UPPSALA
UNIVERSITET

SiRNA ger hopp om framtiden för patienter med sällsynta sjukdomar

Veronica Gyllenram

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2015
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

SiRNA ger hopp om framtiden för patienter med sällsynta sjukdomar

Veronica Gyllenram

Självständigt arbete i biologi 2015

Sammandrag

SiRNA är små RNA-molekyler som har potential som läkemedel mot dominant negativa genetiska sjukdomar. Genom att gå in i kroppens eget genreglerande system, RNA-interferens, kan siRNA binda till önskat mRNA och förhindra translation. Med rätt design kan siRNA skilja på mRNA från två alleler med en nukleotids skillnad. Denna metod öppnar möjligheter för att framställa läkemedel som tystar mutationer till relativt liten kostnad och kan därför ha särskilt stor betydelse för patienter med sällsynta genetiska sjukdomar. Denna artikel tar upp fyra av dessa sjukdomar och deras status i de försök som görs med siRNA. Att designa siRNA för en genetisk sjukdom kräver avvägningar mellan bland annat dess potens, selektivitet och risken att frammana immunrespons.
Mot hudsjukdomen pachyonychia congenita har man lyckats ta fram en design som framgångsrikt dämpar det mutanta genutrycket. De första *in vitro*-försöken mot Meesmanns hornhinnedystropi har gjorts med lovande resultat. Hos celler från en patient med sialuria har man kunnat sänka sialinsyrehalten till normala nivåer. För den neurodegenererande Huntingtons sjukdom har man fått blandade resultat och meningarna är delade om hur man ska gå tillväga för att behandla sjukdomen. Bland annat har en kombination av flera siRNA föreslagits. Möjligheten att ta fram individuella behandlingar med siRNA kan ifrågasätta hur läkemedelsprövning kommer se ut i framtiden.

Inledning

De senaste 35 åren har kunskapen om små RNAs genreglerande egenskaper öppnat en helt ny värld av möjligheter inom forskning och medicinsk terapi. Att lära sig använda kroppens egen metod att tysta genuttryck, RNA-interferens, kan ha ovärderlig betydelse för patienter med genetiska sjukdomar, cancer och även virusinfektioner som HIV (Burnett & Rossi 2012).

RNA-interferens är ett evolutionärt väl konserverat system som finns hos de flesta eukaryoter (Hannon 2002). De kroppsegna verksamma molekylerna är **mikroRNA (miRNA)**, **kort dubbelsträngat RNA (dsRNA)** som tillsammans med specifika proteiner binder till **messenger-RNA (mRNA)** och förhindrar translation. Detta är inte bara ett regulatoriskt system för genuttryck, utan används också av kroppen för att skydda sig mot vissa virus genom att virusets replikering och vidare syntetisering blockeras. Upptäckten av dessa ”reglerande” dsRNA gjordes redan 1978, när en särskild oligodeoxynukleotid sågs hämma replikeringen och produktionen av Rous-Sarcomavirus i cellvävnad (Zamecnik & Stephenson 1978). Sedan dess kämpar forskare världen över för att tillämpa kunskapen för terapi och olika artificiella oligonukleotider har skapats, däribland **”small interfering RNA”(siRNA)** (Fire *et al.* 1998). SiRNA i sig är instabilt och behöver ofta modifieras samt en vektor att levereras med, men kan då verka mer selektivt än miRNA (Burnett & Rossi 2012). Med rätt design ses därför siRNA som en attraktiv kandidat till att behandla de stora genetiska sjukdomarna vi har idag, där stort fokus ligger på cancer (Peer & Lieberman 2011).

Samtidigt lever människor världen över idag med en känsla av hopplöshet över sin sjukdom. Deras sjukdom behöver inte vara obotlig, men de är inte prioriterade. Deras åkomma är så sällsynt att väldigt lite forskning finns, samtidigt som läkemedelsföretag tvekar inför att lägga resurser på en målgrupp som är så liten att de knappast kommer få tillbaka kostnaden i

investeringen. För personer med sällsynta sjukdomar (så kallade ”rare” eller ”orphan diseases”) finns allt för ofta för lite forskning, dålig teknik för diagnosticering, för dålig kontakt till expertis och därmed kan deras framtidsutsikter te sig hopplösa (Tambuyzer 2010).

Hur man definierar en sällsynt sjukdom skiljer sig mellan länder och kontinenter. För Europeiska kommissionen räknas en sjukdom som sällsynt om den drabbar färre än fem personer per 10 000 invånare. I Sverige måste den genetiska defekten dessutom ge ett handikapp (Europeiska kommissionen 2014). Man beräknar att det i EU idag finns från 5 000 till upp mot 8 000 sällsynta sjukdomar, och att 27 till 36 miljoner människor är drabbade (Europeiska kommissionen 2014).

