

Univerzita Karlova v Praze

**Přírodovědecká fakulta**

*Studijní program:* Biologie

*Studijní obor:* Genetika, molekulární biologie a virologie



**Bc. Jana Blažková**

Dopravní systémy na bázi syntetických hydrofilních polymerů pro  
přenos a řízené uvolňování siRNA

Hydrophilic polymers-based delivery systems for the transport and controlled  
release of siRNA

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Richard Laga, Ph.D.

Praha, 2015

**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, 1.8.2015

Bc. Jana Blažková

**Poděkování:**

Ráda bych zde poděkovala všem kolegům z Oddělení biolékařských polymerů z ústavu Makromolekulární chemie AV ČR za jejich cenné rady, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout. Zvláště pak svému školiteli Ing. Richardu Lagovi, Ph.D. za obrovskou trpělivost při psaní diplomové práce a hlavní vedení práce. Dále bych chtěla poděkovat také kolegyním z biologických laboratoří Mgr. Zuzaně Hvězdové, Mgr. Lucii Cuchalové, PhD. a Mgr. Olze Janouškové, PhD., za pomoc s biologickými experimenty a analýzou dat.

## **Abstrakt**

Terapeutika na bázi siRNA představují slibnou naději pro léčbu řady vrozených i získaných onemocnění. Princip metody spočívá v posttranskripčním umlčení patologického genu nebo souboru genů (tzv. RNAi proces), které jsou odpovědné za samotnou příčinu choroby. Přístup tedy vychází z předpokladu možnosti léčby onemocnění přímo v místě vzniku defektu zásahem na molekulární úrovni, čímž se odlišuje od konvenční, tzv. symptomatické terapie, která se zaměřuje pouze na léčbu či potlačení příznaků onemocnění.

Navzdory rychle rostoucímu poznání funkce genů a příčiny řady genetických chorob, je expanze siRNA terapeutik limitována vývojem účinných a bezpečných transportních systémů (tzv. vektorů). Abychom zajistili účinnou přepravu siRNA v *in-vivo* podmínkách, musí vektory dostatečně redukovat velikost siRNA, chránit ji před degradací během transportu a uvolnit v cytoplasmě cílové buňky. Pro tento účel byly vyvinuty sofistikované systémy virového i neviróvého původu, které do jisté míry splňují uvedené požadavky.

Tato diplomová práce je zaměřená na přípravu nových dopravních systémů siRNA na bázi syntetických hydrofilních polymerů, coby neviróvých vektorů. Pro *in vitro* testování účinnosti při transportu siRNA byly připraveny dva typy polymerních nosičů a to kladně nabité polymery (polykationty), které elektrostaticky interagují se záporně nabitou siRNA za vzniku polyelektrolytového komplexu (PEK) a hydrofilní nenabitě polymery, které obsahují ve své struktuře reaktivní skupiny pro kovalentní navázání siRNA.

První část diplomové práce je věnována přípravě a charakterizaci polykationtů a hydrofilních polymerů s reaktivními skupinami a jejich schopností tvořit s siRNA polyelektrolytové komplexy, respektive kovalentní konjugáty. Druhá část diplomové práce je věnována *in vitro* testování biologické účinnosti připravených PEK siRNA a polymerních konjugátů siRNA z hlediska jejich schopností způsobit umlčení GFP genu produkovaného GFP-modifikovanými HeLa buňkami pomocí RNAi mechanismu. Účinnosti jednotlivých siRNA vektorů byly vyhodnocovány jako pokles intenzity fluorescence GFP.

**Klíčová slova:** umlčování genů, siRNA, hydrofilní polymery, polymerní terapeutika, řízené uvolňování

## **Abstract**

Therapeutics based on siRNA represent a promising hope for the treatment of many congenital and acquired disorders. This method is based on posttranscriptional silencing of pathological gene or set of genes (RNAi process), which are responsible for the actual cause of the disease. Access is therefore based on the assumption of treatment options for the disease at the point of origin of the defect intervention at the molecular level, which is different from the conventional, so-called symptomatic therapy, which focuses only on the treatment or suppression of symptoms.

Despite rapidly increasing understanding of gene function and cause a number of genetic diseases, the expansion of siRNA therapeutics limited the development of efficient and safe transport systems (vectors). In order to ensure efficient transport of siRNA *in vivo* conditions, the vectors must sufficiently reduce the size of the siRNA, protect it against degradation during transport, and release in the cytoplasm of the target cell. For this purpose they were developed sophisticated transport systems based on viral and non-viral origin.

This diploma thesis is focused on the preparation of new transport systems, siRNA-based synthetic hydrophilic polymers, such as non-viral vectors. For *in vitro* testing the effectiveness during transport of siRNA we were prepared two types of polymeric carriers and positively charged polymers (polycations), which electrostatically interact with the negatively charged siRNA to form a polyelectrolyte complex (PEC) and hydrophilic uncharged polymers which contain in their structure reactive groups for covalent binding of the siRNA.

The first part is devoted to the preparation and characterization of polycations and hydrophilic polymers with reactive groups and their ability to form a siRNA polyelectrolyte complexes or covalent conjugates. The second part is devoted to *in vitro* testing of biological activity of prepared PEC siRNA and polymer conjugates of siRNAs in terms of their ability to cause gene silencing GFP produced by GFP-modified HeLa cells via RNAi mechanism. The effectiveness of each siRNA vectors were evaluated as a decrease in fluorescence intensity of GFP.

**Key words:** gene silencing, siRNA, hydrophilic polymers, polymer therapeutics, controlled release

## Seznam zkratek

(N/P)	molární poměr kladně nabitých aminoskupin polykationtu ku záporně nabitým fosfátovým skupinám siRNA v PEK
ABIK	4,4'-azobis(kyanovalerová kyselina), iniciátor polymerace
ABIN	2,2'-azobis(isobutyronitril), iniciátor polymerace
AEMA	<i>N</i> -(2-aminoethyl)methakrylamid, monomer
BOC	<i>tert</i> -buthyloxykarbonyl
CCR5	chemokinový receptor
CPP	buňku penetrující peptid
CTA	přenosové činidlo pro polymeraci
DCM	dichlormethan, rozpouštědlo
Dcr-2	Dicer enzym
DMAP	4-(dimethylamino)pyridin
DMF	dimethylformamid, rozpouštědlo
DMSO	dimethylsulfoxid, rozpouštědlo
DOPE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfoethanolamin
DOTAP	<i>N</i> -[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]- <i>N,N,N</i> -trimethylammonium methyl-sulfát
DSL	dynamický rozptyl světla
dsRBD	"dsRNA binding domain" - dsRNA vazebná doména
dsRNA	dvouřetězcová RNA
DTB	dithiobenzoát
DTT	DL-dithiotreitol
EDC	<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylkarbodiimid hydrochlorid
EDIPA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin

FACS	fluorescenční průtoková cytometrie
GFP	zelený fluorescenční protein
HEPES	sodná sůl 4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonové kyseliny
holo-RISC	plně funkční RISC komplex
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPMA	<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methakrylamid
IS	imunitní systém
Ma-AE-PDS	<i>N</i> -[2-(pyridin-2-yl)disulfanyl]aminoethyl]methakrylamid, monomer
Ma-β-Ala-TT	3-(3-Methakryloylamidopropanoyl)thiazolidin-2-thion, monomer
MES	morfolinoethan-sulfonová kyselina monohydrát
miRNA	mikro RNA
$M_n$	početně-průměrná molární hmotnost [g/mol]
$M_n/M_w$	index molekulární neuniformity
$M_w$	hmotnostně-průměrná molární hmotnost [g/mol]
NHS	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
NK	nukleová kyselina
NMR	nukleární magnetická rezonance
P2T	pyridin-2-thion
PAMAM	polyamidoamin
PDS	pyridyldisulfid
PEG	polyethylenglykol
PEI	polyethylenimin
PEK	polyelektrolytový komplex
piRNA	piwi - interagující RNA

pK <sub>A</sub>	disociační konstanta
PKR	proteinkinázový receptor
PLL	poly-L-lysin
pre-miRNA	prekurzor miRNA
pri-miRNA	primární transkript miRNA
PTGS	post-transkripční umlčování genů
RAFT	řízená radikálová polymerace („reverse addition-fragmentation chain transfer polymerization“)
RES	retikuloendoteliální systém
RISC	ribonukleoproteinový komplex indukující umlčování genu
RNAi	RNA interference
SEC	rozměrově eluční chromatografie
siRNA	malá interferující RNA
ssRNA	jednořetězcová RNA
tasiRNA	trans-aktivující malá interferující RNA
THF	tetrahydrofuran
TIPS	triisopropylsilan
TLC	tenkovrtevná chromatografie
TLR	"toll-like" receptor
TNBSA	2,4,6-trinitrobenzen-1-sulfonová kyselina
TT	thiazolidin-2-thion
UTR	nepřekládaná oblast mRNA
VIGS	virem indukované umlčení genu



# OBSAH

1. ÚVOD .....	2
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	3
2.1 <b>RNA interference</b> .....	3
2.1.1 Typy malých dsRNA molekul .....	4
2.1.1 Mechanismus umlčování genů pomocí RNAi .....	7
2.2 <b>Genová terapie – alternativní léčba</b> .....	11
2.3 <b>Rizika použití volné siRNA <i>in vivo</i></b> .....	13
2.3.1 Stabilita siRNA v tělních tekutinách .....	13
2.3.2 Transport siRNA z krve do cílových buněk .....	13
2.3.3 Transport siRNA z endozomu do cytoplazmy .....	14
2.3.4 <b>Vektory – ochrana a transport siRNA</b> .....	14
2.4.1 Virové nosiče siRNA .....	15
2.4.2 Nevirové nosiče siRNA .....	16
3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....	22
4. Materiály a metody .....	23
4.1 <b>Použité materiály</b> .....	23
4.2 <b>Syntetické postupy</b> .....	24
4.2.1 Příprava monomerů, iniciátoru a přenosového činidla .....	24
4.2.2 Příprava polykationtů .....	27
4.2.3 Příprava reaktivních hydrofilních polymerů .....	32
4.3 <b>Dopravní systémy polymer-siRNA</b> .....	37
4.3.1 Příprava polyelektrolytových komplexů siRNA .....	37
4.3.2 Příprava stabilních polymerních konjugátů siRNA .....	37
4.3.3 Příprava reduktivně odštěpitelných polymerních konjugátů siRNA .....	38
4.4 <b>Použité fyzikálně-chemické metody</b> .....	39
4.4.1 Řízená radikálová polymerace (RAFT) .....	39
4.4.2 Kapalinová chromatografie .....	40
4.4.3 Stanovení obsahu primárních aminoskupin pomocí TNBSA .....	41
4.4.4 Stanovení obsahu TT reaktivních skupin .....	41
4.4.5 Stanovení obsahu PDS reaktivních skupin .....	42
4.4.6 Dialýza .....	42
4.4.7 Povrchový náboj částic .....	42
4.4.8 Velikost částic .....	42
4.5 <b>Biochemické a biologické metody</b> .....	43
4.5.1 Duplexace .....	43
4.5.2 Horizontální elektroforéza v agarózovém gelu .....	43
4.5.3 Kultivace buněk .....	45
4.5.4 Post-transkripční umlčování genu pro GFP prostřednictvím RNAi .....	45
4.5.5 Fluorimetrické stanovení intenzity fluorescence GFP .....	46
4.5.6 Fluorescenční mikroskopie .....	46
4.5.7 Fluorescenční průtoková cytometrie (FACS) .....	46
4.5.8 Měření cytotoxicity .....	47
5. VÝSLEDKY A DISKUZE .....	47
5.1 <b>Příprava a charakterizace polymerních prekurzorů</b> .....	47
5.1.1 Příprava a charakterizace polykationtů .....	48

5.1.2	Příprava a charakterizace reaktivních hydrofilních polymerů .....	51
5.3	<b>Příprava a charakterizace PEK</b> .....	53
5.3.1	Elektroforetické sledování tvorby polyplexů .....	54
5.3.2	Stanovení povrchového náboje a velikosti PEK .....	56
5.4	<b>Příprava a charakterizace stabilních polymerních konjugátů siRNA</b> .....	58
5.5	<b>Příprava a charakterizace reduktivně štěpitelných konjugátů siRNA</b> .....	59
5.6	<b><i>In vitro</i> sledování umlčování GFP genu pomocí PEK a konjugátů siRNA</b> .....	61
6.	<b>ZÁVĚR</b> .....	66
7.	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	68

## 1. ÚVOD

Terapeutické přístupy současné medicíny se v mnohých případech zaměřují na léčbu či potlačení symptomů, nikoliv na samotnou příčinu vzniku nemoci, což značně komplikuje život pacientů, kteří jsou tak v řadě případů odkázáni na léčbu po celý život. Mezi nejzávažnější onemocnění, která jsou léčena pomocí symptomatické terapie, patří maligní nádory. I když je léčba těchto onemocnění pomocí konvenčních chemoterapeutik často vysoce účinná, bývá obvykle doprovázena nežádoucími vedlejšími účinky, které vedou k poškození zdravých tkání a orgánů. Z těchto důvodů se v současné době mnoho vědeckých týmů po celém světě snaží najít alternativní způsoby léčby spočívající v likvidaci či opravě poškozených buněk či tkání přímým zásahem na molekulární úrovni. Příkladem takového způsobu léčby je genová terapie zahrnující proces RNA interference.

RNA interference (RNAi) je přirozený biologický jev, který umožňuje post-transkripční umlčení genů pomocí malých interferujících RNA molekul. Cílené umlčení určitých genů prostřednictvím RNAi může vést k léčbě některých geneticky podmíněných onemocnění, ale také k léčbě různých typů nádorových onemocnění. Klíčovou roli v RNAi hrají malé dvouřetězcové RNA molekuly, mezi které řadíme především endogenní miRNA (mikroRNA) a exogenní siRNA (malá interferující RNA). Tyto dsRNA molekuly se pomocí RNAi aparátu umístěného v cytoplazmě buněk mohou navázat na příslušnou mRNA podle komplementarity bází, a tím zablokovat její překlad na protein. Pro terapeutické účely se jako nejvhodnější ukázala být molekula siRNA, která je plně komplementární k cílové mRNA a představuje tak menší riziko nesprávného spárování.

Použití samotné molekuly siRNA pro *in vivo* aplikaci je ovšem značně limitováno, neboť volná siRNA je velice dobře rozpoznávána imunitním systémem, je také nestabilní v prostředí

tělních tekutin a obtížně proniká přes buněčnou membránu do intracelulárního prostředí. Řešením, jak překonat tyto biologické bariéry, je použití vhodného dopravního systému, který umožní ochránit molekulu siRNA před degradací v krevním řečišti a zároveň umožní její transport z krve až do cytoplazmy cílových buněk.

V předkládané práci jsem se zaměřila na použití dopravních systémů na bázi syntetických hydrofilních polymerů vyznačujících se vysokou strukturní variabilitou, chemickou stabilitou, či definovanou a reprodukovatelnou přípravou. Molekula siRNA byla k těmto nosičům přichycena buďto pomocí elektrostatických interakcí za vytvoření nanočásticových komplexů nebo pomocí stabilních či biodegradovatelných kovalentních vazeb za vzniku rozpustných konjugátů. Účinnosti polymer-siRNA systémů byly hodnoceny na modelových GFP-modifikovaných HeLa buňkách z hlediska jejich schopností vyvolat umlčení GFP genu.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 RNA interference

RNA interference (RNAi) je přirozený biologický proces, který ovlivňuje genovou expresi v buňce. Klíčovou rolí při RNAi hrají malé dvouvláknové molekuly RNA (dsRNA) tvořené přibližně 21-24 páry nukleotidů. Tyto malé dsRNA molekuly nesou na jednom vlákně nukleotidovou sekvenci, která je komplementární k nukleotidové sekvenci určité mRNA a mohou tak s touto mRNA interferovat za vzniku stabilního komplexu. Důsledkem je degradace, či zablokování cílové mRNA, což vede k zabránění vzniku proteinového produktu kódovaného daným genem. Tento jev nazýváme jako posttranskripční umlčování genů (PTGS = „post-transcriptional gene silencing“) a řadíme jej mezi epigenetické jevy, tedy takové, kde změna fenotypového projevu není dána změnou sekvence nukleotidů na DNA.

Fenomén RNAi byl poprvé objeven a popsán v roce 1998. Andrew Fire a kol. při pokusech s háďátkem obecným (*Caenorhabditis elegans*) zjistili, že po injekci specifické dsRNA molekuly do buněk dochází k sekvencně specifické degradaci mRNA (Fire, Xu et al. 1998). Za tento objev jim byla v roce 2006 udělena Nobelova cena za fyziologii a medicínu.

Před objevem mechanismu RNAi bylo při několika studiích zjištěno, že nemusí docházet k produkci požadovaného proteinu, přestože došlo k transkripci příslušného genu na mRNA.

Tento jev byl popsán jako post-transkripční umlčování genů (PTGS). Problémem ovšem bylo, že se nevědělo, co je daným faktorem, který způsobuje sekvenčně specifickou degradaci transkriptů ani jaký je mechanismus účinku.

Příkladem může být studium pigmentace rostlin u geneticky modifikovaných petunií. Pomocí genového inženýrství byl do genomu těchto rostlin vložen gen kódující enzym chalkon syntázu, který hraje klíčovou roli při pigmentaci. Cílem experimentu bylo dosáhnout zvýšené exprese chalkon syntázy, a tím i zvýraznění pigmentace rostlin. Navzdory očekávání se ukázalo, že transgenní organizmus nejenže nevykazoval příslušný fenotyp, ale dokonce došlo ke snížení pigmentace oproti nemodifikované rostlině. Předpokládalo se, že se jedná o PTGS daného genu, které je indukováno právě kopiemi transgenu. Přítomnost transgenů vedla k redukci transkriptů nejen exogenního genu (transgenu), ale také vlastního endogenního genu, což bylo popsáno jako ko-suprese (Napoli, Lemieux et al. 1990). Obdobný efekt byl popsán také u transgenní plísně *Neurospora Crassa* jako potlačení („quelling“) (Cogoni, Irelan et al. 1996).

### 2.1.1 Typy malých dsRNA molekul

Je známo, že v eukaryotických buňkách tvoří většinu RNA molekul právě nekódující RNA. Mezi nekódující RNA řadíme všechny RNA molekuly, kromě mRNA. Patří sem mimo jiné transferová RNA (tRNA) a ribozomální RNA (rRNA), které se účastní procesu proteosyntézy nebo malá jaderná RNA (snRNA), která je součástí spliceozomu a hraje roli při sestřihu neboli odstranění intronů z primárního transkriptu mRNA a další.

Nejlépe prostudovanými RNA molekulami, které způsobují RNA interferenci, jsou microRNA (Lee, Nakahara et al.) a siRNA. Další méně prozkoumané interferující RNA jsou tasiRNA („trans-acting small interfering RNA“), rasiRNA („repeat associated small interfering RNA) a piRNA („Piwi-interacting RNA“). Všechny tyto RNA molekuly, které jsou schopné interferovat s mRNA, a tím způsobit post-transkripční umlčení daného genu, mají jednotnou strukturu. Jsou to malé, přibližně 22 nukleotidů dlouhé nekódující dsRNA molekuly, které mají na 3'konci přesah o 2 nukleotidy, které nesou komplementární (tzv. „antisense“) vlákno k dané mRNA (Hamilton and Baulcombe 1999).

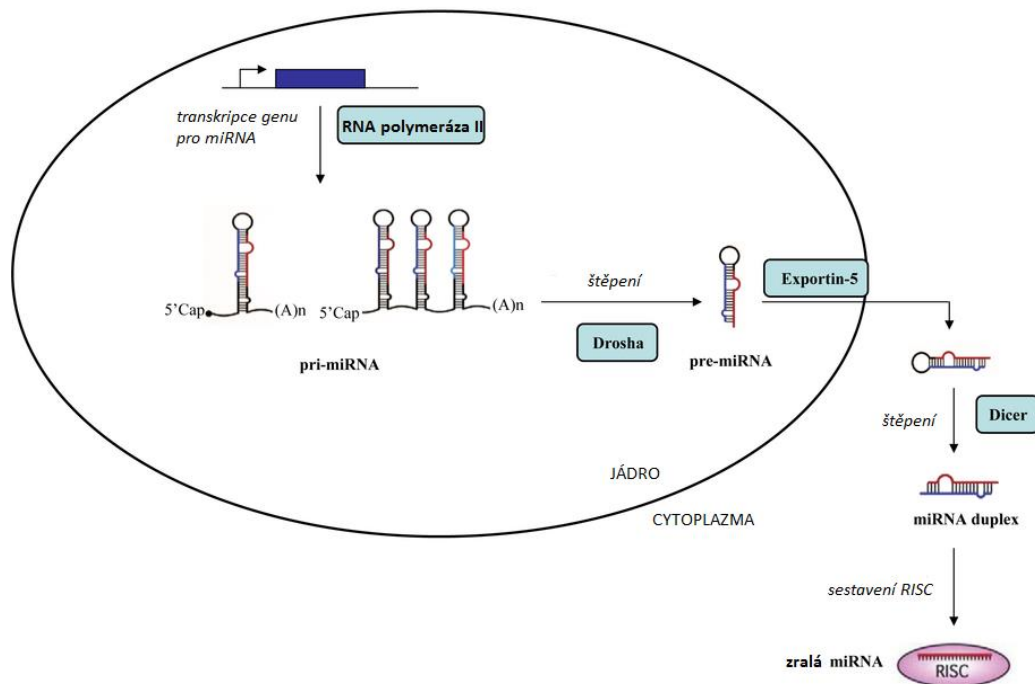
### 2.1.1.1 MicroRNA

První miRNA byla objevena už v roce 1993 u háďátka obecného (*Caenorhabditis elegans*) při studiu genu *lin-4*, o kterém bylo známo, že negativně ovlivňuje produkci produktu genu *lin-14* a tím kontroluje larvální vývoj u háďátka. Lee a kol. zjistili, že gen *lin-4* nekóduje protein, ale pouze malou dsRNA molekulu – miRNA. Tato miRNA *lin-4* je komplementární k 3'konci nepřekládané oblasti (3'UTR) mRNA *lin-14*, se kterou specificky interaguje za vzniku nadmolekulárního komplexu (viz kapitola 2.3), čímž negativně ovlivňuje expresi genu *lin-14*, což vede k zastavení larválního vývoje háďátka v 1. vývojovém stádiu (Lee, Feinbaum et al. 1993).

miRNA jsou endogenního původu, vznikají tedy přepisem vlastních jaderných genů. Umlčování genů prostřednictvím miRNA je tedy zcela přirozený jev, který je důležitý především pro post-transkripční regulaci mnoha biologických procesů, které jsou nezbytné pro vývoj organismů (Bernstein, Kim et al. 2003), (Brennecke, Hipfner et al. 2003) . Je známo, že až 60% lidských genů může být regulováno pomocí miRNA (Elbashir, Harborth et al. 2001).

Geny pro miRNA jsou přepisovány RNA polymerázou II (Lee, Kim et al. 2004) za vzniku primárního transkriptu, který nese na 3'konci polyA a na 5'konci 7-methylguanidinovou čepičku. Tento primární prekurzor označujeme jako pri-miRNA. Proces vzniku maturovaných miRNA z primárního prekurzoru zahrnuje dva kroky: nejprve dojde v jádře k sestřihu pri-miRNA na kratší, přibližně 70 nukleotidů dlouhý prekurzor pre-miRNA a poté je pre-miRNA transportována do cytoplazmy, kde je sestřižena na zralou, přibližně 22 nukleotidů dlouhou miRNA (Lee, Jeon et al. 2002) (viz **obr. 2-1**).

Jaderný sestřih pri-miRNA na pre-miRNA je katalyzován enzymem Drosha, který patří mezi RNázy III (Lee, Ahn et al. 2003). Enzym Drosha zprostředkovává samotné štěpení RNA, ale zároveň tvoří část multiproteinového komplexu nazývaném Mikroprocesor. Součástí tohoto komplexu je také protein Pasha („Partner of Drosha“), který funguje jako RNA vazebná doména a tvoří tedy důležitou součást komplexu (Denli, Tops et al. 2004). Pre-miRNA je přibližně 70 nukleotidů dlouhá jednovláknová RNA molekula, která vytváří na jednom konci vlásenku („hairpin loop“) a střední část je tvořena duplexem s částečnou vzájemnou komplementaritou. Drosha odstřižuje také chránící skupiny na 5'a 3'konci. Pre-miRNA je následně transportována z jádra do cytoplazmy, kde je rozpoznána enzymem Dicer, který štěpí prekurzor na finální maturovanou formu miRNA.



**Obr. 2-1:** Schéma vzniku miRNA. Převzato z (Cautogno, Esposito et al. 2011).

### 2.1.1.2 Malá interferující RNA (siRNA)

Molekula siRNA vzniká sestřihem z delšího dsRNA prekurzoru v cytoplazmě buněk. Její struktura se liší od maturované miRNA pouze tím, že má perfektní komplementaritu bazí. Sestřih dsRNA prekurzoru na siRNA je zprostředkován, stejně jako v případě sestřihu pre-miRNA na miRNA, cytoplazmatickou RNázou III Dicer (Bernstein, Caudy et al. 2001).

Prekurzory pro siRNA jsou primárně exogenního původu, jelikož pocházejí většinou z virů nebo transpozónů. RNA interference tedy funguje také jako obranný mechanismus před virem, což bylo popsáno poprvé u rostlin (Ruiz, Voinnet et al. 1998). V literatuře je efekt umlčování genů způsobený virem označován jako VIGS („virus-induced gene silencing“). Později byla RNAi jako obranný mechanismus pozorována také u háďátka (*Caenorhabditis elegans*) (Wilkins, Dishongh et al. 2005), octomilky (*Drosophila melanogaster*) (Zambon, Vakharia et al. 2006) i u člověka (Gitlin, Karelsky et al. 2002).

### 2.1.1.3 Další typy malých interferujících RNA

Kromě výše uvedených endogenních miRNA a exogenních siRNA rozlišujeme ještě další malé dsRNA molekuly, které jsou schopné interferovat s mRNA, ale nejsou tak běžné. Jedná

se zejména o piRNA („Piwi-interacting RNA“), rasiRNA („repeat associated siRNA“) a tasiRNA („trans-acting siRNA“).

PiRNA je malá interferující dsRNA tvořená 29-30 páry nukleotidů, která se vyskytuje v zárodečných buňkách. Podílí se na regulaci exprese při gametogenezi a pravděpodobně funguje také jako ochrana před transpozony (Girard, Sachidanandam et al. 2006).

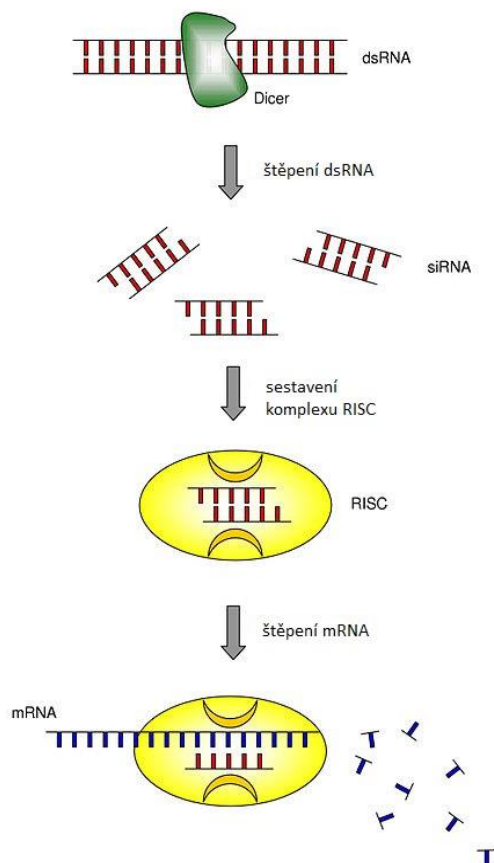
RasiRNA dnes řadíme mezi piRNA. Jak už z názvu vypovídá, jedná se o siRNA, které jsou odvozené od repetitivních sekvencí, jako jsou retrotranspozony nebo oblasti heterochromatinu (Saito, Nishida et al. 2006). Takže je považujeme za siRNA endogenního původu.

TasiRNA jsou malé endogenní siRNA, které způsobují, obdobně jako siRNA, degradaci cílové mRNA. Narozdíl od ostatních siRNA nevyžadují úplnou komplementaritu bází k cílové sekvenci, což je charakteristické pro miRNA (Yoshikawa, Peragine et al. 2005).

### **2.1.1 Mechanismus umlčování genů pomocí RNAi**

Ve výše uvedených kapitolách byly vyjmenovány typy malých RNA, které mohou interferovat s mRNA, a také byl popsán mechanismus jejich vzniku z RNA prekurzorů. Tato kapitola se zaměřuje hlavně na buněčný aparát RNAi a samotný proces post-transkripčního umlčení genů, který probíhá v cytoplazmě buněk.

Proces RNA interference můžeme rozdělit do dvou základních kroků. Prvním krokem je iniciace RNAi, za kterou následuje krok umlčení cílového genu. Iniciace RNAi je zprostředkována enzymem Dicer, který produkuje charakteristické ~22nt dlouhé interferující siRNA nebo miRNA. Efektorovým komplexem je komplex zvaný RISC („RNA induced silencing complex“), který váže cílovou mRNA a prostřednictvím RNAi zprostředkovává samotné umlčení genu (Bernstein, Caudy et al. 2001). Na následujícím obrázku je stručné schéma vzniku siRNA a jeho efekt na cílovou mRNA (**obr. 2-2**).



