Epigenetske promjene u shizofreniji, bipolarnom poremećaju i depresiji

Kero, Tonći

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:359327

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Tonći Kero

Epigenetske promjene u depresiji, shizofreniji i bipolarnom poremećaju

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Tonći Kero

Epigenetske promjene u depresiji, shizofreniji i bipolarnom poremećaju

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Ljiljane Šerman i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2014./2015.

POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA

C citozin

CBP CREB vežući protein (engl. CREB-binding protein)

CBX engl. chick homeobox

ChIP kromatinska imunoprecipitacija (engl. chromatin immunoprecipitation)

DAC 5-aza-deoksicitidin Dacogen (engl. 5-aza-2'-deoxycytidine)

DNA deoksiribonukleinska kiselina

DNMT DNA metiltransferaza (engl.DNA methyltransferase)

EZ transkripcijski faktor E(z) (engl. Enhancer of Zeste)

FDA Agencija za hranu i lijekove (engl.Federal Drug Administration)

GABA gama-aminomaslačna kiselina (engl. γ-aminobutyric acid)

GAD67 dekarboksilaza glutaminske kiseline (engl. glutamic acid decarboxylase 67)

HAT histonska acetiltransferaza (engl. histone acetyltransferase)

HDAChistonska deacetilaza (engl. histone deacetylase)

HDMs histonska demetilaza (engl. histone demethylases)

hMLH1 engl. human mutL homologue 1

HMT histonska metiltransferaza (engl.histone methyltransferases)

HOX homeoboks (engl. Homeobox)

HP1 engl. heterochromatin protein 1

JMJD6 engl. Jumonji domain-containing 6 protein

K lizin

LAM laserska mikrodisekcija (engl.Laser Assisted Microdissection)

LSD1 eng. Lysine-specific histone demethylase 1A

MB-COMT eng. Membrane-bound Catechol-O-methyltransferase

MBP engl. methyl-CpG-binding domain proteins

MECP2 engl. methyl-CpG-binding protein 2

MGMT engl. O^6-methylguanine-DNA methyltransferase

miRNA mikro RNA (engl. micro RNA)

MSP metilacijski specifična lančana reakcija polimeraze (engl. methylation-specific polymerase chain reaction)

MTHFR metilentetrahidrofolat reduktaza (engl. methylenetetrahydropholate reductase NAD)

NAc (lat. Nucleus accumbens)

NSD2 engl. Nuclear Receptor-binding SET Domain 2

PcG polikomb grupa transkripcijskih proteina (engl.Polycomb group)

PFC prefrontalni korteks

PRC2 engl. Polycomb Repressive Complex

PRMTs engl. protein arginine methyltransferases

PTMs posttranslacijske meodifikacije (engl. post-translational modifications)

R arginin

(RT)-PCR lančana reakcija polimeraze reverznom transkripcijom (engl. reverse transcription polymerase chain reaction)

RTT Rettov sindrom

SAM S-adenozil-L-metionin (engl. S-adenosyl-L-methionine)

SAM signifikantna analiza mikročipova (engl. significance analysis of microarrays)

VPA valproična kiselina

SAŽETAK

U prvoj polovici dvadesetog stoljeća, razvojna biologija i genetika bile su odvojene discipline. Riječ epigenetika prvi put je upotrijebio C. Waddington kao jedan od moguće više spojnih neksusa genotipa i fenotipa. Epigenetika u svom fokusu ima regulaciju aktivnosti gena, za razliku od polja genetike koje se bavi anatomijom samih gena, odnosno slijedom dušičnih baza koje označavaju genetski kod, ali koja samostalno ne može objasniti sve biološke aspekte ljudskog razvoja. Regulacija aktivnosti gena odnosi se na načine na koje genetska informacija može biti suprimirana ili aktivirana u različitim razvojnim linijama stanica ili prenesena dalje na potomstvo. Prvo desetljeće 21. stoljeća obilježeno je velikim porastom interesa biomedicinskih istraživanja za polje epigenetike. U raznim istraživanjima pokazane su pozitivne korelacije između epigenetskih abnormalnosti i psihijatrijskih bolesti, a ovdje se specifično obrađuju depresija, shizofrenija i bipolarni poremećaj.

Ključne riječi: razvojna biologija; epigenetika; genotip; fenotip; depresija; shizofrenija; bipolarni poremećaj

SUMMARY

In the first half of the twentieth century, developmental biology and genetics were considered separate disciplines. Word epigenetics was first used by C. Waddington as a possible nexus between the genotype and phenotype. The focus of epigenetics is the regulation of gene activity, in contrast to the field of genetics, which deals with the anatomy of genes themselves, or the sequence of nitrogen-containing nucleobases that make the genetic code, but which cannot explain all biological aspects of human development on its own. Regulation of gene refers to the ways in which genetic information can be suppressed or activated in different evolutionary cell lineages or transferred further to an offspring. The first decade of the 21st century was marked by an increased interest of biomedical research in the field of epigenetics. Various studies have shown positive correlations between epigenetic abnormalities and psychiatric diseases, and here the focus is specifically on depression, schizophrenia and bipolar disorder.

Keywords: developmental biology; epigenetics; genotype, phenotype; depression; schizophrenia; bipolar disorder

SADRŽAJ:

1. UVOD 1

2. MOLEKULARNO-BIOLOŠKA POZADINA 5

2.1. GRAĐA NUKLEOSOMA 5

2.2. EPIGENETSKI MEHANIZMI 6

2.2.1 EPIGENETSKE PROMJENE HISTONA 8

2.2.2. EPIGENETSKE PROMJENE DNA 11

2.2.3. OSTALI EPIGENETSKI MEHANIZMI 14

3. EPIGENETSKE PROMJENE U PSIHIJATRIJSKIM BOLESTIMA 15

3.1 DEPRESIJA 15

3.2 SHIZOFRENIJA I BIPOLARNI AFEKTIVNI POREMEĆAJ 24

4. ZAHVALA 31

5. LITERATURA 32

6. ŽIVOTOPIS 43

1.UVOD

Nazivi "epigeneza" i "epigenetika" se često koriste, ali u različitom kontekstu. Epigeneza etimološki proistječe od riječi -epi – iznad, i -geneza – razvoj, a označava sve ono što ima utjecaj na razvoj organizma. Širi koncept od epigenetike, epigeneza ne pokriva samo somatski, već i mentalni razvoj (Van Speybroeck 2002). Označava diferenciranje organizma kroz interakciju sa svim čimbenicima izvan samog genotipa, za razliku od arhaične preformacijske teorije, koja je postulirala da je potpuna mikroslika razvijenog organizma unaprijed zapisana već u zigoti.

Koncept novijeg datuma je termin epigenetika i zauzima uži i fokusiraniji raspon značenja, a odnosi se na tzv. regulaciju aktivnosti gena, za razliku od polja genetike koje se bavi anatomijom samih gena, odnosno slijedom dušičnih baza koje označavaju genetski kod, ali koja ipak samostalno ne može objasniti sve biološke aspekte ljudskog razvoja. Pod fiziologijom, odnosno patofiziologijom gena mislim na načine na koje genetska informacija može biti suprimirana ili aktivirana u različitim razvojnim linijama stanica ili prenesena dalje na potomstvo.

U prvoj polovici dvadesetog stoljeća, razvojna biologija i genetika bile su odvojene discipline. Riječ epigenetika prvi put je upotrijebio Conrad Waddington da bi povezao ta dva polja. (Choudhuri 2011) Epigenetika je suma svih mehanizama potrebnih da se genetski program razloži s ciljem razvijanja. Waddington je već 1947. pokrenuo osnivanje odjela za genetiku u Edinburghu. Za samo deset godina genetička istraživanja u ovom institutu postala su prepoznatljiva po vrhunskoj kvaliteti, a sam odjel bio je više nego uspješan i postao je jedan od najvećih odjela genetike u svijetu. Tijekom tih godina, Waddington je planirao stvaranje laboratorija za epigenetiku. U svojoj je namjeri uspio 1965., kad je i službeno osnovana Grupa za epigenetička istraživanja. Svjestan značaja genetike u razvoju, ili, još preciznije, značaja aktivnosti materijala jezgre (gena) za događanja u citoplazmi, Waddington je postavio hipotezu o mogućoj nadopunjivosti epigeneze i preformacije, tvrdeći da "...su sve osobitosti odraslog organizma prisutne u oplođenoj jajnoj stanici, ali se trebaju 'odmotati' i razviti...".

Razvoj je smatrao epigenetičkim događajem: "...moglo bi se reći da epigenetsku građu ili epigenotip čini niz događaja kroz koje određeno tkivo prolazi tijekom razvoja; znači – određeni organ nastaje zbog osobitih međudjelovanja genotipa, epigenotipa i vanjskih čimbenika". Njegove ideje ponovno otkrivamo u epigenomici novog doba.

Njegove ideje se svakako mogu smatrati vizionarskima utoliko što su nastajale u vrijeme kada ih tehnički nije mogao potvrditi – bez protutijela, bez tehnologije rekombinantne DNA, bez ikakvih saznanja o tome kako su geni građeni i na koji bi način njihova aktivnost uopće mogla biti regulirana (Trošelj et al 2009; Waddington C. 1942).

Waddington je prije svega prepoznao epigenetiku kao jedan od moguće više spojnih neksusa genotipa i fenotipa. Njegova teorija se nekoliko desetljeća kasnije translatirala u polje molekularne biologije.

Tek nekoliko desetljeća nakon Waddingtona predloženi su specifični mehanizmi preko kojih se informacija superponira na DNA slijed, kao naprimjer hipoteza da 5-metilcitozin ima ulogu u kontroli ekspresije gena, i također da je uzorak metilacije nasljedan, da ima ulogu u razvoju, ali da je on i stohastička pojava koja se javlja pri starenju. Modifikacije bez alteracije sekvence pomažu pri aktivaciji odnosno suprimiranju potrebnih gena u različitim stadijima razvoja, ali isto tako te modifikacije mogu biti patološke i uzrokovati ili biti kolateralna promjena i posljedica bolesti. Maligne bolesti su primjer bolesti s dokazanom epigenetskom podlogom.

Ove hipoteze su naknadno podržane mnogim eksperimentalnim dokazima koji pokazuju da je metilacija snažno povezana s utišavanjem gena u različitim biološkim procesima. Danas postoje i mnogobrojni dokazi epigenetskog nasljeđivanja preko linije germinativnih stanica. Također, postoje i dokazi za različite epigenetske mehanizme koji uključuju modifikacije kromatina i histona kao i šireće polje regulatornih RNA.

Prvo desetljeće 21. stoljeća obilježeno je velikim porastom interesa biomedicinskih istraživanja za polje epigenetike.

Kako je moguće da su preko dvjesto tipova stanica u tijelu koje obavljaju vrlo različite funkcije genetički homogene, ali strukturno i funkcionalno tako heterogene? Zašto monozigotni blizanci imaju nekonkordantnu pojavu nemendelski nasljednih bolesti? Na koji

način je fenotip mejotski i mitotski nasljedan, a bez promjene genetskog koda? Jesmo li genetski predeterminirani, ili okoliš i mi sami imamo utjecaj na to hoćemo li oboljeti od neke bolesti?

Ova i slična pitanja intrigiraju mnoge znanstvenike, a epigenetika je polje koje potencijalno nudi odgovore.

Svakodnevno se otkrivaju nove uloge epigenetskih mehanizama, kao što su: supresija retroelemenata u genomu, instigacija inaktivacije X kromosoma u žena, brojne funkcije u mejotskoj i mitotskoj rekombinaciji i kromosomskoj regulaciji i mnoge druge.

