

Molekulární a buněčná biologie roztroušené sklerózy

RNDr. Kateřina Klíčová¹, prof. MUDr. Jan Mareš, Ph.D., MBA¹, MUDr. Jiří Bučil²

¹Neurologická klinika FN a LF UP Olomouc

²Affidea Praha, s. r. o.

Roztroušená skleróza je chronické autoimunitní zánětlivé onemocnění centrálního nervového systému s neurodegenerativní komponentou, postihující především mladé dospělé. Jedná se o onemocnění, které je značně heterogenní. Příčiny vzniku jsou multifaktoriální a zahrnují genetickou predispozici spolu s faktory prostředí. Specifické epigenetické modifikace, jako např. methylace DNA, mohou ovlivnit patofyziologii a klíčové aspekty roztroušené sklerózy. Procesy probíhající na molekulární úrovni by mohly být nápomocné k pochopení podstaty onemocnění a k nastavení vhodné léčby pacientů.

Klíčová slova: methylace DNA, epigenetika, roztroušená skleróza, molekulární přístupy k léčbě.

Molecular and cellular biology of multiple sclerosis

Multiple sclerosis is a chronic autoimmune inflammatory disease of the central nervous system with an unclear prognosis, mainly affecting young adults. It is a disease that is highly heterogeneous. The causes are multifactorial and include genetic predisposition along with environmental factors. Specific epigenetic modifications such as DNA methylation can affect the pathophysiology and key aspects of multiple sclerosis. Processes at the molecular level could be helpful in understanding the nature of the disease and setting up appropriate treatment for patients.

Key words: DNA methylation, epigenetics, multiple sclerosis, molecular approaches to treatment.

Úvod

Roztroušená skleróza (RS) je primárně zánětlivá porucha mozku a míchy, při které lokální infiltrace lymfocytů vede k poškození axonů a myelinu. Zpočátku je tato infiltrace přechodná a dochází k remyelinizaci. U pacientů pozorujeme epizody neurologické dysfunkce. Postupně však patologickým změnám dominuje rozšířená mikrogliální aktivace spojená s rozsáhlou a chronickou neurodegenerací, jejímž klinickým korelátem je progresivní akumulace postižení (Compston et Coles, 2008).

Projevy RS mohou být velmi různorodé, závisí na lokalizaci demyelinizačních ložisek. Prvním a zároveň nejčastějším

příznakem je retrobulbární neuritida. Častým počátečním projevem jsou také dysestezie, hypestezie, parestezie. K závažným příznakům patří centrální poruchy hybnosti a mozečkové poruchy. K dalším symptomům patří např. únava, deprese, sexuální dysfunkce, sfinkterické potíže a další (Sládková, 2015).

Prevalence RS ve světě je heterogenní. Podle zprávy Mezinárodní federace RS se globální medián prevalence RS zvýšil z 30/100 000 v roce 2008 na 33/100 000 v roce 2013. V České republice byla v 80. letech udávaná prevalence 71/100 000 obyvatel, v současné době 160/100 000 obyvatel (Vališ et Pavelek, 2015).

Diagnostika RS vyžaduje komplexní přístup. Analýza mozkomíšního moku spolu s hodnocením klinického stavu pacienta a nálezem na magnetické rezonanci (Obr. 1–3) představuje nezbytnou součást diagnostiky RS. Charakteristickým znakem změn specifických pro RS v mozkomíšním moku je analýza oligoklonálních páسů, se kterými se setkáváme u drtivé většiny pacientů (Deisenhammer et al., 2019).

Genetické a environmentální faktory

Etiologie RS zůstává stále nejasná. Předpokládá se, že příčiny vzniku jsou multifaktoriální a zahrnují genetickou predispozici



RNDr. Kateřina Klíčová
Neurologická klinika FN a LF UP Olomouc
katerina.klicova@fnol.cz

