

Farmacologia cellulare e molecolare

PR

Epigenetica e farmaci epigenetici

Cos'è l'epigenetica ????

Il termine epigenetica si riferisce ai cambiamenti che influenzano il **FENOTIPO** senza alterare il **GENOTIPO** dell'individuo.

E' **una branca della genetica** che studia tutta una serie di alterazioni che sono in grado di influenzare l'espressione dei geni, pur non alterando la sequenza del DNA.



Un segnale epigenetico è un cambiamento ereditabile che non **altera la** sequenza nucleotidica di un gene, ma la **sua attività**.
Si tratta, quindi, di fenomeni ereditari in cui il fenotipo è determinato non tanto dal genotipo ereditato in sé, quanto dalla **sovrapposizione al genotipo stesso di "un'impronta" che ne influenza il comportamento funzionale**.

Queste mutazioni sono anche chiamate **EPIMUTAZIONI**, che **possono trasmettersi a generazioni successive** delle cellule attraverso le divisioni cellulari, senza tuttavia che le corrispondenti sequenze di DNA siano mutate; sono quindi fattori non-genomici che provocano una diversa espressione dei geni dell'organismo



Le interazioni tra geni e ambiente sono responsabili dell'alterazione delle traiettorie dello sviluppo , portando ad esempio ad un adattamento evolutivo oppure ad una vulnerabilità verso determinate malattie



