

Západočeská univerzita v Plzni

Fakulta filozofická

Bakalárska práca

2017

Jana Tichá

Západočeská univerzita v Plzni

Fakulta filozofická

Bakalárska práca

**Vplyv epigenetickej regulácie aktivity génov
rodičov na embryogenézu potomstva**

Jana Tichá

Plzeň 2017

Západočeská univerzita v Plzni
Fakulta filozofická
Katedra antropologie
Študijný program Antropologie
Študijný odbor Sociální a kulturní antropologie

Bakalářská práce
Vplyv epigenetickej regulácie aktivity génov
rodičov na embryogenézu potomstva
Jana Tichá

Vedoucí práce:

Mgr. Lukáš Friedl, Ph.D.

Katedra antropologie

Fakulta filozofická Západočeské univerzity v Plzni

Plzeň 2017

Prehlasujem, že som prácu vypracovala samostatne a použila len uvedené pramene a literatúru

Plzeň, apríl 2017

.....

Podakovanie

Predovšetkým by som chcela poďakovať vedúcemu mojej práce, Mgr. Lukášovi Friedlovi, Ph.D., za jeho vládny prístup a pripomienky a taktiež mojej rodine za podporu.

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 GÉNOVÁ EXPRESIA.....	6
2.1 Genetické úrovne génovej expresie.....	6
2.2 Epigenetické úrovne génovej expresie.....	7
3 TYPY EPIGENETICKÝCH REGULÁCIÍ.....	9
3.1 Metylácia a demetylácia DNA.....	9
3.1.1 Význam CpG ostrovčekov.....	10
3.1.2 Význam DNA metyltransferáz.....	10
3.2 Histónové modifikácie	11
3.2.1 Históny a štruktúra chromatínu	11
3.2.2 Typy histónových modifikácií.....	12
3.3 Epigenetická regulácia na úrovni RNA.....	14
4 VPLYV ENVIRONMENTÁLNEHO PROSTREDIA NA FENOTYP.....	16
4.1 Prejavy (de)metylácie DNA vo fenotype.....	17
4.2 Prejavy histónových modifikácií vo fenotype.....	19
4.3 Prejavy RNA regulácií vo fenotype.....	21
5 EPIGENÓMY V EMBRYOGENÉZE.....	23
5.1 Epigenetická perspektíva gametogenézy.....	23
5.1.1 Spermatogenéza	23
5.1.2 Oogenéza	24

5.1.3	Metylácie DNA a imprintované kontrolné oblasti ICRs v gametogenéze.....	24
5.2	Epigenetická remodelácia v preimplantačnom embryu.....	25
6	POHLAVNE ŠPECIFICKÁ EPIGENETICKÁ EXPRESIA GÉNOV.....	28
6.1	Genómový imprinting.....	28
6.1.1	Mechanizmus genómového imprintingu.....	29
6.1.2	Perspektívy vzniku imprintovaných génov.....	31
6.1.2.1	<i>Hypotéza rodičovského konfliktu.....</i>	<i>32</i>
6.1.2.2	<i>Hypotéza koadaptácia matky a potomstva</i>	<i>34</i>
6.1.2.3	<i>Intralokusový pohlavný konflikt.....</i>	<i>35</i>
6.1.3	Príklady fenotypových prejavov dysregulácie genómového imprintingu.....	36
6.2	Inaktivácia X chromozómu.....	38
6.2.1	Imprintovaná inaktivácia, reaktivácia a náhodná inaktivácia chromozómu v samičom embryu	39
6.2.2	Mozaicizmus inaktivovaného X chromozómu.....	41
6.2.3	Príklady fenotypových prejavov dysregulácie inaktivovaného X chromozómu.....	42
7	DEDIČNOSŤ EPIGENETICKÝCH ZMIEN.....	45
7.1	Priama epigenetická dedičnosť'.....	45
7.2	Multigeneračná expozícia.....	46
7.3	Transgeneračná epigenetická dedičnosť'.....	47
7.3.1	Epimutácie.....	48
7.3.2	Ďalšie príklady transgeneračnej dedičnosti.....	49

8	ZÁVER.....	52
9	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY.....	54
10	RESUMÉ.....	65
11	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	66
12	OBRAZOVÉ PRÍLOHY.....	70

1 ÚVOD

Téma tejto bakalárskej práce je v zásade evolučne-vývojovo biologická. Hoci sa o evolúcii zmieňujeme iba kontextuálne, je to platforma tvoriaca rámec celej práce. Zároveň chceme aplikovať genocentrický pohľad na dynamiku vývoja; obecné ako je variácia fenotypu závislá na génovej variácii; a konkrétne v tomto prípade, ako sa epigenetická regulácia expresie génov podpisuje pod variabilitu fenotypu.

Epigenetika je relatívne mladý rozvíjajúci sa odbor, ktorý vznikol v kontexte výskumov v genetike a biochémie. Základ pre vznik epigenetiky položil v 30. rokoch 20. storočia T.H.Morgan; zaujímala ho príčina genomickej ekvivalencie; prečo sa bunky s rovnakou genetickou výbavou dokážu diferencovať a plniť špecializované funkcie v priebehu ontogenézy. Dnes sa už vie (Spivakov et al., 2007), že sa embryonálne kmeňové bunky dokážu špecializovať bez zmeny v samotnom genóme a že tieto procesy zmeny riadia "nad-genetické" regulácie. Tie "nad-genetické", alebo epi-genetické regulácie (termín epigenetika zaviedol v 40. rokoch 20. storočia Conrad Waddington) začala skúmať vývojová biológia v súvislosti so zmenami v postzygotickom období zárodka. Mikrobiológ David L. Nanney v 50. rokoch začal rozlišovať dva typy systémov bunkovej kontroly. Prvý systém funguje podľa predlohy predpísanej sekvenciami DNA; to je genetický systém. Druhý, s odkazom na Waddingtona, je epigenetický systém a určuje špecifické nastavenie genetickej informácie pre konkrétnu bunku, pričom zdôraznil, že epigenetický systém je závislý na genetickom (Deichmann, 2016).

Faktory epigenetických regulácií, ktoré ovplyvňujú vypnutie alebo zapnutie génu, sa nachádzajú v samotnom organizme a sú telu vlastné, príkladom môže byť chybná translácia mRNA, ktorá spustí proces epigenetických zmien, alebo sa zdroj môže nachádzať mimo organizmus vo vonkajšom prostredí, napríklad v ovzduší, v potrave, v chemických látkach okolo, ale napríklad aj v strese, ktorý na organizmus pôsobí.

Termín epigenetická krajinka, ktorý použil Conrad Weddington, je metaforický výraz pre bunku, ktorá počas svojho vývoja mení metabolické dráhy v závislosti na zmene životných podmienok. Weddington pri pokusoch s octomilkou (*Drosophila melanogaster*) zisťoval, nakoľko môžu vonkajšie environmentálne podmienky vyvolať zmeny v metabolizme buniek vedúcich k odlišnému fenotypu, a či túto zmenu môžu zdediť ďalšie generácie (Viskot, 2010). Termínom epigenetika definoval fenotypové rozdiely pozorované v neprítomnosti genetických zmien. Slovo "dedičnosť" je obsiahnutá aj v inej definícii epigenetiky podľa Gerdy Egger: "*Pojem Epigenetika zahŕňa všetky meioticky a mitoticky dedičné zmeny v génovej expresii, ktoré nie sú kódované v samotnej sekvencii DNA*" (Baedke,2013). Epigenetické regulácie spôsobujú najčastejšie vypnutie alebo zapnutie génu, prípadne oslabenie, alebo zosilnenie jeho účinku. DNA metylácia alebo acetylácia, modifikácia a fosforylácia histónov, genómový imprinting alebo remodelizácia chromatinu; všetky majú účinok na remodeláciu epigenómu¹ s dosahom na zmeny vo fenotype², ale tento stav nemusí byť stabilný; niekedy však môže napríklad metylácia cytozínu spôsobiť bodovú mutáciu génu a tá, pokiaľ sa preniesie do ďalšej generácie môže vyvolať evolučné zmeny.

Fenotypová plasticita spôsobená reguláciou expresie génov vyvolanou environmentálnymi faktormi otvorila diskusie na tému, nakoľko sa rovnaký fenotyp indukuje prostredím v každej ďalšej generácii znova aj bez dedičnosti. Čiže epigenetická variabilita fenotypov s rovnakou genetickou informáciou by mohla umožniť väčšie prispôbenie sa prírodnému prostrediu bez nutnosti tlaku na zmeny genómu, čím by zvýšila adaptabilitu organizmu, hoci to spomaľuje evolúciu. Na druhej strane, pokiaľ vyvolaná epigenetická zmena vedie k novému dedičnému fenotypu, ktorý zostane stabilný aj pri zmenách prostredia, na procese evolúcie sa zúčastňuje.

¹ epigenóm - genóm obsahujúci epigenetické zmeny.

² fenotyp - súhrn vonkajších dedičných znakov a vlastností organizmu daný realizáciou genotypu.

Výskumy regulácie génovej expresie vonkajšími faktormi sa rozišli dvomi základnými smermi. U prokaryotických organizmoch sa postupne zistilo, že je ich adaptabilita závislá na schopnosti vypínať a zapínať gény v reakcii na zmenené environmentálne prostredie. Schopnosť zapínať a vypínať gény podľa potreby totiž významne šetrí energiu organizmu, na rozdiel od stavu permanentnej pohotovosti zapnutých génov. Stav získanej génovej expresie dokážu jednobunkové organizmy následne dediť po celé generácie (Neuhof et al.,2016). U eukaryotických organizmoch sa výskumy sústredili na modelové organizmy prvokov a kvasiniek a niektorých druhov rastlín, u bezstavovcov na hlístice a octomilku, ale našu pozornosť nasmerujeme predovšetkým na cicavce a na človeka. Je nutné zdôrazniť, že samotný komplexný eukaryotický organizmus si zložito reguluje svoje stále vnútorné prostredie (hormonálne, rastovými faktormi), takže je ťažké rozlíšiť mieru, nakoľko sú epigenetické faktory rozhodujúce pri regulácii expresie. V skutočnosti vonkajší faktor ovplyvní expresiu len niektorých génov, ale následne až ich génové produkty ovplyvnia expresiu iných, dôležitejších génov, takže konečná regulácia majúca dopad na fenotyp je výsledkom viacerých regulačných elementov (Matouš et al.,2010, str.334). Pokiaľ je však expresia génu indukovaná v jednej, napríklad somatickej bunke, prenesie sa aj do dcérskej bunky a tento typ dedičnosti je obvykle vysoko stabilný a môže sa prejavíť vo fenotype (Jablonka a Lamb.,1998). Ale už nemusí byť stabilný v medzigeneračnom prenose. Keďže väčšina pokusov sa vykonáva v experimentálnych umelých podmienkach, nie je úplne jasné nakoľko sa táto variabilita prejaví v populačnej dynamike. Jedna časť epigenetiky sa preto venuje ekológii, kde sa výsledky molekulárnych štúdií a riadených experimentov overujú v prírodných populáciách (Baedke,2013).

Epigenetika je teda multidisciplinárny odbor, ktorý v sebe zahŕňa syntézu molekulárnej, vývojovej a evolučnej biológie ako aj ekológie. V súvislosti so zameraním na človeka v rámci vonkajších epigenetických faktorov nie sú nepodstatné ani kultúrne vplyvy. Dá sa povedať, že aj kultúrne vzorce v stravovaní, v liečení, v odolávaní stresu atď., majú vplyv

na reguláciu génovej expresie s účinkom na fenotyp, variabilitu a na dedičnosť. To je vlastne dôvod, prečo som si primárne vybrala túto tému. Tak ako je genetika a biochémia človeka spätá s biologickou antropológiou, súvisí epigenetika tiež s kultúrnou a sociálnou antropológiou.

Či sa epigenetická regulácia expresie génov zúčastňuje procesu evolúcie je otázka, na ktorú odpoveď sa hľadá v procesoch, ktoré prenášajú expresiu do ďalšej generácie. Nakoľko je tento prenos stabilný a nakoľko reverzibilný? Nás budú zaujímať epigenetické regulácie ovplyvňujúce génovú expresiu u rodiča, ktoré sa nejakým spôsobom prejavujú a zasahujú do embryogenézy jeho potomkov. Vedie nás k tomu predpoklad, že pokiaľ niektoré typy epigenetických regulácií nesú potenciál evolučnej zmeny, musia sa určitým spôsobom prejavíť v embryogenéze. Ďalším cieľom tejto práce bude nájsť odpoveď na otázku, nakoľko sú epigenetické regulácie génovej aktivity prenášané v embryogenéze na potomka závislé na pohlaví rodiča. Logický predpoklad je, že sa viac prejavia maternálne epigenetické vplyvy, keďže navyše pôsobia na genóm potomka in utero. Pokiaľ je to tak, väčší potenciál evolučnej zmeny majú dedičné epigenetické regulácie pôsobiace na embryo v materskej línii. Ďalej nás bude zaujímať, ako a aké vonkajšie environmentálne faktory ovplyvňujú embryonálny epigenetický program skrz parentálne epigenómy.

Pre potreby bakalárskej práce bude najvhodnejšou metódou zmapovanie výsledkov vedeckého bádania v tejto oblasti. Aby sme mohli poskytnúť relevantné odpovede, bude potrebné sa zoznámiť s epigenetickými reguláciami obecné v eukaryotických organizmoch a s ohľadom na človeka v genóme cicavcov a vysvetliť základné mechanizmy epigenetiky. Z dostupnej odbornej, prevažne zahraničnej literatúry preštudujeme články s problematikou epigenetiky a ujasníme si výber konkrétnych epigenetických mechanizmov. Bližšie jednotlivé typy epigenetických regulácií budeme štrukturovať do samostatných podkapitol, pričom výsledkom a zároveň cieľom tejto bakalárskej práce bude zodpovedanie výskumných otázok: Je epigeneticky regulovaná

expresia génov transgeneračne prenosná? Je epigeneticky podmienená expresia génov transgeneračne stabilná? Je prenos expresie génov z rodiča do embryogenézy potomka závislé na pohlaví nositeľa (na pohlaví embrya)? Napríklad aké vonkajšie faktory iniciujú aktivitu regulačných mechanizmov? Ako vonkajšie faktory iniciujú aktivitu regulačných procesov expresie tohto typu? V záverečnej časti zhrnieme nadobudnuté informácie a výsledkom by mala byť syntéza poznatkov poskytujúca bližšiu predstavu o tom, aký vplyv majú konkrétne typy epigenetických regulácii aktivity génov u rodičov na embryogenézu ich potomstva s ohľadom na možný potenciál evolučnej zmeny.

2 GÉNOVÁ EXPRESIA

Génová expresia je komplexný proces vyjadrenia genetickej informácie, ktorá je uložená v DNA. V tomto procese dochádza k prepisu genetickej informácie zo štruktúrneho génu³ do mRNA a následne do štruktúry polypeptidového reťazca. Výsledný proteín ako produkt génu podmieňuje funkcie bunky.

Približne z 30 000 génov ľudského genómu vzniká 1×10^6 proteínov, pričom len ich malá časť dokáže fungovať izolovane; väčšina spolupracuje s ostatnými formou proteínových sietí, v ktorých vzájomné väzby prechodne vznikajú a zanikajú. Signály z vonkajšieho prostredia sa prostredníctvom receptorov prenášajú do vnútra bunky pôsobením proteínových interakcií signálnych molekúl. Tým ovplyvňujú rôzne bunkové procesy, medzi nimi aj expresiu génov⁴. Pre pochopenie expresie génov je dôležité poznať nielen štruktúru DNA, ale tiež priebeh bunkového cyklu, samotnú štruktúru jadra a chromatínu, ktorý sa v ňom nachádza.

2.1 Genetické úrovne génovej expresie

Génovú expresiu z pohľadu genetiky je možné rozdeliť do známych základných procesov ako je transkripcia DNA do RNA odohrávajúca sa v jadre bunky, v ktorej prebieha aj úprava RNA-transkriptov realizovaná pridaním čiapočky, polyadenyláciou a odtránením intrónov. Po týchto posttranskripčných modifikáciách pre-mRNA sa výsledná mRNA transportuje cez jadrovú membránu do cytoplazmy a tam sa spája s ribozómami nachádzajúcimi sa na membránach endoplazmatického retikula. Po spojení mRNA s ribozómami prebehne následná translácia do polypeptidov a taktiež posttranslačné úpravy novo nasyntetizovaných proteínov. V eukaryotických bunkách sú tieto deje fyzicky oddelené, keďže prebiehajú v organelách na rôznych miestach. Gény dôležité pre

³ štruktúrny gén - úsek DNA na chromozóme, ktorý sa prepisuje do mRNA.

⁴ Vávrová, dostupné na: <http://genetika.upol.cz/download.aspx?id=312&t=0>

chod bunky sa exprimujú neustále, ale ostatné gény sa aktivujú iba vtedy, keď sú ich produkty v bunke potrebné. (Snustad a Simmons, 2009) Génová expresia je proces dynamický, previazaný a neustále regulovaný na úrovniach, ktoré spolu úzko súvisia a sú tiež odpoveďou na zmeny bunkového prostredia.

2.2 Epigenetické úrovne génovej expresie

Regulácia génovej expresie v štruktúre bunky sa uskutočňuje na troch úrovniach a riadia ju faktory, ktoré sa môžu nazývať epigenetické. To "nad" genetické riadenie spočíva v tom, že aktivitu génov regulujú bunkové faktory, ktoré sa nachádzajú mimo DNA (Wells, 2005). Podľa Matouša, *"mechanizmy týchto regulácií nie sú zapísané v sekvenciách báz DNA a prebiehajú ako bezprostredné reakcie bunkových elementov na zmenené podmienky nachádzajúce sa mimo DNA"*. V podstate však treba mať zakaždým na zreteli, že genetické a epigenetické faktory pôsobia v bunke spolu a súčasne (Matouš, 2010).

Regulácia génovej expresie prebieha v princípe na troch úrovniach v rámci určitej perspektívy. Na tej najvyššej pôsobia regulácie na úrovni bunkového jadra a súvisia s teritóriom, ktoré tam zaberá chromozóm v interfáze⁵ bunkového cyklu. To ako sa chromatín (viac v kapitole 3.2.1) v rámci tohoto teritória v bunkovom jadre priestorovo organizuje, vytvára určité špecifické oblasti - domény, ktoré majú odlišné funkcie a makromolekulárne zloženie. Existuje predpoklad, že lokalizácia génov v rámci konkrétnych domén bude ovplyvňovať ich aktivitu (van Driel, et al, 2003).

Samotný chromatín je platforma pre druhú úroveň regulácií génovej aktivity. Na tejto úrovni odráža aktivitu génov stav konformácie chromatínu nachádzajúceho sa v rôznych miestach jadra v interfáze bunkového cyklu. Geometrické usporiadanie chromatínu ovplyvňujú

⁵ interfáza bunkového cyklu - obdobie, kedy sa bunka pripravuje na delenie.

faktory, ako napríklad metylácia DNA, modifikácia histónov a enzýmy remodelujúce chromatín (Maston *et al.*,2006).

Na najmenej úrovni prebieha regulácia počas génovej transkripcie a vzťahuje sa k regulácií individuálneho génu prostredníctvom regulačných sekvencií ako sú promotory, tzn. úseky na DNA, ktoré rozpoznávajú príslušný gén prostredníctvom enzýmu RNA polymerázy II a iniciujú transkripciu rozpoznáním jej začiatku (Okano *et al.*,1999). Ďalej sú to enhancery a silencery, čo sú zosilovače a zoslabovače transkripcie. Na tieto sekvencie sa naviažu špeciálne regulačné proteíny a RNA polymerázy , ktoré zvyšujú expresiu príslušných génov. Interakcie medzi zosilovačmi a promotormi dokážu zablockovať iné krátke sekvencie DNA tzv. izolátory (Snustad a Simmons, 2009).

3 TYPY EPIGENETICKÝCH REGULÁCIÍ

V tejto kapitole si vysvetlíme mechanizmy určitých typov modifikácií, ktoré epigeneticky regulujú expresiu génov v bunke. Je to klasifikácia podľa nositeľov prenášanej epigenetickej informácie. Je možné ich rozdeliť na určité základné skupiny; chemická modifikácia štandardných aminokyselín DNA ako je napríklad metylácia alebo demetylácia, ktorá sa uplatňuje tiež ako posttranslačná modifikácia; potom sú to zmeny v stabilite transkriptu a v posttranslačných úpravách na úrovni mRNA; tiež sú to modifikácie histónov, napr. metylácia alebo acetylácia, ktoré majú vplyv na štruktúru chromatínu; pričom jednotlivé typy modifikácií, tak ako ilustruje obrázok č.1, sa navzájom ovplyvňujú a medzi sebou interferujú (Moosavi and Ardekani,2016).

3.1 Metylácia a demetylácia DNA

Najčastejšou epigenetickou modifikáciou DNA v eukaryotických organizmoch je metylácia cytozínovej bázy nukleotidov DNA bez zmeny jej kódujúceho významu. Je to proces, v ktorom dochádza k naviazaniu metylovej skupiny ($-CH_3$) na cytozín (obr.2). Táto reakcia je katalyzovaná pomocou DNA-metyltransferáz (DNMT) a zdrojom metylovej skupiny je aminokyselina S-adenosyl-L-methionin (SAMe). Prostredníctvom DNMT sa kovalentne modifikuje uhlík cytozínovej bázy najčastejšie v pozícii 5 na mieste CpG dinukleotidov (Jones a Takai, 2001).

Demetylácia DNA je proces, pri ktorom dochádza k odstráneniu metylovej skupiny z 5mC. Tento proces môže byť do určitej miery pasívny; po replikácii DNA sa nový reťazec nemetyluje (napríklad z nedostatku DNMT), alebo aktívny; pokiaľ demetylácia prebehne nezávisle na replikácii, napríklad prostredníctvom nejakého hypometylačného činidla (Bodorovsky et al.,2013).

