



Modyfikowane chemicznie duplekisy siRNA

Małgorzata Sierant

Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych,
Polska Akademia Nauk, Łódź

Chemically modified siRNA duplexes

Summary

RNA interference (RNAi) is a powerful biological process for a sequence-specific silencing of a gene expression in diverse eukaryotic cells. Discovery of this phenomena had tremendous significance for functional genomics and development of novel gene-specific therapies. The future success of RNAi technology relies on identifying appropriate chemical modifications to improve stability, potency and *in vivo* cellular delivery of the effector moieties, siRNAs. The presented review attempts to describe some of the biological challenges associated with using synthetic siRNAs to effect RNAi and summarizes the role of the chemical tools in the application of RNAi technology.

Key words:

RNA interference, short interfering RNAs, siRNAs, gene silencing, gene expression, structural modification, nucleoside modification.

Adres do korespondencji

Małgorzata Sierant,
Centrum Badań
Molekularnych
i Makromolekularnych,
Polska Akademia Nauk,
ul. Sienkiewicza 112,
90-363 Łódź;
e-mail:
msierant@bio.cbmm.lodz.pl

biotechnologia

3 (90) 146–172 2010

1. Wstęp

Ponad dekadę temu, w 1998 r., amerykańscy uczeni A. Fire i C. Mello zaobserwowali, że podanie do organizmu nicienia *Caenorhabditis elegans* dwuniciowego RNA (*dsRNA*, ang. *double-stranded RNA*) o sekwencji homologicznej do badanego genu powoduje wyciszenie ekspresji tego genu. Zaobserwowane zjawisko nazwali interferencją RNA (*RNAi*, ang. *RNA interference*) (1). Od tej chwili rozpoczęła się „era” technologii opartych o RNAi, przełom w badaniach nad funkcją genów i poszukiwań efektywnych terapii mających na celu wyciszenie genów zasocjowanych

z patogenezą chorób. W ciągu kilku pierwszych lat po odkryciu zdefiniowano mechanizm procesu, zidentyfikowano białka, które w nim uczestniczą, a także rozpoznano rzeczywiste cząsteczki efektorowe procesu RNAi, jakimi są małe interferujące RNA (ang. *small interfering RNA*), a wśród nich krótkie duplekisy RNA (siRNA, ang. *short interfering RNA*) czy mikro RNA (*miRNA*) (2-4). Nastąpił gwałtowny rozwój technologii dotyczących projektowania, wytwarzania i modyfikacji dupleksów siRNA mających na celu udoskonalenie ich właściwości biologicznych i farmakokinetycznych. Obecnie szczególne nadzieje budzą możliwości wykorzystania technologii RNAi w terapii. Technologia ta może znaleźć zastosowanie we wszystkich terapiach, w których dąży się do zmniejszenia ilości białka zaangażowanego w proces chorobowy, m.in. w chorobach metabolicznych, nowotworowych, neurodegeneracyjnych, genetycznych czy wywołanych wirusami. Od kilku lat trwają badania kliniczne nad zastosowaniem siRNA jako leku. Najbardziej zaawansowane są próby wdrożenia siRNA do leczenia zwyrodnienia plamki żółtej związanego z wiekiem (AMD, ang. *Age Related Macular Degeneration*). Choroba ta jest jedną z najczęstszych przyczyn nieodwracalnej ślepoty wśród osób starszych. W II i III fazie badań klinicznych znajdują się odpowiednio, dwie potencjalnie lecznicze cząsteczki siRNA: Sirna-027, hamująca ekspresję genu receptora typu 1 dla czynnika wzrostu komórek śródbłonka (VEGFR1, ang. *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1*) oraz Cand5 skierowana na mRNA czynnika wzrostu komórek śródbłonka, VEGF. Inne preparaty oparte na technologii RNAi są na różnych etapach badań klinicznych, np. ALN-RSV01 dupleks siRNA skierowany na gen kodujący białko nukleokapsydu wirusa RSV (ang. *Respiratory Syncytial Virus*) jest w II fazie badań klinicznych, AKI-i5 (dupleks specyficzny wobec transkryptu kodującego białko p53, w ostrej niewydolności nerek) jest w I fazie badań klinicznych itd. (5,6). O ile miejscowe sposoby podania siRNA, np. w postaci aerozolu do oskrzeli czy iniekcji do oka są łatwe i skuteczne w użyciu, to leczenie systemowe lub związane z konkretnymi narządami napotyka na poważne problemy.

Z wielu możliwości zastosowań, również do badań podstawowych *in vitro*, wynika potrzeba ciągłego polepszania właściwości dupleksów siRNA. Wprowadzanie modyfikacji chemicznych do nici siRNA stwarza możliwość polepszenia aktywności, specyficzności, obniżenia immunogenności, stabilności w obecności nukleaz i wydłużenia czasu półtrwania cząsteczek efektorowych w organizmie. Szczególnie dwa ostatnie parametry są istotne z punktu widzenia badań *in vivo*, gdzie czas półtrwania niemodyfikowanych siRNA liczy się w minutach i powinien być znacznie wydłużony dla osiągnięcia efektu biologicznego. Wprowadzanie modyfikacji chemicznych do nici siRNA stwarza również możliwość rozszerzenia informacji, w jaki sposób modyfikacje umieszczone w danej pozycji dupleksu są istotne z punktu widzenia oddziaływania z białkami, biorącymi udział w mechanizmie interferencji RNA. Choć wiele problemów, związanych z projektowaniem oraz wybiórczym dostarczaniem siRNA do konkretnych komórek, tkanek bądź narządów, pozostaje nadal nierozwiązanych, prace trwają i istnieje realna szansa, że już niedługo klasa całkiem nowych związków o strukturze oligonukleotydów znajdzie swoje miejsce na rynku farmaceutycznym.

2. Mechanizm interferencji RNA i białka, które w nim uczestniczą

Ogólnie przyjęty mechanizm interferencji RNA jest następujący: dwuniciowy RNA, powstały endogennie lub wprowadzony do komórki, jest rozpoznawany przez rybonukleazę Dicer i poddawany obróbce, w konsekwencji czego powstają 21-23-nukleotydowe (nt) dupлексы RNA (siRNA) (2). Białka Dicer i TRBP (ang. *Human Immunodeficiency Virus, Type 1, Trans-Activating Response RNA-Binding Protein*) wiążą siRNA i wprowadzają do kompleksu efektorowego RISC (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*), którego głównym składnikiem katalitycznym jest białko Ago2 (3,4,7-9). Jedną z nici siRNA jest rozpoznawana jako nić aktywna, opisywana w języku angielskim jako nić *guide*, wiodąca RISC do docelowej sekwencji mRNA, druga z nici jest hydrolizowana i usuwana z kompleksu (10,11). Nić aktywna związana z białkiem Ago2 hybryduje z docelowym mRNA, a Ago2 hydrolizuje ściśle określone wiązanie fosfodiesterowe w mRNA. Miejsce hydrolizy mRNA znajduje się naprzeciw wiązania internukleotydowego pomiędzy dziesiątym i jedenastym nukleotydem nici antysensowej.

Tuschl i wsp. jako pierwsi udowodnili, że sekwencyjno-specyficzne wyciszenie ekspresji wybranego genu może odbywać się poprzez bezpośrednie wprowadzenie do komórki syntetycznych siRNA (12). Odkrycie to miało ogromne znaczenie dla eksperymentów prowadzonych w komórkach ssaczych, w których długi dsRNA indukuje niepożądaną odpowiedź immunologiczną. Najczęściej stosowany syntetyczny siRNA zawiera 21-nt nić sensową (S) o sekwencji homologicznej do fragmentu wybranego genu oraz komplementarną do niej 21-nt nić antysensową (AS). Obie nici tworzą dupлекс o długości 19-par zasad (pz), na każdym końcu 3' duplesku występują po dwa niesparowane nukleotydy (rys. 1A). W przeciwieństwie do naturalnych duplesków generowanych wewnątrzkomórkowo, syntetyczne siRNA posiadają na końcach 5' obu nici grupę hydroksylową (5'-OH) i, aby mogły być włączone do kompleksu RISC i wziąć udział w procesie RNAi, muszą zostać w tej pozycji ufosforylowane. W komórkach ludzkich za ten proces odpowiedzialny jest, ostatnio zidentyfikowany, enzym o nazwie kinaza **Clp1** (13). Wspomniany wcześniej enzym **Dicer** jest wyspecjalizowaną rybonukleazą, która inicjuje mechanizm RNAi poprzez rozpoznanie i hydrolizę dsRNA do krótkich produktów siRNA. Nukleaza Dicer jest też odpowiedzialna za generowanie innych małych interferujących RNA, np. mikro RNA (miRNA) z prekursorowego miRNA (pre-miRNA) i jest głównym składnikiem kompleksu RLC (ang. *RISC Loading Complex*), odgrywającego zasadniczą rolę w rozpoznaniu aktywnej nici i włączaniu jej do kompleksu RISC (10). Białko **TRBP** pełni ważną funkcję w stabilizacji wiązania Dicer do siRNA, pośredniczy w przekazaniu siRNA z Dicer do Ago2 oraz uczestniczy w selekcji aktywnej nici siRNA. Wcześniejsze doniesienia z eksperymentów prowadzonych w *Drosophila melanogaster* pozwoliły na stworzenie modelu selekcji nici siRNA w komórkach owadów (14). Białko R2D2, homolog ludzkiego TRBP, wiąże się z termodynamicznie bardziej stabilnym końcem duplesku siRNA, podczas gdy Dicer-2, owadzi homolog ludzkiego Dicer, wiąże się do końca siRNA

mniej stabilnego. Domena PAZ Dicer-2 wiąże koniec 3' nici sensowej, natomiast nić antysensowa jest rozpoznawana jako nić aktywna i zostaje włączona do Ago2. Ostatnio Gredell i wsp. udowodnili, że w warunkach *in vitro*, ludzkie białko TRBP może wiązać się do siRNA i rozróżnić termodynamicznie zróżnicowane końce dupleksu (15). Białka z rodziny **Argonaute** są podstawowymi regulatorami ekspresji genów w procesach wyciszania, w których uczestniczą małe regulatorowe RNA. Argonaute wiążą się z małymi cząsteczkami RNA tworząc enzymatycznie aktywne kompleksy RISC. Niektóre z nich posiadają aktywność endonukleolityczną i hydroлизują docelowe mRNA, inne jej nie posiadają, regulując ekspresję genu przez inne mechanizmy, szczególnie poprzez inhibicję translacji mRNA (16,17). Białka Ago stanowiące podrodzinę Argonaute asocjują głównie z miRNA i z siRNA. Zrozumienie natury oddziaływań pomiędzy aktywną nicią dupleksu RNA i białkiem Ago2 powinno doprowadzić do identyfikacji optymalnych konfiguracji struktury siRNA.

3. Ogólne zasady dotyczące projektowania cząsteczek siRNA

Efektywność wyciszania ekspresji genów poprzez mechanizm RNAi zależy od zrozumienia i zastosowania parametrów, które mają wpływ na specyficzność i funkcjonalność dupleksów siRNA. Sekwencję docelową definiuje się jako miejsce w genie, na które może być skierowana cząsteczka siRNA, aby efektywnie wyciszyć ekspresję genu. Obecnie przyjmuje się, że sekwencje docelowe mogą znaleźć się w sekwencjach 5' i 3'UTR (miejsca, które nie ulegają translacji), w sekwencji kodującej genu, rozpoczynając od 70-100 nt (licząc od kodonu START translacji), w miejscach, w których liczba nukleotydów G+C zawiera się w granicach 30-70%. Uznaje się, że sekwencje docelowe dla cząsteczek siRNA nie powinny być położone zbyt blisko kodonu START, ponieważ ten rejon genu jest zwykle zasocjowany z różnorodnymi czynnikami białkowymi i jest mało dostępny dla maszyneryi RNAi (6,18).

3.1. Wybór sekwencji dupleksu siRNA

Projektowanie siRNA obejmuje przede wszystkim wybór odpowiedniej sekwencji dupleksu, zdolnej do selektywnego wyciszenia ekspresji docelowego genu. Warunkiem specyficzności działania dupleksu siRNA jest aby jego sekwencja była unikatowa, tzn. homologiczna tylko do jednego wybranego genu, który mamy zamiar wyciszyć. Nawet częściowa homologia do sekwencji innych genów może być przyczyną niezamierzonego, niespecyficznego ich wyciszenia. Dochodzi wówczas do efektów niepożądanych, tzw. *off-target effects* (19). W przykładowej analizie aktywności siRNA z podwójną mutacją w stosunku do sekwencji genu docelowego wykazano, że taki dupleks wciąż może efektywnie wyciszać ekspresję docelowego mRNA (efektywność wyciszania >50%) (20). Niespecyficzne wyciszenie innych genów wyni-

ka stąd, że siRNA, poprzez częściową hybrydyzację z przypadkowym transkryptem, wchodzi na drogę mikro RNA. Hamowanie ekspresji w mechanizmie miRNA polega na częściowej komplementarności tzw. rejonu *seed* (nukleotydy w pozycji 2-8 od końca 5' nici aktywnej) do docelowej cząsteczki mRNA i odbywa się częściej poprzez represję translacji niż przez hydrolizę mRNA (21,22). Podczas projektowania sekwencji siRNA należy zwrócić szczególną uwagę na rejon *seed* i unikać komplementarności tej sekwencji do genów innych niż docelowy. W przypadku gdy nić sensowa dupleksu siRNA jest w przewodzie włączana do kompleksu RISC, podobna analiza powinna być przeprowadzona dla tej nici.

