

Received: 2010.05.05
Accepted: 2010.09.14
Published: 2010.10.19

Zastosowanie interferencji RNA w diagnostyce i terapii niektórych chorób człowieka*

RNA interference as a potential tool for diagnosis and therapy of some human diseases

Paweł Józwiak, Anna Lipińska

Zakład Cytobiochemii, Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

Interferencja RNA jest jednym z najważniejszych odkryć w dziedzinie biologii molekularnej. Dotąd przeprowadzono wiele badań, które sugerują udział interferencji RNA w różnych procesach biologicznych istotnych w rozwoju wielu chorób. Jednak interferencja RNA dzięki swojej specyficzności i dużej efektywności stała się obiecującym narzędziem terapii genowej. Pomyślne wprowadzenie terapeutycznych małych interferencyjnych RNA (siRNAs) do docelowej tkanki wymaga ominięcia pewnych krytycznych barier organizmu. To z kolei przyczynia się do poszukiwań nowych wektorów, które powinny w sposób wybiórczy wnikać do określonego typu komórek oraz wykluczać odpowiedź immunologiczną. Artykuł jest próbą uporządkowania obecnego stanu wiedzy na temat zastosowania interferencyjnych RNA w diagnostyce i terapii niektórych chorób człowieka.

Słowa kluczowe:

RNA interferencja • wyciszenie genu • nowotwory • choroby neurodegeneracyjne • choroby wirusowe • systemy dostarczania leków • wrodzona odpowiedź immunologiczna

Summary

RNA interference is one of the most important discoveries in the field of molecular biology. To date, many studies have been reported which suggest that RNA interference takes part in various biological processes essential for the development of many diseases. On the other hand, owing to its high specificity and efficiency, RNA interference has become a powerful tool in gene therapy. However, introduction of small interfering RNAs (siRNAs) to a target tissue requires overcoming some critical biological barriers. This, in turn, contributes to searching for new effective vectors, which should selectively penetrate the tissue and be able to exclude the innate immune response. This study provides a brief overview of the application of RNA interference in the diagnosis and therapy of some human diseases.

Key words:

RNA interference • gene silencing • cancer • neurodegenerative diseases • viral diseases • drug delivery systems • innate immune response

* Praca powstała w ramach działalności statutowej Katedry Cytobiochemii UŁ.

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=921322>**Word count:** 3466**Tables:** 1**Figures:** 1**References:** 111**Adres autorki:** prof. dr hab. Anna Lipińska, Zakład Cytobiochemii, Katedra Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: anna@biol.uni.lodz.pl

WPROWADZENIE

Interferencja RNA jest naturalnym, starym ewolucyjnie procesem, którego jedną z podstawowych funkcji wydaje się ochrona genomu przed wirusami i transpozonami. Mimo iż zjawisko to jest szeroko rozpowszechnione w organizmach eukariotycznych, to przez wiele lat umykało ono uwadze naukowców [1]. Pierwsze obserwacje potranskrypcyjnego wyciszania ekspresji genów, które określono kosupresją, opisała grupa naukowców z Uniwersytetu w Kalifornii przeprowadzając badania nad transgeniczną modyfikacją rośliny *Petunia hybrida* [63]. Przełom w dziedzinie potranskrypcyjnego wyciszania ekspresji genów nastąpił w 1998 roku, gdy Fire i wsp. opublikowali na łamach tygodnika *Nature* wyniki swoich badań przeprowadzonych na nicieniu *Caenorhabditis elegans*, z których wynikało, że sensowne i antysensowne sekwencje RNA łączą się ze sobą tworząc dwuniciowy RNA – dsRNA (double stranded RNA) swoiście wyciszający dany gen [28]. Wprowadzili oni powszechnie uznany termin „RNA interferencji”. Należy nadmienić, że za swoje osiągnięcia A. Fire i C. C. Mello w 2006 roku otrzymali Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny.

W 2003 roku po raz pierwszy zastosowano interferencję RNA w terapii żółtaczki wątrobowej u myszy. Rok później Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków zatwierdziła pierwsze kliniczne próby z użyciem interferencyjnych RNA [79]. Przeprowadzono już wiele badań w różnych systemach w celu zastosowania interferencji RNA w terapii chorób [78].

MECHANIZM WYCISZANIA EKSPRESJI GENU W PROCESIE INTERFERENCJI RNA

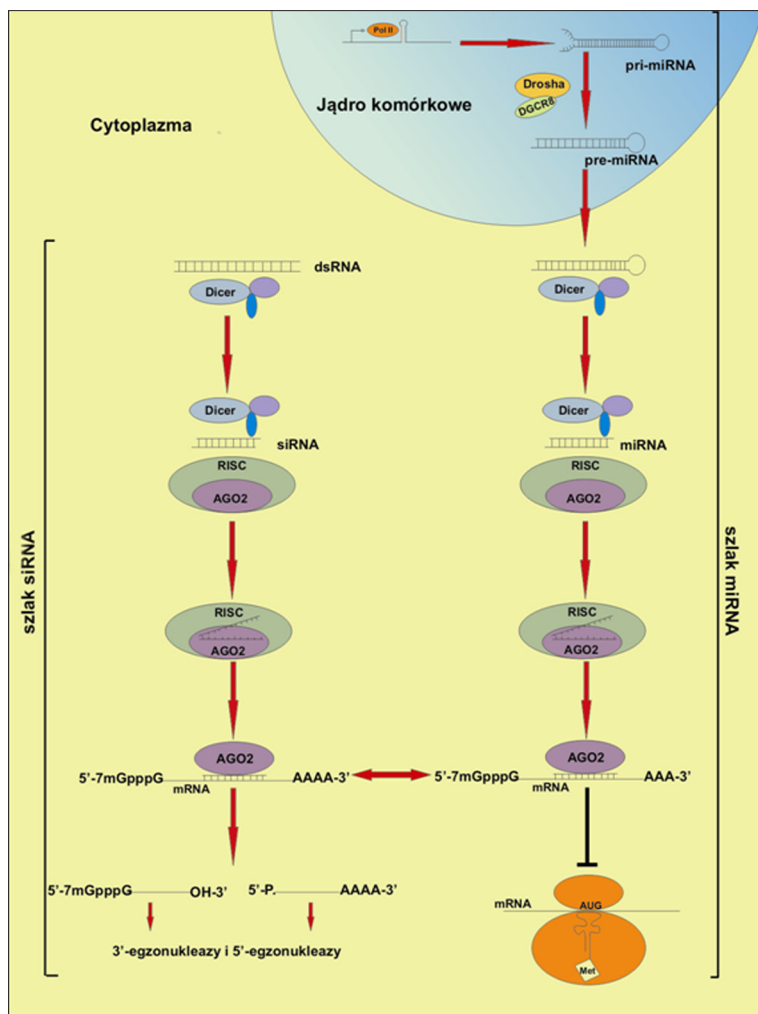
Zjawisko interferencji RNA (RNAi) polega na degradacji lub zahamowaniu ekspresji docelowego transkryptu przez egzogenne wprowadzenie lub endogenną syntezę dsRNA o homologicznej sekwencji. Poszczególne etapy tego procesu przedstawiono na ryc. 1. Pierwszy etap interferencji RNA z egzogennym dsRNA zachodzi w cytoplazmie i prowadzi do hydrolizy dsRNA do małych interferencyjnych RNA – siRNA (small interfering RNA) z udziałem rybonukleazy Dicer, której każda z dwóch domen o aktywności RNazy III tnie pojedynczą nić duplesku generując jedno nowe zakończenie. W wyniku enzymatycznego cięcia powstają produkty o długości około 21 nukleotydów mające przy końcu 3' grupę hydroksylową oraz dwa niesparowane nukleotydy, a przy końcu 5' grupę fosforanową. Następnie nukleaza Dicer współdziałając z innymi kofaktorami pośredniczy w wiązaniu cząsteczek siRNA z kompleksem efektorowym RISC (RNA induced silencing complex) [17,25,35,46,49,99].

