

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra obecné zootechniky a etologie



Epigenetika v chovech zvířat

Bakalářská práce

Autor práce: Lívia Orolínová

Vedoucí práce: prof. Ing. Luděk Bartoš, DrSc.

Čestné prehlásenie

Prehlasujem, že svoju bakalársku prácu na tému "Epigenetika v chovech zvierat" som vypracovala samostatne pomocou odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú citované v práci a uvedené v zozname literatúry na konci práce. Ako autorka uvedenej bakalárskej práce ďalej prehlasujem, že som v súvislosti s jej vytvorením neporušila autorské práva tretích osôb.

V Prahe dňa 5.4.2016

PodĀkovanie

Chcela by som v prvom rade poĀakovať pánu prof. Ing. LuĀkovi Bartošovi, DrSc. ako vedúcemu práce, predovšetkým za trpezlivosť, hodnotné rady a za poskytnutie kvalitných vedeckých článkov v rozsiahlom množstve k vypracovaniu tejto práce. Āalej musím poĀakovať svojej rodine zvlášť mojím rodičom a aj môjmu partnerovi Mariánovi za veľkú podporu.

Epigenetika v chovech zvierat

Súhrn

Táto práca je literárnou rešeršou epigenetiky zameraná hlavne na cicavce spoločenské, čiže na hlodavce a primáty. Prvé kapitoly sa zaoberajú všeobecnými základmi epigenetiky. Najprv je stručne popísaná história od Aristotela cez Lamarcka, Waddingtona až po súčasnosť ako je Nobelová cena, ktorú získali Andrew Z. Fire a Craig C. Mello.

Ďalej sú objasnené základy a pojmy z ktorých epigenetika vychádza, pre lepšie pochopenie nadväzujúcich súvislostí v mechanizmoch.

Hlavné epigenetické mechanizmy, ako je metylácia cytozínu, ďalšie modifikácie histónov ako je acetylácia, fosforylácia a iné, sú v práci popísané. Pre ich zložitosť a odbornosť na úrovni molekulárnej biológie sú veľmi zosťručené. Rovnako je popísaný aj negenetický prenos z jednej generácie na druhú.

Ďalšie kapitoly zhŕňajú poznatky z vedeckých odborných článkov zaoberajúcich sa vplyvom rôzneho sociálneho prostredia (hlavne interakcie medzi matkou a dieťaťom) na jedinca. Téma je rozdelená a chronologicky popísaná od prenatálneho obdobia skrz postnatálne a prípadne opisuje aj neskoršie obdobie. Sociálne prostredie vplyva na matku a počas gravidity aj na plod. Rôznymi zmenami v prostredí môže byť matka stresovaná, čím je spustená kaskáda hormonálnych a neurologických zmien, ktoré môžu mať trvalé následky u matky samotnej ale aj u mláďat a epigenetickými mechanizmami prenesené do ďalších generácií.

Zmeny môžu byť spôsobené umelo, alebo existujú prirodzené odchýlky v materskej starostlivosti v rámci druhu a medzi líniami laboratórnych hlodavcov. Práca popisuje následky zníženej materskej starostlivosti prirodzenej alebo vyvolanej rôznymi mechanizmami. Taktiež popisuje efekty zvýšenej materskej starostlivosti, ktorá môže byť prirodzená alebo vyvolaná, napríklad spoločným chovom väčšej skupiny jedincov.

Práca sa venuje aj dôsledkom úplnej absencie materského kontaktu, kedy sú dôsledky podobné ako pri nedostatočnej starostlivosti, až prehĺbenejšie s problémami v kognitívnom a sociálnom správaní. Niektoré dôsledky sa dajú zvrátiť alebo zmierniť prostredníctvom spôsobu chovu po odstave. V tejto oblasti je potreba viacej výskumov.

Kľúčové slová: epigenetika, epigenetické faktory a chovanie, epigeneračný prenos nedostatočného materského chovania, metylácia,

Epigenetics in captive animals

Summary

This thesis is a literature review of epigenetics as a scientific discipline focused on social mammals - primates and rodents. First chapters deal with general basis of epigenetics. Then it is followed by brief description of the history from Aristotle through Lamarck, Waddington until present like Nobel Prize, received by A. Z. Fire and Craig C. Mello. The fundamentals and concepts of epigenetics are explained, for better understanding of the context of follow-up mechanisms.

The main epigenetic mechanisms, such as methylation of cytosine, modifications of histones such as acetylation, phosphorylation, and others, are described in the thesis. Because of their complexity at the level of molecular biology, they are described very condensely and briefly. At the same time it is followed by description of the non-genetic transfer from generation to generation.

Next chapters summarize findings of scientific research articles dealing with influence from different social backgrounds (particularly the interaction between mother and offspring) on the subject. The topic is divided and chronologically described from prenatal period through postnatal and can also describes later period.

Social environment affects mother and fetus in gestation. Various changes in the environment can make mother to be stressed. Stress can trigger hormonal and neurological changes that may cause permanent consequences in mother itself but also in pups. And through the epigenetic mechanisms can be transfered to future generations.

Changes can be caused by artificial or natural variations in maternal care within spiecies and strains. This thesis describes effects of naturally or artificially induced decrease of maternal care, by several mechanisms. The effects of increased maternal care are also described. They can be natural or induced, for example by comunal raising of pups.

The thesis also describe results of the complete absence in maternal contact. That consequences are similar to the lack of sufficient care. But the cognitive problems and social behavior can differ. Some of the consequences can be reversed or reduced by appropriate rearing techniques after weaning. This area require more additional studies to produce more conclusions.

Keywords: epigenetics, epigenetic factors and behavior, epigenerational transfer of deficient maternal behavior, methylation

Obsah

1	Úvod	7
2	Cieľ práce	8
3	História a introdukcia do epigenetiky	9
3.1	Epigenetika v historickom kontexte	10
3.2	Definícia základných epigenetických pojmov	13
4	Základné epigenetické procesy a ich mechanizmus	15
4.1	Metylácia cytozínu DNA	16
4.1.1	DNA metyltransferázy a väzbové proteíny	17
4.1.2	Inhibítory metylácie DNA	17
4.2	Modifikácia chromozómových histónov	17
4.2.1	Acetylácia histónov	18
4.2.2	Metylácia histónov	18
4.2.3	Ubiquitinácia a SUMOylácia	19
4.3	Dedičnosť epigenetických vlastností	20
4.3.1	Proteíny skupín Polycomb a Trithorax	21
5	Epigenetické zmeny vplyvom sociálneho prostredia	22
5.1	V prenatálnom období	22
5.2	V postnatálnom období	23
5.2.1	Individuálne intradruhové rozdiely v materskej starostlivosti	24
5.2.2	Zámerné narušenie a modifikácia kontaktu matka - mláďa	26
5.2.3	Úplná absencia materského kontaktu	27
5.2.4	Hrubé zaobchádzanie s mláďatami	28
5.2.5	Adaptívny vývoj	28
5.3	V neskoršom období	29
6	Záver	30
	Zoznam literatúry	31

1 Úvod

Hlavný prúd v oblasti genetiky v posledných rokoch 20. storočia predpokladal, že všetky jej otázky zodpovie kompletná sekvencia DNA jedinca. Práve preto na prelome tisícročia začal narastať výskum v oblasti epigenetiky. Epigenetika sa snaží nájsť odpovede, ktoré samotná sekvencia DNA nie je schopná poskytnúť. Po sekvenovaní celého genomu ľudského jedinca sa ukázalo, že gény DNA dvoj-závitnice by sa dali prirovnať k hardvéru počítača, ktorý je východiskovou základňou pre operácie v našom tele; ale už samotné operácie sú riadené softvérom - to znamená, epigenetickými procesmi. (Curley et al., 2011; Dahlen et al., 2013)

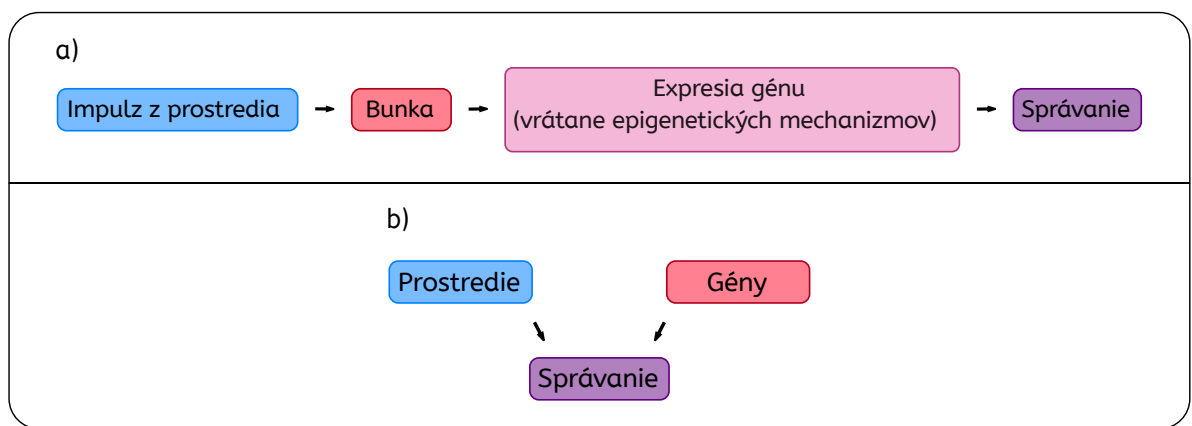
2 Cieľ práce

Cieľom tejto bakalárskej práce je literárna rešerš vedeckej literatúry o epigenetike. Epigenetika ako téma sama o sebe je veľmi rozsiahla. Účelom práce je popísať základné epigenetické mechanizmy a možnosti ich zvratného procesu. Zamerať sa na problematiku sociálnej interakcie (napr. vzťah nedostatočného materského chovania) ako prostredia s potenciálom k epigenetickým zmenám v prenatálnom, perinatálnom a v postnatálnom období a jeho negenetického prenosu do ďalších generácií.

3 História a introdukcia do epigenetiky

Pre molekulárnych biológov je epigenetika veda reprezentujúca štúdium dedičných znakov, ktoré nemožno vysvetliť zmenami v sekvencii DNA (Kováč, 2009). Zaraďuje sa do odboru genetiky, ale študuje javy, ktoré majú moc ovplyvňovať gény. To znamená, že napriek tomu, že patrí pod genetiku je tak trochu aj nad ňou. Samotná predpona to naznačuje, podľa toho, ktorý z jej významov sa uprednostní. „*Epi*“ je gréckeho pôvodu a znamená na, nad, do, vyššie alebo pri (Carey, 2012).

