



Rubrika Fórum České neuropsychofarmakologické společnosti se zaměřuje na pravidelná sdělení z oblasti neuropsychofarmakologie. Informuje o aktualitách našeho oboru, přináší podrobné přehledy individuálních preparátů nebo charakteristiky skupin psychofarmak a zabývá se neurobiologií účinku těchto léků. Jako platforma České neuropsychofarmakologické společnosti (ČNPS) přináší také informace z oblasti lékové politiky a informuje o aktuálním dění v ČNPS.

doc. MUDr. Jiří Masopust, Ph.D.

## ΕPIGENETIKA A NEKÓDUJÍCÍ RNA VE VZTAHU K PSYCHOFARMAKOTERAPII

EPIGENETICS AND NON-CODING RNA IN A RELATIONSHIP TO PSYCHOPHARMACOTHERAPY

LADISLAV HOSÁK<sup>1,2,3,4</sup>, JAROSLAV POKORNÝ<sup>5</sup>, JINDŘICH MOUREK<sup>5</sup>, OMAR ŠERÝ<sup>6,7</sup>

<sup>1</sup>Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Psychiatrická klinika

<sup>2</sup>Fakultní nemocnice Hradec Králové, Psychiatrická klinika

<sup>3</sup>Ostravská univerzita v Ostravě, Lékařská fakulta, Katedra interních oborů

<sup>4</sup>Fakultní nemocnice Ostrava, Oddělení psychiatrické

<sup>5</sup>Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Fyziologický ústav

<sup>6</sup>Masarykova univerzita Brno, Přírodovědecká fakulta, Ústav biochemie

<sup>7</sup>Ústav živočišné fyziologie a genetiky Brno, AV ČR, Laboratoř embryologie živočichů

### SOUHRN

Epigenetika se zabývá tím, jak zevní i vnitřní faktory ovlivňují funkci DNA daného organismu, aniž by se přitom změnila její sekvence. Epigenetické vlivy jsou významné jak v buňkách stávajících, tak dceřiných, a to v rámci jedince i mezigeneračního přenosu získaných znaků. Za nejvýznamnější epigenetické mechanismy bývají považovány acetylace histonů a metylace DNA, k nim však přistupuje řada dalších molekulárních procesů. Vedle epigenetiky je dalším odvětvím molekulární biologie výzkum nekódující RNA, který se začíná uplatňovat také ve studiu psychických poruch. Nekódující RNA, vznikající především z tzv. nesmyslné DNA, ovlivňuje genovou expresi. Epigenetické výzkumy doposud byly prováděny jen na tkáních *in vitro*, pokusných zvířatech a zemřelých nemocných. Chybí epigenetické klinické studie. Do budoucna se jako nadějná jeví epigenetická terapie kognitivních poruch, schizofrenie a poruch nálady. Přitom je možno využívat jak léků stávajících (např. valproát, klozapin, sulpirid, escitalopram, lithium), tak látek nově syntetizovaných. Problémem je, že epigenetické účinky uvedených látek nejsou topicky, tkáňově, enzymaticky či genově specifické. To může vést k závažným nežádoucím účinkům. V budoucnu je zapotřebí vyrábět substrátově specifická farmaka s epigenetickými účinky a začít jejich testování na lidech. Epigenetika nám může napomoci při překonávání farmakorezistence duševních poruch, případně v jejich časně detekci a prevenci.

**Klíčová slova:** duševní poruchy, léčba, epigenetika, genová exprese, farmakorezistence

### SUMMARY

Epigenetics deals with the influence of external as well as intrinsic factors on the DNA function in a given organism without the change of DNA sequence. Epigenetic effects are significant in both currently existing cells and their daughter cells. This holds true for an individual organism as well as intergenerational transmission of acquired signs. Histone acetylation and DNA methylation are considered as the most important epigenetic mechanisms. In addition to this, other molecular procedures have already been recognized, including non-coding RNA molecules which influence gene expression. Non-coding RNA is mostly synthesized based on so called nonsense DNA. Epigenetic research has only been performed on *in vitro* tissues, experimental animals and brain tissue of deceased psychiatric patients so far. Clinical epigenetic studies in the treatment of mental disorders are lacking. Epigenetic therapy of cognitive disorders, schizophrenia, and mood disorders seems to be promising for the future. In this effort, both existing medicaments (valproate, clozapine, sulpiride, escitalopram, lithium) and newly synthesized chemical substances can be utilized. The problem is that epigenetic effects of currently known substances are not specific for individual parts of the brain, brain cells, enzymes or genes. This may induce serious adverse effects. In the future, it is necessary to produce substrate-specific epigenetic medicaments, and start epigenetic clinical studies. Epigenetics can help us to overcome treatment resistance of mental disorders, and possibly detect and prevent them early.

**Key words:** mental disorders, treatment, epigenetics, gene expression, treatment resistance

## Úvod

Epigenetika studuje přenos dědičných informací z buněk do dceřiných buněk, který probíhá beze změn v sekvenci kyseliny deoxyribonukleové (DNA). Tento přenos souvisí jak s buněčnou diferenciací, kdy se například z jedné buňky postupně vyvine až 200 různých typů buněk lidského těla, tak také s přenosem informací do zárodečných buněk a do dalších generací daného organismu. Kromě toho se epigenetika zabývá ovlivněním genetických informací ve stávajících buňkách vlivem vnitřního a vnějšího prostředí, opět beze změn sekvence DNA (Csoka a Szyf, 2009).

Na jedné straně epigenetické mechanismy umožňují relativně stabilní přenos informací mimo primární strukturu DNA z buňky na buňku a z organismu na dceřiný organizmus, na druhou stranu jsou tyto epigenetické mechanismy do jisté míry ovlivnitelné vnějšími vlivy. Tato paradoxní situace vede k termínu „epigenetická metastabilita“, vyjadřujícímu stabilitu ovlivnitelnou vnějšími vlivy. U každé buňky pak mluvíme o tzv. epigenetickém statusu, který je dán zejména mírou metylace cytosinu v DNA sekvenci a acetylaci histonů, ale i mnohými dalšími vlivy včetně genetického obsahu mitochondrií. Každá buňka lidského těla může mít jiný epigenetický status (Cortessis et al., 2012). Celkový epigenetický stav genomu se pak označuje jako „epigenom“. Tento pojem byl poprvé použit Waddingtonem (1942).