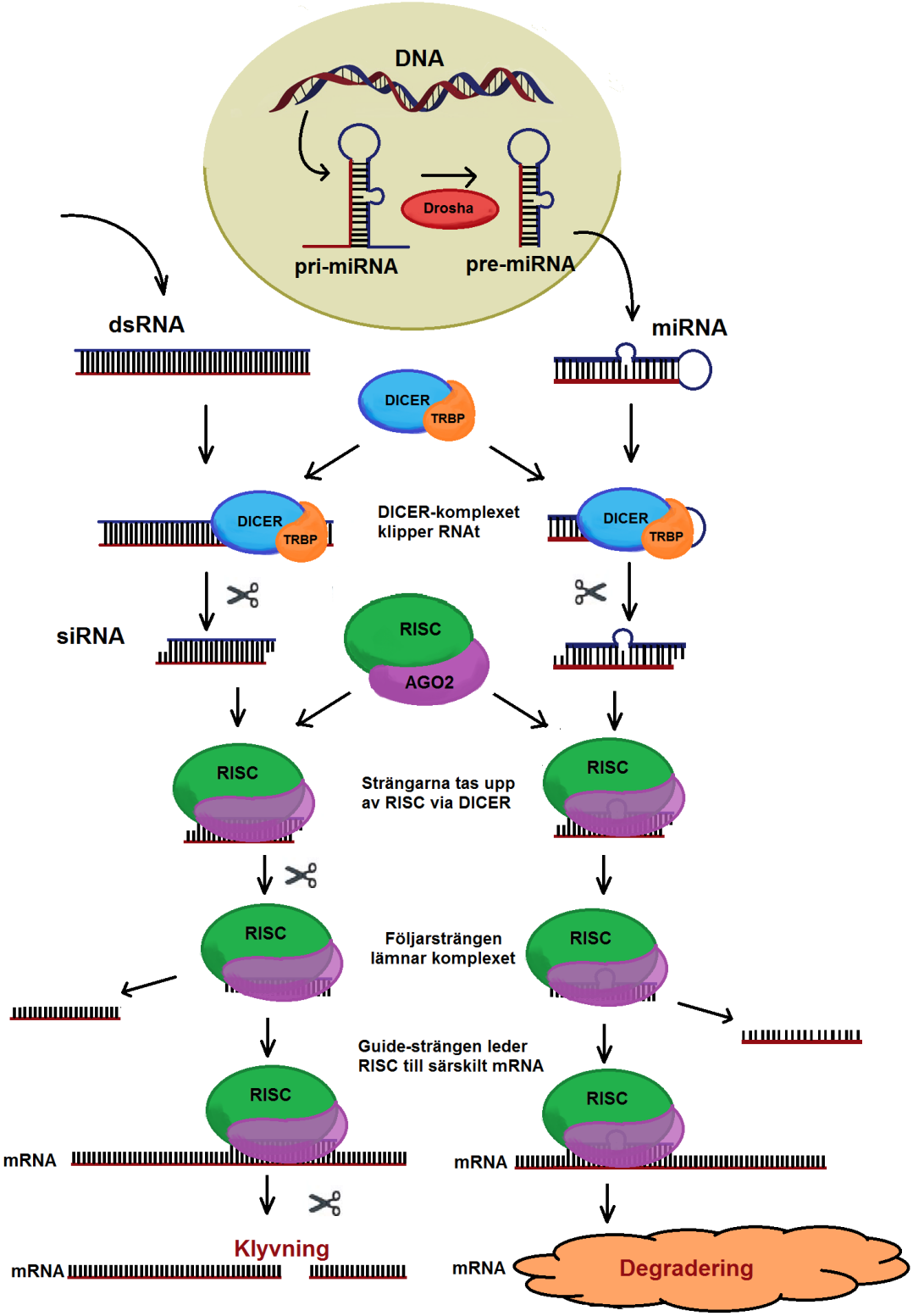
Med RNA-interferens kan det finnas möjligheter att ge en individanpassad behandling till betydligt lägre kostnad än vad som skulle krävas med klassiska läkemedel. Hur många vanliga sjukdomar som interferensterapin än kan tänkas behandla; den målgrupp som terapin kommer spela avgörande roll för är de otaliga med sällsynta sjukdomar. Dessa patienter skulle kunna få en betydande chans att lindra sina symptom och få sin livskvalitet förbättrad.

Denna review tar upp några genetiskt betingade sällsynta sjukdomar som man i nuläget försöker behandla med siRNA. Den tar fram vilka förutsättningar som krävs för en sjukdom för att den ska kunna behandlas med RNA-interferens och några aspekter på hur leveransmetoden kan se ut.

RNA-interferens – kroppens eget genreglerande system

Hur fungerar RNA-interferens?
Ur DNAt transkriberas en obearbetad form av miRNA. Den klipps och bearbetas av ett protein kallt Drosha, varpå exportproteiner för ut miRNAt ur cellkärnan (Burnett & Rossi 2012). Väl ute i cytoplasman tas det upp av ett komplex bestående av proteinerna Dicer och TRBP (”TAR RNA-binding protein”), som bearbetar strängen och klipper ner den till 21-23 nt (nukleotider) långa strängar (se figur 1). En av strängarna fångas upp av ett annat komplex, RISC (RNA induced silencing complex), och med sin bassekvens ”leder” guidesträngen komplexet till mål-mRNAt (Martinez *et al.* 2002). Det bundna mRNAt förs vidare till degenerering och translateras inte (Burnett & Rossi 2012).

Vad är siRNA?
SiRNA är en artificiell variant av ”icke-kodande” RNA som använder sig av miRNAts reaktionsväg för att skapa RNA-interferens (Elbashir *et al.* 2001). Till skillnad från miRNA har siRNA en perfekt eller nästintill perfekt kompletterande guidesträng till mRNAt. SiRNA uppstår av att längre dubbelsträngat RNA introduceras till cellen, där Dicer och TRBP fattar tag i det och klipper ner även det till 21-23 nt. Det nyblivna siRNAt tas upp av RISC och ett av proteinerna, Argonaute-2 (AGO2), klyver dubbelsträngen. Guidesträngen, väl skyddat av RISC, binder till slut till det önskade mRNAt. Ago-2, som har en endonukleasaktivitet, klyver mRNAt som blir dysfunktionellt och degraderas senare (Meister *et al.* 2004). SiRNAt i sig blir inte klippt utan kan fortsätta att binda till nästa mRNA (Burnett & Rossi 2012).



Figur 1 RNA-interferens med miRNA (till höger) och siRNA (till vänster). SiRNAts perfekt komplementära sträng till mRNAt leder till att AGO2 klyver mRNAt, som blir dysfunktionellt och bryts ner. Egen bild.

Design av siRNA-vilka aspekter måste man ha i åtanke?
Syntetiskt siRNA kan designas så att det integreras i något av de båda komplexen i de olika stegen. Den klassiska designen är en 19 nukleotider lång dubbelsträng med två baspar hängande i överkant i varje 3'-ände för att direkt kunna gå in i RISC (Burnett & Rossi 2012). Det har däremot visats att längre dsRNA, som är 25-27 nt långt och måste bearbetas först, ger ett mer potent utslag än den klassiska formen med 21 nt (Kim *et al.* 2005). Den högre effektiviteten kan härledas till Dicers aktivitet, vars interaktion med AGO2 får siRNAt att integreras lättare i RISC än om RNAt diffunderat fritt (Amarzguioui & Rossi 2008).

Off-targeteffekter
Eftersom den nämnda klassiska formen är symmetrisk är det stor risk för off-targeteffekter, då den till mRNAt identiska följarsträngen kan tas upp lika lätt som den komplementära guidesträngen, som endast den leder till det rätta mRNAt (Amarzguioui & Rossi 2008). Att bara injicera guidesträngen ger inte heller önskad potens, då den dubbelsträngade motsvarigheten kan ge en tio gånger så stor effekt (Fire *et al.* 1998). För att få RISC att fånga rätt sträng, guidesträngen, kan man ge denne en uthängande 3'- ände, så den blir lättare att "fatta tag i", och göra den andra änden trubbig (Amarzguioui & Rossi 2008).

Specificitet
SiRNA kan med rätt design träffa så allelspecifikt att den kan skilja på sekvenser med en enda nukleotids skillnad (Schwarz *et al.* 2006). Beroende på var den "mutationsparande nukleotiden är positionerad på strängen kan olika nivåer av potens och selektivitet nås. Det finns andra omständigheter som kan sänka risken ytterligare att siRNAt ska påverka den friska allelens uttryck. Genom att para en purin i siRNAt med en purin i vildtypsekvensen blir chansen ännu större att vildtypen inte väljs (Schwarz *et al.* 2006). Har ett cytidin exempelvis tagit platsen av ett guanin i mutantsekvensen kommer siRNAt matcha med ett guanin och stöta ifrån vildtypens guanin.