Najmladší pododbor genetiky sa snaží odpovedať na otázku: „Ako prostredie, v ktorom žijeme, ovplyvňuje naše gény?“

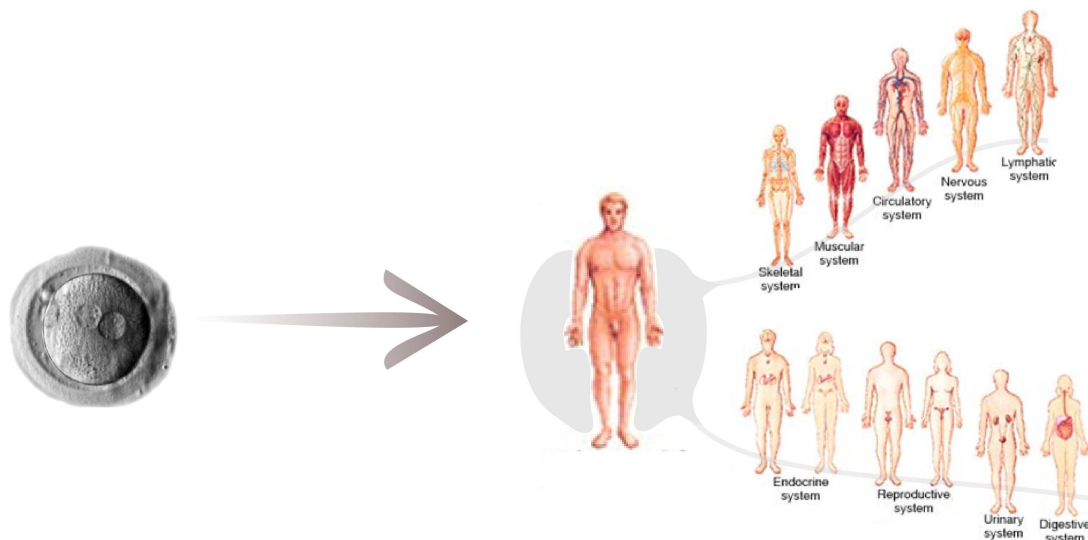


Obr. 1: Modely pôsobenia prostredia a génov na správanie

Vonkajšie prostredie, nás aj naše správanie, dokáže ovplyvniť prostredníctvom génov. Presnejšie, prostredníctvom modulácie génovej aktivity. Takéto pôsobenie na gény je sprostredkované zmenami v bunkách, v ktorých naše gény sídlia (Francis, 2011). Názorne zobrazuje obrázok 1a).

Časť b) obrázka 1 ukazuje starší model, ktorý oddeľuje zvlášť vplyv prostredia a vplyv génov. Vyjadruje priamy vplyv prostredia v ktorom žijeme; lenže už je dokázané, že takáto predstava je mylná. Model znázornený v časti 1b) je zastaralý a nesprávny. Prostredie, neovplyvňuje naše správanie priamo (Sweatt, 2013).

Táto vedná disciplína sa snaží zodpovedať mnoho iných, ale súvisiacich otázok. Niektoré, sú zreteľné aj pre ľudí, ktorý sa nezaoberajú biológiou. Ako sa jednoduchá zygota vyvinula v mnohobunkový komplexný organizmus zložený stovkami odlišných buniek, všetky s úplne rovnakou genetickou výbavou ale s tak odlišnými funkciami (obr. 2)? Prečo je veľký rozdiel u jednovaječných dvojčat v správaní a v predispozíciach na choroby, napriek tomu že sú vzhľadovo takmer rovnaké? Ak práve environmentálne faktory sú príčinou takých zmien, prečo sú obdobné odlišnosti pozorované aj medzi geneticky identickými zvieratami umiestnenými v jednotvárnom prostredí (Petronis, 2011)?



Obr. 2: Zo zygoty komplexný človek
 Fotografia zygoty pôvodne z vedeckej práce Nicoli et al. (2010). Pozmenené schéma
 orgánových systémov z Human Anatomy & Physiology (Elaine and Katja, 2012)

Tieto otázky nie sú nové. Viac ako pred pol storočím C. H. Waddington, prezieravý Britský vývojový biológ sa snažil nájsť pre ne odpoveď a položil seriózne základy pre epigenetiku. Aj keď pojem *epigenéza* už bol použitý niekoľko storočí pred Waddingtonom (Petronis, 2011).

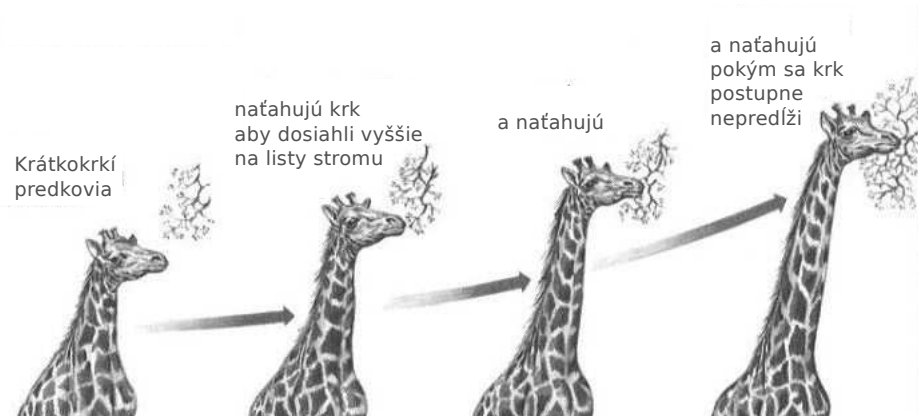
3.1 Epigenetika v historickom kontexte

Grécky filozof Aristoteles (384 - 322 p.n.l.) ako prvý použil pojem epigenéza (Vyskot, 2010). Jej význam nie je rovnaký s epigenetikou, ale až sem siahajú jej korene. Pojem epigenéza, Aristoteles použil na popísanie a pochopenie individuálneho vývoja organizmu resp. ako dokáže dosiahnuť nových foriem, ktoré sa časom postupne vynárajú (Petronis, 2011). Veril, že výsledná forma organizmu nie je dopredu daná, ale vzniká postupnými kreatívnymi procesmi (Vyskot, 2010). Dnes sa tento pojem často skloňuje v súvislosti s evolučnou vývojovou biológiou alebo s tzv. evo - devo biológiou ako proces ontogenézy (Kováč, 2009).

Ako píše Vyskot (2010) Francúza Jeana-Baptista Lamarcka (1744 - 1829) môžeme považovať za prvého prírodovedca, ktorý sa pokúsil o serióznejší celistvý výklad evolučnej teórie a to už v roku 1802 (Kováč, 2009).

Lamarck síce nepoužíval pojmy epigenetika ani epigenéza, ale nosným pilierom jeho evolučnej teórie bola priama dedičnosť získaných vlastností počas života rodiča na svojho potomka. Veľmi sa to podobá na definíciu epigenetiky, ale nie je to úplne tak. Bol presvedčený, že jednoduché živé organizmy sa vytvárajú spontánne prostredníctvom pôsobenia hmotnej životnej sily - fluida. Cvičením sa koncentruje v určitých častiach tela a stimu-

luje vznik nového orgánu. Naopak, z nepoužívaných orgánov fluidum odteká a následne atrofujú. Lamarck vnímal celý proces ako veľmi adaptívny (Kováč, 2009). Najznámejším príkladom je jeho teória o vývine dlhých krkov u žiráf (obr. 3).



Obr. 3: Lamarcková žirafa
Pôvodne z Evolution (Savage, 1971)

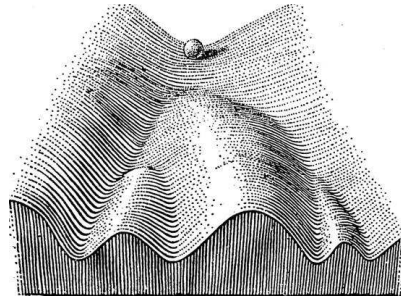
Krátkokrkkí predchodcovia, ktorí údajne naťahovali krk, aby dočiahli na listy, ktoré boli čoraz vyššie vďaka suchším podmienkam v africkej savane. Naťahovaním im pritekalo fluidum do krkov - predlžovali sa (Kováč, 2009).

Na to, aby to celé fungovalo, Lamarck postuloval, že nadobudnuté znaky (napríklad spomínaný dlhší žirafí krk) sú dedičné. Zmeny jedincov sa v priebehu generácií kumulovali a tak sa vyvíjali viditeľne odlišné typy (Kováč, 2009). August Weisman (1834 - 1914) nemecký učenec, ktorý patril medzi najväčších kritikov Lamarcka, sledoval dedičnosť získaných znakov experimentom v ktorom odstrihával myšiam chvostíky a došiel k záveru, že získane znaky počas života sa nededia (Vyskot, 2010). Lamarckova pôvodná koncepcia evolúcie je mylná v myšlienke fyzického putovania fluida a priamej dedičnosti získaných vlastností. Napriek tomu jej však nemožno uprieť racionálny základ. Výsledky bádania v oblasti evo - devo biológie však jasne indikujú, že prostredie na evolúciu organizmov vplyva, ale len nepriamo, prostredníctvom epigenetických mechanizmov (Kováč, 2009).

Conrad Hal Waddington (1905 - 1975) položil základy teórie, ktorá vysvetľuje ako identické genotypy môžu produkovať širokú škálu fenotypov počas svojho vývoja. Ako prvý použil výraz epigenetika a definuje ho ako vývojový proces, ktorý „spája“ bunkový genotyp k jeho fenotypu. (Petronis, 2011). Vyjadruje symbiózu Aristotelovej idey epigenézy (výsledná forma organizmu nie je dopredu daná - teda opak performizmu) a genetiky (v tej dobe vo svojej podstate performistická - založená na študovaní génov nachádzajúcich sa v zygote) (Vyskot, 2010).

Tuto symbiotickú teóriu vysvetľuje na modele epigenetickej krajiny (obr. 4). Model zobrazuje viacero možností guľôčky pohybujúcej sa po členitom rozvetvenom povrchu.

Je metaforou osudu bunky v priebehu ontogenézy. Gulôčka je z kopca poháňaná gravitáciou, analogicky má takto bunka predurčený vývoj na základe génov uložených v DNA. Gulôčka schádza z kopca rôznymi údoliami, pričom môže alebo nemusí prejsť svoju pôvodnú trasu. Analogicky takto do vývoja bunky, predurčeného génmi zasahujú epigenetické mechanizmy zapínaním, resp. vypínaním odlišných génov na základe vnútrobunkových alebo mimobunkových signálov. To môže viesť k vychýleniu v mieste vetvenia trajektórií zo svojej pôvodnej dráhy. Tieto zmeny môžu byť fixované aj do ďalších generácií (Cota et al., 2013; Cameron et al., 2005).



