

Viaggio tra le molecole di un microcosmo in espansione

I meccanismi molecolari responsabili del silenziamento genico
si sono evoluti per difendere il genoma dagli invasori
e stanno diventando armi di precisione al servizio della ricerca

CARLO COGONI

L GENOMA DI UN ORGANISMO può essere considerato come una banca dati contenente tutte le informazioni che specificano la costruzione dell'organismo stesso. Queste banche dati sono potenziali bersagli per l'invasione di elementi estranei, come i virus e gli elementi trasponibili, che sono in grado di inserirsi all'interno del genoma dell'ospite e di aumentare di numero, così da massimizzare la possibilità di essere trasmessi alla progenie durante la riproduzione. Questi invasori molecolari non sono innocui: la loro presenza minaccia in diversi modi l'integrità delle informazioni contenute nel genoma. Nel processo di integrazione e moltiplicazione, per esempio, si possono inserire all'interno dei geni impedendone il normale funzionamento. Inoltre la presenza di questi elementi ripetuti in migliaia di copie facilita processi di ricombinazione che mettono a repentaglio la stabilità del genoma. Il genoma umano, per esempio, consiste per circa il 40% di sequenze ripetitive, che rappresentano il retaggio di passate invasioni a opera di elementi trasponibili e virus, divenuti ormai in gran parte inattivi. Vista l'abbondanza e la distribuzione ubiquitaria degli invasori molecolari, è logico attendersi che gli organismi abbiano sviluppato sistemi di difesa nei loro confronti per evitare che il contenuto informativo del genoma sia pesantemente compromesso. Un meccanismo efficace di difesa dovrebbe essere in grado di riconoscere gli invasori e impedirne l'espressione, cioè di bloccare la loro capacità di moltiplicarsi.

Negli ultimi dieci anni è emerso un nuovo fenomeno, definito come silenziamento genico mediato da RNA, che ha tutte le caratteristiche di un meccanismo di difesa del genoma. Questo meccanismo è conservato tra specie evolutivamente molto distanti tra loro e appartenenti ai tre diversi regni animale, vegetale e fungino, il che lascia supporre una sua origine evolutiva molto antica¹. Il fenomeno è stato scoperto indipendentemente in organismi diversi e per questo all'inizio è stato chiamato con nomi differenti: nelle piante ha preso il nome di silenziamento post-trascrizionale, nei funghi è stato battezzato *quelling* (dall'inglese *to quell*, cioè reprimere) e negli animali è stato denominato interferenza da RNA (o RNA interference, RNAi).

Sebbene esistano piccole varianti tra i diversi sistemi, il meccanismo è basato sulla capacità delle cellule eucariotiche di riconoscere le molecole di RNA a doppio filamento (dsRNA) come molecole estranee. Infatti molti degli elementi invasori che minacciano il genoma, per



MIKE BUXTON, PAPILLO / CORBIS / CONTRASTO

Uovo e larva del verme *Caenorhabditis elegans*.

esempio molti virus, hanno come intermedio obbligato nel loro ciclo di replicazione una molecola di dsRNA. La necessità di produrre queste molecole può essere dunque considerato il tallone d'Achille degli invasori, perché segnala alla cellula la loro presenza e attiva una risposta di difesa.

Possiamo ipotizzare che il primo passo nell'evoluzione di questo meccanismo di difesa sia stata la comparsa di enzimi capaci di riconoscere e degradare le molecole di RNA a doppio filamento e quindi di interferire direttamente con la replicazione virale. Questo compito è svolto da enzimi ad attività RNA-sica della famiglia Dicer, che sono in grado di riconoscere e demolire in modo specifico il dsRNA, riducendolo in piccoli frammenti di circa 21 nucleotidi². Tuttavia, benché l'attività di questi enzimi possa avere una certa azione antivirale diretta, l'efficienza di tale azione appare piuttosto limitata, in quanto solo i virus che si trovano nella forma intermedia a dsRNA sono possibili bersagli, mentre le particelle virali in qualsiasi altra fase del ciclo di replicazione non possono essere né riconosciute né inattivate.

