

Post-Transkripsiyonel Gen Susturulması ve Kullanım Alanları

Elif Ünal, Irmak Tahmaz, İrem Hazal Toroslu, Gülce Cansu Serin, Ayşe Yılmaz

Danışman: Yunus Kasım Terzi

ÖZET

Gen susturulması terimi, bir genin genetik modifikasyon ile değil, hücresel bir mekanizma tarafından işlevinin bastırılmasını ifade eder. Post-transkripsiyonel gen susturulması, mRNA üzerinden protein sentezinin engellenmesiyle sağlanır. Bu mekanizmaya RNA interferansı (RNAi) denir. RNAi’de gen susturulması, çift zincirli bir RNA molekülü (dsRNA) ile sağlanmaktadır. dsRNA molekülü sitoplazmada veya çekirdek içerisinde Dicer ve Drosha enzimleriyle işlenerek etkili birer gen susturma ajanları olan siRNA ve miRNA (small interfering RNA ve microRNA) haline getirilir. Oluşan oligonükleotit, ilgilenilen gen bölgesini protein haline getirecek olan mRNA molekülünü parçalar ve gen susturulması sağlanmış olur. İlk olarak bitkilerde varlığı saptanan RNAi üzerinde son yıllarda birçok çalışma yapılmaya başlanmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Mekanizmayı açıklamış olan bilim adamları, 2006 yılında Fizioloji ve Tıp alanında Nobel Ödülü’ne layık görülmüşlerdir. Günümüzde bu mekanizma, hücredeki herhangi bir genin fonksiyonunun belirlenmesinde kullanılan güçlü bir yöntemdir. Genetik hastalıklar, viral hastalıklar, kanser ve diğer bir çok hastalığın tedavisinde yeni bir yöntem olarak karşımıza çıkmakla birlikte, aynı zamanda zarar görmüş genlerin inhibisyonu da bu yöntemle yapılabilmektedir. RNAi’nin kullanım alanları konusunda son yıllarda pek çok çalışma yapılmış ve hala da yapılmaktadır. Özellikle gen susturulması prensibi ile çalışan yeni gen tedavisi protokolleri geliştirilmektedir. RNAi mekanizmasının uygulanması vücuda gönderim, nükleazlar tarafından çok çabuk yıkılma, hücresel alımda problemler, toksisite, endozomal degradasyon gibi birçok zorluğa sahip olmasına rağmen araştırma ve klinik uygulamalarda gelecek vaat etmektedir.

Anahtar Kelimeler: RNA interferansı, RISC, siRNA, miRNA, Dicer

GİRİŞ

Çok hücreli organizmalarda gen ifadelenmesinin kontrolü canlılık için büyük önem taşımaktadır. Genlerin çoğu hücre çekirdeğinde yerleşik kromozomlarda bulunur ve kendilerini sitoplazmada proteinler olarak ifade ederler. Bu genlerin ifadelenmesinin gerekli düzeyde yapılabilmesi, kontrol elemanlarıyla sağlanır.

1980'lerin başında *E. coli*'de mRNA dizisine tamamlayıcı olarak bağlanan ve translasyonu inhibe eden küçük RNA molekülleri saptanmıştır[1]. Daha sonra 1998 yılında ise bir ökaryot olan *C. elegans*'ta da tamamlayıcı RNA'nın protein sentezinin düzenlenmesini yaptığı ortaya çıkmıştır[2]. Andrew Fire ve Craig Mello, bu keşiflerinden dolayı 2006 yılında Fizyoloji ve Tıp alanında Nobel Ödülü'ne layık görülmüşlerdir. Ökaryotlarda yapılan çalışmalar sonucunda da, bu canlıların yanı sıra bitki hücreleri ve memeli canlıların hücrelerinde de benzer bir mekanizmanın olduğu tespit edilmiştir[3]. Bu olay daha sonra RNA interferansı olarak isimlendirilmiştir. Bütün bu gelişmelerin sonucunda bilim insanları posttranskripsiyonel gen susturulması üzerine yoğunlaşmıştır.