**Obr. 2-2:** Stručné schéma mechanismu RNAi. Ve schématu je zobrazen vznik malé interferující RNA (siRNA) z delšího dvouřetězcového RNA prekurzoru, sestavení efektorového komplexu RISC a jeho působení na cílovou mRNA. Obrázek převzat z (Mocellini and Provenzano 2004).

### 2.1.2.1 Enzym Dicer (RNáza III)

Hlavní funkcí enzymu Dicer je produkce malých interferujících RNA z delších prekurzorů, ale zároveň je také součástí efektorového komplexu RISC. Pokud není Dicer v buňce přítomen, nedochází k umlčování genu, což dokazuje, že je nezbytný pro vložení siRNA do RISC komplexu (Doi, Zenno et al. 2003).

Dicer patří do rodiny RNA endonukleáz III (RNáz III). Obsahuje 2 endonukleázové domény, helikázovou doménu, PAZ doménu, dsRNA vazebnou doménu a doménu s neznámou funkcí DUF238 (Carmell and Hannon 2004).

Endonukleázové domény specificky štěpí dsRNA prekurzor (pro siRNA) nebo pre-miRNA vlásečku (pro miRNA) na kratší dsRNA molekuly o délce ~22nt, které mají přesahující 3' konce o 2 nukleotidy (Zhang, Kolb et al. 2004). PAZ doména (Siomi and Siomi) je RNA vazebná doména, která rozpoznává právě tyto přesahující 3' konce u siRNA a miRNA (Ma, Ye et al. 2004). ATPásová/helikázová doména se nachází na N-konci proteinu a její funkcí je interakce s vlásečkovou strukturou („hairpin loop“) pre-miRNA, čímž umožňuje enzymu Dicer rozlišit pre-miRNA od dsRNA. Na C-konci se nachází dsRNA vazebná doména



(dsRBD), která je důležitá pro vazbu substrátu pouze v případě nepřítomnosti PAZ domény, ale nemá žádný vliv na délku dsRNA produktu (Ma, Zhou et al. 2012).

PAZ doména je součástí také Argonaute proteinů, které tvoří jádro RISC komplexu. Během sestavování RISC komplexu („RISC loading“), interagují Argonaute proteiny s Dicerem (Hammond, Boettcher et al. 2001).

U různých organismů rozlišujeme odlišné typy Diceru. Například octomilka obecná (*Drosophila melanogaster*) má dva enzymy Dicer, z nichž jeden Dcr-1 produkuje miRNA a druhý Dcr-2 produkuje siRNA (Lee, Nakahara et al. 2004). Na druhou stranu u lidí funguje pouze jeden Dicer, který se uplatňuje v biogenezi jak miRNA, tak siRNA.

### **2.1.2.2 RISC („RNA induced silencing complex“)**

V poslední fázi RNAi dochází k interakci jednoho vlákna interferující dsRNA molekuly s komplementární mRNA (Lee, Nakahara et al. 2004). Výsledkem je buď degradace cílové mRNA nebo pouze zablokování translace. V obojím případě dochází k umlčení daného genu. Interferující dsRNA nefunguje samostatně, ale pro umlčení vyžaduje komplex proteinů, který zprostředkovává přiblížení a interakci interferující dsRNA s cílovou mRNA a také konečnou degradaci mRNA. Tento ribonukleoproteinový komplex, který funguje jako efektor RNAi, souborně nazýváme RISC („RNA-induced silencing complex“) (Hammond, Bernstein et al. 2000).

Při sestavování efektorového komplexu RISC („RISC assembly“) vzniká nejprve komplex zvaný RISC loading complex (RLC). RLC je u octomilky formován pomocí dvou proteinů: enzymu dicer Dcr-2 a dsRNA vazebného proteinu R2D2. Oba tyto proteiny spolu vzájemně interagují a vážou se na siRNA duplex. Molekula siRNA je termodynamicky asymetrická a R2D2 nasedá na stabilnější 5' konec siRNA, kdežto Dcr-2, který není preferenční, nasedá na méně stabilní 5' konec. Orientace Dcr-2/R2D2 heterodimeru tedy určuje, které vlákno siRNA bude vloženo do RISC (Tomari, Matranga et al. 2004).

U lidí je RLC tvořen Dicerem a proteinem TRBP (HIV-1 transactivating response RNA-binding protein) (Gatignol, Bucklerwhite et al.) TRBP funguje jako pozitivní regulátor genové exprese viru HIV-1 (Gatignol, Bucklerwhite et al. 1991) a zároveň se uplatňuje také při RNAi. TRBP nese tři RNA vazebné domény a zastupuje stejnou funkci jako R2D2 u octomilky (Chendrimada, Gregory et al. 2005).

Interferující molekula siRNA je dvojitá vlákenná a nese dvě antiparalelně orientovaná RNA vlákna – „sense“ a „antisense“. Pouze „antisense“ vlákno je komplementární k cílové mRNA. Komplementární „antisense“ vlákno nazýváme také jako „guide“ vlákno a druhé komplementární vlákno („sense“) nazýváme jako „passenger“. Zpočátku byla představa taková, že se duplex siRNA nejprve rozplete pomocí ATP-dependentní helikázy („DEAD-box RNA helicase domain“ u Diceru) a následně je už samostatné řídicí „guide“ vlákno siRNA vloženo do efektorového komplexu RISC (Meister and Tuschl 2004). Později bylo ale prokázáno, že pro odvinutí duplexu siRNA je vyžadována přítomnost Argonaute proteinu (Ago2), který tvoří jádro komplexu RISC (Okamura, Ishizuka et al. 2004). Byl tedy navržen nový model, ve kterém nejprve dojde k interakci Ago2 s Dicer/TRBP heterodimerem nesoucím duplex siRNA a Ago2 následně odstraní nepotřebné „passenger“ vlákno (Matranga, Tomari et al. 2005). Po odstranění „passenger“ vlákna vzniká plně funkční RISC komplex (holo-RISC) o velikosti 80S, který štěpí cílovou mRNA (Pham, Pellino et al. 2004).

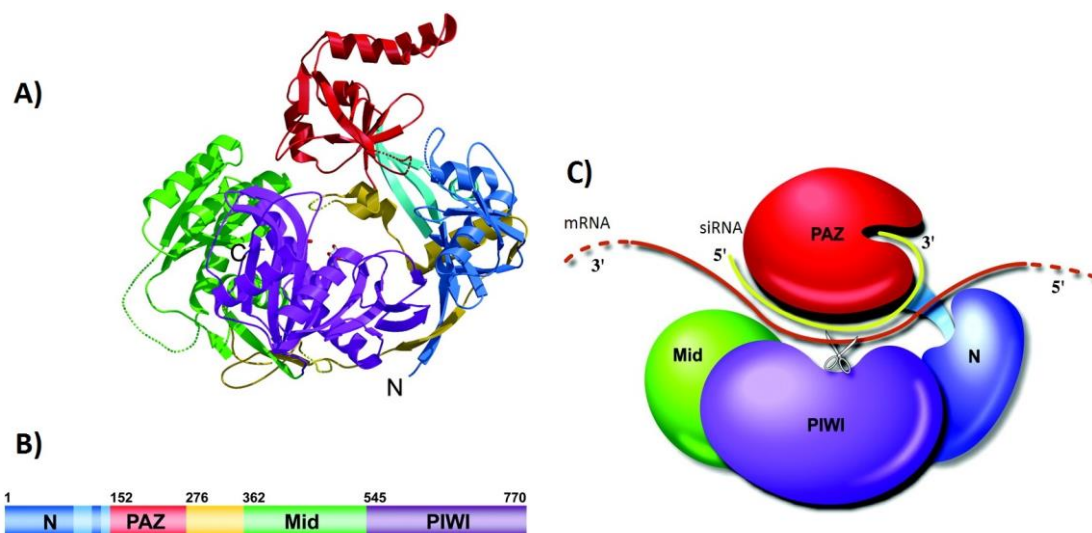
### 2.1.2.3 Působení RISC na cílovou mRNA

Jádro RISC komplexu tvoří proteiny z rodiny Argonaute. Tyto proteiny řídí štěpení cílové mRNA a jsou tedy klíčovými faktory pro umlčování genů prostřednictvím RNAi (Okamura, Ishizuka et al. 2004), (Meister, Landthaler et al. 2004).

Plně funkční komplex RISC (tzv. „holo-RISC“), který nese pouze „guide“ vlákno siRNA nejprve zprostředkuje propojení „guide“ vlákna s cílovou mRNA podle komplementarity bazí a následně dojde k hydrolytickému štěpení mRNA.

Jádro RISC komplexu tvoří proteiny z rodiny Argonaute. Tyto proteiny řídí štěpení cílové mRNA a jsou tedy klíčovými faktory pro umlčování genů prostřednictvím RNAi (Okamura, Ishizuka et al. 2004), (Meister, Landthaler et al. 2004).

Argonaute protein se skládá z několika funkčních domén, a to N-koncové domény, PAZ domény, středové domény „Mid“ a PIWI domény na C-konci proteinu. N-koncová, středová a PIWI doména vytváří pŕlměsícovou strukturu s PIWI doménou uprostřed a PAZ doména je na opačné straně propojena můstkem z N-koncové domény (viz **obr. 2-3**). PAZ doména stejně jako u enzymu Dicer se váže na 3' konec jednovláknové siRNA („guide“ vlákno). Hlavní funkční doménou, která provádí štěpení cílové mRNA je PIWI doména, která má podobnou terciální strukturu jako RNáza H. PIWI doménu označujeme také jako „slicer“ (Song, Smith et al. 2004).



**Obr. 2-3:** Argonaute protein: A) 3D model proteinu, B) Schematické znázornění sekvence od N-konce po C-konec proteinu, C) Prostorové uspořádání proteinového komplexu při štěpení mRNA v RISC. Převzato z (Song, Smith et al. 2004).

Účinek na cílovou mRNA rozlišujeme podle toho, zda je „guide“ vlákno odvozeno od miRNA nebo siRNA. V případě siRNA se „guide“ vlákno dokonale páruje s cílovou mRNA a nedochází tedy k chybám při párování s danou mRNA. Po propojení plně funkčního RISC komplexu s cílovou mRNA dochází k její degradaci.

Zato „guide“ vlákno odvozené od miRNA není plně komplementární s cílovou mRNA a může tak dojít k chybám při párování s mRNA. Po štěpení mRNA RISC komplexem může dojít buď k degradaci mRNA nebo pouze k zablokování translace. RISC s „guide“ vláknem se váže nejčastěji do 3' nepřekládané oblasti (3'UTR) mRNA, čímž dojde k inhibici translace. Následně může dojít jednak k deadenylaci 3' poly(A) konce a tím i k destabilizaci mRNA (Wu, Fan et al. 2006) nebo k uskladnění mRNA do cytoplazmatických tělísek (P-bodies) (Sen and Blau 2005).

## 2.2 Genová terapie – alternativní léčba

Pojmem genová terapie se rozumí použití genetického materiálu jakožto léčiva. Ve většině případů je tato genetická informace transportována do buněk, kde je následně přepsána buněčným aparátem na protein, který plní léčebnou funkci. Tato moderní terapeutická technika umožňuje, narozdíl od konvenčního způsobu léčby, který jen potlačuje symptomy, léčbu samotné podstaty nemoci přímo v místě vzniku defektu zásahem na molekulární úrovni.

Za genovou terapii můžeme ovšem považovat i mechanismus umlčování genů pomocí RNA interference, jehož princip nespočívá v přepisu genetického materiálu na protein, ale terapeutikem je zde samotná molekula RNA (siRNA).

Ačkoliv je praktické využití genové terapie založené na RNAi procesu teprve na samém začátku, mohlo by v budoucnu umlčování genů pomocí siRNA vést k vyvinutí *in vivo* účinných terapeutik pro doplňkovou či alternativní léčbu geneticky podmíněných onemocnění, případně nádorových onemocnění, jejichž počet má i přes veškeré snahy o prevenci stále vzrůstající charakter.

Prvním testovaným léčivem na bázi RNAi byla chemicky modifikovaná siRNA (Sirna-027, Allergan, Irsko), jejímž cílem byla mRNA kódující protein receptoru vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGFR-1). VEGF je růstový faktor, který způsobuje stimulaci angiogeneze v sítnici. U starších lidí způsobuje VEGF abnormální tvorbu vlásečnic v sítnici vedoucí až ke slepotě. Toto onemocnění nazýváme jako věkem podmíněná neovaskulární makulární degenerace (Kaiser, Symons et al. 2010). I když byla léčba pomocí Sirna-027 zastavena ve II. fázi klinického testování kvůli nedostatečné účinnosti, představuje tento inovativní způsob léčby velký příslib do budoucna. Další testovanou molekulou byla například chemicky modifikovaná siRNA s názvem ALN-RSV01 (Alnylam Pharmaceuticals, USA), určená pro lokální aplikace intranazálním podáním. Cílem této modifikované siRNA molekuly je mRNA kódující N-protein respiračního syncytiálního viru (RSV). N-protein zajišťuje replikaci RSV a inhibice jeho syntézy vlivem ALN-RSV01 je tedy pro virus letální (DeVincenzo et al. 2008). Léčba pomocí ALN-RSV01 byla taktéž ukončena ve II. fázi klinického testování a to z důvodu vážného podezření, že umlčování příslušného genu není vyvolané jen RNAi mechanismem, ale také aktivací složek vrozené imunity.

Největší problém použití nukleových kyselin, včetně siRNA, jako léčiv, spočívá v jejich nízké stabilitě v tělních tekutinách a relativně vysoké imunogenicitě. První testovaná terapeutika založená na siRNA jsou proto podávána lokálně přímo do poškozeného místa, aby RNA léčivo nepodlehlo degradaci při transportu a nevyvolávalo nežádoucí imunitní odezvu.

## 2.3 Rizika použití volné siRNA *in vivo*

### 2.3.1 Stabilita siRNA v tělních tekutinách

Úspěch genové terapie spočívá ve schopnosti dopravit molekulu nukleové kyseliny do cílové buňky pacienta. Přímá aplikace volných nukleových kyselin *in vivo* je ovšem značně limitována jejich rychlou degradací všudypřítomnými nukleázami a relativně vysokou imunogenicitou. Zejména dsRNA je díky své podobnosti s virovou RNA efektivně rozpoznávána komponentami imunitního systému, což vede k okamžitému vyvolání imunitní odpovědi. Důležitou roli zde hrají „toll-like receptory“ (TLR) hojně exprimované na povrchích a intracelulárních membránách antigen prezentujících buněk (zejména TLR 7 a 8) a extracelulární proteinkinázové receptory (PKR) (Hornung, Guenthner-Biller et al. 2005). Proto lze tohoto přístupu využít pouze při lokální aplikaci v místě onemocnění, což bývá v praxi často dosti náročné.

### 2.3.2 Transport siRNA z krve do cílových buněk

Poločas rozpadu nemodifikované siRNA v séru se pohybuje v rozmezí několika minut až hodiny (Behlke 2006). V případě, že se volná siRNA v krvi ihned nedegraduje, nastává další problém, kterým je transport z krevního řečiště skrze endotel cév do cílové tkáně. Buněčná výstelka cév, vyživujících většinu zdravých tkání, neumožňuje volný průchod makromolekul, jako např. siRNA, mezibuněčnými prostory díky těsným spojům mezi buňkami. Velmi málo propustná je např. buněčná bariéra oddělující mozek a krevní oběh (1-2 nm), o něco více propustnější jsou membrány v kůži, svalch a plicích (5-10 nm). U myši byl popsán efektivní způsob transportu siRNA z krve do některých orgánů (játra, slezina, slinivka, plíce) pomocí vysokotlaké injekce koncentrovaného roztoku siRNA do ocasní žíly (Lewis, Hagstrom et al. 2002). Přírozený transport siRNA z krve do tkáně je umožněn pouze v místech, kde je endotel perforovaný, jako je tomu např. v tkáních retikuloendoteliálního systému (játra, ledviny a slezina), jejichž velikosti pórů dosahují velikostí nad 100 nm (White 2008). Větší molekuly mohou být také pasivně transportovány do nádorových tkání, jejichž vaskulatura je značně neuspořádaná a propustná. Nádorová vaskulatura totiž vytváří stále nové krevní cévy, aby měl rostoucí nádor zajištěn dostatečný přísun kyslíku a živin. Tento jev je označován jako angiogeneze.

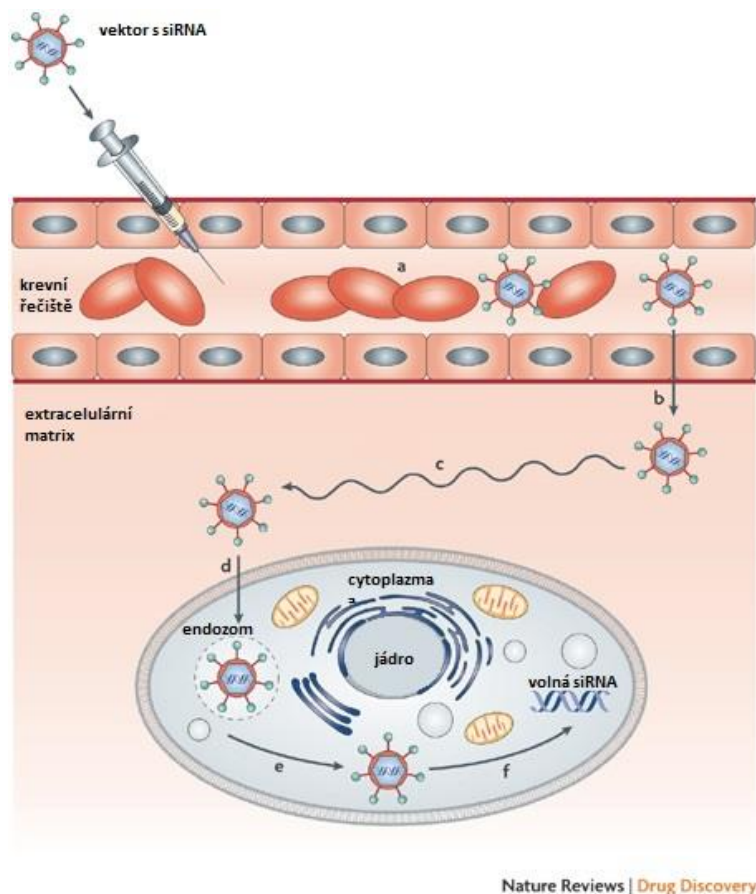
Transport siRNA z mezibuněčného prostoru do cílových buněk je kromě velikosti limitován také jejím záporným nábojem, který způsobuje elektrostatické odpuzování siRNA od rovněž záporně nabitého povrchu plazmatických membrán buněk.

### 2.3.3 Transport siRNA z endozomu do cytoplazmy

V případě, že by byla molekula siRNA přece jenom buňkou endocytována, nastává další problém, a to únik z endozomu do buněčné cytoplazmy, kde se nachází RNAi aparát. Pokud by se totiž siRNA nepodařilo v dostatečně krátké době opustit endozom, došlo by k jeho splynutí s lysozomem, po kterém by byla vystavena účinkům kyselého prostředí (pH ~ 5) a agresivních enzymů. Pro zvýšení účinnosti úniku nukleových kyselin do cytoplazmy jsou v praxi využívány různé typy endozomolytických látek (např. chlorochin) či fusogenních peptidů (např. melitin), které způsobují buďto osmotický rozpad endozomů (tzv. efekt protonové houby, viz kapitola 2.4.2.3.3) nebo rozšiřují póry endozomálních membrán. Je třeba poznamenat, že klinické použití těchto látek je do značné míry limitováno jejich vysokou akutní toxicitou.

### 2.3.4 Vektory – ochrana a transport siRNA

Všechny bariéry *in vivo* transportu siRNA, které jsou shrnuty v předchozí kapitole, představují nezdolatelné překážky pro samotnou nemodifikovanou siRNA. Řešením, jak tyto bariéry obejít, je vytvořit vhodný dopravní systém (= vektor, nosič), který by molekulu siRNA dokázal jednak „zamaskovat“ před imunitním systémem, ochránit ji před degradací RNázami během transportu, ale také by zajistil efektivní transport siRNA do cílového místa (viz **obr. 2-4**). Dalšími požadovanými vlastnostmi vektoru jsou biodegradabilita a schopnost uvolnění siRNA v cytoplazmě buněk.



**Obr. 2-4:** Vektor nesoucí siRNA musí při *in vivo* transportu překonat několik překážek, jako je ochrana siRNA před fagocytickými buňkami a degradací imunitním systémem IS v krvi (a), transport skrze endotel cév (b), průchod extracelulárním matrixem až k cílové buňce (c), transport skrze plazmatickou membránu (d), únik z endozomu (e) a uvolnění siRNA z nosiče (f). Převzato z (Whitehead, Langer et al. 2010).

## 2.4.1 Virové nosiče siRNA

Virové nosiče (vektory) byly jedny z prvních dopravních systémů pro transport siRNA do cílových tkání. Výhodou virových vektorů je především jejich přirozená schopnost efektivně transportovat genetický materiál do buněk a také jejich vysoká tkáňová specifita. Mezi nevýhody naopak patří poměrně vysoká imunogenicita či relativně komplikovaná příprava.

Jedním z prvně testovaných virových vektorů byl například adenovirový vektor nesoucí zabudovanou siRNA proti PTTG-1 („pituitary tumor transforming gene 1“). PTTG-1 je gen kódující protein securin, který se nadměrně exprimuje ve většině nádorů a stimuluje zde produkci růstových faktorů. Použitím tohoto adenovirového vektoru bylo prokázáno při *in vivo* i *in vitro* pokusech potlačení exprese PTTG-1 v játrech (Jung, Yoo et al. 2006).

Pro umlčování genů jsou často využívány také lentivirové vektory. Příkladem může být lentivirový vektor se zabudovanou siRNA proti chemokinovému receptoru CCR5. Tento membránový receptor se nachází na povrchu T-lymfocytů a je hlavním vstupním receptorem

pro virus HIV (Qin, An et al. 2003). Modifikované lentivirové vektory, které měly ve svém genomu kromě genu pro siRNA (proti GFP) také zabudovaný U6 promotor velice efektivně umlčovaly produkci GFP („green fluorescent protein“) v *in vitro* podmínkách, a při *in vivo* aplikaci způsobovaly trvalé umlčení genu pro GFP v mozku geneticky modifikovaných myší (Makinen, Koponen et al. 2006).

Přestože se prokázalo, že virové vektory jsou velmi efektivními dopravními systémy pro přenos siRNA v *in vivo* podmínkách, nízká bezpečnost virových vektorů představuje vysoké riziko pro případné testování těchto systémů na lidských pacientech. Dalšími nevýhodami jsou především vysoká imunogenicita a komplikovaná a drahá výroba ve velkém množství. Proto jsou na vědeckých pracovištích po celém světě čím dál častěji využívány pro transport siRNA nevirové vektory, které sice nejsou z hlediska transfekčních schopností tak účinné jako virové vektory, avšak jejich nízká imunogenicita, nízká akutní toxicita a možnost relativně snadné přípravy ve velkém množství činí z nevirálních vektorů velmi atraktivní systémy vhodné pro *in vivo* aplikace.

## **2.4.2 Nevirové nosiče siRNA**

### **2.4.2.1 Lipidové nosiče (liposomy)**

Lipidy jsou amfifilní molekuly složené z polární hydrofilní „hlavy“, obsahující jednu nebo více ionizovatelných skupin, nepolární části tvořené lipidovým řetězcem či molekulou cholesterolu a spojovací vazby ovlivňující jejich chemickou stabilitu a biodegradabilitu. Lipidy jsou hlavním stavebním prvkem všech biologických membrán, včetně plazmatické membrány a ve vodném prostředí se samovolně uspořádávají do lipozomů.

Nejčastěji využívanými nosiči na bázi lipidů pro přenos siRNA jsou kationtové lipidy. Kladně nabitě skupiny lipidů (nejčastěji amino skupiny) dokáží díky elektrostatickým interakcím vytvořit se záporně nabitou molekulou siRNA stabilní komplex sferického tvaru, který nazýváme lipoplex. Lipoplexy tedy sestávají z kavity vyplněné kondenzovanou siRNA, která je obalena lipidovou dvojrůstvou. Lipoplexy poskytují siRNA ochranu před enzymatickou degradací a zároveň, díky kladnému povrchovému náboji, umožňují snazší průchod přes záporně nabitě buněčné membrány. Testovanými kationtovými lipidy pro dopravu NK, které vykazovaly efektivní transfekční aktivitu v *in vitro* podmínkách byly například komerčně dostupné transfekční činidlo Lipofectamine2000 dodávané společností Life Technologies



(Dalby, Cates et al. 2004) nebo *N*-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium methyl-sulfát (DOTAP) (Martino, di Girolamo et al. 2009).

Při konstrukci lipidových nosičů se využívají také tzv. pomocné neutrální lipidy, například 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfoethanolamin (DOPE), které zvyšují schopnost transfekce (Li and Szoka 2007).

Ovšem při aplikaci *in vivo* byly tyto kladně nabitě lipidové nosiče neefektivní. Lipoplexy jsou dobře rozpoznatelné imunitním systémem a jsou ihned eliminovány přes retikulo-endotheliální systém (RES) z krevního oběhu. Zároveň kladný povrchový náboj lipoplexů vyvolává nespecifické interakce s některými krevními komponentami za vzniku rozměrných agregátů (Li and Szoka 2007). Aby se předešlo těmto efektům, byly vyvinuty tzv. kationtové lipidy s pH-řízenou ionizací. Tyto lipidy nesou při nízkém pH (pH ~ 4) kladný náboj a umožňují tak zabalení (enkapsulaci) záporně nabitě siRNA za vzniku stabilního lipoplexu. Naopak v krvi, kde je pH okolo 7,4, dochází díky částečné deprotonaci jeho aminoskupin k redukci kladného povrchového náboje, což umožní „zamaskování“ lipoplexu před imunitním systémem (Semple, Klimuk et al. 2001). Přestože se prodloužila doba cirkulace těchto lipoplexů v krvi, nebyl pozorován žádný evidentní nárůst efektu genového umlčování. Lipoplexy se později začaly hlavně využívat pro imunostimulační aplikace (de Jong, Chikh et al. 2007).

#### 2.4.2.2 Buňku penetrující peptidy

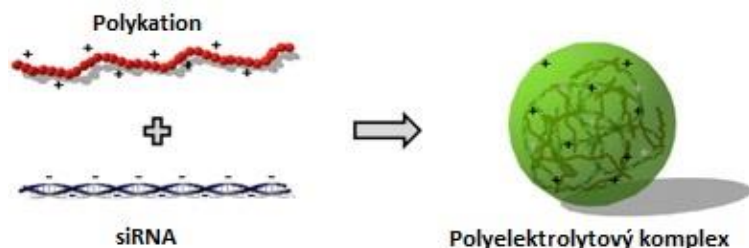
Mezi vektory siRNA můžeme zařadit také **buňku penetrující peptidy**, neboli CPPs („cell penetrating peptides“). CPPs je široká skupina krátkých peptidů (4-30 aminokyselin), jejichž společnou charakteristikou je schopnost translokace skrze plazmatickou membránu, díky které mohou efektivně dopravit malé molekuly dovnitř buněk. První CPP byl objeven v roce 1988, a to zároveň ve dvou laboratořích nezávisle na sobě. Tímto CPP byl trans-aktivační transkripční aktivátor (Tat) izolovaný z viru HIV-1, u kterého bylo zjištěno, že je efektivně pohlcován širokou škálou buněčných typů (Frankel and Pabo 1988, Green and Loewenstein 1988). Tento objev vedl k vývoji dalších CPPs jako transportního systému pro malé molekuly. Pro dopravu siRNA se nejčastěji využívají kationtové peptidy, které elektrostaticky interagují se záporně nabitou siRNA za vzniku komplexu. Příkladem může být CPP zvaný CADY, který je kombinací zbytků tryptofanů a argininů (20 AK) (Crombez, Aldrian-Herrada et al. 2009). Další možností je kovalentní propojení siRNA s CPP, například pomocí

disulfidických můstků, které jsou štěpeny v reduktivním prostředí uvnitř buňky, což umožňuje snazší uvolnění siRNA z vektoru (Muratovska and Eccles 2004).

### 2.4.2.3 Polyelektrolytové komplexy (polyplexy)

Polymer je definovaný jako makromolekula tvořená jednou nebo několika opakujícími se podjednotkami, které jsou vzájemně propojeny do řetězce. Vysoká strukturní variabilita a možnost chemické modifikace jsou základní vlastnosti polymerů, které jsou vyžadovány pro vytvoření vhodného nosiče vyhovující specifickým požadavkům. Takovými vlastnostmi jsou například molární hmotnost polymerního nosiče (popř. velikost klubka, které zaujme polymer ve vodném roztoku), povrchový náboj (zeta-potenciál), či přítomnost reaktivních skupin pro navázání biologicky aktivních látek, jako např. léčiva, směrujících ligandů nebo fluorescenčních či radioaktivních značek pro vizualizaci (Ulbrich and Subr 2010).

Velmi rozšířeným typem polymerů pro dopravu genetické informace jsou kladně nabitě hydrofilní polymery (polykationty), které tvoří se záporně nabitou nukleovou kyselinou tzv. polyelektrolytový komplex (polyplex) (viz **obr. 2-5**). Tyto částice o velikosti 40-200 nm je možné připravit smísením vodných roztoků opačně nabitých makromolekul (Wagner and Kloeckner 2006). Fyzikální stabilitu polyplexů a jejich schopnost transfekovat buňky lze účelově měnit volbou a designem použitého polykationtu. Jelikož stabilní komplexy vznikají při použití molárního nadbytku kladně nabitých skupin polykationtu (zpravidla amino skupin) vůči záporně nabitým skupinám nukleové kyseliny (fosfátové skupiny), je výsledný povrchový náboj (zeta-potenciál) komplexů kladný. Průnik těchto nosičů do buněk je tudíž umožněn nespecifickou interakcí kladně nabitého povrchu polyplexu se záporně nabitou plazmatickou membránou buněk.



