Mehanizmi modifikacije histona

Bumba, Valentina

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:402718

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Sveučilišni preddiplomski studij kemije

Valentina Bumba

MEHANIZMI MODIFIKACIJE HISTONA
MECHANISMS OF HISTONE MODIFICATIONS

Završni rad

Mentor:
doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Osijek, 2019

SAŽETAK:

Kovalentne modifikacije amino-terminalnih završetaka histona u nukleosomima imaju ključnu ulogu u većini bioloških procesa koji su uključeni u ekspresiju i regulaciju gena. Istraživanja u posljednjih nekoliko godina otkrivaju da se te modifikacije sastoje od acetilacije, metilacije, ubikvitinacije, fosforilacije, sumoilacije itd. Acetilacija histona regulirana je djelovanjem dvaju enzima, histonske acetiltransferaze (HAT) i histonske deacetilaze. Fosforilacija se odvija na serinima, treoninima i tirozinima i to pretežno na N-terminalnom histonskom repu. Metilacija histona javlja se samo na argininima i lizinima. Ubikvitinacija se odnosi na post-translacijsku modifikaciju amino skupine lizinskog ostatka kovalentnim vezanjem jednog ili više ubikvitinskih monomera. Sumoilacija je modifikacija koja je povezana s ubikvitinacijom i uključuje kovaletno vezanje SUMO proteina na lizinske ostatke histona. ADP ribozilacija je post-translacijska modifikacija definirana dodatkom ADP-ribozne komponente na protein koji koristi NAD^+ kao supstrat. Posljednjih godina, inhibicija histon deacetilaza (HDAC) pojavila se kao potencijalna strategija za epigenetske promjene povezane s rakom. Nekoliko klasa HDAC inhibitora pokazalo je da imaju snažne i specifične anti-tumorske aktivnosti u predkliničkim istraživanjima.

KLJUČNE RIJEČI: histon, modifikacije, acetilacija, fosforilacija, ubikvitinacija

ABSTRACT:

Covalent modifications to the amino – terminal histone ends in nucleosomes have a key role in many biological processes involved in gene expression and regulation. In the recent years, research has shown that these modifications are mainly acetylation, methylation, ubiquitination, phosphorylation, sumoilation etc. Histone acetylation is regulated by activity of two enzymes, histone acetyltransferase (HAT) and histone deacetylase. Phosphorylation acts on serines, threonines and tyrosines and mostly on N-terminal histone tail. Histone methylation occurs only on arginines and lysines. Ubiquitination refers to a post-translational modification of amino group of a lysine residue by covalent bonding of one or more ubiquitin monomers. Sumoilation is a modification which is related to the ubiquitination and includes covalent bonding of SUMO proteins to lysine histone residue. ADP-ribosylation is a post-translational modification defined by adding ADP-ribose component to a protein which uses NAD^+ as a substrate. In the recent years, inhibition of the histone deacetylase (HDAC) has surfaced as a potential strategy for epigenetic changes linked to cancer. A few classes of HDAC inhibitors showed that they possess strong and specific anti-tumor activities in preclinical research.

KEYWORDS: histone, modifications, acetylation, phosphorylation, ubiquitination

SADRŽAJ:

1.UVOD 1
2.HISTONI 2
3. MODIFIKACIJE HISTONA 4
3.1. Acetilacija 4
3.2. Fosforilacija 6
3.3 Metilacija 7
3.3.1. Metilacija lizina 7
3.3.2. Metilacija arginina 8
3.3.3 *Demetilacija histona* 9
4. Ubikvitinacija 9
5. Sumoilacija 10
6. ADP- ribozilacija 11
7. Izomerizacija prolina 11
8. Deiminacija 12
9. β-N-acetilglukozamin 12
10. Međudjelovanje histonskih modifikacija 12
4. NAČINI DJELOVANJA HISTONSKIH MODIFIKACIJA 14
4.1. Izravno narušavanje strukture 14
4.2.Regulacija vezanja kromatinskih faktora 15
5. HISTONSKE MODIFIKACIJE I RAK 17
5.1. HDAC inhibitori 17
5.2. Učinci inhibicije histonskih deacetilaza 18
6. ZAKLJUČAK 20
7. LITERATURA 21

1.UVOD

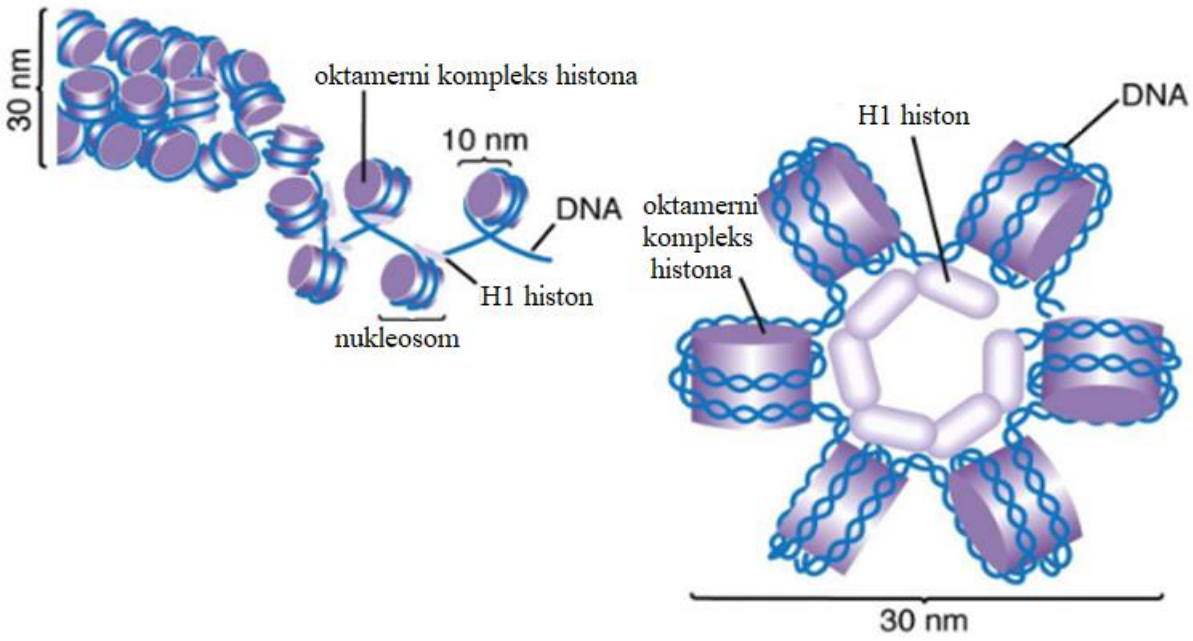
Epigenetika je grana znanosti koja proučava nasljedne promjene u ekspresiji gena koje se događaju bez promjena u rasporedu baza DNA [1]. Genetske informacije se „pakiraju“ u strukturu zvanu kromatin. Proteini histoni i DNA tvore nukleosome koji su osnovni gradivni blokovi eukariotskog kromatina. Glavna komponenta kromatina koja ima ključnu ulogu u regulaciji je histon. Modifikacije histona imaju temeljnu ulogu u većini bioloških procesa koji su uključeni u ekspresiju DNA. Histoni se sastoje od jezgre (oko koje je omotana DNA) i repova. Repovi mogu biti kovalentno modificirani dodavanjem različitih molekula čime dolazi do aktivacije ili deaktivacije histona. Neke od kovalentnih modifikacija su: acetilacija i deacetilacija lizina, fosforilacija serina, metilacija lizina i arginina, ubikvitinacija lizina itd. Brojna izvješća ukazuju na mogućnost da su sve te modifikacije povezane i međusobno ovisne te stoga mogu tvoriti „histonski kod“ što znači da kombinacija različitih modifikacija može rezultirati različitim staničnim ishodima. Histonske modifikacije djeluju putem dva glavna mehanizma. Prvi mehanizam uključuje modifikacije koje izravno utječu na ukupnu strukturu kromatina, bilo na kratkim ili na velikim udaljenostima. Drugi mehanizam uključuje modifikaciju koju regulira (pozitivno ili negativno) vezanje efektorskih molekula.

