

Ein RNA-Deaminase-Konjugat ermöglicht die selektive Reparatur von Punktmutationen**

Thorsten Stafforst* und Marius F. Schneider

Die RNA-Modifikation ist ein wichtiger Mechanismus höherer Organismen zur Regulation und Diversifizierung ihrer Genprodukte.^[1–3] Typische Modifikationen sind die Pseudouridinylierung, die 2'-Hydroxymethylierung und die Adenosin-zu-Inosin (A-zu-I)-Editierung, die häufig in tRNA und rRNA auftreten. Im Unterschied zu anderen Modifikationen ist die Wirkung der A-zu-I-Editierung auf biochemische Reaktionen leicht vorhersagbar, denn Inosin wird vornehmlich als Guanosin gelesen. Folglich erzeugt die A-zu-I-Editierung formal eine A-zu-G-Punktmutation auf der RNA-Ebene. Dies bewirkt unter anderem 1) die hochspezifische Umprogrammierung einzelner Aminosäurekodons und 2) die Änderung des RNA-Spleißmusters durch Bildung oder Zerstörung von Spleißelementen.^[1,2] Außerdem beeinflusst eine A-zu-I-Editierung die RNA-Interferenz^[4] durch Umsetzen von pri-miRNAs.^[5,6] und Hypereditierung spielt eine Rolle in der viralen Abwehr.^[1] A-zu-I-Editierung ist für das Überleben höherer Organismen essentiell. Ein typisches Beispiel ist die ortsselektive Editierung des Glutamatrezeptors.^[1,2] Ein neueres Beispiel legt dar, wie A-zu-I-Editierung die Adaption an Umweltbedingungen ermöglicht.^[7] Der Blick in den genetischen Code zeigt, dass 12 der 20 kanonischen Aminosäuren (nämlich Asp, Glu, Asn, Gln, His, Lys, Arg, Ser, Thr, Tyr, Ile und Met/Start) sowie alle drei Stop-Kodons mittels Editierung verändert werden könnten. Da es sich bei diesen Aminosäuren um solche handelt, die essentiell für die Enzymkatalyse, für posttranslationale Modifikationen (Signaling) und für allgemeine Proteinfunktionen sind, erwarten wir, dass die gerichtete enzymatische Editierung solcher Kodons völlig neue Möglichkeiten zur Manipulation von RNAs und deren Proteinprodukten eröffnen wird.

Es wurde bereits gezeigt, wie man Pseudouridinylierungen^[8] und 2'-Hydroxymethylierungen^[9] umprogrammiert, um in die Genexpression einzugreifen. Dies ist denkbar einfach, da die entsprechenden Enzyme ohnehin mittels kurzer gRNAs zu ihren mRNA-Substraten dirigiert werden, sodass die Umprogrammierung der gRNA-Komponente ausreicht.^[10] Hingegen sind Adenosindeaminasen, die auf RNA

abzielen (ADARs), leider keine Riboproteine, sondern sie erkennen ihre Reaktionspartner mittels N-terminal lokalisierter dsRNA-bindender Domänen.^[1,2] Hinzu kommt, dass die für die Reaktion unerlässliche RNA-Sekundärstruktur im RNA-Substrat selbst vorliegen muss. Beides erschwert, ADAR-Enzyme zur spezifischen Reaktion mit neuen Substraten zu bringen. Dennoch wäre es höchst rational und wünschenswert, ADAR ähnlich einem Riboprotein nach den einfachen Watson-Crick-Basenpaarungsregeln zu adressieren. Um die Deaminase in ein gRNA-abhängiges Enzym zu verwandeln, wurde die C-terminale Domäne von hADAR1 (aa 798–1226) mit dem C-Terminus eines SNAP-Tags^[11] fusioniert, wobei alle natürlichen Substratbindungsdomänen (aa 1–797, Abbildung 1A) entfernt wurden. Das entsprechende Fusionsprotein wurde in Anlehnung an die Literatur exprimiert und aufgereinigt (siehe Hintergrundinformationen).^[12] Kovalente gRNA-Deaminase-Konjugate wurden durch chemoselektive Reaktion des SNAP-Tags mit 5'-O-Benzylguanin-modifizierter gRNA hergestellt (Abbildung 1B, Synthese der BG-gRNA siehe Hintergrundinformationen).^[11] Bei Substratkonzentrationen von ca. 1 μ M werden die Konjugate wie erwartet innerhalb von 30–60 min quantitativ gebildet (Abbildung 1C) und konnten, falls erwünscht, per Heparin-Ionenaustauscher aufgereinigt werden. Das UV-Spektrum des Konjugats überlappt gut mit der Summe der beiden Komponenten, SNAP-Deaminase und gRNA (Abbildung 1D). Da dem Konjugat die natürlichen Substratbindungsdomänen fehlen, erfüllt die gRNA gleich zwei Aufgaben: erstens die Bindung an das Substrat und zweitens die Bildung des Strukturmotivs, das eine effiziente Editierung erlaubt.