U ovom radu, specifično se stavlja naglasak na novija istraživanja iz polja tzv. bihevioralne epigenetike, odnosno epigenetike u kontekstu mentalnih bolesti. U ovom polju se postavljaju pitanja poput: Što je to normalni epigenom mozga? Koja je uloga mejotskog naslijeđa kod psihijatrijskih bolesti? Koju ulogu može imati prehrana majke tijekom gestacije na kasnije mentalno zdravlje djeteta?

U raznim istraživanjima pokazane su pozitivne korelacije između epigenetskih anomalija i postojanja psihijatrijskih bolesti, a ovdje se specifično obrađuju depresija, shizofrenija i bipolarni poremećaj.

Molekularni „kvantni“ skok u epigenetskim istraživanjima omogućio je razvoj novih tehnologija kao što su visokoprotočni genetski mikročipovi (engl. high-throughoutput genomic microarray), sekvenciranje nove generacije (engl. next generation sequencing) i kromatinska imunoprecipitacija (engl. chromatin immunoprecipitation, ChIP), bez kojih najnovija saznanja ne bi bila moguća zbog same složenosti epigenoma i epigenetskih promjena koje najčešće ne rade izolirano već u međusobnim kombinacijama dovode do regulacije ekspresije gena.

Internacionalni angažman znanstvene zajednice rezultirao je sekvenciranjem cjelokupnog humanog genoma što je omogućilo bolje razumijevanje klasičnih genetskih bolesti. Ipak, i drugi pristupi su potrebni da bi se razumjela priroda nemendelskih bolesti i bolesti s kompleksnim nasljeđivanjem, koje su najvjerojatnije uzrokovane kombinacijom genetskih i epigenetskih promjena (Ptak and Petronis, 2008).

Slično asocijacijskim studijama cijeloga genoma (engl. genome-wide association study, GWAS) Nacionalni institut za zdravlje (engl. National Institutes of Health, NIH) i Europska znanstvena fondacija te mnoge druge organizacije sve više sredstava ulažu u epigenetska istraživanja. Unatoč tomu što se ova grana smatra relativnim novitetom, držim opravdanim takav optimističan stav i financijska ulaganja, ponajviše zbog činjenice da je jedna od najbitnijih značajki epigenetskih abnormalnosti njihova reverzibilnost, što otvara brojne mogućnosti terapije. Tako danas imamo primjere HDAC inhibitora, vorinostata i romidepsina, dva lijeka s epigenetskim mehanizmom djelovanja koje je odobrila FDA za liječenje T staničnog limfoma, ali isto tako otkrivamo i „nove“ učinke efikasnih starih lijekova, kao što su poznati antidepresivi fluoksetin ili imipramin, za koje se utvrđuju i epigenetski mehanizmi djelovanja (Holliday R. 2006).

2. MOLEKULARNO BIOLOŠKA POZADINA

2.1 STRUKTURA NUKLEOSOMA

Nukleosom je osnovna jedinica pakiranja DNA molekule u eukariota, koja sadrži DNA sekvencu od oko 200-tinjak nukleotida omotanu oko osam histonskih proteina (H2A, H2B, H3 i H4) (Reece J., Campbell N. 2006).

Postoji još peta vrsta histonskih proteina – H1. Linker histoni H1 i njihove izoforme su uključeni u kompaktiranje kromatina i nalaze se na bazi nukleosoma u blizini ulaza i izlaza [DNA], izvan same nukleosomske jezgre. Taj 'linker' dio DNA zauzima jos otprilike 80 parova baza, ali nije dio nukleosoma. Zahvaljujući mehanizmu pakiranja DNA molekule oko histonskih proteina omogućena je pohrana ovako dugačke strukture u jezgru (Hu, Q., Rosenfeld, M. G. 2012).

Nukleosomi su nadalje organizirani u gusto pakirana vlakna pomoću nehistonskih proteina, i na koncu su pakirani u kromosome. N-terminalna domena svakog od osam histona izlazi iz jezgre nukleosoma (Davey, C.A., et al. 2002).

Ove regije histona su podvrgnute posttranslacijskim modifikacijama (PTM), što služi kao važan signal u epigenetskoj regulaciji transkripcije, unatoč tome što su u prošlosti histoni smatrani statičnim proteinskim kompleksima. PTM su brojne, međusobno interaktivne i recipročno surađuju u postizanju krajnjeg cilja, a to je modifikacija topologije kromatina što utječe na aktivaciju odnosno suprimiranje ekspresije određenog gena (Bártová E. et al 2008).

Mete, odnosno aminokiselinski ostatci koji su podložni PTM nalaze se predominantno na repovima histona koji protrudiraju iz jezgre nukleosoma.

PTM modifikacije nukleosoma su bitne za različite stanične procese kao što su DNA replikacija, transkripcija i stanična diferencijacija (Campos, E. and Reinberg, D. 2009).

2.2 EPIGENETSKI MEHANIZMI

Pojam epigenetika je vrlo diskutabilan i potrebno je prvo osvrnuti se na ono što se danas smatra striktno epigenetikom, a što je iz tog pojma definicijom isključeno, no ipak se vrlo često koristi u nedostatku prikladnijeg termina. Kamen spoticanja među znanstvenicima je uključuje li definicija epigenetike i one promjene koje nisu nasljedne, ali utječu na funkcije gena, ili se treba držati striktno definicije po kojoj taj mehanizam mora biti nasljedan.

Ovdje bih ponudio nekoliko definicija epigenetike u užem i širem smislu koje će rasvijetliti semantičke probleme pri upotrebi tog termina.

Pojam epigenetski odnosi se na stanične ili fiziološke varijacije u osobinama uzrokovane eksternim, odnosno okolišnim faktorima koje potiču ili suprimiraju transkripciju i translaciju i utječu na to kako stanice čitaju gene, a da te varijacije nisu uzrokovane slijedom baza u genskoj sekvenci (Akbarian et al. 2015). Dakle, epigenetska istraživanja nastoje opisati dinamičke promjene tranksripcijskog potencijala stanice.

Te promjene, sudeći po ovoj definiciji, mogu i ne moraju biti nasljedne, unatoč tomu što je takva šira definicija epigenetike kontroverzna, kao što je iznio Ledford u članku objavljenom u časopisu Nature gdje je ponudio neka suprostavljena mišljenja raznih znanstvenika u tom polju (Ledford H 2008).

U spomenutom članku, imamo ponuđene sljedeće definicije:

„Epigenetska promjena označava strukturnu adaptaciju kromosomskih regija koje mogu registrirati, signalizirati ili perpetuirati promijenjena stanja aktivnosti gena“-. (Bird A. 2007).

Suprotstavljeno mišljenje je ono Ptashnea koji preferira klasičnu definiciju:

„Epigenetika je promjena stanja ekspresije gena koja ne uključuje mutaciju, ali je svejedno nasljedna i bez prisutnosti signala ili događaja koji je inicirao promjenu“ (Ptashne 2007).

Recentnija definicija glasi:

„Epigenetika je grana znanosti koja proučava mitotski i/ili mejotski nasljedne promjene funkcija gena koje ne mogu biti objašnjene promjenom slijeda DNA“ (Riggs AD et al 1996).

Danas se uobičajeno koristi termin epigenetski i pri označavanju kemijske modifikacije histona, a za koje trenutno nema dokaza da su nasljedne i to stvara otpor znanstvenika koji se protive takvoj uporabi jer u fokus stavlja istraživanja koja nominalno ne spadaju u polje epigenetike, jer kao što znamo, genetika pa i epigenetika su u svojoj srži uvijek zahtijevale mogućnosti nasljeđivanja.

Zbog praktičnosti postoje pokušaji da se termin epigenetika redefinira u širem smislu što bi izbjeglo okvire i ograničenja koja postavlja mogućnost nasljeđivanja. NIH je za potrebe „Roadmap Epigenomics Project“ iz 2013. dao definiciju koja glasi:

„...epigenetika se odnosi na nasljedne promjene aktivnosti gena i njihove ekspresije (i u potomstvu stanice ili pojedinaca), ali također i na stabilne, dugotrajne promjene u transkripcijskom potencijalu stanice koje nisu nužno nasljedne.“" "Overview". NIH Roadmap Epigenomics Project

U ovom radu pod pojmom epigenetski mehanizam uvrstit ću i histonske modifikacije, za koje, barem zasad, nije utvrđeno da su nasljedne kroz generacije.

Ipak, broj radova i signifikantnost rezultata za psihijatrijske i druge bolesti, zahtijevaju poseban osvrt na takve promjene, i stoga su uvrštene u poglavlje koje obrađuje epigenetske mehanizme.

PREGLED NAJBITNIJIH EPIGENETSKIH MEHANIZAMA

Teoretski, prijenos epigenetskih informacija može biti posredovan bilo kojom makromolekulom prisutnom unutar stanice, bilo to DNA (izvan samog njenog slijeda), RNA ili proteinima, a moguće je da će u budućnosti biti otkriveni i mnogi drugi, kao naprimjer lipidi, šećeri pa čak i organele i membrana stanice.

EPIGENETSKE PROMJENE HISTONA

Posttranslacijske promjene histona su kovalentne modifikacije na histonima u obliku fosforilacije na serinskim ili treoninskim ostatcima, metilacija na lizinu ili argininu, acetilacija, deacetilacija, ubikvitinacija i sumotilacija lizina na N-terminalnim domenama repova histona koji protrudiraju iz nukleosoma i najpristupačnije su regije ovih peptida (Pratt 2006). Djeluju na strukturu i funkciju kromosoma, primjerice tijekom transkripcije i procesa remodeliranja kromatina. Glavna im je zadaća da kreiraju nova mjesta za regrutiranje specifičnih faktora ili da modificiraju postojeća mjesta s ciljem poništavanja prethodnih interakcija. Danas se smatra da postoji oko 150 enzima odgovornih za opisane modifikacije (Bártová E 2008).

Neke od brojnih uloga PTM su demarkacija eukromatinskih i heterokromatinskih regija, transkripcijska regulacija Hox gena bitnih u embrionalnom razvoju, kontrola staničnog ciklusa i brojne druge. Prisutnost ili odsutstvo određenih PTM je glavno obilježje pojedinih tipova raka (Kouzarides 2007).

Ove modifikacije djeluju preko kompleksnih međusobnih kombinacija, odnosno preko tzv. histonskog koda. Zbog broja, međuovisnosti i kompleksnosti histonskih modifikacija (14 različitih modifikacija na otprilike 100 mjesta na proteinu) predložen je model u kojem različiti uzorci i kombinacije epigenetskih mnodifikacija dovode do određenih transkripcijskih i epigenomskih stanja (Jenuwein and Allis, 2001).

Najbitnije i najviše istraživane PTM histona u psihijatrijskim bolestima su acetilacija i metilacija.

ACETILACIJA

Acetilacija repova histona događa se na lizinskim ostatcima, uglavnom na mjestima aktivne transkripcije.

Događa se uz pomoć enzima skupine HATs, odnosno histonskih acetiltransferaza. Ovi enzimi se uglavnom vežu na mjesta genskih promotora (Campos 2009). Uz to, HAT mogu također i osloboditi DNA od histona i time te slijedove učiniti dostupnim transkripciji.

Obrnuto, DNA se deacetilira uz pomoć enzima HDAC, odnosno histonskih deacetilaza.

MBP (engl. methyl-CpG binding domains) također mogu iskoristiti HDAC i time deacetilirati susjedne promotore.