Stabilitet
RNA är ostabilt *in vivo* eftersom det finns RNA-nedbrytande ribonukleaser i serum och i celler. För att oligonukleotiden (siRNAt) ska bli svårigenkänd och inte brytas ner snabbt kan strukturen modifieras lätt, utan att detta påverkar dess egen aktivitet märkbart (Burnett & Rossi 2012). En modifiering som användes tidigt och ofta görs är att byta ut ett fosfatsyre mot svavel i strängens ryggrad (fosforotioat), med det finns även större modifieringar som till exempel att sätta till metyl och metoxyetylgrupper (Burnett & Rossi 2012). Så kallade LNA ("locked nucleic acid"), där sockret är låst till sig själv med en cyklisk metylgrupp, har visat sig fungera i att förstärka stabiliteten och potensen (Sanghvi 2011). Genom att göra ändringar i RNAts ryggrad kan man skydda det från nukleasdegenerering och dessutom öka siRNAts affinitet, potens och specificitet. Farmakokinetiken och dynamiken kan förbättras, dvs. en lägre dos kan användas, samtidigt som risken för immunrespons sänks (Burnett & Rossi 2012). För stora modifieringar kan däremot snedställa ryggraden och därigenom försämra strängens komplementära passform till mRNAt. Det är därför en avvägning mellan att stabilisera RNAt och att behålla affiniteten.

Leveranssätt och spridning i vävnad
Ofta behövs ett leveransmedel för siRNA, som ledsagar det in i celler och skyddar det ytterligare från nedbrytning. Naket siRNA kan fungera men måste då appliceras i högre doser. Plasmider, nanopartiklar, liposomer och virala vektorer är några medel som används och har sina för- och nackdelar vad gäller potens, transfektionsförmåga, immunrespons och cytotoxicitet (Fiszer *et al.* 2013, Godinho *et al.* 2013, Grondin *et al.* 2012, Hickerson *et al.*

2008).

Hur siRNAt kan levereras och vilken vektor som används beror på var i kroppen sjukdomen uttrycks. Är den baserad lokalt skulle man kunna ge en injektion till det påverkade stället vid upprepade tillfällen. Innefattar sjukdomen alla eller de flesta celler i kroppen skulle en systemisk leverans kunna vara möjlig, där siRNA utsöndras och transporteras i blodbanan. Då är modifieringar och skyddande vektorer desto viktigare för att siRNAt ska nå fram till sina målceller.

Ett exempel på en vektor man kan använda för att minska mängden siRNA är nanopartiklarna β-cyklodextriner (β-CD), en vektor med låg cytotoxicitet (Godinho *et al.* 2013) som är uppbyggd av naturligt förekommande oligosackarider (Chaturvedi *et al.* 2011). Dess konformade struktur omsluter och skapar komplex med siRNAt, skyddar den från enzymatisk degradering och gör ytterligare modifiering onödig (Hu-Lieskovan *et al.* 2005).

Att leverera till hjärnan
På grund av blod-hjärnbarriären är leveransmetoden extra betydande för siRNA-terapi mot nervsjukdomar (Stiles *et al.* 2012). För att injicera siRNA i hjärnan kan man använda sig av konvektionsutökad leverans (convection enhanced delivery (CED))(Stiles *et al.* 2012). Metoden innebär en lokal injektion där det positiva trycket hjälper substansen att distribueras i vävnaden. Därtill tycks neuroner vara speciellt resistenta mot RNA-interferens, möjligtvis för att siRNAt inte lyckas tränga in genom neuroners cellmembran (Krichevsky & Kosik 2002). Virala vektorer har använts ofta i studier av neuroner pga. deras relativt höga tranfektions- och överföringsförmåga av siRNA (Godinho *et al.* 2013), men då risken för immunrespons är relativt stor är leveransmetoden inte optimal (Nayak & Herzog 2010). Liposomer har även använts med goda resultat (Fiszer *et al.* 2011). B-cyklodextriner som nämndes tidigare har visat sig hållas stabila i cerebrospinalvätska (vätska i hjärnan) i upp till sex timmar och verkar inte påverkas av kroppstemperatur (37°C) (Godinho *et al.* 2013).

Hur går en klinisk prövning till för ett läkemedel?
Innan ett läkemedel når ut till patienten måste den gå igenom ett antal prövningar för att säkerställa dess effekt. Innan de kliniska prövningarna på människor testas substansen först *in vitro* i passande celltyper, därefter görs lämpliga tester i djurmodeller. I de senare faserna testas substansen i olika försöksgrupper för att bland annat se dess effektivitet, potens och eventuella sidoeffekter.

Sällsynta sjukdomar

Vilka sjukdomar skulle kunna botas med siRNA?
Eftersom siRNA tystar genuttryck lämpar sig terapin till sjukdomar som har ett genetiskt ursprung där man har god kunskap om vilka gener som är involverade. Sjukdomen ska helst vara av negativ-dominant form, där symtomen främst orsakas av den destruktiva funktionen av det muterade proteinet.

Hur man ska gå tillväga för att behandla sjukdomen har sina avvägningar. Saknar proteinet en livsviktig funktion och kan avvaras? Finns det fler gener som uttrycker likande protein och som kan ersätta det dysfunktionella proteinet? I så fall är det inte lika viktigt att siRNAt starkt kan särskilja mellan den friska och den mutanta allelens mRNA. Det kan då underlätta att göra en universell design som passar fler patienter. Ifall det mutanta proteinet gör mer skada än vad vildtypen gör nytta kan det då ligga en nettovinst för patienten om proteinuttrycket

tystas helt (Grondin *et al.* 2012). Är proteinet livsviktigt måste siRNA designas att specifikt tysta den mutanta allelen. Det skulle kunna formas att särskilja allelerna efter själva mutationen som genererar symptomen, till exempel en felaktig nukleotid som kodar för fel aminosyra. Möjligheten finns annars att rikta in sig på enskilda nukleotidpolymorfier (”single nucleotide polymorfism” (SNP)) som är associerade med sjukdomsallelen men som inte orsakar själva sjukdomen (Schwarz *et al.* 2006). Det är också viktigt att punktmutationerna är universella så många patienter som möjligt kan hjälpas av samma siRNA-sekvens.

Några sjukdomar som testats att ”tysta” med siRNA?

Pachyonychia Congenita
Den första siRNA-terapin som gjordes på en människa med mål att tysta en mutation i en ärftlig åkomma var mot den ovanliga hudsjukdomen Pachyonychia Congenita (PC) (Leachman *et al.* 2009). Sjukdomen är autosomalt dominant och orsakas av en mutation i någon av generna för specifika keratiner (K6a, K6b, K16, eller K17) som uttrycks i speciella epitelceller, så kallade keratinocyter (Bowden *et al.* 1995, McLean *et al.* 1995, Smith *et al.* 1998). Keratinocyter är celler som skapar stadga i vävnad och utgör det döda cellagret ytterst på huden. Keratin är de filamentproteiner som sammankopplade bildar det kraftiga cytoskelettet. Missformas en av proteintyperna blir det avbrott i kedjorna och nätverket blir fragilt, vilket kan leda till cytolys (celldöd där cellinnehållet töms ut i vävnaden) och/eller hyperkeratos (förhårdnader i huden) (McLean *et al.* 2011).

