

Wykorzystanie małych interferujących RNA do hamowania ekspresji genów w komórkach ssaków – zastosowanie w neurobiologii

Aleksandra Wesołowska

Pracownia Regulacji Transkrypcji, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa,

Streszczenie

Możliwość zablokowania ekspresji wybranych genów wzbudza ogromne nadzieje w terapii nieuleczalnych jak dotąd schorzeń układu nerwowego takich jak choroby neurodegeneracyjne czy nowotwory mózgu. Część RNA ze względu na swoje właściwości biochemiczne stanowi obiecujące narzędzie terapeutyczne. Odkrycie zjawiska interferencji RNA (RNAi) zapoczątkowało nowe badania dotyczące hamowania ekspresji wybranych genów przez małe interferujące RNA (siRNA) w komórkach ssaków. Technika ta wykorzystuje naturalny proces wyciszania ekspresji genów zależny od dwuniciowego RNA. Rybonukleaza o aktywności RNazy III, w komórkach ludzkich zwana Dicer, degradowuje dwuniciowe, liniowe fragmenty RNA do siRNA. Następnie dochodzi do powstania rybonukleinoproteinowego kompleksu zwanego RISC. Kompleks RISC wykazuje aktywność helikazy, jak również endo i egzonukleazy. Antysensowna nić siRNA zlokalizowana w obrębie RISC rozpoznaje komplementarne sekwencje w obrębie mRNA. Następnie dochodzi do endonukleolitycznej degradacji mRNA w regionie komplementarnym do antysensownej nici siRNA.

Blokowanie ekspresji wybranych genów na drodze interferencji RNA można osiągnąć wprowadzając do komórek ssaków syntetyzowane chemicznie lub uzyskane metodą transkrypcji *in vitro* odcinki RNA o sekwencji odpowiadające siRNA. Możliwa jest również synteza siRNA na matrycy wektora pod kontrolą promotora U6 lub H1 RNA polimerazy III (Pol III) lub promotora polimerazy II cytomegalowirusa (Pol IICMV). Zaprojektowane sekwencje mogą mieć charakter palindromów rozdzielonych pętlą. Sekwencje te tworzą struktury typu spinki (shRNA), które rozpoznawane są przez enzym Dicer i degradowane do siRNA. Wiele cech opisanego zjawiska RNAi, a zwłaszcza selektywność substratowa wzbudza duże nadzieje na wykorzystanie go nie tylko do badań podstawowych. Aby zjawisko RNAi znalazło zastosowanie w neurologii muszą zostać wyjaśnione jego podstawy biochemiczne, których zrozumienie pozwoli dokonywać jednoznacznego wyboru sekwencji docelowych dla siRNA.

Słowa kluczowe: interferencja RNA (RNAi), małe interferujące RNA (siRNA), kompleks RISC (RISC), RNA o strukturze spinki (shRNA)

Wstęp

Patogeneza wielu nieuleczalnych chorób neurologicznych takich jak choroby nowotworowe mózgu, neurodegeneracyjne czy też zaburzenia widzenia związane są ze zmianą ekspresji genów. Pomimo znacznego rozwoju medycyny molekularnej choroby układu nerwowego wciąż pozostają jednymi z mniej poznanych a zarazem wymagających nowych schematów leczenia schorzeń. Odkrycie zjawiska interferencji RNA (RNAi) zapoczątkowało nowe badania dotyczące hamowania ekspresji wybranych genów przez małe interferujące RNA (siRNA) w komórkach ssaków, także w obrębie układu nerwowego. Technika ta wykorzystuje naturalny proces wyciszania ekspresji genów zależny od dwuniciowego RNA.

Molekularne postawy procesu wyciszania ekspresji genów na drodze interferencji RNA w komórkach ssaków

Zarówno biochemiczne jak i genetyczne badania potwierdziły istnienie wspólnych elementów enzymatycznych interferencji RNA u wszystkich organizmów eukariotycznych (Fire i wsp. 1998, Guo i Kemphues 1995, Hamilton i Bulcombe 1999).

