

Epigenetische Genom-Editierung

Genom-Editierung ohne die DNA-Sequenz zu verändern – geht das?

PASCAL Y. SCHÖNBERG, LI DING, FRANK BUCHHOLZ

MEDIZINISCHE SYSTEMBIOLOGIE, MEDIZINISCHE FAKULTÄT CARL GUSTAV CARUS, TU DRESDEN

Epigenetic genome engineering expands our capabilities from modifying the DNA sequence to controlling its regulation. It provides the ability to change epigenetic marks at defined genomic loci to control gene expression without the need for an intervention in the genetic code. This short review touches on current approaches of epigenetic editing with a focus on long-term gene silencing.

DOI: 10.1007/s12268-023-1882-2

© Die Autoren 2023

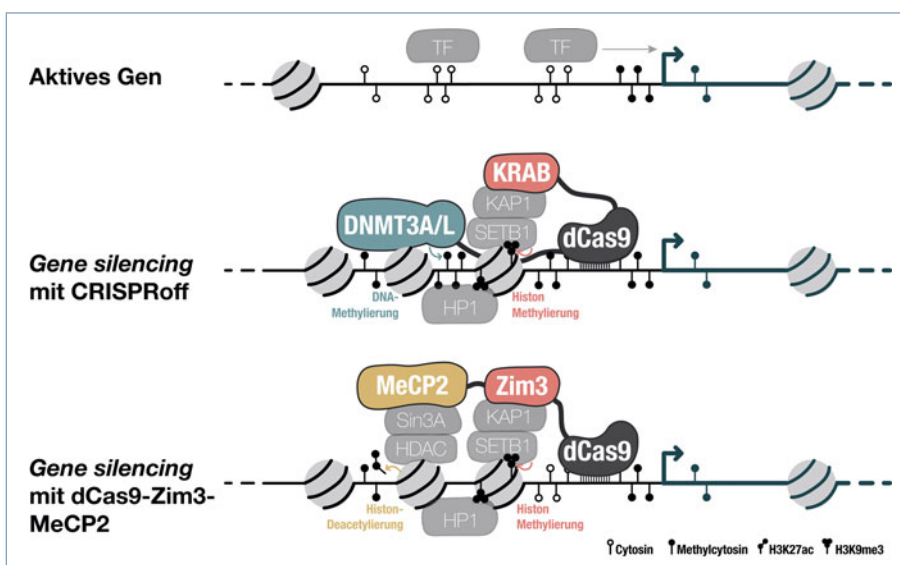
■ Gentechnische Verfahren der Genom-Editierung haben in den letzten zehn Jahren eine wahre Revolution erlebt und erlauben uns heute, Genome präzise zu verändern. Oft wird das menschliche Genom dabei auf die einfache Abfolge der Basenpaare reduziert, welche vermeintlich wie bei einer Program-

miersprache ausgeschnitten, kopiert und eingefügt werden können. Dass jedes Basenpaar Teil eines komplexen Gebildes aus verzahnten regulatorischen Mechanismen ist, wird dabei häufig vernachlässigt. Viele dieser Mechanismen werden durch die Epigenetik (von altgriechisch „zusätzlich zur Gene-

tik“) bestimmt. So können Dinukleotide von Cytosin- und Guanin-Basen (CpG) methyliert werden, was ihr Bindevverhalten mit Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Durch diese DNA-Methylierung kann das Binden von Transkriptionsfaktoren verhindert und das Gen somit ausgeschaltet werden. Außerdem windet sich die DNA alle ca. 80 Basenpaare um Histonproteine. Diese besitzen Histon-schwänze, welche aus dem Geflecht herausragen und deren Aminosäuren ebenfalls modifiziert werden können. Acetylierung kann sie z. B. zugänglicher für Polymerasen sowie Transkriptionsfaktoren machen. Werden Histonschwänze methyliert, legen sie sich typischerweise enger an die DNA, wodurch diese schwerer zugänglich wird. Neben den genannten sterischen Effekten beeinflussen diese epigenetischen Markierungen auch die Rekrutierung anderer Faktoren die zur Genregulation beitragen. Bei der epigenetischen Genom-Editierung werden molekulare Werkzeuge benutzt, die in der Lage sind, gezielt epigenetische Markierungen an bestimmten Stellen im Genom zu verändern. Diese Veränderungen können zur Aktivierung oder Repression eines Gens führen. Damit eröffnet die epigenetische Genom-Editierung die Möglichkeit, Genexpressionslevel zu steuern, ohne in das Erbgut selbst einzugreifen.