Obr. 4: Waddingtonov model epigenetickej krajiny
Pôvodne z Waddington (1940)

Termín epigenetika sa rozšíril veľa rokov po Waddingtonovej smrti, až v sedemdesiatych rokoch 20. storočia, keď sa začali objasňovať niektoré nemendelisticky dedené znaky. V tom čase sa objavili prvé poznatky o modifikáciách DNA a hlavne o metylácii cytozínu. Chvíľu na to austrálsky molekulárny genetik Robin Holliday ako prvý zverejnil v roku 1979 svoju teóriu o pôsobení epigenetických mechanizmov. Tvrdil, že môžu hrať veľkú rolu pri nádorovom bujnení a o osem rokov neskôr vypracoval štúdiu o možnej dedičnosti epigenetických defektov. Ďalšími významnými prácami Andrewa P. Feinberga a Berta Vogelsteina, alebo Davora Soltera a Azima Suraniho (objavenie genomového imprintingu, rok 1984) sa epigenetika stáva uznávanou vednou disciplínou (Vyskot, 2010).

Dnes sa viacerí významní vedci domnievajú, že epigenéza zohráva v evolúcii jednu z rozhodujúcich úloh (Balon, 2004).

Biomedicínske výskumy v prvom desaťročí 21. storočia boli poznačené rapidne rastúcim záujmom o epigenetiku. Najskôr, je to kvôli tomu, že i na vzdory svojej významnosti, samotná sekvencia DNA nestačí na všetky podstatne aspekty biológie človeka resp. nestačí ako návod na komplexné fungovanie organizmu (Petronis, 2011). Potvrďuje to aj udeľenie Nobelovej ceny v roku 2006 za fyziológiu alebo medicínu dvom americkým vedcom z USA, ktorí svoju cenu zdieľajú na polovicu. Andrew Z. Fire a Craig C. Mello objavili RNA interferenciu konkrétne umlčovanie génov prostredníctvom dvojvláknovej RNA (Mack, 2013).

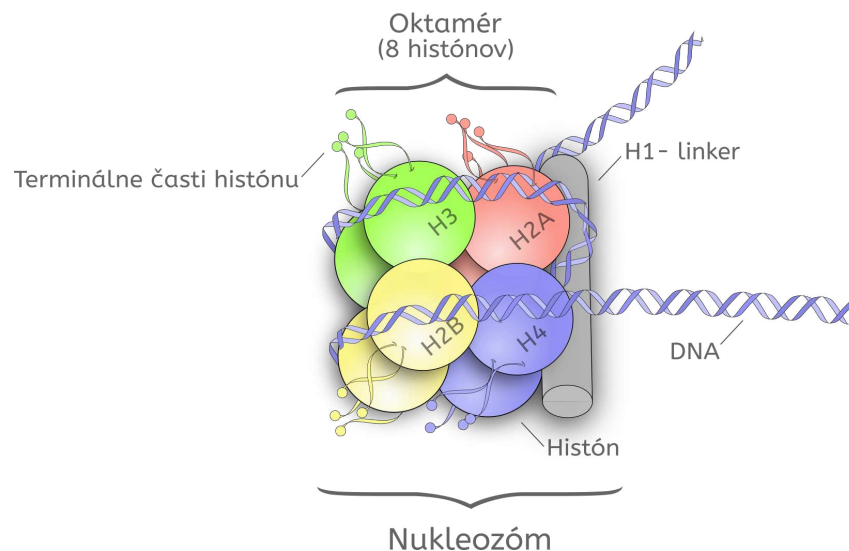
3.2 Definícia základných epigenetických pojmov

Ako je poznamenané v úvode kapitoly, epigenetika je pododborom genetiky. Jej základy sa v mnohom prelínajú so základmi genetiky.

Aby sa DNA zmestila do jadra eukaryotickej bunky, musí byť veľmi natesno stočená. Táto kondenzovaná štruktúra je udržiavaná súbormi zloženými z proteínov (Champagne and Curley, 2009).

Nukleozóm, oktamer a histón

DNA je stočená do útvarov nazývaných nukleozómy. Jeden nukleozóm je tvorený DNA dvojzávitnicou skrútenou okolo oktamerov zložených z histónových proteínov. Tieto oktamer sa skladajú z párovaných histónov H2A, H2B, H3 a H4 ako je to na obrázku 5. Ďalší histón nazývaný H1 (alebo H1 linker) slúži na zakotvenie DNA ku každému histónovému oktameru, čím stabilizuje celý nukleozóm (Choi and Friso, 2009).



Obr. 5: Stavba nukleozómu

Štruktúra týchto proteínov zahŕňa pozitívne veľmi nabitú časť nazývanú „histone tail“ (terminálne časti histónu). Tieto koncové časti môžu končiť amino skupinou (NH_2), nazývané aminoterminálne konce alebo môžu končiť karboxy skupinou ($COOH$) a v tomto prípade sú to karboxyterminálne časti. Táto pozitívne nabitá terminálna časť je stočená dookola negatívne nabitej DNA. Tým sa zachováva veľmi pevná štruktúra. V tejto pozícii sa nemôže transkribovať DNA a génová expresia je inhibovaná. Napriek tomu, terminálne časti histónov môžu podstúpiť niekoľko posttranslačných modifikácií, ktoré pozmenia túto interakciu DNA-proteín (Petronis, 2011).

Najmä acetylácia môže prebehnúť, kde sa skrz enzymatickú reakciu pripojí acetylová skupina k histónovému konci. Keď toto prebehne, tak sa terminálna časť histónu a DNA stanú viac podobné v elektrickom náboji a začnú mať tendencie odpudzovať sa čo vedie

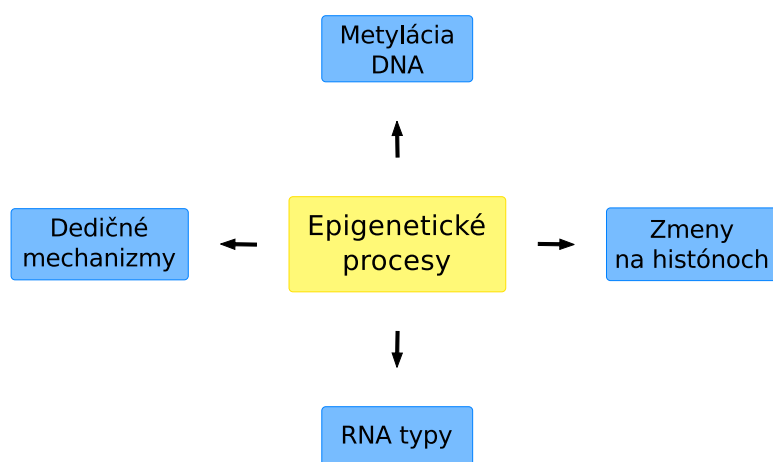
k odhaleniu DNA k transkripčným faktorom. Teda, zvýšenie acetylácie termálnych častí histónov podporuje génovú expresiu zatiaľčo inhibícia tejto modifikácie vedie k nižšej aktivite génovej expresie (Petronis, 2011).

Aby sa gény mohli prejaviť, musí DNA prísť do kontaktu s RNA polymerázou a inými transkripčnými faktormi. To znamená, že DNA musí byť v aktívnom stave, aby mohla prebehnúť génová expresia. DNA je aktívna vtedy, keď je odkrútená, uvoľnená od histónového jadra a sekvencie nukleových kyselín sú odhalené (Champagne and Curley, 2009).

DNA sa nachádza v jadre, kde môžeme rozoznávať dva typy uloženia DNA. Je to heterochromatín a euchromatín. Euchromatín má menej kompaktnú štruktúru a je svetlejší. Často je opisovaný ako 11 nm dlhé vlákno a vyzerá ako „koráliky na šnúrke“, kde koráliky reprezentujú nukleozóm a šnúrka vlákno DNA. Heterochromatín je naopak viacej kompaktný a tmavší (Grewal and Jia, 2007).

4 Základné epigenetické procesy a ich mechanizmus

Od šesťdesiatych rokov 20. storočia je známa metylácia cytozínu DNA, proces, ktorý je zodpovedný za väčšinu epigenetických zmien u vyšších eukaryot. V osemdesiatych rokoch začali skúmať aj epigenetické modifikácie nukleozomálnych histónov. Najprv acetyláciu, potom metyláciu histónov a iné posttranslačné úpravy. S histónovými modifikáciami súvisia DNA väzbové proteíny, ktoré majú často enzymatickú aktivitu. Medzi ne patria histón acetylázy, histón deacetylázy a podobne (Vyskot, 2010). Tieto procesy boli považované za hlavné epigenetické mechanizmy, ktoré majú vplyv na fenotyp. Ale existuje mnoho ďalších epigenetických mechanizmov, vrátane génového imprintingu, inaktivácie X chromozómu, malé a nekódovacie RNA a proteíny remodelujúce nukleozóm (Choi and Friso, 2009). Génový imprinting sa zahrňuje aj ako efekt viacerých epigenetických mechanizmov (Weinhold, 2006).



Obr. 6: Epigenetické procesy

Riadenie génovej transkripcie je silne prepojené s epigenetickými mechanizmami: s metyláciou DNA a s histónovými modifikáciami. Ďalej sú však veľmi dôležité DNA metyltransferázy, enzýmy modifikujúce terminálne časti histónov a proteíny, ktoré modifikujú nukleozóm, pretože ani jedna z týchto látok a procesov nepôsobí samostatne - riadenie génovej transkripcie je určené ich vzájomnými väzbami a pôsobením. Týmito vzájomnými vzťahmi sa nakoniec rozhodne o štruktúre chromatínu resp. o regulácii génovej expresie (Choi and Friso, 2009).

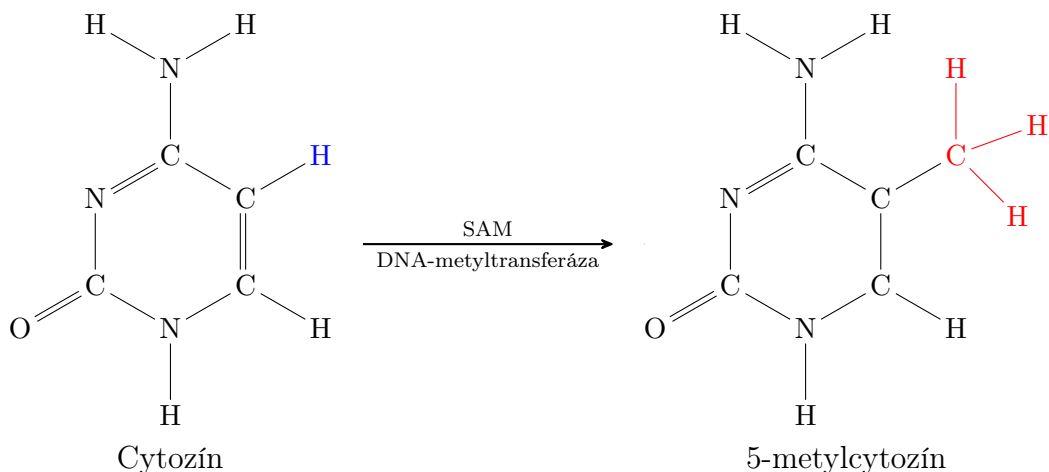
Neskôr, začiatkom 21. storočia, bola odhalená aj úloha malých molekúl (Carey, 2012) RNA, ktoré sú schopné regulovať aktivitu génov pomocou inhibície translácie alebo štiepenia mRNA. Ďalšiu dôležitú úlohu zohrávajú bielkoviny skupín Polycomb a Trithorax práve v bunkovej pamäti. Viazu sa na transkribované resp. umlčané alebo aktivované oblasti génov (Vyskot, 2010).