W przypadku zwierząt, gdzie proces hamowania ekspresji genów zależny od dsRNA jest mniej poznany, mówimy ogólnie o zjawisku RNAi (ang. *RNA interference*), czyli interferencji zależnej od RNA. Podobnie jak u roślin kluczowym elementem tego procesu są oligonukleotydy, określane jako małe interferujące RNA (siRNA ang. *small interfering RNA*), nieznacznie różniące się

długością w zależności od gatunku (Zamore 2000). W dalszej części artykułu zostanie przedstawiony przebieg procesu interferencji RNA zachodzący w komórkach organizmów modelowych z odniesieniami do komórek ludzkich, gdzie proces ten jest niewątpliwie mniej poznany.

Obecność ufosforylowanych na 5' końcu małych, dwuniciowych RNA w ekstraktach komórkowych *D. melanogaster*, w których doszło do inhibicji ekspresji genów zależnej od RNA, sugerowała udział w tym procesie enzymu o aktywności rybonukleazy z rodziny RNazy III (Bernstein i wsp. 2001). Homologi genu RNazy III znaleziono u *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) i nazwano go czynnikiem Carpel (CAF – carpel factory, DCL-1 dicer-like 1), a także u *C.elegans* i *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), gdzie został opisany jako dcr-1. Enzym biorący udział w procesie RNAi, u muszki owocowej, myszy i ludzi zwany Dicer, stanowi odrębną klasę nukleaz charakteryzującą się określoną budową. Posiada dwie domeny o aktywności RNazy III i dodatkowe domeny funkcjonalne: wiążącą dsRNA, helikazową i domenę PAZ odpowiedzialną za interakcję z innymi białkami. Jego kluczowa rola w procesie RNAi polega na degradacji dwuniciowych liniowych fragmentów RNA do siRNA. U ssaków reakcja ta nie wymaga obecności ATP, choć jego hydroliza warunkuje uwolnienie siRNA z miejsca katalitycznego enzymu i umożliwia kolejną reakcję (Zhang 2002). W przypadku ssaków enzym ten bierze również udział w dojrzewaniu RNA o strukturze typu spinki (shRNA, ang. *short hairpin* RNA) tnąc ich prekursorzy (Doench i wsp. 2003, Hommel i wsp. 2003, Lee i wsp. 2002, McManus i wsp. 2002, Paddison i wsp. 2002). Mimo zachowanej w ewolucji domenowej budowy enzymu Dicer, różnice pomiędzy poszczególnymi podjednostkami prowadzą do specyficznej gatunkowo długości produktów degradacji dsRNA wahającej się od 21 do 25 par zasad (Elbashir i wsp. 2001, Fire A i wsp. 1998, Hamilton i Bulcombe 1998, Zhou 2002).

Dalsze badania nad mechanizmem molekularnym procesu interferencji RNA wykazały kolokalizację małych interferujących RNA z kompleksem białek o złożonej aktywności enzymatycznej zwanym RISC (ang. *RNA Induced Silencing Complex*). Kompleks RISC wykazuje aktywność zarówno helikazy, jak i endo oraz egzokleazy. Aktywacja enzymu wymaga dysocjacji dwuniciowych siRNA w procesie zależnym od ATP. Kompleks RISC wiąże preferencyjnie antysensowną nić siRNA, natomiast nić sensowna jest degradowana

(Schwarz i wsp. 2003). Jednociowy antysensowny siRNA zlokalizowany w obrębie RISC rozpoznaje komplementarne sekwencje mRNA (Martinez i wsp. 2002). Dochodzi następnie do endonukleolitycznej hydrolizy mRNA w miejscu które wyznacza ufosforylowany koniec 5' nici antysensownej siRNA. Cięcie następuje w połowie dupleksów mRNA/siRNA, a dalsza degradacja ma już charakter egzokleolityczny (Cerutti 2003, Denli i Hannon 2003, Hammond i wsp. 2000, Matzake i wsp. 2000).

