

## INTERFERENCJA RNA – MECHANIZM I MOŻLIWOŚCI TERAPEUTYCZNEGO WYKORZYSTANIA

### RNA INTERFERENCE – MECHANISM AND THERAPEUTIC POSSIBILITIES

**Anna Piotrowska<sup>1</sup>, Agnieszka Rybarczyk<sup>1</sup>, Piotr Wierzbicki<sup>1</sup>,  
Marzena Kotwas<sup>1</sup>, Agata Wrońska<sup>1</sup>, Zbigniew Kmiec<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Zakład Histologii,

Gdański Uniwersytet Medyczny

<sup>2</sup> Katedra Histologii i Embriologii Człowieka,

Wydział Nauk Medycznych, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

#### STRESZCZENIE

**Wstęp.** Prace prowadzone w latach 90. XX wieku nad *Petunia hybrida* umożliwiły odkrycie nowego mechanizmu regulacji ekspresji genów, jednak nie wyjaśniono, w jaki sposób dochodzi do obniżenia poziomu ekspresji genów na etapie posttranskrypcyjnym. Dzięki późniejszym badaniom zespołów Andrew Fire i Craig Mello nad nicieniem *Caenorhabditis elegans*, poznany został mechanizm interferencji RNA. Odkrycie to otworzyło nowe perspektywy sposobowi poznawania funkcji genów dzięki możliwości zahamowania ekspresji konkretnego genu poprzez degradację jego mRNA w obrębie cytosolu.

**Cel pracy.** Celem pracy było omówienie możliwości zastosowania mechanizmu interferencji RNA jako potencjalnej metody terapeutycznej w wielu rodzajach schorzeń.

**Omówienie.** Obecnie dąży się do poznania ewentualnej roli genów interferencji RNA lub też zaburzeń w ich prawidłowym funkcjonowaniu w chorobach uwarunkowanych genetycznie. Rozważa się także terapeutyczne zastosowanie interferencji RNA w chorobach wirusowych.

**Wnioski.** Terapia oparta na technice interferencji RNA może być w przyszłości wykorzystana w leczeniu wielu schorzeń, których molekularny mechanizm patogenezy został poznany.

## ABSTRACT

**Introduction.** In the early 1990s, during experiments aimed at intensifying the colour of *Petunia hybrida* flowers, a new mechanism of regulation of gene expression was discovered; however, its mechanism, i.e. inhibition of gene expression at a post-transcriptional stage, remained unknown. In 1998 two groups led by A. Fire and C. Mello found a molecular basis for the phenomenon called RNA interference (RNAi). Delivery of a double stranded RNA to a model organism, *Caenorhabditis elegans*, triggered silencing of complementary messenger RNA sequences.

This discovery opened new perspectives for research involving gene functions due to the possibility of inhibiting the expression of a specific gene through its mRNA degradation in the cytosol.

**Aim.** The aim of this paper is to present a potential role of RNAi as a therapeutic method for various diseases.

**Discussion.** RNAi provides a powerful technique for the derivation and analysis of loss-of-function phenotypes in vertebrate cells. This technique may be also applied as a therapeutic strategy, e.g. in genetic and viral diseases, and clinical trials to test this possibility have been already initiated.

**Conclusions.** RNAi-based therapy may become a powerful tool to treat many diseases whose molecular pathogenesis mechanisms have been thoroughly understood.

**Słowa kluczowe:** interferencja RNA, wyciszanie genów, terapia RNAi.

**Key words:** RNA interference, gene silencing, RNAi therapy.

## WSTĘP

### MECHANIZM INTERFERENCJI RNA

Zjawisko interferencji RNA (RNAi) jest specyficznym co do sekwencji procesem posttranskrypcyjnego wyciszania genów. Mechanizm RNAi jest zakonserwowany ewolucyjnie i występuje praktycznie u wszystkich organizmów eukariotycznych. U roślin i bezkręgowców małe interferencyjne RNA (siRNA, ang. *small interfering RNA*) stanowi naturalną obronę przeciwvirusową. Podobną rolę siRNA pełni u ssaków, pomimo wykształcenia bardziej złożonych ewolucyjnie mechanizmów odporności [9]. Interferencja RNA przebiega w kilku etapach, które przedstawiono na ryc. 1.

