcinaniem RNA - miejsce eRNA w grupie cząsteczek wywołujących zjawisko RNAi

Naturalnie występujące cząsteczki kwasów nukleinowych.					Cząsteczki kwasów nukleinowych, wyprodukowane sposobem technicznym.			
typ interferujących RNA:	dopasowanie/homologia/komplementarność z docelową cząsteczką RNA	typowe pochodzenie komórkowe	typowa natura biochemiczna	typowe, docelowe regiony mRNA /działanie w komórce	dostępne podstawowe technologie, wykorzystujące cząsteczki kwasów nukleinowych / typowe działanie w komórce	pochodzenie/selektywność/specyficzność/	typowe, docelowe regiony mRNA	typowa natura biochemiczna
miRNA (mikroRNA)	niepełna homologia, zwykle z małą 2-5 nukleotydową pętlą w środkowej części miRNA	endogenne – transkrybowane w komórkach eukariotycznych z genów miRNA	jednoniciowe (21-25 nukleotydowe) ssRNA	docelowe regiony 3'UTR, częściowe zahamowanie translacji któremu nie towarzyszy degradacja mRNA; jeden z najważniejszych mechanizmów regulacji ekspresji genów; -działanie na poziomie post-transkrypcyjnym, precyzyjniej pre-translacyjnym	1. technologia zależnego od miRNA hamowania translacji (np. onkogenów); 2. syntetyczne antymiRNA stosowane dla celów blokowania natywnych miRNA	syntetyczne lecz projektowane na podstawie baz danych miRNA lub natywne miRNA; nieselektywne, niespecyficzne wiążące się do licznych mRNA.	zwykle 3'UTR	RNA, DNA i modyfikowane pochodne
shRNA /siRNA (krótkie harpinowe RNA / małe hamujące cząsteczki RNA)	niemal pełna komplementarność	endogenne, wytworzone z egzogennych przez pocięcie dwuniciowego RNA (dsRNA) np.: w wyniku odpowiedzi przeciwvirusowej, rzadko występujące naturalnie	dwuniciowe (19-23) dsRNAs	zwykle, docelowe sekwencje kodujące (CDS) / całkowite zahamowanie translacji z jednoczesną degradacją mRNA; -działanie na poziomie post-transkrypcyjnym	zależna od siRNA / shRNA degradacja transkryptów I niemal całkowite zahamowanie translacji (np. wyciszenie onkogenów)	syntetyczne, sztuczne cząsteczki zaprojektowane na podstawie sekwencji docelowej; selektywne; specyficzne	zwykle CDS (sekwencja kodująca mRNA)	RNA, DNA i modyfikowane pochodne
oligonukleotydy typu sens / antisens /sonda	pełna komplementarność	endogenne, wytworzone z egzogennych przez pocięcie jednoniciowego RNA (ssRNA) np.: w wyniku odpowiedzi przeciwvirusowej; rzadko występujące naturalnie	jednoniciowe (16-25 lub dłuższe) ssRNA	zwykle docelowe sekwencje CDS, częściowe zahamowanie syntezy białek; -działanie na poziomie pre-translacyjnym	sens/ antisens/ sonda/ zależne od oligonukleotydu / polinukleotydu zahamowanie translacji	syntetyczne, sztuczne cząsteczki, opracowane na podstawie docelowej sekwencji; selektywne; specyficzne	zwykle CDS (sekwencja kodująca mRNA)	RNA, DNA i modyfikowane pochodne
opisana w niniejszym wynalazku cząsteczka eRNA - nowy rodzaj kwasu nukleinowego, który może uruchamiać zjawisko RNAi i/lub odcinania hamujących sekwencji regulatorowych, prowadząc w konsekwencji do selektywnego wzmocnienia syntezy białek	całkowita lub częściowa komplementarność, zwykle zależna od gatunku	endogenne lub egzogenne cząsteczki	dowolne cząsteczki RNA i DNA zdolne do wzmocnienia syntezy białek, zwykle nieselektywne	1. zwykle docelowe sekwencje 5'UTR, 2. wzmocniające translację grupy genów, zwykle niespecyficznie/ -działanie na poziomie pre-translacyjnym	1. technologia selektywnego wzmocnienia syntezy białek i wydajności translacji wybranych genów/ strukturalnie: jednoniciowe cząsteczki podobne do: miRNA (szczególnie w odniesieniu do ludzkich i zwierzęcych komórek) jak również podobne do sensu/antisensu/sondy (zwłaszcza w odniesieniu do roślin oraz komórek niższych organizmów) i/lub dwuniciowe kwasy nukleinowe; 2. technologia dotychczas nie była dostępna	zwykle, sztuczne, syntetyczne cząsteczki, zaprojektowane na podstawie dowolnej sekwencji docelowej /  wysocze-selektywne i specyficzne wzmocniacze syntezy białek	5'UTR lub dowolna sekwencja RNA poniżej sekwencji 5'UTR, szczególnie regulatorowe sekwencje cis i/lub mocno pofalldowane sekwencje 5'UTR i/lub słabo pofalldowane sekwencje 3'UTR	RNA, DNA i modyfikowane pochodne, LNAs, PNAs, UNAs, 2'O-Me, PTO, tio-rybo-pochodne, oraz inne modyfikacje

Tabela 2-A

Lista sekwencji cząsteczki kwasu nukleinowego (eRNA) będącego przedmiotem wynalazku. Sekwencje przedstawiono w konwencji od 5' do 3' końca. Tabla-2.A. Lista sekwencji:

