

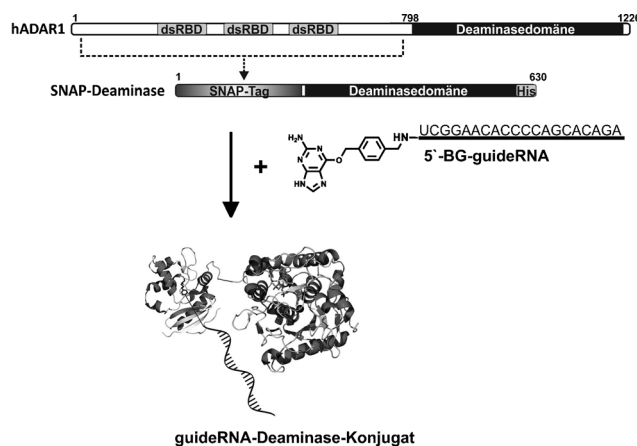
Chemisch modifizierte guideRNAs verbessern die ortsgerichtete RNA-Editierung in vitro und in Zellkultur**

Paul Vogel, Marius F. Schneider, Jacqueline Wettengel und Thorsten Stafforst*

Abstract: Antagomir-ähnliche guideRNAs adressieren die Adenosin-zu-Inosin-Editierung an beliebige mRNAs. Vor allem in der Zelle verbesserte die massive chemische Modifikation die enzymatische Wirkung der kovalenten Konjugate aus guideRNA und SNAP-ADAR. Die gezielte Modifikation der guideRNA mit einzelnen Modifikationen ermöglicht die Kontrolle der Selektivität und wurde zur Reparatur der Faktor-5-Leiden-Mutation eingesetzt.

RNA-Editierung ermöglicht die Umprogrammierung genetischer Information auf der RNA-Ebene.^[1] Je nach Position, an der eine einzelne Adenosinbase zu Inosin umgesetzt wird (A-zu-I), erzielt man ein anderes Ergebnis. Im offenen Leserahmen bewirkt eine Editierung die Substitution einzelner Aminosäuren; im nichtkodierenden Bereich wird die RNA-Prozessierung beeinflusst. Durch die zielgerichtete Editierung einzelner Stellen in einer (pre)-mRNA gelingt daher die Manipulation der RNA- und Proteinfunktion mit großem Potenzial zur Anwendung in Grundlagenforschung und Medizin (Transkriptreparatur). Kürzlich haben wir eine Strategie zur Assemblierung einer künstlichen guideRNA-abhängigen Maschine vorgestellt, die es ermöglicht, RNA-Editierung gezielt unter Anwendung der einfachen Watson-Crick-Basenpaarungsregeln an beliebige Kodons zu adressieren.^[2] Nun berichten wir über mehrere Verbesserungen dieses Verfahrens und zeigen, dass es prinzipiell in Zellkultur anwendbar ist.

Zur gezielten Editierung haben wir die Protein-adressierte humane Deaminase ADAR1 („Adenosine Deaminase Acting on RNA“) in ein guideRNA-abhängiges Enzym verwandelt. Dies gelang, indem wir die C-terminale katalytische Domäne an ein SNAP-Tag fusionierten (Schema 1).^[2] Das SNAP-Tag^[3] ermöglicht die Bildung definierter 1-zu-1-Konjugate mit guideRNAs, welche 5'-terminal mit einem O₆-Benzylguanin (BG) ausgestattet sind. In solchen Konjugaten erfüllt die RNA zwei Aufgaben: Erstens lenkt sie die Deaminase zur beabsichtigten Stelle auf einer beliebigen mRNA. Zweitens bildet sie die RNA-Sekundärstruktur, die



Schema 1. guideRNA-abhängige Deaminasen. Die N-terminalen RNA-Substratbindedomänen (dsRBD) werden durch ein SNAP-Tag ersetzt, welches die Bildung definierter 1-zu-1-Konjugate mit kurzen guideRNAs ermöglicht, wenn sie 5'-terminal mit O-Benzylguanin (BG) modifiziert sind. Die guideRNA adressiert die Editierungsaktivität an neue mRNA-Substrate.

zur effizienten und selektiven Editierung einer einzelnen Adenosinbase notwendig ist, ohne dass dabei benachbarte Basen übereditiert werden. Besonders attraktiv ist die modulare Natur des Ansatzes, durch welche die Maschine auf nahezu jedes Ziel programmiert werden kann, indem eine passende guideRNA entworfen wird.