**Obr. 2-5:** Schematické znázornění vzniku polyelektrolytového komplexu siRNA připraveného smícháním polykationtu a siRNA (při použití molárního nadbytku kladně nabitých skupin polykationtu vůči záporně nabitým skupinám siRNA). Kladný náboj (+) na polykationtu představuje protonované aminoskupiny a záporný náboj (-) na siRNA představuje deprotonované fosfátové skupiny. Převzato z (Laga, Carlisle et al. 2012).

#### 2.4.2.3.1 Poly-L-lysin (PLL)

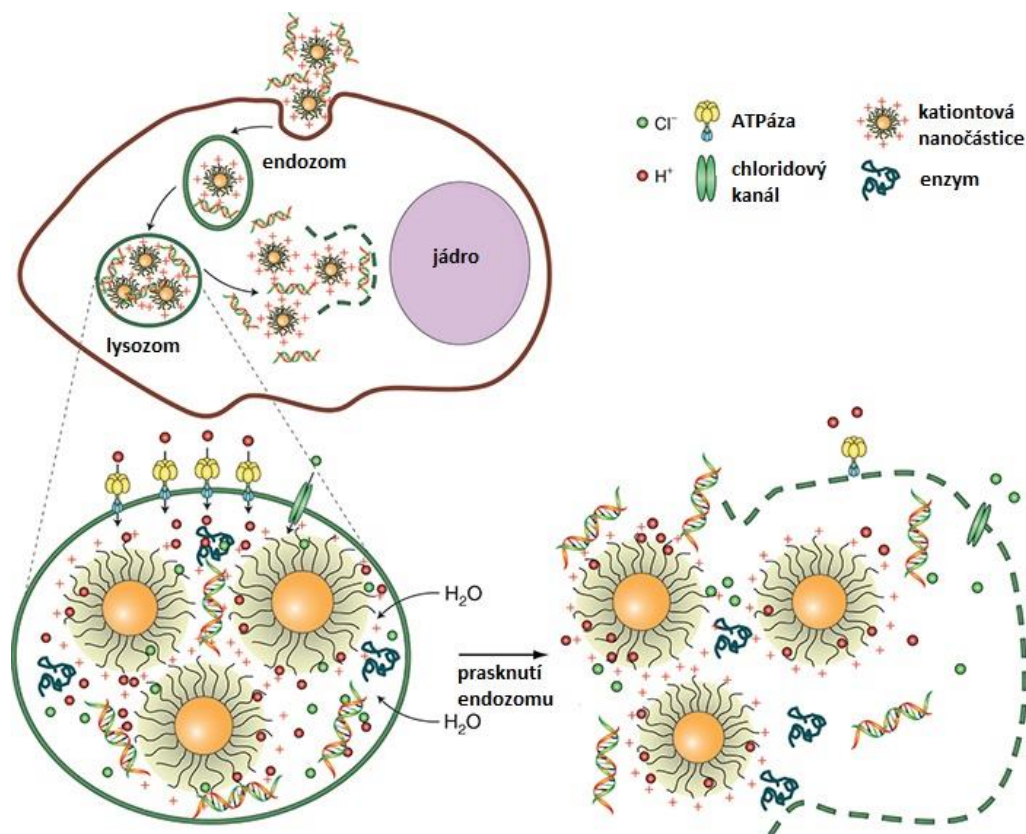
Jedním z prvně testovaných nevirových nosičů nukleových kyselin byl poly(L-lysin) (PLL). PLL je kladně nabitý peptidový řetězec tvořený opakujícími se jednotkami L-lysinu, který nese v postranním řetězci primární aminoskupinu. Bylo zjištěno, že průnik polyplexů na bázi PLL skrze buněčnou membránu je celkem efektivní, avšak únik z endozomů do cytoplazmy představuje závažnou v překážku. Další nevýhodou PLL pro genovou terapii je jeho relativně vysoká cytotoxicita (Symonds, Murray et al. 2005). Částečné snížení cytotoxicity PLL polyplexů se dá provést částečnou modifikací jeho primárních aminoskupin pomocí hydrofilního polymeru, např. polyethylenglykolu (PEG) (Choi, Liu et al. 1998).

#### 2.4.2.3.2 Chitosan

Také některé přírodní polysacharidy mohou být použity pro dopravu siRNA. Příkladem může být kladně nabitý polysacharid poly(D-glukosamin), neboli chitosan, připravený deacetylací chitinu. Nanočástice tvořené komplexem chitosan/siRNA jsou vhodné pro *in vivo* i *in vitro* aplikace, zejména díky biodegradabilitě nosiče, nízké cytotoxicitě i imunogenicitě (Howard, Rahbek et al. 2006).

#### 2.4.2.3.3 Polyethylenimin (PEI)

PEI patří v současné době k nejpoužívanějším polykationtům pro studium dopravy genů a to zejména díky vysoké *in vitro* i *in vivo* transfekční účinnosti jeho polyplexů a to i bez použití pomocných endozomolytických činidel, jako je např. chlorochin, či fuzogenní peptidy (Zou, Erbacher et al. 2000). Tato transfekční účinnost je dána pravděpodobně vysokou pufrovací schopností molekuly PEI, který nese ve své struktuře více typů ionizovatelných skupin (amino skupin) o rozdílné hodnotě  $pK_a$ . Po vstupu polyplexu do endozomu dochází ke spuštění acidifikačního procesu, při kterém jsou přes membránu endozomu „pumpovány“ vodíkové ionty ( $H^+$ ), aby se uchovalo kyselé prostředí uvnitř endozomu, které je důležité pro funkci hydroláz. Zároveň dochází také k infuzi chloridových aniontů ( $Cl^-$ ), které kompenzují kladný náboj. Zvyšující se koncentrace solí uvnitř endozomu je redukována infuzí vody, což vede k tzv. osmotickému botnání. Destabilizovaný endozom poté praskne a komplex je uvolněn do cytoplazmy (Sonawane, Szoka et al. 2003). Tento proces je v literatuře popsán jako **efekt protonové houby** („proton sponge effect“) (Akinc, Thomas et al. 2005) (viz **obr. 2-6**).



**Obr. 2-6:** Mechanismus úniku polyplexu z endozomu po pohlčení buňkou prostřednictvím jevu nazývaného efekt protonové houby („proton sponge effect“). Převzato z (Ding, Jiang et al. 2014).

Nevýhodou PEI je jeho vysoká cytotoxicita, která je způsobena především nescifickými elektrostatickými interakcemi s biologickým prostředím. Kladný povrchový náboj PEI nescificky interaguje se záporně nabitými sérovými proteiny, jako jsou např. IgG nebo albumin za vzniku velkých agregátů, které jsou dobře rozpoznatelné buňkami imunitního systému a následně odstraněny z organismu (Chollet, Favrot et al. 2002).

#### 2.4.2.3.4 Dendrimery

Dendrimery jsou symetrické, radiálně větvené polymery, které jsou tvořené jádrem („core“), ze kterého vycházejí charakteristické dendritické větve. Postranní větve vznikají navázáním další podjednotky na terciární aminoskupinu a počet podjednotek na větvi udává počet generací. Stejně jako PEI mají i dendrimery díky přítomnosti různých typů aminoskupin (primárních, sekundárních a terciárních) vysokou pufovací schopnost, která umožňuje jejich komplexům s siRNA efektivní únik z endozomů (Sonawane, Szoka et al. 2003).

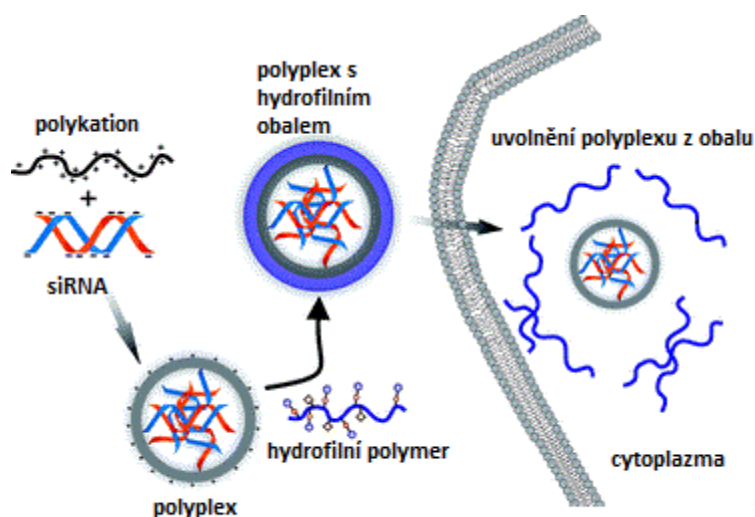
Nejvíce používané jsou polyamidoaminové (PAMAM) dendrimery (struktura viz **obr. 2-7**). Nejlepší výsledky v umlčování genů byly zaznamenány při použití polyplexu PAMAM/siRNA s PAMAM dendrimerem 7. generace. Účinnost umlčení genu pro luciferázu

(GL3Luc), použitím tohoto polyplexu byla okolo 80% u modifikované buněčné linie A549 stabilně exprimující luciferázu GL3Luc (Zhou, Wu et al. 2006).

#### 2.4.2.4 Polykationy s hydrofilní složkou

Abychom omezili nežádoucí účinky kladně nabitého povrchu polyplexu – nespecifické interakce a tvorbu agregátů s komponentami krve, můžeme k tvorbě komplexu použít (blokový nebo roubovaný) polykationt s hydrofilní složkou, která vytvoří kolem polyplexu ochranný obal. Velmi rozšířeným hydrofilním polymerem pro konstrukci takových polykationtů je např. polyethylenglykol (PEG), s výhodou lze také použít multivalentní nebo semitelechelické polymery na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)metakrylamidu (HPMA).

Další možností je připravit nejprve polyplex tvořený siRNA a polykationem (připravený v přebytku polykationtu vůči siRNA) a poté využít volné povrchové amino skupiny komplexu, nepodílející se na tvorbě komplexu s fosfátovými skupinami siRNA, k navázání hydrofilního polymeru. Tento způsob ochrany PEK označujeme jako post-povrchovou modifikaci. Příkladem může být hydrofilní kopolymer na bázi HPMA, který má v postranních řetězcích přes disulfidickou spojku navázané reaktivní karbonylthiazolidin-2-thionové skupiny (TT). TT skupiny ochotně reagují s aminoskupinami na povrchu polyplexu za vzniku hydrofilního obalu. V reduktivním prostředí buňky dojde ke štěpení disulfidické vazby a tím také k uvolnění hydrofilního obalu od polyplexu (Kostka, Konak et al. 2011) (viz **obr. 2-8**).



**Obr. 2-8:** Schéma vzniku polyplexu s intracelulárně odštěpitelným hydrofilním obalem a uvolnění dsRNA v cytoplazmě buňky. Převzato z (Kostka, Konak et al. 2011).

### 3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

#### 1. Příprava polyelektrolytových komplexů polykationtů s siRNA

- Syntéza kladně nabitých polymerů (polykationtů) s různým typem ionizovatelných skupin
- Příprava a fyzikálně-chemická charakterizace polyelektrolytových komplexů vzniklých smísením vodných roztoků polykationtů s siRNA

#### 2. Příprava konjugátů hydrofilních polymerů s siRNA

- Syntéza hydrofilních nenabitých polymerů na bázi HPMA nesoucích reaktivní skupiny podél nebo na na konci polymerního řetězce
- Příprava a fyzikálně-chemická charakterizace konjugátů hydrofilních polymerů s siRNA pospojovaných pomocí stabilních nebo biodegradovatelných kovalentních vazeb

#### 3. Biologické testování připravených polymer-siRNA dopravních systémů

- *In vitro* testování cytotoxicit polyelektrolytových komplexů siRNA a kovalentních polymerních konjugátů siRNA na modelových buněčných liniích
- Vyhodnocení *in vitro* účinností polyelektrolytových komplexů siRNA a kovalentních polymerních konjugátů siRNA z hlediska jejich schopností umlčování GFP genu na modelových buněčných liniích

## 4. MATERIÁLY A METODY

### 4.1 Použité materiály

S výjimkou *N*-(2-aminoethyl)methakrylamidu hydrochloridu (AEMA) a polyethyleniminu (PEI), které byly zakoupeny od firmy Polysciences, Inc (USA), *S*-2-pyridinthiocysteaminu hydrochloridu zakoupeného od firmy Toronto Research Chemicals, Inc (Kanada) a fluorescenční značky s označením DY-676 zakoupené od firmy Dyomics, GmbH (Německo) byla všechna činidla a výchozí látky použité v chemické části této práce zakoupena od firmy Sigma-Aldrich Co (USA).

Pro *in vitro* testování polyplexů a polymerních konjugátů s siRNA byly použity buněčné linie HeLa. Jedná se o nádorové buňky izolované v roce 1951, které pocházejí z děložního hrdla Henrietty Lacksové. Konkrétně byly použity modifikované HeLa buňky nesoucí gen pro zelený fluorescenční protein (GFP), který byl do buněk vložen pomocí lentivirového vektoru. Tyto buňky byly zakoupeny od firmy Cell Biolabs, Inc (USA). Nukleotidové sekvence pro přípravu siRNA, která je určena pro umlčování GFP genu, byly zakoupeny od firmy ChemGenes Co (USA). Bylo použito jedno nemodifikované „antisense“ vlákno (Seq-4) a tři „sense“ vlákna, z nichž jedno vlákno zůstalo nemodifikováno (Seq-1) a u dalších dvou byl 3' konec modifikován buďto primární aminoskupinou (Seq-2) nebo merkaptoskupinou (Seq-3). Níže jsou uvedeny sekvence nukleotidů jednotlivých RNA vláken:

Seq-1: 5'-GCCACAACGUCUAUAUCAUdTdT-3'

Seq-2: 5'-GCCACAACGUCUAUAUCAUdTdT-linker-NH<sub>2</sub>-3'

Seq-3: 5'-GCCACAACGUCUAUAUCAUdTdT-linker-SH-3'

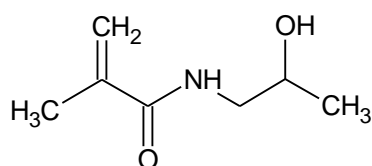
Seq-4: 5'-AUGAUAUAGACGUUGUGGCdTdT-3'

## 4.2 Syntetické postupy

### 4.2.1 Příprava monomerů, iniciátoru a přenosového činidla

#### *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamid (HPMA)

HPMA byl připraven podle (Ulbrich, Subr et al. 2000) acylací DL-1-aminopropan-2-olu methakryloyl-chloridem v dichlormethanu (DCM) (struktura viz **obr. 4-1**). Stručně: K roztoku DL-1-aminopropan-2-olu (75 g, 1,0 mol) ve 260 ml dichlormethanu byl přidán jemně rozetřený Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (105 g, 1,0 mol), suspenze byla vychlazena na 4 °C a za intenzivního míchání byl po kapkách přidáván roztok methakryloyl-chloridu (105 g, 1,0 mol) ve 230 ml dichlormethanu. Po přidání celého objemu byly nerozpustné anorganické soli odfiltrovány a promyty 300 ml dichlormethanu. Spojené filtráty byly vysušeny bezvodým MgSO<sub>4</sub> a zahuštěny na rotační vakuové odparce. Produkt byl získán krystalizací z dichlormethanu a následnou rekrystalizací z acetonu (při -18 °C). Bylo získáno 120 g (83,8 %) produktu ve formě bílých krystalů. Čistota produktu stanovená pomocí HPLC byla > 98 %, struktura produktu byla ověřena pomocí <sup>1</sup>H-NMR.



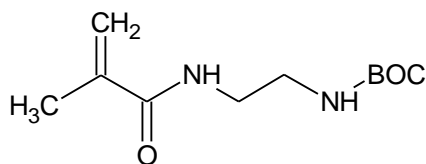
**Obr. 4-1:** Struktura monomeru HPMA

#### *N*-[2-(*tert*-Butyloxykarbonyl)aminoethyl]methakrylamid (AEMA-BOC)

Syntéza AEMA-BOC (struktura viz **obr. 4-2**) byla provedena dle postupu uvedeného v práci (Retschel, 2002). Stručně: K roztoku *tert*-butyl (2-aminoethyl)karbamátu (BOC-EDA, 1,0 g, 6,2 mmol) a triethylaminu (2,5 ml, 18,0 mmol) v 10 ml chloroformu byl za míchání a neustálého chlazení (4 °C) po kapkách přidán roztok methakryloyl-chloridu (0,639 ml, 6,6 mmol) v 5 ml chloroformu. Reakční směs byla poté pozvolna vytemperována na laboratorní teplotu a vzniklý triethylamin hydrochlorid byl odstraněn extrakcí (3 x 25 mL) s destilovanou vodou. Organická fáze byla vysušena bezvodým MgSO<sub>4</sub>, rozpouštědlo bylo odpařeno a produkt byl získán krystalizací ze směsi diethylether : hexan (3:5) a následnou rekrystalizací ze směsi chloroform : diethylether : hexan (1:55:55). Bylo izolováno 2,52 g (61,3 %)



produktu ve formě bílých krystalů. Čistota produktu stanovená pomocí HPLC byla > 98 %, struktura produktu byla ověřena pomocí <sup>1</sup>H-NMR.

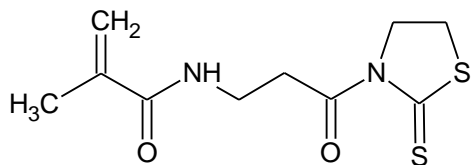


**Obr. 4-2:** Struktura monomeru AEMA-BOC

### ***3-(3-Methakryloylamidopropanoyl)thiazolidin-2-thion (Ma-β-Ala-TT)***

Syntéza monomeru Ma-β-Ala-TT byla provedena ve dvou krocích (struktura viz **obr. 4-3**). Stručně: K roztoku β-Alaninu (12,47 g, 134 mmol) v 50 ml H<sub>2</sub>O bylo přidáno 60 ml 1,5 M roztoku NaOH a směs byla vychlazena na 0 °C. K vychlazené směsi byly za stálého míchání současně přikapávány vodný roztok NaOH (1,5 M, 95 ml) a roztok methakryloyl-chloridu (14,0 g, 134 mmol) ve 40 ml dichlormethanu (DCM). Poté byla směs ohřáta na laboratorní teplotu, při které byla míchána po dobu 1 h. Organická fáze byla odstraněna, vodná fáze byla okyselená roztokem HCl na pH ≈ 2 a produkt byl extrahován do 100 ml ethylacetátu. Organická fáze byla vysušena bezvodým MgSO<sub>4</sub>, rozpouštědlo bylo částečně odpařeno a meziproduct Ma-β-Ala-COOH byl získán krystalizací ze směsi ether : ethylacetát. Bylo získáno 13,6 g produktu ve formě bílých krystalů, jehož čistota stanovená pomocí HPLC byla > 95 %.

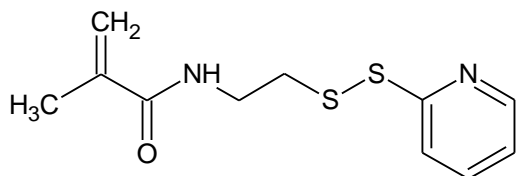
Ve druhém kroku byl ke směsi izolovaného meziproductu Ma-β-Ala-COOH (5,0 g, 32 mmol) a *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid hydrochloridu (EDC) (9,2 g, 48 mmol) rozpuštěné ve 127,8 ml DCM přidán roztok 2-thiazolidin-2-thionu (TT) (5,72 g, 48 mmol) v 51,48 ml DCM a reakční směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Reakční směs byla poté promyta 5 % roztokem KHSO<sub>4</sub> (3 x 200 mL) a organická fáze s produktem byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Rozpouštědlo bylo částečně odpařeno a finální produkt Ma-β-Ala-TT byl získán krystalizací ze směsi DCM : diethylether a následnou rekrystalizací ze směsi ethylacetát : ether. Bylo získáno 3,0g produktu ve formě žlutých krystalů. Čistota produktu stanovená pomocí HPLC byla > 98 %, struktura produktu byla ověřena pomocí <sup>1</sup>H-NMR.



**Obr. 4-3:** Struktura monomeru Ma-β-Ala-TT

#### *N*-[2-(pyridin-2-yl)disulfanyl]aminoethyl]methakrylamid (*Ma-AE-PDS*)

Příprava monomeru Ma-AE-PDS (struktura viz **obr. 4-4**). Stručně: Směs methakrylové kys. (138,6 mg, 1,61 mmol) a EDC (463,0 mg, 2,415 mmol) byla rozpuštěna v 5,4 ml DCM a přidána ke směsi *S*-2-pyridylthiocysteamin hydrochloridu (AE-PDS) (300 mg, 1,37 mmol) a *N,N*-diisopropylethylaminu (EDIPA) (261,1 mg, 2,02 mmol) v 5 ml DCM. K reakční směsi bylo poté přidáno katalytické množství 4-(dimethylamino)pyridinu (DMAP) a roztok byl míchán přes noc při laboratorní teplotě. Reakční směs byla poté promyta 2x 10 ml PBS a 1x 10 ml destilované H<sub>2</sub>O. Organický podíl s produktem byl zbaven vody inkubací s bezvodým MgSO<sub>4</sub>, rozpouštědlo bylo odpařeno a produkt byl chromatograficky přečištěn na silikagelové koloně s použitím mobilní fáze ethylacetát : hexan (3 : 1 → 1 : 1). Po odpaření rozpouštědla bylo získáno 231,7 mg produktu ve formě světle žluté amorfni látky. Čistota produktu stanovená pomocí HPLC byla > 98 %, struktura produktu byla ověřena pomocí <sup>1</sup>H-NMR.

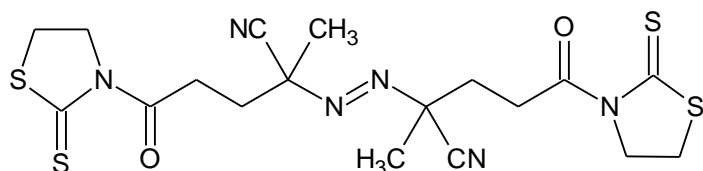


**Obr. 4-4:** Struktura monomeru Ma-AE-PDS

#### *Bis*(thiazolidin-2-thion) 4,4'-azobis(kyanovalerové kyseliny) (*ABIK-TT*)

*Bis*(thiazolidin-2-thion) 4,4'-azobis(kyanovalerové kyseliny) (*ABIK-TT*) (struktura viz **obr. 4-5**) byl připraven reakcí thiazolidin-2-thionu (TT) s 4,4'-azobis(kyanovalerovou kyselinou) (*ABIK*) v přítomnosti *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) v prostředí THF podle (Subr, Konak et al. 2006). Stručně: *ABIK* (2,0 g 0,007 mol), TT (1,87 g, 0,016 mol) a katalytické množství 4-(dimethylamino)pyridinu (DMAP) byly rozpuštěny ve 20 ml THF. DCC (3,88 g, 0,019 mol) byl rozpuštěn v 5,0 mL THF. Oba roztoky byly vychlazeny na -18 °C, smíchány a reakční směs byla udržována 1 h při -18 °C a poté 24 h při 4 °C. K reakční směsi bylo přidáno

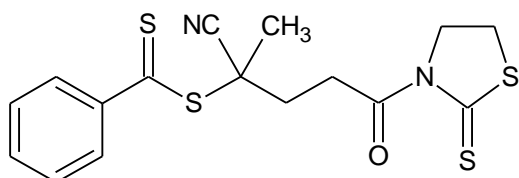
0,1 ml koncentrované kyseliny octové a směs ponechána reagovat 1 h při laboratorní teplotě. Vyloučená *N,N'*-dicyklohexylmočovina (DCU) byla odfiltrována a rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku. Olejovitý zbytek byl rozpuštěn v malém množství dichlormethanu a výsledný produkt byl získán krystalizací (při -18 °C) ze směsi dichlormethan : diethylether. Výtěžek ABIK-TT byl 3,0 g (87 %). Čistota produktu stanovená pomocí HPLC byla > 98 %, struktura produktu byla ověřena pomocí <sup>1</sup>H-NMR.



**Obr. 4-5:** Struktura iniciátoru ABIK-TT

#### ***1-Kyano-1-methyl-4-oxo-(2-thioxothiazolidin-3-yl)butyl ester dithiobenzoové kys. (CTA-TT)***

Přenosové činidlo CTA-TT (struktura viz **obr. 4-6**) bylo syntetizováno podle (Subr, Kostka et al. 2013). Roztok iniciátoru ABIK-TT (0,95 g, 1,96 mmol) a bis(thiobenzoyl) disulfidu (0,5 g, 1,63 mmol) v ethylacetátu (250 ml) byl míchán při 80°C po dobu 6 hod. Po ochlazení roztoku na laboratorní teplotu byla reakční směs zahuštěna a přečištěna na silikagelové koloně s mobilní fází ethylacetát : hexan (1 : 1). Bylo získáno 0,44 g (56%) produktu, jehož čistota stanovená pomocí HPLC byla > 98 %, struktura produktu byla ověřena pomocí <sup>1</sup>H-NMR.



**Obr. 4-6:** Struktura přenosového činidla CTA-TT.

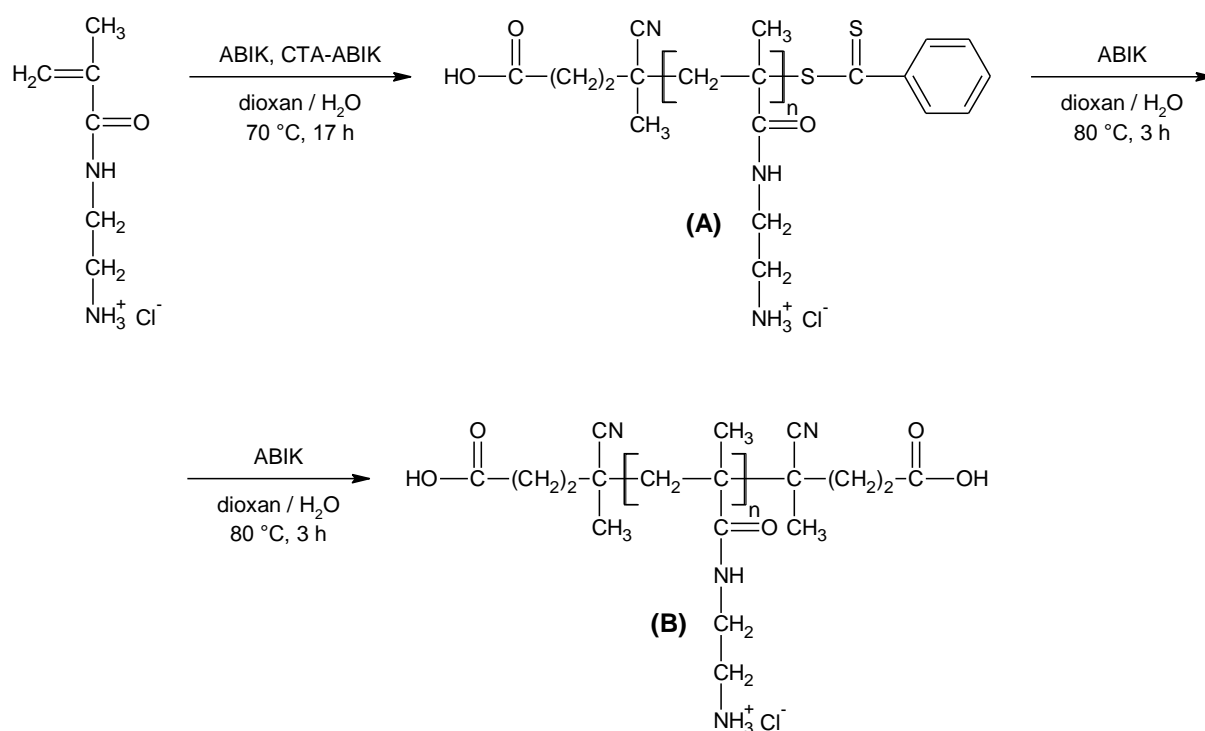
## **4.2.2 Příprava polykationtů**

### ***Příprava homopolymeru poly[N-(2-aminoethyl)metakrylamidu] p(AEMA) (PK1)***

Homopolymer p(AEMA) (**PK1**) nesoucí v postranním řetězci kladně nabitě primární aminoskupiny byl připraven řízenou radikálovou polymerací („Reversible addition–fragmentation chain-transfer, RAFT) (viz kapitola 4.4.1) s pomocí 4-kyano-4-(thiobenzoylthio)pentanové kyseliny (CTA-ABIK), jako přenosového RAFT činidla a 4,4'-

azobis(kyanovalerové kyseliny) (ABIK) jako iniciátoru (viz **obr. 4-7**). Stručně: Směs CTA-ABIK (4,66 mg, 16,5  $\mu\text{mol}$ ) a ABIK (2,34 mg, 8,34  $\mu\text{mol}$ ) byla rozpuštěna v 1,15 ml dioxanu a smíchána s roztokem *N*-(2-aminoethyl)methakrylamidu hydrochloridu ( $\text{AEMA}^+\text{Cl}^-$ ) (500 mg, 3,04 mmol) rozpuštěného v 575  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Polymerační směs byla inkubována při teplotě 70°C po dobu 17 hod. Připravený polymer byl z reakční směsi izolován srážením do acetonu. Bylo získáno 552 mg polymeru.