e1	CGCTCGACTCTTATCAGAAGTCCATATCCATCC	e86	CTGCTCTTCACTGCTCCAG	e157	CAAGAGCTTCCCTGCTTCCA	e225	GCATCACCAGAGAACGGGAAGAAATTCATTGAAT
e2	ATCGAAGCGCGGATGGAAGCAGTGTGCTGG	e87	CGGACATGAGGAGCTGTGC	e158	CTTCAACCTAGCATCATTACC	e226	CGACCTGACTGCTGACTCTCAGATGACTCCATT
e3	GGCATCCCTCAGTATGSA	e88	CGCGACATGGAGGAGCTG	e159	CCATGCTGAAACTTCTCAAC	e227	AACAAGCTTCTTCTAGATGACTCCATTAATAAATTC
e4	TCCTCAGAAGTGCATATCC	e89	GACCACTCGACAGGTTCTG	e160	CTGGAGTGGTCTGAGTGA	e228	AATGAAATTCAGAAGCTTTGTA
e5	CGCTCGACTCTTGAAGACTTTCGGGTGGA	e90	GCTGAATTCATATCCTGAGTCA	e161	CCACTAAGTTTGAATCATGCG	e229	AACAAGCTTCTTCTAGATGACTCCATTTAAAATTC
e6	CGGATCGTCAACAATG	e91	CCACAAGATGGTCAAGTTC	e162	CTTTCGGTGTGAAGAATACA	e230	AATGAAATTCAGAAGCTTTGTA
e7	GCTGGGTGTGAAGGCTCT	e92	GAGAGAGGCGCTCCCAAC	e163	CGGATATATCATAGGAATCCCA	e231	AGCCAGCTTCTTCTAGATGACTCCATTTAAAATTC
e8	ATCGAAGCGCGGATGATGATGATATGCGCG	e93	GCTTGGAGGAGTCTCACCAC	e164	ATAGACAGTGTGGGTGAGA	e232	GCATCACCAGAGAAGGATTTTCTCATTCTCCAT
e9	GGTATATAGTATCCCTGAT	e94	CAAGCCCTGTGACCAAG	e165	CAGAGAGATGTGTCTAAG	e233	CGACTGACTTCTGACTCAGAGGAGATCCCAAGCC
e10	GAGGTGATACAGAGTGGT	e95	GGTGGAGGCTTGAAGAT	e166	AGCGCCCTCTCTGCA	e234	AACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e11	GATAGCGAATGTGAAGCAG	e96	GGAGCGCGTGTGA	e167	GGGGTGAAGTCTGTGCT	e235	AACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e12	CCAACTTGGTACAGTGTGTT	e97	AAAAAAAAGAGAGAGTCTAGGTCAGA	e168	GACAAGGCTGTGCTGGA	e236	AATGAAATTCAGAAGCTTTGTA
e13	CGAATTAGACATTTAGTAGCCA	e98	GACTTCAGTACCCGGGCG	e169	CGACCACTCTGTATCCACTCC	e237	ACTGATGTCAGATACCCA
e14	CAGAGTTCAGTGAAGTCA	e99	GTGGGTGAGTACTCTCAAGC	e170	CCUUCUGAGCGCAGGGCCCACT	e238	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e15	AGTTTCAAGAGGGAATCTGA	e100	GCTTGGAGTATAGTCAACCAAC	e171	UCCUGAGCGCAGGGGCCAGTT	e239	AATGAAATTCAGAAGCTTTGTA
e16	CGTACTGAATAATCAGAGTCA	e101	CCUUCUGAGCGCAGGGGCCAGTT	e172	UCCUGAGCGCAGGGGCCAGTT	e240	CGACTGACTTCTGACTCAGAGGAGATCCCAAGCC
e17	CGAAGTGTAGAGGATCAG	e102	UCUCGCGGUAUCCGCGGCTT	e173	AACUGAGCGCAGGGGCCAGTT	e241	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e18	ACCTATGGCTACACTCTCA	e103	AACGCGCGGAUACCGCGGAGA	e174	GUACTTUAUUUUCUUAUUCUGAGAGGCGUUCU	e242	AACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e19	GGAGCGGCAATAGATGAT	e104	UCACGUGACCGCGCGCUCGCGCGCCGCGCG	e175	GGUAAAGUUCUUAUUCUGAGAGGCGUUCU	e243	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e20	CGAGCTTGGAGGAGGAGCA	e105	GCCCGCGGACCCGCGGAGG	e176	GGUAAAGUUCUUAUUCUGAGAGGCGUUCU	e244	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e21	CGAGATGTGGAATCTGGA	e106	TCGGTACTTACTATGCT	e177	GGUAAAGUUCUUAUUCUGAGAGGCGUUCU	e245	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e22	TCGGATCTTCTTCTG	e107	CCCTCAAAAGCTTACTCTCA	e178	GGUAAAGUUCUUAUUCUGAGAGGCGUUCU	e246	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e23	GATGCTATGGGAGTCTG	e108	CTCCTGGCTTASACTAAGC	e179	GGUAAAGUUCUUAUUCUGAGAGGCGUUCU	e247	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e24	GATGATGATAATGATGAGA	e109	TTACAGGCAAACTACTGA	e180	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e248	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e25	GACTTGTGGTACGAGTCA	e110	AGATGACTTGGCGTCTT	e181	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e249	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e26	CGGTATATGATGAGTGA	e111	CCCTCAAAAGCTTACTCTCA	e182	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e250	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e27	CACAGATCAGAGCAGCTCA	e112	GACACTGACAGTGTGCT	e183	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e251	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e28	GACGAGTGTGCTGGA	e113	GCAATTTGGGAAGTGTCT	e184	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e252	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e29	GTGCTGACTCAGACCTA	e114	CGTGGATCTTAACTCTCAAAAACC	e185	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e253	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e30	GTGCTGACTCAGACCTA	e115	ATCGAAGCGCGGTTATGGTGGTTTGTGATG	e186	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e254	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e31	GTGCTGACTCAGACCTA	e116	CGTGGATCTTAACTCTCAAAAACC	e187	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e255	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e32	GAGTGTGACTACCACTAC	e117	ATCGAAGCGCGGTTATGGTGGTTTGTGATG	e188	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e256	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e33	TCAGTCTGATATTTGGT	e118	GAAGAAGCGCGGUAUUCAGAUAAAUU	e189	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e257	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e34	ATTCAGGCTAAAGTGGTGA	e119	AACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e190	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e258	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e35	GATGATGATGATGATGAT	e120	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e191	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e259	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e36	GTGCTGACTCAGACCTA	e121	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e192	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e260	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e37	CATGACCACTGACTGAGTGA	e122	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e193	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e261	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e38	GCATATTTCAATGGTGTCA	e123	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e194	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e262	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e39	CGTTTAAAGTGGTACCTAGT	e124	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e195	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e263	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e40	TCAGCAGCAGTGTGACTGA	e125	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e196	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e264	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e41	TCAGCAGCAGTGTGACTGA	e126	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e197	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e265	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e42	TCAGCAGCAGTGTGACTGA	e127	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e198	