3.1.1 Význam CpG ostrovčekov

CpG nukleotidy sú v genóme cicavcov rozložené nerovnomerne a takmer 80% z nich je metylovaných, avšak netýka sa to CpG ostrovčekov. Pokiaľ sa dinukleotidy CpG ("p" označuje fosfodiesterovú väzbu medzi guanínom a cytozínom) vyskytujú na pomerne krátkych úsekoch DNA, je ich hustota v týchto miestach veľmi vysoká a vtedy sa týmto úsekom hovorí CpG ostrovčeky. V ľudskom genóme je asi 30 000 takýchto oblastí a väčšinou sa nachádzajú blízko promotorov génu, v ktorých sa začína transkripcia (Esteves et al.,2013). Cytozíny v ostrovčekoch nebývajú zvyčajne metylované; vtedy ich stav napomáha transkripcii. Avšak, pokiaľ metylované sú, regulujú génovú expresiu; napr. spôsobujú inaktiváciu príslušného génu (Jeanisch a Bird,2003). Molekula DNA sa metyláciou pozmení vo svojej konformácii na úrovni veľkého žliabku, ktorá sa tým pádom neprelína s normálnym párovaním a v oblasti CpG ostrovov sa stáva hypersenzitívnou na štiepenie DNA metyltransferázou. Metylácia teda spôsobuje chromatinovú prestavbu (Daekin et al.,2014).

3.1.2 Význam DNA metyltransferáz

Enzýmy, ktoré katalyzujú pridanie metylovej skupiny na cytozín sú DNA metyltransferázy. U cicavcov boli detekované tri druhy DNA metyltransferáz. Enzýmy DNMT1, DNMT2 tvoria prvé dve skupiny, tretia skupina obsahuje enzýmy DNMT3a, DNMT3b, DNMT3L. Niektoré metylujú DNA *de novo*, ale väčšina metyluje iba nemetylované vlákno v hemimetylovanej DNA. Pri replikácii DNA, pokiaľ je jeden reťazec už metylovaný (tj.hemimetylovaná DNA), bude reťazec, syntetizovaný podľa metylovaného reťazca tiež metylovaný (Okano et al.,1999).

DNMT1 je označovaná ako udržovacia metyltransferáza; označenie súvisí s tým, že sa podieľa na udržovaní a rozširovaní metylačných vzorcov, ktoré už v bunke existujú. "DNMT1 funkčne interaguje so špecifickými enzýmami, ktoré remodelujú chromatín, aby sa umožnila

úplná metylácia hemi-metylovanej DNA v chromatine (Schrader et al.,2015) DNMT2 má pomerne vysokú afinitu k transférovým RNA transkriptom a uplatňuje sa aj pri metylácii DNA (Scheafer et al, 2010). DNMT3a, DNMT3b katalyzujú vznik nových metylačných vzorcov na DNA (*de novo*) počas vývoja na nemodifikovanom templáte DNA. Globálna *de novo* metylácia sa objavuje v skorej emryogenéze po masívnej demetylačnej vlne, ktorá nastáva počas prvého bunkového delenia (Guenther,2011), Potom je DNA metylácia znovu pripravená pre nové epigenetické naprogramovanie. Gény pre DNMT3a a DNMT3b sú veľmi bohato exprimované v embryonálnych pluripotentných⁶ bunkách, kým v diferencovaných sa udržiava ich nízka aktivita. DNMT3L je enzymaticky najaktívnejší regulačný faktor *de novo* metylácií a uľahčuje vznik väzby medzi DNMT a DNA. Funguje ako kofaktor⁷ pre ostatné DNMT. Katalytická aktivita DNMT3a a DNMT3b sa zvýši pôsobením DNMT3L až 15-násobne (Okano et al.,1999).

3.2 Histónové modifikácie

3.2.1 Históny a štruktúra chromatinu

Chromatín, nachádzajúci sa v jadre eukaryotickej bunky, je v podstate dvojzávitnica DNA zabalená do nukleoproteínového komplexu prostredníctvom histónov (obrázok č.3 a č.4). Okrem nukleoproteínov, DNA a histónov obsahuje tiež proteíny nehistónovej povahy. Osem histónových proteínov zložených zo štyroch typov histónov – H2A, H2B, H3 a H4 sa špecificky naväzujú na DNA a vytvárajú základnú štruktúru podjednotku chromatinu, takzvaný nukleozóm. Tieto históny obsahujú kladne nabitú aminokyselinovú zvyšku tzv. v N-terminálnom konce, ktorých súčasťou je argín a lyzín, a vďaka kladnému náboju interagujú s negatívne nabitými fosfátmi DNA, alebo s inými proteínmi. Aminokyseliny

⁶ pluripotentné bunky - viz kapitola 5.2

⁷ kofaktor - nízkomolekulová, neaminokyselinová štruktúra nutná pre funkciu enzýmu.

na N-terminálnom konci sa zúčastňujú celej škály posttranslačných epigenetických modifikácií ako je acetylácia, metylácia či fosforylácia. Posttranslačné zmeny histónov regulujúce transkripciu génov sa nazývajú histónový kód. Histón H1 oddeľuje dva navzájom susediace nukleozómy, takže má najväčší vplyv na skladanie, alebo teda na kondenzáciu chromatínu do štruktúr vyššieho rádu (obr.2) (Kimmins,2005).

Chromatín v jadre bunky podlieha rôznym úrovniám kondenzácie a v žiadnom prípade nie je jeho štruktúra statická; navyše zakrúcaním alebo odkrúcaním spôsobuje zmeny zloženia štruktúry chromozómov. Pokiaľ chromatín obsahuje menej skondenzované (menej zakrútené) molekuly DNA s rozvolnenými väzbami s histónmi, je transkripčne aktívny a nazýva sa euchromatín; viac skondenzovaný a teda viac zakrútený a tým pádom transkripčne takmer neaktívny je heterochromatín. Schopnosť chromatínu zmršťovať sa alebo rozbaľovať závisí na miere chemických modifikácií histónu H1. Stupeň kondenzácie ovplyvňuje mieru génovej expresie. Viac skondenzovaný heterochromatín je spojený s vysokým stupňom metylácie DNA, a s nízkym stupňom acetylácie histónov (Bannister a Kouzarides, 2011)

Veľký význam pri prestavbe na heterochromatín má proteín HP1, patriaci do nehistónovej frakcie chromatínu. Má tri izoformy HP1 α , HP1 β a HP1 γ líšiace sa lokalizáciou aj funkciou; pričom každá forma reaguje s inými enzýmami a proteínmi. HP1 má schopnosť naviazať sa na metylovaný histón H3 a vytvoriť väzbu s globulárnou časťou nukleozómu a tým spustiť prestavbu na neaktívny heterochromatín (Geiman a Robertson,2002).

3.2.2 Typy histónových modifikácií

Medzi najčastejšie modifikácie histónov patrí metylácia a acetylácia a ubiquitinácia lyzínu⁸, metylácia arginínu⁹ a fosforylácia threonínu¹⁰.

⁸ lyzín - esenciálna aminokyselina, kódovaná kodónmi AAA aAAG.

⁹ arginín - esenciálna proteínogénna aminokyselina, prítomná hlavne v protamínoch a histónoch.

Modifikácie histónov ovplyvňujú štruktúru chromatínu zmenou konformácie nukleozómu, čím usmerňujú prístupnosť DNA pre rôzne proteíny a tak sa podieľajú na regulácii génovej expresie. Histónové modifikácie prebiehajú na rôznych aminokyselinových zvyškoch N-terminálnych koncov a môžu mať podobné, ale aj úplne protichodné funkčné efekty. Súbory histónových modifikácií, majúce opačné účinky na aktivitu génu fungujú ako epigenetický spínač. Výsledná konformácia chromatínu však závisí na výsledku ich celkovej interferencie. Napríklad, pokiaľ je metylovaná pozícia H3K9 (metylácia lyzínu 9 na históne H3) a naviaže sa na ňu proteín HP1, gén je neaktívny. Ale, pokiaľ prebehne fosforylácia na pozícii H3S10 (fosforylácia serínu¹¹ 10 na históne H3), aktivuje sa transkripcia génu, ale zároveň už neprebehne metylácia pozície H3K9 (Deakin et al.,2014).

Pri metylácii histónov je rozhodujúca pozícia aminokyselinového zvyšku lyzínu alebo arginínu na N-terminálnom konci za prítomnosti enzýmu histon metyltransferázy (HMT-asa) (bližšie vysvetlené v kapitole 3.2.1.). Metylácia neovplyvňuje celkový náboj histónových koncov, ale vďaka hydrofóbnosti zvyšuje priľnavosť k molekule DNA, ktorá je odolnejšia voči štiepeniu tým, že obmedzuje svojou uzavretou štruktúrou prístup proteínom. Predpokladá sa, že metylácia histónov má irreverzibilný charakter, pretože zatiaľ ešte neboli objavené žiadne demetylujúce enzýmy. Pokiaľ demetylácia prebieha, jedná sa o prirodzenú alebo riadenú degradáciu. To, ako metylácia histónu ovplyvňuje transkripciu génu sa líši podľa toho, na akom type histónov a akých aminokyselinových zvyškoch metylácia prebehne a aká je ich vzájomná kombinácia. Takže obecné síce metylácia histónov vedie k umlčaniu génu, ale za určitých konštelácií spôsobí pravý opak (Koryakov,2006).

Aktivita enzýmu histon acetyltransferázy (HAT-asa) korešponduje s aktivitou transkripčného aparátu a je prepojená s aktiváciou

¹⁰ threonín - esenciálna glukoplastická aminokyselina, kódovaná tripletmi ACU,ACA,ACC a ACG.

¹¹ serín - neesenciálna, glukoplastická aminokyselina, kódovaná tripletmi UCU, UCC a i.

transkripcie. Acetylácia prebieha na lyzíne N-terminálnych koncoch histónov, pričom kladný náboj lyzínu sa pridaním acetylovej skupiny neutralizuje. To má za následok zníženie celkového kladného náboja histónových koncov a nižšiu afinitu k záporne nabitej DNA (Koryakov,2006). To spôsobuje určité rozvolnenie nukleozómu a lepší prístup regulačných proteínov k DNA. Z toho vyplýva, že acetylácia podporuje génovú aktivitu (Canovas a Ross,2016).

Fosforylácia histónov sa uskutočňuje na seríne a treoníne histónových koncov a podobne ako acetylácia má vplyv na náboj modifikovaného histónu. Vyskytuje sa u všetkých typov histónov. Z funkčného hľadiska súvisí s kondenzáciou mitotického chromozómu a s bunkovými diferenciačnými procesmi. Keď na históne H1, spájajúcom dva nukleozómy, prebehne väčší počet fosforylácií, histón sa zmenou náboja oddiali od DNA, a tým sa chromatín rozvolní a sprístupní pôsobeniu enzymatických komponentov. Dôsledkom tejto modifikácie je aktivácia transkripcie v čase dekondenzácie chromatínu, ale tiež napríklad mitotická kondenzácia chromozómov. Fosforylácia a jej opačný proces - defosforylácia- prebieha pôsobením enzýmov kináza¹² a fosfatáza¹³ (Ausio et al.,2001).

Ubiquitinácia je modifikácia histónov veľkými molekulami ubiquitínu, čo je polypeptid tvorený až 76 aminokyselinami. Tie sa viažu na C terminálne konce lyzínových zvyškov na histónoch H2A a H2B za pôsobenia enzýmov ubiquitinových ligáz¹⁴ a proteáz¹⁵(Koryakov,2006).

3.3 Epigenetická regulácia na úrovni RNA

RNA v bunke tvoria dve základné skupiny; sú to kódujúce mediátorové RNA (mRNA), a nekódujúce ncRNA. Mediátorová jednvláknová RNA vzniká v priebehu transkripcie DNA a slúži ako prepis pre výrobu bielkoviny. Medzi nekódujúce RNA (ncRNA) patrí transférová

¹² kináza - enzým, ktorý prenáša fosfátovú skupinu na cieľovú molekulu.

¹³ fosfatáza- enzým, ktorý odstraňuje fosfátovú skupinu.

¹⁴ ligáza- enzým katalyzujúci spojenie fragmentov polynukleotidových reťazcov.

¹⁵ proteáza- enzým rozkladajúci bielkoviny na menšie časti.

tRNA, ktorej funkciou je rozpoznávanie kodónov na mRNA, na základe ktorých priraduje aminokyseliny do rastúceho polypeptidového reťazca a ribozómová rRNA, ktorá ako súčasť ribozómov má katalytickú, rozpoznávaciu a štruktúrnú funkciu (Friedman et al.,2008). V užšom zmysle ncRNA sa jedná o krátke, mikro RNA (miRNA), ktoré vznikajú z dlhej dvojvláknovej RNA, ktorá sa pôsobením enzýmu Dicer "rozkrája" na malé, cca 20-30 báz dlhé miRNA – tzv. krátke interferujúce RNA (siRNA), ktoré majú symetrické konce; 3'koniec je hydroxylovaný, a 5'koniec je fosforylovaný. Tieto molekuly sú komplementárne k mRNA a pokiaľ sa na ňu naviažu, sú schopné potlačiť expresiu génov tým, že zabrali miesta pre iné molekuly potrebné pre prepis do polypeptidu. Tento jav je známy ako RNA interferencia (RNAi) (Kim a Rossi,2007) Tieto siRNA sa naviažu do viacložkového ribonukleoproteínu, známeho ako komplex RISC (RNA induced silencing complex - RNA multiproteínový umlčovací komplex). RISC potom degraduje mRNA tak (viz. obrázok 5. v prílohe), že siRNA, ktoré RISC obsahuje sa naviažu na komplementárne sekvencie mRNA (Akashi a Taira, 2017). RISC štiepi mRNA za pôsobenia enzýmu endonukleázy Argonaut 2. Pokiaľ je siRNA spárovaná s mRNA dokonale, dôjde k úplnej degradácii mRNA, pokiaľ je spárovanie nedokonalé, translácia mRNA sa zastaví a syntéza polypeptidov sa potlačí (Kim a Rossi,2007).

4 VPLYV ENVIRONMENTÁLNEHO PROSTREDIA NA FENOTYP

"*Pokiaľ sú organizmy vystavené stresu spôsobenému vysokou teplotou, odpovedajú syntézou skupiny proteínov, ktoré pomáhajú stabilizovať vnútrobunkové prostredie* (Snustad a Simmons, 2009, str. 603). Uvádžajú, že u drozofily je proteín teplotného šoku HSP70 kódovaný rodinou génov *hsp70*. Expresia týchto génov nastáva až keď sa teplota zvýši na 33 °C, takže až vonkajšie environmentálne prostredie indukuje génovú expresiu. Konkrétne sa vplyvom tepla fosforyluje transkripčný faktor HSFT a v takomto zmenenom stave sa naviaže na promotory génu *hsp70*. Naviazaním faktora HSTF sa stanú gény prístupnejšie pre enzým RNA polymeráza II., čo stimuluje expresiu génov a transkripciu proteínu HSP70. Proteíny teplotného šoku chránia nukleové kyseliny v jadre a organelách, pretože by sa mohli poškodiť zvýšenou koncentráciou iónov, a tiež chránia novo syntetizované proteíny, u ktorých ešte nebolo ukonené usporiadanie a tiež práve transportované proteíny¹⁶.

Metylácia DNA, histónové modifikácie a RNA interferencie sú príklady epigenetických regulácií, ktoré bez zmeny sekvencie DNA dokážu ovplyvniť expresiu génov. V predchádzajúcej časti sme predstavili samotné mechanizmy, ktoré modifikujú epigenóm na biochemickej úrovni, ale v tejto kapitole sa budeme zaoberať príkladmi, kedy sa informácie zo životného prostredia prenášajú na epigenóm a aký majú konkrétny dopad na fenotyp.

Okrem prirodzene sa vyskytujúcich zložiek potravín, ako sú napríklad vitamíny alebo rôzne enzýmy, ovplyvňujú epigenómy rôzne chemické látky ako je obsah toxických látok v ovzduší, v potravinách, v ošatení, v predmetoch dennej spotreby, účinok ťažkých kovov, žiarenia, teploty, svetla, alebo aj pôsobenie stresu či celkovej zlej životosprávy. Bezprostredná reakcia organizmu na pôsobenie environmentálnych

¹⁶ <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js13/genetika/web/pages/08-rezistence-k-abiotickym-faktorum.html>

faktorov umožňuje prispôsobenie sa fenotypu v pevne danom genotype. Fenotyp sa tak stáva v meniacom sa prostredí dostatočne plastickým a tým urýchľuje adaptáciu.

Častým vedľajším produktom tohoto priameho pôsobenia však býva zvýšené riziko vzniku rôznych ochorení ako je rakovina, astma, metabolické poruchy, poruchy reprodukcie a iné.

4.1 Prejavy (de)metylácie DNA vo fenotype

Metylácia DNA je jedným z kľúčových mechanizmov epigenetických procesov u cicavcov. Strata metylačného metabolizmu alebo neprítomnosť špecifických proteínov, ktoré sa viažu na metylovanú DNA má na cicavce letálny dopad. Ako doplnok k metylácii DNA sa zúčastňujú ostatné epigenetické typy, modifikácie histónov a miRNA, čiže sa vyskytujú spoločne a spoločne ovplyvňujú expresiu génov (Henning et al., 2013).

Príkladom zmeny metylácie, ktorá spôsobuje rozdielny fenotyp je notoricky známy model myši s alelou génu *agouti*. Rozdielna metylácia tohoto génu spôsobuje rozdielny fenotyp (štíhlu, zdravú myš s hnedou srst'ou a myš so žltou srst'ou, náchylnú k obezite, diabetes a rakovine), aj keď oba fenotypy myši môžu byť geneticky totožné. U zdravej hnedej myši je tento gén zablokovaný metyláciou a preto sa neprejavuje. Pokiaľ metylácia chýba, gén *agouti* sa exprimuje. U gravidných samíc, ktoré boli kŕmené stravou s obsahom metylesterov (kyselina listová, vitamín B12, cholín a betaín), sa zvýšil podiel potomstva s tmavou srst'ou. Metylestery z potravy sa naviazali na DNA a zvýšili úroveň metylácie promotoru retroelementu, z ktorého je riadená expresia génu A^{vy} . Čiže pri vysokej miere metylácie promotoru, docielenej diétou, dochádza k nízkej expresii génu A^{vy} a výsledkom je tmavá srst' (obrázok č.6). Naopak, nízky stupeň metylácie zvyšuje expresiu génu u myších embryí a tie sa následne rodia so žltou srst'ou a s ďalšími typickými fenotypovými

prejavmi (Blewitt et al.,2006). Už spomínaný cholín, ktorý bol súčasťou diéty sa produkuje priamo v tele cicavcov, ale taktiež je dôležitý jeho príjem zo stravy. Podľa Zeisela, *"...dostupnosť cholínu počas gravidity priamo ovplyvňuje epigenetické markery na DNA a na histónoch a mení génovú expresiu potrebnú pre normálny vývoj nervových buniek."* Cholín sa v organizme zúčastňuje množstva procesov, je kľúčovou súčasťou chemickej látky acetylcholínu, zlúčeniny, ktorá má nezastupiteľné miesto v činnosti nervového systému a svalov. Zvýšený materský príjem cholínu spôsobuje u potomkov lepšiu tvorbu synapsí a komunikáciu medzi neurónmi. Cholín môže zvýšiť fluiditu¹⁷ neurónovej membrány a transport tuku do mozgu, čo pozitívne ovplyvňuje rast mozgu plodu. Materská diéta s nízkym obsahom cholínu pozmenila vývoj hypokampu u myší a spôsobila zhoršenie pamäte na celý život. Potomkovia napríklad trpeli na vrodené vady neurálnej trubice (Zeisel, 2011). Metabolizmus cholínu narušuje alkohol.

Existuje veľa ďalších bioaktívnych potravinových zložiek, ktoré majú schopnosť modulovať epigenóm. Tak ako nerovnováha živín môže negatívne ovplyvniť zdravý organizmus, tak pri prebiehajúcom ochorení spôsobenom abnormalitami metylácie DNA môžu bioaktívne potravinové zložky napomôcť k uzdraveniu. Napríklad pri pokuse s kultivovanými bunkami sa ukázalo, že výťažok zo zeleného čaju, látka 3-epigalokatechín galát (EGCG) , alebo látka obsiahnutá v sójových bôboch, genisteín, dokáže v určitej koncentrácii obnoviť metylačné schémy a expresiu tumor supresorových génov. Polyfenol EGCG inhibuje DNA metyltransferázu, pričom táto inhibičná aktivita je spojená s demetyláciou ostrovov CpG v promotóroch a s reaktiváciou metylácie umlčaných génov (Fang et al.,2007). Ľudské štúdie zas ukázali, že bioaktívne látky zo zeleného čaju znižujú metyláciu CDX2 a BMP-2 pri karcinome žalúdka (Henning et al., 2013). Prevencia, alebo reverzia hypermetyláciou indukovanej inaktivácie tumorsupresorových génov

¹⁷ fluidita - tekutosť

alebo receptorov génov pre DNMT môže byť efektívna v prevencii rakoviny (Fang et al.,2007).