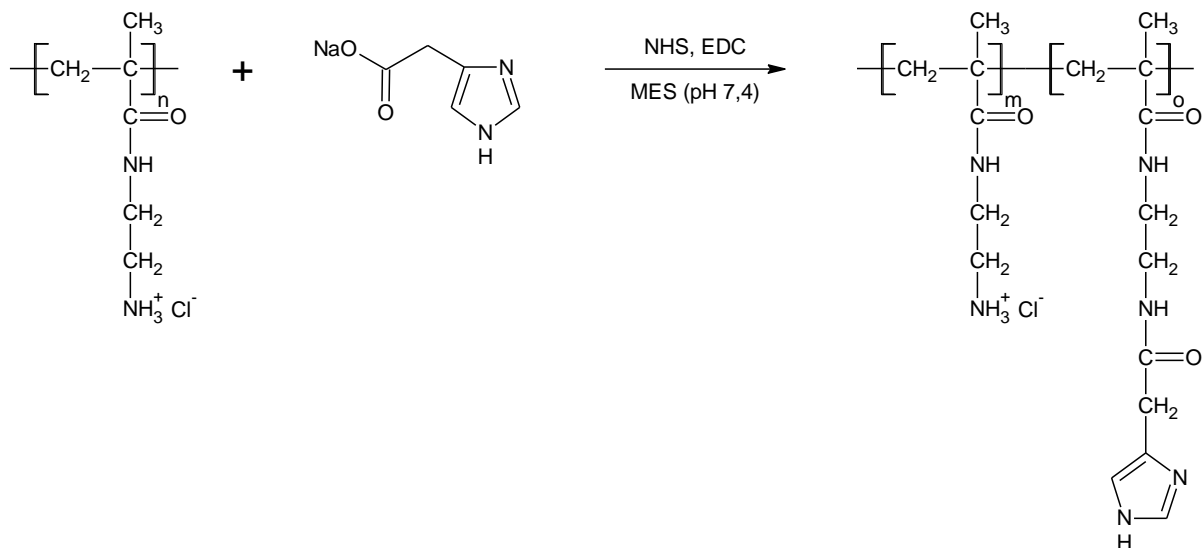
Následně byly odstraněny z polymeru koncové dithiobenzoátové skupiny (DTB), a to reakcí polymeru (350 mg, 11,67  $\mu\text{mol}$  DTB) rozpuštěného v 1,2 ml  $\text{H}_2\text{O}$  s azoiniciátorem (ABIK) (98,1 mg, 350,1  $\mu\text{mol}$ ) rozpuštěným v 2,3 ml dioxanu. Reakce byla provedena při 80 °C po dobu 3 h. Polymer byl zbaven nízkomolekulárních příměsí dialýzou (membrány zakoupeny od Spectrum Laboratories, Inc., USA, MWCO = 3,5 kDa) (viz kapitola 4.4.6) proti  $\text{H}_2\text{O}$  (3 dny) a výsledný polymer byl z vodného roztoku získán lyofilizací. Bylo získáno 65,0 mg polymeru **PK1**, který byl následně charakterizován pomocí rozměrově eluční chromatografie (SEC) (viz kapitola 4.4.2).



**Obr. 4-7:** Schéma přípravy polykationtu p(AEMA) (**PK1**): (A) RAFT polymerace AEMA následovaná (B) zablokováním koncových DTB skupin polymeru.

**Příprava statistického kopolymeru  $p[(AEMA)\text{-}co\text{-}(AEMA\text{-}Im)](PK2)$  a homopolymeru  $p(AEMA\text{-}Im)$  (PK3)**

Polymer-analogickou modifikací primárních aminoskupin polymeru **PK1** sodnou solí imidazol-4-octové kyseliny podle (Putnam, Gentry et al. 2001) byly připraveny další dva polymery (**PK2** a **PK3**) lišící se obsahem imidazolových skupin (Im) v postranních řetězcích polymeru. V případě polymeru **PK2** bylo modifikováno přibližně 50%  $NH_2$  skupin na Im a v případě polymeru **PK3** bylo modifikováno všech 100%  $NH_2$  skupin na Im (viz **obr. 4-8**). Směs polymeru **PK1** (20 mg, 156  $\mu\text{mol}$   $NH_2$  skupin) a sodné soli imidazol-4-octové kyseliny (11,6 mg, 78  $\mu\text{mol}$  u **PK2**) (46,21 mg, 312  $\mu\text{mol}$  u **PK3**) ve 400  $\mu\text{l}$  morfolinoethan-sulfonové kys. monohydrátovém pufru (MES pufr) (25 mM, pH 7,4) byla přidána k roztoku *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid hydrochloridu (EDC) (29,9 mg, 156  $\mu\text{mol}$  u **PK2**) (119,6 mg, 624  $\mu\text{mol}$  u **PK3**) a *N*-hydroxysukcinimidu (NHS) (17,95 mg, 156  $\mu\text{mol}$  u **PK2**) (71,8 mg, 624  $\mu\text{mol}$  u **PK3**) ve 200  $\mu\text{l}$  MES pufru. Reakční směs byla míchána 24 h při laboratorní teplotě. Oba modifikované polymery byly následně zbaveny nízkomolekulárních příměsí dialýzou proti  $H_2O$  (48 h). Modifikované polymery **PK2** a **PK3** byly z vodného roztoku získány lyofilizací. Výtěžek: 16,3 mg **PK2** a 12,6 mg **PK3**. Obsah primárních aminoskupin a imidazolů byl stanoven pomocí reakce s 2,4,6-trinitrobenzensulfonovou kyselinou (TNBSA) (viz kapitola 4.4.3), molární hmotnosti byly stanoveny pomocí SEC (viz kapitola 4.4.2).



**Obr. 4-8:** Schéma polymer-analogické modifikace primárních aminoskupin polykationtu **PK1** sodnou solí imidazol-4-octové kyseliny.

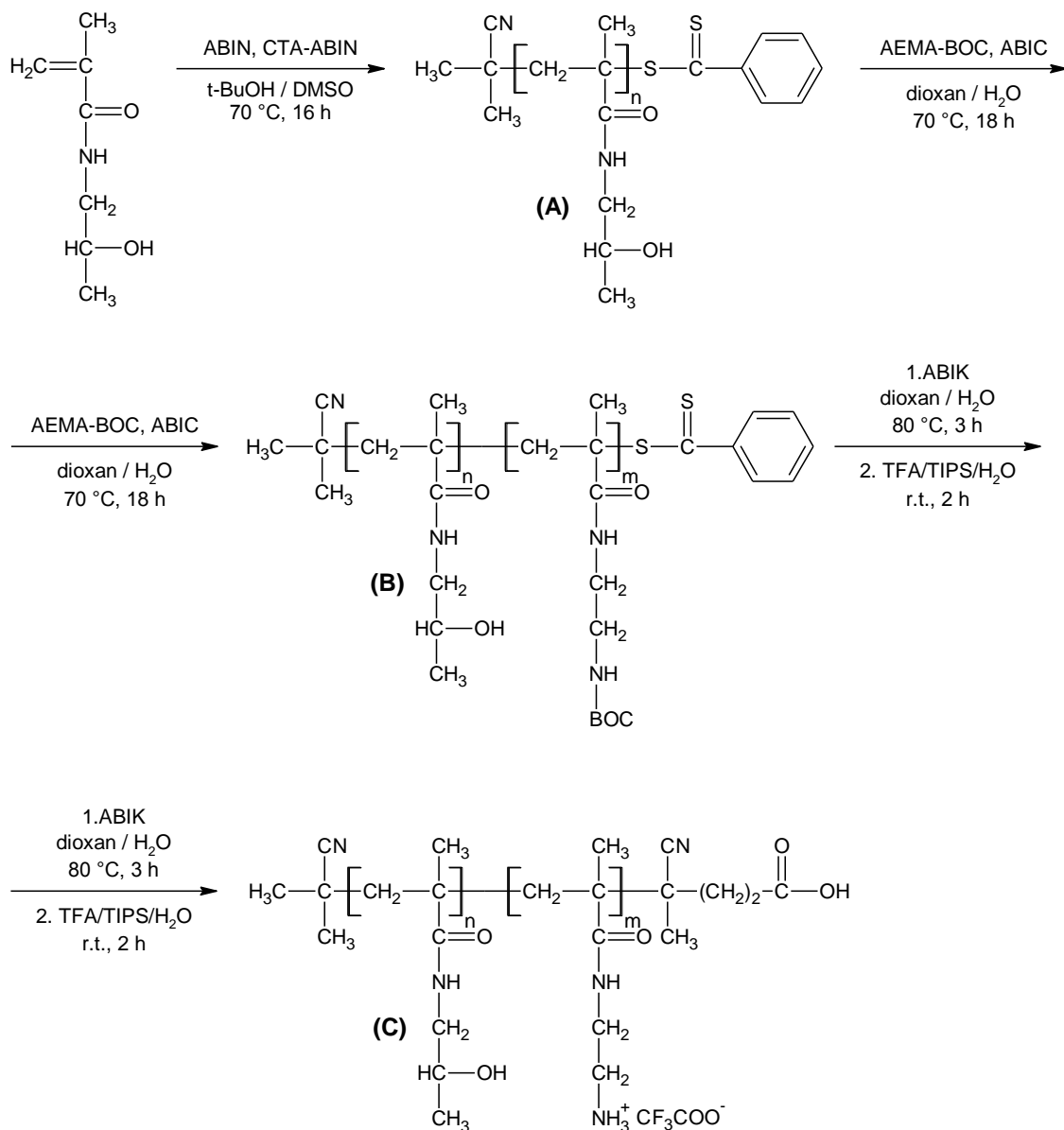
#### ***Příprava diblokového kopolymeru p[(HPMA)-b-(AEMA)] (PK4)***

Příprava p[(HPMA)-b-(AEMA)] byla provedena ve dvou krocích (viz **obr. 4-9**). Nejprve byl připraven RAFT polymerací homopolymer p(HPMA). Jako iniciátor polymerace byl použit 2,2'-azobis(isobutyronitril) (ABIN) a jako RAFT činidlo byl použit 2-kyano-2-propyl benzodithioát (CTA-ABIN). Roztok HPMA (1,0 g, 6,98 mmol) v 6,984 ml terc-butanolu byl přidán ke směsi CTA-ABIN (6,18 mg, 27,92  $\mu\text{mol}$ ) a ABIN (2,29 mg, 14,0  $\mu\text{mol}$ ) rozpuštěné v 776  $\mu\text{l}$  DMSO. Reakční směs byla důkladně probublána argonem a polymerována v zatavených ampulích 16 h při teplotě 70°C. Polymer byl získán srážením do směsi aceton : diethylether (3 : 1). Bylo získáno 982 mg p(HPMA) polymeru, který byl následně charakterizován pomocí rozměrově eluční chromatografie (SEC) (viz kapitola 4.4.2). Obsah koncových DTB skupin, stanovený pomocí UV/Vis spektrofotometrie, byl 30,2  $\mu\text{mol/g}$ .

Ve druhém kroku byl na hydrofilní p(HPMA) řetězec navázán druhý kladně nabitý blok p(AEMA-BOC) za využití RAFT mechanismu. Jako iniciátor polymerace byl použit ABIK a p(HPMA) polymer terminovaný DTB skupinou byl využit jako makro-přenosové činidlo. Směs AEMA-BOC (271,53 mg, 1,18 mmol) a ABIK (0,17 mg, 605 nmol) byla rozpuštěna v 1,629 ml dioxanu a přidána k roztoku p(HPMA) polymeru (100 mg, 3,02  $\mu\text{mol}$  DTB skupin) rozpuštěného v 815  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O. Po důkladném probublání argonem byla reakční směs polymerována v zatavených ampulích 18 h při teplotě 70°C. Po proběhnutí polymerace byl diblokový polymer získán srážením do diethyletheru a následným přesrážením z methanolu do diethyletheru. Bylo získáno 219,1 mg polymeru, který byl následně charakterizován pomocí rozměrově eluční chromatografie (SEC) (viz kapitola 4.4.2).

Koncové dithiobenzoátové skupiny (DTB) byly odstraněny reakcí diblokového polymeru (219,1 mg, 3,36  $\mu\text{mol}$  DTB) s iniciátorem (ABIK) (28,2 mg, 100,7  $\mu\text{mol}$ ) provedené ve směsném rozpouštědle dioxan : voda (2 : 1), při 80°C po dobu 3 h. Polymer byl izolován z roztoku srážením do diethyl etheru.

Chránící *terc*-buthyloxykarbonylové (BOC) skupiny v postranních řetězcích polykationtového bloku diblokového kopolymeru byly odstraněny inkubací polymeru (cca 2 h) ve 2 ml směsi trifluoroctová kys. (TFA) : triisopropylsilan (TIPS) : H<sub>2</sub>O (95:2,5:2,5). Polymer s volnými aminoskupinami byl získán vysrážením reakční směsi do diethyletheru a přečištěn přesrážením z methanolu do směsi aceton/diethyl ether. Bylo získáno 201,0 mg polymeru **PK4** ve formě bílého prášku. Obsah primárních aminoskupin polymeru byl stanoven pomocí reakce s TNBSA (viz kapitola 4.4.3), molární hmotnosti byly stanoveny pomocí SEC (viz kapitola 4.4.2).

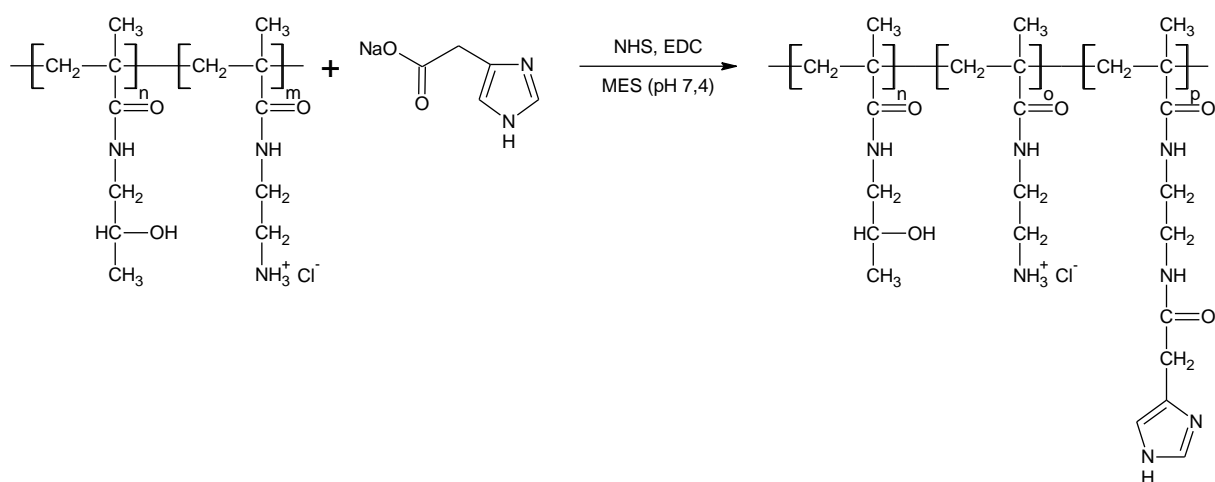


**Obr. 4-9:** Schéma syntézy diblokového kopolymery  $p[(\text{HPMA})\text{-}b\text{-(AEMA)}]$  (PK4): (A) příprava hydrofilního  $p(\text{HPMA})$  bloku RAFT polymerací následovaná (B) zabudováním kladně nabitého  $p(\text{AEMA})$  bloku a (C) odstraněním koncových DTB skupin a BOC chránících skupin v postranních řetězcích polymeru.

**Příprava diblokových kopolymerů  $p[(\text{HPMA})\text{-}b\text{-(AEMA-co-AEMA-Im)}]$  (PK5) a  $p[(\text{HPMA})\text{-}b\text{-(AEMA-Im)}]$  (PK6)**

Z výchozího diblokového kopolymery  $p[(\text{HPMA})\text{-}b\text{-(AEMA)}]$  (PK4) byly připraveny další dva kopolymery, a to polymer-analogickou modifikací jeho postranních primárních aminoskupin sodnou solí imidazol-4-octovou kyselinou (viz **obr. 4-10**). Modifikované kopolymery se lišily obsahem zavedených imidazolových skupin (Im); polymer nesoucí

přibližně 50 % Im je označen jako **PK5** a polymer nesoucí 100 % Im je označen jako **PK6**. Roztok diblokového kopolymeru p[(HPMA)-*b*-(AEMA)] (**PK4**) (43,2 mg, 156 μmol NH<sub>3</sub><sup>+</sup> skupin) a sodné soli imidazol-4-octové kyseliny (11,6 mg, 78 μmol v případě **PK5** a 46,21 mg, 312 μmol v případě **PK6**) ve 400 μl MES pufru (25 mM, pH 7.4) byl přidán k roztoku *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDC) (29,9 mg, 156 μmol v případě **PK5** a 119,6 mg, 624 μmol v případě **PK6**) a *N*-hydroxysukcinimidu (NHS) (17,95 mg, 156 μmol v případě **PK5** a 71,8 mg, 624 μmol v případě **PK6**) ve 200 μl MES pufru. Reakční směs byla míchána 24 h při laboratorní teplotě a oba modifikované polymery byly následně zbaveny nízkomolekulárních látek dialýzou proti H<sub>2</sub>O (48 h). Modifikované polymery byly z vodného roztoku získány lyofilizací. Bylo získáno 24,4 mg polymeru **PK5** a 49,3 mg polymeru **PK6**. Obsah primárních aminoskupin v postranních řetězcích polykationtových bloků kopolymerů **PK5** a **PK6** byl stanoven pomocí reakce s TNBSA (viz kapitola 4.4.3), molární hmotnosti byly stanoveny metodou SEC (viz kapitola 4.4.2).



**Obr. 4-10:** Schéma polymer-analogické modifikace primárních aminoskupin v postranních řetězcích diblokového kopolymeru p[(HPMA)-*b*-(AEMA)] (**PK4**) sodnou solí imidazol-4-octové kyseliny.

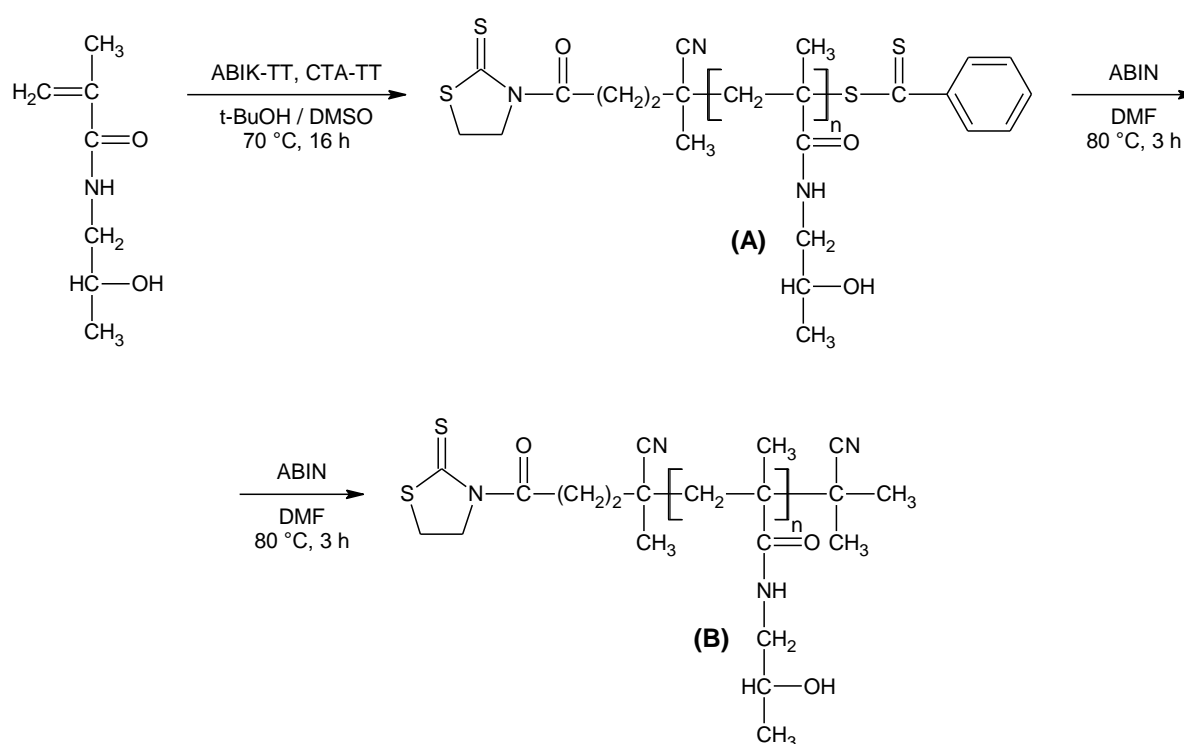
## 4.2.3 Příprava reaktivních hydrofilních polymerů

### *Příprava semitelehelického homopolymeru p(HPMA)-TT (HP1)*

Polymer p(HPMA)-TT byl připraven RAFT polymerací HPMA monomeru v přítomnosti iniciátoru ABIK-TT a přenosového činidla CTA-TT (viz **obr. 4-11**). Směs CTA-TT (3,8 mg, 9,98 μmol) a ABIK-TT (2,41 mg, 4,99 μmol) byla rozpuštěna ve 388 μl DMSO a přidána k roztoku HPMA (500 mg, 3,5 mmol) v 3,5 ml *tert*-butanolu. Polymerační směs byla



inkubována při teplotě 70°C po dobu 16 h. Polymer byl získán srážením do směsi aceton/diethyl ether (3:1) a přečištěn přesrážením z methanolu do acetonu. Koncové dithiobenzoátové skupiny (DTB) byly odstraněny reakcí polymeru (268,0 mg, 10,98 μmol DTB skupin) s iniciátorem (ABIN) (54,1 mg, 329,4 μmol) provedené v 2,7 ml dimethylformamidu (DMF) při 80°C po dobu 3 h. Polymer byl z reakční směsi izolován vysrážením do směsi aceton/ diethyl ether (3 : 1) a přečištěn následným přesrážením z methanolu do acetonu. Bylo získáno 228,0 mg polymeru ve formě světle žlutého prášku, který byl následně charakterizován pomocí rozměrově eluční chromatografie (SEC) (viz kapitola 4.4.2). Obsah koncových TT skupin byl stanoven spektrofotometricky (viz kapitola 4.4.4).

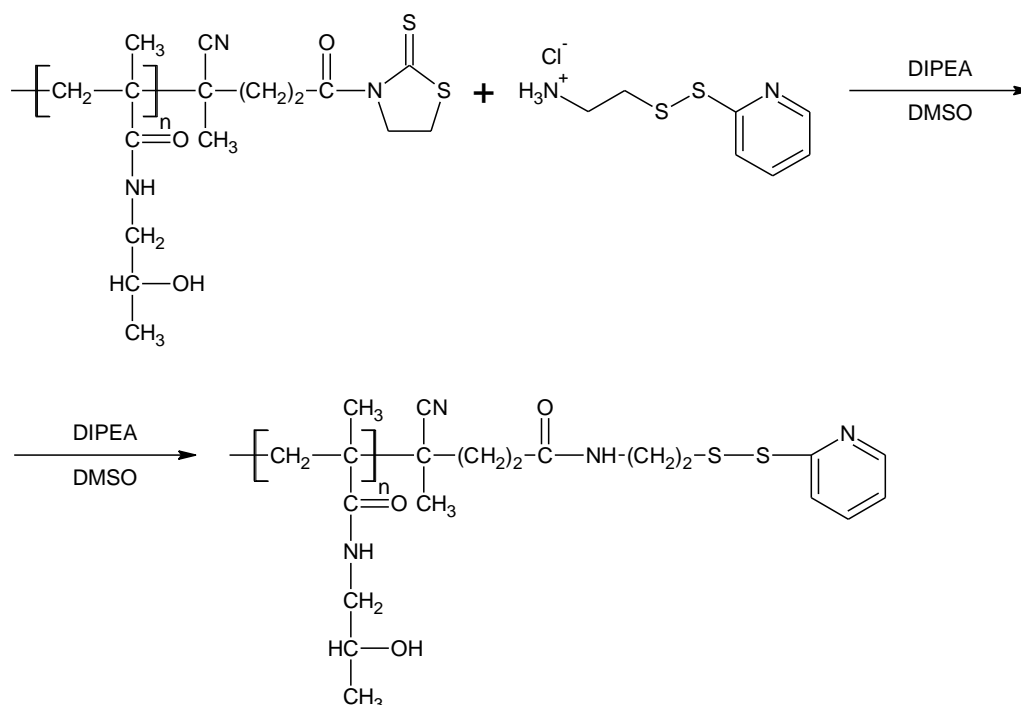


**Obr. 4-11:** Schéma přípravy semitelechelického polymeru p(HPMA)-TT (**HP1**): (A) RAFT polymerace HPMA následovaná (B) zablokováním koncových DTB skupin polymeru.

### ***Příprava semitelechelického homopolymeru p(HPMA)-PDS (HP2)***

Příprava polymeru p(HPMA)-PDS vycházela z p(HPMA)-TT (**HP1**) prekurzoru (viz výše), který byl modifikován polymer-analogickou reakcí jeho koncových thiazolidin-2-thionových (TT) skupin s *S*-2-pyridylthiocysteamin hydrochloridem (AE-PDS) v přítomnosti *N,N'*-

diisopropylethylaminu (DIPEA) (viz **obr. 4-12**). Stručně: Směs AE-PDS (1,83 mg, 8,2  $\mu\text{mol}$ ) a DIPEA (2,12 mg, 16,4  $\mu\text{mol}$ ) byla rozpuštěna v 16,5  $\mu\text{l}$  DMSO, ponechána reagovat cca 10 min a poté byla přidána k roztoku p(HPMA)-TT polymeru (**HP1**) (100 mg, 4,1  $\mu\text{mol}$  TT) rozpuštěném v 900  $\mu\text{l}$  DMSO. Reakční směs byla ponechána reagovat 3 h při laboratorní teplotě. Modifikovaný polymer byl získán srážením do směsi aceton : ether (3 : 1), poté byl rozpuštěn v methanolu a přečištěn na GPC koloně s náplní Sephadex LH-20 (GE Healthcare Life Sciences, USA) při použití methanolu jako mobilní faze. Přečištěný polymer byl získán vysrážením methanolového roztoku do diethyl etheru. Bylo získáno 63,0 mg polymeru ve formě bílého prášku, jehož obsah PDS skupin byl stanoven spektrofotometricky po reakci s DL-dithiotreitolem (DTT) (viz kapitola 4.4.5). Molární hmotnosti polymeru byly stanoveny metodou SEC (viz kapitola 4.4.2).



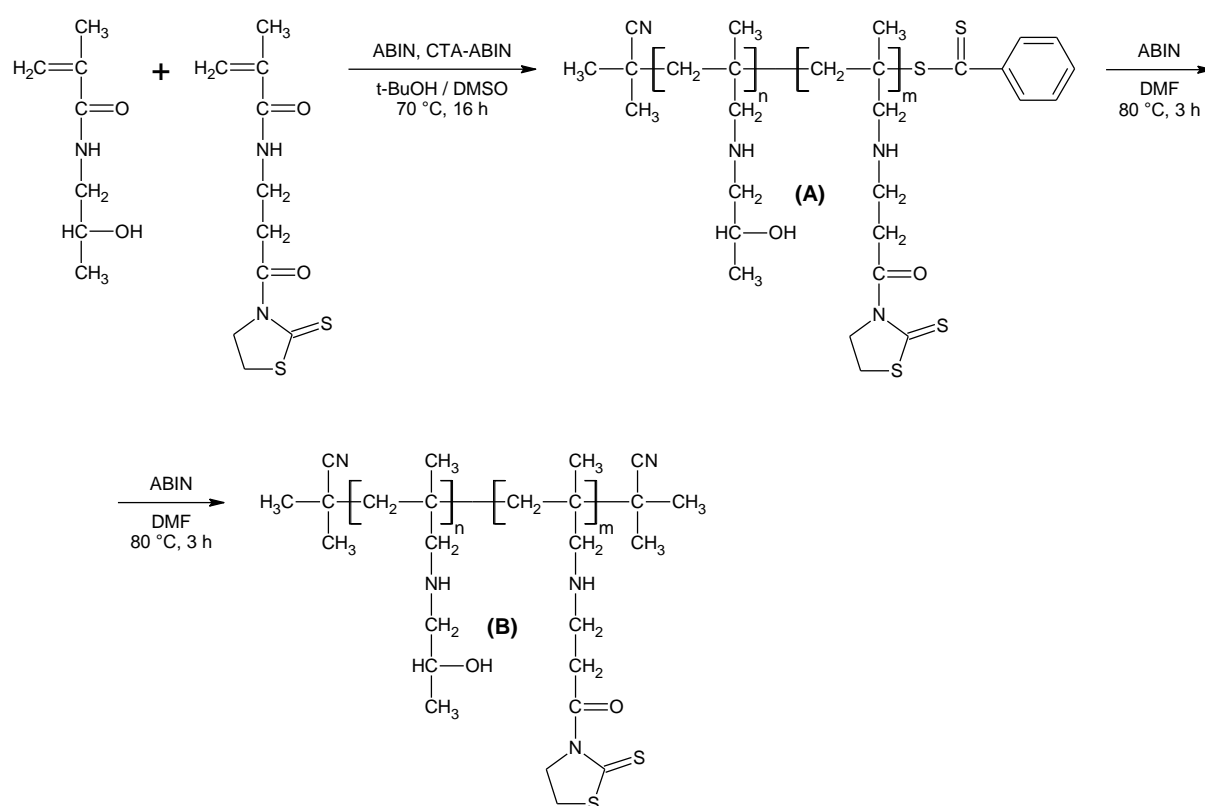
**Obr. 4-12:** Schéma polymer-analogické modifikace koncových TT skupin polymeru p(HPMA)-TT (**HP1**) pyridylthiocysteaminem hydrochloridem.