RNAi MEKANİZMASI

RNAi mekanizması ökaryotlarda, sitoplazmada gerçekleşen bir olaydır. Mekanizmayı sağlayan 2 tür efektör molekül vardır. Birincisi, 21-23 nükleotid uzunluğunda ve çift zincirli RNA (dsRNA) molekülü olan siRNA (small interfering RNA)'dır; ikincisi ise 22 nükleotid uzunluğunda dsRNA molekülü olan miRNA (micro RNA)'dır. Bu küçük RNA molekülleri kodlayıcı özelliğe (genler üzerinden protein kodlama) sahip değildir[4, 5].

siRNA'nın oluşumu, sitoplazmaya uzun dsRNA molekülünün ekzojen olarak gönderilmesinden sonra orada Rnaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Dicer enzimi ile 21-23 nükleotidlik parçalara ayrılmasıyla gerçekleşir[6]. miRNA'nın oluşumu ise çekirdekte başlar. Burada endojen olarak kodlanan primer miRNA (pri-miRNA) molekülü, Rnaz III enzim ailesinin bir üyesi olan Drosha ile işlenerek öncül miRNA (pre-miRNA) molekülüne dönüşür. Pre-miRNA'ların firkete (hairpin) yapısı vardır ve ilmeklerden (loop) oluşur. Pre-miRNA'lar daha sonra sitoplazmaya gönderilir ve burada Dicer ile ilmekleri açılır, böylece miRNA molekülü oluşmuş olur[7].

Dicer enziminin oluşturduğu kısa zincirlerin karakteristik uçları vardır. Zincirin 3' ucu dinükleotid taşır, 5' ucunda bir fosfat grubu bulunur[8].

siRNA ve miRNA'nın gen susturulması işlevini yerine getirebilmesi için RISC (RNA-induced silencing complex) adı verilen bir protein kompleksine girmesi gerekir. siRNA ve miRNA'nın kendine özgü uçları ve uzunlukları RISC tarafından tanınmaları için önemlidir. siRNA ve miRNA'nın zincirleri, RISC'i tamamlayıcısı oldukları hedef mRNA molekülüne yönlendirir[9, 10].

RISC'in merkezi ve birincil yürütücüsü Argonat proteindir[11, 12]. 1998 yılında

keşfedilen bu proteinlerin varlığı, mutant Argonatların *Arabidopsis thaliana* bitkisinin yaprak şeklinin değişmesine neden olduğunun anlaşılmasıyla ortaya çıkarılmıştır[13]. Argonat proteinleri RISC'in katalitik aktivitesinden sorumludur. İnsanda 4 Argonat proteini vardır (AGO 1-4). siRNA ile gen susturulmasında AGO2 kullanılır [11]. miRNA ile gen susturulması ise tüm 4 Argonat proteini ile sağlanır [14]. Susturulmanın sağlanabilmesi için hedefe yönlendirecek olan zincirin bu proteinlere bağlanması gerekir. Bağlanma sırasında da, susturacakları genin tamamlayıcısı olmayan zincir kompleksten dışarı atılır. Daha sonra susturucu özellikteki bu RNA zincirleri, hedef mRNA tarafından tanınır [15]. siRNA'lar hedef mRNA ile tamamen eşleşme gösterirken miRNA'lar kısmen eşleşme gösterirler [14].

Argonatların PAZ, MID ve PIWI adlı üç fonksiyonel bölgesi vardır.

- PIWI, kesme aktivitesinin güç merkezidir [16].
- RISC'e bağlanmada 3' dinükleotid PAZ bölgesi tarafından tanınır. Dinükleotid bölgesi, buradaki bir hidrofobik cebe girer; uçtaki nükleotidin bazı o bölgedeki aromatik kalıntılardan birinin aromatik halkasında kümelenir [17, 18].
- 5' fosfat grubu MID ve PIWI bölgeleri arasına girer, proteinin C-terminal ucundaki bir Mg^{+2} iyonuna bağlanır [19].