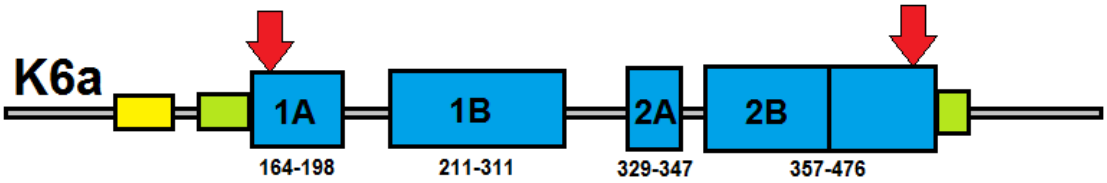
Symptomen varierar starkt mellan patienter och samma mutation kan yttra sig helt olika i två individer (Leachman *et al.* 2005). Grovt förtjockade och deformerade naglar är det huvudsakliga kännetecknet, cystor i huden och oral leukokeratos (vita, ibland smärtsamma, fläckar i munhålan) är också vanliga (Leachman *et al.* 2005). Det mest smärtsamma symptomet som är avgörande för patientens livskvalitet är bildandet av tjocka kallusvävnader på fotsulor och handflator (Leachman *et al.* 2009). Främst uppstår hyperkeratos på områden utsatta för friktion och tryck, till exempel runt midjan och på armbågarna. De patienter som försöker avlasta sina fötter genom att gå på knäna får ofta cystor och förhårdnader även där (Leachman *et al.* 2005).

Hickerson (2008) började undersöka om siRNA kunde användas som terapi för PC, då denna sjukdom har de egenskaper som krävs för att tekniken skulle kunna fungera. Den ansågs som en lämplig prototypsjukdom för siRNA-behandling av genetiska hudsjukdomar eftersom

1. den genetiska orsaken är känd
2. det dominant-negativa mönstret ger potential att tysta mutantuttrycket och behålla vildtypsuttrycket
3. det huvudsakliga symptomet man önskar bota är lokal smärta, oftast från de ytor på fötterna som är utsatta för tryck.

De flesta mutationer verkar ske i änden av en av α-helix-stångstrukturerna (”coiled coil”) i keratinproteinet. Hos keratin 6a (K6a) är mutationer vanliga vid N171, antingen att kodonet har försvunnit eller att en bas bytts (Hickerson *et al.* 2008). Hickerson (2008) valde ut en mutant av *K6a*, där en nukleotidsubstitution (adenin byts till cytosin) skett på position 513, vilket kodar för en annan aminosyra i proteinet. För att se vilken siRNA-sekvens som skulle tysta med störst effektivitet och selektivitet testades alla möjliga varianter (totalt 19 stycken) av den klassiska 21nt-designen (19 parade + 2 överhängande). Plasmider användes till att transfektera celler *in vitro*. Vissa varianter gav inte någon dämpning alls av uttrycket och andra riktade sig inte selektivt nog. Tre designer särskilde starkt allelerna, två med en potens

på över 80 % (Hickerson *et al.* 2008). Det siRNA som hade högst selektivitet och potens var MUT 12, vars mutantparande nukleotid satt på position 12 (exklusive de två överhängande) från guidesträngens ’5-ände. Detta visar att siRNA har potential att bota denna sjukdom. Samtidigt förtydligar resultatet hur viktigt det är att noga undersöka vilken sekvens som är optimal, då varianterna med den mutationsparande nukleotiden ett snäpp fram eller bak i raden saknade samma potens och selektivitet (Hickerson *et al.* 2008).



Figur 2. Schematisk avbildning av keratin 6a. De tjocka, blåa boxarna framställer "coiled coil"-domäner. Mutationer är vanliga i främre änden av 1A eller bakre delen av 2B, markerat med röd pil. Pilen till vänster pekar på nukleotidpositionen N171 som anses vara den vanligaste mutationen hos K6a (Hickerson *et al.* 2008). Förenklad bild från Leachman *et al.* (2005).

Sekvensen för MUT 12 användes senare i den första kliniska prövningen på en människa mot en hudsjukdom såväl som mot en genetisk sjukdom (Leachman *et al.* 2008). SiRNAt (som namngavs TD101) var naket och omodifierat, dels för att modifieringar visade sig störa träffsäkerheten och dels med avseende på säkerheten. Skulle siRNAt råka nå ut i blodomloppet skulle ett omodifierat brytas ner fortare (Leachman *et al.* 2009*)*. Experimentet var dubbelblint och utfördes på en person, med siRNA-injektion i ett litet område av kallusen under ena foten och kontrollinjektion i den andra fotens motsvarande kallus (Leachman *et al.* 2009). Prövningen varade 17 veckor med två injektioner i veckan med stigande dos samt en efterföljande period på tre månader där siRNAt förväntades brytas ner. Efter 70 dagar började patienten uppfatta en positiv skillnad i den högra foten och längden på dess kallus började minska. Vid dag 98 började den förhårdnade huden vid injektionsområdet ramla av och blotta ny, frisk och smärtfri hud. Den vänstra fotens kallus, som senare visade sig ha fått kontrollbehandlingen, förblev oförändrad. Efter att sista dosen tagits dröjde det cirka två månader tills symptomen började återvända. Tyvärr utfördes inga biopsier för att mäta mRNA-uttryck i hudcellerna, eftersom risken för infektioner skulle äventyra studien (Leachman *et al.* 2009).

Meesmanns hornhinnedystropi

Meesmanns hornhinnedystropi (Meesmann epithelial corneal dystrophy) uppstår även den av en mutation i en gen för keratin. Den här gången är det generna till K3 eller K12 som drabbas, som uttrycks endast av keratinocyter i epitellagret i hornhinnan (Liao *et al.* 2011). Liksom i PC skapas en skörhet i det yttre epitelets struktur, som i det här fallet kan ge mikrocystor eller ”fina linjer” över hornhinnan. Ofta känner den drabbade inte av några symtom, ibland kan det dock leda till ljusöverkänslighet och i sällsynta fall till grov oskärpa, varpå en hornhinnetransplantation måste genomföras (Chiou *et al.* 1998).