V rámci psychiatrie epigenetika vnáší světlo do rozdílů mezi jednovaječnými dvojčaty (Czyz et al., 2012). Jednovaječná dvojčata nikdy nemají stejný epigenetický status, to znamená, že exprese stejných genů jsou u těchto dvojčat různá. Současné psychiatrické studie založené na sledování jednovaječných dvojčat již bývají zaměřené na výzkum rozdílů v epigenetickém statusu (Burt, 2012).

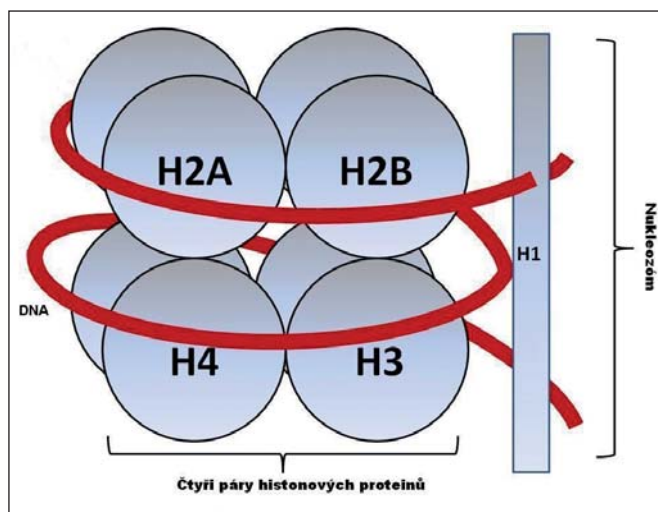
Ukazuje se, že epigenetické mechanismy jsou ovlivněny pohlavím i rasou. DNA žen bývá méně metylována, než DNA mužů. DNA černošské populace je méně metylována, než DNA bělošské populace. Příčin, které sehraávají roli v těchto rozdílech, může být celá řada – od vlivu pohlavních hormonů až po rozdíly v životním stylu.

Složení stravy samo o sobě ovlivňuje epigenetické mechanismy uvnitř lidského organismu. Ukazuje se, že například nedostatek vitamínů B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, a kyseliny listové a zvýšený příjem nasycených mastných kyselin způsobuje hypometylací cytosinu. Naopak příjem zelené zeleniny zvyšuje metylaci DNA.

K epigenetickému výzkumu psychických poruch přispívají nové laboratorní postupy využívající sekvenátory II. generace a čipové technologie. Analýzy probíhají pomocí tzv. bisulfitového sekvenování nebo endonukleáz rozeznávajících metylaci cytosinu.

## Epigeneticky významné struktury a funkce

K epigeneticky významným buněčným strukturám patří zejména histony a vlastní molekula DNA. Histony jsou proteiny, které utvářejí prostorovou strukturu DNA. Strukturální jednotky DNA se nazývají nukleozómy. Nukleozóm tvoří přibližně 147 párů bazí DNA. Nukleozómy se obtácejí kolem čtyř párů histonových proteinů (H2A, H2B, H3 a H4; obr. 1). Histonové proteiny se od sebe liší svým složením, například H2A a H2B obsahují více lyzinu, oproti tomu u proteinů H3 a H4 je přítomno více argininu. Na N-terminálu histonů mohou probíhat chemické modifikace, které pak mění strukturu chromatinu. Může se jednat o metylaci, acetylaci, fosforylaci,



Obrázek 1: Nukleozóm

ubiquitinaci (navázání ubiquitinu) a sumoylaci (připojení signálního proteinu sentrinu). Změna struktury chromatinu může podnítit nebo naopak utlumit expresi genů. Metylace histonů může vést jak ke zvýšení, tak ke snížení exprese příslušných genů (např. dle toho, zda je metylován protein H3 nebo H4). Enzymy, které ovlivňují metylaci histonů, se nazývají histonové metyltransferázy a histonové demethylázy. Funkční výsledek metylace histonů také záleží na tom, kolik metylových skupiny se na lyzinový zbytek naváže. Může to být jedna až tři metylové skupiny. Histony jsou acetylovány histonovými acetyltransferázami. Fosforylace histonů je obvykle spojena s aktivací transkripce DNA. Fosforylace je zprostředkována proteinovými kinázami. V opačném smyslu působí proteinové fosfatázy (Roth et al., 2010).

DNA sama může být metylována na CpG dinukleotidech. Tyto takzvané CpG ostrůvky se u savců vyskytují poblíž přibližně šedesáti procent promotorů genů, i když jinak jsou v DNA jen málo zastoupeny. CpG ostrůvky jsou ty části genomu, které ve vysoké míře obsahují cytosin a guanin. Případná metylace postihuje téměř výlučně cytosin. DNA je metylována DNA metyltransferázami. Metylace DNA obvykle utlumí expresi příslušných genů. Proces metylace DNA může být značně dynamický a reverzibilní. Metylace DNA také spouští tvorbu supresorů transkripce, jako například histonových deacetyláz. Takto probíhá interakce mezi epigenetickými mechanismy spojenými s DNA a histony (Mikaelsson a Miller, 2011; Day a Sweatt, 2012).

Za epigenetické mechanismy lze rovněž považovat genovou translokaci, schopnost opravy DNA, degradaci proteinů, aktivaci transpozónů či změny v oblasti kyseliny ribonukleové (RNA) (Csoka a Szyf, 2009).