Gene silencing basierend auf DNA-Methylierung

Langanhaltendes epigenetisches *gene silencing* kann durch die Kombination des transkriptionellen Repressors Krüppelbox-assoziierte Domäne (KOX1 KRAB) und einer DNAMethyltransferase 3A/L (DNMT3A/L) erzielt werden [1, 2]. Eine Weiterentwicklung dieses Systems (CRISPRoff) wurde unlängst vorgestellt, bei der auch nach Differenzierung die Genexpression ausgeschaltet bleibt (Abb. 1, [3]). CRISPRoff wird hierbei mittels einer entsprechenden *single guide* RNA (sgRNA) zum Promoter eines Gens gelenkt, was dann zur Heterochromatinbildung am Zielort führt [4]. Methylierungen der CpG-Dinukleotide in einem Fenster von



▲ **Abb. 1:** Epigenetische Editoren und ihre Ko-Faktoren. Aktive Gene haben unmethylierte Promotorregionen, an denen aktivierende Transkriptionsfaktoren (TF) binden. CRISPRoffs KRAB-Domäne rekrutiert KAP-1 und SETB1, welche zu H3K9-Dreifach-Methylierung führen. Dadurch wird das Heterochromatin-Protein 1 (HP1) gebunden und DNMT3A/L methyliert CpG-Dinukleotide. dCas9-Zim3-MeCP2 bringt durch seine Zim3-KRAB-Domäne ebenfalls H3K9-Dreifach-Methylierung durch KAP-1 und SETB1 ein, wodurch HP1 gebunden wird. Außerdem wird H3K27 durch die Rekrutierung von Sin3A und einer Histon-Deacetylase (HDAC) deacetyliert, was zur Chromatinkondensation beiträgt.

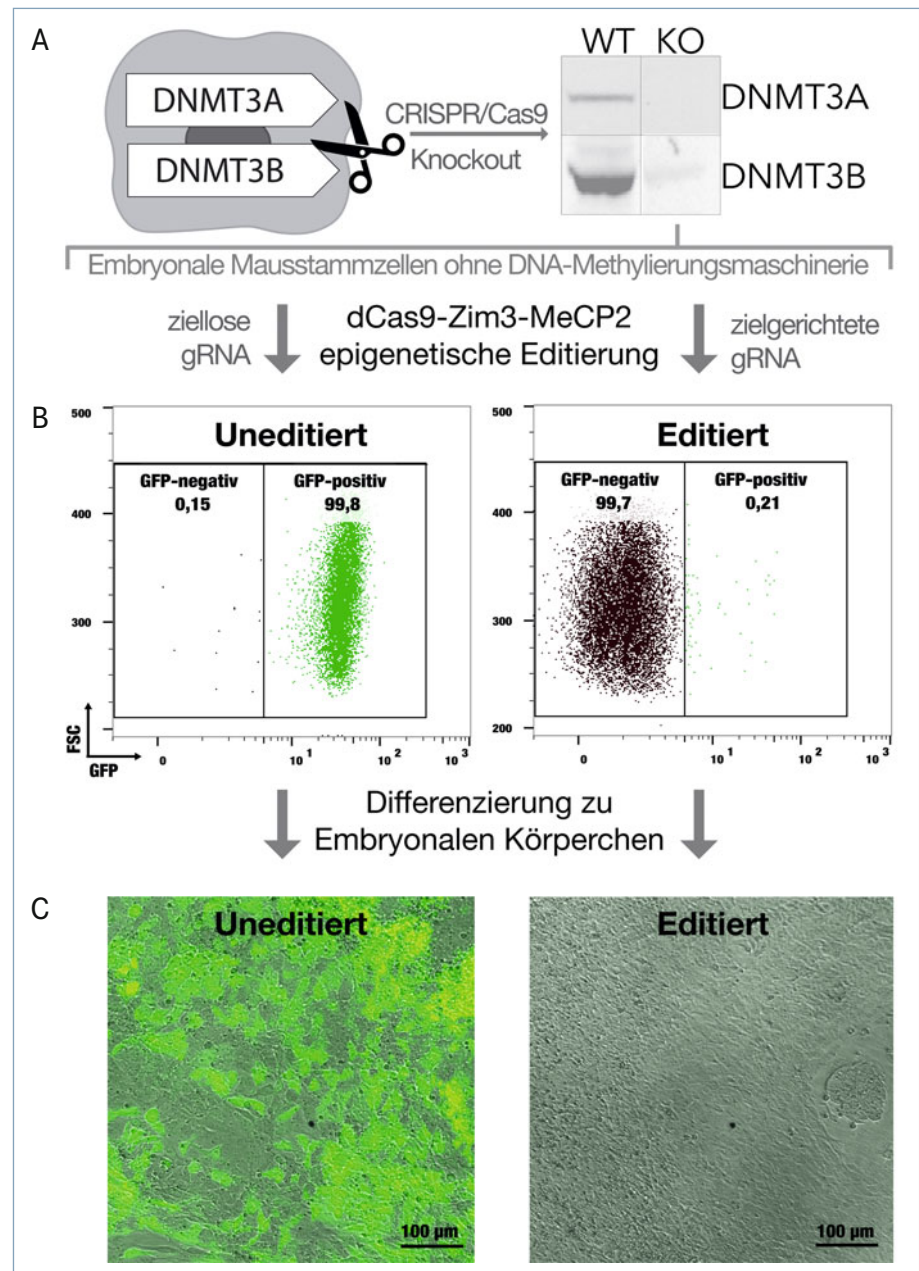
ungefähr 1.000 Basenpaaren haben dann zur Folge, dass das Gen nicht mehr abgelesen werden kann und dadurch ausgeschaltet wird. Die eingebrachten Methylierungsmuster werden bei der Replikation auf den neu synthetisierten DNA-Strang übertragen und bei der Zellteilung vererbt [5]. Das Gen bleibt stumm.