Zuerst untersuchten wir die Reparatur der Nonsense-Mutation Stop⁶⁶ (UAG) \rightarrow Trp⁶⁶ (UGG) im offenen Leserahmen (ORF) im Gen des cyan-fluoreszierenden Proteins (eCFP) (Abbildung 2A).^[13] Dieses Gen wurde aus zwei Gründen gewählt: Zum einen wird die Editierung durch ein positives Fluoreszenzsignal ausgelesen, zum anderen befinden sich nahe des Stop⁶⁶-Kodons keine weiteren Adenosinbasen, was eine unerwünschte Übereditierung ausschließt. Laut Literatur bildet ein ≥ 15 Basenpaare (bp) langer dsRNA-Duplex mit einem mittig gelegenen A/C-Fehlpaar das minimale Strukturmotiv für die effiziente Editierung, und zwar – bemerkenswerterweise – ausschließlich der fehlgepaarten Adenosinbase.^[14] Daher wurde eine aus 17 Nucleotiden (nt) bestehende gRNA entworfen, die die Zielbase (UAG) mittig in die gewünschten Umgebung platziert. Der Einfachheit halber wurde die Konjugation in situ durchgeführt, indem SNAP-Deaminase und BG-gRNA direkt zur Editierungsreaktion gegeben wurden, üblicherweise mit dem Protein in 1.3-fachem Überschuss über der gRNA, um den

[*] Dr. T. Stafforst, M. F. Schneider
Interfakultäres Institut für Biochemie, Universität Tübingen
Auf der Morgenstelle 15, 72076 Tübingen (Deutschland)
E-Mail: thorsten.stafforst@uni-tuebingen.de
Homepage: www.ifib.uni-tuebingen.de/forschung/stafforst.html

[**] Wir danken der DFG (1053/3-1), dem Fonds der Chemischen Industrie und der Universität Tübingen für großzügige Unterstützung sowie Christoph Kröner und Clemens Richert für die MALDI-TOF-Analysen.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201206489> zu finden.

