

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

24. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Rak J. Contribution of the hemostatic system to angiogenesis in cancer. *Semin Thromb Hemost* 2004;30:5-20.
25. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Klement P et al. The hemostatic system and angiogenesis in malignancy. *Neoplasia* 2001;3:371-84.
26. Lykke J, Nielsen HJ. The role of tissue factor in colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 2003;29:417-22.
27. Vrana JA, Stang MT, Grande JP et al. Expression of tissue factor in tumor stroma correlates with progression to invasive human breast cancer: paracrine regulation by carcinoma cell-derived members of the transforming growth factor beta family. *Cancer Res* 1996;56:5063-70.
28. Hamada K, Kuratsu J, Saitoh Y et al. Expression of tissue factor correlates with grade of malignancy in human glioma. *Cancer* 1996;77:1877-83.
29. Lwaleed BA, Chisholm M, Francis JL. Urinary tissue factor levels in patients with breast and colorectal cancer. *J Pathol* 1999;187:291-4.
30. Prandoni P, Piccioli A, Girolami A. Cancer and venous thromboembolism: an overview. *Haematologica* 1999;84:437-45.
31. Geerts WH, Pineo GF, Heit JA et al. Prevention of venous thromboembolism: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004;126:338S-400S.
32. Bergqvist D. Low-molecular-weight heparin for the prevention of postoperative venous thromboembolism after abdominal surgery: a review. *Curr Opin Pulm Med* 2005;11:392-7.
33. De Cicco M. The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;50:187-96.
34. Levine MN. Prevention of thrombotic disorders in cancer patients undergoing chemotherapy. *Thromb Haemost* 1997;78:133-6.
35. Deitcher SR, Gomes MP. The risk of venous thromboembolic disease associated with adjuvant hormone therapy for breast carcinoma: a systematic review. *Cancer* 2004;101:439-49.
36. Bern MM, Lokich JJ, Wallach SR et al. Very low doses of warfarin can prevent thrombosis in central venous catheters. *Ann Intern Med* 1990;112:423-8.
37. Monreal M, Alastrue A, Rull M et al. Upper extremity deep venous thrombosis in cancer patients with venous access devices – prophylaxis with a low molecular weight heparin (Fragmin). *Thromb Haemost* 1996;75:251-3.
38. Lee AY, Levine MN, Baker RI et al. Low-molecular-weight heparin versus a coumarin for the prevention of recurrent venous thromboembolism in patients with cancer. *N Engl J Med* 2003;349:146-53.
39. Lee AY, Rickles FR, Julian JA et al. Randomized comparison of low molecular weight heparin and coumarin derivatives on the survival of patients with cancer and venous thromboembolism. *J Clin Oncol* 2005;23:2123-9.

RNA-interferens – vejen til individualiseret genetisk medicin

Lektor Thomas Juhl Corydon & lektor Jacob Giehm Mikkelsen

Aarhus Universitet, Institut for Human Genetik

Når Nobelprisen i medicin/fysiologi 2006 i denne uge tildeles *Andrew Fire & Craig Mello*, sker det på baggrund af deres epokegørende studier af geners regulering i rundormen *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) [1]. Der kan synes langt fra rundorme og bonede gulve i Stockholm til medicinsk gennemslagskraft og relevans, men *Fire & Mellors* opdagelser har intet mindre end revolutioneret molekylærgenetisk forskning og har for længst tiltrukket klinikerens opmærksomhed verden over. At prisen gives nu – kun otte år efter publiceringen af det oprindelige studium – er ganske usædvanligt og viser med al tydelighed vigtigheden af rundormens afslørede hemmeligheder.

Med *C. elegans* som eksperimentielt modelsystem søgte *Fire & Mello* at belyse de mekanismer, der regulerer strømmen af genetisk information i celler. De var specielt optaget af, at udtrykket af gener i rundormens celler tilsyneladende kunne nedreguleres af kunstigt tilførte RNA-molekyler. Ifølge molekylærbiolegiens centrale dogme afkodes cellens genetiske information i form af dobbeltstrenget DNA til enkeltstrenget messenger-RNA (mRNA) – cellens budbringer af genetisk information – der processeres og transportes ud af cellekernen og translateres til protein i cellens cytoplasma.