Your Genes

+

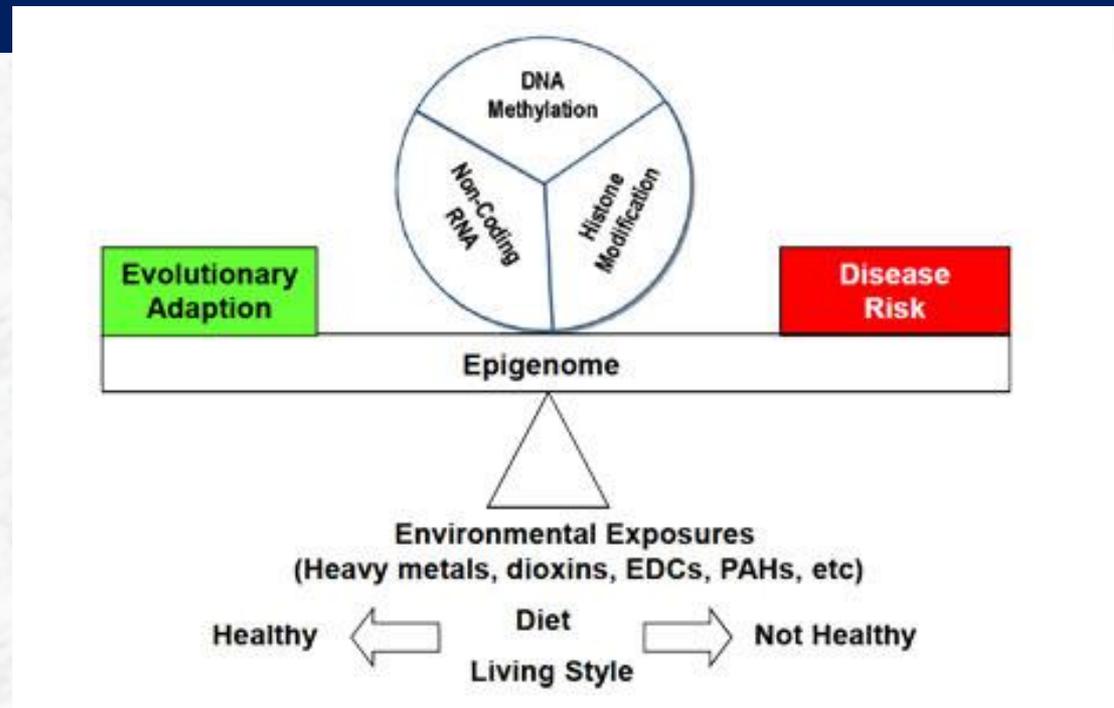


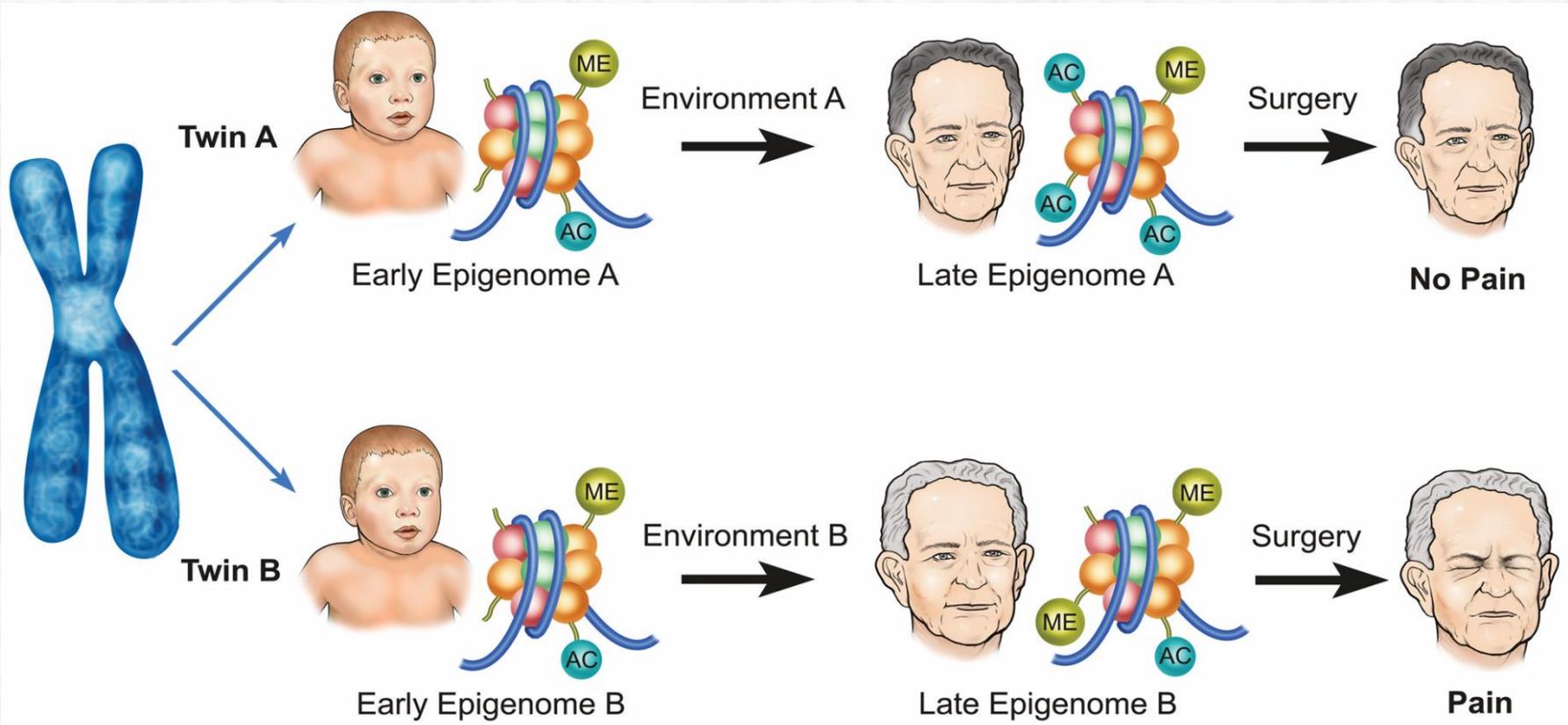
Environment & lifestyle

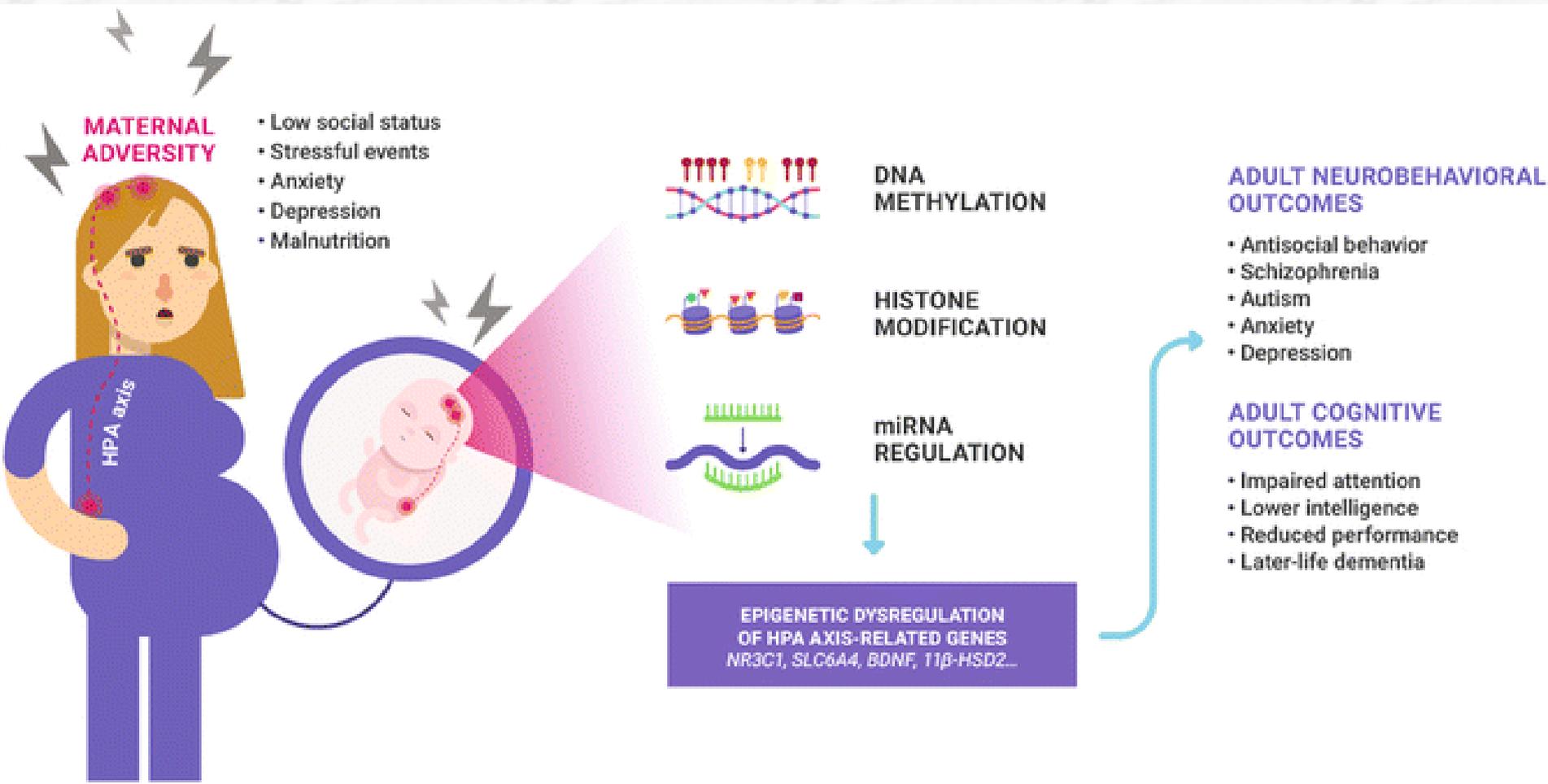
=

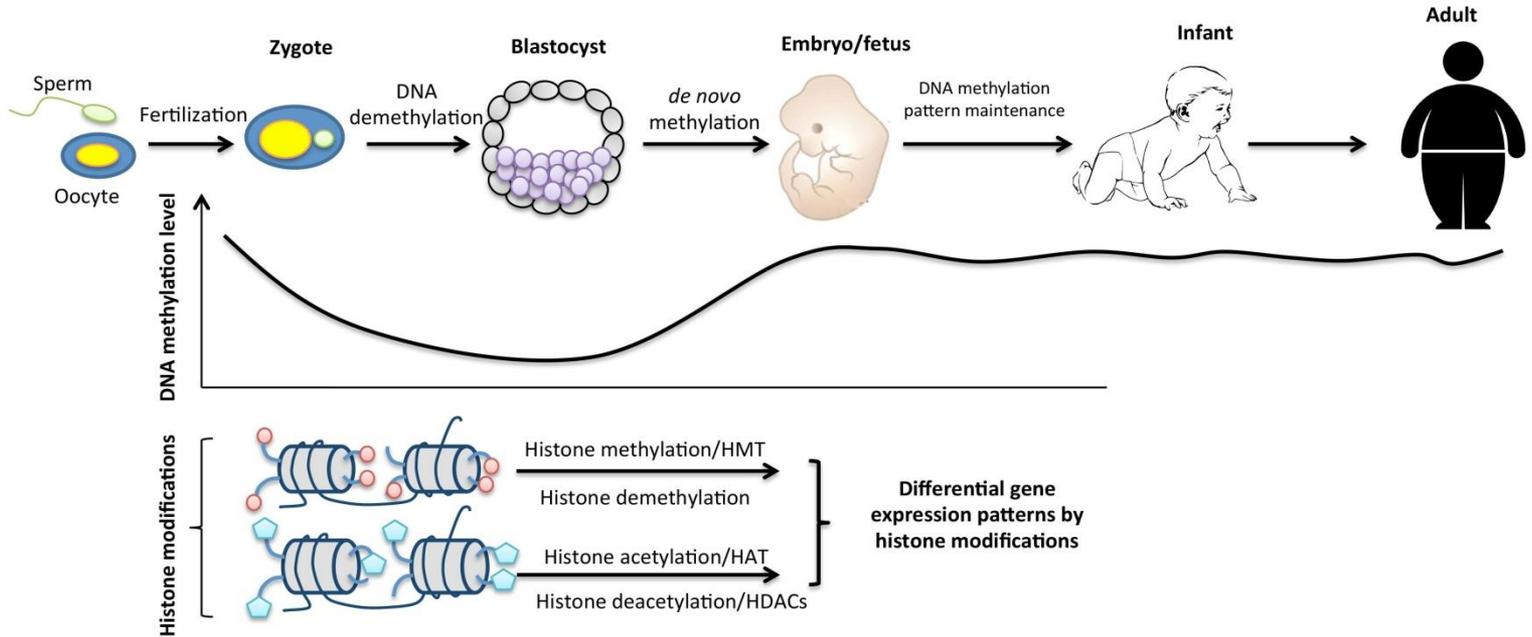
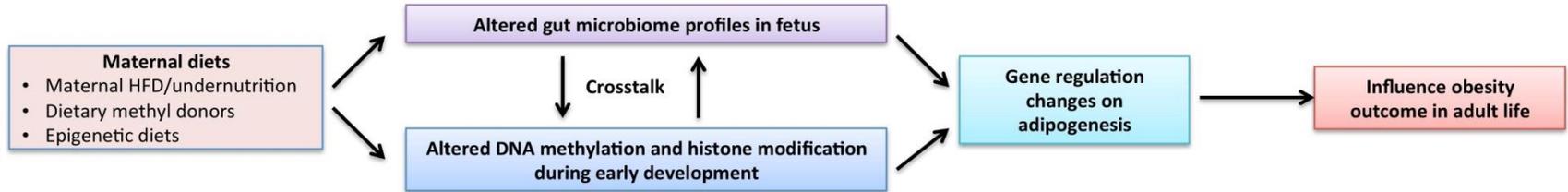