RISC'te 5' ucundaki 2-8. bazlar "kök bölgesi" adını alır. Argonat üzerindeki yerleşme sonucunda bu bölge açık hale gelir ve hedef mRNA ile baz eşleşmesi için serbest kalır. Bu bölge spesifik olarak hedefin tanınması için gereklidir ve hedefin kesici aktif bölgeye yerleşmesini sağlar. Hedef mRNA bu olaydan sonra kesilerek parçalanır ve protein sentezi inhibe edilmiş olur [20].

siRNA'lar doğrudan mRNA'yı parçalayarak gen susturulması işlevini yerine getirirken miRNA'lar çoğunlukla mRNA degradasyonuna sebep olmadan translasyonel baskılama yaparlar [14].

RISC, bu işlemlerin sonucunda geri dönüştürülür ve başka bir gen susturulması aktivitesi için kullanılır.

siRNA'NIN GÖNDERİM YÖNTEMLERİ VE KARŞILAŞILAN ZORLUKLAR

Etkili bir gen susturma ajanının istenilen organ, doku veya hücreye gönderilmediği sürece bir yararı yoktur. siRNA tedavilerinde en büyük zorluk genetik materyali hücreye göndermektir. Bunun sağlanması için çeşitli siRNA gönderim yöntemleri geliştirilmiştir. Bu gönderim yöntemleri viral vektörler, viral olmayan vektörler ve kimyasal modifikasyon yapılarak gönderimi içerir.

Çıplak siRNA düşük düzeyde antijenite göstermesi nedeniyle immun sistemin uyarılmasına neden olmamaktadır. Bununla birlikte siRNA uygulamasında,

siRNA'nın doğasından kaynaklanan bir takım zorluklar bulunmaktadır. Bunlar arasında çıplak siRNA moleküllerinin dolaşımda yer alan nükleazlarla parçalanması ve hedef doku veya hücreye gidişinin engellenmesi, hücre içine yeterli miktarda alınamaması ve istenen doku veya hücre dışındaki hücreler tarafından alınması bulunmaktadır.

Kimyasal olarak modifiye edilmiş siRNA'nın hedefleme düzeyi daha yüksektir ve enzimatik olarak yıkılması daha zordur. Fakat bu işlemin yapılması yüksek maliyetlidir ve oluşan bu siRNA da düşük aktiviteye sahiptir.

Viral vektörlerin hücre veya dokulara hedeflenmesi daha etkinlikle gerçekleşir ve etkileri uzun sürelidir. Ayrıca tek vektörle birçok RNAi mekanizma yolu başlatılmış olur. Fakat bunun da maliyeti yüksektir ve antijenite düzeyi yüksek olduğu için immun cevap oluşturur [21].

Nonviral araçlar lipozomlar, katyonik polimerler ve doğal polimerlerdir. Bu gönderim araçlarının hücreler tarafından alımı yüksek düzeydedir ve kanda hemen degrade olmazlar. Ayrıca biyolojik olarak uyumlu araçlardır. Bununla birlikte lipozomlar yüksek düzeyde toksisiteye sahiptir; katyonik polimerler yüklerinden dolayı sitotoksikite oluştururlar ve doğal polimerlerin de hücre içinde endozomal kaçışı çok düşüktür.

siRNA'nın çok önemli bir işlevi olmasına rağmen, gönderiminde ve uygulanmasında hücre içinde ve hücre dışında zorluklarla karşılaşmaktadır.

Hücre dışında yaşanan zorluklar zorluklar;

- Kan dolaşımında siRNA'nın yarı ömrünün hedefe ulaşamayacak kadar kısa olması [22]
- siRNA'nın gönderiminde kullanılan taşıyıcı sistemlerin toksik etkileri
- siRNA'nın hücre içine alımının yetersiz olması
- siRNA'nın gönderilmek istenen yerler dışındaki yerleri de etkilemesi (hedefleme problemi)

Hücre içinde yaşanan zorluklar;

- Endozomal yıkım
- siRNA'nın taşıyıcı sistemlerinden ayrılması ve işlevini yerine getirmek için serbest kalması

1) Stabilité

siRNA *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda çok kararsızdır. Çıplak siRNA vücutta dolaşıma girdiği zaman serum ve doku nükleazları tarafından yıkılır, böbrekler

yoluyla atılır veya makrofajlar tarafından alınarak yok edilir [23].

