

Julian Grünewald: Tüfteln für die Translation

„Ich wollte in die Entwicklung einer neuen Technologie involviert sein“

An diesen Oktoberabend des Jahres 2017 erinnert sich Julian Grünewald, als sei es gestern gewesen. Er lag wach in seiner Wohnung nahe dem Bunker Hill Monument, wo der Freedom Trail von Boston endet, und fand keinen Schlaf. Seine Gedanken kreisten um eine Frage, die ihn nicht losließ: Wäre es möglich, dass bestimmte Baseneditoren, mit deren Hilfe DNA neuerdings punktgenauer als mit CRISPR-Cas-Genschere verändert werden konnte, unerwünschte Eingriffe an der RNA vornahm? An der DNA wurden solche Off-Target-Effekte sorgfältig untersucht und reduziert, aber an der RNA schien sie niemand zu beachten. Dabei könnten sie doch auch dort Nebenwirkungen auslösen. Er stand auf und durchsuchte auf seinem Rechner bis nachts um drei alle verfügbaren Paper zu diesem Thema. In zwei Publikationen von 1987 wurde er fündig: Das Enzym APOBEC1, essenzieller Baustein des ersten Baseneditors, war ursprünglich in der RNA-Forschung entdeckt und charakterisiert worden. Die Hypothese, dass DNA-Baseneditoren ungewollt RNA-Veränderungen auslösten, war also begründet. Grünewald beschloss, ihr experimentell nachzugehen. Das legte die Basis für seine Karriere im Labor von Keith Joung am Massachusetts General Hospital (MGH), einem der weltweit renommiertesten Forscher im Feld der Geneditierung, trug ihm ein Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft ein und mündete schon 2019 in zwei Publikationen in den Top-Journalen *Nature* und *Nature Biotechnology*.

Geneditierung ohne Doppelstrangbruch

Als eine Weiterentwicklung der CRISPR-Cas-Technik waren Baseneditoren von Joungs Kollegen David Liu und dessen Post-Docs Alexis Komor und Nicole Gaudelli erst 2016/17 am Broad-Institut in Boston erfunden worden. CRISPR-Cas-Systeme bestehen aus zwei Teilen: Einer RNA, die in Spiegelschrift die Adresse eines beliebigen DNA-Abschnitts enthält, und einem damit verknüpften Enzym Cas9, das den Doppelstrang der DNA dort durchschneidet, wo es von dieser RNA hingeführt wird, wodurch die DNA-Sequenz modifiziert werden kann. Auch wenn CRISPR-Cas-Genschere die DNA

heute sehr genau editieren können, so durchtrennen sie die Doppelhelix dabei doch immer komplett. Jeder Doppelstrangbruch aber birgt das Risiko in sich, dass die nachfolgenden DNA-Reparaturmechanismen nicht exakt genug gelingen und es zu Mutationen kommt. Bei Baseneditoren dagegen handelt es sich um dreiteilige Systeme: Neben der Führungs-RNA und einem Cas-Enzym, das nur einen Strang der Helix zerschneidet, ist eine Deaminase an Cas gekoppelt. Das ist ein Enzym, das Aminogruppen abspaltet und dadurch zum Beispiel die Base Cytosin in die Base Uracil verwandeln kann - und zwar auf dem intakten Strang der Helix, den Cas durch einen Einzelstrangsschnitt des gegenüberliegenden Strangs freigelegt hat. Im Zuge der anschließenden Reparatur des zerschnittenen Einzelstrangs wird das gegenüberliegende Uracil, das ja eigentlich eine RNA-Base ist, als Vorlage genutzt und dauerhaft in Thymin umgewandelt. Im Endeffekt hat dieser Editor an einer einzigen Stelle des Doppelstrangs also C-G in T-A umgewandelt. Eine andere Klasse von Editoren kann A-T in G-C umwandeln.

