



# *El ácido ribonucleico de interferencia. ¿Una curiosidad que merece un premio Nobel o una esperanza terapéutica?*

**P. Álvarez Muñoz y J. M. López Novoa**

Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica. Departamento de Fisiología y Farmacología. Universidad de Salamanca. Salamanca.

## INTRODUCCIÓN

En palabras del premio Nobel británico Francis Crick el «dogma central de la biología molecular» consiste en que existe un flujo de información genética desde el genoma, constituido fundamentalmente por el ácido desoxirribonucleico (DNA) nuclear, al ácido ribonucleico mensajero (mRNA) y a las proteínas, de forma que las instrucciones para sintetizar las proteínas, contenidas en el DNA, son copiadas al mRNA y éste sirve como molde para la síntesis de las proteínas en el complejo ribosomas-retículo endoplasmático.

Nuestro genoma está compuesto por alrededor de 30 mil genes. Sin embargo, cada una de nuestras células usa sólo una parte de ellos en cada momento, dependiendo del tipo celular y de otras situaciones como son el ciclo celular, la influencia de hormonas o citocinas, etc. La decisión de qué genes son expresados (esto es, qué nuevas proteínas se sintetizan) y cuales no, es controlada por la maquinaria que copia DNA a mRNA en un proceso llamado transcripción. Éste, a su vez, puede ser modulado por varios factores. Los principios fundamentales de la regulación de la expresión genética fueron identificados hace más de 40 años por los franceses François Jacob y Jacques Monod, también galardonados con el premio Nóbel.

Desde principios de los años 70 se han desarrollado muchas técnicas basadas en los ácidos nucleicos para silenciar genes con un fin terapéutico, entre ellas técnicas de DNA antisentido (secuencias de DNA complementarias a los mRNA), técnicas de mutantes dominantes negativos (introducción de DNAs que codifican para proteínas mutadas que ocupan el lugar de las originales pero no ejercen función), y

animales knock-out (en los que se ha eliminado la transcripción de un gen concreto), entre otras.

Los norteamericanos Andrew Z. Fire (Profesor en la Facultad de Medicina de la Universidad de Stanford) y Craig C. Mello (investigador del Instituto Médico Howard Hughes y Profesor de medicina molecular en la Facultad de Medicina de la Universidad de Massachusetts) han recibido el premio Nobel en Medicina y Fisiología correspondiente al año 2006 por descubrir el mecanismo del RNA de interferencia (iRNA), una de las aproximaciones al silenciamiento génico que más éxito ha tenido. El iRNA está basado en el silenciamiento del mRNA que codifica para la proteína que queremos eliminar por la degradación de ese mRNA. Mediante esta técnica se puede disminuir la expresión de la proteína de interés, pero sin llegar a eliminarla. Esta técnica se está utilizando ampliamente en cultivos celulares puesto que es relativamente fácil de llevar a cabo. También se utiliza en organismos vivos, y se replantea utilizarla para el tratamiento de enfermedades basadas en la sobreexpresión de un gen. Si se conoce que la expresión de un gen concreto causa una enfermedad, se podría usar la interferencia de RNA para evitarla. El objetivo de este breve editorial es explicar el mecanismo de funcionamiento del iRNA y su posible utilidad en el campo de la nefrología clínica y experimental. En esta aportación mantendremos las siglas en inglés, pues son las más frecuentemente utilizadas en la literatura y permiten evitar confusiones entre siglas traducidas de diferente forma. Estas siglas en inglés y su correspondiente traducción al español se detallan en la tabla I.

## ¿QUÉ ES EL iRNA?

Antes del descubrimiento del iRNA, se había descrito en plantas un fenómeno denominado silenciamiento génico. En experimentos diseñados para potenciar el color de las petunias aumentando, mediante ingeniería genética, el número de copias del gen responsable de la síntesis del pigmento, se

---

**Correspondencia:** J. M. López Novoa  
Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina  
Universidad de Salamanca  
Edificio Departamental  
37007 Salamanca  
E-mail: jmlnovoa@usal.es

**Tabla I.** Principales términos mencionados en el artículo con sus respectivos significados

<b>iRNA</b>	Interference RNA	RNA de interferencia
<b>dsRNA</b>	Double Stranded RNA	RNA de doble cadena
<b>miRNA</b>	micro RNA	microRNA
<b>RISC</b>	RNA-induced silencing complex	Complejo de silenciamiento inducido por MRNA
<b>RdRP</b>	RNA-dependent RNA polymerase	RNA polimerasa dependiente de RNA
<b>siRNA</b>	Small Interfering RNA	RNA de interferencia corto
<b>aRNA</b>	Aberrant RNA	RNA aberrante
<b>shRNA</b>	Small hairpin RNA	Horquilla pequeña de RNA

observó que se producía el efecto contrario, originándose una flor blanca<sup>1</sup> (figs. 1 y 2).