Fire & Mello fandt til deres store overraskelse, at geners udtryk i *C. elegans* meget effektivt kunne nedreguleres eller helt slukkes ved at indføre dobbeltstrenget RNA i rundormens cel-

ler [1]. Dette var ikke en opdagelse blot for de specielt indviede i *C. elegans*-biologien, men også den første iagttagelse hos dyr af RNA-interferens (eller RNAi), en evolutionært konserveret og sekvensspecifik mekanisme for posttranskriptionel regulering af geners aktivitet. Planteforskere havde tidligere identificeret en lignende mekanisme i planter [2], og man har i nyere studier påvist, at RNAi har betydning for geners regulering i mange, hvis ikke alle, eukaryote organismer [3].

Hvorfor nu al den opmærksomhed? Svaret er todelte:

1) Opdagelsen af RNAi kaster helt nyt lys på vores genom og udvikling af genetiske sygdomme. Rækken af genetiske sygdomme, der skyldes fejl i proteinkodende gener, er som bekendt meget lang, og for mange sygdomme er de molekylærgenetiske årsager nøje beskrevet. Er det muligt, at genetiske sygdomme kan skyldes geners fejlregulering som følge af fejl i RNAi-maskineriet, eller at RNAi-processer kan have en supplerende rolle i sygdomsudvikling? Vi kender stadig ikke det præcise svar, men ved i dag, at nedsatte niveauer af visse dobbeltstrengede RNA-molekyler (såkaldt miRNA), der afkodes fra distinkte loci i vores genom, synes at korrelere med udvikling af adenokarcinomer (f.eks. kolorektal adenokarcinom) og kronisk lymfatisk leukæmi. Det foreløbige estimat forudsiger, at ca. 30% af vores gener reguleres af miRNA-molekyler via cellens RNAi-apparat. 2) De åbenlyse terapeutiske muligheder i RNAi er måske den væsentligste årsag til den store interesse ikke mindst fra den molekylærmedicinske verden og lægemiddelindustrien. I et tal af in vitro- og in vivo-studier har man allerede påvist, at dobbeltstrenget RNA-sekvens specifikt kan slukke for gener og dermed forhindre produktion af

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

sygdomsfremkaldende proteiner, der ikke er mulige mål-molekyler i konventionelle behandlingsstrategier. En række lovende prækliniske undersøgelser med forsøgsdyr synes at kunne bane vejen for anvendelse af RNA-baserede præparater hos patienter. Således er kliniske testforsøg igangsat i USA. Vi beskriver her den molekylære baggrund for RNA-interferens og giver eksempler på terapeutisk anvendelse af RNAi på vej mod udvikling af individualiseret genetisk medicin.

Fra cellulær forsvarsmekanisme til instrument i individualiseret genetisk behandling

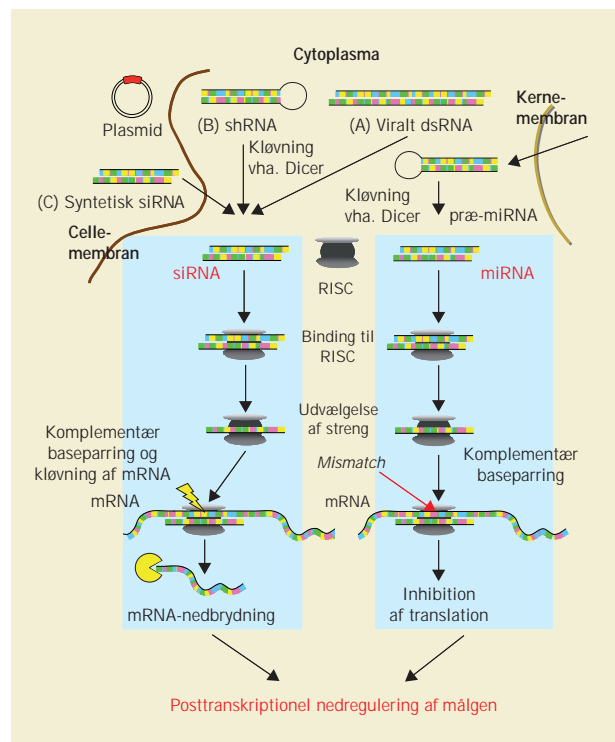
RNAi aktiveres ved tilstedeværelse af dobbeltstrengt RNA, der f.eks. introduceres i celler i forbindelse med virusinfektion (Figur 1, venstre panel). Dobbeltstrengt RNA kløves i mindre stykker a 21-23 basepar, kaldet siRNA (for *small interfering RNA*) af proteinkomplekset Dicer. Efterfølgende genkendes siRNA af proteinkomplekset RISC, der ud fra termodynamiske parametre udvælger en af de to siRNA-streng. Herefter søger RISC i kompleks med siRNA (nu enkeltstrengt) efter en mRNA-streng med komplementær sekvens, og efter dannelse af komplementær baseparring mellem siRNA og mRNA kløves og nedbrydes mRNA-strengen med nedsat produktion af f.eks. viralt protein til følge. Det er altså mRNA og ikke