La grande svolta, che ha accresciuto in modo straordinario l'efficienza del sistema, si è avuta con l'evoluzione della capacità di usare i piccoli RNA prodotti dall'idrolisi del dsRNA come molecole guida, per riconoscere e degradare in modo specifico altre molecole di RNA di origine virale, come per esempio gli RNA messaggeri (mRNA) dei virus. La dimensione dei piccoli RNA prodotti da Dicer, pari a 21 nucleotidi, è largamente sufficiente per avere un'assoluta specificità di riconoscimento attraverso l'appaiamento con molecole di RNA che abbiano sequenze del tutto complementari. Infatti, una qualsiasi sequenza di 21 nucleotidi è statisticamente rappresentata una sola volta in una sequenza di 4.000 miliardi di nucleotidi generata in modo casuale; la sequenza quindi è praticamente unica anche in genomi grandi come quello umano, che contiene circa 3 miliardi di coppie di basi. Il considerevole vantaggio offerto da questo sistema di degradazione sequenza-specifico è che, partendo da poche molecole di dsRNA, possono essere prodotte centinaia di piccoli RNA, in grado di indurre la degradazione efficiente di numerose molecole di RNA virale.

I piccoli RNA, detti con un acronimo inglese siRNA (short interfering RNA o corti RNA interferenti), non sono in grado di per sé di degradare le molecole di RNA omologhe, ma sono incorporati in un grande complesso multiproteico detto RISC (RNA induced silencing complex o complesso del silenziamento indotto da RNA). Tale complesso svolge diverse attività enzimatiche, tra cui l'attività di RNA elicasi, che facilita il riconoscimento tra i piccoli RNA e l'RNA bersaglio, e l'attività di taglio (idrolisi) dell'RNA bersaglio. Diversi studi biochimici e gene-