En los años siguientes se describió este fenómeno en otras plantas transgénicas y en diferentes organismos modelo<sup>2</sup>. Aunque se identificó que este efecto era producido por la inhibición de la expresión del gen que se intentaba potenciar y que el RNA tenía un papel fundamental en ello, la explicación molecular del proceso no se conoció hasta el descubrimiento de Fire y Mello. En 1998 estos investigadores estaban buscando un modo eficiente de silenciar genes como estrategia para estudiar su función en el desarrollo del nematodo *C. elegans*. Para ello, inyectaron moléculas de RNA complementario al mRNA del gen que querían silenciar (antisentido) en las células del gusano. Esta técnica era por lo general muy poco repetible y los efectos producidos muy modestos. En sus experimentos, ni el uso de la cadena antisentido ni el de la secuencia complementaria a éste (cadena sentido) produjeron efecto alguno. Inesperadamente, una mezcla de ambas cadenas, sentido y antisentido, en donde estas dos especies moleculares de cadena sencilla habían hibridado formando un RNA de doble cadena (dsRNA, de double stranded RNA), produjo la eliminación casi completa de la expresión del gen diana. En su artículo original, Fire y Mello demuestran que es posible el silenciamiento específico de un gen

mediante la introducción en la célula de un dsRNA que contiene la secuencia homóloga. Además, proponen que este fenómeno es mediado por un mecanismo endógeno natural, que tiene como consecuencia la degradación del mRNA y que es usado por la célula para controlar la expresión génica. Finalmente, sugieren una conexión entre este mecanismo y el fenómeno descrito en plantas<sup>3</sup>. La publicación de este estudio tuvo una excepcional repercusión en la comunidad científica. En menos de un año se documentó la presencia de iRNA en una gran diversidad de organismos modelo, incluyendo tripanosomas, varias especies de planarias, la mosca del vinagre (*Drosophyla melanogaster*)<sup>4,5</sup>, y el pez-



Fig. 1. — Portada del artículo de Napoli y cols., 1990 (referencia 1), en el que se describe por primera vez el silenciamiento génico.

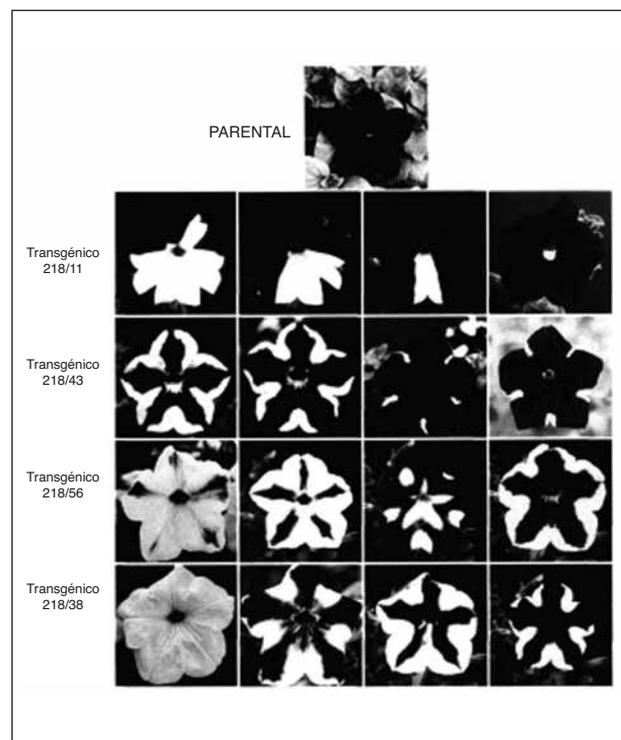


Fig. 2. — Fenotipos de las flores de los diferentes clones transgénicos obtenidos y variaciones de la coloración de las flores dentro de una única planta (obtenido de referencia 1).

cebra (*Danio rerio*)<sup>6-8</sup>. Los estudios en mamíferos sufrieron unos años de retraso debido a que la introducción de fragmentos de dsRNA mayores de 30 nucleótidos en estas células activa una reacción fisiológica que origina la muerte celular. Finalmente, el descubrimiento de que secuencias más cortas inducen iRNA sin producir toxicidad demostró la generalidad de este fenómeno entre los organismos eucariotas, siendo la única notable excepción la levadura *S. cerevisiae*. Además, las mutaciones en algunos genes requeridos para el funcionamiento del iRNA producen grandes defectos en el desarrollo, especialmente en tejidos germinales y proliferativos, sugiriendo un enlace entre esta vía y el desarrollo<sup>9-16</sup>.