## Nekódující ribonukleová kyselina (non-coding RNA, ncRNA)

Na základě nekódující DNA, dříve pokládané za tzv. nesmyslnou DNA, vznikají krátké úseky nekódující RNA (ncRNA). Tyto nekódují žádné proteiny, avšak mají na funkci buňky vliv tím, že ovlivňují genovou expresi (Choudhuri, 2011). Respekt k historii velí v těchto souvislostech vzpomenout Jean Baptistu Lamarcka (1744–1829). Odkaz na jeho dílo (jedná se především o „Philosophie zoologique“ z r. 1809)

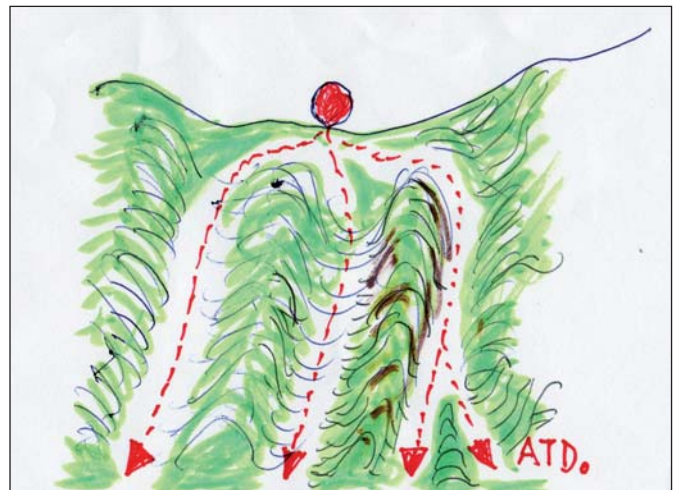
je pozoruhodný. J. B. L. ve zmíněném díle podal – a to asi jako prvý – souvislý a logicky seřazený výklad vývoje života na zemi. Jedním z důležitých prvků jeho koncepce byla tzv. „dědičnost získaných znaků“. Později se toto označuje jako „soft inheritance“ nebo „inheritance of acquired characters“ (IAC). Uvedený koncept se později začal nazývat obecně „lamarckismem“. Rok vydání zmíněného díla je současně rokem narození Charlese Darwina (1809). Jeho stěžejní dílo „O původu druhů“ z roku 1859 nastolilo od té doby trvalý konflikt, boj, až nevráživost mezi oběma koncepcemi evolučního vývoje. Tento spor se pro Lamarcka nevyvíjel příznivě. Jeho rozsáhlé dílo bylo – již za jeho života – předmětem kritiky, která nepostrádala odpudivostí, prvky závisti, dezinterpretace a nespravedlivých invektiv (Novák, 1979). Tato kritika lamarckismu byla velmi často i „živena“ falzifikacemi (Krammerer z konce 19. století), později z třicátých let minulého století pak Lysenkem. Mnohokrát bylo konstatováno, že Darwinův výklad vývoje druhů není plně uspokojivý, i když později se neodarwinisté snažili o jeho modifikace. Objevem ncRNA tento spor dostává zcela nový rozměr (Koonin a Wolf, 2009).

ncRNA vznikají transkripční úseky intronů i oblastí DNA nacházejících se mezi geny, nejsou výjimkou i úseky intron- exon. Tzv. nekódující, dříve také nesmyslná DNA tvoří přibližně 98 % našeho genomu. Kódující část lidského genomu představuje tedy pouze necelá 2 % naší DNA. Jedná se o kolosální nepoměr. Ještě před nedávnem byla nekódující část našeho chromozomálního vybavení pokládána za „smetí“ nebo v nejlepším případě za „parazitární vývojové zbytky“. Přitom základní nálezy o tom, že vývoj je paralelně doprovázen fenoménem geometricky narůstající řady nekódujících úseků – intronů, byl již znám, avšak inadekvátně interpretován (Koonin a Wolf, 2009).

Postupný vývoj od jednobuněčných organizmů až k savcům je při standardním počtu kódujících úseků (exonů) doprovázen (či spíše podmíněn) ohromným nárůstem množství nekódující DNA. Počet kódujících exonů je relativně stabilní. Například člověk se v tomto směru téměř neliší od tzv. „háďátka“ *Caenorhabditis elegans*. Tento hlíst, obsahující přibližně  $10^3$  buněk, má přibližně stejný počet genů (22 000) jako člověk, jehož tělo je složeno z  $10^{14}$  buněk. Odlišnost člověka od hlísta v tomto případě není v počtu kódujících exonů, ale v množství nekódující DNA (Mattick a Makunin, 2006).

Transkripce nekódující DNA a následné štěpení (splitting) vytváří velmi malé úseky ncRNA (obvykle s počtem 18–22 kodónů), pohybující se v cytoplazmě a kontrolující genovou expresi. Kontrolní mechanismus spočívá v jejich připojení na mediátorovou RNA (mRNA), kterou buď blokuje nebo štěpí, a tím zamezí v realizaci dané exprese. I když se jedná o relativně recentní nálezy, existuje již všeobecná shoda v tom, že jednotlivé formy ncRNA představují zásadně důležitý kontrolní mechanismus, např. při ontogenetickém vývoji organismu. Kontrolní funkce ncRNA nejen podmiňuje vlastní ontogenetický vývoj, ale respektuje i vlivy epigenetické (Choudhuri, 2011).

Epigenetická informace může tedy modifikovat funkci DNA prostřednictvím její metylace či shora zmíněných úprav nosných histonů, ale i prostřednictvím ncRNA. Jedná se o tvárnost, která se promítá až do evoluční paměti a primárně zajišťuje přežití organismu. Zevní faktor, mající dostatečnou váhu, vede ke změně exprese genu a tato změna se může stát dědičnou, byť v omezeném rozsahu. Zevní prostředí v této koncepci vystupuje jako aktivní činitel, život se mu přizpůsobuje (obr. 2).



