

Received: 2011.05.24
Accepted: 2011.07.22
Published: 2011.08.19

Epigenetyka a etiologia chorób neurodegeneracyjnych

Epigenetics and etiology of neurodegenerative diseases

Beata M. Gruber

Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków, Narodowy Instytut Leków w Warszawie

Streszczenie

Kluczem do morfologicznego i funkcjonalnego zróżnicowania komórek w obrębie ludzkiego organizmu jest ustalanie specyficznych wzorców ekspresji genów. Genom ludzki zawiera około 25–30 tys. genów, przy czym w każdej komórce tylko część z nich ulega ekspresji. Za ustalanie specyficznych wzorców ekspresji współodpowiedzialne są modyfikacje epigenetyczne. Obejmują one przede wszystkim: metylację DNA, modyfikacje histonów i struktury chromatyny, a także funkcje niekodującego RNA. Uważa się, że aktywne transkrypcyjnie geny wykazują hipometylację, podczas gdy transkrypcyjnie nieaktywne sekwencje są zazwyczaj zmetylowane. Kowalencyjne zmiany histonów i procesy metylacji DNA są zjawiskami współzależnymi, mogącymi się wzajemnie indukować. Modyfikacje białek chromatyny regulowane są przez swoiste enzymy, ale także przez kinazy białkowe, fosfatazy, enzymy związane z ubikwityną i białkiem SUMO i tzw. białka koaktywatorowe, jak CBP (CREB-binding protein). Ich działanie stanowi o tzw. „kodzie histonowym”, który w połączeniu z białkami związanymi z chromatyną determinuje wzór ekspresji genowej w odpowiedzi na czynniki zewnętrzne. Istnieją przesłanki, uzasadniające poszukiwanie związku zjawisk epigenetycznych z chorobami neurologicznymi: niezmiennosc w toku ewolucji struktur histonowych podatnych na zmiany epigenetyczne, wykryte korelacje zmian epigenetycznych z występowaniem syndromów chorobowych w układzie nerwowym i stwierdzona skuteczność małowcząsteczkowych modulatorów procesów epigenetycznych, np. inhibitorów deacetylaz histonowych, m.in. w nieuleczalnych, jak dotąd, schorzeniach neurologicznych, takich jak: choroba Huntingtona (HD), choroba Parkinsona (PD), czy choroba Alzheimera (AD). W pracy omówiono doniesienia literaturowe obejmujące charakterystykę wzorców ekspresji genów w odniesieniu do występowania wymienionych schorzeń neurodegeneracyjnych. Podkreśla się m.in. istotność zjawisk hipometylacji DNA i acetylacji białek histonowych oraz wskazuje na potencjalną przydatność terapeutyczną deacetylaz histonowych.

Słowa kluczowe:

epigenetyka • choroby neurodegeneracyjne • modyfikacje histonów

Summary

Determination of specific gene profile expression is essential for morphological and functional differentiation of cells in the human organism. The human genome consists of 25–30 thousands genes but only some of them are expressed in each cell. Epigenetic modifications such as DNA methylation, histone and chromatin modifications or non-coding RNA functions are also responsible for the unique gene expression patterns. It is suggested that transcriptional gene activation is related to hypomethylation and the transcriptionally non-active sequences are hypermethylated. Covalent histone modifications and DNA methylation are correlated and interacting. Chromatin modeling is regulated not only by specific enzymes but also by protein kinases or phosphatases and coactivators, such as CBP. Such interaction makes the “histone code” which with the chromatin proteins determines gene expression patterns as the response to external agents. Evidence of a major role for epigenetic modifications in neurological disease has come from three converging lines of enquiry: high conservation throughout evolution of the histone residues that are the

target for epigenetic modifications; association between mutations in epigenetic components and multisystem disease syndrome in the nervous system; and broad efficacy of small-molecule epigenetic modulators, e.g. histone deacetylase inhibitors, in models of neurological diseases incurable up to now, such as Huntington's disease, (HD), Parkinson's disease (PD) and Alzheimer's disease (AD). This article is a survey of the literature concerning the characterization of gene expression patterns correlated with some neurodegenerative diseases. The processes of DNA hypomethylation and histone acetylation are emphasized. The histone deacetylases are indicated as the basis for design of potential drugs.

Key words: epigenetics • neurodegenerative disorders • histone modifications

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=956497>

Word count: 5673

Tables: –

Figures: –

References: 36

Adres autorki: doc. dr hab. n. farm. Beata M. Gruber, Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków, Narodowy Instytut Leków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa; e-mail: b-gruber@il.waw.pl

WSTĘP

Termin „epigenetyka” wywodzi się z greckiego przedrostka *epi* oznaczającego „ponad”, „w dodatku do”. Odnosi się w tym przypadku do procesów, które zachodzą z udziałem genów lub w ich obrębie, a wspomagane są mechanizmami opartymi na strukturze i właściwościach chromatyny.

Współczesna definicja epigenetyki to zespół zmian w funkcjach poszczególnych genów – dziedziczony podczas mitozy, jak i mejozy, ale niewynikający ze zmian pierwszorzędowej struktury DNA.

Mechanizmy epigenetyczne są biochemicznymi modyfikacjami DNA i białek histonowych będących strukturalną podstawą chromatyny. Do regulacji epigenetycznej ostatnio zalicza się także białka prionowe i udział interferencyjnego RNA [9,29].

Istnieją przesłanki, uzasadniające poszukiwanie związku zjawisk epigenetycznych z chorobami neurologicznymi. Po pierwsze, mamy do czynienia z niezmiennością w toku ewolucji struktur histonowych podatnych na zmiany epigenetyczne, co według Ratana [26] stanowi pośredni dowód znaczenia takich zmian. Po drugie, zanotowano wiele przykładów świadczących o korelacji zmian epigenetycznych i występowania syndromów chorobowych w układzie nerwowym. Po trzecie, wykazano skuteczność małowczątkowych modulatorów procesów epigenetycznych, takich jak inhibitory deacetylaz histonowych – HDACis (histone deacetylase inhibitors) w wielu schorzeniach neurologicznych, takich jak choroba Huntingtona (HD), choroba Parkinsona (PD), choroba Alzheimera (AD).

EPIGENETYCZNA REGULACJA EKSPRESJI GENÓW

Kluczem do morfologicznego i funkcjonalnego zróżnicowania komórek w obrębie ludzkiego organizmu jest ustalanie swoistych wzorców ekspresji genów. Genom ludzki zawiera około 25–30 tys. genów, przy czym

w każdej komórce tylko część z nich ulega ekspresji. Za ustalanie takich wzorców ekspresji współodpowiedzialne są modyfikacje epigenetyczne [25]. Obejmują one przede wszystkim: metylację DNA, modyfikacje histonów i struktury chromatyny, a także funkcje niekodującego RNA [21,25].

Podstawowym następstwem zmian epigenetycznych jest występowanie różnych fenotypów tego samego genomu, opartych na zróżnicowanym statusie epigenetycznym [5].

Metylacja DNA

Metylacja DNA jest, jak się uważa, najtrwalszą z modyfikacji epigenetycznych [25]. Stanowi poreplikacyjną modyfikację DNA i ma głównie na celu, choć nie zawsze, transkrypcyjne wyciszenie genów [9,12]. W warunkach prawidłowych metylacja jest wykorzystywana w komórce, m.in. do wyciszenia licznych sekwencji powtórzonych, piętnowania rodzicielskiego i wyłączenia drugiego chromosomu X w komórkach żeńskich. Służy też rozróżnianiu nici DNA w procesach naprawczych typu „mismatch” [25].

Metylacja reszt cytozynowych w DNA odgrywa ważną rolę w kontroli procesów decydujących o poziomie ekspresji genów w komórkach, uczestniczy w tworzeniu struktury chromatyny [12,25]. Wzór metylacji DNA ustalany jest we wczesnych fazach rozwoju zarodkowego i utrzymywany podczas życia osobniczego przez metylotransferazy DNA – DNMTs (DNA methyltransferases). Ustalony wzór metylacji DNA jest swoisty tkankowo, stabilny, odwracalny i stanowi cechę dziedziczną [11,12,25].