genet i sig selv, der er målet for genregulering via RNAi. Der er ikke fundet endogent udtrykt siRNA hos mennesker. Derimod producerer menneskers celler miRNA, der forlader kernen som et hårnåleformet præ-miRNA (Figur 1, højre panel). I cytoplasmaet kløves præ-miRNA af Dicer til miRNA, der binder til RISC og mRNA i nævnte rækkefølge. I modsætning til siRNA er baseparringen mellem miRNA og mRNA ikke fuldstændig, og miRNA/mRNA-komplekset inducerer ikke kløvnings af mRNA-strengen, men hæmmer i stedet translation af protein.

Hvordan kan vi udnytte den cellulære RNAi-mekanisme til terapeutisk regulering af gener? siRNA kan tilføres direkte i form af 1) syntetisk siRNA bestående af to korte RNA-streng eller 2) som kort hårnåleformet RNA (shRNA), der afkodes fra et DNA-molekyle, f.eks. plasmid DNA (Figur 1). I eukaryote celler processeres syntetisk siRNA og shRNA i RNAi-maskineriet og resulterer i allelspecifik nedregulering af cellulære gener. Terapeutisk effekt af siRNA-medieret nedregulering af gener afhænger bl.a. af holdbarheden af siRNA i serum. Da umodificeret siRNA har en kort halveringstid (omkring en time), der primært skyldes tilstedeværelse af endonukleaser i serum og renal/hepatisk *clearance*, er stabiliteten via kemiske modifikationer blevet forbedret markant. Desuden har man udviklet flere strategier for effektiv overførsel baseret på indkapsling af siRNA. I de mest lovende forsøg forbedres overførslen signifikant ved at pakke siRNA i nanopartikler bestående af f.eks. lipid, polyetylenimin eller kitosan.

shRNA kodes fra en kilde af DNA (f.eks. plasmid), der forinden er overført til målorganet ved hjælp af virale eller ikke-virale overførselsstrategier. En vigtig forskel mellem syntetisk og DNA-kodet siRNA er, at sidstnævnte typisk har persistent effekt. Da virale strategier baseret på vektorer afledt fra adenovirus, lentivirus og adenoassocieret virus tillige har høj overførselseffektivitet, synes disse i flere sammenhænge at være velegnede i sammenligning med ektopisk administreret RNA eller siRNA. Det kan dog være problematisk, at virale vektorer potentielt fremprovokerer immunologiske reaktioner, og for flere virale strategier vil fremmed DNA integreres i arvmassen med risiko for at ramme essentielle gener. Meget forskning sigter dog på integration af shRNA-kodende DNA i kromosomalt DNA for derved at opnå stabil ekspresion af shRNA og persistent RNAi-effekt og således undgå hyppige behandlingsgentagelser.

Uanset hvordan en klinisk effekt af RNAi søges opnået, er målet det samme: sekvensspecifik nedregulering af et på forhånd udvalgt gen. Med vores nuværende kendskab til menneskets arvmasse og den nære fremtids muligheder for *high throughput*-sekventering af større eller mindre bidder af den enkelte patients arvmasse åbner RNAi døren for effektiv individualiseret behandling. Specificiteten af siRNA betyder, at der kan skelnes mellem raske og syge alleller, der afviger på kun en enkelt nukleotidposition. RNAi er den molekylære afbryderknop, der kan slukke cancergener, dominant negative



Figur 1. Posttranskriptionel nedlukning af gener kan aktiveres af siRNA (venstre panel) eller miRNA (højre panel). miRNA findes naturligt i menneskets celler og regulerer ved translationel inhibition mere end 30% af vores gener i henhold til foreløbige estimater. Figuren viser eksempler på siRNA, der introduceres i cellen ved: (A) viral infektion eller som (B) DNA-kodet shRNA og (C) syntetisk RNA. I terapeutisk øjemed kan shRNA, der er designet til at ligne miRNA, og syntetisk siRNA anvendes til sekvensspecifik nedlukning af sygdomsfremkaldende gener. Se tekst for detaljer.