4.1 Metylácia cytozínu DNA

Chromatín nie je iba neaktívny podklad na uchovávanie genetickej informácie, ale navyše na základe histónových a DNA modifikácií aktívne reguluje proces génovej transkripcie (Choi and Friso, 2009). Najviac preskúmaná epigenetická modifikácia je práve metylácia cytozínu. Jej funkcia bola v minulosti vo väčšej miere spojovaná s umlčovaním génu; no súčasné referencie poukazujú aj na nepriame zriedkavé zvýšenie aktivity génu (Dudley et al., 2011).

Obecne, tento proces, najčastejšie sprevádzaný umlčaním génu, prebieha v riadiacich zónach DNA. Z funkčného hľadiska zabraňuje prístupu transkripčných faktorov a RNA polymeráz k bázam DNA a práve to spôsobuje umlčanie génu. Navyše, naviazané metylové skupiny priťahujú väzbové proteíny, ktoré podporujú histónovú deacetyláciu (ďalší epigenetický proces, vysvetlený v kapitole 4.2). Tým zabraňujú čo i len pravdepodobnej transkripcii resp. expresii génu (Champagne and Curley, 2009).

Metylácia cytozínu (obr. 7) je enzymatický proces, ktorý prebieha na 5. uhlíku molekuly cytozínu nahradením vodíka metylovou skupinou. Na tomto procese sa podieľa špecifický enzým - DNA metyltransferáza, ktorá prenáša metylovú skupinu z S-adenozyl-L-metionínu (označovaný tiež ako SAM, AdoMet, SAdoMet alebo SAMe) na cytozín. U cicavcov DNA metylácia prebieha väčšinou v oblastiach imprintovaných génov, génov inaktivovaných na X chromozómu samíc a na CpG dinukleotidoch v heterochromatínových oblastiach chromatínu s výnimkou oblastí, kde sú veľmi husto vedľa seba umiestnené tzv. CpG ostrovy (Choi and Friso, 2009; Vyskot, 2010).



Obr. 7: Metylácia DNA

Väzba medzi cytozínom a metylovou skupinou je veľmi silná a stabilná, no napriek tomu stále potencionálne schopná zvratnej zmeny na nemetylovaný cytozín (Champagne and Curley, 2009).

4.1.1 DNA metyltransferázy a väzbové proteíny

Na metylované oblasti DNA sa viažu špecifické proteíny rodiny väzbových proteínov, ktoré majú pre príslušné génové oblasti utlmujúci účinok. Pokiaľ sú mutované alebo inak nefunkčné, môžu vyvolávať vážne neurologické choroby.

DNA metyltransferázy tiež označované ako Dnmt sa u cicavcoch rozdeľujú do troch podrodín (Vyskot, 2010):

1. Dnmt1 enzýmy sú zodpovedné za udržiavanie metylácie v CpG dinukleotidoch po replikáciách DNA.
2. Dnmt2 majú nízku aktivitu v niektorých sekvenciách CpG.
3. Dnmt3 má *de novo* metyltransferázovú aktivitu (inaktivácia tejto enzýmovej aktivity má zvyčajne letálny dôsledok). Táto samotná podskupina má ešte 3 členy 3a, 3b a 3L (Choi and Friso, 2009).

Karboxyterminálna katalytická doména metyltransferázy cicavcov je homologická sa bakteriálnou metyltransferázou (Choi and Friso, 2009).

4.1.2 Inhibítory metylácie DNA

Inhibovať metyláciu DNA sa dá prostredníctvom tzv. „knokautu“ (alebo iným umlčaním) DNA metyltransferázy alebo aplikáciou 5 - azacytidinu alebo iného inhibítora metylácie. Štúdie účinkov 5-azacytidinu ukázali mnohé výsledky. Napríklad pri experimentálnej liečbe cytostatický účinok vyvolal záujem v mnohých svetových laboratóriách, ktoré začali látku testovať na najrôznejších druhoch neoplazie¹. Na ďalšej štúdií sa ukázalo, že spôsobuje zmeny v diferenciáciách myších embryonálnych bunkách a inhibuje udržiavanie metyláciu DNA a aj metyláciu *de novo* a dochádza k hypometyláciám dinukleotidov CpG (Vyskot, 2010).

4.2 Modifikácia chromozómových histónov

Históny sú posttranslačne modifikované rôznymi enzymatickými reakciami. Modifikácie prebiehajú hlavne v ich ohybnej aminoterminálnej časti. Toto platí aj pre metyláciu. Tieto zmeny majú dôležitú úlohu v moduláciách chromatickej štruktúry. To znamená, že ovplyvňuje mnoho procesov vrátane regulácie génovej expresie, opráv DNA, a dokonca aj DNA rekombinácie, a veľa iných, ktoré sú závislé na chromatine (Choi and Friso, 2009).

¹novotvorba tkanív aj vo významne malígnej tvorby

Na histónových proteínoch môžu prebiehať tieto epigenetické zmeny:

1. Acetylácia
2. Metylácia
3. Fosforylácia
4. Ubiquitinácia
5. SUMOylácia

Donory príslušných chemických skupín (metylu je S-anedozymetionin, acetylu je acetylkoenzým A, fosfátu je adenzinotrifosfát) sú využívané špecifickými enzýmami (histón metylázami, h. acetylázami, h. fosforylázami,...) k posttranslačným úpravám. Dôležité je, že tieto reakcie sú reverzibilné. Vďaka špecifickým enzýmom (histón demetylázy, h. deacetylázy, h. fosfatázy atď.), ktoré reagujú s príslušnými chemickými skupinami, sa reguluje expresia génov. Modifikácie DNA a histónov sú procesy, vzájomne závislé prostredníctvom interakcie DNA metyltransferáz a histón metyltransferáz (Vyskot, 2010).

4.2.1 Acetylácia histónov

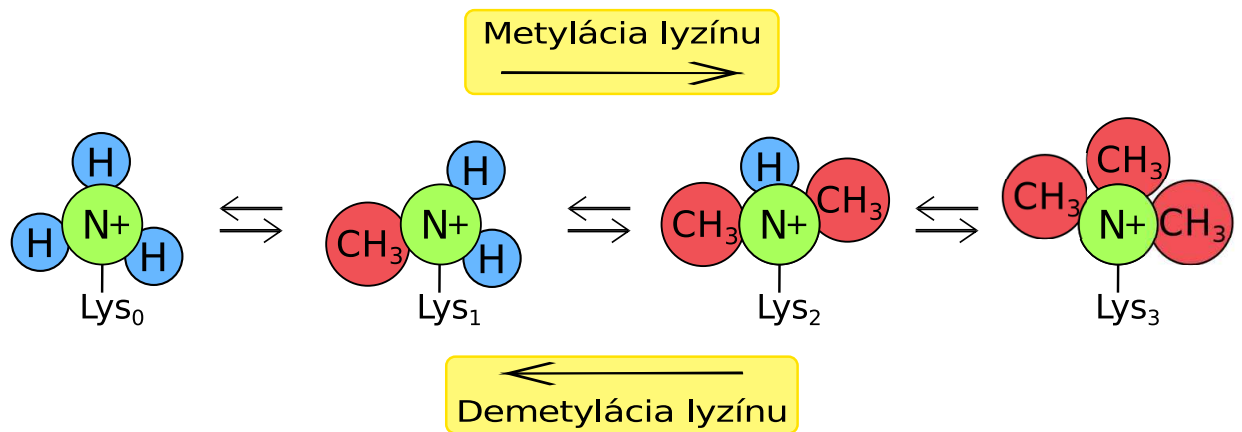
Acetylácia bola ako prvá modifikácia histónov popísaná už v roku 1963. Spôsobuje zníženie pozitívneho náboja histónového aminoterminálneho konca, čo má za následok menej kondenzovanú chromatinovú štruktúru. Vďaka takejto štruktúre majú transkripčné faktory zvýšenú prístupnosť ku DNA. Z čoho vypláva, že acetylácia má vždy aktivačný charakter.

V euchromatinovej oblasti jadra sa nachádza viacej acetylovaného lyzínu ako v umlčivanej heterochromatinovej oblasti. K tomu v jednom nukleozóme môže byť acetylovaných až 26 lyzínových reziduí lokalizovaných v aminoterminálnych koncoch histónového okta-meru - H4 (štyri acetylované lyzíny), H3 (taktiež štyri), H2A (jeden) a H2B (štyri).

Najlepšie preskúmanými regulačnými proteínmi s histón deacetylázovou aktivitou sú proteíny SIR (Silent Information Regulatory proteins - regulačné umlčivacie informačné proteíny) (Vyskot, 2010).

4.2.2 Metylácia histónov

Histónová metylácia môže prebehnúť v lyzínových alebo arginínových zvyškoch (obr. 8). Tak ako DNA metylácia aj metylácia histónov je závislá na S-adenozyl-L-metionínu. Ado-Met je druhý najpoužívanejší enzymatický kofaktor hneď po ATP (Choi and Friso, 2009). Na zvyškoch môže prebehnúť aj viacnásobná metylácia napríklad na lyzíne mono- di- a aj tri- metylácia. Na obrázku 8 je znázornená metylácia aminoterminálneho konca histónového lyzínu na metyl-lyzín. Znova metylovaný na dimetyl-lyzín a úplne v pravo ešte raz metylovaný na trimetyl-lyzín. Dolný index lyzínu (Lys) informuje o stupni jeho metylácie.



Obr. 8: Metylácia resp. demetylácia lyzínu

Na metylovanú skupinu na históne sa viažu rôzne heterochromatínové proteíny, napríklad, umlčiaci proteín HP1 čo spôsobuje heterochromatizáciu daného miesta na chromozóme. Mnoho týchto proteínov zdieľa chromodoménu, vďaka ktorej sú súčasťou represívnych proteínových komplexov. Tieto komplexy navodzujú a aj udržujú umlčaný epigenetický stav génov (Vyskot, 2010).