Punktmutationen (SNP) können einen starken Effekt auf die Prozessierung eines Transkripts oder auf die Funktion eines Proteins haben.^[4] Folglich stehen viele SNP in direktem Zusammenhang mit Krankheiten. Die formale Umprogrammierung von Adenosin zu Guanosin ermöglicht es der A-zu-I-Editierung, Phänotypen genetischer Erkrankungen zu modellieren, zu reparieren oder abzuschwächen.^[5] Die Anwendung in Forschung oder Therapie erfordert jedoch das Wirken der RNA-Proteinkonjugate in der Zelle. Die direkte Transduktion der Konjugate dürfte schwierig sein.^[6] Eine Alternative wäre die Expression der Editierungsmaschine in einem genetisch veränderten Tier oder Zellmodell. Während das SNAP-ADAR-Protein genetisch kodierbar ist, benötigt die guideRNA strikt die Modifikation mit der BG-Gruppe.^[3] Im Hinblick auf Anwendungen in vivo interessierten wir uns daher für die Stabilisierung der guideRNA durch chemische Modifikation.

Antisense-Oligomere sind in der Regel global am Rückgrat modifiziert.^[7] Ein typisches Beispiel sind die Antagomirs,^[8] welche global 2'-O-Methylgruppen, terminal Phosphothioatgruppen und eine einzelne Cholesteringruppe ent-

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

[**] Wir danken Prof. Dr. Alfred Nordheim für die Hilfestellung bei Zellkultur und Fluoreszenzmikroskopie. Wir danken der DFG (STA 1053/3-1), dem Fonds der Chemischen Industrie und der Universität Tübingen für die großzügige Unterstützung.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201402634> zu finden.

halten. Derartige Modifikationen machen die Sonden nukleaseresistent, sodass eine langanhaltende Blockade von microRNAs (mehr als eine Woche) durch einmalige Transfektion erzielt werden kann.^[8] Die hohe Lipophilie unterstützt das Überwinden der Zellmembran und erhöht die Mobilität zwischen Zellkern und Zytosol.^[9] Das Cholesterin wiederum ermöglicht eine rezeptorvermittelte Aufnahme in verschiedene Gewebe, sodass die Gabe zusätzlicher Transfektionshilfen unnötig wird.^[8] Folglich wurden Wirkungen von Antagomirs in Mäusen bei systemischer Gabe beschrieben, die mit bemerkenswert geringer Toxizität und Immunogenität einhergingen.^[10]

Für RNAs, die katalytisch aktive Proteinkomplexe adressieren, etwa der Antisense-Strang einer siRNA im RISC, ist die Situation komplexer. Da sie ihre Aufgabe in der aktiven Tasche eines Proteinkomplexes erfüllen, sind sie viel weniger für chemische Modifikationen empfänglich.^[11] Dennoch wurde gezeigt, dass sich Modifikationen an ausgewählten Stellen^[12] positiv auf die Pharmakokinetik, Selektivität,^[13] Toxizität und Immunogenität^[14] auswirken. Verschiedene Modifikationen, etwa 2'-O-Methyl, 2'-Fluor und LNA werden verwendet.^[11,14]

Eine große Hürde auf dem Weg zur In-vivo-Anwendung wäre genommen, wenn die Deaminasedomäne chemisch modifizierte guideRNAs als Substrate bei der Editierung von mRNAs akzeptiert. Um die Editierung nicht total zu blockieren, mussten wir die Stellen und den Modifikationsgrad umsichtig optimieren. Wir wählten 2'-O-Methylierung und terminale Phosphothioate aus, da sie besonders einfach zu synthetisieren und kommerziell günstig erhältlich sind, und schließlich haben sie sich in zahlreichen Anwendungen bewährt.^[7–15] In unserem In-vitro-Reparaturassay^[2] an Stop66-eCFP-mRNA mit der optimierten 17-nt-guideRNA testeten wir systematisch die Akzeptanz der Editierung gegenüber 2'-O-Methylgruppen. Wie zu erwarten, wird die Editierung vollständig blockiert, wenn man ein Proteinkonjugat verwendet, dessen guideRNA drei 2'-Methoxygruppen direkt gegenüber der Zielbase platziert (vergleiche Abbildung 1B und 1A). Bereits früher wurde gezeigt, dass stark modifizierte Nukleinsäureanaloga die RNA-Editierung inhibieren.^[16] Wenn man gegenüber der Zielbase jedoch nur eine einzelne 2'-Methoxygruppe verwendet, so ist eine Inhibition zwar noch gegeben, aber diese ist nicht mehr vollständig (ca. 50 % Inhibition, Abbildung 1C). Bemerkenswerterweise wirken einzelne Modifikationen in unmittelbarer Nähe der Gegenbase gar nicht oder nur sehr mäßig auf die Ausbeute der Editierung ein (Abbildung 1D,E). Die volle Inhibition erfordert also die kooperative Wirkung mehrerer benachbarter 2'-Modifikationen. Schließlich testeten wir eine guideRNA, die dicht mit 2'-Methoxygruppen ausgestattet war und nur eine kleine Lücke von drei natürlichen Ribonukleotiden um die Zielbase herum enthielt. Zusätzlich enthielt dieses Oligomer zwei 5'-terminale und vier 3'-terminale Phosphothioatmodifikationen, wie dies auch Antagomirs typischerweise haben.^[8] Obwohl der resultierende 17-nt-Duplex an der guideRNA massiv chemisch modifiziert war, wurden ausgesprochen gute Editierungsausbeuten von $\geq 80\%$ erzielt (Abbildung 1F). Antagomir-ähnliche guideRNAs werden demnach gut von der Deaminasedomäne akzeptiert, solange