Endogennym substratem mechanizmu interferencji RNA są cząsteczki mikro RNA – miRNA (micro RNA). Pierwotny transkrypt miRNA – pri-miRNA (primary micro RNA) liczący kilkadziesiąt nukleotydów i podlega enzymatycznej obróbce realizowanej przez kompleks zwany mikroprocesorem. Rdzeń mikroprocesora stanowi enzym Drosha o aktywności RNazy III oraz białko DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8). W wyniku hydrolizy powstaje prekursorowy miRNA – pre-miRNA (precursor miRNA) o strukturze spinki do włosów, który jest transportowany z jądra komórkowego do cytoplazmy, gdzie zachodzi drugi etap dojrzewania miRNA z udziałem nukleazy Dicer. Dojrzałe miRNA, podobnie jak egzogenne siRNA są kierowane do kompleksu efektorowego RISC, w którym w jednakowy sposób pośredniczą w wyciszaniu transkryptu określonego genu [11,17,27,54,69,104].

W komórkach człowieka RISC jest dużym wieloskładnikowym zespołem białek, którego aktywność warunkuje obecność białka Ago-2 należącego do rodziny Argonaut. Wszystkie białka Argonaut zawierają domeny: PAZ, MID i PIWI. Domena PIWI wykazuje wysoki stopień homologii do RNazy H. Pozostałe domeny odgrywają rolę w wiązaniu nici mi/siRNA wchodzącej do kompleksu efektorowego. W aktywnym kompleksie RISC może uczestniczyć tylko jedna z nici siRNA, o wyborze której decyduje stabilność par zasad na końcach duplesków. Nić, której koniec 5' jest mniej stabilny termodynamicznie zostaje związana z białkiem Ago-2 i aktywnie pośredniczy w procesie wyciszania transkryptu docelowego genu, podczas gdy druga nić oddysocjuje od kompleksu [17,37]. Włączona w kompleks RISC pojedyncza nić mi/siRNA pełni funkcję „przewodnika”, dzięki któremu zachodzi identyfikacja komplementarnej sekwencji w obrębie rejonu 3' niepodlegającego translacji – 3' UTR (3' untranslated region) nici mRNA. W przypadku pełnej komplementarności mRNA z nicią mi/siRNA faworyzowane jest bezpośrednie endonukleolityczne cięcie docelowego transkryptu generowane między miejscami sparowania z 10. i 11. nukleotydem mi/siRNA licząc od końca 5'. W wyniku działania endonukleazy powstają dwa fragmenty mRNA, z których każdy jest podatny na trawienie 3'- lub 5'-egzonukleazą. W komórkach zwierzęcych, gdzie niekompletne sparowanie zasad między nicią si/miRNA włączoną do kompleksu RISC a docelowym mRNA jest w zasadzie regułą, dochodzi do zahamowania translacji danego transkryptu bez jego degradacji [17,22,26,27,33,60,69,93,97].

ROLA INTERFERENCJI RNA W DIAGNOZOWANIU I TERAPII NOWOTWORÓW

Dotychczasowe wyniki badań wskazują na odmienny poziom ekspresji miRNA w nowotworach w porównaniu z poziomem ich ekspresji w tkankach prawidłowych (tabela 1).



Ryc. 1. Mechanizm RNA interferencji (opis w tekście)

Zmiany te mogą wynikać z umiejscowienia genów miRNA w tzw. miejscach łamliwych (fra sides), często ulegających amplifikacji, delecji lub translokacji w przebiegu transformacji nowotworowej. Mimo to, w większości przypadków nie są znane mechanizmy prowadzące do zaburzeń syntezy miRNA. Przypuszcza się, że istotny wpływ na te zmiany mają mechanizmy epigenetyczne oraz defekty związane z dojrzewaniem miRNA [75,107].

Obecnie uważa się, że profil ekspresji miRNA w komórkach nowotworowych może być użyteczny w celu diagnozowania, monitorowania oraz odpowiedzi chorego na zastosowany rodzaj terapii [20,57]. Według badań Iorio i wsp. [38] odmienny profil ekspresji zaledwie 15 miRNA pozwolił bezbłędnie odróżnić 76 preparatów nowotworów złośliwych piersi od 10 preparatów prawidłowej tkanki. Ponadto zróżnicowana ekspresja miRNA stanowiła marker ważnych cech histopatologicznych, takich jak zdolność do przerzutowania i angiogenezy oraz stadium nowotworu. Podobne badania oparte na mikromacierzach miRNA przeprowadzili Rosenfeld i wsp. [74], którzy na podstawie 48 różnych sekwencji miRNA przyporządkowali 253 próby do 22 typów nowotworów z trafnością sięgającą 90%. Inna grupa badawcza analizując ekspresję trzech miRNA (miR-21, miR-155 i miR-221) wyróżniła 2 podtypy rozlanego chłoniaka olbrzymiokomórkowego typu B – DLBCL

(diffuse large B cell lymphoma), tj. ABC (activated B cell-like) i GCB (germinal center B cell-like) [47].

Jednymi z najlepiej poznanych miRNA uczestniczących w etiopatogenezie nowotworów człowieka są miR-15 i miR-16. Geny tych miRNA są umiejscowione na chromosomie 13. (13q14) w regionie podlegającym delecji w przebiegu większości przewlekłych białaczek limfocytowych B-komórkowych – B-CLL (B-cell chronic lymphocytic leukemia). Cimmino i wsp [15] wykazali, że miR-15a i miR-16-1 pełnią funkcję negatywnych regulatorów genu *BCL-2*, którego nadekspresja prowadzi do wzrostu oporności limfocytów białaczkowych na apoptozę.

Inne badania sugerują, że let-7 miRNA może kontrolować rozwój nowotworu płuc. Stwierdzono, że spadek ekspresji genu *let-7* korelował ze skróceniem pooperacyjnego czasu przeżycia pacjenta. Doświadczenia przeprowadzone *in vitro* potwierdziły tę obserwację; nadekspresja let-7 miRNA w komórkach linii A549 gruczołakoraków płuc znacznie hamowała proliferację [89]. W celu wyjaśnienia powyższych obserwacji wykazano udział let-7 miRNA w negatywnej regulacji onkogenów *ras* i *myc* – głównych onkogenów w raku płuc [19,41]. Sugeruje się również udział let-7 miRNA w regulacji kinazy LIM należącej do enzymów modulujących kształt i mobilność komórek [98].