YOU









La genetica da sola non determina il nostro stato di salute

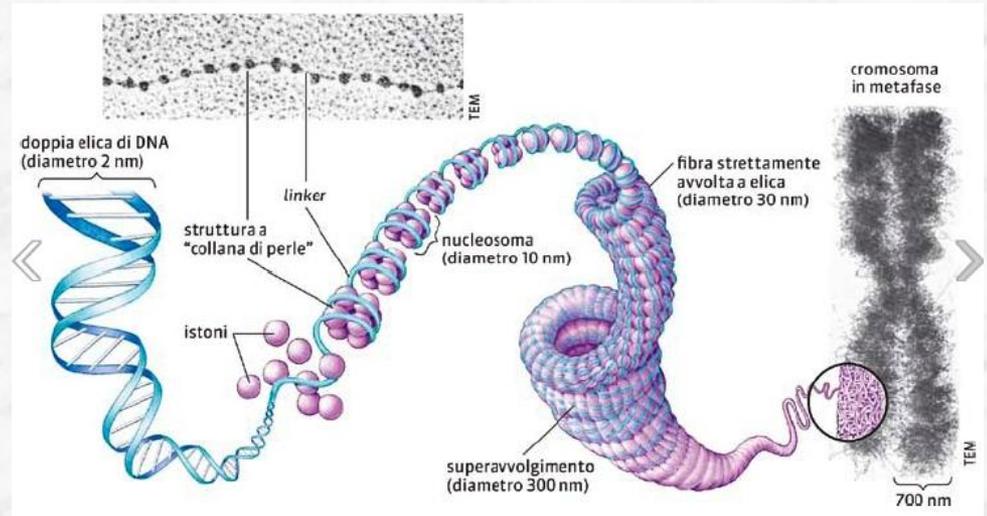


ORGANIZZAZIONE E STRUTTURA DELLA CROMATINA

La **cromatina** è la forma in cui gli acidi nucleici si trovano nella cellula. Negli eucarioti è costituita principalmente da:

DNA avvolto intorno a gruppi di proteine (istoni = H) formando il NUCLEOSOMA

La struttura complessiva della cromatina dipende da vari fattori:

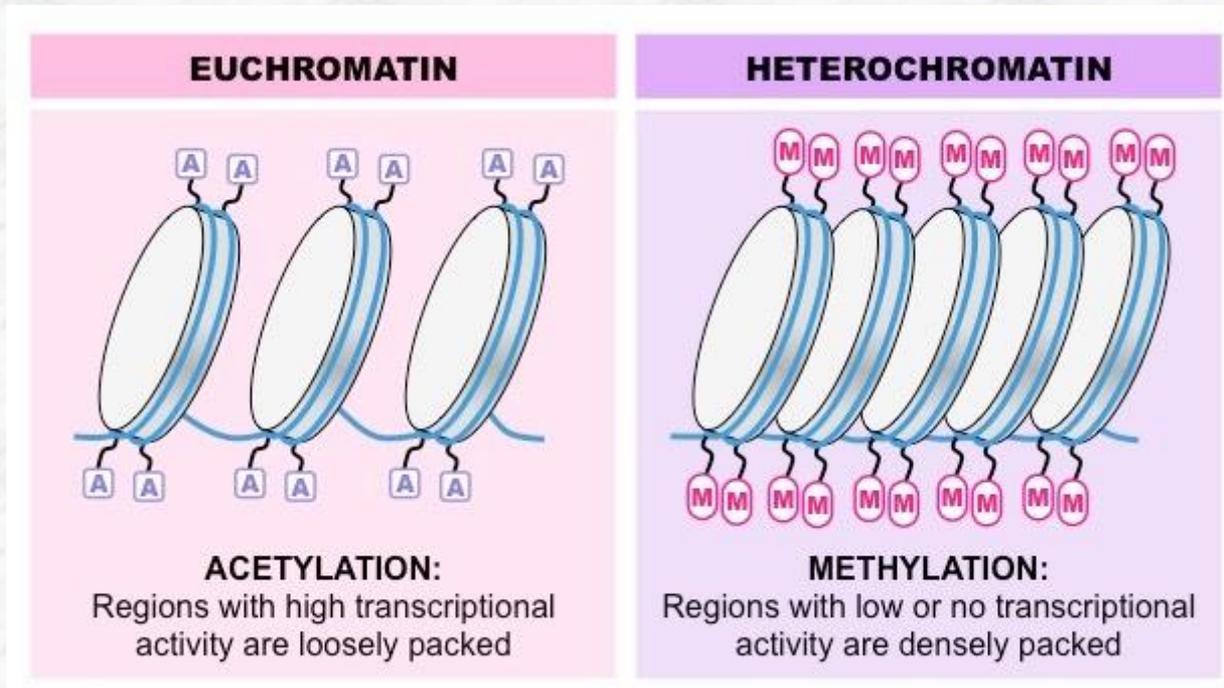


Es. FASE del ciclo cellulare = durante l'interfase, la cromatina è strutturalmente allentata per permettere l'accesso a DNA e RNA polimerasi che trascrivono e replicano il DNA

Es. In base ai tipi di geni trascritti = è meno condensata quando è associata a geni trascrizionalmente attivi, mentre è impacchettata nei geni inattivi

EUCROMATINA vs ATTIVA

ETEROCROMATINA INATTIVA



Porzioni di cromatina meno spiralizzata. Poco elettrondensa



Il DNA è disponibile per la trascrizione.

Porzioni di cromatina molto spiralizzata (Elettrondensa)



Il DNA non viene trascritto

Principali meccanismi epigenetici:

1. modifiche istoniche

2. metilazione del DNA

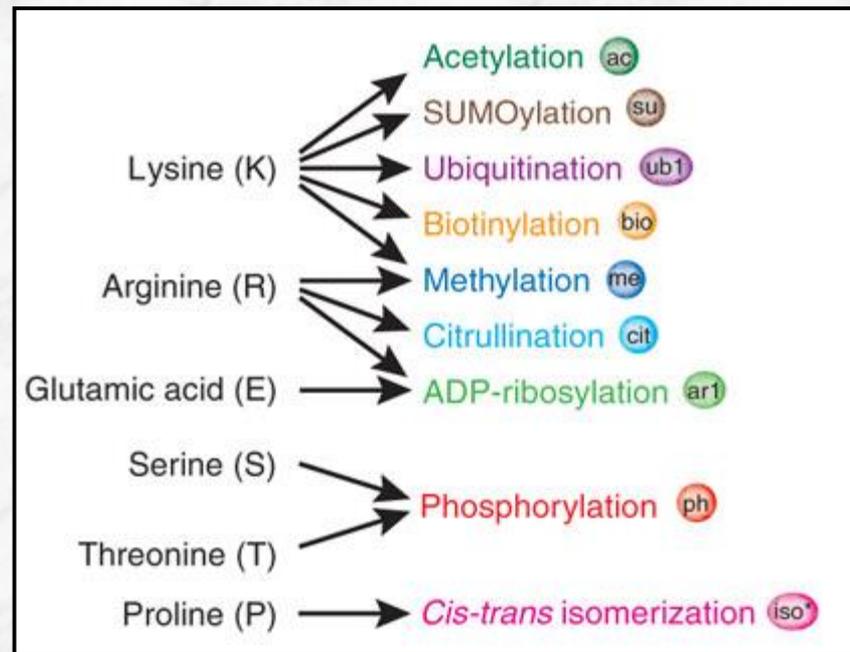
Tali modificazioni sono **dinamiche** e **reversibili**, anche negli adulti.