Pojam „epigenetski“ uveo je Waddington 1942. godine da bi opisao interakcije gena s njihovom okolinom koja stvara fenotip. Među najnovijim postignućima na tom području je spoznaja da epigenetski mehanizmi nisu uključeni samo u regulaciju transkripcije, već utječu na sve procese koji koriste DNA kao predložak, uključujući popravak i replikaciju DNA. Epigenetske promjene uključuju interferenciju RNA (translacijska regulacija putem nekodirajućih RNA molekula), preoblikovanje nukleosoma, DNA metilaciju i modifikacije histona [2].

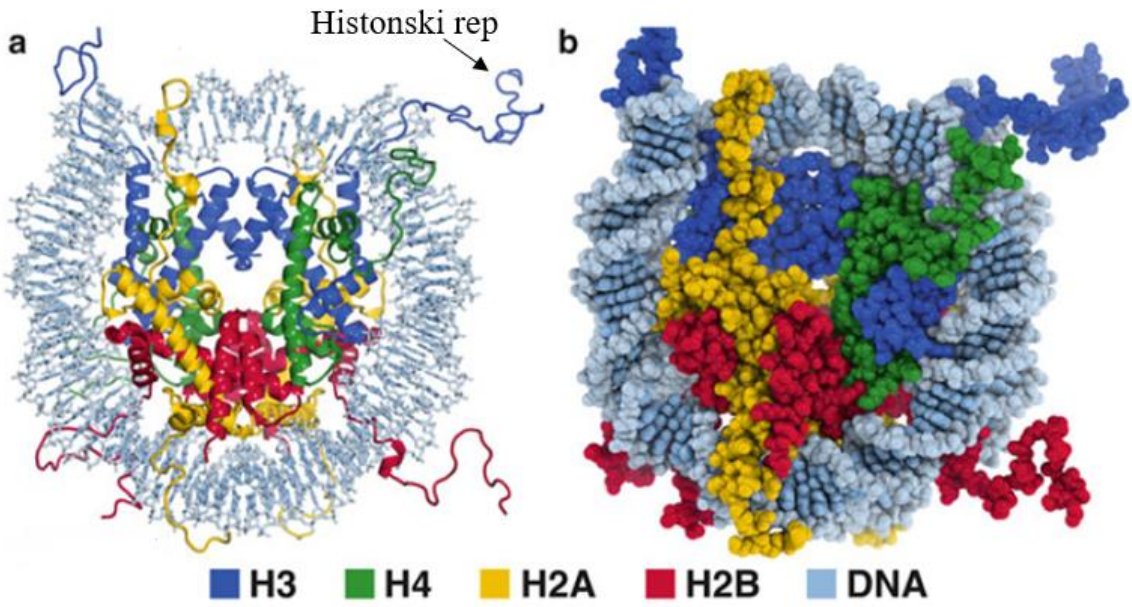
Cilj ovog rada je definirati i opisati mehanizme modifikacije histona te njihovu povezanost s određenim vrstama tumora.

2.HISTONI

Eukariotska DNA čvrsto je vezana na skupinu malih baznih proteina koji se zovu histoni. Histoni imaju izražena bazna svojstva jer lizini i arginini čine četvrtinu aminokiselinskih ostataka svakog histona. Čitav kompleks stanične DNA udružene s proteinima (histonskim i ne histonskim) naziva se kromatin. Osnovne strukturne jedinice kromatina nazivaju se nukleosomi. Na slici 1. i 2. prikazana je građa nukleosoma koji se sastoji od proteinske jezgre i DNA omotane oko nje. Pet je glavnih histona koji čine kromatin : H2A, H2B, H3, H4 i H1. Nukleosomsku jezgru čine osam molekula oktamernog kompleksa histona („core histones“) koji uključuje tetramer H3-H4 i par dimera H2A-H2B. 165 baznih parova DNA omotano je oko nukleosomske jezgre. Svaki histon ima amino-treminalni rep koji se produžuje izvan jezgre nukleosoma. Histon H1, koji ima drugačiju strukturu od ostalih histona, „lijepi“ se na nukleosom na području gdje povezna DNA (engl. *linker* DNA) ulazi i izlazi. Dvije nukleosomske jezgre spaja DNA i histon H1. Histoni su komponente odgovorne za regulaciju transkripcije gena [3,4].



Slika 1. Struktura nukleosoma. Slika adaptirana iz [5]



Slika 2. Nukleosom. Slika adaptirana iz [4]

Ovi su proteini podložni velikom broju post-translacijskih modifikacija, uključujući acetilaciju i metilaciju lizina (K) i arginina (R), fosforilaciju serina (S) i treonina (T), ubikvinaciju i sumoilaciju lizina. Svaki lizinski ostatak može prihvatiti jednu, dvije ili čak tri metilne skupine, dok ih arginin može prihvatiti jednu ili dvije. Većina post-translacijskih modifikacija se odvija na amino-terminalnom i karboksi-terminalnom kraju [6].

3. MODIFIKACIJE HISTONA

3.1. Acetilacija

Acetilacija je reakcija u kojoj se acetilna skupina s acetil-CoA prenosi na određene lizinske ostatke u amino-terminalnim repovima. Dokazano je da je acetilacija lizina vrlo dinamična reakcija koja je regulirana suprotnim djelovanjem dvaju enzima, histon acetiltransferaze (HAT) i histon deacetilaze. HAT koristi acetil-CoA kao kofaktor i katalizira prijenos acetilne skupine na ε-amino skupinu bočnih lanaca lizina. Lizin pri neutralnom pH ima pozitivno nabijenu amonijevu skupinu čiji se naboj neutralizira u nenabijenu amidnu skupinu, dodatkom acetilne skupine. Uslijed toga dolazi do slabljenja interakcija između histona i DNA [7,8].

Postoje dva tipa HAT : tip-A i tip-B. Tip- B je pretežno citoplazmatski i acetilira slobodne histone, ali ne i one koje su pohranjeni u kromatinu. HAT tipa-B acetiliraju novosintetizirani histon H4 na lizinskim ostacima K5 i K12 što utječe za taloženje histona. Tip-A HAT su mnogo raznolikija skupina enzima od tipa -B. Mogu se podijeliti u tri odvojene grupe ovisno o homologiji aminokiselinskih sekvenci i konformacijskoj strukturi, to su: N-acetiltransferaze povezane s GCN5[1], GNAT (eng. *GCN5-related N-acetyltransferases*), MYST i CBP/p300 (eng. *CREB-binding protein*) obitelji . Svaki od tih enzima modificira više mjesta unutar histonskih N-terminalnih repova [7].