Metylacji w ludzkim DNA ulegać mogą wyłącznie reszty cytozyny w obrębie dinukleotydów 5'-CG-3' (CpG), przy czym metylacja jest zawsze symetryczna i obejmuje obie komplementarne nici.

Grupa metylowa pochodzi z S-adenozylometioniny [11,12,25].

Genom człowieka zawiera około 29 000 wysp CpG, tj. obszarów DNA (ok. 1 kb) o zwiększonej w porównaniu z całym genomem zawartości CpG, zlokalizowanych w około 50–60% promotorów genów, tj. wszystkich genów metabolizmu podstawowego i około 40% genów swoistych tkankowo. Uważa się, że aktywne transkrypcyjnie geny wykazują hipometylację promotorów, podczas gdy transkrypcyjnie nieaktywne sekwencje są zazwyczaj zmetylowane [12,33]. Dinukleotydy CpG znajdujące się poza wyspami CpG są rozmieszczone przede wszystkim w obrębie sekwencji powtórzonych lub centromerów i to one zwykle ulegają metylacji – procesowi gwarantującemu stabilność chromosomalną, ochronę przed obcym DNA, czy powstrzymywanie translokacji [33].

Wygazanie ekspresji genów związane jest z utrudnieniem przez grupy metylowe dostępu czynników transkrypcyjnych do rejonów promotorowych genów bądź ze stymulowaniem przyłączania białek efektorowych MBP (methyl binding proteins), MBD1, MBD2, MBD3, MBD4, MeCP2 z domeną MBD, wiążącą zmetylowane DNA. Podobną funkcję pełni białka z rodziny Kaiso [11,25]. O sile wiązania białek MBD do określonych sekwencji DNA mogą decydować ilość i lokalne zagęszczenie dinukleotydowej sekwencji CpG [12]. Zahamowanie funkcji białek MBP znosi efekt wyciszający transkrypcję, wywołany metylacją CpG [25].

Hamowanie transkrypcji przez procesy metylacji DNA następuje też w wyniku ich pośredniego wpływu na kondensację chromatyny, a mianowicie poprzez interakcję białek MBP z białkami modyfikującymi kowalencyjnie histony i z kompleksami przebudowującymi oraz przez aktywację enzymów z grupy deacetylaz histonowych [12,25].

Metylacja DNA kontrolowana jest przez metylotransferazy DNA. W komórkach ssaków zidentyfikowano pięć genów kodujących te enzymy, tj.: DNMT1, DNMT2 (z powodu wykazanej ostatnio funkcji metylowania RNA, ten enzym powinien być raczej umiejscowiony wśród metylotransferaz RNA), DNMT3a, DNMT3b i DNMT3L. Zachowawczą metylotransferazą, odpowiedzialną za utrzymanie stanu metylacji podczas replikacji DNA jest DNMT1. DNMT3a i 3b uczestniczą w ustaleniu wzoru metylacji *de novo* podczas wczesnego rozwoju embrionalnego. DNMT3L nie ma aktywności enzymatycznej, ale działa jako czynnik stymulujący aktywność enzymatyczną enzymów DNMT3a i 3b. Tworzone między tymi dwoma enzymami kompleksy wykazują większą zdolność wiązania DNA i S-adenozylometioniny. DNMT3L jest też zaangażowana w remodelowanie chromatyny i deacetylację histonów [11,12,13,27,33].

Wzór metylacji to konsekwencja nie tylko przyłączania grup metylowych do reszt cytozynowych, ale również efekt procesów demetylacji. Mogą być one zależne, jak i niezależne od replikacji DNA. Demetylacja zależna od replikacji zwana jest demetylacją pasywną i występuje wówczas, gdy DNMT1 nie metyluje nowo zsyntetyzowanego łańcucha DNA, co prowadzi do powstania niezmetylowanego DNA po drugim cyklu replikacyjnym. Demetylacja aktywna przebiega niezależnie od replikacji i zachodzi na drodze enzymatycznej [12].

Jak podają Guz i wsp.[12], w warunkach niewielkiego stężenia S-adenozylometioniny, enzymy DNMT3a i 3b mogą

funkcjonować nie tylko jako metylotransferazy DNA, ale także jako deaminazy 5-metylocytozyny. Deaminacja 5-metylocytozyny do tyminy, a następnie wolna od błędów naprawa (przywrócenie pary G: C) stanowią jeden z prawdopodobnych mechanizmów demetylacji DNA u kręgowców.

Modyfikacje histonów

Histony stanowią białkową podstawę strukturalną chromatyny. Chromatyna składa się z nukleosomów, które zawierają łańcuchy DNA o długości 146–147 par zasad owinięte dookoła oktamerów histonów rdzeniowych stanowiących z kolei pary histonów H3, H4, H2A i H2B. Nukleosomy połączone są łącznikowym DNA nawiniętym na łącznikowy histon H1. Histony rdzeniowe pełnią rolę nie tylko podstawy struktury nukleosomu. Ich N-końce, tzw. ogony histonowe, wystające z nukleosomu są przeznaczone do interakcji z białkami.

W skład histonów wchodzi również warianty histonu H2A, takie jak: H2A.Z; H2A.v; H2A.Bbdb i H2A.Bdb [21,24,33].

W transkrypcyjnie aktywnej euchromatynie, gęstość nukleosomów (jednostek strukturalnych) wynosi 6 jednostek/11 nm, w nieaktywnej heterochromatynie, 12–15 jednostek/11 nm. Promotorowe rejony genów są zwykle wolne od nukleosomów. Ich właściwe rozmieszczenie ma istotne znaczenie dla ekspresji genów i zależy od efektu zmian epigenetycznych. Nukleosomy wykazują preferencje wobec określonych sekwencji DNA [8,21,24,27,33].

Terminem „modyfikacja histonów” określa się zmiany w strukturze DNA i białek histonowych, obejmujące: remodelowanie chromatyny rozumiane jako przemieszczanie się nukleosomów wzdłuż nici DNA, wymianę histonów rdzeniowych na wariant H2A.Z i modyfikacje kowalencyjne N-końców ogonów histonowych, tj.: acetylację, metylację, ubikwitynację, fosforylację, biotynylację, sumoilaację i ADP-rybozylację [9,24,27,32].

O istotności modyfikacji chromatyny jako zmian epigenetycznych determinujących fenotypy chorobowe świadczy twierdzenie baz danych dotyczących wzajemnych zależności genów, struktury chromatyny i występowania określonych chorób. Najpełniejszą, uwzględniającą wszystkie te powiązania wydaje się baza DAN CER (**D**isease-**A**nnotated **C**hromatin **E**pigenetics **R**esource), dostępna na stronie <http://wodaklab.org/dancer> [32].

W niniejszej pracy skoncentrowano się na modyfikacjach kowalencyjnych histonów, wymienianych jako jedne z głównych zmian epigenetycznych mogących korelować z występowaniem chorób neurologicznych. Biologiczne znaczenie powyższego rodzaju zmian zależy od rodzaju modyfikacji i ich umiejscowienia [25].

Posttranslacyjne kowalencyjne modyfikacje w N-końcach histonów odgrywają krytyczną rolę w regulacji transkrypcji genów.

Modyfikacje białek chromatyny regulowane są przez swoje enzymy, tj. acetylotransferazy histonowe HATs (histone acetyltransferases), HDACs, metylotransferazy histonowe HMTs (histone methyltransferases) i demetylasy

histonowe (histone demethylases), ale także przez kinazy białkowe, fosfatazy, enzymy związane z ubikwityną i białkiem SUMO i tzw. białka koaktywatorowe, takie jak CBP (CREB-binding protein), mające aktywność HAT [1,27]. Działanie powyższych enzymów stanowi o tzw. „kodzie histonowym”, który w połączeniu z białkami związanymi z chromatyną determinuje wzór ekspresji genowej w odpowiedzi na czynniki zewnętrzne [9,11].

