

УДК 577.2.08

РАЗРАБОТКА И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА КОРОТКИХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК

© 2012 г. В. В. Гринеv*

Кафедра генетики биологического факультета Белорусского государственного университета,
Минск, 220030, Республика Беларусь

Поступила в редакцию 11.01.2012 г.

Принята к печати 16.02.2012 г.

Обзор посвящен анализу правил подбора высокоэффективных и высокоспецифичных коротких интерферирующих РНК (siРНК), а также требований, предъявляемых к их качеству. В обзоре подробно рассмотрены четыре ключевых этапа разработки таких siРНК: выбор целевой РНК, подбор нуклеотидной последовательности смысловой и антисмысловой цепей соответствующей siРНК, оценка активности и специфичности действия полученных siРНК. Особое внимание уделено правилам подбора нуклеотидной последовательности siРНК, который проводят с учетом особенностей структурной и термодинамической организации, а также нуклеотидного состава siРНК, структурно-термодинамической организации молекулы целевой РНК при детальной проработке условий эксперимента с использованием siРНК. В обзоре также дан анализ биоинформационных ресурсов, используемых при проектировании siРНК. Изложенная и критически проанализированная в обзоре информация может быть полезной при разработке siРНК, коротких шпилечных РНК (shРНК) и/или искусственных микроРНК (amiРНК) для целей функциональной геномики и экспериментальной генной терапии.

Ключевые слова: РНК-интерференция, короткие интерферирующие РНК, правила разработки, оценка активности, оценка специфичности действия.

DESIGN AND QUALITY CONTROL OF SHORT INTERFERING RNAs, by V. V. Grinev* (Department of Genetics, Faculty of Biology, Belarusian State University, Minsk, 220030 Republic of Belarus; *e-mail: grinev_vv@bsu.by). Review is devoted to analysis of design rules as well as quality controls in development of high effective and specific short interfering RNA (siRNA). Four crucial steps in development of such siRNAs are discussed: choice of target RNA, design of sense and antisense strands as well as assessment of activity and specificity of corresponding siRNAs. The special consideration is given to siRNA construction principles which are based on both structural and thermodynamical features and nucleotide composition of siRNAs as well as structural and thermodynamical properties of target RNA and features of experiment performance. Bioinformatics resources for development of siRNAs are also discussed. The information from this review can be useful for development of high effective and specific siRNA, short hairpin RNA (shRNA) and/or artificial microRNA (amiRNA) sequences for gene therapy and functional genomics purposes.

Keywords: RNA-interference, short interfering RNA, design rules, assessment of activity, assessment of specificity.

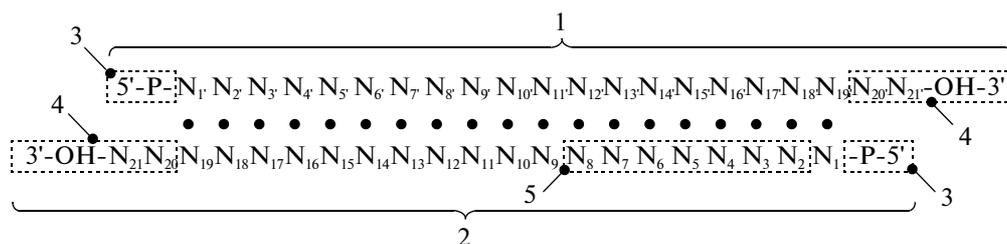
ВВЕДЕНИЕ

РНК-интерференция (РНКi) — это один из механизмов специфичного к последовательности контроля экспрессии генов на посттранскрипционном уровне, ключевую роль в котором играют короткие двухцепочечные молекулы РНК, именуемые короткими, или малыми, интерферирующими РНК (siРНК). Общие структурные особен-

ности организации таких дуплексов включают следующие параметры (рисунок): 1) в состав РНК-дуплекса входят две цепи длиной от 18 до 29 н. — смысловая (цепь-“пассажир”) и антисмысловая (рабочая цепь, цепь-“гид”); 2) РНК-дуплекс обладает структурно-термодинамической асимметричностью; 3) для распознавания целевой (или нецелевой) молекулы РНК важ-

Принятые сокращения: amiРНК (artificial microRNA) — искусственные микроРНК; CDS (coding sequence) — кодирующая белок последовательность; miРНК (microRNA) — микроРНК; siРНК (small interference RNA) — малые, или короткие, интерферирующие РНК; shРНК (short/small hairpin RNA) — короткие шпилечные РНК; UTR (untranslated region) — нетранслируемая область мРНК; РНКi — РНК-интерференция.

* Эл. почта: grinev_vv@bsu.by



Структурная организация синтетических siРНК. Нуклеотидная последовательность siРНК записана с помощью условных обозначений: N1', N2', Ni' – нуклеотиды смысловой цепи; N1, N2, Ni – нуклеотиды антисмысловой цепи. Фигурной скобкой 1 показана смысловая цепь siРНК, фигурной скобкой 2 – антисмысловая цепь. Пунктирными прямоугольниками выделены 5'-фосфатный конец (3), 3'-ОН-конец с двумя выступающими нуклеотидами (4) и “запальная” область (5).

ны 5'-концевые нуклеотиды (со 2-го по 8-й) антисмысловой цепи – это так называемая “запальная” область (“seed”-регион); 4) на обоих 3'-концах РНК-дуплекса находится по два неспаренных выступающих нуклеотида.

Источником siРНК могут быть эндогенные длинные двухцепочечные РНК, которые образуются с помощью клеточных или вирусных РНК-зависимых РНК-полимераз. Кроме того, внутриклеточные двухцепочечные РНК, как источник siРНК, могут появляться в результате транскрипции инвертированных повторов и генов микроРНК (miРНК). Наконец, siРНК могут иметь и искусственное происхождение – от синтетических до образующихся в результате внутриклеточного процессинга экзогенных молекул длинных двухцепочечные РНК, а так же коротких шпилечных РНК (shРНК) или искусственных микроРНК (amiРНК). Более подробно о самом явлении РНКi читатель может узнать из специализированных обзоров (например, [1]).

Вскоре после открытия РНКi стало понятно, что это явление можно использовать в функциональной геномике и экспериментальной генотерапии. Данный вывод основан на следующих соображениях: 1) РНКi как механизм контроля экспрессии генов у эукариот – природное явление, а не лабораторный феномен; 2) РНКi протекает при участии нескольких ферментативных систем, что предполагает усиление интерферирующего сигнала (это означает, что для запуска РНКi достаточно, теоретически, единичных молекул siРНК); 3) РНКi представляет собой высокоспецифичный механизм контроля экспрессии генов у эукариот на посттранскрипционном уровне; 4) источником siРНК могут быть shРНК и/или amiРНК, что позволяет переносить их в клетки с помощью плазмидных или вирусных векторов и контролировать наработку в этих клетках.

Очевидно, что для успешного использования РНКi в геномных исследованиях или генной терапии необходимы siРНК, обладающие высокой активностью и специфичностью. Алгоритм разработки таких siРНК включает четыре последова-

тельных этапа: 1) выбор целевой РНК, 2) подбор нуклеотидной последовательности смысловой и антисмысловой цепей siРНК, 3) оценка активности siРНК и 4) оценка специфичности их действия.

ВЫБОР ЦЕЛЕВОЙ РНК ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ РНКi

Наиболее общие представления о структуре целевого гена и разнообразии его РНК-продуктов могут быть получены с помощью геномных обозревателей (браузеров), самые популярные из которых UCSC Genome Browser [2] и Ensembl [3]. Такого рода геномные обозреватели проводят автоматическую аннотацию (краткое описание) геномов, используя для этого информацию из регулярно обновляемых специализированных баз данных типа NCBI Reference Sequences [4] или GenBank [5]. В зависимости от характера запроса пользователя, интегрированные обозревателем данные могут быть представлены в графическом или текстовом виде, удобном для их дальнейшего анализа. При необходимости массивы данных могут быть переданы пользователю по стандартным протоколам файлового обмена FTP или HTTP и подвергнуты дальнейшему анализу на локальном компьютере.

Однако, несмотря на все плюсы и удобства в использовании, геномные обозреватели дают лишь краткое описание структурно-функциональной организации для запрашиваемого локуса, более же подробная информация может быть получена из специализированных баз данных или литературных источников. При этом для решения задач проектирования и оценки качества siРНК самой значимой считается информация о вариабельности целевого гена, структуре и разнообразии его РНК-транскриптов, а также характере их редактирования.

Наиболее общая, но систематизированная информация о вариабельности целевого гена может быть получена через портал Varietas, который интегрирован с различными внешними геномными

базами данных и позволяет быстро получать доступ к интересующим пользователя сведениям [6]. Подробная же информация по тем или иным формам такой варибельности содержится в специализированных базах данных. Так, в базе данных NCBI dbSNP к настоящему моменту собраны сведения о 121 566 683 сайтах однонуклеотидного полиморфизма 86 организмов (в том числе о 41 365 915 сайтах по геному человека) [7, 8]. Расширенные данные о варьировании копийности, инсерциях, делециях, инверсиях или транслокациях целевого гена содержатся в регулярно обновляемой базе OMIM, где собраны сведения о 12 000 генов человека [9], или базе данных NCBI dbVar [8].

Самой важной информацией для проектирования siРНК служит информация о разнообразии РНК-продуктов целевого гена. К сожалению, в настоящее время не существует единой и всеобъемлющей базы данных, содержащей сведения о точках начала транскрипции (и, как следствие, 5'-концах молекул РНК), сигналах и сайтах полиденитирования (и, как следствие, 3'-концах молекул РНК), стартовых кодонах, стоп-кодонах, составе и структуре кодирующих белок последовательностей (CDS), а также об альтернативных вариантах сплайсинга РНК-транскриптов. Поэтому для получения как можно более полного представления об РНК-транскриптах целевого гена целесообразно провести системный анализ ряда баз данных.

Первоначальный анализ может быть начат с базы данных NCBI Reference Sequences [4], где на 15 июля 2011 года депонирована надежная информация о структуре 2 634 630 РНК-транскриптов (референс-последовательностей) для 12 235 видов организмов. Но, к сожалению, эти сведения нельзя считать полными. Так, согласно NCBI Reference Sequences, ген *RUNX1T1* человека может транскрибироваться с образованием 15 альтернативных РНК-продуктов. В тоже время, анализ всех известных на сегодняшний момент полноразмерных РНК-транскриптов, а также последовательностей EST (expressed sequence tag – короткие сегменты комплементарной ДНК длиной до нескольких сотен нуклеотидов, которые чаще всего имеют 5'- или 3'-концевое происхождение относительно единицы транскрипции) этого гена позволяет идентифицировать для него около 50 альтернативных вариантов РНК. Это указывает на то, что данные из NCBI Reference Sequences необходимо дополнять сведениями из других баз данных и on-line сервисов, наиболее информативными из которых считаются GenBank [5], NCBI dbEST [8], NCBI UniGene [8], GeneCards [10], AceView [11], ASDB [12], FANTOM4 [13] и ENCODE [14]. Однако следует отметить, что даже всесторонний поиск по различным базам данных не гарантирует получения полной информации о РНК-транскриптах целевого гена, особенно когда речь идет о мутантных

генах. В качестве примера можно привести гибридный ген *AML1/ETO*, образующийся при реципрокной транслокации t(8;21)(q22;q22) и участвующий в инициации острого миелоидного лейкоза: во всех базах данных можно найти сведения о десяти РНК-продуктах этого гена, в то время как литературный поиск позволяет расширить данный список до 112 альтернативных вариантов.

Наконец, при выборе молекулы целевой РНК целесообразно проанализировать возможности ее редактирования, так как еще на заре изучения явления РНКi обнаружили, что интенсивное редактирование РНК-мишени может привести к отмене самой РНКi [15]. Сведения о потенциальных сайтах редактирования РНК могут быть найдены в специализированных базах данных, часть из которых депонирует информацию только по отдельным видам живых организмов, но большинство содержат данные по всем изученным к настоящему времени организмам. К наиболее информативным из таких баз данных относятся REDIdb [16], DARNED [17] и dbRES [18].

Таким образом, прежде, чем приступить к проектированию siРНК и их испытанию на активность и специфичность, необходимо собрать как можно более полные сведения о структуре и варибельности целевого гена, а также, что самое главное, структуре и разнообразии его РНК-транскриптов, включая возможные пути их редактирования в клетке. Такие сведения могут быть получены из различных геномных баз данных и литературных первоисточников (а в некоторых случаях целесообразно и заново секвенировать выбранные участки молекулы целевой РНК, чтобы избежать ошибок) и уже на этой основе подходить к выбору целевой молекулы РНК.

