

RNA DE INTERFERENCIA

Otero D*.

INTRODUCCIÓN

Desde la propuesta de DNA → RNA → proteína, se ha visto al RNA como solo un subordinado del DNA encargado de traducir su información. Actualmente se ha visto que el RNA no tiene solo las funciones de traducir y transcribir el DNA, sino que también puede regular la expresión genética e incluso tener función catalítica.

El RNA interferencia (RNAi) es un RNA doble catenarico (dsRNA) que silencia la expresión genética inhibiendo al RNA mensajero (mRNA) que se cree evolucionó como parte del sistema inmune innato. Su descubrimiento y de cómo funciona ha generado desde el mismo momento la inquietud de usarse como posible terapia contra enfermedades que hasta el momento carecen de cura.

HISTORIA

En los 90 un grupo de científicos querían crear petunias de un violeta intenso decidieron agregar copias del gen que codificaba para el color violeta, pero como resultado obtuvieron petunias blancas (Fig.1). Luego de verificar que no fue un error, supusieron que al insertar las copias extras estas se inhibieron y también las copias endógenas, lo que se llamó co-supresión, y que existían dentro de la célula un mecanismo para esto.

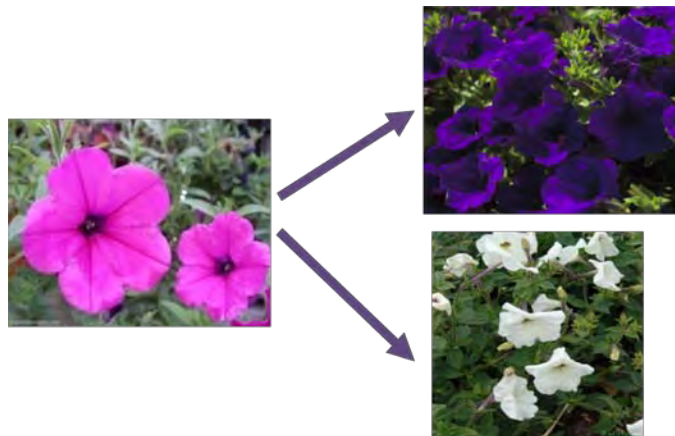


Fig.1 Petunias blancas producidas en vez de violetas

Las investigaciones a partir de este incidente llevaron al descubrimiento de sucesos similares en otras células vegetales. En el 1995 se demostró que tanto el RNA con sentido y el sin sentido podían generar supresión genética en *C. elegans*, en el 1996 se vio un proceso similar en el hongo *Neurospora crassa* llamado “quelling” en inglés. Para aquel entonces también se observó que el RNA viral transgénico en plantas inhibía la replicación viral. Todos estos fenómenos se agruparon bajo el término de Silenciamiento Genético Post-transcripcional (PTGS por sus siglas en inglés).

No fue sino hasta el 1998 cuando Andrew Fire y Craig Mello describieron el mecanismo de acción al insertar RNA doble catenarico en células gonadales de *C. elegans* produciendo inhibición de la expresión genética denominándolo RNAi. Por este descubrimiento ganaron el premio nobel de fisiología o medicina en el 2006.

*Dennis Otero, Estudiante de Medicina, Asistente de Profesor del Área Ciencias Moleculares y Bioquímica de la Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra



Andrew Fire



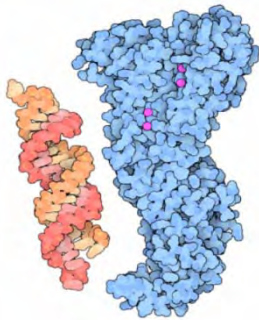
Craig Mello

Fig.2 Ganadores del premio nobel de fisiología o medicina 2006.

COMPONENTES

RNA interferencia es un mecanismo donde moléculas de RNA inhiben la traducción del mRNA silenciando la expresión genética. Existen diversos componentes en este mecanismo y en este review los clasificaremos como componentes ribonucleicos y componentes proteicos.

Componentes ribonucleicos.



RNA pequeño interferente (siRNA) es el protagonista de RNAi. Es un RNA doble catenario de 20 a 25 nucleótidos (nt) derivado de un precursor largo de dsRNA, que posee 2 nucleótidos libres en el extremo 3' y en su extremo 5' posee un grupo fosfato (Fig.1). Estas características son el producto de haber sido producido por la RNasa III. Este siRNA es exógeno, es decir, no está codificado en nuestro genoma y es totalmente complementario al mRNA diana.

Fig.3 siRNA y Dicer



Fig.4 Esquema de siRNA

Micro RNA, se encuentra en los genomas de plantas, invertebrados y vertebrados. Es un RNA no codificante, no se traduce a proteínas, proveniente de horquillas de RNA y posee alrededor de 21-24nt. Inhibe al mRNA pero a diferencia del siRNA su complementariedad con el mRNA diana es parcial y debido a esta característica puede silenciar distintos mRNA diana.

d miRNA-based hairpin RNA



Fig.5 Horquilla de RNA y miRNA

Hasta el 2001 estos eran los tipos de RNAi que se conocían y los investigadores se preguntaban si existían siRNA endógenos y las investigaciones en *C. elegans*, moscas, plantas y ratones demostraron que sí. Actualmente se conoce una amplia variedad de pequeños RNA interferente que se pueden encontrar en las células de los organismos ya mencionados pero todavía no se ha comprobado la existencia de estos en los seres humanos.