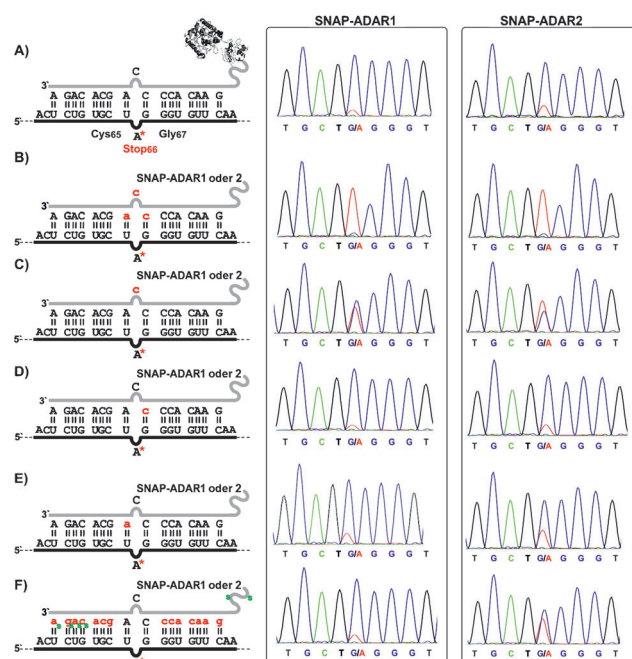


Abbildung 1. Effekt chemisch modifizierter guideRNAs auf die Editierung des Stop66-Kodons in eCFP-mRNA (mRNA schwarz; guideRNA grau; die Zielbase ist mit einem Sternchen markiert; 2'-OME-modifizierte Basen sind rot in Kleinbuchstaben, Phosphothioatverknüpfungen grün mit „s“ markiert). Editierungsausbeuten wurden aus dem Verhältnis der Flächen von Adenosin (rot) und Guanosen (blau) in den Sequenzierspuren für SNAP-ADAR1 (links) und SNAP-ADAR2 (rechts) abgeschätzt. Editierungsbedingungen: 3 h bei 30/37 °C; 50 nM mRNA, 500 nM BG-guideRNA, 650 nM SNAP-ADAR1 oder -ADAR2, 75 mM KCl, 25 mM Tris-HCl, 10 mM DTT, 0.75 mM MgCl₂, 2 μ M Heparin, pH 8.3). Eine vollständige Sequenzierung ist in den Hintergrundinformationen (Abbildung S3) gezeigt.

sie eine minimale Aussparung (3 nt) entlang der Zielstelle enthalten.

Nukleinsäure-abhängige Enzyme tolerieren chemische Modifikationen typischerweise schlechter. Gpmpere etwa, die RNaseH-Aktivität umadressieren, erfordern eine Aussparung von 7 bis 10 nichtmodifizierten Deoxyribonukleotiden,^[17] während der Antisense-Strang von siRNAs zwar 2'-Fluor^[12] gut akzeptiert, aber unter globaler 2'-Methoxylierung^[7,8,11] vollständig funktionslos ist. Generell wird bei siRNAs ein niedriger Grad an Modifikation empfohlen.^[11] Unser Befund ist demnach unerwartet aber folgenreich: Es sollte möglich sein, SNAP-ADAR-Proteine in Zellkultur oder in einem Tier zu exprimieren und die RNA- oder Proteinfunktion durch die Gabe chemisch stabilisierter guideRNAs zu manipulieren.

Um dies zu illustrieren exprimierten wir SNAP_F-ADAR1 und den fluorogenen Reporter unter Kontrolle des CMV-Promotors transient in HEK-293T-Zellen und stimulierten die Transkriptreparatur durch Lipofektion der guideRNA. SNAP_F-ADAR1 und Stop66-eCFP wurden dazu in den pcDNA3.1-Vektor kloniert. Wildtyp(Trp66)-eCFP diente als Positivkontrolle. Die Cotransfektion beider Plasmide in einem 1-zu-1-Verhältnis erfolgte im 24-Loch-Format mittels Lipofectamine 2000. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, gleichmäßig auf 96-Loch-Platten verteilt

