

## ABSTRAKT

V této studii se projevuje nadějná možnost zvýšení genové exprese konjugací ligandů na antisense oligonukleotidy a siRNA. Při modifikaci se využilo 2'-O-lysylaminohexylové skupiny vázané na uridinovou bazi, která nahradila jednu, dvě až tři baze thyminové. Uvedené záměny a modifikace bází byly testovány pro zlepšení inhibice proteinové exprese.

Efektivita modifikací v inhibici proteinové exprese byla zkoušena na alicaforsenové sekvenci (DNA) a siRNA. Alicaforsen, který se nachází ve třetí fázi klinické studie, je phosphorothioát komplementární k ICAM-1, siRNA, jenž nově prokázala afinitu k ICAM-1, čehož bylo využito při porovnání účinnosti výše zmíněných modifikací a objevení následných možností uplatnění alicaforsen a siRNA v terapii. Poprvé byla pozorována a prokázána down-regulace ICAM-1 na buněčné linii ECV304, která imituje prostředí hematoencefalické bariéry.

Nemodifikované/modifikované sekvence oligonukleotidů a siRNA byly transfekovány do ECV304 buněk. Po 24 hodinové transfekci byly buňky rozrušeny chemickou lýzou. Koncentrace získaných proteinů byly stanoveny Bradford analýzou a následná inhibice ICAM-1 byla vyhodnocena western blotem. Hodnoty inhibicí byly standardizovány k odpovídajícímu aktinu a kontrolním buňkám. Vyhodnocení genové exprese proběhlo pomocí denzitometrie autoradiogramů a počítačového programu Quantity One. Všechny pokusy byly provedeny nejméně třikrát.

Modifikace 2'-O-lysylaminohexylem zlepšila uptake oligonukleotidů buněčnou membránou a zároveň zvýšila jejich rezistenci vůči nukleázám. Modifikované DNA i siRNA potlačily genovou expresi ICAM-1 přibližně 50%. Zvýšením počtu modifikací (z jedné na dvě až tři) se zvýšila inhibice ICAM-1 oproti nemodifikovaným oligonukleotidům a siRNA sekvencím. Koncentrace oligonukleotidů, která prokázala nejvyšší inhibici, byla 200 nM u DNA a 50 nM u siRNA.

2'-O-lysylaminohexyluridin by mohla být úspěšnou modifikací DNA a siRNA pro studie genových inhibicí. Všechny testované sekvence oligonukleotidů, zejména se dvěma a třemi modifikacemi, se ukázaly být slibnými pro léčbu chorob CNS.

Výsledky této diplomové práce byly publikovány v: Winkler J, Gilbert M., Kocourková A, Stessl M, and Noe CR: 2'-O-lysylaminohexyl oligonucleotides: modifications for antisense and siRNA, *ChemMedChem* **3**(1):102-110, 2008.