Zmodyfikowane histony grupują się w dwóch kompleksach białkowych, TrxG (trithorax group) i PcG (polycomb group). Niektóre ze składowych tych kompleksów wykazują aktywność metylotransferaz histonowych – HMTs (histone methyltransferases), podczas gdy inne odgrywają rolę w utrzymywaniu równowagi między heterochromatyną (białka związane z PcG) a euchromatyną (białka związane z TrxG). Białka te wiążą się do rejonów promotorowych *PRE* (PcG) i *TRE* (TrhG) genów, odpowiadających za metylację DNA, modyfikacje histonów, ATP-zależne modelowanie nukleosomów i procesy regulatorowe z udziałem RNA [11,21].

Metylacja histonów daje efekt dwojaki, związany zarówno z wyciszeniem, jak i transkrypcyjną aktywacją genów [11]. Metylacja reszt lizynowych -4 i -36 zachodzi w wersjach mono-, di- i tri- w H3 i związana jest z tworzeniem aktywnej transkrypcyjnie euchromatyny [11]. Z wygaszeniem genów, a więc tworzeniem zamkniętej struktury heterochromatyny wiąże się metylacja reszt lizynowych -9 i -27 w histonie H3, czy trimetylacja reszty lizynowej -20 w H4 [8,11,33]. Proces metylacji w wersjach mono- i dimetylowych pochodnych może dotyczyć także argininy, ale wpływ tych zjawisk na strukturę chromatyny nie jest dobrze znany [11].

Z aktywacją transkrypcyjną wiąże się fosforylacja, przyspieszanie dzięki odpychaniu się ujemnego ładunku fosfohistonów i DNA. Takie oddziaływanie dekondensuje chromatynę i ułatwia dostęp czynników transkrypcyjnych do rejonów promotorowych genów [9,11].

Ubikwitynacja, poza rozluźnianiem struktury chromatyny i ułatwianiem transkrypcji, stanowi też warunek następującej po niej metylacji. Dokładna funkcja tych modyfikacji nie jest bliżej poznana, podobnie, jak najslabiej poznanego procesu modyfikacji postranskrypcyjnych – sumoilacji [9,11].

Z aktywacją transkrypcyjną związany jest proces acetylacji. Polega na neutralizującym dodatni ładunek acetylowaniu reszt lizynowych, przez co osłabieniu ulega powinowactwo białka histonowego i DNA i rozluźnia się struktura chromatyny. Acetylacja histonów jest procesem odwracalnym, a enzymami katalizującymi proces odwrotny są HDACs. Usuwiają one grupy acetylowe z reszt lizynowo-argininowych w N-końcach ogonów histonowych. Spośród 11 różnych izoform HDACs, większość wykazuje ekspresję na poziomie białka w komórkach OUN. Odrębną kategorię tych enzymów stanowi rodzina sirtuin – SIRT.

Domena wspólną dla większości HDACs jest domena cynkozależna. Domeny różniące izoformy wykazują swoistość substratową i w sposobie regulacji [1]. Deacetylazy histonowe u ssaków stanowią klasy 1–4, przy czym w komórkach

układu nerwowego dominują klasy 1 i 2. Klasa 1 obejmuje HDACs 1, 2, 3 i 8 – białka jądrowe występujące powszechnie w organizmie; klasa 2 obejmuje HDACs: 4, 5, 6, 7, 9 i 10 – białka wykazujące swoistość tkankową, regulowane w wyniku przemieszczania się jądrowo-cytoplazmatycznego z udziałem białek 14-3-3 [1,30]. Klasę 3 HDACs stanowią sirtuiny, niepoddające się inhibitorom hamującym HDACs z klas 1 i 2, podobnie, jak HDAC11 – jedyna reprezentantka klasy 4 [30].

Należy podkreślić, że procesy zachodzące w ramach zmian epigenetycznych nie są efektywne jako procesy pojedyncze. Białka MBP przyłączone do metylowanego DNA tworzą kompleksy z enzymami HDACs i ten etap dopiero prowadzi do zagęszczenia struktury chromatyny i transkrypcyjnego wyciszenia genów [13]. Białka modyfikujące histony, takie jak HP1 (heterochromatin protein 1), LSD1 (lysine-specific demethylase 1), czy PRMT1 (protein arginine methyltransferase 1) indukują enzymy DNMTs prowadząc do metylacji DNA [13].

Kowalencyjne zmiany histonów i procesy metylacji DNA są zjawiskami współzależnymi, mogącymi się wzajemnie indukować. Wcześniejszy pogląd, że metylacja DNA jest pierwotna względem modyfikacji histonów w ostatnich latach zweryfikowano. Okazało się, że zmiany w białkach histonowych zachodzą przed metylacją DNA, jednocześnie warunkując ten proces.

Czynnikiem regulującym tworzenie zamkniętej struktury chromatyny może być sam brak lub niewielka ekspresja danego genu [25].

Rola niekodującego RNA

Stosunek rejonów niekodujących do kodujących w genomie *Eucaryota* zmienia się jako funkcja postępów w rozwoju ewolucyjnym, przy czym liczba genów kodujących jest stosunkowo stabilna [21]. Co więcej, ostatnie badania wykazały, że rejony niekodujące są aktywnie transkrybowane z obu nici DNA. Powstałe transkrypty stanowią o istnieniu regulatorowych cząsteczek niekodującego RNA – ncRNA (non-coding RNA) [5,21].

Przyjmuje się, że ncRNA odgrywa rolę, m.in. w: różnicowaniu komórek macierzystych układu krwiotwórczego, embriogenezie, apoptozie, regulacji metabolizmu ksenobiotyków, odporności, stanach zapalnych, infekcjach wirusowych i bakteryjnych oraz chorobach neurologicznych [15]. NcRNA, do którego zalicza się, m.in.: mikroRNA (miRNA), tRNA, rRNA i krótkie nukleolarne RNA – snoRNA (small nucleolar RNA) oddziałują rozpoznając specyficzne miejsca bądź sekwencje w DNA, RNA, kompleksach DNA: RNA, a także poprzez interakcje, m.in. z białkami wiążącymi RNA – RBP (RNA-binding proteins) [5,21].

Niektóre z enzymów remodelujących chromatynę mają powinowactwo nie do DNA, ale do RNA dzięki posiadaniu określonych specyficznych domen w swojej strukturze [5,21]. Część ncRNA aktywuje geny białek regulatorowych wpływających na strukturę chromatyny, np. HP1 [21].

Wiele typów ncRNA występuje preferencyjnie w obrębie komórek układu nerwowego u ssaków. Liczne podklasy

miRNA wykryto w neuronach kory nowej i mózdzku. Jak podaje Mehler [21], utrata DICER – kompleksu enzymatycznego zaangażowanego w proces dojrzewania miRNA z prekursorów, w mysich neuronach części czołowej mózgu skutkowało, m.in. zaburzeniami morfogenezy w korze i podwzgórzu, zmianami w sposobie rozgałęzienia dendrytów, czy wzmoczoną apoptozą rozwijających się neuroblastów. SnoRNA ma natomiast zróżnicowane profile ekspresji w obszarach mózgu związanych z uczeniem się i zapamiętywaniem. Zaś mutacje wyspecjalizowanych podklas ncRNA, tj. rRNA i tRNA korelują z patogenezą schorzeń neurodegeneracyjnych, neurodegeneracyjnych i neuropscyhiatrycznych [21].

W świetle powyższych doniesień pojawiły się sugestie, że ncRNA może być zaangażowane w szlaki sygnałowe i procesy leżące u podłoża chorób neurologicznych i psychiatrycznych [21].

MiRNA stanowi krótkoodcinkowe RNA (21–23 nukleotydów). Zidentyfikowano, jak dotąd, jego 700 rodzajów, a podejrzewa się istnienie ponad 1000. Prawdopodobnie około 30% wszystkich ludzkich genów jest regulowanych przez miRNA [11,15,21,23]. Geny miRNA mają różne umiejscowienie, mieszczą się w intronach i/lub w eksonach genów strukturalnych lub w obszarach międzygenowych. Mogą występować pojedynczo lub tworzą skupiska, mające wspólne sekwencje regulatorowe [15]. MiRNA oddziałuje poprzez hamowanie posttranskrypcyjne na etapie mRNA lub na etapie translacji. W każdym z tych przypadków występuje inny sposób wiązania regulatorowej cząsteczki do mRNA, a następnie jego degradacja lub unieczynnienie [15]. MiRNA jest związany nie tylko z wyciszaniem genów. W określonych warunkach może wzmacniać translację docelowego mRNA [23]. W jego funkcję wpisana jest też modyfikacja struktury chromatyny poprzez bezpośredni wpływ na enzymy modyfikujące tę strukturę. Na liście genów, na których transkrypcję wpływa miRNA znajdują się te, kodujące: HMTs, MeCP2, HDACs i białka z chromodomenami – wiążące zmetylowane reszty lizyny i argininy [11,25].