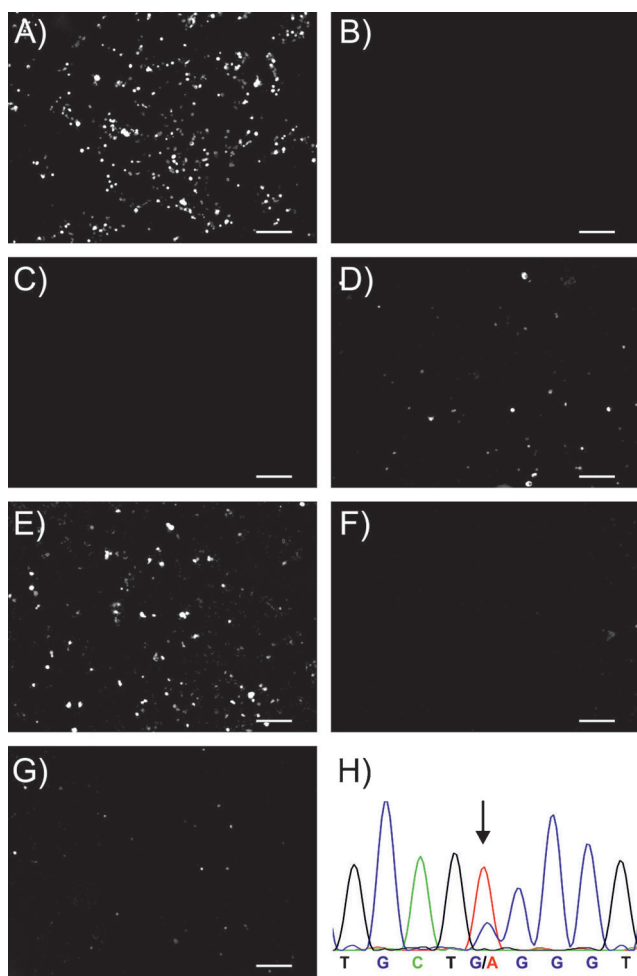


Abbildung 2. Gerichtete RNA-Editierung in 293T-Zellen. Zellen wurden mit gleichen Mengen Reportergen (Stop66-eCFP oder Wildtyp) und SNAP₇-ADAR1 (oder leerer Vektor) cotransfiziert. Nach 24 h wurden guideRNAs transfiziert und weitere 24 h später der Phänotyp im Fluoreszenzmikroskop analysiert. A) Positivkontrolle (wt eCFP mit SNAP₇-ADAR1 und BG-Antagomir-guideRNA); B) Negativkontrolle 1 (Stop66-eCFP/leerer pcDNA3.1/BG-Antagomir-guideRNA); C) Negativkontrolle 2 (Stop66-eCFP/SNAP₇-ADAR1/keine guideRNA); D)–G) Experimente mit Stop66-eCFP/SNAP₇-ADAR1 und verschiedenen guideRNAs: D) Standard-BG-guideRNA; E) BG-Antagomir-guideRNA; F) Standard-NH₂-guideRNA; G) NH₂-Antagomir-guideRNA. Der Messbalken beträgt 200 µm. H) Sanger-Sequenzierung der extrahierten RNA aus Zellen, die wie in Experiment (E) behandelt wurden. Details zur Zellkultur stehen in den Hintergrundinformationen.

und für weitere 24 h inkubiert, worauf die Lipofektion mit verschiedenen guideRNAs folgte (50 pMol in 150 µL pro Loch). Nach einem Tag Inkubation wurde der Fluoreszenzphänotyp im Mikroskop ausgewertet.

Während die Positivkontrolle (Abbildung 2A) eine klar sichtbare Fluoreszenz aufwies, konnte keine Fluoreszenz gemessen werden, wenn das nichtfunktionale Stop66-eCFP in Gegenwart von SNAP₇-ADAR1 oder die BG-modifizierten Antagomir-ähnlichen guideRNA allein exprimiert wurde (Abbildung 2B,C). Weitere Kontrollen finden Sie in Abbildung S6. CFP-Fluoreszenz war hingegen nachweisbar, wenn Stop66-eCFP mit SNAP₇-ADAR1 coexprimiert und

anschließend mit unserer Standard-BG-modifizierten guideRNA ohne 2'-Methoxy- und Phosphothioatgruppen transfiziert wurde (Abbildung 2D). Im Vergleich zur Positivkontrolle war die Zahl hell leuchtender Zellen jedoch gering. Um die Wirkung chemischer Modifikationen zu untersuchen, transfizierten wir Stop66-eCFP und SNAP₇-ADAR1 coexprimierende Zellen auch mit der BG-modifizierten Antagomir-ähnlichen guideRNA. Im Vergleich zur Standard-guideRNA (Abbildung 2D) zeigte die chemisch stabilisierte guideRNA (Abbildung 2E) eine markante Zunahme an fluoreszierenden Zellen. Dies belegt klar die erwarteten Vorteile der chemischen Modifikation in der zellulären Anwendung.