HAT su klasificirane u tip A i tip B na osnovi njihove funkcionalne lokalizacije u jezgri ili citoplazmi (Selvi and Kundu, 2009), a tip A je dalje podijeljen u pet podskupina, ovisno o strukturnim i funkcionalnim razlikama. Funkcija ovih enzima je acetilacija lizinskih ostataka na histonima, što neutralizira njihov pozitivni naboj i time smanjuje jaku interakciju histona i DNA. Smatra se da acetilacija oslabljuje veze između pojedinih nukleosome i služi kao mjesto interakcije s drugim proteinima koji se udružuju s DNA. Takva promjena mijenja strukturu kromatina i pogoduje pretvorbi heterokromatina u eukromatin, transkripcijski aktivan oblik. Sposobnost HAT da manipuliraju strukturom kromatina i time utječu na gensku ekspresiju ih čini nužnim za održavanje i preživljenje stanice (Grant and Berger, 1999).

HDAC se klasificirane u četiri podskupine (Hildmann *et al*, 2007; Selvi and Kundu, 2009).

Skupina 1: Uključuje HDAC 1–3 and 8. One su lokalizirane u jezgri i uglavnom su vezane uz epigenetsku regulaciju.

Skupina 2: U nju spadaju HDAC4–7, 9 i 10. Ove HDAC sadrže domene koje im dopuštaju tranziciju između jezgre i citoplazme, i deacetiliraju ne samo histone, već i proteine citoplazme.

Skupina 3: Poznate i kao sirtuini, specifične su po ovisnosti o NAD-u (nikotinamind adenin dinukleotid) i važni su regulatori metabolizma i transkripcije putem deacetilacije histona i mnogih nehistonskih supstrata (Schwer and Verdin, 2008).

Skupina 4: u ovu skupinu svrstavamo HDAC11 o kojoj je vrlo malo poznato (Gao *et al*, 2002).

Postoji određena specifičnost aminokiselinskih ostataka za HAT i HDAC enzime, iako individualni lizinski ostatci mogu služiti kao supstrati različitim HAT i HDAC, a pojedini od tih enzima može djelovati na različite AMK ostatke, za razliku od metilacije koja je specifičnija (Khan and Khan, 2010; Selvi and Kundu, 2009).

METILACIJA

Obavlja se uz pomoć HMT enzima, tj. histonskih metiltransferaza, a demetilacija uz pomoć HDMT, histonskih demetilaza.

Histoni mogu biti metilirani na svojim lizinskim (K) i argininskim (R) ostatcima, što može dovesti bilo do aktivacije bilo represije gena, ovisno o njihovu položaju unutar nukleosoma, ali i o stupnju metilacije (Sharma et al 2010).

Na mjestu K, mogu biti dodane do tri metilne skupine. K trimetilacija ima biološki najznačajniji učinak na kromatin, neovisno je li riječ o eukromatinu ili heterokromatinu. Metilacija lizinskih ostataka je do sad jedina modifikacija histona povezana s patofiziologijom depresije (Berger, 2007).

Tri metilacijska mjesta na histonu H3 se dovode u vezu s poticanjem aktivne transkripcije: H4K4, H3K36 i H3K79.

Tri različita K metilacijska mjesta su isto tako povezana sa suprimiranjem transkripcije: H3K9, H3K20 i H3K27. Metilacija pojedinih mjesta može dovesti do vezanja suprimirajućih kromatinskih modifikatora poput HDAC. Međutim, ne može se nužno pretpostaviti da u svim slučajevima dolazi do smanjenja transkripcije što čini situaciju složenijom. Pokazane su i iznimke od pravila da metilirani H3K9 dovodi do supresije transkripcije jer se dokazalo da u nekim slučajevima potiče elongacijsku fazu transkripcije, a pretpostavlja se da je to zato što H3K9 u metiliranom obliku može vezati HDAC, koje posljedično, zbijajući kromatin, skrivaju tzv. kriptične promotore, odnosno promotore gena koji dovode do stvaranja nonsense RNA koje onemogućuju ispravnu trankripciju. Dakle, metilacija H3K9 u pojedinim slučajevima ne mora nužno dovesti do suprimiranja transkripcije, već upravno suprotno, onemogućiti stvaranje nonsense RNA i upravo time u konačnici rezultirati izvršenjem genske naredbe i stvaranjem proteina (Kouzarides 2007).

To isto tako pokazuje i da stvaranje heterokromatina, odnosno kompaktnijeg oblika kromatina, ne dovodi nužno do utišavanja gena.

Stoga to, a i mnogobrojne druge iznimke, čini epigenetičke mehanizme tako složenim za proučavanje. Uz to, sam broj metilaza i demetilaza je velik i njihove su interakcije vrlo složene, a to je stoga što oni najčešće ne rade izolirano, već je konačna ekspresija ili utišavanje gena rezultat njihova međudjelovanja.

Metilacija argininskih R ostataka na pojedinom histonu također može dovesti bilo do utišavanja bilo do ekspresije gena, s opet ne potpuno predvidljivim konačnim učinkom na neki genski produkt.

Posttranslacijske promjene na histonima imaju dvojaku svrhu. Ponekad pucanjem veza između pojedinih nukleosoma dovode do labavljenja kromatina što dovodi do poticanja transkripcije, a nekad dovode do regrutiranja nehistonskih proteina koji imaju visok afinitet samo za pojedine modifikacije histona, a oni sami imaju različite, često i kompetitivne, mehanizme regulacije gena. Kovalentne posttranslacijske modifikacije histona kontroliraju arhitekturu kromatina, time i mnogobrojne aspekte razvoja organizma, od jednostavne ekspresije gena pa do determinacije stanične loze, diferencijacije, a u nekim slučajevima i pojave bolesti (Pedersen and Helin 2010).

EPIGENETSKE PROMJENE DNA

Metilacija DNA je proces pri kojem se metilne skupine kovalentno dodaju na poziciji 5 dušične baze citozin koja se u sekvenci nalazi uz dušičnu bazu gvanin, a takvo mjesto u DNA sekvenci se naziva CpG dinukletiod, odnosno CpG mjesto. Takva kemijska promjena je relativno stabilna, a obavljaju je DNMT, odnosno DNA metiltransferaze.

Utjecaj na gensku ekspresiju je nepredvidiljiv, naime može dovesti do poticanja ili suprimiranja transkripcije, a i sto tako njen status može ostati nepromijenjen (Klengel et al. 2014).

CpG dinukleotidi su relativno rijetki u genomu, a mjesta s neuobičajeno učestalijim CpG lokusima se nazivaju CpG otoci, koji čine 1-2% cjelokupnog genoma, a sadrže 30 do 200 CpG dinukletioda po kilobazi.

Oni pokazuju zanimljive karakteristike što se tiče epigenetske kontrole ekspresije gena. Naime, povezani su s čak 70% poznatih genskih promotora, tj. regulatornih, nekodirajućih dijelova gena koji imaju ulogu u kontroli transkripcije, a u odnosu na izolirane CpG lokuse, većinom su hipometilirani (Illingworth and Bird 2009).

Metilacija citozina je posebno učestala u sekvencama između gena, ali rijetka na CpG otocima. Generalno, može se reći da je metilacija izdvojenih CpG dinukleotida česta, a CpG otoka sa sadržanim promotorima rijetka. Uglavnom nemetilirani CpG otoci bivaju metilirani u procesima genskog imprintinga, naprimjer metilacija je prisutna na inaktivnom X kromosomu u žena (Sharp 2011).

Spoznaja da je status metilacije intergeničnih regija različit od tkiva do tkiva govori nam o mogućnosti da takve karakteristične promjene kontroliraju udaljene regulatorne elemente, kao naprimjer distalne izolatore ili ncRNA (engl. non coding RNA) (Wan LB 2008).

Metilacija u području genskog promotora i samog gena pokazuje obrnute učinke na gensku ekspresiju. Dok je metilacija promotora asocirana s inhibicijom, metilacija gena je asocirana s povećanjem transkripcije (Kass, Landsberger and Wolffe, 1997).

Ipak, u tu tvrdnju se ne možemo uvijek pouzdati, s obzirom da je to generalizacija koja se odnosi na cjelokupni genom, dok u pojedinom genu, odnosno genskom promotoru, to ne mora nužno biti tako, već metilacija gena ili promotora mogu biti povezane bilo s inhibicijom bilo s aktivacijom transkripcije, ili ne imati učinak uopće (Lam, Emberly, Fraser et al 2012).

Tijekom razvoja zigote, metilacija pokazuje varijacije koje slijede odeđena pravila. No, ipak, iznimke ovih pravila pokazuju način kako se metilacijske promjene mogu prenositi generacijama.

DNA metilacija se značajno mijenja tijekom embrionalnoga razvoja. Epigenetsko reprogramiranje, odnosno globalne metilacijske promjene dolaze u dva vala tijekom razvoja ploda (Hajkova et al 2002). Neposredno pred implantaciju, dolazi do globalne demetilacije, moguće da bi se oslobodio pluripotentni potencijal svih gena koji su u gametama, spermiju i jajnoj stanici, pred stvaranje zigote metilirani i time inhibirani. Ipak, postoje iznimke od te globalne hipometilacije koje dokazuju mogućenost nasljeđivanja određenih roditeljskih promjena. To su genetski imprinting, odnosno održana metilacija i inhibicija X kromosoma, ali i IAP elementi (engl. Intra-cisternal A-type particle) koji predstavljaju retrotranspozone i

samo su djelomično demetilirani tijekom ovog prvog vala epigenetskog reprogramiranja (Hajkova et al 2002).

Ova aktivna demetilacija koja se odvija u prvom valu epigenetskog reprogramiranja slabo je poznata, ali poznati su nam enzimi koji vrše metilaciju i na kojima se temelji drugi val epigenetskog reprogramiranja, a usmjeravaju stanice u njihove pojedine loze, tkiva i organe. To su DNMT1, DNMT3A i DNMT3B. Nakon prvog vala demetilacije, DNMT3A i DNMT3B uspostavljaju *de novo* uzorke metilacije koji zatim budu održavani aktivnošću DNMT1 koja ima poseban afinitet za hemimetiliranu DNA, što pri replikaciji dovodi do sukcesivnog metiliranja kopije DNA pri replikaciji i time održava epigenetsku stabilnost stanica organizma (Okano 1998). Istraživanja su pokazala da *knock-out* miševi za gen *Dnmt3L* umiru u ranoj fazi razvoja zigote i da taj enzim igra vrlo važnu ulogu u ranom razvoj, dok je enzim DNMT3a uključen u imprinting gena tijekom gametogeneze (Boure'His D 2004).

Dakle, epigenetsko programiranje je složen razvojni proces koji koordinira razvoj organizma, od pluripotentne matične stanice do metiliranih stanica usmjerenih u svoje pojedinačne loze.

Ovo pokazuje da je metilacija osnova ontološke stabilnosti tijekom diferenciranja stanica jer je rezultirajuća promjena većinom trajna i jednosmjerna, sprječavajući stanicu da regredira u matičnu stanicu ili njenu pretvorbu u drugi oblik.

No, s druge strane, upravo ono što pruža ontološku stabilnost stanice je u isto vrijeme odgovorno za promjenjive i dinamične odgovore genoma na stimuluse okoliša od trenutka do trenutka, što stvara tzv. epigenetički paradoks. Poznato je da primjerice stres uzrokuje specifične obrasce metilacije, što kratkotrajne što dugotrajne, i upravo takav način odgovora genoma označava potencijal variranja metilacije genoma sukladno okolišnim faktorima (Meaney 2005).

OSTALI EPIGENETSKI MEHANIZMI

EPIGENETSKE PROMJENE POSREDOVANE RNA

U kontekstu epigenetike najviše su proučavane male, nekodirajuće RNA sekvence zvane mikroRNA (miRNA). MiRNA su 20-23 nukleotida duge jednolančane molekule koje isključivo suprimiraju gensku ekspresiju. Pretpostavlja se da je čak 60% ljudskog gena koji kodiraju proteine regulirano tim molekulama (Friedman 2009).