Cit. zkr: *Neurol. praxi.* 2023;24(2):140-144

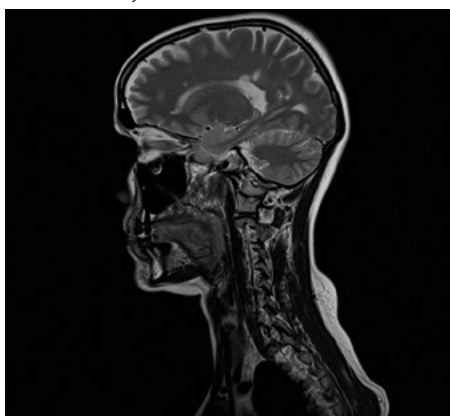
Článek přijat redakcí: 9. 5. 2022

Článek přijat k publikaci: 24. 9. 2022

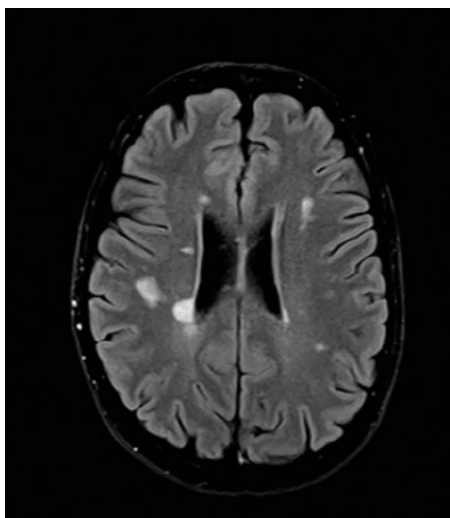
Obr. 1. Mozek RS sagitálně – intramedulární ložiskové léze odpovídající demyelinizaci typu sclerosis multiplex. T2 tse sekvence



Obr. 2. Mozek RS sagitálně – typicky uložené ložisko supratentoriálně, perikalózně – dlouhá osa ložiska je orientovaná kolmo na podélnou osu postranní komory. T2 tse sekvence



Obr. 3. Mozek RS axiálně – typicky distribuovaná ložiska s vysokou intenzitou signálu v bílé hmotě periventrikulárně a subkortikálně. Flair sekvence



spolu s faktory prostředí, jako jsou expozice infekčním agens, nedostatek vitamínu D, kouření (Ghasemi et al., 2017; Pierrot-Deseilligny et Souberbielle, 2017; Arneth, 2020). Odhady založené na genetických a epidemiologických studiích naznačují, že 60–70 % rizika vzniku

RS je přisuzováno genetickým faktorům. Nedávné důkazy naznačují, že relapsy RS jsou indukovány environmentálními a exogenními spouštěči, jako jsou virové infekce (Genc et al., 2018). Specifické epigenetické modifikace mohou ovlivnit patofyziologii a klíčové aspekty RS (Hojati, 2017). Na tomto průsečíku mezi genetickou predispozicí a faktory prostředí mohou změny v metylaci deoxyribonukleových kyselin přispívat k patofyziologii RS (Bjornevik et al., 2022).

Patofyziologický mechanismus roztroušené sklerózy

Autoreaktivní CD4+ T buňky jsou aktivované na periférii buňkami prezentujícími antigen (APC), které prostřednictvím receptoru pro hlavní histokompatibilní komplex (MHC) třídy II produkují aminokyselinu podobnou myelinovým peptidům syntetizovaným v CNS. Na základě této interakce dochází k diferenciaci naivních buněk CD4+T na pomocné buňky CD4+ T (Th). Po aktivaci produkuje Th1 subtyp interferon gama (IFN- γ). IFN- γ je cytokin zodpovědný za nábor CD8+ T buněk, B buněk a monocytů na periférii. Tyto prozánětlivé buňky migrují krevním řečištěm do hematoencefalické bariéry (HEB), kde mohou adherovat na endotel. U pacientů s RS vykazuje HEB aberantní expresi a organizaci těsných endoteliálních spojení, které upřednostňují masivní transport lymfocytů do mozku. Infiltrované CD4+ T buňky v CNS se reaktivují po interakci s rezidentními APC. Reaktivované CD4+ T buňky uvolňují prozánětlivé cytokiny a chemokiny, které způsobí astrogliózu a mikrogliózu. Tento proces se zhoršuje, když infiltrované cytotoxické CD8+ T buňky napadají oligodendrocyty, což vede k jejich destrukci a smrti neuronů. Souběžně plazmatické B buňky produkují protilátky proti vlastním antigenům CNS, což přispívá k poškození myelinové pochvy a demyelinizaci. Plazmatické B buňky v koordinaci s monocyty zvyšují lokální zánětlivou reakci reaktivací autoreaktivních CD4+ T buněk. Axonální poškození zprostředkované T buňkami přispívá k nedostatku metabolické podpory oligodendrocytů a také k nedostatku energie uvolňováním rozpustných zánětlivých molekul. Patofyziologie RS je komplexní proces, který zahrnuje interakci mezi environmentálními

a genetickými faktory regulovanými epigenetickými mechanismy (Celarain et Roig, 2020).

