Farmakoterapia w psychiatrii i neurologii, 2008, 1, 7–18

Specjalnie dla Farmakoterapii w Psychiatrii i Neurologii
Only for Pharmacotherapy in Psychiatry and Neurology

Katarzyna Sipa, Barbara Nawrot

Mechanizm interferencji RNA i wykorzystanie RNAi dla celów terapeutycznych

Mechanism of RNA interference and application of RNAi in therapy

Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi

STRESZCZENIE

Zjawisko interferencji RNA (RNAi) jest nowoodkrytym mechanizmem regulacji ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym. Może być wywoływane przez kodowane w genomie tzw. mikro RNA (miRNA) lub za pomocą syntetycznych, krótkich interferujących RNA (siRNA). Oba typy krótkich RNA, po związaniu przez kompleks białkowy RISC, o aktywności nukleazowej, funkcjonują jako cząsteczki efektorowe i rozpoznają docelową, komplementarną sekwencję w mRNA. Utworzenie kompleksu siRNA/RISC z nicią mRNA prowadzi do hydrolizy mRNA, a w konsekwencji do zniszczenia matrycy. Natomiast związanie miRNA/RISC z mRNA blokuje utworzenie kompleksu translacyjnego. Odkrycie zjawiska interferencji RNA stało się przełomowe dla rozwoju genomiki funkcjonalnej. Wzbudziło także nadzieje uczonych na zrewitalizowanie terapeutycznego wykorzystania kwasów nukleinowych. Obecnie dupleksy siRNA są powszechnie stosowane jako uniwersalne, sekwencyjnie specyficzne inhibitory ekspresji genów. W wielu firmach biotechnologicznych są prowadzone intensywne badania nad wprowadzaniem tych cząsteczek do lecznictwa. Najbardziej zaawansowane są badania (II faza badań klinicznych) nad siRNA skierowanymi na gen czynnika wzrostu VEGF lub jego receptora, w terapii zwyrodnienia plamki żółtej związanego z wiekiem (AMD).

SUMMARY

RNA interference (RNAi) is a newly discovered mechanism of the post-transcriptional regulation of gene expression. This phenomena is induced by coded in genome micro RNA (miRNA) or by synthetic, short interfering RNA (siRNA). Both types of RNA molecules after binding to RISC protein complex, exhibiting nucleolytic activity, operate as guides which recognize the complementary sequence in target mRNA. Formation of the siRNA/RISC complex with mRNA results in hydrolysis of the mRNA, and in consequence, in degradation of the translation template. Binding of the miRNA-loaded RISC to mRNA inhibits formation of the translational complex. Discovery of the RNA interference was a breakthrough for development of the functional genomics as well as kindled a new hope for revitalization of the therapeutic use of nucleic acids. At present the siRNA duplexes are widely used as universal, sequence specific inhibitors of gene expression for research purposes. In numerous biotechnological companies intensive studies are focused on introduction of siRNA molecules into therapies of diverse diseases. The most advanced (clinical trials phase II) are the studies on the siRNA directed towards mRNA of VEGF or of its receptor as an approach for treatment of age-related macular degeneration (AMD).

Słowa kluczowe: Interferencja RNA, RNAi, krótkie interferujące RNA, siRNA, mikro RNA, miRNA, wyciszanie genu, terapeutyczne siRNA

Key **words:** RNA interference, RNAi, short interfering RNA, siRNA, micro RNA, miRNA, gene silencing, therapeutic siRNA

1. WSTĘP

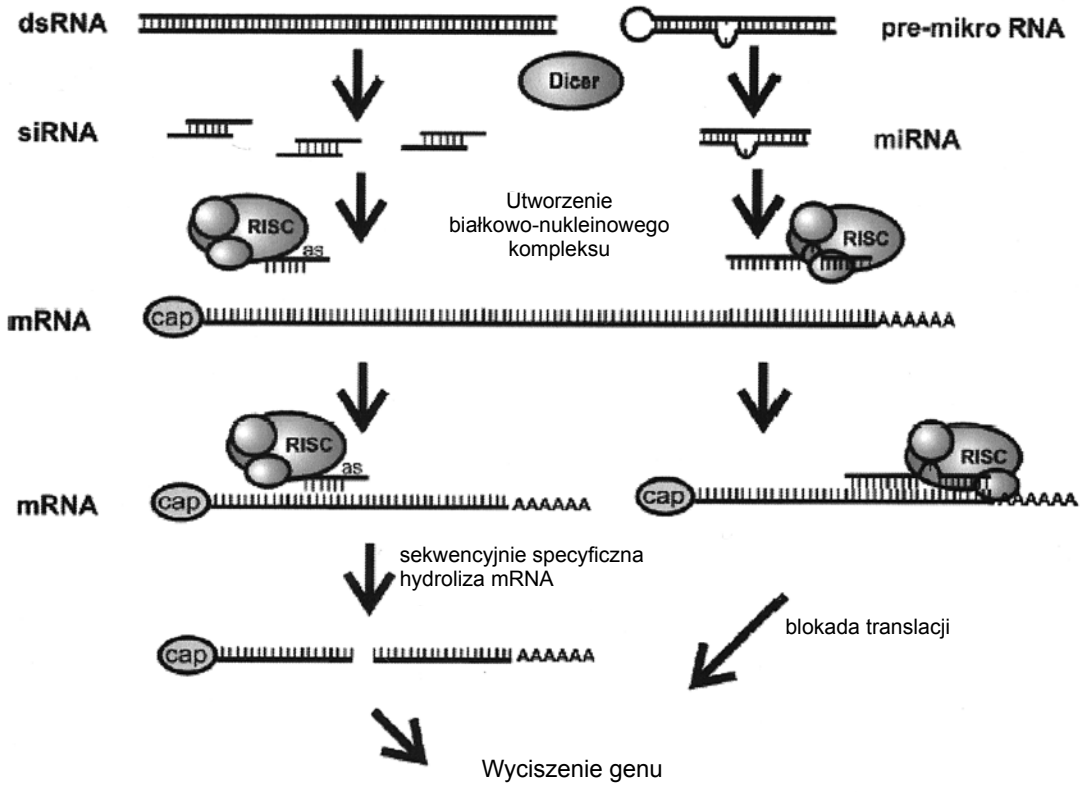
Termin „interferencja RNA" (ang. *RNA interference,* RNAi) został po raz pierwszy użyty przez zespół Craiga Mello do opisu, wywołanego wbrew założeniom prowadzonego doświadczenia, wyciszenia ekspresji genów po podaniu do organizmu nicienia *Caernohabditis elegans* (*C. elegans*) długich, dwuniciowych cząsteczek RNA (Fire i wsp. 1998). Pokrewne procesy potraskrypcyjnej kontroli ekspresji genów, stanowiące systemy zabezpieczające przed transkrypcją transpozonów i wirusów, zaobserwowano już kilka lat wcześniej w organizmach roślin (ang. *posttranscriptional gene silencing*, PTGS) (Hamilton i Baulcombe 1999) i grzybów (ang. *quelling*) (Romano i Macino 1992). Podobnie cząsteczki efektorowe, tzw. krótkie interferujące RNA (ang. *short interfering RNA,* siRNA), zidentyfikowane przez grupę Thomasa Tuschla w ekstraktach z komórek owadów (Caplen i wsp. 2001) były wcześniej scharakteryzowane dla modeli roślinnych (Hamilton i Baulcombe 1999). Przełomem w badaniach nad wyciszaniem genów w komórkach ssaków, z pominięciem uruchamianej przez długie dwuniciowe RNA obrony przeciwwirusowej, było zastosowanie chemicznie zsyntetyzowanych krótkich interferujących RNA (Elbashir i wsp. 2001). W miarę postępu badań nad interferencją RNA okazało się, że badany od 20 lat mechanizm kontroli ekspresji genów regulujący proces rozwoju nicienia *C. elegans* i indukowany przez niedawno odkryte przez mikro RNA (miRNA) (Lee i wsp. 1993), wykorzystuje te same komponenty inżynierii enzymatycznej. Obecnie wiadomo, że podobne cząsteczki RNA decydują o regulacji ekspresji genów w organizmach owadów, roślin i ssaków. Jeśli weźmiemy pod uwagę fakt, że cząsteczki krótkich RNA, uczestnicząc w procesach kondensacji heterochromatyny (Mathieu i Bender 2004) prawdopodobnie regulują także ekspresję genów na poziomie transkrypcji, zrozumiałe staje się powszechne w świecie biologii molekularnej zainteresowanie tymi cząsteczkami, zarówno jako narzędziami do badania funkcji nieznanych genów, jak i potencjalnymi terapeutykami.