Tabela 1. Zmiany ekspresji miRNA w wybranych nowotworach (na podstawie wielu danych literaturowych)

Typ nowotworu	miRNA/ poziom ekspresji w porównaniu z tkanką prawidłową	Regulowane mRNA	Źródło
Rak piersi	mir-21↑ mir-27a↑ mir-17-5q↓ mir-210↓, mir-145↓	BCL-2 ZBTB10 AIB1	[77]
Rak płuc	Let-7↓ mir-17-92↑	RAS, MYC PTEN, RB2	[19,41,89] [36,66]
Przewlekła białaczka limfocytowa (CLL)	mir-15a↓, mir-16-1↓	BCL-2	[9]
Rak brodawkowaty tarczycy	mir-221↑, mir-222↑, mir-186b↑	KIT	[70]
Glejak pierwotny	mir-221↑, mir-128↓, mir-181↓		[14]
Rak trzustki	mir-196a↑, mir-190↑, mir-186↑		[108]
Rak żołądka	mir-15b↑, mir-16↑	BCL-2	[100]
Rak odbytnicy	mir-143↓, mir-145↓		[5]
Rak nerki	mir-210↑ mir-21↑ mir-26a↓ mir-122↑, mir-101↑	BAK1 TPM1 PTEN	[12]

W przeciwieństwie do miRNA let-7 o aktywności supresorowej, ekspresja policistronowego skupiska miR 17-92 znacząco przyspiesza rozwój nowotworu płuc, zwłaszcza najbardziej agresywnej jego postaci, tj. typu drobno-komórkowego. Wzrost ekspresji tych miRNA jest związany z umiejscowieniem ich genów na chromosomie 13. (13Q31), w *locus*, które często podlega amplifikacji, m.in. w chłoniakach B-komórkowych. Badania na mysim modelu chłoniaka wywodzącego się z limfocytów B wykazały, że zwiększona ekspresja miR 17-92 połączona z ekspresją onkogenu *c-myc* pozytywnie koreluje z agresywniejszą progresją guza. Prawdopodobnie skupisko miR 17-92 negatywnie reguluje transkrypcję genów supresorowych PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) i RB2. Zaobserwowano również, że onkogen *c-myc* precyzyjnie kontroluje sygnał do proliferacji poprzez aktywację transkrypcji genu czynnika E2F1 i hamowanie jego translacji [66,106].

Wyniki dotychczasowych eksperymentów zgodnie wskazują na zastosowanie miRNA jako biomarkerów chorób nowotworowych. Odmienny profil ekspresji miRNA pozwala z dużą dokładnością zakwalifikować nowotwór do odpowiedniego podtypu, a także umożliwia badanie nowotworów nisko zróżnicowanych, dla których wynik badania histopatologicznego jest mało precyzyjny [57].

Jeden z wielu celów terapii z wykorzystaniem RNAi stanowią onkogeny. Obecnie szacuje się, że 30% nowotworów człowieka ma mutację punktową w obrębie onkogenów *ras*. Mutacja *K-ras* jest szczególnie istotna w rozwoju ponad 90% przypadków raków trzustki, ponieważ warunkuje pojawienie się kolejnych defektów w genomie komórki [13]. Badania przeprowadzone przez Fleminga i wsp. [29] na dwóch liniach komórkowych raka trzustki (Panc-1 i MiaPace-2) wykazały spadek zdolności do

prolifracji i pojawianie się zmian w białkach cyklu komórkowego po transfekcji swoistymi dla mutacji w *K-ras* siRNA. Odnotowano obniżenie ekspresji białka K-ras, co przekładało się na zahamowanie migracji komórek i rozwój raka trzustki.

Inne podejście terapeutyczne kieruje interferencje RNA w stronę genów pośredniczących w kontroli cyklu komórkowego, którego zaburzenia warunkują immortalizację komórek. Przykładem jest białko Skp-2 (S-phase kinase-associated protein 2), stanowiące podjednostkę kompleksu ligazy ubikwitynowej negatywnie regulującej poziom białka p27^{Kip1} zaangażowanego w kontrolę cyklu komórkowego w punkcie G1/S. Obniżona ekspresja p27^{Kip1} stwierdzona w wielu typach nowotworów ściśle korelowała z agresywnością nowotworu i gorszym rokowaniem. Wyciszenie genu kodującego białko Skp-2 metodą interferencji RNA wpływało na wzrost ekspresji genu p27^{Kip1}, co w rezultacie przyczyniło się do zahamowania rozwoju guza nowotworowego [87].

Obecnie duży problem kliniczny w leczeniu nowotworów stanowi oporność komórek na apoptozę, która uniemożliwia skuteczne zastosowanie leków chemioterapeutycznych. Powszechnie wiadomo, że komórki nowotworowe potrafią omijać proces apoptozy w wyniku wielu mechanizmów angażujących nadekspresję białek antyapoptycznych, na przykład należących do rodziny Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) lub IAP (inhibitor of apoptosis protein) [51]. Według badań Cioca i wsp. [16] spadek ekspresji białek Bcl-2 i Raf-1 w liniach komórkowych białaczki szpikowej po transfekcji interferencyjnymi RNA prowadził do wzrostu spontanicznej apoptozy i uwrażliwienia komórek na chemioterapię daunorubicyną i etoposidem. W innych badaniach siRNA nacelowany na gen białka Bcl-2, obniżając ekspresję tego białka, zwiększał wrażliwość komórek HepG2 na 5-fluorouracyl i 10-hydroksykamptotecynę

[24]. Ponadto interferencja RNA umożliwiła efektywne wyciszenie genu glikoproteiny P odgrywającej rolę w nabywaniu przez komórkę nowotworową oporności wielolekowej. Nadekspresję tego genu obserwuje się w wielu typach nowotworów [101].

INTERFERENCJA RNA W TERAPII CHOROÓB WIRUSOWYCH

Ze względu na brak w pełni skutecznych leków w terapii niektórych chorób wywołanych wirusami, wirusologia pokłada wielkie nadzieje w nowej strategii wyciszenia ekspresji genów.

Obecnie dużym zainteresowaniem cieszą się badania dotyczące wykorzystania interferencji RNA w walce z wirusem HIV-1 (human immunodeficiency virus) człowieka. Wśród zidentyfikowanych sekwencji docelowych znajdują się geny kodujące białka: strukturalne (Gag i Env), regulatorowe (Tat i Rev), pomocnicze (Nef i Vif) oraz odwrotną transkryptazę Pol [58]. Jednak podczas infekcji, materiał genetyczny wirusa HIV (RNA) wnika do cytoplazmy komórek gospodarza w postaci kompleksu nukleoproteinowego utrudniając rozpoznanie sekwencji docelowych przez interferencyjne RNA [48]. Genom HIV-1 cechują ponadto częste mutacje ograniczające sprawne działanie swoistych siRNA. W celu zminimalizowania wpływu tej zmienności na skuteczność terapii sugeruje się jednocześnie ekspresję kilku różnych antywirusowych siRNA (trzech lub czterech) kodowanych w shRNA (short hairpin RNA) [55]. Alternatywne podejście zakłada wykorzystanie interferencyjnych RNA ograniczających ekspresję genów gospodarza niezbędnych w cyklu życiowym wirusa. Wyciszenie ekspresji receptora powierzchniowego CD4 (cluster of differentiation 4) i/lub jednego z koreceptorów CCR5 i CXCR4 (chemokine receptor) znacznie osłabiało wnikanie wirusa do komórek [7,105]. Okazało się, że wirus HIV-1 ma zdolność modulacji mechanizmu RNA interferencji poprzez wpływ na poziom białka TRBP (HIV-1 transactivating response RNA-binding protein), co znacznie utrudnia zahamowanie jego replikacji [56,76].

Komplikacje w potranskrypcyjnym wyciszaniu ekspresji genu, związane z aktywnością mutacyjną, dotyczą również wirusa zapalenia wątroby – HCV (hepatitis C virus). Niemniej jednak pewne sekwencje zlokalizowane w regionie 5' UTR, istotne dla replikacji HCV, wykazują wysoki stopień konserwatywności, co czyni je celem współczesnej terapii z wykorzystaniem interferencji RNA [44,96]. Wykazano, że siRNA skierowane przeciwko sekwencjom IRES (internal ribosome entry site) występujące w obrębie regionu 5'UTR skutecznie hamowały replikację różnych genotypów HCV [72].

