Review Article

J Korean Soc Transplant 2015;29:101-108
http://dx.doi.org/10.4285/jkstn.2015.29.3.101

JKST

장기이식에서의 RNA간섭 치료법의 전망

가천대학교 생명과학과

김재영

Current Prospects of RNA Interference-based Therapy in Organ Transplantation

Jae Young Kim, Ph.D.

Department of Life Science, Gachon University, Seongnam, Korea

RNA interference (RNAi) is a normal cellular process in which small RNAs control gene expression. siRNAs introduced into cells suppress gene expression through their recognition and cleavage of cognate mRNAs in a sequence specific manner. Due to its highly specific mode of action, RNAi has recently been tested for treatment or prevention of various diseases including organ transplantation as well as basic biomedical research. However, to achieve clinical success, there are some important issues that should be fully validated. First, siRNAs should be properly designed to avoid off-target effects. Second, siRNAs must be modified so as not to induce innate immune responses. Third, selective delivery of siRNA into desired organs or tissues is required. Despite such prerequisites, siRNAs are thought to be superior to traditional small molecule drug in terms of new drug development. In addition, in case of heart and islet transplantation which probably requires preservation of organs or cultivation of tissues for a while, siRNAs can be added to preserving solution or medium to control target gene expression during this period. In many research studies, mediators of innate immune response, inflammation, and cell death have been tested for alleviation of tissue injury and immune rejection after transplantation as potent targets of RNAi. We suggest that elucidation of exact mechanisms for tissue injury and immune rejection and subsequent selection and validation of target of RNAi in future studies might be helpful in enabling RNAi-based therapy in clinical organ transplantation to become a reality.

Key Words: RNA interference, Small interfering RNA, Organ transplantation
중심 단어: RNA간섭, 작은 간섭 RNA, 장기이식

서 론

RNA간섭(RNA interference, RNAi)은 작은 크기의 RNA가 염기서열 특이적으로 유전자 발현을 조절하는 세포 내에 정상적으로 존재하는 현상을 말한다(1-3). RNA 간섭에 관여하는 작은 RNA는 크게 두 가지가 있는데, 하나는 miRNA (microRNA)이고, 다른 하나는 siRNA (small interfering RNA)이다(4,5). miRNA는 원래 세포 내 유전자로부터 발현되는 전사체로써 전사후유전자침묵(posttranscriptional gene silencing)을 매개하며, siRNA는 외부로

Received September 2, 2015
Revised September 10, 2015
Accepted September 10, 2015

Corresponding author: Jae Young Kim
Department of Life Science, Gachon University, 1342 Seongnamdae-ro, Sujeong-gu, Seongnam 13120, Korea
Tel: 82-31-750-4762, Fax: 82-31-750-8573
E-mail: jykim85@gachon.ac.kr

Copyright ⓒ the Korean Society for Transplantation, 2015

부터 세포 내로 도입된 이중가닥 RNA (dsRNA)로 자신과 상보적인 염기서열을 지닌 mRNA를 절단한다(4,5). RNA 간섭의 작용방식이 표적 mRNA의 염기서열에 고도로 특이적이기 때문에 염기서열만 안다면 이론적으로 원하는 어떠한 유전자의 발현도 조절 가능하다. 이러한 이유로, 다양한 의생명 연구에 광범위하게 이용되고 있으며, 최근에는 전통적인 약물치료의 대안으로써 다양한 질환에 RNA 간섭 치료법을 적용하려는 시도가 늘고 있다. 본 논문에서는 RNA간섭의 원리, 적용 및 장기이식에서의 RNA간섭 치료연구의 예들을 살펴 봄으로써, 장기이식 분야에서 RNA간섭 치료법의 임상적용에 대해 전망해보고자 한다.