Pojawienie się w organizmie dwuniciowej cząsteczki RNA (dsRNA, ang. *double-stranded RNA*), która w warunkach naturalnych w nim nie występuje, może być wynikiem np. zakażenia wirusowego (dsRNA stanowi materiał genetyczny niektórych wirusów) lub też skutkiem aktywności tzw. ruchomych elementów genetycznych zwanych transpozonomi [19]. Wniknięcie dsRNA do komórki zapoczątkowuje pierwszy etap RNAi. W tym stadium dsRNA ulega enzymatycznej hydrolizie do mniejszych około 21–24 nukleotydowych (nt) cząsteczek dsRNA. Prawidłowy

przebieg tej reakcji zapewnia, podobny strukturalnie do RNazy III, enzym Dicer, który stanowi rybonukleazę specyficzną względem dsRNA [13]. W efekcie powstaje struktura zwana małym interferencyjnym RNA, siRNA.

Tak przygotowane dwuniciowe RNA, siRNA, włączane jest do enzymatycznego kompleksu efektorowego interferencji RNA, określanego jako RISC (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*). Po hydrolizie wiązań wodorowych między niciami w siRNA w procesie zależnym od ATP następuje aktywacja kompleksu RISC. W tym stadium tylko nić antysensowna jest włączana do RISC, a nić sensowna jest degradowana lub służy jako starter do polimerazy RNA, zależnej od RNA (RdRP). Nić antysensowna pełni rolę tzw. przewodnika i doprowadza kompleks RISC do komplementarnego do swojej sekwencji regionu na znajdującym się w cytosolu transkrypcie określonego genu, czyli do jego mRNA. Ponadto w tym etapie istotną rolę odgrywa niezidentyfikowana jeszcze rybonukleaza, która degraduje powstały kompleks jednoniciowy RNA-mRNA (czyli kompleks ssRNA-mRNA, ang. *single-stranded RNA*) poprzez hydrolizę mRNA w rejonie komplementarnym w odległości 10–12 nukleotydów od końca 3' siRNA [13, 17]. W ostatniej fazie procesu następuje całkowita degradacja powstałych po hydrolizie fragmentów mRNA przez egzonukleazy.

Bardzo szybko po opisanu zjawiska RNAi zaproponowano, że może być ono wywołane w sposób sztuczny. Większość z wczesnych eksperymentów przeprowadzanych w komórkach ssaków, związanych z wprowadzaniem do nich dwuniciowej cząsteczki RNA, kończyła się niepowodzeniem ze względu na silną reakcję immunologiczną, związaną z aktywnością RNA-zależnej kinazy białkowej (PKR, ang. *RNA-dependent protein kinase*), aktywującej syntezę interferonu, co prowadziło do zatrzymania syntezy białka [1, 3]. Wykazano jednak, że takiej odpowiedzi immunologicznej można uniknąć wprowadzając dsRNA krótsze niż 30 nt, gdyż minimalny fragment odcinany do aktywacji PKR wynosi dokładnie 30 par zasad (pz) dla RNA w postaci dupleksu [3]. Natomiast warunkiem zachowania specyficzności przyłączenia siRNA do konkretnego genu w dalszych etapach jest długość cząsteczki nie krótsza niż 19 nt. Z tego względu przy projektowaniu siRNA należy uwzględnić najbardziej zakonserwowane ewolucyjne regiony dla danego genu.

## CEL PRACY

Celem pracy było omówienie możliwości zastosowania mechanizmu interferencji RNA jako potencjalnej metody terapeutycznej w wielu rodzajach schorzeń.

## MATERIAŁY I METODY

Materiałem wykorzystanym w pracy była dostępna literatura fachowa, a metodą analiza tej literatury.

## OMÓWIENIE

### MOŻLIWOŚCI KLINICZNEGO ZASTOSOWANIA siRNA W NIEKTÓRYCH CHOROBYCH

Krótkie interferencyjne RNA jest teoretycznie idealnym środkiem leczniczym ze względu na możliwość specyficznego wyeliminowania niepożądanych produktów białkowych wadliwych genów. Należy podkreślić, iż stosowaniu siRNA jako metody terapii genowej towarzyszą liczne zalety. Technika ta jest wydajna i daje silny efekt fenotypowy. Ponadto inhibicja ekspresji genu jest specyficzna, co skutkuje ograniczeniem efektów ubocznych, w tym odpowiedzi ze strony układu immunologicznego [18]. Terapia oparta na technice interferencji RNA może być potencjalnie wykorzystana w leczeniu wielu schorzeń, których molekularny mechanizm patogenyzy został poznany [17].