In vitro profitiert die Editierung stark von der kovalenten Konjugation zwischen guideRNA und Deaminase. Setzt man statt der BG-modifizierten die 5'-aminomodifizierten guideRNAs ein, so erhält man je nach den Bedingungen eine Reduktion oder ein vollständiges Ausbleiben der Editierung.^[2] Entsprechend testeten wir die zelluläre Transkriptreparatur auch in Gegenwart der NH₂-guideRNAs. Wie erwartet wurde die eCFP-Fluoreszenz gar nicht (Abbildung 2F) oder kaum (Abbildung 2G) wiederhergestellt, wenn guideRNAs verwendet wurden, die die Deaminase nicht über eine kovalente Bindung adressieren können. Offensichtlich erfolgt die kovalente Konjugation in der Zelle ausreichend schnell und ist Voraussetzung für eine effiziente Transkriptreparatur. Für die Umsetzung BG-modifizierter Gruppen, etwa Fluorophore, mit der hier verwendeten SNAP₇-Tag-Variante wurde die Kinetik der Konjugation zu $2,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt und es wurde gezeigt, dass diese ausreicht zur Anwendung im Zytosol lebender Zellen.^[18]

Um zu belegen, dass der Fluoreszenzphänotyp tatsächlich aus der Editierung des Stop66-Kodons resultiert, extrahierten wir die gesamte RNA aus den Zellen, entfernten mögliche DNA-Kontaminationen mit DNase I, revers-transkribierten die eCFP-mRNA mit einem spezifischen Primer und amplifizierten die cDNA mit Taq-PCR. Im Einklang mit der Fluoreszenzmikroskopie zeigte die Sequenzierung die höchste Editierungsausbeute mit der Antagomir-ähnlichen guideRNA (Abbildung 2H) und keine sichtbare Editierung in der Negativkontrolle, in der SNAP-ADAR1 ohne guideRNA transfiziert wurde (Abbildung S7A). Natürliche Editierungsenzyme erreichen, ähnlich unserem In-vitro-Ansatz zur gerichteten Editierung, eine sehr selektive und bis zu quantitative Editierung. Da im Zellassay viele Parameter, etwa die Länge, Sequenz, Modifikation, Konzentration und Transfektion der guideRNA noch optimiert werden können, ebenso wie das Verhältnis und die Transfektion des Reportergens und des SNAP-ADAR-Gens, gehen wir davon aus, dass sich die Ausbeuten noch weiter steigern lassen werden.

Als letzte Kontrolle transfizierten wir Stop66-eCFP und SNAP₇-ADAR1 coexprimierende Zellen mit einer 2'-Methoxy-Phosphothioat-modifizierten BG-guideRNA, die am Trp-Kodon 58, also 24 nt stromaufwärts des Zielkodons bindet. Während diese BG-guideRNA fähig ist, eine Stop58-Mutation in GFP zu reparieren, ist sie nicht in der Lage, die Stop66-Mutation in eCFP zu reparieren (Abbildung S6H, S7F). Dieses Ergebnis ist in Einklang mit unserer experimentellen Erfahrung. Die Umadressierung der RNA-Editie-

rung ist hoch selektiv und erfordert die Positionierung der Zielbase in eine definierte Sekundärstruktur.^[2]

Die chemische Modifikation der guideRNA sollte zusätzlich die Substratspezifität in zellulären Anwendungen verbessern, da die zufällige Bindung an teilkomplementäre Sequenzen im Transkriptom seltener eine ungewollte Fehl-editierung nach sich zieht.^[15] Chemische Modifikationen sollten jedoch nicht nur die pharmakologischen Eigenschaften, etwa die Plasmahalbwertszeit, oder Nebeneffekte reduzieren, sondern könnten weiterhin die Editierungsselektivität verbessern. Wir veranschaulichen dies mit der Reparatur der Faktor-5-Leiden-Mutation. Diese krankheitsauslösende $G^{1746} \rightarrow A$ -Punktmutation stellt den häufigsten genetischen Risikofaktor für die erbliche, multifaktorielle Thrombophilie in der weißen Bevölkerung dar.^[19] Aufgrund der Punktmutation kommt es zum Austausch einer einzelnen Aminosäure ($R534 \rightarrow Q$) an der Protein-C-abhängigen Schnittstelle R533R534 des Blutgerinnungsfaktors F5. Während der heterozygote Defekt das Thromboserisiko nur leicht erhöht (etwa 8-fach) verursacht der homozygote Defekt einen wesentlich stärkeren Effekt (> 80 -fach gesteigertes Risiko).^[19] Die gerichtete RNA-Editierung hat das Potenzial, derartige Defekte auf der RNA-Ebene auszugleichen. Ein Blick ins Gen legt allerdings einen ausgesprochen schwierigen, adenosinreichen Sequenzkontext an der Zielbase offen (Abbildung 3); und der Glutaminkodon ($5'$ -CAA) ist schwieriger zu aktivieren als der Amber-Stopkodon.^[2b,20]

