

9. Meccanismi epigenetici nella dipendenza alle sostanze d'abuso

Gaetano Di Chiara¹

¹ Dipartimento di Tossicologia dell'Università degli Studi di Cagliari

Introduzione

L'esposizione ripetuta degli animali di laboratorio alle sostanze e ai farmaci d'abuso è in grado di produrre modificazioni a lungo termine della morfologia, della biochimica e della funzionalità di specifici sistemi neuronali del sistema nervoso centrale, alle quali si associano altrettante modificazioni a lungo termine degli effetti comportamentali delle sostanze stesse (Robinson et al., 2004). Queste osservazioni sperimentali sono alla base dell'ipotesi che la dipendenza da farmaci e sostanze sia il risultato di modificazioni a lungo termine, eventualmente irreversibili, dell'espressione di proteine che mediano la trasmissione dell'informazione tra i neuroni, dovute ad un'azione degli stessi farmaci sulla trascrizione dell'informazione genica (Nestler, 2004). Modificazioni di questo tipo a carico dei sistemi neuronali che presiedono al comportamento motivato sarebbero quindi il substrato neurobiologico dei disturbi sia fisici che psicologici della dipendenza.

Attivazione trascrizionale e farmaci d'abuso

L'esposizione ai farmaci ed alle sostanze d'abuso attiva la trascrizione e l'espressione di vari geni in aree specifiche del SNC. Dopo somministrazione acuta di cocaina si attivano una serie di geni immediati precoci (IEG), come il CREB, il c-fos, il fos-B, il delta fos-B, l'ATF2, l'ATF3 e l'ATF4, lo zif ecc. che codificano per altrettanti fattori di trascrizione. La somministrazione di questi farmaci modifica lo stato trascrizionale della cromatina e la risposta genica ad un successivo trattamento così che l'espressione di alcuni geni è sensibilizzata (primed) mentre quella di altri geni è desensibilizzata.

Altri geni si attivano invece solo dopo trattamento ripetuto e la loro espressione può aumentare ulteriormente dopo che l'esposizione al farmaco è termi-

nata. Questo è il caso del CDK5 (cyclin dependent kinase 5), di varie subunità dell'NFκB (nuclear factor κB), della SIRT2 (sirtuina 2), della PSD-95 (proteina della densità postsinaptica di 95 kDa) e del BDNF (brain-derived neurotrophic factor).

Le caratteristiche temporali di queste modificazioni neuroadattative e in particolare la loro lunga durata, se non, in certi casi, la loro irreversibilità, suggeriscono che alla base di esse vi siano meccanismi di natura epigenetica.

Definizione di epigenetica

Storicamente il termine 'epigenetico' è stato riferito ad un fenotipo trasmissibile alla progenie e codificato da un meccanismo cellulare 'al di fuori' (epi) del genoma (High, 2004). Più recentemente il termine 'epigenetico' viene riferito a caratteri, sia ereditabili che non ereditabili, non codificati dalla sequenza del DNA (Allis et al., 2007). Quest'ultima definizione dei caratteri epigenetici come indipendenti dal DNA e non necessariamente ereditabili, è stata adottata dal National Institutes of Health (NHI Road Map for medical research, 2009) ed è quella correntemente utilizzata in neurobiologia. L'epigenetica studia quindi i processi attraverso i quali stimoli ambientali, tra cui l'esposizione a farmaci e sostanze d'abuso, modifica l'espressione genica agendo su meccanismi che non comportano una alterazione della sequenza delle basi del DNA.

Meccanismi epigenetici

Attualmente si distinguono quattro principali meccanismi epigenetici:

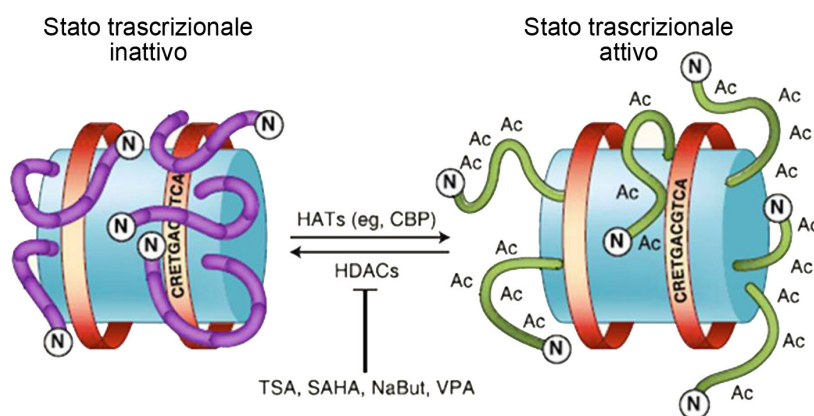
1. metilazione del DNA,
2. modificazione e rimodellamento della cromatina,
3. RNA non codificanti (es. microRNA),
4. editazione dell'RNA e ricodificazione del DNA.

La regolazione epigenetica dell'espressione genica attraverso un'alterazione dell'interazione tra il DNA e la cromatina può avvenire attraverso tre meccanismi: modificazione e rimodellamento della cromatina, introduzione di varianti istoniche e metilazione del DNA.