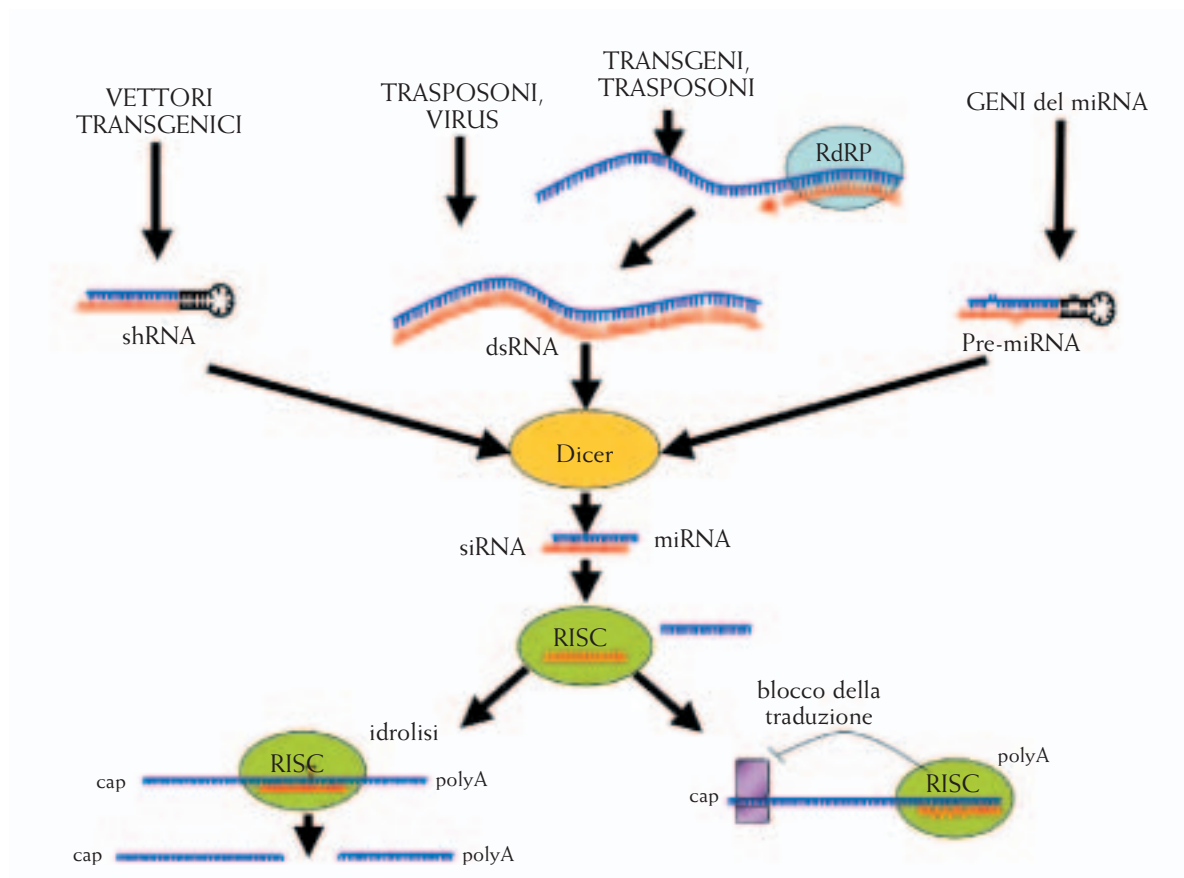
tici hanno mostrato che il complesso RISC è molto conservato nei diversi organismi. Le sue componenti centrali sono le proteine della famiglia Argonata, che si legano direttamente ai piccoli RNA e li alloggiavano in un solco presente sulla proteina stessa³. In questo solco si viene anche a trovare la molecola di RNA bersaglio appaiata con il piccolo RNA. A questo punto, la medesima proteina taglia (idrolizza) la molecola di RNA bersaglio nella regione in cui è appaiata al piccolo RNA. È interessante notare che il piccolo RNA non viene idrolizzato insieme all'RNA bersaglio e quindi può essere utilizzato come molecola guida in successivi cicli di idrolisi. Il cospicuo numero di piccoli RNA prodotti da una singola molecola di dsRNA, insieme alle proprietà catalitiche del complesso RISC, rendono quindi estremamente efficiente il meccanismo di degradazione.

Le molecole di dsRNA possono essere prodotte non solo dai virus ma anche dagli elementi trasponibili, che spesso presentano alle estremità sequenze complementari e invertite, le quali, quando vengono trascritte, danno luogo a molecole di RNA a forcina (dette shRNA o short hairpin RNA). In altri casi molecole di RNA prodotte da elementi esogeni – quali i transgeni introdotti nella cellula con interventi di ingegneria genetica – sono riconosciute, con meccanismi ancora non del tutto chiari, da RNA polimerasi RNA dipendenti (RdRP), che le convertono in dsRNA⁴.

La regolazione genica

Le mutazioni che danneggiano il macchinario del silenziamento genico rendono le piante ipersensibili alle infezioni virali e aumentano l'attività degli elementi trasponibili negli animali, indicando che una delle principali funzioni di questo meccanismo ancestrale è proprio la difesa del genoma dagli elementi mobili. Tuttavia negli ultimi anni si è scoperto che il silenziamento non è coinvolto solo nella difesa del genoma, ma svolge un ruolo centrale anche nel normale controllo dell'espressione genica, in particolare durante lo sviluppo. La scoperta è scaturita dall'osservazione, nel nematode *Caenorhabditis elegans*, di alcuni piccoli RNA endogeni (chiamati lin-4 e lin-7) che controllano lo sviluppo e che hanno dimensioni molto simili ai siRNA responsabili del silenziamento genico. La somiglianza delle dimensioni ha fatto subito pensare che i due tipi di molecole di RNA potessero essere generati e agire attraverso un comune meccanismo molecolare. Infatti studi successivi hanno dimostrato che anche i piccoli RNA endogeni, battezzati microRNA (miRNA), sono prodotti dall'enzima Dicer, a partire da un RNA precursore che è parzialmente a doppio filamento.