### Silenciamiento endógeno

El silenciamiento génico mediante iRNA es un proceso que ocurre en las células de manera natural. La conservación del silenciamiento por acción del iRNA es debida a la expresión de unos RNAs pequeños no codificantes llamados microRNAs (miRNAs). Estos miRNAs son críticos para el desarrollo normal y la fisiología de los tejidos en mamíferos. Además, en varios tipos de cáncer se ha demostrado que existe una pérdida de expresión de miRNAs sugiriendo que esta pérdida contribuye a la aparición de la enfermedad<sup>17, 18</sup>.

Inicialmente los miRNAs se transcriben como precursores formados por una cadena de más de 2 kb de longitud presentando extensiones de bases que pueden sufrir emparejamiento o adoptar estructuras de horquilla (loop)<sup>19, 20</sup>. Además, en las regiones en las que hay un emparejamiento de bases pueden aparecer burbujas, que, junto con las estructuras en horquilla, son importantes, por una parte, para el reconocimiento de los miRNAs por las enzimas celulares y por otra, para la capacidad de esos RNAs para silenciar genes. Los transcritos primarios de miRNA son identificados y procesados en el núcleo por una RNasa III, llamada Drosha, dando lugar a precursores de aproximadamente 70 nt de longitud, conocidos como pre-miRNAs<sup>21</sup>. Estos salen al citoplasma donde son rotos por una segunda RNasa III llamada Dicer. Dicer convierte los pre-miRNAs en miRNAs maduros de doble cadena de entre 21 y 23 nt de longitud<sup>22</sup>. Estos miRNAs maduros se asocian con un complejo de silenciamiento inducido por mRNA (RISC, de RNA-induced silencing complex)<sup>23</sup>. RISC desenrolla el miRNA y una cadena se asocia con la cadena complementaria del mRNA diana<sup>24</sup>. Dependiendo del grado de homología entre un miRNA y su mRNA diana, los complejos miRNA-RISC inhiben la función génica por dos vías distintas<sup>25</sup>:

- a) Si los miRNAs se emparejan imperfectamente se silencia la expresión del gen por represión de la traducción, o sea impidiendo que el mRNA se pueda leer por los ribosomas;
- b) Si los miRNAs presentan una secuencia idéntica al mRNA diana se inhibe la función génica por degradación del mRNA<sup>26, 27</sup>.

### MECANISMO DE ACCIÓN DEL iRNA

En 1998, Fire y cols., acuñaron el término iRNA para referirse a un fenómeno de silenciamiento post-transcripcional de la expresión génica que ocurre en respuesta a la introducción de un dsRNA en una célula<sup>3</sup>. Además diversos experimentos en *C. elegans* han demostrado que el iRNA puede propagarse de célula a célula de la misma manera que en el silenciamiento en plantas<sup>28</sup>. Aunque este silenciamiento sistémico no se ha encontrado en mamíferos existen proteínas homólogas a las que se encuentran implicadas en el silenciamiento en nematodos.

Los mecanismos bioquímicos implicados se han determinado en diferentes sistemas<sup>29</sup> y parece que muchos de los pasos del proceso están bien conservados. Para demostrar que son los mRNAs maduros los que son interferidos se realizaron diversos estudios que demostraron que la secuencia primaria del DNA diana permanece inalterada, que la iniciación y elongación de la transcripción no parece estar afectada y que, mientras que los transcritos nucleares están presentes, los mRNA citoplasmáticos están completamente ausentes por lo que, al igual que en plantas, los mRNAs diana son degradados principalmente en el citoplasma<sup>30</sup>.

Se han determinado dos mecanismos de silenciamiento por iRNA: silenciamiento a través de RISC, y el silenciamiento a través de RNA-polimerasa dependiente de RNA (RdRP, de RNA-dependent RNA polymerase).

### Silenciamiento a través de RISC

Cuando en una célula aparecen dsRNAs, éstos son rotos, de manera dependiente de ATP, mediante una enzima llamada Dicer, en fragmentos de RNA de doble cadena más pequeños llamados RNAs de interferencia cortos<sup>22, 29, 31-33</sup> (siRNAs, de *small interfering RNAs*). Se ha observado en *C. elegans* que Dicer interacciona con proteínas rde. Las proteínas rde se unen a los dsRNAs y se cree que se les presentan a Dicer para su procesamiento<sup>34</sup>. Los mutantes que manifiestan un alto grado de resistencia al efecto del iRNA parece que poseen mutaciones en los genes que codifican las proteínas rde-1 y rde-4<sup>35</sup>.

Una vez que los siRNAs se forman, son incorporados dentro RISC que, una vez activado y de manera dependiente de ATP, desenrolla los siRNAs manteniendo la cadena antisentido del siRNA<sup>22,29,31,33,36</sup>. Finalmente, el complejo RISC es guiado por la cadena antisentido del siRNA que reconoce el mRNA concreto con su secuencia complementaria. Una vez que está unido al mRNA, RISC lo rompe en un sitio localizado aproximadamente en el medio de la secuencia homóloga por lo que se produce su inactivación<sup>22</sup> (fig. 3).

