Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů

Kateřina Kuldanová

Design siRNA a vliv modifikací na jejich stabilitu a účinnost

The Design of siRNAs and the Influence of Modifications on Their Stability and Efficiency

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Václav Vopálenský, Ph. D.

Praha, 2015

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mgr. Václavovi Vopálenskému, Ph. D., za cenné rady a odborné vedení při psaní této práce, jakož i za celkově nadstandardní přístup a nemalé množství času věnovné konzultacím. Dále děkuji své matce Elišce Kuldanové za obětavou a expresní jazykovou korekturu.

Můj velký dík patří *in memoriam* také mým praprarodičům – Tomášovi Holečkovi, který dovedl svou životní zkušenost s lidskou povahou zprostředkovat hrou, a Elišce Holečkové, která mě naučila zavázat si tkaničky u bot a mnoho dalších užitečných dovedností, bez kterých bych nikdy nedošla tak daleko.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. 5. 2015

Podpis

Abstrakt

Návrh krátkých interferujících RNA (siRNA) je základním krokem k úspěšné RNA interferenci (RNAi). Navrhnout vhodný siRNA duplex ale není zcela triviální, neboť existuje několik problematických oblastí, jako jsou například stabilita siRNA duplexů v přítomnosti nukleáz, účinnost eliminace cílové mRNA, sekvenčně specifická eliminace necílových mRNA, cytotoxicita a imunogenicita, ovlivňujících funkčnost siRNA duplexů a tedy i jejich využitelnost v medicíně a dalších oborech. Porozumění principům fungování siRNA duplexů při RNAi je nezbytným krokem k vyřešení výše uvedených překážek na cestě k účinným léčivům. Prostředkem optimalizace popsaných vlastností je úprava návrhu siRNA duplexů pomocí různých modifikací. Modifikovat lze fosfodiesterovou kostru, báze i ribózu. V každé z těchto skupin jsou známy modifikace, které mají na siRNA duplexy a následnou RNA interferenci pozitivní vliv. Tato práce předkládá dosavadní poznatky o několika nejznámějších modifikacích, jako jsou thiofosfátová substituce, 2′-deoxy-2′-fluoronukleotidy, 2′-O-methyl ribonukleotidy a LNA nukleotidy, a o větším počtu méně známých modifikací, jako jsou boranofosfátová substituce, 4′-thioribonukleotidy, 2′-O-methyl-dithiofosfátová modifikace a mnoho dalších, které ovlivňují vlastnosti siRNA duplexu.

Klíčová slova

siRNA, modifikace, stabilita, nukleázová rezistence, termostabilita, účinnost, mRNA, RNAi, RISC

Abstract

Design of small interfering RNA (siRNA) is a basic step to successful RNA interference (RNAi). However, it is not trivial to design a suitable siRNA duplex at all, because there are some problematic areas like stability of siRNA duplexes in the presence of nucleases, efficiency of target mRNA elimination, sequence-specific elimination of non-target mRNAs, cytotoxicity and immunogenicity for example, which can influence the aliveness of siRNA duplexes and consequently also their utility in medicine and other fields. The understanding of the principles of siRNA duplexes function during RNAi is a necessary step to solution of the obstacles on the way to efficient drugs. The mean of optimisation of described troublesome properties is an alteration of siRNA duplexes design by use of different modifications. Phosphodiester backbone, bases and also ribose can be modified. Some modifications beneficial for siRNA duplexes and consequently RNA interference are known in every one of these groups. This work presents existing pieces of knowledge about some of the most known modifications, just like phosphorothioate substitution, 2′-deoxy-2′-fluoronucleotides, 2′-O-methyl ribonucleotides and LNA nucleotides are, as well as about a higher number of less known modifications like boranophosphate substitution, 4′-thioribonucleotides, 2′-O-methyl-phosphorodithioate modification and many others, which influence the attributes of siRNA duplexes.

Keywords

siRNA, modification, stability, nuclease resistence, thermostability, efficiency, mRNA, RNAi, RISC

Seznam použitých zkratek

Ago2	*Argonaute 2*	
AM	*amide modification 1*	amidová modifikace typu 1
BTT	*5-benzylthio-1-H-tetrazole*	5-benzylthio-1-H-tetrazol
DNA	*2′-deoxyribonucleic acid*	2′-deoxyribonukleová kyselina
DOPC	*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine*	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfatidylcholin
***in vivo* I**		experimenty na tkáňových kulturách
***in vivo* II**		experimenty na živých mnohobuněčných organismech
LNA	*locked nucleic acid*	zamknutá nukleová kyselina
mRNA	*messenger RNA*	
PAZ	*P-element induced wimpy testis Argonaute Zwille*	
PIWI	*P-element induced wimpy testis*	
PNA	*peptide nucleic acid*	peptidová nukleová kyselina
RISC	*RNA-induced silencing complex*	
RNA	*ribonucleic acid*	ribonukleová kyselina
RNAi	*RNA interference*	RNA interference
$\boldsymbol{R_P}$	*Rectus Phosphorus*	pravotočivý fosfát
siRNA	*short interfering ribonucleic acid*	krátká interferující ribonukleová kyselina
$\boldsymbol{S_P}$	*Sinister Phosphorus*	levotočivý fosfát
SVPD	*snake venom phosphodiesterase*	fosfodiesteráza hadího jedu

Obsah

1. Úvod ... 1

2. Design siRNA ... 2

2. 1. Základní design siRNA a jeho variace ... 2

2. 2. Vybrané problematické vlastnosti siRNA duplexů ... 3

2. 2. 1. Stabilita duplexů siRNA ... 3

2. 2. 2. Účinnost eliminace cílové mRNA ... 6

2. 2. 3. Imunogenicita siRNA duplexů ... 9

3. Hlavní chemické modifikace siRNA a jejich vliv na vlastnosti siRNA ... 11

3. 1. Modifikace fosfodiesterové kostry vláken siRNA ... 11

3. 1. 1. Thiofosfátová substituce ... 11

3. 1. 2. Dithiofosfátová substituce ... 13

3. 1. 3. Boranofosfátová substituce ... 14

3. 1. 4. Methylenamidová vazba ... 15

3. 2. Modifikace bází ... 17

3. 3. Modifikace ribózy ... 19

3. 3. 1. 2′-deoxy-2′-fluoronukleotidy ... 19

3. 3. 2. 2′-O-methyl ribonukleotidy ... 20

3. 3. 3. 2′-O-benzyl ribonukleotidy ... 22

3. 3. 4. 2′-O-methyl-4-pyridin ribonukleotidy ... 22

3. 3. 5. 4′-thioribonukleotidy ... 23

3. 3. 6. 2′-deoxy-2′-fluoro-4′-thionukleotidy ... 24

3. 3. 7. 2′-O-methyl-4′-thioribonukleotidy ... 24

3. 3. 8. LNA nukleotidy ... 25

3. 3. 9. BNA^{NC} nukleotidy ... 27

3. 3. 10. Substituce ribózy morfolinem ... 27

3. 4. Kombinované modifikace ... 29

3. 4. 1. 2′-O-methyl-dithiofosfátová modifikace ... 29

4. Závěr ... 31

5. Seznam použité literatury 32

1. Úvod

Když v roce 2001 Sayda M. Elbashirová a její kolegové potvrdili, že pomocí siRNA (*short interfering ribonucleic acid*, krátká interferující ribonukleová kyselina) duplexů (viz kapitola 2. 1.) je možné skrze dráhu RNAi (RNA interference) posttranskripčně umlčovat geny eliminací cílové mRNA (*messenger RNA*) i u savčích buněk (Elbashir *et al*., 2001a), zvedla se vlna zájmu o problematiku siRNA. Na duplexy siRNA je od té doby nahlíženo nejen jako na nástroj primárního výzkumu, ale i jako na budoucí molekulární farmaka. Na cestě k využití siRNA duplexů v medicíně je ovšem ještě potřeba překonat velké množství překážek, jejichž příčinou je především komplexní prostředí živého organismu, které vyžaduje sofistikovaný návrh duplexů siRNA.

Při použití siRNA duplexů v *in vivo* I (experimenty na tkáňových kulturách) a zejména *in vivo* II (experimenty na živých mnohobuněčných organismech) experimentech jsou sledovány čtyři hlavní problematické oblasti – účinnost transportu siRNA duplexů, stabilita duplexů siRNA, účinnost eliminace molekul cílové mRNA a imunogenicita siRNA (Braasch *et al*., 2003; Choung *et al*., 2006; Zhang *et al*., 2009). Smyslem první části této práce nazvané „Design siRNA“ je představit vybrané problémy z těchto oblastí a shrnout dosavadní poznatky o jejich příčinách. Problematika účinnosti transportu siRNA duplexů do buněk není v této práci zahrnuta, neboť je poměrně široká a její jádro leží spíše v hledání vhodných transportních systémů než v samotných chemických modifikacích molekul siRNA (Sioud & Sørensen, 2003). Z důvodu rozsahu problematiky je také prostor věnovaný imunogenicitě značně omezen (viz kapitola 2. 2. 3.) a práce se tak věnuje především stabilitě duplexů siRNA (viz kapitola 2. 2. 1.) a účinnosti eliminace cílové mRNA (viz kapitola 2. 2. 2.).

V rámci hledání řešení výše uvedených problémů bylo a je studováno velké množství modifikací siRNA, z nichž některé jsou představeny ve druhé části této práce pojmenované „Hlavní chemické modifikace siRNA a jejich vliv na vlastnosti siRNA“. Tato druhá část pojednává o všech třech typech modifikací siRNA – tedy o modifikacích fosfodiesterové kostry, bází i ribózy – a to zejména ve vztahu k problematice stability siRNA duplexů a účinnosti eliminace cílové mRNA. S ohledem na rozsah, povahu a cíl práce jsou vybrány jednak modifikace nejznámější, jednak modifikace málo známé, avšak podle dosavadního testování potenciálně zajímavé. Cílem je shrnout vlastnosti oněch známějších a prostudovanějších modifikací a představit několik dalších zajímavých modifikací, které by si zasloužily další pozornost. Pro nastínění množství existujících modifikací siRNA jsou ale příležitostně stručně zmíněny i modifikace méně významné.

2. Design siRNA

2. 1. Základní design siRNA a jeho variace

Aktuálně se za nejběžněji používaný design siRNA považují na endoribonukleáze Dicer nezávislé siRNA duplexy, kde vedoucí (*antisense*) vlákno o 21 ribonukleotidech páruje devatenácti páry bází se stejně dlouhým pomocným (*sense*) vláknem, přičemž nepárující ribonukleotidy vytvářejí u obou vláken přesahy o délce 2 ribonukleotidů na 3′ koncích (Rose *et al*., 2005). Toto uspořádání se osvědčilo jak pro RNAi *in vivo* I u savčích buněk (Elbashir *et al*., 2001a), tak i *in vivo* II v savčích organismech (Sørensen *et al*., 2003). Obecně k tomuto základnímu typu duplexu siRNA bývají řazeny nejen 21-mery, ale i 19 až 23-mery siRNA. Jednotlivé názory na to, jak dlouhé siRNA ještě patří k základnímu designu, se ovšem liší (Elbashir *et al*., 2001a; Hefner *et al*., 2008; Kim *et al*., 2005).

Zajímavé výsledky přináší používání siRNA duplexů s vlákny o délce 27 ribonukleotidů při použití pikomolárních koncentrací. 27-mery siRNA jsou při koncentraci 200 pikomolů až stonásobně účinnější ve srovnání s 21-mery, cílícími na stejnou oblast mRNA (Kim *et al*., 2005). To neplatí při použití obvyklých nanomolárních koncentrací, kdy jsou výsledky eliminace cílové mRNA prakticky totožné. Popsaný rozdíl v účinnosti je přisuzován tomu, že 27-mery siRNA fungují jako substrát pro endonukleázu Dicer a tedy se zapojují do vlastní RNAi dráhy organismu (Kim *et al*., 2005).

Navíc se 27-mery siRNA osvědčily i pro eliminaci některých mRNA necitlivých k 21-merům (Kim *et al*., 2005). Pro studium obtížně eliminovatelných mRNA v primárním výzkumu tedy mají 27-mery siRNA značný potenciál. S ohledem na výsledky experimentů publikované Takanorim Kubou a jeho kolegy (Kubo *et al*., 2012) je navíc možné, že 27-mery siRNA budou v budoucnu jako molekulární léčiva v některých případech, díky lepším výsledkům ve srovnávacích studiích, preferovány před využitím 21-merů siRNA. Zatím ale nelze předpokládat, že by používání 27-merů úplně vytlačilo používání 21-merů. Ve srovnávací studii z roku 2012 (Foster *et al*., 2012) vyšly 27-mery siRNA *in vivo* I i *in vivo* II více imunostimulativní a méně tolerantní k chemickým modifikacím, jako jsou 2′-O-methyl ribonukleotidy (viz kapitola 2. 2. 1.) a thiofosfátová substituce (viz kapitola 2. 2. 1.), než 21-mery, přičemž tolerancí je míněno, že není, ve srovnání s nemodifikovanými siRNA duplexy, znemožněn nebo výrazně omezen průběh RNAi.

Předmětem výzkumu jsou také vlastnosti a využití kratších siRNA duplexů. Asi nejblíže k prezentovanému základnímu designu mají 16-mery siRNA. Při srovnávacích experimentech měly při eliminaci shodných cílových mRNA vyšší účinnost než 19-mery (Chu & Rana, 2008), takže lze očekávat, že i kratší siRNA čeká další výzkum a budoucí využití.

2. 2. Vybrané problematické vlastnosti siRNA duplexů

Jak již bylo popsáno v úvodu, používání siRNA duplexů se potýká s mnoha překážkami. Ne každý siRNA duplex má vyhovující vlastnosti pro použití *in vivo* II. Obvyklým problémem RNAi je rozdílná účinnost konkrétního duplexu siRNA při eliminaci cílové mRNA v závislosti na použitém experimentálním uspořádání. To znamená, že dobré výsledky dosažené *in vitro* a *in vivo* I se nemusí promítnout do výsledků *in vivo* II (Layzer *et al*., 2004). Návrh vhodné siRNA tedy komplikuje skutečnost, že modifikace vedoucí například k významnému zvýšení stability nemusí nutně vést k žádoucímu zvýšení účinnosti eliminace cílové mRNA, a dokonce ji může i negativně ovlivnit (Chiu & Rana, 2003). Od výsledné siRNA se ovšem očekává, že bude dobře fungovat ve všech sledovaných oblastech (Morrissey *et al*., 2005). Navrh siRNA je tedy hledáním takových modifikací, které zajistí nikoliv maximální hodnoty pro jednu vlastnost duplexu, ale optimální nebo alespoň dostačující hodnoty všech vlastností.

Při zkoumání, proč mnohé siRNA duplexy nefungují tak, jak by bylo žádoucí, bylo získáno mnoho poznatků o průběhu RNA interference v savčích buňkách. Obeznámení s aspoň malou částí těchto poznatků je nezbytné k pochopení, proč je potřeba vytvářet nové varianty siRNA duplexů pomocí různých modifikací.

2. 2. 1. Stabilita duplexů siRNA

Stabilita siRNA, a to zejména pro terapeutické využití *in vivo* II, je řešena především ve vztahu k sérovým ribonukleázám (Choung *et al*., 2006) schopným efektivně degradovat mimo jiné také molekuly siRNA. Modifikace zvyšující stabilitu siRNA tedy mají za cíl takové zvýšení odolnosti vůči těmto ribonukleázám (RNázám), které se projeví zvýšením poločasu degradace molekul siRNA (Chiu & Rana, 2003). K tomuto účelu se využívají jak modifikace fosfodiesterové kostry, tak modifikace ribózy (Hickerson *et al*., 2008). Zvýšení stability duplexu siRNA bez snížení účinnosti eliminace cílové mRNA je přitom obvykle považováno za dobrý výsledek (Choung *et al*., 2006).

Nejvíce se na degradaci siRNA duplexů zřejmě podílí 3′-5′ exonukleázy (Dowler *et al*., 2006; Dande *et al*., 2006). Ačkoliv endonukleázy také mají na degradaci siRNA nezanedbatelný vliv (Czauderna *et al*., 2003; Dowler *et al*., 2006), výsledky některých experimentů velmi přesvědčivě poukazují na to, že zablokováním volných 3′ konců duplexu siRNA pomocí chemických modifikací, jako je například morfolinová modifikace (viz kapitola 3. 3. 10.), se daný duplex výrazně stabilizuje (Zhang *et al*., 2009). Navíc bylo prokázáno, že modifikace tří koncových ribonukleotidů na 5′ konci molekuly siRNA pomocí thiofosfátové substituce (viz kapitola 3. 1. 1.) anebo 2′-O-methyl ribonukleotidů (viz kapitola 3. 3. 2.) nevede ke zvýšení stability *in vitro* v 10% lidském séru, přičemž tytéž modifikace na 3′ konci nukleázovou rezistenci výrazně zvyšují, což také podporuje význam 3′-5′ exonukleáz v degradaci siRNA duplexů (Choung *et al*., 2006).

Ačkoliv existují i nemodifikované siRNA duplexy, které jsou stabilní až 72 hodin (Braasch *et al*., 2003), obvykle dochází *in vitro* k úplné degradaci nemodifikovaných molekul siRNA jak v 10%

hovězím fetálním séru, tak v méně testovaném koncentrovanějším lidském či myším séru, v řádu několika málo (zpravidla 6) hodin. Vhodně navrženými modifikacemi se však dá docílit toho, že přítomnost nepoškozených duplexů siRNA lze za stejných podmínek zaznamenávat až po dobu 2 dnů (Layzer *et al*., 2004; Elmén *et al*., 2005; Mook *et al*., 2007), v ojedinělých případech i déle (Morrissey et al., 2005; Mook *et al*., 2007).