Rakovina optikou epigenetiky vzniká tak, že pri vzrastajúcej celkovej demetylácii genómu sa promotéry v blízkosti CpG ostrovov tumor supresorových génov hypermetylujú, čím sa obmedzí ich expresia, takže nedokážu regulovať rast prokancerózných tkanív. Hypometylácie DNA zasa spôsobujú dekonduzáciu chromatinu a nestabilitu chromozómov, čím môžu iniciovať chromozómové aberácie, ktoré sú taktiež spájané so vznikom rakoviny (Cortessis et al.,2012). Rakovina, ktorá vznikla aberantnou metyláciou je našťastie ľahšie liečiteľná ako keď je jej vznik spôsobený mutáciou génu. Príkladom môže byť látka 5-azacytidín, používanou na liečenie myelodysplastického syndrómu, ktorý vzniká nadmernou metyláciou a môže vyústiť do vzniku akútnej leukémie. Látka 5-azacytidín dokáže metyláciu úspešne znižovať, ale jej účinnosť na druhej strane ovplyvňuje celú DNA, čiže má schopnosť odstrániť metyláciu aj z takých génov, kde je naopak potrebná (Laribi et al.,2014).

4.2 Prejavy histónových modifikácií vo fenotype

Zmeny histónových modifikácií môžu ovplyvniť štruktúru a integritu genómu a narušiť normálny priebeh génovej expresie, čo môže spôsobiť už spomínanú rakovinu. Histónové modifikácie prebiehajú spolu s metyláciami DNA a tak sa nedá jednoznačne odlíšiť priamy dopad jedného alebo druhého typu. Napríklad vystavenie gravidnej samice tabakovému dymu (príklad fajčiacej tehotnej ženy) býva spojené so zmenenou metyláciou placentárneho cytochrómu P450 typu a¹⁸, ale tiež so zmenami v miRNA a s histónovými modifikáciami (Whayne, 2015). Tabakový dym priamo ohrozuje zdravie matky, ale samozrejme má dopad na epigenóm plodu. Expozícia dymu zvyšuje riziko metabolického

¹⁸ cytochróm- bielkovina viazaná na membrány, ktorá vo svojej molekule obsahuje hemové skupiny, ktoré zaisťujú prenos elektrónov tak, že sa naviazané iony železa striedavo redukujú a oxidujú z Fe²⁺ na Fe³⁺ a opačne.

syndrómu a kardiovaskulárnych chorôb, potomkovia môžu byť ohrození syndrómom náhleho úmrtia v dojčenskom veku, poruchami správania, hyperaktivitou, zníženou schopnosťou učenia a pozornosti a podobne, pretože toxikanty predčasne aktivujú niektoré acetylcholínové receptory a obmedzujú množenie nervových buniek v mozgu. K psychickým a neurologickým zmenám prispieva aj vyššia expozícia plodov fajčiacich matiek olovu, ktorá sa u novorodencov klinicky manifestuje rôznym stupňom poškodenia mozgu. Najčastejším prejavom býva fetálny tabakový syndróm prejavujúci sa nízkou pôrodnou hmotnosťou a dĺžkou, menším obvodom hlavy a hrudníku. Spôsobuje to hypoxia a podvýživa plodu. Zaujímavé je zistenie, že fajčiace tehotné ženy sú samé menej ohrozené preeklampsiou, pretože dym ovplyvňuje reguláciu antioxidantných systémov v placentе, ale na druhej strane, pokiaľ už preeklampsia u fajčiarky prepukne, tehotenstvo je oveľa viac ohrozené ako u matky nefajčiarky (Suter et al.,2010).

Obezita je spájaná s dysfunkčným metabolizmom epigenetického pôvodu. Obezogény¹⁹ meniace reguláciu energetickej bilancie spôsobujú priberanie na váhe a obezitu. Obezogénna expozícia vedie k zmene epigenómu multipotentných kmeňových buniek v embryu a spôsobuje vyššiu produkciu tukových buniek. Normálne homeostatické mechanizmy, ktoré sa podieľajú na regulácii hmotnosti sú týmito obezogénami zmenené tak, že aj pri bežnej strave a cvičení je prítomná predispozícia k priberaniu. Pri pokuse s myšami, vystavenými počas gravidity obezogénnym endokrinným disruptorom sa našla súvislosť s predispozíciou k obezite a bolo to priamo spojené s epigenetickými zmenami expresie génov transkribujúcich tukové bunky. Potomkovia mali vyšší krvný tlak, horšiu toleranciu glukózy, vyšší obsah triglyceridov²⁰ a

¹⁹ obezogény - chemické látky s vlastnosťami endokrinných rozrušovačov, ktoré neadekvátne regulujú a podporujú ukladanie tukov a adipogenézu v prospech narastania telesnej hmotnosti a vývoja obezity.

²⁰ triglyceridy - tuky nachádzajúce sa v krvi. Zvýšená hladina je spojená s vyšším rizikom srdcových ochorení.

uroveň leptínov²¹ a významne nižšiu expresiu adiponektínu²² v bielom tukovom tkanive. Tento vzťah sa dával do súvislosti s nižšou acetyláciou a vyššou úrovňou metylácie histónu H3 na lyzíne 9 v oblasti promotóru pre adiponektín (Whayne, 2015).

Na základe množstva štúdií je dokázané, že v spojitosti s vekom a odlišným životným štýlom vykazujú identické genotypy jednovaječných dvojčiat väčšiu epigenetickú rozmanitosť (Mathers,2008). Jednovaječné dvojčatá sa rodia s rovnakou DNA a s takmer zhodnými metylačnými vzorcami. Ako plynie čas, ich DNA síce zostáva rovnaká, ale život v odlišnom prostredí s odlišnou stravou a s rozdielnymi stresovými situáciami zapríčiní, že sa epigenetické markery v genómoch dvojčiat pozmenia. Výskum porovnával stupne metylácie DNA a acetylácie histónov H3 a H4 u jednovaječných dvojčiat vo veku 3 až 50 rokov a odhalil, že kým u trojročných dvojčiat bola rozdielna expresia u asi 1000 génov, u päťdesiatročných to bolo približne trikrát viac. S vekom sa teda zvyšovala diverzita epigenetických značiek na genóme, ale všeobecne bol tiež pozorovaný globálny pokles metylácií. Prepokladá sa, že strata metylácie je proces, ktorý sprevádza stárnutie (Fraga a Esteller, 2007).

4.3 Prejavy RNA regulácií vo fenotype

MiRNA je významný epigenetický faktor regulujúci expresiu génov kódujúcich proteíny. U cicavcov tvoria miRNA regulácie až 60%podiel (Friedman et al.,2008). Určité faktory životného prostredia môžu spôsobiť odbúranie starých, alebo vytvorenie nových miRNA. Avšak ani regulácia génovej expresie spôsobenej miRNA nepôsobí izolovane, ale vyvoláva odozvu u ostatných typoch regulácií (Scott et al.,2006). Spustenie nového kauzálneho reťazca môže byť obojsmerné; tak napríklad DNA metylácie a histónové modifikácie dokážu ovplyvniť transkripciu miRNA a naopak,

²¹ leptín - hormón, signalizuje množstvo tuku v organizme a nutričné zásoby. Mj.zvyšuje vychytávanie glukózy.

²² adiponektín - hormón tukového tkaniva. Čím viac hormónu, tým menej tukových buniek.

miRNA majú vplyv na expresiu DNMT3A a DNMT3B a polycombové skupiny génov. MiRNA sa podieľa na modifikácii génov počas genómového imprintingu, v ktorom pohlavne špecifická modifikácia génov v parentálnej generácii vedie k funkčným rozdielom medzi paternálnymi a maternálnymi alelami v potomstve (Jung et al,2010). MiRNA sa podieľa na expresii zhluku génov (*Dlk1-Dio3*), ktoré ovplyvňujú vývoj ľudského mozgu a CNS (Royo a Cavaille,2008). MiRNA ovplyvňuje procesy diferenciácie neurónov počas celej ontogenézy – konkrétne dopad na fenotyp majú molekulárne a morfológické zmeny na dendrických trňov spôsobujúcich synaptickú plasticitu, ktorá ovplyvňuje vyššiu kognitívnu činnosť (Schratt,2006).

Iný príklad dopadu regulácie cez miRNA na fenotyp: odlišne exprimovaná miRNA spôsobujúca zmeny v DNA metylácii bola objavená v nádorových bunkách (Futura et al., 2010). Zaujímavé sú výskumy týkajúce sa exogénnych miRNA, ktoré sa do tela organizmu dostávajú z vonkajšieho prostredia, napríklad z potravy. Zhang et al. vo svojej práci ukázali, že exogénne miRNA, nachádzajúce sa napríklad v ryži, sa môžu po prejení tráviacou sústavou cicavcov absorbovať a dopraviť do orgánov, kde sa naviažu na cieľovú mRNA a spôsobujú zníženú expresiu špecifických proteínov LDLRP1, ktoré sa podieľajú na odstraňovaní lipoproteínov LDL z plazmy. To má za následok zvýšenie hladiny cholesterolu v krvi. (Zhang et al.,2010).

5 EPIGENÓMY V EMBRYOGENÉZE

5.1 Epigenetická perspektíva gametogenézy

5.1.1 Spermatogenéza

V špecializovaných orgánoch reprodukčného systému (človeka), v gonádach, čo sú vaječníky u samíc a semenníky u samcov, sa tvoria pohlavné bunky. Samčie gaméty sa vyvíjajú zo zárodočného epitelu, kedy najskôr vzniknú a mitoticky sa delia prapohlavné bunky – spermatogónie, ktoré sa v období pohlavnej zrelosti zväčšujú a menia na spermatocyty I.rádu, následne meiotickým delením a zrením sa z nich stanú spermatocyty II.rádu s haploidným počtom chromozómov a nakoniec dozrievajú do konečnej formy a sú schopné oplodnenia (Jelínek a Zicháček,2007, str.324). Ešte počas spermatogenézy sa chromatín samčej gaméty remodeluje, umlčí a zhutní protamínami²³ a v takomto stave sa účasní oplodnenia. Konkrétne, paternálny príspevok do embryogenézy vyžaduje DNA a chromatínové štruktúry ako celok, pretože obsahujú vrstvy regulačných elementov, ktoré sú potrebné k expresii alebo na umlčanie génov po preniknutí do vajíčka. Tieto epigenetické značky môžu zahŕňať histónové modifikácie na N-terminálnych koncoch a DNA metyláciu. Zrelé spermie obsahujú transkripčne umlčaný chromatín, ktorý je pomerne náchylný na poškodenie externými činidlami. Takéto poškodenie môže byť pre zrelú spermium fatálne, pretože nemá vyhovujúce korekčné mechanizmy, aby zabránila, alebo opravila takéto poškodenia. Jedinou obranou je štrukturálna chromatínová prestavba v neskoršej fáze spermiogenézy, kedy dochádza k nahradeniu histónov protamínami a k zhutneniu chromatínu do pevnej štruktúry. Zhustená štruktúra chromatínu chráni DNA pred poškodením a umlčuje transkripciu, pretože sa cez ňu nedostane žiadna polymeráza (Jenkins a Carell,2011).

²³ protamíny - proteíny bohaté na arginín, ktorá nahrádzajú históny počas spermatogenézy

5.1.2 Oogenéza

Oogenéza začína vývojom prapohlavných samičích buniek – oogónií na zárodočnom epitele; tie sa mitoticky delia a po ukončení rastovej fázy sa menia na oocyty 1.rádu. U človeka tieto dve fázy prebehnú ešte počas vnútro maternicového vývoja. Od puberty postupne vajíčka dozrievajú a meioticky, s haploidným počtom chromozómov, po dvoch zrecích deleniach vzniknú dve pólové telieska a oocyt – vajíčko, ktoré čaká na oplodnenie (Jelínek a Zicháček,2007, str.324). Genóm oocytu je štrukturovaný viac ako somatické bunky. Jadro oocytu obsahuje špecifické históny H1OO.V porovnaní so samčými jadrami, samičie jadro je tiež transkripčne represívne, obsahuje deacetylované históny H4 a jeho transkripčné faktory sú neaktívne. Takáto represívna štruktúra chromatínu dokáže chrániť genóm oocytu proti rozsiahlym epigenetickým modifikáciám paternálneho genómu po oplodnení (Rideout et al.,2001).

5.1.3 Metylácie DNA a imprintované kontrolné oblasti ICRs v gametogenéze

Zrelé gaméty sa líšia úrovňou metylácie DNA. Celkovo je úroveň metylácie v zárodočných bunkách nízka a v priebehu gametogenézy rastie, pričom spermie vykazujú väčší rozsah metylácie genómu na miestach odlišných od CpG ako oocyty. Podobne, nukleotidy CpG sú tiež rozdielne metylované, pričom oocyty vykazujú vyšší pomer hypermetylovaných CpG (10%) ako somatické bunky (3%) (Cavonas a Ross,2016).

Podľa Rideouta a kolegov, repetitívne sekvencie, ktoré sú obyčajne v somatických bunkách vysoko metylované, nie sú rovnako metylované v gamétach. Niektoré elementy sú viac metylované v spermiách, iné v oocytoch. Metylačné rozdiely medzi genómami gamét sú vidieť u tkanivovšpecifických génov (Rideout et al.,2001).

Imprintované kontrolné oblasti ICRs riadia expresiu imprintovaných génových zhlukov. Metylácie ICRs sa zakladajú v priebehu meiotického

delenia v gametogenéze. *De novo* metylácie maternálnych ICRs je post-meiotická udalosť, ktorá sa vyskytuje po narodení v rastúcich oocytov. Metylácia paternálnych ICRs prebieha pred meiózou v samčích zárodočných bunkách plodu. Vzor metylácie sa dedí v zreých gamétach a potom sa po oplodnení prenáša do buniek embrya. Udržiava sa v chromozómoch nového organizmu, a podlieha druhej všeobecnej demetylačnej vlne, kedy sa v ranej fáze preimplantačného fetálneho vývoja paternálne epigenetické značky v zárodočných bunkách vymažú a potom opätovne nastavujú pohlavne špecifickým spôsobom (obrázok č.7). (Schulz et al.,2010).

Oba rodičovské ICRs majú podobný kvantitatívny vplyv na transkripciu v rannom embryu, avšak účinky maternálnych ICRs boli zamerané na biologické dráhy spojené s rozhraním plodu a placenty a paternálne ICRs vyvolávali rozsiahle účinky v biologických procesoch embrya (Fergusson-Smith,2001).

5.2 Epigenetická remodelácia v preimplantačnom embryu

Oplodnenie nastáva splynutím dvoch pohlavných buniek, gamét – vajíčka a spermie. Splynutím gamét sa vytvorí ženské a mužské prvojadro a pomocou mikrotubulov a mikroelementov postupujú obe jadrá do centra bunky, kde sa spoja (Langmeier et al.,2009) a vytvorí bunku embrya – zygótu – čím spostredkovávajú vznik nového komplexného organizmu. Oplodnené vajíčko sa cestou do maternice, kde prebehne nidácia, rozdelí rýchlym mitotickým delením na dve, štyri a osem buniek, až vznikne blastoméra. V tomto preimplantačnom štádiu sa veľkosť zygóty nemení, ale bunky sa delením zmenšujú. Pohlavie jedinca je určené v okamihu oplodnenia a závisí na pohlavných chromozómoch X a Y (Jelínek a Zicháček,2007, str.294).

Súčasne prebieha rozsiahla epigenetická remodelácia, ktorá určuje a stanovuje bunkové fenotypy. Pre správny prebieh embryogenézy sú potrebné epigenetické regulačné mechanizmy, ktoré zahŕňajú metyláciu

DNA, modifikácie histónov, remodeláciu chromatinu, RNA transkripty. Deliace sa bunky prechádzajú rozsiahlymi epigenetickými, morfológickými a metabolickými zmenami, kedy v bunkách prebieha množstvo biochemických reakcií, ktoré sú katalyzované špecifickými enzýmami. Vyvíja sa z nich embryonálny ektoderm, mezoderm a endoderm, rovnako ako zárodočná línia. (De et al.,2015). Výsledkom je diferenciácia na totipotentné typy buniek vrátane buniek tkaniva placenty, u cicavcov je to zygota a nasledujúce blastoméry, a na tzv. pluripotentné bunky, ktoré sa diferencujú na všetky typy buniek okrem placenty. Prvými bunkami nového vyvíjajúceho sa organizmu sú nešpecializované pluripotentné, tzv. embryonálne kmeňové bunky. Odvodzujú sa z vnútornej bunkovej strany ranného embrya (Canovas a Ross, 2016).

Postupným vývojom sa diferenciačný potenciál kmeňových buniek znižuje a ďalšia línia kmeňových buniek je len multipotentná. Jadro kmeňových buniek obsahuje dekonzenzovaný chromatin s transkripčne prístupnými génmi. Kým teda genetické informácie obsiahnuté v DNA sekvenciách sú takmer zhodné vo všetkých bunkách v tele, epigenetické informácie sa líšia v každej bunke a sú zodpovedné za vznik a udržiavanie rozdielnych bunkových typov (Canovas a Ross, 2016).

Po oplodnení, v novovzniknutej zygóte, majú oba rodičovské genómy schopnosť nezávislého priameho štiepenia, pričom majú navzájom veľké rozdiely v epigenetickom usporiadaní. Tieto epigenetické informácie sú programovo z epigenómu vymazané až na úroveň bazálneho stavu. V tomto štádiu je genóm zygóty hypometylovaný a je pripravený na globálnu *de novo* metyláciu. Kým majú obe sady rodičovských alel spoločnú cytoplazmu, môže prebehnúť proces zygotického reprogramovania (Moore a Reik, 1996). Ne-imprintované lokusy sa asynchrónne demetylujú, pričom na paternálnom genóme je demetylácia prevažne aktívna a na materskom genóme prevažne pasívna. Pasívna demetylácia vzniká dôsledkom replikácie DNA, a riadi ju množstvo DNMT1 vyprodukovanej z jadra zygóty. Aktívna demetylácia je čiastočne závislá na aktivite skupiny TET proteínov. TET3 spôsobuje oxidáciu 5mC a jej dôsledkom je demetylácia. Maternálne metylované

cytozíny (5mC) pred TET chráni faktor DPPA3(STELA/PGC7) prostredníctvom jeho väzby na dimetylovaný lizín 9 na históne H3 (H3K9me2). Súčasne so stratou metylovej skupiny na 5mC v parentálnom genóme, prebieha nárast metylácie u hemimetylovanej DNA. Vlny metylácií a demetylácií zbavujú embryo metylačného obrazu zárodočných buniek (Cavonas a Ross,2016).

Po tejto počiatkovej vlne demetylácie sa za účasti DNMT3a a DNMT3b obnovia metylačné vzorce v rámci genómu (Dias a Maher,2013). Vznikne trofoblast, tvoriaci základ pre zárodočný obal (chorion) a embryoblast, z ktorého vznikne vnútorný zárodočný obal (amnion) a jednak vlastné telo zárodka. Nastaví sa celkový obraz genómu. Tento metylačný obraz sa dedí v somatických bunkách rovnakých tkanív, ale nie je trvalý počas celej ontogenézy. Počas celého života prebiehajú metylačné a demetylačné vlny v menšom rozsahu a tak pretvárajú fenotyp jedinca (Jenkins a Carell,2011). Matkine gény majú výhodu kódovať všetky komponenty cytoplazmy vajíčka, čo využívajú na kódovanie smerujúce k potlačeniu expresie nevyhovujúcich paternálnych génov.

Naproti tomu otcovský epigenóm, ktorý je "v nepriateľskom" prostredí, sa usiluje odolávať a aj sám aktívne reprogramovať epigenetické markery maternálnych alel. Výsledkom je vzájomná modifikácia oboch parentálnych sád alel, ktorá sa mení v čase spolu s nárastom paternálne kódovaných génových produktov, ktoré umožňujú "postaviť sa" proti maternálne iniciovaným epigenetickým atakom. Tak sa stane, že napríklad metylačný vzor génu receptora pre inzulínu podobný rastový faktor *Igf2r* sa v štádiu štyroch buniek úplne zruší, a znovu sa nastaví vo fáze ôsmich buniek (Stöger et al.,1993)

Napriek tomu existujú určité molekulárne epigenetické informácie, ktoré sa prenesú zo spermie a vajíčka do embrya, a ktoré dynamickým interaktívnym pôsobením ovplyvňujú priebeh embryogenézy (Esteves et al.,2013).

6 POHLAVNE ŠPECIFICKÁ EPIGENETICKÁ EXPRESIA GÉNOV

S odkazom na tradičné zákony genetiky sa predpokladalo, že diploidné organizmy nesúce v somatických bunkách dve sady odpovedajúcich chromozómov majú za normálnych okolností paternálnu a maternálnu kópiu konkrétneho génu, ktorý má rovnaký potenciál pre expresiu v ktorejkoľvek ľudskej bunke. Pre organizmus to poskytuje určité výhody, pretože recesívne mutantné alely sa prekryjú zdravou alelou a vo fenotype sa neprejavia (Raissing et al.,2011). V roku 1984 sa robili pokusy s myšiami oocytami, pri ktorých vo vajíčku krátko po oplodnení nahradili samčie jadro samičím (gynogenéza), takže sa vo vajíčku nachádzali dva samičie genómy, alebo naopak, samičie jadro bolo nahradené samčím (androgenéza). Ukázalo sa, že hoci uniparentálna dizómia²⁴ niektorých chromozómov umožňovala ďalší vývoj, na dokončenie úplného vývoja bol potrebný samičí ako aj samčí genóm, inak vždy dochádzalo k abnormálnej expresii génov. To priviedlo vedcov k myšlienke, že existujú alely, zodpovedné za rast a vývoj organizmu, ktorých expresia v zygóte je parentálne pohlavne špecifická (Barlow,1995). Vyplývalo z toho, že príspevok maternálnej a paternálnej alely k vývoju zygóty môže byť úplne rozdielny a môže spôsobiť významné zmeny v ontogenéze.