Drugim czynnikiem mającym wpływ na efekt wyciszenia jest dostępność wybranej sekwencji docelowej w transkrypcie dla białek uczestniczących w RNAi, w szczególności dla kompleksu RISC. W tym przypadku użyteczna może być analiza struktury drugorzędowej pożądanego genu (23-25). W domenach publicznych znajduje się wiele darmowych lub komercyjnie dostępnych programów pozwalających na zaplanowanie miejsc docelowych w sekwencji mRNA (np. siDESIGN Center, DEQOR, BLOCK-iT RNAi Designer, siRNA Finder, siDirect, itd.) (26-34). Adresy stron internetowych, gdzie można znaleźć te i inne programy dla projektowania sekwencji siRNA podane są w tabeli. Typowo, projektuje się kilka, np. trzy do pięciu, dupleksów siRNA skierowanych na dany gen, w celu identyfikacji najbardziej aktywnych cząsteczek, nie wywołujących niepożądanego efektu wyciszenia ekspresji innych genów. Przydatnym algorytmem umożliwiającym sprawdzenie czy wybrane przez nas sekwencje nie są homologiczne do innych genów jest program BLAST <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Tabela

Programy do projektowania sekwencji siRNA, dostępne on-line

Nazwa	Adres	Firma/Literatura
1	2	3
siDESIGN Center (Dharmacon, Inc.)	http://www.dharmacon.com/designcenter/designcenterpage.aspx	Dharmacon/ (26)
DEQOR	http://cluster-1.mpi-cbg.de/Deqor/deqor.html	(26)
siRNA at Whitehead (Whitehead Institute for Biomedical Research)	http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/	(27)
BLOCK-iT RNAi Designer (Invitrogen)	https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaexpress/	Invitrogen
siRNA Target Finder (Genescript)	https://www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai	GeneScript
siRNA Finder	http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html	Ambion
TROD: T7 RNAi Oligo Designer	http://www.unige.ch/sciences/biologie/bicel/websoft/RNAi.html	(28)
DSIR	http://biodev.extra.cea.fr/DSIR/DSIR.html	(29)
siDirect	http://genomics.jp/sidirect/index.php?type=fc	(30)

1	2	3
siRNA Target Designer	http://www.promega.com/siRNADesigner/program/	Promega
HuSiDa	http://itb.biologie.hu-berlin.de/~nebulus/sirna/	(31)
BIOPREDSi	http://www.biopredsi.org	(32)
siRecords	http://sirecords.biolead.org/	(33)
siVirus	http://sivirus.rnai.jp/	(34)

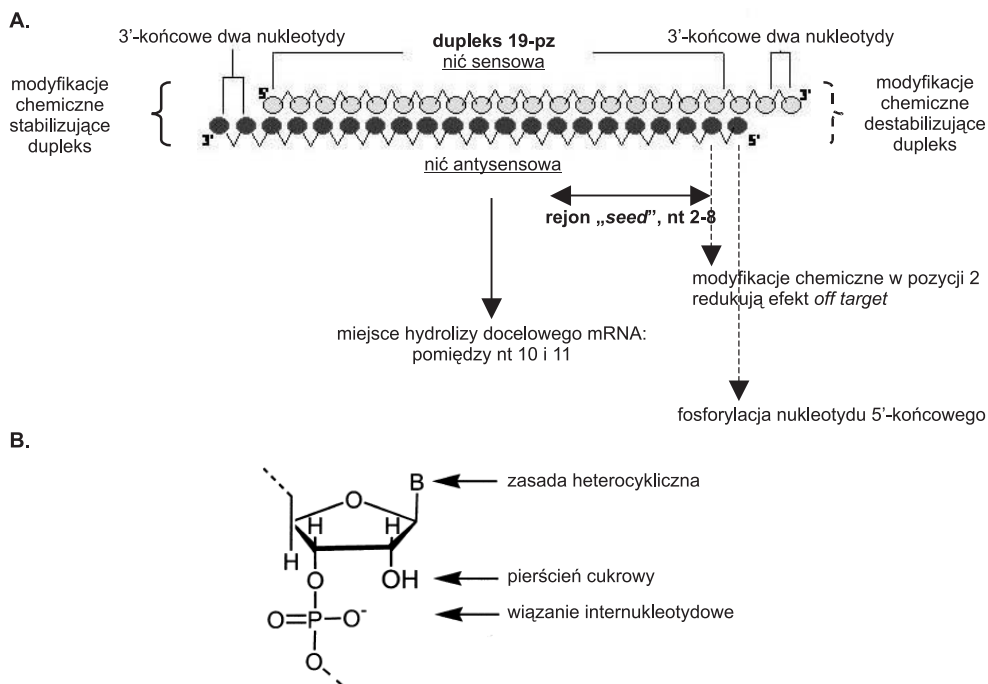
3.2. Immunostymulacja wywołana siRNA

Aktywacja odpowiedzi immunologicznej przez krótkie interferujące RNA, opisana w kilku pracach przeglądowych (35,36), jest skomplikowanym procesem. Generalnie wiadomo, że cząsteczka RNA po dotarciu do cytoplazmy jest rozpoznawana przez trzy typy immunoreceptorów: TLR (ang. *Toll-Like Receptors*), szczególnie TLR3, TLR7, TLR8; przez kinazę białkową zależną od RNA (PKR, ang. *Double-Strand RNA Dependent Protein Kinase*) oraz przez helikazy RIG-1 i MDA5. Aktywacja receptorów wywołuje odpowiedź komórkową prowadzącą do uwolnienia prozapalnych cytokin i zmiany poziomu ekspresji określonych genów (36). Typ odpowiedzi komórkowej zależy od rodzaju czynnika, jaki ją wywołuje, długości i sekwencji dsRNA, metody dostarczania dupleksu do komórki, jak również typu komórek. Mechanizm odpowiedzi immunologicznej spowodowanej przez siRNA o danej sekwencji nie jest jeszcze w pełni zrozumiany. Zidentyfikowano pewne motywy w sekwencji działające immunostymulująco, szczególnie 5'-UGUGU-3' (37), 5'-GUCCUCAA-3' (38). Jakikolwiek sekwencje RNA bogate w U mogą być rozpoznane przez TLR7 (39), obecność 5'-trifosforanu lub „tępych” końców dupleksu prowadzi do aktywacji RIG-1 (40). Dupleksy o długości nici 23-30-pz mogą indukować odpowiedź interferonową zależnie od typu komórki (41). W projektowaniu siRNA należy zatem uwzględnić te informacje i unikać: 1) sekwencji bogatych w U, 2) w zależności od typu komórek, jakie używamy w eksperymentach należy stosować optymalne metody transfekcji, np. metoda elektroporacji jest uważana za nie indukującą odpowiedzi immunologicznej w porównaniu do transfekcji za pośrednictwem nośników liposomowych, podobnie metoda dostarczania siRNA za pośrednictwem specyficznych przeciwciał (42), 3) zastosowanie modyfikacji chemicznych typu 2'-deoksy-, 2'-O-Me, 2'-fluoro-, itd. pozwala na redukcję immunostymulacji bez obniżenia aktywności siRNA. Użycie naturalnych modyfikowanych nukleozydów, takich jak pseudouracydyna czy 5-metylocytydyna może zmniejszyć prawdopodobieństwo rozpoznania RNA jako nieswoistego, 4) unikanie dupleksów z „tępych” końcami, które aktywują RIG-1, 5) usuwanie trifosforanów z końca 5', np. gdy siRNA są uzyskiwane w wyniku transkrypcji *in vitro*.

3.3. Selektywny wybór nici antysensowej jako nici aktywnej w kompleksie RISC

Obie nici dupletu siRNA mogą służyć jako nici aktywne dla RISC, ale tylko kompleksy z nicią antysensową, komplementarną do docelowego mRNA są efektywne i mogą indukować specyficzny proces wyciszania danego genu (43). Mechanizm selekcji nici aktywnej i jej inkorporacji do RISC jest od wielu lat intensywnie badany. Schwarz i wsp. udowodnili, że termodynamiczna stabilność końców dupletu siRNA jest podstawowym parametrem wpływającym na wybór nici sensowej lub antysensowej i włączenia jednej z nici do kompleksu RISC (44-46). Opracowano szereg zasad projektowania siRNA, pozwalających na zachowanie termodynamicznej asymetrii końców i ułatwienie hydrolizy docelowego mRNA. Jest to m. in. wysoka zawartość par GC na końcu 5' (zgodnie z polarnością nici sensowej), niska stabilność końca 3' dupletu (AU w pozycji 1-7) w celu promowania wyboru nici antysensowej jako nici aktywnej, U w pozycji 10 w nici sensowej w celu ułatwienia hydrolizy docelowego mRNA przez RISC i ułatwienia oddysocjowania kompleksu od mRNA (47-50).

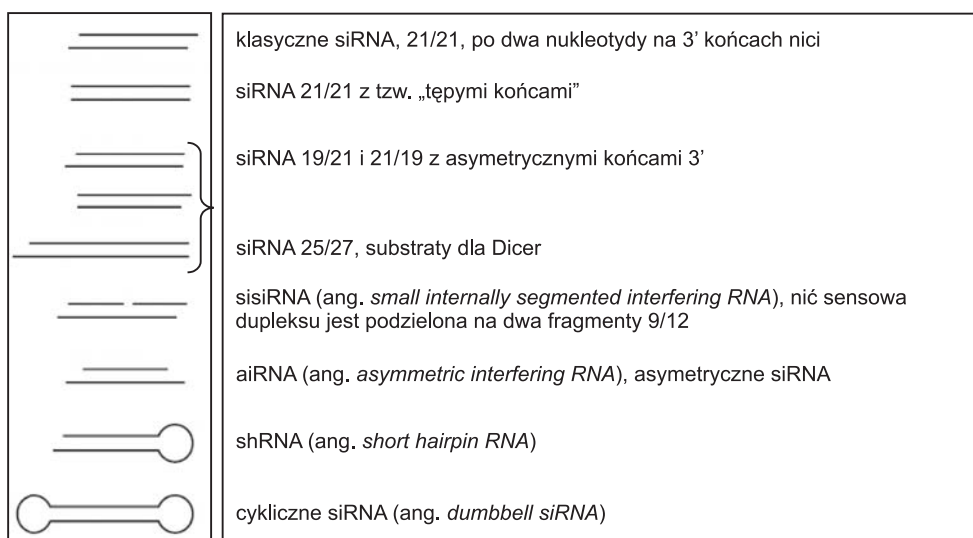
Modyfikacje chemiczne mogą wpływać na aktywność siRNA poprzez zmianę termodynamicznej asymetrii końców oraz na całkowitą stabilność termiczną dupletu,



Rys. 1. A. Struktura dupletu siRNA, B. miejsca w nukleotydzie odpowiednie do wprowadzania modyfikacji chemicznych.

jak również poprzez wzmocnienie lub osłabienie oddziaływań z komponentami białkowymi maszynarii RNAi. Modyfikacje chemiczne przedstawione m in. na rysunkach 3, 4 i 5, mogą zarówno stabilizować (np. 2'-O-Me, kombinacja 2'-O-Me/2'-fluoro-, ANA, LNA lub destabilizować dupleks (np. DNA, 2'-O-AEM, UNA, itd.) (51,52). W cytowanych powyżej pracach najbardziej znaczące polepszenie właściwości wyciszających siRNA uzyskano poprzez podwyższenie termodynamicznej asymetrii końców dupleksu i stworzenie warunków dla preferencyjnej inkorporacji nici antysensowej do kompleksu RISC. Wprowadzenie modyfikacji w wielu miejscach obu nici, prowadzących do podwyższenia całkowitej stabilności termodynamicznej dupleksu, obniżało aktywność siRNA.