4.2.3 Ubiquitinácia a SUMOylácia

Ubiquitinácia a SUMOylácia histónov sú veľmi odlišnými procesmi v porovnaní s acetyláciou, metyláciou či fosforyláciou. Rozdiel spočíva hlavne v tom, že ide o pomerne veľké polypeptidy a spôsobujú podstatné zväčšenie histónov.

Ubiquitinácia histónov môže mať účinok ako aktivačný tak aj inhibičný v závislosti miesta naviazania. Väčšinou sa viažu na karboxyterminálnu časť H2A a H2B histónov. Hlavnou funkciou ubiquitinácie nie je vytvoriť z histónov cieľ pre proteolýzu, aj keď bežná metabolická reakcia polyubiquitinácia vedie k takejto reakcii, ale vytvoriť signál pre ďalšie faktory. Navyše u reakcie s histónmi sa jedná nanajvýš o monoubiquitináciu. Napríklad, pre niektoré koncové časti H2B histónu to môže znamenať signál pre metyláciu. Histónová ubiquitinácia je dôležitá aj pre inaktiváciu X chromozómu a pre umlčanie skupinou proteínov Polycomb (Choi and Friso, 2009).

SUMOylácia histónov je podobná ubiquitinácií nielen samotným mechanizmom uchytenia sa na histón, ale aj SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) proteínom, ktorý je podobný ubiquitínu a aj sa viaže práve na karboxyterminálnu časť histónu. Sumoylácia je taktiež bežná metabolická reakcia v bunke, ale v tomto prípade zabezpečuje presun proteínov do špecifických oblastí buniek. V prípade histónovej sumoylácie zodpovedá za reguláciu transkripčných faktorov. Jej efekt je výhradne represívny: bráni posttranslačným histónovým modifikáciám a dokonca môžu vyvolávať aktivitu histón deacetyláz (Vyskot, 2010).

4.3 Dedičnosť epigenetických vlastností

Život našich prarodičov, vzduch, ktorý dýchali, jedlo, ktoré jedli a dokonca aj veci, ktoré videli, môžu mať dopad na nás samých, desiatky rokov neskôr. A to aj napriek tomu, že sme tieto veci nezažili. Existuje dôkaz na tieto slová (Bird, 2007)?

Postupne sa vynára čoraz viac nepriamych, ale aj priamych vedeckých dôkazov, že epigenetické prejavy sú dedičné. Dôležité je, že na to, aby vznikla fenotypová zmena, nie je vôbec potrebná zmena v sekvencii DNA čiže v poradí génov. Stačí, ak dôjde k zmene génových aktivít a takáto zmena môže byť dedičná. Hovorí sa dokonca o epigenetických dedičných systémoch (Kováč, 2009).

V práci Champagne a Curleyho (2009) je spomínané, že model metylovanej DNA je zachovaný po delení bunky a tým pádom prenesený z buniek rodičovských do buniek potomka. Ale už 2 roky predtým píše Bird (2007), že ak sa bavíme o dedičnosti, tak presnosť replikácie v tom môže tiež hrať rolu. Pri replikácií DNA sa urobí chyba na každú 10^7 až 10^8 kópií báz. Ale kopírovanie DNA metylácie má presnosť 96%, čo predstavuje jednu chybu na okopírovanie 25 metylovaných miest. To môže byť považované za veľký rozdiel a navyše sa to ukáže už len pri klonovaní jednej bunky, z ktorej veľmi rýchlo vznikne populácia buniek s odlišným vzorcom metylovanej DNA.

V knihe, ktorú editoval Choi (2009) je vysvetľovaná relatívne nízka presnosť kopírovania epigenetických zmien v DNA a v štruktúre chromatinu. Počas procesu delenia si bunka pamätá epigenetické značky, ale môžu byť modifikované faktormi prostredia v ktorom sa bunka nachádza alebo jej vlastným vnútorným prostredím. Typické epigenetické značky sa skladajú z javov, ktoré určujú špecifickosť jednotlivých tkanív a rozdiel medzi zárodočnými bunkami a somatickými bunkami, rovnako ako rozdiel medzi malígnymi bunkami a normálnymi bunkami.

Aj keď chromozómy v štádiu mitotickej metafázy majú potlačenú transkripciu, silná acetylácia euchromatínových oblastí zostáva zachovaná a predstavuje tak jeden z mechanizmov udržania či prenosu epigenetickej informácie (Vyskot, 2010).

Vedci dosiaľ objavili štyri typy epigenetickej dedičnosti (Jablonka, 2005):

1. pamäť génových aktivít (tzv. sebaudržiavacie slučky)
2. štrukturálnu dedičnosť (pamäť architektúry)
3. chromozómovú pamäť (systémy chromatinových značiek)
4. interferenciu RNA (tzv. umlčovanie génov)

Vplyvy zo skorého obdobia života na vývoj materského mozgu a ich vzrastajúce chápanie, môžu ponúknuť náhľad do mechanizmov tohto transgeneračného efektu (Champagne, 2011).

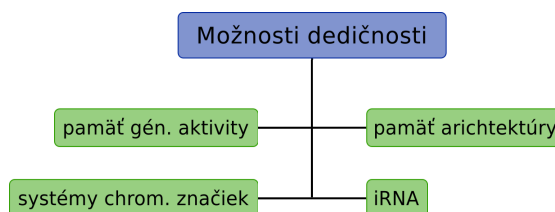
U stavovcov metylovaná sekvecia je CG, ktorá je párová so sekvenciou na opačnom vlákne DNA. Táto symetria znamená, že sú miesta dočasne metlované len na jednom z vlákien DNA (sú hemimetylované) po replikácii DNA. Vzorce CG metylácie sú kopírované medzi generáciami buniek DNA metyltransferázou DNMT1, ktorá „dopĺňa“ hemimetylované vlákno ale nedopĺňa miesta, ktoré neboli metylované (Bird, 2007).

Vďaka kontinuálnej obnove buniek v tele organizmu si dnes vieme predstaviť, že vlastnosti, ktoré organizmus nadobudol počas svojej ontogenézy sa prenášajú do nových buniek. Ale ako sa prenášajú získané vlastnosti z telových buniek do zárodočných, do ďalšej generácie? Ako dokážu epigeneticky získané vlastnosti mnohobunkových živočíchov prekonať mimoriadne účinnú Weissmanovu bariéru medzi somatickými a pohlavnými bunkami? Jedna z odpovedí je dnes už známa: prostredníctvom RNAi. Ide o presne tú RNAi, za ktorú v roku 2006 udelili Nobelovú cenu za fyziológiu alebo medicínu. Prenos získaných vlastností z telových buniek do ďalších generácií je možný aj niekoľkými ďalšími mechanizmami, u cicavcov dokonca cez placentu a mlieko (Kováč, 2009)

4.3.1 Proteíny skupín Polycomb a Trithorax

Proteíny skupín Polycomb a Trithorax, ktoré sú pomenované podľa mutantov mušky octomilky *Drosophila melanogaster*, udržiavajú potlačené alebo aktivované transkribujúce štádium, respektíve, gény dôležité pri vývine. Pri neúplnosti týchto systémov gény, ktoré špecifikujú rôzne časti octomilky spočiatku pracujú správne, ale tento vzorec sa po čase nedokáže udržať (Bird, 2007).

Môžeme z toho usudzovať, že funkcia skupín Polycomb a Trithorax spočíva v stabilizovaní „pamätania si“ vzorca génovej expresie, ktorý bol započatý iným bunkovým mechanizmom. Biochemické štúdie umožnili identifikáciu zložiek dvoch kľúčových Polycomb - proteínových komplexných systémov a zistili tesné spojenie s modifikáciou lyzínového zvyšku na 27. pozícií na históne H3. Akým mechanizmom je sprostredkované umlčovanie medzi generáciami buniek zostáva neobjasnené. (Bird, 2007).



Obr. 9: Epigenetické typy dedičnosti

5 Epigenetické zmeny vplyvom sociálneho prostredia

Zhodujúce sa dôkazy z výskumov primátov a hlodavcov podporujú hypotézu, že prostredie v ktorom matka žije má podstatný vplyv na fenotyp potomkov a že tento vplyv je sprostredkovaný zmenami v expresii génu (Champagne and Curley, 2009).

Narušenie vzťahu medzi matkou a mláďaťom má jednu spoločnú vlastnosť, je spojované s poruchami v reakcii na stres a v materskom správaní u dospelého potomka.

Rôzne typy buniek majú odlišnú reakciu na rovnaký faktor z prostredia, či je to sociálny stres alebo nedostatočná výživa v maternici. A to aj napriek tomu, že všetky bunky v našom tele majú rovnakú genetickú výbavu, akákoľvek reakcia na prostredie v našom tele je špecifická podľa typu bunky. Bunky špecifické pre pečeň reagujú jedným spôsobom, zatiaľ čo bunky - neuróny budú reagovať iným spôsobom alebo mnoho iných typov buniek nereaguje vôbec. Práve preto sa pri určovaní pôsobenia prostredia na organizmus treba zamerať na reakciu špecifických populácií buniek ako sú neuróny, bunky pečene, pankreasu a podobne (Francis, 2011).

5.1 V prenatálnom období

Stres ale aj iné environmentálne faktory, ktoré pôsobia na gravidnú matku, môžu ovplyvniť budúcnosť potomkov a ich správanie.

Medzi samičkami hlodavcov, ktoré boli predtým charakteristické vysokou mierou materskej starostlivosti o svoje mláďatá, absolvovaním chronického stresu počas gravidity, znížili frekvenciu postnatálnej materskej starostlivosti. Takéto chovanie bolo pozorované aj v prípade, ak samičky vychovávajú a živia nevlastné podstrčené nestresované mláďatá (Champagne and Meaney, 2006; Moore and Power, 1986 in Champagne, 2011). A navyše, efekt pretrvával aj keď tieto samičky boli znovu spárené, čo poukazuje na dlhotrvajúci výkyv regulácie neuroendokrinného systému vo funkcii materského chovania (Champagne, 2011).

Práve sociálne prostredie je jeden zo silných faktorov so schopnosťou spôsobovať veľký stres. Pôsobenie stresu vplyvom zmeny sociálneho prostredia bolo skúmané aj na morčákoch domácich lat. *Cavia porcellus* (Linnaeus, 1758). Samičky narodené matkám, ktoré boli v nestabilnom sociálnom prostredí počas gravidity, prejavujú tzv. maskulinizované chovanie. Maskulinizácia spočíva v značne frekventovanejšom prejavovaní dvorenia typického pre samca a v hravom správaní pretrvávajúcom do neskoršieho veku ako u samičiek narodeným matkám, ktoré boli v stabilnom prostredí počas gravidity (Sachser and Kaiser, 1996). V nasledujúcich štúdiách boli zistené neurologické zmeny a zmeny v neuroendokrinnom systéme (Kaiser and Sachser, 1998, 2001).