Questa rassegna si occuperà esclusivamente dei meccanismi di modificazione della cromatina coinvolti negli effetti delle sostanze d'abuso.

La cromatina (Figura 1), è formata da una serie di nucleosomi, formati ciascuno da una catena di DNA costituita da 147 paia di basi legate con legami a idrogeno a un ottamero costituito da 4 coppie di istoni (H2A, H2B, H3 e H4). La doppia elica del DNA, costituisce quindi il filo che unisce in serie i nucleosomi a formare la cromatina. L'unione tra il DNA e gli istoni del nucleosoma costituisce un impedimento alla trascrizione, mentre il distacco e successivo svolgimento della catena del DNA dal nucleosoma ne promuove la trascrizione.

Figura 1 - L'istone acetiltransferasi (HATs) e l'istone deacetiltransferasi (HDACs) hanno attività opposta. I nucleosomi (cilindri azzurri) sono costituiti da ottameri di istoni che sono coinvolti nel legame al DNA. Le code degli istoni N-terminali, mostrate in viola (nucleosoma a sinistra) o in verde (nucleosoma a destra), contengono residui che interagiscono con il DNA genomico. Nello stato trascrizionale silente (nucleosoma sinistro), i residui di lisina carichi positivamente interagiscono con i gruppi fosfato del DNA carichi negativamente, mentre nello stato trascrizionale attivo (nucleosoma destro), i residui di lisina sono modificati dai gruppi acetilici che neutralizzano la carica positiva della lisina. I coattuatori trascrizionali, come la proteina CBP (cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein) sono istoni acetiltransferasici che acetilano i residui di lisina nelle code N-terminali degli istoni. Questo stato acetilato si correla con l'attivazione trascrizionale. L'attività opposta è svolta da HDACs, che rimuove i gruppi acetilici dai residui di lisina, che si correla con il silenziamento trascrizionale. Gli inibitori competitivi di HDACs (come la tricostatina A [TSA], l'acido idrossamico suberoililide [SAHA], il sodio butirato [NaBut] e l'acido valproico [VPA]) interagiscono direttamente e prevengono la deacetilazione delle lisine da parte di HDACs, inducendo quindi uno stato iperacetilato e trascrizionalmente attivo (Mc Kuown e Wood, 2010).



La modificazione della cromatina avviene a carico della porzione N-terminale degli istoni, i cui residui di lisina carichi positivamente interagiscono, nella condizione trascrizionalmente silente, con le basi del DNA cariche negativamente. I terminali aminici degli istoni possono essere il sito di varie modificazioni post-traduzionali, dovute a reazioni enzimatiche di acetilazione, metilazione e fosforilazione e relative reazioni inverse, condotte da altrettante acetiltrasferasi e deacetilasi, metiltrasferasi e demetilasi, kinasi e fostatasi. L'acetilazione degli istoni fa sì che i residui di lisina acetilati perdano la carica positiva e si stacchino dai residui delle basi del DNA, così da far assumere al nucleosoma la conformazione trascrizionalmente attiva o aperta, esponendo il DNA ai fattori di trascrizione. La metilazione degli istoni può, a seconda del tipo di istone che viene metilato, attivare o inibire la trascrizione. La metilazione del DNA, invece, ha l'effetto di sfavorire la trascrizione, chiudendo in maniera irreversibile l'accesso del DNA ai fattori di trascrizione. Le modificazioni post-traduzionali degli istoni servono quindi a regolare attacco dei fattori di trascrizione ai promotori (Borrelli et al., 2008).

La combinazione di una serie di specifiche modificazioni degli istoni costituisce un vero e proprio codice epigenetico, parallelo a quello genetico depositato nel DNA, ma che, a differenza di quest'ultimo, è provvisto di ampie, anche se non illimitate, capacità di cambiamento. Si ritiene infatti che le modificazioni epigenetiche della cromatina facciano parte di un processo il cui stadio finale è la metilazione del DNA, alla quale corrisponde uno stato

irreversibilmente chiuso ai fattori di trascrizione (Borrelli et al., 2008). Il rimodellamento della cromatina è il risultato dell'azione di enzimi ATP-dipendenti che ristrutturano, mobilizzano e rimuovono i nucleosomi, regolando così l'accesso dei fattori di trascrizione al DNA genomico. La Tabella 1 indica i substrati, le reazioni e gli enzimi, ed i relativi effetti sulla trascrizione, coinvolti nel processo di modificazione della cromatina. Un aspetto importante è il fatto che gli enzimi implicati non agiscono solo sugli istoni ma su molti altri substrati e quindi non si limitano ad influenzare la trascrizione ma hanno effetti molto più globali sulle funzioni del neurone.

Tabella 1 - Le principali modificazioni della cromatina. Modificata da LePlane e Nestler (2010).

