

Wiederherstellung des Sehvermögens bei Mäusen durch Neuprogrammierung des Epigenoms

Im Laufe des Alterungsprozesses, aber auch durch degenerative Krankheiten, verändert sich das Methylierungsmuster der DNA und damit die Expression von Genen. Infolgedessen sind manche Gene nur in bestimmten Lebensphasen aktiv und bestimmte Fähigkeiten wie die Zellregeneration gehen mit dem Alter verloren. Jetzt ist es amerikanischen Forschern gelungen, alters- und krankheitsbedingte Degeneration des Sehnervs bei Mäusen rückgängig zu machen. Dazu wurden retinale Ganglienzellen von sehgeschädigten Mäusen mit drei Transkriptionsfaktoren transfiziert. Die induzierte Expression der Transkriptionsfaktoren bewirkte, dass die geschädigten retinalen Ganglienzellen in einen jüngeren epigenetischen Zustand zurückversetzt wurden, wodurch die Mäuse ihr altes Sehvermögen zurückerlangten.

Das Altern ist ein degenerativer Prozess, bei dem es zu einem systematischen Abbau der körperlichen Funktionen kommt. Seit einiger Zeit wird vermutet, dass die Ursache des Alterungsprozesses unter anderem in epigenetischen Veränderungen liegt [1]. Die Epigenetik beschreibt die Modifizierung der Expression von Genen, ohne dabei die Basensequenz der Gene selbst zu verändern. Mit der Zeit scheinen epigenetische Informationen und damit jugendliche Genexpressionsmuster verlorenzugehen, was zu zellulären Fehlfunktionen und zur Alterung führt. Dabei spielt die Methylierung der Desoxyribonucleinsäure (DNA) eine wichtige Rolle [2]. Das Methylierungsmuster der DNA verändert sich im Laufe der Zeit und kann zur Bestimmung des biologischen Alters herangezogen werden (epigenetische Uhr). Ob Informationen zum jugendlichen Epigenom gespeichert werden und später wieder hergestellt werden können, ist bislang unklar. In Experimenten mit kultivierten Zellen konnte jedoch gezeigt werden, dass die ektopische Expression der vier Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und MYC (OSKM) somatische Zellen wieder zu pluripotenten Stammzellen umprogrammieren kann [3]. Bei diesem Prozess wird der Differenzierungszustand der Zelle jedoch aufgehoben und die epigenetische Uhr zurückgesetzt [2]. Gleichmaßen kann die transgene Expression der vier Transkriptionsfaktoren in Mäusen mit Hutchinson-Gilford Progeria Syndrom (eine Frühalterungs Krankheit) die Symptome der Krankheit mildern und die Lebensdauer der Mäuse verlängern [4]. Dies zeigt, dass eine OSKM-Expression den Alterungsprozess möglicherweise entgegenwirken kann. Allerdings führt die beständige Expression aller vier Transkriptionsfaktoren in Mäusen häufig zur Bildung von Keimzelltumoren oder zum Tod innerhalb von wenigen Tagen.

Jetzt ist es einem amerikanischen Forscherteam unter der Leitung der Harvard Medical School gelungen, das DNA-Methylierungsmuster von retinalen Ganglienzellen in Augen von Mäusen nach Schädigung des Sehnervs in einen jüngeren Zustand zurückzusetzen, sodass die Tiere wieder sehen konnten [5]. Als Erstes untersuchten die Wissenschaftler, ob es möglich ist, das jugendliche Epigenom wiederherzustellen, ohne dabei die Identität der Zielzellen aufzuheben. Dazu wurden nur die Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2 und KLF4 (OSK) in Fibroblasten alter Mäuse exprimiert und anschließend deren Wirkung auf Gene untersucht, die eine veränderte Expression mit zunehmendem Alter zeigen. Der

Transkriptionsfaktor MYC wurde nicht berücksichtigt, da dieser von einem Onkogen codiert wird und für die Initiation der zellulären Neuprogrammierung nicht notwendig ist. Die Expression der drei anderen Transkriptionsfaktoren ergab nach 5 Tagen ein jugendliches mRNA Profil der untersuchten Gene ohne offensichtlichen Verlust des Differenzierungszustands der Zelle oder Induktion des Transkriptionsfaktors NANOG, der Pluripotenz und Onkogenizität anzeigt. Als Nächstes entwickelten die Wissenschaftler einen adenoassoziierten Virusvektor (AAV-Vektor) mit induzierbarem Promotor zur ektopischen Expression von OSK in Mäusen. Um die Sicherheit des neuentwickelte AAV-Expressionssystems zu überprüfen, wurden Mäuse mit dem Vektor infiziert. Nach 18 Monaten kontinuierlicher Aktivierung des Expressionssystems wurden keine erhöhten Tumorinzidenzen oder negative Gesundheitsfolgen bei den Mäusen beobachtet. Damit war gezeigt worden, dass OSK-exprimierende Zellen ihren Differenzierungszustand auch *in vivo* bewahren.