Innym ważnym czynnikiem wpływającym na selektywny wybór nici aktywnej przez RISC jest struktura końców 3' dupleksu. Udowodniono, że asymetryczne końce dupleksu, tzn. dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3' nici antysensowej oraz brak niesparowanych nukleotydów na końcu 3' nici sensowej (ten koniec zakończony jest na „tępo”) pomaga w inkorporacji nici antysensowej do RISC, a tym samym polepsza właściwości wyciszające dupleksu (53). Efekt ten występuje nawet wówczas, gdy końce dupleksu nie są termodynamicznie zróżnicowane lub gdy termodynamiczna asymetria końców dupleksu nie sprzyja wyborowi nici antysensowej jako nici aktywnej.



Rys. 2. Przykłady modyfikacji strukturalnych siRNA.

3.4. Wybór struktury dupleksu siRNA

Klasyczny siRNA składa się z dwóch 21-nt komplementarnych nici RNA tworzących dupleks antyrównoległy. Na końcu 3' każdej z nici występują po dwa niesparowane nukleotydy (rys. 1) (54). Dupleksy te naśladują naturalne produkty hydrolizy długiego dwuniciowego RNA przez rybonukleazę Dicer, pojawiające się w naturalnym szlaku komórkowym (55-58). W wyniku badań mających na celu polepszenie właściwości siRNA zaproponowano więcej struktur, które mogą przybierać cząsteczki efektorowe RNAi (rys. 2). Najwcześniejsze badania dotyczyły zmiany długości nici i struktury końców, w tym liczby niesparowanych nukleotydów na końcach 3' i 5' (59). Długość dupleksów siRNA może być zmienna, jednak nie powinna przekraczać 30-pz, dłuższe dupleksy indukują niespecyficzną odpowiedź interferonową prowadzącą do śmierci komórki (60). Dupleksy zawierające nici dłuższe niż 21-nt są substratami dla Dicer, co według niektórych badaczy zwiększa ich potencjał w procesie wyciszania ekspresji genów oraz stabilność wobec nukleaz. Podwyższona aktywność jest prawdopodobnie wynikiem bezpośredniego przeniesienia produktu Dicer do kompleksu RISC (61-63).

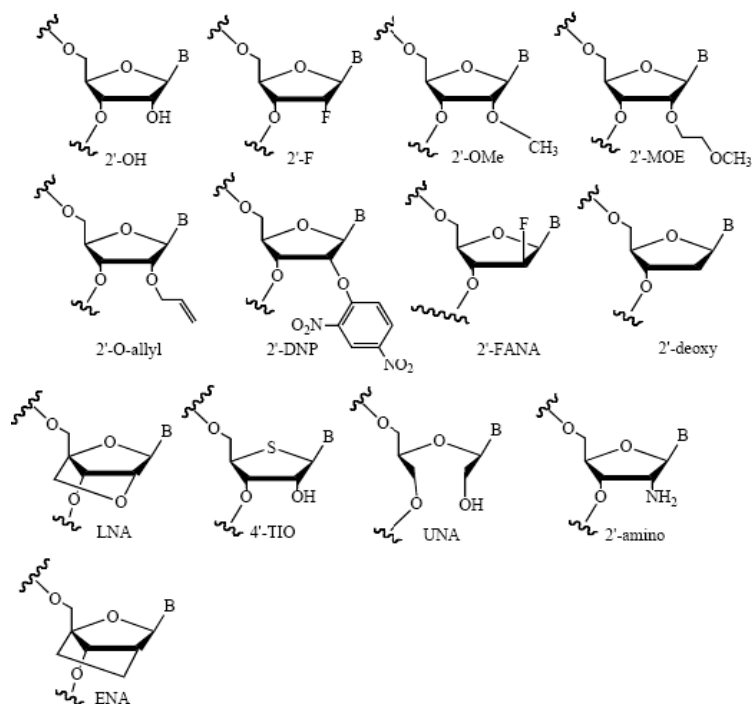
Jest wiele przykładów wykorzystania tzw. dupleksów asymetrycznych, zawierających nic sensową i antysensową różnej długości. I tak Sun i wsp. zaproponowali siRNA z nicią sensową (S) o długości 15-nt i antysensową (AS) o długości 21-nt, Chung i wsp. zbadali aktywność konstruktów 16-nt (S) + 19-nt (AS), zaś Sano i wsp. podali przykłady zastosowania siRNA o długości 15 do 19-nt (S) + 21-nt (AS) (53,64, 65). Asymetryczne siRNA w dużo mniejszym stopniu niż klasyczne dupleksy wywołują niepożądane efekty związane z wyciszaniem ekspresji genów innych niż docelowy. Wiąże się to ze specyficznym wyborem nici antysensowej jako nici aktywnej i jej inkorporacji do kompleksu RISC; druga nic ze względu na swą długość nie bierze udziału w procesie RNAi. Jak już wspomniano w poprzednim rozdziale dla wyboru prawidłowej nici do kompleksu RISC znaczenie ma również struktura końców 3'. siRNA zbudowane w ten sposób, że jedynie nic antysensowa ma na końcu 3' dwa niesparowane nukleotydy powoduje, że właśnie ta nic jest kierowana do RISC, co znacznie poprawia wydajność siRNA (53). Funkcjonalne siRNA mogą być złożone z trzech nici: nic sensowa jest podzielona na dwie części 9 i 12-nt, zaś nic antysensowa pozostaje niezmienną. Są to *sisRNA small internally segmented interfering RNA* zaproponowane przez Bramsena i wsp. (66). Innym przykładem różnorodności strukturalnej siRNA są dupleksy złożone tylko z jednej nici tworzącej strukturę typu hairpin lub zupełnie nietypowe, zaproponowane przez Abe i wsp. cykliczne siRNA, tzw. *dumbbell siRNA* (67,68). Cykliczne siRNA zawierają część dwuniciową o długości 21-25-pz zakończoną dwiema 9-nt pętlami. Cząsteczki te są rozpoznawane przez rybonukleazę Dicer, która hydrolizuje je wytwarzając typowe dupleksy siRNA. Dodatkowo *dumbbell siRNA* charakteryzują się podwyższoną stabilnością termodynamiczną. Temperatura topnienia (T_m , ang. *melting temperature*) dupleksu *dumbbell* jest ok. 20°C wyższa od temperatury topnienia klasycznego siRNA.

4. Modyfikacje chemiczne siRNA

Chociaż wybór sekwencji i struktury dupletu siRNA jest najbardziej istotny w projektowaniu aktywnych cząsteczek siRNA to wprowadzenie modyfikacji chemicznych może znacznie zmienić właściwości siRNA, w tym:

- polepszyć właściwości termodynamiczne dupletu,
- podwyższyć stabilność dupletu wobec nukleaz i tym samym wydłużyć okres półtrwania w osoczu,
- zredukować efekty uboczne jakie mogą wywoływać siRNA, takie jak niespecyficzność w wyciszaniu określonego genu czy aktywację immunoreceptorów,
- polepszyć transport dokomórkowy, w tym również specyficzność dostarczenia siRNA do określonych typów komórek.

Podwyższenie potencjału siRNA przez jego modyfikację prowadzi do obniżenia dawki, jaka jest potrzebna do skutecznego wyciszenia ekspresji wybranego genu.



Rys. 3. Wybrane przykłady modyfikacji chemicznych wprowadzonych do pierścienia rybozy.

Użyte symbole oznaczają kolejno: 2'-OH niemodyfikowane RNA; 2'F: 2'-fluoro-RNA; 2'-O-Me: 2'-O-metylo-RNA; 2'-MOE: 2'-O-(2-metoksyetylo)-RNA; 2'-O-allyl: 2'-O-allilo-RNA; 2'-DNP: 2'-O-(2,4-dinitrofenylo)-RNA; 2'-FANA: 2'-deoksy-2'-fluoro- β -D-arabino-RNA; 2'-deoksy: DNA; LNA: cykliczny kwas nukleinowy; 4'-tio: 4'-tio-RNA; UNA: acykliczny kwas nukleinowy; 2'-amino: 2'-amino-RNA; ENA: kwas nukleinowy mostkowany etylenem.

Dzięki temu minimalizuje się wymienione efekty uboczne. Pierwszym zadaniem w optymalizacji siRNA poprzez wprowadzanie modyfikacji chemicznych jest identyfikacja typu i pozycji specyficznych zmian, jakie mogą być wprowadzone bez utraty aktywności RNAi. Modyfikacje chemiczne mogą być wprowadzone do pierścienia cukrowego, szczególnie w pozycję 2' rybozy, do nukleozasad, jak również do wiązania internukleotydogo (rys. 1B). Przykłady modyfikacji chemicznych wprowadzonych w wymienionych miejscach są przedstawione na rysunkach 3, 4 i 5.

4.1. Modyfikacja pierścienia cukrowego

Pierścień cukrowy nukleozydu, szczególnie węgiel C2' jest najbardziej „atrakcyjnym” miejscem do wprowadzania modyfikacji chemicznych (rys. 3). Chiu i Rana w swoich pierwszych pracach na temat modyfikowanych chemicznie siRNA pokazali, że grupa 2'-OH w pierścieniu rybozy nie jest konieczna dla zachowania aktywności siRNA. W samym duplesie również mogą wystąpić zaburzenia struktury typu A, charakterystycznej dla RNA, bez wpływu na jego aktywność. Perfekcyjna struktura typu A musi być jednak zachowana pomiędzy nicią aktywną a docelowym mRNA (69,70). Z warunku tego wynikają wnioski, że modyfikacje chemiczne, nawet te zaburzające strukturę duplesu, mogą być bezpiecznie wprowadzane do nici sensowej, natomiast modyfikacje w nici antysensowej nie powinny zmieniać konformacji pierścienia cukrowego i zaburzać lokalnej struktury pomiędzy nicią aktywną i mRNA. Z badań Chiu i Rany wynika również, że maszyneria białkowa RNAi nie wymaga obecności grupy 2'-OH dla rozpoznania siRNA i katalitycznej aktywności kompleksu RISC (69,70).

Modyfikacje w pozycji C2': **2'-deoxy- (DNA)** jest najprostszą modyfikacją stosowaną w siRNA najczęściej na niesparowanych końcach 3', wprowadzoną od początku badań nad syntetycznymi siRNA (54). Modyfikacja zabezpiecza duples przed szybką degradacją przez nukleazy nie obniżając równocześnie aktywności. Ograniczona liczba modyfikacji DNA jest tolerowana również w części dwuniciowej siRNA (59,71,72). Duplesy zbudowane z nici antysensowej modyfikowanej jednostkami DNA (puryny) i 2'F-RNA (pirymidyny) są funkcjonalnie aktywne (70). Ui-Tei i wsp. badali efekt systematycznego wprowadzania jednostek DNA do obu nici siRNA i stwierdzili, że rejon w pobliżu końca 5' nici antysensowej (rejon *seed*) mógł być całkowicie zastąpiony przez DNA bez utraty aktywności siRNA. Wprowadzenie jednostek DNA do pozostałej części nici antysensowej (na 2/3 długości od końca 3') prowadziło do całkowitej utraty aktywności (72). Modyfikacja nici sensowej jednostkami DNA w pobliżu końca 3' nie zaburza aktywności siRNA, jednocześnie zabezpiecza przed indukowaniem efektów ubocznych. Eksperymenty Ui-Tei wskazują na oddziaływanie modyfikowanego siRNA z białkami TRBP, PACT i Ago2. Białka rozpoznające końce duplesu (TRBP i PACT) nie są zdolne do wiązania się z dwuniciowym DNA, białko Ago2 rozpoznaje i wiąże się z rejonem *seed* z modyfikacją DNA, natomiast nie jest

zdolne do hydrolizy docelowego mRNA gdy nić aktywna jest modyfikowana jednostkami DNA w pobliżu miejsca hydrolizy.

Druga z najbardziej popularnych i dobrze tolerowanych w siRNA modyfikacji to **2'-O-Me**. Obecność jednostek 2'-O-Me powoduje wzrost siły wiązania nici RNA, podwyższa stabilność nukleolityczną RNA. Przy ograniczonej liczbie modyfikacji (<8) obserwuje się podwyższenie efektywności dupleksów w porównaniu do cząsteczek niemodyfikowanych. Jednak wprowadzenie większej liczby modyfikowanych jednostek powoduje znaczne obniżenie aż do całkowitej utraty aktywności siRNA gdy modyfikacją są objęte całkowicie obie nici dupletu (59,70,74,75). Opisane są jednak pewne wyjątki, gdy modyfikacja nici sensowej nie doprowadziła do inhibicji aktywności siRNA (76,77). Pozycyjnie specyficzna 2'-O-metylacja (w pozycji 2 AS) prowadzi do redukcji niespecyficznego wyciszania ekspresji genów innych niż docelowy (19). Robbins i wsp. wnioskowali, że 2'-O-Me-RNA działa jako potencjalny antagonist immunostymulującego RNA w aktywacji TLR7, który jest w stanie zahamować produkcję prozapalnych cytokin (INF α i IL-6) (78).