2. MECHANIZM RNAI

Centralnym procesem zjawiska interferencji RNA jest degradacja mRNA, komplementarnego do wnikającej do komórki obcej cząsteczki długiego, dwuniciowego RNA (rys. 1). Wywołanie RNAi w komórkach eukariotycznych wydawało się niemożliwe, gdyż pojawienie się długiego (>30 nt), dwuniciowego RNA jest interpretowane jako inwazja wirusa lub efekt transkrypcji ruchomych elementów genetycznych, aktywujących mechanizmy obronne organizmu: szlaki kinazy białkowej R, RNazy L oraz zwiększenie produkcji interferonów α i β, prowadzące w efekcie do śmierci „zakażonej" komórki.

W organizmie nicienia inicjacja RNAi następuje poprzez hydrolizę długiego, dwuniciowego RNA katalizowaną przez rybonukleazę Dicer, należącą do rodziny RNazy III. Tak powstałe 21-23 nukleotydowe dupleksy siRNA rozpoznawane są przez kompleks RISC (ang. *RNA induced silencing complex*). Helikaza kompleksu RISC rozplata dupleks siRNA i jedna z nici zostaje włączona do kompleksu białkowego. Obecna w kompleksie RISC endorybonukleaza wykorzystuje tę nić do odnalezienia komplementarnej do niej sekwencji docelowego mRNA, dlatego nić ta nazwana jest antysensową, kierującą lub przewodnią (ang. *guide*). Specyficzność mechanizmu RNAi opiera się na dokładnym sparowaniu antysensowej nici siRNA z komplementarną sekwencją mRNA i katalitycznej hydrolizie wiązania internukleotydowego w cząsteczce docelowej. Generowanie siRNA przez rybonukleazę Dicer oraz rozplecenie dupleksu siRNA w trakcie jego włączania do RISC są procesami zależnymi od ATP (Nykanen i wsp. 2001), natomiast hydroliza mRNA przebiega bez udziału ATP i jest zależna od jonów Mg^{2+}. Produktami hydrolizy są 5'- i 3'-terminalne fragmenty mRNA, przy czym ten ostatni zawiera grupę fosforanową na 5'-końcu (Martinez i Tuschl 2004; Schwarz i wsp. 2004). Przecięcie wiązania fosfodiestrowego w docelowej sekwencji mRNA następuje zawsze naprzeciwko wiązania pomiędzy 10 a 11 nukleotydem nici prowadzącej, licząc od jej wolnej grupy fosforanowej na 5'-końcu (Elbashir i wsp. 2001). Zhydrolizowane mRNA, pozbawione na obu przeciętych końcach ochrony, jest szybko rozpoznawane przez nukleazy komórkowe i spontanicznie degradowane. Proces hydrolizy mRNA prawdopodobnie może być prowadzony kilkakrotnie przez ten sam aktywny nukleinowo-białkowy kompleks RISC (Nykanen i wsp. 2001; Martinez i wsp. 2002; Schwarz i wsp. 2002).

Jeśli związana w kompleksie białkowym RISC wiodąca nić siRNA nie jest w pełni komplementarna do docelowego mRNA, następuje zahamowanie ekspresji genu na drodze mikro RNA. W tym przypadku krótkie cząsteczki RNA (miRNA), powstające w wyniku hydrolizy cząsteczek substratowych o strukturze spinki do włosów (pre-mikro RNA) są włączane z udziałem nukleazy Dicer do kompleksu białkowego RISC, hamując proces biosyntezy białka na zasadzie zawady przestrzennej (Olsen i Ambros 1999; Zeng i wsp. 2002). Zasadniczą różnicą między mechanizmami RNAi



Rysunek 1. Mechanizmy interferencji RNA i mikro RNA

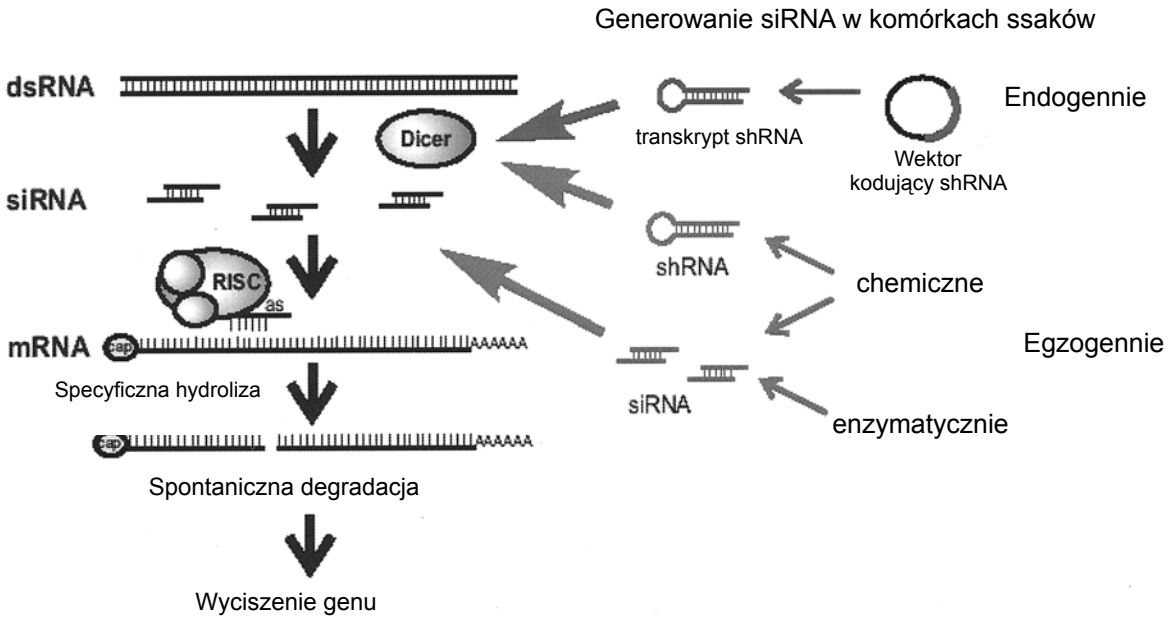
Długie dwuniciowe RNA i jednoniciowe RNA o strukturze spinki są substratami dla rybonukleazy Dicer. Produktami hydrolizy są krótkie dupleksy RNA (siRNA i miRNA), rozpoznawane przez kompleks RISC. Jedna z nici dupleksu jest włączana do kompleksu białkowego i służy jako nić prowadząca RISC do komplementarnej sekwencji mRNA. Jeśli nić antysensowa jest w pełni komplementarna do cząsteczki docelowej następuje aktywacja rybonukleazowej aktywności RISC i hydroliza mRNA. Jeśli natomiast nić wiodąca nie jest w pełni komplementarna do docelowego mRNA, następuje zahamowanie ekspresji genu na drodze mikro RNA.

i mikro RNA jest pochodzenie cząsteczek prekursorowych, które dla miRNA są kodowane w genomie.