Obrázek 2: „Krajina epigenomu“ – volně podle Waddingtona (1942). Kulička nahoře představuje genom, který realizuje či nerealizuje své různé možnosti na základě zevních vlivů.

ncRNA hrají rovněž významnou roli v utváření neuronální plasticity. Jejím základem je genetický program pro tvorbu neuronálních okruhů. Fenotypová variabilita daných neuronálních funkcí byla přikládána variabilitě jednotlivých genů. Již dlouho se však ví, že individuální variabilita funkce nervového systému je v podstatné míře ovlivněna i faktory prostředí (epigenetickými faktory). Předpokládáme-li, že substrátem dlouhodobé paměťové stopy (např. po dlouhodobé potenciaci) je změna účinnosti synaptického přenosu, pak je nutné hledat cesty, kterými jsou aktivované synapse „přestavěny“. Hlavním místem syntézy látek, potřebných pro změnu přenosových vlastností aktivované synapse, je patrně biosyntetický aparát somatu neuronu. Ten je však od synapse dosti vzdálený, v některých případech i několik milimetrů či až decimetrů u senzoryckých a motorických vláken. Je zvažováno, že ncRNA se podílí na přenosu signálu mezi biosyntetickým aparátem neuronu a synapsí jakožto informační médium (Doyle a Kiebler, 2011). Problémem přestavby více či méně vzdálené aktivované synapse je přenos stavebních látek, tvořených v těle neuronu, do této synapse. Uvedený přenos musí být přesně cílený. Možným řešením je opatřit transportovaný materiál (transportní vesikly) něčím, jako adresou cílové synapse. Mohou to být tzv. „topogenní sekvence“ proteinů nebo specifické sekvence molekul ncRNA, sloužící jako „poštovní směrovací čísla“ (zipcodes) (Blobel, 1980). Další možností, kde se opět účastní některé z forem ncRNA, je označení aktivované synapse (tagging), které usnadní cílený přenos a správné zakončení stavebních komponent synapse.

Kromě popsané intraneuronální komunikace mezi synapsí a somatem mohou mít ncRNA význam i v komunikaci mezi neurony a případně s gliemi, a to jak prostřednictvím synaptických kontaktů, tak extrasynapticky. Uvažované přenosové médium této komunikace jsou exozómy. Jedná se o malé sekreční mikrovezikuly, které transportují bílkoviny, lipidy i nukleové kyseliny. Z hlediska synaptické plasticity mohou exozómy přenášet některé morfogenetické bílkoviny, neurotrofní faktory, enzymy a také mRNA či ncRNA (Smalheiser a Lugli, 2009). Exozomální přenos je posílen v situacích, které mohou navodit dlouhodobou potenciaci (LTP) nebo jiné změny související se vznikem paměťové stopy (Smalheiser, 2007; Smythies a Edelstein, 2012). Zatímco membránové

potenciály aktivují neuroplastické děje na synapsích pouze nepřímo, signální molekuly mohou synapse modifikovat většinou přímo, rychle a případně trvale.

Je však nutno doplnit, že epigenetika a význam nekódující RNA nejsou samy o sobě argumentem pro lamarkismus. Mezigenerační přenos epigenetických modifikací je omezen co do rozsahu i počtu generací (Bohacek et al., 2013).

---

### Epigenetické možnosti léčby demence

---

Spouštěcím faktorem amyloidové kaskády u Alzheimerovy choroby může být „poranění“ mozku, tj. např. vliv toxické látky ze zevního prostředí. Předpokládá se, že faktory zevního prostředí ovlivňují epigenetické mechanismy v mozku. Změna metylace DNA může být indukována například olovem, arzénem, tabákem či formou diety (vliv mají např. omega 3 mastné kyseliny, vitamín C, vitamín E, kyselina listová nebo vitamín B<sub>12</sub>). Toto se děje prostřednictvím změn oxidativního stresu v mozkové tkáni, kdy například olovo jej zvyšuje. Významným epigenetickým faktorem je výskyt metylovaného cytosinu v řetězci DNA. Předpokládá se jeho vliv na patogenezi Alzheimerovy choroby. U duševně zdravých osob se liší míra metylace DNA v jednotlivých oblastech mozku, také u neuronů oproti gliím. Rozdíly v metylaci DNA jsou také mezi jednotlivými etniky. U Alzheimerovy choroby se všeobecně předpokládá hypometylace DNA, zejména ve spánkovém laloku mozku. Uvedená demethylace se týká neuronů, astrocytů i mikroglí. Tyto poznatky je možno v budoucnu terapeuticky využít (Coppieters a Dragunow, 2011).

Bylo zjištěno, že v rámci demence u Alzheimerovy choroby rovněž vznikají patologické formy ncRNA. Ty se podílejí na tvorbě beta-amyloidu. Látky ovlivňující ncRNA by tedy mohly být rovněž využity při léčbě kognitivních poruch (Day, a Sweatt, 2012).

U pokusných zvířat bylo prokázáno, že tvorba paměťové stopy je spojena s acetylací histonů. Inhibitory histonových deacetyláz podporují acetylaci histonů a tvorbu paměťové stopy. Pro kognitivní funkce jsou významné zejména epigenetické změny v hipokampu a prefrontální mozkové kůře. U demence u Alzheimerovy choroby se předpokládá dysregulace acetylace a fosforylace histonů. Nález preklinických studií podporují možnost využití inhibitorů histonových deacetyláz (např. kyselina valproová) v léčbě poruch paměti. Rovněž může být přítomna hypometylace některých úseků DNA, jak ukazují post mortem studie u lidí. To podporuje využití diety bohaté na metylové skupiny (kyselina listová, vitamíny B<sub>6</sub> a B<sub>12</sub>) v léčbě Alzheimerovy choroby (Mikaelsson a Miller, 2011).

Ve stárnoucím mozku dochází ke snížené expresi genů, vztahujících se k neuroplasticitě, takže tato postupně klesá. Jedná se zejména o geny Arc (activity-regulated cytoskeletal gene), Zif268 (nerve growth factor inducible-A) a BDNF (brain-derived neurotrophic factor). Nové léčebné postupy využívající epigenetické mechanismy by mohly tento trend zvrátit. Potenciálním terapeutickým cílem se mohou stát histonové deacetylázy, ncRNA deaktivující mediátorovou RNA či metylace DNA. To se již nyní prokazuje v preklinickém výzkumu na myších a potkanech (Kosik et al., 2012).

Zeng et al. (2011) prokázali deficit dlouhodobé synaptické plasticity související s věkem a ztrátu dendritických trnů v hipokampu u 344 potkanů kmene Fisher ve stáří do dvou let. To bylo spojeno s poklesem acetylace histonů chromatinu, upregulací histonové deacetylázy (HDAC)

2 a poklesem exprese histonové acetyltransferázy. Tyto změny následně postihly promotor genu pro brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Byla snížena jeho exprese a poškozena následná neuronální signalizace v hipokampu. Vliv popsaných mechanismů bylo možno zvrátit posílením exprese BDNF a trkB cestou inhibice HDAC nebo přímou aktivací trkB receptorů 7,8-dihydroxyflavonem (7,8-DHF). Jedná se o nově identifikovaného selektivního agonistu receptorů trkB. 7,8-DHF rovněž vykázal epigenetický vliv na obnovení acetylace histonů. Tato látka je tedy potenciálně využitelná v léčbě poruchy kognitivních funkcí například u Alzheimerovy choroby.