6.1 Genómový imprinting

Genómovým, ale aj parentálnym alebo tiež genomickým imprintingom sa označuje špecificky reverzibilné epigenetické modifikácie závislé na parentálnom pôvode alely (Ruvinsky, 1999). Termín gametický imprinting vyjadruje epigenetické značky kontrolujúce špecifické udalosti v embryu získané z otcovskej alebo materskej gaméty. Ale keďže mnoho regiónov DNA s odlišnou metyláciou a

²⁴ uniparentálna dizómia- zdedenie obidvoch homologických chromozómov od jedného rodiča a súčasná strata korešpondujúceho homológa od druhého rodiča.

expresiou génov sa stanoví až postzygoticky (hoci s ohľadom na rodičovský pôvod gametického imprintingu), neodrážajú skutočný gametický imprinting. Preto sa v takých prípadoch preferuje názov genómový imprinting, pričom imprinting gametický tvorí jeho podskupinu (Nicholls, 1994). Hoci pre väčšinu génov v genóme platí, že obe rodičovské alely na autozómoch sú rovnako dôležité, u imprintovaných génov sa exprimuje iba jedna rodičovská alela, zatiaľ čo druhá je umlčaná. V súčasnej dobe je známych asi 80 imprintovaných génov u ľudí a asi 150 u myší. Predpokladá sa, že u ľudí existuje celkovo menej imprintovaných génov ako u myší, každopádne vznik placentárnych cicavcov a genomického imprintingu spolu súvisí (Raissing et al., 2011).

6.1.1 Mechanizmus genómového imprintingu

Genómový imprinting je všeobecne spôsobený rozdielnosťou epigenetických modifikácií v blízkosti CpG dinukleotidov nachádzajúcich sa v blízkosti génu. Konkrétne je to zapríčinené rozdielnym stupňom metylácie 5'cytozínu katalyzovaného enzýmom DNMT1 na maternálnom a paternálnom chromozóme a štrukturálnymi zmenami chromatinu, spôsobenými histónovou modifikáciou (Esteves et al., 2013), (Fergusson-Smith, 2001). Tieto metylované dinukleotidy v blízkosti rôznych génov určujú, ktoré gény z oboch rodičovských genómov sa budú v embryu exprimovať. Napríklad, keď je gén *Igf2* metylovaný v samičej zárodočnej línii, ale nie v samčej, tak po oplodnení, kedy sa tieto dve rozdielne metylované alely stretnú, budú si svoj metylačný stav udržiavať pri každej replikácii génu. A pretože je metylovaný gén *de facto* umlčaný, bude sa exprimovať len gén pochádzajúci od otca. Avšak, metylovaný gén, pochádzajúci od jedného pohlavia, môže byť demetylovaný, keď sa ocitne v potomkovi opačného pohlavia. Takto sa metylačné stavy nastavujú v každej generácii znovu v závislosti na pohlaví jedinca (Snustad a Simmons, 2009, str.622).

Niektoré imprintované gény sú umiestnené jednotlivo po celej dĺžke genómu, ale väčšina z nich je umiestnená v zoskupení. Tieto zhľuky

obsahujú otcovsky aj matersky exprimované gény a často aspoň jeden gén v tomto zhluku je dlhá nekódujúca RNA (ncRNA), ktorá reguluje imprinting susedných génov. Tieto zhluky – klastery – sú koordinovane regulované prostredníctvom DNA sekvencií ICRs. Delícia ICRs má za následok stratu imprintu susedných génov (Weaver et al.,2009).

Keď ICRs potom prejdú druhou demetylačnou vlnou, koordinujú priebeh nového epigenetického reprogramovania imprintovaných génov. Pre vytvorenie nových metylačných vzorov v zárodočných bunkách je potrebná metyltransferáza Dnmt3A a jej regulačný faktor Dnmt3L. Tie sprostredkovávajú vznik metylácií *de novo*. Aby ICRs zostali stabilné na prenesenie informácií do ďalšej generácie, je potrebná prítomnosť ďalších faktorov. Príkladom môže byť gén *Zfp57*, alebo faktor *PGC7/Stella*, ktoré chránia ICRs pred demetyláciou a udržiavajú stabilitu genómového imprintingu (Hanna a Kelsey,2014). Tieto modifikácie sú potom po nastavení v somatických bunkách klonálne dedičné (dedia sa mitózou) a regulujú monoalelickú aktivitu rodičovskej alely. Vzhľadom na zložitosť týchto epigenetických udalostí musia regulačné mechanizmy zabezpečiť, aby vytvorenie a udržiavanie imprintingu prebiehalo správne. Zlyhanie regulačných mechanizmov vedie k porušeniu génovej expresii (Weaver et al.,2009). Gény pod takouto monoalelickou reguláciou sa zistili u oboch pohlaví na autozomálnych (telových) chromozómoch a vyznačujú sa zmenou fenotypu v závislosti na veku a typu tkaniva, ktorý ovplyvňujú. Dôležitú úlohu zohrávajú predovšetkým na začiatku vývoja, vrátane regulácie tvorby a funkčnosti placenty, ale ovplyvňujú napríklad aj ranný vývoj mozgu (cicavcov) (Janecka et al.,2017) .

Imprinting sa dedí pohlavne špecifickým spôsobom, to znamená v závislosti na tom, či sa v gaméte nachádza chromozóm X či Y (Reik a Walter,2001).

Tým, že sa gény exprimujú iba z jednej rodičovskej alely, pretože druhá alela bola imprintovaná epigenetickou značkou v gametogenéze, je funkčný haploidný stav náchylný na vznik rôznych mutácií, delícií, translokácií alebo ďalších epigenetických modifikácií. Tie môžu pozmeniť funkčnosť génu a spôsobiť vznik rôznych syndrómov a ochorení.

Príkladom môže byť Beckwith-Wiedemannov, Prader-Willi a Angelmanov syndróm, Russell-Silverov, Martin-Bellov a Rettov syndróm, novorodenencký diabetes mellitus a rozličné formy rakoviny. Epigenetická dysregulácia genomického imprintingu stojí tiež za vysvetlením patogenézy autizmu a schizofrénie (Jirtle, 2009). Dôležitosť imprintingu je dobre zdokumentovaná. Napríklad výskum Daniela Messerschmitda a kol. sa zaoberal odstránením epigenetického modifikátora z génu *Trim28* v oocyte myší. Výskum sledoval účinky straty imprintovaného génu; aberantná strana metylácie v kontrolných oblastiach tohoto jediného génu v materskej zárodočnej línii na inak identickom genetickom pozadí viedla k silne variabilnému, ale letálnemu fenotypu. Odchýlky sa prejavili už v blastomére preimplantačných embryí (Messerschmidt et al., 2012).

6.1.2 Perspektívy vzniku imprintovných génov

Genómový imprinting sa pravdepodobne vyvinul ako obranný mechanizmus proti mutagénnemu potenciálu transpozónov. Transpozóny sú v genóme zvyčajne silne metylované, práve preto, aby sa zabránilo replikácii, avšak na niektorých miestach je úroveň ich metylácií CpG variabilná. Práve to môže viesť k tvorbe génov s metastabilnými alelami a ku genómovému imprintingu (Das et al., 2009) Pri pokuse u myší, kedy sa demetyloval genóm embryí, reaktivovali sa dovtedy nefunkčné transpozóny, čo malo za následok letálny fenotyp (Walsh et al. 1998).

Pri pozorovaní imprintovaných génov Reik a Walter zistili, že dvanásť pozorovaných génov zo štrnástich obsahujú imprintované kontrolné regióny (ICRs), ktoré sa metylujú skôr v maternálnej, než paternálnej zárodočnej línii. Navrhli *cis* a *trans* perspektívu vzniku imprintovaných génov²⁵. Z hľadiska *trans* perspektívy uvažovali, že demetylácia vznikla ako maternálne adaptačná stratégia s cieľom odstrániť paternálne imprinty v novovzniknutom genóme. Diferenciálne metylácie bolo evolučne ťažké udržať v paternálnej zárodočnej línii a

²⁵ *cis* perspektíva imprintovaných génov znamená perspektívu génu v organizme, *trans* perspektíva odkazuje na pohľad naprieč generáciami.

väčšina imprintovaných génov sa exprimovala prostredníctvom metylácie v maternálnych zárodočných bunkách. Inými slovami, maternálne trans-aktívne faktory boli určené k demetylácii spermatického jadra. Z hľadiska cis perspektívy, optimálnou stratégiou alely je konať rozdielne v materskej a v otcovskej roli, ale nezáleží na tom, či je táto stratégia uskutočnená metyláciou v maternálnej alebo paternálnej zárodočnej línii. Z tohto dôvodu existuje predpoklad, že sa imprintované gény budú vyvíjať tak, aby dosiahli rozdielnu expresiu akýmkoľvek mechanizmom, v ktorejkoľvek zárodočnej línii, hlavne aby boli odolné voči modifikáciám selekciou trans-pôsobiacich faktorov (Haig,2014). Podľa pozorovania uskutočneného Wilkinsom a Haigom v roku 2002, paternálne trans-pôsobiace faktory odstraňujú imprinty založené v paternálnej zárodočnej línii, ale maternálne trans-pôsobiace faktory nikdy neodstraňujú imprinty založené v maternálnej línii. Z tohoto dôvodu sú maternálne imprinty evolučne stabilnejšie. Vplyvy mutácií by tiež mohli prispieť k tendencii kontrolovať imprintovanú expresiu presunom z paternálnej na maternálnu zárodočnú líniu. Metylované cytozíny podliehajú deaminácii, pričom pôvodný cytozín je nahradený tymínom. Cytozíny sa metylujú prenatálne v spermatogóniach²⁶ a postnatálne v rastúcich oocytoch. Preto má metylovaný cytozín viac možností mutovať na tymín v otcovskej zárodočnej línii ako v materskej. Výsledkom je, že prírodný výber favorizuje ICRs, ktoré sú metylované v maternálnej zárodočnej línii (Bourc'his a Bestor, 2006).

6.1.2.1 Hypotéza rodičovského konfliktu

Hypotéza rodičovského konfliktu predstavil Haig a Westoby v roku 1989. Táto hypotéza poskytuje koncepčný rámec, ktorý spája rôzne aspekty vývoja cicavcov, ako je fetálna kontrola rastu, parentálny imprinting, inaktivácia chromozómu X (kapitola 6.2), ale súvisí aj s

²⁶ spermatogónie - primitívne zárodočné bunky, uložené na bazálnom epitele. Začína nimi spermatogéza. Po dosiahnutí pohlavnej zrelosti individua prechádzajú tieto bunky radou mitotických delení.

imunológiou a endokrinológiou v tehotenstve a s komplikáciami sprevádzajúce tehotentvo ako je gestačný diabetes a preeklampsia²⁷ (Moore a Reik,1996). Hypotéza sa v obecnej rovine zaoberá interakciami medzi príbuznými, ktorý majú odlišné koeficienty príbuznosti (Patten et al.,2014). Je založená na myšlienke, že jednotlivé pohlavia majú inak nastavený optimálny výsledok expresie vlastných génov. U cicavcov sa gény pochádzajúce od otca exprimujú v embryu nachádzajúceho sa v tele matky. Expresia génov pochádzajúcich od matky je optimálne nastavená tak, aby šetrila matkin organizmus a aby poskytovala zdroje svojim potomkom v rovnakom rozsahu. Naproti tomu, paternálny genóm v embryu sa snaží maximalizovať prístup a využitie zdrojov, ktoré ponúka placenta, pokiaľ majú ostatné plody odlišných otcov. To vedie k stretu záujmov medzi parentálnymi alelami u embrya aj medzi embryami navzájom. Táto hypotéza skúma, ako môže otec protredníctvom svojho potomka ovplyvniť množstvo zdrojov, ktoré poskytuje matka (Haig,2014). Najznámejším príkladom parentálneho konfliktu pohlavne špecificky imprintovaných génov sú gény pre rastový faktor *Igf2*, ktoré podporujú príjem zdrojov a rast a pre jeho receptor *Igf2r*, ktorý tomu bráni (Barlow et al.,1991). Alela maternálneho génu pre rastový faktor je imprintovaná, tzn.označená, takže sa gén nebude exprimovať, pretože maternálny genóm nechce podporovať abnormálny rast plodu na úkor matkinho zdravia. Na druhej strane alela pre *Igf2r* bude plne funkčná a bude kontrolovať prísun živín embrya z materskej placenty. U alely pochádzajúcej od otca to bude presne naopak; paternálna alela génu pre rastový faktor sa bude exprimovať, pretože jej záleží na plnom využití zdrojov a naopak sa umlčí – imprintuje – receptor pre tento gén *Igf2r*,ktorý by tomu mohol brániť (Moore a Reik,1996). Zároveň, fetálna expresia rastového faktoru ovplyvňuje nielen vývoj plodu, ale má dosah aj na rast a potenciálne aj na zdatnosť v konkurenčnom boji o matkine zdroje medzi súrodencami. Zisk potomka, ktorý dokáže lepšie využívať zdroje bude tým väčší, čím menej bude jeho súrodencov. Takže tu

²⁷ preeklampsia - neskorá gestóza — porucha v III.trimestri tehotenstva s príznakmi, ktoré postihujú oblasť ciev a obličiek ako sú edémy, bielkovina v moči, zvýšený krvný tlak

existuje konflikt medzi rodičmi navzájom, a tiež medzi rodičmi a potomkami a tiež medzi potomkami medzi sebou. Podľa tohto modelu by genomický imprinting mohol riešiť uvedené konflikty. Model predikuje, že prírodný výber bude zvyhodňovať také gény pochádzajúcich od otca, vďaka ktorým dokáže potomok maximalizovať zisk z matkiných zdrojov. Naproti tomu bude pre matku výhodné, keď imprintuje tieto alely prenesené do potomstva tak, aby limitovali využívanie jej zdrojov (Haig,2014).

6.1.2.2 Hypotéza koadaptácie matky a potomstva

Výskum Wolfa a Hagera prišiel s myšlienkou, že potenciálne riziková expresia len jednej rodičovskej alely musí byť nejakou evolučne zvyhodnená a predstavili svoju hypotézu koadaptácie matky a potomstva, ktorou naviazali na hypotézu pohlavného konfliktu. Je založená na myšlienke, že prírodný výber uprednostňuje genómový imprinting, pretože v skutočnosti zvyšuje životaschopnosť potomstva. To sa deje tak, že imprinting zvyšuje podobnosť potomkov na jedného rodiča, ale znižuje podobnosť na druhého. Väčšia podobnosť môže v niektorých prípadoch zlepšiť fitness. Ak podobnosť medzi matkou a potomstvom zlepšuje zdatnosť, potom výber favorizuje umlčanie otcovských alel. Avšak ak zlepšuje fitness podobnosť medzi otcom a potomstvom, potom výber favorizuje umlčanie materských alel (Wolf a Hager,2006).

Výhody "podobnosti", ktoré by mohli vysvetliť vznik pohlavne špecifickej expresie génov sú uvedené na príkladoch, keď otcovsky zdedené antigény placenty sú umlčané, aby sa zabránilo kontradikcii medzi antigénmi matky a plodu. Alebo v inom prípade sú umlčané gény maternálneho pôvodu, aby sa zvýšila podobnosť potomka na jeho otca a tým sa zvýšila aj pravdepodobnosť jeho starostlivosti o potomka. Imprinting môže byť zodpovedný za veľkosť hlavy potomka vzhľadom k veľkosti panvového otvoru matky. Deaktivácia patrigénov²⁸ u dcér a

²⁸ patrigén - alela haploidného genotypu pochádzajúca z diploidného otca. Podobne matrigén je alela haploidného genotypu pochádzajúca z diploidnej matky.

matrigénov u synov zvyšuje podobnosť s rodičom rovnakého pohlavia a zlepšuje pohlavne špecifickú zdatnosť (Spencer et al.,2004). Koadaptačný model tiež vysvetľuje, prečo prírodný výber uprednostňuje viac maternálne exprimované gény. Tie sa často viažu na vývoj a funkčnosť placenty v rannom štádiu embryogenézy, kedy sa riadi presun zdrojov medzi embryom a matkou. Rovnako je koadaptácia výhodná v priebehu maternálnej starostlivosti o potomkov (Wolf a Hager,2006).

6.1.2.3 Intralokusový pohlavný konflikt

Genomickým imprintingom sa dá vysvetliť dimorfizmus medzi pohlaviami. Samce a samice mnohých druhov majú často výrazne rozdielny fenotyp, hoci zdieľajú väčšinu genómu (Wolf a Hager,2006). Napríklad u mnohých druhov vtákov samice preferujú samcov s dlhým chvostom, takže vznikla selekcia na tento znak, kým u samíc má výhodu priemerná dĺžka s maximálnou efektivitou pri lietaní. Alely určujúce podobu chvostu budú u obidvoch pohlaví tlačiť k navzájom antagonistickému optimu (dlhý okrasný chvost vs. priemerný chvost) a vo všeobecnom prípade bude výsledný fenotyp kompromisom medzi záujmami oboch pohlaví. Z hľadiska pohlavného výberu by bolo výhodné, keby alelu dlhého chvosta dedili synovia od svojho otca v paternálnej línii a nie od svojho starého otca v maternálnej línii. Najlepšie by bolo, keby indivíduá exprimovali iba alely pohlavne dimorfných znakov získané od rodiča rovnakého pohlavia. A model ukazuje, že sa to aj tak deje; alela pohlavne špecifického znaku sa exprimuje v závislosti na tom, na akom pohlaví sa nachádza. Tento typ imprintingu pohlavného dimorfizmu sa nazýva intralokusový pohlavný konflikt (Pennel a Morrow,2013), a modelovú situáciu prezentovali Day a Bondurianski (2004). Ako príklad použili hypotetický znak selektovaný u samcov, v ktorom je fenotyp znaku určený lokusmi s dvomi alelami na autozomálnom chromozóme. Alela *p* zvyšuje veľkosť znaku, alela *q* ju znižuje. Pokiaľ majú alely aditívne fenotypové účinky, budú sa heterozygóti prejavovať priemerným

fenotypom v rozmedzí homozygótnych protipólov. V tomto modeli pohlavný výber selektuje veľkosť znaku u samcov, to znamená, že samci s fenotypom pp sú najúspešnejší. Každopádne napriek selekcii na tento samčí znak je možné hypoteticky predpokladať, že sa v populácii stále udržuje alela q , buď kvôli génovému toku, alebo kvôli mutáciám. Avšak, keď sa objaví genómový imprinting spôsobujúci umlčanie alely zdedenej od matky, začne to mať dopad na fenotyp heterozygótov; vo fenotype pq (p je zdedené od otca, q je imprintovaná – umlčaná alela zdedená od matky), sa bude exprimovať iba alela p a bude mať rovnaký fenotyp ako pp homozygóti. Pokiaľ ale q alela bude dedená od otca a p bude u matky imprintovaná, následný fenotyp heterozygóta qp prejavujúci sa ako neúspešný homozygót qq bude vystavený pohlavnému výberu, ktorý prakticky odstráni samce s q alelou z genofondu populácie. Maternálny imprinting alely q sa naopak začne vyskytovať s vyššou frekvenciou (Day a Bonduriansky, 2004). To môže znamenať, že evolúcia zvýhodní pohlavne selektované znaky viazané genomickým imprintingom na autozómoch a zároveň sa výskyt znakov pohlavného dimorfizmu neobmedzí na pohlavné chromozómy.

6.1.3 Príklady fenotypových prejavov dysregulácie genómového imprintingu

Beckwith-Wiedemanov syndróm (BWS) je spojený s nadmerným rastom a so zvýšeným rizikom vzniku nádorov. Zapríčiňuje ho disregulácia imprintingu dvoch skupín imprintovaných génov. Je to gén pre rastový faktor *Igf2*, ktorý je umlčaný v maternálnej alele a exprimuje sa z parentálnej a gén *h19*, ktorý sa exprimuje z materskej alely a je umlčaný v parentálnej. U BWS dysregulácia vzniká, keď sa vytvorí v otcovskom genóme duplikácia na krátkych ramenách 11 chromozómu, uniparentálna dizómia, alebo na materskej alele génu *h19* vznikne delécia alebo translokácia. Toto môže spôsobiť aktiváciu dovtedy umlčanej materskej alely génu pre rastový faktor *Igf2*, čo sa vo fenotype prejaví nadmerným rastom koncom fetálneho vývoja a v prvých rokoch

života, s tvorbou nadmerne veľkej placenty u plodu, novorodeneckou hypoglykémiou, rôznymi anomáliami (obrázok č.8) a tiež zvýšeným rizikom vzniku nádorov a i. (Wekberg et al.,2003).

Za vznikom Prader-Williho a Angelmanov syndrómu (PWS/AS) môže stáť absencia paternálnej alely buď v dôsledku delécie lokusu ramienka na 15.chromozóme zdedeného od otca (oblasť 15q11-13), alebo v dôsledku maternálnej uniparentálnej dizómie, alebo imprintingových dysregulácii metylácie, prípadne mutácie imprintingového centra, ktoré ovplyvňujú expresiu génov tohto regiónu. Angelmanov syndróm je spôsobený poruchou rovnakého úseku ako PWS, ale s tým rozdielom, že je to porucha maternálneho pôvodu, kým Prader-Williho syndróm odkazuje na paternálny pôvod (obrázok č. 9 a,b) (Kantor et al.,2005). Angelmanov syndróm, hoci postihuje rovnakú oblasť má úplne odlišné prejavy a práve preto bol PWS/AS jedným z prvých študovaných príkladov imprintingu u ľudí. Fenotypovo sa (veľmi stručne) Angelmanov syndróm prejavuje ťažkou mentálnou retardáciou, motorickými problémami, málo rozvinutou rečou, záchvatmi smiechu, hypotoniou, mikrocefáliou atď. Prader-Williho syndróm charakterizuje obezita, nezvládateľná túžba po jedle, hypogonádizmus, malý vzrast, poruchy správania, spánkové apnoe a iné²⁹. Práve v súvislosti s množstvom génov, ktoré rôznym spôsobom postihuje má PWS/AS veľký počet klinických prejavov. Inkriminovaná oblasť obsahuje približne 6 miliónov párov báz DNA, asi 100 génov a veľký zhluk imprintovaných génov, pričom kritické sú dva úseky označované *PWCR* a *ASCR* . Za vznik Angelmanovho syndrómu môže delécia oboch úsekov (*PWCR* a *ASCR*). Na otcovskom homológnom chromozóme sa metyluje úsek *ASCR* a tým sa inaktivuje. Avšak zostáva aktívny úsek *PWCR* na paternálnom chromozóme. Prader-Williho syndróm iniciovaný deléciou ramienka 15.chromozómu vzniká analogicky. Z hľadiska expresie imprintovaných génov by za PWS/AS mohli stáť gény exprimované z alely paternálneho pôvodu *Znf127*, *Znf127as*, *Par5*, *PWAR5*, *lpw* ai. V Angelmanovom syndróme môže ísť o enzým ubiquitín ligázu E3A kódovaný génom

²⁹ http://www.wikiskripta.eu/index.php/Prader%C5%AFv-Williho_syndrom

ube3a ležiaci na lokuse, ktorý je aktívny na chromozóme maternálneho, a naopak inaktívny na chromozóme paternálneho pôvodu. Prejavu nadbytku produktov tohoto génu sa vyskytujú u jedincov s maternálnou uniparentálnou dizómiou (Butler,2009).