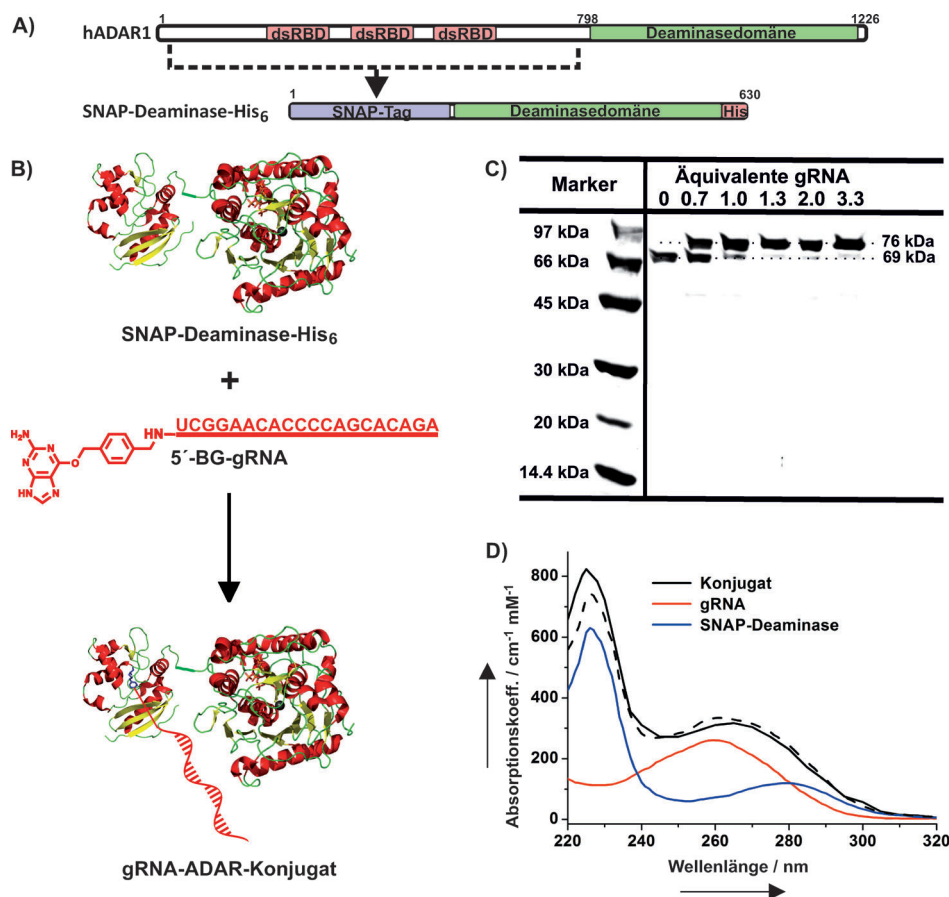


Abbildung 1. Überführen von hADAR1 in eine gRNA-abhängige Deaminase: A) Das SNAP-Deaminaseprotein besteht aus der katalytischen Domäne von hADAR1 (aa 798–1226) ohne natürliche Substratbindungsdomänen (dsRBD) fusioniert mit dem C-Terminus des SNAP-Tags. B) gRNA-Deaminase-Konjugate werden durch Reaktion der SNAP-Deaminase mit BG-gRNA gebildet. C) SDS-PAGE-Analyse (4–20%) der Konjugation nach Inkubation der SNAP-Deaminase (1.5 µM) mit unterschiedlichen Mengen 5'-BG-modifizierter gRNA (5'-r(UCGAUUGAACACCAUAGCAC)) für 2 h bei 30 °C. Die Proben wurden ohne weitere Reinigung geladen. SNAP-Deaminase 69 kDa; gRNA-Deaminase-Konjugat 76 kDa. D) UV-Spektrum der SNAP-Deaminase (blau), der gRNA (rot) und des Konjugats (schwarz). Die gestrichelte Linie stellt die Addition der Extinktionskoeffizienten der gRNA und der SNAP-Deaminase dar.

vollen Umsatz der gRNA zu erzwingen. Reaktionen wurden über einen Konzentrationsbereich der mRNA (500 nM bis hinab zu 10 nM) durchgeführt, der etwa den Konzentrationen von mittel bis stark exprimierten mRNAs in Säugetierzellen entspricht (10^3 – 10^5 Kopien/Zelle). Das Konjugat wurde gewöhnlich im 2- bis 10-fachen Überschuss über der mRNA eingesetzt. Editierungsreaktionen wurden durch Abfangen der gRNA mittels Hybridisierung mit einem Überschuss an revers-komplementärem ssDNA-Oligomer beendet. Die editierte mRNA wurde in cDNA revers transkribiert, durch Polymerasekettenreaktion (Taq) amplifiziert und anschließend analysiert.