Na základě poznatků výzkumu u pokusných zvířat Day a Sweatt (2012) souhrnně uvádějí následující epigenetické postupy potenciálně využitelné v léčbě poruch paměti u demence u Alzheimerovy choroby: Podávání látek zvyšujících metylaci histonů (např. S-adenosyl methionin), posilování fosforylace histonů, která obvykle aktivuje transkripci DNA cestou inhibice proteinové fosfatázy či ovlivnění histonové poly-ADP (poly-adenosindifosfátové) ribosylace.

---

### Epigenetika a léčba schizofrenie

---

Dysfunkce GABAergního systému (systému kyseliny gamma-aminomáselné) v telencefalu může být dle různých studií spojena s psychotickým onemocněním. Dong et al. (2009) předpokládají, že tato dysfunkce je spojena s hypermetylací promotoru genů dekarboxylázy kyseliny glutamové (GAD67), reelinu a dalších, které jsou exprimovány v GABAergních neuronech. Toto bylo prokázáno výzkumem u zemědělných osob se schizofrenií, zejména v prefrontální mozkové kůře. Uvedená hypermetylace je zřejmě následkem zvýšení funkce DNA metyltransferáz. Pokud jsou promotory genů GAD67 a reelinu demetylovány, exprese těchto genů vzrůstá až osmdesátinásobně. GAD67 reguluje syntézu a funkci GABA. Pokles exprese genu GAD67 vede k poklesu funkce GABAergní inhibiční neurotransmise. Následně je dysregulováno pálení (firing) pyramidových neuronů, což vede k narušení kognitivních funkcí. Reelin ovlivňuje tvorbu dendritických trnů a také strukturu a funkci glutamátových receptorů. Pokud je snížena hladina GAD67 a reelinu, klesá počet dendritických trnů, snižuje se exprese genů glutamátových receptorů a kompenzačně se zvyšuje počet postsynaptických podjednotek alfa2 a alfa5 GABAA receptoru v prefrontální mozkové kůře. Na základě několika studií je možno tvrdit, že u schizofrenie je typický deficit GABAergní neuronální funkce. Ovlivnění GABAergní neurotransmise je tedy důležitým cílem při hledání nových léků proti schizofrenii. Zde by odpovídající léčebnou strategií bylo podávání valproátu, který snižuje hypermetylaci promotorů genů ve vztahu ke GABA. Je známo, že účinnost antipsychotik druhé generace je vyšší, pokud jsou podávána spolu s valproátem. To vede k úvahám, zda současné podávání antipsychotik druhé generace také snižuje metylaci promotorů genů spojených s neurotransmisí GABA. Výsledky studií na myších (Dong et al., 2009) naznačují, že klozapin a sulpirid (nikoliv však haloperidol či olanzapin), pokud jsou podávány společně s valproátem, navozují remodelaci chromatinu s následnou demetylací DNA. V důsledku toho se exprese genů reelinu a GAD67 zvýší. Jako perspektivní v léčbě schizofrenie se jeví inhibitory DNA metylace. V současné době jsou z nich nejúčinnější nukleosidové analogy. Bohužel nejsou schopny překonat hematoencefalickou bariéru a působí pouze v dělicích se buňkách. Jinou možností je častěji podávat léky,

kteří usnadňují demetylaci DNA. K nim patří právě zmíněný valproát. DNA demetylaci navozuje valproát nepřímo, cestou remodelace chromatinu.

Day a Sweatt (2012) uvádějí další látky, které by mohly snížit hypermetylaci DNA u schizofrenie. Jsou to inhibitory DNA metyltransferáz, jako zebularin, 5-aza-deoxycytidin nebo RG108. Doposud však nebyly v tomto ohledu provedeny klinické studie u postižených osob.

Dle Akbariana (2010) je DNA některých genů u schizofrenie abnormním způsobem metylována, tj. nadměrně či nedostatečně. Jedná se například o geny pro reelin, dysbindin, katechol-O-methyltransferázu nebo SOX10. Poslední uvedený gen kóduje transkripční faktor, významný pro myelinizaci neuronů a funkci oligodendrocytů. Další postižené geny se vztahují ke glutamatergní či GABAergní neurotransmisi, případně k neurovývojovým změnám. Nelze říci, že by u schizofrenie jednoznačně převažovala hypermetylace či naopak hypometylace. Nalezené změny u pacientů oproti duševně zdravým lidem také nejsou výrazné. Rovněž byly zjištěny změny modulace histonů u schizofrenie. Bohužel uvedené nálezy byly málokdy dostatečně replikovány v nezávislých šetřeních. Metylace DNA může být ovlivněna například faktory sociálního prostředí, ischemií mozku, toxickými látkami zevního prostředí, nikotinem, alkoholem, psychostimulanty nebo antipsychotiky.