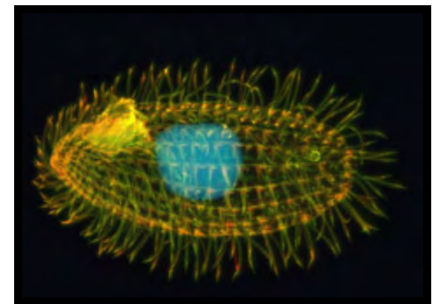
siRNA asociado a repeticiones (rasiRNA) proviene de la hebra sin sentido de su dsRNA precursor y se ha asociado a el silenciamiento de elementos transposables, modificación a histonas y metilación del DNA.

siRNA trans-actuante (tasiRNA) este sólo se ha encontrado en células vegetales y es proveniente de dsRNA sintetizado por RNA polimerasa dependiente de RNA usando transcritos endógenos. Estos tasiRNA dirigen la escisión de mRNA provenientes de genes diferentes del que el tasiRNA fue originado.

Diminuto RNA no codificante (tncRNA) posee de 20-22 nt, parecido a tasiRNA presente en nematodos de función desconocida, pero complementario a mRNA.

Pequeño RNA de exploración (scnRNA) de alrededor de 28 nt se encarga de explorar el DNA para hacer re-arreglos en *Tetrahymena thermophila*, un protozooario utilizado en estudios genéticos. La proteína de la familia Argonauta Twilp media el proceso y un homólogo de Dicer es requerido para la acumulación de scnRNA.

Fig. 6 *Tetrahymena thermophila*



RNA modulador pequeño (smRNA) RNA no codificante que contiene alrededor de 20 nt que se han aislado en células madres neuronales en el hipocampo de ratón adulto. Tiene la misma longitud que el DNA llamado elementos silenciadores de neurona reactiva (NRSE) usualmente encontrado en regiones promotoras de genes neurales específicos. Este inhibe la transcripción de estas secuencias en células no neuronales como parte de un complejo NRSE/REST. smRNA, en células neuronales cambia el NRSE/REST de inhibidor a promotor de las secuencias.

RNA asociado a Piwi (piRNA) este RNA está asociado a una familia de proteínas muy importantes en todo lo que es el mecanismo de acción de RNAi: la familia de proteínas Argonautas que se encuentran muy conservadas en los eucariotas caracterizadas por sus dominios PAZ (Piwi – Argonaute - Zwille) y PIWI (Testículos débiles inducidos por elemento P). Se ha demostrado por diversos estudios que estas proteínas son capaces de interactuar con los RNAi mediante su dominio PAZ, por el extremo 3', y mediante sus dominios central y PIWI, a través del extremo 5'.

Esta familia se divide en dos subfamilias según sus similitudes en la secuencia de aminoácidos: la subfamilia AGO, interacciona con siRNA y miRNA, y la subfamilia Piwi relacionada a piRNA y expresado únicamente en células germinales y células madre.

Los piRNA se encuentran en un rango de entre 26 – 31 nt, se expresa únicamente en testículos de mamíferos y están vinculados al silenciamiento de retrotransposones y otros elementos genéticos.

Componentes proteicos

Dicer es una ribonucleasa, RNasa III, ubicada en el citoplasma celular que procesa dsRNA largos y pre-miRNA en siRNA y miRNA respectivamente. Posee 5 dominios: un dominio de unión a RNA doble catenario (dsRBD) dos dominios con actividad RNasa III, RNA Helicasa con DEAD-box, que necesita ATP para desenrollar al dsRNA, un dominio DUF283 con función desconocida y un dominio PAZ.

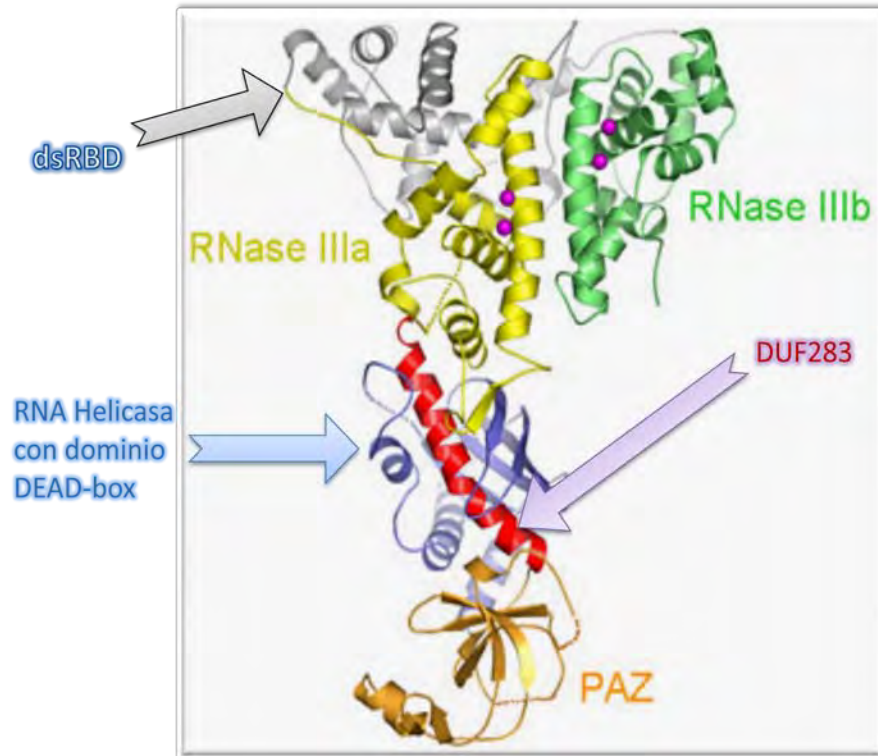


Fig. 7 Dicer con sus dominios.