Acetilirani lizinski ostatak stvara interakcije sa specifičnom acetillizinskom veznom domenom, prisutnom u mnogim proteinima koji reguliraju transkripciju u eukariota. Ta domena, zvana bromodomena, sadržava približno 110 aminokiselina koje stvaraju klupko od četiriju uzvojnica s peptidnim veznim mjestom na jednome kraju [8].

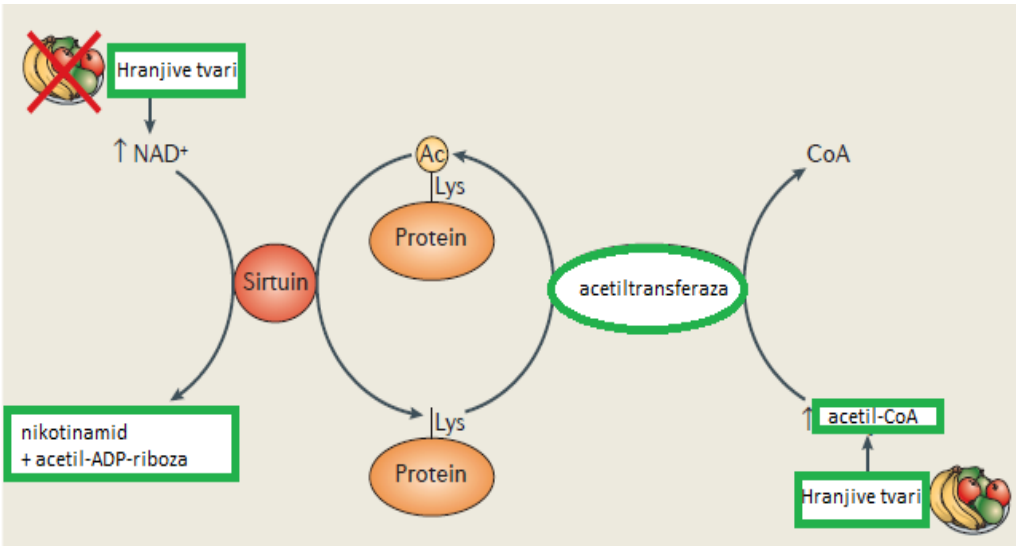
Acetiliranje histona može aktivirati transkripciju kombinacijom triju mehanizama: smanjenjem afiniteta histona za DNA, privlačenjem drugih komponenata sustava za transkripciju i poticanjem remodeliranja strukture kromatina [8].

Histon deacetilaze(HDAC) poništavaju učinke HAT i kataliziraju reakciju deacetilacije lizina čime se obnavlja pozitivni naboja lizina. Postoje četiri klase HDAC : klase I i II sadrže enzime koji su povezani s kvascem scRpd3 i scHda1, klasa IV ima samo jednog člana (HDAC11), dok je klasa III (sirtuini) homologna kvascu scSir2. Klasa III, za razliku od ostalih,

[1] transkripcijski koaktivator iz kvasca

zahtijeva specifičan kofaktor za svoju aktivnost (NAD^+). Općenito, HDAC ima relativno nisku supstratnu specifičnost. Jedan enzim ima sposobnost deacetilirati višestruka mjesta unutar histona [7].

Metabolizam organizma može utjecati na acetilaciju proteina promjenom stanične koncentracije NAD^+ i acetil-koenzim A (acetil-CoA). Na primjer, tijekom gladovanja, relativna koncentracija NAD^+ se povećava što dovodi do povećanja enzimske aktivnosti sirtuina i deacetilacije ciljnog proteina (Slika 2.). Za razliku od kinaza, gdje je enzimska aktivnost uglavnom neovisna o promjeni koncentracije ATP, aktivnost acetiltransferaza je ovisna o koncentraciji acetil-CoA. Kada se poveća količina hranjivih tvari, povećava se i koncentracija acetil-CoA što dovodi do povećanja aktivnosti acetiltransferaze i acetilacije ciljnog proteina [9].



Slika 3. Utjecaj metabolizma na acetilaciju proteina. Slika adaptirana iz [9]

3.2. Fosforilacija

Kao i acetilacija, fosforilacija histona je vrlo dinamična. Ona se odvija na serinima, treoninima i tirozinima, pretežno na N-terminalnom histonskom repu, no može se odvijati i na unutarnjim središnjim regijama. Ona predstavlja dodavanje fosfatne skupine na proteinsku molekulu. Katalizira se različitim specifičnim protein kinazama, dok fosfataze neposredno uklanjaju fosfatnu skupinu. Sve identificirane histon-kinaze prenose fosfatnu skupinu s ATP na hidroksilnu skupinu ciljanog aminokiselinskog bočnog lanca. Pri tome se dodaje značajan negativan naboj histonu koji utječe na strukturu kromatina. Međutim, za većinu kinaza nije jasno kako se enzim točno regrutira na mjesto djelovanja na kromatinu. U nekoliko slučajeva, primjerice proteinske kinaze aktivirane mitogenima MAPK1 (eng. *mitogen-activated protein kinase*) enzimom, kinaza posjeduje unutarnju DNA-veznu domena s kojom je vezana na DNA [7,10].

Manje se zna o ulozi histonskih fosfataza. Svakako, s obzirom na izuzetno brzo odvijanje specifičnih fosforilacija histona, mora postojati visoka aktivnost fosfataza unutar jezgre [7].

Histonska fosforilacija, koja uključuje Ser-10 na histonu H3, pojavila se kao važna modifikacija u transkripciji i kondenzaciji kromatina tijekom mitoze. Početne studije pokazale su da fosforilacija histona ima ulogu u indukciji transkripcije neposrednih ranih gena u stanicama sisavaca, kao što je *c-Fos* gen. Rsk/Msk (eng. *90 kDa ribosomal S6 kinase/ mitogen and stress activated protein kinase*) kinaze mogu uzrokovati fosforilaciju izravno. Transkripcijski povezana histon kinaza je identificirana u pivskom kvascu kao Snfl kinaza. Identitet ovih kinaza , poznatih kao transkripcijski faktori, sugerira da se oni mogu regrutirati u specifične promotore kao koaktivatori [11].

Uzimajući u obzir samo elektrostatičke zahtjeve za preklapanje kromatina, acetilacija histona, kroz neutralizaciju pozitivnog naboja i fosforilacija histona kroz dodatak negativnog naboja, vjerojatno bi uzrokovale dekondenzaciju kromatina. Dakle, uporaba višestrukih oznaka na histonskim repovima, kombiniranjem acetilacije i fosforilacije, može uzrokovati veće promjene u ukupnoj gustoći naboja repa koje dovode do većih promjena u strukturi kromatina ciljnih gena [12].

3.3 Metilacija

Metiliranje proteina je kovalentna modifikacija koja predstavlja dodatak metilne skupine iz donorskog S-adenozilmetionina (SAM) na karboksilnu skupinu glutamata, leucina i izopreniliranog cisteina ili na bočni lanac dušikovih atoma lizina, arginina i histidina. Međutim, metilacija histona javlja se samo na argininima i lizinima. Za razliku od acetilacije i fosforilacije, metilacija histona ne mijenja naboj histonskog proteina. Arginini mogu biti mono- ili di metilirani, dok lizini mogu biti mono-, di- ili tri metilirani [10].