### Silenciamiento a través de RdRP

De manera alternativa al silenciamiento a través de RISC, puede existir un silenciamiento a través de RdRP. Existen varias teorías a cerca de este silenciamiento. Por un lado se piensa que, después de la rotura de los dsRNAs por Dicer, los siRNAs se pueden separar al ser poco estables. Una vez que las dos cadenas de RNA se han separado, la cadena antisentido se une a un mRNA de secuencia complementaria. Esta pequeña cadena actúa como «*primer*» de una RdRP que sintetiza una cadena complementaria de RNA, de manera que se genera un dsRNA. Este dsRNA es roto en siRNA por la acción de la enzima Dicer pudiendo comenzar el proceso, bien por este tipo de silenciamiento o bien por silenciamiento a través de RISC. Generalmente los siRNAs son muy específicos, sin embargo la elongación de los siRNAs usando los mRNAs como molde puede llevar a una interferencia no específica por la aparición de secuencias homólogas a otros mRNAs, generando un iRNA transitorio. Este fenómeno es particular de plantas y nematodos. Otro modelo propuesto es que tras el corte del mRNA por parte del complejo RISC, se produce un RNA aberrante (aRNA) que es utilizado por una RdRP para sintetizar la cadena complementaria obteniéndose de nuevo un dsRNA que puede ser cortado por Dicer. Esto puede llevarse a cabo porque las RdRPs pueden sintetizar RNA sin necesidad de un primer (fig. 3).

El descubrimiento de estas proteínas en el iRNA y el silenciamiento génico post-transcripcional proporciona una posible explicación para la alta eficacia de los dsRNAs en el silenciamiento, ya que solo se requieren unas pocas moléculas de dsRNA para degradar una gran población de mRNAs<sup>3</sup>.

### iRNA EN MAMÍFEROS

El silenciamiento en mamíferos mediante el iRNA parece ser llevado a cabo mediante RISC puesto que

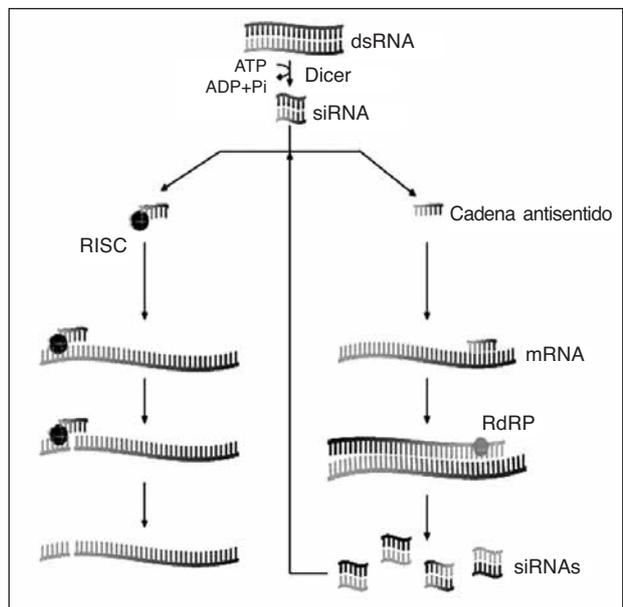


Fig. 3. — Esquema del mecanismo de acción del iRNA.

no se ha encontrado una proteína homóloga a la RdRP. Tampoco se ha detectado ningún sistema de iRNA transitorio en células de mamífero. Esto puede ser debido a que la introducción de grandes dsRNAs en células de mamífero produce una disminución de la transcripción y de la traducción, en parte debida a la activación de la proteína quinasa dependiente de dsRNA<sup>37</sup> (PKR, de dsRNA activated protein kinase). La PKR activada fosforila la subunidad pequeña del factor de iniciación eucariota 2 alfa (eIF2 $\alpha$ ), disminuyendo la traducción. Además, PKR también promueve la síntesis de 2'-5'-ácido poliadenílico, que activa la RNasa L de forma no específica. Estos fenómenos colectivos pueden alterar drásticamente el metabolismo celular y generalmente activan vías de apoptosis<sup>38</sup>. Esta respuesta al estrés podría haberse desarrollado como una defensa contra las infecciones virales de forma que se bloquea la replicación viral impidiendo la síntesis de proteínas y activando la apoptosis en las células infectadas<sup>39</sup>.