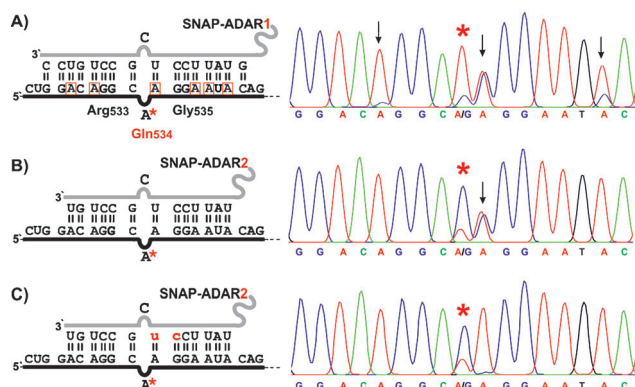


Abbildung 3. Reparatur der F5-Leiden-Mutation. Mögliche Stellen der Übereditierung sind durch rote Boxen, übereditierte Basen sind durch Pfeile und die Zielstelle durch ein Sternchen markiert. Editierungsbedingungen: 50 nM R534Q F5 mRNA, 200 nM BG-guideRNA, 350 nM SNAP-ADAR1/2; 3 h at 30/37 °C in 75 mM KCl, 25 mM Tris-HCl, 10 mM DTT, 0.70 mM MgCl₂, pH 8.3. Eine Übersicht zur Editierung aller guideRNAs mit SNAP-ADAR1 und -ADAR2 befindet sich in den Hintergrundinformationen zusammen mit einer vollständigen Sequenzspur (Abbildung S4, S5).

Wir studierten die Reparatur an einem 1000 nt langen F5-Transkript, welches die F5-Leiden-Mutation mittig enthält. Dies war für unseren Assay^[2] erforderlich, da sowohl die F5 pre-mRNA (> 70 kb) als auch die reife mRNA (7 kb) zu groß sind.^[19d] Wir begannen die Reparaturstudie mit einer 17 nt langen guideRNA, die die Zielbase mittig in guideRNA/mRNA-Duplex über A-C-Fehlpaarung adressiert. Wenn gleich keine der 330 Adenosinbasen außerhalb der Helix

editiert wurde, so fanden wir doch eine massive Übereditierung an benachbarten Basen im guideRNA/mRNA-Duplex (Abbildung 3A). Im Einzelnen wurde Editierung an vier Stellen beobachtet, wobei die Zielbase kaum aktiviert war ($\leq 20\%$ Ausbeute). Die höchste Ausbeute wurde direkt neben der Zielbase erreicht (ca. 50%). Da bekannt war, dass ADAR2 die Q/R-Seite des Glutamaterezeptors quantitativ editiert,^[1] wechselten wir die Deaminasedomäne in SNAP-ADAR von hADAR1 zu hADAR2 und machten uns dabei die Modularität unseres Ansatzes zunutze (Details siehe Hintergrundinformationen). In der Tat half dies, den $5'$ -CAA-Kodon beachtlich zu aktivieren (ca. 70% Ausbeute, Abbildung 3B). Eine Verkürzung der guideRNA von 17 auf 14 nt war ausreichend, um die Übereditierung am Rand der Sekundärstruktur zu unterdrücken; die Übereditierung an der benachbarten Base blieb jedoch unverändert hoch (ca. 50%, Abbildung 3B). Die vorangestellten Experimente zu den $2'$ -O-methylierten guideRNAs (Abbildung 1A–G) deuteten darauf hin, dass das Einbringen von $2'$ -Methoxygruppen eine Unterdrückung der Übereditierung in diesem heiklen Kodonkontext ermöglichen könnte. Um eine Wirkung an der Zielbase zu vermeiden, setzten wir nur zwei Modifikationen an die guideRNA, eine gegenüber der Übereditierungsstelle und die andere gegenüber des benachbarten Guanosins. Tatsächlich wurde die Übereditierung effizient unterdrückt, während die Editierung an der Zielbase unverändert blieb, mit ungefähr 70% Ausbeute (Abbildung 3C). Derartige Reparaturausbeuten sollten ausreichen, den krankhaften Phänotyp deutlich abzuschwächen.^[19] Chemische Modifikationen an der guideRNA sind also nicht nur nützlich um die Nukleaseresistenz zu steigern, sondern stellen auch ein Mittel zur Feinabstimmung der Editierungsselektivität dar.

