

siRNA Design – auf den Algorithmus kommt es an

Chris Echeverri¹, Christoph Sachse¹, Andrew Walsh¹, Anne Grabner¹, Claudia Matz² und David Brown³

¹Cenix BioScience GmbH, Dresden, ²Ambion Europe Ltd., Huntingdon, UK, ³Ambion Inc., Austin, USA

► RNA-Interferenz (RNAi) ist ein zellulärer Prozess bei dem doppelsträngige RNAs so genannte „short interfering RNAs“ (siRNAs) den Abbau von komplementärer mRNA bewirken. Heutzutage werden siRNAs häufig in der funktionellen Genomforschung eingesetzt. Dabei ist eine sorgfältige Auswahl der verwendeten siRNA-Sequenzen unumgänglich, da nicht alle siRNAs ein effektives Ausschalten des jeweiligen Gens (Gen-Silencing oder Knock-Down) bedingen. Wirksamkeit in geringer Konzentration und ein Fehlen unspezifischer Effekte sind weitere wünschenswerte Eigenschaften einer siRNA.

siRNA Design

Mehrere siRNA-Design-Algorithmen, die den Anspruch erheben, hohe Erfolgsraten bei der Reduktion humaner Genexpression zu erzielen, sind mittlerweile kommerziell erhältlich. Die Leistung einiger dieser Design-Algorithmen beruht hauptsächlich auf statistischen Extrapolationen und/oder auf Experimenten, bei denen die Reduktion von mRNAs von co-transfizierten exogenen Reporter-konstrukten untersucht wurde.

Cenix Biosciences entwickelte einen Algorithmus, der potente und spezifische siRNA-Sequenzen mit einem hohen Grad an Exaktheit voraussagt. Die Effizienz von ungefähr 1.100 so ermittelten siRNAs, die gegen insgesamt 379 endogene humane Transkripte gerichtet waren, wurde in Zusammenarbeit mit Ambion Inc. untersucht. Die Analysen wurden in Zellkulturen unter streng standardisierten experimentellen Bedingungen durchgeführt. Gezieltes Gen-Silencing wurde in Triplikaten mittels RT-PCR 48 h nach der Transfektion untersucht. Eine nicht genomische siRNA (*Silen-*

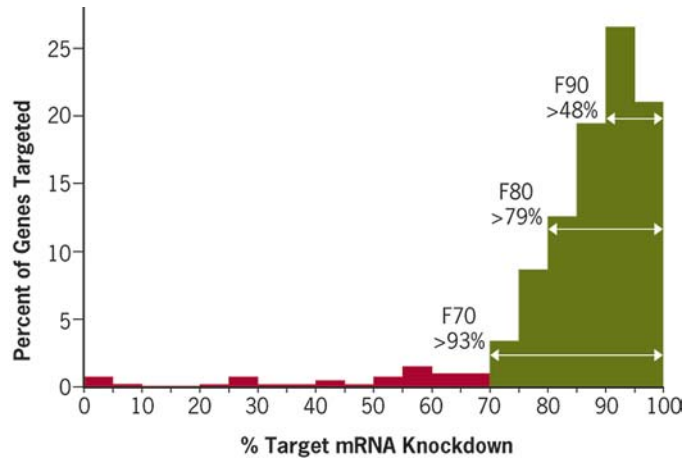


Abb. 1: Gen-Silencing Verteilung für 1106 siRNAs. Es wurden 1106 siRNAs verwendet, die gegen 379 endogen exprimierte humane Gene gerichtet waren. HeLa-Zellen wurden mit jeweils 100 nM siRNAs transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die jeweiligen mRNA-Mengen durch quantitative RT-PCR bestimmt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mittels 18S rRNA. über 93 % der untersuchten Gene wurden um mehr als 70 % reduziert, etwa 80 % der Gene um 80 % und 48 % der Gene um mehr als 90 %. (Abkürzungen: F70: 70 %; F80: 80 %; F90: 90 %)

cerTM Negative Control #1 siRNA; Ambion) wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Diese empirische Studie des Cenix-Designs ist die bislang direkteste, physiologisch relevanteste und umfassendste Leistungsanalyse eines heutzutage erhältlichen siRNA Design-Algorithmus.