ПРОЕКТИРОВАНИЕ siРНК

Потенциально к любой молекуле РНК может быть разработано, в зависимости от ее длины и нуклеотидного состава, множество вариантов siРНК. Однако модельные исследования показали, что путем случайного подбора нуклеотидной последовательности можно получить активный и специфичный вариант siРНК не более чем в 20–30% случаев [19–22]. Поэтому усилия многих исследователей, работающих в области РНКi, на протяжении длительного периода были нацелены на выяснение правил, по которым необходимо вести подбор кандидатов siРНК. Разработанные к настоящему времени правила такого подбора основаны на знаниях тех особенностей структурной и термодинамической организации siРНК, их нуклеотидного состава, а также структурно-термодинамической организации молекулы целевой РНК и постановки эксперимента, которые в совокупности и определяют эффективность и специфичность РНКi.

*Правила, основанные на особенностях
структурной организации siРНК*

Длина цепей siРНК-дуплекса должна лежать в диапазоне от 18 до 29 н. [23, 24]. Более короткие дуплексы не распознаются белками комплекса RISC, а более длинные в неэмбриональных клетках млекопитающих запускают интерфероновый ответ [25, 26]. Далее, как смысловая, так и антисмысловая цепи могут быть сегментированы без потери активности siРНК [27, 28]. Что касается влияния равной или разной длины двух цепей и типа торцов (тупые или выступающие) siРНК-дуплекса, его симметричности или асимметричности, размера и нуклеотидного состава выступающих 5'- или 3'-концов на эффективность РНКi, то имеющиеся данные неоднозначны и зачастую противоречивы: от указаний на полное отсутствие зависимостей до выводов о наличии четких взаимосвязей [24–26, 29–33]. Соотнесение этих данных с экспериментальными моделями, на которых они были получены, позволяет предположить, что оба вывода верны, но с привязкой к конкретному виду живых организмов: у таких организмов, как плодовая мушка, максимальной эффективностью обладают канонические по структуре siРНК, в то же время у более сложно организованных животных система РНКi, по-видимому, более гибкая и менее требовательная к структуре siРНК-дуплексов.

Цепи siРНК-дуплекса должны быть полностью комплементарны [34]. Это правило не является однозначным, однако на данном этапе развития наших представлений о РНКi его целесообразно выполнять, так как имеющиеся данные о влиянии некомплементарных пар (“mismatches”) в siРНК-дуплексе на его интерферирующую активность противоречивы и предсказать заранее последствия введения таких «mismatches» невозможно. Так, некоторые авторы отмечают, что одно- или динуклеотидные “некомплементарности” на концах siРНК-дуплекса могут быть либо нейтральными, либо способны снижать или повышать эффективность РНКi [35]. В то же время другие исследователи указывают только на нейтральный РНКi-эффект в случае отсутствия комплементарности по позициям N₁₈ и N₁₉ [36], и на положительный — при наличии внутренней некомплементарности [37].

Неканонические пары нуклеотидов G:U должны быть исключены из siРНК-дуплекса [38]. Наличие таких пар снижает эффективность РНКi, даже если термодинамическая составляющая siРНК-дуплекса при этом существенно не меняется [38]. Следует отметить, что по этой особенности siРНК отличаются от miРНК человека, для которых неканонические пары нуклеотидов G:U — обычное явление [39].

*Правила, основанные на особенностях
термодинамической организации siРНК*

Свободная энергия siРНК-дуплекса в регионе N₁-N₄ должна быть больше –9 ккал/моль [19, 40, 41]. Низкая стабильность siРНК-дуплекса по 5'-концу антисмысловой цепи — это один из ключевых факторов, определяющих термодинамическую асимметричность дуплекса и влияющих на выбор комплексом RISC рабочей цепи siРНК.

Свободная энергия siРНК-дуплекса в центральном регионе N₈-N₁₃ не должна превышать –13 ккал/моль [19]. Впервые на высокую термодинамическую стабильность центрального региона активных siРНК-дуплексов указала А. Khvorova с коллегами в 2003 году [42]. В последующем к схожему выводу пришли и другие группы исследователей [40, 41, 43–45]. Точные координаты этого региона, а также необходимый оптимум его термодинамической устойчивости определены в специальном системном исследовании, проведенном W. Gong и соавт. [19]. Эта особенность siРНК связана с тем, что данный регион перекрывает нуклеотид N₁₀ антисмысловой цепи siРНК, стоящий напротив сайтов разрезания смысловой цепи siРНК-дуплекса и целевой молекулы РНК, и его термодинамическое состояние влияет на эффективность разрезания указанных цепей активированным комплексом RISC [46]. Однако при этом следует учитывать и тот факт, что слишком высокая термодинамическая стабильность этого региона, обусловленная, например, химической модификацией нуклеотидов А и U, препятствует расплетанию цепей siРНК-дуплекса и существенно, в 3–5 раз, снижает эффективность РНКi [36].

Свободная энергия siРНК-дуплекса в регионе N₁-N₄ должна быть больше свободной энергии региона N₁₆-N₁₉ [19, 40, 42, 44, 47–49]. По-видимому, разница свободных энергий между этими регионами должна быть не менее 2 ккал/моль, однако полного консенсуса в этом вопросе пока не достигнуто. Так, А. Chalk и соавт. [40], а также W. Gong с коллегами [19] указывают на разницу не более чем в 1 ккал/моль. В то же время О. Матвеева (Matveeva) с соавт. [49] установили, что зависимость между термодинамической асимметричностью siРНК-дуплекса и частотой включения антисмысловой цепи в комплекс RISC носит экспоненциальный характер с критической точкой в 2 ккал/моль — при этом (или более высоком) значении антисмысловая цепь включается в RISC в 20 и более раз чаще, чем смысловая. Противоречивость полученных результатов может быть обусловлена разностью подходов, используемых для расчета этого параметра: Матвеева с соавт. рассчитывали термодинамическую асимметричность siРНК-дуплекса по двум концевым нуклеотидам, другие же авторы брали в расчет от 1 до 5 концевых нуклеотидов.

Свободная энергия вторичной структуры антисмысловой цепи siРНК должна лежать в диапазоне между -5 ккал/моль и 1 ккал/моль, а температура плавления – в диапазоне между $+20^{\circ}\text{C}$ и $+60^{\circ}\text{C}$ [19, 40, 49–52]. Сворачивание антисмысловой цепи siРНК в стабильную вторичную структуру может быть препятствием на пути ее взаимодействия с комплементарным участком целевой молекулы РНК. С другой стороны, слишком нестабильная вторичная структура может свидетельствовать об очень низком содержании нуклеотидов G и C в siРНК, что должно отразиться на аффинности ее связывания с целевой молекулой РНК и эффективности РНКи. Указанные в правилах диапазоны стабильности можно рассматривать как компромисс между этими двумя тенденциями.

Правила, основанные на особенностях нуклеотидного состава siРНК

В позициях N_1 и N_3 антисмысловой цепи siРНК должны быть А или U, но не G или C [21, 41, 51, 53–60]. W. Gong и соавт. перепроверили это правило путем анализа 9000 уникальных siРНК из базы данных siRecords и выявили, что наличие нуклеотида А и отсутствие нуклеотида G в данных позициях, действительно, вносит наибольший вклад в высокую активность siРНК по сравнению с наличием/отсутствием других нуклеотидов [19]. Наблюдаемые предпочтения обусловлены необходимостью поддержания термодинамической асимметричности дуплекса siРНК, что и определяет выбор комплексом RISC антисмысловой цепи дуплекса в качестве рабочей.

В позиции N_2 антисмысловой цепи siРНК должен быть U [41, 55, 60]. Это правило далеко не всегда подтверждается. Так, W. Gong с коллегами отдают предпочтение С или А в этой позиции [19], а M. Ichihara с соавт. указывают на равнозначность А и U [56].

В позиции N_4 антисмысловой цепи siРНК должны быть С или G, а по позициям N_5 и N_8 предпочтение за нуклеотидом G, но не С [19, 53, 54]. Взаимосвязь обнаружена путем статистического анализа множества siРНК и не всегда подтверждается. Так, O. Матвеева с соавт. обнаружили предпочтительность А в позициях N_4 и N_8 [41], а в позиции N_5 некоторых активных siРНК находится нуклеотид U [59].

В позиции N_6 антисмысловой цепи siРНК должен быть U, но не С, а по позиции N_{16} – наоборот [19]. Взаимосвязь обнаружена путем статистического анализа обширной коллекции siРНК из базы данных siRecords.

В позиции N_7 антисмысловой цепи siРНК должен быть А или U, но не G или С [41, 51, 53–56, 60]. Проверка предпочтительного нуклеотидного состава siРНК, проведенная W. Gong и соавт., под-

твердила значимость лишь нуклеотида А, но не U, G или C [19]. Более того, в некоторых активных siРНК в данной позиции находится нуклеотид G [21, 57].

В позиции N_{10} антисмысловой цепи siРНК должен быть А или U [41, 51, 55–57]. К сожалению, данное правило, по-видимому, нельзя считать надежным. Так, M. Amarzguioui & H. Prydz показали [53], что наличие U в позиции 10 антисмысловой цепи siРНК существенно снижает эффективность РНКи, а W. Gong с соавт. [19] среди 9000 siРНК вообще не обнаружили никаких нуклеотидных предпочтений в этой позиции. Однако следует иметь в виду, что именно позиция 10 соответствует сайту разрезания смысловой цепи siРНК-дуплекса и целевой молекулы РНК, и термодинамическое состояние пары нуклеотидов в этой позиции может играть существенную роль в эффективности разрезания указанных цепей РНК активированным комплексом RISC [46].

В позиции N_{11} антисмысловой цепи siРНК должен быть С, но не А, G или U [19]. Исключения из этого правила представлены некоторыми вариантами активных siРНК, у которых в позиции 11 антисмысловой цепи находится U [59].

В позиции N_{17} антисмысловой цепи siРНК должен быть А или U, но не G [19, 41, 51]. Из указанных предпочтений наиболее значимо отсутствие нуклеотида G по позиции 17, чем наличие по этой позиции нуклеотидов А или U [19].

В позиции N_{19} антисмысловой цепи siРНК должен быть G или С, но не А или U [19, 21, 41, 53, 55–57, 59]. Предпочтения этой позиции обусловлены необходимостью поддержания термодинамической асимметричности РНК-дуплекса siРНК.

Как обнаружено путем статистического анализа, другие позиции (N_9 , N_{12} – N_{15} и N_{18}) предпочтительно занимает нуклеотид А, однако это не всегда соблюдается [19, 41, 51, 53, 54, 56, 59]. Данные же по предпочтительным нуклеотидам в позициях N_{20} и N_{21} siРНК противоречивы. Так, D. Huesken и соавт. обнаружили, что у функционально активных siРНК в позиции 21 находится G, но не С [55], а X. Wang с соавт. [60] выявили обратную зависимость. В то же время другими исследователями группами установлено [61, 62], что выступающие 3'-концевые нуклеотиды N_{20} и N_{21} антисмысловой цепи siРНК практически не влияют на эффективность и специфичность РНКи и могут быть любыми. Как показано M. Amarzguioui и соавт., однонуклеотидные замены типа трансверсий G→С не оказывают существенного влияния на эффективность РНКи и на более протяженном участке siРНК – с нуклеотида N_9 по нуклеотид N_{21} , в особенности по нуклеотидам N_{10} , N_{17} и N_{18} [63].

Содержание нуклеотидов G и C в siРНК должно быть 25–60% [19, 21, 40, 50–53, 64–67]. При слишком низком содержании нуклеотидов G и C

siРНК-дуплекс не стабилен и, кроме того, антисмысловая цепь siРНК связывается с целевой молекулой РНК с низкой аффинностью. Высокое же содержание этих нуклеотидов препятствует вхождению в комплекс RISC и/или выходу из него целевой молекулы РНК. Оптимальным, в том числе и для предотвращения образования стабильных внутрицепочечных вторичных структур, оказывается близкое к 50%-ному содержание нуклеотидов G и C [40, 51, 68]. Следует также отметить, что активные варианты siРНК имеют крайне неравномерное распределение G и C нуклеотидов: в регионе N₂–N₇ антисмысловой цепи siРНК этих нуклеотидов около 20%, а в регионе N₈–N₁₉ их более 50% [21]; выведен и оптимальный нуклеотидный состав антисмысловой цепи siРНК по нуклеотидам A, U, G и C (0.4, 0.35, 0.15 и 0.1 соответственно) [48].

Среди первых семи 5'-концевых нуклеотидов антисмысловой цепи siРНК A и U должно быть не менее трех [19, 21, 51, 57]. Это необходимо для поддержания термодинамической асимметричности siРНК-дуплекса.

Максимальная протяженность последовательности идентичных нуклеотидов не должна превышать трех [19, 52, 64, 66, 69]. Исключением могут быть нуклеотиды A и U, для которых допустимы более протяженные повторы [50].

