

Summary

RNA interference (RNAi)-based therapy is a promising treatment option for many diseases, including cancer, neurodegenerative disorders and auto-immune diseases. RNAi may target a selected gene, allowing to avoid adverse effects related to standard treatment options. Due to its specificity, RNAi technology may be useful for the treatment of so-called 'undruggable' genes. Strategies based on RNAi have been broadly explored. Currently, increasing numbers of studies focus on the improvement of nanomedicines. Among many available nanocarriers for siRNA, cationic polymers gain special attention, due to efficient and non-toxic delivery mechanisms. As positively charged particles, they show improved interaction with negatively charged cell membranes and enhanced cellular uptake.

The aim of the current work was to describe the properties of polyethyleneimines (PEIs) and their tyrosine modified counterparts. The first step focused on the evaluation of the biophysical properties of PEIs, their toxicity and ability to form complexes with siRNA. We found that the tyrosine modification altered PEI properties, facilitated the interaction with membranes, reduced cytotoxicity and genotoxicity. Linear and branched, tyrosine modified polymers complexed siRNA at favorable mass ratios which allowed significant gene expression knockdown with a limited cytotoxicity. In step 1, we confirmed that tyrosine modification is crucial for improving PEI properties and complexation with siRNA. Due to these favorable properties, tyrosine modified PEIs were investigated in the further steps.

The second task included a better understanding of complex formation, toxicity mechanisms and gene knockdown efficacy. We revealed that the siRNA secondary structure underwent conformational changes upon addition of polymers. Complexes exhibited a positive charge, what suggests that they would be able to enter the cells. Stability of complexes and protective effects against nuclease digestion were confirmed. Toxicity studies revealed that complexes did not affect cellular and mitochondrial membranes, and did not induce apoptosis. In knockdown experiments, levels of GAPDH, EGFP and Luc3 genes were significantly decreased *in vitro*. In *ex vivo* studies, the level of GAPDH was significantly decreased with LP 10Y/siRNA complexes, making them the most promising nanovectors among tyrosine modified PEI.

The third task aimed to describe biophysical properties of tyrosine modified polymer: human serum albumin interactions. Human serum albumin is known as transporter protein for many chemical compounds that are administered to the blood stream. Our goal was to compare complex formation when using different types of polymers. Tyrosine modified polymers were able to interact with human serum albumin; size measurements and transmission electron microscopy confirmed this complexation, which was not seen for unmodified polymers. A tryptophan residue was engaged in complex formation. Polymers were also able to interact with the hydrophobic pocket of human serum albumin. Based on thermodynamic studies, we assumed that Van der Waals and hydrogen bonding were a predominant molecular forces. Analysis of Gibbs free energy values revealed that complex formation is a spontaneous process. We believe that for a better understanding of the mechanism of interaction of tyrosine modified polymers with other human plasma components, further studies must be performed.

Summarizing, tyrosine modification significantly affected the properties of polyethyleneimines, changing their toxicity profile, siRNA binding capacity and interaction with human serum albumin. Tyrosine modified polymers performed better as siRNA carriers, exhibiting acceptable toxic effects and a very promising knockdown efficiency. The above-mentioned properties and the ability to interact with human serum albumin indicate that such polymers may be efficient in more advanced experimental models.

Hiroyonata Kubo

Streszczenie w języku polskim

Terapia oparta na interferencji RNA (RNAi) jest obiecującą opcją w leczeniu wielu chorób nowotworowych, zaburzeń neurodegeneracyjnych i chorób autoimmunologicznych. Interferencja RNA może być ukierunkowana na wybrany gen, co pozwala uniknąć działań niepożądanych związanych ze stosowaniem standardowych metod leczenia. Ze względu na mechanizm działania, technologia RNAi może znaleźć zastosowanie w terapii tzw. chorób „nieuleczalnych”. Rozwiązania oparte na wyciszeniu ekspresji genów od wielu lat pozostają przedmiotem szeroko zakrojonych badań. Obecnie coraz więcej badań koncentruje się na udoskonalaniu nanocząstek. Spośród wielu dostępnych nanonośników dla siRNA na szczególną uwagę zasługują polimery kationowe, ze względu na wydajne i nietoksyczne mechanizmy dostarczania siRNA do komórek. Jako dodatnio naładowane cząstki poprawiają interakcję siRNA z ujemnie naładowaną błoną komórkową i zwiększają wychwyty komórkowy.