U samcov narodených matkám, ktoré boli v nestabilnom sociálnej skupine počas gravidity, sa prejavujú behaviorálne vzorce zvyčajne patriace len veľmi mladým samčekom (napríklad odpočívanie pri druhom morčati s telesným kontaktom) a to vo väčšej miere

a pretrvávajú do staršieho veku ako obyčajne (resp. ako u samcov narodených matkám, ktoré boli v stabilnej skupine počas gravidity). Navyše ich dvorenie je zahrnuté v hravom správaní. Tento behaviorálny syndróm je pomenovaný ako „behaviorálna infantilizácia“ (Kaiser and Sachser, 2001).

Vplyv na pohlavné správanie bol skúmaný aj na iných druhoch a ich kmeňoch napríklad, na potkanoch lat. *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) a myšiach domácich lat. *Mus musculus* (Linnaeus, 1758), u ktorých boli skúmané aj dopady v iných oblastiach. U potkana kmeňa Wistar je v emocionálnom správaní vo zvýšenej miere úzkostné chovanie a v otvorených priestoroch znížené exploratívne chovanie. U samcov sú navyše horšie výsledky v úlohách na priestorovú orientáciu (ale bez zmeny v Morrisovom vodnom labyrinte) (Aleksandrov et al., 2001).



Obr. 10: Potkan v cieľi z Morrisovho vodného labyrintu
Brendan Hare and Gerry Herrera z
<http://www.med-associates.com/medlines/winter09/inourlab.html>

5.2 V postnatálnom období

Výsledky rôznych štúdií z ktorých je čerpané, sú rozdelené do skupín:

1. individuálne intradruhové rozdiely v materskej starostlivosti
2. zámerné narušenie a modifikácia kontaktu matka - mláďa
3. úplná absencia materského kontaktu
4. hrubé zaobchádzanie s mláďatami
5. adaptívny vývoj

5.2.1 Individuálne intradruhové rozdiely v materskej starostlivosti

Prirodzené rozdielnosti v materskej starostlivosti sú prenášané skrz generácie. Potkanie samičky matiek s vysokou mierou materskej starostlivosti vykazujú vysoké hodnoty starostlivosti aj ku svojim mláďatám. Zatiaľ čo samičky matiek s nízkou mierou materskej starostlivosti vykazujú menej starostlivosti ku svojim mláďatám. Pokusy s krížom podstrčenými mláďatami preukázali, že je pravdepodobnejšie, že tieto zmeny vo fenotype potomkov sú spojené s mierou poskytovanej popôrodnej materskej starostlivosti, ako s genetickými alebo prenatalnými faktormi (Champagne et al., 2003; Francis et al., 1999).

Jeden z cieľov ďalších štúdií bolo preskúmať následky takto prirodzene sa vyskytujúcej odchýlky v materskej starostlivosti. Medzi laktujúcimi samicami potkanov kmeňa Long Evans sú značné odchýlky vo frekvencii poskytovania starostlivosti mláďatám počas prvého týždňa po pôrode (Champagne et al., 2003). Selektovali sa samičky, ktoré poskytujú materskej starostlivosti menej alebo viac ako je priemer. Počiatočné štúdie dokázali spojitosť medzi mierou poskytovania materskej starostlivosti a reaktivitou na stres. Samci, ktorý sú potomkovia samíc s vyššou frekvenciou starostlivosti, prejavujú aktívnejšie exploratívne chovanie v novom prostredí, a pri reakcii na stres majú znížené hodnoty adrenokortikotropínu a kortikosteronu v plazme, pri porovnaní so samcami matiek, ktoré poskytovali menej materskej starostlivosti (Caldji, Ch. et al., 2000; Liu et al., 2000).

Potomkovia matiek s vysokou intenzitou starostlivosti sa vo výsledkoch merania behaviorálnej a hormonálnej reakcii na stres podobajú na jedincov, kt. bol poskytovaný handling (viac v kapitole 5.2.2). Zatiaľ čo potomkovia matiek s nízkou intenzitou starostlivosti mali porovnateľné výsledky s jedincami, ktorým nebol poskytovaný handling.

Mláďatá narodené matkám, ktoré poskytovali vysokú intenzitu materskej starostlivosti boli pri narodení podstrčené matkám s nízkou intenzitou poskytovania materskej starostlivosti a naopak. Takéto pokusy potvrdzujú priamy vzťah materskej starostlivosti s postnatálnym vývinom individuálnych rozličností v správaní a v hormonálnych reakciách na stres (Francis et al., 1999; Cameron et al. 2005).

Potomkovia matiek s vysokou mierou starostlivosti vykazujú lepšie výsledky v testoch nielen na priestorovú orientáciu ale aj na pamäť (Liu et al., 2000). Navyše neuronové bunky v hipokampe takýchto potomkov majú lepšiu schopnosť prežiť a majú menší výskyt počtu apoptóz (Champagne and Curley, 2009).

Rozdielnosti v krvnom tlaku (meranom v dospelosti) u potomkov potkanov rôznych línií ako je spontánne hypertenzívna línia (SHR) a Wistar Kyoto línia (WKY) sú spojované s rozdielnymi úrovňami frekvencie materskej starostlivosti a prichádzaním ku mláďatám ako aj pozíciou pri kojení (Myers et al., 1989). Krížovým podstrčením mláďat od WKY matiek matkám SHR línie, sa WKY fenotyp zmení na ten, čo majú biologicky potomkovia SHR matiek. Tento jav poukazuje na význam variácie materského prostredia v sprostredkovaní rozdielností u týchto dvoch línií (Myers et al., 1989).

Ďalšia štúdia sa venuje zmenám v postnatálnom prostredí, preto je zaradená v tejto kapitole, aj keď potomkov vymenili prenatálne.

Líniové odlišnosti v materskej starostlivosti u kmeňov Balb/c a C57BL/6 myší hrajú rolu pri vplyve na stresovú reaktivitu potomkov. Embryá myší C57BL/6 sú prenatálne prenesené do Balb/c matiek a neskôr aj nimi vychované. Takýmto myškám sa vyvinú charakteristiky podobné myšiam Balb/c. Je znížena aktivita exploratívneho chovania v novom prostredí, a vo väčšej miere vykazujú úzkostlivé správanie. Balb/c samice prejavujú zníženú úroveň popôrodnej materskej starostlivosti v porovnaní so samičkami C57BL/6 myší aj keď charakteristiky, ktoré odlišujú prenatálne prostredie u týchto línií je neznáme (Francis, 2011).

Zvýšená materská starostlivosť	Znížená materská starostlivosť
- poskytovaná prirodzene - spôsobená handlingom a chovom v spoločných hniezdach	- poskytovaná prirodzene - spôsobená stresom počas gravidity - dlhodobým pravidelným odlúčením
a ich niektoré pozorované dôsledky	
↑exploratívneho chovania	↓ exploratívneho chovania
↓ aktivity HPA osy	↑ aktivita HPA osy
lepšia pamäť	↓ priestorová orientácia aj v Morrisovom lab.
↓ množstvo apoptóz v hipokampe	↑ množstvo apoptóz
↑ prežitie neurónov v hipokampe	maskulinizácia/infantilizácia
	poruchy v sociálnom správaní
	↓ reaktivita imunity

Tabuľka 1: Niektoré dôsledky materskej starostlivosti

Variabilita v poskytovaní materskej starostlivosti môže byť použitá k predvídaní fenotypu v dospelosti. U opice druhu mačiak vervet lat. *Chlorocebus pygerythrus* (F. Cuvier, 1821) žijúcej v stabilnej sociálnej skupine, sa materské chovanie mení v dvoch smeroch: 1. ochrana, resp. v častom vyhľadávaní kontaktu s mláďaťom a 2. odmietanie, ktoré je spojené s častými pokusmi prerušiť kontakt alebo opustiť mláďa. Reakcia na nové prostredie u rok až dva roky starých mláďat je spojená so zmenami v poskytovaní materskej ochrany, kde zvýšená ľahostajnosť v novom prostredí je spojená s častejším poskytovaním materskej ochrany (Fairbanks and McGuire, 1988 in Champagne and Curley, 2009).

5.2.2 Zámerné narušenie a modifikácia kontaktu matka - mláďa

Handling² praktizovaný počas raného veku u malých myší a potkanov znižoval intenzitu behaviorálnej aj neurálnej reakcie na stres v dospelosti a to prostredníctvom hypotalamo-pituitárno-adrenálnej (HPA) osy. Tieto zistenia ukázali, že aj základné obranné reakcie na hrozby sú ovplyvnené prostredím, v ktorom sa narodili a vyrastali (Levine, 1994).

Levin a ďalší (1994) navrhli, že efekty handlingu mohli byť pozorované vďaka zmene v materskej starostlivosti. A skutočne, handling spôsobil zvýšenie frekvencie v popôrodnej materskej starostlivosti (Liu et al., 1997), čo ďalšie štúdie aj potvrdili (Francis et al., 1999).

Zameranie sa na rozdiely medzi samicami vychovávajúce svoje mláďatá v štandardných hniezdach alebo v spoločných, skupinových prinieslo zaujímavé výsledky. Ak laktujúce samice vychovávajú mláďatá v spoločných hniezdach, zvyšujú frekvenciu opateri a materskej starostlivosti oproti samiciam v štandardných podmienkach. Naznačuje to, že frekvencia materskej starostlivosti sa môže meniť vplyvom postnatálneho prostredia (Curley, 2009). Počas prvého týždňa po pôrode, laktujúce samice potkanov a myší prejavujú vysoké hodnoty vo frekvencii kojenia a v kontakte s mláďatami sprevádzané s pravidelným opatovaním. Frekvencia týchto typov správania je v rámci línii a aj medzi líniami variabilná (Champagne et al., 2003).

Skúmanie dôsledkov predĺžených období separácie medzi matkou a mláďatom taktiež preukázali dlhodobé pôsobenie narušenia materského prostredia na ďalší vývoj potomka. U primátov, sa obdobia separovania matky predlžovali pomocou doby potrebnej k získaniu potravy, ktorá sa náhodne menila počas celého dňa (Rosenblum and Pauly, 1984 in Champagne and Curley, 2009).

Potomkovia vychovaní za daných podmienok prejavovali behaviorálnu inhibíciu³, zníženú aktivitu v sociálnom správaní spojenú so zvýšenou HPA aktivitou. Ďalej boli pozorované znížené hodnoty rastového faktoru, spomalenie a celkové zníženie reaktivity imunity s rôznymi zmenami v mozgu. Navyše k vytvoreniu dlhšej materskej separácií pomocou variabilného času poskytovania potravy sa ukazuje zníženie materskej zodpovednosti pri kontakte s potomkami čo naznačuje, že pozorované dopady môžu byť sprostredkované zmenami aj v kvalite a nie len v kvantite prijatej starostlivosti (Rosenblum et al., 2001 in Champagne and Curley, 2009).