본 론

1. RNA간섭의 원리

RNA간섭은 생체 내에서 RNase III endonuclease인 Dicer의 작용을 통해 siRNA를 생성하는 다단계의 과정이다. 생성된 siRNA는 상보적인 염기서열을 지닌 RNA의 선택적인 분해를 매개한다(6,7). RNA간섭은 실질적으로 어떤 RNA도 분해할 수 있는 단순한 메커니즘을 이용한다. 생체 내로 도입된 긴 dsRNA는 dsRNA 특이적 RNase인 Dicer의 작용에 의해 짧은 siRNA로 가공된다(8,9). 가공된 siRNA는 21～24개의 염기쌍으로 이뤄진 dsRNA이며, 양쪽 3’말단에 2개의 염기가 짝을 이루지 않은 상태로 노출된 형태(3’overhang)를 보인다(10). 외부에서 도입된 합성 siRNA나 세포 내에서 발현되는 siRNA는 Dicer에 의한 dsRNA 가공과정 없이 RNA-induced silencing complex (RISC)와 결합된다. 표적 mRNA의 절단은 siRNA의 5’말단으로부터 10개 염기 상행의 한 지점에서 시작된다(11). RNA간섭 경로에는 두 가지 작은 RNA가 작용하는데 siRNA와 더 길고 stem loop 구조의 전구체 RNA로부터 가공과정을 거쳐 만들어지는 microRNA (miRNA)이다(12,13). Dicer는 이 두 가지 RNA 효과기를 만드는데 중요한 역할을 한다(13). 의생명과학 연구나 치료에 이용될 수 있는 RNA간섭 재료는 크게 두 가지로 나누어지는데, 하나는 화학합성으로 만드는 siRNA이고, 다른 하나는 재조합 DNA로부터 만들어지는 shRNA (short hairpin RNA)이다(14). shRNA는 miRNA를 흉내 내서 디자인된 것으로, 벡터에 포함된 DNA 상태로 세포에 도입되어 RNA로 발현되기 때문에 오랫동안 RNA간섭을 유도할 수 있다는 점이 siRNA와 다르다(15). 본 논문에서는 이 두 가지 RNA 중 RNA간섭 치료도구로써 보다 보편적으로 사용되는 siRNA에 국한하여 논의하고자 한다.

2. siRNA의 염기서열 디자인

유전자 침묵유도를 위해 RNA간섭 경로를 이용하는 가장 일반적인 방법은 21～22개 염기쌍 크기의 siRNA를 세포 내로 도입하는 것이다. siRNA 염기서열은 유전자침묵의 정도와 기간을 결정하는 가장 중요한 요소이다. 효과적인 siRNA 염기서열을 추천하는 여러 웹기반 소프트웨어들이 존재하는데(16-19), 염기서열의 선발에 특별한 규칙을 따른다. 즉, 열역학적 특성(20), 염기서열의 길이(21), GC 비율, RNA 2차 구조, mRNA 상에서의 상보적인 염기서열의 위치, 단일염기다형성 위치, 표적 유전자 이외의 유전자와의 결합 등(22,23)이다. 소프트웨어를 이용해 표적 mRNA에 완벽히 상보적이면서 다른 mRNA에는 상보적이지 않은 대략 21개의 염기서열을 선발할 수 있다(24). 이미 많은 바이오기업들이 siRNA를 디자인, 제작, 판매하고 있기 때문에, 원하는 유전자의 mRNA 염기서열이나 어떤 경우, 분자의 이름만 제공해도, 가장 효율적일 것으로 추정되는 siRNA를 선발해준다. 하지만, 실제 siRNA의 효율은 세포에 적용하여 확인하기 전까지는 장담할 수 없기 때문에, 통상 복수의 siRNA종을 제작해 이용한다. 원하는 유전자의 발현을 얼마나 효율적으로 조절하는가도 중요하지만, 원하지 않는 유전자의 발현에 영향을 주지 않는 것도 중요하다. 표적 mRNA와 완벽히 상보적인 siRNA는 mRNA의 절단을 유도하지만, 완벽하게 상보적이지 않고 1～2개의 염기가 쌍을 이루지 않는 siRNA도 mRNA와 결합해 단백질 합성을 방해할 수 있다. 따라서, 이를 검토해 피하지 않으면 의도와 상관없이 원하지 않는 mRNA 발현에 영향을 줄 수 있다(25,26). 이러한 siRNA의 부작용은 원하지 않는 mRNA의 3번 말단 비번역부위(3’-untranslational region, 3’-UTR)에 상보적인 염기서열이 존재하는 것과 관련이 있다(27). 연구자들이 많이 사용하는 유전자들의 경우 siRNA의 발현억제 효율이나 부작용 등을 미리 시험, 검증하여 판매하기 때문에 문제가 거의 없을 수 있지만, 많이 알려지지 않은 표적 유전자를 조절하고자 할 경우에는 웹기반 탐색 프로그램(http://dscheck.rnai.jp)(28)을 이용해 스스로 검증할 필요가 있다. 비록, 이러한 프로그램이 siRNA의 부작용을 줄일 수 있지만, 실제 다른 유전자 발현에 영향을 주지 않았는가는 마이크로어레이 등을 통해 연구자들이 직접 확인할 필요가 있다.