I studien togs prover av en brittisk familj med en mutation i keratin 12 (K12). Ett siRNA formades efter mRNAt till den muterade allelen Leu132Pro, där en missense-mutation i kodon 132 bytt ett leucin mot ett prolin i proteinet. Liksom i PC sker mutationen i främre änden av keratinets 1A-domän, vilket försvårar filamentbildning och leder istället till aggregeringar. Efter ett liknande test som utfördes för PC för att hitta den ultimata sekvensen för siRNAt sågs att K12-L132P-9 inte bara hämmade potent utan väldigt selektivt. Efter injektion *in vitro* sågs cellerna forma till största delen normal filamentformation och endast 5 % av filamenten utgjorde aggregatformationer (Liao *et al.* 2011).

Sialuria
Sialuria är en sällsynt autosomal dominant sjukdom som drabbar kroppens alla celler. En defekt i cellernas feedbackreglering rubbar metabolismen genom att öka produktionen av sialinsyra (N-acetylneuraminsyra) i cytoplasman (Klootwijk *et al.* 2008).

Kännetecknen för sialuria är svaga men särskilda ansiktsdrag (”coarse facies”), som bland annat innefattar en bred näsrygg, framstående panna och hypertelorism, det vill säga längre avstånd mellan ögonen. Därtill har lindrig motorisk fördröjning och hepatomegali, förstoring av levern, diagnosticerats (Krasnewich *et al*. 1993, Enns *et al.* 2001, Klootwijk *et al.* 2008). Diagnos för att fastställa sialuria sker med hjälp av urinprov, där man kan mäta om halten av fri sialinsyra är abnormt hög (Klootwijk *et al.* 2008).

Sialinsyra är en mellanprodukt i syntetiseringskedjan för cytidinmonofosfatsialinsyra (CMP-sialinsyra). Sialinsyran produceras av enzymet uridindifosfo-N-acetylglukosamin (UDP-GlcNAc)-2-epimeras (GNE-epimeras), som i sin tur får negativ återkoppling av slutprodukten. CMP-sialinsyra binder till enzymets allosteriska bindningscenter och hämmar vidare produktion (Enns *et al.* 2001). Vid sjukdomen sialuria har det skett en missense-mutation, det vill säga att sekvensen kodar för fel aminosyra i genen *GNE*, vilket ändrar strukturen i enzymets allosteriska site. CMP-sialinsyra kan då inte hämma produktionen av sialinsyra, koncentrationen ökar i cellens cytosol och rubbar så metabolismen (Klootwijk *et al.* 2008). Missense-mutationen har setts i två kodon (263 eller 266) som därför antas ligga i det allosteriska området (Seppala *et al.* 1999).

SiRNA var designat till att passa mRNAt till den muterade varianten (*GNE* c.797G>A) av epimerasgenen (*GNE*), där en punktmutation i kodon 266 kodar för fel aminosyra. Även siRNA för vildtypen designades, samt nonsil-siRNA (utan målsekvens) som kontroll (Klootwijk *et al.* 2008). Med plasmider som vektor transfekterades de *in vitro* till fibroblaster från en sialuriapatient. Genom att mäta mängden RNA-uttryck av *GNE* i celler där siRNA tillsatts och jämföra med orörda celler kan man uppskatta tystandets effekt. Båda siRNA gav ett tydligt specifikt tystande av sin egen mål-allel och bara ett visst blockerande av den andra allelen mättes (Klootwijk 2008). Totalt sågs siRNA-mut tysta den muterade allelen med cirka 70 procent och viltypsallelen med 30 procent. Mängden fri sialinsyra i fibroblasterna sågs sjunka, från en fem-dubbelt så hög mängd (17,6 nmol/mg protein) än vad som är förväntat (0,2-3,3 nmol/mg protein), till ett värde inom det spannet (cirka 2nmol/ mg protein) (Klootwijk et al. 2008). I det stora hela sågs siRNAt ge positiva resultat.

Huntingtons sjukdom
En sjukdom som det gjorts mycket forskning om och som siRNA verkar vara en lovande behandlingsmetod för är Huntingtons sjukdom (HD). Denna neurodegenerativa ärftliga sjukdom bryter ut i vuxen ålder och går inte att behandla idag. Den har förödande effekter på den motoriska kontrollen och även personligheten och den kognitiva förmågan kan påverkas.

Grunden för sjukdomen ligger i genen för proteinet huntingtin (HTT), vars ena exon består av flera upprepningar av kodonet (trippelnukleotiden) CAG. Förlängs denna upprepande nukleotidföljd på grund av en mutation får proteinet en abnormt lång polyglutaminkedja som kan göra huntingtinet giftigt (Zuccato *et al.* 2010)**.** Symptomfria individer har en exon som kodar för mellan 6 och 35 glutaminrester i rad, medan patienter med HD kan ha mellan 35 och upp till mer än 100 tripletter (Kremer *et al.* 1994). Styrkan hos symtomen och åldern där de första indikationerna visas korrelerar med antalet CAG-upprepningar; ju fler tripletter

desto tidigare bryter sjukdomen ut. Kedjan har även en tendens att förlängas från generation till generation och de första symptomen ”klättrar” därför ner till allt yngre åldrar (Zuccato *et al.* 2010). Om föräldern exempelvis fick de första symptomen vid 60 års ålder finns risken att barnet får sjukdomssymptom som bryter ut vid 50 eller 40 års ålder, på grund av att huntingtinet fått en ännu längre polyglutaminsvans.

De delar i hjärnan där genen för HTT uttrycks är främst de basala ganglierna i striatum och hjärnbarken, men även andra delar av hjärnan drabbas av atrofi vid långt gången sjukdom (Zuccato *et al.* 2010). Symptomen tros vara en kombination av att vildtypen förlorar sin funktion (”loss of function”), att mutanten får en ny onaturlig aktivitet (”gain of function”) samt att ackumulering av felaktiga proteiner leder till vidare komplikationer (Zuccato *et al.* 2010).

Det har länge varit oklart vad huntingtin har för direkt funktion i den utvecklade hjärnan. Det finns studier som tyder på att långsiktig tystande av både vildtypen och mutant inte skulle ha några negativa långtidseffekter (Grondin *et al.* 2012). Om så är fallet skulle behandlingen med siRNA förenklas betydligt, då man kan skapa en design generellt för HTT. I flera försök har därför siRNA riktats till både mutant och vildtyp (Godinho *et al.* 2013, Stiles *et al.* 2012). Genom att under en längre tid injicera en stor mängd naket, lätt modifierat siRNA mot HTT (både vildtyp och mutant) i striatum i hjärnan lyckades man få en bra spridning lokalt och till intilliggande vävnad och kunde påvisa ett stabilt tystande av proteinuttrycket hos större ickemänskliga primathjärnor (rhesusapa (*Macaca mulatta*)) (Stiles *et al.* 2012). Med hjälp av β-cyklodextriner (CD) för att öka stabiliteten hos siRNAt och därmed minska mängden har HTT-syntetiseringen kunnat sänkas *in vitro* med ca 78 procent (Godinho *et al.* 2013). Efter sju veckors transfektion med CD *in vivo* sågs signifikanta förbättringar i motoriken hos HD-transgena möss (Godinho *et al.* 2013).