Kimyasal modifikasyonlar, stabiliteyi artırmak için uygulanabilecek seçeneklerden bir tanesidir. En yaygın yaklaşımlar 3' ucundaki fosfodiester (PO₄) grubuyla fosfotiat (PS) değişmesidir. siRNA ya O-metil grubu, floro grubu veya 2-metoksietil grubu takılması hücre kültürlerinde ve plazmada yarı ömrünü uzatmıştır. 2,4-dinitrofenol (DNP) gibi küçük moleküllerle yapılan siRNA modifikasyonu, hem nükleaz direncini hem de membranın siRNA'ya geçirgenliğini artırır. Bu modifikasyonların siRNA'nın etkisini azaltacağı yönünde endişeler de vardır. Örneğin boronofosfat modifikasyonu nükleaz direncini artırmasında rağmen RNAi aktivitesini azaltmaktadır.

Uygun taşıyıcı araçların kullanılmasıyla da siRNA'nın kanda dolaşma süresi uzatılabilir. siRNA yüksek miktarda negatif yüke sahip olduğundan dolayı katyonik polimerler veya lipidlerle poliplex veya lipoplex oluşturarak degradasyondan korunabilir [24]. Ancak bu kompleksler kandaki negatif yüklü proteinlerin katyonları kendilerine çekmesi sonucunda bozularak siRNA'yı yalnız bırakabilirler. Bu durumda da siRNA degradasyona açık hale gelir. Bunun engellenmesi için kompleksler polietilen glikol (PEG) ile kaplanabilir ve böylece komplekslerin bozulması önlenmiş olur; ek olarak da PEG, bu komplekslerin antijenik özelliğini azaltır [25].

2) Toksisite

RNAi temelli terapi yöntemlerinin kullanılmasındaki bir diğer endişe de toksisitedir. siRNA'nın toksisitesi kimyasal modifikasyonlar ile azaltılabilmektedir. Bu durumda ise emniyete alınan siRNA seçildikten sonra, gönderim sistemlerinden kaynaklanan toksisite bir sorun oluşturmaktadır [26]. Hücresel alımın ve stabilitenin sağlanması için kullanılan katyonik lipidler ve polimerlerin *in vitro*'da sitotoksik olduğu gösterilmiştir. *In vivo* uygulamada ise bu durumun engellenmesi için immün baskılayıcı ajanlar kullanılabilir.

3) Hücresel Alımın Artırılması

siRNA ve plazma membranının negatif yüklü olması, siRNA'nın hücre tarafından alımının çok düşük olmasına yol açar. Hücresel alımın artırılması için iki yöntem geliştirilmiştir:

- Pozitif yükleri artırmak için katyonik materyallerle kompleks oluşturmak
- Hücreyi geçen peptitler ile konjuge etmek [27]

Fakat bu iki yöntem, siRNA alımının hem istenen hem de istenmeyen hücrelerde artmasına neden olmuştur. Bu nedenle bu yöntemlerin siRNA'nın sistemik gönderimi için uygun yöntemler olduğu düşünülmemektedir.

4) Hedefleme

siRNA'nın istenen dokuya veya hücelere gönderimi, RNAi mekanizmasının istenen şekilde işlev görebilmesi açısından önemlidir. Ayrıca bu sayede hem siRNA'nın tedavi dozu hem de yan etkileri azaltılmış olmaktadır. Bunun için geliştirilen ilk hedefleme stratejisi, artırılmış geçirgenlik ve tutulmadır (EPR-Enhanced Permeability and Retention) ve tümörlere özgüdür [28]. Hedeflemeyi artırmak için taşıyıcılara küçük moleküller peptitler ve antikolar takılabilir. Polimerler ve lipidler hücreye özgü hedefleme yapamazlar ama fonksiyonel grup farklılığı ile hedef parçaların bağlanmasını sağlarlar [29]. Bu da hem hücresel alımı hem de hedeflemeyi artırır.

