

Teoretyczne i praktyczne aspekty zjawiska interferencji RNA

BEATA HUKOWSKA-SZEMATOWICZ, WIESŁAW DEPTUŁA

Katedra Mikrobiologii i Immunologii Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Szczecińskiego,
ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin

Hukowska-Szematowicz B., Deptuła W.

Theoretical and practical aspects of the RNA interference phenomenon

Summary

The discovery of the RNA interference phenomenon proved to be a significant breakthrough in determining the mechanism in which the flow of genetic information is controlled. Apart from dsRNA and siRNA, also microRNA molecules are involved in the process. Current data prove that the phenomenon of RNA interference will open new perspectives in the therapy of numerous diseases, including metabolic, cancer, neurodegenerative and viral ones.

Keywords: RNA interference phenomenon, double-stranded RNA (dsRNA), microRNA (miRNA), small interfering RNA (siRNA)

Rozwój biologii molekularnej i bioinformatyki stworzył nowe możliwości poznania mechanizmów rządzących procesem ekspresji informacji genetycznej. W ostatnich latach nastąpił bardzo burzliwy rozwój badań molekularnych u różnych gatunków zwierząt. Dzięki takim badaniom udało się poznać, między innymi, genom psa i ustalić, że zawiera on ponad 19 tysięcy genów (16, 18), podczas gdy ludzki genom zawiera około 25 tysięcy genów. Każda komórka wykorzystuje tylko niewielką część tych genów, a sekwencje kodujące białka stanowią jedynie niewielką część materiału genetycznego. O tym, który z genów wytworzy swoje białko, decyduje proces transkrypcji, czyli przełożenie informacji z DNA na matrycowy RNA (mRNA – messenger RNA), w wyniku czego powstała cząsteczka mRNA jest komplementarna do jednej nici DNA. Laureaci Nagrody Nobla z 1962 r., Francis Crick i James Watson, taki przepływ informacji genetycznej od DNA przez mRNA do białka nazwali podstawowym dogmatem biologii molekularnej.

W artykule omówiono zjawisko interferencji RNA w aspekcie teorii i praktyki. I choć większość badań zmierza do wykorzystania zjawiska interferencji RNA w terapii chorób u ludzi, to ze względu na podobieństwo genomów ssaków, np. genomu psa i człowieka – 80%, genomu myszy i człowieka – 85-90% (18), badania te mogą przybliżyć podłoże genetyczne wielu chorób występujących także u zwierząt, takich jak: nowotwory, alergie, infekcje wirusowe.

Mechanizm interferencji RNA

Początki odkrycia zjawiska interferencji RNA (RNAi – RNA interference) sięgają 1990 r., kiedy to grupa badaczy z Uniwersytetu w Arizonie przeprowadzając eksperyment, mający na celu wyhodowanie odmiany petunii ogrodowej (*Petunia hybrida*) o kwiatach ciemniejszych od odmiany pospolitej poprzez wprowadzenie do komórek roślinnych dodatkowej kopii genu kodującego enzym odpowiedzialny za syntezę fioletowego barwnika, otrzymali petunie o kwiatach barwy jaśniejszej od pospolitej (24). Tak więc, w niezrozumiały (w tamtym czasie) sposób doszło do zahamowania syntezy barwnika. Postanowiono więc zmierzyć w komórce petunii poziom mRNA genu, kodującego pigment i okazało się, że był on bardzo niski. Zaobserwowane wówczas zjawisko wyciszenia genu określono kosupresją (24), jednak sam mechanizm tego zjawiska w tym czasie pozostał zagadką. Dopiero na początku 1998 r. na łamach czasopisma *Nature* (11) Andrew Z. Fire i Craig C. Mello opisali molekularny mechanizm tego efektu, nazwany interferencją RNA (RNAi), za co uhonorowano ich w 2006 r. Nagrodą Nobla w zakresie biologii i medycyny. W wyjaśnieniu zasług obu nagrodzonych Komisja Noblowska pokreśliła, że dzięki ich badaniom i odkryciom poznano fundamentalny mechanizm kontroli przepływu informacji genetycznej. Amerykańscy nobliści odkrycia zjawiska interferencji dokonali pracując nad regulacją ekspresji genów u nicienia *Caenor-*