W organizmach nicieni i roślin wyciszenie genu utrzymuje się podczas podziałów komórkowych i jest przenoszone do nietransfekowanych komórek i tkanek, a nawet jest zachowane w następnym pokoleniu (Fire i wsp. 1998). Wyjaśnieniem tych właściwości jest mechanizm tzw. „degradacyjnego PCR". Zidentyfikowano polimerazę RNA zależną od RNA (ang. *RNA induced RNA polymerase, RdRP*), która syntetyzuje nić komplementarną do mRNA, tworząc nowe dwuniciowe RNA, rozpoznawane i hydrolizowane przez rybonukleazę Dicer. W ten sposób tworzona jest nowa generacja krótkich dupleksów siRNA, tzw. *secondary siRNA*. Starterem w kolejnych reakcjach polimeryzacji jest antysensowa nić rozplecionego dupleksu siRNA. Niestety, w komórkach ssaków nie odnaleziono genu polimerazy RdRP, a więc wywoływany na drodze RNAi efekt wyciszenia ekspresji genu w komórkach ssaków ma zawsze charakter przejściowy. Najdłużej trwający efekt wyciszenia, wywołany za pomocą syntetycznych siRNA, zaobserwowano w niedzielących się komórkach neuronalnych (21 dni) (Omi i wsp. 2004).

3. WYCISZANIE GENÓW ZA POMOCĄ SIRNA

Jak opisano powyżej, wywołanie interferencji RNA w komórkach ssaków jest możliwe dzięki wykorzystaniu gotowych cząsteczek siRNA (Elbashir i wsp. 2001) bądź ich krótkich prekursorów, substratów dla nukleazy Dicer – krótkich RNA o strukturze spinki do włosów (ang. *short hairpin RNA,* shRNA). Cząsteczki siRNA lub shRNA mogą być otrzymywane chemicznie, enzymatycznie, lub generowane endogennie (rys. 2). Stosowanych jest wiele rozmaitych wektorów kodujących shRNA (konstruuje się także wstawki kodujące oddzielne nici siRNA, hybrydyzujące spontanicznie) (Wadhwa i wsp. 2004; Amarzguioui i wsp. 2005). Można sobie wyobrazić stabilną ekspresję kasety shRNA albo poprzez integrację wektora wirusowego do genomu gospodarza, albo w postaci samoreplikującego wektora. Najbardziej obiecujące pod względem wydajności wnikania do komórek i czasu trwania ekspresji wydają się wektory wirusowe (a wśród nich wirusy skojarzone z adenowirusami i lentiwirusy) (Zentilin i Giacca 2004; Clayton 2004). Jednakże strategie oparte na wektorach wirusowych



Rysunek 2. Metody generowania dupleksów siRNA

Cząsteczki siRNA lub shRNA mogą być otrzymywane chemicznie, enzymatycznie, lub generowane endogennie. Cząsteczki shRNA, zarówno generowane endogennie, jak i te podawane z zewnątrz, są substratami dla rybonukleazy Dicer.

są obciążone trudnymi do kontrolowania efektami ubocznymi, związanymi m.in. z ryzykiem odnowienia wirulencji stosowanego wektora. Najczęściej używanym wektorem jest pSUPER, opisany po raz pierwszy jako wektor kodujący siRNA skierowane na mRNA białka p53 (Brummelkamp i wsp. 2002). W doświadczeniu tym w wyselekcjonowanych komórkach MCF-7 uzyskano długotrwały efekt wyciszenia genu, trwający ponad 2 miesiące. Z informacji podanej na stronie internetowej firmy *Oligoengine* zajmującej się dystrybucją tego wektora, wynika, że zainteresowanie tym produktem od samego początku było olbrzymie – jeszcze przed wprowadzeniem wektora na rynek firma otrzymała ponad 1500 próśb o udostępnienie pSUPER do badań nad interferencją RNA [http://www.oligoengine.com].

Innym podejściem do wywoływania RNAi jest generowanie całej puli tzw. esiRNA skierowanych na jeden docelowy gen, poprzez enzymatyczną hydrolizę *in vitro* komplementarnych do fragmentu docelowego genu długich cząsteczek dwuniciowego RNA (Kittler i wsp. 2004). Jakkolwiek takie podejście gwarantuje największą skuteczność wywoływanego efektu, „wąskim gardłem" jest zawsze wybór odpowiednio specyficznej sekwencji docelowej.

Pierwszą zastosowaną, i wciąż powszechną, metodą otrzymywania cząsteczek siRNA (lub shRNA) jest ich chemiczna synteza. Zasadniczą wadą tej drogi jest jej kosztochłonność, jednak znaczącą zaletą – pełna kontrola sekwencji i struktury otrzymywanych związków. Wprowadzanie modyfikacji do syntetycznych siRNA pozwala nadać im cechy pożądane z punktu widzenia badań podstawowych (jak np. grupy fluorescencyjne do obserwacji dystrybucji dupleksów w komórkach i tkankach) (Harborth i wsp. 2003), jak i przyszłych zastosowań terapeutycznych. W kontekście wykorzystania siRNA jako potencjalnych terapeutyków wprowadzane modyfikacje mają za zadanie usunięcie zasadniczych ograniczeń w stosowaniu technologii RNAi *in vivo*, takich jak: (i) hydroliza cząsteczek RNA przez nukleazy komórkowe – skutecznym zabezpieczeniem są modyfikacje wiązania fosfodiestrowego (Harborth i wsp. 2003; Li i wsp. 2005; Braasch i wsp. 2004; Hall i wsp. 2004) oraz pozycji C2' pierścienia rybozy (Harborth i wsp. 2003; Prakash i wsp. 2005; Amarzguioui i wsp. 2003; Braasch i wsp. 2003; Chiu i Rana 2003), (ii) przenikanie przez błony komórkowe – usprawnione przez np. wprowadzenie grupy cholesterolowej na 3'-końcu nici sensowej dupleksu (Soutschek i wsp. 2004), zaś ukierunkowane tkankowo przez dołączenie cząsteczek ligandów receptorów tkankowych (Zhang i wsp. 2003; Zhang i wsp. 2004; Pardridge 2004) lub przeciwciał (Song i wsp. 2005) oraz (iii) obserwowane efekty niespecyficzne. Ostatni z wymienionych problemów stanowi duże wyzwanie dla badaczy, ponieważ wciąż niewystarczająca jest wiedza o projektowaniu cząsteczek siRNA o gwarantowanej, wysokiej aktywności. Pomimo starannego wyboru specyficznej sekwencji docelowej, siRNA powodują obniżenie lub podwyższenie poziomów ekspresji wielu genów, co zostało zademonstrowane w szeregu badań

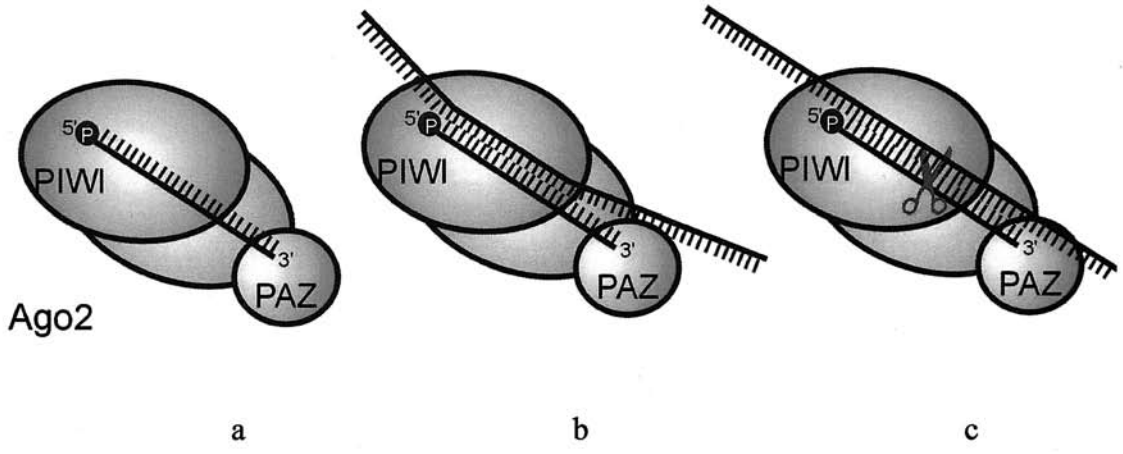
z użyciem metod stosowanych w genomice (Jackson i Linsley 2004; Jackson i wsp. 2003; Chi i wsp. 2003; Semizarov i wsp. 2003; Persengiev i wsp. 2004; Sledz i wsp. 2004). W większości cytowanych doniesień obserwowano wyraźną zależność zakresu i poziomu niepożądanych zmian od ilości siRNA użytych do doświadczeń. Fakt ten daje nadzieję na przezwyciężenie problemu efektów ubocznych poprzez udoskonalanie cząsteczek siRNA (np. na drodze modyfikacji chemicznych) w taki sposób, aby osiągnąć wysoką skuteczność działania przy minimalnej dawce. Na podstawie badań nad włączaniem siRNA do RISC oraz doświadczeń z modyfikowanymi cząsteczkami siRNA, a także przewidywań teoretycznych (np. ryzyko tworzenia struktur wyższego rzędu przez oligonukleotydy zawierające ciągi jednakowych nukleotydów), sformułowano kilka protokołów postępowania przy projektowaniu sekwencji siRNA. Te protokoły, w połączeniu z dostępem do bazy sekwencji genomów różnych organizmów, są wykorzystywane w algorytmach wyszukiwarek potencjalnie aktywnych sekwencji siRNA, dostępnych w sieci Internet, na witrynach firm oferujących syntezę siRNA (np. Dharmacon, Ambion) [http://www.dharmacon.com/sidesign, http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html] oraz jako samodzielne witryny (http://www.cluster-1.mpi-cbg.de/Deqor/deqor.html; Naito i wsp. 2004).