Zbog svog kratkog slijeda nukleotida, miRNA mogu djelovati na mnogobrojne ciljne gene i transkripcijske faktore i time inducirati posttranskripcijsko utišavanje gena (Sharma et al 2010).

One to čine tako da se vežu na 3' kraj mRNA, što dovodi do degradacije mRNA ili inhibicije translacije (He, L. et al. 2004).

MiRNA utječu na razne biološke procese, uključujući staničnu diferencijaciju, apopotozu i proliferaciju (Friedman 2009).

MiRNA nisu samo efektori epigenetske regulacije, već su i one same njene mete, što dodatno ukazuje na kompleksnost ovog sustava regulacije ekspresije gena (Handel et al. 2009).

Uz ove funkcije, zadnjih godina dolazi do otkrića povezanosti RNA s ispoljavanjem različitih bolesti, kao što su depresija (Gurevich *et al.* 2002) i shizofrenija (Sodhi *et al.*, 2001), u kojima je poremećeno RNA uređivanje genskih transkripata.

Ove studije ukazuju na kliničku važnost i ovog mehanizma epigenetske regulacije.

Mnogobrojni drugi epigenetski mehanizmi se svakodnevno rasvjetljavaju, no za sad se ne drže dokazano relevantnima za temu ovog rada pa su isključene iz ovog uvoda.

3. EPIGENETSKE PROMJENE U PSIHIJATRIJSKIM BOLESTIMA

3.1 EPIGENETSKE PROMJENE U DEPRESIJI

UVOD

Depresija, u užem smislu veliki depresivni poremećaj (engl. Major Depressive Disorder, MDD) je bihevioralni poremećaj koji uzrokuje dugotrajan osjećaj tuge i gubitak interesa za uobičajene aktivnosti.

Prema podatcima Svjetske zdravstvene organizacije iz 2001. godine, ona je jedan od većih uzroka morbiditeta širom svijeta.

Vjeruje se da trenutno od nje boluje otprilike 298 milijuna ljudi, odnosno 4.3% sveukupne svjetske populacije (Vos T et al. 2010).

Prevalencija tijekom života varira, od samo 3% populacije Japana pa do čak 17% stanovnika SAD-a. Globalno gledajući, postotak ljudi koji će oboljeti od depresije tijekom života je 8-12% (Andrade et al. 2003).

U Sjevernoj Americi, postotak muškaraca kod kojih će se razviti i biti dijagnosticirana depresija tijekom života iznosi 3-5% , dok kod žena taj postotak iznosi 8-10% (Kessler et al.2005).

Populacijske studije konzistentno pokazuju da je MDD otprilike dvaput češća u žena nego u muškaraca, iako je nejasno zašto je to tako, i pridonose li tomu i neki drugi faktori koji do sad nisu bili uzeti u obzir (Kuehner 2003).

Mogući uzroci uključuju psihološke, psihosocijalne, nasljedne, evolucijske i biološke faktore od kojih su oni epigenetski ovdje obrađeni.

Depresija može biti uzrokovana interakcijom okolišnih i genetskih čimbenika. Kroz studije na blizancima gdje su ispitivani monozigotni i dizigotni blizanci, utvđeno je da depresija ima nasljednost od otprilike 40-50%, što je nisko uspoređujući s drugim psihijatrijskim bolestima, i upućuje na to da genetika nije sama odgovorna za nastanak bolesti.

Moguće objašnjenje ovako niske konkordantnosti monozigotnih blizanaca je akumulacija razlika u epigenomu, vjerojatno zbog različitih životnih iskustava, ali i stohastičkih događaja tijekom razvoja (Fraga *et al*, 2005).

Takvi čimbenici mogu stvoriti pojedince posebno osjetljive, odnosno otporne na razvoj pojedine bolesti. Kompleksne genetske varijacije mogu imati različitu penetrantnost i biti moderirane okolišnim čimbenicima i time dovesti do rezistentnosti ili osjetljivosti organizma, što je utvrđeno u pokusima na životinjama, gdje su isti stresori imali različite učinke na građu i fiziologiju moždanih struktura (Kendler, 1998; Lesch, 2011; Vialou *et al*, 2012).

Nije vjerojatno da je pojedinačni gen uzrok depresije, već kombinacija gena koja može pojedinca učiniti podložnim razvijanju bolesti. Niska nasljednost i visoka incidencija govore da moraju postojati i drugi faktori koji mogu generirati depresiju. Okolišni čimbenici, od kojih neki dovode do epigenetskih promjena, su mogući faktori koji doprinose razvoju bolesti. Tako epidemiološki dokazi povezuju okolišne čimbenike, osobito izloženost stresnim događajima, s povećanim rizikom za razvijanje depresije (Hammen 2005;). Zlostavljanje u dječjoj dobi je povezano s većom stopom incidencije u djece, ali i u odrasloj dobi (Kessler 1997). Mnoge studije su koristile induciranje stresa da bi simulirali ponašanje nalik depresiji i utvrđeno je da kronični stres, kao jedan od najbitnijih okolišnih čimbenika u etiologiji depresije u ljudi, može dovesti do ispoljavanja depresivnog ponašanja u laboratorijskih životinja (Krishnan 2011).

Zbog niza simptoma prisutnih u depresiji, bilo je zahtjevno razviti prikladne životinjske modele na kojima bi objektivno mogli proučavati anhedoniju i druge simptome u glodavaca i time zaključivati o mogućim korelacijama promjena u neuralnim krugovima i neurološkim adaptacijama miševa i onih kod ljudi.

Životinjski modeli korišteni za proučavanje depresije mogu se podijeliti na dvije kategorije: oni koje su koristile akutne stresore i oni koje su izazivale kroničan stres. Samo su paradigme kroničnog stresa dovele do razvoja anhedonije, karakterizirane smanjenim aktivnostima vezane uz traženje nagrada kao što je preferiranje šećera ili hrane bogate mastima i socijalna interakcija (Berton *et al* 2006). Utvrđeno je i da je anhedonija, koja je rezultat samo kroničnog stresa, reverzibilna pomoću terapije antidepresivima, no ona mora biti dugotrajna (Wallace *et al* 2009).

Studije koje su implementirale paradigme kroničnog, ali i akutnog stresa su pružile uvid u određene aspekte depresije. Kroničan stres je omogućio proučavanje anhedonije i druge simptomatologije, dok su studije utjecaja akutnog stresa na organizam životinja omogućile uvid u neuronske adaptacije koje reguliraju odgovor na stresne događaje (Bagot 2014).

Brojne studije na životinjama pokazale su da stres u ranom životu može ostaviti trajne epigenetske promjene u genomu i ponašanju odraslog organizma (McGowan *et al,* 2009, 2011; Murgatroyd *et al,* 2009; Weaver *et al,* 2004). Osim toga, nedavna istraživanja su dokazala da i potentni antidepresivi u čestoj uporabi, a čiji mehanizmi djelovanja nisu u potpunosti rasvijetljeni, isto tako posjeduju i učinak na epigenom. Tako naprimjer inhibitori MAO (IMAO) su ujedno i inhibitori histonske demetilaze LSD1 (engl. Lysine-specific histone demethylase 1A), a valproat, antikonvulziv koji se koristi i kao stabilizator raspoloženja, je ujedno i inhibitor histonskih deacetilaza (HDACs), što služi kao potvrda važnosti proučavanja epigenetskih mehanizama u patofiziologiji depresije (Harwood 2003; Lee *et al* 2006); iako još nije s apsolutnom sigurnošću utvrđeno da promjene strukture kromatina mogu do kraja objasniti klinički učinak ovih lijekova.

Najbitniji epigenetski čimbenici za koje je do sad utvrđeno da imaju ulogu u etiologiji depresije su oni povezani s:

- histonskim deacetilazama (HDAC)
- histonskim metiltransferazama (HMT)
- molekulom BDNF (engl. Brain-Derived Neurotrophic Factor)
- osovinom hipotalamus–hipofiza-nadbubrežna žlijezda (HPA)
- molekulom GDNF (engl. Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor)
- glukokortikoidnim receptorom (GR)

Studije postmortalnih uzoraka pacijenata oboljelih od depresije pokazale su da depresija utječe na nekoliko regija u mozgu, što je razlog kompleksne simptomatologije. Fukcionalne

promjene su prisutne u područjima zaduženim za kogniciju (prefrontalni korteks – PFC i hipokampalna regija), emocije (amigdala), centar za nagradu (nucleus accumbens – NAc) i regijama za homeostazu i stresni odgovor (HPA – osovina hipotalamus, hipofiza, nadbubrežna žlijezda) (Epstein 2006; Fu 2004; Harrison 2002).

Primjeri tog utjecaja su:

1. Smanjenje volumena sive tvari u PFC i volumenu hipokampusa (Drevets 2011).

Studije na ljudskim postmortalnim uzorcima su otkrile smanjenje BDNF-a koji ima najjači utjecaj na diferencijaciju i rast neurona u hipokampusu (Dwivedi *et al*, 2003) što bi moglo pridonijeti primjećenom smanjenju volume sive tvari te regije. To smanjenje BDNF-a je potvrđeno u studijama akutnog (Barrientos *et al,* 2003) i kroničnog stresa u životinja (Nibuya *et al* 1995).

Kroničan stres smanjuje razinu BDNF u PFC (Fumagalli *et al*, 2004) i, slično kao u hipokampusu, nakon terapije antidepresivima razina mu se povećava (Balu *et al*, 2009).

Dokazi da terapija antidepresivima u ljudi i životinja uzrokuje povećanje razine hipokampalnog BDNF-a, i da se učinci antidepresiva gube u BDNF *knockout* modelu, govore da je ovakva molekularna adaptacija bitna za dio simptomatologije depresije (Coppell *et al*, 2003; Nibuya *et al*, 1995; Shimizu *et al*, 2003). Vrijedi napomenuti da je sličan hipokampalni profil evidentiran i za neke druge faktore rasta, kao naprimjer VGF, VEGF (engl. vascular endothelial growth factor) i njegov receptor (VEGF tipa2), u laboratorijskih životinja izloženih kroničnom stresu (Heine *et al*, 2005; Thakker *et al*, 2007).

2. Hipermetabolizam u području amigdale i frontalnim regijama korteksa (Drevets, 2003, 2007; Drevets *et al*, 2008; Fu *et al*, 2004).

I u primjeru amigdale vidljivo je da se stanične adaptacije ne događaju na globalnoj razini, već su regionalno i tipno specifične. Tako ovdje, suprotno situaciji u PFC-u, vidimo porast razine NR2A (eng. N-methyl D-aspartate receptor podtip 2A) i PSD-95 (eng. postsynaptic density protein 95) (Karolewicz et al 2009).

3. Smanjenje aktivnosti odgovora NAc (lat. Nucleus accumbens) na nagradne stimuluse (Epstein et al 2006).

Za NAc, najpoznatijim po tome što služi kao sustav za procesuiranja informacije o nagradi, se pretpostavlja da stoji u podlozi anhedonije u pacijenta oboljelih od depresije (Nestler and Carlezon 2006) Većina onog što je poznato o molekularnim adaptacijama ove regije dolazi od istraživanja na životinjama izloženim kroničnom stresu, a većina nalaza je potvrđena usporedbom s ljudskim uzorcima NAc-a. Jedna od prednosti ovakvih istraživačkih paradigmi u kojima se uporabljaju kronični stresori je u tome što miševi pokazuju vrlo različite odgovore. Dok neke životinje pokazuju izrazitu osjetljivost, druge pokazuju otpornost (Krishnan et al 2007). Taj fenomen bi se mogao translatirati i na razlike u osjetljivosti u ljudi. Tako je uočeno i da su razine BDNF-a povećane u NAc-u osjetljivih životinja, ali ne i u njihovim otpornim pandanima (Berton et al 2006; Krishnan et al 2007).