In Säugetieren ist das Zentralnervensystem eines der ersten Gewebe, das die Regenerationsfähigkeit verliert. Da die Netzhaut zum Zentralnervensystem gehört, untersuchten die Forscher, ob Schädigungen am Sehnerv mithilfe des OSK-Expressionssystems behoben werden können. In einer ersten Versuchsreihe mit Mäusen wurde der Glaskörper des Auges mit dem AAV-Vektor infiziert und zwei Wochen später der Sehnerv mechanisch beschädigt. Die Regeneration der Ganglienzellaxone der Netzhaut wurde mit einem fluoreszierenden Tracer verfolgt und quantifiziert. Maximale Regeneration der Axone wurde beobachtet, wenn alle drei Transkriptionsfaktoren zusammen mit einem polycistronischen AAV-Vektor exprimiert wurden. Nach Induktion der OSK-Expression für 12 bis 16 Wochen wuchsen die Ganglienzellaxone über 5 mm. Die drei Transkriptionsfaktoren konnten auch eine Regeneration der Ganglienzellaxone induzieren, wenn die OSK-Expression erst nach einer Verletzung des Sehnervs aktiviert wurde. Keine Regeneration wurde beobachtet, wenn die OSK-Expression nicht induziert wurde. Ebenso wurde kein Wachstum festgestellt, wenn die Transkriptionsfaktoren einzeln mithilfe von monocistronischen AAV-Vektoren exprimiert wurden. Regeneration der retinalen Ganglienzellaxone nach OSK-Expression wurde sowohl bei jungen als auch bei älteren Mäusen beobachtet, wobei das Regenerationsvermögen bei älteren Mäusen etwas schwächer war. Dennoch beweist dieses Ergebnis, dass die Fähigkeit der OSK-Transkriptionsfaktoren, eine Regeneration von Axonen zu induzieren, nicht mit dem Altern verschwindet.

Als Nächstes wurde untersucht, ob die beobachtete Regeneration verletzter Ganglienzellaxone auf eine durch die OSK-Expression vermittelte Veränderung der DNA-Methylierung zurückzuführen ist. Vier Tage nach Verletzung zeigten die retinalen Ganglienzellen ein vorangeschrittenes DNA-Methylierungsalter. Die Expression der drei Transkriptionsfaktoren wirkte diesem Alterungsprozess nicht nur entgegen, sondern konnte ihn sogar rückgängig machen. Ferner konnte gezeigt werden, dass DNA-Demethylierung notwendig für das Überleben der retinalen Ganglienzellen und das Axonwachstum ist. So verhinderte eine Ausschaltung der Gene für die TET1- und TET2-Methylcytosin-Dioxygenasen, zwei Enzyme, die die Demethylierung von DNA katalysieren, die Regeneration von retinalen Ganglienzellaxonen durch OSK-Expression nach Verletzung. Auch eine Ausschaltung des Gens für die Thymin-DNA-Glycolase, ein Enzym, das

Methylcytosin demethyliert, unterband vollständig die förderliche Wirkung einer induzierten OSK-Expression. Eine Überexpression der katalytischen Domäne der TET1-Methylcytosin-Dioxygenase hatte jedoch keine schützende und regenerative Wirkung. Hieraus folgt, dass DNA-Demethylierung zwar notwendig, aber alleine nicht ausreichend ist, um eine Regeneration bei Ganglienzellaxonen durch OSK-Expression zu bewirken.

Im weiteren Verlauf der Studie wurde untersucht, ob krankheitsbedingter Sehverlust durch OSK-Behandlung geheilt werden kann. Das Glaukom umfasst eine Reihe von Augenerkrankungen, bei denen der Sehnerv geschädigt wird, was zu Erblindung führen kann. Eine häufige Ursache für das Glaukom ist ein erhöhter Augeninnendruck. Um in Mäusen ein Glaukom zu erzeugen, wurden den Tieren Mikroperlen in die vordere Augenkammer des rechten Auges injiziert. Das linke Auge diente als nicht glaukomatöse Kontrolle und in dessen vordere Augenkammer wurde deshalb nur Phosphat-gepufferter Salzlösung injiziert. Nach vier Wochen wurden die Glaskörper der Mäuse mit dem AAV-Vektor infiziert und die OSK-Expression für weitere vier Wochen induziert. Im Vergleich zu glaukomatösen Augen, die mit dem AAV-Vektor ohne OSK-Induktion behandelt wurden, regenerierten sich beschädigte Ganglienzellaxone in glaukomatösen Augen nach OSK-Induktion so weit, dass kein Unterschied zum nicht glaukomatösen Kontrollauge festgestellt werden konnte. Ferner war die Sehschärfe glaukomatöser Augen nach OSK-Behandlung zur Hälfte wieder hergestellt. Mit einem Elektroretinogramm wurden ähnliche Verbesserungen auch für die Netzhautfunktion glaukomatöser Augen nach OSK-Induktion gemessen.