Udane próby oczyszczania aktywnego kompleksu RISC z cytoplazmatycznych ekstraktów komórek HeLa sugerują jego lokalizację na terenie cytoplazmy (Martinez i wsp. 2002). Zidentyfikowano również szereg białek wchodzących w skład kompleksu, którego ciężar *in vivo* oszacowano na kilkaset kDa. Ważne wydają się być białka z rodziny Argonaute (eIF2C1 oraz eIF2C2), białka wiążące dsRNA, jak również szereg białek o aktywności helikaz i nukleaz. Wiadomo że białka Argonaute zawierają dwie charakterystyczne domeny PAZ oraz PIWI (Hammond i wsp. 2001). Domena PAZ okazała się być kluczowa dla wiązania siRNA natomiast w obrębie domeny PIWI zlokalizowane jest centrum katalityczne całego kompleksu RISC. Ostatnie badania z użyciem myszy dowiodły, że w skład kompleksu RISC katalizującego degradację mRNA zależną od siRNA wchodzi białko Ago2 (Liu i wsp. 2004). Rozwiązana struktura krystalograficzna jego bakteryjnego odpowiednika wykazała podobieństwa pomiędzy domeną PIWI a domeną RNazyH tnącej heterodupleksy RNA/DNA, co pozwala przypuszczać że białko Ago2 wykazuje aktywność endonukleolityczną tnąc mRNA w obrębie siRNA/mRNA dupleksów (Song i wsp. 2004).

Jak już wspomniano, w komórkach ludzkich hamowanie ekspresji genów zależne od RNAi wydaje się być ograniczone do cytoplazmy (Martinez i wsp. 2002, Zeng i Bryan 2002). Zarówno enzym Dicer, jak ludzkie homologi białek z rodziny Argonaute, są białkami cytoplazmatycznymi, chociaż elementy składowe ludzkiego kompleksu enzymatycznego RISC takie jak białka Gemin3 i Gemin4 występują dodatkowo w jądrze komórkowym (Mourelatos i wsp. 2002). Nasuwa to przypuszczenie, że proces interferencji RNA może wpływać także na etap translacji. Jak się okazuje białko eIF2C (białko z rodziny Argonaute) wchodzi również w skład złożonego kompleksu rybonukleinoproteinowego (kompleks RNP) regulującego metabolizm RNA w komórce (Hutvagner i Zamore 2002, Mourelatos i wsp. 2002).

siRNA jako narzędzie do blokowania ekspresji genów w komórkach ssaków

Niezależnie od jego biologicznej funkcji, zjawisko interferencji RNA może być wykorzystane do zmiany ekspresji genów zarówno u roślin jak i u zwierząt (Szweykowska-Kulińska i wsp. 2003). Największe nadzieje wzbudza możliwość efektywnego hamowania ekspresji genów ludzkich. Teoretycznie można