habditis elegant (11). Zaobserwowali oni, że wprowadzenie dwuniciowego RNA (dsRNA – double-stranded RNA) o długości 20 nukleotydów do komórek nicienia wycisza ekspresję genu, którego mRNA zawiera sekwencję komplementarną do wprowadzonego dsRNA, co w konsekwencji wywołuje taki sam efekt, jak wprowadzenie do komórek roślinnych dodatkowych kopii RNA, powodując wyciszenie genu. Okazało się, że u podłoża tych obu zjawisk leży ten sam mechanizm, a dsRNA jest w stanie wyciszyć geny (6, 11). Stąd interferencję RNA (RNAi) zdefiniowano jako wyciszenie, wyłączenie ekspresji genu za pomocą dwuniciowego RNA (6) i określono, że jest to proces, w którym dochodzi do degradacji w komórkach organizmów (zwierząt, roślin) wybranych cząsteczek RNA (17). W przypadku ssaków efekt interferencji nie rozprzestrzenia się na cały organizm, a pozwala jedynie na wyciszenie określonego genu w hodowli tkankowej komórek ssaczych, zaś u roślin i nicieni obejmuje cały organizm i może być przekazywany potomstwu.

Omawiając procesy składające się na mechanizm interferencji RNA należy stwierdzić, że dzieli się on na dwa etapy: inicjacyjny oraz efektorowy (6, 13, 33). W inicjacyjnym, przebiegającym w cytoplazmie cząsteczka dsRNA zostaje pocięta przez enzym o nazwie Dicer na fragmenty o długości 21-23 nukleotydów, nazwane małymi interferującymi RNA (siRNA – small interfering RNA). W etapie drugim – efektorowym, przebiegającym w cytoplazmie lub jądrze siRNA, przyłączają się do kompleksu białek – RISC (RNA-Induced Silencing Complex) i ulegają rozpleceniu do jednoniciowych siRNA, gdyż jedna nić jest eliminowana, a druga nić siRNA pozostaje w kompleksie RISC i służy jako sonda rozpoznająca komplementarne cząsteczki RNA (6, 13, 33). Jeżeli aktywny kompleks RISC, złożony z jednoniciowego siRNA i białka pozostaje w cytoplazmie, to wiąże się na zasadzie regionów komplementarnych z mRNA i jeżeli ta komplementarność jest pełna, to dochodzi do cięcia tego kompleksu w połowie utworzonego dupleksu mRNA/siRNA (13). W efekcie cała pula mRNA zostaje eliminowana, jako że stan taki uniemożliwia dalszy przepływ informacji genetycznej z mRNA do białka i proces ten nazwano potranskrypcyjnym wyciszaniem genów (PTGS – Post-Transcriptional Gene Silencing) (6, 13). Jeżeli jednak mRNA jest tylko częściowo komplementarny do nici siRNA, związanej z kompleksem RISC, wtedy nie ulega on zniszczeniu, ale pozostaje związany z kompleksem RISC, co stanowi swojego rodzaju blokadę dla mRNA, które nie może służyć jako matryca do syntezy białka (6, 13). W takiej sytuacji dochodzi do wyciszenia genów na poziomie translacji. Trzeci z kolei mechanizm z udziałem kompleksu RISC mówi, że może się on przedostać do jądra komórkowego i oddziaływać z komplementarnymi do nici siRNA fragmentami genomu, w wyniku czego dochodzi do zależnej od RNA metylacji DNA. Efektem tego

jest przekształcenie euchromatyny w heterochromatynę i zablokowanie aktywności genu, co nazywano transkrypcyjnym wyciszaniem genów (TGS – Transcriptional Gene Silencing) (6, 13).