Zusammenfassend haben wir die Anwendbarkeit der gerichteten RNA-Editierung zur gezielten RNA-Reparatur demonstriert. Die chemische Modifikation hat sich dabei als zuverlässiges Mittel herausgestellt, um Überreaktionen zu unterdrücken und die Selektivität zu steuern. Sogar massive chemische Modifikation, global mit $2'$ -Methoxy und terminal mit Phosphothioaten, wird akzeptiert, solange eine kleine Lücke von drei natürlichen Ribonukleotiden gelassen wird. Weiterhin konnten wir das Funktionieren des Verfahrens in der Zelle belegen. Nach unserem Wissen ist dies das erste Beispiel für das Zusammenfügen eines enzymatisch aktiven kovalenten Konjugats aus einem Protein und einem Nukleinsäureanalogon in der Zelle. Dies dürfte auch eine attraktive Strategie zur räumlich und zeitlich kontrollierten Assemblierung von Proteinarrays darstellen.^[21] Im Unterschied zu konkurrierenden Strategien, welche die Protein-RNA-Wechselwirkung über das MS2- oder λ N-Phagensystem^[21,22] verwenden, sind unsere guideRNAs ausgesprochen kurz, denn zusätzliche Erkennungsstrukturen wie BoxB (19 nt) und Linker (10–20 nt), welche derartige guideRNAs ≥ 60 nt lang werden lassen,^[22] sind nicht erforderlich. Unsere stabilisierten, 20 nt kurzen guideRNAs sind sehr gut für die Transfektion geeignet und sollten klein genug sein, um keine Immunantwort auszulösen.^[7–15] Die Notwendigkeit, unsere guideRNAs zu transfizieren anstatt sie zu exprimieren, ermutigt uns, über Möglichkeiten nachzudenken, weitere chemische Modifikationen einzubringen, etwa, um die Editie-

rung lichtregulierbar zu machen. Unsere Ergebnisse verbessern die Aussicht auf die In-vivo-Anwendung der gerichteten Editierung in Grundlagenforschung und Medizin deutlich. In letzterem Sinne demonstrierten wir hier die erste Reparatur einer krankheitsrelevanten, sinnverändernden Punktmutation in vitro. Dies erforderte den Austausch der Deaminasedomäne im SNAP-Fusionsprotein von hADAR1 zu hADAR2 und die umsichtige chemische Modifikation der guideRNA, um den Zielkodon in seinem herausfordernden, adenosinreichen Sequenzkontext selektiv zu editieren. Die hohe Modularität der SNAP-Deaminasen hebt in Kombination mit ihrer nützlichen Toleranz gegenüber chemischen Modifikationen das große Potenzial dieses Ansatzes zur zielgerichteten RNA-Reparatur hervor.

Eingegangen am 21. Februar 2014

Stichwörter: Antagomir · Erbkrankheiten · Nukleinsäureanalogon · RNA-Editierung · Transkriptreparatur