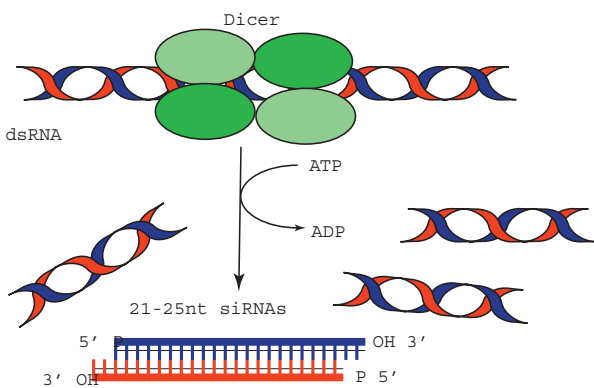
by to osiągnąć podając z zewnątrz dsRNA o sekwencji komplementarnej do mRNA będącego substratem kompleksu RISC (Guo i Kempthues 1995). Okazało się jednak, że u ssaków dsRNA dłuższy niż 30 nukleotydów wywołuje niespecyficzną degradację mRNA w ramach odpowiedzi antywirusowej zależnej od interferonu. Problem ten można rozwiązać wprowadzając do komórki syntetyzowane chemicznie lub uzyskane w reakcji transkrypcji *in vitro* krótkie RNA, odpowiadające siRNA (Donzé i Picard 2002, Elbashir 2001). Możliwa jest również synteza siRNA na matrycy wektora pod kontrolą promotora U6 lub H1 RNA polimerazy III (Pol III) lub promotora polimerazy II cytomegalowirusa (Pol II CMV) (Matsukura i wsp. 2003, Paddison i wsp. 2002, Xia i wsp. 2002, Sui i wsp. 2002). Tworzenie takiego konstruktów może opierać się na technice PCR lub tradycyjnym klonowaniu (Brummelkamp i wsp. 2002, Castanotto i wsp. 2002, Gou i wsp. 2003). Polimeraza III naturalnie występująca w komórce syntetyzuje małe, niekodujące RNA, niemodyfikowane na 3' i 5' końcu. Początek transkrypcji jest ściśle zdefiniowany, a koniec transkrypcji wyznacza ciąg tymidyn. Dzięki temu możliwe jest klonowanie sekwencji DNA kodującej RNA, której ekspresja prowadzi do syntezy odpowiedników siRNA. Nić sensowna i antysensowna krótkich RNA może być klonowana w oddzielnych wektorach lub jako sekwencje tandemowe w tym samym wektorze (Shi i wsp. 2003). Zaprojektowane oligonukleotydy mogą mieć również charakter palindromów rozdzielonych pętlą. Sekwencje te tworzą struktury typu spinki (shRNA), które rozpoznawane są przez enzym Dicer i degradowane do siRNA (Matsukura i wsp. 2003, Paddison i wsp. 2003, Yu i wsp. 2003).

Dzięki sklonowaniu ludzkiego rekombinowanego białka Dicer możliwe jest także uzyskiwanie siRNA *in vitro* po dostarczeniu badanym komórkom oligonukleotydu komplementarnego do mRNA, które ma ulec degradacji. Przy takim podejściu nie ma konieczności wyboru ściśle określonej sekwencji docelowej dla siRNA. Nie daje ona jednak możliwości weryfikacji sekwencji powstających siRNA (Kawasaki i wsp. 2003).

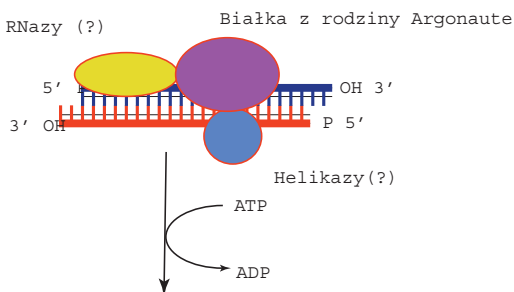
Małe interferujące RNA jako narzędzie do blokowania ekspresji genów w komórkach układu nerwowego

Zastosowanie technik blokowania ekspresji genów opartych o zjawisko RNAi ma szansę stać się szczególnie owocne w przypadku badań dotyczących etiologii

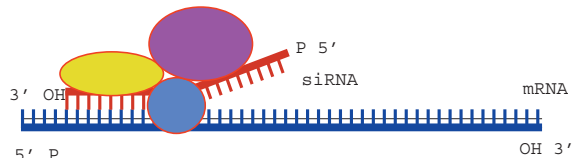
1. Powstanie małych interferujących RNA (siRNA)



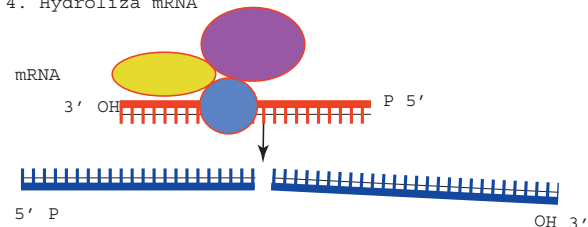
2. Formowanie kompleksu wyciszającego Risc



3. Aktywacja kompleksu wyciszającego Risc* i rozpoznanie mRNA komplementarnego do siRNA



4. Hydroliza mRNA



Ryc. 1. Poznane etapy wyciszania ekspresji genów na drodze interferencji RNA.

schorzeń układu nerwowego a także ich ewentualnej terapii. Przyczyną jest nie tylko nieskuteczność dotychczasowych podejść ale także fakt, że ze względu na unikalność tkankowo specyficznej ekspresji genów w obrębie układu nerwowego bardzo wiele chorób o podłożu genetycznych objawia się zmianami neurologicznymi.