Bramsen i wsp. (53) opisali przegląd 21 modyfikacji chemicznych, wśród nich również modyfikacje pozycji 2'-pierścienia rybozy: 2'-fluoro-, (2'F); 2'-O-Me; DNA; 2'-O-aminoetoksymetylo-, (2'-O-AEM); 2'-O-aminopropoksymetylo-, (2'-O-APM); 2'-O-aminoetylo-, (2'-O-EA); 2'-O-aminopropylo-, (2'-O-AP); 2'-O-(2-cyano)etylo-, (2'-O-CE); 2'-guanidynoetylo-, (2'-GE); 2'-O-metoksyetylo-, (2'-O-MOE); 2'-O-2,4-dinitrofenylo-, (2'-O-DNP); UNA; LNA z pochodnymi, itd. Autorzy zidentyfikowali aż 134 duplekisy (na 2160 badanych), które charakteryzowały się wyższą aktywnością niż siRNA niemodyfikowane. Większość z aktywnych dupleksów była modyfikowana tylko w niewielkim stopniu; modyfikacja całych nici siRNA często powodowała obniżenie lub zablokowanie aktywności RNAi. Modyfikacje nici sensowej były generalnie akceptowane, natomiast nić antysensowa wykazywała ograniczoną i pozycyjno-zależną tolerancję na modyfikację. Podwyższenie aktywności uzyskiwano przede wszystkim przez modulowanie termodynamicznej asymetrii końców dupletu i uprzywilejowaną inkorporację nici antysensowej do RISC. Zmiany siły wiązania nici na obu końcach dupletu powinny być wprowadzone raczej przez destabilizację końca 3' nici sensowej niż przez stabilizację końca 5' tej nici. Nić antysensowa nie powinna zawierać silnie stabilizujących/destabilizujących dużych, w sensie zawady przestrzennej, modyfikacji.

Ciekawe właściwości przedstawia modyfikacja grupą **2,4-dinitrofenylową (2'-O-DNP)**. Choć jest to duża grupa to jednak siRNA z 70% podstawieniem na C2' w obu niciach przedstawiały lepsze właściwości wyciszające, wyższą siłę wiązania nici i wyższą stabilność wobec nukleaz (79,80). Ponadto duplekisy wnikały do komórek bez udziału czynników transfekcyjnych i wykazywały niską cytotoxyczność.

Funkcjonalne siRNA mogą posiadać również atom fluoru w pozycji 2' pierścienia cukrowego. Jedną z najlepiej poznanych, wszechstronną modyfikacją jest **2'-F-RNA (kwas 2'-deoksy-2'-fluoro-rybonukleinowy)**. Elektroujemne grupy w pozycji 2' pierścienia cukrowego silnie stabilizują konformację C3'-endo, a tym samym strukturę

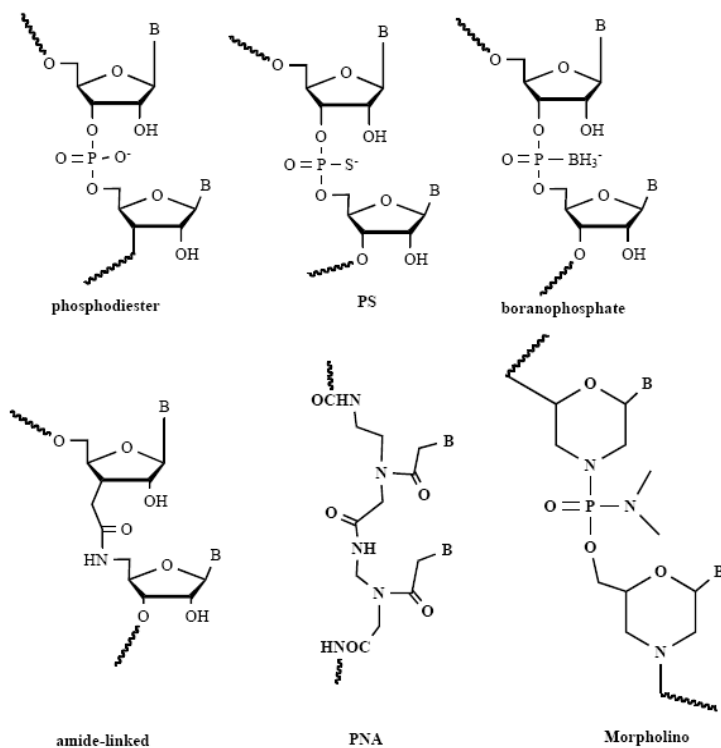
typu A dupleksu RNA (81). Grupa 2'-F- jest dobrze tolerowana w siRNA zarówno w nici sensowej, jak i antysensowej (70,74,82). Nawet pełne podstawienie nukleozydów w obu niciach nie znosi aktywności siRNA (83). Dupleksy wykazują się również znaczną stabilnością nukleolityczną oraz silnym powinowactwem do komplementarnej nici (84,85). Zmiana położenia atomu fluoru do pozycji *ara* prowadzi do pochodnej 2'-F-ANA (**kwasy 2'-deoksy-2'-fluoro-arabinonukleinowe**). Modyfikacja została pierwotnie zaprojektowana, aby naśladować DNA, dlatego zaskakującym był fakt bardzo dobrej tolerancji takich jednostek w siRNA. Modyfikacja jest akceptowana w nici sensowej, nawet w pełni podstawionej, jak również w nici antysensowej, częściowo podstawionej (86,87). Podobnie jak 2'-F-RNA, 2'-F-ANA powoduje wzrost siły wiązania pomiędzy komplementarnymi niciami siRNA, jak również podwyższenie stabilności na degradację nukleolityczną oraz na środowisko kwaśne (88). Sierant i wsp. opisali zastosowanie innej pochodnej fluorowej RNA, **gemcytabiny, (2',2'-difluoro-2'-deoksycytydyny)** wprowadzonej do nici antysensowej dupleksu siRNA (89). Pojedyncze podstawienie cytydyny przez gemcytabinę, w pozycjach 1,2,4,5,8 lub 10 nie miało wpływu na właściwości fizykochemiczne dupleksów, natomiast wyraźnie zmieniała się aktywność dupleksów w zależności od miejsca położenia modyfikowanej jednostki.

Modyfikacja 4'S-RNA, gdzie atom tlenu w pozycji 4' pierścienia rybozy jest zastąpiony atomem siarki, jest dobrze tolerowana w pobliżu końców siRNA (90,91). Wbudowanie modyfikacji do nici antysensowej, szczególnie w centrum, czy na końcu 5', powoduje znaczne obniżenie aktywności. Modyfikacja 4'S może być bezpiecznie wprowadzona do nici sensowej (nawet po cztery modyfikacje na końcu 3' i 5' nici sensowej) i na końcu 3' nici antysensowej (91). Kombinacja modyfikacji 4'S-RNA i 2'-O-Me, 2'-O-MOE lub 4'S-2'-F-ANA jest możliwa na końcach obu nici (87,90).

UNA, acykliczny kwas nukleinowy (ang. *Unlocked Nucleic Acid*), stanowi nową klasę modyfikacji pierścienia cukrowego, w którym usunięto wiązanie pomiędzy atomami węgla C2' i C3'(2',3' *seco* nukleozydy). Zmiana struktury cukru powoduje wzrost elastyczności cząsteczki, co z kolei powoduje obniżenie stabilności dupleksu siRNA. Modyfikacja UNA wpływa na aktywność siRNA w sposób pozycyjno-zależny. Włączenie UNA w pozycje 3, 6, 12 i 18 nici antysensowej nie zmienia aktywności siRNA. Modyfikacja w pozycjach 1-3, 9-12 oraz w 14 i 16 obniża efektywność wyciszającą dupleksu (92). Szczególnie wrażliwa jest pozycja 1 w nici antysensowej. Wprowadzenie w to miejsce UNA powoduje, że kinaza Clp1 nie jest w stanie ufosforylować końca 5'. Chemiczna fosforylacja końca 5' nici antysensowej znosi ten problem. Dupleksy RNA zawierające modyfikacje UNA charakteryzują się bardzo niską cytotoksycznością (92).

LNA, cykliczny kwas nukleinowy (ang. *Locked Nucleic Acid*), 2'-O,4'-C-metyleno-bicyklonukleozydy, zawierają mostek metylenowy pomiędzy atomem tlenu w pozycji C2' i atomem węgla w pozycji C4' pierścienia rybozy. Mostek ten wymusza konformację pierścienia cukrowego C3'-*endo*. Na podstawie badań NMR wskazuje się, że oligonukleotydy zawierające modyfikację LNA przyjmują strukturę helisy typu A, cha-

rakterystyczną dla RNA (93,94). Oligonukleotydy z modyfikacją LNA charakteryzują się bardzo silnym powinowactwem do komplementarnej nici DNA lub RNA, co przejawia się wzrostem temperatury topnienia o 2-8°C /modyfikację w porównaniu do oligonukleotydów niemodyfikowanych. Wykazuje się również bardzo wysoką odporność na degradację w systemach biologicznych (95,96). Braasch i wsp. jako pierwsi wprowadzili modyfikacje LNA do dupleksów siRNA i zaobserwowali wzrost stabilności dupleksów i brak wpływu modyfikacji na aktywność wyciszającą (74). Racjonalne umiejscowienie modyfikacji LNA prowadzi do uzyskania funkcjonalnie aktywnych dupleksów. Najczęściej modyfikowane są końce nici sensowej oraz koniec 3' nici antysensowej (97,98). Tolerowana jest również minimalna modyfikacja w nici antysensowej w obrębie struktury dwuniciowej (74,99). Bramsen i wsp. zaproponowali trójniciowy siRNA (sisiRNA), w którym nić sensowa jest podzielona na dwie części (66). W sisiRNA tylko nić antysensowa jest funkcjonalna. Modyfikacja LNA wprowadzona do nici sensowej pozwala na stabilizację całego układu. Modyfikacja LNA jest przykładem większej rodziny analogów nukleozydowych, tzw. bicyklicznych kwasów nukleinowych, BNA. Inną modyfikacją z tej rodziny jest ENA (ang. *Ethylene-Bridge Nucleic Acid*) testowany na końcach 3' siRNA osłabiał działanie inhibitorowe dupleksów (100).



Rys. 4. Wybrane przykłady modyfikacji chemicznych wiązania internukleotydego.

Ittig i wsp. badali aktywność biologiczną dupleksów siRNA niosących modyfikację **trycyklo-DNA (tc-DNA)** w różnych pozycjach nici sensowej i antysensowej (73). Obecność jednostek tc-DNA podnosi stabilność termodynamiczną dupleksu (T_m wzrasta o 2-4°C/modyfikację), wzrasta również odporność siRNA na trawienie nukleolityczne. Badania CD i modelowanie molekularne wskazują na silną preferencję takich siRNA do tworzenia dupleksów o strukturze typu A. Wprowadzenie jednostek tc-DNA na końce 3' obu nici, jak również w innych miejscach w nici sensowej nie obniżało aktywności dupleksu. Modyfikacja w nici antysensowej znosiła aktywność siRNA. Zaobserwowano jednak, że wprowadzenie tc-DNA w centralnej części nici sensowej, jak i nici antysensowej (pozycja 10) czterokrotnie podwyższało aktywność siRNA w porównaniu do dupleksów niemodyfikowanych.

4.2. Modyfikacja wiązania internukleotydowego

Najprostszym podejściem mającym na celu podniesienie stabilności nukleolitycznej oligonukleotydów jest modyfikacja wiązania internukleotydowego w łańcuchu DNA lub RNA. Modyfikacja zwykle polega na zastąpieniu niemoistkowego atomu tlenu przez atom siarki (tiofosforany, PS), grupę borowodorową BH_3 (boranofosforany, BP), aminową (amidofosforany) lub metylową (metylofosforany), itd.