Kyselina valproová je mohutným inhibitorem histonových deacetyláz. Zatím byl však studován zejména její vliv na DNA v jádru buňky, nikoliv na DNA mitochondriální. Mitochondriální DNA kóduje 13 jednotek komplexu oxydativní fosforylace. Mitochondriální DNA však není navázána na histony, ale vytváří podobně jako bakterie tzv. nukleoidy s jinými proteiny. Pro mitochondriální epigenetiku je tedy významná metylace DNA, nikoliv modifikace histonů. Chen et al. (2012) jako první studovali krátkodobý (1 den) a protražovaný (3 dny) účinek valproátu na myši buňky *in vitro*. Uvedený lék snižoval výskyt 5-hydroxymetylcytosinu, nikoliv však 5-metylcytosinu, na mitochondriální DNA. Tento efekt byl sledován jen po třídním podávání. Není jasné, jaký má tento vliv valproátu funkční význam. Současně byl snížen výskyt TET1 proteinu v mitochondriích. Předpokládá se, že valproát nejdříve inhiboval histonové deacetylázy v jádře buňky, v důsledku toho se zvýšila transkripce genu pro TET1 protein, poté kompenzatorním mechanismem poklesla přítomnost TET1 proteinu v mitochondriích. TET1 je hlavním enzymem, který zajišťuje jadernou konverzi 5-metylcytosinu na 5-hydroxymetylcytosin. Podílí se tedy na regulaci transkripce mitochondriálních genů. K podrobnějšímu zjištění epigenetického vlivu valproátu na mitochondriální DNA je zapotřebí další výzkum. Takto v budoucnu lépe porozumíme léčebným a nežádoucím účinkům tohoto léku, případně dalších inhibitorů histonových deacetyláz. Epigenetické vlivy valproátu v mitochondriích by mohly být využity například při léčbě schizofrenie. Zatím však k tomu nebyly provedeny potřebné studie u lidských jedinců.

Ve výzkumu u pokusných myši bylo prokázáno, že preparát vareniclin, užívaný v humánní medicíně v léčbě závislosti na tabáku, kdy tento lék je agonistou alfa4, beta2 a alfa7 neuronálních nikotinových acetylcholinových receptorů, navozuje třetinový pokles tvorby metyltransferázy DNA a zvýšenou expresi genu dekarboxylázy kyseliny glutamové typu 67 v GABAergních interneuronech mozkové kůry a hipokampu. Těchto epigenetických poznatků by bylo možno využít v léčbě

poruch pozornosti a kognitivních funkcí u schizofrenie (Maloku et al., 2011).

### Léčba poruch nálady a epigenetika

Epigenetický výzkum etiopatogeneze i léčby poruch nálady je na základě současných poznatků nadějný. Ve výzkumech Meaneyho a Szyfa (2005) na potkanech variace v mateřské péči (pečující vs. nepečující matky) regulovaly expresi genu glukokortikoidního receptoru v hipokampu mláďat. Tento účinek přetrvával jako stabilní až do období dospělosti. Mláďata, o která se staraly pečující matky, vykazovala následně méně úzkostných projevů a byla odolnější vůči stresu. To se projevilo i tehdy, když matka mláďate nebyla jeho biologickou matkou, a byla jen matkou „pěstounskou“. Vliv zevního prostředí (způsobu péče ze strany matky) tedy zde byl významnější, než vliv genů mláďate. Toto epigenetické „programování“ však je možno psychofarmakologicky ovlivnit v pozdějším životě. Lze to učinit například podáváním inhibitorů histonových deacetyláz (McGowan a Kato, 2008). Epigenetické změny mohou být v některých případech přenášeny i z jedné generace na druhou.

Pokud jde o léčbu mánie, význam metylace DNA je podtrhován možností využití valproátu, který je inhibitorem histonové deacetylázy a současně snižuje metylaci DNA (McGowan a Kato, 2008). S-adenosyl methionin (SAM), který je donorem metylových skupin při metylaci DNA, má oproti tomu účinky antidepressivní. Při výzkumu pokusných zvířat se ukazuje, že antidepressivní účinky léků mohou být mimo jiné zprostředkovány modifikací histonů v oblasti promotoru genu pro BDNF. Epigenetické změny, které vyžadují určitý čas, mohou být vysvětlením, proč se antidepressivní účinek farmak obvykle projevuje až po několika týdnech podávání.

Posmrtné studie mozků nemocných s bipolární afektivní poruchou prokázaly hypometylaci DNA v oblasti promotoru genu pro katechol-O-methyltransferázu (COMT) v prefrontální mozkové kůře. U monozygotních dvojčat, diskordantních pro bipolární afektivní poruchu, byl nalezen pokles metylace DNA genu pro PPIEL (peptidylprolyl isomerase E-like) u nemocného jedince. V jiné studii osoby s bipolární afektivní poruchou II. vykazovaly hypometylaci genu pro PPIEL oproti duševně zdravým kontrolním jedincům. Protein PPIEL je zahrnut do dopaminergní neurotransmise a neuroendokrinních systémů (McGowan a Kato, 2008).

Histonové deacetylázy mimo jiné působí na protein CREB (cAMP response-element-binding protein), který je prokazatelně zahrnut do patofyziologie bipolární afektivní poruchy. Uvedené deacetylázy také podstatně ovlivňují tvorbu synapsí, opět významnou v rozvoji a léčbě bipolární poruchy. Inhibitory histonových deacetyláz mění epigenetický stav. Mohou zvrátit dysfunkční epigenetickou regulaci navozenou nepříznivými psychotraumatizujícími událostmi na počátku života, což se již prokázalo v preklinických modelech. Tyto epigeneticky působící látky by tudíž mohly být terapeuticky využity zejména u bipolární afektivní poruchy a depresivní epizody. Kromě valproátu k nim patří například trichostatin A, scriptaid či butyrát sodný. Bez epigenetického vlivu není ani lithium. To mimo jiné indukuje fosfoacetylaci histonu H3 v amygdale a tímto snižuje oxidativní stres. V příštích studiích je třeba zkoumat epigenetické změny navozené podáváním antidepressiv či thymopropylaktik (Machado-Vieira et al., 2011).

Protein P11, také v literatuře uváděný pod názvem S100A10, se podílí na nitrobuňčném přenosu transmembránových

proteinů směrem k povrchu buňky. Kromě toho ovlivňuje činnost serotoninových receptorů v mozku. Jeho zapojení do patofyziologie deprese bylo prokázáno u lidských jedinců i hlodavců. Z posmrtných studií vyplývá, že v mozkové tkáni osob s depresí je proteinu P11 nedostatek oproti duševně zdravým lidem. Některé druhy antidepressiv, jako jsou tricyklicka či inhibitory monoaminoxidázy, a také elektrokonvulzivní terapie zvyšují hladinu P11 ve frontální mozkové kůře pokusných hlodavců. Nyní se prokázalo, že genová terapie v oblasti P11 je účinná v potlačení deprese podobného chování, předtím navozeného u pokusných myší. Doposud není dobře známo, jakým molekulárním mechanismem antidepressiva zvyšují expresi genu pro P11. Melas et al. (2012) popsali snížené hladiny P11 ve spojení se zvýšenou metylací promotoru genu pro P11 v prefrontální mozkové kůře pokusných potkanů, kdy byla deprese geneticky modelována. Uvedená hypermethylace DNA byla úspěšně odstraněna chronickým podáváním escitalopramu. Takto se exprese genu P11 zvýšila. Současně poklesla syntéza dvou metyltransferáz (Dnmt1 a Dnmt3a), které v jiné studii prokazatelně udržovaly metylaci DNA v lidské mozkové kůře u dospělých osob. Uvedené údaje tedy podporují názor, že látka P11 je zapojena do patofyziologie deprese a gen pro P11 je ovládán epigenetickými mechanismy, které mohou být ovlivněny také antidepressivy.