Cząsteczki RNA uczestniczące w interferencji

Początkowo wszystkie zidentyfikowane krótkie cząsteczki RNA odpowiedzialne za regulację procesu ekspresji informacji genetycznej określano mianem krótkich interferujących RNA (siRNA – small interfering RNA) (31). Jednak szczegółowe analizy wykazały, że siRNA różnią się między sobą biogenezą i sposobem działania i stąd wśród siRNA wyodrębniono: mikroRNA (miRNA) – małe fragmenty RNA kodowane w genomie, pełniące funkcje regulatorowe, występujące u roślin i zwierząt; rasiRNA (rasiRNA – repeat-associated small interfering RNA) – krótkie interferujące RNA, związane z sekwencjami powtórzeniowymi, występujące tylko u roślin oraz tasiRNA (tasiRNA – transacting small interfering RNA) – krótkie interferujące RNA działające *in trans* oraz egzogenne siRNA (31).

MikroRNA stanowią najliczniejszą grupę krótkich regulatorowych RNA i są to cząsteczki określane jako elementy do „zadań specjalnych” (2, 5, 6, 20). Są to krótkie jednoniciowe cząsteczki RNA o długości 21-23 nukleotydów, występujące u zwierząt kręgowych i bezkręgowych oraz roślin, jednak ich proces dojrzewania jest różny i zależy od typu komórek (5). Rola miRNA polega na obniżeniu ekspresji genów na etapie translacji (20). U ludzi wyróżnić można trzy etapy tworzenia miRNA, gdzie w ostatnim etapie, podobnie jak w przypadku siRNA, udział bierze białko Dicer, a miRNA jest także włączany do kompleksu RISC i hamuje translację lub degraduje docelowe mRNA. Wykazano, że około 2% znanych genów ludzkich koduje miRNA (2). U roślin miRNA bierze udział w regulacji podstawowych procesów życiowych, jak rozwój kwiatów, nadawanie liściom odpowiedniego kształtu (34). U zwierząt miRNA bierze udział w wielu ważnych procesach (tab. 1) (2). Pierwszą i najlepiej poznaną cząsteczką miRNA była ta, którą poznano u nicienia (*Caenorhabditis elegant*) i nazwano lin-4 miRNA (2, 5). Następnie cząsteczki te poznano także u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*), ryby (*Danio rerio*) oraz myszy (*Mus musculus*) (2, 5). U muszki owocowej miRNA stymuluje proliferację apoptozy poprzez blokowanie ekspresji proapoptycznego genu *hid* (2). Podwyższona ekspresja miRNA u muszki owocowej prowadzi do przerostu skrzydeł i oczu, natomiast brak ekspresji tej cząsteczki powoduje powstanie osobników o zredukowanej liczbie komórek (2).

Udowodniony we wcześniejszych badaniach udział cząsteczek miRNA w wielu ważnych procesach życiowych stał się przyczyną do rozpoczęcia poszukiwania powiązania miRNA z patogenezą chorób nowotworowych (20). Badania wykazały, że miRNA

Tab. 1. Funkcja mikroRNA (miRNA) *in vivo* u człowieka i zwierząt (2)

Organizm	miRNA	Funkcja miRNA
Człowiek i inne naczelne	miRNA-32	obrona przeciwwirusowa
Nicień (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	lin-4 miRNA, let-7 miRNA, miRNA-48, miRNA-84, miRNA-241, miRNA-84	różnicowanie komórek pnia
	lisy-6miRNA, miRNA-273	różnicowanie lewej części ciała
Muszka owocowa (<i>Drosophila melanogaster</i>)	bantam miRNA	proliferaacja komórek organizmu, programowana śmierć komórki
	miRNA-14	programowana śmierć komórki
	miRNA-2, miRNA-6, miRNA-11, miRNA-13	embriogeneza
Danio przęgowany (<i>Danio rerio</i>)	miRNA-430	neurogeneza
Mysz domowa (<i>Mus musculus</i>)	miRNA-1	angiogeneza
	miRNA-181	hematopoeza
	miRNA-375	egzocytoza

mają zdolność regulowania ekspresji licznych onkogenów i genów supresorowych, ale, co bardzo ważne, same także mogą działać jako onkogeny i supresory (20).