Правила, основанные на особенностях структурно-термодинамической организации молекулы целевой РНК

Регион молекулы целевой РНК, взаимодействующий с антисмысловой цепью siРНК, должен быть доступен [20, 22, 70–81]. Дело в том, что, если участок-мишень siРНК будет частью термодинамически стабильной вторичной структуры (например, входит в состав разветвленной внутренней петли) молекулы целевой РНК, то доступ siРНК к нему будет затруднен, а это негативно скажется на эффективности РНКi. Доступность сайта-мишени может быть определена путем расчета одного (или нескольких) из следующих параметров: индекса H-b, количества “отталкивающих” петель, локальной свободной энергии сайта-мишени, локального потенциала к сворачиванию и энергии связывания антисмысловой цепи siРНК.

Индекс H-b указывает на среднее количество водородных связей, образуемых нуклеотидами сайта-мишени с остальными нуклеотидами молекулы целевой РНК [76]. Пороговым значением этого индекса считается величина 28.8 – активными будут те siРНК, сайт-мишень которых имеет индекс H-b меньше этой величины [19].

Под “отталкивающими” (repelling) петлями подразумеваются термодинамически стабильные глобальные вторичные структуры молекулы целевой РНК, в состав которых входит сайт-мишень

[22]. Наличие таких структур у молекулы целевой РНК рассчитывается для ее полноразмерной последовательности [22] или для ее 800-нуклеотидного фрагмента, включающего сайт-мишень [43], с помощью стандартных пакетов типа Mfold [22, 82]. Если сайт-мишень входит в состав, по меньшей мере, трех из пяти наиболее стабильных структур целевой РНК, то siРНК, к нему направленные, будут малоактивны или не активны вообще [19, 22, 70].

К локальным структурам молекулы целевой РНК относятся короткие спиральные участки, петли-выступы, симметричные и несимметричные внутренние петли, множественные петли, а также локальные шпильки. Совокупная свободная энергия таких структур, включающих хотя бы один нуклеотид сайта-мишени, определяется как его локальная свободная энергия [79]. Активными могут быть те siРНК, сайты-мишени которых имеют локальную свободную энергию не ниже –20.9 ккал/моль [19, 79].

Способность сайта-мишени сворачиваться в локальную термодинамически стабильную вторичную структуру определяется как его локальный потенциал к сворачиванию [19]. W. Gong и соавт. [19] рассчитали пороговое значение такого потенциала как –22.72 ккал/моль – чем выше по сравнению с пороговым значением этого параметра для сайта-мишени, тем выше активность соответствующей siРНК. Несколько позже это значение увеличили до –18 ккал/моль [70], а в 2010 г. О. Матвеева и др. [49] провели специальное исследование и внесли в это правило последнее уточнение, согласно которому максимальной эффективностью обладают те siРНК, термодинамическая стабильность вторичной структуры сайтов-мишеней которых лежит в диапазоне между –10 ккал/моль и 0 ккал/моль.

Энергия связывания антисмысловой цепи siРНК может быть рассчитана с помощью приложения Sima из пакета Sfold [83]. Наиболее активны те siРНК, антисмысловые цепи которых имеют энергию связывания, не превышающую –10 ккал/моль [19, 83]. Энергию связывания можно рассчитывать не для всей антисмысловой цепи siРНК, а только для первых 8 н. с 5'-конца, при этом пороговое значение составляет –5 ккал/моль, выше которого эффективность РНКi резко снижается, а ниже достигает максимума. Роль 3'-региона, по-видимому, менее значима – ее влияние на РНКi ощутимо только в том случае, когда взаимодействие 5'-области siРНК с молекулой целевой РНК характеризуется низкой энергией [38]. Более того, в контексте взаимодействия с целевой молекулой РНК 5'- и 3'-концевые части антисмысловой цепи siРНК различаются и функционально: 5'-конец отвечает за первоначальное распознавание целевой молекулы и эффективность ее расщепления, а 3'-конец определяет стабильность ассоциации между целевой РНК и антисмысловой

цепью siРНК и многократность оборота последней [70].

Регион молекулы целевой РНК, взаимодействующий с антисмысловой цепью siРНК, должен принадлежать первым трем четвертям CDS [10, 19, 52, 64, 65]. Данное требование связано с тем, что 5'- и 3'-UTR (untranslated regions, нетранслируемые области мРНК), а также CDS-области, перекрывающие стартовый кодон и стоп-кодон молекулы целевой мРНК, обычно связаны с различными регуляторными белками, что может препятствовать посадке siРНК.

РНК-дуплекс, образующийся при взаимодействии антисмысловой цепи siРНК с сайтом-мишенью, формирует спираль стандартной А-формы [34, 36]. Полной комплементарности по всем парам нуклеотидов дуплекса не требуется для события РНКи. Наибольшая толерантность отмечается для единичных некомплементарных пар (в частности, А:С) в позициях 1, 2, 18 и 19, наименьшая (в особенности, А:G) – по позициям 5–11, наличие “неклассических пар” в остальных позициях имеет промежуточный эффект на РНКи [84, 85]. Кроме того, не снижают эффективность РНКи и некоторые двунауклеотидные “некомплементарности”, однако возможностей для варьирования здесь меньше [86, 87].

Правила, основанные на особенностях постановки эксперимента

Приоритет в выборе типа экспериментальных клеток должен быть отдан наиболее восприимчивым к генетической модификации клеткам, в которых РНКи протекает максимально эффективно [19, 21, 69, 88–91]. Установлено, что один и тот же вариант siРНК, направленный к одной и той же РНК, может проявлять разную активность в разных типах клеток. Так, РНКи проходит с разной эффективностью в клетках млекопитающих и в клетках плодовой мушки, в первичных культурах клеток и в клетках раковых линий, а так же в разных типах клеток одного и того же организма [21, 89]. Это обусловлено комплексом причин, ключевой из которых считается восприимчивость клеток к генетической модификации [88–91], а так же состояние в этих клетках системы РНКи [69]. При отсутствии каких-либо иных ограничений, накладываемых на выбор типа клеток, приоритет необходимо отдать клеткам линии HeLa, которые наиболее полно соответствуют предъявляемым требованиям [19, 89].

Приоритет в выборе метода модификации целевых клеток должен быть отдан методу трансфекции синтетических siРНК [19, 89, 90]. Показано, что именно метод трансфекции синтетических siРНК позволяет добиться максимального уровня нокдауна целевого гена [89, 90]. Однако при этом следует учитывать, что синтетические siРНК неста-

бильны при хранении, разрушаются во время манипуляций при постановке эксперимента и, что наиболее существенно, быстро деградируют внутри клетки [92]. Проблема нестабильности siРНК решается благодаря химической модификации нуклеотидов, хотя это решение можно рассматривать как решающее проблему лишь частично [33, 93–95]. Так, долгосрочного нокдауна целевого гена таким способом достичь все равно нельзя, для этого необходимо использовать векторные конструкции, кодирующие shРНК или amiРНК [96].

При оценке эффективности РНКи приоритетным объектом анализа должен быть белок, а методом оценки – Вестерн-блоттинг [19, 97]. Более подробно эти особенности постановки эксперимента обсуждены в разделе “Контроль эффективности экспериментальной РНКи”.

Помимо перечисленных выше факторов на эффективность РНКи может влиять и ряд других особенностей проведения эксперимента. Например, при использовании вместо синтетических siРНК shРНК или amiРНК более активными индукторами РНКи оказываются shРНК [98]. Однако при использовании shРНК как источника интерферирующих РНК следует учитывать, что, во-первых, Dicer эффективно процессирует только те шпильки, длина ствола которых составляет 21 п.н. и более [49, 99], и, во-вторых, уровень активности (экспрессии) этого ключевого фермента системы РНКи может существенно различаться в разных типах клеток [100–104]. Те же шпильки, которые имеют короткий ствол, по-видимому, процессируются РНКазами, распознающими одноцепочечную РНК. В этом случае эффективность их процессинга будет зависеть от длины терминальной петли и нуклеотидного состава этой петли [49].

В завершение следует отметить, что даже самые значимые из перечисленных выше особенностей структурно-термодинамической организации молекулы целевой РНК и siРНК, а также специфики постановки эксперимента сами по себе определяют не более 2.2–2.6% функциональной активности siРНК, при этом указывая лишь на те или иные предпочтения, наблюдаемые для высокоэффективных siРНК [19]. Это означает, что наличие, например, предпочтительного нуклеотида в n-ой позиции или оптимального нуклеотидного состава лишь увеличивают вероятность того, что полученная siРНК будет обладать высокой активностью; но эти критерии нельзя считать абсолютными и их выполнение не дает 100%-ной гарантии получения ожидаемого конечного результата. Более того, следование даже только самым значимым, но не всем, правилам уже существенно уменьшает возможное разнообразие специфичностей активных siРНК. Поэтому в математических моделях, позволяющих при компьютерном проектировании ранжировать siРНК по их активности, учитывается не

Таблица 1. Репрезентативные базы данных, содержащие нуклеотидные последовательности экспериментально верифицированных или заранее спроектированных siРНК

База данных	URL	Ссылка
GeneAssist™ siRNA Workflow Builder	http://www5.appliedbiosystems.com/tools/sirna	Life Technologies Corp., США
HuSiDa	http://www.human-sirna-database.net	[106]
RFRCDDB-siRNA	http://www.bioinf.seu.edu.cn/siRNA/index.htm	[107]
RiDDLE	http://cluster-12.mpi-cbg.de/cgi-bin/riddle/search	[108]
RNAi Codex	http://cancan.cshl.edu/cgi-bin/Codex/Codex.cgi	Hannon Laboratory at CSHL
siMAX™ siRNA	http://www.eurofindsna.com/products-services/sirna/pre-designed-andvalidated-sirna.html	Eurofins MWG Operon, Германия
sIR	http://biotools.swmed.edu/siRNA	[109]
siRecords	http://sirecords.biolead.org	[110]
siRNAdb	http://sirna.sbc.su.se	[111]
siRNA seats	http://web.cos.gmu.edu/~gmanyam/siRNA_db/search.php	[112]
The MIT/ICBP siRNA Database	http://web.mit.edu/sirna	MIT, США

только их нуклеотидный состав, но и описанные структурные и термодинамические особенности siРНК, а также особенности структурно-термодинамической организации молекул целевых РНК. Так, по мнению S. Walton и соавт. [105], при подборе активных siРНК наибольшее значение следует придавать информации по нуклеотидным “предпочтениям” и термодинамической стабильности 5'-концов siРНК-дуплекса, а согласно результатам компьютерного моделирования с использованием алгоритма DRM (от англ. Disjunctive Rule Merging), проведенного W. Gong и соавт. [19] для подбора siРНК с уровнем РНКi активности около 90% и более требуется учет одиночного и комбинированного (как правило, неаддитивного) вклада не менее 14 параметров.

Биоинформационные ресурсы

Для целого ряда генов последовательности siРНК, обладающие оптимальным соотношением эффективность/специфичность, могут быть найдены в оригинальных публикациях или в специализированных базах данных (табл. 1). Самая обширная база данных — siRecords, которая на 2009 год содержала информацию о 17192 экспериментах по РНКi из 6122 оригинальных статей и охватывала 5086 уникальных генов [110]. Одним из ключевых преимуществ такого пути подбора можно считать то, что представленные в базе siРНК, как правило, уже прошли экспериментальную проверку. Однако в тех случаях, когда интересующий исследователя ген еще не изучен, т.е. новый, или когда речь идет о новом РНК-транскрипте гена, возникает необходимость в самостоятельной разработке siРНК. Кроме того, siРНК, использованные в экспериментальных

целях на заре эры РНКi (начало 2000-х), были разработаны в соответствии с правилами, основанными на упрощенном представлении того времени о РНКi. Наконец, необходимо учитывать тот факт, что синтетические siРНК и созданные на их основе shРНК или amiРНК не всегда обладают той же эффективностью и специфичностью, и, следовательно, нуждаются в дополнительной проверке [113].

В том случае, когда необходимый вариант siРНК не удается подобрать из литературы или баз данных, его можно спроектировать в полуавтоматическом режиме с помощью какой-либо из компьютерных программ, специально разработанных для этих целей. На сегодняшний момент различными научно-исследовательскими группами, а также биотехнологическими компаниями создано и доступно для работы “on-line” или распространяется в виде открытого кода более 30 таких программных продуктов (табл. 2).