---

#### Některé problémy při výzkumu a možném použití epigenetické léčby v psychiatrii

---

Dosavadní studie probíhaly na tkáňových kulturách *in vitro*, pokusných zvířatech a mozkových tkáních zemřelých osob s psychickými poruchami. Chybí epigenetické klinické studie u psychiatrických pacientů. Není jasné, zda epigenetické změny jsou příčinou či následkem chorobných procesů v rámci duševních poruch (Day a Sweatt, 2012).

Doposud víme jen málo, nakolik jsou nalezené epigenetické změny v lidském mozku časově stabilní, zda odrážejí trvalý stav či jen momentální odchylku od normy. Výzkumy na buněčných tkáních například ukazují, že metylace DNA se může měnit v rozmezí minut až hodin, dle toho, jak působí nebo jsou blokovány DNA metyltransferázy. Také zatím dobře neznáme, jak během života probíhají fyziologické epigenetické změny v mozku u duševně zdravých lidí (Akbarian, 2010).

Současná metodika výzkumu zatím neumožňuje zjistit, které epigenetické změny chromatinu v mozku se nacházejí v neuronech a které např. v buňkách glií. U schizofrenie zase není jasné, které nalezené epigenetické změny souvisí s příznaky tohoto onemocnění a které nikoliv (Akbarian, 2010).

Další problém je, že inhibitory histonových deacetyláz nebo inhibitory DNA metyltransferáz nejsou selektivní pro jednotlivé podtypy těchto enzymů, podtypy neuronů, jejich geny nebo oblasti mozku. Některé geny by takto byly ovlivněny žádoucím způsobem, jiné však nežádoucím a vznikly by závažné nežádoucí účinky léku. Epigenetické mechanismy jsou navzájem propojeny a terapeutická změna v oblasti jedné by způsobila nežádoucí změny epigenetických mechanismů na jiném místě. Je třeba mít na paměti, že odblokováním metylace může být vyvolán proces buněčného dělení vedoucí ke vzniku nádoru. Je tedy nutné vyvíjet specifické epigenetické léky. Rovněž je nutno zkoumat transgenerační přenos epigenetických změn. Ten poškozuje činnost mozku

rovněž u potomků, ale může být využit také terapeuticky (Day a Sweatt, 2012).

Co se týče nežádoucích epigenetických účinků psychofarmak, inhibice histonové deacetylázy a demethylace DNA kyselínou valproovou mohou vysvětlovat hepatotoxické a teratogenní účinky tohoto léku. Metylfenidát, používaný k léčbě hyperkinetické poruchy, mění expresi genů vztahujících se k neuronální signalizaci a neuroplasticitě. Obdobným způsobem působí kokain či amfetaminy. Genovou expresi mění rovněž antidepressiva SSRI, což může vysvětlovat například desenzitizaci serotoninových 5-HT<sub>1A</sub> receptorů při dlouhodobém podávání fluoxetinu. Hypermethylace DNA, navozená podáváním některého z farmak, může vest k farmakorezistenci. Dlouhodobým nežádoucím lékovým účinkům lépe porozumíme tehdy, když budeme měřit stav metylace DNA a expresi jednotlivých genů. Tyto postupy by měly být zahrnuty do hodnocení bezpečnosti jednotlivých farmak. Mohly by být nazvány „farmakoepigenomikou“ (Csoka a Szyf, 2009).

V obecné rovině lze uvést, že některá psychofarmaka epigenetické účinky mají, nevíme však zatím přesně, nakolik je toto relevantní vzhledem k jejich žádoucím či nežádoucím účinkům klinickým.

---

#### Směry budoucího rozvoje výzkumu a užití epigenetické léčby duševních poruch

---

Epigenetické faktory patří mezi regulátory genové exprese. Těch je však celá řada, včetně nekódující RNA. Některé působí krátkodobě, jiné dlouhodobě a mohou se v určitých případech přenášet mezigeneračně.

Je třeba začít pracovat na klinických epigenetických studiích u duševně nemocných. Zde by byla kromě klinického stavu pacientů hodnocena také genová exprese, a to spíše nepřímou, například v případě proteinů receptorových podjednotek mozku sledováním změny hustoty výskytu těchto receptorů pozitronovou emisní tomografií během příslušné farmakoterapie. Budoucí epigenetické terapie by však měly být substrátově specifické, aby se zamezilo nežádoucím lékovým účinkům (Mikaelsson a Miller, 2011). Je třeba kombinovat sledování epigenetických změn s hodnocením hladiny příslušné RNA a množství syntetizovaného proteinu (Akbarian, 2010).

V dalším epigenetickém výzkumu Alzheimerovy choroby by se měla oddělit její familiární a sporadická forma (Coppeters a Dragunow, 2011). Epigenetické nálezy by v budoucnu mohly sloužit jako markery případné rozvíjející se demence u Alzheimerovy choroby, obdobně jak je tomu již nyní v onkologii, například při výzkumu karcinomu prostaty (Mikaelsson a Miller, 2011).