Maximierung der Erfolgsrate von siRNAs

Öffentlich frei zugängliche siRNA-Designprogramme haben typischerweise eine Erfolgsrate von 50–60 % bei der Erstellung von siRNAs, die 48 h nach der Transfektion mehr als 70 % Knock-Down in HeLa-

Zellen hervorrufen^[1]. Die Erfolgsrate des Cenix-Algorithmus wurde unter ähnlichen Bedingungen getestet, wobei die Effekte von 1.106 verschiedenen siRNAs auf insgesamt 379 endogene humane Transkripte mittels quantitativer RT-PCR ermittelt wurde (Abb. 1). Bei drei getesteten siRNAs pro Gen bewirkten eine oder mehrere der siRNAs ein Gen-Silencing von mehr als 70 % bei über 93 % der getesteten Gene. Mehr als 80 % Knock-Down wurde für etwa 80 % der getesteten Gene und mehr als 90 % Gen-Silencing für 48 % der getesteten Gene ermittelt. Bezogen auf die einzelnen siRNAs bedeutend das, dass ungefähr 80 % der individuellen siRNAs das jeweilige Transkript um mehr als 70 % reduzierten. Diese Daten belegen deutlich den Erfolg des Cenix siRNA-Design-Algorithmus.

Maximierung der Knock-Down Effizienz

Das Einsetzen geringer Konzentrationen hochaktiver siRNA minimiert die Wahrscheinlichkeit von nicht spezifischen Effekten^[2, 3]. Unter optimalen Transfektionsbedingungen wurde eine über 90 %ige Reduzierung der jeweiligen Ziel mRNA-Menge gemessen, wenn die siRNA in nanomolarer und in einigen Fällen sogar picomolarer Endkonzentration eingesetzt wurde. Abbildung 2 zeigt ein Ex-

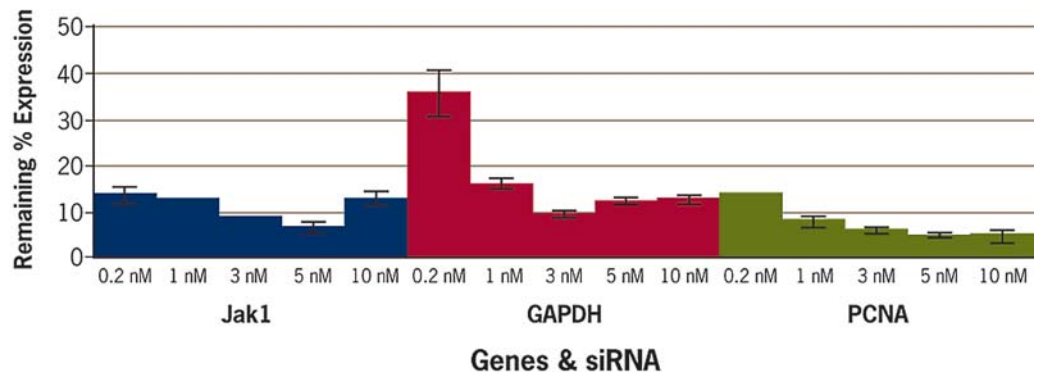


Abb. 2: Effizienz der Cenix siRNAs. HeLa Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von siRNAs transfiziert, die gegen *Jak1*, *GAPDH* und *PCNA* gerichtet waren. Als Negativkontrolle wurde eine nicht-genomische siRNA verwendet (nicht gezeigt). 48 Stunden nach der Transfektion wurden die mRNA-Mengen durch quantitative RT-PCR bestimmt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mittels 18S rRNA. Die Reduzierung der Ziel-RNA-Mengen wurde durch einen Vergleich der RT-PCR Ergebnisse für die jeweiligen mRNAs und die Negativkontrolle ermittelt. Die Cenix-siRNAs können auch bei sehr geringen Mengen effektiven Gen-Knock-Down erzeugen. Abkürzungen: *Jak1*: Janus Kinase 1; *GAPDH*: Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase; *PCNA*: Proliferating Cell Nuclear Antigen