6.2 Inaktivácia X chromozómu

U cicavcov a teda aj u ľudí je pohlavný dimorfizmus spojený s prítomnosťou dvoch pohlavných chromozómov X v somatických bunkách samíc, zatiaľ čo samci majú iba jeden chromozóm X a malý, prevažne degenerovaný Y chromozóm. Následky autozómálnych dizómií môžu byť letálne, ale samci sa dokázali vyrovnáť s tým, že majú aktívny iba jeden gonozóm. Deje sa to prostredníctvom kompenzácie génovej dávky; u cicavcov tak, že v podstate samice inaktivujú jeden zo svojich dvoch pohlavných chromozómov. Tento jav sa volá inaktivácia X chromozómu, alebo aj lyonizácia (podľa objaviteľky Mary Lyon) (Morey a Avner,2011). Nemusí sa nutne jednať o inaktivovanie celého chromozómu. Podľa toho, akú sadu pohlavných chromozómov organizmus v rámci rôznych taxónov má, môže kompenzácia génovej dávky prebiehať inaktivovaním, hyperaktivovaním alebo hypoaktivovaním expresie génov na chromozóme. Pre ilustráciu, hoci sa nejedná o cicavce, u drozofily nie je žiadny z oboch X chromozómov inaktivovaný, ale namiesto toho sa gény na X chromozóme samca transkribujú silnejšie. Alebo u hlístice *Caenorhabditis elegans* dochádza k čiastočnej génovej represii na obidvoch X chromozómoch, a tým sa vyrovnáva expresii génov na jedinom X chromozóme u samcov (Snustad a Simmons, 2009, str.624).

Inaktivácia jedného X chromozómu je pomerne charakteristickým epigenetickým znakom u samíc cicavcov a je zásadná pre vývoj embryonálnych a zárodočných buniek. Neaktívny chromozóm sa stabilne mitoticky dedí v somatických bunkách jedinca. Stav inaktivovaného pohlavného chromozómu nie je konštantný, ale sa mení v embryu počas jeho vývoja. Buď jeho neaktívny stav udržujú imprintované gény, alebo je výber inaktivácie jedného z dvoch X chromozómov riadený náhodne.

Forma závisí na tom, aká expresia ktorých génov a v akom období vývoja embrya je požadovaná (Payer et al, 2011). Imprintovaná inaktivácia, s preferenčným umlčaním paternálneho chromozómu X, je prítomná v zárodočných bunkách extraembryonálnych línií, zatiaľčo náhodná vzniká počas vývoja embryonálnych tkanív v čase implantácie embrya do maternice (Vaskova et al.,2014).

6.2.1 Imprintovaná inaktivácia, reaktivácia a náhodná inaktivácia X chromozómu v samičom embryu

Najlepšie študovaný je embryonálny model myší, v ktorom sa dajú pozorovať inaktivačné a reaktivačné cykly počas formovania trofoektodermy a epiblastu (Lobo et al.,2013). V samčích zárodočných bunkách prechádza gonozóm meiotickou X chromozómovou inaktiváciou a toto celochromozómové umlčanie je udržiavané od meiózy v gamétach, až sa napokon po oplodnení prenesie do samičieho embrya. Ibaže v priebehu celej spermatogenézy, napriek inaktivácii, transkribuje chromozóm X proteíny, ktoré udržiujú tzv. tichú pamäť; a tieto informácie sa prenášajú až do dcérskeho embrya. Následne po oplodnení, v ranom samičom embryu, je inaktivácia X chromozómu imprintovaná tak, aby opäť nastala na paternálnom X chromozóme (Okamoto a Heard, 2005). Celochromozómové umlčanie počas imprintovanej inaktivácie pohlavného chromozómu prebieha v dvoch krokoch; najprv prebehne umlčanie repetitívnych elementov³⁰, a potom nasleduje inaktivácia indukovaná génovým produktom. Opakované umlčanie repetitívnych elementov nastáva nezávisle na lokuse *Xist* vo fáze dvojbunkového štádia blastoméru na paternálnom X chromozóme. *Xist* je aktívny gén nachádzajúci sa v X-inaktivačnom centre, z ktorého sa inaktivácia šíri oboma smermi až na konce chromozómu. Vzhľadom na mechanizmus umlčania, ktorý je v prípade repetitívnych elementov nezávislý na *Xist* v

³⁰ repetície - opakujúce sa sekvencie veľkosti 1-6 báz, ktoré sú rozptýlené v celom genóme a zvyšujú počet opakovaní transkripcie, čo spôsobuje rôzne formy ochorení - závažnosť koreluje s počtom opakovaní repetitívnych sekvencií

mužskej zárodočnej línii, to nazančuje paternálny imprinting. . Častým mechanizmom inaktívácie repetícií sú metylácie DNA, ktoré po deaminácií vedú k bodovej mutácii cytozínu na tymín, čím sa epigenetické umlčanie stane irreverzibilné. Univerzálnym donorom metylových skupín pre všetky typy metylácií je S-adenozylmetionín. Pokiaľ je v bunke nízka hladina tohoto enzýmu, dochádza k hypometylácií DNA, čo sa môže negatívne odraziť na zdraví plodu (Cavonas a Ross,2016).

Inaktívacia závislá na *Xist* je regulovaná maternálnym imprintingom, ktorý nedovoľuje expresiu tohto génu z maternálnej alely. Tým, že obmedzí expresiu génu *Xist* na maternálnom X chromozóme, bude sa viac exprimovať na paternálnom X chromozóme, až to povedie k jeho umlčaniu. Takže, imprintovaná inaktívacia X chromozómu je regulovaná paternálnymi aj maternálnym imprintom u placentálnych cicavcov (Payer et al, 2011). Oproti génu *Xist* pôsobí regulátor *Tsix*, ktorý uľahčuje redukcii transkriptu tohto génu okolo chromozómu a tým sprístupní, čiže reaktivuje inaktivované gény. Produktom *Tsix* je nekódujúca RNA, ktorá sa prepisuje cez RNA transkript lokusu *Xist* (Maclary et al.,2014).

Kľúčových pre začatie reaktívácie je oslabenie expresie génu *Xist* na inaktívnom chromozóme. V štádiu blastocysty vo vnútrobunkovej hmote v samičom preimplantačnom embryu sa potom inaktívny paternálny chromozóm X reaktivuje – je to približne v tom čase, kedy sa blastocysta implantuje do maternice (Lobo et al.,2013). Reaktívacia vyžaduje epigenetické reprogramovanie celého chromozómu, aby v ďalšom kroku umožnila náhodnú inaktíváciu pohlavného chromozómu. To preto, aby oba prítomné X chromozómy mali rovnakú šancu na expresiu (alebo na inaktíváciu) dôležitých transkriptov pre vývoj ďalších tkanív (Payer et al.,2011). Reaktívacia sa riadi pluripotentnými faktormi Oct4, Sox2 a iných, viažúcimi sa na *Xist* v raných samičích zárodočných bunkách, tak i v pluripotentných kmeňových bunkách v neskoršej fáze vývoja, všetko za účasti zosilňovača *Tsix*, ako aj ďalších faktorov (Payer et al.,2011).

Náhodná inaktivácia je riadená aktivitou génu *Xist*, ktorý kóduje špecifickú RNA. Jej nestabilné transkripty sa nabaľujú okolo génu *Xist* a okolo oboch gonozómov. Behom vývoja sa transkripty jedného génu rozpadajú, zatiaľ čo druhé sa stávajú stabilnými a výsledkom je, že sa celý chromozóm zabalí do transkriptov RNA a do deacetylovaných histónov, tým sa stane neaktívnym a umlčí sa (Vaskova et al.,2014). Najskôr sa pred úplným vypnutím chromozómu eliminuje RNA polymeráza a transkripčné faktory. Potom v určitom poradí prebehnú udalosti zahrňujúce trimetyláciu histónu H3 na lyzíne 27 (H3K27me3) prostredníctvom Polycomb komplexu, prebehne metylácia promotorových oblastí a z inaktívneho X chromozómu sa stane Baarovo teliesko – heterochromatín (Okamoto a Heard, 2009).

6.2.2 Mozaicizmus inaktivovaného X chromozómu

V každej bunke samičieho embrya, približne v čase implantácie, dochádza náhodne k inaktivácii paternálneho alebo maternálneho X chromozómu. Na začiatku vývoja obsahuje organizmus približne rovnaký počet buniek s inaktivovanými maternálnymi, alebo paternálnymi chromozómami. Tie sa dedia mitózou v rozmnožujúcich sa somatických bunkách organizmu, ale ako jedinec rastie a vyvíja sa, tento pomer variuje. Vplyvom rôznych mutácií a aberácií tak môže jedna populácia buniek obsahovať normálny karyotyp, kdežto v druhej môže byť prítomná nejaká genetická abnormalita. Tým pádom výsledný samičí organizmus tvorí mozaiku zloženú z týchto dvoch typov buniek (obrázok č. 10)

Mozaicizmus má významné dôsledky pre expresiu ochorení viazaných na X chromozómy. Môže sa prejaviť v zárodočných bunkách, kde je genetická abnormalita viazaná len na určitý podiel zárodočných buniek, pričom ostatné sú normálne. V tejto situácii jedinec nebude mať žiadne príznaky ochorenia, keďže somatické bunky, ktoré vytvárajú zostávajúce časti tela, majú normálny genetický materiál. Jednotlivec napriek tomu môže mutáciu odovzdať ďalej prostredníctvom jednej z abnormálnych zárodočných buniek (Woodruff et al.,2015).

Pri somatickom mozaicizme sú zárodočné bunky, ako aj väčšina telových buniek jedinca, „normálne“ zdravé a len malá populácia telových buniek obsahuje mutáciu alebo nejakú genetickú aberáciu. Takýmto mechanizmom vznikajú napríklad niektoré nádory, kedy sa z jednej bunky v dôsledku porušenej DNA vyvinie tumor, pričom však v ostatných bunkách tela je DNA normálna. Somatický mozaicizmus sa vyskytuje pri mnohých ďalších ochoreniach (Ridout et al.,2008). Mozaikovitosť s vekom narastá - mladé ženy majú nepomer inaktivovaných chromozómov maternálneho a paternálneho pôvodu dvakrát väčší ako ich novonarodené dcéry; od veku 55 sa neustále zvyšuje až do 100 rokov. Dôvody nie sú úplne jasné; môže byť za tým klonálna strata, ale pravdepodobné sú rôzne genetické faktory. Pri somatickom mozaicizme sa ochorenie neprenáša na potomstvo, keďže všetky zárodočné bunky sú normálne. Ale v ojedinelých prípadoch jedinec môže mať somatický aj zárodočný mozaicizmus a v takom prípade sa genetická abnormalita môže odovzdať potomstvu (Ørstavik, 2009).

6.2.3 Príklady fenotypových prejavov dysregulácie inaktivovaného X chromozómu

Rettov syndróm je neurologická porucha viazaná na X chromozóm, ktorá sa vyznačuje charakteristickým fenotypom, ale aj jeho značnou variabilitou. Dotýka sa samozrejme žien, pretože pre mužov je Rettov syndróm letálny. V populácii sa vyskytuje sporadicky a vzniká náhodne, každopádne bola zistená aj dedičnosť dvoch zásadných vlastností, ktoré tento syndróm spôsobujú. Jednu určujú mutácie génu MECP2, ktorý transkribuje proteín MethylCpG proteín 2, dôležitý pre vývoj centrálnej nervovej sústavy. Mutácie viažúce sa na tento gén boli identifikované v 70 – 80% prípadov (Villard et al.,2001). Druhá súvisí s účinkami mimoriadne nesúmernej inaktivácie X chromozómu (Gun et al.,2006). Nesúmernosť inaktivácie môže spôsobiť, že sa matka dieťaťa postihnutého Rettovým syndrómom stane nositeľkou spomínanej mutácie, ktorá bude v jej organizme kninicky nezistiteľná, ale ktorá sa

prenesie do ďalšej generácie. Rettov syndróm sa začína prejavovať medzi 6-18 mesiacom života dievčata, kedy sa spomalí až úplne zastaví jeho psychomotorický vývoj. Je sprevádzaný v rozmedí ďalších 4 rokov rôznymi prejavmi autizmu, epilepsie, atakickou chôdzou a apraxiou rúk. Behom ďalšieho vývoja pribúdajú vážne pohybové a ortopedické problémy, ktoré pacientku pripútavajú na invalidný vozík, ale počas dospievania dochádza k zlepšeniu psychosociálneho kontaktu a záujmu o komunikáciu a očný kontakt (Villard et al.,2001).

Nie všetky z viac ako tisícky génov na inaktivovanom chromozóme sú skutočne umlčané. Gény, ktoré uniknú inaktivácii sú rozosiate po celom chromozóme X, aj keď väčšina býva lokalizovaná na krátkom ramienku. Rozsiahly prieskum expresie X viazaných génov ukázal, že až 15% génov dokáže uniknúť inaktivácii (Ørstavik, 2009). Ubiquitózne transkribovaný tetrapeptid (UTX) je príklad génu viazaného na X chromozóm, ktorý uniká inaktivácii a tým sa spolupodieľa na vzniku Turnerového syndrómu. Výskum Trasher a kolegov odhalil, že repetície génu ubiquitózne transkribovaného tetrapeptidu na chromozóme X (UTX) spolu s demetyláciou histónu 3 na lyzíne 27 (H3K27) spôsobujú epigenetickú dysreguláciu imunitných T lymfocytov u jedincoch s Turnerovým syndrómom. Zmeny u T lymfocytov spôsobujú autoimunitný chronický zápal stredného ucha, ktorý je jedným z klinických prejavov syndrómu (Trasher et al.,2016). Medzi ďalšie charakteristické prejavy patrí malý vzrast, pohlavná dysfunkčnosť, kožná riasa na krku, rečové poruchy a rôzne abnormality mäkkých a tvrdých tkanív. Turnerov syndróm je stav spojený s čiastočnou alebo úplnou absenciou chromozómu X (karyotyp 45,X). Absencia samičieho pohlavného chromozómu končí na 99% potratom, pretože na X chromozóme sú lokalizované gény ovplyvňujúce vývoj placenty, ktoré majú normálnu expresiu v karyotype 46,XX. Zvyšné 1% dievčat s karyotypom 45,X sa narodia s Turnerovým syndrómom. Ak by v samčej chromozomálnej zostave embrya došlo k strate jediného pohlavného chromozómu X, vznikla by zostava 45,Y ktorá je bez pohlavného X chromozómu vždy letálna . Niekedy môže dôjsť k trizómii X chromozómu (karyotyp 47,XXX,

syndróm "superžena"). Aj keď sú nadpočetné kópie chromozómu X inaktivované, gény, ktoré unikli inaktivácii môžu repetíciou spôsobiť nadmernú expresiu, ktorá významne ovplyvňuje vývoj a funkcie mozgu (Berletch et al.,2011).

7 DEDIČNOSŤ EPIGENETICKÝCH ZMIEN

Epigenetika bola pôvodne určená na zodpovedanie funkčných stavov počas diferenciácie bunkových línií. Predpokladalo sa, že tieto molekulárne zmeny nastávajú počas vývoja a potom sa udržujú prostredníctvom mitózy. Tým, že sú somatické bunky oddelené od buniek zárodočnej línie, existoval predpoklad, že molekulárne značky, ako je DNA metylácia alebo histónové modifikácie sú odstránené a nahradené v každej generácii. Myšlienka, že sa informácie o zmenách v somatických bunkách v organizme neprenesú do nasledujúcej generácie, pokiaľ majú oddelené zárodočné línie³¹, bol základ pre vznik modelu tzv. Weismannovej bariéry. Pre ňu je charakteristický špecifický tok informácií v smere od nukleových kyselín k proteínom, ale nie naopak. Predpokladalo sa, že informácie získané počas života jedinca budú v zárodočných bunkách vymazané a prebehne iba prenos genetických informácií (Nauhof et al.,2016) . Ibaže sa ukázalo, že epigenetické zmeny indukované prostredím sú schopné pozmeniť špecifický proteín a cez reverznú transkripciu RNA sa uložiť do DNA. A navyše, sú schopné sa v nej udržať prostredníctvom meiózy a gametogenézy. Tak sa odhalili formy nemendelovskej dedičnosti, ako je imprinting, inaktivácia chromozómu, epimutácie a regulácie prostredníctvom RNA. Tieto transgeneračné účinky porušujú základ väčšiny genotypovo-fenotypových štúdií postavených na predpoklade, že výsledný fenotyp vyplýva z priameho pôsobenia životného prostredia a dedičnej genetiky (Schaefer a Nadeau, 2015).

7.1 Priama epigenetická dedičnosť

Je však nutné odlišovať, akým spôsobom epigenetická dedičnosť pôsobí; pokiaľ je jednotliviec vystavený pôsobeniu životného prostredia,

³¹ oddelené zárodočné línie - iba špecificky označené bunky sa môžu stať zárodočnými bunkami

ide o generáciu F0. Tu epigenetické faktory pôsobia priamo na somatické bunky, ktoré epigenetickú informáciu prenášajú prostredníctvom mitózy do ďalších klonálnych generácií buniek v rámci toho istého, jedného organizmu. Jedná sa teda o priame účinky epigenetickej dedičnosti; o priamu epigenetickú dedičnosť. Dôležité je, že sa epigenetické markery nedokážu implementovať do zárodočnej línie pohlavných buniek a neprenesú sa do ďalšej generácie, pokiaľ prestane pôsobiť faktor životného prostredia (Schaefer a Nadeau, 2015). Ako príklad môžeme uviesť látky decitabin a vorinostat, používaných v onkologickej terapii spôsobujúcich zmenu epigenómu nádorov. U mužských pacientov liečených týmito látkami sa zistil vedľajší účinok – neplodnosť. Pri následných pokusoch na myšiach sa zistilo, že toxikanty spôsobovali v generácii F0 zmeny v hmotnosti nadsemeníkov, vo veľkosti pohlavných žliaz, výšky semenonosného epitelu a zmenu v koncentrácii a morfológii spermíí. V prípade látky decitabin bola detekovaná metylácia DNA v spermíách na niektorých lokusoch. Ale v generáciách F1 – F3 sa okrem drobných zmien na reprodukčných orgánoch nezistil žiadny celkový vplyv na plodnosť - jednalo sa o priamu epigenetickú dedičnosť zasahujúcu len somatickú líniu (Kläver et al.,2015).

7.2 Multigeneračná expozícia

Ďalším typom epigenetickej dedičnosti je tzv. multigeneračná expozícia. Environmentálne vplyvy môžu zasiahnuť do štruktúry somatických buniek gravidnej samice generácie F0, môžu epigeneticky pozmeniť expresiu génov v jej plode, čo je generácia F1 a prípadne môžu mať dosah aj na zárodočnú líniu plodu gravidnej samice, ktorý bude generovať generáciu F2, aj keď už faktor prostredia nebude pôsobiť (McCarrey et al.,2016). Modifikácia prebehne pred meiotickým delením v zárodočných bunkách plodu, ale následne sa zmaže v prvej a druhej demetylačnej vlne v neskoršej gametogenezе a krátko po oplodnení,

čiže vystavenie pôsobeniu prostredia v F0 nebude mať dosah na generáciu F3.

Príkladom môže byť látka dietylstilbestrol (DES), čo je syntetický nesteroidný estrogén, užívaný kedysi ako hormonálna antikoncepcia. Pokiaľ by táto látka pôsobila na gravidnú samicu, povedie to k vývojovým vadám plodu v generácii F1 a k zvýšenému riziku vzniku rakoviny, ale neohrozí to ďalšiu generáciu F2, ktorá už tejto látke nebola priamo vystavená (Schaefer a Nadeau, 2015). Alebo, viaceré výskumy poukázali na multigeneračný účinok pôsobenia stresu. Pokiaľ bola gravidná samica potkanov vystavené stresu, jej potomstvo indukovalo fenotyp, ktorý sa udržiaval cez viaceré generácie. Zahŕňal stavy DNA metylácie pre gény glukokortigoidných receptorov v hypokampe, ktoré spôsobovali úzkostné správanie. Tieto vzorce správania sa neprenášali gameticky; nie práve optimálna ranná materská starostlivosť stresovanej samice podnietila svojim správaním úzkostné stavy u svojho potomka, čo viedlo k epigenetickému preprogramovaniu mozgu a k následnému prenosu do ďalšej generácie. V tomto prípade environmentálne prostredie (plné stresu) viedlo zakaždým k rovnakému špecifickému (vystresovanému) fenotypu a opakovane sa prenášalo generáciami (Daxinger a Whitelaw, 2012). Jedná sa teda o priamu dedičnosť ktorá sa ustanovuje v každej ďalšej generácii.