Zvýšení nukleázové rezistence by v ideálním případě mělo vést ke zvýšení účinnosti eliminace cílové mRNA a prodloužení doby, po kterou je tuto eliminaci možné zaznamenat. I když se zatím zdá, že dosáhnout takto dobrých výsledků bude zejména v *in vivo* II experimentech značně obtížné (Layzer *et al*., 2004), bylo již dosaženo určitých úspěchů. Hydrodynamickou injekcí chemickými modifikacemi stabilizovaných molekul siRNA, jejichž přesná podoba je patentem společnosti Dharmacon, do živé myši, bylo dosaženo čtyřnásobku maximální účinnosti eliminace cílové mRNA ve srovnání s použitím nemodifikovaných siRNA (Bartlett & Davis, 2007). Také David V. Morrissey dosáhl se svými kolegy účinnější eliminace cílové mRNA *in vivo* II pomocí stabilizovaných siRNA duplexů. V jejich experimentu byly modifikovány všechny pyrimidinové pozice obou vláken siRNA duplexu 2′-deoxy-2′-fluoropyrimidiny (viz kapitola 3. 3. 1.), všechny purinové pozice vedoucího vlákna 2′-O-methyl ribonukleotidy (viz kapitola 3. 3. 2.) a všechny purinové pozice pomocného vlákna obsahovaly 2′-deoxyribonukleotidy namísto ribonukleotidů (Morrissey *et al*., 2005).

Zvýšit účinnost eliminace mRNA *in vivo* II prostřednictvím zvýšení rezistence vůči nukleázám je nejspíš možné zejména tam, kde při stejné koncentraci nemodifikovaných molekul siRNA nedojde k nasycení RNAi aparátu. Při určování potřebné koncentrace by tedy měla být zohledněna nejen samotná doba expozice siRNA působení nukleáz, ale i obvyklá účinnost eliminace cílové mRNA. Proto je potřeba pro jednotlivé případy hledat individuální řešení (Bartlett & Davis, 2007).

Přestože bylo ve výše uvedeném experimentu Dereka W. Bartletta a Marka E. Davise dosaženo vyšší maximální hodnoty eliminace cílové mRNA, celkové srovnání neukázalo pro modifikované duplexy siRNA prodloužení doby, po kterou bylo možné eliminaci cílové mRNA pozorovat (Bartlett & Davis, 2007). Jako vysvětlení se nabízí možnost, že modifikované a nemodifikované siRNA mají po úspěšné transfekci podobnou životnost (Layzer *et al*., 2004).

Nemodifikované duplexy siRNA, nebo alespoň některé z nich, mohou být v rychle se dělících buňkách s průměrnou dobou zdvojení 1 až 2 dny účinné něco málo přes týden. V pomalu se dělících buňkách s průměrnou dobou zdvojení 15 až 20 dní mohou siRNA duplexy fungovat až jeden měsíc. Vliv stabilizace siRNA duplexů na jejich životnost v intracelulárním prostředí může být lépe sledován v pomalu se dělících buňkách. Pokaždé, když se buněčná populace zdvojí, je stávající počet duplexů siRNA rozdělen mezi dvojnásobný počet buněk. Tento proces se nazývá vyřeďování. Klesá tak dávka siRNA na buňku a tím i účinnost eliminace cílové mRNA. Nukleázovou rezistenci lze tedy považovat za limitující faktor pro dobu pozorování účinné eliminace cílové mRNA spíše v pomalu se dělících buňkách (Bartlett & Davis, 2007).

Při experimentech s pomalu se dělícími buňkami se ukázalo, že modifikace zajišťující vyšší resistenci proti sérovým nukleázám dobu trvání eliminace cílové mRNA *in vivo* I buď neprodlužují vůbec, nebo ji prodlužují pouze nepatrně. Rozhodujícím faktorem se zdá být metoda transportu duplexů siRNA do buněk. V cytosolu je stabilita modifikovaných i nemodifikovaných molekul siRNA zřejmě prakticky totožná, protože při elektroporaci, kdy velké množství molekul siRNA vstupuje přímo do cytosolu, nebyly zaznamenány rozdíly mezi modifikovanými a nemodifikovanými duplexy. Pomocí matematického modelu byla vytvořena predikce, že případné prodloužení doby přetrvávání siRNA v buňkách je důsledkem vyšší odolnosti stabilizovaných siRNA vůči degradaci při průchodu endozomem. K průchodu molekul siRNA endozomem dochází během internalizace do buňky po transfekci pomocí kationtových lipidů – tedy před tím, než může dojít k zabudování siRNA do RNAi dráhy (Bartlett & Davis, 2007), kde zřejmě působí interakce siRNA duplexu s komponenty RISC (*RNA-induced silencing complex*, Hammond *et al*., 2000, viz kapitola 2. 2. 2.) jako ochrana před nukleázovým atakem. Přesněji se zřejmě jedná o interakce siRNA s PAZ (*P-element induced wimpy testis Argonaute Zwille*) doménou proteinu Ago2 (*Argonaute 2*), která nespecificky váže přesahy o délce 2 ribonukleotidů na 3′ koncích RNA duplexů (Ma *et al*., 2004). Mayumi Takahashi a její kolegové sice význam intracelulární stability siRNA duplexů vyzdvihují, avšak i oni připouštějí, že zde hraje roli celá řada faktorů (Takahashi *et al*., 2012).

Stabilitu ovšem není vždy nutné řešit pouze pomocí modifikací siRNA. *In vitro* byly zaznamenány i úspěchy s inhibicí RNáz komerčně dostupnými inhibitory jako jsou například RNAseOUT™ a RiboLock (Haupenthal *et al*., 2006). Možnosti používání inhibitorů RNáz ale vyžadují další zkoumání, protože se již dříve ukázalo, že jejich prosté přidání do injektovaného koktejlu pro zlepšení výsledků *in vivo* II nestačí (Layzer *et al*., 2004).

Použití siRNA, které nemají modifikacemi zvýšenou nukleázovou rezistenci, je však v některých případech výhodné. Jako žádoucí se jeví tehdy, když je siRNA určená pro působení pouze v určité tkáni, přičemž při transportu a ani v cílové tkáni nehrozí kontakt siRNA s vysokými hladinami RNáz. Tedy je-li zajištěno, že siRNA bude v pořádku dopravena do cílové tkáně. Rychlejší degradace nemodifikované siRNA v případě, že unikne z cílové tkáně do krevního řečiště, pak může sloužit jako ochrana před možnými nežádoucími účinky siRNA (Hickerson *et al*., 2008).

K problematice stability siRNA patří také termostabilita, jelikož teplota 37° C je obecně uznávaná jako normální teplota lidského těla a je pro použití molekul siRNA v medicíně zásadní. Duplexy siRNA obsahující větší množství adeninu a uracilu mají nižší termostabilitu než duplexy obsahující více cytosinu a guaninu a mohou být tedy v závislosti na sekvenci při 37° C natolik nestabilní, že jejich disociace negativně ovlivňuje účinnost eliminace cílové mRNA, neboť disociovaná vlákna siRNA jsou v séru obvykle degradována do 30 vteřin (Braasch *et al*., 2003). Úspěšné zvýšení termostability pomocí modifikací může tedy u některých siRNA duplexů být rozhodujícím faktorem pro jejich efektivní aplikaci (Braasch *et al*., 2003).

Termostabilita siRNA duplexu má ale především zásadní vliv na účinnost eliminace cílové mRNA a cílem jejího modulování může být jak její zvýšení, tak i snížení (Khvorova *et al.*, 2003), jak bude vysvětleno dále (viz kapitola 2. 2. 2).

2. 2. 2. Účinnost eliminace cílové mRNA

Jedním z cílů modifikací siRNA duplexů je i zvýšení účinnosti eliminace cílové mRNA (Zhang *et al.*, 2009). Obzvláště důležité je zvýšení nebo alespoň zachování účinnosti eliminace cílové mRNA i při nižších koncentracích siRNA, protože transportní systémy pro použití siRNA *in vivo* II nejsou tak účinné jako ty, které jsou používány *in vivo* I (Hall *et al.*, 2004).

Jak již bylo uvedeno na konci předchozí kapitoly (viz kapitola 2. 2. 1.), termostabilita siRNA duplexu je pro účinnost eliminace cílové mRNA velmi významným faktorem (Khvorova *et al.*, 2003). S ohledem na účinnost eliminace cílové mRNA by termostabilita siRNA duplexu neměla být ani příliš vysoká, ani příliš nízká. Zatímco příliš nízká by mohla vést k nedostatečné afinitě vedoucího vlákna siRNA k cílové mRNA, příliš vysoká termostabilita pravděpodobně brání rozvíjení siRNA duplexu (Chiu & Rana, 2003; Reynolds *et al.*, 2004; Bramsen *et al.*, 2009).

Rozvíjení siRNA duplexu, ke kterému je potřeba ATP, je přitom nezbytnou součástí sestavení aktivního RISC (Nykänen *et al.*, 2001), což je zase klíčovým krokem k úspěšné eliminaci cílové mRNA (Schwarz *et al.*, 2003). RISC je komplex skládající se ze siRNA a proteinů zprostředkovávajícího štěpení cílové mRNA mezi 10. a 11. ribonukleotidem, počítáno podle vedoucího vlákna siRNA, respektive od ribonukleotidu cílové mRNA párujícího s terminálním ribonukleotidem na 5′ konci siRNA (Elbashir *et al.*, 2001b). Nepostradatelným komponentem pro fungování RISC je protein Ago2, který obsahuje PIWI (*P-element induced wimpy testis*) doménu zajišťující nukleázovou aktivitu RISC (Rand *et al.*, 2004). Erich Koller a jeho kolegové na siRNA duplexech obsahujících jak 2′-deoxy-2′-fluoronukleotidy (viz kapitola 3. 3. 1.), tak 2′-O-methyl ribonukleotidy (viz kapitola 3. 3. 2.), ověřili, že modifikované siRNA duplexy mohou *in vivo* I interagovat s Ago2 stejně jako nemodifikované a že štěpí cílovou mRNA ve stejném místě (Koller *et al.*, 2006).

Jednotlivá vlákna siRNA duplexu si zpravidla nejsou při sestavování RISC zcela rovnocenná (Schwarz *et al.*, 2003), ačkoliv jsou obě dvě obecně vzato schopna vstupovat do RISC a účastnit se RNA interference (Jackson *et al.*, 2003). Duplex siRNA tedy obvykle vykazuje funkční asymetrii, a to i úplnou, což znamená, že jedno z jeho vláken vůbec nemusí být schopné vstupu do RISC. Jakou měrou se bude každé z vláken podílet na RNAi určuje termostabilita párování bází na 5′ koncích siRNA duplexu (Schwarz *et al.*, 2003). Zdá se, že na výběr vlákna siRNA pro zabudování do RISC má zásadní vliv s RISC asociovaný helix s helikázovou aktivitou. Tento helix přednostně rozvíjí ten 5′ konec siRNA duplexu, který s komplementárním vláknem siRNA interaguje slaběji a je tudíž k rozvíjení náchylnější. Tímto krokem je vlastně vybráno vlákno siRNA vstupující do RISC (Schwarz *et al.*, 2003; Khvorova *et al.*, 2003; Bramsen *et al.*, 2009), neboť tento upřednostňuje pravděpodobně

asociaci s vláknem siRNA ve směru 5′-3′, případně interaguje s fosfátem na pátém uhlíku (C5′) prvního ribonukleotidu vlákna siRNA (Khvorova *et al.*, 2003). Význam interakce RISC s fosfátem dokládají experimenty s navázáním methylové skupiny na kyslík na pátém uhlíku téhož ribonukleotidu (Nykänen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2008). Takto 5′-O-methylovaná vlákna mají nízkou frekvenci inkorporace do RISC, a proto lze této modifikace využít k znevýhodnění jednoho z vláken siRNA duplexu (Chen *et al.*, 2008). Existuje ale i mnoho dalších modifikací ovlivňujících výběr vlákna siRNA do RISC a zdá se být výhodnější destabilizovat 3′ konec pomocného vlákna než stabilizovat jeho 5′ konec (Bramsen *et al.*, 2009).

Při experimentálním ověřování vlivu termostability siRNA duplexu na účinnost eliminace cílové mRNA byla definována 70% účinnost jako hranice mezi funkčními a nefunkčními duplexy, kdy za funkční byly považovány jen ty duplexy siRNA vykazující minimálně 70% účinnost eliminace cílové mRNA. Bylo zjištěno, že funkční duplexy siRNA mají ve srovnání s nefunkčními méně termostabilní 5′ konec vedoucího vlákna. Rozšíření experimentu na větší počet různých siRNA duplexů rozdělených do více kategorií a další modifikace pokusů následně potvrdily, že se jedná o obecné pravidlo a nikoliv o náhodu (Khvorova *et al.*, 2003).

Funkční duplexy siRNA také mají méně termostabilní oblast mezi 9. a 14. ribonukleotidem (číslováno dle vedoucího vlákna). Pokud má siRNA duplex méně termostabilní 5′ konec vedoucího vlákna, ale má termostabilní oblast od 9. do 14. ribonukleotidu, účinnost eliminace cílové mRNA je nižší než 70 % (Khvorova *et al.*, 2003). V této oblasti se nachází místo štěpení cílové mRNA (Elbashir *et al.*, 2001b), takže nižší termostabilita siRNA by zde mohla přispívat ke zvýšení účinnosti eliminace cílové mRNA například skrze pozitivní vliv na uvolňování produktu štěpení z RISC a tím i na regeneraci komplexu pro degradaci další shodné molekuly mRNA. Pokud je termostabilita nižší v obou popsaných oblastech siRNA duplexu, dochází v naprosté většině případů ke zvýšení účinnosti eliminace cílové mRNA (Khvorova *et al.*, 2003).

Přestože popsaný termodynamický profil siRNA duplexu není absolutní zárukou úspěchu a zdá se, že existují i další faktory rozhodující o konečném výsledku, modifikace cílené na termostabilitu siRNA duplexu se nabízejí jako možné řešení problémů s nedostatečnou účinností eliminace cílové mRNA. Prostředkem k dosažení žádoucího termodynamického profilu může být jak snižování termostability na 5′ konci vedoucího vlákna siRNA duplexu, tak zvyšování termostability na 5′ konci pomocného vlákna (Khvorova *et al.*, 2003). Tímto modulováním termostability konců vláken siRNA duplexu pomocí modifikací je v konečném důsledku měněn poměr, ve kterém jsou jednotlivá vlákna inkorporována do RISC (Rand *et al.*, 2005).

Existují výsledky experimentů poukazující na to, že problém kompetice vláken siRNA duplexu lze obejít i změnou základního designu. Pokud je přesah o délce 2 ribonukleotidů přítomen pouze na 3′ konci vedoucího vlákna, zvyšuje se frekvence vstupu tohoto vlákna do RISC. Tato změna by mohla nějakým způsobem souviset například s interakcí siRNA s PAZ doménou Ago2 proteinu (Sano *et al.*, 2008).

Vlákno, které po rozvinutí siRNA duplexu nezůstává asociováno s RISC, je degradováno. RISC obvykle štěpí toto vlákno siRNA mezi 9. a 10. ribonukleotidem během disociace duplexu, čímž vzniká aktivovaná forma RISC. Proto jsou modifikace ztěžující štěpení v této části u pomocného vlákna siRNA nevhodné (Rand *et al.*, 2005). Snižování termostability pomocí záměny bází na 9. a 10. pozici se již u některých siRNA duplexů pro zvýšení účinnosti eliminace cílové mRNA osvědčilo (Addepalli *et al.*, 2010). Mnozí se také domnívají, že existuje i alternativní mechanismus, který umožňuje disociaci vláken duplexu siRNA bez souběžné degradace jednoho z nich (Rand *et al.*, 2005; Addepalli *et al.*, 2010). Tato hypotéza byla experimentálně prokázána, ale ukázalo se, že tento alternativní mechanismus je pro využití v RNAi jako kompenzace vysoké termostability siRNA duplexů příliš pomalý (Ohrt *et al.*, 2011).

Duplex siRNA, který nemá popsaný funkční termodynamický profil, hůře interaguje s RISC a navíc je pravděpodobně v intracelulárním prostředí rychleji degradován RNázami (Khvorova *et al.*, 2003). Pro účinnost eliminace cílové mRNA tedy nejsou až tak rozhodující její vlastnosti, ale spíše vlastnosti použitého siRNA duplexu a jeho celková funkčnost. Pro vysoce účinnou eliminaci cílové mRNA se jeví jako ideální siRNA duplexy obsahující 30 – 52 % (Reynolds *et al.*, 2004) guaninu a cytosinu a neobsahující termostabilní repetice, které by mohly deformovat strukturu siRNA duplexu. Účinné siRNA duplexy pak dále mají na 15. až 19. pozici pomocného vlákna tři nebo více adeninů a uracilů, přičemž pro 19. pozici je přitom zřejmě nejvhodnější adenin a obzvláště nevhodný cytosin a guanin. Na 3. pozici pomocného vlákna je vhodný adenin, na 10. pozici pomocného vlákna je vhodný uracin, na 13. pozici pomocného vlákna není vhodný guanin. Na základě těchto kritérií je možné vytvářet algoritmy, které výrazně zvyšují pravděpodobnost výběru dobře fungujícího duplexu siRNA (Reynolds *et al.*, 2004).

