

Arbeitsbericht zum Max-Buchner-Projekt no. 3384

„Manipulation of Disease-related Neuronal Genes by Directed RNA Editing“

22. September 2015

Dr. Thorsten Stafforst

Nachwuchsgruppe Nucleinsäurebiochemie

Interfakultäres Institut für Biochemie

Auf der Morgenstelle 15

72076 Tübingen

Das Ziel des oben genannten Antrags war es, die Weiterentwicklung der orts-gerichteten Editierung in meinem Labor zu unterstützen. Im Mittelpunkt stand insbesondere die Verbesserung des molekularen Verständnisses der gerichteten Editierung, die Etablierung in Zellkultur, sowie der weitere Ausbau der R/G-Strategie. Schließlich sollen diese Arbeiten Wege eröffnen, die gerichtete Editierung zur Reparatur krankheitsverursachender Punktmutationen zu verwenden.

RNA-abhängige Enzyme erlauben die basengenaue Manipulation von Nucleinsäuren. Natürliche RNA-abhängige Enzyme werden in der Zelle mittels RNA-Protein-Wechselwirkung assembliert. Wir konnten 2012 zeigen, dass es mit Hilfe der SNAP-tag-Technologie gelingt, kovalente Deaminase-RNA-Konjugate herzustellen und zur basengenauen A-zu-I-Editierung an mRNAs im PCR-Gefäß zu verwenden. In den letzten 18 Monaten haben wir die Methode deutlich weiterentwickelt. Wir haben in vitro genau untersucht, welche Kodons in welcher RNA-Sekundärstruktur optimal editiert werden und wie sich die Deaminasedomänen von ADAR1 und ADAR2 darin unterscheiden. Dabei haben wir gefunden, dass einige Kodons ganz spezielle Struktur motive bevorzugen, während andere Kodons relativ wenig sensitiv auf die Sequenz der guideRNA reagieren. Die Ergebnisse wurden 2014 in *Nucleic Acids Research* publiziert. Ein weiteres Ziel war die Etablierung der RNA Editierung in Zellkultur. Auch dies ist in den vergangenen 18 Monaten gelungen. Wir konnten zeigen, dass sich ein verfrühtes Stoppsignal in einem Reportergen (eCFP) mittels Editierung in lebenden 293T Zellen reparieren lässt. Dazu musste die Lipofektion chemisch stabilisierter guideRNAs optimiert werden. Die entsprechenden Resultate wurden 2014 in der Zeitschrift *Angewandte Chemie* publiziert. Damals wurden Reparaturausbeuten von ca. 25% gemittelt über die Zellkultur erhalten. Mittlerweile sind wir auf eGFP als Reportergen umgestiegen und konnten durch eine weitere Optimierung der guideRNA und der Lipofektion (reverse Transfektion) die Reparaturausbeute auf 50-75% in 293T Zellen steigern (Manuskript in Vorbereitung). Die Mengen der einzusetzenden guideRNA konnten dabei deutlich reduziert werden auf ca. 10 pmol/96 well, was in etwa den Mengen von siRNA-Duplexen in der RNA-Interferenz entspricht. Auch fanden wir eine klare Dose-Response im Bereich der picomolaren Mengen je Well. Erste Versuche zur Reparatur von Punktmutationen im PINK1-Gen gaben bislang jedoch nicht die gewünschten Editierungsausbeuten, da der ausgewählte Kodon zufällig in einer selbstpaarenden Sequenz liegt.

Die Editierung nach der SNAP-tag-Strategie hat die Limitation, dass die guideRNA-Komponente nicht genetisch kodierbar und daher immer wieder transfiziert werden muss. Daher haben wir die R/G-Strategie entwickelt. Bei dieser wird ein intronisches RNA-Sekundärstrukturelement nachgeahmt, welches das natürliche wildtyp-Enzym hADAR2 an beliebige mRNAs rekrutieren kann, um eine Editierung zu bewirken. Insbesondere in Neuronen, in denen ADAR2 hoch exprimiert ist, könnte allein die Expression oder das Einschleusen einer guideRNA ausreichen, um die Reparatur eines Gens zu bewirken. Nachdem wir in Vorarbeiten zu diesem Antrag das Funktionieren der Strategie in vitro nachweisen konnte, so haben wir in den letzten zwei Jahren nach Möglichkeiten gesucht, die RNA-Reparatur in lebenden Zellen durchzuführen. In 293T Zellen gelang uns die Reparatur von W58amber eGFP mittels transienter Expression aller Komponenten von Plasmiden (wt ADAR2, eGFP, R/G-guideRNA). Die guideRNA wurde dabei von einem U6-Promotor exprimiert. Editierungsausbeuten im Bereich um die 50% wurden erreicht. Bei sehr hoher Gabe von wt ADAR2 kam es zu weiteren off-target Editierungen im Reportergen, da Reparaturausbeuten von 50% jedoch auch bei deutlich niedriger ADAR Konzentration zugänglich waren, gelang die Reparatur frei von off-target Editierungen im Reportergen. Weiterhin gelang uns, zwei Gene durch die Gabe zweier guideRNA parallel zu editieren, nämlich eGFP und Luciferase. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass die guideRNAs in vivo sich etwas anders als in vitro benehmen. In vivo erhalten wir in der Regel die besten Editierungsausbeuten, wenn das zu editierende Adenosin mittig im guideRNA/mRNA-Duplex sitzt, also ca. 8 nt von der R/G-Sekundärstruktur entfernt. In vitro war die Abhängigkeit von der Position viel weniger ausgeprägt. Aufgrund des hohen Potentials zur Anwendung, befindet sich derzeit ein Patent zur Anmeldung in Vorbereitung und die Publikation der Ergebnisse kann erst nach der Patentierung erfolgen.

Während der Laufzeit des Antrags publizierte Arbeiten:

(1) Concept article: *Site-directed RNA editing with Antagomir-deaminases - a tool to study protein and RNA function*

P. Vogel, T. Stafforst*, *ChemMedChem* **2014**, 9, 2021.

(2) *Improving Directed RNA Editing In Vitro and in Cell Culture by Chemical Modification of the guideRNA*

P. Vogel, M. F. Schneider, J. Wettengel, T. Stafforst*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 6267.

(3) *Optimal guideRNAs for Re-directing Deaminase Activity of hADAR1 and hADAR2 in trans*

M. F. Schneider, J. Wettengel, P. C. Hoffmann, T. Stafforst*, *Nucl. Acids Res.* **2014**, 42, e87.

Ferner wurde ein Manuskript zur Publikation eingereicht

(4) *Site-directed RNA editing in vivo can be triggered by the light-driven assembly of an artificial riboprotein*

A. Hanswillemenke, T. Kuzdere, P. Vogel, G. Jékely, T. Stafforst*

(5) ein Patent zur R/G-Strategie wird demnächst angemeldet

(6) die entsprechende Publikation zu diesem Patent befindet sich in Vorbereitung