4. Hiperaktivnost HPA osovine (Gold and Chrousos 2002).

lzlučivanje CRH (engl. corticotropin releasing hormone) je pojačano tijkom stresnih događaja posredovanjem simpatičkog živčanog sustava, a posljedično tome i oslobađanje ACTH i kortizola. U ljudi oboljelih od depresije pronađene su povećane razine CRH, prvenstveno u cerebrospinalnoj tekućini i hipotalamusu, a u potomstvu miševa izloženih stresu tijekom gestacije nađena je smanjena metilacija promotora gena za CRH, što dovodi do povećanja ekspresije gena (Murgatroyd 2011).

5. Glukokortikoidni receptor (GR)

Promotor za GR ima sekvencu koja omogućava vezanje NGFI-A (engl. nerve growth factor induced protein A), a to vezanje je jače čime je i razina mRNA i samog proteina GR veća u eksperimentalnih životinja s većom otpornošću na depresiju, osobito u hipokampusu. Ovo je vezano uz pojačanu acetilaciju H3K9 na promotoru, dok je pojačana metilacija CpG otoka na promotoru gena za GR vezana uz smanjenje ekspresije. Metilacija, osim što smanjuje vezanje NGFI-A, također smanjuje vezivanje CBP (engl. CREB binding protein) koji ima acetiltransferaznu aktivnost, što dovodi do smanjenja acetilacije histona, a upravo ovo je modifikacija nađena u pojedinaca manje podložnih depresiji (Weaver 2007).

Jedna od efikasnih terapija depresije je elektrokonvulzivna terapija (EKT), koja depolarizirajući stanicu, potom posredstvom molekula cAMP-a, dovodi do pojačanog vezanja NGFI-A i veće ekspresije GR. Istraživanjem je pronađeno da i antidepresivi tranilcipromin i imipramin djeluju na biološki identičan način.

Pojačana ekspresija CRH posljedično dovodi do jače negativne povratne sprege čiji je izvršitelj kortizol, koji ima dvojak učinak vežući se u hipotalamusu i hipofizi te do poboljšanja simptoma (Morinobu 1997).

ACETILACIJA I METILACIJA HISTONA U DEPRESIJI

Kako je prethodno već bilo rečeno, svi epigenetski mehanizmi imaju vrlo različite funkcije u pojedinim regijama tijela, pojedinim tkivima pa i u pojedinim dijelovima istog tkiva, kao što je naprimjer mozak i to vidimo i na primjerima ovdje navedenih istraživanja gdje je vidljivo da je ekspresija identičnih HDAC povezana s povećanom otpornošću, ali i osjetljivošću na depresiju, ovisno već u kojem dijelu mozga je enzim eksprimiran. Takvu situaciju imamo zbog neselektivnosti HDAC za pojedine promotore, ali i zbog međudjelovanja s drugim epigenetskim mehanizmima kao što je DNA metilacija, histonska metilacija i činjenice da različiti transkripcijski faktori mogu regrutirati isti HDAC enzim.

HDAC I HDACi U NAc

HDAC2: U ovom području mozga utvrđeno je da nakon kroničnog stresa dolazi do smanjenja acetilacije H3K14 što dovodi do razvoja depresivnih simptoma u glodavaca. Nakon nekog vremena, acetilacija se opet počne povećavati što korelira sa smanjenjem produkcije HDAC2 i mehanizam je obrane organizma i pokušaj održavanja homeostaze (Covington 2009).

To je dodatno koroborirano dokazom da dodavanje HDAC2i dovodi do poboljšanja kliničke slike depresije u životinjskih modela (Sun et al 2012).

HDAC5 (HDAC klase II):

Zanimljivo je da ova histonska deacetilaza pokazuje sasvim drugačiji trend u NAc.

Smanjenje razine HDAC5 ima prodepresivni učinak, što govori da njene ciljne molekule imaju antidepresivni učinak u Nac. Dakle, HDAC5 djeluje protektivno, a mogući razlog tome je što kao i sve deacetilaze klase II, i HDAC5 može acetilirati ne samo histone i proteine jezgre, već i citoplazme.

Utvrđeno je da terapija antidepresivom imipraminom dovodi do povećanja razine HDAC5, dok uvjeti kroničnog stresa u životinjsih modela uzrokuju smanjenje ekspresije HDAC5 (Krishnan 2007).

MS275 (inhibitor HDAC klase I):

Utvrđeno je da infuzija ove molekule direktno u Nac dovodi do poboljšanja simptoma što implicira da je stanje acetilacije svojevrstan fiziološki obrambeni odgovor na stresne stimuluse (Covington et al 2009).

Posljedično tome, lijekovi iz skupine HDAC inhibitora pokazuju dobre rezultate u liječenju depresije, time što potiču acetilaciju, poboljšavaju pristup RNA polimeraza i pojačavaju transkripciju neurotrofnih faktora u hipokampusu i prefrontalnom korteksu.

HDAC I HDACi U HIPOKAMPUSU

HDAC5 (HDAC klase II):

Suprotno situaciji u NAc, povećana razina HDAC5 u hipokampusu dovodi do razvoja depresivne simptomatologije, što govori da je ta molekula u ovoj regiji uključena u druge stanične puteve (Tsankova 2004).

HDAC3:

I u hipokampusu postoji slična situacija kao u NAc, barem što se tiče stanja acetilacije histona H3K14 i H4K12 i razvoja depresije. Tako je utvrđeno da smanjenje acetilacije ovih histona dovodi do razvoja depresivnih simptoma, a isto tako je pokazano da je razina HDAC3 manja kod pojedinaca otpornih na depresiju (Covington 2011).

Važnost ovih otkrića je u tome što mogu dovesti do razvoja potencijalnih biomarkera za depresiju u leukocitima periferne krvi koje pokazuju dobru korelaciju s epigenetskim

obilježjima neurona, a ti biomarkeri mogu biti i pojedine histonske deacetilaze (Hobara 2010).

DEPRESIJA I METILACIJA HISTONA

I ovdje postoje mnogobrojne studije koje su uključivale veliki broj histonskih metiltransferaza (HMT) i susljedne promjene histona.

Generalno je utvrđeno da stres dovodi do smanjenja u metilaciji histona, kao i do smanjenja aktivnosti HMT.

Veći broj HMT, kao naprimjer HMTG9a, smanjen je u podložnih miševa za razliku od onih otpornih na depresiju (Ferland 2010).

Što se tiče pojedinih histona, utvđene su naredne korelacije s povećanjem depresivnih simptomatologije:

- smanjena metilacija H3K9, H3K27 u Nac, smanjena trimetilacija H3K27 (HrK27me3) u hipokampusu (Covington et al 2011)
- kao i za sad jedina studija koja je utvrdila povećanu trimetilaciju H3K9 i H3K4 kao odgovor na akutni stres, ali i njihovo smanjenje kao patološki odgovor na kronični stres (Hunter 2009).

BDNF

Jedan je od neurofaktora bitnih za učenje, pamćenje i više kognitivne funkcije, ima ulogu u rastu i preživljenju neurona tijekom razvoja. Kod ljudi koji boluju od depresije i velikog depresivnog poremećaja pronađene su niže razine BDNF-a u plazmi, što može služiti i kao dijagnostički pokazatelj (Covington et al 2009).

Gen za BDNF ima više promotora, i svaki od njih može biti pod utjecajem različitih epigenetskih mehanizama.

Otkriveno je da stresni čimbenici uzrokuju metilaciju na BDNF promotoru IV, što uzrokuje vezanje MeCP2 (eng. methyl CpG binding protein 2), koji se jedino veže na metiliranu CpG regiju promotora što dovodi do utišavanja gena i smanjene proizvodnje BDNF-a. MeCP2 na drugim mjestima ima ulogu aktivacije gena, što je bitno u patofiziologiji sindroma Rett, jednog od najčešćih uzroka mentalne retardacije u djevojčica.

Na sasvim drugom promotoru za BDNF, REST (eng. RE1-Silencing Transcription factor) igra ulogu u izazivanju istog efekta, odnosno smanjenja transkripcije BDNF-a, ali potpuno drugim epigenetskim mehanizmom.

MeCP2 i REST su samo primjeri kompleksnosti epigenetičke regulacije koja se odvija na različitim BDNF promotorima i to dvama različitim proteinima.

Povećane razine BDNF-a utvrđene su nakon dugotrajne terapije antidepresivima, a to rade smanjujući metilaciju promotora BDNF-a. Također, utvrđena je obrnuta korelacija između razine metilacije H3K27me3 i ekspresije BDNF-a (Menke and Binder 2014).

3.2 SHIZOFRENIJA I BIPOLARNI AFEKTIVNI POREMEĆAJ

UVOD

Shizofrenija (SZ) i bipolarni afektivni poremećaj (BAP) su kompleksne psihijatrijske bolesti. Slično raku i dijabetesu, ovi neuropsihijatrijski poremećaji su agregirani u obiteljima ali ne slijede Mendelova pravila nasljeđivanja (Labrie 2012). Posljednjih desetljeća mnogobrojne su studije pokazale povezanost određenih gena i rasvijetlile molekularne puteve asocirane s shizofrenijom i bipolarnim poremećajem (Craddock et al. 2005; Kushima et al. 2010). Ipak, ograničena replikacija rezultata i identifikacija rizičnih alela koji nisu jako povezani s ispoljavanjem bolesti sugerira da nisu samo genetski faktori uzrok bolesti (Pidsley 2011). Odnedavno se sve veći naglasak stavlja na potencijalne uloge epigenetskih mehanizama u etiopatogenezi ovih poremećaja. DNA metilacija kao ključni epigenetski mehanizam u razvojnoj regulaciji važna je u nekoliko neurobioloških i kognitivnih procesa, kao što su neurogeneza i razvoj mozga (Costello 2003), aktivnost neurona (Guo 2011) sinaptička plastičnost i pamćenje u odraslom mozgu (Levenson et al. 2006). Sudeći po ovim saznanjima, postoji mogućnost da je aberantna DNA metilacija, implicirana u brojnim vrstama raka, također doprinoseći čimbenik u psihijatrijskim bolestima, uključujući SZ i BP (Kato 2009).

Shizofrenija je teški, debilitirajući i stigmatizirani poremećaj koji zahvaća 1% populacije u svijetu. Patologija koja se primjećuje u pacijenata uključuje tri glavne skupine simptoma: 1) pozitivne simptome (halucinacije, deluzije) 2) negativne simptome (apatija, siromašan govor) i 3) kognitivnu disfunkciju (poremećaj radne memorije i konceptualna dezorganizacija). Činjenica da antipsihotici mogu samo umanjiti simptome ove bolesti ukazuje na potrebu boljeg razumijevanja patofiziologije ove teške bolesti radi mogućeg efikasnijeg liječenja.

Nasljeđivanje shizofrenije je multifaktorijalno. Postoji više genetskih i drugih faktora, kao naprimjer konzumacija marihuane i opstetričke komplikacije, koji u kombinaciji mogu dovesti do poremećaja, iako je razina povezanosti većine do sad poznatih čimbenika relativno slaba. Pokušaji da se razmotri i uloga interakcija gena i okoliša u uzrokovanju shizofrenije doveli su do utvrđivanja četiri gena kandidata koji dovode do povećane osjetljivosti mozga djece nosioca na efekte opstetričkih komplikacija, moguće posredstvom epigenetskih

mehanizama, što kasnije u životu može rezultirati većom incidencijom shizofrenije. Ti geni su *AKT1, BDNF, GRM3* (eng. metabotropic glutamate receptor 3) i *DTNBP1* (eng. dystrobrevin binding protein-1) (Nicodemus 2008).