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e266	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e43	GACACTTCAITTTGAGTACT	e128	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e199	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e267	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e44	GAGTACCAAAATGGCTGAT	e129	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e200	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e268	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e45	GTAAATACCAATCACTACT	e130	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e201	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e269	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e46	ACAGATAAGTGTACTTGTGCTGATGCTTGG	e131	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e202	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e270	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e47	AGTTTGTCAAAGCAATTCAGCATATGCTTGTGTA	e132	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e203	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e271	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e48	ACCTGCAAAATGAGCAGAAATAAAGAAAGATGGG	e133	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e204	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e272	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e49	ACAGATAAGTGTACTTCTGATGTTCTTGTCTCAC	e134	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e205	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e273	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e50	AGTTTGTCAAAGCAATTCAGCATATGCTTGTGTA	e135	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e206	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e274	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e51	ACCTGCAAAATGAGCAGAAATAAAGAAAGATGGG	e136	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e207	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e275	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e52	TCCTTGTGGTCACTCTCC	e137	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e208	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e276	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e53	GTGACTGTGAATGTATGG	e138	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e209	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e277	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e54	GGTGTAAATCAGAGCAGCAG	e139	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e210	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e278	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e55	CTGCTGGAATCTGCTCACA	e140	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e211	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e279	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e56	GTGCTCTCAGTATAAAGCAGT	e141	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e212	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e280	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e57	ACGGCAAGCTCTCAGACA	e142	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e213	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e281	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e58	TTGTCAAAGCAATTCAGG	e143	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e214	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e282	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e59	CCCTCAAAATGAGCAGAAATAAAGAAAGATGGG	e144	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e215	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e283	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e60	TTGATCTTGTATGCTTCTGCTCACTT	e145	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e216	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e284	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e61	TTCTCTCAGTATAAAGCAGGATAAGTGTACTTT	e146	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e217	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e285	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e62	GTTCAGCATTTGGATTCAGTGT	e147	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e218	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e286	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e63	CAGCAAGCAAGTGGCAAGT	e148	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e219	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e287	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e64	GGAAATGTGACCAATAGCCAT	e149	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e220	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e288	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e65	GGACTGGAACAGAGCAGTCA	e150	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e221	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e289	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e66	CAAGGGTTOGTTCTTCTGCG	e151	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e222	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e290	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e67	GAGGCCCTCAGCTGAAGT	e152	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e223	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e291	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e68	AGTGAAGCAGCACTTACTGTAATCCAGAGCAGC	e153	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e224	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG	e292	AGCCAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG
e69	ACTGACTGACTGACTCTCACTAGCAATAGTCTGAA	e154	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG	e225	AAACAAGCTTCTTGAAGTCCAGCCAGTACGGAAG		
e70	TTAGATGGCTGATGATGCAAAAATTTGCTGGAGAA	e155	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG				
e71	ACTGACTGACTGACTGACTGACTGAAAAAAGG	e156	CGACTGGACTTCTGAGCAGGATCTCTCAAAAG				
e72	GCCTCTGACTGATGAT						
e73	CGCTGGATCTTACTATCTCAAGCCAGCAG						
e74	ATCGAAGCGCGGATGATGATGGAAGGCTCC						
e75	GGAAGTCCAGAGCAGGAGC						
e76	CCACAGTGCAGAAATCAGC						
e77	CGCTGGATCTTACTGATTTCCCTGATTCGGAG						
e78	CGCTGGATCTTACTGATTTCCCTGATTCGGAG						
e79	ATCGAAGCGCGGATGATGAAAGCTCACTCAGAAACA						
e80	ATCGAAGCGCGGATGATGAAAGCTCAGCCAGCATC						
e81	GTCTCCAAATGTGCTTCTGAT						
e82	ACAGAGCAAGTGAAGTGTAGAG						
e83	GCATGCTCTTCACTCTG						
e84	CGCAACTGGAGAAACCACTGAC						
e85	CCGGCTGGTCACTG						