5) Endozomal Kaçış ve siRNA Salımı

siRNA ve taşıyıcıları hücreye girdiği zaman endozomal enzimlere mağruz kalabilirler. Lipid gönderim sistemlerinin bundan kaçış yeteneği vardır. Katyonik lipidler endozomal membrandaki anyonik lipidlerle iyon çiftleri yapabilirler ve bu da lipid yapısının bozulmasını sağlayarak siRNA salımını tetikler [30]. Polimerlerin ise genellikle kaçış yeteneği yoktur.

Dallı polietilen imin (PEI), siRNA'nın endozomal kaçışını sağlayabilir ancak dallı PEI'nin yüksek toksisitesinin olması, klinik uygulamaları sınırlamaktadır. Buna alternatif yollar aranırken histidinin bu durumdaki işlevleri tanımlanmıştır. Histidin inklüzyonu vektörlere endozomal pH'da tampon oluşturma yeteneği verir. Histidin veya imidazol içeren polimerler siRNA gönderimi için etkili ve güvenli bir yol oluşturur [31].

mRNA sitoplazmada bulunduğu için, gen susturulmasından sorumlu ajanların da sitoplazmada bulunması gerekmektedir. Stabil kompleksler siRNA'nın kompleksten çıkışını engeller, stabil olmayanlar ise siRNA degradasyonuna neden olurlar. siRNA taşıyıcı polimerlere disülfid bağı eklenmesiyle salım artırılmaktadır. Bu disülfid bağları sitoplazmada indirgenir. Sonuçta siRNA salım miktarı artar ve serbest nükleik asitlerin biyolojik aktivitelerine başlaması için uygunluk artırılmış olur [32].

KULLANIM ALANLARI

Son yıllarda siRNA'nın stabilitesini arttıran, toksisitesini azaltan taşıyıcı biçimlerinin bulunması siRNA'nın tedavi amaçlı kullanılmasını hızlandırmıştır. siRNA'nın tedavi amaçlı ilaç olma konusunda çok büyük potansiyeli olduğu düşünülmektedir. siRNA translasyonu etkiler ancak transkripsyonu etkilemez, bu da DNA üzerinde kalıcı hasar yaratan mutasyon oluşumunu engeller. siRNA'nın tedavi edici ilaç olarak kullanılmasının bir diğer avantajı ise etki edip susturabileceği protein sayısı çok ve çeşitli olmasıdır [33].

siRNA'nın tedavi edici potansiyelini gösteren birçok çalışma yapılmıştır. İlk yapılan klinik çalışmalarda siRNA ilaçları AMD (Age-related macular

degeneration) hastalığı için doğrudan göze uygulanmıştır. Lokal olarak uygulanmasının nedeni stabilizasyon ve gönderimdeki zorluklardan kaçınmak olmuştur. Yapılan klinik çalışmaların *in vivo*'da yeterince başarılı olamamasının siRNA'nın gönderimindeki sorunlardan mı kaynaklandığı yoksa RNAi mekanizmasından mı olduğu bilinmemektedir [34].

Viral mRNA'yı hedef alan siRNA'nın, farklı aşamalardaki HIV virüsünün yaşam döngüsünü inhibe ettiği ortaya çıkarılmıştır [35].

Farelerde yapılan çalışmalarda siRNA'nın, kronik ve ağır otoimmün hepatiti olan farelerin karaciğer iflasını engellemiş olduğu saptanmıştır [36].