Gene silencing unabhängig von DNA-Methylierung mit dCas9-Zim3-MeCP2

Dass dCas9-Zim3-MeCP2 in CRISPRi-Experimenten die Genexpression transient unterdrücken kann, war schon seit einiger Zeit bekannt [6]. Das Fusionsprotein beinhaltet eine *zinc finger imprinted-3*-KRAB-Domäne (Zim3 KRAB), welche als transkriptioneller Repressor agiert [7]. Das Methyl-CpG-bindende Protein 2 (MeCP2) leitet dann die Heterochromatinbildung ein [8]. Überraschend konnte nun gezeigt werden, dass dCas9-Zim3-MeCP2 auch zu langanhaltender Genrepression führen kann [9]. Erstaunlicherweise ist diese Art des langanhaltendem *gene silencings* unabhängig von DNA-Methylierung und funktioniert sogar besser, wenn die endogenen DNA-Methylierungsenzyme DNMT3A und DNMT3B in den Zellen ausgeschaltet sind (**Abb. 2A**). In embryonalen Mausstammzellen konnte nach transients Expression von dCas9-Zim3-MeCP2 und einer Oct4-GFP-gerichteten sgRNA das Reportergen faktisch komplett ausgeschaltet werden. Sogar nach 30 Tagen in Kultur konnte anschließend keine Reaktivierung festgestellt werden (**Abb. 2B**). Aus diesen Experimenten lässt sich schließen, dass die Vererbung der epigenetischen Prägung in diesem Fall auf einem DNA-Methylierungs-unabhängigen Mechanismus beruhen muss, der möglicherweise Teil der Chromatinduplikation ist. Dass dieser Effekt ebenfalls über die Differenzierung der embryonalen Stammzellen hinweg stabil blieb, deutet auf ein sehr robustes *gene silencing* hin, welches auch während der Zellentwicklung aufrechterhalten werden kann (**Abb. 2C**).