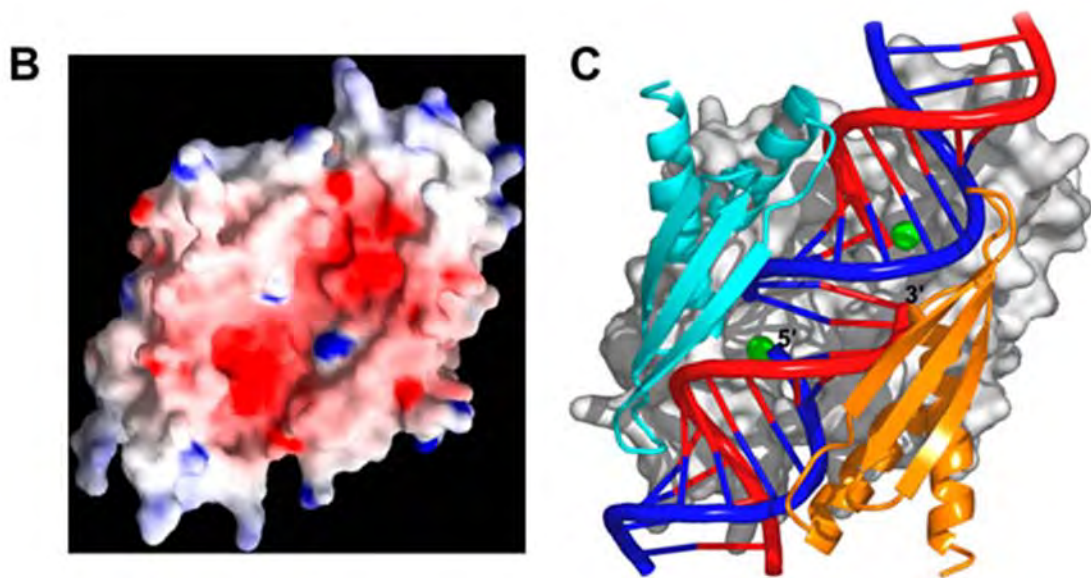


Fig. 8 Configuración 3D del Sitio catalítico de Dicer

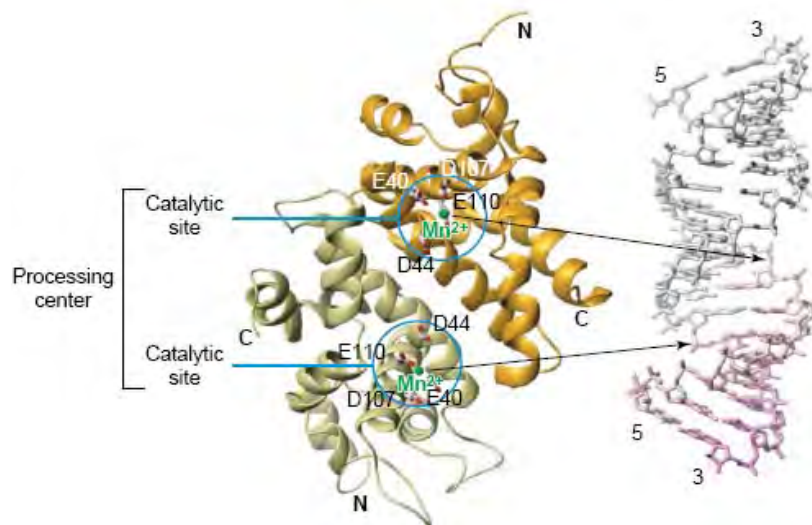


Fig. 9 Sitio catalítico de Dicer
(tomado de *Current Opinion in Structural Biology* 2005, 15:107–115)

Existen en eucariotas otras ribonucleasas RNasa III siendo Drosha una clase II y Dicer clase III presentes en células eucariotas complejas. Ambas poseen dos dominios catalíticos como demostraron las figuras anteriores. En bacterias y eucariotas unicelulares solo se encuentra una RNasa III clase I, aunque en eucariotas existe una proteína mitocondrial parecida a una Rnasa III clase I cuya función hasta el momento es desconocida.

Complejo silenciador inducido por RNA (RISC) conocido mayormente por sus siglas en inglés RISC es una ribonucleoproteína con múltiples subunidades, componente central en el mecanismo de acción del RNAi. Entre los componentes de Dicer en los humanos está Dicer, unida a siRNA o miRNA, Ago2, que actualmente se conoce tiene actividad endonucleasa o “Slicer”, y dos dsRBP: TRBP y PACT.

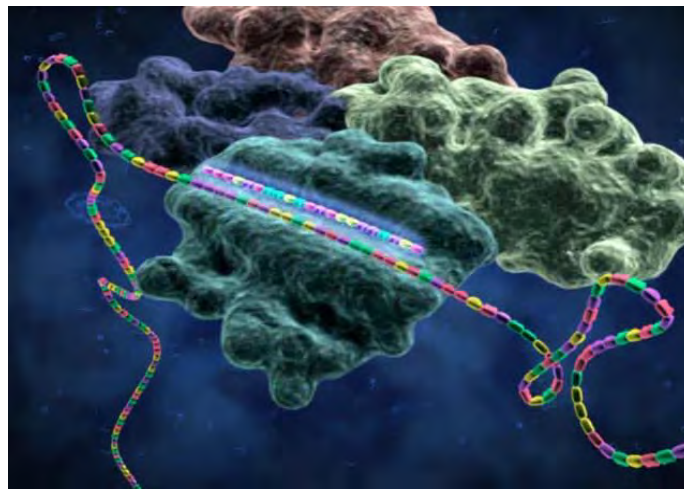


Fig. 10 RISC

MECANISMO DE ACCIÓN

El mecanismo de acción descrito para el siRNA es el siguiente: dsRNA largos van a servir como sustrato para Dicer que lo va a escindir en siRNA, que va a cargarse en RISC en luego se va a desenrollar y se va a elegir como cadena guía a la cadena antisentido, la otra cadena, llamada cadena pasajero, es desechada. Otros sustratos de Dicer para la formación de siRNA son horquillas de RNA y siRNA sintéticos. (Fig. 11)