Часть из предлагаемых компьютерных программ учитывает лишь ограниченный набор правил проектирования высокоэффективных и высокоспецифичных siРНК, сформулированных еще в начале XXI века. Примером такого программного продукта можно считать сервис EMBOSS sirna [120]. Получаемые при этом siРНК-кандидаты, как правило, статистически значимо не отличаются от произвольно подобранного к данной целевой молекуле РНК варианта siРНК и, как следствие, нуждаются в дополнительной биоинформатической и экспериментальной проверке. Отдельные структурно-термодинамические параметры таких кандидатов могут быть проверены “on-line” или “off-line” с помощью узкоспециализированных компьютерных программ, позволяющих анализировать только какую-то одну категорию осо-

Таблица 2. Репрезентативные компьютерные программы, предназначенные для подбора и анализа siРНК *in silico*

Программа	URL	Ссылка
AsiDesigner	http://sysbio.kribb.re.kr:8080/AsiDesigner/menuDesigner.jsf	[50]
desiRm	http://www.imtech.res.in/raghava/desirm	[114]
DSIR	http://biodev.extra.cea.fr/DSIR/DSIR.html	[115]
E-RNAi	http://www.e-rnai.org	[116]
RFRCDDB-siRNA	http://www.bioinf.seu.edu.cn/siRNA/index.htm	[107]
RNAxs	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAxs	[81]
siDE	http://side.bioinfo.cnio.es	[117]
siDRM	http://sidrm.biolead.org	[118]
sIR	http://biotools.swmed.edu/siRNA	[109]
siRNA Scales	http://gesteland.genetics.utah.edu/siRNA_scales	[41]
siRNA Wizard™ v3.1	http://www.sirnazizard.com/design_advanced.php	InvivoGen, США
siSVM	http://sirna.sbc.su.se	[111]
WI siRNA Selection Program	http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/home.php	[69]
Oligoengine 2.0	http://www.oligoengine.com/products/oe2.html	Halo-Bio RNAi Therapeutics Inc., США
siRNA Design Tool	http://bioinfo.wistar.upenn.edu/siRNA/siRNA.htm	[119]
siRNARules 1.0	http://sourceforge.net/projects/sirnarules	Geeknet Inc., США

бенностей организации siРНК. Так, с помощью программы si-shRNA могут быть рассчитаны термодинамические параметры [49], сервис siMAX™ Design компании Eurofins MWG Operon (Германия) позволяет учесть особенности вторичной структуры сайта-мишени из молекулы целевой РНК, а алгоритм AsiDesigner, написанный группой Young Joo Kim из южно-корейского Медицинского центра геномных исследований, обеспечивает отбор эффективных и специфичных siРНК, позволяющих дискриминировать альтернативные формы сплайсинга РНК-транскриптов данного гена [50].

Однако в большинстве современных компьютерных программ подбора siРНК учитывается весь комплекс известных на сегодняшний момент особенностей организации siРНК, влияющих на их активность и специфичность, что исключает необходимость проведения перекрестной проверки подобранных кандидатных siРНК с помощью более специализированных биоинформатических инструментов. В основе таких программ лежат эвристические алгоритмы, весовые линейные и нелинейные статистические модели и методы машинного обучения (метод опорных векторов, генетический алгоритм и искусственные нейронные сети) [55, 60, 109, 115, 121–126]. Как правило, эти программы интегрированы с базами данных по экспериментально верифицированным или заранее спроектированным (“pre-designed”) siРНК и предлагают пользователю широкие возможности по выбору сайта-мишени в молекуле целевой РНК, подбору их длины и нук-

леотидного состава, анализу специфичности кандидатных siРНК и т.д. К наиболее популярным компьютерным программам такого класса – с оптимальным соотношением чувствительность/специфичность – относятся алгоритм DSIR, разработанный группой Jean-Philippe Vert из Парижского центра компьютерной биологии [115], программа BIOPREDSi компании “Novartis” [55], продукт SiDE группы Joaquin Dopazo из Испанского центра онкологических исследований [117], программный пакет BLOCK-iT™ RNAi Designer компании “Life Technologies Corp.” (США), информационный ресурс sIR, разработанный группой Harold R. Garner из Юго-Западного медицинского центра при Техасском университете [109] и программа siDRM, созданная группой Tongbin Li из Университета штата Миннесота [118]. Тем не менее, следует отметить, что даже эти программы не дают 100%-ной гарантии точности подбора siРНК с заданными свойствами. Поэтому на практике, как правило, отбирают несколько самых высокорейтинговых кандидатных siРНК и проводят экспериментальную проверку их активности и специфичности.

КОНТРОЛЬ АКТИВНОСТИ siРНК В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ РНКi

Единой общепринятой шкалы оценки активности siРНК до сих пор не разработано. Разнообразие же используемых в настоящее время шкал может быть сведено к трем категориям: 1) двухуровневая шкала, в соответствии с которой все

siРНК, вызывающие менее 50% нокдауна целевого гена, считаются неактивными, а более 50% – активными [51]; 2) трехуровневая шкала, согласно которой все siРНК, вызывающие нокдауна целевого гена менее чем на 20%, относят к неактивным, при уровне нокдауна между 20 и 70% – к siРНК со средней активностью, а более 70% – к siРНК с высокой активностью [21]; 3) четырехуровневая шкала, в соответствии с которой все siРНК, вызывающие менее 50% нокдауна целевого гена, обладают низкой активностью, между 50 и 70% – средней активностью, между 70 и 90% – высокой активностью и более 90% – очень высокой активностью [19, 110]. В данной статье мы будем придерживаться четырехуровневой шкалы оценки активности siРНК. При этом следует отметить, что ранжирование, принятое в этой шкале, равно как и ранжирования в других шкалах, не имеют строгого математического обоснования и во многом выбрано эмпирически, исходя из функциональных последствий той или иной степени нокдауна целевого гена.

Дальнейшая оценка разработанного варианта siРНК в соответствии с выбранной шкалой активности может быть проведена в три этапа: биоинформатический, предварительный и прямой экспериментальный. К сожалению, биоинформатических подходов, которые позволяли бы *in silico*, до проведения экспериментальной работы, надежно предсказать активность спроектированного варианта siРНК, к настоящему времени не разработано. Впервые попытку решить эту задачу предприняла группа Р. Pancoska в 2004 году [78], однако ни их алгоритм, ни алгоритмы, разработанные позже другими исследователями, в том числе такие алгоритмы, которые лежат в основе современных компьютерных программ проектирования siРНК, не обладают 100%-ной точностью. Более того, критический анализ существующих правил разработки siРНК позволяет прийти к выводу, что с их помощью можно конструировать siРНК с активностью более 50% лишь в 75–80% случаев [110]. Поэтому окончательная оценка активности разработанного варианта siРНК все равно проводится экспериментальным путем.

На предварительном этапе экспериментальной проверки активности siРНК целесообразно использовать систему сдвоенных репортерных генов, один из которых кодирует только какой-нибудь легко детектируемый репортерный белок, а второй кодирует не только дополнительный репортерный белок, но и несет сайт-мишень для посадки siРНК. В такой системе первый ген необходим для нормализации данных, а по уровню экспрессии второго можно судить об эффективности работы выбранного варианта siРНК [55, 67, 127]. Примером системы такого плана служит система siСНЕСК фирмы “Promega”, основанная на гене люциферазы. Эта система позволяет в течение 24 ч. провести ранжирование интерфери-

рующих РНК по их активности и выбрать из 3–5 первоначальных вариантов наиболее активный [72]. Однако, несмотря на явные плюсы такой, а также аналогичных систем предварительной оценки активности siРНК, большинство исследователей все же предпочитают прямые испытания разработанного варианта siРНК. Это обусловлено несколькими причинами: во-первых, предварительная проверка требует дополнительных материально-технических затрат, во-вторых, на ее проведение требуется время, в-третьих, результаты такой проверки не всегда совпадают с результатами, полученными при работе на целевом гене.

При проведении прямых испытаний активность siРНК может быть оценена по изменению уровня экспрессии целевого гена на уровне РНК и/или белка. Для количественной оценки экспрессии целевого гена на уровне РНК используют количественную ПЦР или технологию микрочипов (используемые ранее в экспериментах с РНКi качественные методы анализа целевой РНК, такие как Нозерн-блоттинг или анализ с защитой от РНКаз, в настоящее время практически не применяются). При количественной оценке экспрессии целевой РНК относительным методом в качестве факторов нормализации используют уровень экспрессии одного, а в последнее время сразу комбинации из нескольких генов “домашнего хозяйства” (таких, как GAPDH, β-актина или тубулина) либо, при работе с клетками человека, уровень экспрессии Alu-повторов. В качестве альтернативного подхода используют методы определения абсолютного количества копий целевой РНК на клетку, что определяется по калибровочным кривым количественной ПЦР.

Однако ориентация только на уровень целевой РНК как критерий при оценке активности siРНК содержит в себе скрытую ошибку: уровни мРНК и соответствующего белка не всегда взаимосвязаны. В частности, нокдаун белка может быть обусловлен как деградацией целевой мРНК, что происходит при классическом действии siРНК, полностью комплементарных РНК-мишени, так и за счет блокады трансляции мРНК, что наблюдается при miРНК-подобном действии siРНК, когда они не полностью комплементарны РНК-мишени. Поэтому, как это уже было отмечено ранее, приоритетным объектом анализа при оценке эффективности РНКi должен быть белок [19, 97]. Количественная оценка целевого белка может быть осуществлена с помощью Вестерн-блоттинга с последующей денситометрией полученных блотов, проточной цитометрии, количественной иммуноцитохимии или флуориметрии. При этом наиболее информативным для анализа эндогенных белков считается Вестерн-блоттинг [19].

КОНТРОЛЬ СПЕЦИФИЧНОСТИ ДЕЙСТВИЯ siРНК В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ РНКi

Контроль специфичности нокдауна целевого гена

Снижение экспрессии целевого гена в клетках, трансфицированных siРНК или с эктопической экспрессией shРНК или amiРНК, еще не является свидетельством того, что это обусловлено специфической РНКi. Что бы доказать специфичность наблюдаемого нокдауна целевого гена, необходимо использовать серию контролей.

Использование неактивных siРНК. Под неактивными подразумеваются такие siРНК, которые не имеют полноразмерной гомологии и/или гомологии по “запальной” области с какими-либо молекулами РНК в исследуемом типе клеток. Такие siРНК могут быть созданы с помощью трех разных подходов: 1) разработки скремблированных siРНК, 2) проектирования мутантных siРНК и 3) использования siРНК, направленных к РНК-продуктам генов других живых организмов.

Скремблированные siРНК имеют тот же нуклеотидный состав, что и активные siРНК, но другую последовательность нуклеотидов, причем нуклеотиды “перемешаны” так, что формируемая ими последовательность не комплементарна ни одному из РНК-транскриптов клетки. Скремблированный вариант siРНК может быть создан в автоматическом режиме с помощью специальных модулей, которыми оснащены некоторые компьютерные разработчики siРНК (например, модуль Scramble siRNA сервиса siRNA WizardTM v3.1 компании “InvivoGen”). Альтернативой скремблированным siРНК служит мутантная форма активной siРНК, которая может быть создана путем введения нуклеотидных замен или инверсий в «запальной» области или в центральном регионе исходного варианта малой РНК [72, 128–130]. Наконец, в качестве отрицательного контроля могут быть использованы siРНК, активные по отношению к генам других организмов. Примером таких siРНК могут быть siРНК, направленные к РНК-продукту *GL2* варианта гена, кодирующего люцеферазу светляка *Photinus pyralis* [65].

К сожалению, все указанные варианты контрольных siРНК не лишены недостатков. Так, изменение нуклеотидной последовательности siРНК, особенно в центральном регионе, не гарантирует полную отмену ее специфической активности, сохраняя miРНК-подобный эффект. Кроме того, любой контрольный вариант siРНК обладает собственным профилем неспецифической активности, что может сказаться на состоянии модифицированных клеток.

Комплементация эффекта siРНК. Это своеобразный отрицательный контроль от обратного — введение в клетку мутантной копии целевого гена, РНК-продукт которого будет полностью функционально активен, но не будет распозна-

ваться siРНК. Этого можно добиться, введя нуклеотидные замены в кодирующую часть гена (не нарушая при этом кодировку аминокислот благодаря вырожденности генетического кода), либо заменив нетранслируемые регионы мРНК — если интерферирующая РНК была направлена именно к этим участкам. Очевидно, что этот контроль также имеет свои недостатки. В частности, он не всегда возможен по техническим и методическим причинам, кроме того, эквивалентное восстановление уровня экспрессии целевого белка после трансфекции или трансдукции клеток не всегда возможно. Тем не менее, именно этот контроль считается золотым стандартом, подтверждающим специфический нокдаун целевого гена [73, 129].

Использование набора siРНК. В том случае, когда по техническим или методическим причинам поставить предыдущий контроль невозможно, предлагается использовать не один вариант, а два–три варианта siРНК, направленных против РНК-продукта одного и того же целевого гена, но имеющих разную специфичность. Если такие варианты вызывают нокдаун целевого белка и один и тот же фенотипический эффект, то это может служить косвенным подтверждением специфичности РНКi [73, 129].