Modificazioni degli istoni	Effetto sull'espressione genica	Trascrittori (addizione enzimatica)	Soppressori (sottrazione enzimatica)
Fosforilazione		Chinasi	Fosfatasi
H3pS10	↑	AURKB, <i>MSK1</i>	PP1, <i>DARPP32</i> (indirettamente per regolazione PP1)
Acetilazione		KATs	HDACs (1-11), <i>HDAC4,5,9</i>
H3K9ac	↑	2a (GCN5), 2b, 12	"
H3K14ac	↑	2°-b, 3° (<i>CBP</i>), b3 (p300), 6a, 6b	"
H3K16ac	↑	5.8	<i>Sirt2</i>
Metilazione in lisina		KMTs	KDMs
H3K4me3	↑	2a-h, 7	1,2a,5a-d
H3K9me1/2/3	↑ (me1); ↓ (me2/3)	1a-f (1c- <i>G9a/EHMT2</i>), 8	1,3a-b,4a-d
H3K27me3	↓	6	6a-b
H3K36me3	↑	3°-c	2a-b,4a-c
H3K79me3	↑	4	?
Metilazione in arginina	?	PRMTs	JMJD6
Ubiquitinazione	↑	Ub ligasi (RING2)	Ub proteasi (USP16)
Sumoilazione	↑	SUMO E2s/E3s? (UBC9)	SUMO proteasi (SUSP17)
Metilazione del DNA		DNMT1, <i>DNMT3</i> , DNMT3b	Gadd45a,b,g ?

Modificazioni degli istoni, effetti sulla trascrizione ed enzimi che facilitano la trascrizione (addizione enzimatica) o la sopprimono (sottrazione enzimatica). ↑ = aumentata trascrizione; ↓ = diminuita trascrizione; *Blu* = enzimi per i quali è stata identificata una regolazione biochimica indotta da cocaina e suo significato comportamentale.

Ruolo dell'epigenetica nelle modificazioni neuroadattative indotte dalla esposizione alle sostanze d'abuso.

Gli studi esistenti sul ruolo dei meccanismi epigenetici nella dipendenza da sostanze sono per il momento limitati agli effetti della cocaina nel ratto e nel topo. I modelli sperimentali utilizzati consistono nella somministrazione passiva del farmaco secondo una schedula capace di indurre sensibilizzazione comportamentale, come correlato della capacità di indurre modificazioni a lungo termine dell'espressione genica (Levine et al., 2005; Romieu et al., 2008; Sanchis-Segura et al., 2009). Un altro modello utilizzato in questi studi è la capacità della cocaina di indurre preferenza spaziale per un contesto associato all'effetto del farmaco (Kumar et al., 2005; Renthall et al., 2007; Malvaez et al., 2010). In ambedue questi paradigmi, l'esposizione al farmaco avviene in maniera non-contingente alla risposta del soggetto, una modalità che non corrisponde a quella umana, che è volontaria e quindi contingente alla risposta del soggetto. In alcuni studi è stata utilizzata l'auto-somministrazione endovenosa di cocaina, un modello delle proprietà di rinforzo del farmaco (Romieu et al., 2008; Tarakhovsky et al., 2010).

Vari studi biochimici di natura correlativa suggeriscono un coinvolgimento di meccanismi epigenetici nell'effetto della cocaina. Così, Kumar (Kumar et al., 2005) ha riportato che una singola somministrazione di cocaina è in grado di aumentare nel giro di 30 min. i livelli di istone H4 acetilato (acH4) e di istone H3 fosfo-acetilato (pacH3) nel nucleo accumbens (NAc) del ratto. Inoltre, l'autosomministrazione di cocaina nel ratto aumentava i livelli di acH3 e di acH4 nella shell ma non nel core del NAc ma solo i livelli di acH3 erano correlati alla motivazione ad assumere la cocaina, espressa dal massimo rapporto tra numero di risposte per dose unitaria autosomministrata che il soggetto era in grado di raggiungere (breaking point) in un paradigma nel quale questo rapporto veniva progressivamente aumentato (progressive ratio) (Wang et al., 2010).

Viceversa, la ripetuta esposizione alla cocaina riduceva la dimetilazione dell'istone H3 a livello della lisina in 9 (H3K9me2). Dato che la metilazione di H3, al contrario dell'acetilazione, ha un'azione repressiva sulla trascrizione, l'azione combinata di un aumento dell'acetilazione e di una diminuzione della metilazione dell'istone H3 fa sì che l'esposizione ripetuta alla cocaina induca un aumento globale della trascrizione nel NAc (Maze et al., 2010).

In accordo con queste alterazioni di natura epigenetica, la cocaina modula l'espressione di enzimi che catalizzano modificazioni post-traduzionali della cromatina in una maniera consistente con le modificazioni osservate. Così, dopo esposizione cronica ma non acuta alla cocaina, la deacetilasi HDAC5 viene estrusa dal nucleo nei neuroni del NAc (Romieu et al., 2005; Renthall et al., 2007) e questo sposta a favore della acetilazione l'equilibrio acetilasi/deacetilasi degli istoni. Viceversa, la chinasi MSK1 e la DARPP-32, un inibitore della proteinfosfatasi 1, vengono trasferite al nucleo così da aumentare la fosforilazione dell'istone H3 sulla serina in 10 (H3pS10) (Brami-Cherrier et al., 2005; Stipanovich et al., 2008). Quanto all'aumento dell'istone H3 dimetilato, questa appare mediata da una repressione della trascrizione della metiltrasferasi (G9a) che catalizza la dimetilazione in lisina 9 dell'istone H3 (Maze et al., 2010). L'esposizione cronica alla cocaina induce nel NAc l'espressione de novo di una DNA metiltrasferasi, la DNMT3a, mentre non modifica quella di altre DNA-metiltrasferasi (Maze et al., 2010).