7.3 Transgeneračná epigenetická dedičnosť

Prenos fenotypov cez tri a viac generácií, potom, čo už látka vyvolávajúca epigenetické zmeny prestala pôsobiť, je typom transgeneračnej dedičnosti. Rozdiel medzi multigeneračnou expozíciou a transgeneračnou dedičnosťou je znázornený na obrázku č.11 v prílohe. Transgeneračná dedičnosť vyžaduje mechanizmus, ktorý dokáže epigenetické zmeny genómu transgeneračne prenášať. Prenos sa môže uskutočniť prostredníctvom meiózy (Grossniklaus et al, 2013). Je dôležité,

aby epigenetické markery odolali demetylačným vlnám v gametogenéze a v rannej embryogenéze. Príkladom látok, ktoré majú transgeneračné účinky, môžu byť pesticídy a fungicídy nachádzajúce sa v potravinách a krmivách rastlinného a živočíšneho pôvodu, ako je vinklozolín alebo metoxychlór. Z pokusov s gravidnými samicami potkanov, ktoré boli vystavené pôsobeniu týchto endokrinných disruptorov vyplynulo, že porucha spermatogenézy, ktorú vyvolali, pretrvávala po dobu najmenej troch generácií a prenášala sa z paternálnych genómov do samčej línie (Schaefer a Nadeau, 2015). Rôzne toxické látky, tak ako práve uvedený vinklozolín, podporuje vznik ochorení, ktoré sú transgeneračne prenášané. Podobné to však môže byť aj so stresom; pokiaľ stres vyvolá ochorenie, prenášané genómovým imprintingom do ďalšej generácie, môže se jednať o transgeneračnú dedičnosť. Výskum Yaoa a jeho kolegov sledoval, aké dopady má chronický stres na endokrinné, metabolické a behaviorálne prejavy spôsobujúce predčasný pôrod (Yao et al.,2014).

Gravidné potkanie samice z rodičovskej generácie F0 vystavili stresovým situáciám a ich gravidné dcéry z generácie F1 a vnučky F2 boli buď tiež vystavené stresu, alebo zostali nestresované v kontrolnej skupine. Výsledok ukázal, že od generácie F1 k F2 a F3, stres postupne znižoval gestačnú dĺžku, prírastok váhy matky, a behaviorálne aktivity a tiež hladinu glukózy v krvi, čo viedlo k vyššiemu riziku predčasného pôrodu. Spomalený rast potomstva a oneskorený behaviorálny vývoj indukovaný stresom bol pozorovaný u potomkov, pričom najväčší efekt mal v F3 generácii. U generácie F2 pozorovali zmenenú expresiu miRNA v mozgu a v maternici, vrátane rodiny génov *Mir-200*, čo je rodina cieľových génov v maternici; iné gény v F1 generácii ako *zeb1* a *zeb2* boli tiež dysregulované viacgeneračným stresom. *Zeb2* bol redukovaný v stresovanej F2 generácii, čo naznačuje kauzálny mechanizmus pre narušenie udržania tehotenstva. Tieto zmeny sa dedili v maternálnej línii. Išlo o prvý výskum, ktorý naznačil, že stres transgeneračne ovplyvňuje riziká predčasného pôrodu (Yao et al.,2014).

7.3.1 Epimutácie

Transgeneračnú dedičnosť vyvolanú exponovanými látkami by mohli vysvetľovať tzv. sekundárne epimutácie. Epimutácie sú podľa McCarreyho "*epigenetické aberácie, ktoré sa vyskytujú v neprítomnosti akejkoľvek genetickej zmeny a sú šírené mitoticky v dcérskych bunkách alebo cez meiózu do ďalších generácií skôr na základe epigenetickej ako genetickej dedičnosti*". Sekundárne epimutácie sú tie, ktoré sa vytvoria po počiatkovej genetickej mutácii a prenášajú sa geneticky, alebo epigeneticky alebo obidvomi spôsobmi. Primárne epimutácie v zárodočnej línii majú potenciál byť opravené epigenetickým reprogramovaním, zatiaľ čo sekundárne epimutácie nie, a tým pádom sa môžu prenášať transgeneračne. Princíp prenosu je podobný ako u imprintovaných génov (McCarrey et al., 2016). V bunkách vystavených pôsobeniu vinklozolínu boli objavené DNA metylácie vo všetkých chromozómoch okrem Y v generáciách F1 – F3. Objavili sa aj zmeny v malých nekódujúcich RNA v spermiiach z generácii F3 a našiel sa celý rad bodových mutácií spôsobujúcich sekundárnu epimutáciu v generácii F3, ale nie v F1. Vzory metylácie a histónových modifikácií sa z veľkej časti vymazali v zárodočnej línii a potom sa obnovili tak, aby poskytli správne epigenetické reprogramovanie pre podporu vývoja v priebehu embryogenézy. Takto sa podobne ako u imprintovaných génov niektoré metylácie DNA, ktorá vyvolávajú primárnu epimutáciu preniesli do ďalších generácií (Schaefer a Nadeau, 2015).

7.3.2 Ďalšie príklady transgeneračnej dedičnosti

Klasickým príkladom epigenetickej transgeneračnej epimutácie je mutácia génu kódujúci receptor Kit u myší. Nefunkčná alela *Kit* spôsobuje u heterozygótov biele chvostíky a nožičky. Zistilo sa, že heterozygóti s iniciovanou (ale nie spontánne) mutáciou alely *Kit* produkujú aberantne skrátené molekuly mRNA. Tieto krátke mRNA sa mendelovsky dedia do

d'alšej generácie, kde pomocou epigenetického mechanizmu sprostredkovaného RNA interferenciou ovplyvňujú expresiu génu Kit, ktorý vyvoláva mutantný fenotyp aj pri neprítomnosti mutovanej alely (Rassoulzadegan et al.,2006).

Asi neprekvapí, že súčasná epidémia cukrovky a obezity môže byť environmentálne indukovaná (Burgio et al.,2015). Normálna metabolická regulácia počas dospelosti, okrem požadovanej dobrej rovnováhy medzi príjmom a výdajom energie, môže byť ovplyvnená prenatálnym a postnatálnym prostredím. Je to myslené tak, že maternálne nutričné obmedzenia môžu v priebehu tehotenstva meniť metabolický fenotyp potomkov prostredníctvom epigenetickej regulácie špecifických génov a to môže byť odovzdávané ďalším generáciám. Boli pozorované zmenené úrovne metylácie a /alebo acetylácie histónov v génoch, ktoré sa podieľajú na konkrétnych, ale aj všeobecných metabolických procesoch. Už aj počas puberty má vysoko kalorická strava významný vplyv na zdravie potomkov rovnakého pohlavia, pretože vedie k výraznému zvýšeniu rizika cukrovky a srdcovocievnych ochorení. Obdobie pred pubertálnym rastom je zvlášť kritické obdobie, v ktorom prebytok živín môže vyvolať špecifické epigenetické zmeny v pohlavných bunkách; a to v génoch nevyhnutných na preprogramovanie hlavných metabolických tkanív. Existujú faktory prostredia, ktoré podporujú obezitu. Sú to chemické látky, tzv.endokrinné disruptory, ktoré podľa Burgia *"interferujú s homeostatickými mechanizmami."* Tých je v súčasnej dobe v životnom prostredí skutočne veľa; patria tam ťažké kovy, organické zlúčeniny s prímiesou chlóru, brómové spomaľovače horenia alebo rôzne perzistentné organické látky. Tieto látky znižujú schopnosť funkcie B buniek³² a/alebo indukujú rezistenciu na inzulín. Účinky endokrinných disruptorov predstavujú riziko prenosu spôsobených ochorení do ďalších generácií prostredníctvom epigenetických značiek na gametickej úrovni. Tak sa

³² B bunka je typ bunky Langerhansových ostrovčekov, ktoré tvoria súčasť pankreasu. Jedná sa o bunku s endokrinnou funkciou, ktorý produkuje do krvi hormón inzulín; ten pomáha bunkám odbúravať z krvi glukózu a tým znižuje jej celkový obsah krvi

neplodnosť, obezita a zmeny v správaní udržia vo fenotype po dobu najmenej troch generácií mužských potomkov (Burgio et al.,2015).

S kvalitou stravovania súvisí aj ďalší prípad epigenetickej transgeneračnej dedičnosti. Byrgena a jeho kolegov zaujímalo, či veľké výkyvy v dostupnosti potravy počas raného vývoja starých rodičov vo farnosti Överkalis v severnom Švédsku ovplyvnili úmrtnosť vnúčat na kardiovaskulárne choroby. Tamojšia populácia zažila roky bohaté a potom roky chudobné na úrodu, čo viedlo v priebehu času k značným rozdielom v dostupnosti výživy. *"Ženy, ale nie muži, vykazovali výrazne vyššiu úmrtnosť na choroby srdca a ciev v prípade, že ich paternálna stará mama zakúsila drastické a nepredvídateľné zmeny v nutričnej dostupnosti"* (Byrgen et al.,2014). Autori naznačujú, že nutričné zmeny by mohli byť epigeneticky viazané na X chromozóm, a potom sa odovzdávajú cez synov na vnučky. Zostáva však nejasné, prečo synovia, ktorý nutne dedia X chromozóm od matky nie sú postihnutí náchylnosťou na srdcovocievne ochorenia. Je pravdepodobnejšie, že epigenetická činnosť a prejavy choroby sú pohlavne špecifické a prenášajú sa genómovým imprintingom z autozomálneho chromozómu.

8 ZÁVER

Expresia génov je komplexný proces vyjadrenia genetickej informácie uloženej v DNA. Reguláciu génovej expresie riadia genetické i epigenetické faktory. My sme sa v práci zaoberali epigenetickou reguláciou; jej mechanizmy nie sú zapísané v sekvenciách báz DNA a prebiehajú ako bezprostredné reakcie bunkových elementov na zmenené podmienky nachádzajúce sa mimo DNA. Zmeny prebiehajú na úrovni bunkového jadra, na úrovni chromatinovej štruktúry a na úrovni génovej transkripcie. Epigenetické informácie sú prenášané prostredníctvom modifikácií štandardných aminokyselín, modifikácií histónov a v posttranslačných úpravách na úrovni mRNA. Genóm je najčastejšie modifikovaný metyláciou a demetyláciou cytozínovej bázy nukleotidov DNA, potom metyláciou a acetyláciou a ubiquitináciou lyzínu, metyláciou arginínu prebiehajúcou na histónoch chromatinu a napokon reorganizáciou cieľových sekvencií v mRNA prostredníctvom miRNA.

V práci sme sa pokúsili uviesť argumenty a príklady, ktoré nám mali pomôcť zodpovedať výskumné otázky: Je epigeneticky regulovaná expresia génov transgeneračne prenosná? Odpovedáme, že nie každá epigenetická zmena je dedičná. Transgeneračne prenosné môžu byť iba epigenetické zmeny, ktoré dokážu odolať demetylačným vlnám v gametogenéze a rannej embryogenéze, a ktoré sa prenesú do ďalšej generácie, aj keď už environmentálne faktory nepôsobia. Môže to byť prenos epigenetickej značky imprintovaných génov a epimutácie na úrovni RNA.

Transgeneračne stabilné môžu byť sekundárne epimutácie, ktoré sa vytvoria po počiatočnej genetickej mutácii a potom sa prenášajú genetickými, epigenetickými alebo kombinovanými spôsobmi. ncRNA a taktiež prenos imprintovaných génov a inaktivácia pohlavného chromozómu sú do veľkej miery transgeneračne stabilné, avšak v závislosti na pohlaví rodiča a potomka. V práci sme sa pokúsili o

podrobné vysvetlenie spôsobu, ako vybrané vplyvy prostredia menia epigenóm.

Epigenóm organizmu je ovplyvnený pôsobením životného prostredia. Bezprostredná reakcia organizmu na pôsobenie environmentálnych faktorov zároveň umožňuje plasticitu fenotypu v pevne danom genotype a tým urýchľuje adaptáciu organizmu na zmenené podmienky. Epigenetické regulácie môžu ovplyvňovať expresiu génov v somatických bunkách; modifikované štruktúry chromatinu sa potom klonálne dedia v ďalších bunkových populáciách jediného organizmu. Pokiaľ sa epigenetické zmeny ovplyvnia iba generáciu F₀, jedná sa o priamu dedičnosť, aj keby sa opakovaným vystavením neustále generovala *de novo* v ďalších generáciách. Vtedy by sme hovorili o multigeneračnom exponovaní, a to aj v prípade, že by epigenetické modifikácie ovplyvnili expresiu génov v pohlavných bunkách plodu gravidnej samice. Epigenetické zmeny sa môžu preniesť do nového organizmu po oplodnení. Prenos je sťažený epigenetickým reprogramovaním v preimplantačnej zygóte, kedy dochádza k rozsiahlym demetylačným a metylačným vlnám, počas ktorých sa metylačné vzorce získané od rodičov vymažú. Výnimku tvoria jedine imprintované gény, ktorých epigenetické stavy sa prostredníctvom ICRs znovu obnovia. V prípade epimutácií ako výsledku pôsobenia environmentálnych faktorov sa zmenené epigenetické stavy prenášajú podobne ako v genomickom imprintingu. Vtedy sa jedná o transgeneračnú dedičnosť. Imprintované gény na autozómoch sa prenášajú z rodiča na potomka v závislosti na pohlaví, ako rodiča, tak aj potomka. Hypotéz odôvodňujúcich príčiny vzniku imprintovaných génov je viacero, v práci sme si predstavili hypotézu rodičovského konfliktu, interlokusový pohlavný konflikt a hypotézu koadaptácie matky a potomstva. Všetky tri hypotézy sa snažia vysvetliť, prečo môže byť evolučne výhodné preniesť epigenetický stav ovplyvňujúci génovú aktivitu z rodiča na potomstva, s prevahou prenosu imprintovaných génov v maternálnej línii.

9 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

AGRAWAL A. A. (2001). "Phenotypic Plasticity in the Interactions and Evolution of Species." *Science* 12 (294):321-326.

AKASHI, H. and K. Taira. (2007). "RNAi and Epigenetics: Pol IV is a Matchmaker of Small RNAs Meeting with Chromatin." *Heredity* 98(3):125-7

AUSIO, J., Wade A. D, Wang,X ., Moore,S.M. (2001). "Histone Variants and Histone Modifications: A Structural Perspective." *Biochemistry and Cell Biology* 79(6):693-708.

BAEDKE,Jan. (2013). "The epigenetic landscape in the course of time: Conrad Hal Waddington's methodological impact on the life sciences" *ScienceDirect* 44 (4): 756-773.

BANNISTER,A.J.,Kouzarides,T.(2011). "Regulation of chromatin by histone modifications." *Cell Research* 21:381–395.

BAKIK, S. (2005). "Silence of the Transcripts: RNA Interference in Medicine." *Journal of Molecular Medicine* 83(10):764-73.

BARLOW, D.P. (1995). "Gametic Imprinting in Mammals." *Science* 270(5242):1610.

BARLOW,D.P.,Stoger,R.,Herrman,B.G., Staito,K.,Schweifer,N. (1991). "The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the *Tme* locus." *Nature* 349: 84-87.

BERLETCH, J. B., Yang,F., Xu,J.,Carrel,L. and Disteche. C. M. (2011). "Genes that Escape from X Inactivation." *Human Genetics* 130(2):237-45.
BioMedicine 16(4): 474-484 .

BLEWITT, M. E., Vickaryous, N. K., Paldi,A.,Koseki,H.,Whitelaw,E. (2006). "Dynamic Reprogramming of DNA Methylation at an Epigenetically Sensitive Allele in Mice." *PLoS Genetics* 2(4).

BORODOVSKY, A., Salmasi, V., Turcan, S., Fabius, A.W.M., Baia, G.S., Eberhart, C.G., Weingart, J.D., Gallia, G.L., Baylin, S.B., Chan,

T.A., et al. (2013). "5-azacytidine reduces methylation, promotes differentiation and induces tumor regression in a patient-derived IDH1 mutant glioma xenograft." *Oncotarget* 4: 1737–1747.

BOURCHIS, D. and Bestor, T. H. (2006). "Origins of Extreme Sexual Dimorphism in Genomic Imprinting." *Cytogenetic and Genome Research* 113(1-4):36-40.

BURGIO, E., Lopomo, A. and Migliore, L. (2015). "Obesity and Diabetes: From Genetics to Epigenetics." *Molecular Biology Reports* 42(4):799-818.

BUTLER, M. G. (2009). "Genomic Imprinting Disorders in Humans: A Mini-Review." *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 26(9-10):477-86 .

BYGREN, L.O., Tinghög, P., Carstensen, J., Edvinsson, S., Kaati, G., Pembrey, M.E. and Sjöström, M. (2014). "Change in Paternal Grandmothers' Early Food Supply Influenced Cardiovascular Mortality of the Female Grandchildren." *BMC Genetics* 15:12.

CANOVAS, S., Ross, P.J. (2016). "Epigenetics in preimplantation mammalian development." *Theriogenology* 86(1):69-79.

CARRELL, D. (2008). "Contributions of spermatozoa to embryogenesis: assays to evaluate their genetic and epigenetic fitness." *Reproductive*

CORTESSIS, V. K., Duncan, C., Thomas, A. J, Breton, C. V., Mack, T. M., Siegmund, K. D., Haile, R.W. and Laird, P. W. (2012). "Environmental Epigenetics: Prospects for Studying Epigenetic Mediation of Exposure-Response Relationships." *Human Genetics* 131(10):1565-89.

CURLEY, J.P, Barton, S., Surani, A., Keverne, E.B. (2004). "Coadaptation in mother and infant regulated by a paternally expressed imprinted gene." *Proc R Soc B* 271: 1303–1309.

DANCHIN, É., Charmantier, F. Champagne, F.A., Mesoudi, A., Pujol, B., Blanchet, S. (2011). "Beyond DNA: Integrating Inclusive Inheritance into an Extended Theory of Evolution." *Nature Reviews. Genetics* 12(7):475-86.

DAS, R., Hampton, D. D., & Jirtle, R. L. (2009). "Imprinting evolution and human health. *Mammalian Genome*," 20(9-10): 563-72.

DAXINGER, L. and Whitelaw, E. (2012). "Understanding Transgenerational Epigenetic Inheritance Via the Gametes in Mammals." *Nature Reviews Genetics* 13(3):153-62.

DAY, T., & BONDURIANSKY, R. (2004). "Intralocus sexual conflict can drive the evolution of genomic imprinting." *Genetics* 167(4): 1537-46.

DE, L. A., Ferrari, F., Xi, R., Fujiwara, Y., Benvenisty, N., Deng, H., Hochedlinger, K., Jaenisch, R., Lee, S., Leitch, H. G., Lensch, M. W., Lujan, E., Pei, E., Rossant, J., Wernig, M., Park, P. J. and Daley, G. Q. (2015). "Hallmarks of Pluripotency." *Nature* 525(7570):469-478.

DEAKIN, J.E., Domaschenz, R. Lim, S.P., Ezaz, T., Rao, S. (2014). "Comparative epigenomics: an emerging field with breakthrough potential to understand evolution of epigenetic regulation." *AIMS Genetics* 1 (1):34-54.

DEANS, C., & Maggert, K. A. (2015). "What do you mean, "epigenetic"?" *Genetics*, 199(4), 887-896.

DEICHMAN, Ute. (2016). "Epigenetics: The origins and evolution of a fashionable topic." *Developmental Biology*, 416:249-254.

DIAS, R.P. and Maher, E. R. (2013). "Genes, Assisted Reproductive Technology and Trans-Illumination." *Epigenomics* 5(3):331-340.

DIETZ, D. M. and Nestler, E. J. (2012). "From Father to Offspring: Paternal Transmission of Depressive-Like Behaviors." *Neuropsychopharmacology* 37(1):311-2.

DWIVEDI, R. S., Herman J.G., Mccaffrey, T. A. and Raj, D. S. C. (2011). "Beyond Genetics: Epigenetic Code in Chronic Kidney Disease." *Kidney International* 79(1):23-32.

EHLERS, A., Oker, E., Bentink, D. Lenze, S., Stein, H. and Hummel, M. (2008). "Histone Acetylation and DNA Demethylation of B Cells Result in a Hodgkin-Like Phenotype." *Leukemia* 22(4):835-41 .

FANG, M., Chen, D., Yang, S. (2007). "Dietary Polyphenols May Affect DNA Methylation". *The Journal of nutrition*. 137 (1):223S-228S.

FERGUSON-SMITH, A., & M, A. S. (2001). "Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes." *Science*, 293(5532): 1086-9.

FISCHLE, W., WANG, Y., & ALLIS, C. D. (2003). "Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond." *Nature* 425(6957):475-9.

FRAGA, M.F. & ESTELLER, M. (2007). "Epigenetics and aging: the targets and the marks." *TRENDS in Genetics* 23(8): 413-418.

FRIEDMAN, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., Bartel, D.P. (2008). "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs." *Genome Research* 19: 92–105.

GEIMAN, T.M., Robertson, K.D. (2002). "Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation—how does it all fit together?" *Journal of Cellular Biochemistry* 87(2):117-125.

GROSSNIKLAUS, U., Kelly, B., Ferguson-Smith, A., Pembrey, M., & Lindquist, S. (2013). "Transgenerational epigenetic inheritance: How important is it?" *Nature Reviews Genetics* 14(3): 228-35.

GUENTHER, M. G. (2011). "Transcriptional Control of Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells." *Epigenomics* 3(3):323-43.

GUN, P., Knudsen, S. et al. (2006) "Increased skewing of X chromosome inactivation in Rett syndrome patients and their mothers." *European Journal of Human Genetics* 16(11): 1189-94.