Podobný efekt bol pozorovaný u hlodavcov, taktiež vytvorením variabilnosti v prístupe ku potrave alebo vytvorením intervalov umelým fyzickým odlúčením matky od mláďaťa (Lehmann and Feldon, 2000 in Champagne and Curley, 2009).

Paradigma materského odlúčenia, zahrňujúc hodiny dennej separácie matky a mláďaťa, má aj krátkodobé aj dlhodobé dôsledky na reaktivitu HPA osy. Vedie ku kaskáde

²Handling z angličtiny znamená manipulácia, v tomto prípade, so zvieratami. Jednoduché krátke každodenné presúvanie, napríklad, myšiek z jednej chovnej nádoby do druhej. Uprednostňujem používanie daného výrazu kvôli jasnej interpretácii.

³obmedzené správanie všeobecne v celom spektre prejavujúceho chovania

behaviorálnych a neurobiologických zmien i keď dôslednosť a riadenie týchto zmien bolo diskutované. Takéto manipulácie sú zvyčajne spojované so zníženým exploratívnym správaním, s behaviorálnou inhibíciou, zvýšenými hodnotami kortikosterón uvoľňujúci hormónu (CRH) a s ďalšími neuro - hormonálnymi zmenami (Plotsky and Meany, 1993).

Kognitívne schopnosti sú tiež pozmenené za daného výchovného prostredia. Je pozorovaná znížená aktivita v Morrisovom vodnom labyrinte, znížené určité hodnoty v mozgu a zvýšená apoptóza buniek. Samičky, oddelené od ich matiek na 5 hodín každý deň počas obdobia pred odstavom, poskytujú svojim mláďatám materskú starostlivosť so zníženou frekvenciou (Fleming et al., 2002).

5.2.3 Úplná absencia materského kontaktu

Umelý odchov potkaních mláďat v úplnej absencii postnatálneho materského kontaktu má za následky významné poruchy vo vývoji nervovej sústavy: porucha pozornosti, hyperaktivita a poruchy v sociálnom správaní. Samice vyrastajúce v takýchto podmienkach poskytujú starostlivosť svojim potomkom so zníženou frekvenciou (Lovic and Fleming, 2004).

Harlowov umelý výchovný vzor, v ktorom boli mláďatá makaka rhesusa lat. *Macaca mulatta* (Zimmermann, 1780) sociálne izolované v intervaloch 3 - 12 mesiacov znázorňuje, že normálny vývin vyžaduje viac ako jednoduchý prístup k primeranej výžive. Mláďatá vychovávané v takomto prostredí prejavujú značné nedostatky v hravom správaní a vykazujú zvýšenú úroveň agresie k rovesníkom. Majú zlé výkony v učení a kognitívnych rozlišovacích úlohách. Ďalej sa u nich prejavuje behaviorálna inhibícia spojená s vyššou mierou bojovnosti v reakcii na nové podnety (Harlow and Suomi, 1971).

Tieto behaviorálne vzorce pretrvávajú do dospelosti a tým menia reprodukčnú úspešnosť. Obzvlášť u umelo vychovávaných samičkách, ktoré potom hrubo zaobchádzajú s mláďatami a prejavujú vo zvýšenej miere zanedbávanie a infaticídu (Harlow and Suomi, 1971). Makakom rhesus bez materskej starostlivosti, ktorým je poskytovaná interakcia s rovesníkmi s rovnakým pohlavím majú taktiež zvýšenú reaktivitu osy HPA, nedostatky v učení a v sociálnom správaní. Naznačuje to, že tieto zmeny sú spôsobené narušením vzťahu medzi matkou a mláďaťom ako všeobecný následok sociálnej izolácie (Fahlke et al., 2000 in Champagne and Curley, 2009).

Podobne je to pri úplnej materskej absencii u mláďat hlodavcov v popôrodnom období. Absencia materského kontaktu vedie k zvýšenej reaktivite osy HPA, k zníženiu miery exploratívneho chovania v dospelosti a je spojovaná s pohybovou hyperaktivitou. Ďalej môžu vzniknúť aj poruchy v kognitívnych procesoch. Takto vychovávané samičky prejavujú nízku mieru poskytovania materskej starostlivosti a vôbec veľmi malo kontaktu s mláďaťom pričom majú poruchy v hormonálnej predpríprave k materskému správaniu (Lovic and Fleming, 2004).

5.2.4 Hrubé zaobchádzanie s mláďatami

Podobný prenos správania je pozorovaný aj u postnatálnej hrubej⁴ starostlivosti. Keď poškodenie samičky ako mláďatá zažili takéto chovanie, tak rovnakú starostlivosť poskytujú aj svojim potomkom. F2 potomkovia týchto F1 samičiek majú zvýšené hodnoty metylácie v hipokampe a v iných častiach mozgu (Roth et al., 2009).

Individuálne rozdiely v hrubej starostlivosti medzi makakmi rhesus a makakmi beruklat. *Macaca nemestrina* (Linnaeus, 1766) po pôrode, sú taktiež spojované s behaviorálnymi a neurobiologickými charakteristikami jedinca (Maestripieri et al., 2005). U mláďat s hrubým zaobchádzaním počas prvých 3 mesiacoch je v nasledujúcich 4 - 6 mesiacoch vysoký výskyt krikú, zívania a iných príznakov nepohody u mláďat (Maestripieri et al., 2005). Vysoká úroveň materského odmietnutia prejavene týmito samicami je spojená so zvýšeným výskytom hier o samote a zmenami v mozgu ich potomkov. Prehodením a podstrčením mláďat od matiek s hrubým zaobchádzaním matkám, ktorí neprejavujú takéto chovanie sa zistilo, že tieto efekty sú spôsobené na základe prijatej starostlivosti (Maestripieri et al., 2005).

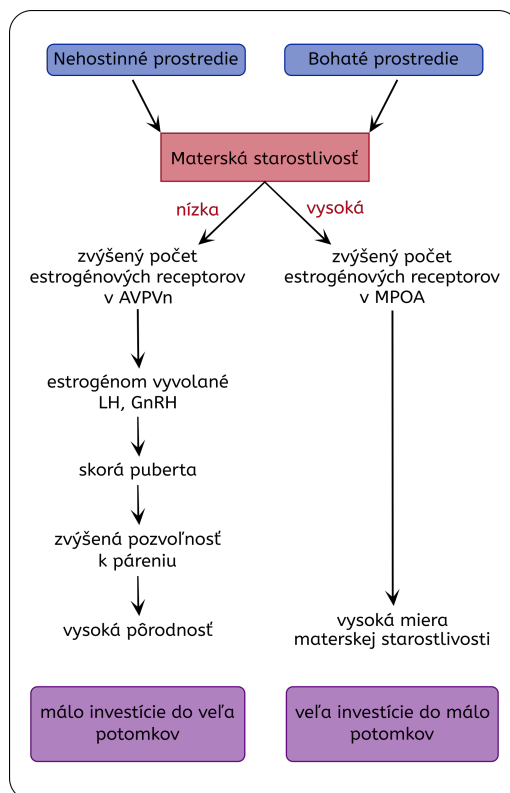
5.2.5 Adaptívny vývoj

Nevie sa či prenatálne vplyvy vo všeobecnosti, na správanie sú adaptívnym prínosom alebo jednoducho len patologickým dôsledkom obmedzení (Kaiser and Sachser, 2005). Vo viacerých štúdiách sa takéto vplyvy vysvetľujú hypotézou adaptívneho vývoja.

Stres a úzkosť rodiča je prenášaná na potomka. Takýmto medzigeneračným prenosom individuálnych odlišností v reaktivite na stres sa môže manifestovať adaptívny vývoj. Nehostinné prostredie sa vyznačuje nutričnou depriváciou, násilím a infekciami. Stresové reakcie poskytujú prirodzenú obranu proti takýmto podmienkam. Je teda pochopiteľné, že rodičia žijúci vo veľmi náročnom prostredí budú prenášať na svojich potomkov vyššiu úroveň reaktivity na stres. Naopak, vo viac priateľskom prostredí prenášajú na svojich potomkov optimistický vzorec vývoja charakterizovaný miernymi reakciami na stresovú situáciu (Cameron et al., 2005).

Na obrázku 11 je ilustrácia reprodukčnej stratégie, ktorá je spojovaná s nízkymi resp. s vysokými hodnotami materskej starostlivosti. Nehostinné podmienky prostredia počas vývoja môžu viesť k zníženej starostlivosti a ku kaskáde neuroendokrinných zmien u mláďat samičieho pohlavia. Vyvoláva skorú pubertu, vysokú pozvoľnosť k páreniu a tým zvýšenie reprodukčnej úspešnosti. V opačnom prípade, pri výchove s častou starostlivosťou, sa u samičích potomkov vyvinie senzitivita na estrogén v materskom krvnom obehu a zdedia fenotyp s vysokou mierou materskej starostlivosti (Champagne, 2011).

⁴hrubé správanie, zanedbávajúce, odmietavé, násilné, výnimočne až infanticídne, preložené z anglického abusive behavior



Obr. 11: Reprodukčná stratégia
Pozmenené z Champagne, 2011

5.3 V neskoršom období

U potkanov, kmeňa Long–Evans, vyrastajúcich po odstavě v štandardných chovných podmienkach, je v F2 generácii pozorovaný reálny prenos fenotypu reprezentujúceho úroveň frekvencie materskej starostlivosti. Ak potomkovia matiek s nižšou frekvenciou starostlivosti vyrastajú v obohatenom chovnom prostredí je pozorované, že svojim mláďatám poskytujú viacej starostlivosti. Navyše sa u nich prejavila odpovedajúca zmena aj v reaktivite HPA osy. A práve fenotyp vysokej frekvencie materskej starostlivosti je prenesený na F2 potomkov týchto samíc. Rovnako ako keď potomkovia matiek s vysokou frekvenciou starostlivosti vyrastajú v sociálnej izolácii, tak je u nich pozorovaná nízka frekvencia materskej starostlivosti voči svojim mláďatám. Takýto fenotyp sa tiež preniesie na F2 samičky (Champagne, 2011; Francis et al., 2002).

U morčiat domácich bolo pozorované, že dôsledky, ako sú maskulinizácia samičiek a behaviorálna infatnilizácia u samcov, z prenatálneho materského stresu, sa dajú zmierniť až zvrátiť. Tento efekt sa dá dosiahnuť, ak v období po odstavě, vyrastajú v skupine rovesníkov oboch pohlaví (Kaiser and Sachser, 2005).

6 Záver

V práci sú popísané základy epigenetiky a jej mechanizmov, vrátane veľmi zložitých procesov negenetického prenosu. Literatúra na túto tému je veľmi obsiahla a podrobná a niektoré kategórie sa nedajú jednoducho definovať, či už hĺbkou do akej treba zasiahnúť pre pochopenie alebo inými faktormi.