Tiofosforany (PS), jedna z najbardziej popularnych modyfikacji w strategii antysensowej, może być również wykorzystywana w interferencji RNA (70,74,75,101). Modyfikacja wiązania fosforanowego poprzez zamianę niemoistkowego atomu tlenu na atom siarki w znacznym stopniu podnosi stabilność oligonukleotydu i zabezpiecza przed szybką degradacją nukleolityczną (102,103). Również dupleksy RNA z wiązaniami tiofosforanowymi są mniej wrażliwe na degradację, znacznie wydłuża się ich okres półtrwania w osoczu (70,104). Obecność siarki w wiązaniu internukleotydowym wpływa jednak na niespecyficzne wiązanie się z białkami komórkowymi, to oddziaływanie uważa się za główną przyczynę różnorodnych efektów niepożądanych (105). Doniesienia na temat aktywności tiofosforanowych siRNA są dość rozbieżne, aktywność dupleksów zależy od ilości modyfikacji i miejsca ich wprowadzenia (106). Według doświadczeń Chiu i Rana modyfikacja wszystkich wiązań internukleotydowych w nici sensowej lub/i antysensowej obniża o 40-60% aktywność siRNA (70). Braasch i wsp. nie obserwowali znacznych spadków aktywności siRNA z modyfikacjami tiofosforanowymi wprowadzonymi na końcach 5' i 3' obu nici dupleksu, nawet przy wzroście ilości modyfikacji do siedmiu na każdym z końców. Znaczny spadek aktywności (~20%) został odnotowany dopiero, wówczas gdy wszystkie wiązania internukleotydowe w obu niciach dupleksu zostały zmodyfikowane (74). Harborth i wsp. badali efekt obecności wiązań tiofosforanowych wprowadzonych w różnym stopniu do obu nici siRNA (końce dupleksu, co drugie wiązanie w jednej lub obu niciach dupleksu) i zanotowali jedynie kilkuprocentowy spadek aktywności (3-5%) (82). Pewne obserwacje mogą jednak wskazywać, że wiązania tiofosforanowe

nie są akceptowane w centralnej części dupleksu, szczególnie w nici sensowej w miejscu jej przecięcia podczas selekcji nici aktywnej do kompleksu RISC (107). Obserwowano również pewną cytotoxycyzość, wywołaną siRNA z dużą ilością wiązań tiofosforanowych (101). Na koniec warto również wspomnieć o doświadczeniach Georga Szakiela i wsp. dotyczących spontanicznego transportu siRNA do komórek bez udziału jakiegokolwiek czynnika transfekcyjnego (tzw. nagich siRNA, ang. *naked siRNA*), transportu stymulowanego jedynie obecnością oligonukleotydów tiofosforanowych (108). Jednoniciowe oligodeoksyrybonukleotydy tiofosforanowe promują wewnątrzkomórkową akumulację siRNA w różnych typach komórek. Szczegółowy mechanizm tego procesu nie został jeszcze rozpoznany. Prawdopodobnie tiofosforanowe oligonukleotydy DNA wiążą się z hipotetycznym receptorem na powierzchni komórki prowadząc do jego aktywacji. Zachodzi wówczas przeniesienie siRNA (w strukturach zwanych kaweolami) do tzw. przestrzeni okołojądrowej, a następnie uwolnienie ich do cytoplazmy (109). Oligonukleotydy tiofosforanowe stymulujące ten proces nie wchodzą do wnętrza komórki.

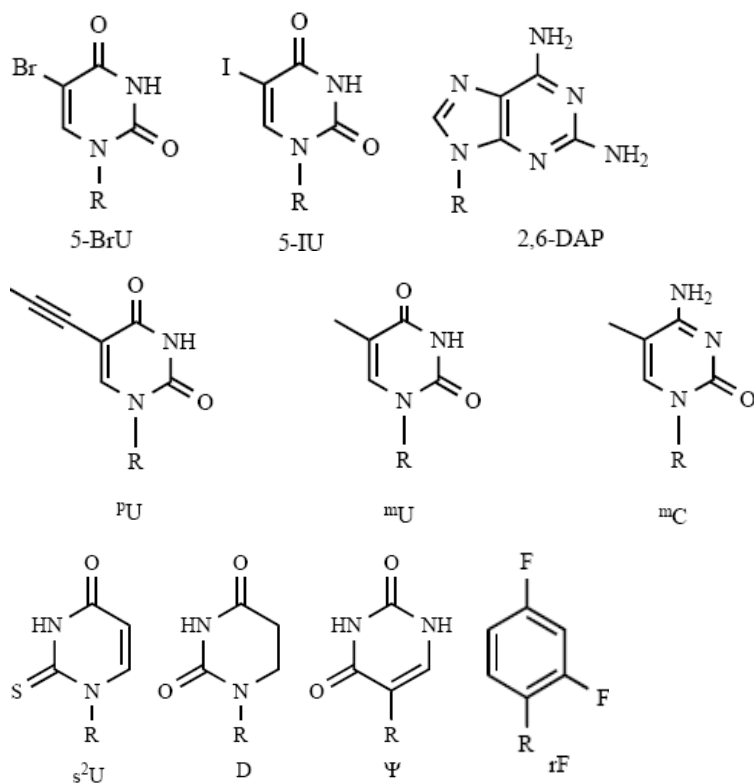
Ditiofosforany (PS2) to modyfikowane kwasy nukleinowe, w których obydwa niemostrkowe atomy tlenu wiązania fosforanowego są wymienione na atomy siarki. Tak modyfikowane jednostki PS2 nadają oligonukleotydowi unikatowe właściwości: wysoką odporność na nukleazy, achiralność na atomie fosforu, dobre właściwości farmakokinetyczne. Oligonukleotydy RNA zawierające wiązania PS2 zostały ostatnio zsyntetyzowane w laboratorium Xianbin Yanga (110). Wykazano, że cząsteczki siRNA zawierające wiązania PS2 są rozpoznawane przez białka uczestniczące w RNAi i aktywnie uczestniczą w wyciszaniu ekspresji docelowych genów. W zależności od miejsca wprowadzenia modyfikacji aktywność dupleksów zmienia się, jest jednak często porównywalna lub wyższa niż dla niemodyfikowanych cząsteczek (111). Z powodu podwyższonej hydrofobowości modyfikowanej cząsteczki, spowodowanej obecnością dwóch atomów siarki, możliwy jest łatwiejszy transport dokomórkowy, modyfikowane siRNA są również bardziej odporne na trawienie nukleazami.

Boranofosforany (BP), są unikatową i wartą zainteresowania klasą modyfikowanych analogów oligonukleotydów, po raz pierwszy opisaną przez Barbarę Ramsay Shaw i wsp. w 1990 r. (112). Modyfikacja BP jest dobrze tolerowana w siRNA, może znajdować się w różnych miejscach, zarówno w nici sensowej jak i antysensowej. Duplekisy wykazują wysoką aktywność wyciszania docelowego genu, równą lub wyższą w porównaniu do niemodyfikowanych cząsteczek lub z modyfikacją tiofosforanową (113). Jedynym wyjątkiem jest centralna część nici antysensowej. Jeżeli modyfikacja BP zostanie wprowadzona do trzech centralnie położonych wiązań internukleotydowych aktywność siRNA znacznie się obniża. Oligonukleotyd z wiązaniami boranofosforanowymi jest ok. 300x bardziej odporny na degradację nukleolityczną niż oligonukleotyd z wiązaniami niemodyfikowanymi. Duplekisy siRNA nawet z dużą zawartością wiązań BP (76%) nie wykazują cytotoxycyzości w stosunku do komórek, w przeciwieństwie do tiofosforanów, gdzie cytotoxycyzość pojawiała się przy 55% zawartości tej modyfikacji (75,101). Dystrybucja ładunku ujemnego w borano-

fosforanach jest inna niż w fosforanach czy tiofosforanach, stąd wynikają zmiany w polarności i hydrofobowości cząsteczki RNA, zmienione właściwości hydratacyjne, inne oddziaływanie z jonami metali i białkami (114,115). Przyczyny wzrostu efektywności boranofosforanowych siRNA upatruje się w wyższej stabilności nukleolitycznej, wydłużonym czasie półtrwania i wynikającej z tego konsekwencji, że efekt wyciszenia uzyskuje się przy dużo niższym stężeniu siRNA.

Peptydowe kwasy nukleinowe (PNA) są analogami oligonukleotydów DNA lub RNA, gdzie szkielet fosforanowo-cukrowy został zastąpiony poliamidem, w którym poszczególne podjednostki są połączone ze sobą wiązaniami peptydowymi. Podstawową różnicą pomiędzy PNA i kwasami nukleinowymi jest brak ładunku ujemnego w szkielecie cząsteczki (normalnie wynikającego z obecności wiązania fosfodiesterowego). PNA wykazuje zdolność do tworzenia stabilnych struktur dwuniciowych, opartych na parowaniu zasad nukleinowych, może wiązać się z drugą cząsteczką PNA lub tworzyć heterodupleksy PNA:DNA lub PNA:RNA. Znane są również cząsteczki chimeryczne tworzone przez liniowe połączenie kwasu nukleinowego do N lub C końca PNA. W przeciwieństwie do chimerycznych struktur DNA-PNA nie ma wielu przykładów zastosowania chimer RNA-PNA, w szczególności w procesie RNAi. Potem i wsp. próbowali połączyć zalety dwóch technologii: PNA i RNAi proponując chimeryczne cząsteczki siRNA, w których dwie niesparowane tymidyny na końcu 3' jednej lub obu nici zastąpiono dimerem PNA, tt(Gly) (116). Autorzy udowodnili, że zaproponowana modyfikacja jest kompatybilna z mechanizmem RNAi. Modyfikacja wprowadzona na koniec 3' nici sensowej spowodowała niewielki wzrost aktywności w stosunku do docelowego genu. Wprowadzenie modyfikacji do obu nici siRNA spowodowało znaczny wzrost stabilności dupleksu wobec nukleaz. Wszystkie warianty siRNA, w tym również cząsteczki niemodyfikowane miały te same właściwości termodynamiczne i strukturę typu A, charakterystyczną dla dsRNA. Oznacza to, że PNA wprowadzony na końcu 3' siRNA (zamiast typowych niesparowanych dwóch reszt tymidyny) nie destabilizuje dupleksu i nie zakłóca jego struktury.

Morfolinowe pochodne kwasów nukleinowych zostały wprowadzone już pod koniec lat osiemdziesiątych XX w. (117,118). Są to związki, w których pięcioczłonowy pierścień rybozy został zastąpiony sześcioczłonowym pierścieniem morfolinowym. Dodatkowo, ujemnie naładowane wiązanie fosfodiesterowe, występujące w naturalnych kwasach nukleinowych, zastąpione zostało niejonowym wiązaniem amidofosforanowym. Konsekwencją zmian strukturalnych są pewne korzystne cechy, jakimi charakteryzują się te związki: 1) są całkowicie stabilne w systemach biologicznych, 2) wykazują wysokie powinowactwo do komplementarnych RNA, dużo wyższe niż oligonukleotydy niemodyfikowane, 3) są doskonale rozpuszczalne w roztworach wodnych w przeciwieństwie do innych związków niejonowych, 4) ze względu na swoją naturę nie oddziałują z białkami, z czym wiąże się brak efektów ubocznych, 5) brak ładunku umożliwia wydajny transport dkomórkowy poprzez mechanizm nietoksycznej endocytozy (119). Zhang i wsp. przeprowadzili syntezę siRNA zawierających morfolinowe pochodne urydyny i zbadali ich właściwości (120).



Rys. 5. Wybrane przykłady modyfikacji chemicznych zasad heterocyklicznych.

Użyte symbole oznaczają kolejno: 5-BrU: 5-bromourydyna; 5-IU: 5-jodourydyna; 2,6-DAP: 2,6-diaminopuryna; PU: 5-propynylourydyna; mU: 5-metylourydyna; mC: 5-metylocytydyna; s²U: 2-tiourydyna; D: dihydrourydyna; Y: pseudourydyna; rF: 2,4-difluorotolueno rybonukleozyd.

Modyfikacje były wprowadzone w różnych pozycjach nici sensowej i antysensowej dupletu. Większość dupletów wykazywała aktywność porównywalną z siRNA niemodyfikowanym, z wyjątkiem tych, które miały modyfikację w nici antysensowej w pozycjach 1, 7 i 10. Te duplety były całkowicie nieaktywne. Najbardziej efektywne i stabilne w osoczu okazały się cząsteczki siRNA z jednostkami morfolinowymi wprowadzonymi na końcach 3' obu nici.