Tabela 2-B

Lista preferowanych sekwencji nukleotydowych, zgodnie z nomenklaturą NCBI (National Center for Biotechnology Information), określonych poniżej na podstawie numerów referencyjnych genów, zawierających regiony, do których może wiązać się cząsteczka kwasu nukleinowego wykazująca homologię sekwencyjną względem tych genów oraz aktywność eRNA.

			COL2A1	1280	NM_001844.4	GH1	2688	NM_000515.3	MSH6	2956	NM_000179.2	TGFBR2	7048	NM_003242.5
			COL2A1	1280	NM_033150.2	GH1	2688	NM_022559.2	MSH6	2956	NM_000179.2	TNF	7124	NM_000594.2
			COL3A1	1281	NM_000090.3	GH1	2688	NM_022560.2	MT-CO2	4513	YP_003024029.1	TNFRSF1A	7132	NM_001065.3
			COL4A1	1282	NM_001845.4	GHR	2690	NM_000163.2	MT-CO1	4512	YP_003024028.1	TNFRSF1B	7133	NM_001066.2
A1CF	29974	NM_001198818.1	COL4A2	1284	NM_001846.2	IFNA1	3439	NM_024013.1	MTOR	2475	NM_004958.3	TP53	7157	NM_000546.4
A1CF	29974	NM_001198819.1	COL4A3	1285	NM_000091.4	IFNA2	3440	NM_000605.3	MYC	4609	NM_002467.4	TP53	7157	NM_001126112.1
A1CF	29974	NM_001198820.1	COL4A4	1286	NM_000092.4	IFNAR1	3454	NM_000629.2	NBN	4683	NM_002485.4	TP53	7157	NM_001126113.1
A1CF	29974	NM_014576.3	COL5A1	1289	NM_000093.3	IFNAR2	3455	NM_000874.3	NGF	4803	NM_002506.2	TP53	7157	NM_001126114.1
A1CF	29974	NM_138932.2	COL6A1	1291	NM_001848.2	IFNB1	3456	NM_002176.2	NGFR	4804	NM_002507.3	TP53	7157	NM_001126115.1
A1CF	29974	NM_138933.2	COL7A1	1294	NM_000094.3	IFNG	3458	NM_000619.2	NOD2	64127	NM_022162.1	TP53	7157	NM_001126116.1
APC	324	NM_000038.5	COL8A1	1295	NM_001850.3	IFNG	3458	NM_000619.2	PMS1	5378	NM_000534.4	TP53	7157	NM_001126117.1
APC	324	NM_001127510.2	COL8A1	1295	NM_020351.2	IFNGR1	3459	NM_000416.2	PMS1	5378	NM_001128143.1	TSC1	7248	NM_000368.4
APC	324	NM_001127511.2	COL9A1	1297	NM_001851.4	IFNGR2	3460	NM_005534.3	PMS1	5378	NM_001128144.1	TSC1	7248	NM_001162426.1
BAX	581	NM_004324.1	COL9A1	1297	NM_078485.3	IGF1	3479	NM_000618.3	PMS2	5395	NM_000535.5	TSC1	7248	NM_001162427.1
BAX	581	NM_138761.3	CXCR2	3579	NM_001168298.1	IGF1	3479	NM_001111283.1	PTEN	5728	NM_000314.4	TSC2	7249	NM_000548.3
BRCA1	672	NM_007294.3	CXCR2	3579	NM_001557.3	IGF1	3479	NM_001111284.1	RARA	5914	NM_000964.3	TSC2	7249	NM_001077183.1
BRCA1	672	NM_007297.3	EGF	1950	NM_001178130.1	IGF1	3479	NM_001111285.1	RARA	5914	NM_001024809.3	TSC2	7249	NM_001114382.1
BRCA1	672	NM_007298.3	EGF	1950	NM_001178131.1	IGF1R	3480	NM_000875.3	RARA	5914	NM_001145301.2	VEGFA	7422	NM_001025366.2
BRCA1	672	NM_007299.3	EGF	1950	NM_001963.4	IGF2	3481	NM_000612.4	RARA	5914	NM_001145302.2	VEGFA	7422	NM_001025367.2
BRCA1	672	NM_007300.3	EGFR	1956	NM_005228.3	IGF2	3481	NM_001007139.4	RARB	5915	NM_000965.3	VEGFA	7422	NM_001025368.2
BRCA1	672	NM_007294.3	EGFR	1956	NM_201282.1	IGF2	3481	NM_001127598.1	RARB	5915	NM_016152.3	VEGFA	7422	NM_001025369.2
BRCA1	672	NM_007297.3	EGFR	1956	NM_201284.1	IGF2R	3482	NM_000876.2	RARG	5916	NM_000966.4	VEGFA	7422	NM_001025370.2
BRCA1	672	NM_007298.3	EIF4A1	1973	NM_001416.2	IL10	3586	NM_000572.2	RARG	5916	NM_001042728.1	VEGFA	7422	NM_001033756.2
BRCA1	672	NM_007299.3	EIF4A2	1974	NM_001967.3	IL10RA	3587	NM_001558.3	RB1	5925	NM_000321.2	VEGFA	7422	NM_001171622.1
BRCA1	672	NM_007300.3	EIF4B	1975	NM_001417.4	IL10RB	3588	NM_000628.3	RET	5979	NM_020630.4	VEGFA	7422	NM_001171623.1
BRCA2	675	NM_000059.3	EIF4E	1977	NM_001130678.1	IL1A	3552	NM_000575.3	RET	5979	NM_020975.4	VEGFA	7422	NM_001171624.1
BRCA2	675	NM_000059.3	EIF4E	1977	NM_001130679.1	IL1B	3553	NM_000576.2	RXRA	6256	NM_002957.4	VEGFA	7422	NM_001171625.1
CASC3	22794	NM_007359.4	EIF4E	1977	NM_001968.3	IL1R1	3554	NM_000877.2	RXRB	6257	NM_021976.3	VEGFA	7422	NM_001171627.1
CDK4	1019	NM_000075.2	EIF4EBP1	1978	NM_004095.3	IL6	3569	NM_000600.3	RXRG	6258	NM_006917.4	VEGFA	7422	NM_001171628.1
CDK4	1019	NM_000075.2	EIF4G1	1981	NM_001194946.1	IL6R	3570	NM_000565.2	SIRT1	23411	NM_001142498.1	VEGFA	7422	NM_001171629.1
CDKN2A	1029	NM_000077.4	EIF4G1	1981	NM_001194947.1	IL6R	3570	NM_181359.1	SIRT1	23411	NM_012238.4	VEGFA	7422	NM_001171630.1
CDKN2A	1029	NM_001195132.1	EIF4G1	1981	NM_004953.4	IL8	3576	NM_000584.2	ST14	6768	NM_021978.3	VEGFA	7422	NM_003376.5
CDKN2A	1029	NM_058195.3	EIF4G1	1981	NM_182917.4	INS	3630	NM_000207.2	ST5	6764	NM_005418.3	VEGFB	7423	NM_003377.3
CDKN2A	1029	NM_058197.4	EIF4G1	1981	NM_198241.2	INS	3630	NM_001185097.1	ST5	6764	NM_139157.2	VEGFC	7424	NM_005429.2
CDKN2A	1029	NM_000077.4	EIF4G1	1981	NM_198242.2	INS	3630	NM_001185098.1	ST7	7982	NM_018412.3	VHL	7428	NM_000551.2
CDKN2A	1029	NM_001195132.1	EIF4G1	1981	NM_198244.2	INSR	3643	NM_000208.2	ST7	7982	NM_021908.2	VHL	7428	NM_198156.1
CDKN2A	1029	NM_058195.3	EIF4G2	1982	NM_001042559.2	INSR	3643	NM_001079817.1	TERT	7015	NM_001193376.1			
CDKN2A	1029	NM_058197.4	EIF4G2	1982	NM_001172705.1	MC1R	4157	NM_002386.3	TERT	7015	NM_198253.2			
CHEK1	1111	NM_001114121.1	EIF4G2	1982	NM_001418.3	MLH1	4292	NM_000249.3	TGFA	7039	NM_001099691.1			
CHEK1	1111	NM_001114122.1	EIF4H	7458	NM_022170.1	MLH1	4292	NM_001167617.1	TGFA	7039	NM_003236.2			
CHEK1	1111	NM_001274.4	EIF4H	7458	NM_031992.1	MLH1	4292	NM_001167618.1	TGFB1	7040	NM_000660.4			
CHEK2	11200	NM_001005735.1	ERCC2	2068	NM_000400.3	MLH1	4292	NM_001167619.1	TGFB2	7042	NM_001135599.2			
CHEK2	11200	NM_007194.3	ERCC2	2068	NM_001130867.1	MLH3	27030	NM_001040108.1	TGFB2	7042	NM_003238.3			
CHEK2	11200	NM_145862.2	FAS	355	NM_000043.3	MLH3	27030	NM_001040108.1	TGFB3	7043	NM_003239.2			
COL10A1	1300	NM_000493.3	FAS	355	NM_152871.1	MLH3	27030	NM_014381.2	TGFB1	7046	NM_001130916.1			
COL1A1	1277	NM_000088.3	FAS	355	NM_152872.1	MLH4	27030	NM_014381.2	TGFB1	7046	NM_004612.2			
COL1A2	1278	NM_000089.3	FASLG	356	NM_000639.1	MSH2	4436	NM_000251.1	TGFB2	7048	NM_001024847.2			