In sintesi, l'esposizione cronica alla cocaina produce nei neuroni del NAc una modificazione globale della cromatina favorevole alla trascrizione attra-

verso un aumento dell'acetilazione (acH3, acH4) e della fosfoacetilazione (pach3) ed una diminuzione della metilazione (H3K9me2) di specifici istoni attraverso la regolazione dell'espressione di enzimi che facilitano (MSK1, DARPP-32, CBP) o reprimono la trascrizione (HDAC5, G9a, Dnmt3a) (Tarakovsky et al., 2010).

Relazione tra modificazioni della cromatina ed espressione di geni specifici

Un'osservazione inattesa dello studio delle modificazioni post-traduzionali (PTM) della cromatina indotte dall'esposizione ripetuta alla cocaina è la loro ampiezza e pervasività, che è tale da produrre una globale modificazione dello stato di acetilazione e metilazione degli istoni dimostrabile con tecniche semplici e grossolane come l'immunoistochimica ed il Western blotting. Questo effetto globale contrasta però con il numero relativamente ridotto (un centinaio circa) dei geni la cui espressione è effettivamente modificata in seguito a esposizione acuta o cronica alla cocaina. Ciò significa che le PTM a carico della cromatina indotte dall'esposizione alla cocaina solo in parte si traducono in una effettiva modificazione della trascrizione e dell'espressione genica. Alla luce di queste osservazioni si pone il problema di conoscere quali sono le condizioni che fanno sì che una PTM della cromatina si traduca in una modificazione dell'espressione genica. Allo scopo di affrontare questo problema è necessario disporre di una tecnica che consenta di stabilire quale sia la porzione del DNA che contrae rapporto con le porzioni di cromatina che sono sede delle PTM indotte dalla esposizione alla cocaina. Dato che l'espressione genica è il risultato di un processo di trascrizione, il quale, a sua volta, è iniziato ed orchestrato da una porzione di DNA, il promotore, che si trova a monte della sequenza di basi che codifica per la sequenza aminoacidica della proteina, è ragionevole assumere che le PTM della cromatina modifichino l'espressione di un determinato gene attraverso un'interazione con il suo promotore. Lo studio della relazione tra PTM della cromatina e trascrizione di specifici geni è quindi, essenzialmente, lo studio della relazione tra promotori di specifici geni e PTM.

La tecnica utilizzata per investigare questo fondamentale aspetto è quella del CHIP-chip. Questa tecnica consiste nello stabilizzare il complesso DNA/istoni attraverso una leggera fissazione in formalina seguita dalla riduzione della cromatina in frammenti di circa 500 paia di basi attraverso la sonificazione e successiva immuno-precipitazione dei frammenti attraverso anticorpi specifici capaci di riconoscere gli istoni modificati. Quindi, dai frammenti di cromatina immuno-precipitati si ottengono i corrispondenti frammenti di DNA per separazione dagli istoni ai quali erano legati. Infine, i frammenti di DNA purificati vengono analizzati allo scopo di stabilire con quali sequenze di basi del DNA in rapporto a specifici geni sono associati gli istoni modificati (Renthal et al., 2008).

Questi studi hanno dimostrato che le sequenze del DNA alle quali si legano gli istoni sono diverse per ciascuna modificazione. Mentre gli istoni acetilati acH3 e acH4 si legano entro le 500 paia di basi (bp) che precedono l'inizio del sito di trascrizione di ciascun gene (TTS), gli istoni metilati meH3 hanno due picchi intorno a -1500 e a + 400 bp rispetto al TTS.

Un'osservazione generale di questi studi è che dopo esposizione ripetuta alla cocaina i geni i cui promotori sono associati a modificazioni epigenetiche

della cromatina sono circa 1000 nel caso dell'acetilazione e 900 nel caso della metilazione. Questo contrasta con il fatto che il numero di geni la cui trascrizione è effettivamente modificata dall'esposizione cronica alla cocaina è intorno a 100, un ordine di grandezza inferiore al numero di geni a cui corrispondono le modificazioni epigenetiche della cromatina indotte dall'esposizione alla cocaina. Questa osservazione è stata interpretata nel senso che le modificazioni epigenetiche della cromatina non influenzano direttamente la trascrizione ma condizionano l'effetto (priming, desensitizzazione) di stimoli, come la stessa cocaina, altre sostanze d'abuso, stimoli stressanti, stimoli condizionati alla cocaina ecc., capaci di influenzare la trascrizione.

Meccanismi epigenetici e sensitizzazione genica (priming)

L'esposizione cronica ai farmaci d'abuso può sensitizzare (prime) la trascrizione genica in risposta ad una successiva esposizione agli stessi o ad altri farmaci d'abuso.