Zajímavá situace nastává v případě využití více různých siRNA duplexů zároveň. V RNA interferenci se může uplatnit jen tolik siRNA, kolik je v buňce možné sestavit jednotlivých RISC. Proto není nijak zvlášť překvapivé zjištění, že různé siRNA duplexy s odlišnými sekvencemi mezi sebou kompetují o vazbu v RISC (McManus *et al.*, 2002; Koller et al., 2006). Některé siRNA duplexy jsou v této soutěži o uplatnění při RNAi úspěšnější než jiné. Ty duplexy siRNA, které při samostatném použití vykazují účinnou eliminaci cílové mRNA, zároveň také vítězí při kompetici o vstup do RISC s jinými méně účinnými siRNA duplexy. Existuje tedy korelace mezi účinností eliminace cílové mRNA a schopností kompetovat jiným druhům siRNA duplexů. Experimentální data však neukázala úplnou závislost mezi oběma vlastnostmi, takže zde mohou hrát roli i další faktory. Schopnost kompetice se mění i v závislosti na použité buněčné linii. Tato schopnost může komplikovat současné použití více druhů siRNA duplexů v jednom experimentu a může způsobit, že výsledky RNAi budou lepší, pokud na buňky v daném čase bude působit jen jedna siRNA. Pro úspěšnou RNAi více různými siRNA současně je zapotřebí nalézt vhodnou kombinaci jejich koncentrací (Koller et al., 2006).

Dalším problémem eliminace mRNA je specifita vedoucího vlákna siRNA k cílové mRNA (Semizarov *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 2006a). Jeden typ mRNA lze eliminovat

za použití různých druhů siRNA a především naopak, jedním druhem siRNA lze eliminovat různé typy mRNA, pokud jsou s vláknem siRNA zabudovaném v RISC alespoň částečně komplementární (Jackson *et al.*, 2003). Pro rozpoznání mRNA RISC je rozhodující sekvence prvních osmi ribonukleotidů na 5′ konci vlákna siRNA zabudovaného do komplexu, zejména pak úsek od 2. do 7. ribonukleotidu (Jackson *et al.*, 2006a). Tím vzniká problém s eliminací molekul mRNA, které nejsou zamýšleným cílem. Zjištění, že nežádoucí eliminace je závislá na sekvenci a není například pouhým artefaktem příliš vysoké koncentrace siRNA, podporuje i skutečnost, že snižováním koncentrace siRNA se tuto nežádoucí eliminaci nepodařilo odstranit (Jackson *et al.*, 2003).

Z neznámých důvodů však není degradován každý typ mRNA komplementární přibližně sedmi ribonukleotidy k výše uvedené oblasti vedoucího vlákna, což činí predikci nežádoucí eliminace mRNA velmi obtížnou (Jackson *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 2006a). Příčinou nežádoucí degradace mRNA navíc může být jak vedoucí, tak i pomocné vlákno siRNA (Jackson *et al.*, 2003). A protože k nežádoucí eliminaci mRNA může stačit relativně malá shoda, navržení absolutně specifického siRNA duplexu je velice obtížné, ne-li nemožné (Jackson *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 2006a). Významného zlepšení specifity vedoucího vlákna siRNA ovšem dosáhnout lze. A to snížením počtu ribonukleotidů vedoucího vlákna siRNA, které jsou komplementární k nejčastěji štěpené necílové mRNA, a maximalizací rozdílu termostability mezi žádoucím siRNA/mRNA duplexem a nejčastějším nežádoucím (Semizarov *et al.*, 2003). Vždy je ale možnost, že se objeví další necílová mRNA kompatibilní s novým designem siRNA duplexu (Jackson *et al.*, 2006a).

Mezi nežádoucí účinky siRNA duplexů patří také cytotoxicita, která je důsledkem nedostatečné specifity k cílové mRNA. Některé nemodifikované siRNA duplexy proto mohou u buněk navodit apoptotický fenotyp, a to u různých druhů buněk, nikoliv jen u jednoho, ovšem s různými účinky – některé buněčné linie jsou k cytotoxickému působení siRNA citlivější než jiné. Cytotoxické účinky siRNA duplexů jsou závislé na koncentraci siRNA, přičemž za zcela bezpečnou je považována koncentrace 1 nM (Fedorov *et al.*, 2006). Dále také závisí na schopnosti buňky sestavit funkční RISC (Fedorov *et al.*, 2006; Bramsen *et al.*, 2009), takže pokud je například z buňky odstraněn protein Ago2, cytotoxicita siRNA se neprojeví. Navíc se cytotoxcita siRNA zdá být až ve 30 % případů sekvenčně vázána na přítomnost motivu GCCA/UGGC (Fedorov *et al.*, 2006). Platí, že modifikace mající příznivý vliv na specifitu vedoucího vlákna siRNA k cílové mRNA jako jsou 2′-O-methyl ribonukleotidy (viz kapitola 3. 3. 2.; Jackson *et al.*, 2006a) snižují obvykle také cytotoxicitu siRNA duplexů (Fedorov *et al.*, 2006).

2. 2. 3. Imunogenicita siRNA duplexů

Přirozeným zdrojem molekul siRNA jsou virové infekce, transgenní aktivita a transposony (Khvorova *et al.*, 2003). Proto není divu, že siRNA duplexy mohou být imunitním systémem rozeznávány jako cizorodé a tedy potenciálně nebezpečné molekuly a jejich další významnou problematickou vlastností, která je závislá na sekvenci a lze ji tedy ovlivnit modifikacemi, je

imunogenicita. U člověka reaguje na přítomnost siRNA duplexů vrozená imunita (Sledz *et al*., 2003; Karikó *et al*., 2004; Hornung *et al*., 2005; Judge *et al*., 2005; Sioud, 2005; Manoharan *et al*., 2011; Wada *et al.*, 2012). Schopnost siRNA duplexů vyvolat imunitní reakci již byla ověřena i *in vivo* II u myší (Judge *et al*., 2005; Judge *et al*., 2006).

3. Hlavní chemické modifikace siRNA a jejich vliv na vlastnosti siRNA

3. 1. Modifikace fosfodiesterové kostry vláken siRNA

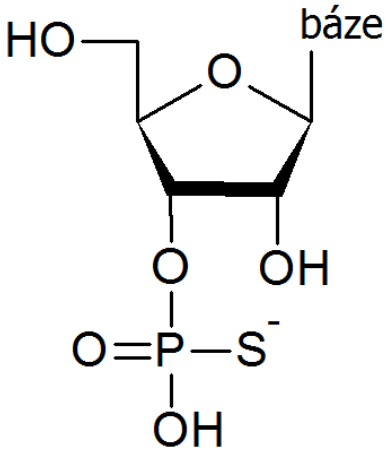
Modifikace fosfodiesterové kostry vláken siRNA jsou dvojího typu. Většina těchto modifikací patří k prvnímu typu, kde je jeden nebo dva kyslíky fosfátu substituován jiným prvkem nebo zbytkem. Používá se buď síra nebo borát, které nahrazují kyslík nebo kyslíky nepodílející se na fosfodiesterových vazbách mezi fosfátem a nukleosidem (viz kapitoly 3. 1. 1. až 3. 1. 3. včetně). Druhou skupinou modifikací je nahrazení fosfátů amidy (viz kapitola 3. 1. 4.).

Pro úspěšné modifikování kostry siRNA je velmi důležité, aby modifikovaná molekula byla schopná při interakci s molekulou cílové mRNA zaujmout konformaci typu A, která je pro průběh RNAi nezbytná (Chiu & Rana, 2002). Stereochemické vlastnosti modifikované kostry by celkově měly, kvůli interakcím s RISC a cílovou molekulou mRNA, zůstat blízké nemodifikované předloze. Naopak změna náboje může být pro docílení efektivní RNAi prospěšná (Hall *et al*., 2004; Yang *et al*., 2012; Mutisya *et al*., 2014).

Modifikace fosfodiesterové kostry se obvykle provádějí primárně za účelem zvýšení rezistence siRNA k sérovým nukleázám. Případná vyšší účinnost takto modifikovaných siRNA, kterou nelze vysvětlit pouze vyšší stabilitou ve vztahu k sérovým nukleázám, je samozřejmě žádoucí a dalšího zkoumání hodný benefit (Chiu & Rana, 2003; Hall *et al*., 2004; Choung *et al*., 2006; Iwase *et al*., 2006; Iwase *et al*., 2007; Iwase *et al*., 2009; Yang, *et al*., 2012; Wu *et al*., 2014; Jahns *et al*., 2015).

3. 1. 1. Thiofosfátová substituce

Asi nejčastější modifikací fosfodiesterové kostry siRNA je thiofosfátová substituce. Při thiofosfátové substituci (viz Obrázek 1) je jeden kyslík, který se nepodílí na fosfodiesterové vazbě, nahrazen sírou (Hall *et al*., 2004). Tato modifikace vede ke snížení teploty tání siRNA duplexu (Braasch *et al*., 2003; Wu *et al*., 2014; Jahns *et al*., 2015).



Obrázek 1: Thiofosfátová substituce

Savčími buňkami je přítomnost thiofosfátů v siRNA duplexech tolerována (Braasch *et al*., 2003), přičemž tolerance k thiofosfátům v pomocném vláknu siRNA je vyšší než tolerance k thiofosfátům ve vedoucím vláknu siRNA (Jahns *et al*., 2015). Takto modifikované duplexy tedy mohou vstupovat do RISC a zprostředkovat účinnou eliminaci cílové mRNA (Braasch *et al*., 2003). Některé siRNA duplexy s thiofosfáty navíc vykazují lepší účinnost eliminace cílové mRNA než jejich nemodifikovaný ekvivalent (Li *et al*., 2005). Dříve uváděná cytotoxicita thiofosfátů (Amarzguioui *et al*., 2003) přitom možná bude spíše otázkou purifikace siRNA než jeho chemické struktury, protože při několika dalších výzkumech

thiofosfátových substitucí nebyla vůbec zaznamenána (Braasch *et al*., 2003; Hall *et al*., 2004; Li *et al*., 2005).

Ohledně vztahu mezi thiofosfáty a nukleázovou rezistencí existuje určitá diskrepance výsledků. Zatímco Dwaine A. Braasch a jeho kolegové neprokázali za přítomnosti 5% hovězího fetálního séra v médiu při experimentech typu *in vivo* I u siRNA duplexů s thiofosfátovými substitucemi v obou vláknech vyšší odolnost vůči nukleázám ve srovnání s nemodifikovanými duplexy siRNA, a to ani při 21 thiofosfátových substitucích v každém vláknu (Braasch *et al*., 2003), jiná studie z téhož roku dokládá vliv thiofosfátové substituce na zvýšení stability *in vitro* nejen u modifikovaných siRNA duplexů, ale dokonce i u modifikovaných jednovláknových molekul siRNA (Chiu & Rana, 2003). Pro zvýšení stability se zdá dostatečná modifikace nukleoidů na 3′ koncích obou vláken siRNA duplexu (Kraynack & Baker, 2006; Choung *et al*., 2006; Wu *et al*., 2014; Jahns *et al*., 2015).

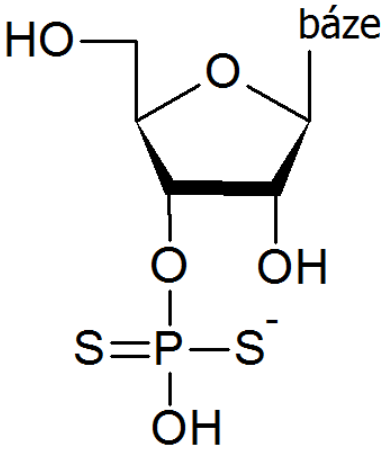
Ukázalo se, že plně modifikované siRNA duplexy obvykle vykazují horší účinnost eliminace cílové mRNA. Pravděpodobně proto, že dochází k jejich kumulaci v jádře (Braasch *et al*., 2003), přičemž RISC funguje pouze v cytoplazmě (Zeng & Cullen, 2002).

Problémem siRNA obsahujících thiofosfáty se zdá být chiralita (Yang *et al*., 2012; Jahns *et al*., 2015). Thiofosfátová skupina totiž může nabývat dvou různých konfigurací, protože její fosfor je chirální. To znamená, že thiofosfáty se vyskytují jako izomery (Yang *et al*., 2012). Běžně jsou syntetizovány směsi 2^n diasteroizomerů siRNA obsahujících thiofosfáty, přičemž $\underline{n}$ je počet thiofosfátových substitucí v molekule. Tyto diasteroizomery siRNA se liší svými vlastnostmi a tudíž i interakcemi s buněčnými proteiny, takže přítomnost různých izomerů snižuje celkovou účinnost eliminace cílové mRNA. Předpokládá se, že zejména ve vedoucím vláknu siRNA vede přítomnost chirálních thiofosfátů k negativnímu ovlivnění interakcí s Ago2. Je přitom pravděpodobné, že tyto rozdíly se negativně projevují zejména u plně modifikovaných siRNA duplexů, protože ty vytvářejí nejvíce různých diasteroizomerů (Jahns *et al*., 2015).

Zatím neexistuje metoda, která by umožňovala syntetizovat pouze jeden izomer, nicméně lze ovlivnit poměr mezi diasteroizomery siRNA. A to buď použitím BTT (5-benzylthio-1-H-tetrazol) ve prospěch R_P (*Rectus Phosphorus*, pravotočivý fosfát) izomerů thiofosfátů nebo použitím tetrazolu ve prospěch S_P (*Sinister Phosphorus*, levotočivý fosfát) izomerů thiofosfátů. Duplexy siRNA s převažujícími S_P thiofosfáty mají nižší teplotu tání než siRNA duplexy s převažujícími R_P thiofosfáty. Duplexy siRNA s převažujícími R_P thiofosfáty naopak vykazují vyšší stabilitu v 10% hovězím fetálním séru. Rovněž platí, že siRNA duplexy s převažujícími R_P thiofosfáty účinněji eliminují cílovou mRNA než siRNA duplexy s převažujícími S_P thiofosfáty (ale zpravidla nikoliv ve srovnání s nemodifikovanými siRNA duplexy), a to jak v případě, že se R_P thiofosfáty vyskytují v obou vláknech siRNA, tak v případě, že se vyskytují jen v pomocném nebo jen ve vedoucím vláknu siRNA. R_P thiofosfáty jsou ve srovnání s S_P thiofosfáty také lépe tolerovány při vstupu do RISC a mohou být přítomny i v centrální oblasti pomocného vlákna (Jahns *et al*., 2015).

3. 1. 2. Dithiofosfátová substituce

Při dithiofosfátové substituci (viz Obrázek 2) jsou oba kyslíky, které se nepodílejí na fosfodiesterové vazbě, nahrazeny sírou. Přítomnost dithiofosfátů v siRNA duplexu neovlivňuje konformaci typu A (Yang *et al*., 2012).



Obrázek 2: Dithiofosfátová substituce

Také tato modifikace se používá ke zvýšení nukleázové rezistence siRNA duplexů, zároveň ovšem vede ke snížení termostability. Její celkový účinek závisí na jejím umístění v siRNA duplexu (Yang *et al*., 2012). Umístění dithiofosfátů na 18. a 19. anebo na 19. a 20. pozici pomocného vlákna podporuje rozvíjení duplexu siRNA (Yang *et al*., 2012; Wu *et al*., 2014), protože dává vzniknout žádoucímu termodynamickému profilu (viz kapitola 2. 2. 2.). V případě obou dvou výše popsaných modifikací je výsledkem zvýšení účinnosti eliminace cílové mRNA *in vivo* I ve srovnání s nemodifikovanými duplexy siRNA (Yang *et al*., 2012; Wu *et al*., 2014). Dithiofosfáty navíc ve srovnání s thiofosfáty méně snižují teplotu tání siRNA duplexu (Wu *et al*., 2014).

Nukleázová rezistence molekul siRNA obsahujících dithiofosfáty byla testována *in vitro* v 10% fetálním hovězím séru. Molekuly siRNA modifikované dithiofosfáty mají signifikantně zvýšenou nukleázovou rezistenci nejen ve srovnání s nemodifikovanými ekvivalenty, ale i s odpovídajícími siRNA, které mají fosfodiesterovou kostru na stejných pozicích modifikovanou thiofosfáty (Yang *et al*., 2012; Wu *et al*., 2014).

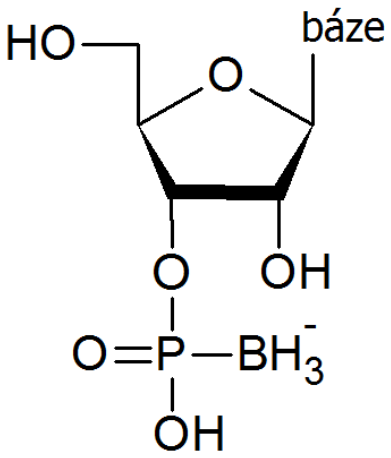
Ačkoliv je rezistence siRNA duplexů proti nukleázám tím vyšší, čím vyšší je počet dithiofosfátů, zvyšování jejich počtu nevede ke zvýšení účinnosti eliminace cílové mRNA, ale naopak k jejímu snížení. Proto je nutné pro duplex siRNA hledat optimální počet a umístění dithiofosfátových substitucí. Ke zlepšení účinnosti eliminace cílové mRNA *in vivo* I ve srovnání s nemodifikovaným duplexem siRNA, vede, vedle již popsaných dithiofosfátových substitucí, například umístění modifikace na 10. ribonukleotidu vedoucího vlákna nebo na 3. a 12. ribonukleotidu pomocného vlákna (Yang *et al*., 2012; Wu *et al*., 2014). Umístění dithiofosfátů na první čtyři ribonukleotidy vedoucího vlákna naopak vede k úplné ztrátě účinnosti eliminace cílové mRNA (Yang *et al*., 2012).