3. siRNA에 대한 면역반응

이 밖에도 siRNA를 제작하는데 고려할 점이 더 있는데, 그것은 siRNA에 대한 면역반응이다. 바이러스 유래 dsRNA에 대한 선천면역시스템(innate immune system)이 존재하

기 때문에, siRNA가 선천면역반응을 유도할 수 있는가에 대한 많은 논의가 있었다(29-31). 실제로, 단일가닥 또는 이중가닥 RNA는 Toll-like receptor 3 (TLR3)(32), TLR7/8 (23,33,34)경로, 비TLR 경로인, Retinoic acid inducible gene I (RIG-I)(35) 또는 PKR (dsRNA-dependent protein kinase) 경로(36) 등을 통해 선천면역계를 자극할 수 있다. 하지만, siRNA의 화학적 특성을 바꾸면 외부에서 도입되는 siRNA에 의해 유도되는 선천면역 반응을 현저히 감소시킬 수 있다. 예를 들어, dsRNA에서 RISC (RNA-induced silencing complex)와 복합체를 이루지 않는 기능이 없는 sense RNA에 2'-O-methyl-modified purine nucleosides를 결합시키면 표적 유전자 특이성은 유지하면서 인터페론 반응을 감소시킬 수 있다(37-39). 이러한 변조는 또한 RNA의 RNase에 대한 감수성을 감소시켜 혈청 내 안정성을 향상시킨다(40). 이와 같이, 비록 포유동물 세포가 dsRNA의 도입에 정교하게 반응하지만, 30개 이하 염기쌍 크기의 dsRNA에 대해서는 PKR-매개 인터페론 반응을 유도하지 않을 것으로 여겨지고 있다(14,29,31,41). siRNA의 크기 외에 고려할 점이 있는데, T7 polymerase를 이용한 siRNA의 시험관 내 합성은 5번 말단 3인산을 만드는데, 이는 인터페론 반응을 야기할 수 있다(42). 또한, siRNA에 3'overhang이 없이 뭉뚝한 말단으로 만들어 사용할 경우, 세포질에 있는 RIG-I에 의해 인지되어 인터페론반응을 유도할 수 있다(35). 따라서, 5번 말단 3인산이 없고, 적절한 3'overhang이 있는 화학적으로 합성된 siRNA는 이러한 문제점을 경감시킬 수 있다(43).

4. siRNA 운반체

siRNA는 음전하를 띄고 있고, 상대적으로 큰 분자이기 때문에 세포막을 투과하기 어렵다. 따라서, 리포좀 등을 포함한 transfection 용액을 이용해 siRNA를 세포 내로 도입하는 것이 일반적인 방법이다. 하지만, 일차세포(primary cell)와 생체 내 적용을 위해서는 종종 특별한 운반체가 요구되기도 한다. 혈액을 통해 전신적으로 운반하기 위해서는 화학적으로 변조된 siRNA를 운반체로 포장하는 것이 가장 빈번한 방법이다. 수 많은 siRNA 운반체들이 개발되어 보고된 바 있다(44-47). 가장 일반적인 것은 지질기반 운반체나 sense가닥에 콜레스테롤을 결합시킨 것이다. 콜

Table 1. 실험동물 장기이식 모델에서의 RNA간섭치료 연구

장기이식모델	표적 유전자	RNA	운반체	효과	참고문헌
마우스 동종심장이식	MyD88, TRIF	siRNA	-	생존율 증가, 림프구 침윤 감소	(66)
마우스 동종심장이식	CCR5	shRNA	Lentivirus	생존율 증가, 림프구 침윤 감소	(72)
마우스 자가심장 허혈/재관류손상	TNF-a, C3, Fas	siRNA	-	생존율 증가, 심기능 향상, 림프구 침윤감소	(65)
랫 자가신장 허혈/재관류손상	ETaR	shRNA	Plasmid	신기능 향상, 조직 내 염증성 매개자 감소	(73)
미니돼지 자가신장 허혈/재관류손상	Caspase3	siRNA	-	조직손상 및 신기능 영향 없음	(74)
랫 동종신장이식	CD40	siRNA	-	공여체 특이항체, 보체, 염증매개자 감소,	(71)
랫 동종신장이식	SHARP-2	shRNA	Lentivirus	생존율 증가	(75)
마우스 자가신장 허혈/재관류손상	RelB	siRNA	-	신기능 향상, 생존율 증가	(76)
마우스 자가신장 허혈/재관류손상	p53	siRNA	-	신기능 향상	(62)
마우스 자가신장 허혈/재관류손상	C5aR	siRNA	-	신기능 향상, 염증매개자 감소	(77)
당뇨마우스 췌도세포이식	β2m	siRNA	Nanoparticle	당뇨유도 연기, MRI로 모니토링 가능	(78)
당뇨마우스 췌도세포이식	CCR2	siRNA	Lipid nanoparticle	당뇨유도 연기	(67)
당뇨마우스 췌도세포이식	Caspase3	siRNA	Nanoparticle	췌도세포 사멸 감소	(79)
당뇨마우스 췌도세포이식	Caspase3	shRNA	Adenovirus	당뇨유도 연기	(80)

Abbreviations: MyD88, myeloid differentiation factor 88; TRIF, TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β; CCR5, CC-motif chemokine receptor 5; TNF-a, tumor necrosis factor-alpha; C3, complement 3; ETaR, endothelin A receptor; SHARP-2, split- and hairy-related protein-2; RelB, Rel/nuclear factor kappaB; β2m, β2-microglobulin.