Dock har andra studier kopplat vildtypen till flera mekanismer livsviktiga för neuronen, bland annat hämmande av enzymet kaspas-3, vars aktivitet leder till apoptos (Zhang *et al.* 2006). Detta visar på vikten av en allelspecifik behandling.

Det finns några heterozygota nukleotidpolymorfier som är gemensamma för ett stort antal patienter, varav en SNP är associerad till CAG-triplettexpansion (Pfister *et al.* 2009, Warby *et al. 2009)*. Pfister och kollegor (2009) hävdar att fem siRNA som riktar sig mot tre specifika SNP skulle i kombination kunna behandla 75% av USAs och Europas HD-patienter. Även andra har försökt tysta mutantuttrycket genom att designa siRNA mot allelspecifika SNPs, med några lovande resultat (van Bilsen *et al.* 2008, Fiszer *et al*. 2012).

Det kan verka fördelaktigt att ospecifikt rikta in sig på långa CAG-repetitioner för att kunna undvika att behöva rikta in sig på polymorfier. Det skulle ge en starkare universalitet; att en enskild siRNA skulle kunna hjälpa flera patienter och kanske rent av kunna behandla andra sjukdomar som uppstår på grund av CAG-upprepningar. Risken är tyvärr stor för off-targeteffekter, då många andra essentiella gener innehåller delar med CAG-repetitioner (Hu *et al.* 2009, Fiszer *et al.* 2011). Resultaten har varit varierande i olika försök. I vissa fall har tystandet hävdats problematiskt och siRNA har jämfört med andra metoder inte alls verkat potent och selektivt (Miller *et al.* 2003, Hu *et al.* 2009). Men med små modifieringar av följarsträngen och små substitutioner i CUG-följden har man lyckats tysta både gen- och allelspecifikt, vilket ger en mer lovande framtidsbild (Fiszer *et al.* 2011).

Diskussion

Dessa sjukdomar, som sammanfattats i tabell 1, var endast ett axplock av de sjukdomar som man idag försöker bota med RNA-interferens. Dessa fyra har alla sina fördelaktiga egenskaper som talar för en framtida siRNA-terapi och kännetecken som försvårar för en behandling.

Tabell 1 Fyra sällsynta sjukdomar som prövats med siRNA.

Sällsynt sjukdom	**Symptom**	**Vävnad**	**Muterad allel**	**Möjlig framtida metod**	**Vehicle (transport)**
Pachyonychia congenita	Cystor och smärtsamma förhårdnader	Hud	*K6a* (N171K)	Injektion, kräm	Naket, liposom
Meesmanns hornhinne-dystropi	Symtlomlös till skrovlig hornhinna	Öga/ hornhinna	*K12* (Leu132Pro)	Ögondroppar	Naket
Sialuria	Bl a. ”coarse facies”, hög halt sialinsyra i urinen	Samtliga celler	*GNE* (c.797G>A)	Passiv eller systemisk leverans	Nanopartiklar eller liposomer
Huntingtons sjukdom	Motorisk dysfunktion, förändring i personlighet	Striatum och cortex i hjärnan	*HTT*	CED	B-cyklo-dextriner

För patienter med **pachyonychia congenita** skulle en behandling kunna innebära att de slipper invalidisering och att de utan smärta kan stödja sig på fötterna och använda sina händer. Problemet med behandlingen är leveranssättet. En injektion är sällan smärtfri och att nålen vid åtskilliga tillfällen ska in i förhårdnad, högkänslig hud gjorde metoden till en nästintill outhärdlig upplevelse för patienten (Leachman *et al.* 2009). En möjlig framtida leveranssätt är en fettbaserad salva (”gene creme”) (Burnett & Rossi 2012) där siRNAt eskorteras av liposomer eller liknande vektor som tränger in i hudens celler. Den skulle lätt kunna appliceras av patienten själv och kanske även lindra andra symptom, som exempelvis deformerade naglar. När lättare påfrestningar som friktion och tryck tidigare resulterat i cystor och förhårdnader skulle patienten få en mindre hämmad vardag med ett leveranssätt som personen kan hantera själv. Om inte en kräm kan tränga in i de hårda skorporna skulle man kunna börja med injektioner för att ny frisk hud ska bildas under, och sedan upprätthålla proteinuttrycket med salvan. I det fall att siRNAt inte är stabilt i en sådan kräm är reguljära läkarbesök ett alternativ.

Meesmanns hornhinne-dystropi är en sjukdom som i och för sig ofta är symptomlös, men vid ett kraftigt fall av mikrocystbildning kan en siRNA-behandling förhindra att man behöver göra en transplantation av hornhinnan, där mikrocystorna i vissa fall kan komma tillbaka (Chiou *et al.* 1998). Försöket visar även liksom för sjukdomen PC principen av siRNA som behandlingsätt, denna gång som terapi mot en ögonsjukdom. Även hos Meesmanns finns möjligheten för patienten att applicera själv, i form av ögondroppar där siRNAt eventuellt skulle kunna vara naket. Eftersom det skulle behöva sprida sig extremt lokalt skulle en vektor teoretiskt sett inte behövas, bara siRNAt har modifieringar som kan underlätta för dess

intagning i ögats epitelceller.

Båda keratinsjukdomarna har även den fördelen att det oftast är en speciell punkt i genen som blivit utsatt för en mutation. Det ger möjligheten att skapa ett läkemedel som de flesta patienter kan behandlas med.

Vad beträffar **sialuria** så förekommer den feedbackdysfunktion som resulterar i hög sialinsyrahalt i alla kroppens celler, så där skulle en systemisk leverans vara nödvändig. En systemisk leverans innebär högre krav på modifieringen och vektorn, då siRNAt behöver ta sig igenom blodbanan oskadd och interagera med blodkomponenter och nukleaser. Den får heller inte vara för stabil så att den ackumuleras i kroppens filtreringsorgan (Peer & Lieberman 2011). En för hög dos skulle då kunna ge en toxisk effekt eller aktivera immunrespons. Ett mål att förse alla kroppens celler med en jämn mängd siRNA är nog väldigt svårt att nå, om än omöjligt. Dock behöver det inte vara nödvändigt att behandla alla celler för att få lindring av de mest markanta symptomen, utan det kanske räcker med att behandla de organ där problem har observerats. Ett symptom som förekommer är exempelvis förstoring av levern. Om hepatomegalin uppstår på grund av dysfunktion hos leverns cellers (och inte på grund av andra utomstående faktorer) skulle man kunna använda sig av så kallad passiv leverans. Eftersom levern är ett filtreringsorgan tenderar liposomer och nanopartiklar att samlas och koncentreras där (Peer & Lieberman 2011), vilket gör dessa till tänkbara vektorer. Vad gäller den motoriska fördröjningen och vissa av de andra symptomen behövs nog som sagt en systemisk leverans, samt en djupare förståelse för hur dessa symptom uppkommer. Om det till exempel är den motoriska nervbanan eller själva muskelns celler, eller både och, som påverkas av sialinsyran så borde olika leveranssätt vara olika effektiva.