Na temat kolejnych klas cząsteczek uczestniczących w interferencji RNA – rasiRNA, tasiRNA oraz egzogenicznych siRNA – wiemy niewiele. Opisano je u rośliny *Arabidopsis thaliana* (12, 25, 30, 31). Cząsteczki rasiRNA biorą udział w obronie przeciwwirusowej u roślin, prowadząc do wyciszenia genów wirusowych (12), zaś tasiRNA u roślin funkcjonują podobnie jak miRNA u zwierząt, pełniąc funkcję negatywnych regulatorów ekspresji genów, w szczególności tych, których produkty uczestniczą w różnych procesach rozwojowych oraz w sytuacjach stresu u roślin (31).

Terapeutyczne aspekty zjawiska interferencji RNA

Ze zjawiskiem interferencji RNA od momentu jego odkrycia wiązano bardzo duże nadzieje, ponieważ terapia oparta na tym zjawisku wykorzystywałaby naturalne procesy komórkowe (6). Wykazano, że zjawisko interferencji RNA pozwala bronić się przed infekcjami wirusowymi u ludzi, zwierząt i roślin (10, 17). Za silnych induktorów tego zjawiska uważa się wirusy RNA np.: wirusa zapalenia wątroby typu C, wirusa zapalenia wątroby typu B, retrowirusy oraz wirusy DNA np.: wirus cytomegalii, wirus Epstein-Barr (10). Jednak, jak się okazuje, zjawisko interferencji RNA w zainfekowanej komórce ssaka nie daje gwarancji jej obrony przed infekcją wirusową. Dzieje się tak, ponieważ wirusy w toku ewolucji wykształciły w sobie liczne mechanizmy chroniące wirusowe RNA przed degradacją. Dowiedziono, że wirusy mogą,

z jednej strony, zapanować nad procesami komórkowymi produkując własne miRNA, z drugiej strony – w genomie gospodarza może być kodowane miRNA, które hamuje replikację wirusa (10). Opisano kilka przypadków obrazujących takie strategie działania wirusa z udziałem miRNA, np. miRNA ludzkiego herpeswirusa KSHV (Kaposi's sarkoma-associated virus – wirus mięsaka Kaposiego) odgrywa istotną rolę w powstaniu i utrzymaniu utajonej infekcji oraz indukuje ontogenezę; z kolei wirus HCV (hepatitis C virus – wirus zapalenia wątroby typu C) do swojej replikacji wymaga tkankowo-specyficznego miRNA (mir-122), który występuje w komórkach wątroby (10). Ostatni z wymienionych przykładów ma ogromne znaczenie dla lepszego poznania molekularnych uwarunkowań procesu replikacji i opracowania skutecznych sposobów leczenia HCV i HBV. W przypadku wirusa HBV (hepatitis B virus – wirus zapalenia wątroby typu B) oprócz hamowania inicjacji replikacji tego wirusa w zakażonych liniach komórkowych (22), udało się już opracować (35) metody hamowania jego replikacji w komórkach ssaczy przy zastosowaniu rekombinowanych siRNA.