레스테롤이 결합된 siRNA는 제품화되어 있으며, 혈청에서 저밀도지질단백(low-density lipoprotein, LDL)과 결합함으로써 간으로의 유입을 향상시킨다(48). 친지질성의 siRNA는 또한 고밀도지질단백(high-density lipoprotein, HDL)과도 결합하여, HDL 수용체를 지닌 장(49), 신장(49), 질(50)의 상피세포와 뇌의 희돌기교세포(oligodendrocytes)(51)로 운반이 용이하다. 영장류 실험에서 stable nucleic acid lipid particle (SNALP)과 siRNA를 결합시켜 단회 투여로 거의 2주간 표적 유전자 발현을 감소시킨 흥미로운 결과도 있다(52). 최근 동일한 운반 전략을 이용해 Ebola virus 단백질 발현을 공격하는 siRNA를 영장류에 주입하여 치명적인 Ebola virus로부터 영장류를 성공적으로 보호할 수 있었다(53). siRNA에 transferrin을 결합시켜 transferrin 수용체를 지닌 암세포를 선택적으로 공격하는 연구결과도 보고된 바 있다(54). 그 밖의 조직 특이적 운반체들은 aptamer(55,56), 항체(57-59), 펩티드 및 단백질(54,60), oligonucleotide agonists(61) 등이 있다. 혈액을 통해 전신적으로 운반된 RNA중 복합체를 이루지 않은 siRNA는 신장을 통해 쉽게 제거되어 배출된다(62).

5. 장기이식에서의 RNA간섭 치료연구

RNA간섭은 질병의 치료와 예방 등을 포함하는 다양한 의생명연구에 이용되고 있으며(63), 신약개발 등으로 패러다임이 옮겨지고 있다(64). 아직까지 RNA간섭의 임상적용이 실현되지는 않았지만, 진행중인 여러 임상연구는 성공 가능성을 기대하게 한다(43). 안질환, 암, 신장질환, 바이러스 감염, 등에 대한 20여건의 임상연구가 진행 중이거나 완료되었다(43). 이 중에는 장기이식 치료제로써 연구가 진행중인 약물도 있다. Table 1에 최근에 보고된 실험동물을 이용한 장기이식 모델에서의 RNA간섭 치료연구들을 정리해 놓았다. 이 연구들에서 사용한 표적 유전자들은 주로 선천면역반응 매개자, 염증반응매개자나 세포사멸 매개자들로 장기의 손상과 거부반응을 줄이는 데 이용되었다. 췌도를 제외하고는 운반체를 이용하지 않고, 일시적으로 siRNA를 도입해고 비교적 좋은 결과를 얻음을 알 수 있다. Table 1에 정리된 내용 중 대표적인 연구결과 한두 가지를 심장, 신장, 췌도이식 모델 순으로 살펴 보고자 한다.

1) 심장

심장의 경우 연구 예가 많지 않은데, 그 중 두 가지를 소개하면, 첫 번째는 공여심장의 냉장보존을 장시간 할 수 밖에 없을 때 유용한 방법에 관한 논문이다. 심장 허혈/재관류 손상 마우스 모델에서 각각 Tumor necrosis factor-a (TNF-a), 보체 C3와 Fas 유전자를 제어하는 siRNA들을 장기보존액인 UW 용액(University of Wisconsin solution)에 함께 넣어 48시간 장기를 보관 후 이식할 경우, 대조군 siRNA를 포함한 UW 용액에 보관한 장기에 비해, 장기 내로 침윤되는 면역세포의 수가 현저히 감소되고, 심기능이 향상되며, 결과적으로 장기 생존율이 증가하는 결과를 보여주었다(65). 이러한 연구결과는 이식 전, 환자가 아닌 장기를 처리함으로써 이식 거부반응에 관여하는 분자를 제어하는데 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 보인다. 이와는 반대로 이식 받을 수혜자(recipient)를 처치하는 경우도 있는데, 마우스 동종 심장이식 모델에서 수용자에게 TLR 신호전달 경로의 공통매개분자들인 MyD88과 TRIF를 표적으로 하는 siRNA를 주입했을 때 이식생존율이 현저히 증가함을 보고하였다. 이러한 결과는 CD4+CD25+FoxP3+ 조절 T 세포(regulatory T cell) 수의 증가와 Th2 면역반응으로의 전향 때문인 것으로 해석하고 있다(66). 비록 앞서 언급한 장기 보관액을 이용한 전처리 방법이 상대적으로 임상에 더 쉽게 적용될 수 있을 것으로 보이지만, 수용자의 면역반응을 직접적으로 제어하는 방법이 추가적인 연구들을 통해 그 효용과 안정성이 입증된 다면, 훨씬 더 큰 파급효과를 보일 것으로 기대한다.