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

mutationsalleler eller virale gener, der er aktive i forbindelse med f.eks. hiv-infektion.

Terapeutisk anvendelse af RNAi

I betragtning af RNAi-metodens relativt unge alder er der allerede publiceret et stort antal in vivo-studier relateret til præklinisk udvikling af siRNA-lægemidler. Resultaterne fra disse studier har internationalt ansporet mere end 30 farmaceutiske og bioteknologiske firmaer til at påbegynde udvikling af terapeutiske præparater baseret på RNAi-teknologien. Som det fremgår af **Tabel 1** anvendes RNAi allerede i en lang række prækliniske og kliniske forsøg til behandling af bl.a. infektionssygdomme, cancer, neurodegenerative sygdomme, okulære lidelser og allergi.

Til behandling af aldersrelateret maculadegeneration (AMD), der er den dominerende årsag til svært irreversibelt synstab hos ældre i den vestlige verden, er RNAi blevet anvendt som terapeutisk middel i kliniske fase II-forsøg. Der er kumulativ evidens for, at vaskulær endotelial vækstfaktor (VEGF) spiller en kausal rolle i udviklingen af AMD. Behandlingsregimer baseret på RNAi til modulering af effekten af VEGF er derfor under udvikling. Nedregulering af VEGF receptor 1 ved gentagne periokulære eller intravitreale injektioner af syntetisk siRNA resulterede i signifikant reduktion i koroidal neovaskularisering [4]. I mus kunne en enkelt subretinal injektion af en adenovirusbaseret vektor, der udtrykker shRNA rettet mod VEGF, hæmme udviklingen af koroidal neovaskularisering [5]. Der er derfor god grund til at antage, at shRNA-medieret nedregulering af VEGF alternativt i kombination med shRNA rettet mod andre gener, såsom VEGF receptor 1, kan vise sig at være en potent strategi til behandling af AMD.

Inhibition af respiratorisk syncytialvirus (RSV), der er en kausal komponent i udvikling af alvorlig respiratorisk sygdom, ofte med høj mortalitet, er et andet lovende forsøg på terapeutisk anvendelse af RNAi. I en in vivo-model for RSV-infektion resulterede nasal overførsel af siRNA til lungevæv i signifikant reduktion af pulmonal viral titer [6]. Bemærkelsesværdigt viste analyser af respirationsfrekvens, pulmonal inflammation og leukotrieninduktion, at siRNA-behandling hæmmede patogenesen med såvel præventiv som kurativ effekt til følge. Senest er potentialet af siRNA-overførsel til pulmonale epitelceller blevet fremhævet i danske studier ved kombineret anvendelse af kitosanindkapslede nanopartikler og nasal administration [7].

I forsøg på at nærme sig en strategi, der er klinisk anvendelig, udførte *Zimmermann et al* en række forsøg med aber med det mål at nedregulere apolipoprotein B (ApoB) ved systemisk overførsel af siRNA [8]. ApoB er et essentielt protein, der indgår i transport og metabolisme af kolesterol. Et forhøjet niveau af ApoB korrelerer med en forhøjet risiko for koronar sygdom, men som et stort lipidassocieret protein er ApoB ikke et tilgængeligt mål ved brug af konventionel terapi. Intravenøs injektion af syntetisk siRNA indkapslet i lipidpartik-

Tabel 1. Eksempler på kliniske og prækliniske RNAi-baserede forsøgsbehandlinger.