Celem niniejszej pracy było opisanie właściwości polimerów polietylenoiminowych (PEI) oraz ich odpowiedników modyfikowanych tyroziną. W pierwszym etapie skupiono się na ocenie właściwości biofizycznych PEI, ich toksyczności oraz zdolności do tworzenia kompleksów z siRNA. Potwierdzono, że modyfikacja tyroziną zmieniła właściwości PEI, ułatwiła interakcję z błonami, zmniejszyła cytotoksyczność oraz genotoksyczność polimerów. Liniowe i rozgałęzione, modyfikowane tyroziną polimery kompleksowały siRNA w korzystnych stosunkach masowych, co umożliwiło obniżenie poziomu mRNA wybranych genów przy ograniczonej cytotoksyczności względem komórek. Podsumowując ten etap, potwierdzono, że modyfikacja tyroziną ma kluczowe znaczenie dla właściwości PEI i kompleksowania z siRNA. Ze względu na ujawnione właściwości polimery modyfikowane tyroziną przeznaczono do dalszych analiz.

Drugie zadanie badawcze obejmowało lepsze poznanie mechanizmów kompleksacji, toksyczności i wyciszenia ekspresji genów. Potwierdzono, że struktura drugorzędowa siRNA uległa zmianom konformacyjnym pod wpływem polimerów. Kompleksy polimer/siRNA wykazywały ładunek dodatni, co sugerowało, że będą w stanie wnikać do komórek. Dodatkowo, potwierdzono stabilność kompleksów oraz działanie protekcyjne przed trawieniem nukleazą. Badania toksyczności wykazały, że kompleksy nie uszkadzają błony komórkowej i błony mitochondrialnej oraz nie indukują apoptozy. Przy zastosowaniu kompleksów LP 5Y/siRNA, LP 10Y/siRNA, P 5Y/siRNA oraz P 10Y/siRNA w warunkach in vitro

poziom ekspresji genów GAPDH, EGFP, Luc3 istotnie zmalał. W badaniach ex vivo poziom GAPDH znacząco spadł w przypadku zastosowania kompleksów LP 10Y/siRNA. To właśnie liniowy, modyfikowany tyrozyną polimer 10 kDa wykazał najbardziej obiecujące właściwości w dostarczaniu siRNA do komórek.

Trzecie zadanie miało na celu opisanie interakcji polimerów modyfikowanych tyrozyną i albuminy ludzkiej. Albumina jest znana jako transporter większości związków chemicznych, które są podawane do krwioobiegu. Naszym celem było porównanie kompleksów tworzonych między albuminą a polimerami LP 5Y, LP 10Y, P 5Y oraz P 10Y. Polimery modyfikowane tyrozyną były zdolne do interakcji z ludzką albuminą. Pomiarzy średnicy hydrodynamicznej i transmisyjna mikroskopia elektronowa potwierdziły kompleksowanie, czego nie zaobserwowano dla niezmodyfikowanych polimerów. Wykazano, że tryptofan w pozycji 214 (Trp 214) jest zaangażowany w tworzenie kompleksu. Polimery były również zdolne do interakcji z kieszenią hydrofobową albuminy. Na podstawie badań termodynamicznych zasugerowaliśmy, że dominującymi siłami molekularnymi są oddziaływania Van der Waalsa i wiązania wodorowe. Analiza wartości energii swobodnej Gibbsa wykazała, że tworzenie kompleksów jest procesem spontanicznym. Uważamy, że dla lepszego zrozumienia interakcji polimerów modyfikowanych tyrozyną z innymi składnikami osocza ludzkiego należy przeprowadzić bardziej zaawansowane badania.

Podsumowując, modyfikacja tyrozyną znacząco wpłynęła na właściwości polimerów polietylenoiminowych, zmieniając ich profil toksyczności, zdolność wiązania siRNA oraz interakcję z albuminą ludzką. Polimery modyfikowane tyrozyną działały efektywniej jako nośniki siRNA, wykazując niski efekt toksyczny i bardzo obiecującą skuteczność wyciszenia poziomu genu. Powyższe właściwości oraz zdolność do interakcji z albuminą wskazują, że kompleksy polimerów modyfikowanych tyrozyną mogą być skuteczne w bardziej zaawansowanych modelach eksperymentalnych.

Muhammad Kuback