3. non-coding RNA (ncRNA) = è una molecola di RNA funzionale che viene trascritta dal DNA ma non tradotta in proteine → **funzionano per regolare l'espressione genica a livello trascrizionale e post-trascrizionale.**

I **ncRNA correlati all'epigenetica** includono **short-ncRNA** (microRNAs (miRNAs), short interfering RNAs (siRNAs), and piwi-interacting RNAs (piRNAs) e **long-ncRNA.**

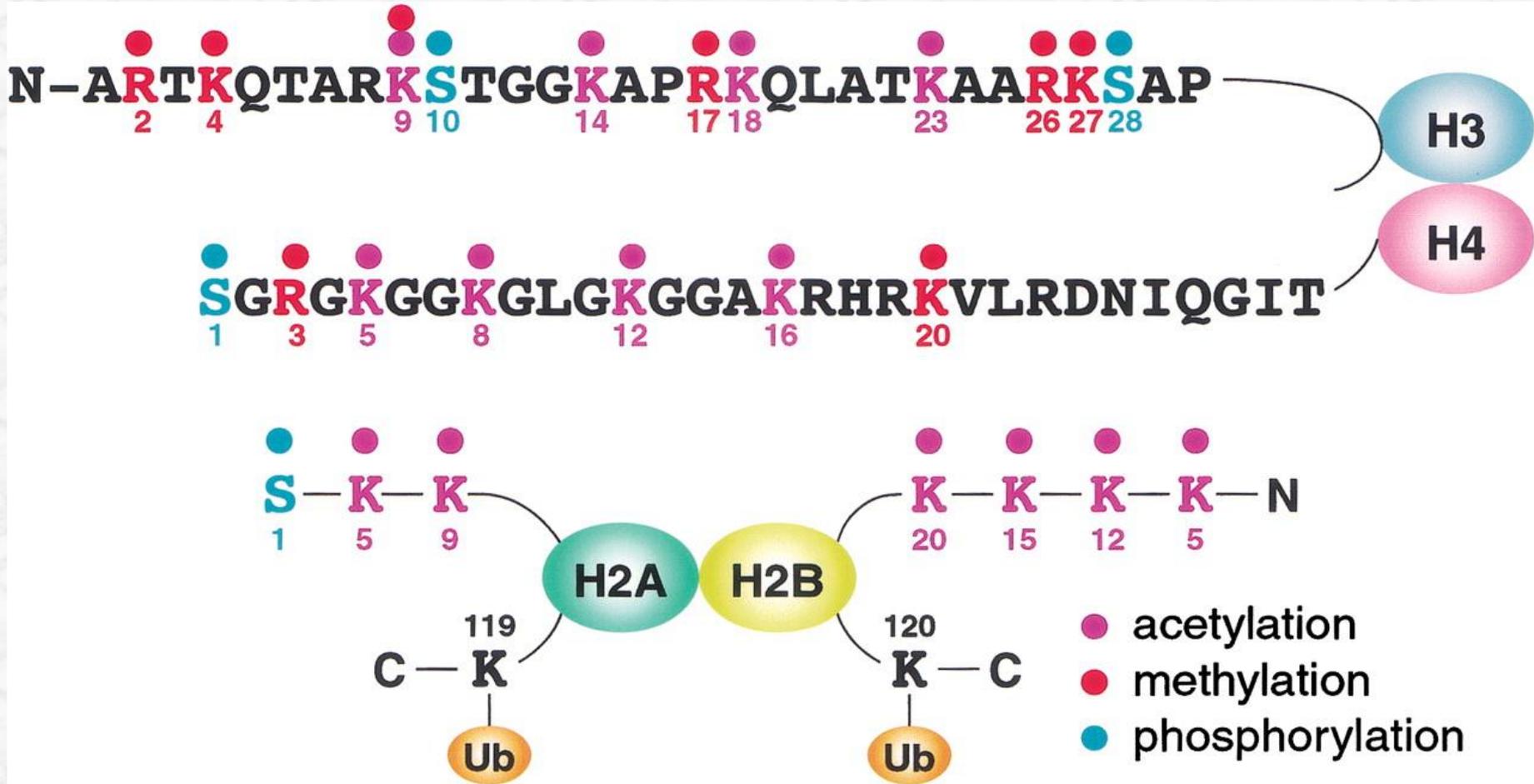
1. Modifiche degli istoni SONO MODIFICHE POST-TRADUZIONALI

- Acetilazione
- Metilazione
- Fosforilazione
- Ubiquitinazione
- Sumoilazione
- ADP-ribosilazione



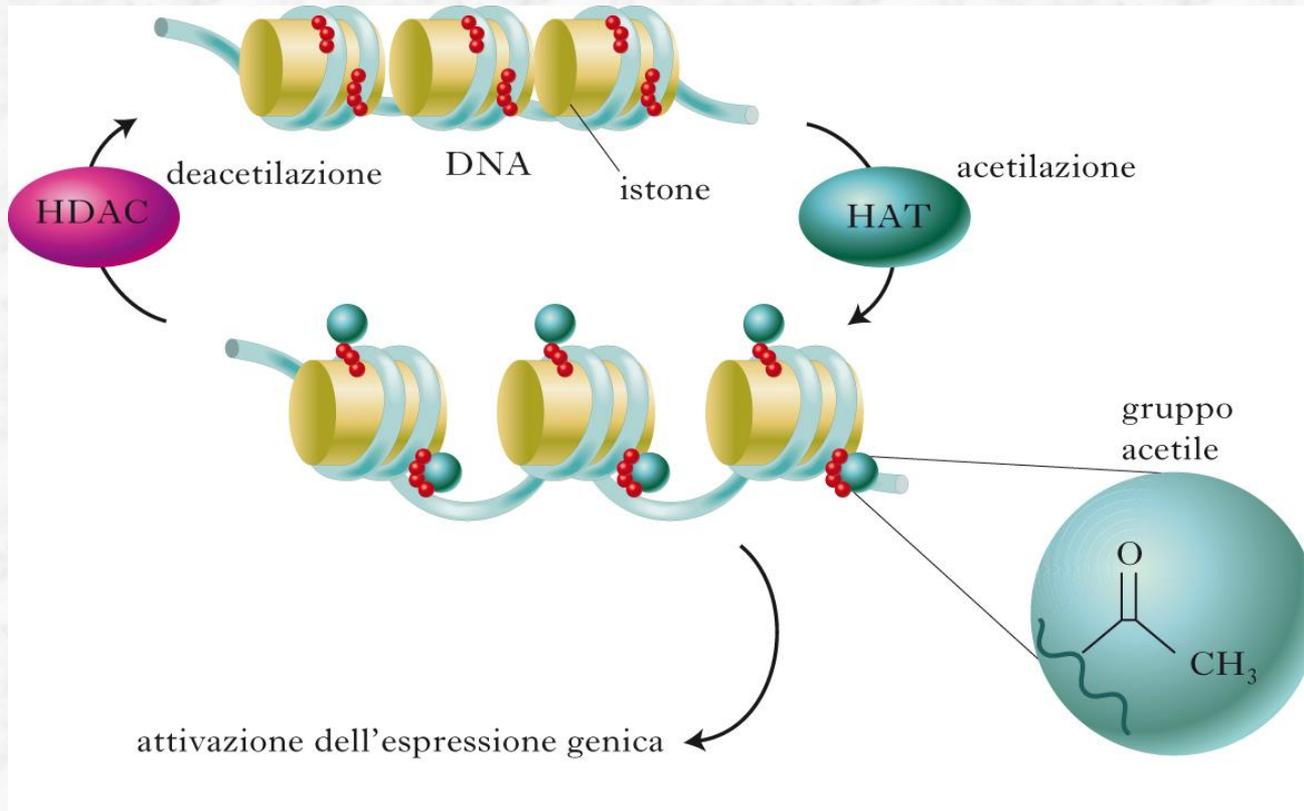
Responsabili di cambiamenti conformazionali della cromatina.