El complejo es guiado por la cadena de RNA, mediante mecanismos aún no dilucidados, hacia el mRNA diana. La escisión se va a dar entre 10 y 11 nucleótidos desde el extremo 5' que sirve de regla, que es alrededor del centro de complementariedad entre la cadena guía y la cadena diana.

El mRNA escindido es reconocido por la célula como extraño y es degradado. En plantas este mRNA puede ser usado como template para la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) formando nuevos dsRNA que pueden ser procesados por Dicer amplificando el silenciamiento. Esta respuesta amplificadora en plantas y gusanos se expresa, además, sistemáticamente.

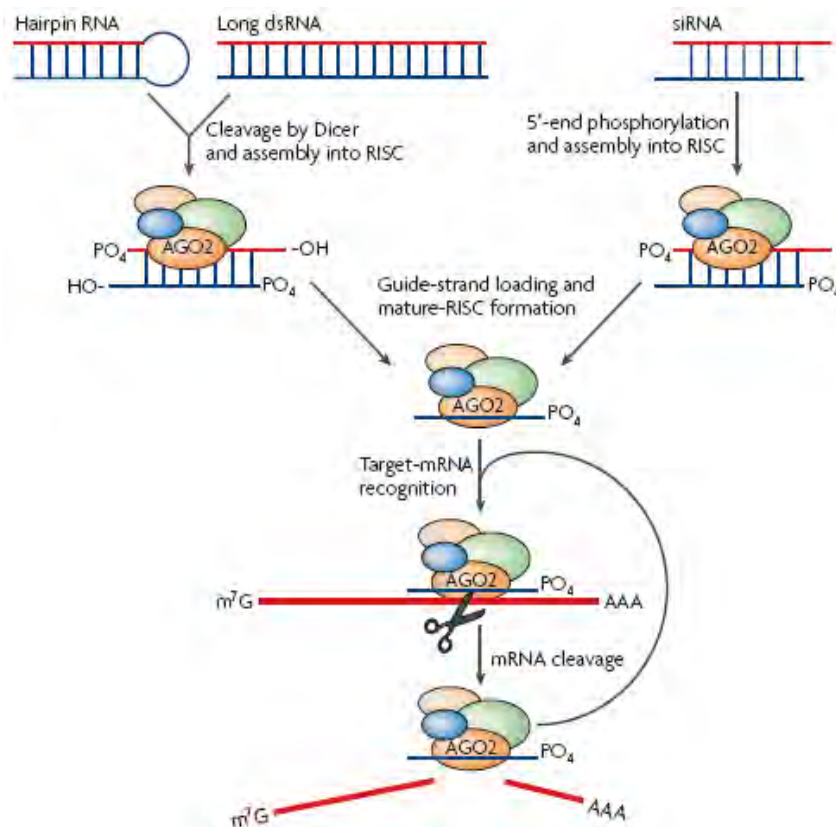


Fig. 11 Mecanismo de acción de siRNA (Tomado de: *Molecular Cell Biology* 2008 jan; Vol 9:22-32)

Por otra parte, el mecanismo por el cual actúa miRNA es en parte diferente (Fig. 12). Se crea un precursor llamado pri-miRNA a partir de la transcripción del DNA y éste es procesado por Droscha, una ribonucleasa que se encuentra en el núcleo, en conjunto con la proteína DGCR8 o Pasha (en *Drosophila* y *C. elegans*), generando pre-miRNA. Éste será exportado al citoplasma mediante exportina 5, que es un transportador ubicado en la membrana nuclear.

Ya en el citoplasma pre-miRNA volverá a ser escindido, esta vez por Dicer generando miRNA que será cargado al complejo RISC y le guiará a los mRNA diana. Al presentar solo complementariedad parcial en vez de escindir al mRNA el miRISC se va a unir a él impidiendo así su traducción.

Este mRNA inhibido va a los cuerpos P, que son estructuras citoplasmática donde se almacenan y destruyen el RNA reprimido.

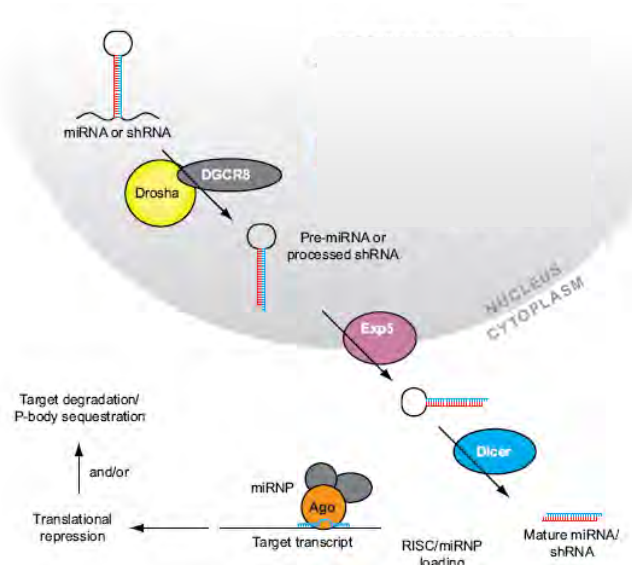


Fig. 12 Mecanismo de acción de miRNA (Tomado de: Annu. Rev. Genom. Human Genet. 2007.8:81-108)

En caso de que miRNA sea complementario totalmente al RNA habrá una escisión de éste y viceversa, si siRNA es parcialmente complementario al mRNA sólo inhibirá la traducción y no lo escindirán, lo que muestra un solapamiento entre ambos mecanismos de acción.