Контроль неспецифических проявлений системы РНКi

Результаты более чем десятилетних исследований РНКi убедительно показывают, что, вопреки первоначальным надеждам, этот процесс не стоит считать абсолютно специфичным. Анализ имеющихся на сегодняшний момент данных позволяет заключить, что нарушение специфичности РНКi может быть обусловлено несколькими причинами, ключевые из которых: интерфероновый ответ, насыщение системы биогенеза малых РНК, неспецифическое действие (off-target effect) siРНК, а также их цитотоксичность и аптамерный эффект. Ниже каждая из этих причин будет рассмотрена подробно, с указаниями на возможности их биоинформатического и/или экспериментального контроля.

Интерфероновый ответ. Интерфероновый ответ — компонент системы врожденной противовирусной защиты организма, функциональная суть которого сводится к подавлению транскрипционной и/или трансляционной активности клетки в ответ на появление в ней двухцепочечных РНК. Появление таких РНК в клетке приводит к активации специфических белков (в частности, протеинкиназы R), а также запускает экспрессию ряда генов интерферонового ответа (в частности, гена 2'5'-олигоаденилатсинтетазы 1), белковые продукты которых и подавляют транскрипцию и/или трансляцию в клетке.

Протеинкиназа R преимущественно активируется в ответ на появление длинных (более 30 п.н.) [131] и, гораздо реже, коротких (менее 30 п.н.) [132] РНК-дуплексов. Поскольку в большинстве случаев для экспериментальной РНКi используются siРНК меньшего размера, то этот механизм запуска интерферонового ответа не представляется значимым в контроле специфичности РНКi.

Однако и короткие РНК-дуплексы так же могут запустить интерфероновый ответ, правда, по другому механизму. Впервые на способность siРНК протяженностью менее 30 п.н. индуцировать интерфероновый ответ обратил внимание A. Bridge с соавт. в 2003 году. Используя в своих исследованиях модель фибробластов легких человека, они обнаружили, что экспрессия одного из классических генов интерферонового ответа – гена 2'5'-олигоденилатсинтетазы 1 – может увеличиваться в 50 раз в ответ на конститутивную наработку в этих клетках некоторых вариантов shРНК (как предшественников siРНК). При этом интерфероновый ответ не зависит от типа вектора (челночный плазмидный или лентивирусный), используемого для переноса экспрессионной кассеты, ориентации последней, а также от специфичности shРНК и степени нокдауна целевого гена, но находился в прямой зависимости от дозы вектора, доставляемого в целевые клетки [133]. Это наблюдение позволяет предположить, что интерфероновый ответ может быть спровоцирован насыщением системы биогенеза малых РНК и накоплением в клетке непроцессированных или неправильно процессированных shРНК.

Кроме того, интерфероновый ответ может запускаться некоторыми вариантами siРНК через взаимодействие последних с эндосомальными Toll-подобными рецепторами (TLR3, TLR7 и TLR8). Первоначально такой механизм запуска интерферонового ответа обнаружили только у макрофагов, дендритных клеток и у клеток некоторых клеточных линий, причем только в том случае, когда использовались синтетические siРНК, содержащие последовательность 5'-UGU-GU-3' или 5'-GUCCUCAA-3' [134–136]. Однако более поздние исследования показали, что данный феномен распространен гораздо шире и не всегда зависит от указанных нуклеотидных последовательностей [137, 138].

Таким образом, при планировании и постановке экспериментов с использованием РНКi необходима строгая количественная оценка уровня экспрессии генов интерферонового ответа. В некоторых случаях, что бы снизить вероятность индукции интерферонового ответа, возможно использование РНК-дуплексов, цепи которых не полностью комплементарны (не имеют полностью комплементарных участков на протяжении не менее 11 п.н.), а содержат петли-выступы или внутренние петли, что мимикрирует ситуацию с предшественниками miРНК [72, 139]. Однако не

следует забывать, что такие дуплексы могут обладать меньшей активностью [36]. Кроме того, при анализе интерферонового ответа необходимо иметь в виду, что ряд опухолевых клеточных линий имеет дефектную систему интерферонового ответа [140], а некоторые векторы, попадая в клетку, способны сами по себе, не кодируя shРНК, запускать интерфероновый ответ (в частности, из-за наличия криптических конвергентных промоторов) [141]. В последнем случае возможность запуска интерферонового ответа может быть проконтролирована с помощью “пустого” вектора – вектора, не содержащего экспрессионную кассету для shРНК или amiРНК.

Насыщение системы биогенеза малых РНК. Эктопическая экспрессия предшественников shРНК или amiРНК приводит к насыщению системы ядерного транспорта малых РНК клетки (в частности, к насыщению гетеродимерного комплекса Exportin-5-Ran-GTP как основного компонента такой транспортной системы), что нарушает их биогенез и сопровождается гибелью клетки [142]. Для разных типов клеток пороговый уровень экспрессии shРНК или предшественников amiРНК, за которым наблюдается насыщение системы биогенеза малых клеточных РНК, не одинаков. В связи с этим, для адекватного контроля такой ситуации необходимо оценивать уровень экспрессии наиболее значимой(ых) для данного типа клеток miРНК (например, has-mir-122 для клеток печени, где эта miРНК составляет примерно 70% от всех miРНК).

Неспецифическое действие siРНК. Неспецифическое действие siРНК может быть обусловлено тремя механизмами: 1) взаимодействием “запальной” области антисмысловой цепи siРНК с молекулами нецелевых РНК, 2) включением смысловой цепи siРНК в состав комплекса RISC и 3) удлинением siРНК на РНК-мишени как матрице, что генерирует новые варианты siРНК.

Взаимодействие “запальной” области антисмысловой цепи siРНК с молекулами нецелевых РНК. Несмотря на то, что в начале 2000-х получены данные, указывающие на высокую специфичность действия siРНК [143], уже к 2004 году появились первые свидетельства неспецифической активности siРНК [144, 145]. При этом неспецифическое действие siРНК может быть обусловлено двумя причинами: во-первых, довольно редкими случаями, когда между антисмысловой цепью siРНК и нецелевой РНК наблюдается полная комплементарность, и, во-вторых, широко распространенными случаями, когда между антисмысловой цепью siРНК и нецелевой РНК имеется частичная комплементарность [50, 120, 146–149].

Размер непрерывающегося участка антисмысловой цепи siРНК, имеющего комплементарность к молекуле нецелевой РНК, может варьировать от 4 до 14 н. со средним значением 8 н. При

этом предпочтение получают нуклеотиды 2–8 “запальной” области siРНК [147]. Чаще всего в качестве сайтов взаимодействия с такими siРНК выступают нуклеотидные последовательности из 3'-UTR, далее идут CDS и 5'-UTR РНК-транскриптов [147]. В целом, siРНК действуют как miРНК, которые регулируют экспрессию сотен генов путем взаимодействия через свою “запальную” область с 3'-UTR их РНК-транскриптов. Подобие настолько высоко, что отмечается даже соответствие между насыщенностью 3'-UTR РНК-транскрипта последовательностями, комплементарными “запальной” области siРНК, и уровнем нецелевого эффекта, как и в случае с miРНК [146, 147, 150]. При этом нецелевой эффект проявляется одинаково хорошо как на уровне РНК, так и на уровне белка, и зависит от последовательности siРНК, но не от гена-мишени [147].

По-видимому, на нынешнем этапе развития технологии РНКi проблема неспецифического действия siРНК окончательно решена быть не может. Так, для эффективной блокады трансляции между мРНК и siРНК достаточно области гомологии в шесть нуклеотидов [50, 144, 146]. Размер же гаплоидного ядерного генома человека равен 3 167 000 895 п.н. (сборка-стандарт GRCh37 генома человека, The Genome Reference Consortium <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/index.shtml>), из которых более 60% транскрибируется [13], причем часть образующихся транскриптов не тождественна геномной последовательности (из-за *цис*- и *транс*-сплайсинга, посттранскрипционного “тасования” экзонов, а также РНК-редактирования). В такой ситуации любая случайно сгенерированная siРНК будет находить себе мишень (даже самые редко встречаемые шестинуклеотидные последовательности могут быть найдены не менее чем у 142 3'-UTR, а семинуклеотидные – не менее чем у 17 3'-UTR [146, 151]). Тем не менее, к настоящему моменту предложено несколько подходов для снижения неспецифической активности siРНК.

Одним из таких подходов может быть замена некоторых нуклеотидов в “запальной” области антисмысловой цепи siРНК, не влияющая на ее целевое действие [144, 148, 152, 153]. В частности, наиболее толерантными оказываются замены, приводящие к образованию между “запальной” областью и сайтом-мишенью пар нуклеотидов G:U и A:C [84, 149]. Однако эти замены, действительно приводящие к снижению неспецифического действия siРНК по отношению к изначальному списку нецелевых молекул РНК, создают новый список таких молекул, не решая общей проблемы [147].

Второй путь решения проблемы специфичности – проектирование siРНК с таким расчетом, что бы их антисмысловая цепь, взаимодействуя с нецелевыми РНК, формировала РНК-дуплекс, содержащий внутреннюю петлю из-за некомплементарности по позиции 2. Модельные исследо-

вания показывают, что такой подход на самом деле позволяет существенно снизить неспецифическое действие siРНК [154], однако он же снижает и спектр специфичности самих siРНК.

Аналогичен этому пути третий подход – подбор таких вариантов siРНК, “запальные” области которых комплементарны последовательности 3'-UTR минимального количества генов [146], либо образуют с ними термодинамически нестабильные дуплексы [151].

Наконец, четвертый вариант – подбор оптимальной концентрации siРНК. В ряде исследований показано, что целевая активность siРНК мало зависит от их концентрации и проявляется в широком диапазоне ее значений. В то же время, нецелевая активность siРНК, как правило, зависит от их концентрации и наиболее выражена при высоких значениях. В частности, на моделях химически синтезированных siРНК показано, что при их внеклеточной концентрации на момент трансфекции более 100 нМ неспецифический эффект наиболее вероятен, при концентрации от 20 до 100 нМ отмечается лишь изредка, а при концентрации менее 20 нМ маловероятен (но все же возможен) [60, 130, 132, 149]. Вероятно, это обусловлено различиями в термодинамической стабильности (температуре плавления и константе диссоциации) РНК-дуплекса, образуемого siРНК с целевой РНК и нецелевой; при этом пороговое значение температуры плавления РНК-дуплекса составляет +21.5°C [149]. Аналогичная взаимосвязь существует и между концентрацией siРНК и вероятностью индукции интерферонового ответа [72, 130, 155]. Следует также отметить, что для одного и того же типа siРНК и одной и той же концентрации их неспецифическое действие зависит еще и от типа клеток-мишеней [25].

Учитывая исключительную важность сведений о спектре неспецифической активности siРНК для интерпретации экспериментальных данных, контролю этого параметра РНКi необходимо уделять особое внимание. На этапе планирования исследования строго рекомендуется проведение биоинформатической проверки *in silico* разработанного варианта siРНК на его специфичность. Большинство современных компьютерных разработчиков интерферирующих РНК уже содержат модули для такой проверки. В тех же случаях, когда такой модуль отсутствует или есть необходимость провести проверку уже существующего варианта siРНК, можно воспользоваться такими общими программами поиска гомологии как BLAST, доступной «on-line» на официальном Web-сайте американского Национального центра биотехнологической информации (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), и SSEARCH, также выложенной для свободного пользования на сервере Европейского института биоинформатики (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta>), либо же специ-

ализированными программами типа Overlapping seeds [156], siRNA Seed Locator [128] или SpecificityServer [157]. Однако окончательный вердикт специфичности siРНК может дать только экспериментальная проверка, где для оценки специфичности используются такие технологии как количественная ПЦР и микрочипы.

Включение смысловой цепи siРНК в состав комплекса RISC. В тех случаях, когда siРНК-дуплекс не обладает необходимой асимметричностью, в составе комплекса RISC* может сохраняться не только антисмысловая цепь, но и смысловая [158], которая окажет неспецифическое действие. Впервые на такую возможность указала группа под руководством Р. Clark из Медицинской школы Йельского университета: они обнаружили, что смысловая цепь анти-ICAM-1 siРНК приводит к сайленсингу гена *TNFR1* – с мРНК которого она образует 17 комплементарных пар [159].

Удлинение siРНК на РНК-мишени как матрице. Удлинение siРНК на РНК-мишени как матрице приводит к появлению в клетке новых вариантов интерферирующих РНК, запускающих так называемую транзитивную РНКi. Этот феномен характерен для растений и нематод, но не для млекопитающих, у которых не обнаружен гомолог РНК-зависимой РНК-полимеразы [160–163].