### Dane bibliograficzne.

Abbott CM, Proud CG. Translation factors: in sickness and in health. Trends Biochem Sci. 2004 Jan;29(1):25–31. Review. PubMed PMID: 14729329.

Albesiano E, Messmer BT, Damie RN, Allen SL, Rai KR, Chiorazzi N. Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. Blood. 2003 Nov 1;102(9):3333–9. Epub 2003 Jul 10. PubMed PMID: 12855567.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004 Jan 23;116(2):281–97. Review. PubMed PMID: 14744438.

Batey RT, Rambo RP, Doudna JA. Tertiary Motifs in RNA Structure and Folding. Angew Chem Int Ed Engl. 1999 Aug; 38(16):2326–2343. PubMed PMID: 10458781.

Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z (July 2005). "Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs". Nat. Genet. 37 (7): 766–70. doi:10.1038/ng1590. PMID 15965474.

Bregues M, Teixeira D, Parker R. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science*. 2005 Oct 21;310(5747):486–9. Epub 2005 Sep 1. PubMed PMID: 16141371; PubMed Central PMCID: PMC1863069.

Carter PS, Jarquin-Pardo M, De Benedetti A. Differential expression of Myc1 and Myc2 isoforms in cells transformed by eIF4E: evidence for internal ribosome repositioning in the human c-myc 5'UTR. *Oncogene*. 1999 Jul 29;18(30):4326–35. PubMed PMID: 10439040.

Chappell SA, LeQuesne JP, Paulin FE, deSchoolmeester ML, Stoneley M, Soutar RL, Ralston SH, Helfrich MH, Willis AE. A mutation in the c-myc-IRES leads to enhanced internal ribosome entry in multiple myeloma: a novel mechanism of oncogene de-regulation. *Oncogene*. 2000 Sep 7; 19(38):4437–40. PubMed PMID: 10980620.

Chatterjee S, Pal JK. Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol Cell*. 2009 May;101(5):251–62. Review. PubMed PMID: 19275763.

Chen X. MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Lett*. 2005 Oct 31;579(26):5923–31. Epub 2005 Aug 9. PMID: 16144699.

Cornelis S, Bruynooghe Y, Denecker G, Van Huffel S, Tinton S, Beyaert R. Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site. *Mol Cell*. 2000 Apr; 5(4):597–605. PubMed PMID: 10882096.

De Benedetti A, Graff JR. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene*. 2004 Apr 19;23(18):3189–99. Review. PubMed PMID: 15094768.

Dorsett Y, McBride KM, Jankovic M, Gazumyan A, Thai TH, Robbiani DF, Di Virgilio M, San-Martin BR, Heidkamp G, Schwickert TA, Eisenreich T, Rajewsky K, Nussenzweig MC. MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-Igh translocation. *Immunity*. 2008 May;28(5):630–8. Epub 2008 May 1. PubMed PMID: 18455451; PubMed Central PMCID: PMC2713656.

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 Apr;6(4):259–69. Review. PubMed PMID: 16557279. Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, Scheuner D, Kaufman RJ, Golan DE, Anderson P. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol*. 2005 Jun 20;169(6):871–84. PubMed PMID: 15967811; PubMed Central PMCID: PMC2171635.

Eulalio A, Behm-Ansmant I, Schweizer D, Izaurralde E. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol*. 2007 Jun;27(11):3970–81. Epub 2007 Apr 2. PubMed PMID: 17403906; PubMed Central PMCID: PMC1900022.

Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol*. 2005 Jun;15(3):331–41. Review. PubMed PMID:15925505.

Filipowicz W. RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell*. 2005 Jul 15;122(1):17–20. Review. PubMed PMID: 16009129.

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP (January 2009). “Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs”. *Genome Res*. 19 (1): 92–105. doi:10.1101/gr.082701.108. PMID 18955434.

Graff JR, Zimmer SG. Translational control and metastatic progression: enhanced activity of the mRNA cap-binding protein eIF-4E selectively enhances translation of metastasis-related mRNAs. *Clin Exp Metastasis*. 2003;20(3):265–73. Review. PubMed PMID: 12741684.

Greenman 1C, Gomez E, Moore CE, Herbert TP. Distinct glucose-dependent stress responses revealed by translational profiling in pancreatic beta-cells. *J Endocrinol*. 2007 Jan;192(1):179–87. PubMed PMID: 17210755; PubMed Central PMCID: PMC1831533.

Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Fehr C, Jünemann C, Niepmann M. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J*. 2008 Dec 17;27(24):3300–10. Epub 2008 Nov 20. PubMed PMID: 19020517; PubMed Central PMCID: PMC2586803.

Huang V, Qin Y, Wang J, Wang X, Place RF, Lin G, Lue TF, Li LC. RNAa is conserved in mammalian cells. *PLoS One*. 2010 Jan 22;5(1):e8848. PubMed PMID:20107511; PubMed Central PMCID: PMC2809750.

Inhan Lee,1,7,8 Subramanian S. Ajay,2,7 Jong In Yook,3,9 Hyun Sil Kim,3 Su Hyung Hong,4 Nam Hee Kim,3 Saravana M. Dhanasekaran,5 Arul M. Chinnaiyan,5 and Brian D. Atheyl,6. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites, *Genome Res*. 2009 July;19(7): 1175–1183. PMCID: PMC2704433.