HAIG, D. (2014). "Coadaptation and Conflict, Misconception and Muddle, in the Evolution of Genomic Imprinting." *Heredity* 113(2):96-103.

HANNA, C. W. and Kelsey, G. (2014). "The Specification of Imprints in Mammals." *Heredity* 113(2):176-83.

HENNING, S. M., Wang, P., Carpenter, C.L. and Heber, D. (2013). "Epigenetic Effects of Green Tea Polyphenols in Cancer." *Epigenomics* 5(6):729-41.

CHEN, J., Shengde, W.U., Sheng, W.E.N., et al. (2015) "The Mechanism of Environmental Endocrine Disruptors (DEHP) Induces Epigenetic Transgenerational Inheritance of Cryptorchidism." *PLoS ONE* 10(6): 1-16 .

JABLONKA, E. and LAMB, M.J. (1998). "Epigenetic inheritance in evolution." *Journal of Evolutionary Biology* 11(2): 159-183.

JANECKA, M., Mill, J., Baason, M.A., Goriely, A., Spiers, H., Reichenberg, A., Schalkwyk, L., Fernandes, C. (2017). "Advancing paternal age effects in neurodevelopmental disorders - review of potential underlying mechanisms." *Translational Psychiatry* 7:1019.

JEANISCH, R., Bird, A. (2003). "Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals." *Nature Genetics* 33: 245 - 254.

JENKINS, T. G. and Carrell D.T. (2011). "The Paternal Epigenome and Embryogenesis: Poising Mechanisms for Development." *Asian Journal of Andrology* 13(1):76-80.

JIRTLE, R.L. (2009). "Epigenome: The Program for Human Health and Disease." *Epigenomics* 1(1):13.

JONES, P. A. and Takai, D. (2001). "The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics." *Science* 293(5532):1068-70.

JUNG, Y. H., Gupta, M. K., Shin, J. Y., Uhm, S. J., Lee, H. T. (2010). "MicroRNA signature in testes-derived male germ-line stem cells." *Mol. Hum. Reprod.* 16: 804-810.

KANTOR, B., Shemer, R. and Razin, A. (2006). "The Prader-Willi/Angelman Imprinted Domain and its Control Center." *Cytogenetic and Genome Research* 113(1-4):300-5.

KIM, D. H. and J. J. Rossi. (2007). "Strategies for Silencing Human Disease using RNA Interference." *Nature Reviews. Genetics* 8(3):173-84.

KIMMINS, S., Sassone-Corsi, P. (2005). "Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells." *Nature* 434:583-589.

KLÄVER, R., Sánchez, V., Damm, O. S. Redmann, K., Lahrmann, E., Sandhowe-Klaverkamp, R., Rohde, C., Wistuba, J., Ehmcke, J., Schlatt, S., and Gromoll, J. (2015). "Direct but no Transgenerational Effects of Decitabine and Vorinostat on Male Fertility." *PLoS One* 10(2).

KORYAKOV, D.E. (2006). "Histone Modification and Regulation of Chromatin Funktion." *Russian Journal of Genetics* 42(9):970-84.

LARIBI, K., Denizon, N., Ghnaya, H., Atlassi, M., Besancon, A., et al. (2014). "Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: the first report of

two cases treated by 5-Azacytidine." *European Journal of Hematology* 93 (1):81-85.

LOBO, M.E.A., Vázquez, N.A. and Londoño, F.L.F. (2013). "X Chromosome Inactivation in Mammalian Embryonic development*/Inactivación Del Cromosoma X En El Desarrollo Embrionario mamífero/Inativação do Cromossomo X no Desenvolvimento Embrionário Dos Mamíferos." *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 8(2):108-119.

MACLARY, E., Buttigieg, E., Hinten, M., Gayen, S., Harris, C., Sarkar, M.K., Purushothaman, S and Kalantry, S. (2014). "Differentiation-Dependent Requirement of Tsix Long Non-Coding RNA in Imprinted X-Chromosome Inactivation." *Nature Communications* 5:4209.

MASTONS, G.A., Evans, S.K., Green, M.R. (2006). "Transcriptional Regulatory elements in the Human Genom." *Annual review of Genomic and Human genetics* 7: 29-59.

MATHERS, J. C. (2008). "Session 2: Personalised Nutrition Epigenomics: A Basis for Understanding Individual Differences?" *The Proceedings of the Nutrition Society* 67(4):390-4 .

MCCARREY, J.R., Lehle, J. D., Raju, S. S., Wang, Y., Nilsson E.E., Skinner, M.K. (2016). "Tertiary Epimutations - A Novel Aspect of Epigenetic Transgenerational Inheritance Promoting Genome Instability." *PLoS One* 11(12).

MCDONALD, J. F., Matzke, M. A. and Matzke, A. J. (2005). "Host Defenses to Transposable Elements and the Evolution of Genomic Imprinting." *Cytogenetic and Genome Research* 110(1-4):242-9.

MESSERSCHMIDT, D. M., de Vries, W., Ito, M., Solter, D., Ferguson-Smith, A. and Knowles, B.B. (2012). "Trim28 is Required for Epigenetic Stability during Mouse Oocyte to Embryo Transition." *Science* 335(6075):1499-1502.

MONK, M. (2002). "Mammalian Embryonic Development - Insights from Studies on the X Chromosome." *Cytogenetic and Genome Research* 99(1-4):200-9.

MOORE, T. REIK, W. (1996). "Genetic conflict in early development: parental imprinting in normal and abnormal growth." *Reviews of reproduction* 1:73-77.

MOOSAVI, A., ARDEKANI, A. M. (2016). "Role of Epigenetics in Biology and Human Diseases." *Iranian Biomedical Journal*, 20(5): 246–258.

MOREY, C. and Avner, F. (2011). "The Demoiselle of X-Inactivation: 50 Years Old and as Trendy and Mesmerising as Ever." *PLoS Genetics* 7(7) .

NAUHOF, M., Levin, M., Rechavi, O. (2016). "Vertically- and horizontally-transmitted memories - the fading boundaries between regeneration and inheritance in planaria." *Biology Open* 5: 1177-1188.

NICHOLLS, R. D. (1994). "Imprinting: The Embryo and Adult Point of View." *Trends in Genetics* 10(11):389.

OKAMOTO, I. and HEARD, E. (2009). "Lessons from Comparative Analysis of X-Chromosome Inactivation in Mammals." *Chromosome Research* 17(5):659-69.

OKAMOTO, I., Arnaud, D., Baccon, P. L., et al. (2005). "Evidence for De Novo Imprinted X-Chromosome Inactivation Independent of Meiotic Inactivation in Mice." *Nature* 438(7066):369-73.

OKANO, M., Bell, D. W., Gaber, D. A., Li, E. (1999). "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." *Cell* 99: 247-257.

ØRSTAVIK, K. H. (2009). "X Chromosome Inactivation in Clinical Practice." *Human Genetics* 126(3):363-73.

PATTEN, M. M., Ross, L., Curley, J. P., Queller, D. C., Bonduriansky, R. and Wolf, J. B. (2014). "The Evolution of Genomic Imprinting: Theories, Predictions and Empirical Tests." *Heredity* 113(2):119-28.

PAYER, B., Lee, J. T. and Namekawa, S. H. (2011). "X-Inactivation and X-Reactivation: Epigenetic Hallmarks of Mammalian Reproduction and Pluripotent Stem Cells." *Human Genetics* 130(2):265-80.

PENNELL, T. M.; Morrow, E. H. (2013). "Two Sexes, One Genome: The Evolutionary Dynamics of Intralocus Sexual Conflict". *Ecology and Evolution*. 3: 1819–34.

PENNY, G. D., Kay, G. F., Sheardown, S. A., Rastan, S. and Brockdorff, N. (1996). "Requirement for Xist in X Chromosome Inactivation." *Nature* 379(6561):131-7.

RAISSIG, M. T., Baroux, C., & Grossniklaus, U. (2011). "Regulation and flexibility of genomic imprinting during seed development." *Plant Cell*, 23(1): 16-26.

RASSOULZADEGAN, M. and CUZIN, F. (2015) "Epigenetic heredity: RNA-mediated modes of phenotypic variation." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1341(1): 172-175.

RASSOULZADEGAN, M., Grandjean, V., Gounon, P., Vincent, S., Gillot, I., Cuzin, F. (2006). "RNA-Mediated Non-Mendelian Inheritance of an Epigenetic Change in the Mouse." *Nature* 441(7092):469-74.

REIK, W. (2007). "Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development." *Nature* 447(7143): 425-32.

REIK, W., Walter, J. (2001). "Genomic imprinting: parental influence on the genome." *Nature Reviews. Genetics* 2(1):21-32.

RIDEOUT, W. M., Eggan, K. and Jaenisch, R. (2001). "Nuclear Cloning and Epigenetic Reprogramming of the Genome." *Science* 293(5532):1093-8.

RIDOUT, C.K., Brown, R. M., Walter, J. H. and Brown, G.K. (2008). "Somatic Mosaicism for a PDHA1 Mutation in a Female with Pyruvate Dehydrogenase Deficiency." *Human Genetics* 124(2):187-93.

ROYO, H., Cavaille, J. (2008). "Non-coding RNAs in imprinted gene clusters. Biol." *Cell* 100: 149-166.

RUVINSKY, A. (1999). "Basics of Gametic Imprinting." *Journal of Animal Science* 77:228-37.

SCOTT, G.K., Mattie, M.D., Berger, C.E., Benz, S.C., Benz, C.C. (2006). "Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition." *Cancer Res.* 66. 1277–1281.

SHARMA, A. (2015) "Transgenerational epigenetic inheritance: resolving uncertainty and evolving biology." *Biomolecular Concepts* 6(2):87-103.

SCHAEFER, S. and NADEAU, J.H. (2015) "The genetics of epigenetic inheritance: modes, molecules, and mechanisms." *Quarterly Review of Biology* 90(4): 381-415.

SCHEAFER, M., Lyko, F. (2010). "Solving the Dnmt2 enigma." *Chromosoma* 119(1):35-40.

SCHRADER, A., Gross, T., Thalhammer, V., Längst, G. (2015). "Characterization of Dnmt1 Binding and DNA Methylation on Nucleosomes and Nucleosomal Arrays." *PLoS One* 10(10).

SCHRATT, G. M., Tuebing, F., Nigh, E. A., Kane, C. G., Sabatini, M. E., Kiebler, M., & Greenberg, M. E. (2006). "A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development." *Nature*, 439(7074): 283-9.

SCHULZ, R., Proudhon, C., Bestor, T.H., Woodfine, C., Lin, C-S., Lin, S-P., Prissette, M and Oakey, R.J. (2010). "The Parental Non-Equivalence of Imprinting Control Regions during Mammalian Development and Evolution." *PLoS Genetics* 6(11).

SKINNER, M. K. (2014). "Environmental Stress and Epigenetic Transgenerational Inheritance." *BMC Medicine* 12

SKINNER, M. K. (2015) "Environmental Epigenetics and a Unified Theory of the Molecular Aspects of Evolution: A Neo-Lamarckian Concept that Facilitates Neo-Darwinian Evolution." *Genome Biology* 7(5):1296-1302.

SKINNER, M. K., Gurerrero-Bosagna, C., M. et al (2014) "Epigenetics and the Evolution of Darwin's Finches." *Genome Biology* 6(8):1972-1989.

SPENCER, H.G., Feldman, M.W., Clark, A.G., Weisstein, A.E. (2004). "The effect of genetic conflict on genomic imprinting and modification of expression at a sex-linked locus." *Genetics* 166: 565–579.

SPIVAKOV, M., FISHER, A.G. (2007). "Epigenetic signature of stem-cell identity." *Nat.Rev.Genet* 8:263-271

STÖGER, R., Kubicka, P. Liu, C-G., Kafri, T., Razin, A., Cedar, H., Barlow, D.P. (1993). "Maternal-specific methylation of the imprinted mouse *Igf2r* locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal." *Cell* 73:61-71.

SURANI, M.A, Barton S.C, Norris M.L (1984). "Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis." *Nature* 308: 548–550.

SUTER, M., Abramovici, A., Aagaard-Tillery, K. (2010). "Genetic and Epigenetic Influences Associated with Intrauterine Growth Restriction Due to In Utero Tobacco Exposure." *Pediatr Endocrinol Revue* 8(2):94-102.

THRASHER, B. J., Hong, L. K., Whitmire, J.K. and Su, M. A. (2016). "Epigenetic Dysfunction in Turner Syndrome Immune Cells." *Current Allergy and Asthma Reports* 16(5):1-6.

U' BEDA, F., Gardner, A. (2011). "A model for genomic imprinting in the social brain: adults." *Evolution* 65: 462–475.

VAN DRIEL, R., Fransz, P.F., Verschure, P.J. (2003). "The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels." *Journals of Cell Science* 116:4067-4075

VASKOVA, E. A., Dementyeva, E. V., Shevchenko, A. I., Pavlova, S. V., Zhelezova, A. I., VandeBerg J.L. and Zakian, S. M. (2014). "Dynamics of the Two Heterochromatin Types during Imprinted X Chromosome Inactivation in Vole *Microtus Levis*." *PLoS One* 9(2):e88256.

VILLARD, L., Lévy, N., Xiang, F., Kpebe, A., Labelle, V., Chevillard, C., Zhang, Z., Schwartz, C. E., Tardieu, M., et al. (2001). "Segregation of a Totally Skewed Pattern of X Chromosome Inactivation in Four Familial Cases of Rett Syndrome without MECP2 Mutation: Implications for the Disease." *Journal of Medical Genetics* 38(7):435.

WALSH, C. P., Chaillet, J. R. and Bestor, T. H. (1998). "Transcription of IAP Endogenous Retroviruses is Constrained by Cytosine Methylation." *Nature Genetics* 20(2):116-117.

WEAVER, J. R., Susiarjo, M., Bartolomei, M.S. (2009). "Imprinting and Epigenetic Changes in the Early Embryo." *Mammalian Genome* 20(9-10):532-43.

WEKSBERG, R., Smith, A. C., Squire, J. and Sadowski, P. (2003). "Beckwith-Wiedemann Syndrome Demonstrates a Role for Epigenetic Control of Normal Development." *Human Molecular Genetics* 12.

WHAYNE, T. F. (2015). "Epigenetics in the Development, Modification, and Prevention of Cardiovascular Disease." *Molecular Biology Reports* 42(4):765-776.

WOLF, J. B. and Hager, R. (2006). "A Maternal-Offspring Coadaptation Theory for the Evolution of Genomic Imprinting." *PLoS Biology* 4(12):e380.

WOLF, J.B., Hager, R. (2009). "Selective abortion and the evolution of genomic imprinting." *Journal of Evolutionary Biology* 22: 2519–2523.

WOODRUFF, R. C., Balinski, M. A. and Bouzat, J. L. (2015). "A Perspective on the Evolution of Germ-Cell Development and Germinal Mosaics of Deleterious Mutations." *Genetica* 143(5):563-569.

YAO, ., Robinson, A. MZucchi, ., F. C. R. , Robbins, J. C., Babenko,O.,Kovalchuk,O.,Kovalchuk,I.,Olson, D.M. and Metz,G.A.S. (2014). "Ancestral Exposure to Stress Epigenetically Programs Preterm Birth Risk and Adverse Maternal and Newborn Outcomes." *BMC Medicine* 12:121.

ZEISEL, S. H. (2011). "What Choline Metabolism can Tell Us about the Underlying Mechanisms of Fetal Alcohol Spectrum Disorders." *Molecular Neurobiology* 44(2):185-191.

ZHANG X.,Zeng,Y.(2010). "Regulation of mamalian microRNA expression." *Journal of Cardiovascular Translational Research* 3 (3):197-203.

Knižné zdroje

JELÍNEK,J.,Zicháček,V.(2007).*Biologie pro gymnázia (teoretická a praktická část)*. Olomouc:Nakladatelství Olomouc.

MATOUŠ,B.(2010). *Základy lékařské chemie a biochemie*.Praha:Galén.

SNUSTAD,D.P., Simmons,M.J.(2009).*Genetika*. Brno:Masarykova univerzita.

VYSKOT,B.(2010). *EpiGenetika*.Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci.

Citované internetové stránky

<http://genetika.upol.cz/download.aspx?id=312&t=0>

http://www.wikiskripta.eu/index.php/Prader%20AFv-Williho_syndrom

<https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js13/genetika/web/pages/08-rezistence-k-abiotickym-faktorum.html>

10 RESUMÉ

This bachelor thesis introduces the basic types of epigenetic mechanisms that affect gene expression, such as DNA methylation, histone modification and RNA interference. The work deals with the transmission of informations from the environment into the epigenom of the generation Fo and the possibility of transfer to the next generations F1 and F2 through multigenerational exposition and through transgenerational inheritance. Bachelor thesis deals with the effect of epigenetic regulation of gene expression induced in parents on embryogenesis of their offspring.

11 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

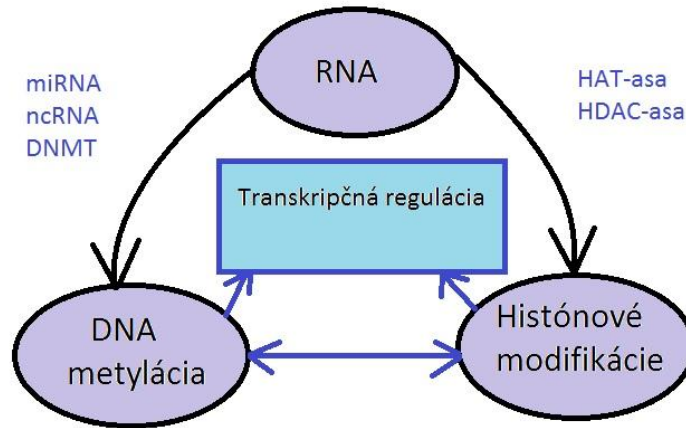
ASCR	oblasť imprintovaných génov súvisiacich s Angelmanovým syndrómom
BMP-2	genetický lokus pre krvný tlak
BWS	Beckwith-Wiedemanov syndróm
CDX2	gén pre kaudálny typ homeoboxu 2
CNS	centrálne nervová sústava
CpG	dinukleotid s fosfodiesterovou väzbou medzi guanínom a citozínom
DES	Dietylstilbestrol
<i>Dlk1-Dio3</i>	zhluk imprintovaných génov podobných delta homológu 1 a génu typu 3 pre jódotyronín deiodinázu
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DNMT	DNA metyltransferáza
<i>DPPA3(Stella/PGC7)</i>	gén pre proteín 3 asociovaný s vývojom pluripotencie
dsRNA	dvojvláknová RNA
E3A	enzým ubiquitín-proteínová ligáza kódovaná génom <i>UBE3A</i>
EGCG	3-epigalokatechín galát
H1oo	špecifický typ histónu H1 nachádzajúci sa v oocytoch

H2A	typ A histónu H2
H2B	typ B histónu H2
H3	histón s označením H3
H3K27	me3 trimetylácia histónu H3 na lyzíne 27
H3K9	lyzín 9 na históne H3
H3S10	serín 10 na históne H3
H4	typ histónu s označením H4
HAT-asa	histónová acetyltransferáza
HDAC-asa	histónová deacetyláza
HMT-asa	histón metyltransferáza
HP1	heterochromatínový proteín typu 1
HSP70	proteín teplotného šoku
<i>hsp70</i>	gén kódujúci HSP70
HSFT	transkripčný faktor tepelného šoku
ICRs	imprintované kontrolné oblasti
<i>Igf2</i>	gén pre inzulínový rastový faktor
<i>Igf2r</i>	gén pre inzulínu podobný rastový faktor
<i>lpw</i>	gén pre imprintovaný Prader-Williho syndróm, spojený s nekódujúcou triedou RNA
<i>kit</i>	gén pre receptor tyrozínkinázového proteínu
LDL	lipoproteíny s nízkou hustotou

<i>LDLRP1</i>	gén pre receptor lipoproteínov s nízkou hustotou súvisiacich s proteínom 1
<i>MECP2</i>	gén kódujúci proteín MECP2-metylový CpG väzbový proteín2
<i>Mir-200a</i>	MicroRNA 200a -gén spojený s miRNA
miRNA	mikro RNA
mRNA	mediátorová RNA
ncRNA	nekódujúca RNA
<i>Oct4</i>	gén pre oktamér viažúci transkripčný faktor 4
<i>Par5</i>	gén pre Prader-Williho/Angelmanovu oblasť 5, spojený s nekódujúcou triedou RNA
piRNA	piwi-interagujúce RNA
pri-miRNA	primárny transkript mikroRNA
PWCR	oblasť imprintovaných génov súvisiacich s PW
PWS/AS	Prader-Williho a Angelmanov syndróm
RISC	RNA indukovaný umlčovací komplex
RNA	kyselina ribonukleová
RNAi	RNA interferencia
siRNA	krátke interferujúce RNA
snoRNA	malá nukleonárna RNA
<i>Sox2</i>	gén pre transkripčný faktor pohlavne determinovaného regiónu Y chromozómu, oblasť 2
TET	desiata-jedenácta translokácia metylcytozín dioxygenázy - rodina enzymatických proteínov kódovaná génom <i>Tet</i>