Abbildung 2 zeigt ein typisches Ergebnis der gerichteten Editierung. Die Sequenzierung des ORF der mRNA nach reverser Transkription/PCR-Amplifikation belegt die ausgesprochen ortsspezifische A-zu-G-Umsetzung am adressierten UAG-Stop-Kodon in 60–90% Ausbeute (Hintergrundinformationen, Abbildung S2). Bemerkenswert ist, dass keine der

anderen 244 Adenosinbasen im ORF, nicht einmal in der Nachbarschaft, detektierbar editiert wurde. Allein auf Basis der cDNA-Sequenzierung könnte man die Qualität der RNA-Reparatur allerdings leicht falsch einschätzen, falls eine Übereditierung zufällig über alle 244 Adenosinbasen verteilt auftritt. Die cDNA editierter mRNA wurde daher amplifiziert (Taq), einer Doppelrestriktion unterzogen, in einen leeren Vektor ligiert und in kompetente *E. coli*-Zellen Typ T7 Express (New England Biolabs) transformiert. Nach Induktion mit IPTG (Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid) zeigten 50–75% der Zellen auf der Platte die erwartete cyanfarbene Fluoreszenz, was die Leichtigkeit aufzeigt, mit der die Funktionalität der Nonsense-mRNA wiederhergestellt werden kann (Abbildung 2C). Von diesen Platten wurden 24 Klone sequenziert, von denen die eine Hälfte den positiven und die andere Hälfte den negativen Fluoreszenzphänotyp aufwies. Wie erwartet enthielten alle 12 positiven Klone den wiederhergestellten Trp⁶⁶-Kodon (Hintergrundinformationen). Nur einer der 12 Klone hatte eine zusätzliche stille A-zu-G-Mutation erworben, die aus einer Übereditierung resultieren könnte. Unter

den 12 negativen Klonen war ebenfalls nur ein einziger Klon, der den reparierten Trp⁶⁶-Kodon enthielt, dessen Phänotyp jedoch durch eine weitere A-zu-G-Missense-Mutation zerstört war, welche aus einer Übereditierung resultieren könnte. Zusammengefasst zeigt dies auf, mit welcher Leichtigkeit die Deaminaseaktivität herangezogen werden kann, um einzelne Kodons selektiv unter geringer Nebenreaktion zu editieren.

Wesentlich ist auch, dass die Editierung strikt die kovalente Verknüpfung von Deaminase und gRNA erfordert. Obwohl das entsprechende Sekundärstrukturmotiv vorhanden ist, wird kein Umsatz über dem Hintergrund erhalten, wenn die Editierung in Gegenwart der unmodifizierten Amino-gRNA durchgeführt wird (Abbildung 2D und S3). Das Entfernen der natürlichen Substratbindungsdomänen hat offensichtlich die Erkennung des RNA-Motivs als Substrat so stark herabgesetzt,^[15] dass die kovalente Verknüpfung mit der Deaminase Voraussetzung für die RNA-Reparatur wird. Man