Epidemiološki podatci pokazuju i obiteljsku nasljednost shizofrenije, za koju je rizik u prvom koljenu devet puta veći nego u općoj populaciji. Ukoliko jedan od monozigotnih blizanaca razvije shizofreniju, rizik za drugog je 53%. Ukoliko se radi o dvojajčanim blizancima, rizik iznosi 15% (Sham 1996). Nepotpuna konkordantnost u monozigotnih blizanaca objašnjava se nepotpunom penetrantnošću gena, s obzirom da je utvrđeno da postoji povećan rizik od obolijevanja u djece zdravog blizanca, ali je moguć i utjecaj faktora okoliša na takvu pojavnost bolesti (Oh and Petronis 2008).

Istraživanja na posvojenoj djeci su također dala zanimljive rezultate. Naime, djeca shizofrenih roditelja koja su dana na posvajanje imala su kasniju incidenciju bolesti od 18.8%, dok su djeca zdravih bioloških roditelja koja su također dana na posvajanje, ali su posvojitelji naknadno oboljeli od shizofrenije, imala incidenciju od čak 10.7%, što je daleko više od normalne pojavnosti te bolesti u populaciji (Wender 1974). Ovi rezultati govore u prilog i okolišnom utjecaju, iako on ima manji učinak od genetičkog. Najjača povezanost je utvrđena za opstetričke komplikacije, primjerice preeklampsiju i perinatalno oštećenje mozga, dok su Rh faktor, malnutricija majke, neželjena trudnoća i drugi također disruptivni, ali je povezanost manja.

Prediktivni faktori za razvoj shizofrenije koji se mogu primjetiti na djetetu su smetnje govora, problemi u školi, socijalna anksioznost, preferiranje samostalne igre i sl. (Helgeland 2005).

Bipolarni afektivni poremećaj (BAP) je psihoza za koju je nekad bio uvriježen izraz manična depresija ili manično-depresivna psihoza. Oko 1% opće populacije boluje od ovog poremećaja. Bipolarni poremećaj karakteriziran je rekurentnim epizodama manije i depresije. Sve je više dokaza, pogotovo u vidu istraživanja blizanaca, koji govore u prilog genetskim uzrocima bolesti. Ipak, nepotpuna konkordantnost u monozigotnih blizanaca, kliničke razlike između muškaraca i žena, i značajne fluktuacije u tijeku bolesti govore u prilog i drugim mogućim etiopatogenetskim čimbenicima (Petronis 2003).

Ovdje ću navesti najbitnije rezultate epigenetičkih istraživanja koji dovode u vezu DNA metilaciju i modifikaciju histona, koji daju doprinos regulaciji aktivnosti gena u SŽS-u.

EPIGENETSKE PROMJENE GABAERGIČKOG SUSTAVA

Sve je više dokaza da DNA metilacija ima ulogu u disfunkciji GABA-ergičkih neurona kod shizofrenije. Interneuroni ovog sustava eksprimiraju proteine GAD67, kodiran genom *GAD1*, i *reelin*, kodiran genom *RELN*. Najbitniji rezultati istraživanja se dovode u vezu sa smanjenom ekspresijom gena *GAD1* i *RELN* u korteksu i hipokampusu postmortalnih uzoraka oboljelih, i to proteina i mRNA (Guidotti 2000).

Uloga Dnmt1 je ustanovljena u pokusima s antisense oligunukleotidima dodanim u stanice korteksa, nakon čega je utvrđena povećana ekspresija mRNA GAD67 i reelina. Naime, Dnmt1 metilira CpG otoke u promotorima gena za ove proteine, a njegova inhibicija antisense oligonukleotidima posljedično tome dovodi do povećanja transkricpije (Noh et al 2005). I druge studije su pokazale negativnu korelaciju između razine mRNA Dnmt1 i mRNA enzima GAD67 i proteina reelina, specifično u PFC i hipokampusu (Veldic et al 2004). Još jedna studija koja je potvrdila povezanost Dnmt1 s problemima radne memorije i drugim osobitostima shizofrenije je utvrdila da davanjem 1-metionina miševima dovodi do ispoljavanja simptoma nalik shizofreniji, a ta je supstanca prekursor potreban za aktivnost aktivnost DNMT-a (Gavin and Sharma 2010).

Što se tiče samih gena koji su posljedično suprimirani posredstvom Dnmt1, njihove funkcije su sljedeće:

RELN kodira reelin, protein izvanstaničnog matriksa bitnog za integritet sinapse, neuralni razvoj, ali i dugoročnu plastičnost odraslog mozga (Costa et al 2002), dok *GAD1* kodira protein GAD67 – enzim za dekarboksilaciju glutamata u GABU koja, između ostalog, inhibira dendrite, tijela ili aksone piramidalnih neurona. Smanjenje ekspresije gena *RELN* negativno utječe na ekspresiju *GAD1*, što dovodi do smanjene razine mRNA GAD67 utvrđene u transgeničnih miševa haploinsuficijentnih za RELN. Posljedica toga je smanjenje dendritičkih trnova piramidalnih neurona sloja III u FPC te regije CA1 u hipokampusu (Liu et al 2001). Ovi rezultati su zanimljivi zbog toga što su nalazi uzoraka takvih transgeničnih miševa slični nalazima postmortalnih uzoraka oboljelih od psihoze, ali i bipolarnog poremećaja (Glenn 2014).

Još jedna zanimljivost je činjenica da čak 80% oboljelih od shizofrenije puši ili koristi nikotin u nekom drugom obliku (Kelly 2000). Pokazano je da nikotin smanjuje DNMT1 u gabergičkim neuronima miša, metilira DNA i smanjuje ekspresiju GAD67 (Satta 2008).

Ipak, ne smatra se da samo ove epigenetske promjene dovode do podložnosti osobe shizofreniji, već da su ovi geni usporedo zahvaćeni u tijeku shizofrenije i bipolarnog poremećaja (Connor and Akbarian 2008).

EPIGENETSKE PROMJENE SEROTONERGIČKOG SUSTAVA

Promjene u razini receptora za serotonin nađene su u velikom broju psihijatrijskih bolesti, uključujući shizofreniju i bipolarni poremećaj (Gray 2006).

Dokazano je da različiti genski polimorfizmi ove skupine receptora mogu biti uzrokom psihoze (Tsuang 2004), ali tek su nedavno počela istraživanja uloge epigenetskih alteracija u etiologiji shizofrenije (Pidsley 2011).

Tako je utvrđena povećana metilacija promotora gena *5HTR1A* u leukocitima periferne krvi oboljelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja u odnosu na kontrole. Razlika nije velika, ali statistički je značajna (Carrard 2011).

Ovi rezultati sugeriraju zajedničke etiološke faktore tih poremećaja (Craddock 2009).

Gen za serotoninski receptor je također impliciran u patofiziologiji shizofrenije i bipolarnog poremećaja. Epigenetska disregulacija *5HTR2A* je pronađena u postmortalnim uzorcima čeonog režnja oboljelih u vidu pojačane metilacije i smanjene ekspresije gena, što je povezano s ranijim nastupom shizofrenije i bipolarnog poremećaja (Abdolmaleky et al 2011). Zanimljivost istog istraživanja je i da je dokazana korelacija ekspresije *5HTR2A* i ekspresije *RELN, DRD1, DRD2 i MB-COMT*.

Jedna od interpretacija ovih rezultata je da metilacija promotora za *5HTR2A* utječe i na ekspresiju drugih staničnih puteva uključenih u patogenezu psihoze ili upućuje na to da postoji zajednički etiološki faktor koji neovisno utječe na ekspresiju više gena.

EPIGENETSKE PROMJENE DOPAMINERGIČKOG SUSTAVA

Disfunkcija limbičkog sustava se smatra primarnim patofiziološkim mehanizmom shizofrenije. Važan enzim tog sustava je enzim COMT, kodiran istoimenim genom, koji degradira katekolamine (dopamin, adrenalin i noradrenalin). Gen *COMT* je od velikog interesa jer je lociran u regiji 22q11, njegova delecija dovodi do DiGeorge sindroma, čiji simptom je i psihoza. COMT je odgovoran za metabolizam dopamina u dorzolateralnom prefrontalnom korteksu, regiji bitnoj za radnu memoriju koja je disfunkcionalna u shizofreniji (Callicott 2000). Zbog navedenih činjenica, COMT se čini kao dobar kandidat za epigenetska istraživanja shizofrenije. Za jednu od izoformi COMT-a je utvrđeno da ima izmijenjen epigenetski profil u postmortalnim uzorcima oboljelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja. Radi se o izoformi MB-COMT (eng. membrane-bound COMT) čiji je promotor hipometiliran i to za otprilike 50% u odnosu na kontrole (Malaspina 2008). Također, utvrđena je i korelacija takve hipometilacije s hipometilacijom promotora *DRD2* (eng.dopamine 2 receptor gene) kod shizofrenije i bipolarnog poremećaja (Abdolmaleky 2006). Međutim, ove studije nisu specifično mjerile metilaciju unutar dorzolateralnog korteksa, tako da se ne može sa sigurnošću tvrditi da je metilacija *COMT*-a vezana uz smetnje radne memorije oboljelih od shizofrenije i bipolarnog poremećaja. Kao što je već rečeno, okolišni čimbenici mogu, u kombinaciji s genetskom podlogom, dovesti do razvoja bolesti. Primjer koji pokazuje da bi faktore rizika trebalo razmatrati u kombinaciji s individualnim genotipom je i činjenica da je polimorfizam ovog gena, *COMT* valin158, prediktor psihotičnih simptoma, ali samo u ljudi koji konzumiraju kanabis (Caspi et al 2005).

Epidemiološke studije su identificirale prenatalno izlaganje gladi kao jedan od rizičnih faktora za razvijanje shizofrenije, a animalni modeli prenatalne malnutricije pokazuju strukturne i funkcionalne anomalije mozga povezane sa shizofrenijom. Takvi dokazi dolaze od istraživanja na ženama koje su bile trudne u doba okupacije Nizozemske u zimu 1944-1945. kad je došlo do izrazitog pomanjkanja hrane, posebno u gradskim područjima. Kohorta koja je bila najizloženija pokazala je dvostruko povećan rizik za shizofreniju (Susser 1992), dok sličan primjer postoji i u Kini u doba gladi 1959-1961., gdje se rizik za shizofreniju s uobičajenih 0.84% za tu populaciju 1960. popeo na 2.15%, odnosno 1.81% 1961.godine (St Clair et al 2005).

Na temelju ovih činjenica pristupilo se razvijanju animalnog modela za prenatalno izlaganje gladi, odnosno manjku nutrijenata, pa je razvijen RLP50 model laboratorijskog štakora koji je u gestaciji izložen manjku proteina u prehrani. Manjak proteina u prehrani dovodi do manje porođajne težine, a ona sama je jedan od rizičnih čimbenika za razvoj shizofrenije (Rifkin et al. 1994). Podmladak ovih štakora je pokazao abnormalnosti sukladne shizofreniji (abnormalno ponašanje, razine neurotransmitora u prefrontalnom korteksu, abnormalnu strukturu i funkciju hipokampusa, veću osjetljivost na terapiju agonistima dopaminskog receptora i NMDA antagonistima, probleme s radnom memorijom i sl.) (Susser 2008). Profiliranje metiloma hipokampusa pokazalo je sistematske epigenetske promjene; u većini slučajeva (87%) radilo se o hipermetilaciji. S tim je povezana zanimljiva činjenica da je tim procesom zahvaćen i gen *Mecp2* povezan s kognitivnim oštećenjima. Odnosno, aktivnost ovog gena je u ovim modelima bila suprimirana (Xu et al. 2014). Funkcija mu je izrazito bitna u hipotalamusu jer tu regrutira transkripcijski faktor CREB1 i time aktivira mnogobrojne gene bitne za normalno funkcioniranje neurona (Chahrour et al. 2008), a inače se dovodi u vezu s većinom slučajeva Rettovog sindroma (Amir et al. 1999). Bitan je za sazrijevanje stanica i za formiranje sinapsi (Luikenhuis et al. 2004).