Enzimi odgovorni za metilaciju histona grupirani su u tri različite klase [10]:

- Lizin-specifična SET (eng. *Su(var)3-9, Enhancer of zeste and Trithorax*) domena – sadrži histon metiltransferaze (HMT) koje su uključene u metilaciju lizina 4, 9, 27 i 36 histona H3 i lizina 20 histona H4
- Lizin metiltransferaze koje ne sadrže SET, a koje su uključene u metiliranje lizina 79 histona H3
- Arginin metiltransferaze koje su uključene u metiliranje arginina 2,17 i 26 histona H3 i arginina 3 histona H4

3.3.1. Metilacija lizina

Tri mjesta metilacije lizina povezana su s transkripcijskom represijom: H3K9, H3K27 i H4K20. Vrlo malo je poznato u vezi s represijom H4K20 u usporedbi s velikom brojem studija na druge dvije represije. Kod ljudi metilaciju H3K9 provode SUV39H1(eng. *suppressor of variegation 3-9 homolog 1*) i SUV39H2 (eng. *suppressor of variegation 3-9 homolog 2*). Pokazalo se da ove histon-lizin-metiltransferaza, HKMT sadrže SET domenu koja sadrži enzimsku aktivnost. Domena SET obično sadrži 130-140 aminokiselina i uobičajena je značajka proteina grupe Trithorax (Thx) i Polycomc (PcG) koji su uključeni u aktivaciju i represiju transkripcije. Iznimka je enzim Dot1 koji metilira H3K79 unutar histonske globularne jezgre i ne sadrži SET domenu [7,10].

HKMT su specifični enzimi i modificiraju lizin do određenog stupnja (mono-, di- i tri-). Na primjer, DIM5 (eng. *Dim-5 histone-3 lysine-9 methyltransferase)* može tri-metilirati H3K9, ali SET7/9 može samo mono-metilirati H3K4. Ovi specifični reakcijski produkti mogu se proizvesti korištenjem samo pročišćenih enzima tako da je sposobnost razlikovanja između različitih histonskih lizina i između različitih metiliranih stanja unutrašnje svojstvo enzima. Iz

kristalografskih studija X-zraka proizlazi da u katalitičkoj domeni enzima postoji ključni ostatak koji određuje da li se aktivnost enzima proteže od mono-metilnog do tri-metilnog produkta. U DIM5 se, unutar mjesta za vezanje lizina, nalazi fenilalanin(F281), koji može primiti sve metilirane oblike lizina čime omogućuje enzimu generiranje tri-metiliranog produkta. Nasuprot tome, SER7/9 ima tirozin (Y305) u takvom položaju da se može prilagoditi samo mono-metiliranom produktu [7].

3.3.2. Metilacija arginina

Postoje dvije klase arginin metiltransferaza(RMT): enzimi tipa I i enzimi tipa II. Enzimi tipa I proizvode monometilirane arginine, Rme1 (eng. *monomethylarginine*) i asimetrične dimetilirane arginine, Rme2as (eng. *dimethylarginine asymmetric)*, dok enzimi tipa II generiraju Rme1 i simetrične dimetiliane arginine, Rme2s (eng. *dimethylarginine symmetric)*. Zajedno, dva tipa arginin metiltransferaza čine relativno veliku obitelj proteina (11 članova). Svi ovi enzimi prenose metilnu skupinu iz SAM u ω-gvanidino skupinu arginina. Što se tiče metilacije histonskog arginina, najrelevantniji enzimi su argininske metiltransferaze, PRMT1, 4, 5 i 6 (eng. *protein arginine methyltransferase 1,4,5 and 6*) [7].

Utjecaj metilacije arginina na transkripciju može biti aktivirajući ili represivan i ovisi o vrsti uključene argininske metiltransferaze. Na primjer, tip I RMT, koji uključuje CARM1 / eng. *coactivator associated arginine methyltransferase 1*), PRMT1 i PRMT2 i stvaranje monometil-arginina i asimetričnih derivata dimetil-arginina je uključen u aktivaciju, dok argininmetiltransferaza tipa II PRMT5, koja generira monometil-arginin i simetrične dimetil-argininske derivate, sudjeluje u represiji [10].

Metiltransferaze, i za arginin i za lizin, imaju karakteristično prošireno katalitičko aktivno mjesto koje razlikuje ovu široku skupinu metiltransferaza od drugih enzima ovisnih o SAM. SAM-vezni džep je na jednoj strani enzima, dok je kanal za prihvat peptidna kanal na suprotnoj strani. To ukazuje da se molekula SAM i histonskog supstrata spajaju sa suprotnih strana enzima [7].

3.3.3 *Demetilacija histona*

Demetilacija je kemijska reakcija u kojoj se iz molekule uklanja metilna skupina. Kao i kod lizin-metil-transferaza, demetilaze imaju vrlo visoku razinu supstratne specifičnosti. Također su osjetljivi na stupanj metilacije lizina. Na primjer, neki od enzima mogu samo demetilirati mono- i di-metil supstrate, dok drugi mogu demetilirati sva tri stanja metiliranog lizina [7].

Godine 2004. identificirana je prva lizin-demetilaza. Otkriveno je da ovaj enzim koristi FAD kao kofaktor i nazvan je lizin-specifična demetilaza 1 (LSD1). Reakcija demetilacije zahtijeva protonirani dušik i stoga je kompatibilna samo s mono- i di- metiliranim lizinskim supstratima [7].

2006. godine otkrivena je još jedna skupina lizinske demetilaze u kojoj su određeni enzimi bili sposobni demetilirati tri-metilirane lizine. Oni imaju poseban katalitički mehanizam u odnosu na LSD1, koriste mehanizam radikala te Fe^{2+} i α-ketoglutarat kao kofaktore. Prvi enzim, koji je identificiran kao tri-metil lizin demetilaza, je JMJD2 (eng. *jumonji C domain-containing* 2) koji demetilira H3K9me3 i H3K36me3 [7].

4. Ubikvitinacija

Ubikvitin je protein koji se sastoji od 76 aminokiselina i prisutan je kod svih eukariota. Ubikvitinacija je post-translacijska modifikacija u kojoj se na amino skupinu lizinskog ostatka kovalentno veže jedan (monoubikvitinacija) ili više (poliubikvitinacija) ubikvitinskih monomera. Poliubikvitinacijom se označava protein koji se razgrađuje pomoću 26S proteasoma, dok monoubikvitinacija modificira funkciju proteina [10].

Histon H2 bio je prvi histon koje je ubikvitiniran. Kasnije su ubikvitirani još H2B, H3 i H1. Histoni su uglavnom monoubikvitirani, iako H2A i H2B mogu biti i poliubikvitirani. Ubikvitinacija histona se sastoji od stvaranja izopeptidne veze između C-kraja ubikvitina i lizinskog bočnog lanca histona djelovanjem E1 aktivirajućih, E2 konjugirajućih i E3 ligaznih enzima. E2 i E3 imaju ključnu ulogu u određivanju proteina za ubikvitinaciju. E3 ligaze

pripadaju HECT (eng. *Homologous to E6AP-C Terminus*) i RING (eng. *Really Interesting New Gene*) obitelji proteina [10].