Używając wektorów kodujących sekwencje shRNA lub syntetycznych małych interferujących RNA (siRNA) zahamowano ekspresję genów kodujących zarówno białka czynników chorobotwórczych atakujących układ nerwowy takich jak priony jak również białek endogennych związanych z poważnymi chorobami układu nerwowego takimi jak choroba Alzheimera, stwardnienie zanikowe boczne czy też choroba Kennediego oraz płasawica Huntingtona (Caplen i wsp. 2002, Kao i wsp. 2002, Tilly i wsp. 2003). Dostarczane przez firmy biotechnologiczne wektory umożliwiają indukcję genów kodujących zaprojektowaną sekwencję siRNA w ściśle określonych warunkach laboratoryjnych, jak i badanie efektu fenotypowego hamowania ekspresji danego genu w liniach komórkowych stabilnie transfekowanych (Brummelkamp i wsp. 2002, Matsukura i wsp. 2003). Dostępne systemy wprowadzania siRNA do komórek (liposomy, elektroporacja, wektory pochodzenia wirusowego) umożliwiają badanie efektu hamowania ekspresji genów zarówno w ustalonych liniach komórek nowotworowych pochodzenia neuronalnego (neuroblastoma) jak również pierwotnych neuronach (Gan i wsp. 2002, Krichevsky i Kosik 2002). O ile schorzenie związane jest z utratą funkcji określonego genu siRNA stanowi dogodne narzędzie do konstruowania modeli zwierzęcych tego typu chorób neurologicznych. I tak na przykład opracowano model *in vitro* choroby związanej z zanikiem neuronów motorycznych w rdzeniu kręgowym (SMA, ang. *Spinal Muscular Atrophy*) blokując ekspresję kluczowego genu w mysich komórkach P19 (Trulzsch i wsp. 2004). Udało się również precyzyjnie w określonym rejonie mózgu zablokować ekspresję genu kodującego hydrolazę tyrozynową u dorosłych myszy używając wektorów pochodzenia adenowirusowego. Enzym ten konieczny jest do produkcji domapiny, której brak jest przyczyną choroby Parkinsona (Hommel i wsp. 2002) Istnieją również modele zwierzęce chorób związanych z ekspansją trójek nukleotydowych (SBMA ang. *Spinobulbar Muscular Atrophy*, SCA1 ang. *Spinocerebellar Ataxia type 1*) ustalone dzięki wykorzystaniu siRNA (Buckingham i wsp. 2004, Xia i wsp. 2002).