Цитотоксическое действие siРНК. Те siРНК, которые имеют последовательность 5'-UGGC-3', оказывают токсический эффект на клетки [164]. Явление обнаружено только одной группой исследователей, не имеет объяснения, не известна его распространенность, работа независимыми исследователями не проверялась.

Аптамерный эффект siРНК. Постулируется, что siРНК могут оказывать неспецифическое действие – наподобие РНК-аптамеров или антисмысловых РНК, – связываясь с эндогенными белками и нарушая их работу [130, 132, 165–170].

Таким образом, при разработке высокоэффективных и высокоспецифичных siРНК необходимо использовать системный подход, который должен включать как всесторонний биоинформатический анализ, так и экспериментальную проверку кандидатов на siРНК. При этом и в биоинформатическом анализе, и в экспериментальной проверке должны быть учтены все параметры, влияющие на эффективность и специфичность siРНК: особенности структурно-термодинамической организации siРНК, их нуклеотидного состава, а также структурно-термодинамической организации молекулы целевой РНК и постановки эксперимента. Только такой подход позволяет получить высокоэффективные и высокоспецифичные siРНК, дающие надежно интерпретируемые экспериментальные результаты.

Эта работа получила финансовую поддержку со стороны Министерства образования Республики Беларусь в рамках Государственных про-

грамм научных исследований “Фундаментальные основы биотехнологий” (проект № 576/54) и “Фундаментальная и прикладная медицина и фармация” (проект № 590/54).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tomari Y., Zamore P.D. 2005. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.* **19**, 517–529.
2. Fujita P.A., Rhead B., Zweig A.S., Hinrichs A.S., Karolchik D., Cline M.S., Goldman M., Barber G.P., Clawson H., Coelho A., Diekhans M., Dreszer T.R., Gardine B.M., Harte R.A., Hillman-Jackson J., Hsu F., Kirkup V., Kuhn R.M., Learned K., Li C.H., Meyer L.R., Pohl A., Raney B.J., Rosenbloom K.R., Smith K.E., Haussler D., Kent W.J. 2011. The UCSC Genome Browser database: update 2011. *Nucl. Acids Res.* **39**, D876–882.
3. Flicek P., Amode M.R., Barrell D., Beal K., Brent S., Chen Y., Clapham P., Coates G., Fairley S., Fitzgerald S., Gordon L., Hendrix M., Hourlier T., Johnson N., Kähler A., Keefe D., Keenan S., Kinsella R., Kokocinski F., Kulesha E., Larsson P., Longden I., McLaren W., Overduin B., Pritchard B., Riat H.S., Rios D., Ritchie G.R., Ruffier M., Schuster M., Sobral D., Spudich G., Tang Y.A., Trevanion S., Vandrovicova J., Vilella A.J., White S., Wilder S.P., Zadissa A., Zamora J., Aken B.L., Birney E., Cunningham F., Dunham I., Durbin R., Fernández-Suarez X.M., Herrero J., Hubbard T.J., Parker A., Proctor G., Vogel J., Searle S.M. 2011. Ensembl 2011. *Nucl. Acids Res.* **39**, D800–806.
4. Pruitt K.D., Tatusova T., Klimke W., Maglott D.R. 2009. NCBI Reference Sequences: current status, policy and new initiatives. *Nucl. Acids Res.* **37**, D32–36.
5. Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W. 2011. GenBank. *Nucl. Acids Res.* **39**, D32–37.
6. Paananen J., Cizek R., Wong G. 2010. Varietas: a functional variation database portal. *Database (Oxford)*. doi:10.1093/database/baq016.
7. Bhagwat M. 2010. Searching NCBI's dbSNP database. *Curr. Protoc. Bioinformatics*. Chapter 1:Unit 1.19.
8. Sayers E.W., Barrett T., Benson D.A., Bolton E., Bryant S.H., Canese K., Chetvernin V., Church D.M., DiCuccio M., Federhen S., Feolo M., Fingerman I.M., Geer L.Y., Helmberg W., Kapustin Y., Landsman D., Lipman D.J., Lu Z., Madden T.L., Madej T., Maglott D.R., Marchler-Bauer A., Miller V., Mizrachi I., Ostell J., Panchenko A., Phan L., Pruitt K.D., Schuler G.D., Sequeira E., Sherry S.T., Shumway M., Sirotkin K., Slotta D., Souvorov A., Starchenko G., Tatusova T.A., Wagner L., Wang Y., Wilbur W.J., Yaschenko E., Ye J. 2011. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucl. Acids Res.* **39**, D38–51.
9. Hamosh A., Scott A.F., Amberger J.S., Bocchini C.A., McKusick V.A. 2005. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. *Nucl. Acids Res.* **33**, D514–517.
10. Safran M., Dalah I., Alexander J., Rosen N., Iny Stein T., Shmoish M., Nativ N., Bahir I., Doniger T., Krug H., Sirota-Madi A., Olender T., Golan Y., Stelzer G., Harel A., Lancet D. 2010. GeneCards Version 3: the human gene integrator. *Database*. doi:10.1093/database/baq020.

11. Thierry-Mieg D., Thierry-Mieg J. 2006. AceView: a comprehensive cDNA-supported gene and transcripts annotation. *Genome Biol.* **7**, S12.1–14.
12. Dralyuk I., Brudno M., Gelfand M.S., Zorn M., Dubchak I. 2000. ASDB: database of alternatively spliced genes. *Nucl. Acids Res.* **28**, 296–297.
13. Kawaji H., Severin J., Lizio M., Forrest A.R., van Nimwegen E., Rehli M., Schroder K., Irvine K., Suzuki H., Carninci P., Hayashizaki Y., Daub C.O. 2011. Update of the FANTOM web resource: from mammalian transcriptional landscape to its dynamic regulation. *Nucl. Acids Res.* **39**, D856–D860.
14. ENCODE Project Consortium, Myers R.M., Stamatoyannopoulos J., Snyder M., Dunham I., Hardison R.C., Bernstein B.E., Gingeras T.R., Kent W.J., Birney E., Wold B., Crawford G.E. 2011. A user's guide to the encyclopedia of DNA elements (ENCODE). *PLoS Biol.* **9**, e1001046.
15. Scadden A.D.J., Smith C.W.J. 2001. RNAi is antagonized by A → I hyper-editing. *EMBO Rep.* **2**, 1107–1111.
16. Picardi E., Regina T.M.R., Brennicke A., Quagliarello C. 2007. REDIdb: the RNA editing database. *Nucl. Acids Res.* **35**, D173–D177.
17. Kiran A., Baranov P.V. 2010. DARNED: a DAtabase of RNA EDiting in humans. *Bioinformatics.* **26**, 1772–1776.
18. He T., Du P., Li Y. 2007. dbRES: a web-oriented database for annotated RNA editing sites. *Nucl. Acids Res.* **35**, D141–D144.
19. Gong W., Ren Y., Xu Q., Wang Y., Lin D., Zhou H., Li T. 2006. Integrated siRNA design based on surveying of features associated with high RNAi effectiveness. *BMC Bioinformatics.* **7**, doi:10.1186/1471-2105-7-516.
20. Heale B.S.E., Soifer H.S., Bowers C., Rossi J.J. 2005. siRNA target site secondary structure predictions using local stable substructures. *Nucl. Acids Res.* **33**, e30.
21. Ui-Tei K., Naito U., Takahashi F., Haraguchi T., Ohki-Hamazaki H., Juni A., Ueda R., Saigo K. 2004. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucl. Acids Res.* **32**, 936–948.
22. Yiu S.M., Wong P.W., Lam T.W., Mui Y.C., Kung H.F., Lin M., Cheung Y.T. 2005. Filtering of ineffective siRNAs and improved siRNA design tool. *Bioinformatics.* **21**, 144–151.
23. Chu C.Y., Rana T.M. 2008. Potent RNAi by short RNA triggers. *RNA.* **14**, 1714–1719.
24. Kim D.H., Behlke M.A., Rose S.D., Chang M-S., Choi S., Rossi J.J. 2005. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat. Biotechnol.* **23**, 222–226.
25. Reynolds A., Anderson E.M., Vermeulen A., Fedorov Y., Robinson K., Leake D., Karpilow J., Marshall W.S., Khvorova A. 2006. Induction of the interferon response by siRNA is cell type and duplex length-dependent. *RNA.* **12**, 988–993.
26. Vermeulen A., Behlen L., Reynolds A., Wolfson A., Marshall W.S., Karpilow J., Khvorova A. 2005. The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency. *RNA.* **11**, 674–682.
27. Bramsen J.B., Laursen M.B., Damgaard C.K., Lena S.W., Babu B.R., Wengel J., Kjems J. 2007. Improved silencing properties using small internally segmented interfering RNAs. *Nucl. Acids Res.* **35**, 5886–5897.
28. Lu X., Yang G., Zhang J., Fu H., Jin L., Wei M., Wang L., Lu Z. 2011. The sense strand pre-cleaved RNA duplex mediates an efficient RNA interference with less off-target and immune response effects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90**, 583–589.
29. Amarzguioui M., Rossi J.J., Kim D. 2005. Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi. *FEBS Lett.* **579**, 5974–5981.
30. Chang C.I., Kim H.A., Dua P., Kim S., Li C.J., Lee D.-K. 2011. Structural diversity repertoire of gene silencing small interfering RNAs. *Nucl. Acid Ther.* **21**, 125–131.
31. Marques J.T., Devosse T., Wang D., Zamanian-Daryoush M., Serbinowski P., Hartmann R., Fujita T., Behlke M.A., Williams B.R. 2006. A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **24**, 559–565.
32. Rose S.D., Kim D.-H., Amarzguioui M., Heidel J.D., Collingwood M.A., Davis M.E., Rossi J.J., Behlke M.A. 2005. Functional polarity is introduced by Dicer processing of short substrate RNAs. *Nucl. Acids Res.* **33**, 4140–4156.
33. Soutschek J., Akinc A., Bramlage B., Charisse K., Constien R., Donoghue M., Elbashir S., Geick A., Hadwiger P., Harborth J., John M., Kesavan V., Lavine G., Pandey R.K., Racie T., Rajeev K.G., Röhl I., Toudjarska I., Wang G., Wuschko S., Bumcrot D., Kotliarsky V., Limmer S., Manoharan M., Vornlocher H.P. 2004. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature.* **432**, 173–178.
34. Chiu Y.-L., Rana T.M. 2002. RNAi in human cells: Basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol. Cell.* **10**, 549–561.
35. Dykxhoorn D.M., Schlehuber L.D., London I.M., Lieberman J. 2006. Determinants of specific RNA interference-mediated silencing of human β -globin alleles differing by a single nucleotide polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 5953–5958.
36. Chiu Y.-L., Rana T.M. 2003. siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis. *RNA.* **9**, 1034–1048.
37. Kini H.K., Walton S.P. 2009. Effect of siRNA terminal mismatches on TRBP and Dicer binding and silencing efficacy. *FEBS J.* **276**, 6576–6585.
38. Doench J.G., Sharp P.A. 2004. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* **18**, 504–511.
39. Посредник Д.В., Романовская Т.В., Радишевская А.А., Хацкевич А.А., Гончаревич А.Ю., Черепович В.С., Гринев В.В. 2011. Структурно-термодинамическая организация межгенных и интронных первичных микроРНК человека. *Молекуляр. биология.* **45**, 554–564.
40. Chalk A.M., Wahlestedt C., Sonnhammer E.L. 2004. Improved and automated prediction of effective siRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 264–274.
41. Matveeva O., Nechipurenko Y., Rossi L., Moore B., Sætrom P., Ogurtsov A.Y., Atkins J.F., Shabalina S.A. 2007. Comparison of approaches for rational siRNA design leading to a new efficient and transparent method. *Nucl. Acids Res.* **35**, e63.
42. Khvorova A., Reynolds A., Jayasena S.D. 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell.* **115**, 209–216.