EPIGENETSKE PROMJENE HISTONA

Za sad ne postoji velik broj radova koji dovode u vezu histonske promjene i shizofreniju, ali postoje radovi koji su pronašli jake asocijacije takvih promjena, iako na malom broju uzoraka. Prva takva studija je ona Akbariana i suradnika, u kojoj je pronađena jača metilacija histona H3 na mjestu arginina (H3meR17) povezana s otvorenim kromatinom u neuronima prefrontalnog korteksa u shizofrenih pacijenata u odnosu na kontrole, i to za 30%, što je povezano sa smanjenjem razine četiri metabolička transkripta.

Osim toga, postoji i studija koja još jednom ukazuje na visoku kompleksnost i međuovisnost epigenetskih mehanizama u kliničkom izražaju simptoma. Naime, u postmortalnim je uzorcima pronađena povećana razina HDAC1 koja se dovela u korelaciju s ranije spomenutom smanjenom ekspresijom GAD67, dakle s manjkom identičnog enzima uzrokovanim različitim epigenetskim mehanizmom (Sharma et al 2008).

Iako rezultati epigenetskih promjena histona za sad nisu od kliničkog značaja, ukazuju na potencijal daljnjih istraživanja na tom i području drugih epigenetskih mehanizama u potencijalnom razvoju lijekova. Tako je primjerice pozitivan učinak na kognitivne simptome primjećen korištenjem DNMT inhibitora u štakora modela za ljudske neuropsihijatrijske poremećaje (Deutsch et al 2008), a u drugom istraživanju primjećen je sličan pozitivan učinak nespecifičnih HDAC inhibitora (Fischer et al 2007).

Zaključno, treba reći da su dodatne studije potrebne da razjasne jesu li promjene histona na postmortalnim uzorcima reprezentativne za stabilan epigenetski imprint koji postoji dulje vrijeme, ili čak prethode dobi pri kojoj su se javili klinički simptomi u zahvaćenog pojedinca.

4. ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Ljiljani Šerman na ljubaznosti i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima.

Hvala kolegama na medicini u Splitu i Zagrebu na svim lijepim uspomenama u tijeku studiranja.

5. LITERATURA

Abdolmaleky, H. M., Cheng, K., Faraone, S. V., Wilcox, M., Glatt, S. J., Gao, F., … Thiagalingam, S. (2006). Hypomethylation of *MB-COMT* promoter is a major risk factor for schizophrenia and bipolar disorder. *Human Molecular Genetics*, *15*(21), 3132–3145

Abdolmaleky HM, Yaqubi S, Papageorgis P, Lambert AW, Ozturk S, Sivaraman V, Thiagalingam S. (2011) Epigenetic dysregulation of HTR2A in the brain of patients with schizophrenia and bipolar disorder. Schizophr Res. 129(2-3):183-90.

Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. Nat Genet. 23(2):185-8

Andrade L, Caraveo-Anduaga JJ, Berglund P, Bijl RV, De Graaf R, Vollebergh W, Dragomirecka E, Kohn R, Keller M, Kessler RC, Kawakami N, Kiliç C, Offord D, Ustun TB, Wittchen HU (2003). "The epidemiology of major depressive episodes: results from the International Consortium of Psychiatric Epidemiology (ICPE) Surveys". *Int J Methods Psychiatr Res* 12 (1): 3–21

Bagot, R. C., Labonté, B., Peña, C. J., & Nestler, E. J. (2014). Epigenetic signaling in psychiatric disorders: stress and depression. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *16*(3), 281–295.

Balu DT, Hodes GE, Anderson BT, Lucki I. (2009) Enhanced sensitivity of the MRL/MpJ mouse to the neuroplastic and behavioral effects of chronic antidepressant treatments. Neuropsychopharmacology. 34(7):1764-73.

Barrientos RM, Sprunger DB, Campeau S, Higgins EA, Watkins LR, Rudy JW, Maier

SF. (2003) Brain-derived neurotrophic factor mRNA downregulation produced by social

isolation is blocked by intrahippocampal interleukin-1 receptor antagonist.

Neuroscience. 121(4):847-53

Bártová E, Krejcí J, Harnicarová A, Galiová G, Kozubek S; Krejcí; Harnicarová; Galiová; Kozubek (2008). "Histone modifications and nuclear architecture: a review". *J Histochem Cytochem* 56 (8): 711–21

Berger SL. (2007) The complex language of chromatin regulation during transcription. Nature (7143):407-12

Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D,

Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ. (2006) Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. Science 311(5762):864-8

Bird, A. (2007) Perceptions of epigenetics, Nature 447, 396–398

Bourc'his D, Bestor TH. (2004) Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation

in male germ cells lacking Dnmt3L. Nature. 2;431(7004):96-9

Callicott JH, Bertolino A, Mattay VS, Langheim FJ, Duyn J, Coppola R, Goldberg TE, Weinberger DR. Physiological dysfunction of the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia revisited. Cereb Cortex.10(11):1078-92

Campos, E. and Reinberg, D. (2009) Histones: Annotating Chromatin. Annu. Rev. Genet.Vol. 43

Carrard A, Salzmann A, Malafosse A, Karege F. (2011) Increased DNA methylation status of the serotonin receptor 5HTR1A gene promoter in schizophrenia and bipolar disorder. J Affect Disord. 132(3):450-3

Caspi A, Moffitt TE, Cannon M, McClay J, Murray R, Harrington H, Taylor A, Arseneault L, Williams B, Braithwaite A, Poulton R, Craig IW. (2005) Moderation of the effect of adolescent-onset cannabis use on adult psychosis by a functional polymorphism in the catechol-O-methyltransferase gene: longitudinal evidence of a gene X environment interaction. Biol Psychiatry 57(10):1117-27

Chahrour, M., Jung, S. Y., Shaw, C., Zhou, X., Wong, S. T. C., Qin, J., & Zoghbi, H. Y. (2008). MeCP2, a Key Contributor to Neurological Disease, Activates and Represses Transcription. *Science (New York, N.Y.)*, *320*(5880), 1224–1229

Charney DS, Manji HK. (2004) Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. Sci STKE. ;2004(225):re5

Choudhuri S (2011) From Waddington's epigenetic landscape to small noncoding RNA: some important milestones in the history of epigenetics research. Toxicol Mech Methods 21(4):252-74.

Connor CM, Akbarian S. 2008 Mar 19. DNA methylation changes in schizophrenia and bipolar disorder. Epigenetics 3(2):55-8

Costa E, Chen Y, Davis J, Dong E, Noh JS, Tremolizzo L, Veldic M, Grayson DR, Guidotti A. (2002) REELIN and schizophrenia: a disease at the interface of the genome and the epigenome. Mol Interv. 2(1):47-57

Costello JF. (2008) DNA methylation in brain development and gliomagenesis. Front

Biosci 8:s175-84

Covington HE 3rd, Maze I, LaPlant QC, Vialou VF, Ohnishi YN, Berton O, Fass DM, Renthal W, Rush AJ 3rd, Wu EY, Ghose S, Krishnan V, Russo SJ, Tamminga C, Haggarty SJ, Nestler EJ. (2009) Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. J Neurosci. S;29(37):11451-60

Covington HE 3rd, Vialou VF, LaPlant Q, Ohnishi YN, Nestler EJ. (2011) Hippocampal-dependent antidepressant-like activity of histone deacetylase inhibition. Neurosci Lett. 493(3):122-6

Craddock, N., O'Donovan, M., & Owen, M. (2005). The genetics of schizophrenia and bipolar disorder: dissecting psychosis. *Journal of Medical Genetics*, *42*(3), 193–204.

Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ. (2009) Psychosis Genetics: Modeling the Relationship Between Schizophrenia, Bipolar Disorder, and Mixed (or "Schizoaffective") Psychoses. *Schizophrenia Bulletin*. 35(3):482-490

Davey, C.A., et al. (2002) Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 a resolution. J. Mol. Biol. Vol. 319

Deutsch SI, Rosse RB, Mastropaolo J, Long KD, Gaskins BL. (2008) Epigenetic therapeutic strategies for the treatment of neuropsychiatric disorders: ready for prime time? Clin Neuropharmacol. 31(2):104-19

Drevets WC. (2001) Neuroimaging and neuropathological studies of depression:

implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. Curr Opin Neurobiol. 11(2):240-9

Dwivedi Y, Rizavi HS, Conley RR, Roberts RC, Tamminga CA, Pandey GN. (2003) Altered

gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. Arch Gen Psychiatry. 60(8):804-15

Epstein J, Pan H, Kocsis JH, Yang Y, Butler T, Chusid J, Hochberg H, Murrough

J, Strohmayer E, Stern E, Silbersweig DA. (2006) Lack of ventral striatal response to

positive stimuli in depressed versus normal subjects. Am J Psychiatry. 163(10):1784-90

Ferland, C. L., & Schrader, L. A. (2011). Regulation of histone acetylation in the hippocampus of chronically stressed rats: A potential role of sirtuins. *Neuroscience*, *174*, 104–114

Fischer A, Sananbenesi F, Wang X, Dobbin M, Tsai LH. (2007) Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. Nature 10;447(7141):178-82

Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, *19*(1), 92–105.

Fu CH, Williams SC, Cleare AJ, Brammer MJ, Walsh ND, Kim J, Andrew CM, Pich

EM, Williams PM, Reed LJ, Mitterschiffthaler MT, Suckling J, Bullmore ET. (2004) Attenuation of the neural response to sad faces in major depression by antidepressant treatment: a prospective, event-related functional magnetic resonance imaging study. Arch Gen Psychiatry. 61(9):877-89

Fumagalli F, Bedogni F, Perez J, Racagni G, Riva MA.)(2004) Corticostriatal

brain-derived neurotrophic factor dysregulation in adult rats following prenatal stress. Eur J Neurosci. 20(5):1348-54

Gao L, Cueto MA, Asselbergs F, Atadja P. (2002) Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. J Biol Chem. 12;277(28):25748-55

Gavin DP, Sharma RP (May 2010). Histone modifications, DNA methylation, and schizophrenia *Neurosci Biobehav Rev* 34 (6): 882–8.