#### **RNAi w chorobach układu oddechowego**

W przypadku chorób układu oddechowego miejscowe dostarczenie siRNA na drodze inhalacji oferuje wyjątkową możliwość podjęcia leczenia schorzeń dotąd opierających się konwencjonalnym metodom leczenia [8]. Efektywne dostarczenie siRNA do płuc wymaga pokonania dwóch głównych barier. Pierwszą z nich jest skomplikowana budowa płuc oraz istnienie mechanicznej bariery w postaci śluzu pokrywającego nabłonek oddechowy. Drugą z nich jest sama błona plazmatyczna komórek nabłonka. Aby uzyskać efektywne wyciszenie genów w płucach, konieczne jest dostarczenie siRNA w stabilnej postaci do konkretnego miejsca działania. Oznacza to, iż siRNA musi dotrzeć do wnętrza komórek i osiągnąć wysokie stężenie w cytoplazmie. Wektory wirusowe są stosowane na szeroką skalę w celu dostarczania siRNA do wielu rodzajów komórek ssaczy [5, 8]. Systemy retrowirusowe są efektywne w większości linii komórkowych, włączając hodowle pierwotne [24].

Alternatywą dla wektorów wirusowych jest użycie innego rodzaju wektorów, których budowa opiera się na lipidach bądź polimerach [5, 8]. Użycie dodatkowo naładowanych czynników transfekcyjnych w postaci lipidów lub polimerów umożliwia wprowadzenie konstruktów do komórki ze względu na ujemny wypadkowy ładunek zarówno siRNA, jak i powierzchni komórki [5, 6]. Dowiedziono, iż transfekcja z użyciem lipidów i polimerów jest efektywna zarówno w hodowlach komórkowych, jak i w modelach zwierzęcych. Dostępnych jest obecnie wiele czynników transfekcyjnych, które pomagają w efektywnym dostarczeniu siRNA do wnętrza komórek w liniach wyprawdzonych z nabłonka pęcherzyków płucnych lub dróg oddechowych [8].

Z dostarczeniem siRNA do organizmu często wiążą się pewne problemy, takie jak toksyczność, szybka degradacja konstruktów przez nukleazy oraz związana z tym możliwość, iż siRNA nie dotrze do docelowego organu. W przypadku płuc tego typu niedogodności mogą zostać rozwiązane przez dostarczenie siRNA w formie inhalacji. Podanie siRNA w postaci aerozolu, który gwarantuje niską inwazyjność, pozwala

na dostarczenie konstruktów do konkretnego, zaplanowanego miejsca oraz znacząco obniżoną toksyczność wywieraną na cały organizm [8].

Nowe generacje środków inhalujących, które zostały zaprojektowane pierwotnie z myślą o dostarczeniu białek, pozwalają na wydajne dostarczenie siRNA w przypadku płuc. Liczne firmy rozwijają obecnie zaawansowane systemy ciekło-sprayowe, które stanowią pierwszą z możliwości podawania siRNA w formie inhalacji. Bardzo obiecujące wydają się być również badania nad systemem suchych proszków, które mogą być przydatne w przyszłości [8].

W kilku badaniach udało się efektywnie dostarczyć siRNA z użyciem metody wkraplania donosowego *in vivo* na modelu zwierzęcym [3, 15]. Wydaje się, iż metoda ta jest również skuteczna u naczelnych. Na przykład uzyskano siRNA specyficzny dla wirusa SARS i dostarczono go donosowo do makaków, co przyniosło spadek miana wirusa w górnych drogach oddechowych i pęcherzykach płucnych, zmniejszenie uszkodzeń pęcherzyków płucnych oraz obniżenie gorączki [13].

Mukowiscydoza (CF, ang. *cystic fibrosis*) jest najczęściej występującą śmiertelną chorobą genetyczną u ludzi rasy kaukaskiej, spowodowaną mutacjami genu leżącego na chromosomie 7, który koduje zespół transportera białkowego wiążącego ATP, tzw. przebłonowe białko regulatorowe w mukowiscydozie (CFTR, ang. *cystic fibrosis transmembrane regulator*). Kluczową rolę w mukowiscydozie odgrywa nadmierne aktywne białko VCP/pr97 (ang. *valosin containing protein*), które indukuje zniszczenie transporterów chlorkowych (CFTR) u chorych. Dowiedziono, iż wyciszenie ekspresji genu dla białka VCP/pr97 z użyciem siRNA w liniach komórkowych, uzyskanych z nabłonka tchawicy od chorych na mukowiscydozę, przywróciło tym komórkom zdolność transportowania jonów chlorkowych [23].