Sygdom	Målmolekyle	Status
Aldersrelateret maculadegeneration	VEGF	Fase II
Diabetisk retinopati	Fibronektin, kollagen IV	Fase II
Hepatitis B	HBV-S1	Fase I og præklinisk
Interstitiel pneumoni (RSV)	RSV-P	IND
Aids (hiv)	Nef, gag, pol	Præklinisk
SARS (SARS-koronavirus)	NSP1	Præklinisk
Familier hyperkolesterolemie	ApoB	Præklinisk
Parkinsons sygdom	α -synuklein	Præklinisk
Huntingtons chorea	Huntingtin	Præklinisk
Amyotrofisk lateralsklerose	SOD-1	Præklinisk
Reumatoid arthritis	TNF- α	Præklinisk
Diabetes mellitus, type 2	PTP1B	Præklinisk
Alzheimers sygdom	APP	Præklinisk
Osteoporose	NFATc1	Præklinisk
Astma	Arginase1	Præklinisk
Ewings sarkom	EWS-FLI1	Præklinisk
Cancer cervicis uteri	HPV E6 og E7	Præklinisk
Cancer (angiogenese)	CD31	Præklinisk
Cancer mammae	Survivin, osteopontin	Præklinisk
Cancer prostatae	MMP-2	Præklinisk

IND = Investigational New Drug ansøgning indsendt til Food and Drug Administration (FDA); VEGF = vaskulær endotelial vækstfaktor; HBV = hepatitis B-virus; RSV = respiratorisk syncytialvirus; SARS = svært, akut, respiratorisk syndrom; SOD = superoxid dismutase; TNF = tumornekrosefaktor; PTP = protein-tyrosin-fosfatase; APP = amyloid precursor-protein; NFAT = nuklear faktor i aktiverede T-celler; EWS-FLI = Ewings sarkom Friend leukæmivirus-integration; HPV = humant papillomvirus; CD = cluster-of-differentiation-molekyle; MMP = matrix-metalloproteinase; NSP = non-structural protein.

ler resulterede i specifik nedregulering af ApoB med maksimal effekt efter 48 timers behandling. Som konsekvens heraf faldt niveauet af såvel ApoB-protein, serumkolesterol og lavdensitetslipoprotein (LDL) signifikant allerede efter 24 timer og forblev lavt i op til 11 dage. *Zimmermann et al* konkluderede derfor, at siRNA er en hurtig, potent og langtidsholdbar strategi til klinisk relevant reduktion af LDL-kolesterol, og at en enkelt injektion af syntetisk siRNA resulterer i betydelige fænotypiske ændringer.

shRNA-medieret RNAi er på elegant vis blevet anvendt til behandling af hepatitis B-virus (HBV) [9]. I en in vivo-model for HBV resulterede injektion af en vektor baseret på adenoassocieret virus (AAV) i effektiv og vedvarende ekspresion af shRNA rettet imod HBV. Inden for de første to uger faldt mængden af hepatitis B-antigen (HBsAg) hurtigt til under 10% af det niveau, der blev observeret ved behandlingsstart. Mere interessant stabiliseredes mængden af HBsAg efter seks uger og frem til forsøgets afslutning mere end fem måneder senere på et lavt terapeutisk niveau. I lighed hermed observeredes der en kraftig reduktion af virus-DNA i serum. Set i lyset af disse resultater og af at AAV-medieret genoverførsel tilsyneladende er uden bivirkninger, kan terapeutisk anvendelse af RNAi snart vise sig at blive en realitet.

Perspektiver

Fire & Mello antydede i deres banebrydende artikel, at »RNA-interferens må være der for at tjene et biologisk formål«. Me-

RNAi-nomenklatur

Dicer: Proteinkompleks, der kløver dsRNA til mindre enheder a 21-23 basepar, der herefter kaldes siRNA.

dsRNA: Dobbeltstrenget RNA, RNA-duplex, der dannes ved komplementær baseparring mellem to RNA-strengene.

Endonuklease: Enzym, der nedbryder RNA eller DNA.

miRNA: Mikro-RNA; hårnåleformet RNA-molekyle, der afkodes fra cellens DNA og har regulerende effekt på mRNA.

Plasmid: DNA-molekyle (vektor), der indeholder DNA-sekvens, der f.eks. koder for shRNA.

Posttranskriptionel regulering: Regulering af genekspression på RNA-niveau efter transkription af DNA til RNA.

RISC: RNA-induced silencing complex; proteinkompleks der: 1) udvælger siRNA-streng, 2) binder den til mRNA-streng med komplementær basesequens og 3) medierer kløvning og nedbrydning af udvalgt mRNA-streng.

shRNA: *Short hairpin*-RNA; dobbeltstrenget hårnåleformet RNA-molekyle hvor de to strengene er forbundet af en *loop*-sekvens.

siRNA: *Short interfering*-RNA.

get tyder på, at vi indtil nu kun har skrabet i overfladen, og at RNAi ikke bare tjener et formål, men repræsenterer et helt nyt og selvstændigt niveau for regulering af vore genes aktivitet med betydning for genetisk sygdom og diagnostik.