Av dessa fyra sjukdomar är **Huntingtons sjukdom** den mest kritiska sjukdomen som man försöker hitta ett läkemedel till. Då den har dödlig utgång och är starkt handikappande fysiskt och psykiskt skulle behandling som lindrar dessa symptom om än något räknas som ett stort framsteg. För tillfället råder det delade meningar om hur man ska gå tillväga: om man ska rikta in sig på SNPs eller rikta sig till den abnorma förlängningen av CAG-regionen hos mRNAt. Hu *et al.* (2009) menar att det sistnämnda kan göras bättre med ensträngade antisenseoligonukleotider (”peptide nucleic acid” (PNA) och ”locked nucleic acid” (LNA)). De har visat sig kunna skilja mellan vildtyp och mutant mer specifikt och potent än liknande tester med siRNA. Hu menar även (2009) att siRNAt kanske skulle hämmat mer specifikt med ytterligare modifieringar. De såg även att ju längre polykedjan var (ju gravare sjukdom) desto bättre kunde PNA binda och potent hämma. Kanske betyder det att andra metoder lämpar sig bättre för denna sjukdom, men som sagt finns det andra forskare som haft bättre framgång med sin design av siRNA (Fiszer *et al.* 2011, Pfister *et al.* 2009).

Inom många sjukdomar har patienterna liknande mutationer (exempelvis K171 hos PC) där många patienter skulle kunna behandlas med samma siRNA. Problematik kvarstår för de patienter som skulle behöva individuell analys och design av siRNA för att få bukt med sin sjukdom, något som inte är möjligt med det regelverk för läkemedelsframtagning som finns idag. Med vår växande förståelse för RNA-interferens och med utvecklingen av bättre metoder att designa och leverera kanske nya, säkra metoder att behandla individuella mutationer kommer tillåtas. Kanske regelverket för läkemedelsframtagning utvecklas i samma riktning, och fler människor får chansen till vård. Till dess kommer man förhoppningsvis ha kunnat skapa generella siRNA-behandlingar som klarar dagens läkemedelsprövningar och som kan hjälpa miljoner människor världen över. Från att i nuläget inte ha några möjligheter till behandling kan de med sällsynta, genetiska sjukdomar känna hopp om framtiden tack vare

denna oansenliga men lovande molekyl.

Tack

Jag vill tacka Jöns Hilborn och alla de på Ångströms avdelning för polymerkemi som inspirerat och hjälpt mig att förstå siRNAts komplexitet och möjligheter. Tack till Irene Söderhäll som hjälpt och handlett mig och till Albin Kozma, Erik Elgh och Erik Karlsson som givit mig återkoppling och stöd.

Referenser

Amarzguioui M, Rossi JJ. 2008. Principles of Dicer substrate (D-siRNA) design and function. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.) **442**: 3–10.

Bowden PE, Haley JL, Kansky A, Rothnagel JA, Jones DO, Turner RJ. 1995. Mutation of a type II keratin gene (K6a) in pachyonychia congenita. Nature Genetics **10**: 363–365.

Burnett JC, Rossi JJ. 2012. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. Chemistry & Biology **19**: 60–71.

Chaturvedi K, Ganguly K, Kulkarni AR, Kulkarni VH, Nadagouda MN, Rudzinski WE, Aminabhavi TM. 2011. Cyclodextrin-based siRNA delivery nanocarriers: a state-of-the-art review. Expert Opinion on Drug Delivery **8**: 1455–1468.

Chiou AG, Florakis GJ, Copeland RL, Williams VA, McCormick SA, Chiesa R. 1998. Recurrent Meesmann's corneal epithelial dystrophy after penetrating keratoplasty. Cornea **17**: 566–570.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature **411**: 494–498.

Enns GM, Seppala R, Musci TJ, Weisiger K, Ferrell LD, Wenger DA, Gahl WA, Packman S. 2001. Clinical course and biochemistry of sialuria. Journal of Inherited Metabolic Disease **24**: 328–336.

Europeiska kommissionen. 2014. Rapport om tillämpningen av kommissionens meddelande om sällsynta sjukdomar: utmaningar för Europa [KOM(2008) 679 slutlig] och rådets rekommendation av den 8 juni 2009 om en satsning avseende sällsynta sjukdomar (2009/C 151/02). Elektronisk rapport. Brüssel. Europeiska kommissionen. Tillgänglig: http://ec.europa.eu/health/rare_diseases/docs/2014_rarediseases_implementationreport_sv.pdf [2015-04-26]

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature **391**: 806–811.

Fiszer A, Mykowska A, Krzyzosiak WJ. 2011. Inhibition of mutant huntingtin expression by RNA duplex targeting expanded CAG repeats. Nucleic Acids Research **39**: 5578–5585.

Fiszer A, Olejniczak M, Switonski PM, Wroblewska JP, Wisniewska-Kruk J, Mykowska A, Krzyzosiak WJ. 2012. An evaluation of oligonucleotide-based therapeutic strategies for polyQ diseases. BMC molecular biology **13**: 6.

Fiszer A, Olejniczak M, Galka-Marciniak P, Mykowska A, Krzyzosiak WJ. 2013. Self-duplexing CUG repeats selectively inhibit mutant huntingtin expression. Nucleic Acids Research **41**: 10426–10437.

Godinho BMDC, Ogier JR, Darcy R, O'Driscoll CM, Cryan JF. 2013. Self-assembling modified β-cyclodextrin nanoparticles as neuronal siRNA delivery vectors: focus on Huntington's disease. Molecular Pharmaceutics **10**: 640–649.

Grondin R, Kaytor MD, Ai Y, Nelson PT, Thakker DR, Heisel J, Weatherspoon MR, Blum

