Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory:

Molekulární biologie a biochemie organismů

Jana Blažková

Polymerní systémy pro dopravu siRNA

Polymer systems for siRNA delivery

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Ing. Michal Pechar, Csc.

Praha, 2013

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 dne 11.5.2012

Jana Blažková

Chtěla bych velmi poděkovat svému školiteli Ing. Michalu Pecharovi, CSc. za cenné připomínky, odborné rady a za nekonečnou trpělivost v průběhu sepisování této práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu.

Abstrakt

Proces RNA interference (RNAi) je přirozený jev, při kterém dochází prostřednictvím malých dvouřetězcových RNA molekul (dsRNA) k posttranskripční regulaci exprese genů. „Small interfering RNA“ (siRNA) je malá dsRNA, kterou můžeme využít pro cílené umlčování genů, jakožto alternativní terapeutickou léčbu geneticky podmíněných onemocnění. Pro *in vivo* aplikaci je nutné siRNA ochránit před degradací, abychom zajistili její efektivní dopravení do cílových buněk pomocí sofistikovaných vektorů. Tato práce je zaměřená především na na popis nevirových vektorů na bázi kladně nabitých polymerů, tvořících s siRNA polyelektrolytové komplexy (polyplexy), a povrchově modifikujících hydrofilních polymerů zajišťující ochranu vektoru během transportu v krvi.

Klíčová slova: siRNA, genová terapie, polymerní nosiče léčiv, cílený transport

Abstract

The process of RNA interference (RNAi) is a natural phenomenon posttranscriptionally controlling gene expression by means of small double-stranded RNA molecules (dsRNA). Small interfering RNA (siRNA) is a small dsRNA that can be used for targeted gene silencing as an alternative therapeutic treatment of genetic diseases. For *in vivo* administration, siRNA must be protected against degradation to ensure its efficient delivery to target cells using sophisticated vectors. This work is focused on description of non-viral vectors based on cationic polymers, forming polyelectrolyte complexes with siRNA (polyplexes), and surface-modifying hydrophilic polymers enabling protection of the vector during its transport in the bloodstream.

Key words: siRNA, gene therapy, polymer drug carriers, targeted delivery

Seznam důležitých zkratek:

AGO	protein z rodiny argonaute
bPEI	větvený poly(ethylenimin)
dsRNA	dvouřetězcová RNA
HPMA	*N*-(2-hydroxypropyl) metakrylamid
lPEI	lineární poly(ethylenimin)
miRNA	micro RNA
mRNA	“messenger” RNA
PAMAM	poly(amidoamin)
PEG	poly(ethylenglykol)
PLL	poly(L-lysin)
Pre-miRNA	prekurzor micro RNA
Pri-miRNA	primární transkript micro RNA
PTGS	“posttranscriptional gene silencing”
RISC	“RNA induced silencing complex”
RNAi	RNA interference
siRNA	“small interfering” RNA

Obsah

1. Úvod 2
2. RNA interference 4
   2.1. Typy malých RNA molekul 4
   2.2. Mechanismus vzniku microRNA 5
   2.3. Přehled enzymů účastnících se procesu RNA interference 7
      2.3.1. Drosha 7
      2.3.2. Ribonukleázový enzym Dicer 7
      2.3.3. Ribonukleoproteinový komplex RISC 8
   2.4. Mechanismus působení komplexu RISC na mRNA 10
3. Využití RNAi při léčbě onemocnění 11
4. Doprava siRNA do míst účinku 12
   4.1. Bariéry, které musí být překonány při *in vivo* transport molekuly siRNA do cílové buňky 12
   4.2. Vektory pro siRNA 13
      4.2.1. Virové 13
      4.2.2. Nevirové 14
         4.2.2.1. Lipidové nosiče - LIPOPLEXY 14
         4.2.2.2. Polymerní nosiče - POLYPLEXY 15
            4.2.2.2.1. poly(L-lysin) (PLL) 18
            4.2.2.2.2. poly(ethylenimin) (PEI) 18
            4.2.2.2.3. Dendrimery 20
   4.3. Povrchová modifikace vektorů pro dopravu NK pomocí hydrofilních polymerů 22
5. Závěr 24
6. Seznam literatury 25

1. Úvod

Pokroky v oblasti molekulární biologie odhalily, že nejen dědičná onemocnění, ale také celá řada nemocí získaných, jsou často genetického původu. Současná medicína ovšem nabízí pouze léčebné metody, které neřeší samotnou podstatu nemoci, ale zaměřují se na léčbu symptomů a pacient je tak většinou odkázán na léčbu po celý život. Genová terapie a metoda umlčování genů prostřednictvím RNA interference představují alternativní způsob léčby a to cíleným zásahem v místě vzniku poruchy genetické informace. Tato metoda nabízí možnosti léčby jak různých typů nádorových onemocnění, genetických onemocnění, tak i dalších nežádoucích fenotypů.

RNA interference (RNAi), dříve známé také jako posttranskripční umlčování genů (PTGS = post-transcriptional gene silencing) je biologický proces, při němž krátké molekuly dsRNA dokážou potlačit nebo přerušit expresi určitého genu. Tato inhibice genové exprese je dána především degradací specifické mRNA.

Fenomén RNAi poprvé objevili a popsali roku 1998 vědci Andrew Fire a Craig C. Mello při pokusech s háďátkem obecným (*Caenorhabditis elegans*). Za tento objev jim byla roku 2006 udělena Nobelova cena za fyziologii a medicínu.

Mechanismus umlčování genů pomocí RNAi byl následně popsán i u dalších eukaryotických organismů, jako jsou octomilka obecná (*Drosophila melanogaster)* (Kennerdell and Carthew 1998), nezmar (*Hydra*) (Lohmann, Endl et al. 1999), rostliny (Waterhouse and Helliwell 2003) nebo člověk (McManus and Sharp 2002).

Klíčovou roli v RNAi procesu hrají malé dsRNA molekuly, mezi které řadíme především endogenní miRNA (microRNA) a exogenní siRNA (small interfering RNA). Tyto malé dsRNA se komplementárně vážou k cílovým mRNA a zablokují tak translační fázi syntézy bílkovin. Tento proces tedy posttranskripčně zabrání expresi určitého genu.

MicroRNA jsou přepisovány z vlastního jaderného genomu a jsou fylogeneticky nejvíce konzervované. Jejich funkcí je posttranskripční regulace mnoha biologických procesů, včetně buněčné proliferace a apoptózy při vývoji organismu (Brennecke, Hipfner et al. 2003), embryogeneze (Lee, Feinbaum et al. 1993) i fylogenetického vývoje (Pasquinelli, Reinhart et al. 2000).

Pro terapeutické účely cíleného umlčování genů prostřednictvím RNA interference se jako vhodná molekula ukázala siRNA. Hlavní výhodou použití siRNA je dokonalé párování bází s bázemi cílové mRNA. Oproti tomu microRNA není s cílovou mRNA úplně komplementární a může se tedy vázat i na jiné mRNA s podobnou sekvencí (Pillai, Bhattacharyya et al. 2007).

Použití samotné siRNA molekuly je ovšem limitováno, jelikož stejně jako DNA je snadno identifikovatelná imunitním systémem, rychle degradována nukleázami a má nízkou buněčnou specifitu. Proto byly vyvinuty vektory, neboli nosiče genetické informace, které zajistí molekule siRNA bezpečnou a efektivní dopravu do cílových tkání. V současné době se využívají dva typy vektorů, a to virové a nevirové. Přestože virové vektory představují doposud nejefektivnější systémy z hlediska přenosu genů *in vivo*, hlavní pozornost v této práci bude věnována nevirovým polymerním vektorům, jejichž výhodou je především široká strukturní variabilita, relativně snadná příprava ve větším množství a nízká imunogenicita (shrnuto v Huang, Wagner 1999).

2. RNA interference

2.1. Typy malých RNA molekul

Ve většině eukaryotických organismů se malé RNA molekuly nacházejí zcela přirozeně, velikost těchto dvouřetězcových molekul je přibližně 22 párů nukleotidů, ale jejich délka se může lišit podle typu organismu. Vznikají štěpením z delších RNA prekurzorů, které byly transkripcí přepsány z DNA. Podle původu těchto RNA prekurzorů rozlišujeme malé dsRNA na exogenní a endogenní.