Zelltyp und genspezifische Effekte

Trotz des großen klinischen Potenzials steht das Feld der epigenetischen Genom-Editierung vor großen Herausforderungen. Diese bestehen hauptsächlich in der Zelltyp- und Zielgenabhängigkeit der bis heute eingesetzten genetischen Effektoren. In den meisten Fällen entfalten die eingesetzten Effektoren nur durch die Rekrutierung vielfältiger zellulärer Proteinkomplexe ihre volle Wirkung



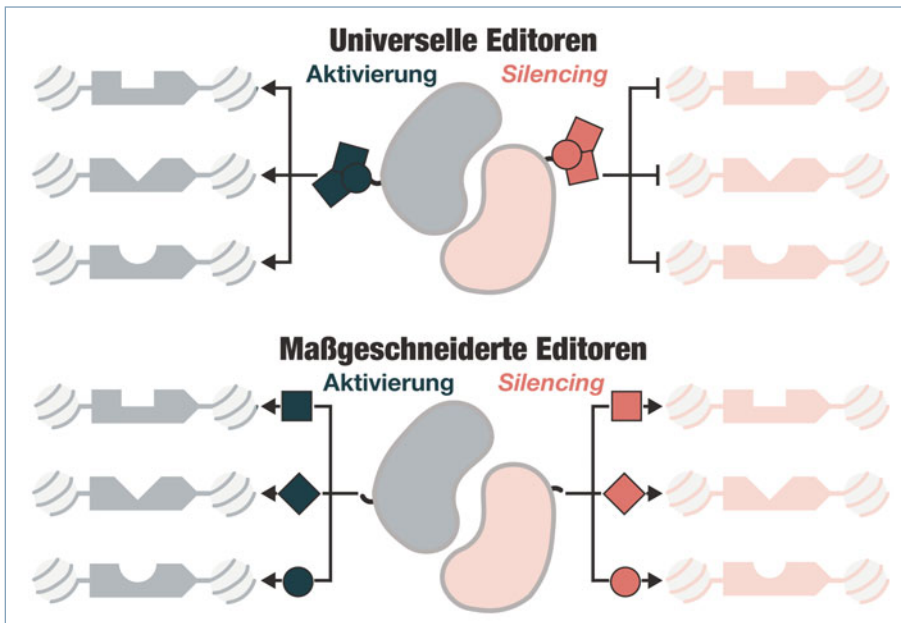
▲ **Abb. 2:** Silencing mit dCas9-Zim3-MeCP2 ist unabhängig von DNA-Methylierung. **A**, Illustration und Nachweis der ausgeschalteten DNA-Methylierungsmaschinerie (DNMTs) in embryonalen Mausstammzellen (Western Blot). **B, C**, Zellen, die mit dCas9-Zim3-MeCP2 und einer zielgerichteten sgRNA editiert wurden (**B**), verlieren ihre GFP-Expression auch über die Differenzierung hinweg (**C**).

[10]. Das macht ihre Funktionalität nach dem heutigen Wissensstand schwer vorhersagbar. So ist zu beobachten, dass in einigen Zelltypen und an einigen Zielgenen das epigenetische *gene silencing* hocheffizient funktioniert, während andere Zielgene nicht oder nur teilweise ausgeschaltet werden können. Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese beobachteten Effekte von den variierenden, bereits vorliegenden epigenetischen Markierungen des Zielgens abhängen.

Die Zukunft der epigenetischen Editierung

In Zukunft wird es deshalb nötig sein, die Interaktion der eingesetzten epigenetischen Effektoren mit der zellulären Regulationsmaschinerie besser zu verstehen, um die nächste Generation von epigenetischen Editoren zu entwickeln (**Abb. 3**).

Einige Forscher suchen dabei nach einem universell einsetzbaren Aktivator oder *silencer*, welcher sich die zellulären Regula-



▲ **Abb. 3:** Schema für universelle und maßgeschneiderte *silencing*-Ansätze. Epigenetische Markierungen, die zur Aktivierung bzw. *silencing* eines Gens führen, werden als geometrische Formen dargestellt. Universelle epigenetische Editoren sollen eine Kombination von Effektoren nutzen, welche alle Gene adressieren kann (oben), während die Effektoren von maßgeschneiderten Editoren je nach Zielgen passend ausgewählt werden (unten).