Når vi gør status over RNAi-teknologiens terapeutiske potentiale er det, teknikkenes unge alder taget i betragtning, med videnskabelig begrundet optimisme. I laboratorier verden over anvendes RNAi allerede i dag som en standardmetode til studier af genes funktion. Hertil kommer nye tiltag, der viser udviklingen af levedygtige transgene husdyr med produktion af siRNA rettet mod f.eks. RNA, der koder for bovine prioner [10]. På baggrund af forsøg med celler og dyr tilpasses regelsættet løbende for optimalt genetisk design af syntetisk og DNA-kodet siRNA. Det er dog vigtigt at pointere, at ikke alle korrekt konstruerede siRNA-molekyler vil have den ønskede genregulerende effekt, da strukturelle egenskaber af mRNA transkriberet fra gener kan betyde, at der ikke er direkte adgang til siRNA-molekylets målsekvens. Det kan derfor være nødvendigt at teste en række forskellige siRNA, typisk i størrelsesordenen 4-6 for at finde den mest effektive variant.

Anvendelsen af dobbeltstrenget RNA som lægemiddel tiltrækker lige nu massiv interesse. De første kliniske forsøg er igangsat, og mange flere vil komme til i forbindelse med en lang række forskellige sygdomme. RNAi-teknologiens største fortrin er, at ethvert gen i princippet kan rammes på det post-

transkriptionelle niveau uden detaljeret kendskab til f.eks. strukturen af det protein, som genet koder for. Derfor er teknikken universel og kan tilpasses helt specifikt til den enkelte patient på baggrund af sekvensvariationer i et sygdoms-gen. Hertil kommer teknologiske fremskridt for in vivo-administrering af siRNA som følge af de enorme resurser, der i øjeblikket anvendes på nanoteknologiske og virale overførselsmetoder. Som med andre nye behandlingsstrategier er der udfordringer, der skal tackles. Det vil således være nødvendigt at teste, hvorvidt et lovende siRNA-præparat har præference kun for det på forhånd ønskede gen. I helt nye studier har man påvist en anden potentiel faldgrube; store mængder DNA-kodet siRNA kan nemlig mætte celletransportveje, der har betydning for endogene miRNA-molekyler funktion [9]. Det er derfor vigtigt nøje at tilpasse mængden af effektormolekyler, der produceres fra f.eks. virale vektorer.

Med *C. elegans* som springbræt synes RNA-interferens at bane vejen for medicin, der kan skræddersyes til det enkelte sygdoms-gen og det enkelte individ. I eget regi fortsætter anvendelsen af RNAi til udredning af den cellulære patogenese i mitokondriel dysfunktion og neurodegenerative sygdomme samt med fokus på genetisk nedregulering af proinflammatorisk cytokinproduktion i inflammatoriske lidelser med henblik på fremtidige behandlingsforsøg.

Korrespondance: *Jacob Giehm Mikkelsen*, Institut for Human Genetik, Aarhus Universitet, DK-8000 Århus C. Email: giehm@humgen.au.dk

Antaget: 15. november 2006

Interessekonflikter: Ingen angivet

Artiklen bygger på en større litteraturgennemgang. En fuldstændig litteraturliste kan fås ved henvendelse til forfatterne.

Litteratur

1. Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-11.
2. Baulcombe DC. RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Mol Biol* 1996;32:79-88.
3. Hannon GJ, Rossi JJ. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 2004;431:371-8.
4. Shen J, Samul R, Silva RL et al. Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1. *Gene Ther* 2006;13:225-34.
5. Cashman SM, Bowman L, Christofferson J et al. Inhibition of choroidal neovascularization by adenovirus-mediated delivery of short hairpin RNAs targeting VEGF as a potential therapy for AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:3496-504.
6. Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O et al. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* 2005;11:50-5.
7. Howard KA, Rahbek UL, Liu X et al. RNA Interference in vitro and in vivo using a novel chitosan/siRNA nanoparticle system. *Mol Ther* 2006;14:476-84.
8. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 2006;441:111-4.
9. Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 2006;441:537-41.
10. Golding MC, Long CR, Carmell MA et al. Suppression of prion protein in livestock by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:5285-90.