Jang SK, Kräusslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during *in vitro* translation. *J Virol.* 1988 Aug;62(8):2636–43. PubMed PMID: 2839690; PubMed Central PMCID: PMC253694.

Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2006;57:19–53. Review. PubMed PMID: 16669754.

Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, Omura K, Watanabe G, Danenberg PV. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin Cancer Res.* 2001 Dec; 7(12):4096–101. PubMed PMID: 11751507.

Kerekatte V, Smiley K, Hu B, Smith A, Gelder F, De Benedetti A. The proto-oncogene/translation factor eIF4E: a survey of its expression in breast carcinomas. *Int J Cancer.* 1995 Feb 20;64(1):27–31. PubMed PMID: 7665244.

Koromilas AE, Lazaris-Karatzas A, Sonenberg N. mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E. *EMBO J.* 1992 Nov; 11(11):4153–8. Erratum in: *EMBO J* 1992 Dec;11(13):5138. PubMed PMID: 1396596; PubMed Central PMCID: PMC556925.

Kozak M. A short leader sequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes. *Gene Expr.* 1991 May;1(2):111–5. PubMed PMID: 1820208.

Kozak M. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J Cell Biol.* 1991 Nov;115(4):887–903. Review. PubMed PMID: 1955461; PubMed Central PMCID: PMC2289952.

Kozak M. Effects of long 5' leader sequences on initiation by eukaryotic ribosomes *in vitro*. *Gene Expr.* 1991 May;1(2):117–25. PubMed PMID: 1820209.

Kozak M. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem.* 1991 Oct 25; 266(30):19867–70. Review. PubMed PMID: 1939050.

Li LC, Okino ST, Zhao H, Pookot D, Place RF, Urakami S, Enokida H, Dahiya R. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006 Nov 14;103(46):17337–42. Epub 2006 Nov 3. PubMed PMID: 17085592

Liu L, Dilworth D, Gao L, Monzon J, Summers A, Lassam N, Hogg D. Mutation of the CDKN2A 5' UTR creates an aberrant initiation codon and predisposes to melanoma. *Nat Genet.* 1999 Jan; 21(1):128–32. PubMed PMID: 9916806.

Lodish HG, Housman D, Jacobsen M. Initiation of hemoglobin synthesis. Specific inhibition by antibiotics and bacteriophage ribonucleic acid. *Biochemistry.* 1971 Jun 8;10(12):2348–56. PubMed PMID: 5114993.

Macejak DG, Sarnow P. Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature.* 1991 Sep 5; 353(6339):90–4. PubMed PMID: 1652694.

Mamane Y, Petroulakis E, Rong L, Yoshida K, Ler LW, Sonenberg N. eIF4E – from translation to transformation. *Oncogene.* 2004 Apr 19;23(18):3172–9. PubMed PMID: 15094766.

Mathews MB, Sonenberg N, Hershey JWB. *Translational Control in Biology and Medicine.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2007.

Minn AH, Lan H, Rabaglia ME, Harlan DM, Peculis BA, Attie AD, Shalev A. Increased insulin translation from an insulin splice-variant overexpressed in diabetes, obesity, and insulin resistance. *Mol Endocrinol.* 2005 Mar;19(3):794–803. Epub 2004 Nov 18.

Minn AH, Pise-Masison CA, Radonovich M, Brady JN, Wang P, Kendzioriski C, Shalev A. Gene expression profiling in INS-1 cells overexpressing thioredoxin-interacting protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Oct 28;336(3):770–8. PubMed PMID: 16143294.

Mukhopadhyay D, Anant S, Lee RM, Kennedy S, Viskochil D, Davidson NO. C→U editing of neurofibromatosis 1 mRNA occurs in tumors that express both the type II transcript and apobec-1, the catalytic subunit of the apolipoprotein B mRNA-editing enzyme. *Am J Hum Genet.* 2002 Jan;70(1):38–50. Epub 2001 Nov 27. PubMed PMID: 11727199; PubMed Central PMCID: PMC384902.

Myasnikov AG, Simonetti A, Marzi S, Klaholz BP. Structure-function insights into prokaryotic and eukaryotic translation initiation. *Curr Opin Struct Biol.* 2009 Jun;19(3):300–9. Epub 2009 Jun 1. Review. PubMed PMID: 19493673.

Nilsen TW. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet.* 2007 May;23(5):243–9. Epub 2007 Mar 26. PubMed PMID: 17368621.

Ohnishi Y, Tamura Y, Yoshida M, Tokunaga K, Hohjoh H. Enhancement of allele discrimination by introduction of nucleotide mismatches into siRNA in allele-specific gene silencing by RNAi. *PLoS One*. 2008 May 21;3(5):e2248. PubMed PMID: 18493311; PubMed Central PMCID: PMC2373929.

Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell*. 2008 May 23;30(4):460–71. PubMed PMID:18498749.

Paulin FE, Chappell SA, Willis AE. A single nucleotide change in the c-myc internal ribosome entry segment leads to enhanced binding of a group of protein factors. *Nucleic Acids Res*. 1998 Jul 1; 26(13):3097–103. PubMed PMID: 9628905; PubMed Central PMCID: PMC147696.

Pelletier J, Sonenberg N. Photochemical cross-linking of cap binding proteins to eucaryotic mRNAs: effect of mRNA 5' secondary structure. *Mol Cell Biol*. 1985 Nov;5(11):3222–30. PubMed PMID: 3837842; PubMed Central PMCID: PMC369138.

Pickering BM, Willis AE. The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *Semin Cell Dev Biol*. 2005 Feb;16(1):39–47. Epub 2004 Dec 10. Review. PubMed PMID: 15659338.

Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*. 2005 Sep 2;309(5740): 1573–6. Epub 2005 Aug 4. PubMed PMID: 16081698.

Preiss T, W Hentze M. Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *Bioessays*. 2003 Dec;25(12):1201–11. Review. PubMed PMID: 14635255.

Shalev A, Blair PJ, Hoffmann SC, Hirshberg B, Peculis BA, Harlan DM. A proinsulin gene splice variant with increased translation efficiency is expressed in human pancreatic islets.

*Endocrinology*. 2002 Jul;143(7):2541–7. PubMed PMID: 12072386.