Kanser de bir genetik hastalık kategorisine girmektedir ve kanserle ilgili birçok gen bulunmuştur. Kanser bu genetik doğası siRNA aracılı gen tedavisi için onu iyi bir aday yapmaktadır. Dominant onkogenleri, düzenleyici ve viral onkogenleri hedef alan siRNA modelleri tasarlanmıştır. Kanser tedavisi için RNAi mekanizmasıyla gen susturulması çoğunlukla laboratuvarlarda hücre kültürlerinde denenmiştir. Asıl zorluk olan hastalara gönderim konusunda tartışmalar hala sürmektedir. Her kanser türü için farklı gönderim sistemleri mevcuttur. Farklı türdeki kanserler için siRNA gönderim mekanizmaları aşağıdaki tabloda gösterilmektedir [37, 38]

Gönderim Sistemleri	Özellik	Hedef Gen	Hayvan Modeli	Yol
Lipozomlar	SNALP	HBV	HBV vektör bazlı fare	i.v.
	Katyonik lipozom	Bcl-2	Karaciğer metastazı fare modeli	i.v.
	Katyonik lipozom	Integrin-av	Prostat kanseri	i.t.
	Katyonik lipozom	CD31	Prostat kanseri	i.v.
	Katyonik lipozom	Bcl-2	Prostat kanseri	i.t.
	Katyonik kardiolipin lipozom	Raf-1	Prostat kanseri	i.v.
	Katyonik kardiolipin analog bazlı lipozom	c-raf	Meme kanseri	i.v.
	Nötral lipozomlar (DOPC)	EphA2	Over kanseri	i.v./i.p.
	Nötral lipozomlar (DOPC)	FAK	Over kanseri	i.p.
	Nötral lipozomlar (DOPC)	ADRB2	Over kanseri	i.p.
	Nötral lipozomlar (DOPC)	IL-8	Over kanseri	i.p.
	Lipozom polikasyon DNA	EGFR	Akciğer kanseri	i.v.
	Katyonik immunolipozom		Akciğer metastazı	i.v.
	İmmunolipozom	Her-2	Meme kanseri	i.v.
Nanopartiküller	CaCO ₃ nanopartikül	VEGF	Mide kanseri	i.t.
	Chitosan kaplı nanopartikül	RhoA	Meme kanseri	i.v.
	Folatlı lipid nanopartikül	Her-2	Nazofaringeal kanseri	i.t.
Polimerler	PEI	Her-2	Over kanseri	i.p.
	PEI	PTN	Orthotopik glioblastom	i.c.
	Poli (ester amin)	Akt1	Akciğer kanseri	Solunum
Diğerleri	Atelokollajen	HPV18 tipi E6 ve E7	Serviks kanseri	i.t.
	Kimyasal modifikasyonlar	HBV	HBV vektör bazlı fare	i.v.
	Karbon nanotüp	TERT	Lewis akciğer tümörü	i.t.
	Siklodekstrin (polikasyon içerir)	EWS-FL11	Ewing'in metastatik sarkomu	i.v.
	Füzyon protein (Protamin, HIV-1 zarflı Ab	c-myc, MDM2, VEGF	Cilt altı B16 melanom tümör	i.t./i.v.
	Elektroporasyon	EGFP	Cilt altı B16F10 ifadelenen EGFP	i.t.

SONUÇ

RNAi teknolojisi son yıllarda, genlerin işlevlerini inceleme konusunda en büyük gelişmedir. Sadece hastalıkların tedavisinde değil, işlevini bilmediğimiz genlerin fonksiyonlarını anlamamıza da yardımcı olmaktadır. Gen ifadelenmesini durdurarak birçok hastalığın gelişimini ve oluşumunu engelleyerek hastalıkların tedavisinde gelecek vaat etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Gottesman S. The small RNA regulators of Escherichia coli: roles and mechanisms*. *Annu Rev Microbiol* 2004,**58**:303-328.
2. 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* 1998,**391**:806-811.
3. Blokland Rv. Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *The Plant Journal* 1994.
4. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000,**101**:25-33.
5. Zhao Y. A developmental view of microRNA function. *Trends in Biochemical Sciences* 2007.
6. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001,**409**:363-366.
7. Gregory RI, Chendrimada TP, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex. *Methods Mol Biol* 2006,**342**:33-47.
8. Vermeulen A, Behlen L, Reynolds A, Wolfson A, Marshall WS, Karpilow J, et al. The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency. *RNA* 2005,**11**:674-682.
9. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005,**123**:631-640.
10. Leuschner PJF, Ameres SL, Kueng S, Martinez J. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep.* 2006.
11. Hutvagner G, Simard MJ. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008,**9**:22-32.
12. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004,**305**:1437-1441.
13. Bohmert K, Camus I, Bellini C, Bouchez D, Caboche M, Benning C. AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *EMBO J* 1998,**17**:170-180.
14. Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, et al. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 2005,**122**:553-563.