Wiele cech opisanego zjawiska RNAi, takich jak udział w szlakach biochemicznych naturalnie występujących w komórce czy też specyficzność substratu, wzbudza duże nadzieje na wykorzystanie go nie tylko do badań podstawowych. Jednocześnie jednak właściwości te wyznaczają ograniczenia stosowania tej metody w terapii chorób. Badania specyficzności substratowej małych interferujących RNA wykazały, że różnica pojedynczego nukleotydu w zaprojektowanej sekwencji skierowanej przeciw danemu mRNA może znosić zjawisko blokowania ekspresji danego genu, a na pewno wpływa na poziom jego wyciszenia. (Denli i Hannon 2003, Doench i wsp. 2003). Stwarza to nadzieje na użycie tej metody do leczenia chorób związanych z mutacją jednego allelu danego genu. Przykładem zablokowania ekspresji zmutowanego allelu genu może być użycie siRNA skierowanych na transkrypt genu kodującego białko Tau w rejonie niosącym mutacje missens powodującą zaburzenia neurologiczne o charakterze demencji (Miller i wsp. 2003). Jednocześnie wykazano że selektywność procesu zależy od ilości użytego siRNA. Nadmiar małych interferujących cząsteczek RNA powoduje niespecyficzną indukcję szeregu genów związanych z odpowiedzią komórki na stres. Pierwsze badania za pomocą mikromacierzy DNA wykazały, że zahamowanie ekspresji danego genu w komórce przy użyciu siRNA nie zmienia profilu ekspresji pozostałych genów (Semizarov i wsp. 2003). Biorąc jednak pod uwagę naturalną rolę tego proces w stabilizacji genomu i regulacji ekspresji genów trudno przewidzieć, jakie mogą być jego konsekwencje dla integralności poddawanych mu komórek. Ostatnie doniesienia poddają w wątpliwość wyniki wcześniejszych badań dotyczących niespecyficznego odpowiedzi komórki na małe interferujące RNA powstające na matrycy plazmidów (Bridge i wsp. 2003). Być może brak reakcji zależnej od interferonu po wprowadzeniu plazmidów kodujących hpRNA wynikał z defektu tej drogi w komórkach poddawanych eksperymentom. Ze względu na ograniczoną odpowiedź immunologiczną na terenie Centralnego Układu Nerwowego użycie siRNA do blokowania ekspresji genów w obrębie układu nerwowego wydaje się być bezpieczne i selektywne chociaż trzeba brać pod uwagę doniesienia o reakcji immunologicznej na same wektory pochodzenia wirusowego, które póki co stanowią najefektywniejszy sposób dostarczania siRNA w układzie *in vivo*.

Przede wszystkim jednak, aby opisywane zjawisko znalazło zastosowanie w medycynie musi zostać do

końca wyjaśniony mechanizm biochemiczny degradacji RNA zależnej od RNAi, którego zrozumienie pozwoli dokonywać jednoznacznego wyboru sekwencji docelowych dla siRNA (Dillin 2002, Sullenger i Gilboa 2003, Kretschmer-Kazemi i Szczakiel 2003)