Shalev A, Pise-Masison CA, Radonovich M, Hoffmann SC, Hirshberg B, Brady JN, Harlan DM. Oligonucleotide microarray analysis of intact human pancreatic islets: identification of glucose-responsive genes and a highly regulated TGFbeta signaling pathway. *Endocrinology*. 2002 Sep;143(9):3695–8. PubMed PMID: 12193586.

Sonenberg N, Dever TE. Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol*. 2003 Feb;13(1):56–63. Review. PubMed PMID: 12581660.

Stephen A Chappell, John PC LeQuesne, Fiona EM Paulin, Matthew L deSchoolmeester, Mark Stoneley, Richard L Soutar, Stuart H Ralston, Miép H Helfrich and Anne E Willis; A mutation in the c-myc-IRES leads to enhanced internal ribosome entry in multiple myeloma: A novel mechanism of oncogene de-regulation *Oncogene* (1998) 16, 423 ± 428.

Tijsterman M, Ketting RF, Plasterk RH. The genetics of RNA silencing. *Annu Rev Genet*. 2002;36:489–519. Epub 2002 Jun 11. Review. PubMed PMID: 12429701.

Tinton SA, Schepens B, Bruynooghe Y, Beyaert R, Cornelis S. Regulation of the cell-cycle-dependent internal ribosome entry site of the PITSLRE protein kinase: roles of Unr (upstream of N-ras) protein and phosphorylated translation initiation factor eIF-2alpha. *Biochem J*. 2005 Jan 1; 385(Pt 1):155–63. PubMed PMID: 15330758; PubMed Central PMCID: PMC1134683.

Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev*. 2006 Mar 1; 20(5):515–24.

Van Der Kelen K, Beyaert R, Inzé D, De Veylder L. Translational control of eukaryotic gene expression. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2009 Jul–Aug;44(4):143–68. Review. PubMed PMID: 19604130.

Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*. 2007 Dec 21;318(5858):1931–4. Epub 2007 Nov 29. PubMed PMID: 18048652.

Wang G, Guo X, Floras J. Differences in the translation efficiency and mRNA stability mediated by 5'-UTR splice variants of human SP-A1 and SP-A2 genes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005 Sep;289(3):L497–508. Epub 2005 May 13. PubMed PMID: 15894557.

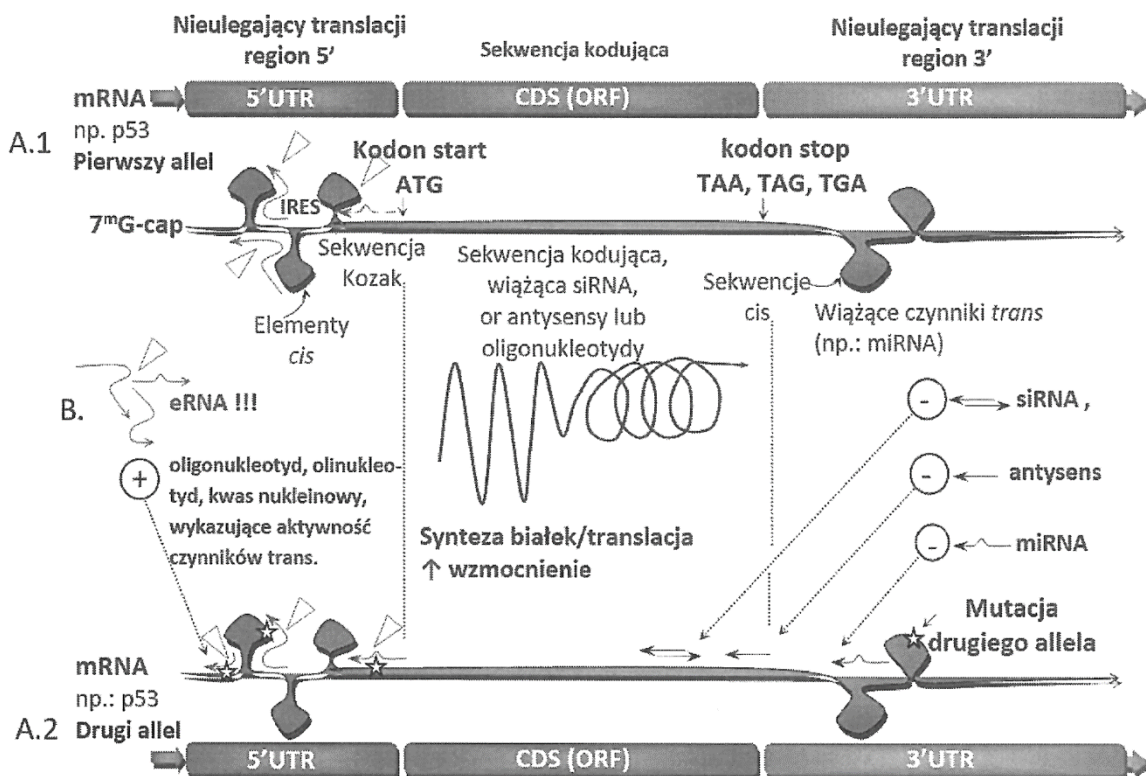
Willis AE. Translational control of growth factor and proto-oncogene expression. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999 Jan;31(1):73–86. Review. PubMed PMID: 10216945.

Yoon A, Peng G, Brandenburger Y, Zollo O, Xu W, Rego E, Ruggero D. Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita. *Science*. 2006 May 12;312(5775):902–6. Erratum in: *Science*. 2006 Sep;313(5791):1238. Brandenburger, Yves [corrected to Brandenburger, Yves]. PubMed PMID: 16690864.