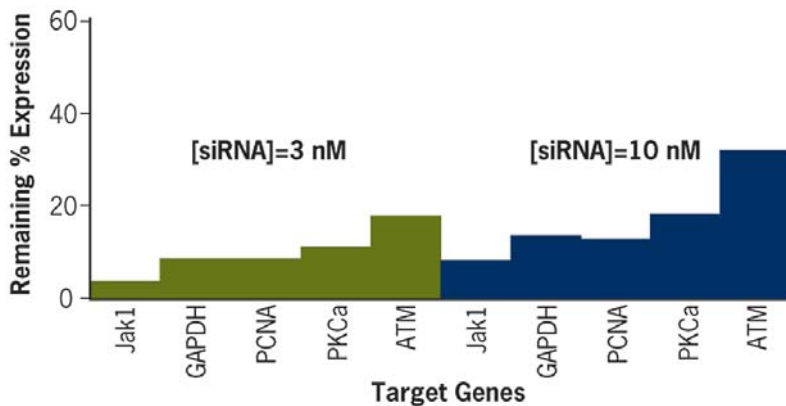


Abb. 3: Gleichzeitiger Knock-Down verschiedener Gene. Equimolare Mengen (3 nM oder 10 nM) von 5 verschiedenen siRNAs wurden gemischt und für die Transfektion von HeLa Zellen eingesetzt. 48 Stunden nach der Transfektion wurden mRNA-Mengen durch quantitative RT-PCR bestimmt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mittels 18S rRNA. Die Reduzierung der Ziel-RNA wurde durch einen Vergleich der RT-PCR Ergebnisse für die jeweiligen mRNAs und der Negativkontrolle ermittelt. Abkürzungen: Jak1: Janus Kinase 1; GAPDH: Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase; PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen; PKCa, Protein Kinase C alpha Untereinheit; ATM, Ataxia Telangiectasia-Gen

periment bei dem siRNAs gegen drei verschiedene Gene in verschiedenen Konzentrationen bei der Transfektion eingesetzt wurden. Es wurde kein signifikanter Unterschied bei den Transkriptmengen von Jak1 und PCNA in HeLa-Zellen gemessen, wenn die entsprechende siRNA in 200 pM oder 1 nM Endkonzentration eingesetzt wurde. Die Reduzierung der GAPDH mRNA war jedoch deutlich weniger effektiv, wenn siRNA in einer Konzentration von 200 pM eingesetzt wurde. Dieses Ergebnis ist sehr wahrscheinlich durch die signifikante Abundanz von GAPDH mRNA in der Zelle zu erklären, die vermutlich höher war, als die Konzentration des „RNA Induced Silencing Complex“ (RISC), der nach Transfektion mit lediglich 200 pM GAPDH siRNA gebildet wurde.

Die Verwendung geringer siRNA Konzentrationen macht es auch möglich, mehrere gegen verschiedene Gene gerichtete siRNAs simultan bei einer Transfektion einzusetzen: Die mRNA Mengen von bis zu fünf Genen konnte gleichzeitig um mehr als 70 % reduziert werden (Abb. 3).

Was bestimmt den Erfolg von siRNA-Design-Algorithmen?

