

Designer-Organellen

Selektive RNA-Modifizierung durch OREOs

LUKAS SCHARTEL^{1,2}, EDWARD A. LEMKE^{1,3}

¹ BIOCENTER, UNIVERSITÄT MAINZ

² DEPARTMENTS OF BIOLOGY AND CHEMISTRY, INTERNATIONAL MAX PLANCK RESEARCH SCHOOL ON CELLULAR BIOPHYSICS, MAINZ

³ INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY, MAINZ

RNA modifications are key regulators of cellular processes, yet selectively introducing these modifications into target RNAs remains challenging. We developed “designer organelles” to perform highly selective, guide-RNA-driven pseudouridylation of mRNA in living cells. Circular guide RNAs further enhance modification efficiency and specificity. These orthogonal RNA editing organelles (OREOs) thus represent a versatile new approach to precise RNA modification, with promising applications from basic research to therapeutic interventions.

DOI: 10.1007/s12268-025-2500-2

© The Author(s) 2025

■ RNA-Modifikationen sind essenziell für zahlreiche zelluläre Prozesse. Unter ihnen nimmt das Pseudouridin (Ψ), ein Uridin-Isomer, eine besondere Rolle ein, da es RNA-Strukturen stabilisiert und die Translations-effizienz beeinflusst. Insbesondere besitzt Ψ die einzigartige Fähigkeit, Stopcodons zu unterdrücken, was zur Therapie genetischer Erkrankungen genutzt werden könnte, die durch vorzeitige Stopcodons in Genen entstehen. Verfrühte Stop-Signale in mRNAs resultieren in der Produktion von verkürzten Proteinen die oft nicht-funktional sind. Mehr als 10 % aller Erbkrankheiten werden durch solch vorzeitige Stopcodons verursacht[1]. Einige aktuelle Ansätze zur Verwendung von Pseudouridin in diesem Bereich beruhen auf der Überexpression zytoplasmatischer Enzyme, was zu Off-Target-Effekten führen kann.

Andere nutzen endogene Enzyme, die jedoch nur eine geringe Effizienz aufweisen [2, 3].

Designer-Organellen zur gezielten RNA-Modifikation

Um diese Limitierungen zu überwinden, haben wir ein System entwickelt, das RNA-selektive Modifikationen durch maßgeschneiderte Organellen ermöglicht. Diese Designer-Organellen (*Orthogonal RNA Editing Organelles*, OREOs) sind inspiriert von dem Konzept der Phasentrennung. Phasentrennung (*phase separation*) beschreibt den Vorgang, bei dem Biomoleküle, z. B. Proteine und Nukleinsäuren, ab einer gewissen Konzentration in der Zelle spontan hochkonzentrierte Tröpfchen formen. Der Unterschied in der Konzentration zwischen dem Inneren des Tropfen und der Umgebung in der das

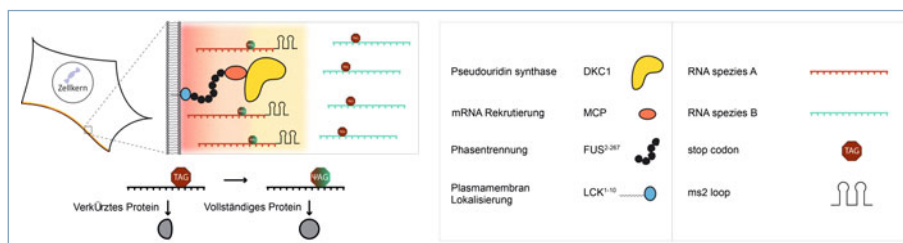
Tröpfchen schwimmt, kann schnell 1000fach sein. Ähnlich wie Öltröpfchen in Wasser entstehen dabei abgegrenzte Bereiche mit spezifischen chemischen Eigenschaften, die sich dennoch im ständigen Austausch mit der Umgebung befinden. Um den Konzentrationsunterschied noch weiter zu erhöhen, haben wir in unserer Publikation Tropfen quasi auf eine Membran geklebt, wodurch eine Film-artige Designer-Organelle generiert wurde. Diese Filme erlauben es, RNA-Modifikationsenzyme gezielt lokal anzureichern und bestimmte mRNA-Moleküle räumlich zu konzentrieren. Dadurch erhöht sich die Selektivität der gewünschten RNA-Modifikation, während *Off-target*-Effekte im restlichen Zytoplasma reduziert werden (**Abb. 1, Abb.2**).