W doświadczeniach *in vitro* siRNA najczęściej dostarczane są do komórek w kompleksach z lipofilowymi odczynnikami polikationowymi. Konkurencyjnym odczynnikiem transfekującym jest ostatnio wprowadzony na rynek przez firmę Genospectra tak zwany EXPRESS-si, stanowiący zestaw kapsydowych białek wirusowych zdolnych do samoorganizacji i zamknięcia w swoim wnętrzu cząsteczek kwasów nukleinowych (zarówno wektorów DNA, jak siRNA) i wniknięcia do komórek eukariotycznych, gdzie w cytoplazmie ulega rozpadowi (Simeoni i wsp. 2003). W doświadczeniach *in vivo*, jak i coraz częściej opisywanych testach klinicznych, siRNA mogą być podawane domiejscowo (np. do oka lub donosowo) lub dosystemowo (dożylnie lub podskórnie), często w obecności liposomów i nanocząsteczek polimerowych.

4. STRUKTURA KOMPLEKSU RISC

Projektowanie cząsteczek siRNA wymaga pełnego zrozumienia funkcji białek uczestniczących w rozpoznawaniu i rozplataniu dupleksu siRNA oraz w hydrolizie docelowego mRNA. Po kilku latach intensywnych badań poznano najważniejsze składniki kompleksu RISC, które pomimo że znacząco różnią się w zależności od organizmu, to zawsze zawierają białka z rodziny *Argonaute*, z którymi związana jest aktywność nukleazowa kompleksu (Song i wsp. 2004). Spośród czterech ludzkich białek *Argonaute* najprawdopodobniej tylko Ago2 bierze udział w wywoływaniu zjawiska RNAi (Meister i wsp. 2004; Liu i wsp. 2004).

Charakterystyczną cechą strukturalną białek *Agronaute* jest występowanie domen PAZ i PIWI, których struktury krystaliczne zostały ostatnio rozwiązane.



Rysunek 3. Schemat wiązania siRNA do kompleksu RISC

Na podstawie cytowanej literatury (Hammond 2005).

(a) Nić antysensowa siRNA tworzy kompleks z białkiem Ago2; 5'-terminalna grupa fosforanowa jest wiązana przez kieszeń w domenie PIWI, zaś dwunukleotydowy 3'-koniec jest wiązany przez domenę PAZ.

(b) Nić antysensowa siRNA rozpoznaje komplementarną sekwencję mRNA; w regionie 5'-końca nici antysensowej tworzy się kilkunukleotydowy dupleks siRNA/mRNA.

(c) Po zhybrydyzowaniu w pełni komplementarnych nici siRNA/mRNA uaktywnia się nukleazowa aktywność kompleksu RISC i następuje hydroliza ściśle określonego wiązania fosfodiestrowego w mRNA, znajdującego się pomiędzy nukleozydami 10 i 11 nici antysensowej.

W obrębie domeny PAZ zidentyfikowano kieszeń wiążącą dwunukleotydowe, 3'-końcowe fragmenty RNA (Lingel i wsp. 2003; Yan i wsp. 2003; Ma i wsp. 2003). Natomiast badania strukturalne dwóch bakteryjnych białek *Argonaute* z *Pyrococcus furiosus* (Song i wsp. 2004) i z *Archaeoglobus fulgidus* (Parker i wsp. 2004) potwierdziły obecność w domenie PIWI centrum katalitycznego o budowie przestrzennej charakterystycznej dla RNazy H. Badania strukturalne domeny AfPiwi w kompleksie z dwuniciowym RNA pozwoliły na zaproponowanie modelu wiązania nici wiodącej siRNA w kompleksie RISC i jej oddziaływania z mRNA (Parker i wsp. 2005; Ma i wsp. 2005). W wiązaniu do sekwencji docelowej najważniejszą rolę pełni region 5' nici siRNA (lub miRNA) związanej w kompleksie RISC (rys. 3). Badania te udowodniły także obecność w obrębie domeny PIWI kieszeni wiążącej grupę 5' fosforanową wiodącej nici siRNA, co tłumaczy precyzyjność odmierzania miejsca cięcia mRNA.

Zasadniczym etapem w tworzeniu aktywnego kompleksu RISC jest włączanie do niego jednej z nici dupleksu siRNA. Wybór nici prowadzącej jest zdeterminowany przez asymetryczną stabilność końców dupleksu (Schwarz i wsp. 2003). Jako nić wiodąca zostaje „wybrana" ta, której 5'-koniec jest słabiej zaangażowany w wiązania typu Watsona-Cricka z drugą nicią dupleksu. Podobny wybór nici aktywnej ma miejsce w przypadku miRNA na etapie jej wycinania z prekursora (Khvorova i wsp. 2003). Jednak sam proces tworzenia kompleksu z RISC nie jest do końca wyjaśniony, i prawdopodobnie obejmuje kilka etapów. Ostatnie badania potwierdzają przewidywane na podstawie wcześniej obserwowanej ko-immunoprecypitacji (Hammond i wsp. 2001) ścisłe zależności między rybonukleazą Dicer a kompleksem RISC. Prawdopodobnie Dicer, który jest również wielodomenowym białkiem zawierającym m.in. domenę PAZ (Zhang i wsp. 2004), nie oddysocjowuje od dupleksu siRNA wyciętego z prekursorowej cząsteczki, ale wspólnie z dsRBP (ang. *double stranded RNA Binding Protein*, u *Drosophili* R2D2) uczestniczy w jego rozpleceniu i włączeniu do RISC (Pham i wsp. 2004; Tomari i wsp. 2004). Możliwe także, że Dicer bierze udział w rozpoznawaniu „gotowych" dupleksów siRNA. Wnioski takie nasuwają dwie obserwacje: upośledzenie RNAi wywoływanego przez siRNA w komórkach pozbawionych tego białka (Doi i wsp. 2003) oraz większa skuteczność wyciszania wywołanego za pośrednictwem substratów dla Dicer [27-mio nukleotydowych dsRNA (Kim i wsp. 2005) oraz shRNA (Siolas i wsp. 2005)], niż z użyciem standardowych siRNA.

Więcej informacji o budowie białek zaangażowanych w mechanizm RNAi czytelnik znajdzie w pracach przeglądowych w 579 woluminie FEBS Letters z roku 2005 (Hammond 2005; Collins i Cheng 2005).