Mit unvoreingenommenem Blick

Als Julian Grünewald den Einfall mit den unerwünschten RNA-Effekten der Baseneditoren hatte, arbeitete er erst seit vier Monaten als Post-Doc im Labor von Keith Joung. Warum ausgerechnet ihm damals diese doch eigentlich naheliegende Idee kam? „Mein Vorteil war sicher, dass ich den Blick des Außenstehenden hatte“, sagt Grünewald. Denn von Genomeditierung habe er vorher wenig Ahnung gehabt und habe sich als Novize auf diesem Gebiet noch auf einer „steilen Lernkurve“ befunden. Zwar hatte er während seiner Doktorarbeit Feuer für die Forschung gefangen und sich eine Zukunft als *physician scientist* vorstellen können, anschließend aber doch fünf Jahre „ganz normal“ als Assistenzarzt in der Nephrologie des Universitätsklinikums Freiburg gearbeitet. Den einsetzenden Siegeszug von CRISPR-Cas verfolgte er damals vorwiegend in wissenschaftsjournalistischen Artikeln der Publikumspresse. Auch in Freiburg sei ihm eine Post-Doc-Stelle angeboten worden. „Aber ich bin ein Tüftler“, sagt Grünewald. „Ich wollte in die Entwicklung einer neuen Technologie involviert sein, die Patienten zugute kommen kann, also translationales Potential hat.“ Da schien ihm die Genomeditierung wie gerufen zu kommen. Also wurde er initiativ und schrieb eine Reihe von E-Mail-Anfragen an einige ausgezeichnete US-Labors. Antworten blieben meist aus. Deshalb unternahm er im Winter eine zweiwöchige Ivy-League-Tour entlang der amerikanischen Ostküste, um sich wo immer möglich persönlich vorzustellen. „Ich habe nie damit hinter dem Berg gehalten, dass ich methodisch von Geneditierung keine Ahnung hatte, mich aber brennend dafür interessierte.“ Freundliche Absagen waren die Folge. Keith Joung aber spürte, wie

ernsthaft der junge Arzt für sein Feld brannte und wieviel Energie er bereit sein würde, dafür einzusetzen. Er stellte ihn ein. „Da hatte ich großes Glück, ich hatte vorher wirklich überhaupt keine Connections.“ Die Chemie zwischen ihm und Joung habe einfach von vorneherein gestimmt.

Baseneditoren mit besserer Sicherheit

Keith Joung war beeindruckt von der „Kreativität und Unerschrockenheit“ seines neuen Mitarbeiters, als dieser ihm vorschlug, das Ausmaß unerwünschter RNA-Editierung beim Einsatz von APOBEC1 durch Hochdurchsatzsequenzierung im Transkriptom menschlicher Zellkulturen festzustellen. Er ließ ihm freie Hand. Auch wenn RNA-Moleküle im Gegensatz zur DNA schnell abgebaut werden und nur vorübergehend vorhanden sind, so waren in Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen doch schon unspezifische RNA-Editierungen beschrieben worden. Grünwald ging ans Werk und bestätigte, dass Baseneditoren, die an bestimmten Stellen der DNA Cytosin in Uracil umwandeln, nebenbei ungewollt zehntausende von Zielen auf RNA-Molekülen ansteuern und verändern.¹ Bei dieser Erkenntnis ließ er es nicht bewenden. Er konstruierte vielmehr im nächsten Schritt Baseneditoren mit drastisch verringerter Off-Target-Aktivität und vielfach höherer Sicherheit, indem er deren Deaminasen durch „Protein Engineering“ bearbeitete.^{1,2} Und als krönenden Abschluss seiner Arbeit an Baseneditoren entwickelten er und sein Team solche, die dank einer dualen Deaminase sowohl Cytosin als auch Adenin gezielt und mit minimalen RNA-Seitensprüngen verwandeln können³. Darüber hinaus entwarf er Editoren, die auf der DNA C-G in G-C umwandeln können - eine chemisch noch kompliziertere Reaktion, deren Bewältigung ihm seine erste Letztautorenschaft eintrug.⁴

Kurze Wege von der Idee zur Innovation

Die Arbeitsatmosphäre und Teamarbeit in Joungs Lab sei außerordentlich inspirierend gewesen, sagt Grünwald, der von seinem Mentor wiederum für seine große Begeisterungs- und Führungsfähigkeit gelobt wird. Was ihn an Boston fasziniert habe, sagt Grünwald, seien die vielen smarten Wissenschaftler und die „Pipeline“ zwischen akademischer Forschung und Biotech-Industrie innerhalb eines überschaubaren Ökotops, nicht als direkte Zusammenarbeit, sondern zur schnelleren Umsetzbarkeit von Forschungsergebnissen, im Sinne der Patienten. Ein Beispiel hierfür sei die Bostoner Firma Verve, die jüngst, nur 4 Jahre nach Gründung, die erste klinische Studie mit einem Baseneditor begonnen hat, um dessen Verträglichkeit und Wirksamkeit für die Behandlung einer erblich bedingten

Fettstoffwechselstörung zu prüfen. „Dass man eine neue Technologie in so kurzer Zeit in die klinische Prüfung bringt, ist eine unglaubliche und inspirierende Leistung.“