Podkreśla się także rolę miRNA jako regulatora DNMT. Jak wykazano na przykładzie niedrobnokomórkowego raka płuc, zależność ekspresji miRNA i DNMT była odwrotna. Stwierdzono też komplementarność między miRNA-29s a określonymi sekwencjami w mRNA niektórych rodzajów DNMT [11].

EPIGENETYCZNE PODŁOŻE CHOROBY NEURODEGENERACYJNYCH

Choroba Alzheimera

Choroba Alzheimera (AD) należy do kręgu schorzeń otępiennych i jest uważana za bardzo rozpowszechnioną wśród ludzi w podeszłym wieku. Stanowi ponad 50% wszystkich przypadków otępienia, charakteryzujących się zaburzeniami w sferze czynności poznawczych, zwłaszcza zaś postępującym zanikiem pamięci, traceniem zdolności do abstrakcyjnego myślenia, do wykonywania w sposób logicznie uporządkowany złożonych, a potem, w miarę postępu choroby, nawet prostych zadań. W miarę upływu czasu pojawiają się różne zaburzenia zachowania i objawy związane przede wszystkim z upośledzeniem pamięci [10].

Typowe dla AD zmiany w mózgowiu polegają na powstawaniu blaszek starczych z β -amyloidu oraz zwyrodnienia włóknienkowego, w którym główną rolę odgrywa zmienione białko tau. Wzdłuż naczyń mózgowych odkładają się złoże β -amyloidu. Stwierdza się, szczególnie nasilone w korze mózgowej, zmniejszenie liczby neuronów i synaps [10].

Istnieje kilka hipotez próbujących wyjaśnić patogenezę tej choroby, m.in. deficyt neuroprzekazników, zaburzenia przemian energetycznych, stres oksydacyjny i zmiany w sygnalizacji mitotycznej oraz kaskada amyloidowa związana z udziałem β -amyloidu. β -amyloid pochodzi z proteolitycznego rozszczepienia prekursora APP (amyloid precursor protein) przez kompleks γ -sekreazy. APP kodowany jest przez geny *PSEN1* i *PSEN2* (presenilina 1; 2) [9,33]. Białko to, poza tym że tworzy neurotoksyczne agregaty składające się z 39–40 aminokwasów, kumulujące się w blaszkach starczych, przyczynia się bezpośrednio do formowania nadtenków, aktywuje też komórki generujące przemiany tlenu azotu w rodniki nadtlenuazotynowe. Z AD wiąże się także występowanie określonych izoform apolipoproteiny E (APOE), białka będącego składnikiem chylomikronów i lipoprotein o bardzo niskiej gęstości – VLDL (very low density lipoproteins), zaangażowanego w transport cholesterolu [10]. Uważa się, że jedna z izoform APOE – APOE- ϵ 4 stymuluje odkładanie β -amyloidu i formowanie blaszek [22]. Jak podaje Gruber [10], u chorych z AD obserwuje się podwyższone stężenie APOE w osoczu, a także mRNA dla tego genu w mózgu chorych. Pojawienie się kopii izoform *APOE- ϵ 3* i *APOE- ϵ 4* korelowało z większą koncentracją β -amyloidu. Co ciekawe, kopia *APOE- ϵ 2* wiązała się z obniżeniem ryzyka AD [10, 22].

Interesująca jest obserwacja, że powyższe korelacje między *APOE- ϵ 4* a AD, zależne od płci, a także uwarunkowane etnicznie, wraz z wiekiem stawały się mniej znaczące [22].

Przez ostatnie 20 lat przebadano ponad 300 genów jako potencjalnych determinantów późnoobjawowej, sporadycznej postaci AD, stanowiącej 90–95% wszystkich przypadków AD. Jednak, z wyjątkiem genu *APOE*, żaden nie został potwierdzony jako marker AD, powtarzający się w toku badań niezależnych populacji [22]. Potwierdzono jedynie, że z późnoobjawową, sporadyczną postacią AD związane są geny mieszczące się w obrębie chromosomów 9, 10 i 12.

Za rodzinną, wczesnoobjawową postać choroby odpowiada rzadko występujący zespół penetrujących mutacji w trzech genach: *APP*, *PSEN1* i *PSEN2*. Jak podają Migliore i Coppede [22], według ostatnich badań nadekspresja APP okazuje się wystarczająca do wystąpienia AD. Warunkują ją trzy mutacje punktowe usytuowane blisko miejsca rozszczepienia APP przez sekretazę, zaburzające proces proteolizy prekursora. Poza tymi mutacjami stwierdzono też istnienie kopii APP będącej przyczyną nadekspresji APP na poziomie białka.

W przypadku *PSEN1* i *PSEN2* zanotowano, jak dotąd, ponad 160 mutacji, w tym ponad 150 mutacji w genie *PSEN1*. W badaniach podkreśla się też polimorfizm występujący w rejonach niekodujących *PSEN1* [22].

Związane z fenotypem AD mutacje w genie *PSEN1* prowadzą do utrzymującej się aktywności HAT białka

koaktywatorowego – CBP. Z kolei hipometylacja rejonu promotorowego tego genu wzmacnia aktywność enzymatyczną białka *PSEN1* i wytwarzanie β -amyloidu [9]. Jak wykazano w badaniach *in vitro*, proces hipometylacji może być częściowo odwrócony przez S-adenozylometioninę – źródło grup metylowych, co wskazuje na możliwości ukierunkowania terapii AD w przyszłości [9].

Notowane tendencje do hipometylacji w genomie chorych obciążonych AD potwierdzają rezultaty prospektywnych, obserwacyjnych badań przeprowadzonych przez Roe i wsp. [31]. Prowadzący badania stwierdzili istnienie odwrotnej zależności między tempem rozwoju AD i chorób nowotworowych. U pacjentów z AD obserwowano znacznie wolniejszy rozwój nowotworów, bez rozróżnienia na ich rodzaje. Nie tak znacząca, ale dająca się zauważyć prawidłowość zanotowano u chorych obciążonych nowotworami w odniesieniu do tempa postępu AD. Ma to przypuszczalny związek z profilami metylacji genów. Hipometylacja odblokuje transkrypcję genów supresorowych nowotworów, zaś hipermetylacja, wzmożona w przypadku chorób nowotworowych, prawdopodobnie obejmuje też geny kodujące enzymy generujące β -amyloid, unieczynniając je i przyczyniając się w ten sposób do spowolnienia postępu AD [31].

Wyniki badań, cytowane przez Migliore i Coppedè [22], a dotyczące zależności profilu metylacji w genach *APP*, *PSEN1* i *BACE* (β -site amyloid precursor protein clearing enzyme) – genie, kodującym β -sekretazę odpowiedzialną razem z γ -sekretazą za rozpad APP i generowanie neurotoksycznego β -amyloidu a szlakiem metabolicznym S-adenozylometioniny potwierdzają, że procesy metylacji są istotną częścią zmian epigenetycznych związanych z występowaniem AD. Okazuje się bowiem, że niedobór folianów i cyjanokobalaminy – związków biorących udział w remetylacji S-adenozylometioniny, w pożywcze hodowlanej ludzkich komórek neuroblastomy SK-N-SH i SK-N-BE zmienia profil metylacji promotora genu *PSEN1* i zaburza wydzielanie białek *PSEN1*, *BACE* i *APP*. Niedawno wykazano też jednoczesną kumulację homocysteiny w tych komórkach, pozostającą w odwrotnej zależności z poziomem S-adenozylometioniny [10,22].