Další testování již uvedeného siRNA duplexu s dithiofosfáty na 18. a 19. pozici ukázalo, že také ve srovnání s nemodifikovaným ekvivalentním siRNA duplexem až třikrát lépe interaguje s proteinem Ago2 (Wu *et al*., 2014).

Při srovnání s thiofosfátovou a boranofosfátovou substitucí (viz kapitola 3. 1. 3.) má dithiofosfátová substituce lépe vyhovující stereochemické vlastnosti, protože fosfor při ní zůstává achirální, stejně jako tomu je v nemodifikované molekule siRNA. To je možným vysvětlením, proč je účinnost siRNA s dithiofosfáty obecně vyšší než účinnost siRNA s thiofosfáty (Yang *et al*., 2012).

3. 1. 3. Boranofosfátová substituce

Boranofosfátová substituce (viz Obrázek 3) je nahrazení jednoho z kyslíků, který se nepodílí na fosfodiesterové vazbě, boranem. Tato modifikace patří mezi úpravy cílící na zvýšení stability molekul siRNA. Přítomnost relativně vysokého počtu boranofosfátů ve fosfodiesterových kostrách molekul siRNA duplexu zvyšuje nukleázovou rezistenci ve srovnání s ekvivalentními nemodifikovanými duplexy nejméně desetkrát. Modifikované molekuly siRNA ovšem vykazují signifikantní zvýšení stability již při šesti boranofosfátových substitucích. Zvýšení stability je v některých případech dokonce tak velké, že pro experimentální zjištění rozdílů mezi jednotlivými typy modifikovaných siRNA duplexů bylo nutné použít koncentrované hovězí pankreatické RNázy (Hall *et al*., 2004).



Obrázek 3: Boranofosfátová substituce

Přítomnost boranofosfátů v pomocném vláknu siRNA má na účinnost eliminace cílové mRNA buď neutrální, nebo mírně pozitivní vliv. Boranofosfátová substituce ve vedoucím vláknu siRNA může mít vliv jak pozitivní tak i negativní. Účinek zde závisí na tom, zda se modifikace účastní cytidinové nebo uridinové zbytky. Zatím co ve spojení s cytidinem má modifikace vedoucího vlákna výrazně pozitivní vliv, ve spojení s uridinem vede k signifikantnímu snížení účinnosti eliminace cílové mRNA. Rovněž modifikace tří nebo více z pěti centrálních ribonukleotidů vedoucího vlákna vede ke snížení účinnosti eliminace cílové mRNA (Hall *et al*., 2004). Mimo tuto oblast zatím nebyl nalezen početní limit omezující množství možných boranofosfátových substitucí. Celkové zvýšení účinnosti přitom nelze vysvětlit jen zvýšením stability, takže je pravděpodobné, že modifikace nějakým způsobem ovlivňuje efektivitu samotného procesu RNAi. Protože boranofosfáty jsou lipofilnější než fosfáty, mohlo by se jednat o lepší schopnost interakce s některým z komponentů RISC (Hall *et al*., 2004).

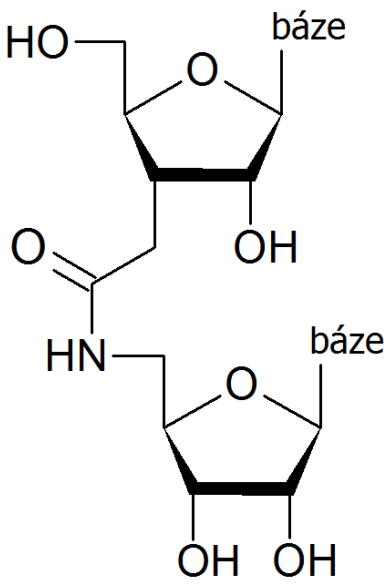
Duplexy siRNA s boranofosfáty jsou při eliminaci cílové mRNA účinnější než jejich nemodifikované ekvivalenty. Se vrůstajícím počtem boranofosfátů v duplexu siRNA navíc klesá jeho citlivost na snižování koncentrace. Duplexy siRNA s vysokým podílem boranofosfátů lze tedy úspěšně aplikovat i při nižších koncentracích. V experimentech Allison H. S. Hallové a jejích kolegů u těchto siRNA duplexů při snížení koncentrace z 25 nM na 3,1 nM klesla účinnost eliminace cílové mRNA o méně než 20 %, zatímco u nemodifikovaných siRNA duplexů o 50 %. Tento typ modifikace také vykazuje vyšší účinnost než thiofosfátová substituce (Hall *et al*., 2004).

Boranofosfátová substituce je natolik přínosnou modifikací, že její použití vylepšuje vlastnosti jednovláknových siRNA na úroveň srovnatelnou s nemodifikovanými siRNA duplexy. Jednovláknové siRNA s boranofosfáty vykazují velmi dobrou účinnost eliminace cílové mRNA, a to i při nízkých koncentracích (Hall *et al*., 2006).

3. 1. 4. Methylenamidová vazba

K vytvoření methylenamidových neionických vazeb v kostře molekuly siRNA se používá nahrazení fosfátů amidy. To je možné díky tomu, že karbonylová skupina amidu se chová podobně jako kyslík neúčastnící se fosfodiesterové vazby. Interakce vázané na tuto část molekuly by tedy měly probíhat i v přítomnosti amidů (Mutisya *et al*., 2014).

Nejčastěji používanou modifikací tohoto typu je AM1 (*amide modification 1*, amidová modifikace typu 1). Jedná se o amidovou vazbu mezi dvěma ribonukleotidy (viz Obrázek 4), která má orientaci 3′-CH_2-CO-NH-5′ (Selvam *et al*., 2011). Dále existují také modifikace typu AM2–5, které se liší orientací svých funkčních skupin vůči spojovaným ribonukleotidům (Mutisya *et al*., 2014). Konformace typu A zůstává u siRNA duplexu, přinejmenším při použití amidové modifikace AM1, zachována (Selvam *et al*., 2011).



Obrázek 4: RNA dimer s amidovou modifikací AM1

Pokud se jeden nebo dva amidy typu AM1 nacházejí v přesazích na 3′ koncích obou vláken siRNA duplexu, dochází skrze zlepšení *stacking* interakcí modifikovaných ribonukleotidů s purinovými bázemi ke zvýšení teploty tání siRNA duplexu v řádu desetin stupně Celsia na jednu modifikaci. Především se ale významně zvyšuje nukleázová rezistence, a to bez výrazného negativního ovlivnění účinnosti eliminace cílové mRNA *in vivo* I (Iwase *et al.*, 2006; Iwase *et al.*, 2007). Reiko Iwaseová a její kolegové později zjistili, že k dalšímu zlepšení stability dojde, když se k 5′ koncům obou vláken siRNA duplexu připojí nemodifikované ribonukleotidy komplementární k modifikovaným 3′ koncům, čímž vlastně vznikne siRNA duplex s tupými konci (Iwase *et al.*, 2009). Není však známo, jak se tato úprava projevuje na účinnosti eliminace cílové mRNA.

Pomocí AM1 lze také zvýšit účinnost eliminace cílové mRNA. Přínosem pro zvýšení účinnosti eliminace cílové mRNA se jeví být zejména přítomnost AM1 mezi prvním a druhým ribonukleotidem na 5′ konci pomocného vlákna, přičemž výsledné zvýšení účinnosti eliminace cílové mRNA je pravděpodobně důsledkem snížení frekvence, se kterou pomocné vlákno vstupuje do RISC namísto vlákna vedoucího (Mutisya *et al*., 2014). AM1 vazby jsou tolerovány i na vnitřních pozicích obou vláken duplexu (Mutisya *et al*., 2014; Tanui *et al.*, 2014), ale není vhodné je ve vedoucím vláknu lokalizovat v oblasti místa štěpení. Také platí, že s narůstajícím počtem AM1 modifikací přítomných ve vedoucím vláknu účinnost eliminace cílové mRNA klesá. Duplex siRNA obsahující větší množství AM1 ve vedoucím vláknu ovšem může být účinnějším nástrojem pro RNAi než nemodifikovaná ekvivalentní molekula, pokud je nalezena optimální amidová modifikace pro jeho pomocné vlákno. Pravděpodobně je to opět způsobeno zhoršením schopnosti pomocného vlákna siRNA sloužit jako substrát pro RISC. AM1 může teplotu tání v závislosti na umístění v siRNA duplexu zvyšovat

i snižovat (Iwase *et al.*, 2006; Iwase *et al.*, 2007; Mutisya *et al*., 2014; Tanui *et al.*, 2014), zatím ale nebyla nalezena korelace mezi změnou termostability a zvýšením účinnosti eliminace cílové mRNA. Případné zvýšení účinnosti eliminace cílové mRNA je tedy pravděpodobně spíše důsledkem změny interakcí modifikovaných vláken siRNA s Ago2 proteinem (Mutisya *et al*., 2014).

Účinky amidových modifikací závisí více na pozici ve vláknu, než na konkrétní nukleotidové sekvenci siRNA, lze tedy předpokládat, že tyto účinky budou u různých siRNA obdobné (Mutisya *et al*., 2014).

3. 2. Modifikace bází

Modifikacemi bází je možné ovlivňovat zejména termostabilitu siRNA duplexu (Chiu & Rana, 2003; Xia *et al.*, 2006; Somoza *et al.*, 2006; Sipa *et al.*, 2007; Somoza *et al.*, 2008; Terrazas & Kool 2009; Addepalli *et al.*, 2010). Termostabilitu zvyšují například 2-thiouridin, pseudouridin, 5-propynyluracil, 5-methyluracil a 5-methylcytosin (Sipa *et al.*, 2007; Terrazas & Kool 2009). Tři poslední uvedené zároveň také zvyšují nukleázovou rezistenci v lidském séru (Terrazas & Kool 2009). Odolnost vůči endonukleázám v lidském séru může být zvýšena pomocí 2,4-difluorotoluenu (Xia *et al.*, 2006), který patří k termostabilitu snižujícím nepolárním bázím neschopným vytvářet vodíkové můstky. Kromě něj do této skupiny patří také 2,4-difluorobenzen, 2,4-dichlorobenzen, 2,3-dichlorobenzen a 5-nitroindol (Xia *et al.*, 2006; Somoza *et al.*, 2006; Somoza *et al.*, 2008; Addepalli *et al.*, 2010).

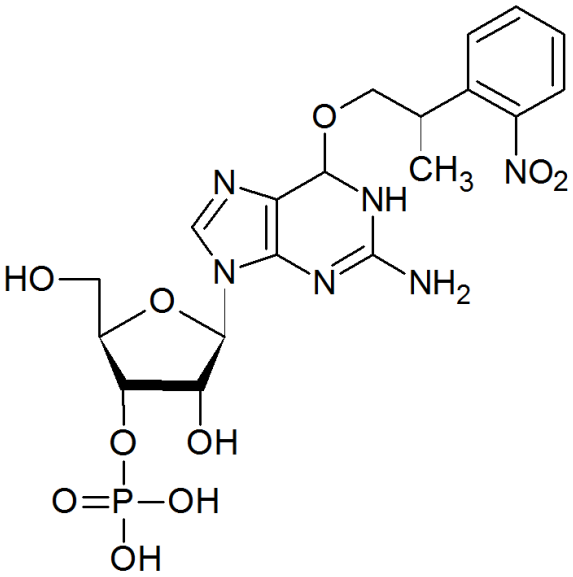
Vliv na účinnost eliminace cílové mRNA se odvíjí jak od konkrétní modifikace, tak od jejího umístění v siRNA duplexu (Xia *et al.*, 2006; Somoza *et al.*, 2006; Sipa *et al.*, 2007; Somoza *et al.*, 2008; Terrazas & Kool 2009; Addepalli *et al.*, 2010). K velmi dobře tolerovaným patří například 5-methyluracil a 5-methylcytosin. Při použití těchto dvou bází v siRNA duplexu v některých případech dochází ke zlepšení eliminace cílové mRNA (Terrazas & Kool 2009). Korelace mezi účinností eliminace cílové mRNA a tím, zda je báze navázána na ribózu nebo na 2′-deoxyribózu, objevena nebyla, vliv se liší případ od případu (Addepalli *et al.*, 2010).

Modifikované báze není vhodné umísťovat na 9., 10. a 11. ribonukleotid vedoucího vlákna siRNA duplexu, protože na těchto pozicích obvykle způsobují ztrátu účinnosti eliminace cílové mRNA (Xia *et al.*, 2006; Somoza *et al.*, 2006; Sipa *et al.*, 2007; Somoza *et al.*, 2008). Existují ale i alternativní báze, jako 2-thiouridin, které jsou na 10. pozici vedoucího vlákna siRNA duplexu tolerovány (Sipa *et al.*, 2007). Pozitivní vliv na účinnost eliminace mRNA mají některé báze zvyšující teplotu tání, jako jsou 2-thiouridin a pseudouridin, pokud jsou lokalizovány na 19. pozici vedoucího vlákna, protože tak vytvářejí žádoucí termodynamický profil (viz kapitola 2. 2. 2.; Sipa *et al.*, 2007). Také na 7. ribonukleotidu mohou být nekanonické báze překvapivě dobře tolerovány (Xia *et al.*, 2006; Somoza *et al.*, 2006; Somoza *et al.*, 2008) a některé, jako například 2,4-difluorobenzen, 2,4-dichlorobenzen, 2,3-dichlorobenzen a 4-methylbenzimidazol, i zvyšují specifitu k cílové mRNA skrze preferenci konkrétních kanonických bází (Somoza *et al.*, 2006; Somoza *et al.*, 2008). *Stacking* interakce báze jsou při používání modifikovaných bází pravděpodobně na mnoha pozicích v siRNA duplexu významnější než schopnost vytvářet vodíkové můstky (Xia *et al.*, 2006; Somoza *et al.*, 2008).

Umístění 2,4-difluorotoluenu nebo 5-nitroindolu na 10. pozici v pomocném vláknu naopak vede ke zvýšení účinnosti eliminace cílové mRNA. Vhodným cílem umístění nepolárních bází se zdá být obecně 9. až 12. pozice pomocného vlákna. Zatímco 2,4-difluorotoluen má ve srovnání 5-nitroindolem lepší výsledky na 10. pozici, účinek 5-nitroindolu je v rámci uvedeného úseku nezávislý na umístění. Příčinou zvýšení účinnosti eliminace cílové mRNA při umístění těchto nepolárních bází na 9. až 12. pozici pomocného vlákna je snížení termostability. Pro ověření této

skutečnosti bylo použito 2-hydroxymethyl-tetrahydrofuran-3-olu bez báze, který snižuje teplotu tání o 9 °C až 15 °C v závislosti na tom, který ribonukleotid nahrazuje. Jeho přítomnost v popsané oblasti siRNA duplexu vedla k signifikantnímu zvýšení účinnosti eliminace cílové mRNA (Addepalli *et al.*, 2010). Obecně však není vhodné umísťovat nekanonické báze na 19. pozici pomocného vlákna, protože dochází k poklesu účinnosti eliminace cílové mRNA. Pokud je však zároveň s dihydrouridinem na 19. pozici pomocného vlákna také 2-thiouridin nebo pseudouridin na 19. pozici vedoucího vlákna téhož siRNA duplexu, dochází ke zvýšení účinnosti eliminace cílové mRNA (Sipa *et al.*, 2007).

Velmi zajímavým využitím modifikací bází je kontrola nad začátkem působení siRNA duplexů v buňce. Přidání 2-(2-nitrofenyl)propylové skupiny na kyslík na šestém uhlíku (C6) guaninu (viz Obrázek 5) nebo na čtvrtém uhlíku (C4) thyminu na pozici v oblasti místa štěpení ve vedoucím vláknu siRNA brání štěpení cílové mRNA. Blokování lze následně odstranit působením ultrafialového záření. Tímto způsobem je možné pozdržet začátek RNAi nejméně o 28 hodin (Mikat & Heckel, 2007).



Obrázek 5: 2-(2-nitrofenyl)propylová skupina na C6 guaninu

Modifikací bází existuje velké množství, v siRNA duplexech byly testovány mimo již uvedené ještě například: 2,6-diaminopurin, 5-bromouracil, 5-jodouracil, inosin, nebularin, 2-aminopurine a 7-deazaguanin (Chiu & Rana, 2003; Eberle *et al.*, 2008; Addepalli *et al.*, 2010).

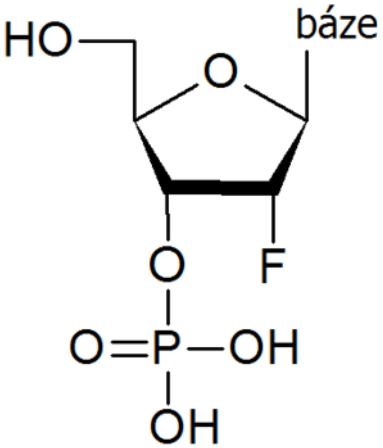
3. 3. Modifikace ribózy

V této skupině modifikací jsou nejběžnější modifikace na druhém uhlíku ribózy. Přítomnost hydroxylové skupiny na uvedené pozici není důležitá pro rozpoznávání vedoucího vlákna siRNA komponety RISC a ani není podmínkou katalytické ribonukleázové aktivity RISC. Přitom je to právě ta skupina, která odlišuje RNA od DNA a slouží RNázám k rozpoznání cílových molekul. Proto mají modifikace na uvedené pozici často pozitivní vliv na stabilitu molekuly siRNA (Chiu & Rana, 2003).