El mecanismo de acción de rasiRNA en *Drosophila* está dado por las transcripciones derivadas de promotores opuestos en elementos repetitivos del DNA, como los centrómeros y DNA satelital formando dsRNA largos que serán escindidos por Dicer en siRNAs. Estos son desenrollados y llevados por el complejo silenciador transcripcional inducido por RNA (RITS en inglés) quien dirige el establecimiento de cromatina silenciada en la región de DNA homóloga a las de siRNAs. La cromatina silenciada está caracterizada por metilación de los residuos de lisina 9 de la histona H3 y el reclutamiento de proteínas asociadas a heterocromatina HP1 y HP2. (Fig 13.)

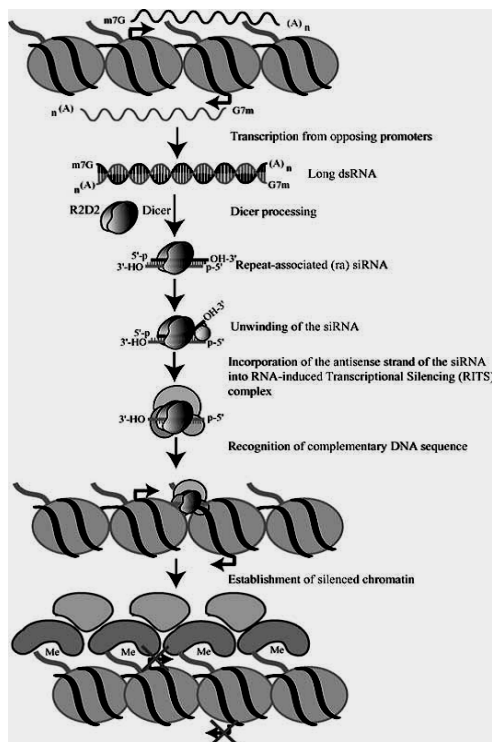


Fig. 13 Vía de siRNA asociado a repeticiones (rasiRNA). (Tomado de Annu, Rev. Med. 2005.56:401-423)

La producción de piRNA no necesita de Drosha o Dicer. No se conoce aun cómo el sustrato primario es generado, pero éste es procesado por proteínas tipo Piwi como Aubergine (AUB) y que induce la producción exponencial de piRNA. En *Drosophila* piRNA es generado por dos tipos de proteínas: Argonata-3 (AGO3) que se suele unir a piRNA proveniente de la hebra con sentido de los retrotransposones, mientras que los piRNA provenientes de la hebra antisentido de los retrotransposones se une a AUB.

Curiosamente los primeros 10 nucleótidos de piRNA que interactúan con AGO3 son complementarios a los 10 primero que interactúan con AUB. Esto ha generado el modelo de "ping-pong" donde se dice que el corte realizado por AGO3-piRNA especifica el extremo 5' del piRNA asociado a Aubergine y viceversa (Fig. 14).

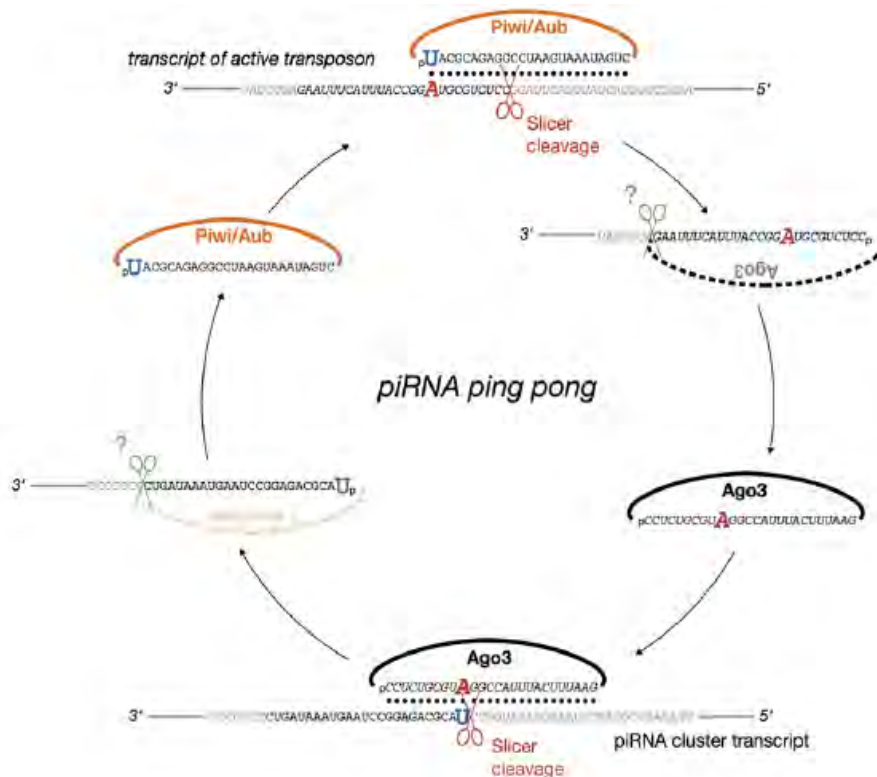


Fig. 14 Modelo de "ping-pong" del piRNA (Tomado de: Cell 128, 1089–1103, March 23, 2007)

En la actualidad no se conoce mecanismos regulatorios del RNAi, pero en *C. elegans* fue descubierto mediante screening genético ERI-1 que degrada siRNA. Esta es la primera evidencia de un mecanismo regulatorio para limitar el silenciamiento mediado por RNAi.