Rozpad APP generuje nie tylko β -amyloid, ale także peptyd C-końcowy APP – AICD [9,33]. AICD przemieszcza się do jądra i oddziałuje na swoiste geny, takie jak gen neprilizyny – *NEP*, kodujący enzym degradujący β -amyloid. Jak podaje Urdinguo i wsp. [33], wykazano, że w ludzkich komórkach neuroblastomy NB7 i SH-SY5Y ekspresja tego genu regulowana jest przez procesy acetytacji historynowej, co potwierdzono też na przykładzie szczurzych komórek guza chromochłonnego – PC12. Podwyższone stężenie białka AICD nasila acetylację reszt lizynowych: -14 w H3 i -5 w H4. Współdziałanie AICD z Fe65 – białkiem wiążącym prekursora β -amyloidu A4 i indukcja HAT-Tip60 są warunkami wywierania wpływu AICD na chromatynę. Acetylacja H4 przez HAT-Tip60 jest niezbędna do prawidłowej naprawy powstałych w przebiegu AD uszkodzeń DNA [22,33].

W schorzeniach związanych z zaburzeniami pamięci, np. AD, podkreśla się znaczenie HDAC2. Niedobór tego enzymu koreluje ze wzrostem liczby synaps i poprawą pamięci. W AD zwrócono też uwagę na istotność epigenetycznej

regulacji dwóch innych genów, tj. S100A2, kodującego białko wiążące wapń i SORBS3, kodującego białko adhezyjne z domeną SH3. W obu przypadkach zanotowano różne profile metylacji DNA w AD w porównaniu z próbą kontrolną. Wiadomo, że S100B – białko należące, podobnie jak S100A2 do rodziny S100 jest czynnikiem neurotroficznym i zapewniającym przeżycie neuronów. SORBS3 wykryto w synapsach. Funkcje obu białek w AD nie zostały dokładnie poznane, ale powyższe rezultaty skłaniają do dalszych badań [33].

Szansą na „terapię przyszłości” w AD jest miRNA. Okazuje się, że poziom miRNA-107 uzależnia ekspresję *BACE1*. W strukturze tego genu wykryto 5 różnych miejsc w rejonie niekodującym mRNA, komplementarnych z miRNA i stwierdzono odwrotną zależność poziomów ekspresji *BACE1* i miRNA-107 [35].

To, że w etiologii AD odnotowuje się niebagatelną rolę procesów acetytacji w zakresie regulacji ekspresji genów związanych z chorobą, umożliwiła poszukiwanie rozwiązań terapeutycznych wśród enzymów bezpośrednio wpływających na ten proces, tj. HDACs.

Inhibitory HDAC (HDACis) można sklasyfikować jako cztery chemiczne rodziny, tj.: krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, kwasy hydroksamowe, benzamidy i epoksyketony [1].

W badaniach na modelach komórkowych wykazano obniżenie poziomu białka CBP/p300 o aktywności HAT i stopnia acetytacji histonów, przy jednoczesnej aktywacji procesów generujących APP. Jak wykazano, kwas walproinowy – HDACi należący do grupy krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych obniżał wytwarzanie β -amyloidu w ludzkich komórkach embrionalnych nerki – HEK293 i w komórkach OUN myszy modelowych z AD [4]. W innych badaniach, codzienne wstrzykiwanie myszom modelowym z AD – Tg2576 HDACi – fenylomaślanu znosiło ubytki pamięci dzięki hiperfosforylacji białka tau w podwzgórze, bez wpływu na poziom β -amyloidu. Fenylomaślan drastycznie obniżał też acetylację H4 w korze i stymulował ekspresję czynników transkrypcyjnych, co sugeruje, że u podłoża mechanizmów neuroprotekcyjnych leży normalizacja dysfunkcji w procesach transkrypcji [4]. U myszy transgenicznym APP23, wstrzykiwanie fenylomaślanu w dawce 30 mg/kg *i.p.*/dz. redukowało ilość blaszek β -amyloidowych, a także poprawiało pamięć, pod warunkiem rozpoczęcia podawania HDACi stosunkowo wcześnie (w siódmym miesiącu życia myszy). Poprawę pamięci i obniżenie stężenia białka tau bez wpływu na blaszki amyloidowe zanotowano też po zastosowaniu nikotynamidu – inhibitora klasy 3 HDAC [4].

Paradoksalnie, w rzadkich przypadkach, neuroprotekcyjny efekt w AD wykazują izoformy HDAC, np. HDAC1, czy sirtuina – SIRT1 [16]. Jak wykazali Kim i wsp. [16], u myszy transgenicznym p25 stanowiących model zmian neurodegeneracyjnych występował podwyższony poziom mRNA genu *SIRT1*, co sugeruje indukcję czynników odpowiedzialnych za transkrypcję tego genu. Autorzy podkreślają, że wyniki te mogą stanowić przesłankę do poszukiwania możliwości interwencji w aktywację *SIRT1*. Na możliwy związek *SIRT1* z AD wskazuje też to, że gen

ten znajduje się na chromosomie 10, na którym występują geny związane z rodzinną postacią AD.

Choroba Parkinsona

Choroba Parkinsona (PD) jest postępującym neurologicznym schorzeniem charakteryzującym się występowaniem licznych ruchowych i pozaruchowych zaburzeń, takich jak zaburzenia węchu, neuropsychiatryczne oraz układu autonomicznego. Badania neuropatologiczne dotyczące zaburzeń tego układu u osób z PD wykazały występowanie α -synukleiny – białka o aktywności chaperonowej, regulującego uwalnianie neuroprzekazników w synapsach w jądrze grzbietowym nerwu błędnego, ciała Lewy'ego w ośrodkach autonomicznych w podwzgórzu, jądrze miejsca sinawego, jądrze szwu, korze limbicznej oraz w zwojach współczulnych i w trzewnych splotach śródściennych przewodu pokarmowego [7,10]. PD jest chorobą zwyrodnieniową struktur mózgu, zwłaszcza jąder podkorowych, czyli istoty szarej leżącej w głębi półkul mózgu. Dochodzi w niej do zaniku komórek dopaminergicznych istoty czarnej, który prowadzi do niedoboru dopaminy oraz przewagi układu cholinergicznego. Skutkiem powstających zmian są zaburzenia układu ruchu [19]. Główne zaburzenia autonomiczne w PD obejmują: zaburzenia układu sercowo-naczyniowego, przewodu pokarmowego, układu moczowo-płciowego, odżywiania, nadmiernego wydzielania łju i termoregulacji [7]. Z PD wiąże się zmiany w obrębie chromosomu 17 i w strukturze białka tau, co charakteryzuje także AD [6].

Ponad 90% przypadków PD to postać sporadyczna. Jednak podstawę większości badań dotyczących etiologii choroby stanowi postać rodzinna. W oparciu o te badania wymieniono 8 genów, w których mutacje związane są z pojawieniem się PD. Zalicza się do nich geny kodujące: α -synukleinę – *SNCA*; białka zaangażowane w ubiquitytację i procesy z udziałem proteosomu (*PARK 2* (parkin), *UCH-L1* (ubiquitin carboxyterminal hydrolase L1)), białka mitochondrialne związane z ochroną komórek, m.in. przed stresem oksydacyjnym (*PINK-1* (PTEN-induced putative kinase 1) i *DJ-1*), białko dardaryne, zawierające domenę kinazy tyrozynowej (*LRKK2* (leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2)), lizosomalną ATP-azę (*ATP13A2*), czy proteazę serynową – *OMI/HTRA2*, zaangażowaną w procesy apoptozy, a także geny kodujące białka uczestniczące w synaptycznym transporcie i wydzielaniu neuroprzekazników, takich jak synaptobrewina [6,22,33]. W tym miejscu należy przybliżyć rolę α -synukleiny, tworzącej fibrylarne agregaty zwane ciałkami Lewy'ego, kumulujące się w miejscach ubytków neuronów, co stanowi jeden z głównych markerów PD [22,33]. Jak wykazano, polimorfizm występujący w obrębie promotora genu *SNCA* wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na PD. W rodzinnej postaci choroby notowano też występowanie dodatkowych kopii genu i substytucje [22].