5. WYKORZYSTANIE INTERFERENCJI RNA DLA CELÓW TERAPEUTYCZNYCH

20 grudnia 2002 roku czasopismo *Science* ogłosiło odkrycie zjawiska interferencji RNA (RNAi) przełomowym odkryciem roku 2002 („*Breakthrough of the Year*") (Breakthrough of the year 2002). Wyróżnienie to świadczyło o zrozumieniu, jak potężnym narzędziem w biologii i medycynie stało się odkrycie mechanizmu regulacji ekspresji genów i możliwość jego wywoływania za pomocą syntetycznych dupleksów RNA. Po raz pierwszy uzyskano możliwość inhibicji ekspresji każdego wybranego genu, i tylko kwestią czasu było udokumentowanie tego faktu w badaniach komórkowych i w badaniach *in vivo*. Odkrycie to dało asumpt do ożywienia w świecie biotechnologii, medycyny i farmacji, oraz zrewitalizowało dotychczas stosowane technologie terapeutyczne oparte na syntetycznych fragmentach kwasów nukleinowych. Powstały firmy biotechnologiczne specjalizujące się w projektowaniu i wytwarzaniu siRNA, wykorzystywanych do badań w obszarze genomiki funkcjonalnej, a więc do śledzenia szlaków metabolicznych, poznawania mechanizmów sygnalizacji komórkowej, apoptozy, proliferacji czy różnicowania komórek. Zauważono także olbrzymi potencjał cząsteczek siRNA do „wyłączania" genów związanych z patogenezą chorób. Cząsteczki siRNA stały się więc uniwersalnymi, sekwencyjnie specyficznymi narzędziami, pozwalającymi z jednej strony na identyfikację celów terapeutycznych, a więc genów, których wyciszenie prowadzi do cofnięcia lub zatrzymania choroby, a z drugiej – na weryfikację tego wyboru jako związków o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym. Lista najbardziej prężnych firm biotechnologicznych i farmaceutycznych rozwijających terapie oparte na interferencji RNA przedstawiona jest w tabeli 1 (Uprichard 2005).

5.1. Zastosowania terapeutyczne

5.1.1. Infekcje wirusowe

Jednym z najwcześniejszych zastosowań interferencji RNA dla celów terapeutycznych było hamowanie infekcji wirusowych. Na szczególną uwagę zasługują badania nad hamowaniem replikacji wirusa HIV i wirusów zapalenia wątroby typu B i typu C, gdyż jak na razie brak jest skutecznych terapii dla leczenia schorzeń wywoływanych tymi wirusami. Terapie te skierowane są zarówno na wirusowe RNA, jak i na

Tabela 1. Firmy biotechnologiczne i farmaceutyczne rozwijające terapie oparte na interferencji RNA

Firma Farmaceutyczna	**Najważniejsze obszary badań**
Acuity Pharmaceuticals	AMD (starcze zwyrodnienie plamki żółtej); retinopatie cukrzycowe
AGY Therapeutics	RNAi w komórkach nerwowych i glejowych
Alnylam Pharmaceuticals Inc.	AMD; choroba Parkinsona, wirus oskrzelowy; mukowiscydoza; grypa; uszkodzenia rdzenia kręgowego; choroba Huntingtona i neuropatia
Atugen AG	Choroby przemiany materii; nowotwory oka; choroby skóry
Benitec Australia Limited	Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV); HIV/AIDS; nowotwory; cukrzyca/otyłość
BioImage	nowotwory
Calando Pharmaceuticals	nanotechnologia
Cytrx Corporation	cukrzyca/otyłość; stwardnienie zanikowe boczne ALS; cytomegalowirusowe zapalenie siatkówki
Devgen	cukrzyca/otyłość; arytmia
Dharmacon Inc.	starcze zwyrodnienie plamki żółtej (AMD)
Galenea	wirus ptasiej grypy H5N1
Genesis R&D	alergie
Genta Incorporated	nowotwory
International Therapeutics	HIV; wirus zapalenia wątroby typu B (HBV)
Intradigm Corporation	nowotwory; SARS; zapalenie stawów
Nastech Pharmaceutical	reumatoidalne zapalenie stawów; osteoporoza; otyłość
Nucleonics, Inc.	HBV; HCV
Sirna Therapeutics, Inc.	AMD; HBV, HCV, HIV, astma; cukrzyca; choroba Huntingtona; choroba Parkinsona, utrata słuchu, choroby układu oddechowego, NOGO i receptory NOGO (uszkodzenia rdzenia kręgowego), nowotwory

mRNA białek gospodarza, używanych przez wirus w procesie replikacji. Na przykład w terapii anty-HIV projektuje się siRNA skierowane na mRNA receptorów CD4 i CCR5 (Qin i wsp. 2003; Martinez i wsp. 2002), dzięki którym wirus wnika do komórek gospodarza. Przykłady innych zastosowań RNAi skierowanych na geny wirusowe wymienione są w tabeli 2. opracowanej na podstawie przeglądu Susan Uprichard (Uprichard 2005).

5.1.2. Choroby neurologiczne

Choroby neurologiczne, takie jak choroba Parkinsona, choroba Huntingtona (HD), zespół łamliwego chromosomu X, stwardnienie zanikowe boczne (ang. *amyotrophic lateral sclerosis*, ALS), czy zanik mięśni są przykładami schorzeń, dla których terapie RNAi są najbardziej obiecujące (Buckingham i wsp. 2004; Wood i wsp. 2003; Rodriguez-Lebron i Gonzales-Alegre 2006) (tabela 2). Schorzenia te rozwijają się na skutek dominującej mutacji w obrębie jednego allelu. Projektuje się cząsteczki siRNA zdolne do wyciszania zmutowanego genu, pozwalając na ekspresję allelu dzikiego. Przykładem takiego podejścia jest specyficzne wyciszanie zmutowanego genu dysmutazy ponadtlenkowej SOD1, w którym zamiana pojedynczego nukleotydu stanowi przyczynę rozwoju ALS (Ding i wsp. 2003).

Ostatnio wykazano także użyteczność terapii RNAi w poprawianiu motoryki w modelu zwierzęcym choroby Huntingtona, spowodowanej ekspansją trójnukleotydowych powtórzeń CAG (Harper i wsp. 2005). Zidentyfikowano także aktywne cząsteczki siRNA zdolne do hamowania ekspresji genu beta sekretazy (białka BACE1), uczestniczącej w wydzielaniu beta amyloidu (Kao i wsp. 2004; Nawrot i wsp. 2005; Sierant i wsp. w przygotowaniu). Ten krótki peptyd jest głównym składnikiem płytek amyloidowych zidentyfikowanych w mózgach pacjentów z chorobą Alzheimera (AD). Znalezienie wydajnej terapii anty-amyloidowej może stanowić przełom w zahamowaniu rozwoju tego schorzenia.

5.1.3. Choroby nowotworowe

W terapii chorób nowotworowych zasadniczym problemem jest selektywność leku w stosunku do komórek rakowych, przy niskiej toksyczności w stosunku do komórek prawidłowych. Jednym z podejść zapewniających wybiórcze niszczenie komórek nowotworu jest terapia genowa. Przykłady genów zaangażowanych w procesy nowotworzenia, ekspresję