### **RNAi w zakażeniu wirusem HIV**

Ostatnie badania przemawiają za możliwością użycia siRNA jako środka terapeutycznego w przypadku infekcji wirusem HIV-1 [2, 12]. Wykorzystując transgeniczne myszy z przeszczepionym ludzkim szpikiem kostnym, badacze mogli kontrolować replikację wirusa i zapobiegać związanej z tą chorobą utracie limfocytów T CD4+ [9]. Fakt, iż syntetyczny siRNA może kontrolować rozwój infekcji HIV-1 u myszy posiadających jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, wywodzące się od chorych ludzi, może wskazywać, iż leki zawierające taki syntetyczny siRNA mogłyby wpływać na przebieg infekcji HIV-1 także u ludzi [2].

### **RNAi w chorobie trzewnej**

Chorobą układu pokarmowego, w której siRNA może znaleźć swoje zastosowanie, jest choroba trzewna czyli celiakia. Ma ona swoje podłoże w zaburzeniach wchłaniania jelitowego, spowodowanych zależnym od glutenu uszkodzeniem immunologicznym błony śluzowej proksymalnego odcinka jelita cienkiego z następ-

czym zanikaniem kosmyków jelitowych i utratą powierzchni wchłaniania. W celiakii dochodzi do wytworzenia niewłaściwej odpowiedzi limfocytów T na dostarczane w diecie białko, gluten. Po połączeniu z tkankową transglutaminazą (tTG), gluten ulega modyfikacji, co doprowadza do powstawania kompleksów immunogennych, wywołujących odpowiedź zapalną zależną od limfocytów T [16, 22]. Transglutaminazy są grupą enzymów, które w dużych ilościach występują w całym ludzkim organizmie. Zaproponowano, że technika RNAi może być narzędziem, które umożliwi zablokowanie aktywności specyficznej dla celiakii transglutaminazy, bez wpływania na aktywność innego rodzaju transglutaminaz [1].

#### PIERWSZE BADANIA KLINICZNE DOTYCZĄCE TERAPEUTYCZNEGO ZASTOSOWANIA RNAi

Intensywne badania nad mechanizmem interferencji RNA doprowadziły do tego, że w krótkim czasie od ich wykrycia Amerykańska Agencja do spraw Żywności i Leków (FDA) wyraziła zgodę na przeprowadzenie badań klinicznych z użyciem siRNA przeciwko mRNA VEGF (ang. *vascular-endothelial growth factor*, czynnik wzrostu śródbłónka naczyń) w celu zablokowania angiogenezy u chorych na zależne od wieku zwyrodnienie plamki żółtej (AMD, ang. *age-related macular degeneration*). Zgoda na pierwsze badania kliniczne z wykorzystaniem cząsteczki siRNA nie bez przyczyny dotyczyła chorób oczu. Po pierwsze, wiadomym było, że to właśnie VEGF jest odpowiedzialny za neowaskularyzację siatkówki, a co za tym idzie, za degenerację plamki żółtej. Po drugie, bardzo łatwe jest dostarczenie terapeutyku tylko do gałki ocznej [20].

*Acuity Pharmaceuticals* odkryła siRNA nazwane Cand 5, zaprojektowane tak, aby hamowało produkcję czynnika wzrostu komórek śródbłónka (VEGF), pobudzającego angiogenezę w siatkówce. Badania na myszach pokazały zmniejszenie neowaskularyzacji, spowodowane redukcją ekspresji VEGF po bezpośredniej iniekcji doocznej siRNA. Cand 5 jest aktualnie w trzeciej fazie badań klinicznych w leczeniu chorych na AMD oraz w drugiej fazie badań klinicznych w leczeniu retinopatii cukrzycowej i spowodowanego przez nią obrzęku plamki żółtej [4, 20].

Podobny wynik przyniosły badania zmodyfikowanego chemicznie siRNA o nazwie Sirna-027 również u pacjentów z AMD. W pierwszej fazie badań klinicznych, prowadzonych przez Sirna Therapeutics, wzięło udział 26 pacjentów. U 25 z nich stwierdzono stabilizację ostrości widzenia (zatrzymanie postępu choroby), a u 23% z tych pacjentów stwierdzono znaczącą poprawę ostrości widzenia po 8 tygodniach od podania siRNA [4].