Glenn T. Konopaske, Nicholas Lange, Joseph T. Coyle, Francine M. Benes. (2014) Prefrontal Cortical Dendritic Spine Pathology in Schizophrenia and Bipolar Disorder. *JAMA Psychiatry*, 2014.1582

Gold PW, Chrousos GP. (2002) Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. Mol Psychiatry. 7(3):254-75

Grant PA, Berger SL. (1999) Histone acetyltransferase complexes. Semin Cell Dev Biol.10(2):169-77

Gray L, Scarr E, Dean B. (2006) Serotonin 1a receptor and associated G-protein activation in schizophrenia and bipolar disorder. Psychiatry Res.43(2-3):111-20

Guidotti A, Auta J, Davis JM, Di-Giorgi-Gerevini V, Dwivedi Y, Grayson DR, Impagnatiello F, Pandey G, Pesold C, Sharma R, Uzunov D, Costa E. (2000) Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. Arch Gen Psychiatry 57(11):1061-9

Guo, J. U., Ma, D. K., Mo, H., Ball, M. P., Jang, M.-H., Bonaguidi, M. A., … Song, H. (2011). Neuronal activity modifies DNA methylation landscape in the adult brain. *Nature Neuroscience*, *14*(10), 1345–1351

Gurevich I, Tamir H, Arango V, Dwork AJ, Mann JJ, Schmauss C. (2002) Altered editing

of serotonin 2C receptor pre-mRNA in the prefrontal cortex of depressed suicide

victims. Neuron. 25;34(3):349-56

Hajkova P, Erhardt S, Lane N, Haaf T, El-Maarri O, Reik W, Walter J, Surani (2002)

MA. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. Mech Dev. ;117(1-2):15-23

Hammen C. (2005) Stress and depression. Annu Rev Clin Psychol. 1:293-319

Harrison PJ.(2002) The neuropathology of primary mood disorder. Brain. 125(Pt 7):1428-49

Harwood AJ. (2003) Neurodevelopment and mood stabilizers. Curr Mol Med. 3(5):472-82

Heine VM, Zareno J, Maslam S, Joëls M, Lucassen PJ. (2005) Chronic stress in then adult dentate gyrus reduces cell proliferation near the vasculature and VEGF and Flk-1 protein expression. Eur J Neurosci. 21(5):1304-14

Helgeland MI, Torgersen S. Stability and prediction of schizophrenia from adolescence to adulthood. Eur Child Adolesc Psychiatry. 2005;14:83–94

Hildmann C, Riester D, Schwienhorst A. (2007) Histone deacetylases--an important class of cellular regulators with a variety of functions. Appl Microbiol Biotechnol. 75(3):487-97

Hu, Q., & Rosenfeld, M. G. (2012). Epigenetic regulation of human embryonic stem cells. *Frontiers in Genetics*, *3*, 238.

Illingworth RS, Bird AP. (2009) CpG islands--'a rough guide'. FEBS Lett. 583(11):1713-20

Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. Science. (2001) 293(5532):1074-80

Karolewicz B, Szebeni K, Gilmore T, Maciag D, Stockmeier CA, Ordway GA. (2008) Elevated levels of NR2A and PSD-95 in the lateral amygdala in depression. Int J Neuropsychopharmacol. 12(2):143-53.

Kelly (2000). "Cigarette smoking and schizophrenia". *Advances in Psychiatric Treatment* 6 (5): 327–331.

Kendler KS. Anna-Monika-Prize (1998) Major depression and the environment: a psychiatric genetic perspective. Pharmacopsychiatry. 31(1):5-9

Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE (2005). "Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication". *Archives of General Psychiatry* 62 (6): 593–602

Khan SN, Khan AU. (2010) Role of histone acetylation in cell physiology and diseases: An update. Clin Chim Acta. 9;411(19-20):1401-11

Klengel T, Pape J, Binder EB, Mehta D. (2014) The role of DNA methylation instress-related psychiatric disorders. Neuropharmacology 80:115-32

Kouzarides, Tony. Chromatin Modifications and Their Function (2007) Cell. Vol. 128

Krishnan V, Nestler EJ. (2008) The molecular neurobiology of depression. Nature. 455(7215):894-902

Krishnan, V., & Nestler, E. J. (2011). Animal Models of Depression: Molecular Perspectives. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, *7*, 121–147.

Kuehner C (2003). "Gender differences in unipolar depression: An update of epidemiological findings and possible explanations". *Acta Psychiatrica Scandinavica* 108 (3): 163–74

Kushima I, Aleksic B, Ito Y, Nakamura Y, Nakamura K, Mori N, Kikuchi M, Inada T, Kunugi H, Nanko S, Kato T, Yoshikawa T, Ujike H, Suzuki M, Iwata N, Ozaki N. (2010) Association study of ubiquitin-specific peptidase 46 (USP46) with bipolar disorder and schizophrenia in a Japanese population. J Hum Genet. 55(3):133-6

Labrie V., S. Pai, and A. Petronis (2012) "Epigenetics of major psychosis: progress, problems and perspectives," Trends in Genetics, vol. 28, no. 9, pp. 427–435

Ledford H (2008). Disputed definitions. Nature 455 (7216)

Liu WS, Pesold C, Rodriguez MA, Carboni G, Auta J, Lacor P, Larson J, Condie BG, Guidotti A, Costa E. (2001) Down-regulation of dendritic spine and glutamic acid decarboxylase 67 expressions in the reelin haploinsufficient heterozygous reeler mouse. Proc Natl Acad Sci U S A. 98(6):3477-82

Luikenhuis S, Giacometti E, Beard CF, Jaenisch R. (2004) Expression of MeCP2 in postmitotic neurons rescues Rett syndrome in mice.Proc Natl Acad Sci U S A.101(16):6033-8

Malaspina, D., Corcoran, C., Kleinhaus, K., Perrin, M., Fennig, S., Nahon, D., … Harlap, S. (2008). Acute maternal stress in pregnancy and schizophrenia in offspring: A cohort prospective study. *BMC Psychiatry*, *8*, 71.

McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonté B, Szyf M, Turecki G,

Meaney MJ. (2009) Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. Nat Neurosci. 12(3):342-8

Menke, A., & Binder, E. B. (2014). Epigenetic alterations in depression and antidepressant treatment. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *16*(3), 395–404.

Morinobu S, Strausbaugh H, Terwilliger R, Duman RS. (1997) Regulation of c-Fos and

NGF1-A by antidepressant treatments. Synapse 25(4):313-20

Murgatroyd C, Patchev AV, Wu Y, Micale V, Bockmühl Y, Fischer D, Holsboer F,

Wotjak CT, Almeida OF, Spengler D. (2010) Dynamic DNA methylation programs persistent

adverse effects of early-life stress. Nat Neurosci. 12(12):1559-66

Nestler EJ, Carlezon WA Jr. (2006) The mesolimbic dopamine reward circuit in

depression. Biol Psychiatry. 59(12):1151-9

Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. (1995) Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain

by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. J Neurosci. 15(11):7539-47

Nicodemus KK, et al. (2008) Serious obstetric complications interact with hypoxia-regulated/vascular-expression genes to influence schizophrenia risk. Mol Psychiatry 13:873–877

Noh, J. et al. (2005) DNA methyltransferase 1 regulates reelin mRNA expression in mouse primary cortical cultures. PNAS. Vol. 102, No. 5, pp. 1749 – 1754.

Oh G, Petronis A. Environmental studies of schizophrenia through the prism of epigenetics. Schizophr Bull. 2008;34:1122–1129

Okano M, Xie S, Li E. (1998) Cloning and characterization of a family of novel

mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. Nat Genet. 19(3):219-20

Pidsley R, Mill J. (2011) Epigenetic studies of psychosis: current findings, methodological approaches, and implications for postmortem research. Biol Psychiatry. 69(2):146-56

Pratt, Donald Voet; Judith G. Voet; Charlotte W. (2006). *Fundamentals of biochemistry : life at the molecular level* (2. ed.). 47:152-57

Ptak C, Petronis A. (2008) Epigenetics and complex disease: from etiology to new therapeutics. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 48:257-76.

Ptashne, M. (2007) Curr. Biol. 17, R233–R236

Reece J., Campbell N. (2006) Biology ISBN0-8053-6624-5.

Rifkin L, Lewis S, Jones P, Toone B, Murray R. (1994) Low birth weight and schizophrenia. Br J Psychiatry 165(3):357-62

Riggs AD, Russo VEA, Martienssen RA (1996). *Epigenetic mechanisms of gene regulation*. 1(4):152-74.

Satta R, Maloku E, Zhubi A, Pibiri F, Hajos M, Costa E, Guidotti A (2008). "Nicotine decreases DNA methyltransferase 1 expression and glutamic acid decarboxylase 67 promoter methylation in GABAergic interneurons". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (42): 16356–61.

Schwer B, Verdin E. (2007) Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins. Cell Metab. (2):104-12

Selvi RB, Kundu TK. (2009) Reversible acetylation of chromatin: implication inregulation of gene expression, disease and therapeutics. Biotechnol J. 4(3):375-90

Sham P. Genetic epidemiology. Br Med Bull. 1996;52:408–433.

Sharma, R. P., Grayson, D. R., & Gavin, D. P. (2008). Histone Deactylase 1 expression is increased in the prefrontal cortex of Schizophrenia subjects; analysis of the National Brain Databank microarray collection. *Schizophrenia Research*, *98*(1-3), 111–117.

Sharma, S., Kelly, T. K., & Jones, P. A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, *31*(1), 27–36

Sharp AJ, Stathaki E, Migliavacca E, Brahmachary M, Montgomery SB, Dupre Y, Antonarakis SE. (2011) DNA methylation profiles of human active and inactive X chromosomes. Genome Res.21(10):1592-600

Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, Nakazato M, Watanabe H, Shinoda N, Okada S, Iyo M. (2003) Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. Biol Psychiatry. ;54(1):70-5

Susser ES, Lin SP. (1992) Schizophrenia after prenatal exposure to the Dutch Hunger Winter of 1944-1945. Arch Gen Psychiatry 49(12):983-8

Thakker-Varia S, Krol JJ, Nettleton J, Bilimoria PM, Bangasser DA, Shors TJ, Black IB, Alder J. (2007) The neuropeptide VGF produces antidepressant-like behavioral effects and enhances proliferation in the hippocampus. J Neurosci. 7;27(45):12156-67

Trošelj K, Novak Kujundžić R, Grbeša I (2009) Epigenetics and gene phisiology Review article. Medicina 2009 Vol. 45 No.2

Tsuang MT, Taylor L, Faraone SV. (2004) An overview of the genetics of psychotic mood

disorders. J Psychiatr Res. 38(1):3-15

Van Speybroeck L. (2002) From epigenesis to epigenetics: the case of C. H. Waddington, Ann N Y Acad Sci. 981:61-81

Veldic, M., Kadriu, B., Maloku, E., Agis-Balboa, R. C., Guidotti, A., Davis, J. M., & Costa, E. (2007). Epigenetic mechanisms expressed in basal ganglia GABAergic neurons differentiate schizophrenia from bipolar disorder. *Schizophrenia Research*, *91*(1-3), 51–61

Vos T (2012) Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet. 15;380(9859):2163-96

Waddington C. (1942) The epigenotype. Endeavour 1942;1:18-20.

Wallace DL, Han MH, Graham DL, Green TA, Vialou V, Iñiguez SD, Cao JL, Kirk A,

Chakravarty S, Kumar A, Krishnan V, Neve RL, Cooper DC, Bolaños CA, Barrot M,

McClung CA, Nestler EJ. (2009) CREB regulation of nucleus accumbens excitability mediates social isolation-induced behavioral deficits. Nat Neurosci. 12(2):200-9

Wan LB, Bartolomei MS. (2008) Regulation of imprinting in clusters: noncoding RNAs versus insulators. Adv Genet 61:207-23

Wender PH, Rosenthal D, Kety SS, Schulsinger F, Welner J. Crossfostering. A research strategy for clarifying the role of genetic and experimental factors in the etiology of schizophrenia. Arch Gen Psychiatry. 1974;30:121-128

Xu J, He G, Zhu J, Zhou X, St Clair D, Wang T, Xiang Y, Zhao Q, Xing Q, Liu Y, Wang L, Li Q, He L, Zhao X (2014) Prenatal nutritional deficiency reprogrammed postnatal gene expression in mammal brains: implications for schizophrenia. Int J Neuropsychopharmacol. 18(4)

6. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Tonći Kero

Datum rođenja: 06.12.1989.

Adresa: Paraćeva 26, 21000 Split

Broj mobitela: 0913375376

E-mail: tonci.kero@hotmail.com

Obrazovanje:

2009. - 2013. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Šoltanska 2, 21000 Split

2013.-2015. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Šalata 3b, 10000 Zagreb

2004.-2008. I. gimnazija, Nikole Tesle 10, 21000 Split

1996.-2004. OŠ Sućidar, perivoj Ane Roje 1, 21000 Split

Osobne vještine i znanja:

Strani jezici

- Engleski jezik : C2 (2008)

Microsoft Office programi