Queste osservazioni, insieme al fatto che piante difettive sia nell'enzima Dicer sia nella proteina Argonata mostravano difetti nello sviluppo, hanno fatto



Le molecole di RNA a doppio filamento (dsRNA) possono essere prodotte come intermedi della replicazione virale, oppure come conseguenza della presenza di sequenze ripetute invertite in alcuni trascritti originati da elementi trasponibili. In altri casi, i trascritti di origine esogena (transgeni) o i trascritti degli elementi trasponibili vengono convertiti in dsRNA a opera di RNA polimerasi RNA dipendenti (RdRP). L'enzima Dicer processa le molecole di dsRNA in piccoli RNA interferenti (siRNA). I geni endogeni che codificano i micro RNA (miRNA) trascrivono molecole di RNA con struttura a forcina (pre-miRNA), che vengono processate sempre da Dicer per dare i miRNA maturi.

Simili molecole a forcina (shRNA) possono essere prodotte ad hoc da vettori transgenici opportunamente ingegnerizzati. Sia i siRNA sia i miRNA vanno poi a far parte di un complesso ribonucleoproteico chiamato RISC. A seconda delle modalità di appaiamento tra il piccolo RNA e il suo mRNA bersaglio, vengono attivate due diverse modalità di funzionamento del complesso RISC: quando l'appaiamento è perfetto l'mRNA viene idrolizzato, mentre se l'appaiamento è incompleto ne viene bloccata la traduzione.

sospettare che il ruolo del silenziamento nel controllo dell'espressione genica fosse profondo e conservato in diversi organismi. In effetti, usando tecniche biochimiche per clonare gli RNA di piccole dimensioni, si è scoperto che le piante e gli animali esprimono centinaia di miRNA⁵ che controllano vari aspetti della fisiologia di diversi organismi: ne sono esempi la proliferazione e la morte cellulare programmata nelle mosche, il differenziamento delle cellule nervose del midollo spinale e la secrezione di insulina nei mammiferi, lo sviluppo delle foglie e dei fiori nelle piante.

Nonostante i siRNA e i miRNA vengano generati con meccanismi simili, esistono però differenze im-

portanti nel loro funzionamento. I siRNA, come si è visto, prendono di mira le molecole di RNA con sequenza complementare e ne inducono la degradazione, mentre i miRNA agiscono su specifiche molecole di RNA messaggero anche non perfettamente complementari e ne inibiscono la traduzione. A differenza dei siRNA, infatti, molti miRNA possono appaiarsi in modo imperfetto con una sequenza nella regione in 3' non tradotta dell'mRNA bersaglio; gli RNA così appaiati vengono legati dal complesso RISC, che però in questo caso ha un'attività modificata e si limita a bloccare la traduzione dell'RNA messaggero anziché idrolizzarlo. Questa marcata differenza di

funzionamento dipende esclusivamente dalle modalità di appaiamento tra il miRNA e l'RNA bersaglio. Infatti nei casi in cui il miRNA si appaia in modo perfetto con il bersaglio, come avviene per alcuni miRNA animali e per molti vegetali, viene attivato il processo di idrolisi. Ma quanto è esteso questo tipo di regolazione dell'espressione genica? Le stime attuali indicano che il genoma umano codifica circa trecento diversi miRNA. Sebbene la predizione dei bersagli sia piuttosto complicata, per via della non perfetta complementarità tra il miRNA e il suo bersaglio, si valuta che ciascun miRNA umano sia in grado di regolare la traduzione di dieci diversi RNA messaggeri. È quindi ragionevole ipotizzare che circa un decimo di tutti i geni umani sia sottoposto a questo tipo di controllo della traduzione.