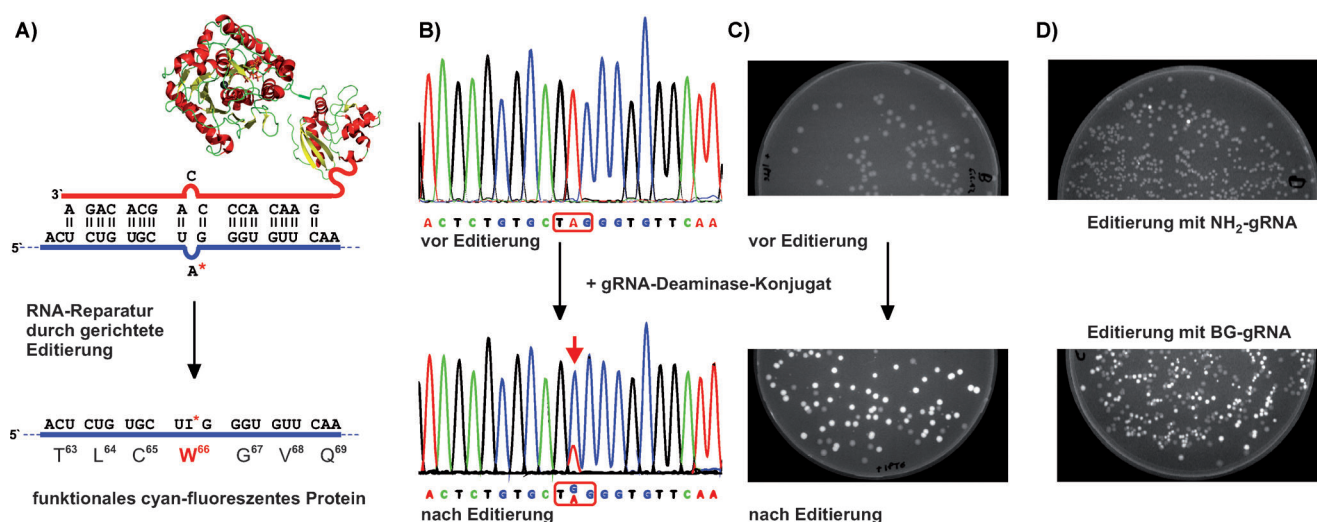


Abbildung 2. Reparatur der Stop⁶⁶-Nonsense-Mutation in *ecfp*-mRNA: A) Übersicht. B) Verfolgen der A-zu-G-Umsetzung mittels Sequenzierung nach reverser Transkription, [eCF-mRNA] = 100 nM; [BG-gRNA] = 1.0 μ M; [SNAP-Deaminase] = 1.3 μ M, 3 h. C) Plattenassay: Reparierte Gene erzeugen einen fluoreszierenden Phänotyp. D) Plattenassay, der die Abhängigkeit der gezielten Editierung von der Konjugation demonstriert: Eine Reparatur der RNA erfolgt nur mit BG-modifizierter gRNA und nicht mit unmodifizierter Amino-(NH₂)-gRNA.

kann daher erwarten, dass das Deaminasekonjugat nur eine geringe oder keine Umsetzung natürlicher ADAR-Substrate bewirkt. In Anlehnung an die Literatur^[16] wurde anfangs Cytosin als Gegenbase zur Zielbase gewählt. Unter den vier kanonischen Basen ist Cytosin tatsächlich die beste Wahl, gefolgt von Uridin. Die Purinbasen sind hingegen schlechte Substrate, und vor allem mit Guanotin wurde gar kein Umsatz beobachtet (Abbildung S4). Folglich ist die natürliche Präferenz von hADAR1 für Cytosin als Gegenbase im SNAP-Deaminase-Konjugat erhalten geblieben.

Um die Spezifität der gRNA-gerichteten Editierung nochmals auf die Probe zu stellen, wurde die Reparatur zwei weiterer nicht-fluoreszierender eGFP-Varianten (eGFP = grün-fluoreszierendes Protein) untersucht, nämlich C65Y (UAC) und G67S (AGC), die jeweils eine Missense-Punktmutation in unmittelbarer Nähe des leicht editierbaren Tyr⁶⁶-Kodons (UAU) enthalten (Abbildung 3 A und S5). Da Tyr⁶⁶ für die GFP-Fluoreszenz unerlässlich ist,^[17] muss dieser Kodon strikt vor Übereditierung geschützt werden. Die selektive Reparatur beider Punktmutationen gelang dennoch ohne Beeinträchtigung des Tyr⁶⁶-Kodons, indem die gRNA so entworfen wurde, dass der empfindliche Tyr⁶⁶-Kodon entweder nahe dem 5'- oder dem 3'-Terminus der gRNA liegt (Abbildung 3). Zwar war die Editierung etwas weniger effizient, ihre Selektivität ist aber bemerkenswert: Keine der anderen fünf Adenosinbasen im Bindungsbereich der gRNA wurde editiert. Dies wurde zusätzlich durch Sequenzierung von 20 Klonen bestätigt (Hintergrundinformationen).