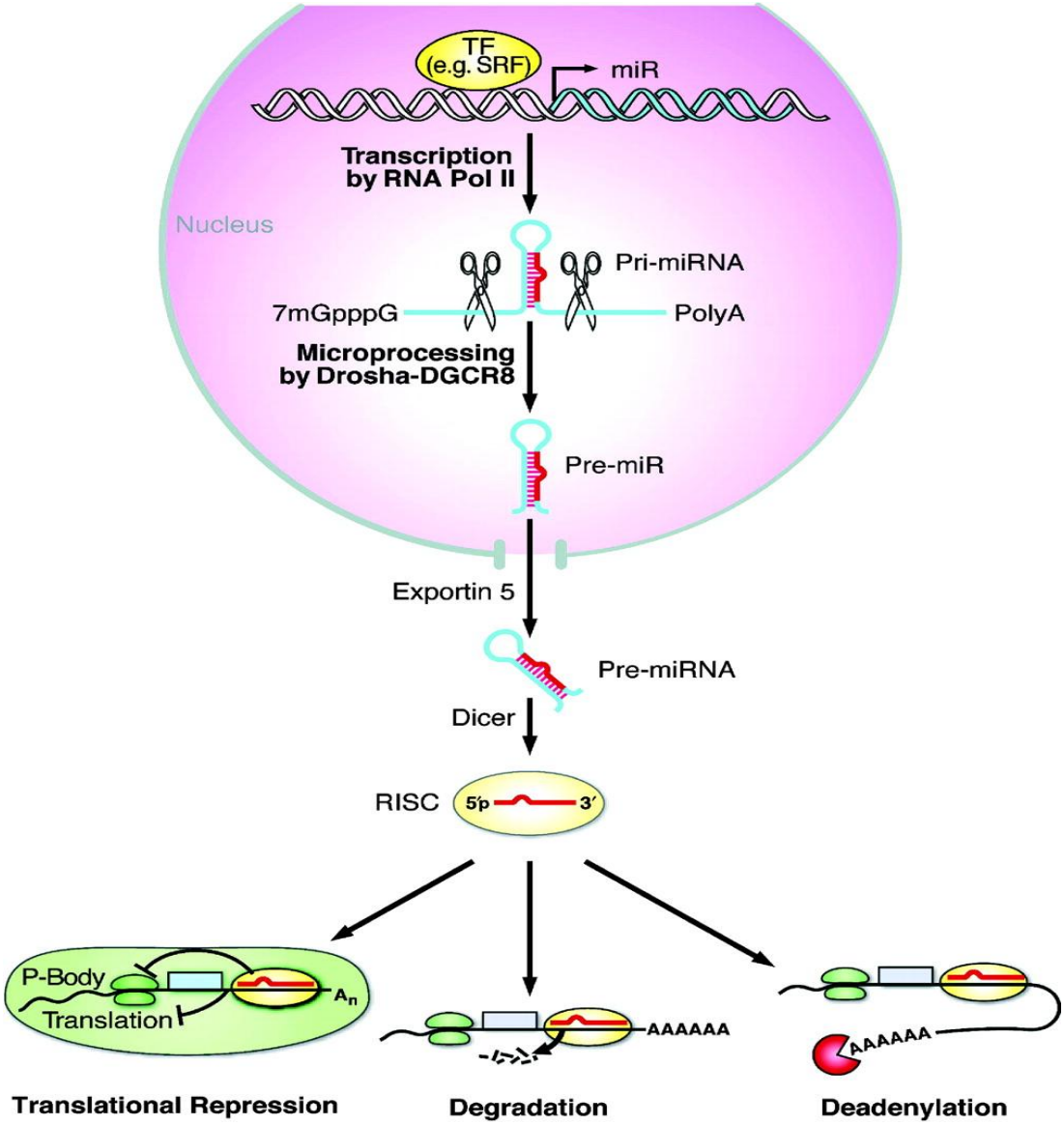
Mezi malé dsRNA molekuly endogenního původu patří microRNA (miRNA), což je krátký úsek RNA (21-23 nt), patřící do rodiny malých, nekódujících RNA, který vzniká přepisem vlastních jaderných genů. Zástupci malých exogenních dsRNA jsou siRNA („small interfering RNAs"), méně známé rasiRNA („repeat-associated siRNAs") a tasiRNA („trans-acting RNAs").

Jednotlivé typy malých RNA způsobují umlčování genů na různých úrovních genové exprese. Většinou je výsledkem tohoto procesu degradace příslušné cílové mRNA (působením siRNA, částečně miRNA a pravděpodobně i tasiRNA). Další možností je dočasná blokace translace mRNA (působením miRNA) nebo v případě rasiRNA je výsledkem modifikace chromatinu, vedoucí až ke změně exprese (shrnuto v Meister and Tushl 2004).

Přestože malé miRNA molekuly považujeme za spíše endogenní, nedávné výzkumy potvrdily přítomnost microRNA u viru Epstein-Barrové (EBV), který patří do rodiny lidských herpesvirů (Pfeffer, Sewer et al. 2005). Tento fakt poukazuje na to, že viry mohou využít mechanismus umlčování genů jak vlastního, tak hostitelského genomu.

V následující kapitole se budu věnovat microRNA molekulám, které se zcela přirozeně vyskytují ve všech eukaryotických organismech. Jejich funkcí je regulace genové exprese, která je zcela nezbytná pro vývoj a fungování organismů.

2.2. Mechanismus vzniku microRNA



Obrázek 1: Schéma RNAi dráhy - proces vzniku a působení microRNA na komplementární mRNA. Převzato z (Cordes and Srivastava 2009)

Již z výše uvedených poznatků vyplývá, že molekuly miRNA vznikají z delších dsRNA prekurzorů, které pocházejí z vlastního jaderného genomu buňky. Jsou tedy endogenního původu.

Dráha vedoucí ke vzniku malých miRNA zahrnuje dva kroky. Transkripci příslušného genu za vzniku dlouhého mono- nebo polycistronního primárního transkriptu pri-miRNA v prvním kroku a následnou úpravu na přibližně 70 nt dlouhý prekurzor pre-miRNA, ze kterého dalším štěpením vzniknou malé miRNA molekuly, neboli „mature“ microRNA. Prekurzory mají typickou vlásenkovou strukturu, což znamená, že vytvářejí duplex z jediného vlákna, kde na jednom konci vzniká smyčka a druhý konec je tvořen 3’ a 5’ konci. Střední část vytváří dvoušroubovici díky komplementaritě bazí (viz. Obrázek 1). Metodou pro analýzu genové exprese zvané RNase protection assays (RPA) bylo zjištěno, že prekurzory pri-miRNA a pre-miRNA jsou koncentrovány v jádře, kdežto samotné miRNA („mature miRNA“) se nachází v cytosolu buňky (Lee et al., 2002).

Geny pro miRNA jsou přepisovány v jádře RNA polymerázou II, přičemž nejprve vzniká primární transkript zvaný pri-miRNA, který obsahuje jako všechny primární transkripty na 5’konci methylguanosinovanou čepičku („cap“), která chrání konec nukleové kyseliny před degradací enzymy. Na 3’ konci je tzv. polyA (polyadenylovaný) konec (Lee, Kim et al. 2004), který jednak zvyšuje stabilitu molekuly, ale také umožňuje rozpoznávání jadernými enzymy, které molekulu RNA transportují z jádra do cytoplazmy. Enzymy účastnící se tohoto exportu se nazývají exportiny, konkrétně pro transport pre-miRNA je to Exportin 5 (Yi, Qin et al. 2003).

Primární transkript pri-miRNA je následně v jádře štěpen na kratší ~70 nt dlouhý prekurzor zvaný pre-miRNA. Štěpení je zprostředkováno jadernou RNázou III Drosha, která odstraňuje polyA 3’ konec a metylguanosinovou čepičku na 5’ konci primárního transkriptu (Lee, Ahn et al. 2003). Vzniklý pre-miRNA prekurzor je následně navázán na exportní faktor a přenesen do cytosolu. V cytosolu se pre-miRNA navazuje na enzym Dicer, který zprostředkovává vznik finální ~ 22nt dlouhé „mature“ miRNA (Lee, Jeon et al. 2002).

2.3. Přehled enzymů účastnících se procesu RNA interference

2.3.1. Drosha

Jak již bylo zmíněno, enzym Drosha zprostředkovává v jádře štěpení dlouhého prekurzoru pri-miRNA na ~70 nt dlouhý prekurzor pre-miRNA. Tento enzym ovšem nefunguje samostatně, ale interaguje s dalším proteinem a dohromady vytváří ~500 kDa komplex nazvaný Microprocessor. Druhý enzym, známý jako DGCR8 nebo Pasha („partner of Drosha“), obsahuje vazebné místo pro dsRNA molekulu. Kromě dsRNA vazebné domény na C-konci obsahuje také druhou doménu na N-konci a to tzv. WW doménu, která interaguje s oblastmi bohatými na prolin, což je mimo jiné také N-terminální konec enzymu Drosha (Denli, Tops et al. 2004).

2.3.2. Ribonukleázový enzym Dicer

Důležitou roli při RNA interferenci hraje enzym Dicer. Tento protein řadíme mezi tzv. Ribonukleázy třetí třídy (RNázy III), který obsahuje dvě ribonukleázové podjednotky, PAZ doménu, helikázovou doménu, DUF283 a dsRNA vazebnou doménu neboli dsRBD (Carmell and Hannon 2004) .

Dvě RNázové domény katalyzují štěpení dsRNA prekurzoru nebo pre-miRNA vlásenky, za vzniku malých RNA molekul o velikosti přibližně 21-23 nukleotidů, známých jako siRNA nebo miRNA. Tyto dvě RNázové domény (RNase IIIa a RNase IIIb) vytvářejí katalytické aktivní místo intramolekulární dimerizací domén, která funguje obdobně jako homodimerizace bakteriální RNázy III (Zhang, Kolb et al. 2004).

Název PAZ domény je odvozen od 3 proteinových struktur: PIWI-Argonaute-Zwillige a obsahuje 110 aminokyselin. Funkcí PAZ domény je specifická vazba na dsRNA, konkrétně na přesahující 3’ konce o 2 nukleotidy (Ma, Ye et al. 2004). Kromě toho bylo prokázáno, že PAZ doména je také potřebná pro produkci malých RNA (siRNA, miRNA) o specifické délce. Pokud tato doména v enzymu Dicer chybí, vznikají RNA produkty o různých délkách (MacRae, Zhou et al. 2007).