2) 신장

신장의 경우 현재 임상연구 2상이 진행되고 있는 약물과 관련하여 이미 보고된 논문의 내용을 소개하고자 한다. Molitoris 등은 형광물질이 부착된 p53을 표적으로 하는 siRNA (siRNA-p53)를 허혈모델 마우스의 정맥으로 주입하고 2-광자(2-photon) 현미경을 이용해 siRNA의 체내 분포를 실시간으로 분석하고, 신손상과 신기능을 분석하였다. 그 결과 주입된 siRNA-p53이 허혈이나 신독성과 관련된 신손상의 주된 장소인 근위세관세포(proximal tubule cells)의 손상을 억제하고 신기능을 효과적으로 보호함이 확인되었다(62). 더불어, 흥미로운 점은 정맥주사된 siRNA가 다른 장기에 비해 매우 선택적으로 신장의 근위세관세포에 흡수되었다는 점이다. 이러한 결과는 신장으로 국부주입하거나 특별한 운반체와 함께 사용할 필요 없이 정맥주사를 통해 근위세관세포를 표적으로 siRNA를 사용할 수 있음을 의미해, 그 응용 가치가 매우 높다고 할 수 있다. 실제로 siRNA-p53을 급성 신손상, 이식 후 지연성 신기능, 급성신부전 등의 치료제로써 임상 1/2상을 완료하였거나 진행 중에 있다(43).

Table 2. 신약개발 측면에서의 siRNA와 기존 화학약물의 다양한 특성 비교

	siRNA	화학약물
특이성	매우 높음	상대적으로 낮음
효능	보통 pM 농도	다양함
접근 가능한 표적 수	1,000개 이상	500～1,000개
가능한 선도 및 후보분자 수	10～100개 이상	2～3개
선도물질 개발기간	1～2개월	2～4년
종간 교차 반응성	높음	낮음
제조과정	공통되고, 빠름	다양하고, 복잡할 수 있음

Reprinted from Table 1 of reference [64].

3) 췌도

Leuschner 등은 손상부위로 침윤되는 염증성 단구세포(monocyte)가 비염증성 세포와 달리 CCR2 (C-C chemokine receptor type 2)를 발현한다는 사실을 기초로 siRNA-CCR2를 제작하여 lipid nanoparticle을 운반체로 함께 마우스에 주입했을 때 이 siRNA가 염증조직의 단구세포에 선택적으로 흡수됨을 확인하였다. 또한 당뇨마우스에 주입하였을 때 당뇨유도가 연기됨을 확인하였다(67). 췌도이식은 췌도의 분리, 정제과정을 생체 외에서 수행할 수 밖에 없는데, 이 기간 동안 siRNA를 이용해 이식에 장애가 되는 유전자의 발현을 제어할 수 있다. 하지만, 췌도는 β-세포와 달리 세포덩어리로 존재해 siRNA가 중심까지 완벽히 침투하기 어려워, 이를 개선할 필요가 있다(68). 실제로 siRNA 도입 효율을 높이기 위해, 분리된 췌도를 물리적으로 개개의 세포로 분산시킨 후 siRNA를 도입한 후 다시 세포덩어리로 만들어 이식하는 전략을 사용하기도 하였다(69). 췌도이식에서 RNA간섭을 이용해 제어해 볼만한 표적 유전자에 대해 Li와 Mahato가 리뷰논문을 통해 잘 정리해 놓았다(70). 염증성 케모카인, 싸이토카인, 보체, 세포사멸 관련 매개자들, MHC (major histocompatibility complex), 공자극분자(costimulatory molecule) 등 T 세포 활성화 분자 등이 주요 표적 유전자들이다. 앞으로, 이들 중 siRNA로 제어되어 성공적인 췌도이식 성적을 성취할 최적의 표적 유전자가 발굴될 것으로 기대한다.