Kolejnym celem terapii z wykorzystaniem RNA interferencji stały się wirusy grypy, które chociaż nie stanowią dużego zagrożenia dla życia pacjenta, mają zdolność do tworzenia nowych postaci mutacyjnych, co skłania do ciągłego poszukiwania leków antywirusowych [91,109]. siRNA skierowane przeciwko transkryptowi wysoce konserwatywnego wirusowego genu *M2* długotrwałe hamowało replikację w obrębie podtypów H1N1 i H5N1 wirusa grypy typu A [88].

Inne obiecujące wyniki badań przedstawili Yamato i wsp. [103], którzy stosując swoiste siRNA skierowane przeciwko

onkogenom *E6* i *E7* wirusa brodawczaka człowieka efektywnie zahamowali wzrost linii komórkowych nowotworów szyjki macicy.

INTERFERENCJA RNA W CHOROBYCH NEURODEGENERACYJNYCH

Z powodu braku efektywnej terapii, choroby neurodegeneracyjne są jednym z głównych problemów zdrowotnych starzejącej się populacji krajów zachodnich. Sprzyja to rozwojowi nowych strategii leczenia opartych na specyficznym wyciszeniu ekspresji genu zaangażowanego w przebieg schorzenia [40]. Najbardziej powszechną chorobą neurodegeneracyjną jest choroba Alzheimera charakteryzująca się m.in. tworzeniem toksycznych β -amyloidowych płytek w regionie hipokampa i kory mózgowej. β -amyloid powstaje w wyniku proteolitycznego cięcia swoistego białkowego prekursora przez sekretazy typu β i γ . W neuronach β -sekretraza, zwana także białkiem BACE1 (B-site APP cleaving enzyme 1), jest atrakcyjnym celem terapeutycznym interferencyjnych RNA [67]. Badania przeprowadzone na modelu mysiej amyloidozy zgodnie potwierdziły, że zahamowanie ekspresji białka BACE1 redukuje neurodegeneracyjne i behawioralne defekty, co potwierdza potencjalne zastosowanie interferencji RNA w terapii choroby Alzheimera [23].

W przypadku chorób neurodegeneracyjnych o podłożu genetycznym, które dziedziczą w sposób autosomalny dominujący terapia z udziałem interferencyjnych RNA polega na wyciszeniu ekspresji zmutowanego allelu [31]. Strategii tej podlegają m.in. choroby neurodegeneracyjne spowodowane ekspansją powtórzeń CAG w obrębie odpowiedniego genu, kodujących rozciągnięty ciąg reszt glutaminy w białku – polyQ [8]. Eksperymenty przeprowadzone na modelu ataksji mózdkowo-rdzeniowej typu 1 u myszy - *SCA1* (spinocerebellar ataxia 1) (należącej również do chorób polyQ) wykazały, że shRNA skierowane przeciwko genowi *SCA1* kodującego ataksynę 1 skutecznie przywracało sprawność motoryczną oraz redukowało patologiczne inkluzje w komórkach Purkiniego [40,42]. Wyciszenie ekspresji zmutowanego allelu dotyczy również innych jednostek chorobowych nienależących do grupy polyQ, na przykład sklerozy lateralnej miotroficznej [71].

WPROWADZANIE siRNA DO KOMÓRKI *IN VIVO* I *IN VITRO*

Od kiedy interferencja RNA stała się potencjalnie efektywnym narzędziem zarówno w terapii chorób, jak i w badaniu funkcji genów, poszukuje się różnorodnych systemów jej zastosowania *in vivo* i *in vitro*. Powinny one działać nie tylko specyficznym w stosunku do danej tkanki czy typu komórek, ale także wykluczać aktywację odpowiedzi immunologicznej.

WEKTORY WIRUSOWE

Spośród dużej liczby systemów wirusowych, w przypadku RNAi na uwagę zasługują: retrowirusy łącznie z lentiwirusami, adenowirusy, parwowirus związany z adenowirusem - AAV (adeno-associated virus) oraz wirus opryszczki typu pierwszego. Genom retrowirusów stanowi jednocięty RNA, który po infekcji podlega reakcji odwrotnej transkrypcji i integracji z genomem gospodarza. Warunkiem retrowirusowej integracji i ekspresji wirusowego DNA jest

podział komórki. To ograniczenie wydaje się bardzo korzystne w odniesieniu do szybko dzielących się komórek nowotworowych, które mogą być efektywnie transdukowane. Jednakże retrowirusy są inaktywowane w surowicy przez białko c1 dopełniacza. Trudności te mogą być pokonane przez opracowanie wektorów retrowirusowych odpornych na działanie dopełniacza, co może być sposobem do bardziej efektywnego wprowadzenia shRNA [45]. Immunogenność i cytotoksyczność towarzyszą także wektorom lentiwirusowym oraz wirusowi opryszczki typu I [90]. Niektóre parwowirusy, tzn. parwowirusy związane z adenowirusami nie wywołują odpowiedzi układu immunologicznego. Mimo to, utrzymanie wysokiego miana AAV w hodowli *in vitro* jest bardzo problematyczne [21,90]. Najlepszymi wektorami pozwalającymi na stabilną ekspresję interferencyjnych RNA w komórkach docelowych są lentiwirusy, ponieważ w odróżnieniu od retrowirusów wykazują tendencję do integracji z genomem gospodarza w miejscu odległym od promotorów, w obszarze intronów, co potencjalnie ogranicza ich onkogenność [62]. Konstrukcja uniwersalnego wektora wirusowego jest bardzo trudna. Chociaż wektory wirusowe wyróżniają się dużą efektywnością, ich kliniczne zastosowanie jest utrudnione z powodu aktywacji odpowiedzi immunologicznej oraz zmiany ekspresji genów wskutek losowej integracji z genomem gospodarza. Poszukuje się zatem innych niewirusowych nośników [2].

WEKTORY NIEWIRUSOWE

Nagie dupleksy siRNA to makromolekuły o masie cząsteczkowej około 13 kDa i polianionowej naturze. Badania na myszach dowiodły, że dożylnie wprowadzenie nagich siRNA powodowało ich akumulację, a następnie degradację w narządach z rozwiniętym układem siateczkowo-śródbłonkowym, takich jak wątroba, płuca, śledziona, nerki [4]. Co więcej, nagie siRNA wprowadzone do organizmu przez podanie ogólnoustrojowe zachowują się jak typowe makromolekuły o masie cząsteczkowej poniżej 50 kDa, a więc podlegają filtracji przez kłębuszki nerkowe i są wydalane z moczem. Prowadzi to do obniżenia biologicznego okresu półtrwania terapeutycznych interferujących RNA [43]. W związku z powyższym obecnie duży nacisk kładzie się na projektowanie wektorów niewirusowych umożliwiających poprawę ich właściwości farmakokinetycznych i biodystrybucji w organizmie [64]. W przypadku RNAi do najczęściej stosowanych nośników należą kationowe polimery i liposomy. Główna zasada generowania wektorów niewirusowych polega na tworzeniu kompleksów siRNA z komponentami o ładunku dodatnim. Pozwala to uniknąć wydalania przez nerki (ze względu na masę molekularną) całego kompleksu oraz poprawia przenikanie do komórek poprzez elektrostatyczne oddziaływanie siatki dodatnich ładunków z ujemnie naładowaną błoną komórkową [3]. Jednakże wysoki pozytywny ładunek nośników może prowadzić do opsonizacji białkami osocza, takimi jak: IgM, IgG, fibronektyna lub komplement C3, co powoduje ich degradację przez układ fagocytów jednojądrzastych w wątrobie, śledzionie i płucach [92]. Dlatego w celu wyeliminowania niepożądanych oddziaływań systemów dostarczania leków ze składnikami krwi stosuje się opłaszczanie nośników hydrofilowymi polimerami, których celem jest maskowanie siatki powierzchniowych ładunków. Jednym z najczęściej stosowanych polimerów o takiej funkcji jest glikol polietylenowy – PEG (polyethylene glycol) [65]. Kationowe lipidy