Alterazioni a carico degli istoni



Lisine = K; Arginine = R; Serine = S

Acetilazione e De-Acetilazione



HDACs
(Tante isoforme)

La rimozione dei gruppi acetile è generalmente associata alla condensazione della cromatina ed al conseguente
→ **silenziamento genico**

HATs
(Tante isoforme)

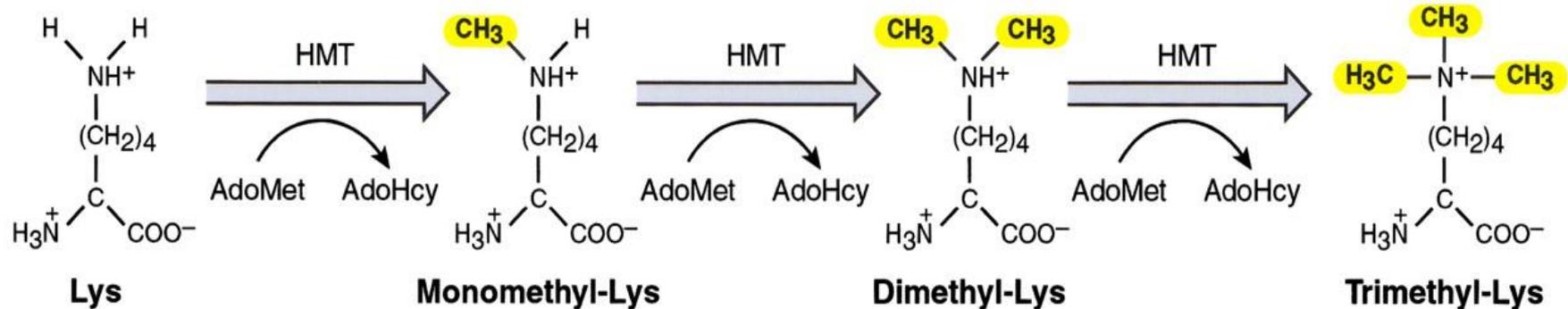
L'acetilazione degli istoni è associata alla decondensazione della cromatina
→ **attiva la trascrizione**

La metilazione degli istoni

Avviene grazie all'azione di istone-metiltransferasi (HMTs) che hanno come target alcuni residui di arginina (R) o di lisina (K) → **un atomo di H è sostituito da un gruppo -CH3**

In genere la metilazione di R è attivatrice della trascrizione, quella delle K inibisce; non dipende solo dal tipo di residuo modificato ma anche dalla quantità di gruppi -CH3 aggiunti

Es . la K può essere MONO, DI o TRI metilata

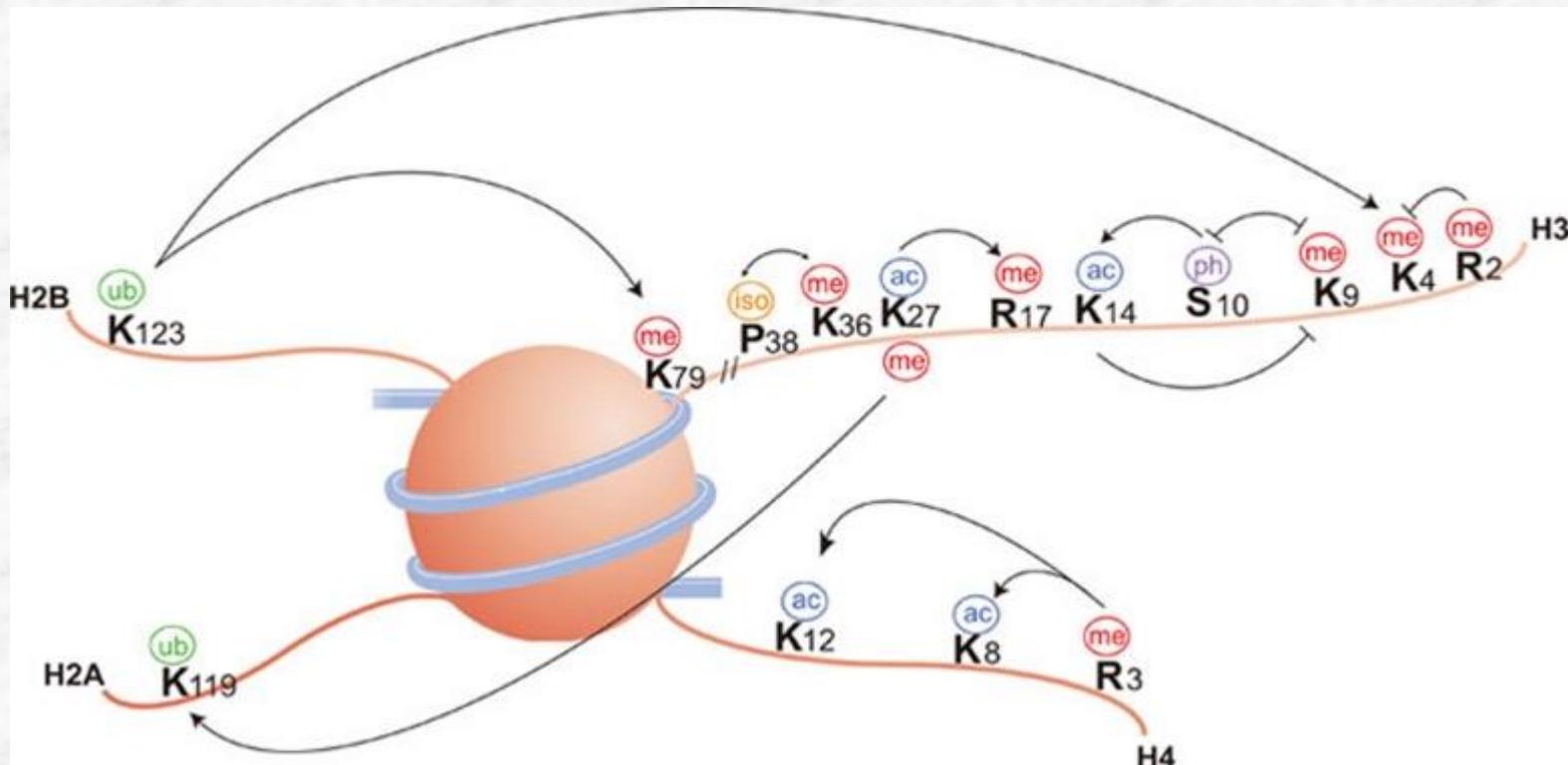


Tab.1 Modifiche epigenetiche istoniche

Histone PTMs		
Acetylated lysine (Kac)	H3 (9, 14, 18, 56), H4 (5, 8, 13, 16), H2A, H2B	Activation
Phosphorylated serine/threonine (S/Tph)	H3 (3, 10, 28), H2A, H2B	Activation
Methylated arginine (Rme)	H3 (17, 23), H4 (3)	Activation
Methylated lysine (Kme)	H3 (4, 36, 79) H3 (9, 27), H4 (20)	Activation Repression
Ubiquitylated lysine (Kub)	H2B (123s/120 ^u) H2A (119 ^u)	Activation Repression
Sumoylated lysine (Ksu)	H2B (6/7), H2A (126)	Repression
Isomerized proline (Pisom)	H3 (30-38)	Activation/ repression

Cross-talk delle modificazioni istoniche

Le modifiche istoniche possono agire positivamente o negativamente sulle altre modifiche.



Regulation of chromatin by histone modifications

Bannister and Kouzarides

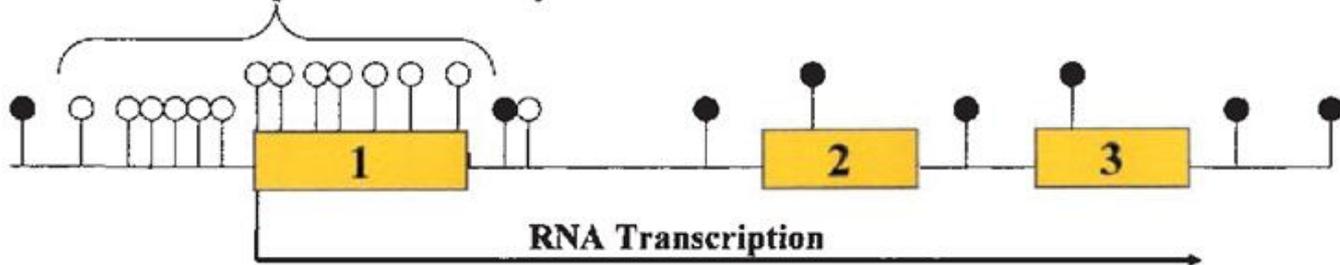
(Cell Res 2011 Mar;21(3):381-95)

2. Metilazione del DNA

Dei circa 3 miliardi di coppie di basi che costituiscono il genoma di mammifero, **circa il 40% sono coppie CG e il 2-7% di esse è metilato**. Nelle cellule eucariotiche la metilazione è a carico della Citosina (C) delle isole CpG.