Jak wykazały najnowsze badania, mechanizmy związane z wyciszaniem RNA mają udział w patofizjologii zakażeń wirusowych wywoływanych przez wirusy z rodziny *Retroviridae*, co obrazują wirus HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1 – wirus zespołu nabytego braku odporności) oraz wirus PFV-1 (primate foamy virus type 1 – spumawirus naczelných typu 1) (2, 29). Wykazano, że miRNA hamuje replikację wirusa HIV-1 w obwodowych jednojądrzastych komórkach krwi ludzkiej pochodzącej od zainfekowanych wirusem HIV-1 dawców oraz w przetrwale zakażonych liniach komórkowych. Z drugiej strony, dowiedziono, iż wirus HIV-1 ma zdolność hamowania ekspresji miR-17/92, a supresja taka jest niezbędna do jego efektywnej replikacji (29). W przypadku wirusa PFV-1 (2) wykazano, że ludzkie komórkowe miRNA (miRNA-32) efektywnie ogranicza replikację tego retrowirusa w zakażonych nim liniach komórkowych HeLa. Z drugiej jednak strony, wirus ten nabył zdolność blokowania wyciszania genów na drodze interferencji RNA, co realizuje poprzez kodowanie białka TAS, które jest supresorem miRNA w komórkach ssaków. Rolę dwuniciowych cząsteczek RNA (dsRNA) w indukcji odporności przeciwwirusowej opisano u krewetek (*Litopenaeus vannamei*) (26). Bezkręgowcom tym podano cztery różne typy sekwencji dsRNA pochodzące od kaczki, świni, ryby i bakterii, a następnie zakażono je wirusem z rodziny *Nimaviridae* WSSV (White spot syndrome virus) i wirusem z rodziny *Dicistroviridae* TSV (Taura syndrome virus). Wyniki badań wykazały, że każda użyta w doświadczeniu sekwencja dsRNA skutecznie indukowała u krewetek ochronę przeciwko wirusom WSSV i TSV (26). Kolejny przykład zastosowania zjawiska interferencji RNA w zapobieganiu chorobom wirusowym zapre-

zentował w 2005 r. zespół Bai (7). W swoich badaniach wykazali, że siRNA hamują *in vitro* replikację mysiego wirusa zachodniego Nilu WNV (West Nile Virus) (7). Jak uważają autorzy, wyniki tych badań są bardzo obiecujące i rokuje nowe strategie w walce z wirusem Zachodniego Nilu. Między innymi z tego także powodu głównym celem trwających aktualnie badań jest opracowanie jak najbardziej efektywnych sposobów podawania cząsteczek dsRNA chorym pacjentom. W przypadku chorób wirusowych, dsRNA wprowadzone we wczesnym etapie infekcji mogłyby skutecznie zredukować ilość cząsteczek wirusa w zainfekowanym organizmie do momentu, w którym odpowiedź immunologiczna gospodarza mogłaby skutecznie niszczyć wirusa i zapobiegać rozwojowi choroby (1, 7). Również metodę tę jako nową strategię w walce z wirusem grypy typu A (podtyp H5N1, H7N7 i H9N2) przedstawił zespół Epstein (28). Wykazano, że małe interferujące cząsteczki RNA są w stanie skutecznie obniżyć poziom wirusa grypy w płucach zakażonych myszy, a ponadto cząsteczki te są zdolne do skutecznej ochrony myszy przed wysoce patogennym wirusem ptasiej grypy typu A (podtyp H5 i H7).

Prowadzone badania nad zastosowaniem interferencji RNA wskazują, że w przyszłości interferencja RNA może stać się obiecującym narzędziem także w kontroli wielu infekcji wirusowych u zwierząt domowych i hodowlanych o bardzo dużym znaczeniu ekonomicznym. Wirusowo specyficznego siRNA użyto do hamowania replikacji takich wirusów, jak: ptasiego herpeswirusa AHV-1 (Anatid herpes virus-1) (21), kociego wirusa niedoboru immunologicznego FIV (Feline immunodeficiency virus) (4), świńskiego wirusa powodującego zespół rozrodczo-oddechowy PRRS (Porcine reproductive and respiratory syndrome) (14), wirusa biegunki bydła i choroby błon śluzowych BVDV (Bovine viral diarrhoea virus) (8) oraz wirusa przyszczy FMDV (Foot-and-mouth disease virus) (15, 32).