stabilizowane przez PEG określane jako SNALPs (solid nucleic acid lipid particles) skutecznie zastosowano do dostarczania siRNA w celu wyciszenia genu apolipoproteiny B – *apoB* u myszy i naczelnych. Pojedyncza dawka 2,5 mg/kg siRNA zamknięta w SNALPs zredukowała ekspresję genu *apoB* w wątrobie małego gatunku *Cynomolgus* o ponad 90%. To z kolei prowadziło do obniżenia stężeń apolipoproteiny B, cholesterolu i lipoprotein o małej gęstości – LDL (low density lipoprotein) przy czym efekt ten utrzymywał się przez 11 dni od chwili wprowadzenia do organizmu interferujących RNA [110]. Niestety, zastosowanie PEG w dostarczaniu leków często koreluje ze znaczącym spadkiem wnikania kompleksów do komórek. Spowodowało to rozwój nowych strategii w projektowaniu nośników opartych na wykorzystaniu ligandów, dzięki którym wektory mogą się przyłączać do swoistych typów komórek prezentujących na swojej powierzchni odpowiedni receptor. Pozwala to zmniejszyć dawkę terapeutyczną i uniknąć nieswoistego wyciszenia ekspresji genów w innych tkankach niż docelowe. Wśród obecnie stosowanych ligandów można wyróżnić związki niskocząsteczkowe (np.: galaktoza, LDL) oraz peptydy i białka (np.: transferyna, fragmenty przeciwciał) [53,95]. Po raz pierwszy koniugaty z przeciwciałami zostały wykorzystane w badaniach Songa i wsp. [86], którzy wykazali, że związanie fragmentów przeciwciał Fab (fragment antigen binding) i scFv (single-chain variable fragment) z protaminą i utworzenie białka fuzyjnego pozwala na specyficzne wprowadzenie w systemie *in vivo* anty-HIV siRNA do słabo transfekowalnych komórek T o immunofenotypie CD4⁺.

Dystrybucja systemów dostarczania dupleksów siRNA z krwioobiegu do narządów polega głównie na wykorzystaniu zwiększonej przepuszczalności naczyńkowej i zatrzymaniu cząsteczek w tkance – EPR (enhanced vascular permeability and retention), co jest charakterystyczne dla chorób o podłożu zapalnym oraz chorób nowotworowych [61,64]. W celu zwiększenia efektywności pobierania kompleksów z siRNA przez komórkę, głównie w procesie endocytozy i makropinocytozy, istotne znaczenie ma średnica stosowanych kompleksów. W przypadku internalizacji nanosystemów do komórek guza nowotworowego preferowany rozmiar cząsteczek powinien być możliwie mały o średnicy nieprzekraczającej 100 nm [73].

Wewnątrzkomórkowo, podstawowym warunkiem umożliwiającym włączenie transfekowanego siRNA do cytoplazmatycznego kompleksu RISC jest rozpad nośnika oraz opuszczenie endosomu przez siRNA. Proces ten może zachodzić z udziałem różnych mechanizmów zależnych od typu nośnika [30]. Na przykład, polimery kationowe, takie jak PEI (polyethylene imine) buforują niskie pH endosomów przez zwiększenie napływu protonów i wody, co prowadzi do osmotycznego pęcznienia, a następnie pęknięcia endosomów i uwolnienia kompleksów z siRNA do cytoplazmy [32]. W odróżnieniu od polipleksów, lipopleksy podlegają innemu mechanizmowi, którego podstawę stanowi destabilizacja błony endosomu oparta na ruchach „flip-flop”. Powoduje to rozpad kompleksu i uwolnienie siRNA do cytoplazmy [34,102]. Ponadto osiągnięcie dobrych właściwości fuzogennych lipopleksów umożliwiające pH wrażliwe, fuzogenne lipidy pomocnicze, których podstawową funkcją jest promowanie tworzenia odwróconej fazy heksagonalnej (H IIb) [68,80,94,111].

NIEPOŻĄDANE DZIAŁANIE INTERFERENCYJNYCH RNA W KOMÓRCIE

Poza selektywnym wyciszaniem specyficznych genów, siRNA może aktywować szlaki sygnalizacji z udziałem kinazy białkowej zależnej od dwuniciowych RNA – PKR (double-stranded RNA-dependent protein kinase) oraz receptorów Toll-like – TLR (Toll-like receptor) [2].

W większości komórek człowieka kinaza PKR pozostaje nieaktywna. Jednak po stymulacji dwuniciowym RNA dochodzi do homodimeryzacji i pełnej aktywacji PKR w wyniku autofosforylacji licznych reszt seryny i treoniny oraz fosforylacji wielu substratów łącznie z podjednostką α czynnika inicjującego translację eIF-2 α . W rezultacie następuje całkowite zahamowanie syntezy białek i śmierć komórki. Kinaza PKR może fosforylować inhibitor kinazy NF- κ B – IKK- β (inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta) aktywując w ten sposób szlak sygnalizacji NF- κ B [84,85].

Indukcja wrodzonej odpowiedzi immunologicznej może zachodzić w wyniku kaskady przekazywania sygnału aktywowanej przez receptory Toll-like ulegające głównie ekspresji na powierzchni komórki. U człowieka zidentyfikowano jednocześnie receptory Toll-like, z których cztery: TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 przemieszczają się do wnętrza komórki, do endosomów. Aktywacja odpowiedzi immunologicznej wywołana transfekcją cząsteczek siRNA w wektorze niewirusowym zachodzi przeważnie z udziałem TLR7 i TLR8 [81]. Pewne sekwencje siRNA stymulują monocyty poprzez TLR8 do wytwarzania prozapalnych cytokin, podczas gdy komórki dendrytyczne poprzez TLR7 – do uwalniania znacznej ilości interferonu α . Przeprowadzone badania ujawniły, że za efekty immunostymulacyjne odpowiadają reszty urydyny występujące w sekwencji cząsteczek siRNA [82,83]. W związku z powyższym obecnie dużo uwagi poświęca się modyfikacjom chemicznym

cząsteczek siRNA, które głównie dotyczą substytucji grupy hydroksylowej przy drugim atomie węgla pierścienia rybozy nukleozydów [6,59]. Potwierdzono eksperymentalnie, że cząsteczki siRNA z modyfikacją urydyn w tej pozycji mogą z różnym powinowactwem wiązać się z receptorami Toll-like, lecz nie powodują dalszej sygnalizacji [10,83,84]. Pozostałe modyfikacje dotyczą grup fosfodiestrowych siRNA, rzadziej zasad azotowych [18].

Powszechnie wiadomo, że interferencja RNA toleruje pewne niedopasowanie pomiędzy cząsteczkami siRNA, a docelowym mRNA, co może prowadzić do potranskrypcyjnego wyciszenia ekspresji innych genów niż zakładane [39,52]. Okazało się, że sparowanie zaledwie jedenastu kolejnych nukleotydów cząsteczki siRNA z cząsteczką mRNA jest wystarczające do skutecznego wyciszenia transkryptu. Doprowadziło to do rozwoju wielu metod prognozowania efektywności działania siRNA, które opierają się na charakterystyce ich sekwencji oraz struktury drugorzędowej docelowego mRNA i są określane z zastosowaniem algorytmów [50].

Niemniej w analizie z zastosowaniem mikromacierzy wykazano, że systemy dostarczania siRNA mogą zmieniać ekspresję genów traktowanych komórek, co ogranicza zastosowanie tej metody w terapii *in vivo* [43].