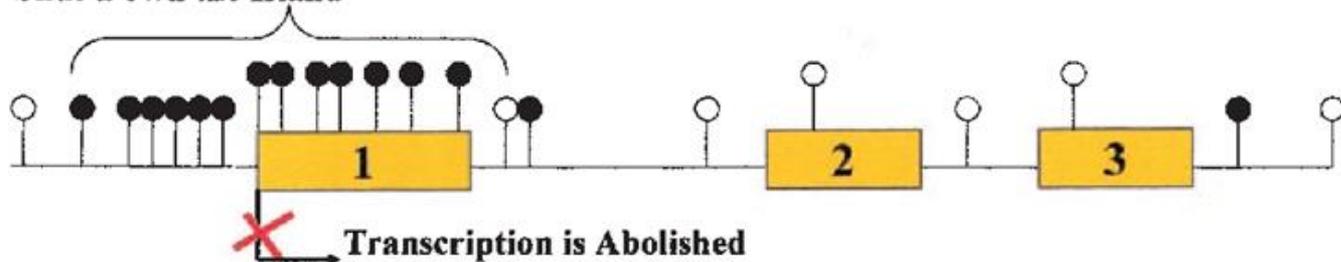
Unmethylated CpG Island

Activators, Histone Acetyltransferases,
Basal Transcriptional Machinery Protect the Island



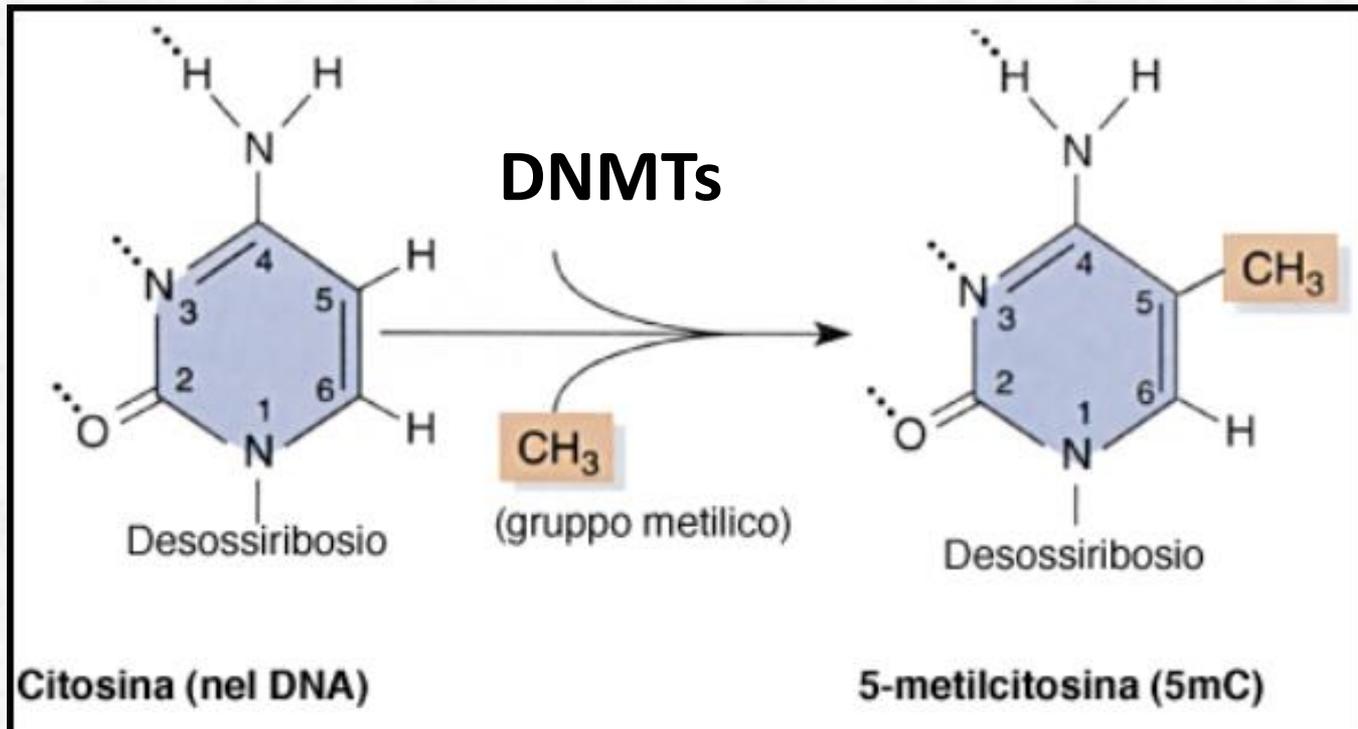
Hypermethylated CpG Island

Transcriptional Repressors, Histone Deacetylases,
DNA Methyltransferases and Methyl-binding Proteins
Shut-Down the Island



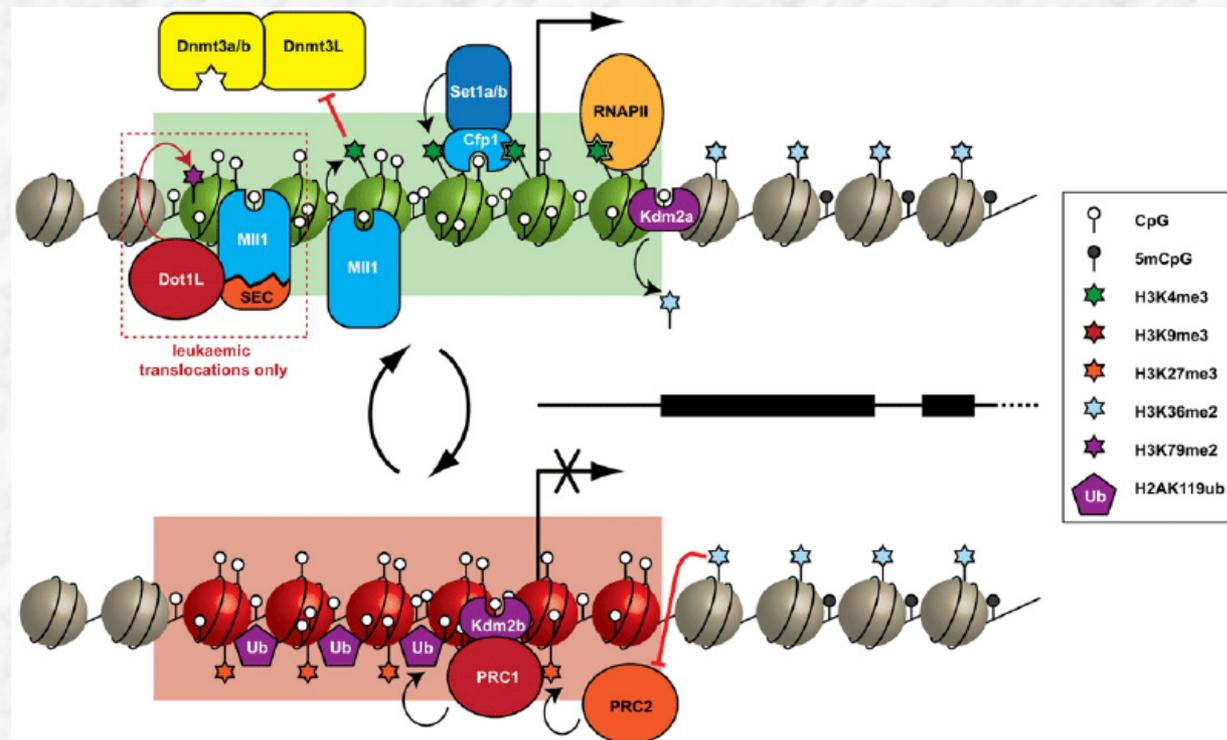
L'enzima DNA metiltrasferasi (DNMT) opera una metilazione in posizione 5 della base citosina, con formazione di 5-metilcitosina.

Anche queste sono famiglie di enzimi che presentano diverse isoforme (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b..)



Isole CpG: tratti di genoma, nei quali le sequenze CpG sono 10 volte più frequenti, si trovano soprattutto in prossimità dei siti di inizio della trascrizione.