Um diese Prinzipien in die Praxis umzusetzen, werden unsere OREOs aus Fusionsproteinen gebildet, die aus einer Membrananker-Domäne (LCK), einer intrinsisch ungeordneten und multivalenten Region des Proteins FUS welche die Präferenz hat mit sich selbst zu interagieren und Phasentrennung zu begünstigen. Weiterhin wird im Film eine kleine RNA-bindende Domäne (MCP) und die Pseudouridin-Synthase Dyskerin (DKC1) angereichert, die mithilfe einer *guide*-RNA (gRNA) ein gezieltes Uridin zu Pseudouridin in der Ziel mRNA umwandeln kann. Die zu modifizierende RNA wird über spezifische RNA-Loops (*ms2-loops*), welche an MCP binden, gezielt in das OREO rekrutiert und dadurch überwiegend lokal durch das DKC1 modifiziert.

In Zellkulturexperimenten konnten wir zeigen, dass die selektive Pseudouridinylierung mit OREOs deutlich effizienter ist als mit endogenen Enzymen und spezifischer erfolgt als mit konventionellen zytoplasmatischen Systemen, also solchen Systemen, die einfach im Zytoplasma exprimiert werden und keine Tröpfchen oder Filme bilden [4]. Die selektive Modifikation konnten wir zusätzlich auf RNA-Ebene mittels Nanopore- und Bisulfite-Sequenzierung bestätigen.

Zirkuläre guide-RNAs erhöhen die Effizienz der Modifikation

Zur weiteren Effizienzsteigerung implementierten wir zirkuläre gRNAs (*circ-gRNAs*), die



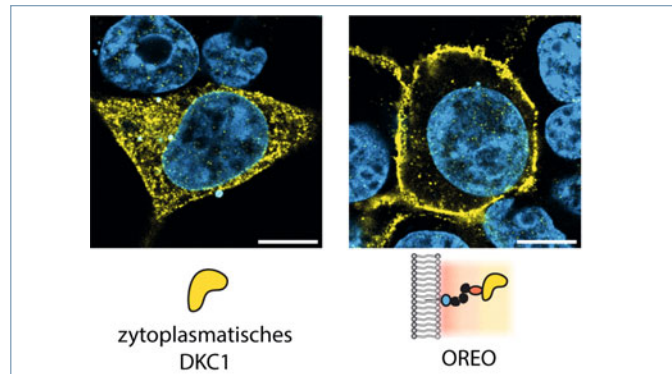
▲ **Abb. 1:** Aufbau des OREO-Systems durch verschiedene Protein-Domänen. Vorzeitige Stopcodons können durch Modifizierung mit Pseudouridin überlesen werden und es kann ein vollständiges Protein hergestellt werden. Das OREO bildet eine Film-artige Organelle an der Plasmamembran wobei es eine RNA die mit *ms2 loops* modifiziert ist selektiv rekrutieren und mithilfe einer *guide*-RNA (nicht dargestellt) modifizieren kann.

durch eine Ribozym-vermittelte Autokatalyse gebildet werden und keine freien 5' und 3' Enden besitzen. Circ-gRNAs sind exonuklease-resistent und stabiler als lineare gRNAs[5]. Durch Verwendung dieser circ-gRNAs erhöhte sich der Anteil erfolgreich modifizierter Ziel-mRNA signifikant, was insbesondere bei Krankheit-relevanten mRNAs interessant ist.

Anwendungspotenzial bei genetischen Erkrankungen

Um das Anwendungspotenzial unseres OREO-Systems bei genetischen Erkrankungen zu demonstrieren, untersuchten wir ein Zellmodell für die Hereditäre Fruktoseintoleranz. Bei dieser Erbkrankheit führt eine Mutation im Gen für das Enzym Aldolase B dazu, dass Betroffene Fruktose-1-phosphat nicht abbauen können. In unserem Experiment erhielten HEK293T-Zellen Gene für zwei mRNAs: eine krankheitsrelevante Variante des Aldolase-B-Gens (*ALDOB*) sowie zusätzlich eGFP, das hier als Modell für eine unerwünschte Off-target-RNA dient. Beide Gene enthielten ein vorzeitiges Stopcodon wodurch zunächst kein vollständiges Protein erzeugt wurde. Nur das *ALDOB*-Gen war zusätzlich mit ms2-loops ausgestattet, sodass es gezielt in die OREOs rekrutiert und dort bevorzugt modifiziert werden konnte. Dadurch sollte in Anwesenheit von OREOs überwiegend das *ALDOB*-Transkript effizient modifiziert werden, während eGFP unbeeinflusst bleibt. Die Produktion von eGFP diente hier bewusst als Marker für unspezifische Modifikationen: Je weniger eGFP in den Zellen nachweisbar war, desto selektiver arbeitete unser System. Tatsächlich stellten wir fest, dass Zellen mit OREOs bevorzugt Aldolase B produzierten, während eGFP kaum nachweisbar war. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen mit im Zytoplasma exprimiertem DKC1 sowohl Aldolase B als auch eGFP, was auf reduzierte Selektivität hinweist. Der Unterschied zeigte sich deutlich im Verhältnis von Aldolase B zu eGFP in OREO-haltigen Zellen (**Abb. 3B**).