Epigenetika

Epigenetika zahrnuje studium mitoticky a/nebo meioticky dědičných změn v genové funkci, které nelze vysvětlit změnami v sekvenci DNA (Riggs et al., 1996). Novější definice epigenetiky říká, že epigenetický znak je stabilně dědičný fenotyp vyplývající ze změn v chromozomu beze změn v sekvenci DNA. Pochopení mechanismů zapojených do iniciace, udržování a dědičnosti epigenetických stavů je důležitým aspektem výzkumu (Berger et al., 2009). Souhra mezi genetickými faktory a epigenetickými změnami specifickými pro buňky může být velmi důležitá při rozvoji RS (Garcias et al., 2014).

Epigenetika zahrnuje proces, který mění genovou aktivitu. Vede k modifikacím, které lze přenášet do dceřiných buněk, ačkoli některé epigenetické změny lze zvrátit. Hybné síly epigenetických procesů zahrnují činidla, těžké kovy, pesticidy, výfukové plyny, tabákový kouř, polycyklické aromatické uhlovodíky, hormony, radioaktivitu, viry a bakterie. Bylo identifikováno mnoho typů epigenetických procesů např. methylace, acetylace, fosforylace a další. Epigenetické procesy jsou přirozené a nezbytné pro mnoho funkcí organismu, ale pokud k nim dochází nesprávně, mohou nastat závažné nepříznivé účinky na zdraví a chování. Nejznámější epigenetický proces je methylace DNA, při kterém dochází k přidání nebo odstranění methylové skupiny. Methylace DNA byla poprvé potvrzena u pacientů s rakovinou v roce 1983. Od té doby byla pozorována také u dalších onemocnění (Weinhold, 2006). V souvislosti s RS patří methylace DNA k nejintenzivněji studované epigenetické modifikaci. K dalším epigenetickým regulačním mechanismům studovaným v souvislosti s RS patří modifikace histonů a regulace genů zprostředkovaná mikroRNA.

Methylace DNA u roztroušené sklerózy

S DNA metylací se setkáváme především v regulačních a promotorových oblastech,

kde jsou hojně zastoupeny dinukleotidy cytosin-guanin (Weber et al., 2007; Celarain et Roig, 2019). Přesný mechanismus methylylace DNA není zcela objasněn, avšak několik studií uvádí odlišně methylované oblasti v lymfocytech nebo v mononukleárních buňkách periferní krve a v mozkové tkáni *post mortem*. U pacientů s RS byl zjištěn odlišný methylační profil DNA v CD8+ T a CD4+ T buňkách, což zdůrazňuje význam odlišných buněčných podtypů při zkoumání epigenetických změn u RS a dalších komplexních chorob (Celarain et Roig, 2019). Byla také zaznamenána hypermethylylace VDR genu, který kóduje receptor pro vitamin D, jehož nedostatek je považován za jeden z klíčových nedědičných spouštěčů RS (Ayuso et al., 2017).

Změny v methylačním stavu určitých genů způsobují chromozomální abnormality a poškození DNA. Hlubší pochopení základních fyziologických mechanismů zprostředkovaných DNA methylyací přispěje k rozvoji nových strategií v prognóze a léčbě RS.

Modifikace histonů u roztroušené sklerózy

Histony patří mezi nejvíce konzervované proteiny, které spolu s DNA tvoří nukleozom. Nejrozmanitější epigenetické modifikace se nachází právě na histonových proteinech. K nejrozšířenějším modifikacím histonů patří acetylace a methylylace. Narušení transkripční rovnováhy může podpořit dysregulaci imunitního systému a neurodegeneraci. Experimenty na zvířecích modelech ukazují, že záměrné epigenetické přeprogramování pro správné fungování oligodendrocytů, imunitních buněk a neuronů může být potenciální terapeutickou strategií pro RS (Chan, 2020).