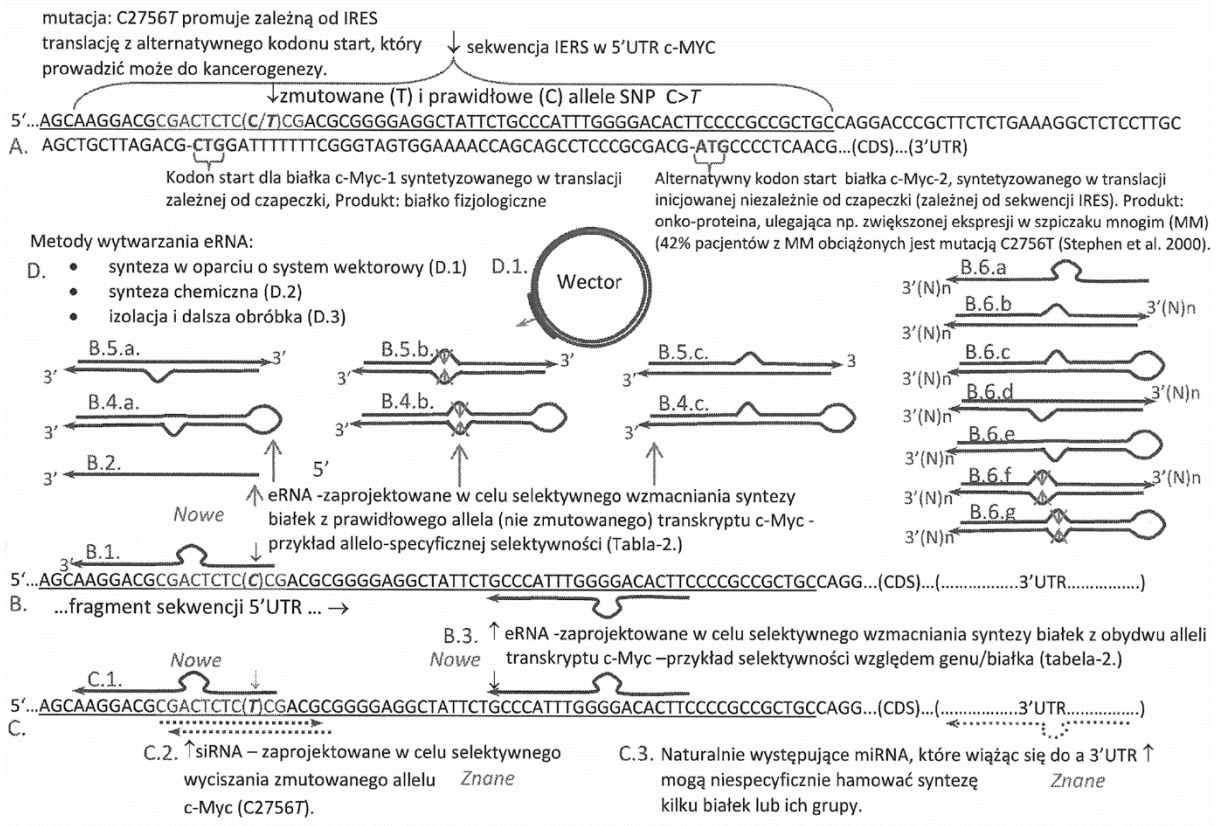
## Zastrzeżenie patentowe

1. Część cząsteczki kwasu nukleinowego, określona jako „eRNA”, obejmująca co najmniej jedną z sekwencji oligonukleotydów, polinukleotydów lub kwasów nukleinowych opisanych w Tabeli 2-A, przy czym cząsteczka ta ma cechę selektywnego wiązania się do sekwencji docelowej RNA na zasadzie komplementarności zasad i wzmacniania syntezy białek, w szczególności wzmacniania syntezy białek w komórkach lub w pozakomórkowych mieszaninach reakcyjnych *in vitro*.

## Rysunki



Rysunek 1.



Rysunek 2.

5'...AGCAAGGACGCGACTCTC(C)CGACGCGGGGAGGCTATTCTGCCCATTTGGGGACACTTCCCCGCCGCTGCCAGG...(CDS)...(.....3'UTR....)  
 ...fragment sekwencji 5'UTR genu MYC ... →

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25  
 UUCGGGAGAGU-CAU-CGCGUCCUUTT-3' A

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25  
 UUCGAGAGAGU-CAU-CGCGUCCUUTT-3' B

3'-TTCAGCTCUCUCAGCGCAGG C  
 GUCGAGAGAGUCGCGUCCUU-3'

GUCGGGAGAGUCGCGUCCUU-(3'(N)n)-3' D

AAGGACGCGACUCUCCCGAC-3' E

A  
 C U  
 UUCGGGAGAGU CGCGUCCUUTT-3' F

A  
 C U  
 UUCGGGAGAGU CGCGUCCUUTT-3'  
 3'-TTAAGCCCUCUCA GCGCAGGAA G  
 G A  
 U

A  
 C U  
 UUCGGGAGAGU CGCGUCCUUTT-3' H  
 3'-TTAAGCCCUCUCA ---- GCGCAGGAA

UUCGGGAGAGU---- CGCGUCCUUTT-3'  
 3'-TTAAGCCCUCUCA GCGCAGGAA I  
 G A  
 U

A  
 C U  
 UUCGGGAGAGU CGCGUCCUU U C U A J  
 3'-TTAAGCCCUCUCA GCGCAGGAA U C U  
 G A U A

Rysunek 3.

5'...AGCAAGGACGCGACTCTC(C)CGACGCGGGGAGGCTATTCTGCCCATTTGGGGACACTTCCCCGCCGCTGCCAGG...(CDS)...(.....3'UTR....)

...fragment sekwencji 5'UTR genu MYC ... →

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25  
UUCGGGAGAGU-CAU-CGCGUCCUUTT-3' A

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25  
UUCGAGAGAGU-CAU-CGCGUCCUUTT-3' B

3'-TTCAGCTCUCUCAGCGCAGG C  
GUCGAGAGAGUCGCGUCCUU-3'

GUCGGGAGAGUCGCGUCCUU-{3'(N)n}-3' D

AAGGACGCGACUCUCCCGAC-3' E

A  
C U  
UUCGGGAGAGU CGCGUCCUUTT-3' F

A  
C U  
UUCGGGAGAGU CGCGUCCUUTT-3' G  
3'-TTAAGCCCUCUCA GCGCAGGAA  
G A  
U

A  
C U  
UUCGGGAGAGU CGCGUCCUUTT-3' H  
3'-TTAAGCCCUCUCA ---- GCGCAGGAA

UUCGGGAGAGU---- CGCGUCCUUTT-3' I  
3'-TTAAGCCCUCUCA GCGCAGGAA  
G A  
U

A  
C U  
UUCGGGAGAGU CGCGUCCUU J  
3'-TTAAGCCCUCUCA GCGCAGGAA U C U A  
G A U C  
U A

Rysunek 3.