Následující kapitoly shrnují poznatky o vybraných modifikacích ribózy. Existuje značné množství dalších modifikací ribózy, které byly ve vztahu k siRNA zkoumány a jimiž se práce blíže nezabývá. K těm významnějším patří například DNA nukleotidy, které jsou v siRNA duplexech obecně dobře tolerovány (Morrissey *et al.*, 2005; Eberle *et al.*, 2008; Addepalli *et al.*, 2010) a z nichž 2′-deoxyuridin, 2′-deoxythymidin a částečně i 2′-deoxycytidin snižují imunostimulativní účinky siRNA duplexu (Eberle *et al.*, 2008). Některé méně známé modifikace se osvědčily při použití spolu se známějšími modifikacemi v jednom siRNA duplexu, jako třeba 4′-C-hydroxymethyl-DNA nukleotidy při použití s LNA nukleotidy (viz kapitola 3. 3. 8.), takže by si zřejmě zasloužily více pozornosti, než je jim věnováno. Pro více informací lze doporučit srovnávací studii Jespera B. Bramsena a jeho kolegů (Bramsen *et al.*, 2009).

3. 3. 1. 2′-deoxy-2′-fluoronukleotidy

2′-deoxy-2′-fluoronukleotidy mají na 2′ uhlíku ribózy hydroxylovou skupinu nahrazenu atomem fluoru (viz Obrázek 6). V siRNA je známo zejména využívání 2′-deoxy-2′-fluoropyrimidiny, protože 2′-deoxy-2′-fluoropuriny se začaly používat později. Ukázalo se, že vliv 2′-deoxy-2′-fluoropyrimidinů a 2′-deoxy-2′-fluoropurinů na účinnost eliminace cílové mRNA se v některých případech liší (Muhonen *et al.*, 2007).



Obrázek 6: 2′-deoxy-2′-fluoronukleotid

Přítomnost 2′-deoxy-2′-fluoronukleotidů v siRNA duplexu neovlivňuje konformaci typu A (Takahashi *et al.*, 2009) a v savčích buňkách může být tolerována (Braasch *et al.*, 2003; Muhonen *et al.*, 2007), a to zřejmě jak v centrální oblasti vedoucího vlákna (Prakash *et al.*, 2005), tak v oblasti, kde je štěpeno pomocné vlákno. Ve vedoucím vláknu ale mohou mít tyto modifikace i negativní vliv. *In vivo* I nepůsobí siRNA duplexy s 2′-deoxy-2′-fluoronukleotidy na buňky cytotoxicky (Muhonen *et al.*, 2007) a, na rozdíl od nemodifikovaných siRNA duplexů, nejsou u lidských periferních krevních mononukleárních buněk imunostimulativní (Manoharan *et al.*, 2011).

In vitro mají 2′-deoxy-2′-fluoronukleotidy pozitivní vliv zejména na zvýšení nukleázové rezistence siRNA duplexu (Chiu & Rana, 2003; Layzer *et al.*, 2004; Muhonen *et al.*, 2007; Manoharan

et al., 2011). Zatímco nemodifikované siRNA duplexy byly při inkubaci v lidské plazmě či séru *in vitro* prakticky všechny degradovány do 4 hodin, více než 25 % molekul siRNA s 2′-deoxy-2′-fluoronukleotidy zůstalo nepoškozeno i po 48 hodinách (Layzer *et al.*, 2004; Manoharan *et al.*, 2011).

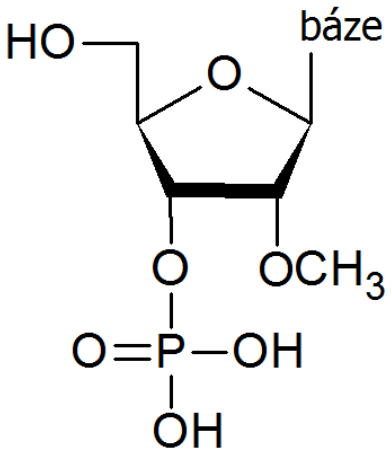
Zvýšení nukleázové rezistence siRNA duplexu vede ke zvýšení jeho poločasu rozpadu. Tím se prodlužuje doba, po kterou lze *in vivo* I zaznamenat účinky RNAi (Chiu & Rana, 2003). Experiment prokazující toto prodloužení se ovšem zatím nepodařilo přesvědčivě zopakovat a je možné, že za rozdílné výsledky by mohla být zodpovědná odlišná volba transportního systému v jednotlivých experimentech (Layzer *et al.*, 2004).

Přítomnost většího množství těchto modifikací v siRNA duplexu také výrazně zvyšuje jeho teplotu tání (Muhonen *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2009; Manoharan *et al.*, 2011). Při použití nejvýše dvou 2′-deoxy-2′-fluorouridinů ale nebyl zaznamenán signifikantní nárůst termostability siRNA duplexu (Braasch *et al.*, 2003).

Při střídání 2′-deoxy-2′-fluoronukleotidů s 2′-O-methyl ribonukleotidy (viz kapitola 3. 3. 2.) v obou vláknech duplexu siRNA se výrazně zvyšuje jeho teplota tání a nukleázová rezistence. U takto modifikovaných siRNA duplexů nebyla zaznamenána cytotoxicita a jejich použití *in vivo* I vede, alespoň v některých případech, ke zvýšení účinnosti eliminace cílové mRNA a úměrně tomu i k poklesu obsahu cílového proteinu v buňce (Allerson *et al.*, 2005; Koller *et al.*, 2006; Bramsen *et al.*, 2009). Existují ale i případy, kdy byl u tohoto typu siRNA duplexů naopak zaznamenán pokles účinnosti eliminace cílové mRNA (Bramsen *et al.*, 2009).

3. 3. 2. 2′-O-methyl ribonukleotidy

2′-O-methyl ribonukleotidy (viz Obrázek 7) mají na druhém uhlíku ribózy přes kyslík navázanou methylovou skupinu (Choung *et al.*, 2006). Tato modifikace patří ve výzkumu siRNA k nejstudovanějším modifikacím ribózy. Umožňuje uchování konformace typu A (Takahashi *et al.*, 2009) a má velký potenciál pro stabilizaci duplexu siRNA zvýšením nukleázové rezistence (Czauderna *et al.*, 2003; Kraynack & Baker, 2006; Choung *et al.*, 2006; Hoerter & Walter, 2007; Bramsen *et al.*, 2009; Ocampo *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2014). Například zvyšuje nukleázovou rezistenci vůči endonukleáze S1 (Takahashi *et al.*, 2009).



Obrázek 7: 2′-O-methyl ribonukleotid

K dosažení výrazně vyšší nukleázové rezistence *in vitro* stačí přítomnost pouhých dvou 2′-O-methyl ribonukleotidů v pomocném vlákně, konkrétně na 18. a 19. pozici (Wu *et al.*, 2014). Modifikace posledních tří pozic na obou 3′ koncích siRNA duplexu pomocí 2′-O-methyl ribonukleotidů také vede ke zvýšení nukleázové rezistence. Nicméně přidáním dalších trojic 2′-O-

methyl ribonukleotidů po celé délce obou vláken duplexu, mezi nimiž jsou vloženy vždy dva nebo tři nemodifikované ribonukleotidy, dojde sice k významnému zvýšení stability, ale zároveň i k zásadnímu snížení účinnosti eliminace cílové mRNA (Choung *et al.*, 2006). Příčinou ztráty účinnosti eliminace cílové mRNA při použití siRNA duplexů mnohonásobně modifikovaných 2′-O-methyl ribonukleotidy je buď zhoršení interakci RISC s vedoucím vláknem siRNA, to když se modifikace nacházejí na 5′ konci vedoucího vlákna, nebo zablokování odstranění pomocného vlákna z siRNA duplexu, a to zejména když se modifikace nacházejí na 5′ konci vedoucího vlákna. K tomuto zablokování ale dochází i v případě, že je modifikováno pouze vedoucí vlákno (Ohrt *et al.*, 2011).

Testování vlastností duplexů siRNA s různě se střídajícími nemodifikovanými a 2′-O-methyl ribonukleotidy v obou vláknech přitom již dříve ukázalo, že v některých případech dochází ke zvýšení odolnosti proti sérovým nukleázám, aniž by přitom docházelo ke ztrátám účinnosti eliminace cílové mRNA. Pro zachování účinnosti eliminace cílové mRNA je obecně lepší modifikovat pomocné vlákno (Czauderna *et al.*, 2003; Choung *et al.*, 2006; Judge *et al.*, 2006; Manoharan *et al.*, 2011), ačkoliv některé studie dokládají, že 2′-O-methyl ribonukleotidy mohou být tolerovány ve vedoucím vláknu, dokonce i v centrální oblasti (Prakash *et al.*, 2005; Jackson *et al.*, 2006b). Jsou-li dva 2′-O-methyl ribonukleotidy přítomné na 1. a 2. pozici nebo i jen jeden na 2. pozici ve vedoucím vláknu, dochází ke zvýšení specifity tohoto vlákna k cílové mRNA, aniž by byla negativně ovlivněna účinnost eliminace cílové mRNA, a to dokonce nezávisle na použité koncentraci siRNA. Souběžná modifikace na 1. a 2. pozici pomocného vlákna zajišťuje snížení počtu nežádoucích eliminací způsobovaných tímto vláknem (Jackson *et al.*, 2006b). Přítomnost 2′-O-methyl ribonukleotidů v siRNA duplexu nezpůsobuje cytotoxicitu (Amarzguioui *et al.*, 2003) a jejich lokalizace na 1. a 2. pozicích vláken siRNA duplexu se osvědčila pro snížení cytotoxicity (Fedorov *et al.*, 2006).

Nejlepších výsledků pro účinnost eliminace cílové mRNA i stabilitu zároveň bylo dosaženo při modifikování ob jednu pozici na obou vláknech, kdy byl modifikován první ribonukleotid vedoucího vlákna. Pokud je prvním modifikovaným ribonukleotidem vedoucího vlákna až druhý ribonukleotid na 5′ konci, účinnost eliminace cílové mRNA je podstatně nižší (Czauderna *et al.*, 2003; Choung *et al.*, 2006).

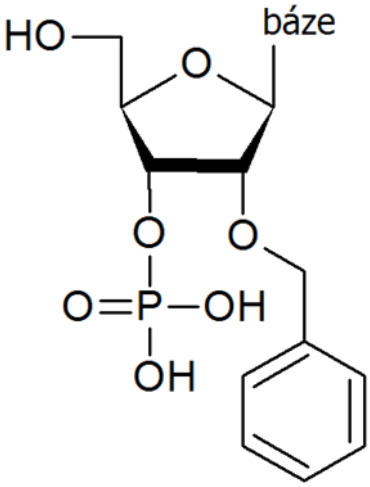
Pomocné vlákno lze v některých případech modifikovat pomocí 2′-O-methyl ribonukleotidů i celé, aniž by došlo k významné ztrátě účinnosti, zejména pokud je zároveň vedoucí vlákno modifikováno thiofosfátovými substitucemi nebo 2′-deoxy-2′-fluoronukleotidy. To poskytuje prostor pro další optimalizace vlastností těchto kombinací (Kraynack & Baker, 2006; Choung *et al.*, 2006). V případě modifikace celého pomocného vlákna má, ve srovnání se základním 21-merem siRNA, širší využití 20-mer siRNA s tupými konci (Kraynack & Baker, 2006). Jinak však platí, že není vhodné umístit 2′-O-methyl ribonukleotid na 9. pozici pomocného vlákna siRNA, kde zvýšená nukleázová rezistence v tomto místě brání aktivaci RISC, což vede k poklesu účinnosti eliminace cílové mRNA (Rand *et al.*, 2005).

Přítomnost 2′-O-methyl ribonukleotidů v duplexu siRNA také vede ke zvýšení jeho teploty tání (Bramsen *et al*., 2009; Takahashi *et al*., 2009; Wu *et al*., 2014) a prodloužení doby, po kterou je možné zaznamenat účinnou eliminaci cílové mRNA. Zároveň modifikovaný siRNA duplex v porovnání s nemodifikovaným siRNA duplexem méně reaguje na snižování koncentrace (Takahashi *et al*., 2012). 2′-O-methyl uridin, 2′-O-methyl guanin a 2′-O-methyl adenin navíc snižují imunogenicitu siRNA duplexu (Judge *et al*., 2006; Eberle *et al*., 2008; Ocampo *et al*., 2011). K významnému omezení imunogenicity dochází již při inkorporaci dvou 2′-O-methyl ribonukleotidů do kteréhokoliv z obou vláken siRNA duplexu. Používání siRNA duplexů s 2′-O-methyl ribonukleotidy se již ve vztahu k imunogenicitě a zároveň k zachování účinnosti eliminace cílové mRNA osvědčilo *in vivo* II u myší (Judge *et al*., 2006).

2′-O-methyl ribonukleotidy jsou také vhodným doplněním ke 4′-thioribonukleotidům (viz kapitola 3. 3. 5.), a to případně i spolu s 2′-O-methyloxyethyl ribonukleotidy (viz kapitola 3. 3.). Smyslem takovýchto kombinací je zvýšení nukleázové rezistence, aniž by došlo k potížím plynoucím z příliš vysokého počtu jednotlivých modifikací v siRNA duplexu. V některých případech takto bylo dosaženo i zvýšení účinnosti eliminace cílové mRNA, takže se zdá pravděpodobné, že vhodná kombinace uvedených modifikací v duplexu zvyšuje frekvenci vstupu vedoucího vlákna do RISC (Dande *et al*., 2006).

3. 3. 3. 2′-O-benzyl ribonukleotidy

2′-O-benzyl ribonukleotidy mají přes kyslík na druhém uhlíku ribózy navázaný benzyl (viz Obrázek 8). Tato modifikace je *in vivo* I tolerována zejména na 5., 8., 15. a 19. pozici vedoucího vlákna a v některých případech vede i ke zvýšení účinnosti eliminace cílové mRNA (Butora *et al*., 2011; Kenski *et al*., 2012). *In vivo* II se pro dosažení vyšší účinnosti eliminace cílové mRNA hodí pouze modifikace na 8. nebo na 15. pozici vedoucího vlákna, přičemž tyto pozice mohou být modifikovány i obě najednou. Dobu, po kterou lze zaznamenat účinnou eliminaci cílové mRNA *in vivo* II, ale prodlužují nejen modifikace na uvedených dvou pozicích, ale i modifikace na 5. pozici. Pozitivní vliv na obě uvedené vlastnosti má i modifikace všech čtyř pozic, na kterých jsou 2′-O-benzyl ribonukleotidy tolerovány. Takto modifikované siRNA duplexy však nepředčí ty siRNA duplexy, kde je modifikována pouze 8. a 15. pozice (Kenski *et al*., 2012).

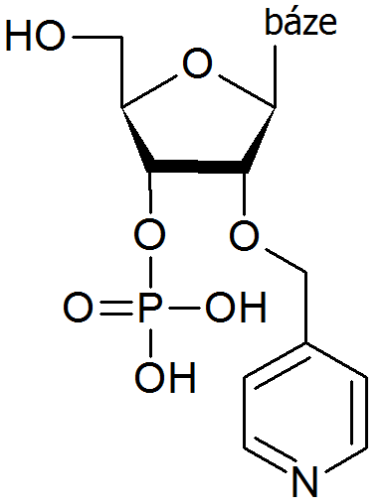


Obrázek 8: 2′-O-benzyl ribonukleotid

3. 3. 4. 2′-O-methyl-4-pyridin ribonukleotidy

2′-O-methyl-4-pyridin ribonukleotidy mají přes kyslík na druhém uhlíku ribózy a methyl navázaný pyridin (viz Obrázek 9). Tato modifikace je *in vivo* I i *in vivo* II tolerována na 5., 6., 8., 10.,

15. a 19. pozici vedoucího vlákna. Při použití *in vivo* II je tolerována i současná modifikace všech šesti uvedených pozic, účinky jsou ale neutrální. Přítomnost dvou 2′-O-methyl-4-pyridin ribonukleotidů ve vedoucím vláknu, na 8. a 15. pozici, má na účinnost eliminace cílové mRNA a na dobu, po kterou lze tuto eliminaci zaznamenat, pozitivní vliv (Kenski *et al.*, 2012).

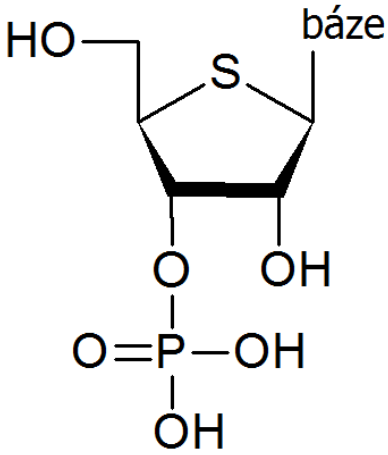


Obrázek 9: 2′-O-methyl-4-pyridin ribonukleotid

3. 3. 5. 4′-thioribonukleotidy

Ačkoli ve furanózovém kruhu je u 4′-thioribonukleotidů (viz Obrázek 10) navázaná síra a ne kyslík (Hoshika *et al.*, 2003), zaujímají duplexy siRNA obsahující tuto modifikaci požadovanou konformaci typu A (Hoshika *et al.*, 2003; Hoshika *et al.*, 2004).