Doména, která se váže na dsRNA (dsRBD) pravděpodobně hraje pouze pomocnou roli při vazbě a štěpení dsRNA molekul enzymem Dicer. Plně se podílí na vazbě k dsRNA jen v případě, že chybí PAZ doména v Dicer enzymu, ale na rozdíl od PAZ domény nemá vliv na délku produktů (Ma, Zhou et al. 2012).

Na N-terminálním konci enzymu Dicer se nachází velká ATPázová/helikázová doména (DExD/H-box), jejíž funkce není úplně objasněna, ale má se za to, že je zodpovědná za efektivní štěpení dsRNA vlásenkových struktur ("hairpin loop"), které jsou termodynamicky nestabilní (Soifer, Sano et al. 2008). Dále bylo prokázáno, že produkce siRNA enzymem Dicer u savců je nezávislá na ATP (Zhang, Kolb et al. 2002).

Funkce domény DUF283 („domain with unknown function") není zcela objasněna, ale při zkoumání 3D modelu bylo zjištěno, že má stejný povrch jako dsRBD a může tak sloužit jako dsRNA vazebná doména (Dlakic 2006).

U různých druhů jsou ale rozdíly jak ve struktuře enzymu, tak i v názvech. Například u octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) jsou k dispozici dva různé enzymy Dicer, které rozlišují vznik malých RNA molekul siRNA a miRNA. Při biogenezi miRNA se uplatňuje enzym Dicer zvaný Dcr-1, který spolupracuje s dalším proteinem Loquacious, což je protein vázající se na dsRNA (Saito, Ishizuka et al. 2005). Při vzniku siRNA, jehož prekurzor má narozdíl od pre-miRNA báze v duplexu perfektně spárované, se zase uplatňuje komplex sestavený z Dicer enzymu Dcr-2 a dsRNA vázajícího proteinu R2D2 (Liu, Rand et al. 2003).

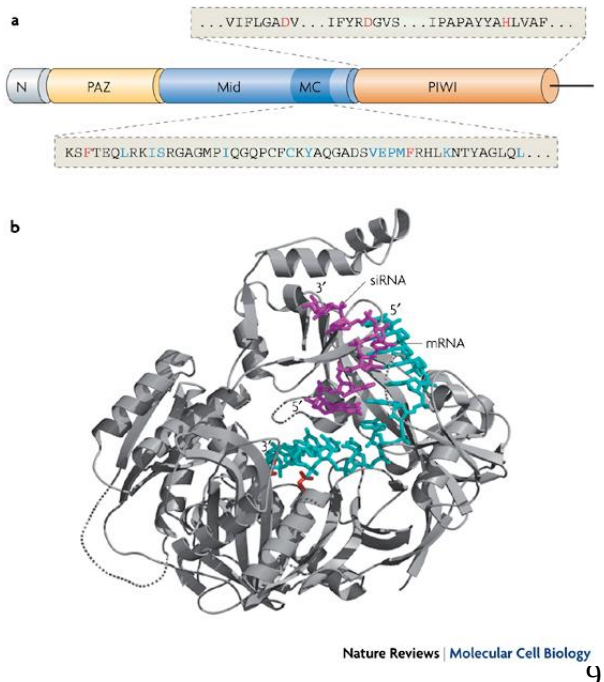
2.3.3. Ribonukleoproteinový komplex RISC

Poté co enzym Dicer vytvořil malé RNA molekuly (siRNA, miRNA) rozštěpením z delších dsRNA prekurzorů, sestavuje se ribonukleoproteinový efektorový komplex, tvořený několika enzymy a vláknem RNA, který souhrnně nazýváme RISC („RNA-induced silencing complex"). Tento komplex se následně váže na cílovou mRNA a brání tak expresi určitého genu, čímž se dokončuje proces umlčování genů prostřednictvím RNA interference (Hammond, Bernstein et al. 2000).

Při sestavování komplexu RISC můžeme rozlišit dva navazující kroky. Prvním krokem je tzv. „RISC-loading“, při kterém dochází k vložení malých RNA duplexů do Ago proteinu. Jde o prekurzorovou formu komplexu (pre-RISC), která ještě není schopná blokace exprese a až následně se vybírá jedno vlákno z dsRNA a vzniká tak zralá („mature“) forma RISCu neboli holo-RISC s ssRNA molekulou. Tento krok je také jinak zvaný „RISC-unwiding“ (Kawamata and Tomari 2010).

Jádrem RNA silencing komplexu jsou enzymy z rodiny argonaute. Tyto enzymy můžeme rozdělit podle struktur do 3 podkategorií na: (1) Argonaute-like proteiny, které jsou odvozeny od AGO1, enzymu nalezeného u huseníčka rolního (*Arabidopsis thaliana*), (2) PIWI-like proteiny, odvozené od (PIWI) nalezené u octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) a (3) argonaute proteiny, které byly nalezeny u háďátka obecného (*Ceanorhabitis elegans*). Zatímco argonaute enzymy spadající do prvních dvou podskupin byly nalezeny u všech bakterií, archeí i eukaryot, enzymy z poslední podskupiny byly nalezeny pouze u háďátka (Hutvagner and Simard 2008).

Enzymy z rodiny argonaute proteinů obsahují několik funkčních domén, a to N-terminální doménu, PAZ, Mid a PIWI doménu (viz obrázek 2). PIWI doména má terciární strukturu shodnou s enzymy patřící do rodiny RNáz H, což značí, že má nukleázovou aktivitu. Tento fakt poukazuje na to, že argonaute je složka komplexu RISC, která štěpí cílovou mRNA (Song, Smith et al. 2004).



Obrázek 2: Struktura argonaute proteinů: a) schéma řazení domén struktury, b) trojrozměrný model proteinu s navázanou siRNA a mRNA. Převzato z (Hutvagner and Simard 2008)

Základními komponentami, které se podílí na vzniku plně funkčního RISC komplexu u lidí jsou Dicer s navázanou RNA molekulou, Ago2 a vazebný protein TRBP (The human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein) (Gatignol, Bucklerwhite et al. 1991). TRBP je RNA-vazebný protein se 3 vazebnými doménami pro RNA, který plní hlavní funkci při navazování malých RNA molekul, které jsou součástí enzymu Dicer na argonaute protein Ago2 (Chendrimada, Gregory et al. 2005).

Jelikož při štěpení prekurzorů na malé RNA molekuly enzymem Dicer vznikají duplexy, které jsou při vazbě na cílovou mRNA nepoužitelné, musí nejprve dojít k odvinutí duplexu a až poté se může řídící („guide“) vlákno navázat na cílovou mRNA. Volba, které vlákno bude použito je dána termodynamickou stabilitou na 5’ konci siRNA a platí, že se při sestavování RISC komplexu inkorporuje právě to vlákno, které má méně stabilní 5’konec. V případě siRNA je tímto vláknem anti-sense vlákno. Tato funkční asymetrie duplexu siRNA je dána tím, že 5’ konec anti-sense vlákna má poslední bázi U (uracil), která se komplementárně váže prostřednictvím 2 vodíkových můstků k A (adenin), což je slabší interakce než v případě poslední báze na 5‘ konci u „sense“ vlákna duplexu siRNA, kde je interakce mezi C-G párem třemi H-můstky (Schwarz, Hutvagner et al. 2003).

2.4. Mechanismus působení komplexu RISC na mRNA

Již dříve bylo zmíněno že Ago2 jako centrální molekula RISC komplexu obsahuje mimo jiné také PIWI doménu, která je blízce příbuzná k RNáze H. To znamená, že právě tato doména vykonává funkci tzv. „sliceru“, tedy molekuly schopné štěpit cílovou mRNA. Ago2 je tedy katalytickou jednotkou konečné fáze RNAi u savců (Liu, Carmell et al. 2004).

Malé ssRNA molekuly, které jsou součástí RISC komplexu, jsou zcela (siRNA) nebo částečně (miRNA) komplementární k cílové mRNA a proto se může RISC navázat na cílovou mRNA. Po propojení cílové mRNA s dokonale komplementárním vláknem siRNA dojde ke katalytickému štěpení cílové mRNA mezi 10. a 11. nt od 5’ konce „guide“ vlákna endonukleázovou doménou PIWI. Tento proces je závislý na přítomnosti Mg^{2+} iontů (Schwarz, Tomari et al.

2004). RISC s neporušeným „guide“ vláknem opouští rozštěpenou mRNA v nezměněném stavu a může tak štěpit další mRNA.

Uvolněná mRNA po účinku RISC komplexu odhaluje 5’- fosfátové a 3’- hydroxylové konce, které jsou snadno rozpoznány a štěpeny cytoplazmatickými exonukleázami (Liu, Fortin et al. 2008).

Párování bazí mezi cílovou mRNA a miRNA není dokonalé a většinou se miRNA vážou na 3’ konec nepřekládané oblasti UTR cílové mRNA. Tím způsobí pouze inhibici translace (nedojde ke štěpení mRNA), případně vlákno mRNA destabilizují indukcí deadenylace poly(A) na 3’ konci cílové mRNA (Wu, Fan et al. 2006).