4.3. Modyfikacja zasad heterocyklicznych

Niewiele jest przykładów wprowadzania modyfikacji chemicznych w zasadach heterocyklicznych, niektóre z nich przedstawione są na rysunku 5. W jednym z pierwszych przykładów zastosowania modyfikowanych nukleozasad Parrish i wsp. zbadali wpływ podstawienia 4-tio- (4-SU), 5-bromo- (5-BrU), 5-jodo- (5-IU) i 5-(3-aminoalli-

lo-urydyny w miejsce urydyny oraz **inozyny** w miejsce guanozyny w nici sensowej lub antysensowej siRNA skierowanego na geny *unc-22A* i *unc-54A* (71). Zaobserwowano pewne różnice w stopniu wyciszenia docelowych genów w zależności od rodzaju modyfikacji i miejsca jej wprowadzenia. Wprowadzenie 4-tio-urydyny, 5-bromo-urydyny i inozyny nie zmieniało aktywności siRNA bez względu na to, która nić dupletu była modyfikowana. Jednostki 5-jodo-urydyny czy 5-(3-aminoallilo)-urydyny wprowadzone do nici antysensowej poważnie obniżały aktywność siRNA, modyfikacja nici sensowej nie powodowała zmian w aktywności RNAi. Chiu i Rana opisali eksperyment, w którym zastosowali duplety RNA zawierające 5-bromo-urydynę, 5-jodo-urydynę, **N-3-metylo-urydynę** w miejscu urydyny i **2,6-diaminopurynę (2,6-DAP)** w miejscu adeniny (70). Duplety siRNA skierowane były na gen białka zielonej fluorescencji (GFP, ang. *Green Fluorescent Protein*). Oceny aktywności dokonano stosując tzw. test podwójnej fluorescencji (DFA, ang. *Dual Fluorescence Assay*). Wszystkie modyfikacje stabilizujące strukturę dupletu (5-BrU, 5-IU, 2,6-DAP), czy destabilizujące jak N-3-metylo-urydyna, powodowały obniżenie aktywności siRNA w kierunku inhibicji ekspresji docelowego genu. W kolejnych badaniach Sipa i wsp. ocenili stabilność termodynamiczną oraz aktywność siRNA z trzema naturalnie występującymi rzadkimi nukleozydami: **2-tio-urydyną (s²U)**, **pseudourydyną (Ψ)** i **dihydrourydyną (D)** (51). Zade monstrowano możliwość modulacji właściwości siRNA, a przede wszystkim zdolności dupletu do wyciszania docelowego genu, w zależności od miejsca wprowadzenia modyfikacji. 2-tio-urydyna i pseudourydyna przyjmują konformację C3'-*endo* rybozy i tym samym stabilizują duplet RNA (121-123). Dihydrourydyna destabilizuje strukturę RNA przyjmując konformację pierścienia cukrowego typu C2'-*endo*, która jest charakterystyczna dla struktury typu B DNA (124). Dodatkowo pierścień zasady w dihydrourydynie ma charakter niearomatyczny, co wyklucza oddziaływania warstwowe (ang. *stacking*) z sąsiednimi zasadami w łańcuchu RNA (122,125). Umieszczenie nukleozydów stabilizujących strukturę RNA (s²U, Ψ) na końcu 5' nici sensowej lub końcu 3' nici antysensowej (np. w pozycji 19) oraz nukleozydu destabilizującego (D) na końcu 3' nici sensowej (pozycja 19) wpływa w znaczącym stopniu na zwiększenie termodynamicznej asymetrii dupletu siRNA, a tym samym wymusza uczestnictwo nici antysensowej jako nici aktywnej w mechanizmie RNAi. Wprowadzenie modyfikowanych nukleozydów (s²U, Ψ) do centralnej domeny nici antysensowej (pozycja 10) dało wynik zależny od charakteru/typu modyfikacji. Wprowadzenie s²U w pozycji 10 nici antysensowej nie zmieniło aktywności wyciszającej dupletu, natomiast wprowadzenie w tę pozycję jednostki Ψ znacznie obniżyło aktywność badanego siRNA. Destabilizacja struktury RNA w miejscu hydrolizy docelowego mRNA poprzez wprowadzenie wiązania typu wahadłowego (ang. *wobble*) powoduje znaczące obniżenie aktywności dupletu. Sąsiadująca z wiązaniem *wobble* 2-tio-urydyna przywraca siRNA zdolność do wyciszenia docelowego genu. Informacja ta może być wskazówką do projektowania sekwencji siRNA skierowanych na geny z mutacjami punktowymi.

Kool i wsp. badali wpływ podstawienia grupy metylowej i propynylowej na węgiel C-5 w zasadach pirymidynowych (**5-metylo-U**, **5-metylo-C**, **5-propynilo-U**, **5-pro-**

propynylo-C) na stabilność i aktywność dupleksów siRNA (126). Celem tych badań była również odpowiedź na pytanie, w jaki sposób wprowadzenie zawady przestrzennej, jaką stwarzają te podstawniki (grupa propynyłowa $\sim 53 \text{ \AA}^3$, grupa metylowa $\sim 23 \text{ \AA}^3$), zaburza oddziaływanie pomiędzy nicią aktywną a docelowym mRNA w kompleksie białkowym RISC. Udowodniono, że podstawienie grupy metylowej czy propynyłowej na C-5 podnosi stabilność termiczną (wzrost T_m od kilku do kilkunastu stopni C, w zależności od ilości i rodzaju modyfikacji) oraz stabilność dupleksów RNA wobec nukleaz. Badanie stopnia zahamowania ekspresji genu docelowego (gen lucyferazy w komórkach HeLa) wykazało, że wprowadzenie dużej grupy propynyłowej znacznie obniża aktywność RNAi pomimo stabilizacji struktury RNA. Efekt obniżenia aktywności siRNA był większy, gdy modyfikacje obejmowały nukleozydy znajdujące się w nici antysensowej, w pozycjach 1-7. Podstawienie zasad pirymidynowych na C-5 mniejszą grupą metylową nie wywoływało efektu obniżenia aktywności siRNA. Wyniki te wskazują jednoznacznie na ścisły związek pomiędzy wielkością podstawnika (zawadą przestrzenną), znajdującego się w dużym rowku w strukturze duplexu siRNA/mRNA a zaburzeniem oddziaływania z komponentami białkowymi kompleksu RISC i wynikającym z tego zahamowaniem wyciszenia RNAi.

Badano również pewne atypowe nukleozydy, które zamiast zasady heterocyklicznej zawierały podstawnik **difluorotoluenowy**, **2,4-difluorotoluenowy** czy **2,4-dichlorobenzenowy** (127,128). Difluorotoluen jest podobny strukturalnie do tyminy, ale nie może tworzyć klasycznych wiązań wodorowych. Możliwe jest pojedyncze zastąpienie urydyny przez tak podstawiony nukleozyd bez zmiany aktywności duplexu siRNA (127). Niepolarne nukleozasady (2,4-difluorotoluen, 2,4-dichlorobenzen) są również tolerowane w pewnych pozycjach (nić antysensowa pozycja: 1, 3, 4, 7, 19) siRNA (128). Destabilizacja struktury duplexu w miejscu podstawienia urydyny przez nukleozyd z resztą 2,4-difluorotoluenową była mniejsza niż w przypadku innych mutacji, obserwowano również podwyższoną stabilność duplexu w osoczu.

Wprowadzenie modyfikacji chemicznych do zasad heterocyklicznych (Ψ , 5-metylo-C, N^6 -metylo-A) może zapobiec lub zredukować efekty immunostymulacji wywołane przez duplekisy RNA, np. aktywację receptorów rozpoznających dwuniciowy czy jednoniciowy RNA (TLR3, TLR7 i TLR8) (129).

4.4. Modyfikacje chemiczne końców siRNA, koniugaty

Aby ніć antysensowa duplexu siRNA mogła wejść na szlak interferencji RNA musi być ufosforylowana na 5'-końcu (13). Wszystkie modyfikacje chemiczne, które nie zaburzają oddziaływania końca 5' nici antysensowej ze specyficzną kinazą (np. hClp1 w komórkach ludzkich) są dozwolone. Fosforylacja grupy OH znajdującej się na końcu 5' nici sensowej nie jest wymagana dla aktywności duplexu. Wprowadzenie grupy 2'-O-Me do 5'-końcowego nukleotydu w nici sensowej zabezpiecza jej ko-

niec 5' przed fosforylacją, a tym samym wymusza inkorporację nici antysensowej do kompleksu RISC (130).

Końce dupleksu są również miejscem, gdzie możliwe jest przyłączenie różnych grup funkcyjnych, mających różnorakie zadania: np. zwiększenie stabilności dupleksu, np. przyłączenie reszty 2'-deoksyrybozy poprzez wiązanie 5'-5' (ang. *Inverted Deoxy Abasic Residue*) (131), umożliwianie wizualizacji dupleksów w komórkach (fluorofory, biotyna) (69,82), wspomagające transport dokomórkowy, w tym również transport ukierunkowany na dany typ komórek (związki lipidowe, cholesterol, długie rozgałęzione łańcuchy alkilowe, peptydy, aptamery) (132-135). Najbezpieczniejszym miejscem dla przyłączenia wymienionych grup są końce 5' i 3' nici sensowej. Teoretycznie, również koniec 3' nici antysensowej może służyć do przyłączenia koniugatów, chociaż wprowadzenie cząsteczek chemicznych w tym rejonie może zaburzać rozpoznanie 3'-terminalnych niesparowanych nukleotydów nici aktywnej przez domenę PAZ białka Ago2, a tym samym zahamować cały proces RNAi (136). Jeszcze bardziej restrykcyjnie jest traktowany koniec 5' nici antysensowej, który oddziałuje z domeną PIWI białka Ago (137).

Większość koniugatów jest przyłączana do siRNA przez hydrolizowalne łączniki, wśród nich kwasowo-labilne lub ulegające redukcji wiązania disiarczkowe pomiędzy RNA i przyłączaną grupą, w celu łatwego uwolnienia nietkniętych siRNA we wnętrzu komórki.

Przyłączenie związków lipidowych do siRNA wspomaga transport dokomórkowy poprzez zwiększenie przepuszczalności błony komórkowej dla kwasu nukleinowego lub poprzez endocytozę receptorowo-zależną. Znane są pozytywne przykłady zastosowania koniugatów siRNA z cholesterolem (chol-siRNA) przyłączonym na końcu 5' (138) lub końcu 3' nici sensowej (139). Transport chol-siRNA do komórek odbywał się bez udziału innych czynników transfekcyjnych, przy czym zaobserwowano znaczne wyciszenie ekspresji docelowego genu. W przeprowadzonych eksperymentach *in vivo* wykazano, że podany do żyły ogonowej gryzoni chol-siRNA lokalizował się głównie w wątrobie i w jelicie cienkim. Podobnie, jak we wcześniejszych eksperymentach *in vitro* obserwowano inhibicję ekspresji docelowego genu.

Peptydy CPP (ang. *Cell Penetrating Peptides*), o długości 10-30 aminokwasów, szczególnie zasadowych, mają zdolność „przenoszenia” hydrofilowych makromolekuł, jak peptydy czy kwasy nukleinowe, przez błonę komórkową. W literaturze związanej tematycznie z transportem siRNA jest wiele przykładów sekwencji takich peptydów, m in. TAT (ang. *Trans Activator Protein from HIV-1*) skoniugowany z końcem 3' nici antysensowej (140-142). TAT znacząco polepszał transport siRNA do komórek, co przejawiało się obniżeniem poziomu docelowego białka.

Polietylenoglikol (PEG) skoniugowany z siRNA jest często skompleksowany z kationowymi polimerami lub peptydami jako czynnikami kondensującymi w celu utworzenia koloidalnych nanocząsteczek, zwanych PEC-micelami (ang. *Polyelectrolyte Complex Micelles*) (143,144). Koniugaty PEG-siRNA wykazywały znacznie wyższą stabilność niż tzw. nagie siRNA w 50% osoczu (145).

Ukierunkowany transport dokomórkowy jest bardzo atrakcyjną możliwością wprowadzania siRNA, szczególnie w aspekcie przyszłych terapii. Ten sposób wprowadzania siRNA do organizmu zmniejsza niebezpieczeństwo powikłań i obniża znacznie dawkę leku. Przyłączenie specyficznych ligandów: aptamerów, przeciwciał, peptydów, cząsteczek cukrów, witamin i hormonów) do siRNA prowadzi do specyficznego rozpoznania, oddziaływania pomiędzy ligandem a jego receptorem na powierzchni komórki (146-148). Przykładem zastosowania tej technologii jest skoniugowanie siRNA z aptamerem skierowanym na receptor specyficzny dla komórek nowotworu prostaty (PSMA, ang. *Prostate-Specific Membrane Antigen*) (149).