43. Lu Z.J., Mathews D.H. 2008. Efficient siRNA selection using hybridization thermodynamics. *Nucl. Acids Res.* **36**, 640–647.
44. Poliseno L., Evangelista M., Mercatanti A., Mariani L., Citti L., Rainaldi G. 2004. The energy profiling of short interfering RNAs is highly predictive of their activity. *Oligonucleotides*. **14**, 227–232.
45. Taxman D.J., Livingstone L.R., Zhang J., Conti B.J., Iocca H.A., Williams K.L., Lich J.D., Ting J.P., Reed W. 2006. Criteria for effective design, construction, and gene knockdown by shRNA vectors. *BMC Biotechnol.* **6**, doi: 10.1186/1472-6750-6-7.
46. Pei Y., Tuschl T. 2006. On the art of identifying effective and specific siRNAs. *Nat. Method.* **3**, 670–676.
47. Hutvagner G. 2005. Small RNA asymmetry in RNAi: function in RISC assembly and gene regulation. *FEBS Lett.* **579**, 5850–5857.
48. Katoh T., Suzuki T. 2007. Specific residues at every third position of siRNA shape its efficient RNAi activity. *Nucl. Acids Res.* **35**, e27.
49. Matveeva O., Kang Y., Spiridonov A.N., Sætrum P., Nemtsov V.A., Ogurtsov A.Y., Nechipurenko Y.D., Shabalina S.A. 2010. Optimization of duplex stability and terminal asymmetry for shRNA design. *PLoS ONE*. **5**, e10180.
50. Park Y.-K., Park S.-M., Choi Y.-C., Lee D., Won M., Kim Y.J. 2008. AsiDesigner: exon-based siRNA design server considering alternative splicing. *Nucl. Acids Res.* **36**, W97–W103.
51. Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W.S., Khvorova A. 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* **22**, 326–330.
52. Wang L., Mu F.Y. 2004. A Web-based design center for vector-based siRNA and siRNA cassette. *Bioinformatics*. **20**, 1818–1820.
53. Amarzguioui M., Prydz H. 2004. An algorithm for selection of functional siRNA sequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 1050–1058.
54. Hsieh A.C., Bo R., Manola J., Vazquez F., Bare O., Khvorova A., Scaringe S., Sellers W.R. 2004. A library of siRNA duplexes targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway: determinants of gene silencing for use in cell-based screens. *Nucl. Acids Res.* **32**, 893–901.
55. Huesken D., Lange J., Mickanin C., Weiler J., Asselbergs F., Warner J., Meloon B., Engel S., Rosenberg A., Cohen D., Labow M., Reinhardt M., Natt F., Hall J. 2005. Design of a genome-wide siRNA library using an artificial neural network. *Nat. Biotechnol.* **23**, 995–1001.
56. Ichihara M., Murakumo Y., Masuda A., Matsuura T., Asai N., Jijiwa M., Ishida M., Shinmi J., Yatsuya H., Qiao S., Takahashi M., Ohno K. 2007. Thermodynamic instability of siRNA duplex is a prerequisite for dependable prediction of siRNA activities. *Nucl. Acids Res.* **35**, e123.
57. Jagla B., Aulner N., Kelly P.D., Kim E., Song D., Volchuk A., Zatorski A., Shum D., Mayer T., de Angelis D.A., Ouerfelli O., Rutishauser U., Rothman J.E. 2005. Sequence characteristics of functional siRNAs. *RNA*. **11**, 864–872.
58. Shabalina S.A., Spiridonov A.N., Ogurtsov A.Y. 2006. Computational models with thermodynamic and composition features improve siRNA design. *BMC Bioinformatics*. **7**, doi:10.1186/1471-2105-7-65.
59. Takasaki S., Kotani S., Konagaya A. 2004. An effective method for selecting siRNA target sequences in mammalian cells. *Cell Cycle*. **3**, 790–795.
60. Wang X., Varma R.K., Beauchamp L., Magdaleno S., Sendera T.J. 2009. Selection of hyperfunctional siRNAs with improved potency and specificity. *Nucl. Acids Res.* **37**, e152.
61. Haley B., Zamore P.D. 2004. Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 599–606.
62. Martinez J., Tuschl T. 2004. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Gene Dev.* **18**, 975–980.
63. Amarzguioui M., Hølen T., Babaie E., Prydz H. 2003. Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucl. Acids Res.* **31**, 589–595.
64. Cui W., Ning J., Naik U.P., Duncan M.K. 2004. OptiRNAi, an RNAi design tool. *Comput. Methods Program. Biomed.* **75**, 67–73.
65. Elbashir S.M., Harborth J., Weber K., Tuschl T. 2002. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*. **26**, 199–213.
66. Henschel A., Buchholz F., Habermann B. 2004. DE-QOR: a web-based tool for the design and quality control of siRNAs. *Nucl. Acids Res.* **32**, W113–W120.
67. Kumar R., Conklin D.S., Mittal V. 2003. High-throughput selection of effective RNAi probes for gene silencing. *Genom Res.* **13**, 2333–2340.
68. Patzel V., Rutz S., Dietrich I., Köberle C., Scheffold A., Kaufmann S.H.E. 2005. Design of siRNAs producing unstructured guide-RNAs results in improved RNA interference efficiency. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1440–1444.
69. Yuan B., Latek R., Hossbach M., Tuschl T., Lewitter F. 2004. siRNA Selection Server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server. *Nucl. Acids Res.* **32**, W130–W134.
70. Ameres S.L., Martinez J., Schroeder R. 2007. Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell*. **130**, 101–112.
71. Bohula E.A., Salisbury A.J., Sohail M., Playford M.P., Riedemann J., Southern E.M., Macaulay V.M. 2003. The efficacy of small interfering RNAs targeted to the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) is influenced by secondary structure in the IGF1R transcript. *J. Biol. Chem.* **278**, 15991–15997.
72. Cullen B.R. 2006. Enhancing and confirming the specificity of RNAi experiments. *Nat. Method.* **3**, 677–681.
73. Gredell J.A., Berger A.K., Walton S.P. 2008. Impact of target mRNA structure on siRNA silencing efficiency: a large-scale study. *Biotechnol. Bioeng.* **100**, 744–755.
74. Hølen T., Amarzguioui M., Wiiger M.T., Babaie E. and Prydz H. 2002. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucl. Acids Res.* **30**, 1757–1766.
75. Kretschmer-Kazemi Far R., Sczakiel G. 2003. The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucl. Acids Res.* **31**, 4417–4424.
76. Luo K.Q., Chang D.C. 2004. The gene-silencing efficiency of siRNA is strongly dependent on the local structure of mRNA at the targeted region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **318**, 303–310.
77. Overhoff M., Alken M., Kretschmer-Kazemi F.R., Lemaitre M., Lebleu B., Sczakiel G., Robbins I. 2005.

- Local RNA target structure influences siRNA efficacy: a systematic global analysis. *J. Mol. Biol.* **348**, 871–881.
78. Pancoska P., Moravek Z., Moll U.M. 2004. Efficient RNA interference depends on global context of the target sequence: quantitative analysis of silencing efficiency using Eulerian graph representation of siRNA. *Nucl. Acids Res.* **32**, 1469–1479.
79. Schubert S., Grunweller A., Erdmann V.A., Kurreck J. 2005. Local RNA target structure influences siRNA efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions. *J. Mol. Biol.* **348**, 883–893.
80. Shao Y., Chan C.Y., Maliyekkel A., Lawrence C.E., Roninson I.B., Ding Y. 2007. Effect of target secondary structure on RNAi efficiency. *RNA*. **13**, 1631–1640.
81. Tafer H., Ameres S.L., Obernosterer G., Gebeshuber C.A., Schroeder R., Martinez J., Hofacker I.L. 2008. The impact of target site accessibility on the design of effective siRNAs. *Nat. Biotechnol.* **26**, 578–583.
82. Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucl. Acids Res.* **31**, 3406–3415.
83. Ding Y., Chan C.Y., Lawrence C.E. 2004. Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids. *Nucl. Acids Res.* **32**, W135–W141.
84. Du Q., Thonberg H., Wang J., Wahlestedt C., Liang Z. 2005. A systematic analysis of the silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites. *Nucl. Acids Res.* **33**, 1671–1677.
85. Huang H., Qiao R., Zhao D., Zhang T., Li Y., Yi F., Lai F., Hong J., Ding X., Yang Z., Zhang L., Du Q., Liang Z. 2009. Profiling of mismatch discrimination in RNAi enabled rational design of allele-specific siRNAs. *Nucl. Acids Res.* **37**, 7560–7569.
86. Dahlgren C., Zhang H.Y., Du Q., Grahn M., Nørstedt G., Wahlestedt C., Liang Z. 2008. Analysis of siRNA specificity on targets with double-nucleotide mismatches. *Nucl. Acids Res.* **36**: e53.
87. Geng C. M., Ding H.L. 2008. Double-mismatched siRNAs enhance selective gene silencing of a mutant ALS-causing allele. *Acta Pharmacol. Sin.* **29**, 211–216.
88. Guan R., Tapang P., Levenson J.D., Alber D., Giranda V.L., Luo Y. 2005. Small interfering RNA-mediated Polo-like kinase 1 depletion preferentially reduces the survival of p53-defective, oncogenic transformed cells and inhibits tumor growth in animals. *Cancer Res.* **65**, 2698–2704.
89. McManus M.T., Haines B.B., Dillon C.P., Whitehurst C.E., van Parijs L., Chen J., Sharp P.A. 2002. Small interfering RNA-mediated gene silencing in T lymphocytes. *J. Immunol.* **169**, 5754–5760.
90. McManus M.T., Sharp P.A. 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 737–747.
91. Nicholson L.J., Philippe M., Paine A.J., Mann D.A. and Dolphin C.T. 2005. RNA interference mediated in human primary cells via recombinant baculoviral vectors. *Mol. Ther.* **11**, 638–644.
92. Bartlett D.W., Davis M.E. 2006. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucl. Acids Res.* **34**, 322–333.
93. Chernolovskaya E.L., Zenkova M.A. 2010. Chemical modification of siRNA. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **12**, 158–167.
94. De Fougères A., Vornlocher H.P., Maraganore J., Lieberman J. 2007. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 443–453.
95. Gaglione M., Messere A. 2010. Recent progress in chemically modified siRNAs. *Mini Rev. Med. Chem.* **10**, 578–595.
96. Cullen B.R. 2006. Induction of stable RNA interference in mammalian cells. *Gene Ther.* **13**, 503–508.
97. Atkinson P.J., Young K.W., Ennion S.J., Kew J.N., Nahorski S.R., Challiss R.A. 2006. Altered expression of G(q/11alpha) protein shapes mGlu1 and mGlu5 receptor-mediated single cell inositol 1,4,5-trisphosphate and Ca(2+) signaling. *Mol. Pharmacol.* **69**, 174–184.
98. Гринев В.В., Посредник Д.В., Heidenreich O. 2011. Эффективный и специфичный контроль экспрессии гена AML1/ETO в клетках острого миелоидного лейкоза с помощью РНК-интерференции, основанной на лентивирусной трансдукции. *Молекуляр. биология.* **45**, 335–345.
99. McIntyre G.J., Yu Y.-H., Lomas M., Fanning G.C. 2011. The effects of stem length and core placement on shRNA activity. *BMC Mol. Biol.* **12**, 34.
100. Davis-Dusenbery B.N., Hata A. 2010. MicroRNA in cancer – The involvement of aberrant microRNA biogenesis regulatory pathways. *Gene Cancer.* **1**, 1100–1114.
101. Karube Y., Tanaka H., Osada H., Tomida S., Tatamatsu Y., Yanagisawa K., Yatabe Y., Takamizawa J., Miyoshi S., Mitsudomi T., Takahashi T. 2005. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci.* **96**, 111–115.
102. Ma Z., Swede H., Cassarino D., Fleming E., Fire A., Dadrás S.S. 2011. Up-regulated Dicer expression in patients with cutaneous melanoma. *PLoS ONE.* **6**, e20494. doi:10.1371/journal.pone.0020494.
103. Sago N., Omi K., Tamura Y., Kunugi H., Toyo-oka T., Tokunaga K., Hohjoh H. 2004. RNAi induction and activation in mammalian muscle cells where Dicer and eIF2C translation initiation factors are barely expressed. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 50–57.
104. Vickers T.A., Lima W.F., Nichols J.G., Crooke S.T. 2007. Reduced levels of Ago2 expression result in increased siRNA competition in mammalian cells. *Nucl. Acids Res.* **35**, 6598–6610.
105. Walton S.P., Wu M., Gredell J.A., Chan C. 2010. Designing highly active siRNAs for therapeutic applications. *FEBS J.* **277**, 4806–4813.
106. Truss M., Swat M., Kielbasa S.M., Schäfer R., Herzog H., Hagemeyer C. 2005. HuSiDa – the human siRNA database: an open-access database for published functional siRNA sequences and technical details of efficient transfer into recipient cells. *Nucl. Acids Res.* **33**, D108–D111.
107. Jiang P., Wu H., Da Y., Sang F., Wei J., Sun X., Lu Z. 2007. RFRCDDB-siRNA: improved design of siRNAs by random forest regression model coupled with database searching. *Comp. Method Program. Biomed.* **87**, 230–238.
108. Kittler R., Surendranath V., Heninger A.K., Slabicki M., Theis M., Putz G., Franke K., Caldarelli A., Grabner H., Kozak K., Wagner J., Rees E., Korn B., Frenzel C., Sachse C., Sönnichsen B., Guo J., Schelter J., Burchard J., Linsley P.S., Jackson A.L., Habermann B., Buchholz F. 2007. Genome-wide resources of endoribo-