3. Využití RNAi při léčbě onemocnění

Objev vlivu RNA interference prostřednictvím malých RNA molekul na expresi určitých genů u savčích buněk (Elbashir, Harborth et al. 2001) přivedl vědce na myšlenku vytvořit terapeutika založená na RNAi. Takovéto léky by byly vhodné pro léčbu nemocí, které jsou vyvolány poškozením nebo chybnou funkcí jednoho nebo i několika genů a mohly by vést mimo jiné i k léčbě různých typů nádorových onemocnění. První terapeutika založená na RNAi, která postoupila do klinických zkoušek, jsou zatím pouze ta, která je možné lokálně vpravit do místa onemocnění (Oliveira, Hogset et al. 2008).

Za průkopníky léčiv využívajících RNAi považujeme molekulu Sirna-027 k léčbě věkem podmíněné makulární degenerace („neovascular age-related macular degeneration“), která způsobuje slepotu u starších lidí. Sirna-027 je chemicky upravená siRNA molekula, která se váže na mRNA pro VEGFR-1 a redukuje tak vznik tohoto proteinu. VEGFR-1 je membránový receptor pro růstový faktor, který stimuluje angiogenezi v sítnici a v pokročilejším věku způsobuje u pacientů abnormální tvorbu cév, což je příčinou postupné ztráty zraku (Kaiser, Symons et al. 2010).

Další testovanou molekulou je chemicky modifikovaná siRNA molekula s názvem ALN-RSV01, která se také musí aplikovat lokálně, 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 (DeVincenco et al. 2008).

4. Doprava siRNA do míst účinku

4.1. Bariéry, které musí být překonány při *in vivo* transport molekuly siRNA do cílové buňky

Aby mohla být metoda umlčování genů, prostřednictvím malých siRNA molekul, využita pro terapeutické účely, je důležité danou molekulu v nezměněném stavu dopravit do místa působení. Použití siRNA ve své nativní podobě je ale omezeno jen na lokální aplikace, neboť po vpravení do organismu je tato molekula snadno detekovatelná imunitním systémem a je náchylná k degradaci nukleázami, které se nacházejí v celém těle jak extracelulárně, tak i intracelulárně.

Velikost a hydrofilní charakter siRNA molekul nedovoluje průchod do buňky volnou difuzí, ale musí být buňkou endocytovány. Jelikož většina buněk nemá schopnost samovolně vychytávat molekuly siRNA z ECM, je žádoucí zvýšit její specifitu přítomností nějakého transfekčního ligandu, například protilátky proti vhodnému antigenu (Song, Zhu et al. 2005). Dalším problémem je také průchod siRNA z krve do cílové tkáně skrz endotel krevních kapilár (extravazace). Endotel je krycí epitel cév obsahující těsné spoje mezi buňkami, který nedovoluje volný průchod mezibuněčnými prostorami. Snadný transport z krve do tkáně má siRNA pouze v místech, kde je endotel fenestrovaný, jako je tomu v játrech nebo ledvinách (White 2008).

Pokud se podaří molekule siRNA proniknout do buňky endocytózou, nastává další problém, a to uniknout z endosomu, aby mohla přijít do kontaktu s RISC komplexem, který je situovaný v cytoplazmě buňky (White 2008).

Řešením, jak tyto bariéry eliminovat a efektivně dopravit molekulu siRNA do cílové tkáně, je použití vhodného vektoru. To je struktura, která molekulu siRNA ochrání a pomůže ji úspěšně transportovat do cílové tkáně. Vektor účinný *in vivo* by měl rovněž zajistit efektivní únik siRNA z endosomů a poté ji uvolnit v cytoplasmě.

4.2. Vektory pro siRNA

Transportní molekuly můžeme rozdělit do dvou podkategorií, které se liší svým původem, strukturou i mechanismem transfekce.

4.2.1. Virové

Viry jakožto nosiče genetické informace jsou velice oblíbené a to hned z několika důvodů. Za prvé to je jejich přirozená schopnost importovat vlastní genetický materiál do buňky a za druhé vysoká tkáňová specifita, která vede k efektivnímu dopravení genetického materiálu do příslušné tkáně. Bohužel, mají také své nevýhody, které omezují jejich širší využití v *in vivo* podmínkách. Virus, jakožto vysoce infekční vnitrobuněčný parazit, může vyvolat imunitní reakci organismu, případně organismus nevratně infikovat a poškodit (Castanotto and Rossi 2009). Další nevýhodou je neschopnost nést nativní siRNA, ale pouze inkorporovanou do vlastního genomu.

Příkladem využití může být geneticky modifikovaný adenovirový vektor se zabudovanou siRNA proti PTTG-1 (pitularity tumor transforming gene- 1) kódující protein sekurin. PTTG-1 je gen, který se ve zvýšené míře exprimuje ve většině lidských nádorů a stimuluje zde zvýšenou expresi růstových faktorů. Při aplikaci adenovirů se zabudovanou siRNA proti PTTG-1 dochází k částečné inhibici exprese PTTG-1 v hepatocytech (Jung, Yoo et al. 2006).

Dalším příkladem testovaného virového nosiče pro transport siRNA je retrovirus, do jehož genomu byla inkorporována siRNA komplementární k mRNA kódující protein p53 (Liu, Liu et al. 2004). Protein p53 je transkripční faktor, který reguluje expresi několika genů, zejména těch, které ovlivňují dělení buněk nebo programovanou buněčnou smrt. Jejich nevýhodou je především nízká specifita a vysoká mutagenicita.

4.2.2. Nevirové

Mezi nevirové nosiče řadíme dvě velké podkategorie: (1) nosiče založené na vodorozpustných kladně nabitých lipidech, které tvoří s nukleovou kyselinou komplexy zvané lipoplexy a (2) kladně nabité polymerní nosiče (polykationty), tvořící komplexy s NK zvané polyplexy. Výhodou nevirových nosičů je především jejich nízká imunogenicita, což je schopnost vyvolat imunitní odpověď, a relativně snadná příprava ve větším množství. Na druhou stranu mají ve srovnání s virovými vektory velmi nízkou buněčnou specifitu a horší schopnost uvolnit NK v cytoplasmě, (David, Pitard et al. 2010).

4.2.2.1. Lipidové nosiče - LIPOPLEXY

Kationtové lipidy jsou amfifilní molekuly složené z kladně nabité hydrofilní „hlavy“ a hydrofóbní části tvořené lipidovým řetězcem. Tyto sloučeniny vytvářejí ve vodném roztoku tzv. liposomy, neboli váčky (vesikuly) složené z fosfolipidové dvojvrstvy, které mají podobnou strukturu jako biologické membrány. Uvnitř mají volný prostor, který může být naplněn molekulami hydrofilní povahy, jako jsou např. NK. Takto maskovaná NK není imunitními buňkami rozpoznána jako patogen, proto se lipidové nosiče často využívají při dopravě léčiva do cílové tkáně (Wang, Lu et al. 2010).

Nukleové kyseliny jsou za fyziologických podmínek záporně nabité molekuly, které elektrostaticky interagují s kladně nabitými lipidy za vzniku komplexu = lipoplexu (Birchall, Kellaway et al. 1999). Mechanismus, který lipidové nosiče využívají k průniku a následnému uvolnění NK v buňce, nazýváme liposomální transfekce („lipofection“) a je založen na

endocytóze, jelikož dojde ke splynutí membrány liposomu s plazmatickou membránou cílové buňky (Felgner, Gadek et al. 1987).

Mezi kationtové lipidy široce využívané pro přípravu liposomálních vektorů patří například DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propan), a to především díky jeho vysoké transfekční schopnosti. Při *in vivo* pokusech bylo ale zjištěno, že komplexy siRNA/DOTAP spouští imunitní reakci. (Ma, Li et al. 2005).

Dále byly studovány liposomy založené na analogu kardiolipinu (CCLA), které byly sestaveny z CCLA-DOPE lipidů (DOPE = dioleyl-fosfatidylethanolamin, neutrální lipid). Komplex siRNA s CCLA-DOPE lipidy vykazoval menší toxicitu i vyšší transfekci než výše uvedené lipoplexy nejen při pokusech *in vitro*, ale také *in vivo* (Chien, Wang et al. 2005).

Výhodou struktury liposomu je, že může být do jeho membrány začleněn ligand, který bude lipoplex směrovat do cílových buněk, které budou mít v membráně receptor pro daný ligand. Bylo ukázáno (viz níže), že takovéto modifikované liposomy jsou efektivnější v dopravě léčiva do specifických cílových buňek.