POTENCIAL TERAPÉUTICO

Desde el descubrimiento mismo del mecanismo de acción del RNAi se vislumbró el gran potencial terapéutico, en especial en aquellas enfermedades donde había una sobre expresión genética o enfermedad viral. siRNAs pueden ser inyectados en células de mamíferos simulando miRNA endógenos escindidos por Dicer.

Pero como todo fármaco existen 4 características a vencer para lograr un fármaco deseado:

1. Potencia: esta se refiere a la capacidad de inducir silenciamiento efectivo a la menor concentración.

2. Estabilidad: En el plasma humano la vida media de siRNA “desnudos” es de tan solo minutos. Para su uso terapéutico es necesario prolongar su vida media. Cambios bioquímicos mínimos pueden permitirles durar más sin afectar su actividad ni causar toxicidad. Ejemplo de estos cambios es la inserción de un grupo fosforotioato (P=S) en el extremo 3’ del esqueleto protege contra la actividad de exonucleasas y modificación en 2’ de los azúcares como 2’-O- metil ó 2’fluoro proveen resistencia a la degradación mediante endonucleasa.
3. Especificidad: A pesar de que el siRNA es un muy específico puede interferir con mRNA parcialmente complementarios. Para evitar esto se pueden realizar modificaciones como 2’-o-metil en la cadena guía sin afectar la especificidad hacia el blanco. También siRNA es capaz de activar el sistema inmune innato. dsRNA mayor de 30nt o grandes cantidades de siRNA son reconocidos por la célula por la proteína kinasa de serina/treonina (PKR) inhibiendo la traducción global y generando muerte celular. También el dsRNA es capaz de ser reconocido por las células dendríticas que producen Interferón tipo I y citoquinas pro-inflamatorias. Para evitar la respuesta inmune se utiliza siRNA en vez de dsRNA largos.
4. Mecanismo de entrega (“delivery”): Uno de los mayores retos en la actualidad para la aplicación de siRNA como terapia es cómo llevar las moléculas dentro del organismo. Se han creado diversas maneras para superar esta barrera como modificaciones bioquímicas, uso de agentes virales como vectores y mecanismos no dependientes de vectores.

Entre los mecanismos no dependientes de vectores tenemos (Fig. 15):

- *siRNA “desnudos”*. Si RNA en solución salina u otro excipiente como dextrosa al 5%. De fácil uso y siRNA pueden ser llevados directamente al tejido, como el ojo, pulmón y sistema nervioso central que tienen la capacidad de tomarlos del medio al citoplasma.
- *Conjugados*. siRNA pueden ser conjugados a otras moléculas en la cadena pasajero o en el extremo 3’ de la cadena guía sin afectar su actividad. *In vivo* se ha demostrado silenciamiento mediante siRNA conjugado a colesterol.
- *Liposomas/lipoplexos*. Lipoplexos son partículas amorfas de ácidos nucleídos y complejos lipídicos. Liposomas y lipoplexos han sido utilizados efectivamente en llevar siRNA a las células *in vitro* e *in vivo* con resultado prometedores en ojo, sistema nervioso central y tumores. Se está investigando su uso en mucosas.
- *Péptidos y polímeros*. siRNA puede hacer complejos con péptidos y polímeros catiónicos, el más usado es polietilenimina (PEI), mediante interacciones iónicas. Y para evitar la agregación y estabilizar las moléculas se utiliza polietilen glicol (PEG). Este mecanismo ha presentado muchos beneficios en modelos *in vivo*, pero presenta una gran desventaja al ser tóxico en altas dosis.
- *Anticuerpos*. Los anticuerpos también sirven para llevar siRNA a las células mediante la unión de siRNA a protamina-anticuerpo. Esta técnica ha demostrado utilidad en modelo de tumores subcutáneos y contra HIV.

Entre los vectores usados para llevar siRNA a la célula, y producir un silenciamiento prolongado, se encuentran:

- *Vectores basados en Retrovirus*. Son buenos en introducir material genético estable dentro de células cíclicas. Se ha logrado que células infectadas produzcan RNA en horquilla (shRNA) que desencadenará el silenciamiento mediado por RNAi.
- *Vectores de Lentivirus*. Tienen un mayor rango de acción que los anteriores ya que también puede infectar a células que no están reproduciéndose y pos mitótica como las neuronas.

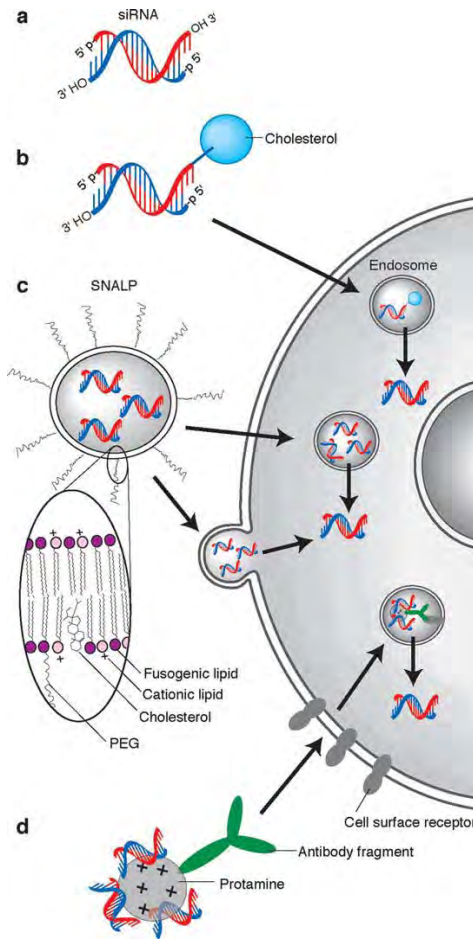


Fig.15 Mecanismo de entrada. **a)** siRNA “desnudos”, **b)** conjugado con colesterol, **c)** complejo con péptidos y polímeros, **d)** con anticuerpo (Tomado de: *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2006.8:377-402.)