Przytoczone badania, w których wykazano poprawę stanu klinicznego chorych na AMD po zastosowaniu siRNA przeciw VEGF, wywołały wielkie zainteresowanie tą drogą podawania siRNA. Okazało się jednak, że zaobserwowana redukcja angiogenezy nie była efektem specyficznego wyciszenia genu VEGF przez siRNA,

lecz została spowodowana przez niespecyficzną aktywację szlaku TLR-3 (tj. Toll-podobnego receptora 3) przez podany dooocznie siRNA [10]. Wewnątrzkomórkowe sygnałowanie drogą TLR-3 powoduje między innymi aktywację syntezy interferonu gamma i interleukiny 12, które negatywnie regulują VEGF, powodując również zahamowanie angiogenezy.

Pierwsze kliniczne wykorzystanie interferencji RNA w leczeniu nowotworu złośliwego dotyczyło pacjentów chorych na wielopostaciowego glejaka (*Glioblastoma multiforme*). Ten typ nowotworu jest praktycznie niewrażliwy na żadną z obecnie stosowanych metod leczenia, a rokowanie jest bardzo złe (około 40% chorych umiera w ciągu 6 miesięcy od wykrycia guza). Rozprzestrzenianie się komórek glejaka polega na ich przyleganiu do zewnątrzkomórkowej macierzy, a następnie jej degradacji i w konsekwencji na penetracji komórek do sąsiednich struktur mózgowych. Tenascyna C jest białkiem macierzy zewnątrzkomórkowej, które ulega silnej nadprodukcji w komórkach glejaka, zwłaszcza w jego najbardziej inwazyjnych formach. Polscy badacze opracowali formułę siRNA, skierowanego przeciwko tenascynie C, które podawano pacjentom po chirurgicznym usunięciu guza w rejonie tkanek pooperacyjnych. Skojarzenie tego rodzaju terapii z radioterapią i chemioterapią doprowadziło do znacznego przedłużenia czasu do wznowy wzrostu guza [21, 25].

Przedstawione powyżej przykłady pokazują tylko niektóre z możliwych zastosowań procesu interferencji RNA. W tab. 1 przedstawiono kilka przykładów badań klinicznych, prowadzonych z wykorzystaniem techniki interferencji RNA [5].

**Tab. 1.** Przykłady wybranych klinicznych badań z wykorzystaniem siRNA [5]

**Tab. 1.** SiRNA-based therapies undergoing clinical trials [5]

Nazwa leku/ siRNA	Firma	Choroba	Faza badań klinicznych
Bevasiranib (Cand 5)	Acuity Pharmacacueticals	AMD <sup>a</sup> (odmiana wysiękowa)	Faza III
AGN211745 (Sirna - 027)	Merck-Sirna Therapeutics	AMD <sup>a</sup> (odmiana wysiękowa)	Faza II
RTP801i-14	Quark Pharmaceuticals	AMD <sup>a</sup> (odmiana wysiękowa)	Faza I/IIA
ALN-RSV01	Alnylam Pharmaceuticals	Infekcje RSV (Respiratory Syncytial Virus)	Faza II
AKli-5	Quark Pharmaceuticals	Ostra niewydolność nerek	Faza I
NUC B1000	Nucleonics	Infekcja HBV	Faza I
TD101	TransDerm	Wrodzone zgrubienie paznokci	Faza I