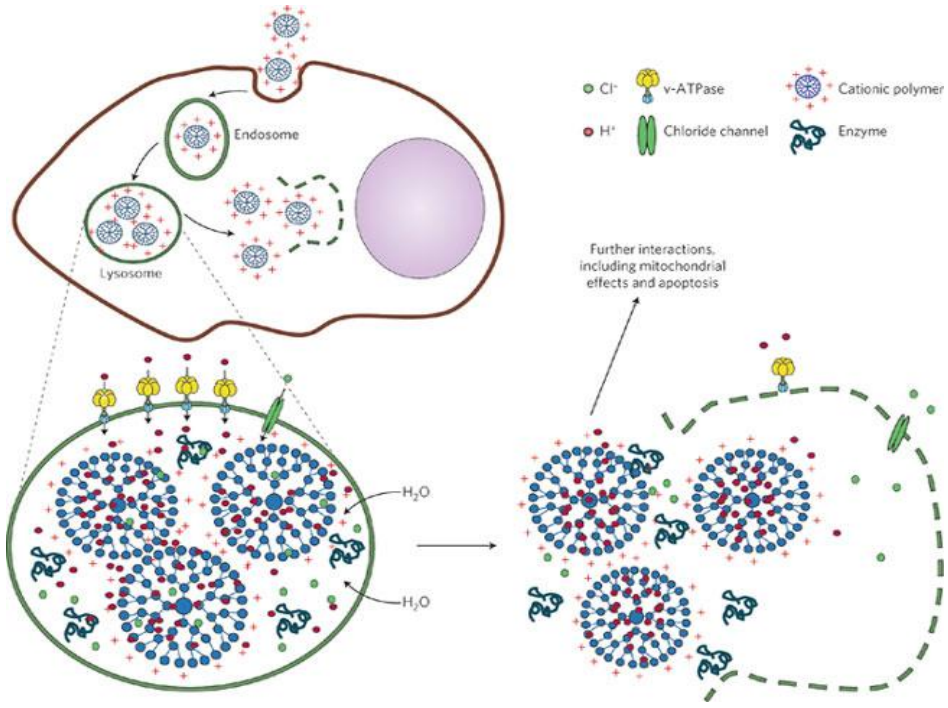
Příkladem může být třeba liposom s manózovým ligandem, který účinně směruje lipoplex do makrofágů (Hattori et al. 2004) nebo liposom s galaktózovým ligandem pro dopravu léčiva do hepatocytů (Kawakami et al. 2000). Další možností, jak dosáhnout efektivního dopravení lipoplexu do cílové tkáně, může být také navázání protilátek na membránu liposomu, pak se jedná o imunoliposomy (Wright a Huang 1989, podle Inoue et al. 2006).

4.2.2.2. Polymerní nosiče - POLYPLEXY

Polymerní nosiče na bázi syntetických a přírodních polykationtů jsou vhodnými kandidáty pro transport siRNA molekul do cílových buněk, zejména z toho důvodu, že mají nízkou imunogenicitu, představují také nižší mutagenní riziko než viry, a jsou snadněji připravovány a modifikovány.

Mezi nejčastější syntetické polymery využívané k transportu siRNA patří poly(ethylenimin) (PEI), poly(amidoamin)ové (PAMAM) dendrimery, poly(L-lysin) (PLL) a poly(*N,N*-dimethylaminoethylmetakrylát) (PDMAEMA). Z přírodních polymerních nosičů můžeme jmenovat například chitosan, či atelokolagen (David, Pitard et al. 2010).

Kladně nabité polymerní vektory (polykationty) nesou ve svých strukturách velké množství pozitivně nabitých skupin (zejména různých typů aminoskupin, které jsou při fyziologickém pH 7,4 z větší části protonované), které interagují se záporně nabitými fosfátovými skupinami na NK. V závislosti na poměru nábojů obou složek vytvářejí spontánně tyto dvě molekuly ve vodném prostředí kompaktní sférické částice zvané polyplexy (Lankalapalli and Kolapalli 2009). Bylo zjištěno, že velikost a stabilitu polyplexů lze ovlivnit řadou faktorů, jako jsou typ a molární hmotnost polykationtu, iontová síla prostředí nebo poměr ionizovatelných skupin obou polyelektrolytů. Jelikož jsou polyplexy zpravidla připravovány při přebytku polykationtu vůči NK, je výsledný povrchový náboj komplexu kladný.



Obrázek 3: Mechanismus úniku polyplexu z endosomu po pohlcení buňkou v důsledku jevu nazývaného „proton sponge effect". Převzato z (Nel, Madler et al. 2009)

Kladný povrchový náboj polymerů je důležitý nejen pro tvorbu komplexů s NK, ale také usnadňuje vazbu výsledného komplexu na záporně nabitou membránu buněk (Mislick and Baldeschwieler 1996) a umožňuje únik polyplexu z endozomu. Endozom, jakožto organela s kyselým prostředím si udržuje pH v hodnotách 4-5, pomocí vtoku H^+ iontů protonovou pumpou v membráně. Kyselé prostředí endozomů je důležité pro činnost hydroláz a degradaci endocytovaných organických látek.

Po pohlcení buňkou se polyplex dostává do endozomu s nízkým pH a přítomné vodíkové ionty se postupně navazují na aminoskupiny polyplexu, které v extracelulárním prostředí dosud protonované nebyly. Do endozomu se transportují další H^+ ionty, které dále snižují pH prostředí, což způsobuje otevírání aniontových kanálů v membráně endozomů a vtok Cl^- iontů dovnitř, které kompenzují kladný náboj. Zvýšená koncentrace iontů v endozomu způsobí zvýšení osmotického tlaku, neboť zároveň s Cl^- ionty vstupuje dovnitř také voda, což vede k prasknutí organely (tzv. osmotické botnání endozomů). Tento mechanismus úniku polyplexu z endozomu se nazývá efekt protonové houby („proton-sponge effect“) (viz obrázek 3) a je charakteristický pro polykationty obsahujícící aminoskupiny s různou hodnotou pK_a. Typickým představitelem takových polykationtů je např. větvený PEI (Akinc, Thomas et al. 2005).

Pozitivní náboj na povrchu polyplexů má také své nevýhody. Kladně nabité polyplexy v *in vivo* podmínkách nespecificky interagují se záporně nabitými sérovými komponentami, jako jsou IgG nebo albumin, za vzniku rozměrných agregátů, které jsou dobře rozpoznatelné buňkami imunitního systému a následně odstraněny z organismu. Tyto interakce mohou významně zkrátit dobu cirkulace polyplexů v krevním řečišti a zabránit efektivnímu dopravení molekuly siRNA do cílové buňky (Zelphati, Uyechi et al. 1998).

Řešením tohoto problému může být navázání hydrofilního polymeru na povrch polyplexu, čímž se skryje jeho kladný náboj na povrchu. Příkladem takovýchto hydrofilních modifikujících polymerů jsou především poly(ethylenglykol) (PEG) nebo kopolymery na bázi *N*-(2-hydroxypropyl)metakrylamidu (HPMA).

4.2.2.2.1. poly(L-lysin) (PLL)

PLL je jeden z prvních nevirových nosičů užívaných pro transport genetického materiálu do cílových buněk (Wu 1987). PLL je polypeptid tvořený opakujícími se jednotkami bazické aminokyseliny L-lysinu, která obsahuje primární aminoskupinu v bočním řetězci. Nevýhodou PLL jako nosiče NK je právě přítomnost pouze primárních aminoskupin, které nevykazují v kyselém prostředí endosomů dostatečnou pufrovací kapacitu a nedochází tak k účinnému endosomálnímu úniku pomocí „proton-sponge effect" (Pietersz, Tang et al. 2006). Z tohoto důvodu byl vyvinut roubovaný kopolymer tvořený kombinací dvou typů polyaminokyselin poly(L-lysinu) a poly(L-histidinu) s různou bazicitou aminoskupin, který umožňoval efektivnější únik polyplexu z endosomu (Benns, Choi et al. 2000).

4.2.2.2.2. poly(ethylenimin) (PEI)

Polyethylenimin je polykationtový polymer, který se často využívá jako nosič nukleových kyselin, jak DNA (Boussif, Lezoualch et al. 1995), tak siRNA molekul (Aigner, Fischer et al. 2002).

Rozlišujeme 2 konstituční (strukturní) izomery: lineární PEI (lPEI) a větvený PEI (bPEI). Lineární PEI je složen z opakujících se jednotek $[CH_2CH_2NH]_n$ a obsahuje v hlavním polymerním řetězci pouze sekundární aminoskupiny (-NH-).

Větvený PEI může dle míry větvení obsahovat primární ($-NH_2$), sekundární (-NH-), i terciární aminy (-N=), které mají rozdílné hodnoty pK_a. Díky tomu má bPEI velkou pufrační kapacitu. Stupeň protonace jeho aminoskupin stoupá z 20% na 45% při přechodu z pH 7 do kyselejšího pH 5 v endosomu, což má za následek již zmíněný „proton sponge effect" (shrnuto v Behr 1997).

Další výhodou bPEI je také snadnější příprava, a to polymerací aziridinu za otevření kruhu. Kdežto lPEI se syntetizuje především hydrolýzou poly(2-ethyl-2-oxazolin)u (Brissault, Kichler et al. 2003).