Bibliografia

- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-6.
- Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz A-L, Iggo R (2003) Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Science* (dostępny w sieci www) doi:10.1038/ng1173.
- Brummelkamp TJ, Bernards R, Agami R (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550-553.
- Buckingham ST, Esmacili B, Wood M, Sattelle DB (2004) RNA interference: from model organism towards therapy for neuronal and neuromuscular disorders. *Hum Mol Genet* 13: R275-R288
- Caplen NJ, Taylor JP, Statham VS, Tanaka F, Fire A, Morgan RA (2002) Rescu of polyglutamine-mediated cytotoxicity by double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Hum Mol Genet* 11: 175-184
- Castanotto D, Li H, Rossi JJ (2002) Functional siRNA expression from transfected PCR products. *RNA* 8(11): 1454-1460.
- Cerutti H (2003) RNA interference: traveling in the cell and gaining functions. *Trends Genet* 19: 39-45.
- Denli AM, Hannon GJ (2003) RNAi: an ever-growing puzzle. *Trends Biochem Sci* 28: 196-201.
- Dillin A (2003) The specifics of small interfering RNA specificity. *Proc Natl Acad Sci* 100: 6289-6291.
- Doench JG, Petersen CHP, Sharp PA (2003) siRNA can function as miRNAs. *Genes Dev.* 17: 438-442.
- Donzé O, Picard D (2002) RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 30 (e46).
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) Duplex of 21- nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- Gan L, Anton KE, Masterson BA, Vincent VA, Ye S, Gonzalez-Zuluteta M (2002) Specific interference with gene expression and gene function mediated by long dsRNA in neural cells. *J Neurosci Meth* 121: 151-157
- Gou D, Jin N, Liu L (2003) Gene silencing in mammalian cells by PCR-based short hairpin RNA. *FEBS Lett* 548: 113-118.
- Guo S, Kemphues KJ (1995) par-1, a gene required establishing polarity in *C.elegans* embryos encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81: 611-620.
- Hamilton AJ, Bulcombe DCA (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-296.
- Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Koayashi R, Hannon GJ (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293: 1147-1150.
- Hommel JD, Sears RM, Georgescu D, Simmons DL, DiLeone RJ (2003) Local gene knockdown in brain using viral-mediated RNA interference. *Nat Med* 9: 1539-1544
- Hutvagner G, Zamore PD (2002) A microRNA is a multiple turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297: 2056-2060.
- Kao S-Ch, Krichevsky AM, Kosik KS, Tsai LH (2004) BACE1 suppression by RNA interference in primary cortical neurons. *J Biol Chem* 279: 1942-1949
- Kawasaki H, Suyama E, Iyo M, Taira K (2003) siRNAs generated by recombinant human Dicer induce specific and significant but target site-independent gene silencing in human cells. *Nucleic Acids Res* 31: 981-987.
- Kretschmer-Kazemi FAR R, Szczakiel G (2003) The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 31: 4417-24.
- Krichevsky AM, Kosik KS (2002) RNAi functions in cultured mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci* 99: 11926-11929.
- Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN (2002) MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 21: 4663-4670.
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305: 1437-1441.
- McManus MT, Petersen CP, Haines BB, Chen J, Sharp PA. (2002) Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. *RNA* 8: 842-50.
- Matsukura S, Jones PA, Takai D (2003) Establishment of conditional vectors for hairpin siRNA knockdowns. *Nucleic Acids Res* 31: e77.
- Matzake M, Matzake A, Kooter JM (2002) RNAi: guiding gene silencing. *Science* 293: 1080-1083.
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T (2002) Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110: 563-74.
- Miller VM, Marrs GL, Gouvion CM, Lee G, Davidson BL, Paulson HL (2003) Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 7195-7200.
- Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G (2002) MiRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* 16: 720-728.
- Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS (2002) Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* 16: 948-958.
- Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroger P, Halbert DN, Fesik SW (2003) Specificity of short interfering RNA determined by through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci* 100: 6347-6352.
- Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305: 1434.
- Shi Y (2003) Mammalian RNA for masses. *Trends Genet* 19: 9-12.
- Sui G, Soohoo CH, Affar EF, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y (2002) A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* 99: 5515-5520.
- Sullenger BA, Gilboa E (2002) Emerging clinical applications of RNA. *Nature* 418: 252-257.

- Szweykowska-Kulińska Z, Jarmołowski A, Figlerowicz M (2003) RNA interference and its role in regulation of eucaryotic gene expression. *Acta Bioch Pol* 50: 217-229.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD.(2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115(2): 199-208
- Tilly G, Chapuis J, Vilette D, Laude H, Vilotte JL (2003) Efficient and specific down-regulation of prion protein expression by RNAi. *Biochem Biophys Res Commun* 305: 548-551
- Trulzsch B, Davies K, Wood M (2004) Survival of motor neuron gene downregulation by RNAi: towards a cell culture model of spinal muscular atrophy. *Brain Res Mol Brain Res* 120: 145-150
- Yu J-H, Deruiter L, Turner DL (2003) RNA interference by expression of short interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* 99: 6047-6052.
- Zamore PD (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101: 25-33.
- Zeng Y, Bryan RC (2002) RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *RNA* 8: 855-860.
- Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W (2002) Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO.J* 21: 5875-5885.
- Zhou Y, Ching Y-P, Kok KH, Kung H, Jin D-J (2002) Post-transcriptional suppression of gene expression in *Xenopus* embryos by small interfering RNA. *Nucleic Acids Res* 30: 1664-1669.
- Xia H, Mao Q, Paulson HL, Davidson BL (2002) siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* 20: 1006-1010.

Autorka jest słuchaczem Studium Medycyny Molekularnej, Akademia Medyczna, Warszawa.

Adres do korespondencji: ul. Aleje Jerozolimskie 131 m 15, 02-304 Warszawa, tel. 8222 26 80, tel. kom. 600 93 85 27, e-mail: owesola@wp.pl