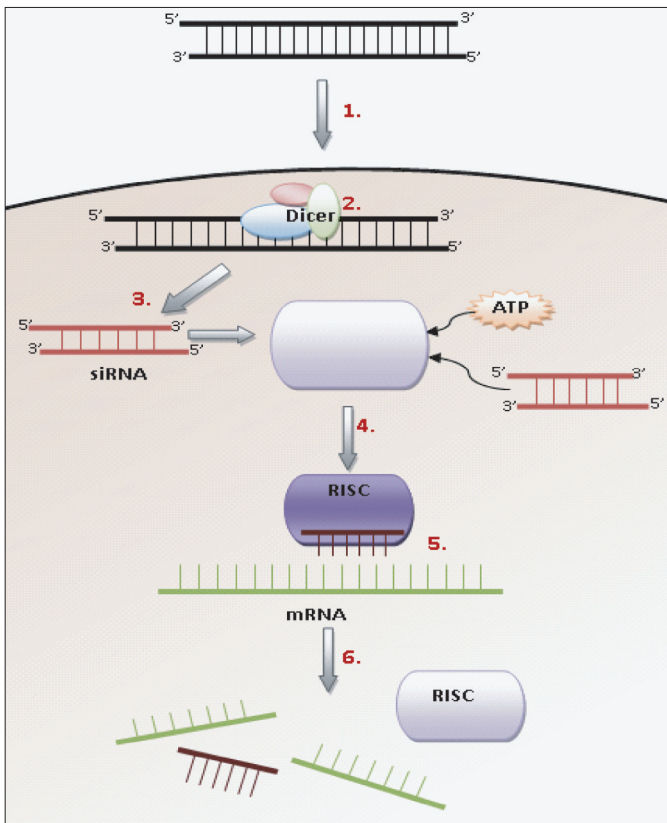
Objaśnienie:

<sup>a</sup> AMD, zwyrodnienie plamki żółtej związane z wiekiem.



**Ryc.1.** Schemat interferencji RNA. Wniknięcie do komórki dwuniciowego RNA (dsRNA) (1) powoduje zainicjowanie interferencji RNA. Następuje przyłączenie enzymu Dicer o aktywności rybonukleazy III do dsRNA (2) i jego hydroliza do fragmentów o długości 21–24 nukleotydów (3), tzw. małego interferencyjnego RNA (siRNA). Włączenie dwuniciowego siRNA do kompleksu enzymatycznego RISC, z jednoczesną denaturacją do jednoniciowego RNA (ssRNA), powoduje aktywację kompleksu RISC (4). Następnie, po komplementarnym sparowaniu siRNA z mRNA, dochodzi do degradacji mRNA i tym samym zahamowania ekspresji określonego genu przed etapem translacji (5).

**Fig. 1.** Steps of RNA interference. Entering of exogenous dsRNA (1) into a cell initiates RNAi by activating the ribonuclease protein Dicer (2), which binds and cleaves double-stranded RNAs (dsRNAs) to produce double-stranded fragments of 21–24 base pairs (3), siRNAs. The siRNAs are then separated into single strands and integrated into an active RISC complex (4). In RISC, siRNAs base-pair to their target mRNA and induce mRNA cleavage, thereby preventing it from being used as a template for translation (5).



## WNIOSKI

W podsumowaniu można stwierdzić, że występujący naturalnie w przyrodzie proces interferencji RNA jest intensywnie wykorzystywany przez badaczy jako metoda pozwalająca na poznanie funkcji określonych genów. Obecnie dąży się do określenia funkcji genów kodujących kluczowe składniki aparatu interferencji RNA. Można



przypuszczać, że pokonanie problemów, takich jak pojawiające się efekty niespecyficzne, indukcja odpowiedzi immunologicznej, a co najważniejsze, znalezienie metody specyficznego dostarczania siRNA do ściśle określonego miejsca, np. guza nowotworowego, otworzy perspektywy zastosowania zjawiska interferencji RNA w leczeniu chorób dotąd nieuleczalnych.