Podle délky polymerního řetězce rozlišujeme poly(ethylenimin) s malou molekulovou hmotností LMW-PEI („low molecular weight PEI), jehož velikost je cca do 25 kDa a HMW-PEI (high molecular weight PEI) s velkou molekulovou hmotností v rozmezí 25 – 800 kDa. Zároveň platí, že větvený HMW-PEI má poměr jednotlivých aminoskupin primární : sekundární : terciární roven zhruba 1:1:1, kdežto LMW-PEI má tento poměr zhruba 1:2:1. To znamená, že HMW-PEI je více rozvětvený než LMW-PEI. Výhodou vyššího stupně větvení je především vyšší hustota kladného náboje po protonizaci H^+ v kyselém prostředí endozomů, čímž se zvyšuje efektivita úniku polyplexu do cytosolu. Ovšem syntéza HMW-PEI vede k vyšší polydisperzitě výsledného produktu, což znamená, že produkt obsahuje PEI s velkým rozptylem molekulových vah 10^4 až 10^7 Da. Další nežádoucí vlastností HMW-PEI je vysoká cytotoxicita, která je dána vysokou afinitou k vnější straně plazmatické membrány buňky, kdy se na povrchu buněk tvoří obrovské klastry PEI o velikosti desítek mikrometrů, které jsou lehce rozpoznatelné pro buňky IS. LMW-PEI má naopak nižší polydisperzitu a tvoří pouze malé agregáty nalepené na membránu buněk o velikosti desítek nanometrů, které jsou nenápadnější a zároveň snadněji prostupují do buňky nespecifickou pinocytózou (Fischer, Bieber et al. 1999).

Optimální velikost polyplexů je do 150 nm, což je limit pro nespecifickou klathrinem zprostředkovanou endocytózu. Menší molekuly mohou vstupovat do buňky také mikropinocytózou, což je mechanismus na klathrinu nezávislý (Bishop 1997).

Velikost polyplexů závisí nejen na velikosti PEI, ale také na typu konstitučního izomeru (lineární vs. rozvětvený) a na molárním poměru aminů PEI a fosfátů siRNA („N:P ratio“). Při *in vitro* pokusech s bPEI, M = 800 Da a 25 kDa a lPEI, M = 22 kDa s různými molárními poměry N:P bylo zjištěno, že nejvhodnějším vektorem pro siRNA je bPEI o velikosti 25 kDa v molárních poměrech 6:1 a 8:1. Nízkomolekulární lPEI (M = 800 Da) nevytvářel s siRNA polyplexy menší než 195 nm. Nejmenší 22 kDa lPEI-siRNA polyplexy měly v průměru 155 nm při molárním poměru 8:1 (Grayson, Doody et al. 2006).

Z těchto výzkumů vyplývá, že polymery s větší molekulovou hmotností a hustotou náboje dokážou NK lépe kondenzovat a vytvořit tak kompaktnější a menší komplex. Na druhou stranu vzniklé polyplexy mají na svém povrchu velkou hustotu kladného náboje, který jednak

zvyšuje cytotoxicitu agregací na povrchu buňky a za druhé má za následek adsorpci záporně nabitých sérových proteinů z krve.

Kladný náboj na povrchu polyplexů může být v případě bPEI snížen například záměnou 10% aminoskupin polymeru za záporně nabité karboxylové skupiny reakcí s kyselinou butandiovou (Wagner 2012). Další možností je kladný náboj na povrchu eliminovat obalením polyplexu hydrofilním polymerem, jak již bylo dříve zmíněno.

4.2.2.2.3. Dendrimery

Dendrimery byly poprvé připraveny a charakterizovány jako symetricky větvené, monodisperzní, syntetické makromolekuly (oligomery), které vznikají řízenou syntézou z iniciačního jádra („core“) (Tomalia et al. 1985, podle Twyman et al. 1999).

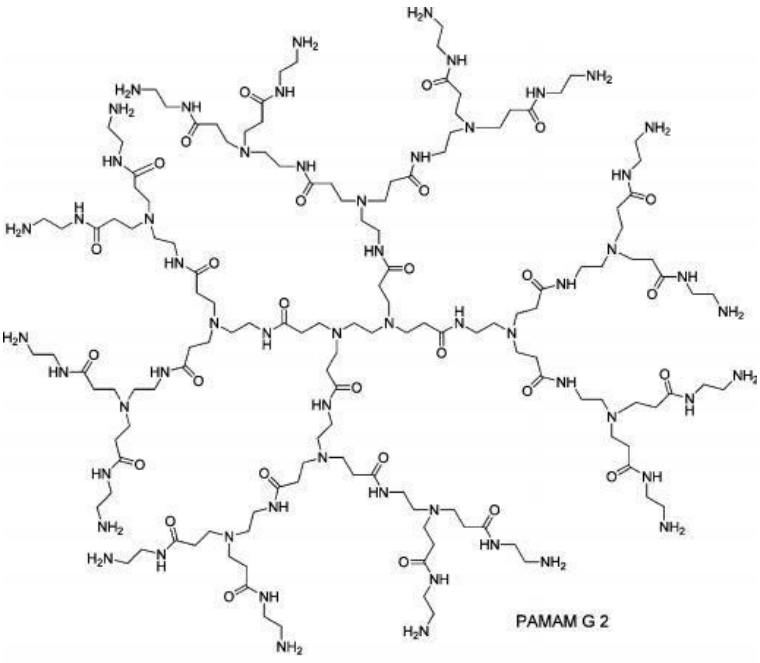
Dendrimery používané pro transport NK zpravidla nesou na svém povrchu kladně nabité aminoskupiny, které samovolně interagují s fosfátovými skupinami siRNA za vzniku kompaktních kulovitých nanočástic o velikosti 60-110 nm.. Jejich výhodou je především kontrolovatelná velikost, tvar a také možnost kovalentní modifikace jeho povrchových aminoskupin buněčně specifickými ligandy (Dufes, Uchegbu et al. 2005).

Mezi nejvýznamnější dendrimery využívané jako nosiče genetické informace patří především poly(amidoamin) (PAMAM) a poly(propylenimin) (PPI).

Centrální molekulou (iniciačním jádrem) PAMAM dendrimerů je alkylendiamin, nejčastěji ethylendiamin, který reaguje s methylakrylátem za vzniku nulté generace (G_0) PAMAM. Následné reakce vedou ke vzniku vyšších generací. Konečný produkt obsahuje uprostřed centrální molekulu, pravidelně uspořádané postranní větve vycházející vždy z terciárních aminoskupin a povrch molekuly tvoří kladně nabité primární aminoskupiny (viz obrázek 4). Aminoskupiny se podílejí na elektrostatických interakcích s fosfátovými skupinami NK za vzniku kompaktní částice a zároveň fungují jako „protonové houby“ pro uvolnění NK z endozomu do cytoplazmy (Zhou, Wu et al. 2006).

Nejlepší výsledky pro cílené umlčování genů komplexem PAMAM/siRNA byly zaznamenány u komplexů, které obsahovaly siRNA a PAMAM dendrimer G_7 v poměru N/P= 10-20. Účinnost umlčení genu tímto komplexem byla okolo 80% (Zhou, Wu et al. 2006).

Kladný náboj na povrchu dendrimer/NK komplexů má, stejně jako v případě ostatních polykationt/NK komplexů, řadu nevýhod spojených s *in vivo* aplikací (viz výše). Cytotoxicita může být u PAMAM/NK komplexu redukována modifikací povrchových primárních aminoskupin. Pro dopravu siRNA je možné použít např. acetylaci povrchových aminoskupin, případně záměna povrchových aminoskupin za hydroxy skupiny (Patil, Zhang et al. 2008). Takto modifikované PAMAM dendrimery jsou na povrchu neutrální, přičemž uvnitř mají kladný náboj, který je ovšem nedostatečný pro interakci se záporně nabitými siRNA. Terciární aminoskupiny uvnitř PAMAM dendrimeru mohou být částečněkvarternizovány. Vzniklé kvartérní amoniové skupiny jsou schopné utvářet elektrostatické komplexy s siRNA (Sideratou, Tziveleka et al. 2006).

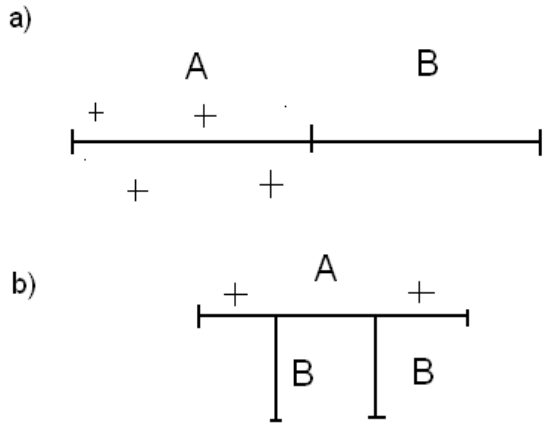


Obrázek 4: Struktura PAMAM dendrimeru G2 generace. Převzato z (Troiber and Wagner 2011)

4.3. Povrchová modifikace vektorů pro dopravu NK pomocí hydrofilních polymerů

Negativní dopady kladného povrchového náboje polyplexů, jako zvýšení cytotoxicity vlivem agregace na povrchu membrán buněk nebo nespecifické interakce se sérovými komponentami již byly zmíněny v předešlé kapitole o polyplexech (4.2.2). Omezit tyto nežádoucí vlivy můžeme kovalentním navázáním hydrofilního polymeru, který vytvoří hustý hydrofilní obal obklopující vektor. Nejvyužívanějšími hydrofilními polymery jsou poly(ethylenglykol) (PEG) a kopolymery na bázi *N*-(2-hydroxypropyl) metakrylamidu (HPMA).

Jednou z možností vytvoření hydrofilního obalu na povrchu polyplexu je navázání hydrofilního polymeru (viz obrázek 6) na již vytvořený polyplex. Druhou možností je použít blokové, či roubované kopolymery, které mají již ve své struktuře zabudovaný jak kationtový polymer, tak hydrofilní polymer (viz obrázek 5).