Práca môže byť prínosom pre študentov, ktorý sa chcú jednoducho zorientovať v danej oblasti. Keďže je epigenetika väčšinou spracovaná veľmi odborne je veľmi náročná a navyše informačne zdroje sú hlavne v anglickom jazyku.

V kapitole epigenetických zmien vplyvom sociálneho prostredia sú popísané mnohé ešte z väčšieho množstva rôznych efektov a dopadov na vplyv jedinca resp. potomka alebo matky, ktoré sú spôsobené zmenou sociálneho prostredia či už aplikovanom umelo, prirodzene a to na matku či potomka. Tieto dopady nám môžu poskytnúť podklad pre ďalšie výskumy v rôznych oblastiach napríklad pre rozšírenie v práci spomenutej hypotézy adaptívneho vývoja. Krátkodobé odlúčenie handlingom zvýšilo materskú starostlivosť ale dlhodobejšie odlúčenie už pôsobilo opačným efektom. K dĺžke odlúčenia budú ďalšie štúdie určite prínosom. Ďalej nám môžu pomôcť k objektívnejším výsledkom rôznych výskumov pri ktorých sa testujú farmakologické lieky práve na stres (napríklad handling dokáže toto ovplyvniť). Alebo môžu dopomôcť k zlepšeniu chovu a k významnému prehĺbeniu predošlých znalostí, napríklad pre zamedzenie stresu u gravidnej samici.

Zoznam literatúry

- Aleksandrov, A. A., Polyakova, O. N., and Batuev, A. S., 2001, The effects of prenatal stress on learning in rats in a Morris maze, *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 31, (1), 71–74.
- Balon, E. K., 2004, Alternative Ontogenies and Evolution: A Farewell to Gradualism., in B. K. Hall, R. D. Pearson, and G. Müller, editors, *Environment, development, and evolution: Toward a synthesis*, The Vienna series in theoretical biology, MIT Press, Cambridge, Mass, ISBN 0-262-08319-1, 37–66.
- Bird, A., 2007, Perceptions of epigenetics, *Nature*, 447, (7143), 396–398.
- Caldji, Ch., Josie, D., and Michael, M. J., 2000, Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity, *Biological Psychiatry*, 48, (12), 1164–1174.
- Cameron, N. M., Champagne, F. A., Parent, C., Fish, E. W., Ozaki-Kuroda, K., and Meaney, M. J., 2005, The programming of individual differences in defensive responses and reproductive strategies in the rat through variations in maternal care, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29, (4), 843–865.
- Carey, N., 2012, *The epigenetics revolution: how modern biology is rewriting our understanding of genetics, disease, and inheritance*, Columbia University Press, New York, ISBN 978-0-231-16116-9.
- Champagne, F. A., 2011, Maternal imprints and the origins of variation, *Hormones and Behavior*, 60, (1), 4 – 11.
- Champagne, F. A. and Curley, J. P., 2009, Epigenetic mechanisms mediating the long-term effects of maternal care on development, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 33, (4), 593–600.
- Champagne, F. A., Francis, D. D., Mar, A., and Meaney, M. J., 2003, Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development, *Physiology & Behavior*, 79, (3), 359–371.
- Choi, S.-W. and Friso, S., editors, 2009, *Nutrients and epigenetics*, CRC Press, Boca Raton, ISBN 978-1-4200-6354-7.
- Cota, P., Shafa, M., and E., D., 2013, *Stem Cells and Epigenetic Reprogramming*, in D. Bhartiya, editor, *Pluripotent Stem Cells*, InTech, ISBN 978-953-51-1192-4.
- Curley, J. P., 2009, Social enrichment during postnatal development induces transgenerational effects on emotional and reproductive behavior in mice, *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3, (25).

- Curley, J. P., Jensen, C. L., Mashoodh, R., and Champagne, F. A., 2011, Social influences on neurobiology and behavior: Epigenetic effects during development, *Psychoneuroendocrinology*, 36, (3), 352 – 371, in *Search Of The Biological Basis Of Mood Disorders: Exploring Out Of The Mainstream*.
- Dahlen, H., Kennedy, H., Anderson, C., Bell, A., Clark, A., Foureur, M., Ohm, J., Shearman, A., Taylor, J., Wright, M., and Downe, S., 2013, The EPIIC hypothesis: Intrapartum effects on the neonatal epigenome and consequent health outcomes, *Medical Hypotheses*, 80, (5), 656–662.
- Dudley, K. J., Li, X., Kobor, M. S., Kippin, T. E., and Bredy, T. W., 2011, Epigenetic mechanisms mediating vulnerability and resilience to psychiatric disorders, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35, (7), 1544 – 1551.
- Elaine, N. M. and Katja, H., 2012, *Human Anatomy & Physiology Books a La Carte Edition.*, Benjamin-Cummings Pub Co, ISBN 978-0-321-80218-7.
- Fleming, A. S., Kraemer, G. W., Gonzalez, A., Lovic, V., Rees, S., and Melo, A., 2002, Mothering begets mothering: the transmission of behavior and its neurobiology across generations, *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 73, (1), 61–75.
- Francis, D., Diorio, J., Liu, D., and Meaney, M., 1999, Nongenomic Transmission Across Generations of Maternal Behavior and Stress Responses in the Rat, *Science*, 286, (5442), 1155–1158.
- Francis, D. D., Diorio, J., Plotsky, P. M., and Meaney, M. J., 2002, Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity, *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22, (18), 7840–7843.
- Francis, R. C., 2011, *Epigenetics: the ultimate mystery of inheritance*, W.W. Norton, New York, 1st ed edition, ISBN 978-0-393-07005-7.
- Grewal, S. I. S. and Jia, S., 2007, Heterochromatin revisited, *Nature Reviews. Genetics*, 8, (1), 35–46.
- Harlow, H. F. and Suomi, S. J., 1971, Social Recovery by Isolation-Reared Monkeys, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68, (7), 1534–1538.
- Jablonka, E., 2005, *Evolution in four dimensions: genetic, epigenetic, behavioral, and symbolic variation in the history of life*, Life and mind, MIT Press, Cambridge, Mass, ISBN 0-262-10107-6.

- Kaiser, S. and Sachser, N., 1998, The social environment during pregnancy and lactation affects the female offsprings' endocrine status and behaviour in guinea pigs, *Physiology & Behavior*, 63, (3), 361–366.
- Kaiser, S. and Sachser, N., 2001, Social stress during pregnancy and lactation affects in guinea pigs the male offsprings' endocrine status and infantilizes their behaviour, *Psychoneuroendocrinology*, 26, (5), 503–519.
- Kaiser, S. and Sachser, N., 2005, The effects of prenatal social stress on behaviour: mechanisms and function, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29, (2), 283–294.
- Kováč, V., 2009, Vybrané aspekty evolučnej vývinovej biológie, AQ-BIOS, spol. s r. o., Bratislava, ISBN 978-80-970224-5-7, URL <http://www.aqbios.com/Vybrane-aspekty-evo-devo-05.pdf>.
- Levine, S., 1994, The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 746, 275–293.
- Liu, D., Diorio, J., Day, J. C., Francis, D. D., and Meaney, M. J., 2000, Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats, *Nat Neurosci*, 3, (8), 799–806.
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P. M., and Meaney, M. J., 1997, Maternal Care, Hippocampal Glucocorticoid Receptors, and Hypothalamic- Pituitary-Adrenal Responses to Stress, *Science*, 277, (5332), 1659–1662.
- Lovic, V. and Fleming, A. S., 2004, Artificially-reared female rats show reduced pre-pulse inhibition and deficits in the attentional set shifting task-reversal of effects with maternal-like licking stimulation, *Behavioural Brain Research*, 148, (2), 209–219.
- Mack, G. S., 2013, The Stunning Potential of Gene Silencing: Nobel Laureate Craig C. Mello, Technical report, URL <http://www.thelifesciencesreport.com/>.
- Maestripieri, D., Lindell, S. G., Ayala, A., Gold, P. W., and Higley, J. D., 2005, Neurobiological characteristics of rhesus macaque abusive mothers and their relation to social and maternal behavior, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29, (1), 51–57.
- Myers, M. M., Brunelli, S. A., Shair, H. N., Squire, J. M., and Hofer, M. A., 1989, Relationships between maternal behavior of SHR and WKY dams and adult blood pressures of cross-fostered F1 pups, *Developmental Psychobiology*, 22, (1), 55–67.
- Nicoli, A., Capodanno, F., Moscato, L., Rondini, I., Villani, M., Tuzio, A., and La Sala, G., 2010, Analysis of pronuclear zygote configurations in 459 clinical pregnancies obtained

with assisted reproductive technique procedures, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8, (1), 77.

Petronis, A., 2011, *Brain, behavior, and epigenetics*, Epigenetics and human health, Springer, Heidelberg, ISBN 978-3-642-17425-4.

Plotsky, P. M. and Meaney, M. J., 1993, Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats, *Brain Research. Molecular Brain Research*, 18, (3), 195–200.

Roth, T. L., Lubin, F. D., Funk, A. J., and Sweatt, J. D., 2009, Lasting Epigenetic Influence of Early-Life Adversity on the {BDNF} Gene, *Biological Psychiatry*, 65, (9), 760 – 769.

Sachser, N. and Kaiser, S., 1996, Prenatal social stress masculinizes the females' behaviour in guinea pigs, *Physiology & Behavior*, 60, (2), 589–594.

Savage, J. M., 1971, *Evolution*, Holt, Rinehart and Winston, London, ISBN 978-0-03-910125-1.

Sweatt, J. D., editor, 2013, *Epigenetic regulation in the nervous system: basic mechanisms and clinical impact*, Academic Press, London ; Waltham, MA, ISBN 978-0-12-391494-1.

Vyskot, B., 2010, *Epigenetika*, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, ISBN 978-80-244-2534-4.

Waddington, C., 1940, *Organisers & genes*, Cambridge biological studies, The University Press, URL <http://books.google.cz/books?id=9Ak6AAAAAAAJ>.

Weinhold, B., 2006, Epigenetics: The Science of Change, *Environmental Health Perspectives*, 114, (3), A160–A167.

Zoznam obrázkov

1	Modely pôsobenia prostredia a génov na správanie	9
2	Zo zygoty komplexný človek	10
3	Lamarcková žirafa	11
4	Waddingtonov model epigenetickej krajiny	12
5	Stavba nukleozómu	13
6	Epigenetické procesy	15
7	Metylácia DNA	16
8	Metylácia resp. demetylácia lyzínu	19
9	Epigenetické typy dedičnosti	21
10	Potkan v cieli z Morrisovho vodného labyrintu	23
11	Reprodukčná stratégia	29