Ze względu na fakt, że nowotwory stanowią bardzo istotny problem nie tylko u ludzi, ale i u licznych zwierząt, takich jak: pies, kot, koń, mysz, chomik, szczur, świnka morska, zastosowanie zjawiska interferencji RNA w terapii tych chorób otwiera nowe możliwości zapobiegania im poprzez wykorzystanie siRNA do wyciszenia ekspresji genów nowotworowych oraz zastosowanie miRNA w terapii chorób nowotworowych (19, 20, 27). Wykazano, że inhibicja miRNA prowadziła *in vitro* do obniżenia proliferacji komórek nowotworowych w przypadku raka prostaty (w liniach komórkowych PC-3) oraz raka szyjki macicy (w liniach komórkowych HeLa) (20). Na podstawie poziomu ekspresji miRNA można diagnozować inne liczne choroby nowotworowe. W przypadku glejaków obserwowano wzrost ekspresji miRNA-21, przy nowotworach płuc wzrost ekspresji miRNA-155 i miRNA-17-92, rak jelita grubego powodował obniżenie ekspresji miRNA-143 i miRNA-145, zaś w przypadku raka piersi stwierdzono obniżenie ekspresji

miRNA125-1, miRNA125-2, miRNA-145, a wzrost miRNA-21. W chorobach nowotworowych, takich jak chłoniak Burkitta i chłoniak Hodgkina rejestrowano wzrost ekspresji miRNA-155 (20). Dodać należy także, że dzięki odkryciu zjawiska interferencji RNA u myszy udało się „wyciszyć” gen odpowiedzialny za podwyższony poziom cholesterolu, a rokowania są na tyle optymistyczne, że, być może, w przyszłości uda się wprowadzić je u ludzi, zapobiegając w ten sposób chorobom serca. Ponadto trwają intensywne badania nad zastosowaniem zjawiska interferencji RNA w terapii chorób układu oddechowego oraz chorobach immunologicznych u ludzi i zwierząt (9, 33).

Wyciszanie genów za pomocą zjawiska interferencji RNA może znaleźć również zastosowanie w ksenotransplantologii (23). W związku z ustawicznym brakiem narządów do przeszczepów alogenicznych prowadzi się próby wykorzystania narządów świni domowej, która może być idealnym źródłem obcopolnych narządów. Jednak istotną przeszkodę w tej kwestii stanowią endogenne patogeny wirusowe bytujące w organizmie świni. Do takich wirusów należą, między innymi, retrowirusy świń PERV (Porcine endogenous retrovirus), które ulegają ekspresji i wykazują zdolność do infekowania komórek człowieka w warunkach *in vitro*, wirus PLHV (Porcine lymphotropic herpesvirus), wirus PCMV (Porcine cytomegalovirus) oraz wirus PCV (Porcine circovirus) (23). Stąd też w ostatnim czasie oprócz prób selekcji osobników nie będących nosicielami PERV, sięgnięto do rozwiązania tego problemu przy zastosowaniu zjawiska interferencji RNA. W wyniku badań (23) otrzymano siRNA, które eliminowały cząsteczki wirusowe PERV w zakażonej nimi hodowli komórkowej, a rezultaty badań potwierdzają skuteczność zastosowania interferencji RNA w rozwiązywaniu problemów zakażeń wirusowych w ksenotransplantacji.

Ponadto trwają badania nad ewentualnym wykorzystaniem siRNA do produkcji farmaceutyków do leczenia starczego zwyrodnienia płamki, grypy, astmy, przewlekłych infekcji płuc, idiopatycznego zwłóknienia płuc, syndromu AIDS, choroby Parkinsona, choroby Huntingtona, mukowiscydozy oraz chorób skóry (3).