Dodatak ubikvitina histonima je reverzibilan proces i može se poništiti djelovanjem enzima deubikvitinacije koji se sastoje od ubikvitin C-terminalnih hidrolaza i ubikvitin-specifičnih proteaza (USP, eng. *ubiquitin-specific proteases*). Do sada je u kvascu identificirano 16 USP. Ovi USP razlikuju se po duljini amino-terminalnog dijela koji daje njihovu specifičnost. Najbolje proučene USP su USP8 i USP10 koje su specifične za H2B [10].

Ubikvitinacija histona može utjecati na druge modifikacije histona. Na primjer, pokazano je da se histon deacetilaza 6 (HDAC6) veže na ubikvitin preko svoje cink-prst domene. Utjecaj ubikvitinacije na metilaciju histona može objasniti ulogu koju ubikvitinacija ima u aktivaciji i inhibiciji transkripcije. Na primjer, predloženo je da se ubikvitinacija H2B događa uglavnom u eukromatinu[2] što dovodi do metilacije H2K4 i H3K79 što bi spriječilo povezivanje SIR-proteina(eng. *silent information regulator)* s aktivnim eukromatskim regijama čime se ograničavaju SIR-proteini na heterokromatske regije da posreduju u utišavanju gena. U isto vrijeme u eukromatinu, ubikvitinacija bi aktivirala transkripciju metilacijom H3K5 i olakšavanjem elongacije transkripcije [10].

5. Sumoilacija

Sumoilacija je modifikacija koja je povezana s ubikvitinacijom i uključuje kovalentno vezanje malih modifikatora sličnih ubikvitinu (SUMO, eng. *small ubiquitin-like modifier*) na histonske lizine djelovanjem enzima E1, E2 i E3. Sumoilacija histona prvi je put objavljena 2003. godine kada je otkriveno da H4 može biti modificiran sa SUMO te da takva modifikacija dovodi do potiskivanja transkripcijske aktivnosti mobilizirajući HDAC i HP1 (eng. *heterochromatin protein 1*) protein. Sumoilacija je otkrivena na sva četiri osnovna histona i čini se da djeluje kao antagonist acetilacije i ubikvitinacije koje bi se inače mogle pojaviti na istom lizinskom bočnom lancu. Zbog toga je uglavnom povezana s represivnim funkcijama [7].

[2] dio kromatina koji sadrži kodirajuće dijelove DNA

6. ADP- ribozilacija

ADP -ribozilacija je post-translacijska modifikacija kojoj se skupina ADP-riboze prenosi na NAD^+ protein. Histoni mogu biti mono- i poli- ADP- ribozilirani na glutamatnim i argininskim ostatcima, ali relativno je malo poznato o funkciji ove modifikacije koja je reverzibilna. Poli-ADP-ribozilaciju histona kataliziraju poli-ADP-riboza-polimeraze (PARP, eng. *poly(ADP-ribose) polymerase*), dok se reverzni proces odvija hidrolitičkim djelovanjem enzima poli-ADP-riboza glikohidrolaze (PARG). Ove skupine enzima djeluju zajedno kako bi kontrolirali razine poli-ADP riboziliranih histona koje su u korelaciji s relativno opuštenim stanjem kromatina. Smatra se da je ta korelacija djelomična posljedica negativnog naboja kojeg histon ima uslijed ove modifikacije. Međutim, ujedno je objavljeno i da aktivacija PARP-1 dovodi do povišenih razina acetilacije histonske jezgre. Riboziliranje H3K4me3 demetilaze KDM5B, posredovano djelovanjem PARP-1, inhibira tu demetilazu i uklanja ju iz kromatina istodobno s H1, pri čemu ciljni promotori postaju dostupniji [7,10].

Mono-ADP-ribozilaciju histona vrše mono-ADP-riboziltransferaze i otkrivena je na sva četiri histona koji čine jezgru nukleosoma kao i na histonu H1. Značajno je da se ove modifikacije povećavaju uslijed oštećenja DNA što upućuje na njihovu ulogu u odgovoru stanice na oštećenja DNA [7,10].

7. Izomerizacija prolina

Izomerizacija se definira kao transformacija molekule u različite izomere. Izomerizacija proteina prvi je put opisana 1968. godine i pokazano je da značajno utječe na konformaciju proteina narušavanjem sekundarne strukture polipeptida. Protein može primiti dvije različite konformacije - *cis* i *trans*. Izomerizacija se događa spontano, no postoje i enzimi, koji se nazivaju prolin izomeraze, koji ubrzavaju promjenu između različitih konformacija (*cis-trans*). Prvi dokaz da se histoni mogu izomerizirati zabilježen je 2006. godine kada je Frp4 identificiran kao histonska izomeraza prolina 30 i 38 (P30 i P38) smještenih na repu H3. Konformacijski status P38 potreban je da inducira lizin 36 za metilaciju histona H3 (H3K36) i čini se da njegova izomerizacija inhibira sposobnost Set2 da metilira H3K36 [10].

8. Deiminacija

Reakcija deiminacije uključuje pretvorbu arginina u citrulin. U stanicama sisavaca, ova je reakcija na histonima katalizirana peptidil deiminazom PADI4 (eng. *peptidyl arginine deiminase, type IV*) koja pretvara peptidil- arginine u peptidil-citruline. Reakcija učinkovito neutralizira pozitivan naboj arginina jer je citrulin neutralan. Također, postoje dokazi da PADI4 pretvara mono-metilirani arginin u citrulin čime djeluje kao argininska demetilaza. Međutim, za razliku od „prave" demetilaze, reakcija PADI4 ne regenerira nemodificirani arginin [7].

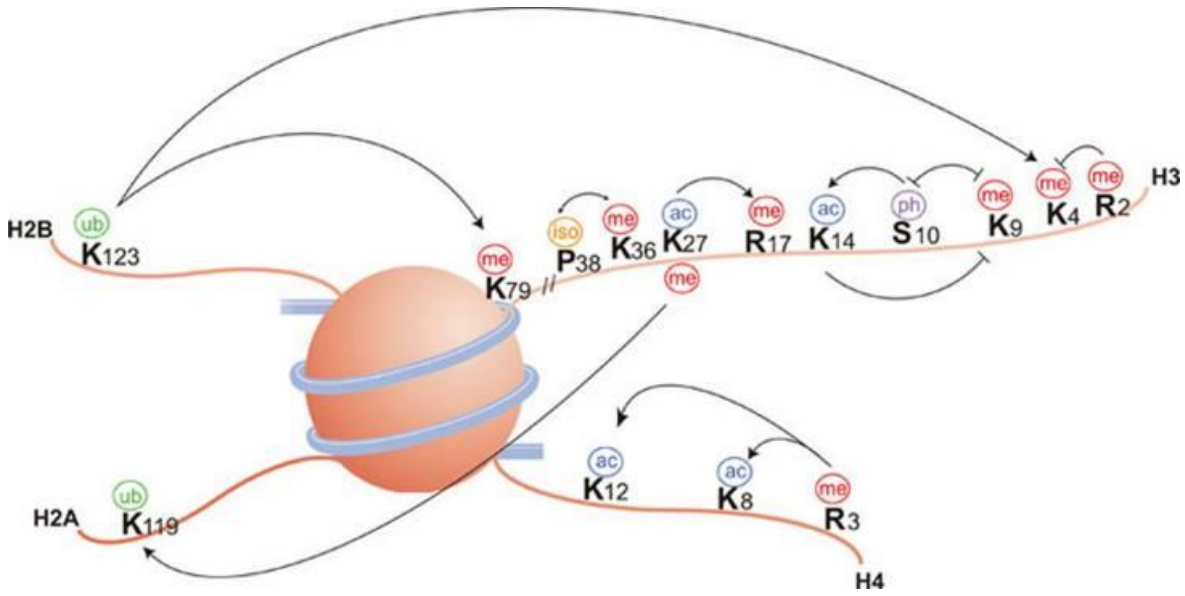
9. β-N-acetilglukozamin

Mnogi su nehistonski proteini regulirani modifikacijom bočnih lanaca serinskih i treoninskih ostataka s jednim ostatkom šećera β-N-acetilglukozamina (O-GlcNAc). Nedavno je otkriveno da se i histoni mogu modificirati β-N-acetilglukozaminacijom. U stanicama sisavaca postoji samo jedan enzim, O-GlcNAc -transferaza, koji katalizira prijenos šećera iz donorskog supstrata uridin-difosfat-GlcNAc (UDP-GlcNAc), na ciljni protein. Do sada se pokazalo da se histoni H2, H2B i H4 modificiraju s O-GlcNac [7].