PODSUMOWANIE

Odkrycie naturalnego, specyficznego zjawiska interferencji RNA miało istotny wpływ na rozwój badań klinicznych. Obszerne dowody potwierdzają udział cząsteczek miRNA w regulacji procesów patologicznych, w tym chorób nowotworowych. Proces interferencji RNA ma duży potencjał terapeutyczny zarówno w diagnostyce, jak i terapii celowanej. Niemniej skuteczne wykorzystanie możliwości tego procesu w przyszłości zależy głównie od postępu w dziedzinie systemów dostarczania leków.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Agrawal N., Dasaradhi P.V., Mohmmmed A., Malhotra P., Bhatnagar R.K., Mukherjee S.K.: RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2003; 67: 657–685
- [2] Aigner A.: Delivery systems for the direct application of siRNAs to induce RNA interference (RNAi) *in vivo*. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2006; 2006: 71659
- [3] Akhtar S., Benter I.: Toxicogenomics of non-viral drug delivery systems for RNAi: potential impact on siRNA-mediated gene silencing activity and specificity. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2007; 59: 164–182
- [4] Akhtar S., Benter I.F.: Nonviral delivery of synthetic siRNAs *in vivo*. *J. Clin. Invest.*, 2007; 117: 3623–3632
- [5] Arndt G.M., Dossey L., Cullen L.M., Lai A., Druker R., Eisbacher M., Zhang C., Tran N., Fan H., Retzlaff K., Bittner A., Raponi M.: Characterization of global microRNA expression reveals oncogenic potential of miR-145 in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*, 2009; 9: 374
- [6] Behlke M.A.: Chemical modification of siRNAs for *in vivo* use. *Oligonucleotides*, 2008; 18: 305–319
- [7] Bennasser Y., Yeung M.L., Jeang K.T.: RNAi therapy for HIV infection: principles and practicalities. *BioDrugs*, 2007; 21: 17–22
- [8] Bonini N.M., La Spada A.R.: Silencing polyglutamine degeneration with RNAi. *Neuron*, 2005; 48: 715–718
- [9] Calin G.A., Ferracin M., Cimmino A., Di Leva G., Shimizu M., Wojcik S.E., Iorio M.V., Visone R., Sever N.I., Fabbri M., Iuliano R., Palumbo T., Pichiiorri F., Roldo C., Garzon R., Sevignani C., Rassenti L., Alder H., Volinia S., Liu C.G., Kipps T.J., Negrini M., Croce C.M.: A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2005; 353: 1793–1801
- [10] Cekaite L., Furset G., Hovig E., Sioud M.: Gene expression analysis in blood cells in response to unmodified and 2'-modified siRNAs reveals TLR-dependent and independent effects. *J. Mol. Biol.*, 2007; 365: 90–108
- [11] Chan S.P., Slack F.J.: And now introducing mammalian mirtrons. *Dev. Cell*, 2007; 13: 605–607
- [12] Chow T.F., Youssef Y.M., Lianidou E., Romaschin A.D., Honey R.J., Stewart R., Pace K.T., Yusef G.M.: Differential expression profiling of microRNAs and their potential involvement in renal cell carcinoma pathogenesis. *Clin. Biochem.*, 2010; 43: 150–158
- [13] Chromik I.: Zastosowanie interferencji RNA (RNAi) w raku trzustki - nowa strategia leczenia. *Gastroenterologia Polska*, 2008; 15: 337–342
- [14] Ciafre S.A., Galardi S., Mangiola A., Ferracin M., Liu C.G., Sabatino G., Negrini M., Maira G., Croce C.M., Farace M.G.: Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 334: 1351–1358
- [15] Cimmino A., Calin G.A., Fabbri M., Iorio M.V., Ferracin M., Shimizu M., Wojcik S.E., Aqeilan R.I., Zupo S., Dono M., Rassenti L., Alder H., Volinia S., Liu C.G., Kipps T.J., Negrini M., Croce C.M.: miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 13944–13949
- [16] Cioca D.P., Aoki Y., Kiyosawa K.: RNA interference is a functional pathway with therapeutic potential in human myeloid leukemia cell lines. *Cancer Gene Ther.*, 2003; 10: 125–133
- [17] Collins R.E., Cheng X.: Structural and biochemical advances in mammalian RNAi. *J. Cell. Biochem.*, 2006; 99: 1251–1266
- [18] Corey D.R.: Chemical modification: the key to clinical application of RNA interference? *J. Clin. Invest.*, 2007; 117: 3615–3622