□ DNA and histone lysine methylation systems are highly interrelated



□ Anche l'acetilazione degli istoni e la metilazione del DNA sono eventi reciprocamente regolati → da una parte, l'acetilazione degli istoni consente l'accesso al DNA anche delle demetilasi responsabili della rimozione dei gruppi metilici; dall'altra, la metilazione del DNA ne aumenta l'affinità per le deacetilasi istoniche

PRIME IPOTESI.....

I pattern di metilazione del genoma andasse incontro a cambiamenti importanti solo durante lo sviluppo embrionale, regolando l'attivazione o la repressione di classi specifiche di geni nei vari tessuti come base essenziale per il differenziamento cellulare.

Lo stato di metilazione alla nascita era ritenuto irreversibile, con gli esempi paradigmatici dell'inattivazione di uno dei due cromosomi X nelle femmine dei mammiferi e dell'imprinting genico, ossia l'inattivazione di uno dei due alleli ereditati dai genitori attraverso un processo di metilazione embrionale.

Studi più recenti mostrano, invece, che la metilazione del DNA può cambiare anche nei neuroni maturi, in risposta a segnali cellulari diretti dagli stimoli ambientali

Epigenetica e Patologie

Modificazioni istoniche

Molte malattie neurologiche sono associate ad uno squilibrio dei livelli di acetilazione degli istoni e disfunzioni trascrizionali.

- Il **trattamento con inibitori delle deacetilasi** può correggere tali deficienze fornendo promettenti strategie terapeutiche per le malattie neurodegenerative.
- Gli **inibitori delle HDAC** hanno proprietà neuroprotettive, neurotrofiche ed antiinfiammatorie
- **L'arricchimento ambientale** è anche capace di curare i deficit di apprendimento e memoria in topi che vanno incontro a perdita massiva di neuroni nell'ippocampo e nella corteccia; **in questo caso, la stimolazione dell'acetilazione istonica operata dall'ambiente consente il raffinamento dei circuiti nervosi rimasti intatti in genere tramite aumento dei livelli di BDNF**

Es. acido valproico è un farmaco utilizzato per trattare l'epilessia e il disturbo bipolare

Quindi è utilizzato sia come anticonvulsivamente che come stabilizzante per l'umore. I suoi meccanismi d'azione:

- ❖ Aumento dell'attività dell'enzima GAD quindi maggiore sintesi di GABA
- ❖ Effetto inibitorio su un trasportatore del GABA il GAT-1 (contribuirebbe all'effetto antiepilettico)
- ❖ Agendo sui canali del Calcio e del Sodio, porta a una riduzione della rilascio di glutammato
- ❖ Meccanismo epigenetico di inibizione delle HDACs!!

Altre sperimentazioni, sia a livello di laboratorio che su soggetti umani sono state intraprese anche **per valutare l'impiego dell'acido valproico** per altre malattie neurodegenerative su base genetica come:

- la corea di Huntington
- la malattia di Alzheimer
- la sclerosi laterale amiotrofica (SLA)
- l' atrofia muscolare spinale (SMA)
- una forma di autismo genetico chiamato sindrome di Rett

Epigenetica e Patologie

→ Patologie della sfera emotiva

Piccoli di ratto che ricevono **alti livelli di stimolazione/cure materna**

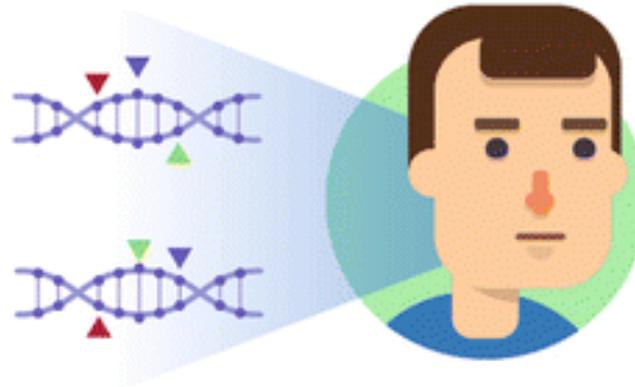
vanno incontro a una demetilazione del gene del recettore dei glucocorticoidi, a cui fa seguito l'aumento dell'acetilazione istonica nell'ippocampo, con un incremento a lungo termine dei livelli di **trascrizione** = Ciò si traduce, nell'adulto, in maggiori quantità del recettore dei glucocorticoidi e un fenotipo caratterizzato da ridotti livelli di stress, poiché esso è responsabile della regolazione del circuito di risposta allo stress operata dall'asse ipotalamo-ipofisario

CHILDHOOD ADVERSITY

- Low socioeconomic status
- Parental neglect or abuse
- Parental psychiatric disorders
- Exposure to violence

CRITICAL DEVELOPMENTAL WINDOW

EPIGENETIC DYSREGULATION OF HPA AXIS-RELATED GENES
NR3C1, CRH, FKBP5...



IMMUNE DYSREGULATION
ALTERATIONS IN NEURAL DEVELOPMENT
HPA AXIS DYSREGULATION

- Enhanced stress response
- Cognitive impairment
- Anxiety
- Depression
- Aggressive behaviors
- Suicidal behaviors

Anche lo stato funzionale del BDNF ha un ruolo cruciale nella plasticità cerebrale, è regolato su base epigenetica.

→ **Nei neuroni inattivi, il promotore del BDNF è metilato e legato al fattore MECP2 (MEthyl Cytosine phosphate guanine binding Protein 2) e a un complesso di repressione della trascrizione.**

→ La **depolarizzazione neuronale** innescata dagli stimoli ambientali **demetila il promotore del gene per il BDNF**, provocando il distacco del complesso di repressione dipendente da MECP2.

→ **Mutazioni che causano la perdita di funzione del gene per MECP2** sono responsabili, nell'uomo, di gravi deficit di coordinazione motoria e nelle abilità cognitive e di socializzazione (**sindrome di Rett**).

Metilazione del DNA e neoplasie

La metilazione anormale del DNA è associata al silenziamento genico non programmato

I pattern anormali di metilazione del DNA sono stati associati ad un gran numero di neoplasie umane e si trovano in due forme distinte:

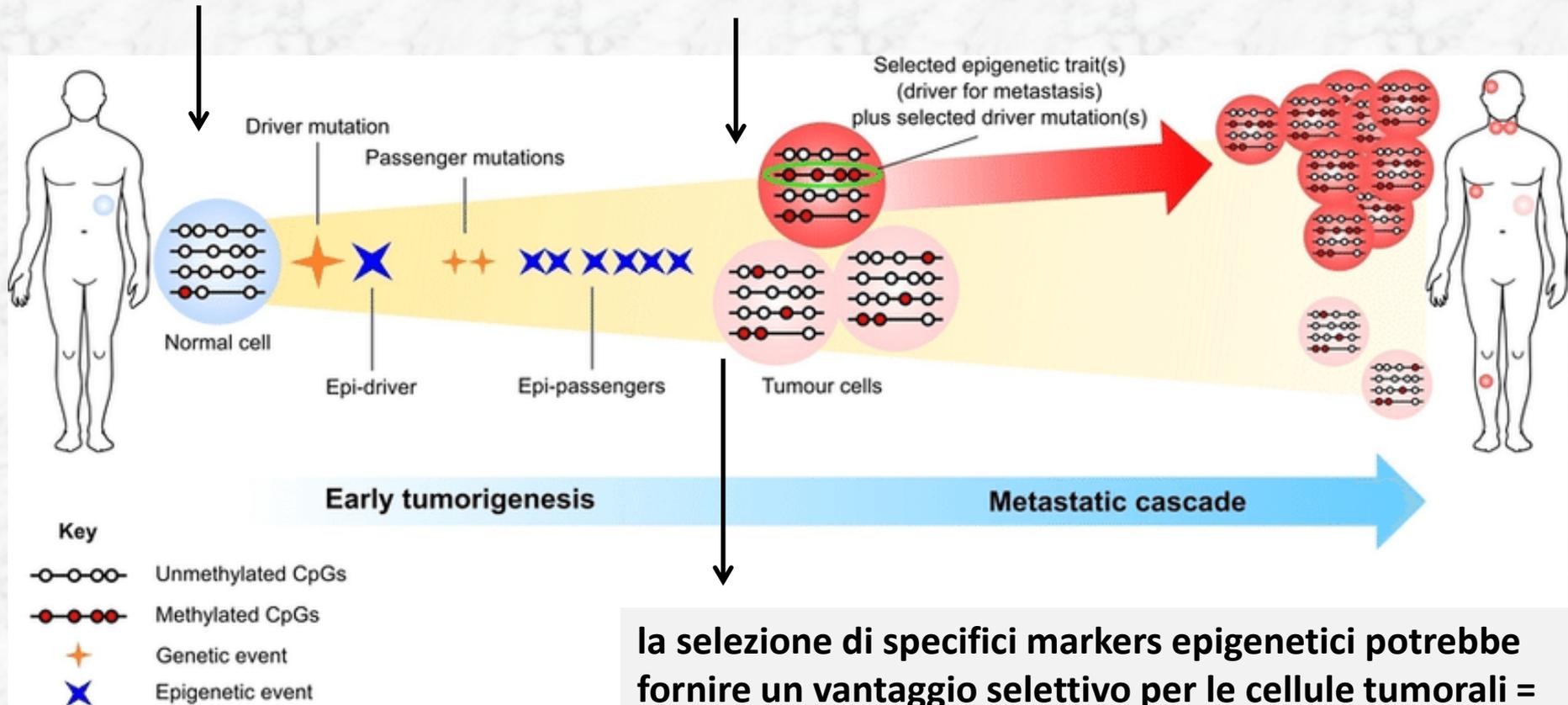
IPERMETILAZIONE e IPOMETILAZIONE rispetto al tessuto normale.