W PD α -synukleina przemieszcza się do jądra i może się wiązać z histonami hamując procesy acetylacji w H3 poprzez stymulujący wpływ na deacetylazę *SIRT2*, ale także inaktywując aktywność HAT białek: *CBP*, *p300* i *p/CAF* (*CBP associated factor*) i powodując hipocetylację i apoptozę ludzkich komórek neuroblastomy [4,18]. Dowodem na tego typu interakcje są wyniki badań, które potwierdziły efekt ochrony przed toksycznym działaniem α -synukleiny w komórkach, do których wprowadzono siRNA dla *SIRT2*.

Toksyczność α -synukleiny obniżały też HDACi, takie jak vorinostat, co wykazano *in vivo* i *in vitro*. Wyniki tych badań wskazują kierunek terapeutyczny i potwierdzają konieczność dalszych badań na zwierzęcych modelach PD [1,18,33].

Omawiając molekularne podłoże PD podkreśla się też rolę czynnika wzrostu fibroblastów – FGF20 (fibroblast growth factor 20). FGF20 należy do rodziny czynników wzrostu fibroblastów, które swoje funkcje biologiczne wykazują poprzez cztery rodzaje receptorów, FGFR1-4. FGF20 przez wiązanie do FGFR1 stymuluje różnicowanie komórek nerwowych w komórki wykazujące ekspresję hydroksylazy tyrozynowej i wpływa dodatnio na przeżycie neuronów dopaminergicznych [34]. Jak wykazano, FGF20 wraz z FG2 – należącym także do rodziny FGF, wzmagal ekspresję α -synukleiny w szczurzych neuronach dopaminergicznych śródmózgowia [34]. Jak sugerują autorzy, FGF20 we wczesnych okresie życia zapewnia proliferację, różnicowanie i ochronę przed stresem neuronów dopaminergicznych śródmózgowia, jednak w późniejszych etapach, chronicznie podwyższony poziom tego czynnika może pośrednio odpowiadać za śmierć komórek nerwowych i zwiększone ryzyko PD. Potwierdzają tę sugestię badania, w których stwierdzono mutacje w rejonie niekodującym w genie *FGF20*, powodujące zaburzenia struktury miejsca wiązania miRNA-433, wzmożoną translokację FGF20 i zwiększoną ekspresję α -synukleiny [21].

Oddziaływanie synukleiny z histonami nie jest jedynym zjawiskiem epigenetycznym charakteryzującym PD. Obniżenie stężenia dopaminy, obserwowane w tej chorobie, związane jest ze spadkiem stężenia trimetylowej pochodnej lizyny -4 w H3. Przewlekła terapia lewodopą prowadzi do deacetylacji lizynowych reszt: -5, -6, -12 i -16. MPTP (1-metyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyna) – związek wywołujący objawy zbliżone do występujących w PD indukuje acetylację w H3 hamowaną przez lewodopę. Powyższe dane potwierdzają naruszenie szlaków epigenetycznych w PD, jednak bezpośrednie implikacje poszczególnych procesów nie są, jak dotąd, pewne [33]. Wiadomo, że przynajmniej w części, uszkodzenia w istocie czarnej mogą być konsekwencją hipometylacji w genie *TNF α* . Hipometylacja prowadzi do nadekspresji białka *TNF- α* i w konsekwencji do zmniejszonej apoptozy neuronów. Wysoki poziom *TNF- α* zanotowano w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych obciążonych PD [33].

Znaczenie acetylacji histonów w etiopatogenezie PD potwierdzają badania z zastosowaniem HDACi. Jak podają Chuang i wsp. [4], podawanie myszom modelowym HDACi – fenylomaślanu znacząco zmniejszało skutki ubytku dopaminy i zanikania neuronów w substancji czarnej, wykazujących ekspresję hydrolazy tyrozynowej, odpowiedzialnej za biosyntezę dopaminy. Inni autorzy wykazali, że śmierci neuronów dopaminergicznych zapobiegało podawanie także innych HDACi, w tym kwasu walproinowego. Stosowane HDACi indukowały przy tym GDNF – neurotroficzny czynnik komórek glejowych (glial-cell line-derived neurotrophic factor) w astrocytach śródmózgowia, co wskazuje na możliwość wykorzystania także GDNF w terapii chorób neurodegeneracyjnych [4].

Choroba Huntingtona (HD)

Choroba Huntingtona jest dziedzicznym schorzeniem neurodegeneracyjnym, przekazywanym z pokolenia na pokolenie

w sposób autosomalny, dominujący, spowodowanym mutacją genową w chromosomie 4. Głównie dotyka neurony kory mózgowej i prądkowia [4,10,33].

Rozpowszechnienie choroby w populacji ogólnej wynosi 10/100 000. Defekt polega na patologicznym zwiększeniu liczby powtórzeń trójek CAG w genie kodującym białko huntingtynę (HTT). Zwiększenie liczby powtórzeń trójek CAG, umiejscowionych w eksonie 1 zmienia konformację HTT. W wyniku tego dochodzi do nagromadzenia nieprawidłowego białka w komórce, co implikuje zaburzenie procesów komórkowych i w efekcie śmierć komórki [4,10,33]. Mimo iż choroba jest dziedziczna, objawy nie pojawiają się zwykle od urodzenia, lecz najczęściej między 30 a 50 rokiem życia. Tylko w około 3% wszystkich przypadków początek choroby przypada na okres dzieciństwa [10].

W badaniu analizującym objawy kliniczne u 1901 chorych, do najczęstszych objawów należały: płasawica, zaburzenia chodu, niestabilność postawy, drażliwość, depresja, niezgrabność ruchów, zaburzenia mowy, utrata pamięci, wypadanie przedmiotów z rąk, utrata motywacji i napędu, zespół urojeniowy, regresja intelektualna, zaburzenia snu, halucynacje, utrata masy i zaburzenia seksualne. Często, przed pojawieniem się objawów ruchowych występują objawy psychiatryczne. Wydają się całkowicie niezależne od objawów ruchowych, a ich progresja może być odmienna niż postęp innych objawów choroby [10].

Zaburzenia emocjonalne, drażliwość, labilność, zachowania agresywne, aspołeczność, nadużywanie alkoholu, apatia oraz pogorszenie zdolności poznawczych w HD, związane są z uszkodzeniem głowy jądra ogoniastego i jądra soczewkowatego oraz funkcji pętli czołowo-podstawnej. Powyższe objawy wynikają, jak się przypuszcza, ze zmniejszenia stężenia acetylocholiny i liczby neuronów GABA-ergicznych w jądrach podstawy [10].

Borovecki i wsp. [2] stwierdzili istotne zmiany w poziomie mRNA 12 genów w próbkach krwi pobranej od pacjentów znajdujących się w różnych stadiach HD. Białka kodowane przez te geny należały do różnych grup funkcjonalnych, m.in. procesów transkrypcji i przemian RNA (koaktywator TAF7, czynnik uczestniczący w splicingu – SF3B1, białka z domenami palca cynkowego), szlaków z udziałem ubikwityny i proteasomu (proteaza ubikwitynoswoista – USP15), transportu pęcherzykowego (proteoglikan 1). Profil ekspresji tych genów u pacjentów we wczesnym stadium przedobjawowym choroby był zbliżony do profilu u osób zdrowych. Profil w późnym stadium przedobjawowym był zbliżony z wyznaczonym u chorych w rozwiniętym, objawowym stadium HD. Autorzy wykazali jednocześnie, że podwyższone poziomy mRNA ulegały redukcji pod wpływem fenylomaślanu sodu – HDACi, podawanego pacjentom przez 4 tygodnie, co wskazuje na znaczenie procesów acetylacji histonów w przebiegu HD i zasadność uwzględnienia HDACi w projektowaniu potencjalnych terapii HD. Ekspresja genów należących do powyższych grup, a także związanych z cyklem komórkowym, kanałami jonowymi, apoptozą, chaperonami, czy gospodarką wapniową różniła szczurze komórki modelowe prądkowia –ST14A i komórki szczepu dzikiego [28]. Autorzy w swoich badaniach wymieniają jako różnicującą, także ekspresję genów związanych z metabolizmem cholesterolu i kwasów tłuszczowych.

