

## **ABSTRAKT**

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biochemických věd

University of Vienna, Faculty center for Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Laboratory of MacroMolecular Cancer Therapeutics

Kandidát: Barbora Kovářová

Školitel (Univerzita Karlova): PharmDr. Anna Jirkovská, Ph.D.

Školitel (University of Vienna): Univ. Prof. Dipl. Ing. Dr. Manfred Ogris

Konzultant (University of Vienna): Dr. Haider Sami, Ph.D.

Název diplomové práce: Studie nanočásticemi zprostředkovaného dopravování DNA a siRNA založené na reportérovém genu

Klíčová slova: transfekce, plasmidová DNA, siRNA, nanočástice

Genová terapie je nadějný obor, který nabízí potenciál k léčbě mnoha nevléčitelných chorob. Je zprostředkována modulací genové exprese ve specifických buňkách pomocí dopravení exogenní nukleové kyseliny do těchto buněk. Jednou ze současných výzev dopravování nukleových kyselin je výzkum syntetických vektorů, které mají potenciál překonat nevýhody běžně používaných vektorů virových. Tato práce je zaměřena na různé typy nanočástic založených na polyethyleniminu pro dopravování plasmidové DNA (pDNA) a small interfering RNA (siRNA).

Spojení kontrastních zobrazovacích činidel se systémy pro dopravování genů nabízí mnoho výhod pro sledování procesu dopravování genů jak *in vivo* tak i *in vitro*. Kontrastní činidla založená na gadoliniu (např. kyselina gadoterová) vykazují potenciál pro aplikaci v zobrazování magnetickou rezonancí (MRI – magnetic resonance imaging). Nicméně spojení gadoterové kyseliny s polyethyleniminem může ovlivnit jeho schopnost transfekce. Za tímto účelem byly testovány polyplexy založené na lineárním polyethyleniminu (LPEI) značeném gadoterovou kyselinou (LPEI-DOTA-Gd) s cílem zhodnotit jejich účinnost v pDNA transfekci. Tato účinnost byla zkoumána na A549 a CT26 buňkách a vyhodnocena pomocí reportérového luciferázového testu (Firefly luciferase reporter gene assay) s výsledkem nevykazujícím negativní efekt konjugace s gadoterovou kyselinou na LPEI transfekční schopnost v porovnání s neznačeným LPEI.

V další části této práce byly testovány polyplexy pro dopravování siRNA založené na různých typech polyethyleniminu: lineárním (LPEI), rozvětveném (branched) (BPEI) a disulfidicky kroslinkovaném lineárním polyethyleniminu (c-LPEI), s cílem nalézt optimální parametry polyplexů a inkubační parametry pro účinné dopravování siRNA vedoucí k snížení exprese cíleného genu, v této práci genu pro světluščí (Firefly) luciferázu. Účinnost dopravování siRNA byla hodnocena na buňkách stabilně exprimujících gen pro světluščí luciferázu a vyhodnocena na základě poklesu aktivity této luciferázy. Polyplexy založené na BPEI byly nejúčinnější v dopravování siRNA vedoucímu ke snížení exprese cíleného genu, což nám umožnilo definovat optimální koncentraci, parametry polyplexů a inkubační parametry.

Posledním typem nanočástic testovaných pro dopravování siRNA byly tzv. “vrstvu po vrstvě sestavené zlaté nanočástice” složené z různých vrstev zahrnujících BPEI nebo c-LPEI. Výsledkem pilotního *in vitro* testování těchto nanočástic, také vyhodnoceného pomocí reportérového luciferázového testu, bylo specifikování rozsahu koncentrací z hlediska toxicity a potenciální účinnosti při snižování genové exprese, což může být využito v budoucích experimentech.