Vari geni sono sovraregolati (aumentata espressione del corrispondente RNAm) dopo esposizione cronica, ma non acuta, alla cocaina. Dei promotori di alcuni di questi geni, e in particolare di quelli che codificano per il BDNF, il CDK5, l'NFκB ed il SIRT2, sono state studiate le modificazioni della cromatina corrispondente attraverso il metodo dell'immunoprecipitazione associata all'analisi genomica con microchips (Kumar et al., 2005; Wang et al., 2010; Renthal et al., 2009; Russo et al., 2009). L'aspetto particolarmente suggestivo di questi studi è che gli effetti dell'esposizione cronica alla cocaina sull'espressione genica precedono le modificazioni della cromatina e, nel caso di certi geni, permangono anche quando la loro espressione è tornata ai livelli di base. Le modificazioni epigenetiche indotte dall'esposizione cronica alla cocaina sono caratterizzate da un aumento dell'acetilazione e da una riduzione della metilazione degli istoni H3, modificazioni tipiche di uno stato di facilitazione della trascrizione. Associata a queste modificazioni è un'aumentata espressione di geni 'cronici' come il delta fosB. Queste modificazioni potrebbero essere il substrato di una sensitizzazione (priming) che modifica l'espressione genica in risposta a stimoli acuti come la successiva esposizione agli stessi farmaci o a stimoli ad essi condizionati o a stress.

Meccanismi epigenetici e desensitizzazione genica

Un'altra modificazione indotta dall'esposizione ai farmaci d'abuso è la desensitizzazione dell'espressione di specifici geni in risposta allo stesso farmaco o ad altri farmaci d'abuso. Questo è il caso del gene c-fos, la cui espressione nelle aree terminali del sistema dopaminergico va incontro a desensitizzazione anche dopo una singola esposizione al farmaco.

In questo caso si osserva una acetilazione degli istoni H4 (acH4) associati al promotore del gene c-fos, che accompagna l'aumentata espressione del mRNA per il c-fos, a sua volta preceduta da una fosfoacetilazione degli istoni H3 (pacH3). Al contrario delle modificazioni che si osservano dopo somministrazione acuta di cocaina, compatibili con un aumento della trascrizione, le modificazioni della cromatina a livello del promotore del c-fos indotte dalla somministrazione ripetuta di cocaina sono caratterizzate da una repressione

dell'espressione conseguente alla riduzione dell'acetilazione degli istoni H3, per induzione dell'espressione della deacetilasi HDAC1, e da un aumento della metilazione degli istoni H3 (H3K9me2) per induzione dell'enzima metilante G9A (Tarakhovsky et al., 2010).

Interazione tra fattori di trascrizione e modificazioni epigenetiche

La trascrizione è il risultato di un processo coordinato nel quale i fattori di trascrizione non solo agiscono direttamente sul gene legandosi al suo promotore, la cui sequenza è localizzata a monte di quella che codifica per la sequenza aminoacidica, ma anche reclutando una serie di fattori enzimatici che regolano la trascrizione indirettamente attraverso una modificazione della cromatina. Per esempio, il CREB fosforilato, che si forma in seguito alla stimolazione dei recettori D1 da parte della dopamina liberata dagli psicotrofici, dopo essersi legato al promotore di un gene (es. c-fos) recluta la proteina legante il CREB, una potente acetiltransferasi degli istoni (CBP), che, acetilando la cromatina, facilita la trascrizione dello stesso gene.

Il delta FosB, un fattore di trascrizione estremamente stabile, che si forma dopo esposizione acuta alla cocaina e che permane a lungo all'interno dei neuroni, è in grado di legarsi sia a promotori implicati nel "condizionamento" (priming) che a promotori implicati nella desensitizzazione genica.

Per esempio, nel priming il deltaFosB si lega al promotore del gene regolato e recluta il BRG1, un attivatore trascrizionale, che promuove il rimodellamento del DNA in una conformazione che facilita la trascrizione da parte della cocaina. Nella desensitizzazione invece il deltaFosB recluta enzimi metilanti, come il G9A e deacetilanti, come l'HDAC1, contribuendo così alla repressione genica che sta alla base della desensitizzazione del c-fos che si osserva dopo esposizione ripetuta alla cocaina.

Studi sperimentali

Allo scopo di stabilire il contributo delle modificazioni della cromatina agli effetti comportamentali della cocaina ed in particolare alle sue proprietà gratificanti e di rinforzo, è necessario passare da un approccio di ricerca di tipo correlativo ad uno di tipo sperimentale. Questo approccio comporta la manipolazione degli stessi meccanismi di modificazione della cromatina associati all'esposizione alla cocaina attraverso la somministrazione di farmaci bloccanti gli enzimi che catalizzano l'acetilazione e la metilazione o la deacetilazione e la demetilazione o che agiscono sugli attivatori trascrizionali o, alternativamente, la manipolazione dell'espressione, la delezione o la mutazione dei geni che li codificano o li promuovono (Borrelli et al., 2008). I risultati di questi studi (Tabella 2) non sono univoci, dato che l'effetto sulle proprietà comportamentali della cocaina dipende dall'enzima specifico oggetto della manipolazione piuttosto che dalla reazione enzimatica implicata o dall'effetto globale sulla trascrizione. Per esempio, mentre il blocco farmacologico dell'istone deacetilasi di classe I e II (HDAC1 e 2) aumenta la proprietà della cocaina di indurre condizionamento spaziale, il blocco della siruina, un istone deacetilasi di classe III, produce l'effetto opposto.