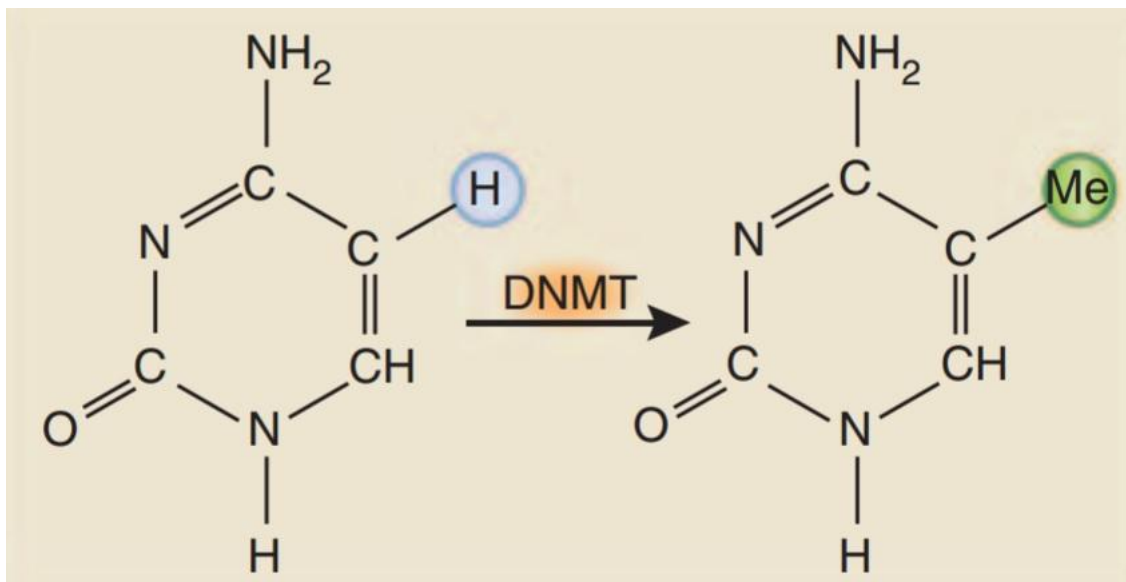
TRIM28	transkripčný intermediátorový faktor 28
Tsix	nekódujúci RNA gén, protizmyslovo prepisovaný voči Xist
ube3a	gén pre E3A
UTX	ubiquitózne transkribovaný tetrakopeptid
Xist	gén pre špecifický transkript inaktivujúci X chromozóm
zeb1	gén kódujúci transkripčný faktor zinkového prstu viažúci sa na oblasť 1
zeb2	gén kódujúci transkripčný faktor zinkového prstu viažúci sa na oblasť 2
Zfp57	gén pre homológ 57 proteínu zinkového prstu
Znf127	gén pre proteín zinkového prstu 127
5mC	metylovaný cytozín na 5.pozícii

12 OBRAZOVÉ PRÍLOHY



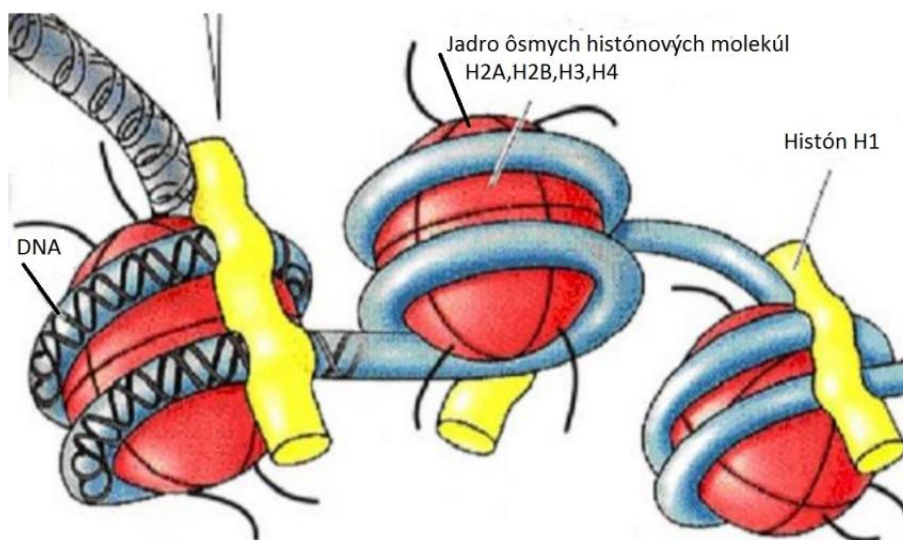
Obrázok č. 1 : Epigenetické mechanizmy v zájomnej súčinnosti za pôsobenia enzýmov DNMT, HAT-asa a HDAC-asa.

[Zdroj: <https://search.proquest.com/docview/817624621?accountid=14965>],
upravené



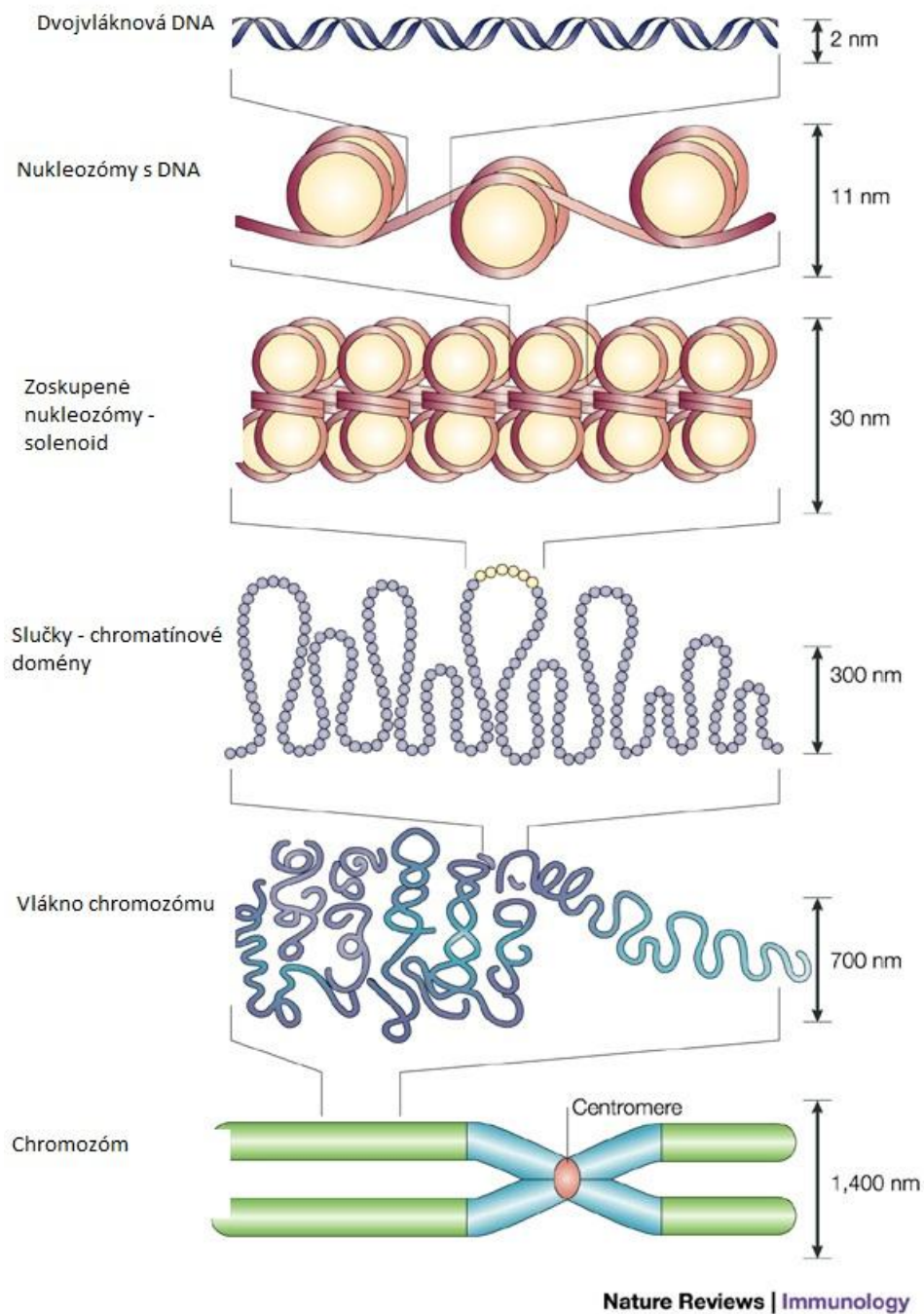
Obrázok č.2 : Metylácia cytozínu na pozícii 5´

[Zdroj: <https://search.proquest.com/docview/817624621?accountid=14965>],
upravené



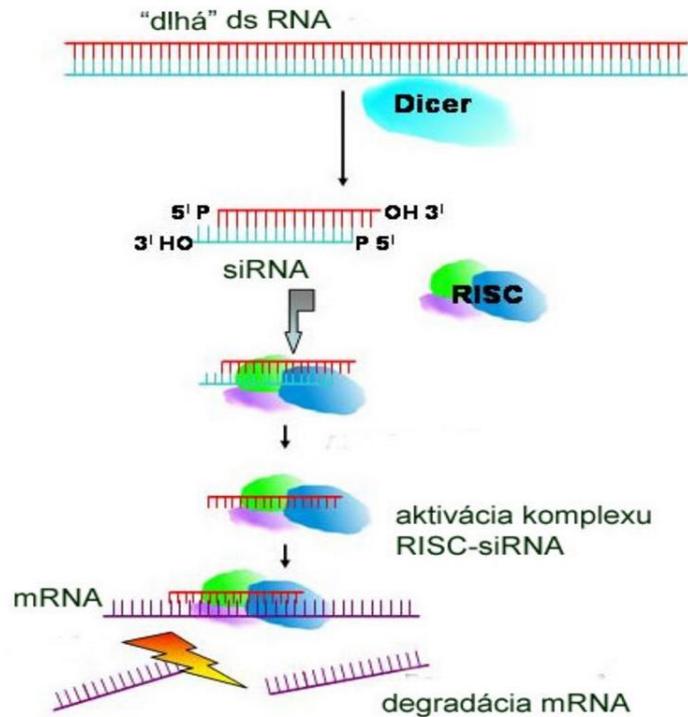
Obrázok č. 3: Vázba histónových proteínov na dvojzávitnicu DNA

[Zdroj: <http://mobile.kreacionismus.cz/content/evoluce-zbavena-pozlatka>],
upravené

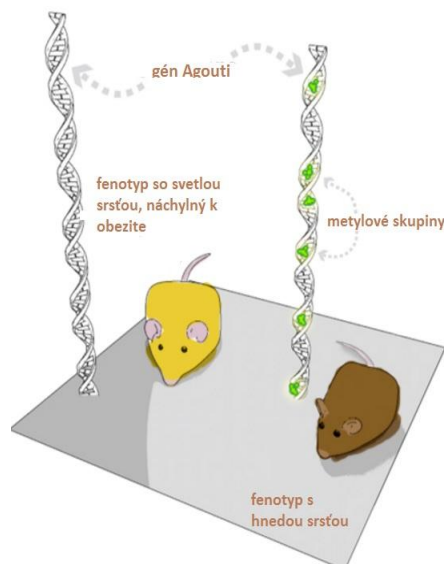


Obrázok č.4 : Štruktúra chromozómu

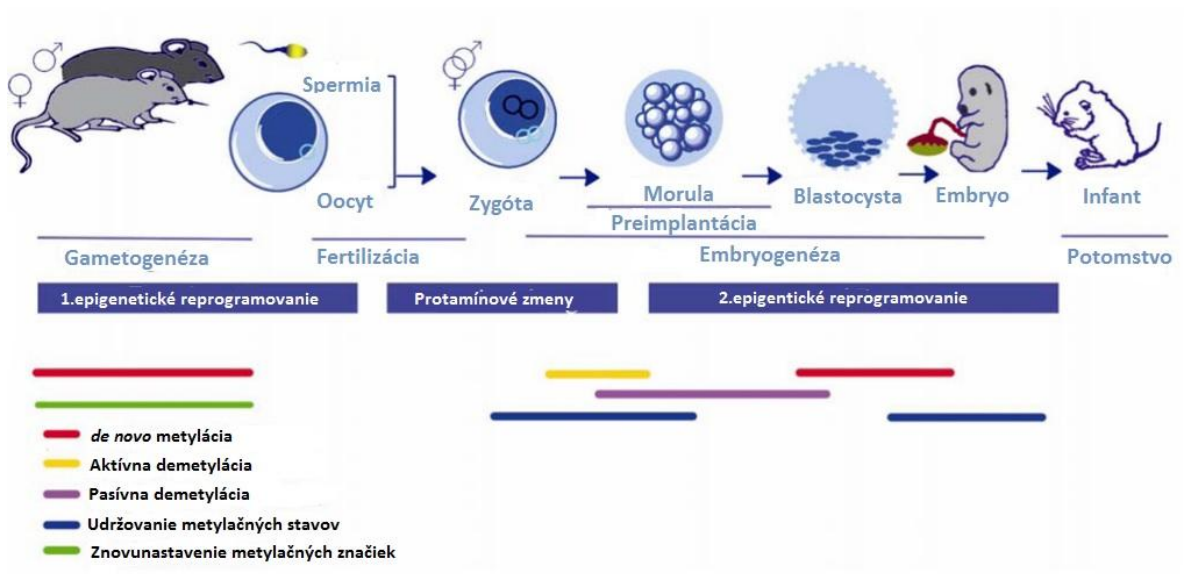
[Zdroj:<http://www.dogforum.sk/viewtopic.php?f=30&t=2210&start=150&mobile=on>], upravené



Obrázok č.5 : Rozklad RNA za účasti enzýmu Dicer na krátke nekódujúce siRNA. Spolu s komplexom RISC degradujú mRNA.
 [Zdroj:<http://provokater.blog.sk/detail.html?a=82f4d443aed76b52315c36f4a6be7e0a>], upraven



Obrázok č.6 : Zmena metylácie génu Agouti
 [Zdroj: <http://learn.genetics.utah.edu/content/epigenetics/nutrition/>] upravené



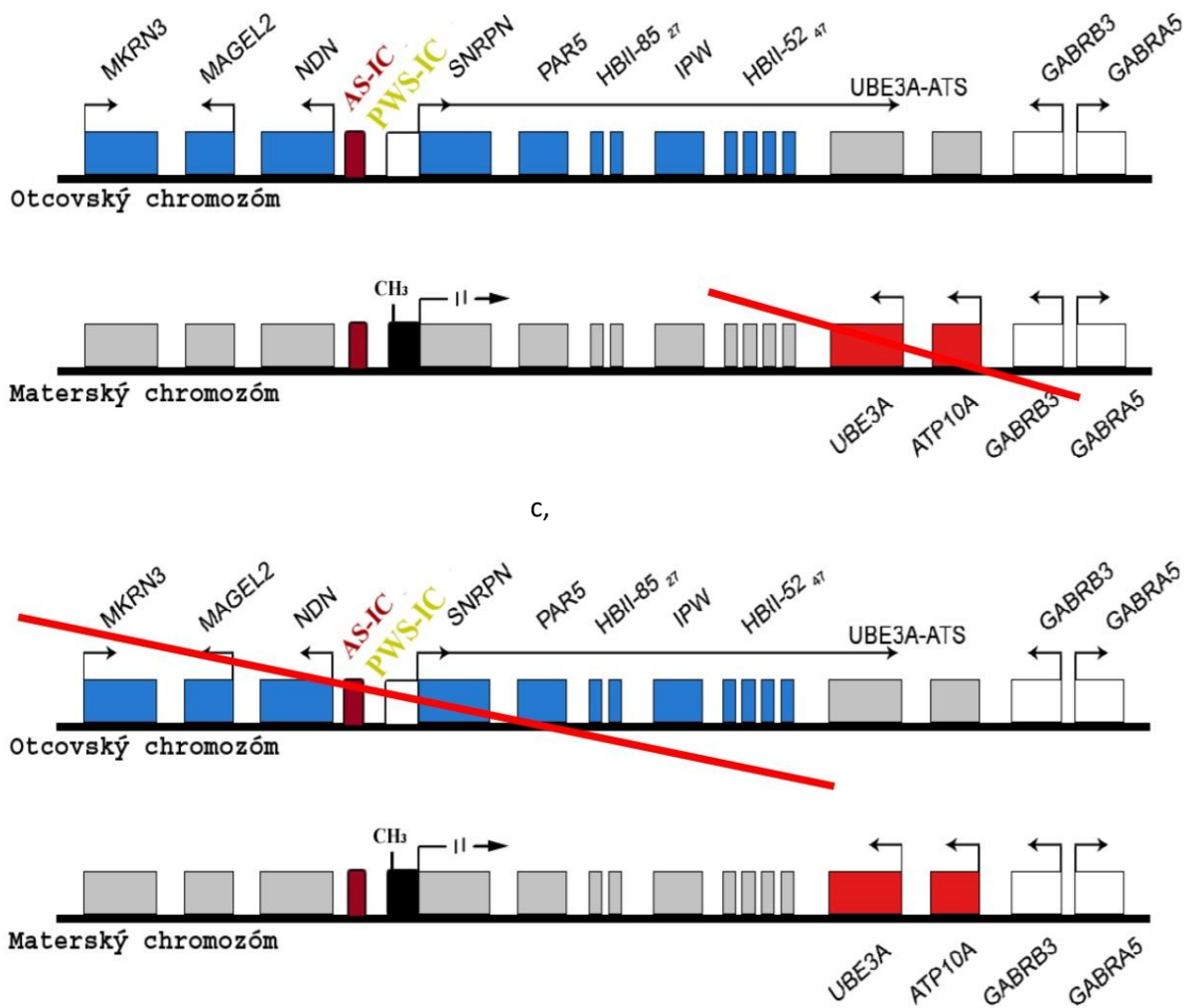
Obrázok č.7 : Epigenetické regulácie v gametogenéze a embryogenéze

[Zdroj: <http://www.mdpi.com/1422-0067/12/12/8661/htm>], upravené



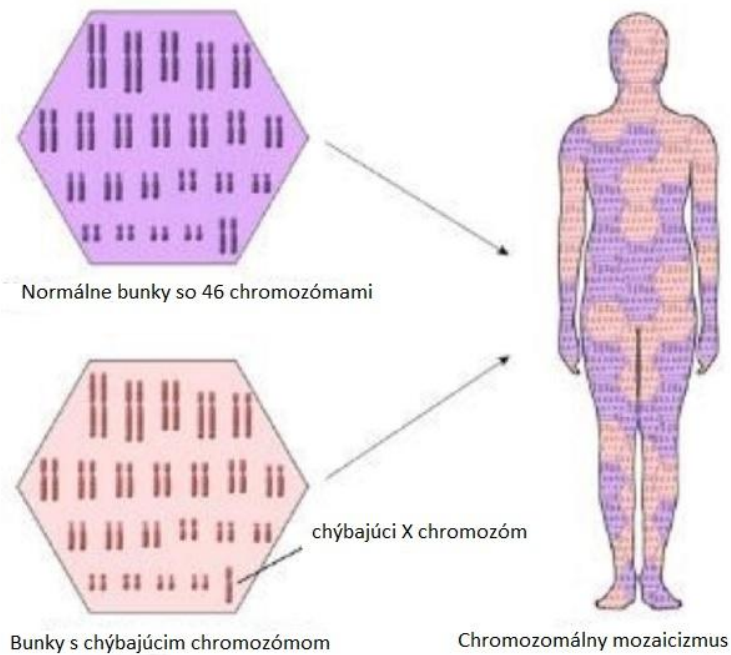
Obrázok č.8 : Beckwith-Wiedemanov syndróm (BWS)

[Zdroj: <http://what-when-how.com/genetics/beckwith-wiedemann-syndrome-genetics/>], upravené



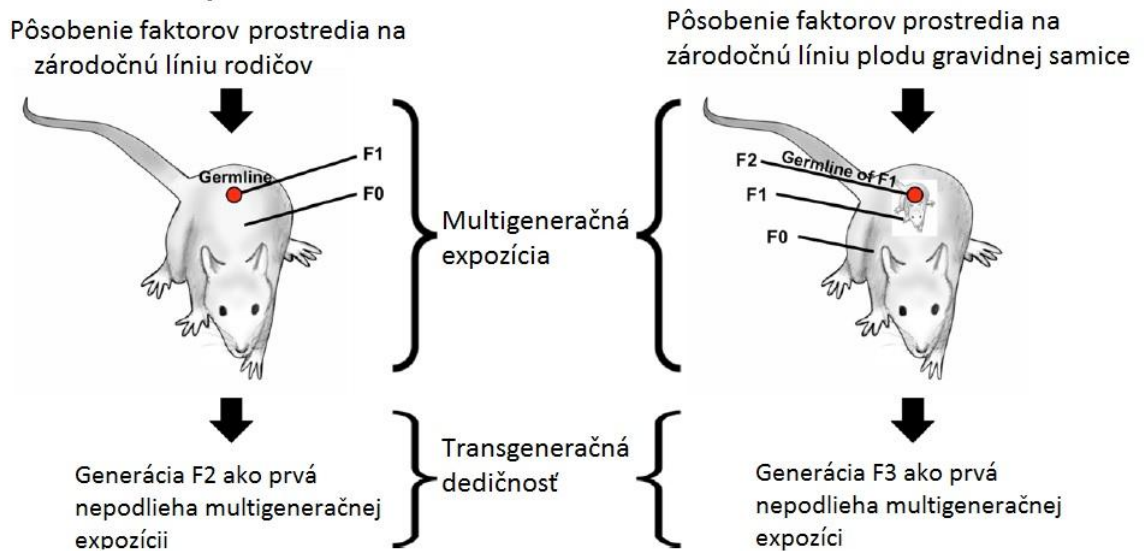
Obrázok č.9 : a,b,c: Schéma alelovo-špecifickej expresie génov na PWS/AS regióne chromozómu 15q11- q13

[zdroj:<http://www.datasolution.sk/pdf/pws.pdf?PHPSESSID=9c9d4c3dcf9c892441c9bb8e52ae4bff>], upravené



Obrázok č.10 : Mozaicizmus

[Zdroj: <http://www.cdk15.sk/co-je-cdk15/geneticke-pozadie-cdk15/>], upravené



Obrázok č.11 : Multigeneračná a transgeneračná dedičnosť:

[Zdroj: <https://search.proquest.com/docview/1560291643?accountid=14965>], upravené