Tabela 2. Zastosowanie RNAi dla celów terapeutycznych

Obszar badań	**Jednostki chorobowe**	**Gen docelowy**
Schorzenia neurologiczne	Stwardnienie zanikowe boczne (ALS)	SOD1
		SOD1
	Ataksja rdzeniowo-móżdżkowa	Ataxina1
	Choroba Huntingtona	Huntingtina
	Bóle neuropatyczne	kanał jonowy P2X3
	Choroba Alzheimera	BACE1
Choroby oczu	Zapalenie oka	TGFβ RII
	Starcze zwyrodnienie plamki żółtej	VEGF
	Opryszczkowe zapalenie rogówki	VEGF/R
Choroby laryngologiczne	Choroby autosomalne wywołane mutacją dominującą	Gap junction β2
Zapalenia	Reumatoidalne zapalenie stawów	TNFα
	Posocznica	TNFα
Apoptoza	Ostra niewydolność wątroby	Fas
		Kaspaza 8
	Niedokrwienie wątroby	Kaspaza 8/3
	Niedokrwienie nerek	Fas
	Niedokrwienie płuc	Oksygenaza hemu1
Metabolizm	Otyłość	AGRP
	Cholesterol	ApoB
Infekcje wirusowe	Gorączka zachodniego Nilu	wirus gorączki zachodniego Nilu
	Wirusowe zapalenie wątroby typu C	HCV
	Choroby serca, trzustki, wątroby	Coxsakiewirus B3
	Przeziębienie	wirus oskrzelowy RSV
	Ostre stany zapalne układu oddechowego	wirus paragrypy
	Grypa	wirus grypy
	Wirusowe zapalenie wątroby typu B	HBV
	Zespół ostrej ciężkiej niewydolności oddechowej	SARS-CoV
	Nieżyt nosa	wirus nieżytu nosa
	Nagminne porażenie dziecięce (choroba Heinego-Medina)	poliowirus
	AIDS	HIV
	Brodawki płciowe	Papillomomawirus
	Cytomegalia, zespół mononukleozowy	Cytomegalowirus
Choroby nowotworowe	Rak prostaty	Bcl-2
	Rak sutka	Cxcr4
		RhoA
	Rak trzustki	Kinaza białkowa FAK
		EphA2
	Rak piersi, macicy, okrężnicy, płuc (proliferacja neoplastyczna)	Kinaza Polo-like 1
	Guz sutka	czynnik stymulujący powstawanie kolonii CSF1
	Mięśniakomięsak prążkowany	surwiwina
	Gruczolakorak trzustki	CEACAM6
	Wewnątrzczaszkowy rak mózgu	EGFR
	Drobnokomórkowy rak płuc	Skp-2
	Chroniczna białaczka szpikowa	Bcr-abl

których obniżano z zastosowaniem interferencji RNA w warunkach zarówno *in vitro* jak i *in vivo,* podane są w tabeli 2. (Uprichard 2005; Fuchs i wsp. 2004).

Powszechny jest pogląd, iż dobrymi celami terapeutycznymi w leczeniu białaczek i chłoniaków są onkogeny, tworzące się poprzez nieprawidłowe translokacje chromosomalne, takie jak gen *bcr-abl*, stanowiący molekularne podłoże przewlekłej białaczki szpikowej (ang. *chronic myeloid leukemia,* CML). Zidentyfikowano cząsteczki siRNA efektywnie wyciszające gen *bcr-abl* (Li i wsp. 2003). Terapie przeciwnowotworowe nacelowane są również na geny *ras* i p53, które w wyniku mutacji punktowych nie spełniają fizjologicznej funkcji „strażnika genomu", co może przyczyniać się do rozwoju nowotworów (Yang i wsp. 2003; Martinez i wsp. 2002). Terapie RNAi są skuteczne w podwyższaniu efektu terapeutycznego, wywoływanego klasycznymi lekami przeciwnowotworowymi, takimi jak daunorubicyna (Zangemeister-Wittke 2003). Innym podejściem jest skierowanie siRNA na mRNA białka MDR1 (ang. *multidrug resistance protein*), którego supresja zwiększa podatność komórek rakowych na chemioterapię (Yague i wsp. 2004; Nieth i wsp. 2003). Technikę RNAi stosuje się też w badaniach nad kontrolą procesu angiogenezy. Badane są efekty wyciszania genu czynnika wzrostu naczyń śródbłonka (VEGF) na wzrost guza prostaty. W modelu zwierzęcym zaobserwowano długoterminowe zahamowania wzrostu i obniżenie zagęszczenia naczyń włosowatych w guzie (Wannenes i wsp. 2005). Natomiast efekt osłabienia wzrostu komórek guza oraz tempa i liczby podziałów komórkowych w modelu raka sutka uzyskano w wyniku wyciszenia ekspresji receptora adenozyny A1 (Mirza i wsp. 2005).

Większość nowotworów charakteryzuje się wysoką aktywnością telomerazy, dzięki czemu komórki nowotworowe zachowują wysoki potencjał replikacyjny. Zahamowanie aktywności telomerazy mogłoby więc reaktywować proces skracania telomerów w komórce, a tym samym doprowadzić do zahamowania ich proliferacji. Przykładem takiego podejścia terapeutycznego są badania z użyciem komórek gruczolaka Barretta, w których po zastosowaniu siRNA skierowanych na gen telomerazy obserwowano indukcję apoptozy (Shammas i wsp. 2005).

5.1.4. Choroby oczu

Największy postęp nad zastosowaniem RNAi jako potencjalnych leków osiągnięto w badaniach nad hamowaniem starczego zwyrodnienia plamki żółtej (ang. *age-related macular degeneration*, AMD), opryszczkowego zapalenia rogówki, i zapalenia oka (tabela 2). We wszystkich tych terapiach genem docelowym jest gen VEGF (czynnik wzrostu naczyń śródbłonka).

W sierpniu 2004 roku FDA (*Food and Drug Administration*) zezwoliła firmie Acuity Pharmaceuticals na rozpoczęcie I fazy badań klinicznych z Cand5, skierowanym na gen VEGF w terapii starczego zwyrodnienia plamki. Równocześnie testy kliniczne z własnym siRNA (siRNA-027), skierowanym na ten sam gen rozpoczęła firma Sirna Therapeutics (wcześniej Ribozyme Pharmaceuticals). Badaniami objęto 14 pacjentów (8 kobiet i 6 mężczyzn) w wieku 70-93 lat. Pacjentów podzielono na cztery grupy, którym podawano bezpośrednio do oka odpowiednio po 100, 200, 400, i 800 mcg Sirna-027. Nie obserwowano efektów toksycznych ograniczających wysokość dawki. Po dwóch latach badań opublikowano pierwsze entuzjastyczne wyniki potwierdzające, że u wszystkich testowanych pacjentów zaobserwowano zahamowanie postępu choroby, a u połowy powróciła ostrość widzenia. W ten sposób po raz pierwszy w badaniach na ludziach wykazano, że terapia za pomocą siRNA jest bezpieczna i dobrze tolerowana.

5.1.5. Stany zapalne

Technologia interferencji RNA została wykorzystana jako podejście w terapii reumatoidalnego zapalenia stawów (Schiffelers i wsp. 2005). W schorzeniu tym, jak i innych przewlekłych chorobach związanych z procesem zapalnym, występuje nadekspresja czynnika nekrozy nowotworów (TNF-alfa). Ten sam gen był celem terapeutycznym w testach nad zahamowaniem sepsy (Sorensen i wsp. 2003). Na mysim modelu wykazano, że podane dootrzewnowo siRNA zwiększyło sześciokrotnie szanse przeżycia zwierząt laboratoryjnych po ich późniejszym zakażeniu. Badano także aktywność siRNA, skierowanego na gen *fas* w mysim modelu zapalenia wątroby (Song i wsp. 2003), oraz siRNA specyficznego dla mRNA kaspazy 8 – jako czynnika terapeutycznego w leczeniu ostrej niewydolności wątroby (Zender i wsp. 2003). Badania te dobrze ilustrują koncepcję zastosowania RNAi jako potencjalnego leku dla terapii ostrych stanów zapalnych i zakażeń.

6. PODSUMOWANIE

Cząsteczki siRNA, zdolne do wyciszania genów w sposób sekwencyjnie specyficzny, coraz częściej są anonsowane jako nowe potencjalne czynniki terapeutyczne. Szczególnie obiecujące efekty terapii RNAi są zapowiadane w odniesieniu do chorób oczu. Podobnie jak w przypadky terapii antysensowej (Vitravene), efektywność tej formy terapii może wynikać z ułatwionego podawania tych dużych cząsteczek do

leczonej tkanki, w porównaniu do działania leków podawanych ogólnoustrojowo.