### ***Příprava multivalentního statistického kopolymery p[(HPMA)-co-(Ma-β-Ala-TT)] (HP3)***

Kopolymer p[(HPMA)-co-(Ma-β-Ala-TT)] nesoucí v postranním řetězci reaktivní TT skupiny byl připraven RAFT polymerací monomerů HPMA a Ma-β-Ala-TT v přítomnosti iniciátoru ABIN a přenosového činidla CTA-ABIN (viz **obr. 4-13**). Směs CTA-ABIN (3,62 mg, 16,34  $\mu\text{mol}$ ) a ABIN (1,34 mg, 8,17  $\mu\text{mol}$ ) byla rozpuštěna v 816,8  $\mu\text{l}$  DMSO a přidána ke směsi

HPMA (500 mg, 3,5 mmol) a Ma-β-Ala-TT (47 mg, 184 μmol) rozpuštěné v 3,267 ml *tert*-butanolu. Polymerační směs byla inkubována 16 h při teplotě 70°C. Polymer byl získán srážením do směsi aceton/diethyl ether (3:1) a přečištěn přesrážením z methanolu do acetonu.

Zablokování DTB skupin bylo provedeno reakcí polymeru (406,0 mg, 21 μmol DTB skupin) s iniciátorem (ABIN) (103,4 mg, 629,5 μmol) rozpuštěných v 4,1 ml dimethylformamidu (DMF) při 80°C po dobu 3 h. Polymer byl z reakční směsi izolován vysrážením do směsi aceton/diethylether (3 : 1) a přečištěn následným přesrážením z methanolu do acetonu. Bylo získáno 368,0 mg polymeru ve formě žlutého prášku, který byl následně charakterizován pomocí rozměrově eluční chromatografie (SEC) (viz kapitola 4.4.2). Obsah TT skupin v postranních řetězcích kopolymeru byl stanoven spektrofotometricky (viz. kapitola 4.4.4).

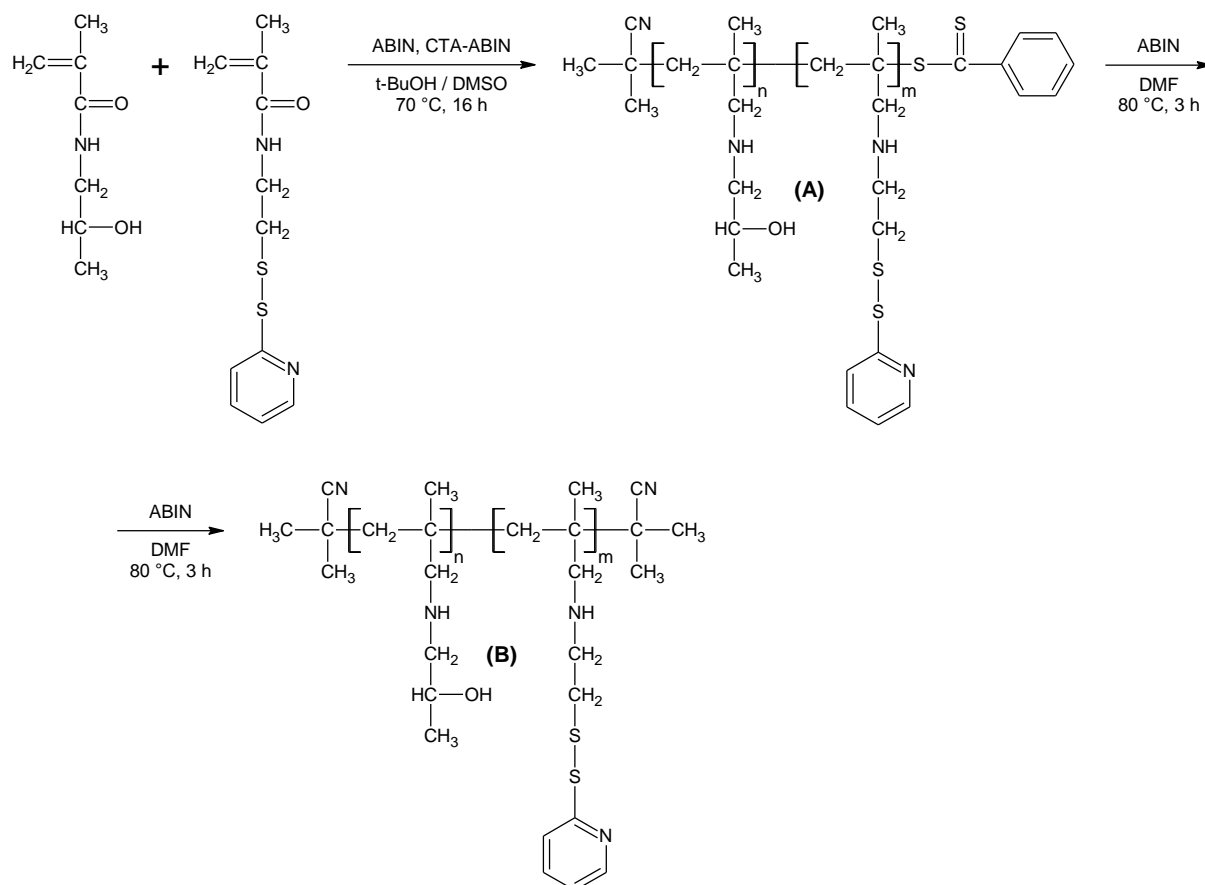


Obr. 4-13: Schéma přípravy multivalentního polymeru p[(HPMA)-*co*-(Ma-β-Ala-TT)] (HP3): (A) RAFT polymerace HPMA a Ma-β-Ala-TT následovaná (B) zablokováním koncových DTB skupin polymeru.

#### **Příprava multivalentního kopolymeru p[(HPMA)-*co*-(Ma-AE-PDS)] (HP4)**

Polymer p[(HPMA)-*co*-(Ma-AE-PDS)] byl připraven RAFT polymerací monomerů HPMA a Ma-AE-PDS v přítomnosti ABIN coby iniciátoru a CTA-ABIN coby přenosového činidla (viz

**obr. 4-14).** Směs CTA-ABIN (1,41 mg, 6,38  $\mu\text{mol}$ ), ABIN (0,52 mg, 3,19  $\mu\text{mol}$ ) a Ma-AE-PDS (24,4 mg, 92  $\mu\text{mol}$ ) byla rozpuštěna ve 409,2  $\mu\text{l}$  DMSO a přidána k roztoku HPMA (250,0 mg, 1,75 mmol) rozpuštěného v 1,842 ml terc-buthanolu. Polymerační směs byla inkubována 16 h při teplotě 70°C. Polymer byl získán srážením do směsi aceton/diethylether (3 : 1). Bylo získáno 166,6 mg polymeru, který byl následně charakterizován pomocí rozměrově eluční chromatografie (SEC) (viz kapitola 4.4.2). Koncové dithiobenzoátové skupiny (DTB) byly odstraněny reakcí polymeru (166,6 mg, 6,0  $\mu\text{mol}$  DTB skupin) s iniciátorem (ABIN) (29,78 mg, 181,3  $\mu\text{mol}$ ), provedené v 1,7 ml dimethylformamidu (DMF) při 80°C po dobu 3 h. Polymer byl z reakční směsi izolován vysrážením do směsi aceton/diethylether (3 : 1) a přečištěn následným přesrážením z methanolu do diethyletheru. Bylo získáno 143,0 mg polymeru ve formě bílého prášku. Obsah PDS skupin byl stanoven spektrofotometricky po reakci s DL-dithiotreitolem (DTT) (viz kapitola 4.4.5). Molární hmotnosti polymeru byly stanoveny metodou SEC (viz kapitola 4.4.2).



**Obr. 4-13:** Schéma přípravy multivalentního polymeru p[(HPMA)-*co*-(Ma-AE-PDS)] (**HP4**): (A) RAFT polymerace HPMA a Ma- $\beta$ -Ala-TT následovaná (B) zablokováním koncových DTB skupin polymeru.

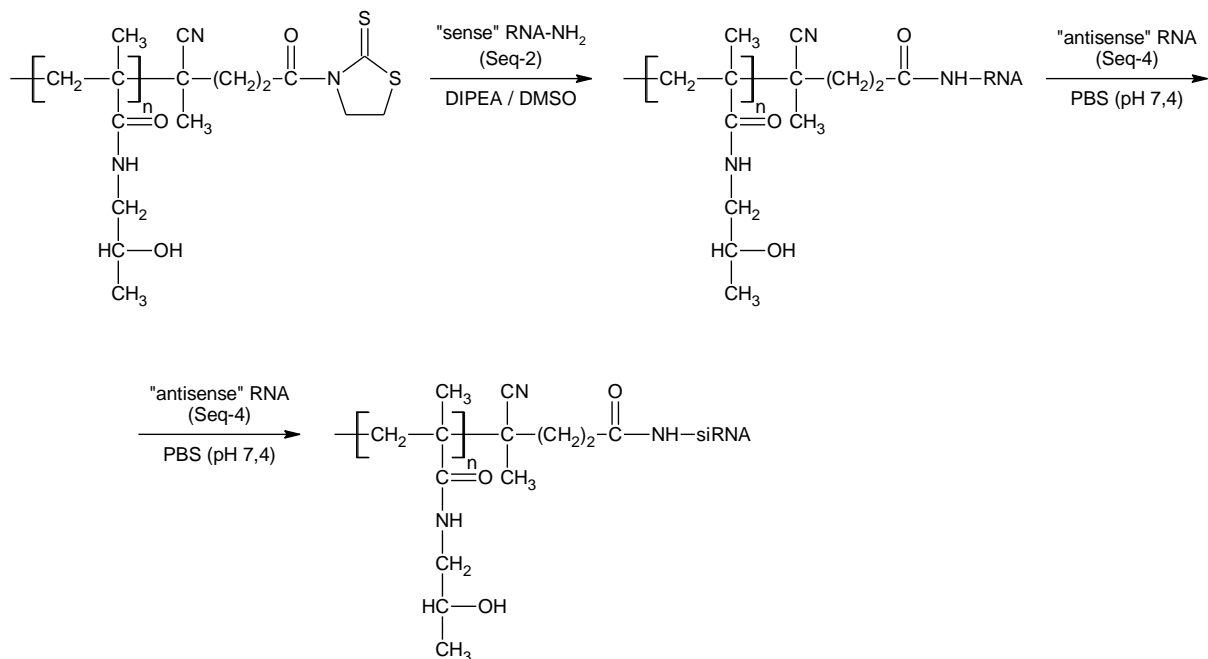
## 4.3 Dopravní systémy polymer-siRNA

### 4.3.1 Příprava polyelektrolytových komplexů siRNA

Polyelektrolytové komplexy (PEK) siRNA byly připraveny rychlým přidavkem roztoku polykationtu k míchanému roztoku siRNA ve 20 mM HEPES pufru (pH 7,4), tak, aby molární poměr aminoskupin polykationtu ku fosfátovým skupinám siRNA (N/P) byl roven 6 : 1, 12 : 1 a 24 : 1. Pro získání PEK vysoké čistoty umožňující jejich přesnou charakterizaci rozptylovými technikami byly připravené komplexy dále přečištěny filtrací přes 0,2  $\mu\text{m}$  PVDF membrány vysycené roztokem polykationtu. Zastoupení aminoskupin ve vzorcích polykationtů bylo určeno pomocí TNBSA metody (viz kapitola 4.4.3). K vyhodnocení hydrodynamických rozměrů a  $\zeta$ -potenciálů PEK byly použity metody dynamického (DSL) rozptylu světla (viz kapitola 4.4.7 a 4.4.8).

### 4.3.2 Příprava stabilních polymerních konjugátů siRNA (HP1-siRNA a HP3-siRNA)

Stabilní konjugáty hydrofilních polymerů s siRNA byly připraveny reakcí polymerů **HP1** a **HP3** nesoucích reaktivní TT skupiny s chemicky modifikovanou RNA obsahující terminální aminoskupinu (RNA-NH<sub>2</sub>, Seq 2) (viz obr. 4-14) (viz kapitola 4.1). Použitý molární poměr reaktivních TT skupin polymeru vůči RNA-NH<sub>2</sub> byl 1,1 : 1. Směs 10 % roztoku polymeru v DMSO a EDIPA (20ti molární nadbytek vůči TT skupinám polymeru) byla přidána k 10 % roztoku RNA-NH<sub>2</sub> v DMSO a reakční směs byla inkubována 18 h při laboratorní teplotě. Po přečištění polymerního konjugátu s jednovláknovou RNA na SEC koloně PD MiniTrap s náplní Sephadex G-10 (GE Healthcare Life Sciences) v PBS pufru (pH 7.4) bylo do roztoku přidáno ekvimolární množství “antisense” RNA vlákna (Seq 4) (viz kapitola 4.1) a byla provedena duplexace ribonukleotidových řetězců za vzniku dvouvláknové siRNA (viz kapitola 4.5.1). Průběh konjugace polymeru s RNA byl sledován pomocí SEC (viz kapitola 4.4.2) a horizontální elektroforézou v agarózovém gelu (viz kapitola 4.5.2.2).



**Obr. 4-14:** Schéma konjugace NH<sub>2</sub>-skupinou modifikované RNA (Seq-2) s multivalentním reaktivním polymerem nesoucím TT skupiny (**HP1**) za vzniku stabilní amidové vazby a následná duplexace po přidavku komplementární nemodifikované siRNA (Seq-4) za vzniku polymer-siRNA konjugátu **HP1-siRNA**.

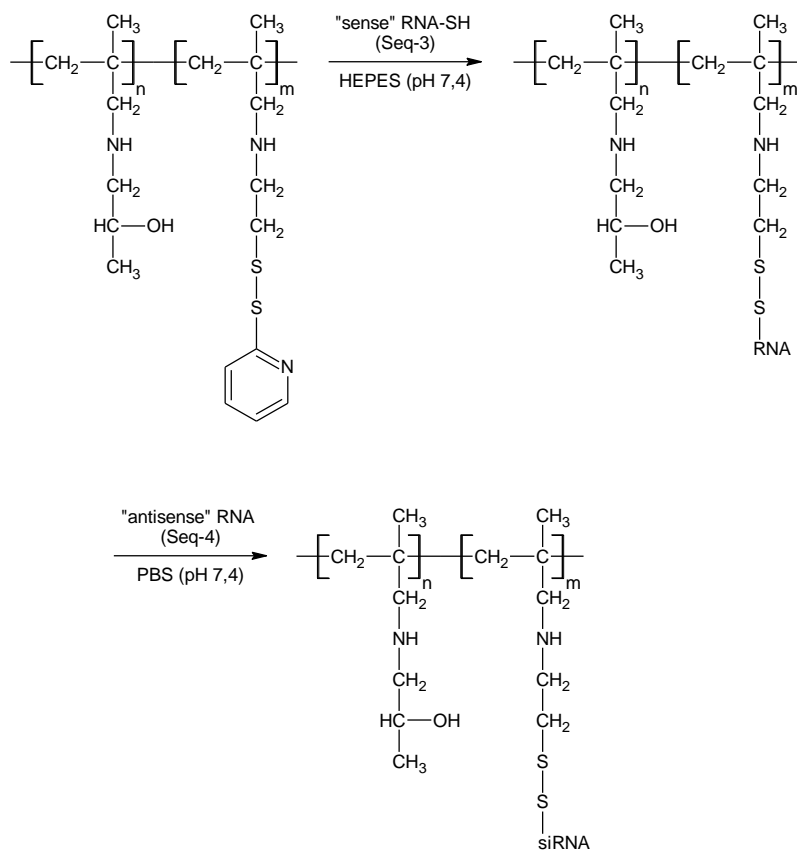
### 4.3.3 Příprava reduktivně odštěpitelných polymerních konjugátů siRNA (**HP2-siRNA** a **HP4-siRNA**)

Konjugáty hydrofilních polymerů s siRNA pospojované reduktivně štěpitelnou vazbou byly připraveny reakcí polymerů **HP2** a **HP4** nesoucích PDS skupiny s chemicky modifikovanou RNA obsahující koncovou SH skupinu (RNA-SH, Seq 3).

Jelikož byl terminální thiol zakoupené RNA chráněn alkyldisulfidovou skupinou, byla nejprve tato chránící skupina (označena jako R) z RNA-S-S-R odstraněna reakcí s dithiotreitem (DTT). Stručně: RNA-S-S-R byla 15 min inkubována v přítomnosti 0,5 M roztoku DTT (pH = 9,0), (0,5 ml 0,5 M roztoku DTT na 1 μmol RNA). Poté byl k reakční směsi přidán 5,0 M roztok NaCl a 100% ethanolu objemovém poměru ethanol : DTT : NaCl = 40 : 10 : 1. Po přidání ethanolu došlo k precipitaci ochráněné RNA-SH, sraženina byla následně zcentrifugována (10 min, 10 000 ot./min), supernatant byl šetrně dekantován a usazená sraženina byla ještě 2x promyta 70% ethanolom.

Ochráněná RNA-SH byla následně navázána na polymery obsahující PDS skupiny (10 % nadbytek vůči RNA) a to smícháním 10 % roztoků polymeru a RNA-SH ve 20mM HEPES

puftru (pH = 7,4) při laboratorní teplotě(viz **obr. 4-15**). Po 2 h byla reakce ukončena a polymerní konjugát s jednovláknovou RNA byl přečištěn na SEC koloně PD MiniTrap s náplní Sephadex G-10 (GE Healthcare Life Sciences) v PBS puftru (pH = 7.4). Následně byla provedena duplexace s „antisense“ vláknem (Seq 4) (viz kapitola 4.5.1).



**Obr. 4-15:** Schéma konjugace SH-skupinou modifikované RNA (Seq-3) s multivalentním reaktivním polymerem nesoucím PDS skupiny (**HP4**) za vzniku reduktivně odštěpitelné disulfidové vazby a následná duplexace po přidavku komplementární nedomodifikované siRNA (Seq-4) za vzniku polymer-siRNA konjugátu **HP4-siRNA**.

## 4.4 Použité fyzikálně-chemické metody

### 4.4.1 Řízená radikálová polymerace („Reversible addition-fragmentation chain-transfer, RAFT“)

RAFT technika je moderní polymerizační metoda využívající specifického přenosového činidla („chain-transfer agent“, CTA) na bázi dithioesterů, thiokarbamátů nebo xanthátů

k přípravě polymerů za využití procesu reverzibilní deaktivace rostoucího řetězce. Metoda umožňuje přípravu polymerů s přesnou architekturou, zavedení různých reaktivních skupin na oba konce polymerního řetězce, ale také precizní kontrolu molární hmotnosti výsledného polymeru. Polymer připravený RAFT technikou se rovněž vyznačuje velmi úzkou distribucí molárních hmotností.

## 4.4.2 Kapalinová chromatografie

### *Tenkvrstvá kapalinová chromatografie (TLC)*

Pro ověření čistoty připravených chemikálií a sledování průběhu reakcí byla použita tenkvrstvá kapalinová chromatografie (TLC). Byly použity destičky Silikagel 60 F254 (Merck, Německo).

### *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)*

Čistota připravených chemikálií byla ověřena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na systému Shimadzu VP vybaveným PDA detektorem (UV-VIS 200 – 800 nm). Látky byly analyzovány na koloně Chromolith C18 HR (Merck, Německo) ve směsi A : B, kde A = 5 % acetonitril, 94,9 % voda, 0,1 % TFA a B = 94,9 % acetonitril, 5 % voda, 0,1 % TFA) při použití lineární gradientové eluce.

### *Rozměrově eluční chromatografie (SEC)*

Hmotnostně a početně průměrné molární hmotnosti a indexy molekulárních neuniformit všech připravených polymerů a polymerních konjugátů byly stanoveny na HPLC chromatografu (Shimadzu, Japonsko) vybaveném 18ti-úhlovým rozptylovým detektorem (DAWN DSP-F, Wyatt Technology, USA), diferenciálním refraktometrem (RI) a UV detektorem. Stanovení molárních hmotností kationtových polymerů bylo provedeno na speciálně upravených silikagelových kolonách CATSEC-300 (Micra Scientific, USA) v mobilní fázi 0,2 M NaCl s přídavkem 0,1% TFA při průtoku 0,3 ml/min. SEC hydrofilních polymerů a kopolymerů na bázi HPMA byla provedena na sériově zapojených kolonách TSK-Gel Super AW 3000 a 4000 (Tosoh Bioscience, Japonsko) ve směsi methanol : octanový pufr (0,3 M, pH 6,5) (80 : 20). Polymerní konjugáty siRNA byly charakterizovány na koloně TSK-Gel G2000 SWXL (Tosoh Bioscience, Japonsko) v 0,15 M PBS (pH = 7,4).

Preparativní dělení hydrofilních polymerů od nízkomolekulárních příměsí bylo prováděno na sloupcových kolonách s náplní Sephadex™ PD-10 ve vodě nebo Sephadex™ LH-20 v



methanolu. Eluované látky byly detekovány pomocí přenosného UV detektoru (Knauer, Německo).

### 4.4.3 Stanovení obsahu primárních aminoskupin pomocí TNBSA

Principem stanovení obsahu primárních aminoskupin pomocí TNBSA je nukleofilní aromatická substituce sulfonové skupiny 2,4,6-trinitrobenzensulfonové kyseliny (TNBSA) primární aminoskupinou (Snyder and Sobocinski 1975). Produktem této reakce je sekundární trinitrofenylamin, výrazně absorbující ve žluté oblasti viditelného spektra (420 nm). V této práci byla TNBSA metoda využita pro stanovení zastoupení komonomeru s primární aminoskupinou a pro nepřímé stanovení obsahu imidazolových skupin ve statistických kationtových polymerech. Obecný postup používaný pro stanovení obsahu primárních aminoskupin v polymerech byl následující: k roztoku vzorku obsahujícího aminoskupiny v 0,1 M  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  (pH 9,3) byla přidána TNBSA ve formě vodného roztoku (výsledná koncentrace 0,32 mg/ml) a po 60 min inkubace při laboratorní teplotě byla měřena absorbance při vlnové délce 420 nm. Jako reference byl použit roztok neobsahující vzorek.

### 4.4.4 Stanovení obsahu TT reaktivních skupin

Obsah TT reaktivních skupin multivalentních kopolymerů a semitelechelických polymerů byl stanoven spektrofotometrickou analýzou roztoků polymerů v methanolu z absorpčního píku náležícímu karbonylthiazolidin-2-thionovým skupinám při 305 nm. Pro výpočet obsahu TT skupin kopolymeru byl použit následující vztah:

$$\text{mol}\%m_2 = \frac{100 \cdot M1}{M1 - M2 + \frac{\varepsilon \cdot l \cdot x_p}{A}}$$

kde  $m_2$  je označení pro reaktivní komonomer,  $M1$  (resp.  $M2$ ) je molekulová hmotnost HPMa (resp. reaktivního komonomeru),  $\varepsilon$  je extinkční koeficient vázaného TT v methanolu (10300 l/mol.cm),  $l$  je délka optické dráhy v cm,  $x_p$  je koncentrace polymeru v g/l,  $A$  je hodnota absorbance při  $\lambda = 305$  nm.

#### 4.4.5 Stanovení obsahu PDS reaktivních skupin

Obsah PDS reaktivních skupin multivalentních kopolymerů a semitelechelických polymerů byl nepřímo stanoven spektrofotometrickou analýzou uvolněného pyridin-2-thionu (P2T), který vzniká po reakci polymerů s PDS skupinami s roztokem DTT. Obecný postup při stanovení PDS v polymerech byl následující: k 100  $\mu\text{l}$  roztoku polymeru v  $\text{H}_2\text{O}$  (5,0 mg/ml) bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  roztoku DTT ve  $\text{H}_2\text{O}$  (0,1 M – u semitelechelického polymeru a 1,0 M u multivalentního polymeru) a 850  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  a po 60 min inkubace při laboratorní teplotě byla měřena absorbance při vlnové délce 343 nm. Jako reference byl použit roztok neobsahující vzorek. Pro výpočet obsahu PDS skupin kopolymeru byl použit stejný vztah jako při stanovení obsahu TT reaktivních skupin (viz kapitola 4.4.3). Použitý extinkční koeficient ( $\epsilon$ ) uvolněného P2T byl 8080 l/mol.cm.

#### 4.4.6 Dialýza

Dialýza je separační metoda, při které jsou od sebe odděleny látky s různým hydrodynamickým poloměrem, resp. s různou molární hmotností. V našem případě byly použity dialyzační membrány z regenerované celulózy mající MWCO = 3,5 - 5 kDa od firmy Spectrum Laboratories, USA, k oddělení nízkomolekulárních látek od polymerů. Polymery s nízkomolekulárními příměsmi rozpuštěné ve vodě nebo v pufru byly převedeny do dialyzační membrány a poté byly dialyzovány po dobu 3 dnů oproti vodě.

#### 4.4.7 Povrchový náboj částic

Povrchový náboj částic byl měřen pomocí metody elektroforetického rozptylu světla, která byla použita pro stanovení  $\zeta$  – potenciálů nanočásticových systémů. Všechna měření byla provedena na přístroji Nano-ZS zetasizer ZEN3600 (Malvern Instruments, UK) vybaveným He-Ne laserem (632,8 nm). Výsledné hodnoty  $\zeta$ -potenciálů byly získány jako aritmetické průměry nejméně ze 3 měření. Elektroforetická pohyblivost byla převedena na  $\zeta$  – potenciál užitím Smoluchowskiho aproximace.

#### 4.4.8 Velikost částic

Velikost polyelektrolytových komplexů polykationtů s siRNA byla měřena pomocí dynamického (DLS) rozptylu světla. Měření byla provedena na přístroji Nano-ZS zetasizer

ZEN3600 (Malvern Instruments, UK) vybaveného He-Ne laserem (632,8 nm) při rozptylovém úhlu 173°. Výsledné hodnoty velikosti částic byly získány jako aritmetické průměry nejméně ze 3 měření.

## **4.5 Biochemické a biologické metody**

### **4.5.1 Duplexace**

Duplexace, neboli spárování jednovláknových RNA sekvencí („sense“ + „antisense“) prostřednictvím komplementarity bazí bylo provedeno smícháním komplementárních RNA řetězců v ekvimolárním poměru. Tato směs byla poté zahřata na 90 °C po dobu 1 min a poté pozvolna ochlazena na laboratorní teplotu.

### **4.5.2 Horizontální elektroforéza v agarózovém gelu**

K měření elektroforetické pohyblivosti siRNA, siRNA polyplexů a polymer-siRNA konjugátů byly použity 2 % agarózové gely. Agaróza byla suspendována v 1x TAE pufru (v případě polyplexů byly použity větší gely - 2 g agarózy + 100 ml TAE pufru a v případě polymerních konjugátů byly použity menší gely – 1,2 g agarózy + 60 ml TAE pufru), suspenze byla přivedena k varu a 5 min míchána. Horký agarózový roztok byl odlit do vodorovně umístěné plastové vaničky s hřebenem a ponechán vychladnout. Po vyjmutí hřebene byly připraveny gely s 15 jamkami pro vzorky. Gely byly použity nejdříve 40 min po odlití. Na start bylo nanášeno vždy příslušné množství vzorku s přidavkem roztoku SYBR Green I (100 × konc) a nanášecí barvičky. Gel byl zalit TAE puftrem (pH 7,8) a elektroforetická pohyblivost byla měřena při 90 V po dobu 20 min. K vizualizaci fluorescenčně značené siRNA bylo použito UV transiluminátoru (254 nm) a gel byl vyfotografován fotoaparátem Kodak Gel Logic 112 (Kodak, USA). Elektroforetická měření byla využita při studiu kompenzace nábojů PEK na modelových komplexech připravených siRNA a polykationtu (viz kapitola 4.2.2) a také pro studium vzniku konjugátů siRNA s hydrofilními reaktivními polymery (viz kapitola 4.2.3).

#### **4.5.2.1 Stanovení stupně kompenzace nábojů PEK**

Gelová elektroforéza byl také použita pro stanovení kompenzace nábojů PEK, připravených smícháním roztoků siRNA a polykationtů o různém poměru N/P. K vybarvení siRNA bylo

použito interkalační činidlo SYBR Green I (100× konc.). Do jednotlivých jamek agarózového gelu (příprava viz kapitola 4.5.1) byly postupně naneseny homogenizované směsi tvořené 50 µl komplexů lišícími se molárním poměrem aminoskupin polykationtu ku fosfátovým skupinám siRNA = poměr N/P (viz. tab. 4-1), 0,5 µl SYBR Green I roztokem a 10 µl 6x koncentrované nanášecí barvičky. Gel byl přelit TEA pufrem (pH 7,8) a analýza probíhala přibližně 15 min při 90 V. Bylo sledováno, při kterém poměru N/P již není v roztoku přítomná nekompensovaná siRNA.