10. Međudjelovanje histonskih modifikacija

Veliki broj mogućih modifikacija histona pruža prostor za čvrstu kontrolu strukture kromatina. Dodatna razina složenosti postoji zbog međudjelovanja (eng. *cross-talk*) različitih modifikacija, koje najvjerojatnije služi za „fino podešavanje" sveukupne kontrole. Cross-talk se može odvijati preko nekoliko mehanizama (Slika 3.). Može postojati antagonizam između modifikacija ako više od jedne modifikacije cilja na isto mjesto. To je posebno prisutno kod lizina koji mogu biti acetilirani, metilirani ili ubikvitinirani. Potom, jedna modifikacija može ovisiti o drugoj tako npr. metilacija H3K4 i H3K79 u potpunosti ovisi o ubikvitinaciji H2BK123. Kod trećeg mehanizma, vezanje proteina na određenu modifikaciju može se poremetiti susjednom modifikacijom. Na primjer, HP1 se veže na H3K9me2/3, ali tijekom mitoze vezanje je poremećeno zbog fosforilacije H3S10. Da bi se reguliralo vezanje na ovaj način, modificirane aminokiseline ne moraju nužno biti izravno susjedne jedna drugoj. Također, modifikacija supstrata može utjecati na enzimsku aktivnost. U kvascu scFpr4 prolinska izomeraza katalizira međukonverziju peptidne veze H3P38 i ova aktivnost utječe na

sposobnost scSet2 enzima da metilira H3K36 što je povezano s učincima na transkripciju gena. Može postojati suradnja između modifikacija kako bi se učinkovito regrutirali specifični faktori. Na primjer, PHF8 se specifično veže na H3K4me preko PhD prsta i ta interakcija je jača kada su H3K9 i H2K14 također acetilirani na istom repu H3. Međutim, ova stabilizacija vezanja može biti posljedica dodatnih čimbenika u kompleksu s PHF8, a ne izravnog učinka na PHF8. Također, može postojati suradnja između modifikacija histona i DNA metilacije. Na primjer, protein UHRF1 se veže na nukleosome koji nose H3K9me3, ali ovo vezanje je značajno poboljšano kada je nukleosomska DNA CpG metilirana. Suprotno tome, metilacija DNA može inhibirati vezanje proteina na specifične histonske modifikacije. Dobar primjer ovdje je KDM2A koji se veže samo na nukleosome koji nose H3K9me3 kada DNA nije metilirana [7].



Slika 4. Cross-talk histonska modifikacija. Modifikacije histona mogu pozitivno ili negativno utjecati na druge modifikacije. Pozitivan učinak označen je glavom strelice, a negativan ravnom crtom. Slika adaptirana iz [7]

4. NAČINI DJELOVANJA HISTONSKIH MODIFIKACIJA

Histonske modifikacije svoje djelovanje iskazuju putem dva glavna mehanizma. Prvi mehanizam uključuje modifikacije koje izravno utječu na cjelokupnu strukturu kromatina, bilo na kratkim ili na velikim udaljenostima. Drugi mehanizam uključuje modifikaciju koja regulira (pozitivno ili negativno) vezanje efektorskih molekula [7].

4.1. Izravno narušavanje strukture

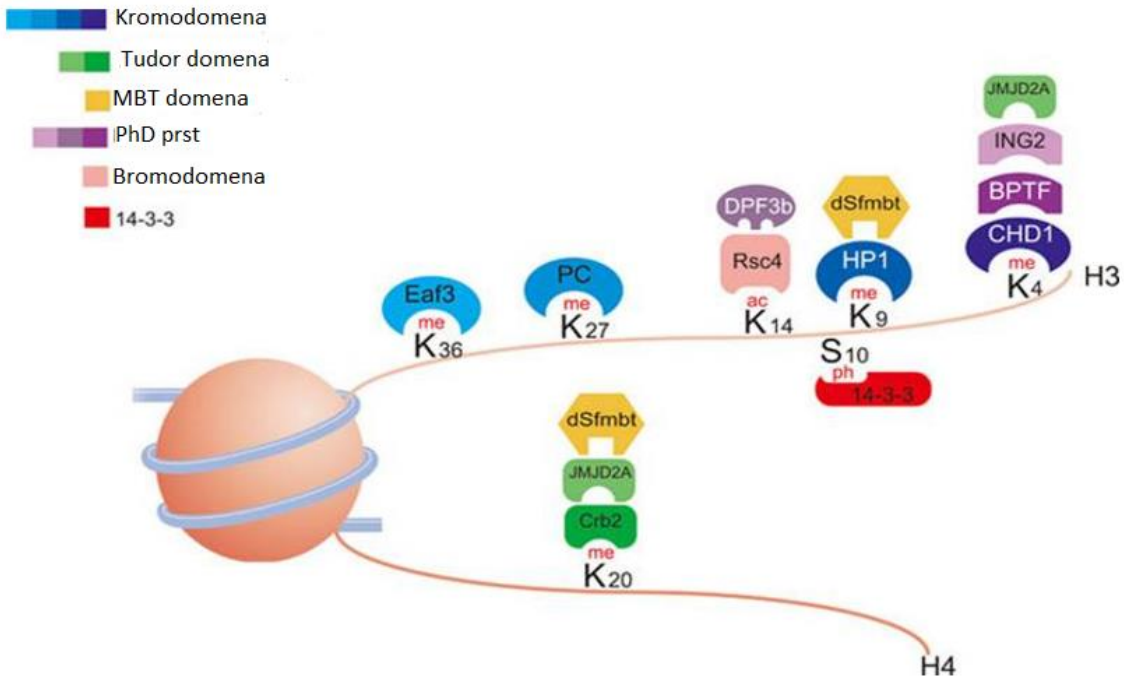
Acetilacija i fosforilacija histona učinkovito smanjuju pozitivni naboj histona što dovodi do narušavanja elektrostatskih interakcija između histona i DNA. Zbog toga, kromatin ima manje kompaktnu strukturu čime se olakšava pristup DNA proteinima poput onih koji su uključeni u transkripciju. Acetiliranje se događa na brojnim lizinima histonskih repova, uključujući H3K9, H3K14, H2K18, H4K5, H4K8 i H4K12. Ovaj veliki broj potencijalnih mjesta modifikacije upućuje na to da se u hiperacetiliranim područjima naboj na histonskim repovima može učinkovito neutralizirati što može imati značajan utjecaj na strukturu kromatina. Višestruke histonske acetilacije su također učestalije u pojačavačkim sekvencama, posebice u promotorskim regijama, gdje najvjerojatnije olakšavaju pristup transkripcijskim faktorima [7].