Najważniejszą zaletą terapii opartych na interferencji RNA jest możliwość projektowania siRNA, skierowanych na selektywnie wybrany gen docelowy, bez konieczności kumulowania wiedzy o strukturze jego produktu białkowego. Nie bez znaczenia jest fakt, że wykorzystywany mechanizm jest mechanizmem naturalnie występującym w komórce, a więc wywołującym słabsze efekty uboczne niż inne formy terapii, oraz działającym w niższych stężeniach cząsteczek efektorowych (Miyagishi i wsp. 2003). Udowodniono również, że wyciszanie „niechcianego" genu za pomocą siRNA jest bardziej efektywne niż za pomocą oligonukleotydów antysensowych czy rybozymów (Zhang i wsp. 2005; Grunweller i wsp. 2003; Scherer i Rossi 2003; Kim i wsp. 2006; Nawrot 2004). Identyfikacja aktywnych cząsteczek siRNA, skierowanych na związany z chorobą gen stanowi tzw. „*proof-of-concept*" w terapii wybranego schorzenia.

Najbardziej zaawansowane badania nad zastosowaniem RNAi dla terapii prowadzone są obecnie przez Sirna Therapeutics, Inc. W firmie tej w drugiej fazie badań klinicznych znajdują się siRNA zaprojektowane dla leczenia AMD, a w pierwszej fazie badań klinicznych – badania nad terapiami RNAi dla wirusowego zapalenia wątroby typu C oraz wykorzystaniem siRNA w schorzeniach dermatologicznych [http://www.sirna.com/wt/page/index].

Jakkolwiek terapie genowe, wykorzystujące syntetyczne oligonukleotydy od blisko dwudziestu lat wywołują nadzieje, jak i rozczarowania, w stosunku do oczekiwań znalezienia leków przeciwko chorobom towarzyszącym współczesnej cywilizacji, na podstawie szeregu doniesień literaturowych można sądzić, iż spośród licznych strategii tzw. racjonalnego projektowania leków strategia siRNA może stanowić przełom współczesnej medycyny zarówno w aspekcie diagnostycznym, jak i terapeutycznym. I jakkolwiek ten postęp będzie odnotowany jako sukces biologów molekularnych, nie należy zapominać o fakcie, iż punktem zwrotnym było opracowanie przez chemików efektywnych metod syntezy oligonukleotydów (Caruthers, 1985).

Praca powstała dzięki finansowemu wsparciu z projektu ICGEB CRP/POL04-01

PIŚMIENNICTWO

1. Amarzguioui M, Holen T, Babaie E, Prydz H. Tolerance of mutations and chemical modifications in a siRNA. Nucleic Acid Res 2003; 31: 589-595.
2. Amarzguioui M, Rossi JJ, Kim D. Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi. FEBS Lett 2005; 579: 5974-5981.
3. Braasch DA, Jensen S, Liu Y, Kaur K, Arar K, White MA i wsp. RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. Biochemistry 2003; 42: 7967-7975.
4. Braasch DA, Paroo Z, Contantinescu A, Ren G, Oz OK, Mason RP I wsp. Biodistribution of phpsphodiester and phosphorothioate siRNA. Bioorg Med Chem Lett 2004; 14: 1139-1143.
5. Breakthrough of the year. The runners-up. Science 2002; 298: 2297-2303.
6. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science 2002; 296: 550-553.
7. Buckingham S, Esmaeili B, Wood M, Sattelle D. RNA interference: from model organisms towards therapy for neural and neuromuscular disorders. Hum Mol Genet 2004; 13: R275-R288.
8. Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 9742-9747.
9. Caruthers MH. Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses. Science 1985; 230: 281-285.
10. Chi JT, Chang HY, Wang NN, Chang DS, Dunphy N, Brown PO. Genomewide view of gene silencing by small interfering RNAs. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 6343-6346.
11. Chiu YL, Rana TM. siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis. RNA 2003; 9: 1034-1048.
12. Clayton J. RNA interference: the silent treatment. Nature 2004; 431: 599-605.
13. Collins RE, Cheng X. Structural domains in RNAi. FEBS Lett 2005; 579: 5841-5849.
14. Ding H, Schwarz D, Keene A, Affarel B, Fenton L, Xia X i wsp. Selective silencing by RNAi of a dominant allele that causes amyotrophic lateral sclerosis. Aging Cell 2003; 2: 209-217.
15. Doi N, Zenno S, Ueda R, Ohki-Hamazaki H, Ui-Tei K, Saigo K. Short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors. Curr Biol 2003; 13: 41-46.
16. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 2001; 411: 494-498.
17. Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendecel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. EMBO J 2001; 20: 6877-6888.
18. Fire A, Xu SiQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabitis elegans*. Nature 1998; 391: 806-813.
19. Fuchs U, Damm-Welk C, Borkhardt A. Silencing of disease-related genes by small interfering RNAs. Curr Mol Med 2004; 4: 507-517.
20. Grunweller A, Wyszko E, Bieber B, Jahnel R, Erdmann V, Kurreck J. Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2′-O -methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. Nucleic Acids Res 2003; 31: 3185-3193.
21. Hall AHS, Wan J, Shaughnessy EE, Ramsay Shaw B, Alexander KA. RNA interference using boranophospate siRNAs: structure-activity relationships. Nucleic Acid Res 2004; 32: 5991-6000.

22. Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science 1999; 286: 950-952.
23. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. Science 2001; 293: 1146-1150.
24. Hammond SM. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. FEBS Lett 2005; 579: 5822-5829.
25. Harborth J, Elbashir SM, Vandenburgh K, Manninga H, Scaringe SA, Weber K I wsp. Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. Antisense Nucleic Acid Drug Dev 2003; 13: 83-105.
26. Harper S, Staber P, He X, Eliason S, Martins I, Mao Q i wsp. RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 5820-5825.
27. Jackson AL, Linsley PS. Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? Trends Genet 2004; 20: 521-524.
28. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M i wsp. Expression profiling reveleals off-target gene regulation by RNAi. Nat Biotech 2003; 21: 635-637.
29. Kao S, Krichevsky A, Kosik K, Tsai L. BACE1 suppression by RNA interference in primary cortical neurons. J Biol Chem 2004; 279: 1942-1949.
30. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. Cell 2003; 115: 209-216.
31. Kim DH, Behlke MA, Rose SD, Chang MS, Choi S, Rossi JJ. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. Nat Biotechnol 2005; 23: 222-226.
32. Kim SH, Mok H, Jeong JH, Kim SW, Park TG. Comparative evaluation of target-specific GFP gene silencing efficiencies for antisense ODN, synthetic siRNA, and siRNA plasmid complexed with PEI-PEG-FOL conjugate. Bioconjug Chem 2006; 17: 241-244.
33. Kittler R, Putz G, Pelletier L, Poser I, Heninger AK, Drechsel D i wsp. An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. Nature 2004; 432: 1036-1040.
34. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elens* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 1993; 75: 843-854.
35. Li MJ, McMahon R, Snyder DS, Yee JK, Rossi JJ. Specific killing of Ph+ chronic myeloid leukemia cells by a lentiviral vector-delivered anti-bcr/abl small hairpin RNA. Oligonucleotides 2003; 13: 401-409.
36. Li ZY, Mao H, Kallick DA, Gorenstein DG. The effects of thiophosphate substitutions on native siRNA gene silencing. Biochem Biophys Res Commun 2005; 329: 1026-1030.
37. Lingel A, Simo B, Izaurralde E, Sattler M. Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. Nature 2003; 426: 465-469.
38. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ i wsp. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. Science 2004; 305: 1437-1441.
39. Ma JB, Ye K, Patel DJ. Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. Nature 2004; 429: 318-322.
40. Ma JB, Yuan YR, Meister G, Pei Y, Tuschl T, Patel DJ. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. Nature 2005; 434: 666-670.
41. Martinez M, Gutierrez A, Armand-Ugon M, Blanco J, Parera M, Gomez J i wsp. Suppression of chemokine receptor expression by RNA interference allows for inhibition of HIV-1 replication. AIDS 2002; 16: 2385-2390.
42. Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleveage in RNAi. Cell 2002; 110: 563-574.
43. Martinez L, Naguibneva I, Lehrmann H, Vervisch A, Tchenio T, Lozano G i wsp. Synthetic small inhibiting RNAs: efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 14849-14854.
44. Martinez J, Tuschl T. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. Genes & Dev 2004; 18: 975-980.
45. Mathieu O, Bender J. RNA-directed DNA methylation. J Cell Sci 2004; 117: 4881-4888.
46. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. Mol Cell 2004; 15: 185-197.
47. Mirza A, Basso A , Black S, Malkowski M, Kwee L, Pachter JA i wsp. RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis. Cancer Biol Ther 2005; 4: 1355-1360.
48. Miyagishi M, Hayashi M, Taira K. Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNAs directed against the same targets in mammalian cells. Antisense Nucleic Acid Drug Dev 2003; 13: 1-7.
49. Naito Y, Yamada T, Ui-Tei K, Morishita S, Saigo K. siDirect: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference. Nucleic Acids Res 2004; 32: W124-W129.
50. Nawrot B. Targeting BACE with small inhibitory nucleic acids – a future for Alzheimer's disease therapy? Acta Biochim Pol 2004; 51: 431-444.
51. Nawrot B, Sipa K, Widera K, Antoszczyk A, Sierant M, Wojcik M i wsp. Use of small inhibitory nucleic acids for down-regulation of genes involved in Alzheimer's Disease. Proceedings of JMMC. Ettmayer P, Ecker G (eds), Medimond S.r.l., Vienna, 2005, 49-54.
52. Nieth C, Priebsch A, Stege A, Lage H. Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). FEBS Lett 2003; 545: 144-150.
53. Nykanen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interfernce pathway. Cell 2001; 107: 309-321.
54. Olsen PH, Ambros V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caernohabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after initiation of translation. Dev Biol 1999; 216: 671-680.
55. Omi K, Tokunaga K, Hohjoh H. Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. FEBS Lett 2004; 558: 89-95.
56. Pardridge WM. Intravenous, non-viral RNAi gene therapy of brain cancer. Expert Opin Biol Ther 2004; 4: 1103-1113.
57. Parker JS, Roe SM, Barford D. Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. EMBO J 2004; 23: 4727-4737.
58. Parker JS, Roe SM, Barford D. Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. Nature 2005; 434: 663-666.
59. Persengiev SP, Zhu X, Green MR. Nonspecific, concentration-dependent stimulation and represion of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). RNA 2004; 10: 12-18.
60. Pham JW, Pellino JL, Lee YS, Carthew RW, Sontheimer EJ. A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. Cell 2004; 117: 83-94.
61. Prakash TP, Allerson CR, Dande P, Vickers TA, Sioufi N, Jarres R i wsp. Positional effect of chemical modifications on short interference RNA activity in mammalian cells. J Med Chem 2005; 48: 4247-4253.
62. Qin X, An D, Chen I, Baltimore D. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 183-188.
63. Rodriguez-Lebron E, Gonzales-Alegre P. Silencing neurodegenerative disease: bringing RNA interference to the clinic. Expert Rev Neurother 2006; 6: 223-233.