Spiare il genoma

Negli ultimi anni, con il miglioramento delle tecniche di sequenziamento del DNA, è stato possibile decifrare l'intera sequenza del genoma di molti organismi, uomo compreso. Nell'era post-genomica il passo successivo, e ben più ambizioso, sarà quello di assegnare una funzione a ciascun gene identificato. Uno degli approcci più informativi che vengono usati per farsi un'idea del ruolo di un gene consiste nell'inattivarlo e analizzare le conseguenze dell'inattivazione sul fenotipo. Per esempio, se l'inattivazione di un certo gene di una pianta provoca un difetto nella formazione delle foglie, ciò rivela che una delle funzioni del gene in esame è legata al differenziamento della foglia. Una delle tecniche più diffuse per inattivare un gene consiste nell'introdurre all'interno della sua sequenza delle sequenze estranee, che interferiscono con la sua funzionalità. Sebbene questo approccio sia molto efficace, una delle controindicazioni è che, specialmente negli organismi complessi, è costoso e piuttosto complicato.

La capacità delle cellule eucariotiche di rispondere a molecole di RNA a doppio filamento, attivando la degradazione specifica delle molecole di RNA che hanno la stessa sequenza, offre uno straordinario strumento alternativo per l'inattivazione mirata dei geni. In alcuni organismi come il nematode *C. elegans* la procedura è eccezionalmente semplice: basta nutrire il nematode con batteri che esprimono un dato dsRNA per far sì che le cellule incorporino al proprio interno questo dsRNA, e attivino quindi il meccanismo di silenziamento diretto contro quello specifico gene. Seguendo questa metodologia di RNAi sono stati sintetizzati dsRNA contro tutti i geni del nematode e si sta procedendo allo screening sistematico dell'intero genoma.

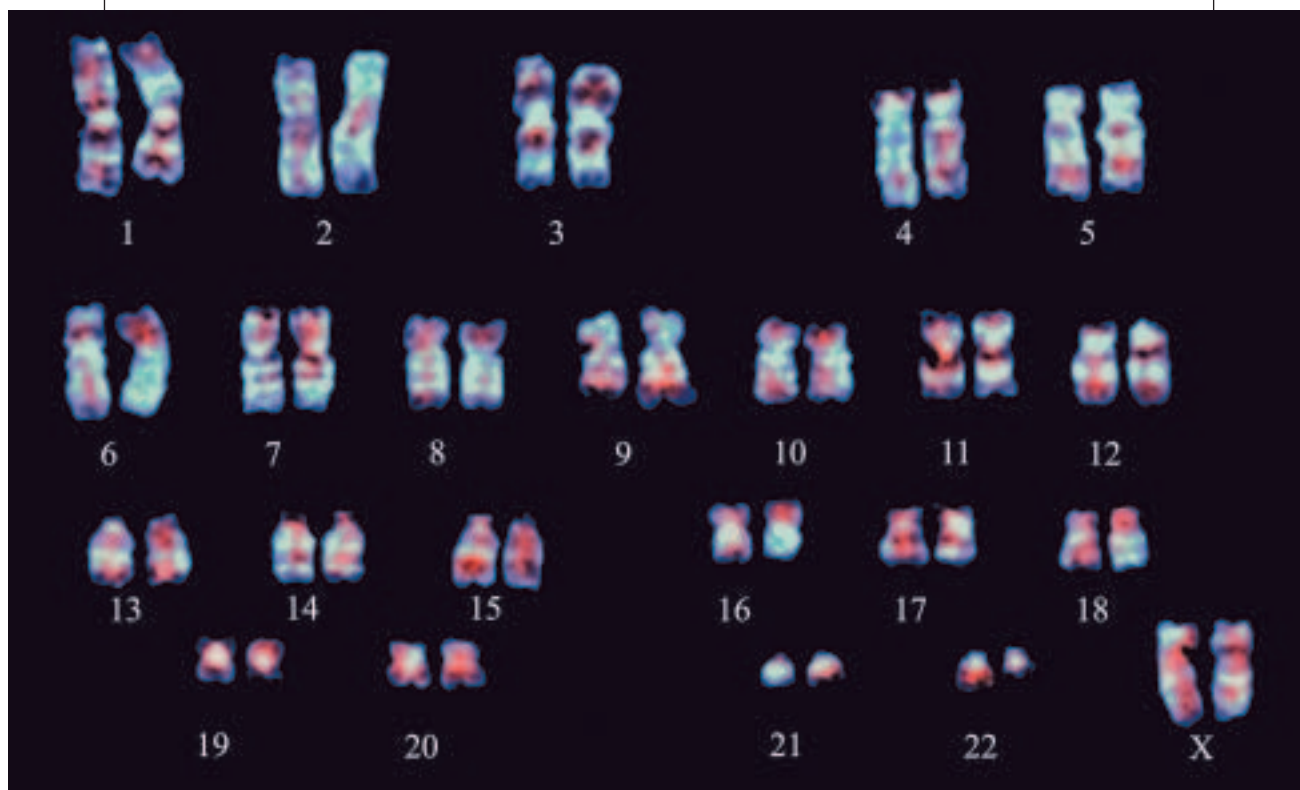
Un simile approccio non può però essere usato nei mammiferi. La ragione principale sta nel fatto che le cellule di mammifero, quando esposte a molecole