Mjesta fosforilacije histona su znatno specifičnije te ih je manje u odnosu na mjesta acetilacije. Također, i ove modifikacije mogu biti povezane s velikim strukturnim promjenama unutar kromatina. Na primjer, fosforilacija H3S10 tijekom mitoze povezana je s nastankom kondenziranijeg kromatina [7].

Ubikvitinacija dodaje vrlo veliku molekulu histonu i zbog toga izaziva promjenu u ukupnoj konformaciji nukleosoma što utječe na intra-nukleosomalne interakcije i interakcije s drugim kompleksima vezanim na kromatin. Histonsko rezanje repa, koje rezultira gubitkom prvih 21 aminokiselina H3, imat će slične učinke. Nasuprot tome, neutralne modifikacije kao što je metilacija histona vjerojatno neće izravno ometati strukturu kromatina jer su te modifikacije male i ne mijenjaju naboj histona [7].

4.2.Regulacija vezanja kromatinskih faktora

Pokazalo se da brojni čimbenici povezani s kromatinom specifično međudjeluju s modificiranim histonima preko mnogih različitih domena (Slika 4.). Sve je veći broj takvih proteina otkrivenih razvojem i primjenom novih proteomičkih metoda. Postoje multivalentni proteini i kompleksi koji posjeduju specifične domene unutar koje im omogućuju istodobno prepoznavanje nekoliko modifikacija i drugih nukleosomskih značajki [7].



Slika 5. Primjeri proteina s domenama koje se specifično vežu na modificirane histone. Slika adaptirana iz [7]

Postoje različiti tipovi domena koje razlikuju metilaciju lizina od bilo koje druge modifikacije. Tu pripradaju PhD prsti i takozvana Tudorova „kraljevska domena“, koja obuhvaća Tudor, kromodomene i MBT domene (Slika 3.). Brojne domene mogu prepoznati isti modificirani lizin histona. Na primjer, H3K4me3, oznaka povezana s aktivnom transkripcijom, prepoznaje PhD prst unutar ING obitelji proteina (ING1-5). ING proteini zauzvrat regrutiraju dodatne modifikatore kromatina kao što su HAT i HDAC [7].

Histonski acetilirani lizini vezani su bromodomenama koje se često nalaze na HAT-ovima i u kompleksima remodeliranja kromatina. Nedavno je također pokazano da PhD prsti mogu specifično prepoznati acetilirane histone. Protein DPF3b sastavni je dio kompleksa remodeliranja kromatina i sadrži PhD prste koji su odgovorni za regrutiranje kompleksa BAF u acetilirani histon [7].

Histonske modifikacije ne funkcioniraju samo isključivo pružanjem vezujućih platformi za različite faktore. Oni također mogu djelovati tako da ometaju interakciju između histona i kromatinskog faktora. Na primjer, H3K3me3 može spriječiti vezanje NuRD kompleksa na H3 N-terminalni rep. Ovaj jednostavan mehanizam ima smisla jer je NuRD transkripcijski represor, a H3K4me3 je znak aktivne transkripcije. Metilacija H3K4 ometa vezanje PhD prsta DNMT3L na H3 rep. Doista, ova vrlo N-terminalna regija H3 čini se da je važna u regrutiranju ovih tipova interakcija iako regulacija nije isključivo preko modifikacije K4. Na primjer, fosforilacija H3T3 sprječava vezanje INHAT transkripcijskog represorskog kompleksa na H3 repu [7].

5. HISTONSKE MODIFIKACIJE I RAK

Histonske deacetilaze (HDAC) su enzimi uključeni u remodeliranje kromatina i imaju ključnu ulogu u epigenetskoj regulaciji ekspresije gena. Aktivnost ne-histonskih proteina može se regulirati putem HDAC-hipoacetilacije. Posljednjih godina, inhibicija HDAC-ova pojavila se kao potencijalna strategija za epigenetske promjene povezane s rakom. Nekoliko klasa HDAC inhibitora pokazalo je da imaju snažne i specifične anti-tumorske aktivnosti u predkliničkim istraživanjima. Međutim, takva su istraživanja također pokazala da učinci inhibitora HDAC mogu biti znatno širi i složeniji nego što je prvobitno smatrano [13].

Postojeći dokazi upućuju na to da čimbenici okoliša tijekom pred- i postnatalnog razvoja mogu povećati rizik od kroničnih bolesti kao što su rak, dijabetes, kardiovaskularne bolesti, pretilost i poremećaji u ponašanju poput shizofrenije. Također, drugi okolišni faktori kao što su kemijski zagađivači, duhanski dim, alkohol, zračenje, promjene temperature, mogu imati učinak na razvoj, metabolizam i zdravlje. Ti čimbenici okoline mogu prekinuti DNA metilaciju i DNA fragmentaciju. Oštećenje DNA uzrokovano oksidativnim stresom može olakšati nenormalnu globalnu DNA metilaciju [14].

5.1. HDAC inhibitori

Identificirano je nekoliko strukturnih klasa inhibitora HDAC [15]:

- Masne kiselina kratkog lanca (butirati)
- Hidroksamske kiseline (trihostatin A, TSA), Suberoilanilid hidroksamska kiselina (SAHA) i oksamflatin
- Ciklički tetrapeptidi koji sadrže 2-amino-8-okso-9,10-epoksi-dekanoil (AOE) jedinice (trapoksin A)
- Ciklički tetrapeptidi koje ne sadrže AOE jedinice (apicidin)
- Benzamid (MS-27-275)

HDAC inhibitori uvijek inhibiraju proliferaciju transformiranih stanica u kulturi, a jedna podskupina ovih inhibitora je pokazala da inhibira rast tumora u životinjskim modelima. Butirati predstavljaju jedini razred koji je odobren za uporabu u klinici. No, oni nisu idealna

sredstva zbog visokih potrebnih koncentracija za postizanje inhibicije HDAC aktivnosti. TSA, izvorno razvijen kao antifungalno sredstvo, je snažan inhibitor HDAC koji je aktivan u nanomolarnim koncentracijama. Oksamflatin, spoj na bazi hidroksamske kiseline, i benzamid MS.27.275 inhibiraju HDAC aktivnost i mikromolarnim koncentraijama. Apicidin je metabolit gljiva koji pokazuje široki spektar anti-protozoalne aktivnosti i inhibira HDAC u nanomolarnim koncentracijama. Depsipeptid, izoliran iz *Chromobacterium violaceum*, inhibira HDAC aktivnost u mikromolarnim koncentracijama. Trapoksin i depudecin nepovratno se vežu na HDAC i inhibiraju njegovu aktivnost na nanamolarne i mikromolarne koncentracije [15].