D'altra parte, il blocco della fosforilazione dell'istone H3 produce effetti op-

posti sulle proprietà gratificanti della cocaina a seconda che sia ottenuta attraverso la delezione di una kinasi (MSK1) o la mutazione del gene per la DARPP32, che ne impedisce l'attivazione ad inibitore della fosfatasi. Queste apparenti discrepanze si possono giustificare se si considera che questi enzimi sono attivi su molti altri substrati oltre che sugli istoni H3.

Altre osservazioni non sono però facilmente conciliabili. Per esempio (Tabella 2), l'inibizione delle deacetilasi degli istoni con tricostatina A, mentre aumenta la sensibilità alle proprietà gratificanti della cocaina, valutate attraverso un paradigma di condizionamento spaziale, ne diminuisce le proprietà di rinforzo in un paradigma di autosomministrazione endovenosa, riducendo la risposta operante quando il blocco dell'acetilasi avviene in fase di acquisizione e aumentandola quando il blocco avviene in fase di mantenimento, cioè, una volta che l'acquisizione è avvenuta. Dato che l'autosomministrazione di cocaina è associata ad un aumento dell'acetilazione degli istoni nelle aree terminali del sistema mesolimbico (nucleo accumbens), il fatto che tale modificazione determini una riduzione delle proprietà di rinforzo della cocaina suggerisce che essa sia l'effetto, piuttosto che la causa, delle proprietà di rinforzo della cocaina stessa. In pratica, l'aumento dell'acetilazione degli istoni avrebbe il significato di meccanismo adattativo volto a contrastare le proprietà di rinforzo della cocaina.

Ma le inconsistenze non si fermano qui. Il CREB viene attivato nel citoplasma attraverso la sua fosforilazione da parte della protein-kinasi A e viene quindi traslocato nel nucleo dove agisce come fattore di trascrizione. La cocaina aumenta la dopamina e in questo modo non solo stimola la fosforilazione di CREB da parte della protein-kinasi A ma aumenta anche l'espressione di CREB². Come indicato in Tabella 3, l'iper-espressione di CREB nel nucleo accumbens del ratto, attraverso l'infusione locale di herpes virus geneticamente modificati, aumenta la formazione di fosfo-CREB ma diminuisce le proprietà gratificanti della cocaina, mentre l'infusione nell'accumbens di lentivirus nel cui genoma è stato inserito il gene per un CREB mutato (mCREB), diminuisce il fosfo-CREB ma aumenta le proprietà gratificanti della cocaina in un paradigma di condizionamento spaziale. Effetti opposti sono stati ottenuti con lo stesso paradigma in ratti che iper-esprimono il CREB o, rispettivamente, il CREB mutato (mCREB) nel VTA, l'area di origine dei neuroni dopaminergici che terminano nel n. accumbens.

Queste osservazioni, pur indicando che il CREB gioca un ruolo nelle proprietà gratificanti della cocaina, non sono immediatamente conciliabili con l'osservazione che la cocaina aumenta il fosfo-CREB. In queste condizioni ci si sarebbe infatti aspettati che l'aumento del pool di CREB, aumentando la quantità di CREB fosforilato, avrebbe potenziato le proprietà gratificanti della cocaina mentre l'opposto avrebbe dovuto fare l'iper-espressione di mCREB. Invece si è ottenuto esattamente il contrario. Peraltro, anche l'osservazione che la conseguenza finale dell'attivazione della trascrizione indotta dalla cocaina, cioè l'iper-espressione di CREB, produce una diminuzione degli effetti gratificanti della cocaina, mal si concilia con il fatto che la cocaina induce modificazioni della cromatina che dovrebbero favorire la trascrizione genica, inclusa quella del CREB.

Conclusioni

Lo studio delle modificazioni della cromatina sono un aspetto ancora poco esplorato delle modificazioni epigenetiche indotte dall'esposizione alle sostanze d'abuso. Questo studio è stato finora limitato agli effetti della cocaina. Sono quindi ancora da investigare gli effetti di sostanze come la Cannabis ed i cannabinoidi, che sono stati implicati in effetti a lungo termine e sono stati imputati della capacità di slentizzare o favorire l'espressione di una predisposizione genetica nei confronti della schizofrenia e di altre condizioni di interesse psichiatrico.

Tabella 2 - Effetto dell'acetilazione degli istoni nel comportamento motivato.

CBP: proteina di legame di CREB; CPP: preferenza spaziale condizionata; CREB: cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein; HAT: istone acetiltransferasi; HDAC: istone deacetilasi; HSV: herpes simplex virus; NAc: nucleo accumbens; SAHA: acido idrossamico suberoilamide; TSA: tricotatina A. Modificata da McQuown e Wood, 2010.