JL, Burright EN, Zhang Z, Kaemmerer WF. 2012. Six-month partial suppression of Huntingtin is well tolerated in the adult rhesus striatum. Brain: A Journal of Neurology **135**: 1197–1209.
Hannon GJ. 2002. RNA interference. Nature **418**: 244–251.
Hickerson RP, Smith FJD, Reeves RE, Contag CH, Leake D, Leachman SA, Milstone LM, McLean WHI, Kaspar RL. 2008. Single-nucleotide-specific siRNA targeting in a dominant-negative skin model. The Journal of Investigative Dermatology **128**: 594–605.
Hu J, Matsui M, Gagnon KT, Schwartz JC, Gabillet S, Arar K, Wu J, Bezprozvanny I, Corey DR. 2009. Allele-specific silencing of mutant huntingtin and ataxin-3 genes by targeting expanded CAG repeats in mRNAs. Nature Biotechnology **27**: 478–484.
Hu-Lieskovan S, Heidel JD, Bartlett DW, Davis ME, Triche TJ. 2005. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. Cancer Research **65**: 8984–8992.
Kim DH, Behlke MA, Rose SD, Chang MS, Choi S, Rossi JJ. 2005. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. Nature Biotechnology **23**: 222–226.
Klootwijk RD, Savelkoul PJM, Ciccone C, Manoli I, Caplen NJ, Krasnewich DM, Gahl WA, Huizing M. 2008. Allele-specific silencing of the dominant disease allele in sialuria by RNA interference. The FASEB Journal **22**: 3846–3852.
Krasnewich DM, Tietze F, Krause W, Pretzlaff R, Wenger DA, Diwadkar V, Gahl WA. 1993. Clinical and Biochemical Studies in an American Child with Sialuria. Biochemical Medicine and Metabolic Biology **49**: 90–96.
Kremer B, Goldberg P, Andrew SE, Theilmann J, Telenius H, Zeisler J, Squitieri F, Lin B, Bassett A, Almqvist E. 1994. A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. The New England Journal of Medicine **330**: 1401–1406.
Krichevsky AM, Kosik KS. 2002. RNAi functions in cultured mammalian neurons. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**: 11926–11929.
Leachman SA, Kaspar RL, Fleckman P, Florell SR, Smith FJD, McLean WHI, Lunny DP, Milstone LM, van Steensel MAM, Munro CS, O'Toole EA, Celebi JT, Kansky A, Lane Eb. 2005. Clinical and Pathological Features of Pachyonychia Congenita. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings **10**: 3–17.
Leachman SA, Hickerson RP, Hull PR, Smith FJD, Milstone LM, Lane EB, Bale SJ, Roop DR, McLean WHI, Kaspar RL. 2008. Therapeutic siRNAs for dominant genetic skin disorders including pachyonychia congenita. Journal of Dermatological Science **51**: 151–157.
Leachman SA, Hickerson RP, Schwartz ME, Bullough EE, Hutcherson SL, Boucher KM, Hansen CD, Eliason MJ, Srivatsa GS, Kornbrust DJ, Smith FJ, McLean WI, Milstone LM, Kaspar RL. 2009. First-in-human Mutation-targeted siRNA Phase Ib Trial of an Inherited Skin Disorder. Molecular Therapy **18**: 442–446.
Liao H, Irvine AD, MacEwen CJ, Weed KH, Porter L, Corden LD, Gibson AB, Moore JE, Smith FJD, McLean WHI, Moore CBT. 2011. Development of Allele-Specific Therapeutic siRNA in Meesmann Epithelial Corneal Dystrophy. PLoS ONE **6**: e28582.
Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. 2002. Single-Stranded Antisense siRNAs Guide Target RNA Cleavage in RNAi. Cell **110**: 563–574.
McLean WH, Rugg EL, Lunny DP, Morley SM, Lane EB, Swensson O, Dopping-Hepenstal PJ, Griffiths WA, Eady RA, Higgins C. 1995. Keratin 16 and keratin 17 mutations cause pachyonychia congenita. Nature Genetics **9**: 273–278.
McLean WH, Hansen CD, Eliason MJ, Smith FJD. 2011. The Phenotypic and Molecular

Genetic Features of Pachyonychia Congenita. Journal of Investigative Dermatology **131**: 1015–1017.
Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. 2004. Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs. Molecular Cell **15**: 185–197.
Miller VM, Xia H, Marrs GL, Gouvion CM, Lee G, Davidson BL, Paulson HL. 2003. Allele-specific silencing of dominant disease genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**: 7195–7200.
Nayak S, Herzog RW. 2010. Progress and prospects: immune responses to viral vectors. Gene Therapy **17**: 295–304.
Peer D, Lieberman J. 2011. Special delivery: targeted therapy with small RNAs. Gene Therapy **18**: 1127–1133.
Pfister EL, Kennington L, Straubhaar J, Wagh S, Liu W, DiFiglia M, Landwehrmeyer B, Vonsattel J-P, Zamore PD, Aronin N. 2009. Five siRNAs targeting three SNPs may provide therapy for three-quarters of Huntington's disease patients. Current biology: CB **19**: 774–778.
Sanghvi YS. 2011. A status update of modified oligonucleotides for chemotherapeutics applications. Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry. Edited by Serge L. Beaucage. **Chapter 4**: Unit 4.1.1–22.
Schwarz DS, Ding H, Kennington L, Moore JT, Schelter J, Burchard J, Linsley PS, Aronin N, Xu Z, Zamore PD. 2006. Designing siRNA that distinguish between genes that differ by a single nucleotide. PLoS genetics **2**: e140.
Seppala R, Lehto VP, Gahl WA. 1999. Mutations in the human UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase gene define the disease sialuria and the allosteric site of the enzyme. American Journal of Human Genetics **64**: 1563–1569.
Smith FJ, Jonkman MF, van Goor H, Coleman CM, Covello SP, Uitto J, McLean WH. 1998. A mutation in human keratin K6b produces a phenocopy of the K17 disorder pachyonychia congenita type 2. Human Molecular Genetics **7**: 1143–1148.
Stiles DK, Zhang Z, Ge P, Nelson B, Grondin R, Ai Y, Hardy P, Nelson PT, Guzaev AP, Butt MT, Charisse K, Kosovrasti V, Tchangov L, Meys M, Maier M, Nechev L, Manoharan M, Kaemmerer WF, Gwost D, Stewart GR, Gash DM, Sah DWY. 2012. Widespread suppression of huntingtin with convection-enhanced delivery of siRNA. Experimental Neurology **233**: 463–471.
Tambuyzer E. 2010. Rare diseases, orphan drugs and their regulation: questions and misconceptions. Nature Reviews. Drug Discovery **9**: 921–929.
Van Bilsen PHJ, Jaspers L, Lombardi MS, Odekerken JCE, Burright EN, Kaemmerer WF. 2008. Identification and allele-specific silencing of the mutant huntingtin allele in Huntington's disease patient-derived fibroblasts. Human Gene Therapy **19**: 710–719.
Warby SC, Montpetit A, Hayden AR, Carroll JB, Butland SL, Visscher H, Collins JA, Semaka A, Hudson TJ, Hayden MR. 2009. CAG expansion in the Huntington disease gene is associated with a specific and targetable predisposing haplogroup. American Journal of Human Genetics **84**: 351–366.
Zamecnik PC, Stephenson ML. 1978. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. Proceedings of the National Academy of Sciences **75**: 280–284.
Zhang Y, Leavitt BR, van Raamsdonk JM, Dragatsis I, Goldowitz D, MacDonald ME, Hayden MR, Friedlander RM. 2006. Huntingtin inhibits caspase-3 activation. The EMBO journal **25**: 5896–5906.
Zuccato C, Valenza M, Cattaneo E. 2010. Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. Physiological Reviews **90**: 905–981.