### FUTURO TERAPÉUTICO DEL iRNA

La supresión de la expresión de genes por iRNA es generalmente un fenómeno transitorio<sup>40</sup>. El silenciamiento génico en células de mamífero está limitado por el número de moléculas de siRNA que se introducen. El número de siRNAs decrece con el tiempo debido a la dilución que se produce cuando las células se dividen y a la degradación de las enzimas celu-

lares. Una vez que los siRNAs son introducidos la expresión génica se recupera después de entre 96 y 120 horas, o de entre 3 y 5 divisiones celulares después de la transfección<sup>41</sup>. Los primeros esfuerzos se enfocaron sobre la administración directa de siRNAs sintéticos en animales, desarrollando tres métodos principales que parecen ser los que más eficacia tienen: a) la inyección intravenosa de siRNAs, creando un «back-flow» en el sistema venoso, que fuerza a la solución del siRNA a introducirse en diversos órganos<sup>42,43</sup>; b) la inyección de pequeños volúmenes de siRNAs empaquetados en liposomas catiónicos, observándose el silenciamiento en tejidos con un alto flujo sanguíneo<sup>44</sup>; c) la electroporación de siRNAs directamente en tejidos y órganos<sup>45-48</sup>.

La solución para obtener un silenciamiento génico estable a través del iRNA ha sido el desarrollo de sistemas de expresión que producen siRNAs. Esto fue llevado a cabo por varios grupos<sup>41,49,50</sup> que utilizaron el promotor U6 o H1, para expresar una horquilla pequeña de RNA (shRNA, de small hairpin RNA). Los shRNAs pueden ser procesados por Dicer para producir siRNAs. Varios grupos han utilizado plásmidos basados en shRNAs para obtener un silenciamiento *in vivo* de mayor duración<sup>51</sup>. También se han utilizado vectores virales para la expresión de shRNAs en las células. Así se han realizado estudios con retrovirus<sup>52-57</sup>, lentivirus<sup>52,55,57,58</sup>, adenovirus<sup>59-61</sup> y virus asociados a adenovirus<sup>62,63</sup>.

### Aplicaciones prácticas del iRNA

La tecnología derivada del iRNA ha revolucionado la forma en que podemos analizar la función de los genes. Ahora podemos llevar a cabo estudios de silenciamiento génico de una manera sencilla y eficiente. En ellos introducimos en las células dsRNAs o siRNAs diseñados artificialmente para silenciar un gen determinado. Esta tecnología representa una oportunidad única para identificar genes implicados en cualquier proceso biológico o enfermedad. Además, debido a su sencillez, estos estudios pueden ser realizados en miles de genes a la vez, dándonos una perspectiva global del problema biológico que se estudia.

Por ejemplo, nosotros estamos estudiando el efecto que tiene el silenciamiento del gen de la endoglina, una molécula que parece regular el efecto profibrótico del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), sobre la síntesis de matriz extracelular<sup>64</sup>. Nuestros resultados preliminares parecen demostrar que el silenciamiento de endoglina con un siRNA específico modifica la producción de matriz extracelular por las células mesangiales (Patricia Álvarez-

Muñoz y José M. López-Novoa; resultados sin publicar). Asimismo, en un estudio en el que tratábamos de relacionar la expresión de endoglina con la regulación de la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), la transfección de las células endoteliales con un siRNA para endoglina aumentó la expresión de COX-2 tanto en condiciones basales como en respuesta a TGF-beta1<sup>65</sup>.

Otro ejemplo de un trabajo muy recientemente publicado en *Kidney International*, escogido entre muchos trabajos del mismo tipo, demuestra que el silenciamiento con siRNA del gen ELMO1 (de engulfment and cell motility 1), un gen de susceptibilidad a la nefropatía diabética y que se hiperexpresa en diversos modelos animales de fibrosis renal, suprime la expresión de fibronectina que se observaba en células que expresan este gen, sugiriendo que la expresión de ELMO1 contribuye al desarrollo y progresión de la nefropatía diabética a través de la alteración de la síntesis de matriz extracelular<sup>66</sup>. Otro ejemplo es un trabajo muy reciente publicado en *American Journal of Transplantation* en el que demuestran que el silenciamiento con siRNA de C3, el componente central de todas las vías de activación del complemento, es efectivo inhibiendo la expresión de C3 en un modelo de isquemia/reperfusión renal experimental en ratón, reduciendo el daño renal, la producción del factor de necrosis tumoral alfa (tumoral necrosis factor alpha; TNF-alpha) y la mortalidad inducida por la isquemia/reperfusión. Los autores sugieren que el uso del siRNA representa una nueva posibilidad terapéutica en la necrosis tubular aguda o en la preservación de órganos para trasplante<sup>67</sup>.