Studio	Esposizione al farmaco	Modello	Effetto di acetilazione dell'istone	Effetto sul comportamento
Levine et al. 2005	Sensibilizzazione da cocaina	Topo CBP aploin-sufficiente	↓ (↓ HAT)	↓ sensibilizzazione da cocaina
Kumar et al. 2005	CPP da cocaina	HSV-HDAC4 TSA	↓ (↑HDAC4 NAc) ↑ (↓HDAC)	↓ CCP ↑ CCP
Renthal et al. 2007	CPP da cocaina	SAHA (continuo intra-NAc) HSV-HDAC5 HSV-HDAC9	↑ (↓HDAC NAc) ↓ (↑HDAC5 NAc) ↓ (↑HDAC9 NAc)	↑ CCP ↓ CCP Nessuna modificazione di CPP
Romieu et al. 2008	Auto somministrazione di cocaina Sensibilizzazione da Cocaina	TSA TSA 4 gg prima di cocaina	↑ (↓HDAC) ↑ (↓HDAC)	↓ consumo di cocaina, rapida acquisizione ↓ sensibilizzazione motoria da cocaina
Sun et al. 2008	Auto somministrazione di cocaina	Sodio butirrato	↑ (↓HDAC)	↑ consumo di cocaina, mantenimento
Sanchis-Segura et al 2009	Sensibilizzazione da cocaina	Sodio butirrato	↑ (↓HDAC)	↑ attività motoria indotta da cocaina
Malvaez et al. 2010	Estinzione della CPP da cocaina	Sodio butirrato	↑ (↓HDAC)	↑ estinzione di CPP

Tabella 3 - Ruolo del CREB nel comportamento motivato da cocaina. L'analisi degli effetti del CREB sul comportamento è stata condotta in specifiche aree cerebrali come la shell del nucleo accumbens, l'area ventrale del tegmento e lo striato dorsale.

CPP: preferenza spaziale condizionata; CREB: cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein; DStr: striato dorsale; HSV: herpes simplex virus; KCREB: forma mutante di CREB che eterodimerizza con la forma wild-type; mCREB: forma mutante di CREB; NAc: nucleo accumbens; NAcSh: shell del nucleo accumbens; pCREB: forma fosforilata attivata di CREB, Str: striato; VTA: area ventrale del tegmento. Modificata da McQuown e Wood, 2010.

Studio	Esposizione al farmaco	Modello	Effetto di CREB	Effetto sul comportamento
Carlezon et al. 1998	CPP da cocaina	HSV-CREB HSV-mCREB	↑ pCREB NAcSh ↓ pCREB NAcSh	↓ CCP (avversione a basse dosi) ↑ CPP a basse dosi
Pliakas et al. 2001	CPP da cocaina	HSV-CREB HSV-mCREB	↑ pCREB NAcSh ↓ pCREB NAcSh	↓ CCP (avversione a basse dosi) ↑ CPP a basse dosi
Olson et al. 2005	CPP da cocaina	HSV-CREB HSV-mCREB	↑ pCREB VTA ↓ pCREB VTA	↑ CPP nella porzione rostrale ↓ CPP nella porzione caudale ↓ CPP nella porzione rostrale ↑ CPP nella porzione caudale
Fasano et al. 2009	CPP da cocaina, sensibilizzazione	Str-KCREB	↓ pCREB DStr	↑ CPP e sensibilizzazione motoria a basse dosi
Walters and Blendy 2001	CPP da cocaina, sensibilizzazione	CREBΔΔ	↓ pCREB	↑ CPP e ↑ sensibilizzazione motoria
Valverde et al. 2004	CPP da cocaina	CREBΔΔ	↓ pCREB	Nessuna modificazione nella CPP ad alte dosi
Choi et al. 2006	Autosomministrazione di cocaina	CREB antisenso	↓ pCREB NAc	↓ consumo di cocaina

Bibliografia

1. Robinson TE, Kolb B: Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 2004, 47(Suppl 1):33–46.
2. Nestler EJ: Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 2004, 47(Suppl 1):24–32.
3. Haig D: The (dual) origin of epigenetics. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2004, 69:67–70.
4. Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D: Epigenetics. Edited by Caparros ML. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press; 2007.
5. NIH Roadmap for Medical Research: Epigenomics overview. Disponibile presso <http://nihroadmap.nih.gov/epigenomics/index.asp>, 2009.
6. Borrelli, E., Nestler, E.J., Allis, C.D., Sassone-Corsi, P.: Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity. *Neuron*, 2008, 60, 961–974.
7. Levine AA, Guan Z, Barco A, et al.: CREB-binding protein controls response to cocaine by acetylating histones at the fosB promoter in the mouse striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102:19186–19191.
8. Romieu P, Host L, Gobaille S, et al.: Histone deacetylase inhibitors decrease cocaine but not sucrose self-administration in rats. *J Neurosci* 2008, 28:9342–9348.
9. Sanchis-Segura C, Lopez-Atalaya JP, Barco A: Selective boosting of transcriptional and be-