5.2. Učinci inhibicije histonskih deacetilaza

HDAC inhibitori mogu utjecati na transkripciju induciranjem acetilacije histona, transkripcijskih faktora i drugih proteina. Eksperimenti s limfnim staničnim linijama tretiranim s TSA, pokazali su da se samo 2% od 340 ispitivanih gena promijenilo, odnosno povećalo ili smanjilo u usporedbi s netretiranim stanicama. Nedavne studije, koje su koristile nizove komplementarnih DNA, pokazale su da je čak 7-10% gena promijenjeno u njihovoj ekspresiji u staničnim linijama leukemije, multiplog mijeloma i karcinoma debelog crijeva, mjehura, uburega, prostate i dojke, uzgojene 48 sati s butiratom, TSA, MS-27-275, depsipeptidom i vorinostatom. Promjena genske ekspresije slična je za različite inhibitore HDAC, ali ipak postoje određene razlike koje nastaju uslijed djelovanja pojedinih agensa u različitim transformiranim stanicama [16].

HDAC inhibitori uzrokuju zaustavljanje staničnog ciklusa u G1 i G2 fazi, apoptozu i diferencijaciju transformiranih stanica u kulturi. Koncentracije inhibitora HDAC koje su potrebne za zaustavljanje staničnog ciklusa koreliraju s koncentracijom potrebnom za acetiliranje histona [17].

Otkriveno je da HDAC inhibitori uništavaju transformirane stanice ili stanice raka. Ovi spojevi također induciraju zaustavljanje rasta stanica i diferencijaciju. Takva svojstva čini ih dobrim kandidatima za ciljane terapije. HDAC inhibitori mogu povećati acetilaciju histona i raznih drugih proteina. Zajedno s histon acetil transferazama reguliraju acetilaciju histona i tako su uključeni u regulaciju transkripcije i diferencijaciju stanice [18].

U potpunosti nije objašnjeno kako HDAC inhibitori postižu svoju učinkovitost, da li putem moduliranja acetilacije histona ili ne-histonskih supstrata. Većina inhibitora HDAC nisu

specifični za enzim, već oni inhibiraju širok raspon različitih HDAC enzima. Nije poznato da li to potiče njihovu učinkovitost ili da li bi bilo terapijski korisno razviti inhibitore sposobne za ciljanje specifičnih HDAC [7].

Rak dojke najčešća je dijagnosticirana maligna bolest i najveći je uzrok smrtnosti od raka u žena. Poznato je da su promjene u post-translacijskim modifikacijama histona i gubitak specifičnih oznaka acetilacije i metilacije histona povezane s rakom dojke. Neravnoteža u omjeru acetilacije/deaacetilacije histona igra važnu ulogu u razvoju raka. HDAC inhibitori su testirani u svim podtipovima karcinoma dojke te su istraživanja potvrdila da ova klasa lijekova može ciljati rak dojke kroz nekoliko različitih pristupa, uključujući olakšanje transkripcijske represije s utjecajem na epitelijalno-mezenhimalni prijelaz (EMT) i reaktivacija utišanog estrogenskog receptora (ER) u hormonkim receptor-negativnim tumorima. Iako HDAC inhibitori nisu pokazali značajnu anti-tumorsku aktivnost kao pojedinačna sredstva u tumoru dojke, obećavajući podaci proizlaze u kombinaciji s drugim anti-tumorskim sredstvima [19,20].

6. ZAKLJUČAK

Histoni su skupina malih baznih proteina na koju je vezana eukariotska DNA. Zbog lizinskih i argininskih ostataka imaju izražena bazična svojstva. Kompleks DNA s proteinima zove se kromatin. Histoni koji čine kromatin su: H2A, H2B, H3, H4 i H1. Histonske modifikacije služe za regulaciju genske ekspresije bez promjene temeljne DNA sekvence. Većina promjena se odvija na amino-terminalnim dijelovima. Modifikacije histona djeluju koordinirano kako bi regulirale stanične procese kao što su transkripcija, replikacija i popravak DNA. One uključuju acetilaciju, metilaciju, ubikvitinaciju, fosforilaciju itd. Takva izmjena ima značajnu ulogu u promjeni strukture kromatina. U ovim modifikacijama također sudjeluju i enzimi kao što su histonske metiltransferaze, acetiltransferaze, kinaze. Svaka modifikacija ima jedinstveni utjecaj na transkripcijsku aktivnost povezanog gena. Histonske modifikacije djeluju putem dva glavna mehanizma. Prvi mehanizam uključuje modifikacije koje izravno utječu na ukupnu strukturu kromatina, bilo na kratkim ili na velikim udaljenostima. Drugi mehanizam uključuje modifikaciju koju regulira (pozitivno ili negativno) vezanje efektorskih molekula. Sama činjenica da su modifikacije histona reverzibilne, otvara mogućnost novom liječenju. Neravnoteža u omjeru acetilacije/deaacetilacije histona igra važnu ulogu u razvoju raka. HDAC inhibitori su novi anti-tumorski agensi koji potiču smrt tumorskih stanica, diferencijaciju i zaustavljanje staničnog ciklusa. Međutim, molekularni procesi na kojima se temelje HDAC inhibitori još nisu posve razjašnjeni.

7. LITERATURA

[1] A. P. Wolffe, M.A. Matzke, *Science* **286** (1999),481-486

[2] L. Vanzan, A. Sklias, Z. Herceg, R. Murr, *Handbook of Epigenetics* (2007), 25-46

[3] L. Verdone, E. Agricola, M.Caserta ,E. Di Mauro, *Brief. Funct. Genomics Proteomics* **5** (2006), 209-221

[4] R.K. Mcginty, S. Tan, *Chem. Rev*. **6 (**2015), 2255-2273

[5] https://www.mun.ca/biology/scarr/Histone_Protein_Structure.html (21.9.2019.)

[6] C.L. Peterson, M. Laniel, *Curr. Biol.* **14** (2004), 546-551

[7] A. J. Bannister, T. Kouzarides, *Cell. Res.* **3** (2011), 381-395

[8] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L.Stryer, *Biokemija,* Školska knjiga, Zagreb, 2013.

[9] E.Verdin, M. Ott, *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio*. **16** (2015), 258-264

[10**]** Z.Herceg, R. Murr, *Mechanisms of histone modifications, Handbook of epigenetics: the new molecular and medical genetics* (Tollefsbol T, ur.), Elsevier, London, 2011, 25-45

[11] S. L. Berger, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12** (2002), 142-148

[12] B. D. Strahl, C. D. Allis, *Nature* **403** (2000),41-45

[13] J. E. Bolden, M. J. Peart, R.W. Johnstone, *Nat. Rev. Drug. Discov*. **5** (2006), 769-784

[14] J.N. Nojadeh, H. Daghghagh, *Asian Pacific Journal of Reproduction* **5** (2016), 10-13

[15] P.A. Marks, V.M. Richon, R.A. Rifkind, *J. Natl. Cancer. I.* **92** (2000), 1210-1216

[16] W.S. Xu, R. B. Parmigiani, P.A. Marks, *Oncogene* **26** (2007), 5541-5552

[17] P. A. Marks, R. A. Rifkind, V. M. Richon, R. Breslow, T. Miller, W. K. Kelly, *Nat. Rev. Cancer*. **1** (2001), 194-202

[18] Y. Shao, Z. Gao, P. A. Marks, X. Jlang, *PNAS* **101** (2004), 18030-18035

[19] N. Aztopal, M. Erkisa, E. Erturk, E. Ulukaya, A. H. Tokullugil, F. Ari, *Chem.-Biol. Interact.* **280** (2018), 51-58

[20] B. Zucchetti, A. K. Shimada, A. Katz, G. Curigliano, *The Breast* **43** (2019), 130-134