5. Perspektywy

Pomimo że interferencja RNA jest wciąż jeszcze nowatorską techniką modulacji ekspresji genów, to istnieje lista chorób, wobec których duplekisy siRNA są testowane jako potencjalne leki w różnych fazach badań klinicznych (150). Sukces, jakim będzie wprowadzenie siRNA do lecznictwa, nie będzie osiągnięty bez polepszenia właściwości dupleksów RNA, podwyższenia bezpieczeństwa stosowania, efektywności, specyficzności, stabilności, redukcji efektów ubocznych i niezawodności systemu ukierunkowanego transportu cząsteczek siRNA/shRNA do określonych tkanek czy nawet komórek. Modyfikacje chemiczne w znacznym stopniu przyczyniają się do pokonania tych wyzwań. Jest to szybko rozwijająca się dziedzina badań w obszarze syntetycznych siRNA. Stabilizacja lub destabilizacja oddziaływań pomiędzy oboma niciami w pewnych rejonach siRNA dała możliwość modulowania termodynamiczną stabilnością i asymetrią dupletu, co z kolei pozwala selektywnie włączać tylko jedną z nici (dedykowaną jako nić aktywną) do dalszych etapów RNAi. Modyfikacje blokujące wystąpienie niespecyficznych efektów, tj. indukcji odpowiedzi immunologicznej (np. 2'-O-Me, 2'-F) czy niepożądanego wyciszenia ekspresji genów innych niż zaplanowany (np. 2'-O-Me w pozycji 2 nici antysensowej), znacznie wzmacniają specyficzność dupleksów. Modyfikacje chemiczne zwiększające stabilność wiązania internukleotydowego aktywnością obecności nukleaz powodują wydłużenie efektu wyciszenia, pozwalają na bardziej efektywny transport i biodystrybucję. Przyłączenie do nici siRNA cząsteczek umożliwiających dostarczenie ich do określonych komórek stwarza możliwość efektywnego i ukierunkowanego transportu w objęte chorobą konkretne miejsca w organizmie. Interesującą koncepcją jest kombinacja kilku uzupełniających się modyfikacji w jednej cząsteczce siRNA. Możliwe jest wówczas tworzenie zupełnie nowych i różnych od naturalnych cząsteczek, posiadających nowe właściwości biologiczne. Wyzwaniem jest znalezienie uniwersalnej strategii projektowania struktury i modyfikacji chemicznych w siRNA, które będą najbardziej odpowiednie dla konkretnego zadania, jakim jest inhibicja ekspresji określonego genu.

Praca finansowana z projektu PBZ-MNiSW-07/I/2007 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w latach 2008-2010.

Literatura

1. Fire A., Xu S. Q., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C., (1998), *Nature*, 391, 806-813.
2. Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S. M., Hannon G. J., (2001), *Nature*, 409, 363-366.
3. Martinez J., Patkaniowska A., Urlaub H., Luhrmann R., Tuschl T., (2002), *Cell*, 110, 563-574.
4. Liu J., Carmell M. A., Rivas F. V., Marsden C. G., Hannon G. J., (2004), *Science*, 305, 1437-1441.
5. Shukla S., Sumaria C. S., Pradeepkumar P. I., (2009), *ChemMedChem*, DOI:10.1002/cmdc.(2009)00444.
6. Lüsebrink J., Schildgen V., Schildgen O., (2009), *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 7, 1125-1129.
7. Rand T. A., Ginalski K., Grishin N. V., Wang X., (2005), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 14385-14389.
8. Matranga C., Tomari Y., Shin C., Bartel D. P., Zamore P. D., (2005), *Cell*, 123, 607-620.
9. Chendrimada T. P., Gregory R. I., Kumaraswamy E., Norman J., Cooch N., Nishikura K., Shiekhattar R., (2005), *Nature*, 436, 740-744.
10. Wang H. W., Noland C., Siridechadilok B., Taylor D. W., Ma E., Felderer K., Doudna J. A., Nogales E., (2009), *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 16, 1148-1153.
11. Rand T. A., Petersen S., Du F., Wang X., (2005), *Cell*, 123, 621-629.
12. Elbashir S. M., Lendeckel W., Tuschl T., (2001), *Genes Dev.*, 15, 188-200.
13. Weitzer S., Javier Martinez J., (2007), *Nature*, 447, 222-226.
14. Tomari Y., Matranga C., Haley B., Martinez N., Zamore P. D., (2004), *Science*, 306, 1377-1380.
15. Gredell J. A., Dittmer M. J., Wu M., Chan C., Walton S. P., (2010), *Biochemistry*, DOI:10.1021/bi902189s.
16. Malone C. D., Hannon G. J., (2009), *Cell*, 136, 656-668.
17. Kim V. N., Han J., Siomi M. C., (2009), *Nature Rev.*, 10, 126-139.
18. Praveensingh B. H., Sunit K. S., (2009), *Drug Disc. Today*, 14, 851-858.
19. Jackson A. L., Burchard J., Schelter J., Chau B. N., Cleary M., Lim L., Linsley P. S., (2006), *RNA*, 12, 1179-1187.
20. Dahlgren C., Zhang H.-Y., Du Q., Grahn M., Norstedt G., Wahlestedt C., Liang Z., (2008), *Nucleic Acids Res.*, 36, e53.
21. Birmingham A., Anderson E. M., Reynolds A., Ilsley-Tyree D., Leake D., Fedorov Y., Baskerville S., Maksimova E., Robinson K., Karpilow J., Marshall W. S., Khvorova A., (2006), *Nat. Methods*, 3, 199-204.
22. Jackson A. L., Bartz S. R., Schelter J., Kobayashi S. V., Burchard J., Mao M., Li B., Cavet G., Linsley P. S., (2003), *Nat. Biotechnol.*, 21, 635-637.
23. Brown K. M., Chu C. Y., Rana T. M., (2005), *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12, 469-470.
24. Gredell J. A., Berger A. K., Walton S. P., (2008), *Biotech. and Bioeng.*, 100, 744-755.
25. Rudnick S. I., Swaminathan J., Sumaroka M., Liebhaber S., Gewirtz A. M., (2008), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 13787-13792.
26. Sierant M., Kubiak K., Kazmierczak-Baranska J., Warashina M., Kuwabara T., Nawrot B., (2009), *International Journal of Alzheimer's Disease*, vol. art. ID 257403.
27. Henschel A., Buchholz F., Habermann B., (2004), *Nucleic Acids Res.*, 32, W113-W120.
28. Dudek P., Picard D., (2004), *Nucleic Acids Res.*, 32, W121-W123.
29. Gong W., Ren Y., Xu Q., Wang Y., Lin D., Zhou H., Li T., (2006), *BMC Bioinformatics*, 7, 516.
30. Naito Y., Yamada T., Ui-Tei K., Morishita S., Saigo K., (2004), *Nucleic Acids Res.*, 32, W124-W129.
31. Truss M., Swat M., Kielbasa S. M., Schäfer R., Herzel H., Hagemeyer C., (2005), *Nucleic Acids Res.*, 33 (Database issue), D108-D111.
32. Huesken D., Lange J., Mickanin C., Weiler J., Asselbergs F., Warner J., Meloon B., Engel S., Rosenberg A., Cohen D., Labow M., Reinhardt M., Natt F., Hall J., (2005), *Nat. Biotechnol.*, 23, 995-1001.

33. Ren Y., Gong W., Xu, Q., Zheng X., Lin D., Wang Y., Li T., (2006), *Bioinformatics*, 22, 1027-1028.
34. Naito Y., Ui-Tei K., Nishikawa T., Takebe Y., Saigo K., (2006), *Nucleic Acids Res.*, 34, W448-W450.
35. Marques J. T., Devosse T., Wang D., Zamanian-Daryoush M., Serbinowski P., Hartmann R., Fujita T., Behlke M. A., Williams B. R. G., (2006), *Nat. Biotech.*, 24, 559-565.
36. Schlee M., Hornung V. I., Hartmann G., (2006), *Mol. Ther.*, 14, 463-470.
37. Judge A. D., Sood V., Shaw J. R., Fang D., McClintock K. I., Maclachlan I., (2005), *Nat. Biotechnol.*, 23, 457-462.
38. Hornung V., Guenther-Biller M., Bourquin C., Ablasser A., Schlee M., Uematsu S., Noronha A., Manoharan M., Akira S., DeFougerolles A., Endres S., Hartmann G., (2005), *Nat. Med.*, 11, 263-270.
39. Diebold S. S., Massacrier C., Akira S., Patrel C., Morel Y., Sousa C. R., (2006), *Eur. J. Immunol.*, 36, 3256-3267.
40. Kim D-H., Longo M., Han Y., Lundberg P., Cantin E., Rossi J. J., (2004), *Nat. Biotechnol.*, 22, 321-325.
41. Reynolds A., Anderson E. M., Vermeulen A., Fedorov Y., Robinson K., Leake D., Karpilow J., Marshall W. S., Khvorova A., (2006), *RNA*, 12, 988-993.
42. Song E., Zhu P., Lee S. K., Chowdhury D., Kussman S., Dykxhoorn D. M., Feng Y., Palliser D., Weiner D. B., Shankar P., Marasco W. A., Lieberman J., (2005), *Nat. Biotechnol.*, 23, 709-717.
43. Wei J. X., Yang J., Sun J. F., Jia L. T., Zhang Y., Zhang H. Z., Li X., Meng Y. L., Yao L. B., Yang A. G., (2009), *PLoS One*, 4, e5382.
44. Schwarz D. S., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N., Zamore P. D., (2003), *Cell*, 115, 199-208.
45. Carthew R. W., Sontheimer E. J., (2009), *Cell*, 136, 642-655.
46. Aronin N., (2006), *Gene Ther.*, 13, 509-516.
47. Ui-Tei K., Naito Y., Takahashi F., Haraguchi T., Ohki-Hamazaki H., Juni A., Ueda R., Saigo K., (2004), *Nucleic Acids Res.*, 32, 936-948.
48. Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W. S., Khvorova A., (2004), *Nat. Biotechnol.*, 22, 326-330.
49. Jagla B., Aulner N., Kelly P. D., Song D., Volchuk A., Zatorski A., Shum D., Mayer T., de Angelis D. A., Ouerfelli O., Rutishauser U., Rothman J. E., (2005), *RNA*, 11, 864-872.
50. Shabalina S. A., Spiridonov A. N., Ogurtsov A. Y., (2006), *BMC Bioinformatics*, 7, 65.
51. Sipa K., Sochacka E., Kazmierczak-Baranska J., Maszewska M., Janicka M., Nowak G., Nawrot B., (2007), *RNA*, 13, 1301-1316.
52. Bramson J. B., Laursen M. B., Nielsen A. F., Hansen T. B., Bus C., Langkjaer N., Babu B. R., Hojland T., Abramov M., van Aerschoot A., Odadzic D., Smicic R., Haas J., Andree C., Barman J., Wenska M., Srivastava P., Zhou C., Honcharenko D., Hess S., Müller E., Bobkov G. V., Mikhailov S. N., Fava E., Meyer T. F., Chattopadhyaya J., Zerial M., Engels J. W., Herdewijn P., Wengel J., Kjems J., (2009), *Nucleic Acids Res.*, 37, 2867-2881.
53. Sano M., Sierant M., Miyagishi M., Nakanishi M., Takagi Y., Sutou S., (2008), *Nucleic Acids Res.*, 36, 5812-5821.
54. Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T., (2001), *Nature*, 411, 494-498.
55. Meister G., Tuschl T., (2004), *Nature*, 431, 343-349.
56. Filipowicz W., Jaskiewicz L., Kolb F. A., Pillai R. S., (2005), *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 15, 331-341.
57. Bartel D. P., (2004), *Cell*, 116, 281-297.
58. Tomari Y., Zamore P. D., (2005), *Genes Dev.*, 19, 517-529.
59. Elbashir S. M., Martinez J., Patkaniowska A., Lendeckel W., Tuschl T., (2001), *EMBO J.*, 20, 6877-6888.
60. Minks M. A., West D. K., Benveniste S., Baglioni C., (1979), *J. Biol. Chem.*, 254, 10180-10183.
61. Kim D-H., Behlke M. A., Rose S. D., Chang M-S., Choi S., Rossi J. J., (2005), *Nat. Biotechnol.*, 23, 222-226.
62. Amarzguioui M., Lundberg P., Cantin E., Hagstrom J., Behlke M. A., Rossi J. J., (2006), *Nat. Protoc.*, 1, 508-517.
63. Kubo T., Zhelev Z., Ohba H., Bakalova R., (2007), *Oligonucleotides*, 17, 445-464.
64. Sun X., Rogoff H. A., Li C. J., (2008), *Nat. Biotechnol.*, 26, 1379-1382.