---

#### Závěr

---

Dosavadní poznatky epigenetiky v oblasti léčby duševních poruch jsou roztříštěné, vznikly výzkumem tkáňových kultur *in vitro*, pokusných zvířat či mozkové tkáně zemřelých osob s psychickými poruchami. Nejsou provedeny žádné klinické studie hodnotící vliv epigenetických faktorů na živé psychiatrické pacienty. Přestože řada výše uvedených léků je duševně nemocným běžně podávána, doposud nebylo známo, že kromě účinků farmakodynamických mohou mít také účinky epigenetické, a to jak žádoucí, tak nežádoucí. Poznání epigenetiky nám v budoucnu napomůže při vývoji

lepších léčebných možností pro duševně nemocné, také při překonávání farmakorezistence. Epigenetika může mít také svůj význam při časně detekci a prevenci duševních poruch.

*Sestavení této práce bylo podpořeno grantem P-34/LF1/7 a grantem NT14504/2013 Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví ČR.*

*prof. MUDr. Ladislav Hosák, Ph.D.  
Psychiatrická klinika  
Fakultní nemocnice  
Sokolská 581  
500 05 Hradec Králové  
e-mail: hosak@lfhk.cuni.cz*

## LITERATURA

- Alkbarian S. Epigenetics of Schizophrenia. *Curr Top Behav Neurosci* 2010; 4: 611-628.
- Blobel G. Intracellular protein topogenesis. *European Journal of Cell Biology* 1980; 22: 153-153.
- Bohacek J, Gapp K, Saab BJ, Mansuy IM. Transgenerational epigenetic effects on brain functions. *Biol Psychiatry* 2013; 73: 313-320.
- Burt SA. Twin and family studies are actually more important than ever. *Behav Brain Sci* 2012; 35: 361.
- Coppieters N, Dragunow M. Epigenetics in Alzheimer's Disease: a Focus on DNA Modifications. *Curr Pharmaceut Design* 2011; 17: 3398-3412.
- Cortessis VK, Thomas DC, Levine AJ, Breton CV, Mack TM, Siegmund KD, Haile RW, Laird PW. Environmental epigenetics: prospects for studying epigenetic mediation of exposure-response relationships. *Hum Genet* 2012; 131: 1565-1589.
- Csoka AB, Szyf M. Epigenetic side-effects of common pharmaceuticals: A potential new field in medicine and pharmacology. *Med Hypotheses* 2009; 73: 770-780.
- Czyz W, Morahan JM, Ebers GC, Ramagopalan SV. Genetic, environmental and stochastic factors in monozygotic twin discordance with a focus on epigenetic differences. *BMC Med* 2012; doi: 10.1186/1741-7015-10-93.
- Day JJ, Sweatt JD. Epigenetic Treatments for Cognitive Impairments. *Neuropsychopharmacology Reviews* 2012; 37: 247-260.
- Dong E, Grayson DR, Guidotti A, Costa E. Antipsychotic subtypes can be characterized by differences in their ability to modify GABAergic promoter methylation. *Epigenomics* 2009; 1: 201-211.
- Doyle M, Kiebler MA. Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging. *The EMBO Journal* 2011; 30: 3540-3552.
- Chen H, Dzitojeva S, Manev H. Effect of valproic acid on mitochondrial epigenetics. *Eur J Pharmacol* 2012; 690: 51-59.
- Choudhuri S. From Waddington's epigenetic landscape to small non-coding RNA: some important milestones in the history of epigenetics research. *Toxicol Mech Methods* 2011; 21: 252-274.
- Koonin EV, Wolf YI. Is evolution Darwinian or/and Lamarckian? *Biology Dir* 2009; 4: doi: 10.1186/1745-6150-4-42.
- Kosik KS, Rapp PR, Raz N, Small SA, Sweatt JD, Tsai LH. Mechanisms of Age-Related Cognitive Change and Targets for Intervention: Epigenetics. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2012; 67: 741-746.
- Machado-Vieira R, Ibrahim L, Zarate CA. Histone Deacetylases and Mood Disorders: Epigenetic Programming in Gene-Environment Interactions. *CNS Neurosci Therapeutics* 2011; 17: 699-704.
- Maloku E, Kadriu B, Zhubi A, Dong E, Pibiri F, Satta R, Guidotti A. Selective alpha4 beta2 Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists Target Epigenetic Mechanisms in Cortical GABAergic Neurons. *Neuropsychopharmacology* 2011; 36: 1366-1374.
- Mattick JS, Makunin VI. Non Coding RNA. *Human Mol Genetics* 2006; 15: 17-29.
- McGowan PO, Kato T. Epigenetics in mood disorders. *Environ Health Prev Med* 2008; 13: 16-24.
- Meaney MJ, Szyf M. Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. *Dialogues Clin Neurosci* 2005; 7: 103-123.
- Melas PA, Rogdaki M, Lennartsson A, Björk K, Qi H, Witasz A, Werme M, Wegener G, Mathe AA, Svenningsson P, Lavebratt C. Antidepressant treatment is associated with epigenetic alterations in the promoter of P11 in a genetic model of depression. *Int J Neuropsychopharmacology* 2012; 15: 669-679.
- Mikaelsson MA, Miller CA. The Path to Epigenetic Treatment of Memory Disorders. *Neurobiol Learn Mem* 2011; 96: 13-18.
- Novák V. J.B. Lamarck – člověk, vědec a myslitel (1744-1829). *Čas Lék Českých* 1979; 118: 1562-1563.
- Roth TL, Roth ED, Sweatt JD. Epigenetic regulation of genes in learning and memory. *Essay Biochem* 2010; 48: 263-274.
- Smalheiser NR. Exosomal transfer of proteins and RNAs at synapses in the nervous system. *Biology Direct* 2007; 2: 35.
- Smalheiser NR, Lugli G. microRNA regulation of synaptic plasticity. *Neuromol Med* 2009; 11: 133-140.
- Smythies J, Edelstein L. Transsynaptic modality codes in the brain: possible involvement of synchronized spike timing, microRNAs, exosomes and epigenetic processes. *Front Integr Neurosci* 2012; 6: 126.
- Waddington C. The epigenom. *Endeavour* 1942; 1: 18-20.
- Zeng Y, Tan M, Kohyama J, Sneddon M, Watson JB, Sun YE, Xie CW. Epigenetic Enhancement of BDNF Signaling Rescues Synaptic Plasticity in Aging. *J Neurosci* 2011; 31: 17800-17810.