- havioral responses to drugs of abuse by histone deacetylase inhibition. *Neuropsychopharmacology* 2009,34:2642–2654.
10. Kumar A, Choi KH, Renthal W, et al.: Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron* 2005, 48:303–314.
 11. Renthal W, Maze I, Krishnan V, et al.: Histone deacetylase 5 epigenetically controls behavioral adaptations to chronic emotional stimuli. *Neuron* 2007, 56:517–529.
 12. Malvaez M, Sanchis-Segura C, Vo D, et al.: Modulation of chromatin modification facilitates extinction of cocaine-induced conditioned place preference. *Biol Psychiatry* 2010, 67:36–43.
 13. Tarakhovsky, A., Schaefer, A., Nestler, E.J.: Essential role of the histone methyltransferase G9a in cocaine-induced plasticity. *Science* 2010, 327, 213–216.
 14. Wang, L., Lv, Z., Hu, Z., Sheng, J., Hui, B., Sun, J., Ma, L.: Chronic cocaine-induced H3 acetylation and transcriptional activation of CaMKIIalpha in the nucleus accumbens is critical for motivation for drug reinforcement. *Neuropsychopharmacology* 2010, 35, 913–928.
 15. Maze, I., Covington 3rd, H.E., Dietz, D.M., LaPlant, Q., Renthal, W., Russo, S.J., Mechanic, M., Mouzon, E., Neve, R.L., Haggarty, S.J., Ren, Y., Sampath, S.C., Hurd, Y.L., Greengard, P., Tarakhovsky, A., Schaefer, A., Nestler, E.J.: Essential role of the histone methyltransferase G9a in cocaine-induced plasticity. *Science* 2010, 327, 213–216.
 16. Bami-Cherrier, K., Valjent, E., Herve, D., Darragh, J., Corvol, J.C., Pages, C., Arthur, S.J., Girault, J.A., Caboche, J.: Parsing molecular and behavioral effects of cocaine in mitogen- and stress-activated protein kinase-1-deficient mice. *J. Neurosci.* 2005, 25, 11444–11454.
 17. Stipanovich, A., Valjent, E., Matamalas, M., Nishi, A., Ahn, J.H., Maroteaux, M., Bertran-Gonzalez, J., Bami-Cherrier, K., Enslen, H., Corbille, A.G., Filhol, O., Nairn, A.C., Greengard, P., Herve, D., Girault, J.A.: A phosphatase cascade by which rewarding stimuli control nucleosomal response. *Nature* 2008, 453, 879–884.
 18. Renthal, W., Nestler, E.J.: Histone acetylation in drug addiction. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2009, 20, 387–394.
 19. Renthal W, Kumar A, Xiao G, et al.: Genome-wide analysis of chromatin regulation by cocaine reveals a role for sirtuins. *Neuron* 2009, 62:335–348.
 20. Russo, S.J., Wilkinson, M.B., Mazei-Robison, M.S., Dietz, D.M., Maze, I., Krishnan, V., Renthal, W., Graham, A., Birnbaum, S.G., Green, T.A., Robison, B., Lesselyong, A., Perrotti, L.I., Bolanos, C.A., Kumar, A., Clark, M.S., Neumaier, J.F., Neve, R.L., Bhakar, A.L., Barker, P.A., Nestler, E.J.: Nuclear factor kappa B signaling regulates neuronal morphology and cocaine reward. *J. Neurosci.* 2009, 29, 3529–3537.
 21. McKeown, S.C. e Wood, M.A.: Epigenetic regulation in substance use disorders. *Curr. Psychiatry Rep.* 2010, 12:145–15.
 22. La Plane Q. e Nestler, E.J.: CRACKing the histone code: Cocaine's effects on chromatin structure and function, *Hormones and Behavior*, 2010, in press
 23. Sun J, Wang L, Jiang B, et al.: The effects of sodium butyrate, an inhibitor of histone deacetylase, on the cocaine- and sucrose-maintained self-administration in rats. *Neurosci Lett* 2008, 441:72–76.
 24. Carlezon WA Jr, Thome J, Olson VG, et al.: Regulation of cocaine reward by CREB. *Science* 1998, 282:2272–2275.
 25. Pliakas AM, Carlson RR, Neve RL, et al.: Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens. *J Neurosci* 2001, 21:7397–7403.
 26. Olson VG, Zabetian CP, Bolanos CA, et al.: Regulation of drug reward by cAMP response element-binding protein: evidence for two functionally distinct subregions of the ventral tegmental area. *J Neurosci* 2005, 25:5553–5562.
 27. Fasano S, Pittenger C, Brambilla R: Inhibition of CREB activity in the dorsal portion of the striatum potentiates behavioral responses to drugs of abuse. *Front Behav Neurosci* 2009, 3:29.
 28. Walters CL, Blendy JA: Different requirements for cAMP response element binding protein in positive and negative reinforcing properties of drugs of abuse. *J Neurosci* 2001, 21:9438–9444.
 29. Valverde O, Mantamadiotis T, Torrecilla M, et al.: Modulation of anxiety-like behavior and morphine dependence in CREB-deficient mice. *Neuropsychopharmacology* 2004, 29:1122–1133.
 30. Choi KH, Whisler K, Graham DL, Self DW: Antisense-induced reduction in nucleus accumbens cyclic AMP response element binding protein attenuates cocaine reinforcement. *Neuroscience* 2006, 137:373–383.