Weiterhin konnte altersbedingter Sehverlust mittels OSK-Behandlung geheilt werden. So zeigten 12 Monate alte Mäuse nach vierwöchiger OSK-Induktion verbesserte Sehschärfe und Netzhautfunktion als Kontrolltiere, bei denen die Transkriptionsfaktoren nicht induziert wurden. Weitere Untersuchungen ergaben, dass sich die Expression von 464 Genen in Ganglienzellen der Netzhaut mit fortschreitendem Alter bei Mäusen ändert. Ungefähr 90% dieser Änderungen der Genexpression konnten durch OSK-Behandlung wieder rückgängig gemacht werden. Unter den 268 altersbedingt herunterregulierten Genen wurden 44 Gene identifiziert, die eine Rolle bei der Sinneswahrnehmung und Axonentwicklung haben. Die anderen 196 Gene waren altersbedingt heraufreguliert. Darunter befand sich das Gen *Efemp1*, ein Gen, das die Expression der TET1- und TET2-Methylcytosin-Dioxygenasen reguliert und mit dem Glaukom und altersabhängiger Makuladegeneration assoziiert ist. Daraus folgt, dass Veränderungen in der DNA-Methylierung anscheinend eine wichtige Rolle bei der Wiederherstellung des Sehvermögens durch OSK-Behandlung bei alten Mäusen spielen.

Um festzustellen, ob eine OSK-Behandlung auch bei kultivierten menschlichen Neuronen eine Regeneration nach Schädigung bewirken kann, wurden differenzierte SH-SY5Y Neuroblastom-Zellen mit Vincristin behandelt. Das Alkaloid Vincristin bewirkt eine Degeneration von Neuriten bei Nervenzellen. Zunächst wurden die Zellen mit einem AAV-Vektor transfiziert und nach fünf Tagen dem Alkaloid für 24 h ausgesetzt. Neun Tage später hatten OSK-induzierte Zellen bis zu 15-mal mehr Neuriten gebildet als nicht induzierte Kontrollzellen. Der OSK-vermittelte Auswuchs von Neuriten wurde durch Ausschalten des Gens für die TET2-Methylcytosin-Dioxygenase unterbunden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Fähigkeit der OSK-Transkriptionsfaktoren, über eine Veränderung der DNA-

Methylierung Neuronen neu zu programmieren und das Wachstum von Neuriten zu fördern, zwischen Mäusen und Menschen konserviert ist.

Diese Studie hat gezeigt, dass es möglich ist, gealtertes Gewebe *in vivo* wieder zu verjüngen und dessen ehemalige Funktionen wiederherzustellen. Die ektopische Expression von OSK-Transkriptionsfaktoren kann gefahrlos ein jungendliches Epigenom und Genexpressionsmuster rekonstruieren, ohne das dabei der Differenzierungszustand der Zelle verloren geht oder Pluripotenz erzeugt wird. Die für diesen Prozess erforderliche aktive Demethylierung bedeutet, dass der Alterungsprozess und seine Umkehrung von DNA-Methylierungsmustern gesteuert werden (Abb.). Es ist aber nicht auszuschließen, dass noch andere Faktoren und epigenetische Modifikationen in diesem Prozess eine Rolle spielen. Eine andere entscheidende Frage ist: Wie ist die Information zum jungendlichen Epigenom in Zellen codiert und gespeichert? Die Antwort auf diese Frage, und ob epigenetische Neuprogrammierung zur Heilung krankheits- und altersbedingter Degenerationen beim Menschen erfolgreich eingesetzt werden kann, muss zukünftige Forschung zeigen.

[1] S. Pal, J. K. Tyler, *Sci. Adv.* **2**, e1600584 (2016). – [2] S. Horvath, *Genome Biol.* **14**, 3156 (2013). – [3] K. Takahashi, S. Yamanaka, *Cell* **126**, 663 (2006). – [4] A. Ocampo et al., *Cell* **167**, 1719 (2016). – [5] Y. Lu et al., *Nature* **588**, 124 (2020).

PD Dr. Dietmar Steverding, Norwich, England

Abb. Alters- und krankheitsbedingte Degenerationsprozesse führen zu Veränderungen der DNA-Methylierung und damit zu Abweichungen vom jungendlichen Genexpressionsmuster. Als Folge nehmen die Funktionen und die Regenerationsfähigkeit von Zellen und Geweben ab. OSK-vermittelte Neuprogrammierung versetzt die DNA-Methylierung zurück in einen jüngeren Zustand und stellt damit das jungendliche Genexpressionsmuster wieder her. Dies verbessert die Funktionen und die Regenerationsfähigkeit von Zellen und Geweben. Dieser Prozess benötigt aktive Demethylierung mittels TET1- und TET2-Methylcytosin-Dioxygenasen (TET1/2) und Thymin-DNA-Glycolase (TDG) sowie vermutlich auch aktive Methylierung mittels DNA-Methyltransferasen (DMTs).
Graphik Steverding, nach [5]