- nuclease-prepared short interfering RNAs for specific loss-of-function studies. *Nat. Method.* **4**, 337–344.
109. Shah J.K., Garner H.R., White M.A., Shames D.S., Minna J.D. 2007. siR: siRNA information resource, a web-based tool for siRNA sequence design and analysis and an open access siRNA database. *BMC Bioinformatics.* **8**, doi:10.1186/1471-2105-8-178.
 110. Ren Y., Gong W., Zhou H., Wang Y., Xiao F., Li T. 2009. siRecords: a database of mammalian RNAi experiments and efficacies. *Nucl. Acids Res.* **37**, D146–149.
 111. Chalk A.M., Warfinge R.E., Georgii-Hemming P., Sonnhammer E.L. 2005. siRNADB: a database of siRNA sequences. *Nucl. Acids Res.* **33**, D131–D134.
 112. Baranova A., Bode J., Manyam G., Emelianenko M. 2011. An efficient algorithm for systematic analysis of nucleotide strings suitable for siRNA design. *BMC Res. Note.* **4**, 168. doi:10.1186/1756-0500-4-168.
 113. Rao D.D., Vorhies J.S., Senzer N., Nemunaitis J. 2009. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 746–759.
 114. Ahmed F., Raghava G.P.S. 2011. Designing of highly effective complementary and mismatch siRNAs for silencing a gene. *PLoS ONE.* **6**, e23443. doi:10.1371/journal.pone.0023443
 115. Vert J.-P., Foveau N., Lajaunie C., Vandenbrouck Y. 2006. An accurate and interpretable model for siRNA efficacy prediction. *BMC Bioinformatics.* **7**, 520 doi:10.1186/1471-2105-7-520.
 116. Horn T., Boutros M. 2010. E-RNAi: a web application for the multi-species design of RNAi reagents – 2010 update. *Nucl. Acids Res.* **38**, W332–W339.
 117. Santoyo J., Vaquerizas J. M., Dopazo J. 2005. Highly specific and accurate selection of siRNAs for high-throughput functional assays. *Bioinformatics.* **21**, 1376–1382.
 118. Gong W., Ren Y., Zhou H., Wang Y., Kang S., Li T. 2008. siDRM: an effective and generally applicable online siRNA design tool. *Bioinformatics.* **24**, 2405–2406.
 119. Levenkova N., Gu Q., Rux J.J. 2004. Gene specific siRNA selector. *Bioinformatics.* **20**, 430–432.
 120. Rice P., Longden I., Bleasby A. 2000. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trend. Gen.* **16**, 276–277.
 121. Jia P., Shi T., Cai Y., Li Y. 2006. Demonstration of two novel methods for predicting functional siRNA efficiency. *BMC Bioinformatics.* **7**, 271.
 122. Ladunga I. 2007. More complete gene silencing by fewer siRNAs: transparent optimized design and biophysical signature. *Nucl. Acids Res.* **35**, 433–440.
 123. Saetrom P. 2004. Predicting the efficacy of short oligonucleotides in antisense and RNAi experiments with boosted genetic programming. *Bioinformatics.* **20**, 3055–3063.
 124. Takasaki S., Kawamura Y., Konagaya A. 2006. Selecting effective siRNA sequences by using radial basis function network and decision tree learning. *BMC Bioinformatics.* **7**, doi:10.1186/1471-2105-7-S5-S22.
 125. Teramoto R., Aoki M., Kimura T., Kanaoka M. 2005. Prediction of siRNA functionality using generalized string kernel and support vector machine. *FEBS Lett.* **579**, 2878–2882.
 126. Wang L., Huang C., Yang J.Y. 2010. Predicting siRNA potency with random forests and support vector machines. *BMC Genomic.* **11**, S2. doi:10.1186/1471-2164-11-S3-S2.
 127. Malik I., Garrido M., Bahr M., Kugler S., Michel U. 2006. Comparison of test systems for RNA interference. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 245–253.
 128. Birmingham A., Anderson E., Reynolds A., Ilesley-Tyree D., Leake D., Fedorov Y., Baskerville S., Maksimova E., Robinson K., Karpilow J., Marshall W.S., Khvorova A. 2006. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat. Method.* **3**, 199–204.
 129. Editorial. 2003. Whither RNAi? *Nat. Cell Biol.* **5**, 489–490.
 130. Semizarov D., Frost L., Sarthy A., Kroeger P., Halbert D.N., Fesik S.W. 2003. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 6347–6352.
 131. Manche L., Green S.R., Schmedt C., Mathews M.B. 1992. Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5238–5248.
 132. Shi H., Hoffman B., Lis J.T. 1999. RNA aptamers as effective protein antagonists in a multicellular organism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 10033–10038.
 133. Bridge A.J., Pebernard S., Ducraux A., Nicoulaz A.-L., Iggo R. 2003. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat. Gen.* **34**, 263–264.
 134. Hornung V., Guenther-Biller M., Bourquin C., Ablasser A., Schlee M., Uematsu S., Noronha A., Manoharan M., Akira S., de Fougères A., Endres S., Hartmann G. 2005. Sequence-specific potent induction of interferon- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med.* **11**, 263–270.
 135. Judge A.D., Sood V., Shaw J.R., Fang D., McClintock K., MacLachlan I. 2005. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat. Biotechnol.* **23**, 457–462.
 136. Kariko K., Bhuyan P., Capodici J., Weissman D. 2004. Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J. Immunol.* **172**, 6545–6549.
 137. Cho W.G., Albuquerque R.J., Kleinman M.E., Tarallo V., Greco A., Nozaki M., Green M.G., Baffi J.Z., Ambati B.K., De Falco M., Alexander J.S., Brunetti A., De Falco S., Ambati J. 2009. Small interfering RNA-induced TLR3 activation inhibits blood and lymphatic vessel growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 7137–7142.
 138. Kleinman M.E., Yamada K., Takeda A., Chandrasekaran V., Nozaki M., Baffi J.Z., Albuquerque R.J., Yamasaki S., Itaya M., Pan Y., Appukuttan B., Gibbs D., Yang Z., Karikó K., Ambati B.K., Wilgus T.A., DiPietro L.A., Sakurai E., Zhang K., Smith J.R., Taylor E.W., Ambati J. 2008. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature.* **452**, 591–597.
 139. Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* **294**, 853–858.
 140. Stojdl D.F., Lichty B., Knowles S., Marius R., Atkins H., Sonenberg N., Bell J.C. 2000. Exploiting tumor-specific

- ic defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat. Med.* **6**, 821–825.
141. Akusjärvi G., Svensson C., Nygård O. 1987. A mechanism by which adenovirus virus-associated RNAi controls translation in a transient expression assay. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 549–551.
 142. Grimm D., Streetz K.L., Jopling C.L., Storm T.A., Pandey K., Davis C.R., Marion P., Salazar F., Kay M.A. 2006. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*. **441**, 537–541.
 143. Chi J.-T., Chang H.Y., Wang N.N., Chang D.S., Dunphy N., Brown P.O. 2003. Genome wide view of gene silencing by small interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 6343–6346.
 144. Jackson A.L., Bartz S.R., Schelter J., Kobayashi S.V., Burchard J., Mao M., Li B., Cavet G., Linsley P.S. 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* **21**, 635–637.
 145. Scacheri P.C., Rozenblatt-Rosen O., Caplen N.J., Wofsyberg T.G., Umayam L., Lee J.C., Hughes C.M., Shanmugam K.S., Bhattacharjee A., Meyerson M., Collins F.S. 2004. Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101**, 1892–1897.
 146. Anderson E.M., Birmingham A., Baskerville S., Reynolds A., Maksimova E., Leake D., Fedorov Y., Karpilow J., Khvorova A. 2008. Experimental validation of the importance of seed complement frequency to siRNA specificity. *RNA*. **14**, 853–861.
 147. Jackson A.L., Burchard J., Schelter J., Chau B.N., Cleary M., Lim L., Linsley P.S. 2006. Widespread siRNA “off-target” transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* **12**, 1179–1187.
 148. Lin X., Ruan X., Anderson M.G., McDowell J.A., Kroeger P.E., Fesik S.W., Shen Y. 2005. siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucl. Acids Res.* **33**, 4527–4535.
 149. Ui-Tei K., Naito Y., Nishi K., Juni A., Saigo K. 2008. Thermodynamic stability and Watson–Crick base pairing in the seed duplex are major determinants of the efficiency of the siRNA-based off-target effect. *Nucl. Acids Res.* **36**, 7100–7109.
 150. Lim L.P., Lau N.C., Garrett-Engele P., Grimson A., Schelter J.M., Castle J., Bartel D.P., Linsley P.S., Johnson J.M. 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. **433**: 769–773.
 151. Naito Y., Yoshimura J., Morishita S., Ui-Tei K. 2009. siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect. *BMC Bioinformatics*. **10**, doi:10.1186/1471-2105-10-392.
 152. Holen T., Moe S.E., Sorbo J.G., Meza T.J., Otterse- nand O.P., Klungland A. 2005. Tolerated wobble mutations in siRNAs decrease specificity, but can enhance activity *in vivo*. *Nucl. Acids Res.* **33**, 4704–4710.
 153. Ui-Tei K., Naito Y., Zenno S., Nishi K., Yamato K., Takahashi F., Juni A., Saigo K. 2008. Functional dis- section of siRNA sequence by systematic DNA substi- tution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with sig- nificantly reduced off-target effect. *Nucl. Acids Res.* **36**, 2136–2151.
 154. Dua P., Yoo J.W., Kim S., Lee D.K. 2011. Modified siRNA structure with a single nucleotide bulge over- comes conventional siRNA-mediated off-target silencing. *Mol. Ther.* **14**, doi: 10.1038/mt.2011.109.
 155. Persengiev S.P., Zhu X., Green M.R. 2004. Nonspe- cific concentration-dependent stimulation and repres- sion of mammalian gene expression by small interfer- ing RNAs (siRNAs). *RNA*. **10**, 12–18.
 156. Yamada T., Morishita S. 2005. Accelerated off-target search algorithm for siRNA. *Bioinformatics*. **21**, 1316– 1324.
 157. Chalk A.M., Sonnhammer E.L. 2008. siRNA specifi- city searching incorporating mismatch tolerance data. *Bioinformatics*. **24**, 1316–1317.
 158. Schwarz D.S., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N., Zamore P.D. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. **115**, 199–208.
 159. Clark P.R., Pober J.S., Kluger M.S. Knockdown of TNFR1 by the sense strand of an ICAM-1 siRNA: dis- section of an off-target effect. *Nucl. Acids Res.* **36**, 1081–1097.
 160. Dillin A. 2003. The specifics of small interfering RNA specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 6289–6291.
 161. Martinez J., Patkaniowska A., Urlaub H., Luhrmann R., Tuschl T. 2002. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*. **110**, 563– 574.
 162. Stein P., Svoboda P., Anger M., Schultz R.M. 2003. RNAi: mammalian oocytes do it without RNA-de- pendent RNA polymerase. *RNA*. **9**, 187–192.
 163. Zamore P.D., Tuschl T., Sharp P.A., Bartel D.P. 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-depen- dent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide inter- vals. *Cell*. **101**, 25–33.
 164. Fedorov Y., Anderson E.M., Birmingham A., Rey- nolds A., Karpilow J., Robinson K., Leake D., Mars- hall M.S., Khvorova A. 2006. Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA*. **12**, 1188–1196.
 165. Branch A.D. 1998. A good antisense molecule is hard to find. *Trend. Biochem. Sci.* **23**, 45–50.
 166. Bruckner I., Tremblay G.A. 2000. Cellular proteins prevent antisense phosphorothioate oligonucleotide (SdT18) to target sense RNA (rA18): development of a new *in vitro* assay. *Biochemistry*. **39**, 11463–11466.
 167. Cho Y.S., Kim M.-K., Cheadle C., Neary C., Bec- ker K.G., Cho-Chung Y.S. 2001. Antisense DNAs as multisite genomic modulators identified by DNA mi- croarray. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 9819–9823.
 168. Fisher A.A., Ye D., Sergueev D.S., Fisher M.H., Shaw B.R., Juliano R.L. 2002. Evaluating the speci- ficity of antisense oligonucleotide conjugates a DNA ar- ray analysis. *J. Biol. Chem.* **277**, 22980–22984.
 169. Lebedeva I., Stein C.A. 2001. Antisense oligonucle- otides: Promise and reality. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 403–419.
 170. Stein C.A. 1995. Does antisense exist? *Nat. Med.* **1**, 1119–1121.