64. Romano N, Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. Mol Microbiol 1992; 6: 3343-3353.
65. Scherer L, Rossi J. Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. Nat Biotechnol 2003; 21: 1457-1465.
66. Schiffelers R, Xu J, Storm G, Woodle M, Scaria P. Effects of treatment with small interfering RNA on joint inflammation in mice with collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum 2005; 52: 1314-1318.
67. Schwarz DS, Hutvagner G, Haley B, Zamore PD. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. Mol Cell 2002; 10: 537-548.
68. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. Cell 2003; 115: 199-208.
69. Schwarz DS, Tomari Y, Zamore PD. The RNA-Induced Silencing Complex is a Mg2+ - dependent endonuclease. Curr Biol 2004; 14: 787-791.
70. Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroeger P, Halbert DN, Fesik SW. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 6347-6352.
71. Shammas MA, Koley H, Batchu RB, Bertheau RC, Protopopov A, Munshi NC i wsp. Telomerase inhibition by siRNA causes senescence and apoptosis in Barrett's adenocarcinoma cells: mechanism and therapeutic potential. Mol Cancer 2005; 4: 24.
72. Sierant M, Sipa K, Kazimierczak-Barańska J, Kuwabara T, Warashina M, Nawrot B I wsp. Efficient silencing of BACE1 by RNA interference in cellular and animal models, w przygotowaniu
73. Simeoni F, Morris MC, Heitz F, Divita G. Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. Nucleic Acids Res 2003; 31: 2717-2724.
74. Siolas D, Lerner C, Burchard J, Ge W, Linsley PS, Paddison PJ I wsp. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. Nat Biotech 2005; 23: 227-231.
75. Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BRG. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. Nat Cell Biol 2003; 5: 834-839.
76. Song E, Lee S, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J i wsp. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. Nat Med 2003; 9: 347-351.
77. Song E, Zhu P, Lee SK, Chowdhury D, Kussman S, Dykxhoorn DM i wsp. Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. Nat Biotechnol 2005; 23: 709-717.
78. Song JJ, Smith SK, Martienssen RA, Hannon GJ, Joshua-Tor L. The crystal structure of the Argonaute and its implications for RISC slicer activity. Science 2004; 305: 1434-1437.
79. Sorensen D, Leirdal M, Sioud M. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. J Mol Biol 2003; 327: 761-766.
80. Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constein R, Donoghue M i wsp. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systhemic administration of modified siRNAs. Nature 2004; 432: 173-178.
81. Tomari Y, Du T, Haley B, Schwarz DS, Bennett R, Cook HA i wsp. RISC assembly defects in the Drosophila RNAi mutant armitage. Cell 2004; 116: 831-841.
82. Uprichard SL. The therapeutic potential of RNA interference. FEBS Lett 2005; 579: 5996-6007.
83. Wadhwa R, Kaul SC, Miyagishi M, Taira K. Vectors for RNA interference. Curr Opin Mol Ther 2004; 6: 367-372.
84. Wannenes F, Ciafré SA, Niola F, Frajese G, Farace MG. Vector-based RNA interference against vascular endothelial growth factor-A significantly limits vascularization and growth of prostate cancer in vivo. Cancer Gene Ther 2005; 12: 926–934.
85. Wood M, Trulzsch B, Abdelgany A, Beeson D. Therapeutic gene silencing in the nervous system. Hum Mol Genet 2003; 12: R279-R284.
86. Yague E, Higgins C, Raguz S. Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting MDR1. Gene Ther 2004; 11: 1170-1174.
87. Yang G, Thompson J, Fang B, Liu J. Silencing of H-ras gene expression by retrovirus-mediated siRNA decreases transformation efficiency and tumorgrowth in a model of human ovarian cancer. Oncogene 2003; 22: 5694-5701.
88. Yan KS; Farooq A; Hen A; Zeng L; Zhou MM. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. Nature 2003; 426: 469-474.
89. Zangemeister-Wittke U. Antisense to apoptosis inhibitors facilitates chemotherapy and TRAIL-induced death signaling. Ann NY Acad Sci 2003; 1002: 90-94.
90. Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR. Technique: both natural and designed microRNAs can inhibit expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. Mol Cell 2002; 9: 1327-1333.
91. Zender L, Hutker S, Liedtke C, Tillmann H, Zender S, Mundt B i wsp. Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 7797-7802.
92. Zentilin L, Giacca M. In vivo transfer and expression of genes coding for short interfering RNAs. Curr Pharm Biotechnol 2004; 5: 341-347.
93. Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. Cell 2004; 18: 57-68.
94. Zhang Y, Boado R, Pardridge W. In vivo knockdown of gene expression in brain cancer with intravenous RNAi in adult rats. J Gene Med 2003; 5: 1039–1045.
95. Zhang Y, Zhang YF, Bryant J, Charles A, Boado RJ, Pardridge WM. Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. Clin Cancer Res 2004; 10: 3667–3677.
96. Zhang Y, Taylor M, Samson W, Phillips M. Antisense inhibition: oligonucleotides, ribozymes, and siRNAs. Methods Mol Med 2005; 106: 11-24.

Adres korespondencyjny:
Katarzyna Sipa
Zakład Chemii Bioorganicznej
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN
Sienkiewicza 112
90-363 Łódź
ksipa@bio.cbmm.lodz.pl; bnawrot@bio.cbmm.lodz.pl