tionsmechanismen so geschickt zunutze macht, dass er unabhängig von Zelltyp und Lokus jedes Zielgen an- bzw. ausschalten kann. Dieser Ansatz würde es erlauben, schnell gezielte Therapien zu entwickeln und macht die Editoren auch nutzbar für das Hochdurchsatzscreening. Andere Wissenschaftler beginnen im großen Maßstab Sammlungen von charakterisierten epigenetischen Effektoren aufzubauen, welche sie je nach Ziel maßgeschneidert kombinieren können. Egal welchen Ansatz man verfolgt, ein tiefgreifendes Verständnis der epigenetischen Regulation ist für die vorhersagbare Anwendung unabdingbar. In Zukunft werden die Gebiete der Grundlagenforschung zu epigenetischen Regulationsmechanismen und der translationalen Forschung für die Entwicklung neuer Therapien Hand in Hand arbeiten müssen, um die hohen Erwartungen der epigenetischen Genom-Editierung Realität werden zu lassen. ■

Literatur

- [1] Amabile A, Migliara A, Capasso P et al. (2016) Inheritable Silencing of Endogenous Genes by Hit-and-Run Targeted Epigenetic Editing. *Cell* 167: 219–232.e14
 [2] Mlambo T, Nitsch S, Hildenbeutel M et al. (2018) Designer epigenome modifiers enable robust and sustained gene silencing in clinically relevant human cells. *Nucleic Acids Res* 46: 4456
 [3] Nuñez JK, Chen J, Pommier GC et al. (2021) Genome-wide programmable transcriptional memory by CRISPR-based epigenome editing. *Cell* 184: 2503–2519.e17

- [4] Sripathy SP, Stevens J, Schultz DC (2006) The KAP1 Corepressor Functions To Coordinate the Assembly of De Novo HP1-Demarcated Microenvironments of Heterochromatin Required for KRAB Zinc Finger Protein-Mediated Transcriptional Repression. *Mol Cell Biol* 26: 8623
 [5] Petryk N, Bultmann S, Bartke T et al. (2021) Staying true to yourself: mechanisms of DNA methylation maintenance in mammals. *Nucleic Acids Res* 49: 3020–3032

- [6] Yeo NC, Chavez A, Lance-Byrne A et al. (2018) An enhanced CRISPR repressor for targeted mammalian gene regulation. *Nat Methods* 15: 611–616
 [7] Alerasool N, Segal D, Lee H et al. (2020) An efficient KRAB domain for CRISPRi applications in human cells. *Nat Methods* 17: 1093–1096
 [8] Georgel PT, Horowitz-Scherer RA, Adkins N et al. (2003) Chromatin compaction by human MeCP2. Assembly of novel secondary chromatin structures in the absence of DNA methylation. *J Biol Chem* 278: 32181–32188
 [9] Ding L, Schmitt LT, Brux M et al. (2022) DNA methylation-independent long-term epigenetic silencing with dCRISPR/Cas9 fusion proteins. *Life Sci Alliance* 5: e202101321
 [10] Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D et al. (2002) SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev* 16: 919

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>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Frank Buchholz
 TU Dresden
 BIOTEC
 Tatzberg 47/49
 D-01307 Dresden
frank.buchholz@tu-dresden.de
www.buchholzlab.org
 ORCID: 0000-0002-4577-3344

AUTOREN



Pascal Y. Schönberg

Jahrgang 1998. 2016–2021 B. Sc. Biotechnologie, Hochschule Mittweida, und M. Sc. Molecular Bioengineering, TU Dresden. Seit 2022 Promotion über die epigenetische Editierung zur Entwicklung zellulärer Therapien.



Li Ding

Jahrgang 1972. 1990–1997 B. Sc. Genetik, Universität Wuhan, und M. Sc. Genetik, Chinesische Akademie der Wissenschaften, China. 2005 Promotion am IPK Gatersleben. Seit 2019 Postdoc zur Entwicklung neuer epigenetischer Editoren.



Frank Buchholz

Jahrgang 1966. Biologiestudium, Universität Göttingen. 1998 Promotion EMBL Heidelberg. 1998–2002 Postdoc, University of California, San Francisco (UCSF), USA. 2002–2010 Gruppenleiter, Max-Planck-Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden. Seit 2010 Professor für Medizinische Systembiologie und Leiter der translationalen Forschung am NCT/UCC, Medizinische Fakultät der TU Dresden.