Dass die Fluoreszenzspektren von eGFP und eCFP leicht unterscheidbar sind, kann genutzt werden, um die Reparatur einer mRNA in Gegenwart einer anderen zu untersuchen. Wurde die Editierung in Gegenwart beider Substrate, Y⁶⁵-eGFP- und Stop⁶⁶-eCFP-mRNA, nur mit Y⁶⁵-gRNA durchgeführt, so kam es ausschließlich zur Reparatur des ersten Substrats, deutlich sichtbar durch die Bildung grün-, aber

nicht cyan-fluoreszierender Kolonien (Abbildung S6). Die Zugabe von Stop⁶⁶-gRNA allein ergab in ähnlicher Weise ausschließlich cyan-fluoreszierende Kolonien, während beide Substrate in Gegenwart beider gRNAs repariert wurden. Dies zeigt, dass unsere Strategie die hochselektive Reparatur von G-zu-A-Punktmutationen selbst in Gegenwart sehr ähnlicher Gene ermöglicht.

Die Leichtigkeit, mit der die drei hier studierten Kodons (Stop, Tyr und Ser) repariert wurden, die hohe Selektivität der Adressierung, zusammen mit dem rationalen Design belegt das große Potential der gezielten Editierung zur Anwendung in der Medizin oder als Methode in der Grundlagenforschung. Die gezielte A-zu-I-Editierung könnte beispielsweise genutzt werden, um eine Enzymaktivität, eine posttranslationale Modifikation oder eine Protein-Protein-Interaktion zu unterdrücken, ohne dass dabei das Zielprotein oder dessen Transkript entfernt werden muss, wie dies bei den konventionellen Techniken der RNA-Interferenz^[18] und Cre/Lox-Rekombination^[19] der Fall ist. Für die Entschlüsselung einzelner Funktionen (Katalyse, Signaling, Interaktion) von Proteinen, die in Multienzymkomplexen eingebettet sind, könnte dies von besonderem Interesse sein. Weiterhin sind Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) die Ursache verschiedener schwerer Krankheiten etwa des Nervensystems, des Blutes oder von Krebs.^[20] Chemisch stabilisierte^[21] gRNA-Deaminase-Konjugate könnten möglicherweise helfen, derartige genetische Krankheiten auszugleichen, sobald die Proteintransduktion^[22] ausreichend effizient gelingt.

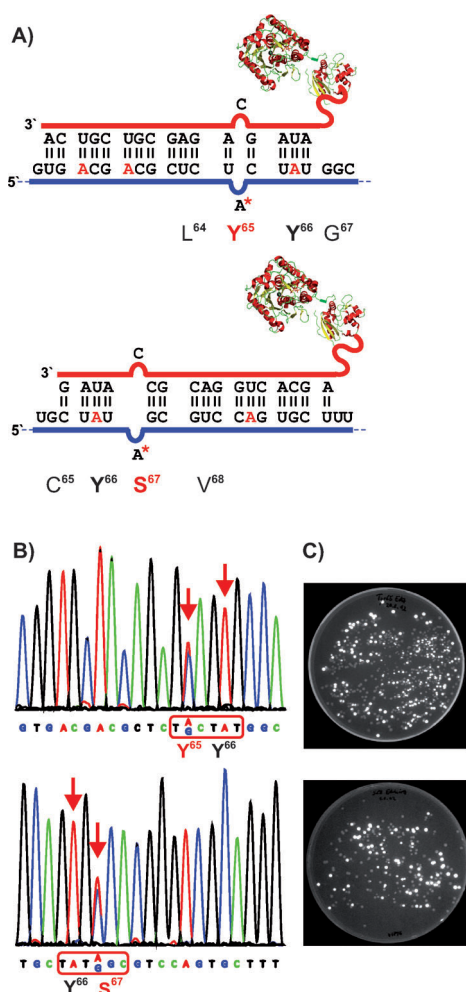


Abbildung 3. Gerichtete Editierung anspruchsvoller Substrate: A) Die Reparatur der Punktmutationen C65Y (UAC) und G67S (AGC) erfolgt in Gegenwart weiterer A-haltiger Kodons, insbesondere Tyr⁶⁶ (UAU). B) Die Sequenzierung der cDNA zeigt die hochselektive Editierung beider Zielkodons ohne Übereditierung an irgendeiner der anderen fünf Adenosinbasen. C) Die Reparatur der mRNAs wurde im Plattenassay durch den positive Fluoreszenzphänotyp bestätigt. Die Sequenzanalyse einzelner Klone ist in den Hintergrundinformationen zu finden.