**Tab. 4-1:** Poměr N/P komplexů nanesených na agarózový gel pro stanovení kompenzace nábojů PEK.

1 : 24	1 : 12	1 : 6	1 : 3	1 : 1,5	1 : 1	1,5 : 1	3 : 1	6 : 1	12 : 1	24 : 1
--------	--------	-------	-------	---------	-------	---------	-------	-------	--------	--------

#### 4.5.2.2 Sledování vzniku konjugátů siRNA s hydrofilními polymery

Vznik kovalentních konjugátů po reakci modifikované RNA s hydrofilními reaktivními polymery byl rovněž sledován pomocí horizontální gelové elektroforézy. Do jednotlivých jamek menšího 2% agarózového gelu (příprava viz kapitola 4.5.1) byly postupně naneseny homogenizované směsi tvořené příslušným množstvím vzorku, SYBR Green I roztokem a 2x koncentrované RNA nanášecí barvičky (Thermo Scientific, USA). Jako vzorky byly použity jednak připravené polymerní konjugáty (viz. kapitoly 4.3.2 a 4.3.3), ale také kontroly, kterými byly pouhé fyzikální směsi jednotlivých polymerů s nemodifikovanou siRNA, které byly připraveny stejným způsobem jako konjugáty. V případě reduktivně štěpitelných konjugátů (**HP2-siRNA** a **HP4-siRNA**) byly použity ještě jako další kontroly konjugáty (10 µl, 25 µg siRNA), které byly inkubovány po dobu 15 min v 0,5 M roztoku DTT (0,9 µl) o pH = 9,0.

V případě stabilních konjugátů (**HP1-siRNA** a **HP3-siRNA**) (viz. kapitola 4.3.2) byly do jednotlivých jamek naneseny homogenizované směsi tvořené 3,13 µl vzorku ( $m_{\text{siRNA}} = 2,5 \mu\text{g}$ ), 3,13 µl 4x koncentrovaného SYBR Green I roztoku a 6,26 µl 2x koncentrovaného roztoku RNA nanášecí barvičky. Analýza probíhala 15 min při 90 V.

V případě reduktivně štěpitelných konjugátů (viz. kapitola 4.3.3) byly do jednotlivých jamek naneseny homogenizované směsi tvořené 1 µl vzorku ( $m_{\text{siRNA}} = 2,5 \mu\text{g}$ ) (resp. 1,09 µl ( $m_{\text{siRNA}} = 2,5 \mu\text{g}$ ) vzorku v případě konjugátů inkubovaných v DTT), 1 µl (resp. 1,09 µl) 4x

koncentrovaného SYBR Green I roztoku a 2  $\mu$ l (resp. 2,18  $\mu$ l) 2x koncentrovaného roztoku RNA nanášecí barvičky. Analýza probíhala 15 min při 90 V.

### 4.5.3 Kultivace buněk

GFP – modifikované HeLa buňky (viz kapitola 4.1) byly kultivovány v kultivačním médiu složeném z DMEM („Dulbecco's Modified Eagle Medium“) s vysokým obsahem glukózy, 10% FBS („fetal bovine serum“), 0,1 mM MEM neesenciálních aminokyselin, 2 mM L-glutaminu, 1% Pen-Strep mix (směs streptomycinu a penicilinu - konečná koncentrace 100  $\mu$ g/ml streptomycinu a 100 U/ml penicilinu) a blasticidinu (10  $\mu$ g / ml). Kultivace probíhala v termostatu při teplotě 37 °C v atmosféře o obsahu 5 % CO<sub>2</sub> v plastových kultivačních lahvičkách o objemu 25 ml.

Během práce s buněčnými liniemi bylo nutné tyto linie pasážovat – pokud linie příliš narostly, bylo třeba je naředit čerstvým médiem a rozsadit do nových kultivačních lahviček. Protože námi použitá buněčná linie adherovala k podkladu, bylo nutné buňky v průběhu pasážování uvolnit inkubací v roztoku trypsinu/EDTA. Pasážování buněk bylo prováděno každé 2 – 3 dny podle následujícího postupu: po odsátí starého kultivačního média byly buňky nejprve promyty 2 ml 1x PBS a poté byly 5 min inkubovány v 1 ml směsi trypsin/EDTA. Úplné odlepení buněk ze dna kultivační lahvičky bylo kontrolováno optickým mikroskopem. Poté bylo k buňkám přidáno čerstvé kultivační médium, což způsobilo neutralizaci trypsinu a buněčná suspenze byla následně rozdělena do nových kultivačních lahviček. Nakonec bylo médium v lahvičkách doplněno do celkového objemu 8 ml a lahvičky byly přeneseny do termostatu vyhřátého na teplotu 37 °C.

### 4.5.4 Post-transkripční umlčování genu pro GFP prostřednictvím RNAi („silencing“)

Samotné *in vitro* experimenty pro cílené umlčování genu pro GFP byly prováděny na GFP – modifikovaných HeLa buňkách (viz kapitola 4.1) v 24 jamkových kultivačních destičkách. Do každé jamky byl přidán 1 ml buněčné suspenze (65 tis. buněk) a destičky byly 24 h inkubovány v termostatu (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Poté bylo z jamek odsáto staré médium (složení viz kapitola 4.5.3) a k buňkám bylo přidáno 900  $\mu$ l čerstvého kultivačního média a 100  $\mu$ l vzorku, tak aby výsledná koncentrace siRNA v 1 ml byla 50 nM, 250 nM a 1250 nM siRNA. Obsah jamek byl šetrně promíchán a destičky byly vloženy zpět do termostatu. Intenzita

fluorescence GFP byla monitorována po 24 h a 48 h inkubace pomocí multi-modálního spektrometru (viz 4.5.5) a fluorescenční mikroskopie (viz 4.5.6). Vybrané vzorky byly po 48 h inkubace rovněž analyzovány pomocí průtokové cytometrie (FACS) (viz 4.5.7)

#### **4.5.5 Fluorometrické stanovení intenzity fluorescence GFP**

Pro fluorometrické stanovení intenzity fluorescence v GFP-modifikovaných buňkách byl použit hybridní multi-modální optický systém Synergy H1 multi-mode reader (BioTek Instruments, Inc., USA), který umožňuje analýzu v 6 - 96 jamkových destičkách. Intenzita fluorescence GFP byla měřena při 395/509 nm (excitace/emise) a vyhodnocení intenzity fluorescence GFP bylo provedeno pomocí softwaru Gen5.

#### **4.5.6 Fluorescenční mikroskopie**

Pro vizualizaci buněčných linií HeLa exprimujících GFP a sledování poklesu fluorescence během *in vitro* experimentu umlčování genu GFP prostřednictvím RNAi byl použit fluorescenční mikroskop Olympus IX83 (Olympus, Japan) se FV10-ASW softwarem. GFP – modifikované buňky byly pozorovány v 24 jamkových destičkách a fluorescence GFP byla pozorována přes 500 – 600 nm filtr.

#### **4.5.7 Fluorescenční průtoková cytometrie („fluorescence – activated cell sorting“, FACS)**

Průtoková cytometrie je metoda umožňující měření a analýzu fyzikálně – chemických vlastností buňky, ale také identifikaci a třídění různých buněčných populací uvnitř smíšené populace buněk. Měření intenzity fluorescence GFP produkovaného buňkou bylo měřeno pomocí průtokového cytometru BD FACSVersé (BD Biosciences, USA) a mediány intenzity fluorescence byly vyhodnoceny pomocí FlowJo softwaru (Tree Star, USA).

Pro analýzu byly použity GFP - modifikované buňky, které byly inkubované 48 h s vybranými vzorky PEK siRNA a konjugáty siRNA, u kterých byl pozorován pokles intenzity fluorescence vyhodnocený pomocí fluorometrického stanovení (viz kapitola 4.5.5) a pomocí fluorescenční mikroskopie (viz kapitola 4.5.6). Vybrané vzorky byly připraveny takto: z jamek bylo odsáto médium (složení viz kapitola 4.5.3) obsahující rovněž vzorky konjugátů siRNA a PEK siRNA v HEPES pufru (pH 7,4), poté byly buňky promyty 250  $\mu$ l 1x PBS a

následně 5 min inkubovány v 200  $\mu$ l směsi trypsin/EDTA. Nakonec bylo k buněčné suspenzi ještě přidáno 500  $\mu$ l 1x PBS (5% bovinní sérový albumin, BSA).

## 4.5.8 Měření cytotoxicity

Pro měření cytotoxicit siRNA polyplexů a polymerních konjugátů siRNA byly použity GFP-modifikované HeLa buňky Experimenty byly provedeny v 96 jamkových destičkách, kde do každé jamky bylo nadávkováno 100  $\mu$ l buněčné suspenze obsahující 3000 – 5000 buněk. Po 24 h inkubace v termostatu bylo k buňkám přidáno 10  $\mu$ l vzorku v koncentrační řadě od nejvyšší koncentrace polymeru (30  $\mu$ M), až po koncentraci 58,6 mM (dvojkové ředění). Po 72 h od přidání testovaných vzorků bylo k buňkám přidáno 10  $\mu$ l Alamar Blue a po 3 hodinách inkubace byla na multi-modálním destičkovém spektrometru měřena fluorescence, při excitační/emisní vlnové délce: 570/600 nm. Výsledky testů cytotoxicity jsou vyjádřené jako hodnota  $IC_{50}$  - množství konjugátu siRNA / PEK siRNA (v  $\mu$ M), které z 50 % usmrtí testované buňky.

# 5. VÝSLEDKY A DISKUZE

## 5.1 Příprava a charakterizace polymerních prekurzorů

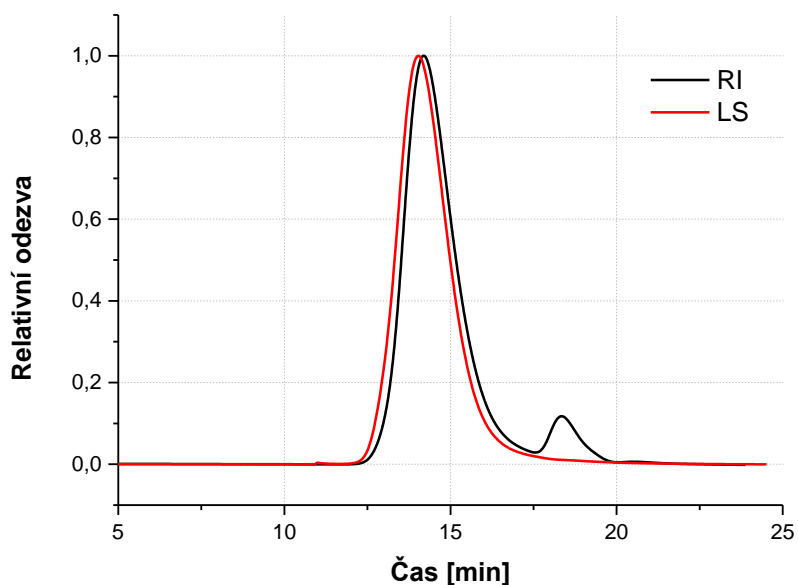
Všechny polymery použité v této práci byly připraveny řízenou radikálovou polymerizací (RAFT, viz kapitola 4.4.1), umožňující syntézu vysoce definovaných makromolekul s velmi úzkou distribucí molárních hmotností a vysokým obsahem funkčních skupin na obou koncích polymerního řetězce. Příprava polymerů byla navržena tak, aby se molární hmotnosti syntetizovaných materiálů pohybovaly do 80 000 g/mol, což jim zaručuje vysokou míru pasivní akumulace v nádorových buňkách (pouze s minimálním dopadem na zdravé buňky), a zároveň mohou být po splnění svého úkolu, tj. dopravě účinné látky do místa účinku vyloučeny renální filtrací z organismu. Molární hmotnosti výsledných polymerů připravených RAFT technikou lze velmi efektivně řídit reakčními podmínkami, jako je teplota a čas polymerace, použité rozpouštědlo, ale také volbou iniciátoru a přenosového činidla či poměrem látkových množství jednotlivých reaktantů v polymerizační směsi – monomer : přenosové činidlo : iniciátor ( $[M]:[CTA]:[I]$ ).

### 5.1.1 Příprava a charakterizace polykationtů

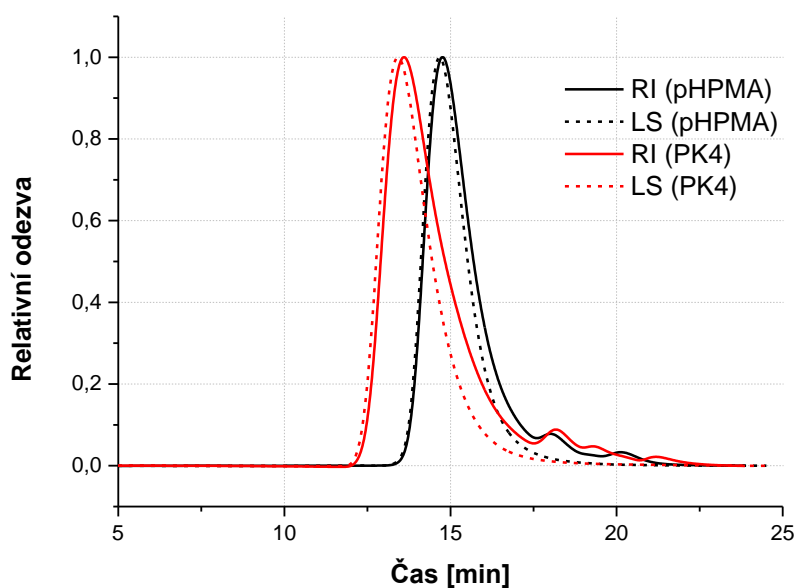
Polykationty použité v této práci můžeme rozdělit do dvou skupin, a to na homopolymery tvořené pouze kladně nabitými monomerními jednotkami a na diblokové kopolymery sestávající z hydrofilního elektroneutrálního bloku a polykationtového bloku. Mezi kationtové homopolymery řadíme polymer p(AEMA) (**PK1**) s primárními aminoskupinami v postranním řetězci, a další dva polymery, které mají buď zcela substituované aminoskupiny imidazolovými skupinami p(AEMA-Im) (**PK3**) (100% Im) nebo jen z 50 % p[(AEMA)-co-(AEMA-Im)] (**PK2**). Polykationty **PK2** a **PK3** byly připraveny polymeranalogickou modifikací primárních aminoskupin polykationtu **PK1** sodnou solí imidazol-4-octové kyseliny. Různé typy ionizovatelných skupin (různé pKa) byly do struktur polykationtů zavedeny kvůli účinnějšímu úniku jejich siRNA polyplexů z buněčných endozomů v důsledku efektu protonové houby (viz 2.4.2.3.3). Mezi diblokové kopolymery řadíme jednak p[(HPMA)-*b*-(AEMA)], nesoucí primární aminoskupiny v postranním řetězci polykationtového bloku (**PK4**) a pak další dva blokové kopolymery, jejichž primární aminoskupiny byly buďto z 50 % (p[(HPMA)-*b*-(AEMA)-*co*-AEMA-Im]) (**PK5**) nebo ze 100 % (p[(HPMA)-*b*-(AEMA-Im)]) (**PK6**) převedeny na imidazolové polymeranalogickou reakcí. Syntéza diblokových kopolymerů vycházela z RAFT polymerace připraveného hydrofilního HPMA bloku, který byl použit jako makro-přenosové činidlo při následném prodlužování řetězce AEMA jednotkami. Poměr molárních hmotností (délek řetězců) jednotlivých bloků byl přibližně 1 : 1. Důvodem zabudování hydrofilního bloku do struktury polykationtu byla především eliminace kladného povrchového náboje jeho polyplexů s siRNA, který je v *in vivo* podmínkách zdrojem nespecifických interakcí s proteiny krevní plasmy a buňkami imunitního systému.

Všechny polykationty byly připraveny za účelem vytvoření stabilních PEK s siRNA. Hmotnostně – průměrné molární hmotnosti ( $\bar{M}_w^{\text{pol}}$ ) kationtových homopolymerů byly okolo 40 000 g/mol, v případě blokových polymerů byly polymery připraveny tak, aby oba bloky měly molární hmotnost mezi 30 000 a 40 000 g/mol. Příklady chromatogramů polymerů **PK1** a **PK4** jsou uvedeny v **obr. 5-1**, respektive **5-2**.





**Obr. 5-1:** SEC profil kationtového homopolymery pAEMA (**PK1**) vyneseny jako relativní odezva RI (černá čára) a LS (červená čára) detektorů v čase.



**Obr. 5-2:** SEC profil výchozího hydrofilního polymeru pHPMA (černá čára) a z něj připraveného diblokového kopolymeru p[(HPMA)-*b*-(AEMA)] (**PK4**) (červená čára). Graf je vyneseny jako závislost relativní odezvy RI (plná čára) a LS (čárkovaná čára) detektorů v čase.

Poměr látkových množství [M]:[CTA]:[I] v polymerační směsi u polymerů připravených řízenou polymerací (**PK1**, **PK4**) a přesné hodnoty hmotnostně – průměrných molárních

hmotností ( $\bar{M}_w^{\text{pol}}$ ) a indexů molekulárních neuniformit (polydisperzit) ( $\bar{M}_w^{\text{pol}}/\bar{M}_n^{\text{pol}}$ ) všech připravených polykationtů jsou uvedeny v **tab. 5-1**. Jelikož připravené polykationty obsahovaly ve svých strukturách velké množství ionizovatelných skupin schopných elektrostatické interakce se záporně nabitými povrchy většiny typů komerčně dostupných chromatografických kolon, byly molární hmotnosti připravených kationtových polymerů stanoveny na speciálně upravených silikagelových kolonách CATSEC-300, nejevících při daném složení mobilní fáze iontovou exkluzi. Eluované látky byly detekovány pomocí rozptylového (LS) a koncentračního (RI) detektoru.

**Tabulka 5-1:** Charakteristiky připravených polykationtů

Název	Struktura polymeru	[M]:[CTA]:[I]	$\bar{M}_w^{\text{pol}}$ [g/mol]	$\bar{M}_w^{\text{pol}}/\bar{M}_n^{\text{pol}}$	$X_{x/y/z}$ <sup>2)</sup> [mol%]
PK1	p(AEMA) <sub>x</sub>	364 : 2 : 1	39 080	1,1	100/0/0
PK2	p[(AEMA) <sub>x</sub> -co-(AEMA-Im) <sub>y</sub> ]	-	40 560	1,3	48/52/0
PK3	p(AEMA-Im) <sub>y</sub>	-	41 200	1,4	0/100/0
PK4	p(HPMA) <sub>z</sub> <sup>1)</sup>	500 : 2 : 1	30 320	1,0	0/0/100
	p[(HPMA) <sub>z</sub> -b-(AEMA) <sub>x</sub> ]	1950 : 5 : 1	78 810	1,2	46/0/54
PK5	p[(HPMA) <sub>z</sub> ]-b-[(AEMA) <sub>x</sub> -co-(AEMA-Im) <sub>y</sub> ]	-	79 640	1,4	22/24/54
PK6	p[(HPMA) <sub>z</sub> -b-(AEMA-Im) <sub>y</sub> ]	-	80 900	1.5	0/46/54

<sup>1)</sup> pHPMA hydrofilní polymerní prekurzor, který byl použit jako makro-přenosové činidlo pro navázání kationtového pAEMA bloku za vzniku diblokového kopolymeru **PK4**

<sup>2)</sup> Hodnota  $X_{x/y/z}$  udává molární zastoupení jednotlivých komonomerů v kopolymeru, kde  $x$  je obsah AEMA jednotek,  $y$  je obsah AEMA-Im jednotek a  $z$  je obsah HPMA jednotek.

Obsah kladně nabitých skupin (amino skupin) polykationtů, který je důležitý pro určení stupně kompenzace nábojů (N/P poměr) při přípravě polyplexu, byl stanoven metodou TNBSA (viz kapitola 4.4.3). Jelikož TNBSA reaguje za daných podmínek selektivně

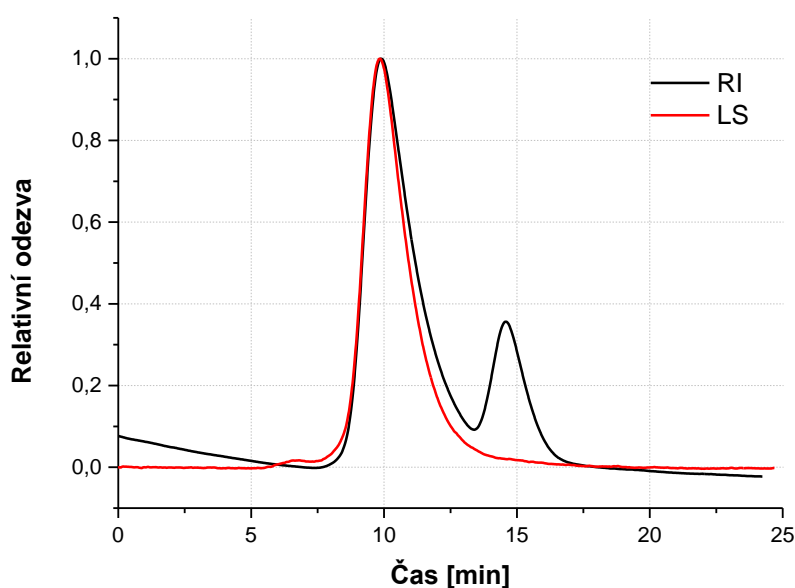
pouze s primárními aminoskupinami, byl obsah imidazolových skupin u polymerů **PK2** a **PK5** stanoven nepřímo. V případě polykationtů **PK3** a **PK6** proběhla substituce aminoskupin imidazoly ze 100 %, o čemž svědčí negativní reakce s TNBSA. Reakcí s TNBSA bylo stanoveno, že polymer **PK4** nese ve své struktuře 46,3 mol % primárních amino skupin, což znamená, že diblokový polymer je z 53,7 % tvořen hydrofilním nenabitým blokem a z 46,3 % polykationtovým blokem. Přesné hodnoty molárního zastoupení komonomerů obsahujících primárních aminoskupiny a imidazoly jsou uvedeny v **tab. 5-1**. Vyhodnocení imidazolových skupin bylo vypočteno odečtením hodnoty mol % primárních aminoskupin od 100 % v případě **PK1**, **PK2**, a **PK3** a v případě diblokových polymerů **PK4**, **PK5**, **PK6** byla hodnota mol % imidazolových skupin vypočtena odečtením mol % primárních aminoskupin od 46,3 %, která odpovídá polykationtovému bloku.

### **5.1.2 Příprava a charakterizace reaktivních hydrofilních polymerů**

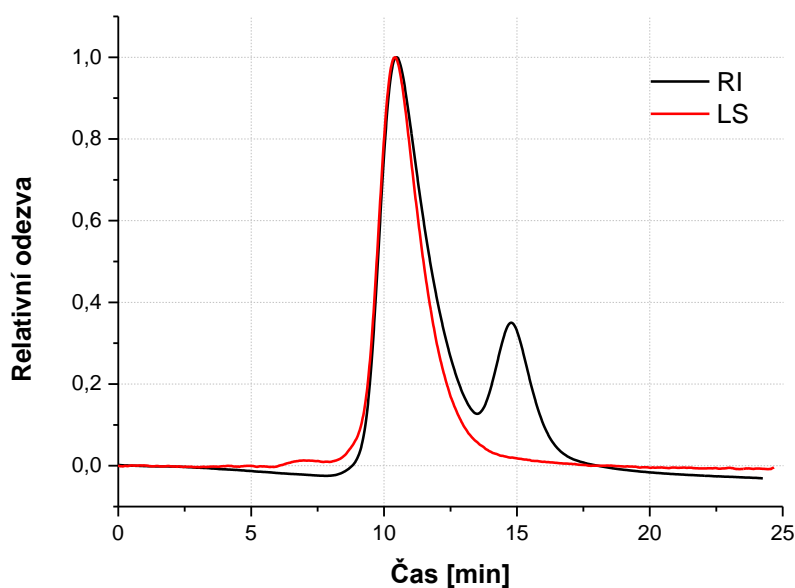
Dalším typem polymerních nosičů pro transport siRNA *in vivo* jsou reaktivní hydrofilní polymery umožňující reakci s siRNA za vzniku kovalentní vazby. Pro navázání siRNA na polymerní nosič za vzniku stabilního konjugátu byly připraveny hydrofilní polymery na bázi HPMA obsahující amino-reaktivní (karbonylthiazolidin-2-thionové) TT skupiny. Zatímco polymer **HP1** má TT skupinu zabudovanou na konci polymerního řetězce (tzv. semitelehelický polymer), statistický kopolymer **HP3** má TT skupiny nahodile distribuované podél polymerního řetězce (tzv. multivalentní polymer). TT skupiny na polymeru byly využity pro reakci s terminální aminoskupinou modifikované siRNA (Seq-2) za vzniku stabilní amidové vazby.

Pro konjugaci siRNA na polymerní nosič za vzniku reduktivně štěpitelné vazby byly rovněž připraveny semitelehelický a multivalentní hydrofilní polymer na bázi HPMA, avšak obsahující thiol-reaktivní pyridyldisulfidové (PDS) skupiny. PDS skupiny na polymeru byly využity pro reakci s terminální thiolovou skupinou modifikované siRNA (Seq-3) za vzniku disulfidové vazby odštěpitelné v redukčním prostředí. Design této vazby vycházel z poznatku, že koncentrace přirozeně se vyskytujícího redukčního činidla L-glutathionu (L- $\alpha$ -glutamyl-L-cysteinyl glycin) uvnitř buněk je řádově 1000  $\times$  větší než v krevní plasmě (Chawla, Lewis et al. 1984), což znamená, že siRNA bude chráněna hydrofilním polymerním obalem v průběhu transportu k cílové buňce, ale po internalizaci dojde k jejímu uvolnění.

Molární hmotnosti připravených polymerů byly stanoveny na soustavě dvou sériově zapojených kolon TSK Gel Super AW 3000 a 4000 umožňující analýzu a separaci molekul v širokém rozmezí molárních hmotností. Hodnoty naměřených molárních hmotností ( $\bar{M}_w^{\text{pol}}$ ) a indexů neuniformit ( $\bar{M}_w^{\text{pol}}/\bar{M}_n^{\text{pol}}$ ) polymerů **HP1-HP4** stejně jako molární zastoupení komonomerů v polymerační násadě ( $X_{x/y}$ ) a poměry látkových množství reaktantů ( $[M] : [CTA] : [I]$ ) v polymerizační směsi jsou uvedeny v **tab. 5-2**. Příklady chromatogramů polymerů **HP1** a **HP3** jsou uvedeny na **obr. 5-3**, respektive **5-4**.



**Obr. 5-3:** SEC profil semitelechelického hydrofilního polymeru p(HPMA)-TT (**HP1**) vyneseny jako relativní odezva RI (černá čára) a LS (červená čára) detektorů v čase.



**Obr. 5-4:** SEC profil multivalentního hydrofilního polymeru p[(HPMA)-co-(Ma-β-Ala-TT)] (**HP3**) vyneseny jako relativní odezva RI (černá čára) a LS (červená čára) detektorů v čase.

Další důležitou charakteristikou reaktivních hydrofilních polymerů je obsah reaktivních skupin (TT, PDS) připadajících na jeden polymerní řetězec. Zatímco semitelechelické polymery **HP1** a **HP2** obsahovaly v průměru 0,9, resp. 0,6 reaktivních skupin na polymerní řetězec, v případě multivalentních polymerů **HP3** a **HP4** připadalo na každý řetězec v průměru 3,6 TT, resp. 4,9 PDS skupin. Znalost molárního obsahu reaktivních skupin na polymeru je důležitá především pro výpočet množství siRNA při tvorbě konjugátů. Stanovení obsahu TT (viz kapitola 4.4.4) a PDS (viz kapitola 4.4.5) bylo provedeno spektrofotometricky, výsledky stanovení jsou uvedeny v **tabulce 5-2**.

**Tabulka 5-2:** Charakteristiky reaktivních hydrofilních polymerů

Název	Struktura polymeru	$X_{x/y}$ <sup>1)</sup> [mol%]	[M]:[CTA]:[I]	$\bar{M}_w^{pol}$ [g/mol]	$\bar{M}_w^{pol}/\bar{M}_n^{pol}$	Obsah reaktivních skupin
HP1	p(HPMA) <sub>x</sub> -TT	100/0	700 : 2 : 1	24 410	1,1	0,9 TT/pol.
HP2	p(HPMA) <sub>x</sub> -PDS	100/0	-			0,6 PDS/pol.
HP3	p[(HPMA) <sub>x</sub> -co-(Ma-β-Ala-TT) <sub>y</sub> ]	95/5	450 : 2 : 1	19 350	1,1	3,6 TT/pol.
HP4	p[(HPMA) <sub>x</sub> -co-(Ma-AE-PDS) <sub>y</sub> ]	95/5	576 : 2 : 1	31 930	1,2	4,9 PDS/pol.

<sup>1)</sup> Hodnota  $X_{x/y}$  udává molární zastoupení komonomerů v polymerační násadě, kde x je hodnota pro HPMA a y je hodnota pro monomer s reaktivní skupinou

## 5.3 Příprava a charakterizace PEK

Pro přípravu PEK s siRNA byly použity polykationty na bázi AEMA s různým zastoupením primárních aminoskupin a imidazolových skupin (**PK1**, **PK2**, **PK3**) a diblokové kopolymery složené z hydrofilní složky (HPMA) a polykationtové složky (AEMA) s různým obsahem primárních amino skupin a imidazolových skupin (**PK4**, **PK5**, **PK6**) (viz **tabulka 5-1**).