- [19] Dalmay T.: MicroRNAs and cancer. *J. Intern. Med.*, 2008; 263: 366–375
- [20] Drakaki A., Iliopoulos D.: MicroRNA gene networks in oncogenesis. *Curr. Genomics*, 2009; 10: 35–41
- [21] Duniec K.: Wirusowe nośniki genów w neurobiologii. Konferencja “Nowe metody w neurobiologii”, 2004; 13–17
- [22] Eulalio A., Huntzinger E., Izaurralde E.: Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell*, 2008; 132: 9–14
- [23] Farah M.H.: RNAi silencing in mouse models of neurodegenerative diseases. *Curr. Drug Deliv.*, 2007; 4: 161–167
- [24] Feng L.F., Zhong M., Lei X.Y., Zhu B.Y., Tang S.S., Liao D.F.: Bcl-2 siRNA induced apoptosis and increased sensitivity to 5-fluorouracil and HCPT in HepG2 cells. *J. Drug Target.*, 2006; 14: 21–26
- [25] Filip A.: Mikro-RNA – małe cząsteczki o wielkim znaczeniu. *Postepy Biol. Kom.*, 2006; 33: 45–58
- [26] Filip A.: MikroRNA: nowe mechanizmy regulacji ekspresji genów. *Postepy Biochem.*, 2007; 53: 413–419
- [27] Filipowicz W., Jaskiewicz L., Kolb F.A., Pillai R.S.: Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2005; 15: 331–341
- [28] Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C.: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998; 391: 806–811
- [29] Fleming J.B., Shen G.L., Holloway S.E., Davis M., Brekken R.A.: Molecular consequences of silencing mutant K-ras in pancreatic cancer cells: justification for K-ras-directed therapy. *Mol. Cancer Res.*, 2005; 3: 413–423
- [30] Gary D.J., Puri N., Won Y.Y.: Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. *J. Control. Release*, 2007; 121: 64–73
- [31] Gonzalez-Alegre P.: Therapeutic RNA interference for neurodegenerative diseases: from promise to progress. *Pharmacol. Ther.*, 2007; 114: 34–55
- [32] Grabe M., Oster G.: Regulation of organelle acidity. *J. Gen. Physiol.*, 2001; 117: 329–344
- [33] Gregory R.I., Chendrimada T.P., Cooch N., Shiekhattar R.: Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 2005; 123: 631–640
- [34] Hafez I.M., Maurer N., Cullis P.R.: On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. *Gene Ther.*, 2001; 8: 1188–1196
- [35] Hammond S.M.: Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett.*, 2005; 579: 5822–5829
- [36] Hayashita Y., Osada H., Tatematsu Y., Yamada H., Yanagisawa K., Tomida S., Yabate Y., Kawahara K., Sekido Y., Takahashi T.: A polycistronic microRNA cluster, *miR-17-92*, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.*, 2005; 65: 9628–9632
- [37] Höck J., Meister G.: The Argonaute protein family. *Genome Biol.*, 2008; 9: 210
- [38] Iorio M.V., Ferracin M., Liu C.G., Veronese A., Spizzo R., Sabbioni S., Magri E., Pedriali M., Fabbri M., Campiglio M., Ménard S., Palazzo J.P., Rosenberg A., Musiani P., Volinia S., Nenci I., Calin G.A., Querzoli P., Negrini M., Croce C.M.: MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.*, 2005; 65: 7065–7070
- [39] Jackson A.L., Burchard J., Schelter J., Chau B.N., Cleary M., Lim L., Linsley P.S.: Widespread siRNA “off-target” transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA*, 2006; 12: 1179–1187
- [40] Jagannath A., Wood M.: RNA interference based gene therapy for neurological disease. *Brief Funct. Genomic. Proteomic.*, 2007; 6: 40–49
- [41] Johnson S.M., Grosshans H., Shingara J., Byrom M., Jarvis R., Cheng A., Labourier E., Reinert K.L., Brown D., Slack F.J.: *RAS* is regulated by the *let-7* microRNA family. *Cell*, 2005; 120: 635–647
- [42] Kang S., Hong S.: Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 1 disease. *Mol. Cells*, 2009; 27: 621–627
- [43] Kawakami S., Hashida M.: Targeted delivery systems of small interfering RNA by systemic administration. *Drug Metab. Pharmacokin.*, 2007; 22: 142–151
- [44] Khaliq S., Khaliq S.A., Zahur M., Ijaz B., Jahan S., Ansar M., Riazuddin S., Hassan S.: RNAi as a new therapeutic strategy against HCV. *Biotechnol. Adv.*, 2010; 28: 27–34
- [45] Kumar L.D., Clarke A.R.: Gene manipulation through the use of small interfering RNA (siRNA): from *in vitro* to *in vivo* applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2007; 59: 87–100
- [46] Laraki G., Clerzius G., Daher A., Melendez-Peña C., Daniels S., Gatignol A.: Interactions between the double-stranded RNA-binding proteins TRBP and PACT define the Medial domain that mediates protein-protein interactions. *RNA Biol.*, 2008; 5: 92–103
- [47] Lawrie C.H., Soneji S., Marafioti T., Cooper C.D., Palazzo S., Paterson J.C., Cattani H., Enver T., Mager R., Boulwood J., Wainscoat J.S., Hatton C.S.: MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *Int. J. Cancer*, 2007; 121: 1156–1161
- [48] Lee N.S., Rossi J.J.: Control of HIV-1 replication by RNA interference. *Virus Res.*, 2004; 102: 53–58
- [49] Lee Y., Hur I., Park S.Y., Kim Y.K., Suh M.R., Kim V.N.: The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.*, 2006; 25: 522–532
- [50] Li W., Cha L.: Predicting siRNA efficiency. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2007; 64: 1785–1792
- [51] Lima R.T., Martins L.M., Guimarães J.E., Sambade C., Vasconcelos M.H.: Specific downregulation of bcl-2 and XIAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Gene Ther.*, 2004; 11: 309–316
- [52] Lin X., Ruan X., Anderson M.G., McDowell J.A., Kroeger P.E., Fesik S.W., Shen Y.: siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Res.*, 2005; 33: 4527–4535
- [53] Liu B.: Exploring cell type-specific internalizing antibodies for targeted delivery of siRNA. *Brief Funct. Genomic. Proteomic.*, 2007; 6: 112–119
- [54] Liu X., Fortin K., Mourelatos Z.: MicroRNAs: biogenesis and molecular functions. *Brain Pathol.*, 2008; 18: 113–121
- [55] Liu Y.P., von Eije K.J., Schopman N.C., Westerink J.T., ter Brake O., Haasnoot J., Berkhout B.: Combinatorial RNAi against HIV-1 using extended short hairpin RNAs. *Mol. Ther.*, 2009; 17: 1712–1723
- [56] Ludwig L.B.: RNA silencing and HIV: a hypothesis for the etiology of the severe combined immunodeficiency induced by the virus. *Retrovirology*, 2008; 5: 79
- [57] Lynam-Lennon N., Maher S.G., Reynolds J.V.: The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 2009; 84: 55–71
- [58] Ma Y., Chan C.Y., He M.L.: RNA interference and antiviral therapy. *World J. Gastroenterol.*, 2007; 13: 5169–5179
- [59] Manoharan M.: RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2004; 8: 570–579
- [60] Meister G.: miRNAs get an early start on translational silencing. *Cell*, 2007; 131: 25–28
- [61] Morille M., Passirani C., Vonarbourg A., Clavreul A., Benoit J.P.: Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials*, 2008; 29: 3477–3496
- [62] Morris K.V., Rossi J.J.: Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy. *Gene Ther.*, 2006; 13: 553–558
- [63] Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R.: Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 1990; 2: 279–289
- [64] Nevozhay D., Kańska U., Budzyńska R., Boratyński J.: Współczesny stan badań nad koniugatami i innymi systemami dostarczania leków w leczeniu schorzeń nowotworowych i innych jednostek chorobowych. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2007; 61: 350–360
- [65] Nimesh S., Goyal A., Pawar V., Jayaraman S., Kumar P., Chandra R., Singh Y., Gupta K.C.: Polyethyleneimine nanoparticles as efficient transfecting agents for mammalian cells. *J. Control. Release*, 2006; 110: 457–468
- [66] O’Donnell K.A., Wentzel E.A., Zeller K.I., Dang C.V., Mendell J.T.: c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 2005; 435: 839–843
- [67] Orlicchio A., Bernardi G., Orlicchio A., Martino S.: RNA interference as a tool for Alzheimer’s disease therapy. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2007; 7: 1166–1176
- [68] Ortiz A., Killian J.A., Verkleij A.J., Wilschut J.: Membrane fusion and the lamellar-to-inverted-hexagonal phase transition in cardiolipin vesicle systems induced by divalent cations. *Biophys. J.*, 1999; 77: 2003–2014
- [69] Ouellet D.L., Perron M.P., Gobeil L.A., Plante P., Provost P.: MicroRNAs in gene regulation: when the smallest governs it all. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2006; 2006: 69616
- [70] Pallante P., Visone R., Ferracin M., Ferraro A., Berlingieri M.T., Troncone G., Chiappetta G., Liu C.G., Santoro M., Negrini M., Croce C.M., Fusco A.: MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr. Relat. Cancer*, 2006; 13: 497–508