Zmutowana HTT wiąże i blokuje domenę HAT w koaktywatorach CBP i CAF, co w efekcie prowadzi do deregulacji transkrypcji [4,9,33]. Oddziaływanie HTT na CBP może polegać też na stymulowaniu tworzenia agregatów tego białka. Efekt ten niektórzy autorzy traktują jako pośrednio wpływający na modyfikację histonów [3]. W mysich modelach HD wykazano wpływ HDACi na łagodzenie zaburzeń motorycznych i atrofii neuronów, przy jednoczesnym wzmożeniu procesów acetylacji histonów i obniżonej ich metylacji. Zmieniona HTT powodowała hipoacetylację H3 i H4 u modelowych myszy R6/2 i 82Q. Trimetylację w H3 wykryto nie tylko u myszy 82Q, ale także u chorych obciążonych HD [33]. Powyższe oddziaływanie HTT w sposób przeciwny w kontekście zależności struktury chromatyny i możliwości zachodzenia procesów transkrypcyjnych (hipoacetylacja i hipermetylacja) wskazuje na znaczenie nieprawidłowej HTT dla procesów utrzymujących równowagę między aktywną transkrypcyjnie a represorową chromatyną [33].

Znaczenie procesów acetylacji histonów w etiopatogenezie HD potwierdzały już badania Hockly i wsp. w 2005 roku. W badaniach przedklinicznych na modelu mysim HD – R6/2, vorinostat po podaniu doustnym wzmacniał procesy acetylacji histonów w mózgu myszy. Objawowo znacząco wygaszał zaburzenia motoryczne. Jak podają Chuang i wsp. [4], wzrost przeżywalności u myszy R6/2 i ograniczenie procesów neurodegeneracyjnych zanotowano też w przypadku zastosowania HDACi – maślanu sodu.

Problemem w wykorzystaniu wymienionych HDACis, stosowanych w opisywanych eksperymentach jest ich toksyczność. Stąd poszukuje się HDACis o selektywnym działaniu. Przykładem takiego inhibitora jest HDACi 4b skierowany wybiórczo przeciw HDAC3. Niewątpliwą jego zaletą, poza selektywnym oddziaływaniem na izoformę HDAC 3 jest to, że hamujące działanie wobec tej deacetylazy HDACi 4b wykazuje w stężeniu 50-krotnie niższym niż stężenie toksyczne [30]. Myszy modelowe R6/2 i kontrolne typu dzikiego były poddawane działaniu tego inhibitora (150 mg/kg m.c.) lub placebo przez 67 dni. Efekty oceniano w badaniach prowadzonych w trakcie podawania HDACi 4b. Inhibitor poprawiał zachowania motoryczne, powodował wydłużenie czasu utrzymywania się zwierząt na walcu (rotarod test), spowalniał spadek masy ciała. W analizie histologicznej wykazano też działanie neuroprotektoryjne. Hamowaniu deacetylacji przypisuje się również normalizację ekspresji genów mózdzku, kory i prądkowia, zaburzonej w HD [30].

W świetle powyższych doniesień, HDACis wydawałyby się doskonałym potencjalnym kandydatem do zastosowania ich w terapii HD. Należy jednak pamiętać o złożoności procesów wewnątrzkomórkowych i tym samym niejednoznaczności funkcji enzymów odpowiedzialnych za zmiany epigenetyczne w obrębie DNA i chromatyny. Dowodem na to jest dwojake działanie HDAC6. Funkcja deacetylazy uniemożliwia acetylację tubul i upośledza transport pęcherzykowy BDNF – czynnika nekrotycznego pochodzenia mózgowego (brain-derived necrotic factor), wykazującego wraz z HSP70 protekcyjną rolę w HD. W tym kontekście, pożądanym jest zastosowanie HDACi. Jednak HDAC6 działa neuroprotektoryjnie uzależniając transport w mikrotubulach, niezbędny do autofagalnego rozpadu agregatów HTT,

a więc wprowadzenie inhibitora będzie odnosić skutek niepożądany. Stąd jednoznaczne zastosowanie HDACi w HD nie musi być gwarantem terapeutycznego sukcesu [3,4,20].

Obserwowane w badaniach nad HD pozytywne efekty HDACis nie wynikają jedynie z funkcji modulatora struktury chromatyny, ale mogą być rezultatem kompleksowej aktywności farmakologicznej. Tak jest np. w przypadku kwasu walproinowego. Jak wykazali Zádori i wsp. [36], podawany myszom modelowym N171-82Q dootrzewnowo w sposób ciągły, w dawce dziennej 100 mg/kg m.c. znacznie wydłużał przeżywalność myszy i poprawiał obniżoną aktywność lokomotoryczną. Takie działanie, jak sugerują autorzy, może być wynikiem uruchomienia przez HDACi mechanizmów antyeksytotoksycznych, GABA-ergicznymi lub hamowania HDAC.

HTT wpływa też na procesy ubikwitynacji histonów. Jak wykazali Kim i wsp. [17] w komórkowym i mysim modelu HD, zaburzona interakcja HTT z kompleksem ligazy ubikwitynowej E3 – hPRC1L E3 związanym z Bmi1 wzmacniała monoubikwitynację H2A, redukując przy tym analogiczny proces w H2B. Upośledzenie tych procesów determinowało przebieg procesów metylacji lizyny 9 w H3. Wyniki uzyskane przez Kim i wsp. [17] potwierdzają teorię znaczenia kodów histonowych i istnienie współdziałania poszczególnych procesów w regulowaniu ekspresji genów.

PODSUMOWANIE

Odkrycie uwarunkowania ekspresji genów od zjawisk epigenetycznych stworzyło nowy rozdział w terapii chorób nieuleczalnych i leczonych dotąd jedynie objawowo.

Skuteczność małowcząsteczkowych modulatorów procesów epigenetycznych, takich jak inhibitory deacetylaz histonowych – HDACis, wykazana w schorzeniach neurologicznych, np.: AD, PD, czy HD potwierdza związek ich etiopatogenezy z posttranslacyjnymi zmianami w histonach.

Poza hipotezami potencjalnie wyjaśniającymi patogenezę AD, obejmującymi, m.in. zaburzenia energetyczne, stres oksydacyjny, czy kaskadę amyloidową z udziałem β -amyloidu oraz stwierdzeniem ponad 160 mutacji w genach kodujących prekursora amyloidu – *PSEN1* i *PSEN2*, wykazano także udział zjawisk epigenetycznych. Stwierdzono wpływ wspomnianych mutacji na aktywność acetylotransferazową białka koaktywatorowego CBP, a także istotność

hipometylacji rejonu promotorowego genu *PSEN1* dla aktywności białka *PSEN1* i wytwarzania β -amyloidu oraz znaczenie zarówno procesów acetylacji, jak i deacetylacji histonowej dla prawidłowej naprawy powstałych w przebiegu AD uszkodzeń DNA, a także ich korelacje z liczbą synaps i poprawą pamięci.

W świetle powyższych badań poszukuje się zatem rozwiązań terapeutycznych wśród czynników bezpośrednio wpływających na procesy acetylacji, tj. HDACs, modyfikując ich funkcję.

W PD okazało się, że α -synukleina tworząca ciałka Lewy'ego – jeden z głównych markerów choroby – wpływa na hamowanie procesów acetylacji oddziałując na deacetylazę SIRT2, ale także na aktywność acetylotransferazową białek koaktywatorowych: CBP, p300 i p/CAF. Ten mechanizm, podobnie jak hipometylacja genu *TNF α* , jest wiązany ze wzmożoną apoptozą neuronów, co wykazano m.in. na przykładzie ludzkich komórek neuroblastomy.

Znaczenie acetylacji histonów w etiopatogenezie PD potwierdziły badania z zastosowaniem HDACis. Inhibitory znosiły efekt neurodegeneracji, w tym neuronów dopaminergicznych u myszy modelowych oraz indukowały neurotroficzny czynnik komórek glejowych – GDNF.