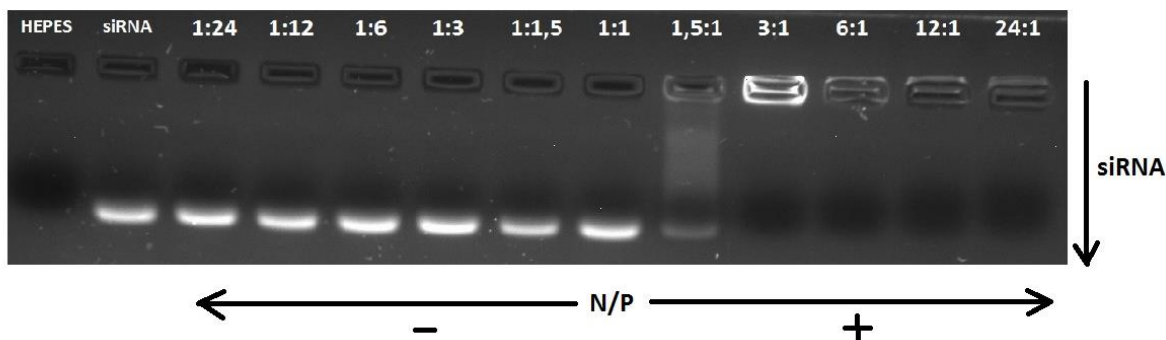
Z teoretických výpočtů i experimentálních dat popsanych v literatuře vyplývá, že hydrodynamicky stabilní komplexy dvou opačně nabitých polyelektrolytů lze připravit pouze

při použití neekvimolárního poměru jejich ionizovatelných skupin (při stechiometrickém poměru dochází ke vzniku hydrofobních elektroneutrálních částic, které precipitují z roztoku). Z hlediska přípravy PEK s siRNA se jako výhodné ukázalo použití molárního nadbytku kladně nabitých amino skupin polykationtu vůči záporně nabitým fosfátovým skupinám siRNA (N/P), a to zejména v *in vitro* pokusech, neboť komplexy nesoucí kladný povrchový náboj ochotně interagují s fosfolipidovými membránami buněk a dochází tak jejich efektivní internalizaci. Jelikož se polykationty použité v této práci lišily obsahem a typem ionizovatelné skupiny (různé pKa), bylo nutné stanovit, při které hodnotě N/P tvoří s siRNA stabilní komplexy. Vhodnou metodou se ukázala být elektroforéza v agarózovém gelu. K elektroforetickému stanovení kompenzace nábojů polyplexů (viz kapitola 4.5.2.1) byly připraveny PEK o různém N/P poměru (viz **tabulka 4-1**). PEK byly připraveny podle kapitoly 4.3.1, pouze v případě polykationtů nesoucích 100 % imidazolových skupin (**PK3** a **PK6**) musel být k jejich rozpuštění použit HEPES pufr (pH 5,5), a to kvůli nižší hodnotě pKa jejich ionizovatelných skupin ( $pK_a(I_m) \approx 6$ ), díky čemuž jsou špatně rozpustné při neutrálním pH (pH 7,4). Dalšími metodami, použitými v této práci k charakterizaci připravených polyplexů byly elektroforetický a dynamický rozptyl světla, umožňující stanovení velikosti jejich povrchového náboje (tzv. zeta-potenciálu) a hydrodynamické velikosti. Povrchový náboj (viz kapitola 4.4.7) a velikost PEK (viz kapitola 4.4.8) byly stanoveny pouze u PEK s N/P poměry 6:1, 12:1 a 24:1.

Pro samotný *in vitro* experiment umlčování genu pro GFP jsme vybrali pouze polyplexy s poměrem N/P = 24 : 1, které tvořily stabilní částice a měly také vyhovující koloidní charakteristiky (zeta potenciál, velikost částic, viz kapitola 5.3.2).

### 5.3.1 Elektroforetické sledování tvorby polyplexů

Připravené roztoky PEK byly nanášeny na agarózový gel (viz kapitola 4.5.2.1), načež byla sledována jejich elektroforetická mobilita v závislosti na molárním poměru polykationtu/siRNA. Nekompenzovaná siRNA byla vizualizována interkalačním fluorescenčním barvivem SYBR Green I. Příklad elektroforetické mobility směsi **PK4**/siRNA připravené v poměru 1:24 – 24:1 v přítomnosti SYBR Green I je uveden na **obr. 5-5**.



**Obr. 5-5:** Elektroforetické znázornění kompenzace nábojů směsi polykationtu **PK4** a siRNA připravené v poměru 1:24 – 24:1 v přítomnosti fluorescenční značky SYBR Green I.

Ze snímku je patrné, že s rostoucím obsahem zabudovaného polykationtu klesal podíl volné siRNA (intenzita fluorescence klesá) až do stavu úplné kompenzace nábojů ( $N/P = 1,5:1$ ), kdy docházelo k tvorbě elektroneutrálních stechiometrických komplexů. Při tomto poměru zabudovaný polykationt kompletně vytěsnil interkalované fluorescenční barvivo z dvoušroubovice siRNA, což se projevilo „zhasnutím“ fluorescence. V oblasti hodnot  $N/P$  vyšších než 1,5:1 byly již přítomny pouze stabilní kladně nabitě komplexy, které v důsledku vyšší molární hmotnosti a tudíž nižší elektroforetické mobility neopustily jamky. Hodnoty  $N/P$  odpovídající úplné kompenzaci nábojů ostatních polykationtů (**PK2** – **PK5**) jsou shrnuty v **tabulce 5-3**.

**Tabulka 5-3:** Kompenzace nábojů PEK

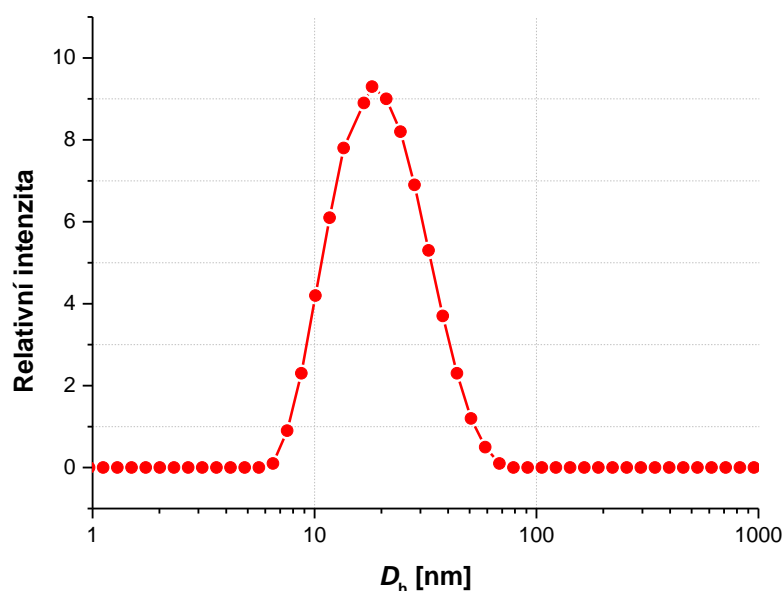
Název polyplexu	Použitý polykation	Název polykationtu	$N/P$ <sup>1)</sup>
PEK 1	p(AEMA)	PK1	1,5:1
PEK 2	p[(AEMA)-co-(AEMA-Im)]	PK2	3:1
PEK 3	p(AEMA-Im)	PK3	24:1
PEK 4	p[(HPMA)-b-(AEMA)]	PK4	1:1
PEK 5	p[(HPMA)-b-(AEMA-co-AEMA-Im)]	PK5	1,5:1
PEK 6	p[(HPMA)-b-(AEMA-Im)]	PK6	-

<sup>1)</sup> Hodnota  $N/P$  vyjadřuje molární poměr aminoskupin polykationtů ku fosfátovým skupinám siRNA, při kterém dochází k úplné kompenzaci nábojů

Z hodnot N/P poměrů pro polykationty **PK1 – PK5** uvedených v **tab. 5-3** je patrné, že schopnost polykationtů kompenzovat záporný náboj siRNA klesá s rostoucím obsahem imidazolových skupin, tj. že u polykationtů obsahující imidazolové skupiny je k dosažení úplné kompenzace nábojů potřeba použít většího nadbytku polykationtu. V případě PEK6 nebyla úplná kompenzace náboje pozorována ani při N/P poměru 24:1. Tento trend zjevně souvisí s ionizační schopností amino skupiny polykationtu při daném pH a je plně v souladu s literárními údaji.

### 5.3.2 Stanovení povrchového náboje a velikosti PEK

Pro stanovení velikostí částic a povrchového náboje byly použity PEK siRNA (viz **tabulka 5-3**) mající N/P poměr polyelektrolytů 24:1, jež (ve většině případů) garantuje tvorbu stabilních komplexů s kladným povrchovým nábojem. Hodnoty hydrodynamických průměrů PEK siRNA, stanovených pomocí dynamického rozptylu světla (DSL) (viz kapitola 4.4.8) a povrchových nábojů (zeta-potenciálu) PEK, stanovených metodou elektroforetického rozptylu světla (viz kapitola 4.4.7) jsou uvedeny v **tab. 5-4**. Příklad distribuce hydrodynamických průměrů PEK4 připraveného při poměru N/P = 24:1 je uveden v **obr. 5-6**.



**Obr. 5-6:** Distribuce hydrodynamických průměrů **PEK4** připraveného při poměru N/P = 24:1.



**Tabulka 5-4:** Hydrodynamické průměry ( $D_h$ ) a  $\zeta$ -potenciály PEK siRNA připravených v poměru N/P 24:1.

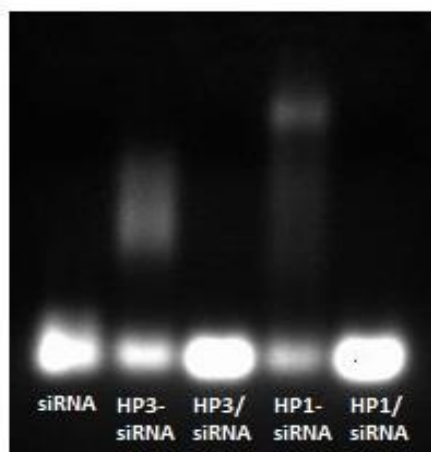
Název polyplexu	$D_h$ PEK [nm]	$\zeta$ - potenciál [mV]
PEK1	32	17
PEK2	38	19
PEK3	30	-1
PEK4	22	6
PEK5	26	10
PEK6	26	-1

V případě polyelektrolytových komplexů připravených při poměru N/P 6:1 a 12:1 nebylo možné zpracováním dat z dynamického a elektroforetického rozptylu světla získat přesné hodnoty velikosti částic ani  $\zeta$ -potenciálů, pravděpodobně z toho důvodu, že takto připravené komplexy tvořily velmi heterogenní, časově nestálou populaci částic. Z hodnot hydrodynamických průměrů PEK uvedených v **tab. 5-4** lze vyčíst, že všechny polykationty kondenzovaly siRNA do částic o velikosti  $\sim 20 - 30$  nm, přičemž mírně nižší hodnoty velikosti komplexů byly zaznamenány v případě použití diblokových kopolymerů. Můžeme spekulovat, že za menšími rozměry PEK stojí vrstva hydrofilního pHPMA bloku, která částečně eliminuje kladný povrchový náboj komplexů, čímž brání rozpínání řetězců polykationtu v důsledku elektrostatické repulze jeho nekompenzovaných amino skupin. To ostatně potvrzují i nižší hodnoty  $\zeta$ -potenciálů polyplexů připravených z diblokových kopolymerů ve srovnání s polyplexy připravených z kationtových homopolymerů, popř. statistických kopolymerů. V případě polyplexů tvořených siRNA a polymerem se 100 % imidazolových skupin (**PEK3** a **PEK6**) byly dokonce hodnoty  $\zeta$ -potenciálu v minusových hodnotách, což ale spíše nasvědčuje přítomnosti volné nekompenzované siRNA. To znamená, že polykationty s imidazolovými skupinami **PK3** a **PK6** nedokáží dostatečně kompenzovat záporný náboj na siRNA a tvořit tak stabilní částice ani při N/P poměru 24:1. Z těchto důvodů byly pro *in vitro* experimenty připraveny PEK s N/P poměrem 24:1, aby bylo zajištěno, že použité komplexy budou mít plně kompenzované náboje a nebude přítomna volná siRNA.

## 5.4 Příprava a charakterizace stabilních polymerních konjugátů siRNA

Stabilní konjugáty hydrofilních polymerů s siRNA byly připraveny reakcí polymerů **HP1** a **HP3**, nesoucích reaktivní TT skupiny, s chemicky modifikovanou RNA obsahující terminální amino skupinu (RNA-NH<sub>2</sub>, Seq 2) a následnou duplexací s „antisense“ RNA (Seq 4) (viz kapitola 4.3.2).

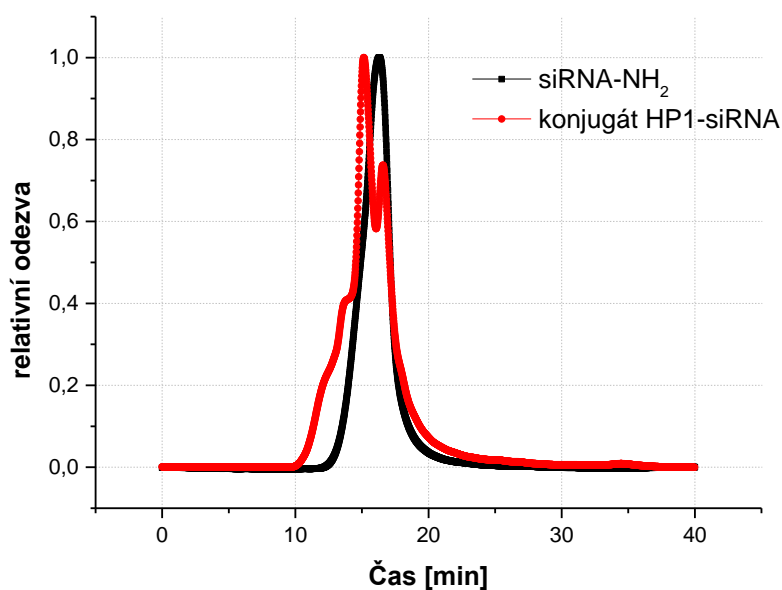
Připravené roztoky polymerních konjugátů siRNA (**HP1-siRNA** a **HP3-siRNA**) a kontrolní směsi polymerů s nemodifikovanou siRNA (**HP1/siRNA** a **HP3/siRNA**) byly naneseny na agarózový gel (viz kapitola 4.5.2.2), načež byla sledována jejich elektroforetická mobilita v přítomnosti fluorescenčního barviva SYBER Green I (viz **obr. 5-7**).



**Obr. 5-7:** Elektroforetogram porovnávající mobilitu polymerních konjugátů siRNA (**HP1-siRNA**, **HP3-siRNA**) a kontrolních směsí příslušného polymeru a siRNA (**HP1/siRNA**, **HP3/siRNA**). Vzorčky jsou vizualizovány interkalačním fluorescenčním barvivem SYBR Green I.

Z elektroforetogramu je patrné, že v případě polymerních konjugátů **HP1-siRNA** a **HP3-siRNA** je intenzita fluorescence volné siRNA výrazně nižší než v případě samotné siRNA a směsi nemodifikované siRNA (Seq 1) s příslušnými polymery (**HP1/siRNA** a **HP3/siRNA**), což indikuje, že došlo k vytvoření kovalentních konjugátů. K výraznějšímu snížení intenzity fluorescence došlo v případě použití semitelechelického polymeru **HP1**, který zřejmě ze sterických důvodů reaguje ochotněji s siRNA než multivalentní polymer **HP3**, jehož reaktivní skupiny mohou být skryté uvnitř polymerního klubla a tudíž hůře přístupné k reakci s siRNA. U vzorků polymerních konjugátů jsou rovněž viditelné méně intenzivní skvrny v prostřední části gelu, které pravděpodobně odpovídají kovalentním polymer-siRNA konjugátům, jež díky vyšším molárním hmotnostem migrují gelem pomaleji než volná siRNA. Konjugace modifikované siRNA s polymerními prekurzory byla rovněž

monitorována chromatografickými technikami, jako jsou SEC a HPLC. Příklad GPC chromatogramu po navázání siRNA-NH<sub>2</sub> na polymer HP1 je uveden na obr. 5-8.



**Obr. 5-8:** SEC profil siRNA-NH<sub>2</sub> (černá čára) a kovalentního konjugátu siRNA-NH<sub>2</sub> se semitelechelickým hydrofilním polymerem p(HPMA)-TT (**HP1**) (červená čára) vyneseny jako relativní odezva UV detektoru (260 nm).

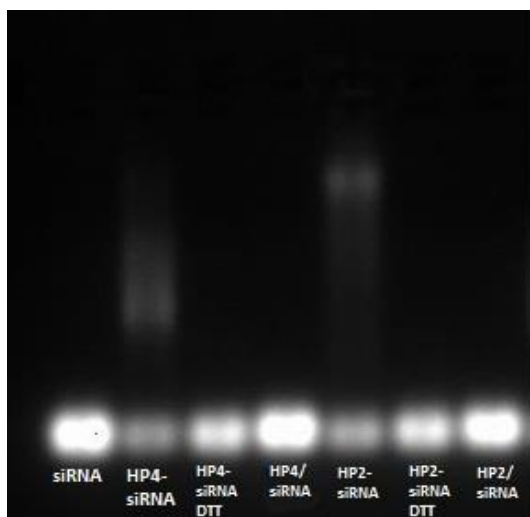
Z chromatogramu je patrné, že po navázání siRNA na polymerní nosič došlo k posunu maxima píku směrem k nižším retenčním časům, což indikuje nárůst molární hmotnosti (rozměru konjugátu) oproti siRNA. Zároveň je nutné konstatovat, že produkt obsahuje ~30 % nezreagované siRNA, která se na polymer nenavázala pravděpodobně z důvodu, že část jeho řetězců neobsahovalo TT reaktivní skupiny schopné reakce s amino skupinou modifikovanou siRNA. Tyto výsledky jsou v souladu s pozorováním průběhu reakce pomocí elektroforézy v agarózovém gelu (viz výše).

## 5.5 Příprava a charakterizace reduktivně štěpitelných polymerních konjugátů siRNA

Reduktivně štěpitelné konjugáty hydrofilních polymerů s siRNA byly připraveny reakcí polymerů **HP2** a **HP4**, nesoucích reaktivní PDS skupiny, s chemicky modifikovanou RNA obsahující terminální thiolovou skupinu (RNA-SH, Seq 3) a následnou duplexací s „antisense“ RNA (Seq4) (viz kapitola 4.3.3). Připravené roztoky polymerních konjugátů

siRNA (**HP2-siRNA** a **HP4-siRNA**), kontrolní směsi polymerů s nemodifikovanou siRNA (**HP2/siRNA** a **HP4/siRNA**) a vzorky polymerních konjugátů siRNA inkubovaných v 0,5 M roztoku DTT (**HP2-siRNA/DTT** a **HP4-siRNA/DTT**) byly naneseny na agarózový gel (viz kapitola 4.5.2.2), načež byla sledována jejich elektroforetická mobilita v přítomnosti fluorescenčního barviva SYBER Green I (viz **obr. 5-9**).

Intenzita fluorescence odpovídající volné siRNA je v případě polymerních konjugátů siRNA (**HP2-siRNA** a **HP4-siRNA**) výrazně nižší než v případě samotné siRNA a kontrolních směsí nemodifikované siRNA (Seq 1) s příslušnými polymery (**HP2/siRNA** a **HP4/siRNA**). Stejně jako v případě stabilních konjugátů **HP1-siRNA** a **HP3-siRNA** jsou také u konjugátů **HP2-siRNA** a **HP4-siRNA** viditelné méně intenzivní skvrny ve střední části gelu, které pravděpodobně odpovídají kovalentním, reduktivně odštěpitelným polymer-siRNA konjugátům, jež díky vyšším molárním hmotnostem migrují gelem pomaleji než volná siRNA. V případě vzorků polymerních konjugátů inkubovaných v přítomnosti činidla modelujícího reduktivní prostředí uvnitř buněk (0,5 M roztoku DTT) vzrostla intenzita skvrny ve spodní části gelu, odpovídající volné siRNA, téměř na hodnotu kontrolní siRNA, a zároveň zmizela skvrna ve střední části gelu odpovídající polymer-siRNA konjugátům, což značí, že došlo ke štěpení disulfidové vazby mezi siRNA a polymerem.



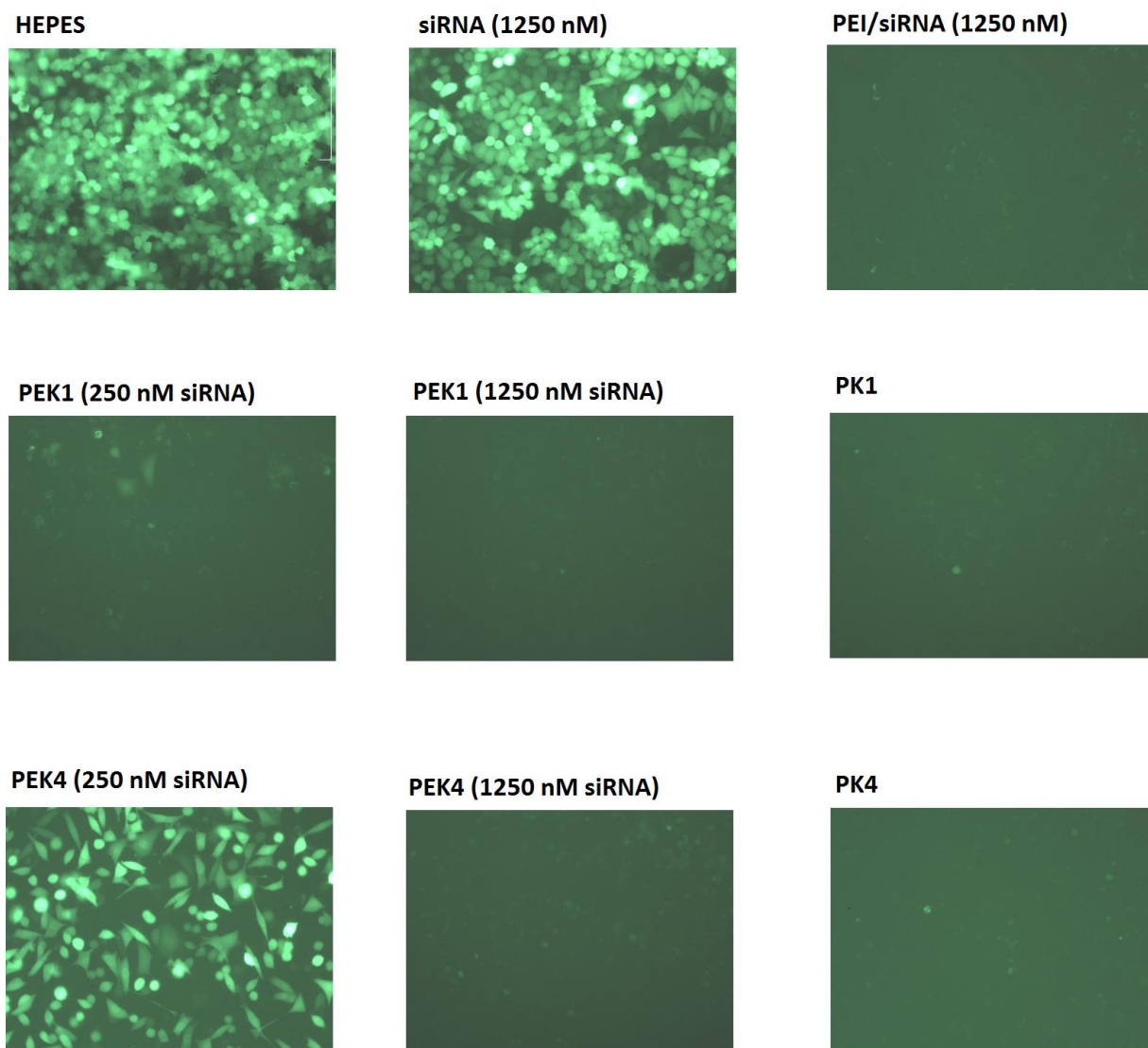
**Obr. 5-9:** Elektroforetogram porovnávající mobilitu vzorků: siRNA, polymerních konjugátů siRNA (**HP2-siRNA**, **HP4-siRNA**), kontrolních směsí příslušného polymeru a siRNA (**HP2/siRNA**, **HP4/siRNA**) a polymerních konjugátů inkubovaných 15 min v 0,5 M roztoku DTT. Vzorky jsou vizualizovány interkalačním fluorescenčním barvivem SYBR Green I.

## 5.6 *In vitro* sledování umlčování GFP genu pomocí připravených PEK siRNA a polymerních konjugátů siRNA

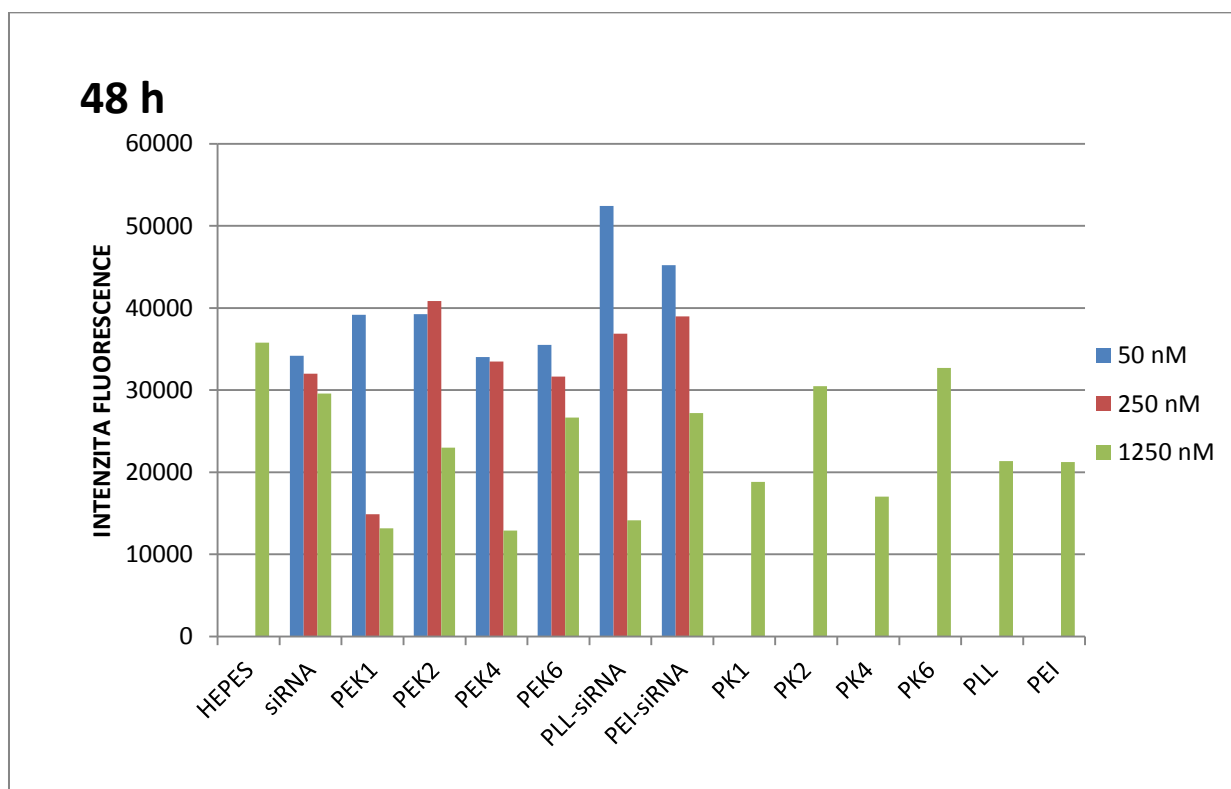
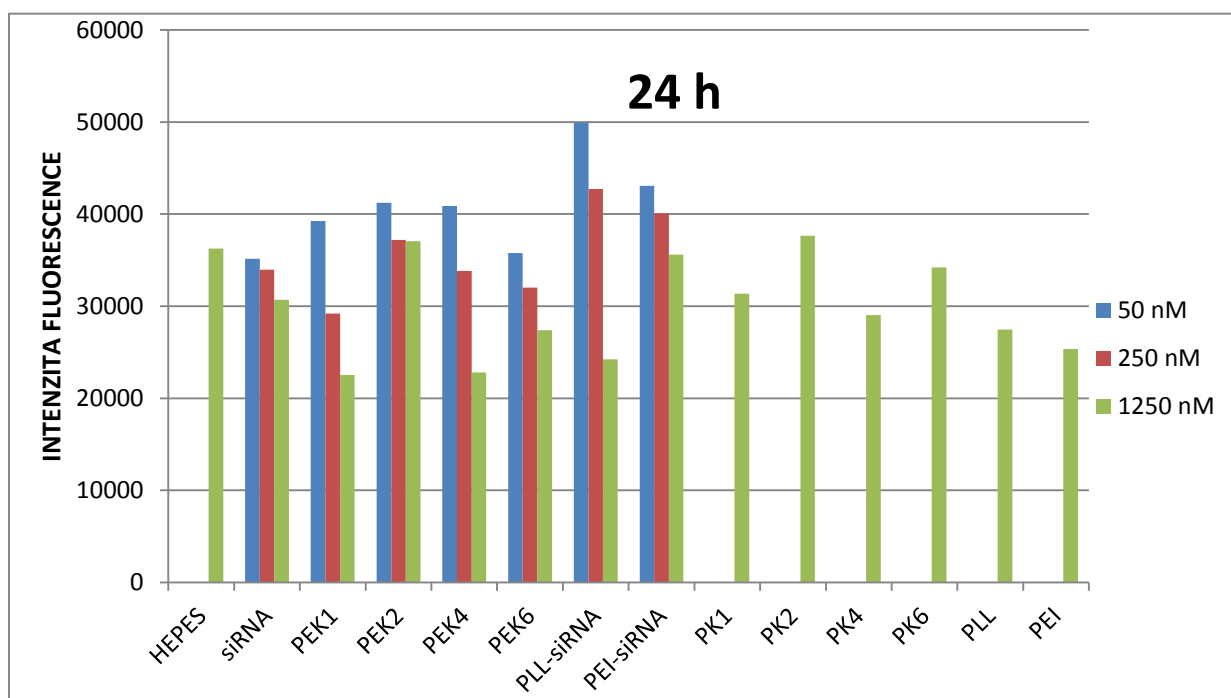
Roztoky připravených polyelektrolytových komplexů siRNA a polymerních konjugátů siRNA byly naneseny na GFP-modifikované HeLa buňky (viz kapitola 4.5.4) a po 24 h a 48 h inkubace byla sledována jejich biologická účinnost z hlediska umlčování genu pro GFP, vyhodnocené z poklesu intenzity fluorescence GFP, produkovaného buňkou.