4′-thioribonukleotidy zvyšují teplotu tání duplexu (Hoshika *et al.*, 2003; Hoshika *et al.*, 2004; Dande *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2009) přibližně o 0,5 °C na modifikaci, pokud je jedno z vláken siRNA duplexu plně modifikováno a druhé je nemodifikováno, a o 2,5 °C na modifikaci, pokud jsou plně modifikována obě vlákna (Hoshika *et al.*, 2004).



Obrázek 10: 4′-thioribonukleotid

In vivo I se 4′-thioribonukleotidy nejeví jako cytotoxické. Jejich přítomnost v pomocném vláknu siRNA duplexu je z hlediska fungování RNAi dráhy obecně velmi dobře tolerována bez ohledu na pozici modifikace a účinnost eliminace cílové mRNA se drží v hodnotách blízkých nemodifikovanému duplexu siRNA (Hoshika *et al.*, 2005; Dande *et al.*, 2006). To ovšem neplatí pro situaci, kdy jsou v pomocném vláknu modifikovány všechny ribonukleotidy, neboť poté dochází k významnému poklesu účinnosti eliminace cílové mRNA. Ve vedoucím vláknu jsou 4′-thioribonukleotidy tolerovány v závislosti na jejich počtu a pozici (Hoshika *et al.*, 2005). Co se pozice týče, přítomnost 4′-thioribonukleotidů má obvykle negativní vliv zejména na 7. až 15. pozici vedoucího vlákna (Hoshika *et al.*, 2005; Dande *et al.*, 2006). Z hlediska počtu je šest po sobě jdoucích 4′-thioribonukleotidů ve vedoucím vláknu již příliš mnoho, ale čtyři jsou ještě dobře tolerovány na obou koncích vedoucího vlákna, i když pro 5′ konec je vhodnější použít jen dva nebo tři (Hoshika *et al.*, 2005; Dande *et al.*, 2006; Hoshika *et al.*, 2007). Zdá se, že tato modifikace jako jedna z mála modifikací ribózy nemá negativní vliv na interakci vedoucího vlákna siRNA s Ago2 (Dande *et al.*, 2006).

Pomocí 4′-thioribonukleotidů lze také zvýšit účinnost eliminace cílové mRNA (Dande *et al.*, 2006; Hoshika *et al.*, 2007). Tak tomu obvykle je v případě přítomnosti čtyř 4′-thioribonukleotidů na obou koncích pomocného vlákna a na 3′ konci vedoucího vlákna. Při použití takto modifikovaného

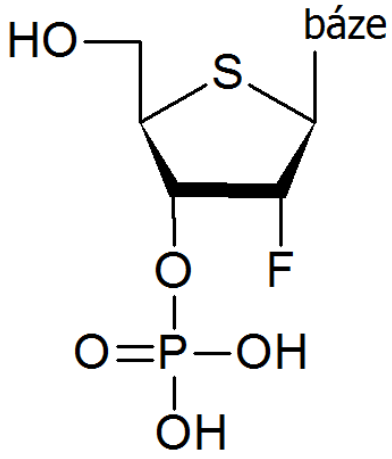
siRNA duplexu byla snížena exprese cílového proteinu o 91 %, zatímco nemodifikovaný siRNA duplex snižoval expresi cílového proteinu pouze o 42 % (Hoshika *et al*., 2007).

Dalším významným přínosem 4′-thioribonukleotidů pro siRNA duplexy je výrazné zvýšení nukleázové rezistence (Dande *et al*., 2006; Hoshika *et al*., 2007; Takahashi *et al*., 2009). V tomto směru může být využití 4′-thioribonukleotidů ve srovnání s použitím 2′-O-methyl ribonukleotidů (viz kapitola 3. 3. 2.) nebo 2′-deoxy-2′-fluoronukleotidů (viz kapitola 3. 3. 1.) účinnější (Takahashi *et al*., 2009). Kromě toho jsou 4′-thioribonukleotidy tolerovány lépe než 2′-O-methyl ribonukleotidy (Hoshika *et al*., 2005).

3. 3. 6. 2′-deoxy-2′-fluoro-4′-thionukleotidy

2′-deoxy-2′-fluoro-4′-thionukleotidy mají ribózu modifikovanou hned dvakrát. Ve furanózovém kruhu mají síru místo kyslíku a na 2′ uhlíku ribózy mají navázaný fluor (viz Obrázek 11). Jsou tedy kombinací 2′-deoxy-2′-fluoronukleotidů (viz kapitola 3. 3. 1.) a 4′-thioribonukleotidů (viz kapitola 3. 3. 5.). Zatímco syntéza 2′-deoxy-2′-fluoro-4′-thioguaninu je zatím příliš obtížná, modifikace ostatních nukleotidů je možná (Takahashi *et al*., 2008).

Konformace typu A zůstává v přítomnosti 2′-deoxy-2′-fluoro-4′-thionukleotidů zachována. Tato modifikace zvyšuje teplotu tání i nukleázovou rezistenci siRNA duplexu (Takahashi *et al*., 2009).

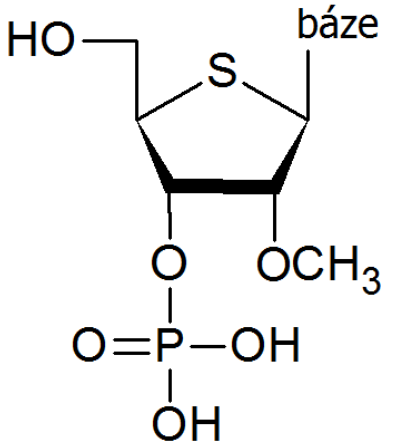


Obrázek 11: 2′-deoxy-2′-fluoro-4′-thionukleotid

3. 3. 7. 2′-O-methyl-4′-thioribonukleotidy

2′-O-methyl-4′-thioribonukleotidy (viz Obrázek 12) kombinují v rámci jednoho ribonukleotidu dvě modifikace ribózy, a to 2′-O-methyl ribonukleotidovou (viz kapitola 3. 3. 2.) a 4′-thioribonukleotidovou (viz kapitola 3. 3. 5.). Na rozdíl od 2′-deoxy-2′-fluoro-4′-thionukleotidů (viz kapitola 3. 3. 6.), 2′-O-methyl-4′-thioribonukleotidy je možné syntetizovat se všemi čtyřmi bázemi charakteristickými pro RNA. Duplexy siRNA s 2′-O-methyl-4′-thioribonukleotidy zaujímají konformaci typu A (Takahashi *et al*., 2009).

Tato modifikace zvyšuje teplotu tání siRNA duplexu přibližně stejně jako přítomnost 4′-thioribonukleotidů. Jejím přínosem je zejména zvýšení nukleázové rezistence vůči 3′-5′ exonukleáze SVPD (*snake venom phosphodiesterase*, fosfodiesteráza hadího jedu) a endonukleáze S1. Ve vztahu k oběma uvedeným nukleázám jsou



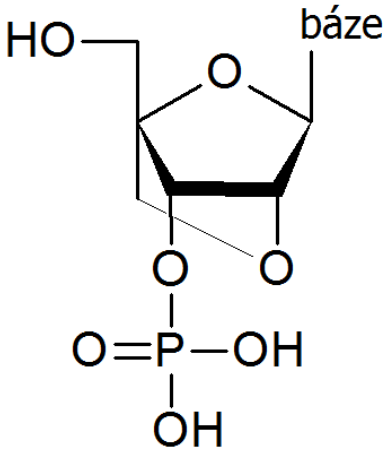
Obrázek 12: 2′-O-methyl-4′-thioribonukleotid

vlastnosti 2′-O-methyl-4′-thioribonukleotidů lepší než vlastnosti 2′-deoxy-2′-fluoro-4′-thionukleotidů (Takahashi *et al*., 2009). Modifikace se osvědčila i v 50% lidské plazmě a v 50% myším séru (Takahashi *et al*., 2009; Takahashi *et al*., 2012).

Design siRNA duplexu, který se osvědčil pro 4′-thioribonukleotidy (viz kapitola 3. 3. 5.), vedl při použití 2′-O-methyl-4′-thioribonukleotidů *in vitro* I k výraznému snížení účinnosti eliminace cílové mRNA. Pozitivní vliv na účinnost eliminace cílové mRNA má modifikace třemi 2′-O-methyl-4′-thioribonukleotidy na obou koncích pomocného vlákna siRNA duplexu, jehož vedoucí vlákno je nemodifikované. Zároveň takto modifikovaný duplex siRNA vykazoval účinnou eliminaci cílové mRNA i po pěti dnech, zatímco účinnost eliminace cílové mRNA pomocí ekvivalentního nemodifikovaného duplexu siRNA výrazně klesla. V době působení předčí tento modifikovaný siRNA duplex i odpovídající siRNA duplexy modifikované pouze 4′-thioribonukleotidy nebo pouze 2′-O-methyl ribonukleotidy. Také z uvedených siRNA duplexů nejlépe funguje při nižších koncentracích. Prodloužení doby, po kterou lze zaznamenat účinnou eliminaci cílové mRNA, by mohlo být důsledkem možného zvýšení intracelulární stability modifikovaného duplexu siRNA jakožto vedlejšího produktu vysoké nukleázové rezistence (Takahashi *et al*., 2012). Starší studie však tuto možnost spíše popírají (Bartlett & Davis, 2007; Collingwood *et al*., 2008).

3. 3. 8. LNA nukleotidy

LNA nukleotidy jsou bicyklické analogy nukleotidů odlišující se tím, že mají methylenový můstek mezi čtvrtým uhlíkem a kyslíkem na druhém uhlíku ribózy (viz Obrázek 13). Tento můstek se chemicky označuje jako 2′-C,4′-C-oxymethylenový nebo jako 2′-O,4′-C-methylenový (Singh *et al*., 1998; Koshkin *et al*., 1998). 2′,4′-BNA (*bridged nucleic acid*) je proto alternativním názvem LNA nukleotidů (Rahman *et al*., 2010; Wada *et al*., 2012).



Obrázek 13: LNA nukleotid

LNA nukleotidy vytvářejí preferenčně 3′ endo konformaci, neboli konformaci typu N, která umožňuje vznik A konformace duplexu siRNA (Singh *et al*., 1998; Koshkin *et al*., 1998). Někdy bývá pro siRNA s LNA nukleotidy užíváno označení siLNA (Elmén *et al*., 2005) a případně i siBNA (Rahman *et al*., 2010).

Přítomnost LNA nukleotidů v siRNA způsobuje podstatné zvýšení jeho termostability (Braasch *et al*., 2003; Bramsen *et al*., 2009; Rahman *et al*., 2010; Manoharan *et al*., 2011). Pro dosažení žádoucího efektu se zdají být klíčovými faktory počet a lokalizace LNA nukleotidů v siRNA duplexu. Čtyři LNA nukleotidy v duplexu se jeví jako minimální postačující počet (Braasch *et al*., 2003).

Použití LNA nukleotidů k syntéze siRNA molekul, aniž by tím byla negativně ovlivněna jejich funkčnost *in vivo* I, je možné na 3′ konci i na 5′ konci a případně i na obou koncích vláken duplexu.

RISC je schopen rozpoznat a akceptovat jako substrát LNA-RNA chiméry navzdory jejich geometrické odlišnosti od nemodifikovaných siRNA (Braasch *et al.*, 2003; Mook *et al.*, 2007; Rahman *et al.*, 2010; Wada *et al.*, 2012). V některých případech může dojít i ke zlepšení účinnosti eliminace cílové mRNA (Bramsen *et al.*, 2009). Platí však, že 5′ konec vedoucího vlákna je k modifikaci citlivější a přítomnost LNA zde má výrazně negativní vliv (Elmén *et al.*, 2005; Hornung *et al.*, 2005). V některých případech lze však tento negativní vliv úspěšně vykompenzovat použitím LNA nukleotidů na jednom nebo i na obou koncích pomocného vlákna (Elmén *et al.*, 2005; Bramsen *et al.*, 2009). Tyto poznatky ukazují, že LNA nukleotidů lze používat i k významnému zvýhodnění vedoucího vlákna při kompetici s pomocným vláknem o vstup do RISC a tím dosáhnout zvýšení účinnosti eliminace cílové mRNA (Elmén *et al.*, 2005; Schubert *et al.*, 2006; Bramsen *et al.*, 2009). Pozitivní vliv modifikace 5′ konce pomocného vlákna pomocí LNA nukleotidů na frekvenci inkorporace vedoucího vlákna do RISC byl pozorován u původně málo účinného duplexu siRNA, kde obě vlákna měla 5′ konec bohatý na adenin a uridin (Elmén *et al.*, 2005) a tudíž měly podobnou pravděpodobnost inkorporace do RISC (viz kapitola 2. 2. 2.).

Celkový počet tolerovaných LNA nukleotidů v siRNA duplexu je zřejmě omezený. I když se v jednotlivých případech tento počet liší, podle dosavadních výsledků by se obecně mělo jednat o číslo menší než deset (Braasch *et al.*, 2003; Elmén *et al.*, 2005; Mook *et al.*, 2007; Bramsen *et al.*, 2009; Rahman *et al.*, 2010). Přinejmenším plná modifikace vlákna, ať už vedoucího nebo pomocného, vede k úplné ztrátě účinnosti eliminace cílové mRNA (Elmén *et al.*, 2005). Negativní se jeví i umístění LNA nukleotidů do oblasti centrálních sedmi nukleotidů vedoucího vlákna, zejména pak na 10., 12. nebo 14. pozici (Braasch *et al.*, 2003; Elmén *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2010; Manoharan *et al.*, 2011). Protože se jedná o pozice v oblasti místa štěpení cílové mRNA, je možné, že přítomnost LNA nukleotidů na těchto pozicích ovlivňuje aktivní místo. Proto by modifikace 10., 12. a 14. pozice pomocného vlákna LNA nukleotidy mohlo být možné využít ke snížení nežádoucí eliminace jiné než cílové mRNA tam, kde by na vině byla inkorporace pomocného vlákna do RISC (Elmén *et al.*, 2005). V některých případech ale lze negativní vliv LNA nukleotidů umístěných v centrální oblasti vedoucího vlákna siRNA duplexu neutralizovat nahrazením modifikovaného pomocného vlákna nemodifikovaným. Úspěch v takovém případě může souviset se snížením celkového počtu LNA nukleotidů v duplexu (Braasch *et al.*, 2003). Jsou ale zaznamenány i případy, kdy byl LNA nukleotid v centrální oblasti vedoucího vlákna ve vztahu k účinnosti eliminace cílové mRNA tolerován, ačkoliv bylo modifikováno i pomocné vlákno (Braasch *et al.*, 2003; Rahman *et al.*, 2010).

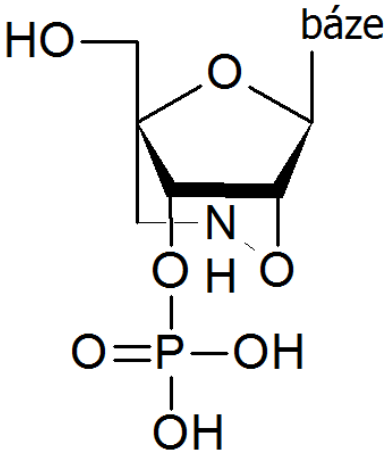
Přítomnost LNA nukleotidů pozitivně ovlivňuje nejen termostabilitu, ale i nukleázovou rezistenci (Elmén *et al.*, 2005; Mook *et al.*, 2007; Bramsen *et al.*, 2009; Rahman *et al.*, 2010; Wada *et al.*, 2012). *In vitro* mohou být ve 100% lidském a 100% myším séru neporušené modifikované duplexy siRNA identifikovány i po 24 hodinách, zatímco nemodifikovaný ekvivalent byl degradován do 6 hodin (Elmén *et al.*, 2005). Se vzrůstajícím počtem LNA nukleotidů roste i nukleázová rezistence, ale jak již bylo uvedeno výše, vysoký počet LNA nukleotidů v duplexu se negativně

projevuje na účinnosti eliminace cílové mRNA (Elmén *et al*., 2005; Mook *et al*., 2007; Bramsen *et al*., 2009). Dále lze pomocí LNA nukleotidů umístěných na obou koncích nebo i jen na 3′ konci pomocného vlákna výrazně omezit imunogenní působení siRNA duplexu (Hornung *et al*., 2005).

Funkčnost duplexů siRNA obsahující LNA nukleotidy na koncích vláken, s přihlédnutím k citlivosti 5′ konce vedoucího vlákna vůči modifikacím, byla úspěšně ověřena *in vivo* II u myši, přičemž modifikované siRNA duplexy dokonce mají vyšší specifitu k cílové mRNA než jejich nemodifikované ekvivalenty (Mook *et al*., 2007). Pro použití *in vivo* II se zdá být také vhodné kombinovat v rámci jednoho siRNA duplexu LNA nukleotidy, thiofosfáty (viz kapitola 3. 1. 1.) a 2′-O-methyl ribonukleotidy (viz kapitola 3. 3. 2.). I takto modifikované siRNA duplexy mohou *in vivo* II nejen účinně eliminovat cílovou mRNA, ale také snižovat imunogenicitu, pokud se jedná o alternativy imunogenních duplexů (Wada *et al*., 2012).