Experimentelles

Editierungsreaktionen wurden direkt im Puffer zur reversen Transkription (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 2 μM Heparin, pH 8.3) bei mRNA-Konzentrationen zwischen 50 und 100 nM und in Gegenwart von 5–10 Äquivalenten Konjugat durchgeführt. Konjugate wurden in situ durch Zugabe von BG-gRNA und SNAP-ADAR erzeugt, mit letzterem im 1.3-fachen Überschuss. Reaktionsmischungen wurden für 3 Zyklen [30°C/30 min + 37°C/30 min] inkubiert, und die Editierung wurde durch

Zugabe eines 15-fachen Überschusses eines revers-komplementären ssDNA-Oligomers gestoppt. Der Editierung folgte die reverse Transkription und PCR-Amplifizierung mit Taq-DNA-Polymerase. Per Sequenzierung oder Plattenassay wurden die PCR-Transkripte analysiert. Im letzteren Fall wurden die PCR-Transkripte doppelt verdaut (XhoI/NheI), in einen leeren pMG211-Vektor ligiert und in kompetente *E. coli*-Zellen vom Typ T7 Express transformiert. Nach dem Ausplattieren auf LB-Ampicillin/IPTG wurde die Editierungseffizienz aus der Anzahl fluoreszierender versus nicht-fluoreszierender Kolonien bestimmt. Einzelne Klone wurden sequenziert, um ihren Genotyp auf ungewollte Übereditierung hin zu untersuchen.

Eingegangen am 11. August 2012

Online veröffentlicht am 4. Oktober 2012

Stichwörter: Deaminierungen · Genreparatur · Proteinmodifikation · RNA · RNA-Editierung

- [1] M. F. Jantsch, M. Öhman, S. Brenner, *Nucleic Acids Mol. Biol.* **2008**, *20*, 51–84.
- [2] a) B. L. Bass, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 817–846; b) S. M. Rueter, C. M. Burns, S. A. Coode, P. Mookherjee, R. B. Emeson, *Science* **1995**, *267*, 1491–1494.
- [3] H. Grosjean, *Top. Curr. Genet.* **2005**, *12*, 1–22.
- [4] A. K. Das, G. G. Carmichael, *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 217–220.
- [5] W. Yang, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 13–21.
- [6] Y. Kawahara, B. Zinshteyn, P. Sethupathy, H. Iizasa, A. G. Hatzigeorgiou, K. Nishikura, *Science* **2007**, *315*, 1137–1140.
- [7] S. Garrett, J. J. C. Rosenthal, *Science* **2012**, *335*, 848–851.
- [8] J. Karijovich, Y.-T. Yu, *Nature* **2011**, *474*, 395–398.
- [9] X. Zhao, Y.-T. Yu, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 95–100.
- [10] Y.-T. Yu, R. M. Terns, M. P. Terns, *Top. Curr. Genet.* **2005**, *12*, 223–262.
- [11] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 86–89.
- [12] M. R. Macbeth, B. L. Bass, *Methods Enzymol.* **2007**, *424*, 319–331.
- [13] R. Heim, R. Y. Tsien, *Curr. Biol.* **1996**, *6*, 178–182.
- [14] A. Herbert, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 12132–12137.
- [15] M. R. Macbeth, A. T. Lingam, C. P. Hill, B. L. Bass, *Science* **2005**, *309*, 1534–1539.
- [16] S. K. E. E. Wong, S. Sato, D. W. Lazinski, *Mol. Biol.* **2001**, *846*–858.
- [17] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509–544.
- [18] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806–811.
- [19] H. Gu, J. D. Marth, P. C. Orban, H. Mossman, K. Rajewsky, *Science* **1994**, *265*, 103–106.
- [20] The International SNP Map Working Group, *Nature* **2001**, *409*, 928–933.
- [21] J. Krützfeldt, N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nature* **2005**, *438*, 685–689.
- [22] Y. Yang, N. Ballatori, H. C. Smith, *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61*, 269–276.