- [71] Raoul C., Barker S.D., Aebischer P.: Viral-based modelling and correction of neurodegenerative diseases by RNA interference. *Gene Ther.*, 2006; 13: 487–495
- [72] Ray R.B., Kanda T.: Inhibition of HCV replication by small interfering RNA. *Methods Mol. Biol.*, 2009; 510: 251–262
- [73] Reischl D., Zimmer A.: Drug delivery of siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems. *Nanomedicine*, 2009; 5: 8–20
- [74] Rosenfeld N., Aharonov R., Meiri E., Rosenwald S., Spector Y., Zepeniuk M., Benjamin H., Shabes N., Tabak S., Levy A., Lebanony D., Goren Y., Silberschein E., Targan N., Ben-Ari A., Gilad S., Sion-Vardy N., Tobar A., Feinmesser M., Kharenko O., Nativ O., Nass D., Perelman M., Yosepovich A., Shalmon B., Polak-Charcon S., Fridman E., Avniel A., Bentwich I., Bentwich Z., Cohen D., Chajut A., Barshack I.: MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat. Biotechnol.*, 2008; 26: 462–469
- [75] Rouhi A., Mager D.L., Humphries R.K., Kuchenbauer F.: MiRNAs, epigenetics, and cancer. *Mamm. Genome*, 2008; 19: 517–525
- [76] Scherer L., Rossi J.J., Weinberg M.S.: Progress and prospects: RNA-based therapies for treatment of HIV infection. *Gene Ther.*, 2007; 14: 1057–1064
- [77] Shi M., Guo N.: MicroRNA expression and its implications for the diagnosis and therapeutic strategies of breast cancer. *Cancer Treat. Rev.*, 2009; 35: 328–334
- [78] Shrey K., Suchit A., Nishant M., Vibha R.: RNA interference: emerging diagnostics and therapeutics tool. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009; 386: 273–277
- [79] Shrivastava N., Srivastava A.: RNA interference: an emerging generation of biologicals. *Biotechnol. J.*, 2008; 3: 339–353
- [80] Simões S., Moreira J.N., Fonseca C., Düzgünes N., de Lima M.C.: On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2004; 56: 947–965
- [81] Sioud M.: Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J. Mol. Biol.*, 2005; 348: 1079–1090
- [82] Sioud M.: Innate sensing of self and non-self RNAs by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.*, 2006; 12: 167–176
- [83] Sioud M.: RNA interference and innate immunity. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2007; 59: 153–163
- [84] Sioud M., Furset G., Cekaite L.: Suppression of immunostimulatory siRNA-driven innate immune activation by 2'-modified RNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007; 361: 122–126
- [85] Sledz C.A., Williams B.R.: RNA interference and double-stranded-RNA-activated pathways. *Biochem. Soc. Trans.*, 2004; 32: 952–956
- [86] Song E., Zhu P., Lee S.K., Chowdhury D., Kussman S., Dyckhoorn D.M., Feng Y., Palliser D., Weiner D.B., Shankar P., Marasco W.A., Lieberman J.: Antibody mediated *in vivo* delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat. Biotechnol.*, 2005; 23: 709–717
- [87] Sumimoto H., Yamagata S., Shimizu A., Miyoshi H., Mizuguchi H., Hayakawa T., Miyagishi M., Taira K., Kawakami Y.: Gene therapy for human small-cell lung carcinoma by inactivation of Skp-2 with virally mediated RNA interference. *Gene Ther.*, 2005; 12: 95–100
- [88] Sui H.Y., Zhao G.Y., Huang J.D., Jin D.Y., Yuen K.Y., Zheng B.J.: Small interfering RNA targeting M2 gene induces effective and long term inhibition of influenza A virus replication. *PLoS One*, 2009; 4: e5671
- [89] Takamizawa J., Konishi H., Yanagisawa K., Tomida S., Osada H., Endoh H., Harano T., Yatabe Y., Nagino M., Nimura Y., Mitsudomi T., Takahashi T.: Reduced expression of the *let-7* microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.*, 2004; 64: 3753–3756
- [90] Tomar R.S., Matta H., Chaudhary P.M.: Use of adeno-associated viral vector for delivery of small interfering RNA. *Oncogene*, 2003; 22: 5712–5715
- [91] Tompkins S.M., Lo C.Y., Tumpey T.M., Epstein S.L.: Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 8682–8686
- [92] Tseng Y.C., Mozumdar S., Huang L.: Lipid-based systemic delivery of siRNA. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009; 61: 721–731
- [93] Valencia-Sanchez M.A., Liu J., Hannon G.J., Parker R.: Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.*, 2006; 20: 515–524
- [94] Wang X.L., Ramusovic S., Nguyen T., Lu Z.R.: Novel polymerizable surfactants with pH-sensitive amphiphilicity and cell membrane disruption for efficient siRNA delivery. *Bioconjug. Chem.*, 2007; 18: 2169–2177
- [95] Wang X.L., Xu R., Lu Z.R.: A peptide-targeted delivery system with pH-sensitive amphiphilic cell membrane disruption for efficient receptor-mediated siRNA delivery. *J. Control. Release*, 2009; 134: 207–213
- [96] Watanabe T., Umehara T., Kohara M.: Therapeutic application of RNA interference for hepatitis C virus. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2007; 59: 1263–1276
- [97] Wu L., Belasco J.G.: Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell*, 2008; 29: 1–7
- [98] Wu W., Sun M., Zou G.M., Chen J.: MicroRNA and cancer: current status and prospective. *Int. J. Cancer*, 2007; 120: 953–960
- [99] Wyszko E., Szaflarski W., Barciszewski J.: Interferencyjny RNA – molekularny regulator ekspresji genu. *Postepy Biochem.*, 2003; 49: 2–8
- [100] Xia L., Zhang D., Du R., Pan Y., Zhao L., Sun S., Hong L., Liu J., Fan D.: miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells. *Int. J. Cancer*, 2008; 123: 372–379
- [101] Xiao H., Wu Z., Shen H., Luo A.L., Yang Y.F., Li X.B., Zhu D.Y.: *In vivo* reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by efficient delivery of stealth RNAi. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 2008; 103: 342–348
- [102] Xu Y., Szoka F.C. Jr.: Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry*, 1996; 35: 5616–5623
- [103] Yamato K., Yamada T., Kizaki M., Ui-Tei K., Natori Y., Fujino M., Nishihara T., Ikeda Y., Nasu Y., Saigo K., Yoshinouchi M.: New highly potent and specific E6 and E7 siRNAs for treatment of HPV16 positive cervical cancer. *Cancer Gene Ther.*, 2008; 15: 140–153
- [104] Yeom K.H., Lee Y., Han J., Suh M.R., Kim V.N.: Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res.*, 2006; 34: 4622–4629
- [105] Yeung M.L., Bennasser Y., Le S.Y., Jeang K.T.: siRNA, miRNA and HIV: promises and challenges. *Cell Res.*, 2005; 15: 935–946
- [106] Zhang B., Pan X., Cobb G.P., Anderson T.A.: microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev. Biol.*, 2007; 302: 1–12
- [107] Zhang L., Volinia S., Bonome T., Calin G.A., Greshock J., Yang N., Liu C.G., Giannakakis A., Alexiou P., Hasegawa K., Johnstone C.N., Megraw M.S., Adams S., Lassus H., Huang J., Kaur S., Liang S., Sethupathy P., Lemin A., Simossis V.A., Sandaltzopoulos R., Naomoto Y., Katsaros D., Gimotty P.A., DeMichele A., Huang Q., Bützow R., Rustgi A.K., Weber B.L., Birrer M.J., Hatzigeorgiou A.G., Croce C.M., Coukos G.: Genomic and epigenetic alterations deregulate microRNA expression in human epithelial ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 7004–7009
- [108] Zhang Y., Li M., Wang H., Fisher W.E., Lin P.H., Yao Q., Chen C.: Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis. *World J. Surg.*, 2009; 33: 698–709
- [109] Zhou K., He H., Wu Y., Duan M.: RNA interference of avian influenza virus H5N1 by inhibiting viral mRNA with siRNA expression plasmids. *J. Biotechnol.*, 2008; 135: 140–144
- [110] Zimmermann T.S., Lee A.C., Akinc A., Brاملage B., Bumcrot D., Fedoruk M.N., Harborth J., Heyes J.A., Jeffs L.B., John M., Judge A.D., Lam K., McClintock K., Nechev L.V., Palmer L.R., Racie T., Röhl I., Seiffert S., Shanmugam S., Sood V., Soutschek J., Toudjarska I., Wheat A.J., Yaworski E., Zedalis W., Koteliensky V., Manoharan M., Vormlocher H.P., MacLachlan I.: RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, 2006; 441: 111–114
- [111] Zuhorn I.S., Bakowsky U., Polushkin E., Visser W.H., Stuart M.C., Engberts J.B., Hoekstra D.: Nonbilayer phase of lipoplex-membrane mixture determines endosomal escape of genetic cargo and transfection efficiency. *Mol. Ther.*, 2005; 11: 801–810

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.