3. 3. 9. BNA^{NC} nukleotidy

BNA^{NC} (*2′,4′-aminomethylene bridged nucleic acid*) nukleotidy mají na čtvrtém uhlíku ribózy methylovou skupinu, která se váže s aminovou skupinou navázanou na kyslík na druhém uhlíku ribózy (viz Obrázek 14). BNA^{NC} nukleotidy jsou tedy bicyklické nukleotidové analogy lišící se od LNA nukleotidů typem přemostění (Rahman *et al*., 2007). Přítomnost BNA^{NC} nukleotidů v siRNA duplexu zvyšuje jeho teplotu tání až o několik stupňů Celsia na modifikaci, podobně jako přítomnost LNA nukleotidů. Také má pozitivní vliv na nukleázovou rezistenci siRNA duplexu. Ve vztahu k RNAi mají BNA^{NC} nukleotidy vlastnosti velmi blízké vlastnostem LNA nukleotidů a jsou v siRNA duplexech také obdobně tolerovány (Rahman *et al*., 2010).

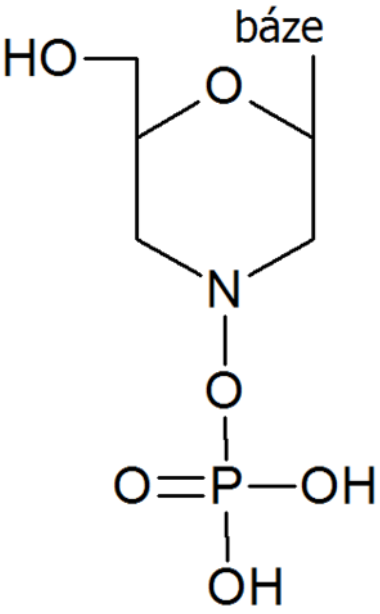


Obrázek 14: BNA^{NC} nukleotid

3. 3. 10. Substituce ribózy morfolinem

Při této modifikaci je ribóza zcela nahrazena morfolinem (1-oxa-4-azacyklo-hexan, heterocyklickou organickou sloučeninou se dvěma odlišnými funkčními skupinami, aminovou a éterovou, viz Obrázek 15). *In vivo* I má obvykle přítomnost morfolinových uridinů v duplexu siRNA na účinnost eliminace cílové mRNA neutrální efekt. Najdou se ale i případy, ve kterých je vliv modifikace výrazně negativní. K tomu dochází, pokud je modifikováno vedoucí vlákno v oblasti místa štěpení nebo na 5′ konci. O vlivu morfolinové modifikace na účinnost eliminace cílové mRNA tedy rozhoduje lokalizace v siRNA duplexu. V pomocném vláknu jsou morfolinové nukleotidy obecně dobře tolerovány. Pozitivní vliv na účinnost eliminace cílové mRNA byl pozorován při modifikaci 5′ konce pomocného vlákna. Spíše nevhodné jsou pak modifikace v jeho prostřední části, protože vedou k mírnému snížení účinnosti eliminace cílové mRNA. Duplexy siRNA, kde vedoucí vlákno nebo obě vlákna nesou tuto modifikaci na 3′ konci, mají ve srovnání s nemodifikovaným ekvivalentem

zvýšenou účinnost eliminace cílové mRNA. Navíc morfolinová modifikace *in vitro* v 10% fetálním hovězím séru zvyšuje nukleázovou rezistenci, zejména u siRNA duplexů s modifikacemi na 3′ koncích. Zdá se tedy, že morfolinová modifikace účinně blokuje degradaci siRNA 3′-5′ exonukleázami. Při použití popsaných modifikovaných siRNA duplexů lze navíc *in vivo* I pozorovat účinnou eliminaci cílové mRNA delší dobu než při použití nemodifikovaných (Zhang *et al*., 2009).



Obrázek 15: Morfolinový nukleotid

3. 4. Kombinované modifikace

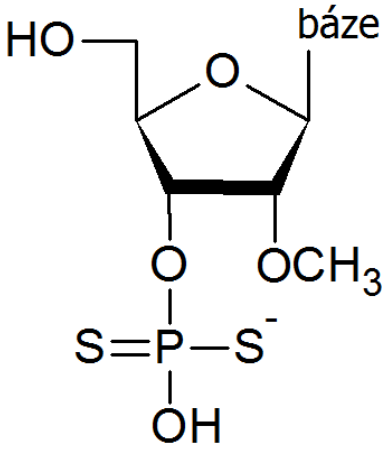
Tato kapitola zmiňuje takové modifikace, které v rámci jednoho nukleotidu kombinují dvě modifikace z různých kategorií, přičemž se obvykle jedná o modifikace fosfodiesterové kostry a modifikace ribózy.

Patří sem například 2′-deoxy-2′-fluoro-dithiofosfátová modifikace, která je kombinací substituce fosfátu dithiofosfátem a nahrazení hydroxylové skupiny na druhém uhlíku ribózy fluorem, a 2′-O-methyl-thiofosfátové modifikace, která je kombinací methylace na druhém uhlíku ribózy a substituce fosfátu thiofosfátem. Obě modifikace jsou málo prostudované a zatím u nich nebyl prokázán přínos pro účinnost eliminace cílové mRNA. Zdá se ale, že 2′-O-methyl-thiofosfátová modifikace mírně snižuje teplotu tání siRNA duplexu (Kraynack & Baker, 2006; Wu *et al*., 2014).

Také existují modifikace kombinující AM náhradu fosfátu (viz kapitola 3. 1. 4.) a peptidovou náhradu ribózy. K takovým patří například AM-PNA (*peptide nucleic acid*, peptidová nukleová kyselina), které zvyšují nukleázovou rezistenci siRNA duplexu (Gong & Desaulniers, 2012).

3. 4. 1. 2′-O-methyl-dithiofosfátová modifikace

2′-O-methyl-dithiofosfátová modifikace kombinuje v rámci jednoho ribonukleotidu methylaci na druhém uhlíku ribózy a substituci fosfátu dithiofosfátem (viz Obrázek 16). Přitom platí, že siRNA duplex nesoucí dvě tyto modifikace stále zaujímá potřebnou konformaci typu A.



Obrázek 16: 2'-O-methyl-dithiofosfátová modifikace

Duplexy siRNA s 2′-O-methyl-dithiofosfátovou modifikací na 18. a 19. ribonukleotidu (tedy blízko 3′ konce) pomocného vlákna vykazují výrazně účinější eliminaci cílové mRNA *in vivo* I ve srovnání s nemodifikovanými duplexy siRNA, s duplexy siRNA obsahujícími dithiofosfáty (viz kapitola 3. 1. 2.), s duplexy siRNA s 2′-O-methyl ribonukleotidy (viz kapitola 3. 3. 2.) i duplexy siRNA obsahujícími 2′-O-methyl-thiofosfátové modifikace (viz kapitola 3. 4.). K prodloužení doby, po kterou je možné pozorovat účinnou eliminaci cílové mRNA, ale při použití popsaných duplexů siRNA nedošlo (Wu *et al*., 2014).

Ke zvýšení účinnosti eliminace cílové mRNA nedochází, pokud se 2′-O-methyl-dithiofosfátové modifikace nacházejí na 3. a 12. ribonukleotidu pomocného vlákna, 11. a 12. ribonukleotidu vedoucího vlákna, nebo 5. a 9. ribonukleotidu vedoucího vlákna (Wu *et al*., 2014).

Uvedená účinná 2′-O-methyl-dithiofosfátová modifikace také *in vitro* významně zvyšuje nukleázovou rezistenci duplexu siRNA. Stejně jako v případě účinnosti eliminace cílové mRNA, i v případě stability vyšly tyto duplexy siRNA při srovnání s výše popsanými modifikovanými i nemodifikovanými siRNA duplexy nejlépe.

Přítomnost dvou 2′-O-methyl-dithiofosfátových modifikací v duplexu siRNA vede ke snížení jeho teploty tání o více než 1 °C. Tedy k většímu snížení než k jakému vede samotná dithiofosfátová substituce, ačkoliv součástí této kombinované modifikace je 2′-O-methylová modifikace, která sama o sobě teplotu tání zvyšuje. Duplex siRNA se tedy při vhodným umístěním 2′-O-methyl-dithiofosfátových modifikací v blízkosti 3′ konce pomocného vlákna ve srovnání s ekvivalentním nemodifikovaným duplexem lépe rozvíjí, což by ve spojení se zvýšenou nukleázovou rezistencí a skutečností, že duplex také *in vivo* I lépe interaguje s PAZ doménou Ago2 proteinu (viz kapitola 2. 2. 1.), mohlo vysvětlovat zvýšení frekvence vstupu vedoucího vlákna do RISC, vedoucí ke zvýšení účinnosti eliminace cílové mRNA. Z blíže neznámých důvodů je při stejném počtu modifikovaných ribonukleotidů toto zlepšení interakce s Ago2 proteinem asi dvakrát větší u 2′-O-methyl-dithiofosfátové modifikace než u dithiofosfátové substituce (Wu *et al*., 2014).

Imunostimulativní účinky jsou u siRNA duplexů s 2′-O-methyl-dithiofosfátovými modifikacemi *in vivo* I i *in vivo* II na stejně nízké úrovni jako u nemodifikovaných duplexů siRNA, takže se tato modifikace zdá být pro aplikaci *in vivo* II po všech stránkách velmi slibná. Dosavadní pokusy na myších s rakovinou vaječníků, při kterých byly k duplexům siRNA kvůli jejich dopravení do cílových buněk přidány DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfatidylcholin) nanolipozomy, ukázaly, že modifikované duplexy siRNA fungují *in vivo* II mnohem účinněji než nemodifikované. Účinnost eliminace cílové mRNA do proteinu dosahuje až 80 % a pokles hmotnosti tumoru je až 70 % (Wu *et al*., 2014).

4. Závěr

Tato práce shrnuje základní poznatky o problematice stability siRNA duplexů a účinnosti eliminace cílové mRNA při jejich použití. Následně předkládá souhrnné poznatky o vybraných modifikacích siRNA duplexů, jež jsou využívány k odstranění nebo alespoň zmírnění popsaných problémů. Těchto modifikací existuje velké množství a stále se objevují nové slibné modifikace jako v poslední době například 2′-O-methyl-dithiofosfátová modifikace (Wu *et al*., 2014).

V odborné liteatuře se vyskytují ohledně jednotlivých modifikací různá protikladná tvrzení, z nichž jedno bývá časem ověřeno jako pravdivé. Například Dwaine A. Braasch a jeho kolegové (Braasch *et al.*, 2003) neprokázali zvýšení nukleázové rezistence siRNA pomocí thiofosfátů. Později se ale objevily články, které toto zvýšení experimentálně dokumentují (Chiu & Rana, 2003; Kraynack & Baker, 2006; Choung *et al*., 2006; Wu *et al*., 2014; Jahns *et al*., 2015). Je tedy možné, že výsledky experimentu Dwaine A. Braasche a jeho kolegů ovlivnila volba nemodifikovaného siRNA duplexu, který byl i bez modifikací zcela výjimečně stabilní v přítomnosti nukleáz. Proto je často žádoucí zabývat se výzkumem vlastností jednotlivých modifikací opakovaně.

Důležité je také srovnávat jednotlivé modifikace a typy modifikovaných duplexů mezi sebou. Kupříkladu byly popsány plně modifikované siRNA duplexy obsahující 2′-O-methyl ribonukleotidy a 2′-deoxy-2′-fluoropyrimidiny s velmi slibnými vlastnostmi (Allerson *et al.*, 2005; Koller *et al.*, 2006). Jesper B. Bramsen a jeho kolegové ale zjistili, že tyto plně modifikované siRNA duplexy mohou být předčeny siRNA duplexy částečně modifikované LNA nukleotidy, které vykazují lepší stabilitu (Bramsen *et al.*, 2009).

V současné době se výzkumy zaměřují, vedle popisu nových modifikací a detailnější charakterizace modifikací již osvědčených, na zlepšování možností syntézy některých modifikací (Jahns *et al.*, 2015). Například velmi slibné boranofosfátové modifikaci (Hall *et al.*, 2004; Hall *et al.*, 2006) se nedostalo téměř žádné další pozornosti. Vzhledem k tomu, že původní práce Allison H. S. Hallové a jejích kolegů je hojně citována, ale nikoliv kritizována, příčinou, proč se od dalšího výzkumu upustilo, bude pravděpodobně nějaký problém technického či finančního rázu. Cena siRNa duplexů je ostatně jedním z klíčových, i když málo zmiňovaných, kritérií při vývoji modifikací, protože výsledná molekulární farmaka by měla mít vedle přijatelných léčebných vlastností i akceptovatelnou cenu výroby.

Pro umožnění skutečného využití siRNA v medicíně je ještě nutné vyřešení mnoha otázek a v neposlední řadě problému imunogenicity a cytotoxicity. Ukazuje se, že ačkoliv jsou modifikace siRNA velmi důležité, jejich vlastnosti obvykle nejde zcela zobecnit a zásadní roli hraje sekvence siRNA. Jednotlivé sekvence siRNA se často chovají odlišně a proto nelze zcela spolehlivě predikovat účinek modifikací. Dosavadní výzkum ale již přinesl mnoho poznatků, které jsou samy o sobě hodnotné, protože poskytují hlubší porozumění problematice RNAi.

5. Seznam použité literatury

Addepalli H., Meena, Peng C., Wang G., Fan Y., Charisse K., Jayaprakash K., Rajeev K., Pandey R., Lavine G., Zhang L., Jahn-Hofmann K., Hadwiger P., Manoharan M., Maier M. A. Modulation of thermal stability can enhance the potency of siRNA. *Nucleic Acids Research* 38, 7320–7331 (2010).

Allerson C. R., Sioufi N., Jarres R., Prakash T. P., Naik N., Berdeja A., Wanders L., Griffey R. H., Swayze E. E., Bhat B. Fully 2‘-modified oligonucleotide duplexes with improved *in vitro* potency and stability compared to unmodified small interfering RNA. *Journal of Medicinal Chemistry* 48, 901–904 (2005).

Amarzguioui M., Holen T., Babaie E., Prydz H. Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Research* 31, 589–595 (2003).

Bartlett D. W. & Davis M. E. Effect of siRNA nuclease stability on the *in vitro* and *in vivo* kinetics of siRNA-mediated gene silencing. *Biotechnology and Bioengineering* 97, 909–921 (2007).

Braasch D. A., Jensen S., Liu Y., Kaur K., Arar K., White M. A., Corey D. R. RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Biochemistry* 42, 7967–7975 (2003).

Bramsen J. B., Laursen M. B., Nielsen A. F., Hansen T. B., Bus C., Langkjær N., Babu B. R., Højland T., Abramov M., Aerschot A., Odadzic D., Smicius R., Haas J., Andree C., Barman J., Wenska M., Srivastava P., Zhou C., Honcharenko D., Hess S., Müller E., Bobkov G. V., Mikhailov S. N., Fava E., Meyer T. F., Chattopadhyaya J., Zerial M., Engels J. W., Herdewijn P., Wengel J., Kjems J. A large-scale chemical modification screen identifies design rules to generate siRNAs with high activity, high stability and low toxicity. *Nucleic Acids Research* 37, 2867–2881 (2009).

Butora G., Kenski D. M., Cooper A. J., Fu W., Qi N., Li J. J., Flanagan W. M., Davies I. W. Nucleoside optimization for RNAi: A high-throughput platform. *Journal of the American Chemical Society* 133, 16766–16769 (2011).

Collingwood M. A., Rose S. D., Huang L., Hillier C., Amarzguioui M., Wiiger M. T., Soifer H. S., Rossi J. J., Behlke M. A. Chemical modification patterns compatible with high potency Dicer-substrate small interfering RNAs. *Oligonucleotides* 18, 187-200 (2008).

Czauderna F., Fechtner M., Dames S., Aygün H., Klippel A., Pronk G. J., Giese K., Kaufmann J. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 31, 2705–2716 (2003).

Dande P., Prakash T. P., Sioufi N., Gaus H., Jarres R., Berdeja A., Swayze E. E., Griffey R. H., Bhat B. Improving RNA interference in mammalian cells by 4‘-thio-modified small interfering RNA (siRNA): Effect on siRNA activity and nuclease stability when used in combination with 2‘-O-alkyl modifications. *Journal of Medicinal Chemistry* 49, 1624–1634 (2006).

Dowler T., Bergeron D., Tedeschi A.-L., Paquet L., Ferrari N., Damha M. J. Improvements in siRNA properties mediated by 2′-deoxy-2′-fluoro-β-d-arabinonucleic acid (FANA). *Nucleic Acids Research* 34, 1669–1675 (2006).

Eberle F., Giessler K., Deck C., Heeg K., Peter M., Richert C., Dalpke A. H. Modifications in small interfering RNA that separate immunostimulation from RNA interference. *Journal of immunology* 180, 3229–3237 (2008).

Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494–498 (2001a).

Elbashir S. M., Martinez J., Patkaniowska A., Lendeckel W., Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO Journal* 20, 6877–6888 (2001b).

Elmén J., Thonberg H., Ljungberg K., Frieden M., Westergaard M., Xu Y., Wahren B., Liang Z., Ørum H., Koch T., Wahlestedt C. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Research* 33, 439–447 (2005).

Fedorov Y., Anderson E. M., Birmingham A., Reynolds A., Karpilow J., Robinson K., Leake D., Marshall W. S., Khvorova A. Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA* 12, 1188–1196 (2006).

Foster D. J., Barros S., Duncan R., Shaikh S., Cantley W., Dell A., Bulgakova E., O'Shea J., Taneja N., Kuchimanchi S., Sherrill C. B., Akinc A., Hinkle G., Seila White A. C., Pang B., Charisse K., Meyers R., Manoharan M., Elbashir S. M. Comprehensive evaluation of canonical versus Dicer-substrate siRNA *in vitro* and *in vivo*. *RNA* 18, 557–568 (2012).