di dsRNA, attivano una potente risposta antivirale regolata dall'interferone, che consiste nel blocco generale della sintesi proteica e, in alcune condizioni, anche nel suicidio della cellula. Bloccando la sintesi proteica, la cellula infettata impedisce l'assemblaggio di nuove particelle virali che possono propagarsi alle cellule vicine; nei casi più gravi, quando l'infezione persiste, la morte cellulare ha il significato di ultimo sacrificio della cellula nell'intento di bloccare la diffusione dell'infezione. I mammiferi sembrano quindi possedere due differenti sistemi di protezione dai virus: il primo, costituito dalla risposta generale non rivolta contro una sequenza specifica, risulta sovrapposto al secondo, evolutivamente più antico, che è il silenziamento genico diretto specificamente contro il virus. L'esistenza della risposta aspecifica contro l'RNA a doppio filamento ne preclude l'uso per il silenziamento di uno specifico gene bersaglio.

Un'importante svolta per la possibilità di usare l'RNAi nei mammiferi è venuta da un'osservazione: introducendo in una cellula non il dsRNA, ma direttamente i prodotti della sua demolizione a opera dell'enzima Dicer, cioè i siRNA, la risposta generale aspecifica non viene più attivata, mentre si induce esclusivamente il silenziamento sequenza-specifico⁶. Questa iniziale osservazione ha quindi aperto la strada per l'uso dei siRNA come strumento standard nella biologia molecolare. I siRNA possono essere introdotti in una cellula di mammifero usando tecniche di trasfezione. L'efficienza e la durata del silenziamento dipendono da una serie di parametri che vanno dalla tecnica di trasfezione adottata al tipo di cellula usato come recipiente, alla quantità di siRNA che effettivamente entra nella cellula e al livello di espressione del gene bersaglio. Il limite principale di questo approccio è che l'effetto del silenziamento è transitorio, sia perché i siRNA hanno una vita media limitata all'interno della cellula, sia per la diluizione cui vanno incontro quando le cellule si replicano. Inoltre è difficile immaginare di applicare questo sistema, studiato e sperimentato nelle colture cellulari, direttamente sull'animale.

Un metodo alternativo per introdurre i siRNA nelle cellule di mammifero si basa sull'idea di mimare le modalità di espressione e processamento dei miRNA che abbiamo descritto nel paragrafo precedente. Un miRNA è il prodotto di un gene endogeno: il gene viene trascritto producendo un RNA parzialmente a doppio filamento, il quale viene processato da Dicer. I miRNA, come si è detto, sono funzionalmente equivalenti ai siRNA in quanto sono incorporati negli stessi complessi RISC e, se hanno una sequenza perfettamente complementare, possono indurre la degradazione dell'mRNA bersaglio.