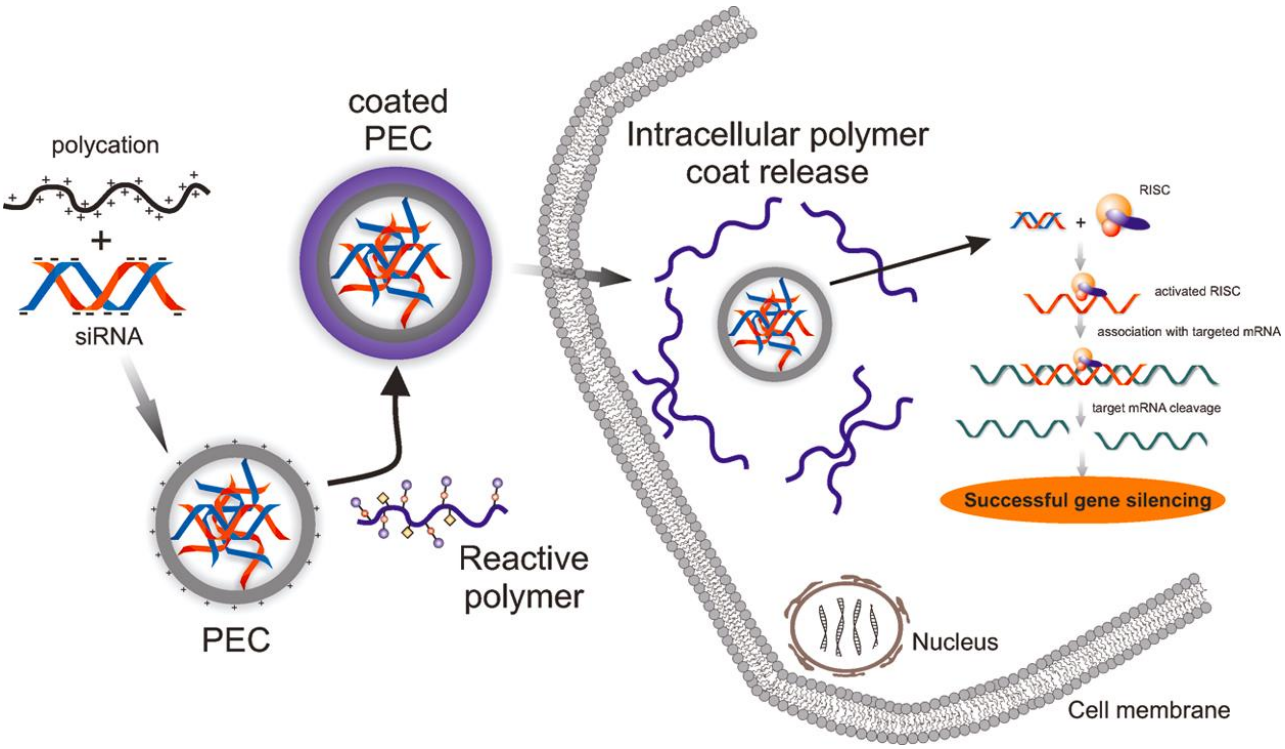
<u>Obrázek 5:</u> Schematické znázornění struktury a) diblokového kopolymeru a b) roubovaného kopolymeru, kde A je kladně nabitý polymerní blok a B je hydrofilní polymerní blok

PEGylace, neboli proces navázání PEG molekuly na povrch vektoru, redukuje interakci sérových proteinů s povrchem polyplexu. Bylo ukázáno, že PEGylované polyplexy jsou efektivnějšími systémy z hlediska dopravy siRNA molekuly *in vivo*, jelikož mohou déle cirkulovat v krvi a mají tak větší šanci proniknout do cílových buněk (Ogris, Brunner et al. 1999).

Pro oddělení hydrofilního PEG obalu od polyplexu v buňce se dá využít pH senzitivní vazba mezi těmito dvěma makromolekulami, která se v kyselejším prostředí endozomů rozpadne (Knorr, Allmendinger et al. 2007). Odstranění ochranného obalu umožní snazší uvolnění NK z komplexu v cytoplasmě.

Dalším příkladem intracelulárně odštěpitelného polymeru je reaktivní multivalentní kopolymer na bázi pHPMA, který má přes spojky obsahující disulfidické můstky navázané reaktivní karbonylthiazolidin-2-thionové skupiny (TT). TT skupiny ochotně reagují s aminoskupinami na povrchu polyplexů, za vzniku hustého, hydrofilního obalu, který chrání povrch vektoru. Tento obal se v buňkách oddělí činností přirozeně se vyskytujícího redukčního činidla glutathionu (GSH), který štěpí přítomné disulfidické můstky (Kostka, Konak et al. 2011).

Tyto hydrofilní polymery využívané pro maskování kladného náboje na povrchu polyplexů se dají využít také na ochranu lipoplexů a virových vektorů. Jednak se zvýší doba jejich cirkulace v krvi, a zároveň se sníží cytotoxicita částic.



Obrázek 5: Schéma vzniku polyplexu s hydrofilním obalem a uvolnění dsRNA v buňce Převzato z (Kostka, Konak et al. 2011)

5. Závěr

V této bakalářské práci jsou shrnuty základní poznatky o mechanismu působení RNA interference prostřednictvím malých dsRNA molekul. Umlčování genů pomocí RNAi můžeme využít jako alternativní způsob léčby například geneticky podmíněných onemocnění nebo nádorových onemocnění. Vhodnou molekulou pro cílené umlčování genů se jeví malá dsRNA molekula exogenního původu zvaná siRNA.

Při *in vivo* aplikaci musí molekula siRNA, stejně jako ostatní terapeutika, překonat řadu překážek, aby byla v nepozměněné podobě doručena do místa určení. Proto byly vyvinuty sofistikované nosiče (vektory), které molekulu siRNA ochrání v průběhu transportu a zajistí tak její efektivní doručení do cílových buněk.

Tato práce byla zaměřená zejména na popis polymerních vektorů nevirového původu vhodných pro terapeutické účely. Velká pozornost je jim věnována kvůli jejich snadné přípravě a výhodným fyzikálně-chemickým a biologickým vlastnostem.

Pro přípravu vektorů jsou používány jednak kationtové polymery, které se záporně nabitou molekulou siRNA vytvářejí polyelektrolytické komplexy (polyplexy); druhou skupinu představují reaktivní hydrofilní polymery, které jsou určené pro povrchovou modifikaci polyplexů.

Výzkum povrchově modifikovaných vektorů by mohl vést k vytvoření ideálního vektoru, který by byl schopen překonat všechny bariéry při *in vivo* aplikaci.To by mohlo vést k účinné léčbě těžko léčitelných onemocnění s minimálními vedlejšími účinky

6. Seznam literatury

Aigner, A., D. Fischer, T. Merdan, C. Brus, T. Kissel and F. Czubayko (2002). "Delivery of unmodified bioactive ribozymes by an RNA-stabilizing polyethylenimine (LMW-PEI) efficiently down-regulates gene expression." Gene Ther **9**(24): 1700-1707.

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.

Benns, J. M., J. S. Choi, R. I. Mahato, J. S. Park and S. W. Kim (2000). "pH-sensitive cationic polymer gene delivery vehicle: N-Ac-poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine) comb shaped polymer." Bioconjugate Chem **11**(5): 637-645.

Birchall, J. C., I. W. Kellaway and S. N. Mills (1999). "Physico-chemical characterisation and transfection efficiency of lipid-based gene delivery complexes." Int J Pharmaceut **183**(2): 195-207.

Bishop, N. E. (1997). "An update on non-clathrin-coated endocytosis." Rev Medi Virol **7**(4): 199-209.

Boussif, O., F. Lezoualch, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix and J. P. Behr (1995). "A VERSATILE VECTOR FOR GENE AND OLIGONUCLEOTIDE TRANSFER INTO CELLS IN CULTURE AND IN-VIVO - POLYETHYLENIMINE." P Nat Acad Sci USA **92**(16): 7297-7301.

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.

Brissault, B., A. Kichler, C. Guis, C. Leborgne, O. Danos and H. Cheradame (2003). "Synthesis of linear polyethylenimine derivatives for DNA transfection." Bioconjugate Chem **14**(3): 581-587.

Carmell, M. A. and G. J. Hannon (2004). "RNase III enzymes and the initiation of gene silencing." Nat Struct Mol Biol **11**(3): 214-218.

Castanotto, D. and J. J. Rossi (2009). "The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics." Nature **457**(7228): 426-433.

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.

Chien, P. Y., J. K. Wang, D. Carbonaro, S. Lei, B. Miller, S. Sheikh, S. M. Ali, M. U. Ahmad and I. Ahmad (2005). "Novel cationic cardiolipin analogue-based liposome for efficient DNA and small interfering RNA delivery in vitro and in vivo." Cancer Gene Ther **12**(3): 321-328.

Cordes, K. R. and D. Srivastava (2009). "MicroRNA Regulation of Cardiovascular Development." Circ Res **104**(6): 724-732.

David, S., B. Pitard, J. P. Benoit and C. Passirani (2010). "Non-viral nanosystems for systemic siRNA delivery." Pharmacol Res **62**(2): 100-114.

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. Vaishnaw, 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.