- *Adenovirus*. Presenta un medio más efectivo para llevar siRNA a las células debido a que infectan un rango mayor de células, pero al no integrarse su genoma al de las células huésped producen una fuerte respuesta inmune disminuyendo su uso.
- Virus asociados a Adenovirus (AAV). Estos no causan enfermedades en los humanos e integran sus genes al genoma huésped, y a diferencia de los retrovirus y lentivirus, se insertan en regiones específicas disminuyendo el chance de mutaciones indeseadas. Se ha demostrado que puede inducir efectivamente silenciamiento tras su inyección.

Existen múltiples terapias desarrolladas a partir de RNAi e inclusive muchas se encuentran en fase pre clínica o clínica (Fig. 16). Los campos en los que se desarrollan estas terapias son descritos a continuación.

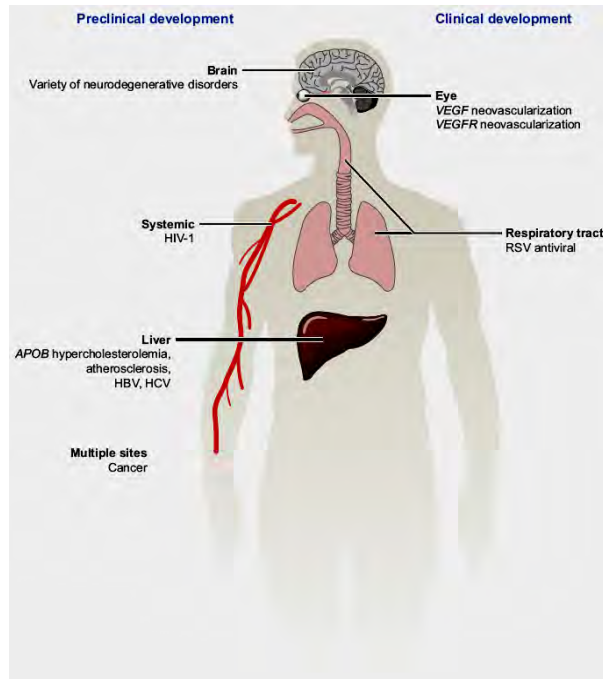


Fig. 16 Diferentes aplicaciones de RNAi. (Tomado de *Annu. Rev. Genom. Human Genet.* 2007.8:81-108)

Degeneración Macular

En la degeneración macular es una enfermedad degenerativa donde lo que existe es un aumento en el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) generando neo-formación de vasos en la retina y disminuyendo la visión. Con la inyección de siRNA “desnudos” directamente en el tejido el siRNA evita ser destruido en el torrente sanguíneo, y además, se evitan los efectos sistémicos indeseados.

El primer ensayo clínico, que envolvía alrededor de dos docenas de pacientes, fue lanzado en el 2004 con resultados prometedores: a los dos meses un cuarto de los pacientes tenían una mejor visión y en el resto se había estabilizado al menos la visión. Se espera tener drogas de RNAi para esta enfermedad en el mercado en el 2009

Cáncer

Debido a que los oncogenes son sobre expresados en los cánceres son blancos atractivos para la terapia con siRNA. Investigadores han logrado silenciar más de una docena de oncogenes, muchos solamente en cultivos celulares y muy difíciles de llevar a cabo en pacientes. Algunos modelos con ratones han demostrado efectividad en el tratamiento de algunos tumores.

En cambio, en vez de ser el protagonista en la terapia, RNAi puede ayudar a los fármacos actuales. La resistencia a fármacos es el mayor problema de la quimioterapia y gran parte está dado por la sobre expresión e una proteína llamada p-glicoproteína. En el 2004 científicos de la Universidad Imperial de Londres demostraron silenciar la proteína causante de resistencia a múltiples fármacos en leucemia, restableciendo la sensibilidad a los fármacos existentes.

En vertebrados la familia de genes miR-34 (miR-34a, miR-34b, y miR-34c) y sus ortólogos en especies invertebradas han sido relacionadas con tumores y los niveles de p53. Activación de p53 conlleva diversas respuesta en la célula que incluyen la apoptosis, detención de ciclo celular detención de la angiogénesis y activación de la reparación del DNA. Se ha demostrado de que miR-34 puede inducir detención del ciclo celular en G1 en paralelo a p21 bajo la dirección de p53. En algunos tumores con miRNA disminuidos, la inyección de miRNA disminuye la mitosis y retrasa el crecimiento celular, demostrando la implicación de miRNA en la ongénesis como supresos tumoral.

Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas es un blanco atractivo para la terapia con siRNA y de ellas la enfermedad de Huntington es la más estudiada, debido a que no existen buenos modelos animales para la enfermedad de Parkinson ni para el Alzheimer. El exceso de proteína generado por la expansión de los tripletes en el gen es el que provoca la enfermedad y en modelos la terapia ha reducido un 60% la expresión génica. Pero en también se ha visto que no solo silencia la expresión del gen afectado sino que afecta también el gen normal.