mikroRNA a roztroušená skleróza

mikroRNA (miRNA) se skládá z krátkých nekódujících jednořetězcových molekul (21–25 nukleotidů), které se podílejí na regulaci genové exprese především na posttranskripční úrovni. miRNA se podílí na proliferaci, diferenciaci a apoptóze různých buněk v celém těle, hraje důležitou roli ve vývoji a regulaci imunitního systému. Studie naznačují, že dysfunkce miRNA se podílí na patologii RS. miRNA se nachází také v plazmě, séru a CSF

(Gao et al., 2021). miRNA je atraktivním kandidátem jak pro farmakologickou intervenci, tak i jako biomarker onemocnění.

miR-155 je miRNA nezbytná pro normální funkci imunitního systému. Cílená delece genu u myši vedla ke snížení diferenciaci Th1 a Th17 buněk jak v CNS, tak i v periferních lymfoidních orgánech. miR-150 se podílí na regulaci exprese transkripčního faktoru c-Myb, který reguluje vývoj B buněk. Snížení exprese c-Myb mělo za následek snížení zrání B buněk. Důležitá je také role miRNA v regulaci samotné myelinizace. Studie na myších prokázaly, že nadměrná exprese miR-23a způsobuje zvýšenou tloušťku myelinu, což svědčí o tom, že miR-23a zvyšuje jak diferenciaci oligodendrocytů, tak i syntézu myelinu (Murugaiyan et al., 2011; Lin et al., 2013; Mycko et Branzini, 2020).

Mitochondrie a roztroušená skleróza

Mutace mitochondriální DNA (mtDNA) a jaderné DNA může zvýšit riziko rozvoje RS. Důsledkem jsou změny v expresi několika proteinů, které jsou zapojeny do regulace oxidačního stresu. Kromě toho jsou léze RS charakterizovány oxidačním poškozením, pravděpodobně kvůli dysregulaci proteinů zapojených do produkce a detoxikace reaktivních forem kyslíku (ROS). Manipulace s Ca^{2+} je důležitá pro správnou funkci mitochondrií a regulaci apoptózy. Nadměrná expozice prozánětlivých cytokinů u RS může změnit homeostázu Ca^{2+} a blokování diferenciaci oligodendrocytů (Patergnani et al., 2017).

Specifické znaky mitochondriálních abnormalit během vývoje a progresu RS

- Změny v mtDNA, abnormální funkce mitochondriálních proteinů
- Zvýšená tvorba volných radikálů a oxidační poškození
- Buněčná iontová nerovnováha
- Apoptóza
- Mechanismy buněčné clearance

Molekulární a buněčné přístupy k léčbě

Buněčná substituční terapie představuje léčebnou možnost, jejímž cílem je překonat

ztrátu neuronů, selhání remyelinizace a zvýšit kapacitu endogenní opravy myelinu (Genc et al., 2019). Značný zájem, jako nové terapeutické strategie pro imunitní modulace, neuroprotektce a opravy poškozeného CNS u RS, vyvolává transplantace kmenových buněk, farmakologická manipulace endogenních kmenových buněk nebo transplantace progenitorových buněk oligodendrocytů (Scolding et al., 2017).

Ve studii Petrou et al. zkoumali optimální způsob podání a klinickou účinnost transplantace mezenchymálních kmenových buněk (MSC) u pacientů s aktivní a progresivní RS. Autologní MSC byly pacientům podávány intratekálně nebo intravenózně. Léčba byla dobře tolerována a vyvolala krátkodobé příznivé účinky zejména u pacientů s aktivním onemocněním. Intratekální podání bylo v několika parametrech účinnější (Petrou et al., 2020).

Transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSCT) představuje potenciálně užitečný přístup ke zpomalení nebo prevenci invalidity u pacientů s relaps-remitentní RS (RRRS). Ve studii Burt et al. porovnávali vliv nemyeloablativních HSCT a chorobu modifikující terapii (DMT) na progresi onemocnění. U pacientů s RRRS vedla nemyeloablativní HSCT ve srovnání s DMT k prodloužení doby do progresu onemocnění (Burnt et al., 2019).

Každý z těchto nových léčebných přístupů má své potenciální výhody, ale na straně druhé jsou zde také bezpečnostní obavy a nevyřešené otázky. Klinické studie v oblasti buněčných terapií mají také své metodologické a etické problémy. V tomto ohledu je zapotřebí dalšího výzkumu.