Per sfruttare tale meccanismo, sono stati prodotti vettori transgenici a DNA che, una volta intro-



DEPT. OF CLINICAL CYTOGENETICS, ADJUNCT PROFESSOR, SCIENCE PHOTO LIBRARY / GAZZANINI

Fotografia al microscopio ottico del corredo cromosomico di una donna malata di leucemia mieloide cronica, in cui si vede il cromosoma Philadelphia, prodotto dalla traslocazione di un frammento del cromosoma 22 sul cromosoma 9. In ciascuna delle due coppie di cromosomi, 9 e 22, quello sulla sinistra è normale; il cromosoma 9 sulla destra invece possiede un frammento in più, quello mancante nel cromosoma 22.

dotti nelle cellule, esprimono una piccola molecola di RNA a forcina (shRNA, short hairpin RNA) in qualche modo simile al precursore di un miRNA; questa riesce a essere processata da Dicer e dà quindi come prodotto finale un siRNA⁷. Questo sistema offre importanti vantaggi rispetto alla trasfezione di molecole di siRNA già formate. Innanzitutto, i metodi per introdurre nelle cellule il DNA sono molto più flessibili ed efficienti rispetto alla trasfezione di RNA. Si possono, per esempio, usare vettori retrovirali che hanno una grandissima efficienza di trasferimento del DNA esogeno e che sono in grado di integrarsi in modo stabile nel genoma, permettendo di ottenere un silenziamento sostenuto nel tempo. Inoltre, vettori che esprimono shRNA sono stati usati per creare animali transgenici in cui un dato gene può essere silenziato in modo inducibile o tessuto specifico.

Un'arma per la terapia

Fin dalla prima comparsa sulla scena del fenomeno dell'RNAi, sono apparse subito chiare le sue potenzialità come strumento terapeutico. La sua grande attrattiva sta nella capacità di inattivare in modo effi-

ciente e specifico l'espressione genica. I possibili bersagli terapeutici vanno dagli oncogeni ai fattori di crescita, al virus dell'immunodeficienza umana Hiv, a geni mutati che sono causa di malattie genetiche. Uno dei campi d'elezione per l'applicazione terapeutica dell'RNAi è la cura del cancro. I diversi tumori sono spesso caratterizzati dal fatto di esprimere in modo non corretto alcuni geni, chiamati oncogeni, che determinano una proliferazione cellulare incontrollata. È pertanto ragionevole attendersi che il silenziamento di questi oncogeni possa indurre un blocco nel processo proliferativo e quindi impedire l'avanzamento della malattia e promuoverne la regressione.

Un oncogene tristemente famoso è il gene di fusione Bcr-Abl, che è il prodotto di una traslocazione conosciuta come cromosoma Philadelphia ed è tipico della leucemia mieloide cronica. I malati di questa forma leucemica sono trattati con la chemioterapia, il trapianto allogenico del midollo osseo e, negli ultimi tempi, con una piccola molecola, l'imatinib, che funziona come inibitore delle tirosino chinasi. Benché queste terapie combinate abbiano un certo successo, alcuni pazienti sviluppano resistenza all'imati-

nib, rendendo necessario lo sviluppo di terapie alternative. Di recente, usando siRNA diretti contro l'mRNA chimerico Bcr-Abl su linee cellulari, è stato dimostrato un effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare, e questo fa pensare che la strategia abbia delle potenzialità nel trattamento della leucemia mieloide cronica. Analoghi risultati sono stati ottenuti per altri oncogeni come K-RAS v112, coinvolto nel cancro del pancreas e del colon, e BRAF v599E, coinvolto nel melanoma, indicando come il silenziamento attraverso l'RNAi possa essere impiegato nel trattamento di un ampio spettro di patologie. È importante sottolineare che la potenza e la flessibilità di questo approccio stanno nella specificità di azione dei siRNA. Per esempio, disegnando dei siRNA a cavallo del punto di fusione dell'oncogene chimerico Bcr-Abl si induce il silenziamento specifico dell'oncogene ma non dei geni Bcr e Abl nelle cellule sane.