Eine der ursprünglichen Hypothesen bei der Vorhersage effi-

zienter siRNA Sequenzen ging davon aus, dass der Gesamt-GC-Gehalt von Bedeutung ist: wirksame siRNAs haben tendenziell einen GC-Gehalt von unter 50 %. Allerdings ist ein geringer GC-Gehalt nicht unbedingt ein verlässlicher Garant für die Wirksamkeit einer siRNA (Daten nicht gezeigt). Cenix erkannte, dass siRNAs mit höherem GC-Gehalt an bestimmten Positionen des 3' Endes des Antisensestranges und zusätzlich niedrigem GC-Gehalt an bestimmten Positionen des 5' Endes des Antisensestranges signifikant höhere Erfolgsraten aufwiesen. Dieses Prinzip wurde daraufhin als eine der wichtigsten die siRNA Wirksamkeit bestimmenden Determinanten des Algorithmus implementiert. Schwarz *et al.*^[4] haben seitdem gezeigt, dass der Sense- und Antisensestrang einer siRNA nicht mit gleicher Wahrscheinlichkeit in den RISC-Komplex eingebaut werden. Der siRNA-Strang, der einen niedrigeren GC-Gehalt am 5'-Ende aufweist, wird gewöhnlich bevorzugt. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass eine für das Entwinden der siRNAs verantwortliche RNA-Helikase denjenigen Strang für den Einbau in den RISC selektiert, bei dem die ersten vier bis fünf Nukleotide der Duplex leichter entwunden werden können. Eine siRNA Zielsequenz mit hohem GC-Ge-

halt in den Positionen 1–4 und einem niedrigen GC-Gehalt in den Positionen 16–19 entspricht einer siRNA mit niedrigem GC-Gehalt am 5'-Ende und hohem GC-Gehalt am 3'-Ende des Antisensestranges. Der Antisensestrang wird vorzugsweise in den RISC-Komplex eingebaut und bedingt den Abbau der jeweiligen mRNA.

Die bevorzugte Aufnahme eines siRNA Stranges in den RISC hat zur Konsequenz, dass erstens die siRNA eine höhere Effizienz und zweitens eine höhere Spezifität hat^[2].

Weitere wichtige Parameter für erfolgreichen siRNA-Design

Zusätzlich zu dem GC-Gehalt der siRNA Enden (der terminalen Schmelztemperaturen (T_m)) gibt es noch weitere Parameter, die das optimale siRNA Design beeinflussen, wie z.B. die terminale Schmelztemperatur von spezifischen internen Domänen der siRNA, die Länge der siRNA, die Position der Zielsequenz in der kodierenden Region und der Nukleotidgehalt der 3'-Überhänge. Alle diese Parameter werden vom Cenix-siRNA-Design-Algorithmus berücksichtigt, der von Ambion genutzt wurde, um eine weitläufige Produktpalette vorgefertigter siRNAs, validierten siRNAs und siRNA-Bibliotheken zu entwickeln. Experimente von Cenix

und anderen^[4, 5] haben gezeigt, dass man bestimmte Regeln beim Design von siRNAs beachten muss und nutzen kann, um die Chancen zu erhöhen wirksame und hochaktive siRNAs zu produzieren. Bei der Verwendung von solch hocheffektiven Design-Algorithmen entfällt die Notwendigkeit, die siRNAs auf ihre Funktionalität hin zu untersuchen.

Literatur

[1] **Jarvis, R., Ford, L.** (2007): The siRNA Target Site Is an Important Parameter for Inducing RNAi in Human Cells. *Tech-Notes* 8(5): www.ambion.com/techlib/tn/85/852.html

[2] **Jackson, A. L., et al.** (2003): Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol.* 21(6), 635–637

[3] **Persengiev, S. P., et al.** (2004): Non-specific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA* 10(1), 12–18

[4] **Schwarz, D., et al.** (2003): Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115(2), 199–208

[5] **Khvorova, A., et al.** (2003): Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115(2), 209–216.

Korrespondenzadressen:

Dr. David Brown
Ambion Inc.
 2130 Woodward
 Austin TX 78744-1832
 USA
 Tel.: 001-512-651-0200
 Fax: 001-512-651-0200

Dr. Claudia Matz
Ambion Europe Ltd.
 Spitfire Close
 Huntingdon PE29 6XY
 United Kingdom
 Tel.: 0044-1480-373020
 Fax: 0044-1480-373010
cmatz@ambion.com
www.ambion.com