결 론

RNA간섭 치료법은 유전자 염기서열에 대해 고도로 특이적인 작용기전을 보이기 때문에 표적 유전자만 잘 선정한다면 매우 효율적인 치료 수단이 될 수 있다. 하지만, RNA간섭 치료가 안전하고, 효율적으로 임상에 적용되기 위해서는, 도입된 siRNA에 대해 선천면역반응이 발생하면 안 된다는 전제조건이 따른다. 따라서, 사용하고자 하는 siRNA에 대한 시험관 및 생체 외 검사를 통한 면역반응 유도 여부의 검증이 충분히 이루어져야 한다. 그럼에도 불구하고, siRNA는 기존의 화학약물에 비해 여러 가지 측면에서 치료제로써의 장점을 지닌다(Table 2). 즉, 고도의 특이성, 다양한 선도물질 선발 가능성, 짧은 선도물질 개발기간, 제조공정의 단순함 등이 그것이다. 이 밖에도, 대부분의 화학약물과 달리 RNA는 이미 생체 내에 존재하는 분자이기 때문에 대사관련 문제점이 적을 것으로 보인다. RNA간섭 치료는 동시에 여러 종의 유전자들을 제어할 수 있는데(65), 이는 장기이식 후 상호보완적으로 작동하는 면역거부반응을 통제하는 데 효과적일 것이다. 심장이나 췌도세포 연구의 경우에서 볼 수 있듯이, 장기를 보존하거나 배양하는 과정이 필요한 경우, 이 과정 동안에 siRNA를 처리할 수 있기 때문에 환자에 직접 처치할 필요가 없다. 또한, 신장의 경우 앞서 소개한 연구(62)에서 볼 수 있듯이, 운반체를 이용하지 않은 siRNA가 다른 장기보다 고도로 선택적으로 신장으로 운반되는 현상은 신장질환에 RNA간섭 치료의 임상적용 기대감을 높힌다. 또한 Zhang과 Ripoll 등의 연구(66,71)에서 보듯이 siRNA 단독 치료뿐만 아니라 기존의 면역억제제와 병용요법으로 사용하는 것도 시도해볼 가치가 크다. 앞으로 장기이식 시 장기의 손상과 면역거부반응의 기전을 밝히고, 이에 관여하는 최적의 표적 유전자를 선발하는 일이 RNA간섭 치료의 임상현실화를 앞당기는 데 가장 중요한 일중 하나가 되리라 전망한다.

REFERENCES

1) 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;

391:806-11.
2) Hannon GJ. RNA interference. Nature 2002;418:244-51.
3) Zamore PD, Haley B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs. Science 2005;309:1519-24.
4) Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. Nature 2004;431:343-9.
5) Kim YK, Kim VN. Processing of intronic microRNAs. EMBO J 2007;26:775-83.
6) Shi Y. Mammalian RNAi for the masses. Trends Genet 2003;19:9-12.
7) Zou GM, Yoder MC. Application of RNA interference to study stem cell function: current status and future perspectives. Biol Cell 2005;97:211-9.
8) Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 2001;409:363-6.
9) Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. Nature 2000;404:293-6.
10) Stevenson M. Therapeutic potential of RNA interference. N Engl J Med 2004;351:1772-7.
11) Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate. EMBO J 2001;20:6877-88.
12) Yin JQ, Wan Y. RNA-mediated gene regulation system: now and the future (Review). Int J Mol Med 2002;10:355-65.
13) Tijsterman M, Plasterk RH. Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. Cell 2004;117:1-3.
14) Siolas D, Lerner C, Burchard J, Ge W, Linsley PS, Paddison PJ, et al. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. Nat Biotechnol 2005;23:227-31.
15) Choi I, Cho BR, Kim D, Miyagawa S, Kubo T, Kim JY, et al. Choice of the adequate detection time for the accurate evaluation of the efficiency of siRNA-induced gene silencing. J Biotechnol 2005;120:251-61.
16) Wang L, Mu FY. A web-based design center for vector-based siRNA and siRNA cassette. Bioinformatics 2004; 20:1818-20.
17) Naito Y, Yamada T, Ui-Tei K, Morishita S, Saigo K. siDirect: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference. Nucleic Acids Res 2004; 32:W124-9.
18) Yuan B, Latek R, Hossbach M, Tuschl T, Lewitter F. siRNA Selection Server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server. Nucleic Acids Res 2004;32:W130-4.
19) Henschel A, Buchholz F, Habermann B. DEQOR: a web-based tool for the design and quality control of siRNAs. Nucleic Acids Res 2004;32:W113-20.
20) Li L, Lin X, Khvorova A, Fesik SW, Shen Y. Defining the optimal parameters for hairpin-based knockdown constructs. RNA 2007;13:1765-74.
21) Harborth J, Elbashir SM, Vandenburgh K, Manninga H, Scaringe SA, Weber K, et al. Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. Antisense Nucleic Acid Drug Dev 2003;13:83-105.
22) Jackson AL, Burchard J, Schelter J, Chau BN, Cleary M, Lim L, et al. Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. RNA 2006;12:1179-87.
23) Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. Nat Biotechnol 2005;23:457-62.
24) Pei Y, Tuschl T. On the art of identifying effective and specific siRNAs. Nat Methods 2006;3:670-6.
25) Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. Nat Biotechnol 2003;21:635-7.
26) Lin X, Ruan X, Anderson MG, McDowell JA, Kroeger PE, Fesik SW, et al. siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. Nucleic Acids Res 2005;33:4527-35.
27) Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A, Ilsley-Tyree D, Leake D, Fedorov Y, et al. 3'UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. Nat Methods 2006;3:199-204.
28) Naito Y, Yamada T, Matsumiya T, Ui-Tei K, Saigo K, Morishita S. dsCheck: highly sensitive off-target search software for double stranded RNA-mediated RNA interference. Nucleic Acids Res 2005;33:W589-91.
29) Manche L, Green SR, Schmedt C, Mathews MB. Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. Mol Cell Biol1992;12:5238-48.
30) Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. Nat Cell Biol 2003;5:834-9.
31) Kim DH, Behlke MA, Rose SD, Chang MS, Choi S, Rossi JJ. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. Nat Biotechnol 2005;23:222-6.
32) Kleinman ME, Yamada K, Takeda A, Chandrasekaran V, Nozaki M, Baffi JZ, et al. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. Nature 2008; 452:591-7.
33) Hornung V, Guenthner-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, et al. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacy-