Dlakic, M. (2006). "DUF283 domain of Dicer proteins has a double-stranded RNA-binding fold." Bioinformatics **22**(22): 2711-2714.

Dufes, C., I. F. Uchegbu and A. G. Schatzlein (2005). "Dendrimers in gene delivery." Adv Drug Deliver Rev **57**(15): 2177-2202.

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.

Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold and M. Danielsen (1987). "LIPOFECTION - A HIGHLY EFFICIENT, LIPID-MEDIATED DNA-TRANSFECTION PROCEDURE." P Nat Acad Sci USA **84**(21): 7413-7417.

Fischer, D., T. Bieber, Y. X. Li, H. P. Elsasser and T. Kissel (1999). "A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: Effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity." Pharmaceut Res **16**(8): 1273-1279.

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.

Grayson, A. C. R., A. M. Doody and D. Putnam (2006). "Biophysical and structural characterization of polyethylenimine-mediated siRNA delivery in vitro." Pharmaceut Res **23**(8): 1868-1876.

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.

Hutvagner, G. and M. J. Simard (2008). "Argonaute proteins: key players in RNA silencing." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 22-32.

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." Am J Ophthalmol **150**(1): 33-39.

Kawamata, T. and Y. Tomari (2010). "Making RISC." Trends in Biochem Sci **35**(7): 368-376.

Kennerdell, J. R. and R. W. Carthew (1998). "Use of dsRNA-Mediated Genetic Interference to Demonstrate that frizzled and frizzled 2 Act in the Wingless Pathway." Cell **95**(7): 1017-1026.

Knorr, V., L. Allmendinger, G. F. Walker, F. F. Paintner and E. Wagner (2007). "An acetal-based PEGylation reagent for pH-Sensitive shielding of DNA polyplexes." Bioconjugate Chem **18**(4): 1218-1225.

Kostka, L., C. Konak, V. Subr, M. Spirkova, Y. Addadi, M. Neeman, T. Lammers and K. Ulbrich (2011). "Removable Nanocoatings for siRNA Polyplexes." Bioconjugate Chem **22**(2): 169-179.

Lankalapalli, S. and V. R. M. Kolapalli (2009). "Polyelectrolyte complexes: A review of their applicability in drug delivery technology." Indian J Pharm Sci **71**(5): 481-487.

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 J **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 J **23**(20): 4051-4060.

Liu, C. M., D. P. Liu, W. J. Dong and C. C. Liang (2004). "Retrovirus vector-mediated stable gene silencing in human cell." Biochem Bioph Res Co **313**(3): 716-720.

Liu, J. D., M. A. Carmell, F. V. Rivas, C. G. Marsden, J. M. Thomson, J. J. Song, S. M. Hammond, L. Joshua-Tor and G. J. Hannon (2004). "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi." Science **305**(5689): 1437-1441.

Liu, Q. H., T. A. Rand, S. Kalidas, F. H. Du, H. E. Kim, D. P. Smith and X. D. Wang (2003). "R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway." Science **301**(5641): 1921-1925.

Liu, X., K. Fortin and Z. Mourelatos (2008). "MicroRNAs: Biogenesis and molecular functions." Brain Pathol **18**(1): 113-121.

Lohmann, J. U., I. Endl and T. C. G. Bosch (1999). "Silencing of developmental genes in Hydra." Dev Biol **214**(1): 211-214.

Ma, E. B., K. H. Zhou, M. A. Kidwell and J. A. Doudna (2012). "Coordinated Activities of Human Dicer Domains in Regulatory RNA Processing." J Mol Biol **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.

Ma, Z., J. Li, F. T. He, A. Wilson, B. Pitt and S. Li (2005). "Cationic lipids enhance siRNA-mediated interferon response in mice." Biochem Bioph Res Co **330**(3): 755-759.

MacRae, I. J., K. Zhou and J. A. Doudna (2007). "Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer." Nat Struct Mol Biol **14**(10): 934-940.

McManus, M. T. and P. A. Sharp (2002). "Gene silencing in mammals by small interfering RNAs." Nat Rev Genet **3**(10): 737-747.

Meister, G. and T. Tuschl (2004). "Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA." Nature **431**(7006): 343-349.

Mislick, K. A. and J. D. Baldeschwieler (1996). "Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer." P Nat Acad Sci USA **93**(22): 12349-12354.

Nel, A. E., L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova and M. Thompson (2009). "Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface." Nat Mater **8**(7): 543-557.

Ogris, M., S. Brunner, S. Schuller, R. Kircheis and E. Wagner (1999). "PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery." Gene Ther **6**(4): 595-605.

Oliveira, S., A. Hogset, G. Storm and M. Schiffelers (2008). "Delivery of siRNA to the Target Cell Cytoplasm: Photochemical Internalization Facilitates Endosomal Escape and Improves Silencing Efficiency, In Vitro and In Vivo." Curr Pharm Design **14**(34): 3686-3697.

Pasquinelli, A. E., B. J. Reinhart, F. Slack, M. Q. Martindale, M. I. Kuroda, B. Maller, D. C. Hayward, E. E. Ball, B. Degnan, P. Muller, J. Spring, A. Srinivasan, M. Fishman, J. Finnerty, J. Corbo, M. Levine, P. Leahy, E. Davidson and G. Ruvkun (2000). "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." Nature **408**(6808): 86-89.

Patil, M. L., M. Zhang, S. Betigeri, O. Taratula, H. He and T. Minko (2008). "Surface-modified and internally cationic polyamidoamine dendrimers for efficient siRNA delivery." Bioconjugate Chem **19**(7): 1396-1403.

Pfeffer, S., A. Sewer, M. Lagos-Quintana, R. Sheridan, C. Sander, F. A. Grasser, L. F. van Dyk, C. K. Ho, S. Shuman, M. C. Chien, J. J. Russo, J. Y. Ju, G. Randall, B. D. Lindenbach, C. M. Rice, V. Simon, D. D. Ho, M. Zavolan and T. Tuschl (2005). "Identification of microRNAs of the herpesvirus family." Nat Methods **2**(4): 269-276.

Pietersz, G. A., C. K. Tang and V. Apostolopoulos (2006). "Structure and design of polycationic carriers for gene delivery." Mini-Rev Med Chem **6**(12): 1285-1298.

Pillai, R. S., S. N. Bhattacharyya and W. Filipowicz (2007). "Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?" Trends Cell Biol **17**(3): 118-126.

Saito, K., A. Ishizuka, H. Siomi and M. C. Siomi (2005). "Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in Drosophila cells." Plos Biol **3**(7): 1202-1212.

Schwarz, D. S., G. Hutvagner, T. Du, Z. S. Xu, N. Aronin and P. D. Zamore (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." Cell **115**(2): 199-208.

Schwarz, D. S., Y. Tomari and P. D. Zamore (2004). "The RNA-induced silencing complex is a Mg2+-dependent endonuclease." Curr Biol **14**(9): 787-791.

Sideratou, Z., L. A. Tziveleka, C. Kontoyianni, D. Tsiourvas and C. M. Paleos (2006). "Design of functional dendritic polymers for application as drug and gene delivery systems." Gene Ther Mol Biol **10A**: 71-94.

Soifer, H. S., M. Sano, K. Sakurai, P. Chomchan, P. Saetrom, M. A. Sherman, M. A. Collingwood, M. A. Behlke and J. J. Rossi (2008). "A role for the Dicer helicase domain in the processing of thermodynamically unstable hairpin RNAs." Nucleic Acids Res **36**(20): 6511-6522.

Song, E. W., P. C. Zhu, S. K. Lee, D. Chowdhury, S. Kussman, D. M. Dykxhoorn, Y. Feng, D. Palliser, D. B. Weiner, P. Shankar, W. A. Marasco and J. Lieberman (2005). "Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors." Nat Biotechnol **23**(6): 709-717.

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.

Troiber, C. and E. Wagner (2011). "Nucleic Acid Carriers Based on Precise Polymer Conjugates." Bioconjugate Chem **22**(9): 1737-1752.

Wagner, E. (2012). "Polymers for siRNA Delivery: Inspired by Viruses to be Targeted, Dynamic, and Precise." Accounts Chem Res **45**(7): 1005-1013.

Wang, J., Z. Lu, M. G. Wientjes and J. L. S. Au (2010). "Delivery of siRNA Therapeutics: Barriers and Carriers." Aaps J **12**(4): 492-503.

Waterhouse, P. M. and C. A. Helliwell (2003). "Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing." Nat Rev Genet **4**(1): 29-38.

White, P. J. (2008). "BARRIERS TO SUCCESSFUL DELIVERY OF SHORT INTERFERING RNA AFTER SYSTEMIC ADMINISTRATION." Clin Exp Pharmacol P **35**(11): 1371-1376.

Wu, L. G., J. H. Fan and J. G. Belasco (2006). "MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA." P Nat Acad Sci USA **103**(11): 4034-4039.

Yi, R., Y. Qin, I. G. Macara and B. R. Cullen (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." Gene Dev **17**(24): 3011-3016.

Zelphati, O., L. S. Uyechi, L. G. Barron and F. C. Szoka (1998). "Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells." BBA-Lipid Lipid Met **1390**(2): 119-133.

Zhang, H. D., F. A. Kolb, V. Brondani, E. Billy and W. Filipowicz (2002). "Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP." Embo J **21**(21): 5875-5885.

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.