Podsumowanie

Już od momentu odkrycia zjawiska interferencji RNA wiązano z nim duże nadzieje. Dziś już wiadomo, że ten sposób wyciszenia genów ma ogromne znaczenie, a dokładne poznanie jego mechanizmów w przyszłości może pozwolić na kontrolowanie rozwoju infekcji lub modulowanie ich przebiegu głównie w zakażeniach wirusowych u ludzi i zwierząt. Ponadto zjawisko to będzie można wykorzystać w terapii chorób metabolicznych, nowotworowych i neurodegeneracyjnych. Cząsteczki dsRNA, siRNA i miRNA są obecnie uważane za „materiał” o ogromnym potencjale aplikacyjnym, a, jak wypowiadają się badacze,

doświadczenia związane z wykorzystaniem ich w praktyce zmierzają we właściwym kierunku.

Piśmiennictwo

1. *Aigner A.*: Delivery systems for the direct application of siRNAs to induce RNA interference (RNAi) in vivo. *J. Biomed Biotechnol.* 2006, 71659, 1-15.
2. *Alvarez-Garcia I., Miska E. A.*: MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 2005, 132, 4653-4662.
3. *Appasahi K.*: RNA Interference Technology: From basic science to drug development. Cambridge University Press, Cambridge 2005.
4. *Baba K., Mizukoshi F., Goto-Koshino Y., Setoguchi-Mukai A., Fujino Y., Ohno K., Tsujimoto H.*: Application of RNA interference for inhibiting the replication of feline immunodeficiency virus in chronically infected cell lines. *Vet. Microbiol.* 2007, 120, 207-216.
5. *Bartel D. P.*: MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism and function. *Cell* 2004, 116, 281-297.
6. *Bak D.*: RNAi – interferencja RNA – skuteczny sposób na ciszę. *Post. Bioch.* 2003, 49, 136-146.
7. *Bai F., Wang T., Pal U., Bao F., Gould L. H., Fikrig E.*: Use of RNA interference to prevent lethal murine West Nile Virus infection. *J. Infect. Dis.* 2005, 191, 1148-1154.
8. *Daisuke Y., Kentaro K., Yukinobu T., Hiroomi A.*: The double-stranded RNA-induced apoptosis pathway is involved in the cytopathogenicity of cythopathogenic Bovine viral diarrhea virus. *J. Gen. Virol.* 2006, 87, 2961-2970.
9. *Dreyfus D. H., Ghoda L.*: A review of recent patents concerning therapy of respiratory diseases using gene silencing by RNAi (RISC) and EGS (RNase P). *Recent Pat. Inflammation Allergy Drug Discovery* 2007, 1, 49-55.
10. *Figlarowicz M., Tyczewska A., Figlarowicz M.*: Wpływ małych regulatorowych RNA na przebieg zakażeń wirusowych – nowe strategie leczenia zakażeń HCV. *Przegl. Epidemiol.* 2006, 60, 693-700.
11. *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.
12. *Hamilton A., Voinnet O., Chappell L., Baulcombe D.*: Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* 2002, 21, 4671-4679.
13. *Hannon G. J.*: RNA interference. *Nature* 2002, 11, 244-251.
14. *He Y. X., Hua R. H., Zhou Y. J., Qiu H. J., Tong G. Z.*: Interference of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication on MARC-145 cells using DNA-based short interfering RNAs. *Antiviral Res.* 2007, 74, 83-91.
15. *Kahana R., Kuznetzova L., Rogel A., Shemesh M., Hai D., Yadin H., Stram Y.*: Inhibition of foot-and mouth disease virus replication by small interfering RNA. *J. Gen. Virol.* 2004, 85, 3213-3217.
16. *Kirkness E. F., Bafna V., Halpern A. L.*: The dog Genome: Survey Sequencing and comparative analysis. *Science* 2003, 301, 1898-1903.