Pokles intenzity fluorescence GFP vyvolaný přítomností vybraných polyplexů (**PEK1** a **PEK4**) je znázorněn na fotografiích z fluorescenčního mikroskopu (viz **obr. 5-10**). Relativní hodnoty intenzity fluorescence HeLa buněk produkujících GFP byly získány fluorometrickým stanovením (viz kapitola 4.5.6) po 24 a 48 h inkubace v přítomnosti připravených polyplexů a byly vyneseny do grafu (viz **obr. 5-11**). Vybrané vzorky, vykazující silencing GFP-modifikovaných HeLa buněk zaznamenaný fluorescenčním mikroskopem a fluorometrickým stanovením, byly dále analyzovány pomocí průtokové cytometrie (viz kapitola 4.5.7). Hodnoty mediánů intenzity fluorescencí jsou uvedeny v **tab. 5-5**.

V případě vzorků polymerních konjugátů siRNA (stabilních i reduktivně odštěpitelných) nebyl pozorován žádný pokles intenzity fluorescence. Konjugáty siRNA jsou tvořené hydrofilními nenabitými polymery, které nenesou ve své struktuře žádné ionizovatelné skupiny, které by umožňovaly osmotické bobtnání a následné prasknutí endozomu (efekt protonové houby), tak jako v případě polyelektrolytových komplexů. Pravděpodobně z tohoto důvodu byly konjugáty siRNA po pohlcení buňkou uvězněny v endozomu, kde došlo k enzymatickému rozkladu siRNA.



**Obr. 5-10:** Obrázky z fluorescenčního mikroskopu zachycující GFP-modifikované HeLa buňky po 48 h inkubace v HEPES pufru (pH 7,4), se samotnou siRNA (1250 nM), s PEK siRNA - konkrétně **PEK1** a **PEK4** při koncentracích siRNA – 250 nM a 1250 nM. Jako negativní kontroly byly použity příslušné polykationty bez siRNA – **PK1** a **PK2**, při nejvyšších koncentracích (30  $\mu$ M).



**Obr. 5-11:** Grafické znázornění poklesu intenzity fluorescence GFP u vybraných vzorků polyplexů siRNA (**PEK1**, **PEK2**, **PEK4**, **PEK6**) v závislosti na použité koncentraci siRNA. Jako negativní kontroly byly použity vzorky HEPES pufru (pH 7,4) a samotné siRNA a jako pozitivní kontroly byly použity polyplexy tvořené siRNA a komerčně dostupnými polykationy: poly-L-lyzin (PLL)/siRNA a polyethylenimin (PEI)/siRNA. Jako negativní kontroly byly použity také samotné polykationy – **PK1**, **PK2**, **PK4**, **PK6**, PLL, PEI.

U vzorků GFP-modifikovaných buněk inkubovaných s PEK siRNA (**PEK1**, **PEK2**, **PEK4** a částečně **PEK6**) je z grafu relativních hodnot intenzity fluorescence (**obr. 5-11**) viditelný pokles intenzity GFP v závislosti na koncentraci siRNA, což by mohlo znamenat, že polyplexy úspěšně dopravují siRNA do cytoplazmy buněk, kde dochází k umlčení genu pro GFP. Podobné výsledky byly ovšem pozorovány i v případě samotných polykationtů **PK1** a **PK4**, kde rovněž docházelo k poklesu intenzity fluorescence GFP, což může značit, že pokles intenzity fluorescence GFP nesouvisí se schopností umlčování genu pro GFP, ale spíše s cytotoxicitou daných polykationtů. Pouze v případě polykationtů **PK2** a **PK6**, které mají z 50% modifikované aminoskupiny na imidazolové skupiny, není viditelný výrazný pokles intenzity fluorescence GFP. Z toho lze usoudit, že tyto polykationty by mohly být vhodným kandidátem pro přenos a řízené uvolňování siRNA. Pro zjištění přesných hodnot mediánů fluorescenční intenzity (MFI) byla u vzorků vykazujících silencing GFP genu dále provedena FACS analýza. Buňky byly analyzovány po 48 h inkubace v přítomnosti vybraných PEK siRNA (viz **tab. 5-5**).

**Tab. 5-5:** Mediány fluorescenčních intenzit (MFI) získané z FACS analýzy GFP-modifikovaných HeLa buněk po 48 h inkubace v přítomnosti vybraných PEK siRNA.

	C <sub>siRNA</sub> [nM]	MFI
HEPES		67999
PEK1	250	15196
	1250	3608
PEK2	1250	3834
PEK4	250	42151
	1250	3405
PLL-siRNA	250	63013
	1250	3800
PK1		3542
PK2		67171
PK4		3323
PLL		3742

Hodnoty mediánů intenzity fluorescence (viz **tab. 5-5**) do jisté míry korelují s výsledky relativních hodnot intenzity fluorescence (viz **obr. 5-11**). U polykationtů **PK1** a **PK4** je hodnota MFI přibližně stejná jako u jejich polyplexů – **PEK1** a **PEK4**, která může být způsobená cytotoxicitou daných polykationtů. Z těchto důvodů byl proveden také test životaschopnosti buněk, jejichž přesné hodnoty jsou uvedeny v **tab. 5-6**. V případě



polykationtu **PK2** a jeho polyplexu **PEK2** je výrazný rozdíl v MFI hodnotách, z čehož lze usuzovat, že pokles intenzity fluorescence GFP u **PEK2** je způsoben efektivním transportem siRNA do cytoplazmy buněk.

**Tab. 5-6:** Vyhodnocení cytotoxicit vybraných polyplexů siRNA a příslušných polykationtů

Polyplexy siRNA	IC <sub>50</sub> [μM]	polykation	IC <sub>50</sub> [μM]
<b>PEK1</b>	1,88	<b>PK1</b>	1,59
<b>PEK2</b>	-	<b>PK2</b>	-
<b>PEK4</b>	5,69	<b>PK4</b>	3,23
<b>PEK6</b>	-	<b>PK6</b>	-
<b>PLL-siRNA</b>	6,90	<b>PLL</b>	5,88

Z výsledku cytotoxicit je patrné, že polykationty, které nesou ve své struktuře pouze primární aminoskupiny, jsou poměrně toxické. Nižší cytotoxicita u polykationtu **PK4** (resp. jeho polyplexu **PEK4**) (vyšší hodnota IC<sub>50</sub>) než u polykationtu **PK1** (resp. **PEK1**) je pravděpodobně dána přítomností hydrofilního bloku p(HPMA) u PK4, který částečně eliminuje kladný povrchový náboj. Polykationty, které mají ve své struktuře zabudované z 50% imidazolové skupiny, nevykazovaly cytotoxicitu ani při nejvyšší použité koncentraci (30 μM). Z výsledků cytotoxicit můžeme potvrdit, že pokles intenzity fluorescence GFP u GFP – modifikovaných HeLa buněk inkubovaných s **PEK1** a **PEK4** je způsoben cytotoxicitou daných polykationtů, nikoliv efektivním umlčením genu pro GFP pomocí siRNA.

## 6. ZÁVĚR

Hlavním cílem předkládané diplomové práce bylo navázat na současné poznatky o využití vodorozpustných polymerních nosičů léčiv a připravit takové polymerní dopravní systémy, které dokáží efektivně dopravit terapeutickou molekulu siRNA do místa účinku, tedy do cytoplazmy poškozených buněk, kde by mohly zahájit posttranskripční umlčování cílového genu.

Pro dopravu siRNA byly připraveny řízenou radikálovou polymerací (RAFT technikou) dva typy hydrofilních polymerních nosičů, a to kladně nabitě polymery (polykationty), které umožňují díky elektrostatickým interakcím vytvořit se záporně nabitou molekulou siRNA polyelektrolytový komplex (PEK) a hydrofilní nenabitě polymery, které mají ve své struktuře zabudované reaktivní skupiny pro kovalentní navázání chemicky modifikované siRNA.

Byly syntetizovány dvě strukturně odlišné skupiny polykationtů s různým typem ionizovatelných skupin (primární aminoskupiny, imidazolové skupiny a jejich kombinace) – (i) kationtové homopolymery a (ii) diblokové kopolymery sestávající z kladně nabitěho a elektroneutrálního hydrofilního bloku. Pro vytvoření PEK siRNA byla použita sekvence siRNA, která umožňuje specifické umlčení genu pro zelený fluorescenční protein (GFP). Smísením vodných roztoků polykationtů a siRNA s molárním nadbytkem polykationtu (PK) byly připraveny polyelektrolytové komplexy. Metodami dynamického rozptylu světla a elektroforézou v agarózovém gelu bylo ukázáno, že schopnost PK kondenzovat molekulu siRNA do kompaktních částic závisí struktuře, složení a molárním poměru kladně nabitých skupin PK ku záporně nabitým skupinám siRNA (N/P). Nejstabilnější komplexy byly připravené v poměru  $N/P = 24:1$  jejichž hydrodynamické průměry se pohybovaly v rozmezí 20 – 30 nm, a povrchový náboj byl (ve většině případů) kladný.

Další skupinou připravených polymerů byly hydrofilní nenabitě polymery na bázi *N*-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu, které mají ve své struktuře zabudované reaktivní skupiny pro kovalentní navázání modifikované siRNA. Byly připraveny dva typy hydrofilních polymerů – (i) semitelechelické polymery, obsahující přibližně 1 reaktivní skupinu na konci polymerního řetězce a (ii) multivalentní polymer, obsahující v průměru 4-5 reaktivních skupin náhodně rozmístěných podél polymerního řetězce. Použité reaktivní skupiny byly buďto karbonylthiazolidin-2-thionová (TT), na kterou byla následně navázána chemicky modifikovaná siRNA s terminální aminoskupinou za vzniku stabilního konjugátu, nebo

thiolová (SH), na kterou byla následně navázána siRNA s terminální SH skupinou za vzniku reduktivně štěpitelného konjugátu siRNA. Úspěšné navázání modifikované siRNA na polymerní nosič za vzniku kovalentních konjugátů bylo prokázáno pomocí elektroforézy v agarózovém gelu a chromatografickými technikami.

*In vitro* biologická účinnost připravených PEK siRNA a polymerních konjugátů siRNA byl hodnocena z hlediska jejich schopností způsobit umlčení GFP genu produkovaného GFP-modifikovanými HeLa buňkami. Účinnosti jednotlivých siRNA vektorů byly vyhodnocovány z poklesu intenzity fluorescence GFP.

V případě konjugátů siRNA nebyl pozorován žádný pokles intenzity fluorescence GFP. Konjugáty siRNA byly pravděpodobně po pohlcení buňkou rozloženy účinkem hydrolytických enzymů v lysozomu, jelikož nenesou ve své struktuře žádně ionizovatelné skupiny, které by umožňovány únik z endozomu vlivem „efektu protonové houby“.

Naproti tomu u buněk inkubovaných s PEK siRNA byl pozorován signifikantní pokles intenzity fluorescence GFP, který byl ale ve většině případů pravděpodobně způsoben cytotoxicitou daných polykationtů, nikoliv úspěšným umlčovacím efektem. Pouze v případě polyplexu **PEK2**, tvořeného siRNA a statistickým kopolymerem p[(AEMA)-*co*-(AEMA-Im)] byl pozorován pokles intenzity fluorescence GFP a zároveň nebyl v nejvyšší použité koncentraci polymeru (30  $\mu$ M) toxický. Z těchto výsledků lze vyvodit závěr, že pokles intenzity fluorescence GFP byl způsoben efektivním umlčením genu pro GFP.

Aby bylo možné dostupnými flourometrickými technikami pozorovat pokles intenzity fluorescence GFP u GFP – modifikovaných HeLa buněk po 48 h inkubace v přítomnosti připravených PEK siRNA a kontrolními PEK, musela být použita relativně vysoká koncentrace siRNA (1250 nM). Jelikož byl při této koncentraci způsoben pokles intenzity fluorescence i v případě pozitivních kontrol (poly-L-lyzin / siRNA, polyetylenimin / siRNA a lipofectamine 3000 / siRNA) byl pravděpodobně toxicitou použitých polykationtů, lze vyvodit závěr, že použitá sekvence siRNA nebyla dostatečně účinná pro umlčení genu pro GFP.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Akinc, A., M. Thomas, A. M. Klibanov and R. Langer (2005). "Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis." *J Gene Med* 7(5): 657-663.
- Behlke, M. A. (2006). "Progress towards in vivo use of siRNAs." *Molecular Therapy* 13(4): 644-670.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond and G. J. Hannon (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." *Nature* 409(6818): 363-366.
- Bernstein, E., S. Y. Kim, M. A. Carmell, E. P. Murchison, H. Alcorn, M. Z. Li, A. A. Mills, S. J. Elledge, K. V. Anderson and G. J. Hannon (2003). "Dicer is essential for mouse development." *Nature Genetics* 35(3): 215-217.
- Brennecke, J., D. R. Hipfner, A. Stark, R. B. Russell and S. M. Cohen (2003). "bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila." *Cell* 113(1): 25-36.
- Carmell, M. A. and G. J. Hannon (2004). "RNase III enzymes and the initiation of gene silencing." *Nature Structural & Molecular Biology* 11(3): 214-218.
- Catuogno, S., Esposito, C. L., Quintavalle, C., Cerchia, L., Condorelli, G., & de Franciscis, V. (2011). "Recent Advance in Biosensors for microRNAs Detection in Cancer". *Cancers* 3(2): 1877-1898.
- Chawla, R. K., F. W. Lewis, M. H. Kutner, D. M. Bate, R. G. B. Roy and D. Rudman (1984). "PLASMA CYSTEINE, CYSTINE, AND GLUTATHIONE IN CIRRHOSIS." *Gastroenterology* 87(4): 770-776.
- Chendrimada, T. P., R. I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura and R. Shiekhattar (2005). "TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing." *Nature* 436(7051): 740-744.
- Choi, Y. H., F. Liu, J. S. Kim, Y. K. Choi, J. S. Park and S. W. Kim (1998). "Polyethylene glycol-grafted poly-L-lysine as polymeric gene carrier." *Journal of Controlled Release* 54(1): 39-48.
- Chollet, P., M. C. Favrot, A. Hurbin and J. L. Coll (2002). "Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes." *Journal of Gene Medicine* 4(1): 84-91.
- Cogoni, C., J. T. Irelan, M. Schumacher, T. J. Schmidhauser, E. U. Selker and G. Macino (1996). "Transgene silencing of the al-1 gene in vegetative cells of Neurospora is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation." *EMBO J* 15(12): 3153-3163.
- Crombez, L., G. Aldrian-Herrada, K. Konate, Q. N. Nguyen, G. K. McMaster, R. Brasseur, F. Heitz and G. Divita (2009). "A New Potent Secondary Amphipathic Cell-penetrating Peptide for siRNA Delivery Into Mammalian Cells." *Molecular Therapy* 17(1): 95-103.
- Dalby, B., S. Cates, A. Harris, E. C. Ohki, M. L. Tilkins, P. J. Price and V. C. Ciccarone (2004). "Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications." *Methods* 33(2): 95-103.
- de Jong, S., G. Chikh, L. Sekirov, S. Raney, S. Semple, S. Klimuk, N. Yuan, M. Hope, P. Cullis and Y. Tam (2007). "Encapsulation in liposomal nanoparticles enhances the immunostimulatory, adjuvant and anti-tumor activity of subcutaneously administered CpG ODN." *Cancer Immunology Immunotherapy* 56(8): 1251-1264.

- Denli, A. M., B. B. J. Tops, R. H. A. Plasterk, R. F. Ketting and G. J. Hannon (2004). "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex." *Nature* **432**(7014): 231-235.
- DeVincenzo, J., J. E. Cehelsky, L. Alvarez, A. Elbashir, S. Elbashir, J. Harborth, I. Toudjarska, L. Nechev, V. Murugaiah, A. Van Vliet, A. K. Vaishnav, R. Meyers (2008). "Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV)." *Antivir Res* **77**(3): 225-231.
- Ding, Y., Z. W. Jiang, K. Saha, C. S. Kim, S. T. Kim, R. F. Landis and V. M. Rotello (2014). "Gold Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery." *Molecular Therapy* **22**(6): 1075-1083.
- Doi, N., S. Zenno, R. Ueda, H. Ohki-Hamazaki, K. Ui-Tei and K. Saigo (2003). "Short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires dicer and eIF2C translation initiation factors." *Current Biology* **13**(1): 41-46.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber and T. Tuschl (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." *Nature* **411**(6836): 494-498.
- Fire, A., S. Q. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **391**(6669): 806-811.
- Frankel, A. D. and C. O. Pabo (1988). "CELLULAR UPTAKE OF THE TAT PROTEIN FROM HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS." *Cell* **55**(6): 1189-1193.
- Gatignol, A., A. Bucklerwhite, B. Berkhout and K. T. Jeang (1991). "CHARACTERIZATION OF A HUMAN TAR RNA-BINDING PROTEIN THAT ACTIVATES THE HIV-1 LTR." *Science* **251**(5001): 1597-1600.
- Girard, A., R. Sachidanandam, G. J. Hannon and M. A. Carmell (2006). "A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins." *Nature* **442**(7099): 199-202.
- Gitlin, L., S. Karelsky and R. Andino (2002). "Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells." *Nature* **418**(6896): 430-434.
- Green, M. and P. M. Loewenstein (1988). "AUTONOMOUS FUNCTIONAL DOMAINS OF CHEMICALLY SYNTHESIZED HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TAT TRANS-ACTIVATOR PROTEIN." *Cell* **55**(6): 1179-1188.
- Hamilton, A. J. and D. C. Baulcombe (1999). "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants." *Science* **286**(5441): 950-952.
- Hammond, S. M., E. Bernstein, D. Beach and G. J. Hannon (2000). "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells." *Nature* **404**(6775): 293-296.
- Hammond, S. M., S. Boettcher, A. A. Caudy, R. Kobayashi and G. J. Hannon (2001). "Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi." *Science* **293**(5532): 1146-1150.
- Hornung, V., M. Guenther-Biller, C. Bourquin, A. Ablasser, M. Schlee, S. Uematsu, A. Noronha, M. Manoharan, S. Akira, A. de Fougerolles, S. Endres and G. Hartmann (2005). "Sequence-specific potent induction of IFN- $\alpha$  by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7." *Nature Medicine* **11**(3): 263-270.
- Howard, K. A., U. L. Rahbek, X. D. Liu, C. K. Damgaard, S. Z. Glud, M. O. Andersen, M. B. Hovgaard, A. Schmitz, J. R. Nyengaard, F. Besenbacher and J. Kjems (2006). "RNA interference in vitro and in vivo using a chitosan/siRNA nanoparticle system." *Molecular Therapy* **14**(4): 476-484.

- Jung, C. R., J. Yoo, Y. J. Jang, S. Kim, I. S. Chu, Y. I. Yeom, J. Y. Choi and D. S. Iml (2006). "Adenovirus-mediated transfer of siRNA against PTTG1 inhibits liver cancer cell growth in vitro and in vivo." Hepatology **43**(5): 1042-1052.
- Kaiser, P. K., R. C. A. Symons, S. M. Shah, E. J. Quinlan, H. Tabandeh, D. V. Do, G. Reisen, J. A. Lockridge, B. Short, R. Guerciolini, Q. D. Nguyen and I. Sirna-027 Study (2010). "RNAi-Based Treatment for Neovascular Age-Related Macular Degeneration by Sirna-027." American Journal of Ophthalmology **150**(1): 33-39.
- Kostka, L., C. Konak, V. Subr, M. Spirkova, Y. Addadi, M. Neeman, T. Lammers and K. Ulbrich (2011). "Removable Nanocoatings for siRNA Polyplexes." Bioconjugate Chemistry **22**(2): 169-179.
- Laga, R., R. Carlisle, M. Tangney, K. Ulbrich and L. W. Seymour (2012). "Polymer coatings for delivery of nucleic acid therapeutics." Journal of Controlled Release **161**(2): 537-553.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum and V. Ambros (1993). "THE C-ELEGANS HETEROCHRONIC GENE LIN-4 ENCODES SMALL RNAS WITH ANTISENSE COMPLEMENTARITY TO LIN-14." Cell **75**(5): 843-854.
- Lee, Y., C. Ahn, J. J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim and V. N. Kim (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." Nature **425**(6956): 415-419.
- Lee, Y., K. Jeon, J. T. Lee, S. Kim and V. N. Kim (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." Embo Journal **21**(17): 4663-4670.
- Lee, Y., M. Kim, J. J. Han, K. H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek and V. N. Kim (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." Embo Journal **23**(20): 4051-4060.
- Lee, Y. S., K. Nakahara, J. W. Pham, K. Kim, Z. Y. He, E. J. Sontheimer and R. W. Carthew (2004). "Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways." Cell **117**(1): 69-81.
- Lewis, D. L., J. E. Hagstrom, A. G. Loomis, J. A. Wolff and H. Herweijer (2002). "Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice." Nature Genetics **32**(1): 107-108.
- Li, W. J. and F. C. Szoka (2007). "Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery." Pharmaceutical Research **24**(3): 438-449.
- Ma, E., K. Zhou, M. A. Kidwell and J. A. Doudna (2012). "Coordinated Activities of Human Dicer Domains in Regulatory RNA Processing." Journal of Molecular Biology **422**(4): 466-476.
- Ma, J. B., K. Q. Ye and D. J. Patel (2004). "Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain." Nature **429**(6989): 318-322.
- Makinen, P. I., J. K. Koponen, A. M. Karkkainen, T. M. Malm, K. H. Pulkkinen, J. Koistinaho, M. P. Turunen and S. Yla-Herttuala (2006). "Stable RNA interference: comparison of U6 and H-1 promoters in endothelial cells and in mouse brain." Journal of Gene Medicine **8**(4): 433-441.
- Martino, S., I. di Girolamo, R. Tiribuzi, F. D'Angelo, A. Datti and A. Orlicchio (2009). "Efficient siRNA Delivery by the Cationic Liposome DOTAP in Human Hematopoietic Stem Cells Differentiating into Dendritic Cells." Journal of Biomedicine and Biotechnology: 7.
- Matranga, C., Y. Tomari, C. Shin, D. P. Bartel and P. D. Zamore (2005). "Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes." Cell **123**(4): 607-620.

- Meister, G., M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng and T. Tuschl (2004). "Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs." Molecular Cell **15**(2): 185-197.
- Meister, G. and T. Tuschl (2004). "Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA." Nature **431**(7006): 343-349.
- Mocellin S. and V. Provenzano (2004). "RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology." Journal of Translational Medicine **39**(2).
- Muratovska, A. and M. R. Eccles (2004). "Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells." Febs Letters **558**(1-3): 63-68.
- Napoli, C., C. Lemieux and R. Jorgensen (1990). "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans." The Plant Cell **2**(4): 279-289.
- Okamura, K., A. Ishizuka, H. Siomi and M. C. Siomi (2004). "Distinct roles for argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways." Genes & Development **18**(14): 1655-1666.
- Pham, J. W., J. L. Pellino, Y. S. Lee, R. W. Carthew and E. J. Sontheimer (2004). "A Dicer-2-dependent 80S complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in Drosophila." Cell **117**(1): 83-94.
- Qin, X. F., D. S. An, I. S. Y. Chen and D. Baltimore (2003). "Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(1): 183-188.
- Reschel, T. *Polyelektrolytové komplexy DNA se syntetickými polymery jako vektory pro dopravu genů in vivo*, 2002, Disertační práce, Karlova Universita, Praha.
- Ruiz, M. T., O. Voinnet and D. C. Baulcombe (1998). "Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing." Plant Cell **10**(6): 937-946.
- Saito, K., K. M. Nishida, T. Mori, Y. Kawamura, K. Miyoshi, T. Nagami, H. Siomi and M. C. Siomi (2006). "Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the Drosophila genome." Genes & Development **20**(16): 2214-2222.
- Semple, S. C., S. K. Klimuk, T. O. Harasym, N. Dos Santos, S. M. Ansell, K. F. Wong, N. Maurer, H. Stark, P. R. Cullis, M. J. Hope and P. Scherrer (2001). "Efficient encapsulation of antisense oligonucleotides in lipid vesicles using ionizable aminolipids: formation of novel small multilamellar vesicle structures." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1510**(1-2): 152-166.
- Sen, G. L. and H. M. Blau (2005). "Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies." Nature Cell Biology **7**(6): 633-U628.
- Siomi, H. and M. C. Siomi (2009). "On the road to reading the RNA-interference code." Nature **457**(7228): 396-404.
- Song, J. J., S. K. Smith, G. J. Hannon and L. Joshua-Tor (2004). "Crystal structure of argonaute and its implications for RISC slicer activity." Science **305**(5689): 1434-1437.
- Sonawane, N. D., F. C. Szoka and A. S. Verkman (2003). "Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes." Journal of Biological Chemistry **278**(45): 44826-44831.
- Snyder, S. L. and P. Z. Sobocinski (1975). "IMPROVED 2,4,6-TRINITROBENZENESULFONIC ACID METHOD FOR DETERMINATION OF AMINES." Analytical Biochemistry **64**(1): 284-288.

- Subr, V., C. Konak, R. Laga and K. Ulbrich (2006). "Coating of DNA/poly(L-lysine) complexes by covalent attachment of poly N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide." Biomacromolecules **7**(1): 122-13.
- Subr, V., L. Kostka, J. Strohalm, T. Etrych and K. Ulbrich (2013). "Synthesis of Well-Defined Semitelechelic Poly N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide Polymers with Functional Group at the alpha-End of the Polymer Chain by RAFT Polymerization." Macromolecules **46**(6): 2100-2108.
- Symonds, P., J. C. Murray, A. C. Hunter, G. Debska, A. Szewczyk and S. M. Moghimi (2005). "Low and high molecular weight poly(L-lysine)s/poly(L-lysine) - DNA complexes initiate mitochondrial-mediated apoptosis differently." Febs Letters **579**(27): 6191-6198.
- Tomari, Y., C. Matranga, B. Haley, N. Martinez and P. D. Zamore (2004). "A protein sensor for siRNA asymmetry." Science **306**(5700): 1377-1380.
- Ulbrich, K. and V. Subr (2010). "Structural and chemical aspects of HPMa copolymers as drug carriers." Advanced Drug Delivery Reviews **62**(2): 150-166.
- Ulbrich, K., V. Subr, J. Strohalm, D. Plocova, M. Jelinkova and B. Rihova (2000). "Polymeric drugs based on conjugates of synthetic and natural macromolecules I. Synthesis and physico-chemical characterisation." Journal of Controlled Release **64**(1-3): 63-79.
- Wagner, E. and J. Kloeckner (2006). Gene delivery using polymer therapeutics. Polymer Therapeutics I: Polymers as Drugs, Conjugates and Gene Delivery Systems. R. SatchiFainaro and R. Duncan. Berlin, Springer-Verlag Berlin. **192**: 135-173.
- Whitehead, K. A., R. Langer and D. G. Anderson (2010). "Knocking down barriers: advances in siRNA delivery (vol 8, pg 129, 2009)." Nature Reviews Drug Discovery **9**(5): 412-412.
- Wilkins, C., R. Dishongh, S. C. Moore, M. A. Whitt, M. Chow and K. Machaca (2005). "RNA interference is an antiviral defence mechanism in *Caenorhabditis elegans*." Nature **436**(7053): 1044-1047.
- Wu, L. G., J. H. Fan and J. G. Belasco (2006). "MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(11): 4034-4039.
- Yoshikawa, M., A. Peragine, M. Y. Park and R. S. Poethig (2005). "A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*." Genes & Development **19**(18): 2164-2175.
- Zambon, R. A., V. N. Vakharia and L. P. Wu (2006). "RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*." Cellular Microbiology **8**(5): 880-889.
- Zhang, H. D., F. A. Kolb, L. Jaskiewicz, E. Westhof and W. Filipowicz (2004). "Single processing center models for human dicer and bacterial RNase III." Cell **118**(1): 57-68.
- Zhou, J. H., J. Y. Wu, N. Hafdi, J. P. Behr, P. Erbacher and L. Peng (2006). "PAMAM dendrimers for efficient siRNA delivery and potent gene silencing." Chem Co (22): 2362-2364.
- Zou, S. M., P. Erbacher, J. S. Remy and J. P. Behr (2000). "Systemic linear polyethylenimine (L-PEI)-mediated gene delivery in the mouse." Journal of Gene Medicine **2**(2): 128-134.