toid dendritic cells through TLR7. Nat Med 2005;11:263-70.
34) Sioud M. Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. J Mol Biol 2005;348:1079-90.
35) Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. Nat Immunol 2004;5:730-7.
36) Meurs E, Chong K, Galabru J, Thomas NS, Kerr IM, Williams BR, et al. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. Cell 1990;62:379-90.
37) Judge AD, Bola G, Lee AC, MacLachlan I. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. Mol Ther 2006;13:494-505.
38) Morrissey DV, Lockridge JA, Shaw L, Blanchard K, Jensen K, Breen W, et al. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. Nat Biotechnol 2005;23:1002-7.
39) Semple SC, Akinc A, Chen J, Sandhu AP, Mui BL, Cho CK, et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. Nat Biotechnol 2010;28:172-6.
40) Czauderna F, Fechtner M, Dames S, Aygün H, Klippel A, Pronk GJ, et al. Structural variations and stabilizing modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. Nucleic Acids Res 2003;31:2705-16.
41) Karikó K, Bhuyan P, Capodici J, Weissman D. Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. J Immunol 2004;172:6545-9.
42) Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. Nat Rev Genet 2007;8:173-84.
43) Davidson BL, McCray PB Jr. Current prospects for RNA interference-based therapies. Nat Rev Genet 2011;12:329-40.
44) Lares MR, Rossi JJ, Ouellet DL. RNAi and small interfering RNAs in human disease therapeutic applications. Trends Biotechnol 2010;28:570-9.
45) Shim MS, Kwon YJ. Efficient and targeted delivery of siRNA in vivo. FEBS J 2010;277:4814-27.
46) Weinstein S, Peer D. RNAi nanomedicines: challenges and opportunities within the immune system. Nanotechnology 2010;21:232001.
47) Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. Nat Rev Drug Discov 2009;8:129-38.
48) Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. Nature 2004;432:173-8.
49) Wolfrum C, Shi S, Jayaprakash KN, Jayaraman M, Wang G, Pandey RK, et al. Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. Nat Biotechnol 2007;25:1149-57.
50) Wu Y, Navarro F, Lal A, Basar E, Pandey RK, Manoharan M, et al. Durable protection from Herpes Simplex Virus-2 transmission following intravaginal application of siRNAs targeting both a viral and host gene. Cell Host Microbe 2009;5:84-94.
51) Chen Q, Butler D, Querbes W, Pandey RK, Ge P, Maier MA, et al. Lipophilic siRNAs mediate efficient gene silencing in oligodendrocytes with direct CNS delivery. J Control Release 2010;144:227-32.
52) Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. Nature 2006;441:111-4.
53) Geisbert TW, Lee AC, Robbins M, Geisbert JB, Honko AN, Sood V, et al. Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study. Lancet 2010;375:1896-905.
54) Davis ME, Zuckerman JE, Choi CH, Seligson D, Tolcher A, Alabi CA, et al. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. Nature 2010;464:1067-70.
55) Dassie JP, Liu XY, Thomas GS, Whitaker RM, Thiel KW, Stockdale KR, et al. Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. Nat Biotechnol 2009;27:839-49.
56) Zhou J, Swiderski P, Li H, Zhang J, Neff CP, Akkina R, et al. Selection, characterization and application of new RNA HIV gp 120 aptamers for facile delivery of Dicer substrate siRNAs into HIV infected cells. Nucleic Acids Res 2009;37:3094-109.
57) Kumar P, Ban HS, Kim SS, Wu H, Pearson T, Greiner DL, et al. T cell-specific siRNA delivery suppresses HIV-1 infection in humanized mice. Cell 2008;134:577-86.
58) Peer D, Park EJ, Morishita Y, Carman CV, Shimaoka M. Systemic leukocyte-directed siRNA delivery revealing cyclin D1 as an anti-inflammatory target. Science 2008;319:627-30.
59) Kim SS, Peer D, Kumar P, Subramanya S, Wu H, Asthana D, et al. RNAi-mediated CCR5 silencing by LFA-1-targeted nanoparticles prevents HIV infection in BLT mice. Mol Ther 2010;18:370-6.
60) Kumar P, Wu H, McBride JL, Jung KE, Kim MH, Davidson BL, et al. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. Nature 2007;448:39-43.