Der jüngste Spross der CRISPR-Familie

„Eine ganze Ecke komplexer“ als CRISPR-Cas-Genschere und Baseneditoren, sagt Grünewald, seien Prime-Editoren, die 2019 von Andrew Anzalone und David Liu am Broad Institute entwickelt wurden. Mit deren Erforschung hat er schon in Boston begonnen - und setzt sie seit Februar 2022 auf einer befristeten Tenure-Track-Proessur an der Technischen Universität München (TUM) fort. Ähnlich wie Baseneditoren durchschneiden Prime-Editoren an den DNA-Stellen, zu denen sie ihre Führungs-RNA steuert, nur einen Einzelstrang. Anders als bei Baseneditoren sind ihre Cas-Scheren nicht mit einer Deaminase verknüpft, sondern mit einer reversen Transkriptase (RT). Das sind Enzyme, die RNA in DNA umschreiben. Die RNA, die sie umschreiben werden, tragen Prime-Editoren als Appendix ihrer Führungs-RNA mit sich: Es ist das Spiegelbild des neuen DNA-Abschnittes, der an der Schnittstelle eingebaut werden soll. Prime-Editoren können bis zu 30 neue Basen-Buchstaben in einen DNA-Text einschreiben oder bis zu 80 Buchstaben daraus entfernen. „Das ist die Obergrenze“, sagt Grünewald. „Aber Insertionen bis zu 10 Basen funktionieren oft gut.“ Sein langfristiges Ziel ist die Anwendung von Prime-Editoren für die Behandlung bestimmter Herzkrankheiten. Mit ihrer exzellenten Aufstellung in der Zell- und Gentherapie sei die kardiologische Abteilung des Klinikums rechts der Isar der TU München für ihn dafür ein optimaler Ort.

Herausforderung Herzmuskelzelle

Bisher ist die Leber das bevorzugte solide Zielorgan therapeutischer Genomeditierung. Der Herzmuskel ist dagegen noch Neuland, bei dessen Erkundung TUM-Forschende Pionierarbeit leisten. „Die Herzmuskelzelle ist eine besondere Herausforderung“, sagt Grünewald. Denn anders als Leberzellen, die sich unentwegt regenerierten, blieben sie ein Leben lang dieselben und stellten deshalb höchste Ansprüche an ihre Integrität auf DNA-Ebene. Zudem könne man *in vitro* keine menschlichen Herzmuskelzellen halten und müsse deren Äquivalente deshalb aus induzierten pluripotenten Stammzellen heranziehen. Dieser Herausforderung stellt sich Grünewald mit der ihm eigenen Zuversicht. Er will eine Punktmutation auf dem *LMNA*-Gen adressieren, die eine schwere dilatative Kardiomyopathie verursacht, eine Art Aussackens des Herzens, bei dem es seine Schlagkraft mehr und mehr verliert. Eine Editierung dieser Mutation wäre die einzige Möglichkeit, diese Erkrankung ursächlich zu behandeln. Die Alternative wäre eine Herztransplantation. „Ich habe

hier als neuer *Principal Investigator* eine Nische gefunden, die klinisch relevant ist und meinem Engineering-Interesse entspricht“, sagt Grünewald. Er ist erst vor kurzem ins Emmy-Noether-Nachwuchsprogramm der DFG aufgenommen worden. „Ich bin superglücklich, jetzt kann ich meine Forschungsgruppe optimal aufbauen.“ Mit ihrem Life Sciences Bridge Award will ihn die Aventis Foundation auf seinem Weg zu einer unbefristeten Professur unterstützen.

Author: Joachim Pietzsch, Wissenswort

¹ Grünewald, J., Zhou, R., Garcia, S. P., Iyer, S., Lareau, C. A., Aryee, M. J., & Joung, J. K. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors. *Nature*, 569(7756), 433–437 (2019)

² Grünewald, J., Zhou, R., Iyer, S., Lareau, C. A., Garcia, S. P., Aryee, M. J., & Joung, J. K. - CRISPR DNA base editors with reduced RNA off-target and self-editing activities. *Nature Biotechnology*, 37(9), 1041–1048 (2019)

³ Grünewald, J.* , Zhou, R.* , Lareau, C. A., Garcia, S. P., Iyer, S., Aryee, M. J., & Joung, J. K. - A Dual-Deaminase CRISPR Base Editor Enables Concurrent Adenine and Cytosine Editing. *Nature Biotechnology*. 38(7), 861-864 (2020)

⁴ Kurt, I. C.* , Zhou, R.* , Iyer, S., Garcia, S. P., Miller, B. R., Langner, L. M., Grünewald, J.# & Joung, J. K.# - CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells. *Nature Biotechnology* 39(1), 41-46 (2021)