Závěr

Roztroušená skleróza patří i přes významný vědecký pokrok k nevyléčitelným onemocněním. V současné době je již možné výrazně snížit aktivitu a zpomalit progresi neurologického deficitu. Pochopení mechanismů podílejících se na vzniku nemoci může být zásadní. Stále více důkazů naznačuje, že epigenetické modifikace mohou být klíčem k vysvětlení dědičnosti RS. Nové vědecké poznatky v oblasti patogeneze jsou důležité pro vznik nových terapeutických přístupů.

INZERCE

LITERATURA

1. Arneth B. Multiple Sclerosis and Smoking. *Am J Med.* 2020; 133(7):783-788.
2. Ayuso T, Aznar P, Soriano L, et al. Vitamin D receptor gene is epigenetically altered and transcriptionally up-regulated in multiple sclerosis. *PLoS One.* 2017;12(3):e0174726.
3. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* 2009;23: 781-783.
4. Bjornevik K, Cortese M, Healy B, et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science.* 2022;375(6578):296-301.
5. Burt RK, Balabanov R, Burman J, et al. Effect of nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation vs continued disease-modifying therapy on disease progression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2019;321(2):165-174.
6. Celarain N, Roig TJ. Changes in Deoxyribonucleic Acid Methylation Contribute to the Pathophysiology of Multiple Sclerosis. *Front Genet.* 2019;10:1138.
7. Celarain N, Roig TJ. Aberrant DNA methylation profile exacerbates inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis patients. *J Neuroinflammation.* 2020;17(1):21.
8. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet.* 2008;72(9648):1502-17.
9. Deisenhammer F, Zetterberg H, Fitzner B, Zettl UK. The Cerebrospinal Fluid in Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2019;10:726.
10. Gao Y, Han D, Feng J. MicroRNA in multiple sclerosis. *Clin Chim Acta.* 2021;516:92-99.
11. Garcias M, Casaccia P. Epigenetic mechanism in multiple sclerosis. *Rev Esp Escler Mult.* 2014;6(29):25-35.
12. Genc B, Bozan HR, Genc S, Genc K. Stem cell therapy for multiple sclerosis. *Adv Exp Med Biol.* 2019;145-174.
13. Ghasemi N, Ravazi S, Nikzad E. Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. *Cell J.* 2017;19(1):1-10.
14. Hojati Z. Molecular Genetic and Epigenetic Basic of Multiple Sclerosis. *Adv Exp Med Biol.* 2017;958:65-90.
15. Chan VS. Epigenetics in Multiple sclerosis. *Adv Exp Med Biol.* 2020; 253:309-374.
16. Leray E, Moreau T, Fromont A, Edan G. Epidemiology of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris).* 2016;172(1):3-13.
17. Lin ST, Huang Y, Zhang L, et al. MicroRNA-23a promotes myelination in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(43):17468-73.
18. Murugaiyan G, Beynon V, Mittal A, et al. Silencing microRNA-155 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2011;187(5):2213-21.
19. Mycko MP, Branzini SE. microRNA and exosome profiling in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2020;26(5):599-604.
20. Patergnani S, Fossati V, Bonora M, et al. Mitochondria in Multiple Sclerosis: Molecular Mechanisms of Pathogenesis. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2017;328:49-103.
21. Petrou P, Kassis I, Levin N, et al. Beneficial effect of autologous mesenchymal stem cell transplantation in active progressive multiple sclerosis. *Brain.* 2020; 143(12):3574-3588.
22. Pierrot-Deseilligny Ch, Souberbielle JC. Vitamin D and multiple sclerosis: An update. *Mult Scler Relat Disord.* 2017;14:35-45.
23. Riggs AD, Martienssen RA, Russo VEA. *Introduction.* In Epigenetic mechanisms of gene regulation (ed. Russo VEA, et al.), pp. 1-4. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
24. Scolding NJ, Pasquini M, Reingold SC, Cohen JA. Cell-based therapeutic strategies for multiple sclerosis. *Brain.* 2017;140(11):2776-2796.
25. Sládková V. Diagnostika roztroušené sklerózy, typické klinické příznaky. *Med. praxi.* 2015;12(5):236-242.
26. Vališ M, Pavelek Z. Základní diagnostika a léčba roztroušené sklerózy. *Med. praxi.* 2015;12(2):77-82.
27. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet.* 2007;39(4): 457-66.
28. Weinhold B. Epigenetics: the science of change. *Environ Health Perspect.* 2006;114(3):A160-7.