W HD pod wpływem inhibitora HDAC – fenylomaślanu sodu zaobserwowano obniżenie ekspresji na poziomie mRNA 12 genów wykazujących zmiany w zależności od stadium choroby, co stwierdzono w próbkach krwi pobranej od pacjentów obciążonych HD. Zasadność zastosowania HDACis w potencjalnej terapii HD potwierdza blokowanie przez zmutowaną huntingtinę domeny HAT w koaktywatorach CBP i p/CAF. Pożądane efekty HDACi 4b skierowanego wybiórczo przeciw HDAC3 potwierdzono w badaniach na zwierzętach, obserwując zarówno poprawę zachowań motorycznych, spowolniony spadek masy ciała, neuroprotektoryjne działanie HDACi w analizie histologicznej, jak i normalizację ekspresji genów mózdku, kory i prądkowia.

Znajomość procesów modulujących ekspresję genów i, co za tym idzie pośrednio wpływających na kształtowanie odpowiedzi białkowej zrodziła możliwość opracowywania celowanych strategii terapeutycznych ingerujących w procesy patologiczne u samego ich źródła.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abel T., Zukin R.S.: Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2008; 8: 57–64
- [2] Borovecki F., Lovrecic L., Zhou J., Jeong H., Then F., Rosas H.D., Hersch S.M., Hogarth P., Bouzou B., Jensen R.V., Krainc D.: Genome-wide expression profiling of human blood reveals biomarkers for Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 11023–11028
- [3] Cha J.H.: Transcriptional signatures in Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.*, 2007; 83: 228–248
- [4] Chuang D.M., Leng Y., Marinova Z., Kim H.J., Chiu C.T.: Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Trends Neurosci.*, 2009; 32: 591–601
- [5] Costa F.F.: Non-coding RNA-s, epigenetics and complexity. *Gene*, 2008; 410: 9–17
- [6] Courtney E., Kornfeld S., Janitz K., Janitz M.: Transcriptome profiling in neurodegenerative disease. *J. Neurosci. Methods*, 2010; 193: 189–202
- [7] Fiszer U.: Zaburzenia autonomiczne w chorobie Parkinsona. *Aktualn. Neurol.*, 2009; 9: 159–163
- [8] Gavin D.P., Sharma R.P.: Histone modifications, DNA methylation, and schizophrenia. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2010; 34: 882–888
- [9] Gräff J., Mansuy I.M.: Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behav. Brain Res.*, 2008; 192: 70–87
- [10] Gruber B.M.: Witaminy "pamięci". *Aktualn. Neurol.*, 2009; 9: 52–62
- [11] Guil S., Esteller M.: DNA methylomes, histone codes and miRNA: Tying it all together. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2009; 41: 87–95
- [12] Guz J., Foksiński M., Oliński R.: Mechanizm metylacji i demetylacji DNA – znaczenie w kontroli ekspresji genów. *Postępy Biochem.*, 2010; 56: 7–15

- [13] Handel A.E., Ebers G.C., Ramagopalan S.V.: Epigenetics: molecular mechanism and implications for disease. *Trends Mol. Med.*, 2010; 16: 7–16
- [14] Hockly E., Richon V.M., Woodman B., Smith D.L., Zhou X., Rosa E., Sathasivam K., Ghazi-Noori S., Mahal A., Lowden P.A., Steffan J.S., Marsh J.L., Thompson L.M., Lewis C.M., Marks P.A., Bates G.P.: Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 2041–2046
- [15] Hukowska-Szematowicz B., Deptuła W.: Biologiczna rola mikroRNA (miRNA) nowe dane. *Postępy Biol. Kom.*, 2010; 37: 585–597
- [16] Kim D., Nguyen M.D., Dobbin M.M., Fischer A., Sananbenesi F., Rodgers J.T., Delalle I., Baur J.A., Sui G., Armour S.M., Puigserver P., Sinclair D.A., Tsai L.H.: SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J.*, 2007; 26: 3169–3179
- [17] Kim M.O., Chawla P., Overland R.P., Xia E., Sadri-Vakili G., Cha J.H.: Altered histone monoubiquitylation mediated by mutant huntingtin induces transcriptional dysregulation. *J. Neurosci.*, 2008; 28: 3947–3957
- [18] Kontopoulos E., Parvin J.D., Feany M.B.: α -synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity. *Hum. Mol. Genet.*, 2006; 15: 3012–3023
- [19] Kozera D.: Choroba Parkinsona. http://www.neurologiczne.pl/choroba_parkinsona.htm (20.01.2011)
- [20] Lombardi M.S., Jaspers L., Spronkmans C., Gellera C., Taroni F., Di Maria E., Di Donato S., Kaemmerer W.F.: A majority of Huntington's disease patients may be treatable by individualized allele-specific RNA interference. *Exp. Neurol.*, 2009; 217: 312–319
- [21] Mehler M.F.: Epigenetic principles and mechanisms underlying nervous system functions in health and disease. *Progress Neurobiol.*, 2008; 86: 305–341
- [22] Migliore L., Coppè F.: Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases. *Mutat. Res.*, 2009; 667: 82–97
- [23] Nelson P.T., Wang W.X., Rajeev B.W.: MicroRNAs (miRNAs) in neurodegenerative diseases. *Brain Pathol.*, 2008; 18: 130–138
- [24] Olszewska M.J.: Nukleosomy i regulacja aktywności chromatyny. *Postępy Biol. Kom.*, 2010; 37: 657–670
- [25] Paluszczak J., Baer-Dubowska W.: Epigenom i nowotwory: nowy cel terapeutyczny i możliwości diagnostyczne. W: *Postęp w ocenie jakości substancji i produktów leczniczych*, red: E. Grześkowiak. A. Jelińska, M. Zajac. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2010; 297–316
- [26] Ratan R.R.: Epigenetics and the nervous system: epiphenomenon or missing piece of the neurotherapeutic puzzle? *Lancet Neurol.*, 2009; 8: 975–977
- [27] Roth T.L., Sweatt J.D.: Regulation of chromatin structure in memory formation. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2009; 19: 336–342
- [28] Sipione S., Rigamonti D., Valenza M., Zuccato C., Conti L., Pritchard J., Kooperberg C., Olson J.M., Cattaneo E.: Early transcriptional profiles in huntingtin-inducible striatal cells by microarray analyses. *Hum. Mol. Genet.*, 2002; 11: 1953–1965
- [29] Solaroglu I., Zhang J.H.: The neurosurgical role of epigenome. *Surg. Neurol.*, 2009; 71: 159–160
- [30] Thomas E.: Selective HDAC inhibitors. *BIOforum Europe*, 2009; 3: 32–34
- [31] Tremolizzo L., Rodriguez-Menendez V., Brighina L., Ferrarese C.: Is the inverse association between Alzheimer's disease and cancer the result of a different propensity to methylate DNA? *Med. Hypotheses*, 2006; 66: 1251–1252
- [32] Turinsky A.L., Turner B., Borja R., Gleeson J.A., Heath M., Pu S., Switzer T., Dong D., Gong Y., On T., Xiong X., Emili A., Greenblatt J., Parkinson J., Zhang Z., Wodak S.J.: DANCER: Disease-Annotated Chromatin Epigenetics Resource. *Nucleic Acids Res.*, 2011; 39: D889–D894
- [33] Urduingio R.G., Sanchez-Mut J.V., Esteller M.: Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *Lancet Neurol.*, 2009; 8: 1056–1072
- [34] Wang G., van der Walt J.M., Mayhew G., Li Y.J., Züchner S., Scott W.K., Martin E.R., Vance J.M.: Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of α -synuclein. *Am. J. Hum. Genet.*, 2008; 82: 283–289
- [35] Wang W.X., Rajeev B.W., Stromberg A.J., Ren N., Tang G., Huang Q., Rigoutsos I., Nelson P.T.: The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. *J. Neurosci.*, 2008; 28: 1213–1223
- [36] Zádori D., Geisz A., Vámos E., Vécsei L., Klivényi P.: Valproate ameliorates the survival and the motor performance in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2009; 94: 148–153

Autorka deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.