Anche alcune malattie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer potrebbero essere trattate in futuro con l'RNAi. Si ritiene che lo sviluppo del morbo sia causato dalla formazione di aggregati del peptide beta amiloide. Un'ipotesi è che l'accumulo di questo peptide sia controllato dall'azione di un enzima, la beta-secretasi, espresso in modo anomalo nel cervello dei malati. L'uso di siRNA diretti contro la beta-secretasi, in neuroni corticali di topo che esprimono il precursore umano del peptide beta amiloide, ha ridotto la secrezione del peptide. Questi risultati sono incoraggianti per un futuro uso della strategia del silenziamento, sia nel trattamento dell'Alzheimer sia nelle altre malattie neurodegenerative. La possibilità di disegnare siRNA in grado di discriminare fra due mRNA con sequenza identica, tranne che per un singolo nucleotide, rende plausibile l'uso dell'RNAi contro malattie genetiche determinate da una singola mutazione puntiforme. Paradigmatico è il caso della sclerosi laterale amiotrofica, una malattia genetica dominante dovuta a una mutazione puntiforme nel gene che codifica l'enzima superossido dismutasi (SOD1). Dato che il gene svolge una funzione essenziale, è importante silenziare in modo selettivo solo la versione mutata lasciando indisturbata quella corretta.

Lo scoglio della somministrazione

Sebbene il potenziale dell'RNAi sia enorme, ci sono diversi problemi da risolvere perché il suo impiego nella terapia diventi realtà. Una perplessità nell'uso *in vivo* riguarda la possibilità che le alte concentrazioni di siRNA richieste per avere un effetto terapeutico possano saturare i complessi RISC. Si avrebbero così effetti collaterali dovuti al disturbo dei processi di regolazione genica controllati dai miRNA endogeni. Un altro problema rilevante è quello di ottenere un efficiente "delivery" *in vivo*, cioè riuscire a introdurre i siRNA all'interno delle cellule a concentrazioni che

siano terapeuticamente valide. Allo scopo si possono impiegare con buoni esiti le tecniche della terapia genica tradizionale, ricorrendo a vettori virali come i lentivirus, gli adenovirus e altri retrovirus, modificati per contenere geni sintetici che esprimano gli shRNA precursori dei siRNA. Va però sottolineato che l'uso di questi vettori virali per la somministrazione sistemica solleva ancora molti dubbi e timori per la sicurezza. Nei topi sono stati ottenuti alcuni successi iniziali con la somministrazione locale di siRNA nel naso, per farlo giungere ai polmoni per la terapia dell'ischemia polmonare, o nel corpo vitreo dell'occhio, per la terapia della neovascolarizzazione coroidale. Per la somministrazione sistemica, invece, nei topi è stata sperimentata l'iniezione intravenosa dei siRNA, ma i volumi che devono essere forniti per ottenere il silenziamento *in vivo* sono ancora troppo grandi per pensare di usare questo metodo nell'uomo. Fra i principali ostacoli si annoverano l'instabilità dei siRNA, che vengono degradati da nucleasi presenti nel siero, e la difficoltà con cui questi siRNA penetrano nelle cellule. Per risolvere i due problemi di recente sono stati sperimentati, con risultati quanto mai incoraggianti, siRNA modificati chimicamente che sono più resistenti alle nucleasi e possiedono migliori proprietà farmacologiche⁸.

Carlo Cogoni, Dip. Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università di Roma La Sapienza

Bibliografia

1. Cogoni C, Macino G. Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2000 Dec;10(6):638-43.
2. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon CJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001 Jan 18;409(6818):363-66.
3. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon CJ. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004 Sep 3;305(5689):1437-41.
4. Cogoni C, Macino G. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* 1999 May 13;399(6732):166-69.
5. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004 Sep 16;431(7006):350-55.
6. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediated RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001 May 24;411(6836):494-98.
7. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002 Apr 19;296(5567):550-53.
8. Jurgen Soutschek I et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 2004 Nov 11;432:173-78.