Die OREO-Technologie erlaubt es, dass nur Schlüsselkomponenten angereichert werden müssen. Obwohl DKC1 normalerweise als Heterotetramer Komplex aktiv ist, musste nur DKC1 mit einem Signal ausgestattet werden, um sich im OREO anzureichern. Das reduziert die Gene die verändert werden müssen dramatisch, und steigert dadurch die Chance, dass sich eventuell ein therapeutisches Konzept entwickeln lassen könnte.



▲ **Abb. 2:** Fluoreszenzmarkierung von DKC1 (gelb) in HEK293T-Zellen. Der Zellkern wurde mit DAPI gefärbt (blau). Das OREO zeigt eine klar Plasmamembran-assoziierte Lokalisation. Skalierung: 10 µm

Unsere Methode öffnet eine Tür für potenzielle therapeutische Anwendungen der selektiven RNA-Modifikation mit Pseudouridin.

Danksagung

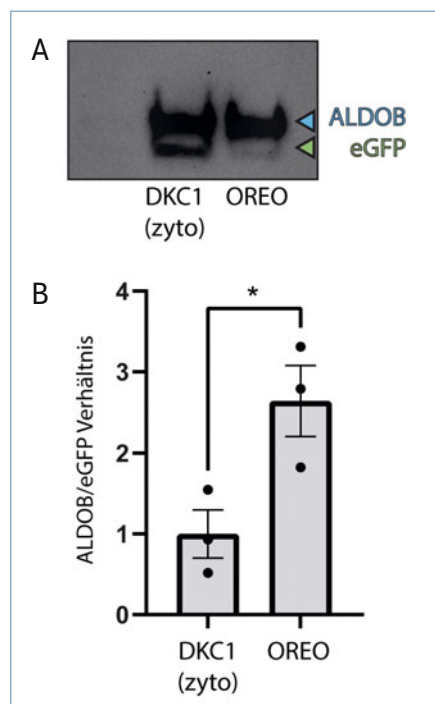
Wir danken den Core Facilities am IMB sowie den Core Facilities des Fachbereichs 10 der Johannes-Gutenberg-Universität für ihre Unterstützung. Weiterhin danken wir den

Mitarbeiter:innen der gesamten Labore von Gerber, Helm und Lemke. Die Arbeit wurde durch das European Research Council (ADG MultiOrganelleDesign) und die Volkswagen Stiftung gefördert. Zudem danken wir für die Förderung durch den SFB1551 „Polymer concepts on Cellular function“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG-Projektnummer 464588647).

Literatur

- [1] Martins-Dias P, Romão L (2021) Nonsense suppression therapies in human genetic diseases. *Cell Mol Life Sci* 78:4677–4701.
- [2] Song J, Dong L, Sun H, et al (2023) CRISPR-free, programmable RNA pseudouridylation to suppress premature termination codons. *Molecular Cell* 83:139–155.e9.
- [3] Adachi H, Pan Y, He X, et al (2023) Targeted pseudouridylation: An approach for suppressing nonsense mutations in disease genes. *Molecular Cell* 83:637–651.e9.
- [4] Scharfel L, Jann C, Wierzeiko A, et al (2024) Selective RNA pseudouridylation in situ by circular gRNAs in designer organelles. *Nat Commun* 15:9177.
- [5] Litke JL, Jaffrey SR (2019) Highly efficient expression of circular RNA aptamers in cells using autocatalytic transcripts. *Nat Biotechnol* 37:667–675.

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/ die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



▲ **Abb. 3:** Intrazelluläre Lokalisation des OREO-Systems. **A**, Differenzielle Protein Expression nach RNA-Modifikation mit zytoplasmatischem (zyto) DKC1 und OREO. Nachweis der Proteine ALDOB/GFP mit Antikörper zeigen das Zellen mit OREOs bevorzugt ALDOB herstellen im Gegensatz zu Zellen mit zyto DKC1 Expression. **B**, Für OREOs ist ein mehr als 2.5-faches Verhältnis von ALDOB/eGFP messbar. Es wurde ein ungepaarter zweiseitiger T-Test durchgeführt (n=3; p= 0,0359, *p<0,05) und der Standardfehler des Mittelwertes ist dargestellt.



Lukas Scharfel (links) und Edward A Lemke

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Edward A. Lemke
 Biocenter
 Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
 Hanns-Dieter-Hüsch-Weg 17
 D-55128 Mainz
 edlemke@uni-mainz.de