61) Kortylewski M, Swiderski P, Herrmann A, Wang L, Kowolik C, Kujawski M, et al. In vivo delivery of siRNA to immune cells by conjugation to a TLR9 agonist enhances antitumor immune responses. Nat Biotechnol 2009;27:925-32.
62) Molitoris BA, Dagher PC, Sandoval RM, Campos SB, Ashush H, Fridman E, et al. siRNA targeted to p53 attenuates ischemic and cisplatin-induced acute kidney injury. J Am Soc Nephrol 2009;20:1754-64.
63) Gupta PK. RNRNA: The 2006 Nobel Prize for Physiology or Medicine. Curr Sci 2006;91:1443.
64) Vaishnaw AK, Gollob J, Gamba-Vitalo C, Hutabarat R, Sah D, Meyers R, et al. A status report on RNAi therapeutics. Silence 2010;1:14.
65) Zheng X, Lian D, Wong A, Bygrave M, Ichim TE, Khoshniat M, et al. Novel small interfering RNA-containing solution protecting donor organs in heart transplantation. Circulation. 2009;120:1099-107.
66) Zhang X, Beduhn M, Zheng X, Lian D, Chen D, Li R, et al. Induction of alloimmune tolerance in heart transplantation through gene silencing of TLR adaptors. Am J Transplant 2012;12:2675-88.
67) Leuschner F, Dutta P, Gorbatov R, Novobrantseva TI, Donahoe JS, Courties G, et al. Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes in mice. Nat Biotechnol 2011;9:1005-10.
68) Li F, Mahato RI. iNOS gene silencing prevents inflammatory cytokine-induced beta-cell apoptosis. Mol Pharm 2008; 5:407-17.
69) Callewaert H, Gysemans C, Cardozo AK, Elsner M, Tiedge M, Eizirik DL, et al. Cell loss during pseudoislet formation hampers profound improvements in islet lentiviral transduction efficacy for transplantation purposes. Cell Transplant 2007;16:527-37.
70) Li F, Mahato RI. RNA interference for improving the outcome of islet transplantation. Adv Drug Deliv Rev 2011; 63:47-68.
71) Ripoll E, Pluvinet R, Torras J, Olivar R, Vidal A, Franquesa M, et al. In vivo therapeutic efficacy of intra-renal CD40 silencing in a model of humoral acute rejection. Gene Ther 2011;18:945-52.
72) Bao C, Lv Z, Zhang X, Zhu J, Ding F, Zhang Y, et al. Suppression of cardiac allograft vasculopathy in mice by inhibition of CC-motif chemokine receptor 5. Transpl Immunol 2012;26:128-32.
73) Jia Y, Zhao Z, Xu M, Zhao T, Qiu Y, Ooi Y, et al. Prevention of renal ischemia-reperfusion injury by short hairpin RNA of endothelin A receptor in a rat model. Exp Biol Med (Maywood) 2012;237:894-902.
74) Yang C, Jia Y, Zhao T, Xue Y, Zhao Z, Zhang J, et al. Naked caspase 3 small interfering RNA is effective in cold preservation but not in autotransplantation of porcine kidneys. J Surg Res 2012;181:342-54.
75) Shou Z, Xiao H, Xu Y, Wang Y, Yang Y, Jiang H, et al. SHARP-2 gene silencing by lentiviral-based short hairpin RNA interference prolonged rat kidney transplant recipients' survival time. J Int Med Res 2009;37:766-78.
76) Feng B, Chen G, Zheng X, Sun H, Zhang X, Zhang ZX, et al. Small interfering RNA targeting RelB protects against renal ischemia-reperfusion injury. Transplantation 2009; 87:1283-9.
77) Zheng X, Zhang X, Feng B, Sun H, Suzuki M, Ichim T, et al. Gene silencing of complement C5a receptor using siRNA for preventing ischemia/reperfusion injury. Am J Pathol 2008;173:973-80.
78) Wang P, Yigit MV, Ran C, Ross A, Wei L, Dai G, et al. A theranostic small interfering RNA nanoprobe protects pancreatic islet grafts from adoptively transferred immune rejection. Diabetes 2012;61:3247-54.
79) Wang P, Yigit MV, Medarova Z, Wei L, Dai G, Schuetz C, et al. Combined small interfering RNA therapy and in vivo magnetic resonance imaging in islet transplantation. Diabetes 2011;60:565-71.
80) Cheng G, Zhu L, Mahato RI. Caspase-3 gene silencing for inhibiting apoptosis in insulinoma cells and human islets. Mol Pharm 2008;5:1093-102.