65. Chang C. I., Yoo J. W., Hong S. W., Lee S. E., Kang H. S., Sun X., Rogoff H. A., Ban C., Kim S., Li C. J., Lee D-K., (2009), *Mol. Ther.*, 17, 725-732.
66. Bramsen J. B., Laursen M. B., Damgaard C. K., Lena S. W., Babu B. R., Wengel J., Kjems J., (2007), *Nucleic Acids Res.*, 35, 5886-5897.
67. Siolas D., Lerner C., Burchard J., Ge W., Linsley P. S., Paddison P. J., Hannon G. J., Cleary M. A., (2005), *Nat. Biotechnol.*, 23, 227-231.
68. Abe N., Abe H., Ito Y., (2007), *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 15108.
69. Chiu Y. L., Rana T. M., (2002), *Mol Cell.*, 10, 549-561.
70. Chiu Y. L., Rana T. M., (2003), *RNA*, 9, 1034-1048.
71. Parrish S., Fleenor J., Xu S., Mell C., Fire A., (2000), *Mol. Cell*, 6, 1077-1087.
72. Ui-Tei K., Naito Y., Zenno S., Nishi K., Yamato K., Takahashi F., Juni A., Saigo K., (2008), *Nucleic Acids Res.*, 36, 2136-2151.
73. Ittig D., Schümperli D., Leumann C. J., (2008), *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 52, 501-502.
74. Braasch D. A., Jensen S., Liu Y., Kaur K., Arar K., White M. A., Corey D. R., (2003), *Biochemistry*, 42, 7967-7975.
75. Czauderna F., Fechtner M., Dames S., Aygun H., Klippel A., Pronk G. J., Giese K., Kaufmann J., (2003), *Nucleic Acids Res.*, 31, 2705-2716.
76. Kraynack B. A., Baker B. F., (2006), *RNA*, 12, 163-176.
77. Choung S., Kim Y. J., Kim S., Park H.-O., Choi Y-C., (2006), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 342, 919-927.
78. Robbins M., Judge A., Liang L., McClintock K., Yaworski E., McLachlan I., (2007), *Mol. Ther.*, 15, 1663-1669.
79. Chen X., Shen L., Wang J. H., (2004), *Oligonucleotides*, 14, 90-99.
80. Chen X., Dudgeon N., Shen L., Wang J. H., (2005), *Drug Discov. Today*, 10, 587-593.
81. Egli M., Minasov G., Tereshko V., Pallan P. S., Teplova M., Inamati G. B., Lesnik E. A., Owens S. R., Ross B. S., Prakash T. P., Manoharan M., (2005), *Biochemistry*, 44, 9045-9057.
82. Harborth J., Elbashir S. M., Vandeburgh K., Manninga H., Scaringe S. A., Weber K., Tuschl T., (2003) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 13, 83-105.
83. Blidner R. A., Hammer R. P., Lopez M. J., Robinson S. O., Monroe W. T., (2007), *Chem. Biol. Drug Des.*, 70, 113-122.
84. Kawasaki A. M., Casper M. D., Freier S. M., Lesnik E. A., Zounes M. C., Cummins L. L., Gonzalez C., Cook P. D., (1993), *J. Med. Chem.*, 36, 831-841.
85. Layzer J. M., Mccaffrey A. P., Tanner A. K., Huang Z., Kay M. A., Sullenger B. A., (2004), *RNA*, 10, 766-771.
86. Dowler T., Bergeron D., Tedeschi A. L., Paquet L., Ferrari N., Damha M. J., (2006), *Nucleic Acids Res.*, 34, 1669-1675.
87. Watts J. K., Choubdar N., Sadalapure K., Robert F., Wahba A. S., Pelletier J., Mario Pinto B., Damha M. J., (2007), *Nucleic Acids Res.*, 35, 1441-1451.
88. Watts J. K., Katolik A., Viladoms J., Damha M. J., (2009), *Org. Biomol. Chem.*, 7, 1904-1910.
89. Sierant M., Sobczak M., Janicka M., Padaszyńska A., Piotrkowska D., (2010), *New J. Chem.*, 34, 918-924.
90. Dande P., Prakash T. P., Sioufi N., Gaus H., Jarres R., Berdeja A., Swayze E. E., Griffey R. H., Bhat B., (2006), *J. Med. Chem.*, 49, 1624-1634.
91. Hoshika S., Minakawa N., Shionoya A., Imada K., Ogawa N., Matsuda A., (2007), *ChemBioChem*, 8, 2133-2138.
92. Kenski D. M., Cooper A. J., Li J. J., Willingham A. T., Harnsma H. J., Young T. A., Kuklin N. A., Jones J. J., Cancilla M. T., McMasters D. R., Mathur M., Sachs A. B., Flanagan W. M., (2010), *Nucleic Acids Res.*, 38, 660-671.
93. Petersen M., Bondensgaard K., Wengel J., Jacobsen J. P., (2002), *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 5974-5982.
94. Nielsen K. E., Rasmussen J., Kumar R., Wengel J., Jacobsen J. P., Petersen M., (2004), *Bioconjugate Chem.*, 15, 449-457.
95. Singh S. K., Koshkin A. A., Wengel J., Nielsen P., (1998), *Chem. Commun.*, 455.

96. Vester B., Wengel J., (2004), *Biochemistry*, 43, 13233-13241.
97. Hornung V., Guenther-Biller M., Bourquin C., Ablasser A., Schlee M., Uematsu S., Noronha A., Manoharan M., Akira S., de Fougerolles A., Endres S., Hartmann, G., (2005), *Nat. Med.*, 11, 263-270.
98. Mook O. R., Baas F., de Wissel M. B., Fluiler K., (2007), *Mol. Cancer Therap.*, 6, 833-843.
99. Elmen J., Thonberg H., Ljungberg K., Frieden M., Westergaard M., Xu Y., Wahren B., Liang Z., Urum H., Koch T., Wahlestedt C., (2005), *Nucleic Acids Res.*, 33, 439-447.
100. Hamada M., Ohtsuka T., Kawaida R., Koizumi M., Morita K., Furukawa H., Imanishi T., Miyagishi M., Taira, K., (2002), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 12, 301-309.
101. Amarzguioui M., Holen T., Babaie E., Prydz H., (2003), *Nucleic Acids Res.*, 31, 589-595.
102. Koziolkiewicz M., Wójcik M., Kobyłańska A., Karwowski B., Rebowska B., Guga P., Stec W. J., (1997), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 7, 43-48.
103. Eckstein F., (2002), *Biochimie*, 84, 841-848.
104. Braasch D. A., Paroo Z., Constantinescu A., Ren G., Oz O. K., Mason R. P., Corey D. R., (2004), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 1139-1143.
105. Krieg A. M., Stein C. A., (1995), *Antisense Res. Dev.*, 5, 241.
106. Nawrot B., Sipa K., (2006), *Curr. Top. Med. Chem.*, 6, 913-925.
107. Leuschner P. J. F., Ameres S. L., Kueng S., Martinez J., (2006), *EMBO Reports*, 7, 314-320.
108. Overhoff M., Sczakiel G., (2005), *EMBO Rep.*, 6, 1176-1181.
109. Detzer A., Sczakiel G., (2009), *Curr. Top. Med. Chem.*, 9, 1109-1116.
110. Yang X., Nawrot B., Sierant M., Janicka M., Martinez C., Mierzejewski E., Hassell T., (2010), prezentacja na konferencji TIDES, Boston, USA, (25-28 kwietnia).
111. Sierant M., Janicka M., Yang X., Mierzejewski E., Nawrot B., (2010), prezentacja na konferencji ICPC, Wrocław (11-15 lipca).
112. Sood A., Ramsay Shaw B., Spielvogel B. F., (1990) *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 9000-9001
113. Hall A. H., Wan J., Shaughnessy E. E., Ramsay Shaw B., Alexander K. A., (2004), *Nucleic Acids Res.*, 32, 5991-6000.
114. Ramsay Shaw B., Sergueev D. S., He K., Porter K., Summers J., Sergueeva Z., Rait V., (1999), *Meth. Enzymol.*, 313, 226-257.
115. Li P., Sergueeva Z. A., Dobrikov M., Shaw B. R., (2007), *Chem Rev.*, 107, 4746-4796.
116. Potenza N., Moggio L., Milano G., Salvatore V., di Blasio B., Russo A., Messere A., (2008), *Int. J. of Mol. Sci.*, 9, 299-315.
117. Stirchak E. P., Summerton J. E., Weller D. D., (1989), *Nucleic Acids Res.*, 17, 6129-6141.
118. Summerton J. E., Weller D. D., (1993), US Patent 5,185,444, Feb 9.
119. Summerton J. E., (2007), *Curr. Top. Med. Chem.*, 7, 651-660.
120. Zhang N., Tan C., Cai P., Zhang P., Zhao Y., Jiang Y., (2009), *Bioorg Med Chem.* 17, 2441-2446.
121. Agris P. F., Sierzputowska-Gracz H., Smith W., Malkiewicz A., Sochacka E., Nawrot B., (1992), *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 2652-2656.
122. Davis D., (1998), *In Modification and editing of RNA*, Eds. H. Grosjean, B. Benne, 85-102, ASM Press, Washington, DC.
123. Kumar R. K., Davis D. R., (1997), *Nucleic Acids Res.*, 25, 1272-1280.
124. Stuart J. W., Basti M. M., Smith W., Forrest B., Guenther R., Sierzputowska-Gracz H., Nawrot B., Malkiewicz A., Agris P. F., (1996), *Nucleosides Nucleotides*, 15, 1009-1028.
125. Westhof E., Dumas P., Moras D., (1988), *Acta Crystallogr. A*, 44, 112-123.
126. Terrazas M., Kool E. T., (2009), *Nucleic Acids Res.*, 37, 346-353.
127. Xia J., Noronha A., Toudjarska I., Li F., Akinc A., Braich R., Frank-Kamenetsky M., Rajeev K.G., Egli M., Manoharan M., (2006), *ACS Chem. Biol.*, 1, 176.
128. Somoza A., Silverman A. P., Miller R. M., Chelliserrykattil J., Kool E. T., (2008), *Chem. Eur. J.*, 14, 7978-7987.
129. Kariko K., Buckstein M., Ni H., Weissman D., (2005), *Immunity*, 23, 165-175.
130. Chen P. Y., Weinmann L., Gaidatzis D., Pei Y., Zavolan M., Tuschl T., Meister G., (2008), *RNA*, 14, 263-274.

131. Morrissey D. V., Blanchard K., Shaw L., Jensen K., Lockridge J. A., Dickinson B., McSwiggen J. A., Vargeese C., Bowman K., Shaffer C. S., Polisky B. A., Zinnen S., (2005), *Hepatology*, 41, 1349-1356.
132. Soutschek J., Akinc A., Bramlage B., Charisse K., Constien R., Donoghue M., Elbashir S., Geick A., Hadwiger P., Harborth J., (2004), *Nature*, 432, 173-178.
133. Lorenz C., Hadwiger, P., John M., Vornlocher H. P., Unverzagt C., (2004), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 4975-4977.
134. Muratowska A., Eccles M. R., (2004), *FEBS Lett.*, 558, 63-68.
135. McNamara J. O., 2nd, Andrechek E. R., Wang Y., Viles K. D., Rempel R. E., Gilboa E., Sullenger B. A., Giangrande P. H., (2006), *Nat. Biotechnol.*, 24, 1005-1015.
136. Ma J. B., Ye K., Patel D. J., (2004), *Nature*, 429, 318-322.
137. Ma J. B., Yuan Y. R., Meister G., Pei Y., Tuschl T., Patel D. J., (2005), *Nature*, 434, 666-670.
138. Soutschek J., Akinc A., Bramlage B., Charisse K., Constien R., Donoghue M., Elbashir S., Geick A., Hadwiger P., Harborth J., John M., Kesavan V., Lavine G., Pandey R. K., Racie T., Rajeev K. G., Rohl I., Toudjarska I., Wang G., Wuschko S., Bumcrot D., Koteliensky V., Limmer S., Manoharan M., Vornlocher H. P., (2004), *Nature*, 432, 173-178.
139. Moschos S. A., Jones S. W., Perry M. M., Williams A. E., Erjefalt J. S., Turner J. J., Barnes P. J., Sproat B. S., Gait M. J., Lindsay M. A., (2007), *Bioconjug. Chem.*, 18, 1450-1459.
140. Vives E., Brodin P., Lebleu B. A., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 16010-16017.
141. Pooga M., Hallbrink M., Zorko M., Langel U., (1998), *FASEB J.*, 12, 67-77.
142. Cesarone G., Edupuganti O. P., Chen C. P., Wickstrom E., (2007), *Bioconjug. Chem.*, 18, 1831-1840.
143. Oishi M., Nagasaki Y., Itaka K., Nishiyama N., Kataok, K., (2005), *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 1624-625.
144. Kim S. H., Jeong J. H., Lee S. H., Kim S. W., Park T. G., (2006), *J. Control. Release*, 116, 123-129.
145. Hammond S. M., Bernstein E., Beach D., Hannon G. J., (2000), *Nature*, 404, 293-296.
146. Nimjee S. M., Rusconi C. P., Sullenger B. A., (2005), *Annu. Rev. Med.*, 56, 555-583.
147. McNamara J. O., Andrechek E. R., Wang Y., Viles K. D., Rempel R. E., Gilboa E., Sullenger B. A., Giangrande P. H., (2006), *Nat. Biotechnol.*, 24, 1005-1015.
148. Kortylewski M., Swiderski P., Herrmann A., Wang L., Kowolik C., Kujawski M., Lee H., Scuto A., Liu Y., Yang C., Deng J. S., Soifer H. S., Raubitschek A., Forman S. J., Rossi J. J., Pardoll D. M., Jove R., Yu, H., (2009), *Nat. Biotechnol.*, 27, 925-932.
149. Chu T. C., Twu K. Y., Ellington A. D., Levy M., (2006), *Nucleic Acids Res.*, 34, e73.
150. Castanotto D., Rossi J. J., (2009), *Nature*, 457, 426-433.