15. Jinek M, Doudna JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* 2009,**457**:405-412.
16. Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 2004,**305**:1434-1437.
17. Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M. Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain. *Nature* 2003,**426**:465-469.
18. Yan KS, Yan S, Farooq A, Han A, Zeng L, Zhou MM. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* 2003,**426**:468-474.
19. Ma JB, Yuan YR, Meister G, Pei Y, Tuschl T, Patel DJ. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the A. fulgidus Piwi protein. *Nature* 2005,**434**:666-670.
20. Parker JS, Roe SM, Barford D. Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* 2005,**434**:663-666.
21. Gao Y, Liu XL, Li XR. Research progress on siRNA delivery with nonviral carriers. *Int J Nanomedicine* 2011,**6**:1017-1025.
22. Merkel OM, Librizzi D, Pfestroff A, Schurrat T, Buyens K, Sanders NN, et al. Stability of siRNA polyplexes from poly(ethylenimine) and poly(ethylenimine)-g-poly(ethylene glycol) under in vivo conditions: effects on pharmacokinetics and biodistribution measured by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy and Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) imaging. *J Control Release* 2009,**138**:148-159.
23. Kim EJ, Park TG, Oh YK, Shim CK. Assessment of siRNA pharmacokinetics using ELISA-based quantification. *J Control Release* 2010,**143**:80-87.
24. Malek A, Merkel O, Fink L, Czubayko F, Kissel T, Aigner A. In vivo pharmacokinetics, tissue distribution and underlying mechanisms of various PEI(-PEG)/siRNA complexes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009,**236**:97-108.
25. Li SD, Chen YC, Hackett MJ, Huang L. Tumor-targeted delivery of siRNA by self-assembled nanoparticles. *Mol Ther* 2008,**16**:163-169.
26. Putnam D, Gentry CA, Pack DW, Langer R. Polymer-based gene delivery with low cytotoxicity by a unique balance of side-chain termini. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001,**98**:1200-1205.
27. Arthanari Y, Pluen A, Rajendran R, Aojula H, Demonacos C. Delivery of therapeutic shRNA and siRNA by Tat fusion peptide targeting BCR-ABL fusion gene in Chronic Myeloid Leukemia cells. *J Control Release* 2010,**145**:272-280.
28. Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2003,**2**:347-360.
29. Zhou QH, You YZ, Wu C, Huang Y, Oupicky D. Cyclic RGD-targeting of reversibly stabilized DNA nanoparticles enhances cell uptake and transfection in vitro. *J Drug Target* 2009,**17**:364-373.
30. Tseng YC, Mozumdar S, Huang L. Lipid-based systemic delivery of siRNA. *Adv Drug Deliv Rev* 2009,**61**:721-731.
31. Leng Q, Scaria P, Zhu J, Ambulos N, Campbell P, Mixson AJ. Highly branched HK peptides are effective carriers of siRNA. *J Gene Med* 2005,**7**:977-986.
32. Soundara Manickam D, Oupicky D. Polyplex gene delivery modulated by redox potential gradients. *J Drug Target* 2006,**14**:519-526.

33. de Fougerolles A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2007,**6**:443-453.
34. Watts JK, Corey DR. Clinical status of duplex RNA. *Bioorg Med Chem Lett* 2010,**20**:3203-3207.
35. Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, Beresford PJ, Riess J, Lee SK, *et al.* siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med* 2002,**8**:681-686.
36. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, *et al.* RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 2003,**9**:347-351.
37. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004,**10**:789-799.
38. Oh YK, Park TG. siRNA delivery systems for cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev* 2009,**61**:850-862.