Enfermedades infecciosas

Quizás la aplicación mas prometedor de la terapia con RNAi es la de combatir las enfermedades infecciosas y como está diseñado para atacar blancos exógenos su uso no afectará a la función normal de las células. RNAi ha demostrado inhibir la infección de HIV, poliovirus, HCV en células cultivadas, se ha usado siRNA para silenciar genes del virus sincitial respiratorio y otros como HIV-1, HCV, HBV, SARS-CoV e Influenza A. En células cultivadas se ha logrado también el silenciamiento de los genes del HIV *tat*, *rev*, *nef* y *gag*, y en ratones se ha logrado reducir la replicación del HBV.

Algunos hitos importantes en la lucha contra las enfermedades infecciosas han sido: en el 2002 científicos de la Universidad de Stanford lograron controlar el virus de la hepatitis C al inyectar rápidamente y a alta presión, siRNA desnudos en ratones de laboratorio. Desde el 2005 se logró la supresión de varios genes del virus sincitial respiratorio (RSV) mediante siRNA desnudos inhalados en ratones. En el 2006 se inició el primer ensayo clínico para tratar esta enfermedad.

Agradecimientos: Agradezco a mis entrenadores Dr. Juan Ovalles, Dr. Rassull Suarez y Dra. Mariela Peña por el apoyo ofrecido, al igual que mis compañeros.

REFERENCIAS

1. Shrivastava N, Srivastava A. RNA interference: An emerging generation of biological. *Biotechnol. J.* 2008, 3, 339–353
2. Tijsterman M, Ketting R, Plasterk R. The Genetics of RNA Silencing. *Annu. Rev. Genet.* 2002.36:489-519
3. Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S, Mello C. Potent and specific genetic interference by double-strandedRNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998 VOL 391: 806-811
4. Okamura K, Lai E. Endogenous small interfering RNAs in animals. *Molecular Cell Biology*, 2008 Vol 9: 673-678
5. Kuwabara T et al. The NRSE smRNA specifies the fate of adult hippocampal neural stem cells. *Nucleic Acids Symposium Series* 2005 No. 49;87-88
6. Kim V. Small RNAs just got bigger: Piwi-interacting RNAs (piRNAs) in mammalian testes. *Genes & Dev.* 2006 20: 1993-1997
7. Girard A, Sachidanandam R, Hannon GCarmell M. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* July 2006, Vol 442
8. Heinrichs A. Argonaute on the move. *Molecular Cell Biology* Septiembre 2008 vol 9
9. Liu J, et al. Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. *SCIENCE* September 2004, Vol 305
10. Kritikou E. Endo-siRNAs truly endogenous. *Molecular Cell Biology* volume June 2008
11. Tian B, Bevilacqua P, Diegelman-Parente A, MathewsM. The Double-stranded-RNAbinding Motif: Interference and much more. *Molecular Cell Biology* 2004 vol 5;1013-1023
12. Lingel A, Sattler M. Novel modes of protein–RNA recognition in the RNAi pathway. *Current Opinion in Structural Biology* 2005, 15:107–115
13. Rana T. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Molecular Cell Biology* 2007 jan; Vol. 9:23-36
14. Zamore P. RNA interference: listening to the sound of silence. *Structural Biology* 2001, vol 8 (9):746-750
15. Bernards R. Exploring the Uses of RNAi — Gene Knockdown and the Nobel Prize. *n engl j med* 2006 355;23
16. Mello C. Return to the RNAi world: rethinking gene expression and evolution. *Cell Death and Differentiation* 2007 14, 2013–2020
17. Robb G, Brown K, Khurana J, Rana T. Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells. *Nature Structural & Molecular Biology* 2005, Vol 12 (2):133-137
18. Hutvagner G, Simard M. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Molecular Cell Biology* 2008 volume 9:22-32
19. Song J et al. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNA effector complex. *Structural Biology* 2003 Vol. 10 (12):1026-1032
20. Dykxhoorn D, Lieberman J. The Silent Revolution: RNA Interference as Basic Biology, Research Tool, and Therapeutic. *Annu. Rev. Med.* 2005.56:401-423

21. Dykxhoorn D, Lieberman J. Running Interference: Prospects and Obstacles to Using Small Interfering RNAs as Small Molecule Drugs. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2006.8:377-402.
22. Dillon C et al. RNAi as an Experimental and Therapeutic Tool to Study and Regulate Physiological and Disease Progress. *Annu. Rev. Physiol.* 2005. 67:147-73
23. Brennecke J et al. Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in *Drosophila*. *Cell* March 2007, vol.128: 1089-1103
24. NOVA, ScienceNow, RNAi, PBS.
25. <http://www.pbs.org/wgbh/nova/sciencenow/3210/02.html>
26. Stevenson M. Therapeutic Potential of RNA Interference. *N Engl J Med* 2004; 351:1772-7.
27. He X, He L, Hannon G. The Guardian's Little Helper: MicroRNAs in the p53 Tumor Suppressor Network. *Cancer Res* 2007; 67: (23): 11099-11101
28. Martin S, Caplen N. Applications of RNA Interference in Mammalian Systems. *Annu. Rev. Genom. Human Genet.* 2007 .8:81-108
29. Marsden P. RNA Interference as Potential Therapy — Not So Fast. *New England Journal of Medicine* 2006, 355;9
30. Mahy B. Therapeutic RNA? *Rev. Med. Virol.* 2005; 15: 349-350.