→ L'ipermetilazione è una delle principali modifiche epigenetiche che reprimono la trascrizione attraverso la **regione promotrice di un gene oncosoppressore = questi frenano la proliferazione**

→ L'ipometilazione a carico di oncogeni favorisce la trascrizione e quindi un **eccesso di proliferazione cellulare**

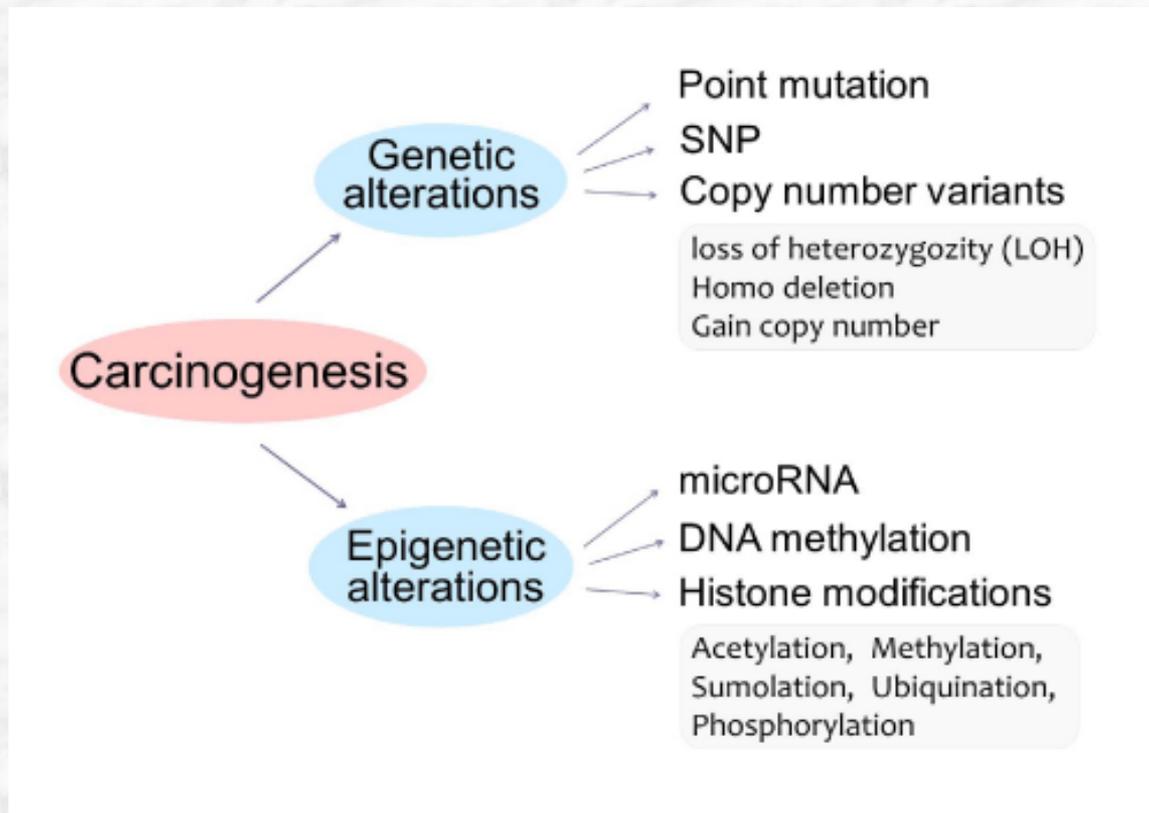
Early epigenetic changes

Late epigenetic changes



la selezione di specifici markers epigenetici potrebbe fornire un vantaggio selettivo per le cellule tumorali = metastatizzare con successo.

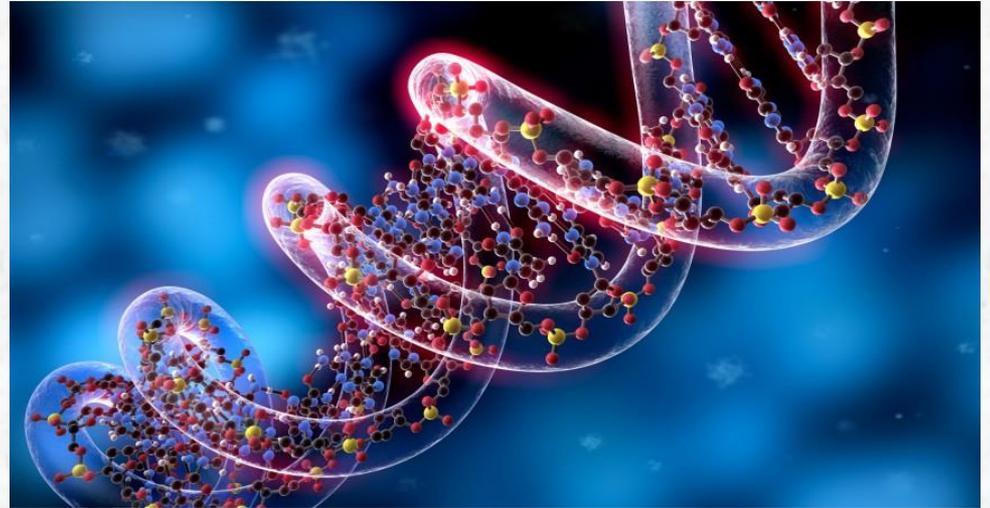
Le cellule tumorali che contengono questi epi-driver continuano a proliferare e sviluppare nuove metastasi negli organi distanti.



- Es. ACIDO VALPROICO è in studio anche per il trattamento dei tumori del sangue
- Es. miRNAs = utilizzabili come marcatori diagnostici e prognostici
- Es. molecole duali che siano HDACs e agiscano anche sulla metilazione del DNA

Sviluppo di molecole ad azione duale “antidemetilasi & antideacetilasi” che hanno mostrato una potente azione antitumorale contro le cellule di melanoma.

L'azione simultanea contro più bersagli offre molteplici vantaggi
→ aumenta la selettività,
in quanto i farmaci agiscono soltanto in cellule, come quelle tumorali, in cui i processi epigenetici sono più gravemente alterati.



→ Nel contempo si tratta di una **strategia che richiede una conoscenza dettagliata dei bersagli che si intende colpire**

"Proprio perché non intervengono sul DNA, queste terapie da sole non saranno mai risolutive, ma potranno, con ogni probabilità, arrestare una progressione o contribuire a far diminuire le dosi di chemioterapici necessari".