Aparte de su incuestionable relevancia como herramienta de investigación, esta tecnología está empezando a ser aplicada a la terapia. Así, se trabaja para que en un futuro pueda usarse para silenciar, por ejemplo, genes alterados en enfermedades tumorales<sup>68</sup>, o genes virales en pacientes con infecciones víricas. Inhibiendo la expresión de genes virales involucrados en la replicación, es posible inhibir ésta dentro de las células y, por lo tanto, la capacidad de los virus para multiplicarse, lisar las células e invadir otras. Hay varios estudios que describen el uso del iRNA para inhibir la replicación del VIH-1 y del virus de la hepatitis B<sup>69-72</sup>. Giladi y cols. (2003)<sup>73</sup> describieron el uso de los siRNA para silenciar tres secuencias diferentes de mRNA *in vivo* en ratones infectados con el virus de la hepatitis B. Los resultados oscilaron entre inhibiciones del 60% al 90% dependiendo de las secuencias de siRNA utilizadas y la proteína silenciada. También se ha planteado el uso del iRNA contra la infección por el virus de la hepatitis C<sup>74,75</sup>.

Otra diana terapéutica (entre las muchas posibles) son los genes causantes de los niveles elevados de

colesterol en sangre. En relación con esto, se ha publicado recientemente en Nature que el silenciamiento del gen de la apolipoproteína B (ApoB) en primates mediante la inyección intravenosa de siRNAs específicos para ApoB y encapsulados en partículas estables un complejo ácidos nucleicos-lípidos, dio lugar a reducciones significativas en los niveles circulantes de ApoB, colesterol y LDL, que se observaron desde 24 horas después de la inyección hasta 11 días después, lo que demuestra la eficacia y la larga duración de este tipo de tratamiento en animales muy parecidos al hombre<sup>76</sup>.

En modelos animales de insuficiencia hepática aguda debida a inducción de la apoptosis de los hepatocitos por agonistas de Fas, el tratamiento con siRNA contra el gen de Fas protegió a los animales contra la hepatitis fulminante<sup>77</sup>. Aunque no conocemos que se hayan publicado hasta la fecha estudios clínicos rigurosos basados en la terapia génica, hay compañías como «siRNA Therapeutics» y «Alnylam Pharmaceuticals» que están realizando estudios clínicos preliminares desde el año 2005<sup>78</sup>.

En resumen, el descubrimiento del iRNA ha expandido enormemente el conocimiento científico sobre los mecanismos implicados en la regulación génica. Además, el desarrollo de tecnologías basadas en el iRNA nos ha equipado a los investigadores con poderosísimas herramientas experimentales para estudiar la función génica. La adaptación de esta tecnología a la terapia de diferentes tipos de patologías, aunque aún en desarrollo, ha abierto expectativas terapéuticas sin precedentes.

## AGRADECIMIENTOS

Patricia Álvarez-Muñoz es becaria FPU del Ministerio de Educación y Ciencia. Los estudios de nuestro laboratorio han sido financiados por el proyecto BFU2004-00285 del Ministerio de Educación y Ciencia y SA22/03 de la Junta de Castilla y León.

## BIBLIOGRAFÍA

1. 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* Apr; 2: 279-289, 1990.
2. Jorgensen RA, Cluster PD, English J, Que Q, Napoli CA: Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs antisense constructs and single-copy vs complex T-DNA sequences. *Plant Mol Biol* Aug; 31: 957-73, 1993.
3. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-11, 1998.
4. Kennerdell JR, Carthew RW: Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* Dec 23; 95: 1017-26, 1998.
5. Kennerdell JR, Carthew RW: Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol* Aug; 18: 896-8, 2000.
6. Li YX, Farrell MJ, Liu R, Mohanty N, Kirby ML: Double-stranded RNA injection produces null phenotypes in zebrafish. *Dev Biol* Jan 15; 217: 394-405, 2000.
7. Zhou Y, Ching YP, Kok KH, Kung HF, Jin DY: Post-transcriptional suppression of gene expression in *Xenopus* embryos by small interfering RNA. *Nucleic Acids Res* Apr 1; 30: 1664-1669, 2002.
8. Svoboda P, Stein P, Schultz RM: RNAi in mouse oocytes and preimplantation embryos: effectiveness of hairpin dsRNA. *Biochem Biophys Res Commun* Oct 12; 287: 1099-1104, 2001.
9. Wilson JE, Connell JE, MacDonald PM: Aubergine enhances oskar translation in the *Drosophila* ovary. *Development* 122: 1631-1639, 1996.
10. Bohmert K, Camus I, Bellini C, Bouchez D, Caboche M, Benning C: AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *EMBO J* 17: 170-180, 1998.
11. Cox DN, Chao A, Baker J, Chang L, Qiao D, Lin H: A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Gen Dev* 12: 3715-3727, 1998.
12. Lynn K, Fernández A, Aida M, Sedbrook J, Tasaka M, Masson P, Barton MK: The PINHEAD/ZWILLE gene acts pleiotropically in *Arabidopsis* development and has overlapping functions with the ARGONAUTE1 gene. *Development* 126: 469-481, 1999.
13. Cerutti L, Mian N, Bateman A: Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem Sci* 25: 481-482, 2000.
14. Fagard M, Boutet S, Morel J-B, Bellini C, Vaucheret H: AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11650-11654, 2000.
15. Smardon A, Spoerke J, Stacey S, Klein M, MacKin N, Maine E: EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol* 10: 169-178, 2000.
16. Schmidt A, Palumbo G, Bozzetti MP, Tritto P, Pimpinelli S, Schafer U: Genetic and molecular characterization of sting, a gene involved in crystal formation and meiotic drive in the male germ line of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 151: 749-760, 1999.
17. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM: Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15524-9, 2002.
18. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM: Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2999-3004, 2004.
19. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T: Identification of tissue specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12: 735-7399, 2002.
20. Lee NS, Dohjima T, Bauer G, Li H, Li MJ, Ehsani A, Salvatore P, Rossi J: Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol* 20: 500-505, 2002.

21. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN: The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425: 415-419, 2003.
22. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ: Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-66, 2001.
23. Hutvagner G, Zamore PD: RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* 12: 225-32, 2002.
24. Martínez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T: Singlestranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110: 563-74, 2002.
25. Bartel DP: 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-97, 2004.
26. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC: Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106: 23-34, 2001.
27. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD: A cellular function for the RNA interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293: 834-38, 2001.
28. Fire A: RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet* 15: 358-63, 1999.
29. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ: An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-296, 2000.
30. Montgomery MK, Xu S, Fire A: RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15502-15507, 1998.
31. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-98, 2001.
32. Hamilton AJ, Baulcombe DC: A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-2, 1999.
33. Zamore P, Tuschl T, Sharp P, Bartel D: RNAi: double-stranded RNA directs the ATP dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101: 25-33, 2000.
34. Tabara H, Yigit E, Siomi H, Mello CC: The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DEXH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell* 109: 861-71, 2002.
35. Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC: The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99: 123-32, 1999.
36. Nykänen A, Haley B, Zamore PD: ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107: 309-321, 2001.
37. Williams BR: Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation. *Biochem Soc Trans* 25: 509-513, 1997.
38. Gil J, Esteban M: Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis* 5: 107-114, 2000.
39. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD: How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67: 227-264, 1998.
40. Yang S, Tutton S, Pierce E, Yoon K: Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 21: 7807-7816, 2001.
41. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R: A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550-553, 2002.
42. McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, KayMA: RNA interference in adult mice. *Nature* 418: 38-39, 2002.
43. Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, Wolff JA, Herweijer H: Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet* 32: 107-108, 2002.
44. Sorensen DR, Leirdal M, Sioud M: Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J Mol Biol* 327: 761-766, 2003.
45. Kishida T, Asada H, Gojo S, Ohashi S, Shin-Ya M, Yasutomi K, Terauchi R, Takahashi KA, Kubo T, Imanishi J, Mazda O: Sequencespecific gene silencing in murine muscle induced by electroporation-mediated transfer of short interfering RNA. *J Gene Med* 6: 105-110, 2004.
46. Konishi Y, Stegmuller J, Matsuda T, Bonni S, Bonni A: Cdh1-APC controls axonal growth and patterning in the mammalian brain. *Science* 303: 1026-1030, 2004.
47. Kong XC, Barzaghi P, Rugg MA: Inhibition of synapse assembly in mammalian muscle *in vivo* by RNA interference. *EMBO Rep* 5: 183-188, 2004.
48. Matsuda T, Cepko CL: Electroporation and RNA interference in the rodent retina *in vivo* and *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 16-22, 2004.
49. Sui G, Soohoo C, Affar elB, Gay F, Shi Y, Forrester WC: A DNAAvector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 5515-5520, 2002.
50. Paddison PJ, Caudy AA, Hannon GJ: Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1443-1448, 2002.
51. Zhang L, Yang N, Mohamed-Hadley A, Rubin SC, Coukos G: Vectorbased RNAi, a novel tool for isoformspecific knockdown of VEGF and anti-angiogenesis gene therapy of cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 1169-1178, 2003.
52. Dirac AM, Bernards R: Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of p53. *J Biol Chem* Apr 4; 278 (14): 11731-11734, 2003.
53. Hemann MT, Fridman JS, Zilfou JT, Hernando E, Paddison PJ, Cordon-Cardo C, Hannon GJ, Lowe SW: An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes *in vivo*. *Nat Genet* 33: 396-400, 2003.
54. Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L: A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 33: 401-406, 2003.
55. Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, Mizuno H, Yu EY, An DS, Sabatini DM, Chen IS, Hahn WC, Sharp PA, Weinberg RA, Novina CD: Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA* 9: 493-501, 2003.
56. Tiscornia G, Singer O, Ikawa M, Verma IM: A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 1844-1848, 2003.
57. Hommel JD, Sears RM, Georgescu D, Simmons DL, DiLeone RJ: Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nat Med* 9: 1539-1544, 2003.
58. Abbas-Terki T, Blanco-Bose W, Deglon N, Pralong W, Aebischer P: Lentiviral-mediated RNA interference. *Hum Gene Ther* 13: 2197-2201, 2002.
59. Xia H, Mao Q, Paulson HL, Davidson BL: siRNA-mediated gene silencing *in vitro* and *in vivo*. *Nat Biotechnol* 20: 1006-1010, 2002.
60. Arts GJ, Langemeijer E, Tissingh R, Ma L, Pavliska H, Dokic K, Dooijes R, Mesic E, Clasen R, Michiels F, Van der Schueren J, Lambrecht M, Herman S, Brys R, Thys K, Hoffmann M, Tomme P, Van Es H: Adenoviral vectors expressing siRNAs for discovery and validation of gene function. *Genome Res* 13: 2325-2332, 2003.