- [1] a) K. Nishikura, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 321–349; b) B. L. Bass, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 817–846; c) S. M. Rueter, C. M. Burns, S. A. Coode, P. Mookherjee, R. B. Emeson, *Science* **1995**, *267*, 1491–1494.
- [2] a) T. Stafforst, M. F. Schneider, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 11329–11332; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11166–11169; b) M. F. Schneider, J. Wettengel, P. C. Hoffmann, T. Stafforst, *Nucl. Acids Res.* **2014**, DOI: 10.1093/nar/gku272.
- [3] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *21*, 86–89.
- [4] The International SNP Map Working Group, *Nature* **2001**, *409*, 928–933.
- [5] a) T. W. Woolf, J. M. Chase, D. Stinchcomb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 8298–8302; b) T. M. Woolf, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 341.
- [6] M. Rapoport, H. Lorberboum-Galski, *Expert Opin. Drug Delivery* **2009**, *6*, 453–463; b) S. R. Schwarze, A. Ho, A. Vocero-Akbani, S. F. Dowdy, *Science* **1999**, *285*, 1569–1572; c) Y. Yang, N. Ballatori, H. C. Smith, *Mol. Pharmaceutics* **2002**, *61*, 269–276.
- [7] a) M. D. Horwich, P. D. Zamore, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1537; b) R. Kole, A. R. Krainer, S. Altman, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2012**, *11*, 125–140.
- [8] J. Krützfeldt, N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nature* **2005**, *438*, 685–689.
- [9] a) R. L. Juliano, X. Ming, O. Nakagawa, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 147–157; b) P. Lorenz, T. Misteli, B. F. Baker, C. F. Bennett, D. L. Spector, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 582–592.
- [10] a) A. Bonauer, G. Carmona, M. Iwasaki, M. Mione, M. Koyanagi, A. Fischer, J. Burchfield, H. Fox, C. Doebele, K. Ohtani, E. Chavakis, M. Potente, M. Tjwa, C. Urbich, A. M. Zeiher, S. Dimmeler, *Science* **2009**, *324*, 1710–1713; b) M. Trajkovski, J. Haussler, J. Soutschek, B. Bhat, A. Akin, M. Zavolan, M. H. Heim, M. Stoffel, *Nature* **2011**, *474*, 649–654; c) S. Dimmeler, et al., *Nature* **2013**, *416*, 107–111.
- [11] a) A. Birmingham, E. Anderson, K. Sullivan, A. Reynolds, Q. Boese, D. Leake, J. Karpilow, A. Khvorova, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2068–2078; b) J. B. Bramsen, M. B. Laursen, A. F. Nielsen, T. B. Hansen, C. Bus, N. Langkjaer, B. R. Babu, T. Hojland, M. Abramov, A. Van Aerschot, D. Odadzic, R. Smicius, J. Haas, C. Andree, J. Barman, M. Wenska, P. Srivastava, C. Zhou, D. Honcharenko, S. Hess, E. Müller, G. V. Bobkov, S. N. Mikhailov, E. Fava, T. F. Meyer, J. Chattopadhyaya, M. Zerial, J. W. Engels, P. Herdewijn, J. Wengel, J. Kjems, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 2867–2881.
- [12] T. P. Prakash, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4247–4253.
- [13] A. L. Jackson, J. Burchard, D. Leake, A. Reynolds, J. Schelter, J. Guo, J. M. Johnson, L. Lim, J. Karpilow, K. Nichols, W. Marshall, A. Khvorova, P. S. Linsley, *RNA* **2006**, *12*, 1197–1205.
- [14] a) V. Hornung, M. Guenther-Biller, C. Bourquin, A. Ablasser, M. Schlee, S. Uematsu, A. Noronha, M. Manoharan, S. Akira, A. de Fougères, S. Endres, G. Hartmann, *Nat. Med.* **2005**, *11*, 263–270; b) J. Soutschek, A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M. Donoghue, S. Elbashir, A. Geick, P. Hadwiger, J. Harborth, M. John, V. Kesavan, G. Lavine, R. K. Pandey, T. Racie, K. G. Rajeev, I. Rohl, I. Toudjarska, G. Wang, S. Wuschko, D. Bumcrot, V. Kotliarsky, S. Limmer, M. Manoharan, H. P. Vornlocher, *Nature* **2004**, *432*, 173–178.
- [15] a) Y.-L. Chiu, T. M. Rana, *RNA* **2003**, *9*, 1034–1048; b) M. M. Fabani, M. J. Gait, *RNA* **2008**, *14*, 336–346; c) J. Elmén, M. Lindow, S. Schütz, M. Lawrence, A. Petri, S. Obad, M. Lindholm, M. Hedtjörn, H. F. Hansen, U. Berger, S. Gullans, P. Kearney, P. Sarnow, E. M. Straarup, S. Kauppinen, *Nature* **2008**, *452*, 896–900; d) J. Soutschek, *Nature* **2004**, *432*, 173–178; W. P. Kloosterman, A. K. Lagendijk, R. F. Ketting, J. D. Moulton, R. H. A. Plasterk, *PLoS Biol.* **2007**, *5*, 1738–1749; e) aktuelle Übersicht: N. M. Snead, J. J. Rossi, *Nucleic Acid Ther.* **2012**, *22*, 139.
- [16] R. A. Mizrahi, N. T. Schirle, P. A. Beal, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 832–839.
- [17] J. E. Lee, C. F. Bennett, T. A. Cooper, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 4221–4226.
- [18] A. Gautier, A. Juillerat, C. Heinis, I. R. Correa, Jr., M. Kindermann, F. Beaufils, K. Johnsson, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 128–136.
- [19] a) S. Khan, J. D. Dickerman, *Thromb. J.* **2006**, *4*, 15–32; b) E. G. Bovill, S. J. Hasstedt, M. F. Leppert, G. L. Long, *Thromb. Haemostasis* **1999**, *82*, 662–666; c) B. Zöller, P. G. de Frutos, A. Hillarp, B. Dahlbäck, *Haematologica* **1999**, *84*, 59–70; d) J. L. Kujovich, *GeneReviews* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1368/>; e) D. C. Rees, M. Cox, J. B. Clegg, *Lancet* **1995**, *346*, 1133–1134.
- [20] J. M. Egginton, T. Greene, B. L. Bass, *Nat. Commun.* **2011**, *2*, DOI: 10.1038/ncomms1324.
- [21] a) C. J. Delebecque, A. B. Lindner, P. A. Silver, F. A. Aldaye, *Science* **2011**, *333*, 470–474; b) F. C. Simmel, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2012**, *23*, 516–521; c) C. M. Agapakis, P. M. Boyle, P. A. Silver, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 527–535.
- [22] M. F. Montiel-Gonzales, I. Vallecillo-Viejo, G. A. Yudowski, J. C. Rosenthal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, DOI: 10.1073/pnas.1306243110.