Gong W. & Desaulniers J.-P. Gene-silencing properties of siRNAs that contain internal amide-bond linkages. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22, 6934–6937 (2012).

Hall A. H. S., Wan J., Shaughnessy E. E., Shaw B. R., Alexander K. A. RNA interference using boranophosphate siRNAs: Structure–activity relationships. *Nucleic Acids Research* 32, 5991–6000 (2004).

Hall A. H. S., Wan J., Spesock A., Sergueeva Z., Shaw B. R., Alexander K. A. High potency silencing by single-stranded boranophosphate siRNA. *Nucleic Acids Research* 34, 2773–2781 (2006).

Hammond S. M., Bernstein E., Beach D., Hannon G. J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293–296 (2000).

Haupenthal J., Baehr C., Kiermayer S., Zeuzem S., Piiper A. Inhibition of RNAse A family enzymes prevents degradation and loss of silencing activity of siRNAs in serum. *Biochemical Pharmacology* 71, 702–710 (2006).

Hefner E., Clark K., Whitman C., Behlke M. A., Rose S. D., Peek A. S., Rubio T. Increased potency and longevity of gene silencing using validated Dicer substrates. *Journal of biomolecular techniques: JBT* 231–237 (2008).

Hickerson R. P., Vlassov A. V., Wang Q., Leake D., Ilves H., Gonzalez-Gonzalez E., Contag C. H., Johnston B. H., Kaspar R. L. Stability study of unmodified siRNA and relevance to clinical use. *Oligonucleotides* 18, 345–354 (2008).

Hoerter J. & Walter N. Chemical modification resolves the asymmetry of siRNA strand degradation in human blood serum. *RNA* 13, 1887–1893 (2007).

Hornung V., Guenthner-Biller M., Bourquin C., Ablasser A., Schlee M., Uematsu S., Noronha A., Manoharan M., Akira S., Fougerolles A., Endres S., Hartmann G. Sequence-specific potent induction of IFN-α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nature Medicine* 11, 263–270 (2005).

Hoshika S., Inoue N., Minakawa N., Matsuda A. Investigation of physical and physiological properties of 4′-thioribonucleotide (4′-thioRNA). *Nucleic Acids Research Supplement* 3, 209–210 (2003).

Hoshika S., Minakawa N., Matsuda A. Synthesis and physical and physiological properties of 4′-thioRNA: Application to post-modification of RNA aptamer toward NF-κB. *Nucleic Acids Research* 32, 3815–3825 (2004).

Hoshika S., Minakawa N., Kamiya H., Harashima H., Matsuda A. RNA interference induced by siRNAs modified with 4′-thioribonucleosides in cultured mammalian cells. *FEBS Letters* 579, 3115–3118 (2005).

Hoshika S., Minakawa N., Shionoya A., Imada K., Ogawa N., Matsuda A. Study of modification pattern–RNAi activity relationships by using siRNAs modified with 4′-thioribonucleosides. *ChemBioChem* 8, 2133–2138 (2007).

Chen P., Weinmann L., Gaidatzis D., Pei Y., Zavolan M., Tuschl T., Meister G. Strand-specific 5′-O-methylation of siRNA duplexes controls guide strand selection and targeting specificity. *RNA* 14, 263–274 (2008).

Chiu Y.-L. & Rana T. M. siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis. *RNA* 9, 1034–1048 (2003).

Chiu Y.-L. & Rana T. M. RNAi in human cells: Basic structural and functional features of small interfering RNA. *Molecular Cell* 10, 549–561 (2002).

Choung S., Kim Y. J., Kim S., Park H.-O., Choi Y.-C. Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342, 919–927 (2006).

Chu C. & Rana T. M. Potent RNAi by short RNA triggers. *RNA* 14, 1714–1719 (2008).

Iwase R., Kurokawa R., Ueno J. Synthesis of modified double stranded RNAs containing duplex regions between amide-linked RNA and RNA at both ends and enhanced nuclease resistance. *Nucleic Acids Symposium Series (Oxford Journals)* 53, 119–120 (2009).

Iwase R., Miyao H., Toyama T., Nishimori K. Synthesis and properties of modified siRNA having amide-linked oligoribonucleosides at their 3′ overhang regions. *Nucleic Acids Symposium Series (Oxford Journals)* 50, 175–176 (2006).

Iwase R., Toyama T., Nishimori K. Solid-phase synthesis of modified RNAs containing amide-linked oligoribonucleosides at their 3′-end and their application to siRNA. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 26, 1451–1454 (2007).

Jackson A. L., Bartz S. R., Schelter J., Kobayashi S. V., Burchard J., Mao M., Li B., Cavet G., Linsley P. S. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnology* 21, 635–637 (2003).

Jackson A. L., Burchard J., Leake D., Reynolds A., Schelter J., Guo J., Johnson J. M., Lim L., Karpilow J., Nichols K., Marshall W., Khvorova A., Linsley P. S. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces 'off-target' transcript silencing. RNA 12, 1197–1205 (2006b).

Jackson A. L., Burchard J., Schelter J., Chau B. N., Cleary M., Lim L., Linsley P. S. Widespread siRNA 'off-target' transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* 12, 1179–1187 (2006a).

Jahns H., Roos M., Imig J., Baumann F., Wang Y., Gilmour R., Hall J. Stereochemical bias introduced during RNA synthesis modulates the activity of phosphorothioate siRNAs. *Nature Communications* 6, 6317 (2015).

Judge A. D., Bola G., Lee A. C. H., MacLachlan I. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing *in vivo*. *Molecular Therapy* 13, 494–505 (2006).

Judge A. D., Sood V., Shaw J. R., Fang D., McClintock K., MacLachlan I. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nature biotechnology* 23, 457–462 (2005).

Karikó K., Bhuyan P., Capodici J., Weissman D. Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *Journal of Immunology* 172, 6545–6549 (2004).

Kenski D. M., Butora G., Willingham A. T., Cooper A. J., Fu W., Qi N., Soriano F., Davies I. W., Flanagan W. M. siRNA-optimized modifications for enhanced *in vivo* activity. *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 1, e5 (2012).

Khvorova A., Reynolds A., Jayasena S. D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209–216 (2003).

Koller E., Propp S., Murray H., Lima W., Bhat B., Prakash T. P., Allerson C. R., Swayze E. E., Marcusson E. G., Dean N. M. Competition for RISC binding predicts *in vitro* potency of siRNA. *Nucleic Acids Research* 34, 4467–4476 (2006).

Kim D.-H. H., Behlke M. A., Rose S. D., Chang M.-S. S., Choi S., Rossi J. J. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nature biotechnology* 23, 222–226 (2005).

Koshkin A. A., Singh S. K., Nielsen P., Rajwanshi V. K., Kumar R., Meldgaard M., Olsen C. E., Wengel J. LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron* 54, 3607–3630 (1998).

Kubo T., Yanagihara K., Sato Y., Morita Y., Seyama T. Enhancement of gene silencing effect and membrane permeability by Peptide-conjugated 27-nucleotide small interfering RNA. *Molecules* 17, 11089–11102 (2012).

Kraynack B. A. & Baker B. F. Small interfering RNAs containing full 2′-O-methylribonucleotide-modified sense strands display Argonaute2/eIF2C2-dependent activity. *RNA* 12, 163–176 (2006).

Layzer J. M., McCaffrey A. P., Tanner A. K., Huang Z., Kay M. A., Sullenger B. A. *In vivo* activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA* 10, 766–771 (2004).

Li X., Kimura H., Hirota K., Sugimoto H., Yoshida H. The effects of thiophosphate substitutions on native siRNA gene silencing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 329, 1026–1030 (2005).

Ma J. B., Ye K., Patel D. J. Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* 429, 318–322 (2004).

Manoharan M., Akinc A., Pandey R. K., Qin J., Hadwiger P., John M., Mills K., Charisse K., Maier M. A., Nechev L., Greene E. M., Pallan P. S., Rozners E., Rajeev K. G., Egli M. Unique gene-silencing and structural properties of 2′-fluoro-modified siRNAs. *Angewandte Chemie International Edition* 50, 2284–2288 (2011).

McManus M. T., Haines B. B., Dillon C. P., Whitehurst C. E., Parijs L., Chen J., Sharp P. A. Small interfering RNA-mediated gene silencing in T lymphocytes. *Journal of Immunology* 169, 5754–5760 (2002).

Mikat V. & Heckel A. Light-dependent RNA interference with nucleobase-caged siRNAs. *RNA* 13, 2341–2347 (2007).

Mook O., Baas F., Wissel M., Fluiter K. Evaluation of locked nucleic acid-modified small interfering RNA *in vitro* and *in vivo*. *Molecular Cancer Therapeutics* 6, 833–843 (2007).

Morrissey D. V., Blanchard K., Shaw L., Jensen K., Lockridge J. A., Dickinson B., McSwiggen J. A., Vargeese C., Bowman K., Shaffer C. S., Polisky B. A., Zinnen S. Activity of stabilized short interfering RNA in a mouse model of hepatitis B virus replication. *Hepatology* 41, 1349–1356 (2005).

Muhonen P., Tennilä T., Azhayeva E., Parthasarathy R. N., Janckila A. J., Väänänen H. K., Azhayev A., Laitala-Leinonen T. RNA interference tolerates 2′-fluoro modifications at the Argonaute2 cleavage site. *Chemistry & Biodiversity* 4, 858–873 (2007).

Mutisya D., Selvam C., Lunstad B. D., Pallan P. P., Haas A., Leake D., Egli M., Rozners E. Amides are excellent mimics of phosphate internucleoside linkages and are well tolerated in short interfering RNAs. *Nucleic Acids Research* 42, 6542–6551 (2014).

Nykänen A., Haley B., Zamore P. D. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107, 309–321 (2001).

Ocampo S. M., Romero C., Aviñó A., Burgueño J., Gassull M. A., Bermúdez J., Eritja R., Fernandez E., Perales J. C. Functionally enhanced siRNA targeting TNFα attenuates DSS-induced colitis and TLR-mediated immunostimulation in mice. *Molecular Therapy* 20, 382–390 (2011).

Odadzic D., Bramsen J. B., Smicius R., Bus C., Kjems J., Engels J. W. Synthesis of 2’-O-modified adenosine building blocks and application for RNA interference. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16, 518–529 (2007).

Ohrt T., Staroske W., Mütze J., Crell K., Landthaler M., Schwille P. Fluorescence cross-correlation spectroscopy reveals mechanistic insights into the effect of 2′-O-methyl modified siRNAs in living cells. *Biophysical Journal* 100, 2981–2990 (2011).

Prakash T. P., Allerson C. A., Dande P., Vickers T. A., Sioufi N., Jarres R., Baker B. F., Swayze E. E., Griffey R. H., Bhat B. Positional effect of chemical modifications on short interference RNA activity in mammalian cells. *Journal of Medicinal Chemistry* 48, 4247–4253 (2005).

Rahman S. M. A., Sato H., Tsuda N., Haitani S., Narukawa K., Imanishi T., Obika S. RNA interference with 2’,4'-bridged nucleic acid analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18, 3474–3480 (2010).

Rahman S. M. A., Seki S., Obika S., Haitani S., Miyashita K., Imanishi T. Highly stable pyrimidine-motif triplex formation at physiological pH values by a bridged nucleic acid analogue. *Angewandte Chemie International Edition* 46, 4306-4309 (2007).

Rand T. A., Ginalski K., Grishin N. V., Wang X. Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 14385–14389 (2004).

Rand T. A., Petersen S., Du F., Wang X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123, 621–629 (2005).

Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W. S., Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology* 22, 326–330 (2004).

Rose S. D., Kim D.-H. H., Amarzguioui M., Heidel J. D., Collingwood M. A., Davis M. E., Rossi J. J., Behlke M. A. Functional polarity is introduced by Dicer processing of short substrate RNAs. *Nucleic Acids Research* 33, 4140–4156 (2005).

Sano M., Sierant M., Miyagishi M., Nakanishi M., Takagi Y., Sutou S. Effect of asymmetric terminal structures of short RNA duplexes on the RNA interference activity and strand selection. *Nucleic Acids Research* 36, 5812–5821 (2008).

Selvam C., Thomas S., Abbott J., Kennedy S. D., Rozners E. Amides as excellent mimics of phosphate linkages in RNA. *Angewandte Chemie International Edition* 50, 2068–2070 (2011).

Semizarov D., Frost L., Sarthy A., Kroeger P., Halbert D. N., Fesik S. W. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 6347–6352 (2003).

Schubert S., Rothe D., Werk D., Grunert H.-P., Zeichhardt H., Erdmann V. A., Kurreck J. Strand-specific silencing of a picornavirus by RNA interference: Evidence for the superiority of plus-strand specific siRNAs. *Antiviral Research* 73, 197–205 (2006).

Schwarz D. S., Hutvágner G., Du T., Xu Z., Aronin N., Zamore P. D. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199–208 (2003).

Singh S. K., Koshkin A. A., Wengel J., Nielsen P. LNA (locked nucleic acids): Synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chemical Communications* 0, 455–456 (1998).

Sioud M. & Sørensen D. R. Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 312, 1220–1225 (2003).

Sipa K. Sochacka E., Kazmierczak-Baranska J., Maszewska M., Janicka M., Nowak G., Nawrot B. Effect of base modifications on structure, thermodynamic stability, and gene silencing activity of short interfering RNA. *RNA* 13, 1301–1316 (2007).

Sioud M. Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *Journal of Molecular Biology* 348, 1079–1090 (2005).

Sledz C. A., Holko M., Veer M. J., Silverman R. H., Williams B. R. G. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nature Cell Biology* 5, 834–839 (2003).

Somoza A., Chelliserrykattil J., Kool E. T. The roles of hydrogen bonding and sterics in RNA interference. *Angewandte Chemie International Edition* 45, 4994–4997 (2006).

Somoza A., Silverman A. P., Miller R. M., Chelliserrykattil J., Kool E. T. Steric effects in RNA interference: Probing the influence of nucleobase size and shape. *Chemistry - A European Journal* 14, 7978–7987 (2008).

Sørensen D. R., Leirdal M., Sioud M. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *Journal of Molecular Biology* 327, 761–766 (2003).

Takahashi M., Daidouji S., Shiro M., Minakawa N., Matsuda A. Synthesis and crystal structure of 2′-deoxy-2′-fluoro-4′-thioribonucleosides: Substrates for the synthesis of novel modified RNAs. *Tetrahedron* 64, 4313–4324 (2008).

Takahashi M., Minakawa N., Matsuda A. Synthesis and characterization of 2’-modified-4'-thioRNA: a comprehensive comparison of nuclease stability. *Nucleic Acids Research* 37, 1353–1362 (2009).

Takahashi M., Nagai C., Hatakeyama H., Minakawa N., Harashima H., Matsuda A. Intracellular stability of 2′-OMe-4′-thioribonucleoside modified siRNA leads to long-term RNAi effect. *Nucleic Acids Research* 40, 5787–5793 (2012).

Tanui P., Kennedy S. D., Lunstad B. D., Haas A., Leake D., Rozners E. Synthesis, biophysical studies and RNA interference activity of RNA having three consecutive amide linkages. *Organic & Biomolecular Chemistry* 12, 1207–1210 (2014).

Terrazas M. & Kool E. T. RNA major groove modifications improve siRNA stability and biological activity. *Nucleic Acids Research* 37, 346–353 (2009).

Wada S., Obika S., Shibata M.-A., Yamamoto T., Nakatani M., Yamaoka T., Torigoe H., Harada-Shiba M. Development of a 2′,4′-BNA/LNA-based siRNA for Dyslipidemia and assessment of the effects of its chemical modifications *in vivo*. *Molecular Therapy — Nucleic Acids* 1, e45 (2012).

Wu S. Y., Yang X., Gharpure K. M., Hatakeyama H., Egli M., McGuire M. H., Nagaraja A. S., Miyake T. M., Rupaimoole R., Pecot C. V., Taylor M., Pradeep S., Sierant M., Rodriguez-Aguayo C., Choi H. J., Previs R. A., Armaiz-Pena G. N., Huang L., Martinez C., Hassell T., Ivan C., Sehgal V., Singhania R., Han H.-D. D., Su C., Kim J. H., Dalton H. J., Kovvali C., Keyomarsi K., McMillan N.

A., Overwijk W. W., Liu J., Lee J.-S. S., Baggerly K. A., Lopez-Berestein G., Ram P. T., Nawrot B., Sood A. K. 2′-OMe-phosphorodithioate-modified siRNAs show increased loading into the RISC complex and enhanced anti-tumour activity. *Nature Communications* 5, 3459 (2014).

Xia J., Noronha A., Toudjarska I., Li F., Akinc A., Braich R., Frank-Kamenetsky M., Rajeev K. G., Egli M., Manoharan M. Gene silencing activity of siRNAs with a ribo-difluorotoluyl nucleotide. *ACS Chemical Biology* 1, 176–183 (2006).

Yang X., Sierant M., Janicka M., Peczek L., Martinez C., Hassell T., Li N., Li X., Wang T., Nawrot B. Gene silencing activity of siRNA molecules containing phosphorodithioate substitutions. *ACS Chemical Biology* 7, 1214–1220 (2012).

Zeng Y. & Cullen B. R. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *RNA* 8, 855–860 (2002).

Zhang N., Tan C., Cai P., Zhang P., Zhao Y., Jiang Y. RNA interference in mammalian cells by siRNAs modified with morpholino nucleoside analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17, 2441–2446 (2009).