61. Zhao LJ, Jian H, Zhu H: Specific gene inhibition by adeno-virus-mediated expression of small interfering RNA. *Gene* 16; 316: 137-141, 2003.
62. Kay MA, Nakai H: Looking into the safety of AAV vectors. *Nature* 424: 251, 2003.
63. Thomas CL, Leh V, Lederer C, Maule AJ: Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology* 306: 33-41, 2003.
64. Rodríguez-Barbero A, Obreo J, Álvarez-Muñoz P, Pandiella A, Bernabéu C, López-Novoa JM. Endoglin modulation of TGF-beta1-induced collagen synthesis is dependent on ERK1/2 MAPK activation. *Cell Physiol Biochem* 18: 135-142, 2006.
65. Jerkic M, Rivas-Elena JV, Santibáñez JF, Prieto M, Rodríguez-Barbero A, Pérez-Barriocanal F, Pericacho M, Arévalo M, Vary CP, Letarte M, Bernabéu C, López-Novoa JM: Endoglin regulates cyclooxygenase-2 expression and activity. *Circ Res* 99: 248-256, 2006.
66. Shimazaki A, Tanaka Y, Shinosaki T, Ikeda M, Watada H, Hirose T, Kawamori R, Maeda S: ELMO1 increases expression of extracellular matrix proteins and inhibits cell adhesion to ECMs. *Kidney Int* 70: 1769-1776, 2006.
67. Zheng X, Feng B, Chen G, Zhang X, Li M, Sun H, Liu W, Vladau C, Liu R, Jevnikar AM, García B, Zhong R, Min WP: Preventing renal ischemia-reperfusion injury using small interfering RNA by targeting complement 3 gene. *Am J Transplant* 6: 2099-2108, 2006.
68. Abdelrahim M, Samudio I, Smith R, Burghardt R, Safe S: Small inhibitory RNA duplexes for Sp1 mRNA block basal and estrogen-induced gene expression and cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem* 277: 28815-28822, 2002.
69. Silva JM, Hammond SM, Hannon GJ: A promising new approach to antiviral therapy? *Trends in Molecular Medicine* 7: 1040-1046, 2002.
70. Capodici J, Kariko K, Weismann D: Inhibition of HIV-1 infection by small interfering RNA-mediated RNA interference. *J Immunol* 169: 5196-5201, 2002.
71. Park WS, Miyano-Kurosaki N, Hayafune M, Nakajima E, Matsuzaki T, Shimada F, Takaku H: Prevention of HIV-1 infection in human peripheral blood mononuclear cells by specific RNA interference. *Nucleic Acids Research* 30: 4830-4835, 2002.
72. Shlomai A, Shaul Y: Inhibition of Hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology*; 37: 764-760, 2003.
73. Giladi H, Ketzinel-Gilad M, Rivkin L, Felig Y, Nussbaum O, Galun E: Small interfering RNA inhibits Hepatitis B virus replication in mice. *Molecular Therapy* 8: 769-776, 2003.
74. Walker MP, Appleby TC, Zhong W, Lau JY, Hong Z: Hepatitis C virus therapies: current treatments, targets and future perspectives. *Antivir Chem Chemother* 14: 1-21, 2003.
75. Liang XS, Lian JQ, Zhou YX, Wan MB: Inhibitor RNA blocks the protein translation mediated by hepatitis C virus internal ribosome entry site *in vivo*. *World J Gastroenterol* 10: 664-667, 2004.
76. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, Harborth J, Heyes JA, Jeffs LB, John M, Judge AD, Lam K, McClintock K, Nechev LV, Palmer LR, Racie T, Rohl I, Seiffert S, Shanmugam S, Sood V, Soutschek J, Toudjarska I, Wheat AJ, Yaworski E, Zedalis W, Koteliensky V, Manoharan M, Vornlocher HP, MacLachlan I: RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 441: 111-114, 2006.
77. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J: RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 9: 347-351, 2003.
78. Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Rohl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliensky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP: Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432: 173-178, 2004.