## PIŚMIENNICTWO

1. Al-toma A., Verbeek W., Mulder C.J.: *Update on the management of refractory celiac disease*. J. Gastrointestin. Liver Dis., 2007; 16: 57–63.
2. Berkhout B., ter Brake O.: *Towards a durable RNAi gene therapy for HIV-AIDS*. Expert Opin. Biol. Ther., 2009; 9: 161–170.
3. Bitko V., Musiyenko A., Shulyayeva O., Barik S.: *Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA*. Nat. Med., 2005; 11: 50–55.
4. Brown S.M., Hay J.G., Oster H.: *Essentials of medical genomics. RNAi Clinical trials*. Wiley-Blackwell, 2009: 267–268.
5. Castanotto D., Rossi J.J.: *The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics*. Nature, 2009; 457: 426–433.
6. Demeneix B., Behr J.P.: *Polyethylenimine (PEI)*. Adv. Genet., 2005; 53: 217–230.
7. Ding S.W., Li H., Lu R., Li F., Li W.X.: *RNA-silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals*. Virus Res., 2004; 102: 109–115.
8. Durcan N., Murphy C., Cyran S.A.: *Inhalable siRNA: Potential as a therapeutic agent in lungs*. Molec. Pharmaceut., 2008; 5: 559–566.
9. Ghildiyal M., Seitz H., Horwich M.D., Li C., Du T., Lee S., Xu J., Kittler E.L., Zapp M.L., Weng Z., Zamore P.D.: *Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in Drosophila somatic cells*. Science, 2008; 23: 1077–1081.
10. Kleinman M.E., Yamada K., Takeda A., Chandrasekaran V., Nozaki M., Baffi J.Z., Albuquerque R.J., Yamasaki S., Itaya M., Pan Y., Appukuttan B., Gibbs D., Yang Z., Karikó K., Ambati B.K., Wilgus T.A., DiPietro L.A., Sakurai E., Zhang K., Smith J.R., Taylor E.W., Ambati J.: *Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3*. Nature, 2008; 452: 591–597.
11. Kumar A.: *RNA interference: a multifaceted innate antiviral defense*. Retrovirology, 2008; 1: 5–17.
12. Kumar P., Ban H.S., Kim S.S., Wu H., Pearson T., Greiner D.L., Laouar A., Yao J., Haridas V., Habiro K., Yang Y.G., Jeong J.H., Lee K.Y., Kim Y.H., Kim S.W., Peipp M., Fey G.H., Manjunath N., Shultz L.D., Lee S.K., Shankar P.: *T cell-specific siRNA delivery suppresses HIV-1 infection in humanized mice*. Cell, 2008; 134: 577–586.
13. Li B.J., Tang Q., Cheng D., Qin C., Xie F.Y., Wei Q., Xu J., Liu Y., Zheng B.J., Woodle M.C., Zhong N., Lu P.Y.: *Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque*. Nat. Med., 2005; 11: 944–951.
14. Martin A., Romito G., Pepe I., De Vivo G., Merola M.R., Limatola A., Gentile V.: *Transglutaminase-catalyzed reactions responsible for the pathogenesis of celiac disease and neurodegenerative diseases: from basic biochemistry to clinic*. Curr. Med. Chem., 2006; 13: 1895–1902.
15. Massaro D., Massaro G.D., Clerch L.B.: *Noninvasive delivery of small inhibitory RNA and other reagents to pulmonary alveoli in mice*. Am. J. Physiol.: Lung Cell. Mol. Physiol., 2004; 287 (5): 1066–1070.
16. Novina C.D., Sharp P.A.: *The RNAi revolution*. Nature, 2004; 430: 161–164.
17. Pellish R.S., Nasir A., Ramratnam B., Moss S.F.: *Review article: RNA interference-potential therapeutic applications for the gastroenterologist*. Aliment. Pharmacol. Ther., 2008; 27: 715–723.
18. Saunders L.R., Barber G.N.: *The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions*. FASEB J., 2003; 17: 961–983.
19. Stribling R., Brunette E., Liggitt D., Gaensler K., Debs R.: *Aerosol gene delivery in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1992; 89: 11277–11281.

20. Whitehead K.A., Langer R., Anderson D.G.: *Knocking down barriers: advances in siRNA delivery*. Nature Rev. Drug Discov., 2009; 8: 129–138.
21. Wyszko E., Rolle K., Nowak S., Zukiel R., Nowak M., Piestrzeniewicz R., Gawrońska I., Barciszewska M., Barciszewski J.: *A multivariate analysis of patients with brain tumors treated with ATN-RNA*. Acta Polon. Pharmaceut., 2008; 65: 677–684.
22. Van Heel D.A., West J.: *Recent advances in coeliac disease*. Gut., 2006; 55: 1037–1046.
23. Vij N., Fang S., Zeitlin P.L.: *Selective inhibition of endoplasmic reticulum-associated degradation rescues DeltaF508-cystic fibrosis transmembrane regulator and suppresses interleukin-8 levels: therapeutic implications*. J. Biol. Chem., 2006; 281: 17369–17378.
24. Zentilin L., Giacca M.: *In vivo transfer and expression of genes coding for short interfering RNAs*. Curr. Pharm. Biotechnol., 2004; 5(4): 341–347.
25. Zukiel R., Nowak S., Wyszko E., Rolle K., Gawronska I., Barciszewska M.Z., Barciszewski J.: *Suppression of human brain tumor with interference RNA specific for tenascin-C*. Cancer Biol. Ther., 2006; 5: 1002–1007.