17. *Lehmann P.*: Wyciszenie RNA; naturalny sposób obrony roślin przeciw infekcji wirusowej. *Post. Biol. Komórki* 2003, 30, 75-86.
18. *Lindblad-Toh K., Wade C. M., Mikkelsen T. S.*: Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 2005, 438, 803-819.
19. *Majorek M., Guzenda P., Lamparska-Przybysz M., Wieczorek M.*: Krótkie interferujące RNA w onkologii. *Współczesna Onkologia* 2006, 10, 367-371.
20. *Majorek K., Krzyżosiak W. J.*: Rola mikroRNA w patogenezie, diagnostyce i terapii nowotworów. *Współczesna Onkologia* 2006, 10, 359-366.
21. *Mallanna S. K., Rasool T. J., Sahay B., Aleyas A. G., Ram H., Mondal B., Nautiyal B., Premraj A., Sreekumar E., Yadav M. P.*: Inhibitions of Anatis Herpes Virus-1 replication by small interfering RNAs in cell culture system. *Virus Res.* 2006, 115, 192-197.
22. *McCaffrey A. P., Nakai H., Pandey K., Huang Z., Salazar F. H., Xu H., Wieland S. F., Marion P. L., Kay M. A.*: Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 2003, 21, 639-644.
23. *Miyagawa S., Nakatsu S., Nakagawa T., Kondo A., Matsunami K., Hazama K., Hamada J., Tomonaga K., Miyazawa T., Shirakura R.*: Prevention of PERV infections in pig to human xenotransplantation by the RNA interference silences gene. *J. Biochem.* 2005, 137, 503-508.
24. *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.
25. *Peragine A., Yoshikawa M., Wu G., Albrecht H. W., Poethig R. S.*: SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev.* 2004, 18, 2368-2379.
26. *Robalino J., Browdy C. L., Priori S., Metz A., Parnell P., Gross P., Warr G.*: Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *J. Virol.* 2004, 78, 10442-10448.
27. *Takeshita F., Ochiya T.*: Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci.* 2006, 97, 689-696.
28. *Tompkins S. M., Lo Ch. Y., Tumpey T. M., Epstein L.*: Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *PNAS* 2004, 101, 8682-8686.
29. *Triboulet R., Mari B., Lin Y. L.*: Suppression of microRNA-Silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science* 2007, 315, 1579-1582.
30. *Vasquez F., Vaucheret H., Rajagopalan R., Lepers C., Gascioli V., Mal-lory A., Hilbert J. L., Bartel D. P., Crete P.*: Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis miRNAs. *Mol. Cell.* 2004, 16, 69-79.
31. *Warkocki Z., Figlarowicz M.*: Krótkie interferencyjne RNA działające in trans. *Post. Bioch.* 2006, 52, 253-259.
32. *Weizao Ch., Weiyao Y., Du Q., Liang F., Mingqiu L., Zheng N., Zutian S., Zhaoxin Z.*: RNA interference targeting VP1 inhibit Foot-and Mouth disease virus replication in BHK-21 cells and suckling mice. *J. Virol.* 2004, 78, 6900-6907.
33. *Wesołowska A.*: Wykorzystanie małych interferujących RNA do hamowania ekspresji genów w komórkach ssaków. *Post. Biol. Komórki* 2004, 31, 35-46.
34. *Wiśniewska A., Filipecki M.*: Wyciszenie genów jako strategia badania ich funkcji w roślinach. *Post. Biol. Komórki* 2003, 30, 339-358.
35. *Wu K., Gong Y., Zhang X., Zhang Y., Mu Y., Liu F., Song D., Zhu Y., Wu J.*: Inhibition of hepatitis B virus replication by recombinant small interfering RNAs. *Acta Virol.* 2005, 49, 235-241.

Adres autora: dr Beata Hukowska-Szematowicz, ul. Z. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin; e-mail: beatahukowska@poczta.onet.pl