



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ**  
**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ**

**Μ.Δ.Ε. ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ**

**Επιγενετικές τροποποιήσεις επαγόμενες από πρώιμες  
εμπειρίες στο DNA του εγκεφάλου επίμυος**

**ΚΑΠΙΡΗ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ**  
**ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΣΤΡΙΑ**  
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2012**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ**  
**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ**

**Μ.Δ.Ε. ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ**

**Επιγενετικές τροποποιήσεις επαγόμενες από πρώιμες  
εμπειρίες στο DNA του εγκεφάλου επίμυος**

**ΚΑΠΙΡΗ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ**  
**ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΣΤΡΙΑ**  
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2012**

**ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:** ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΕΠΑΓΟΜΕΝΕΣ ΑΠΟ ΠΡΩΙΜΕΣ ΕΜΠΕΙΡΙΕΣ ΣΤΟ DNA ΤΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΕΠΙΜΥΟΣ

Καπίρη Αλεξάνδρα, Μοριακή Βιολόγος και Γενετίστρια

**Επιβλέπων:** Στυλλιανοπούλου Φωτεινή, Καθηγήτρια

Σταματάκης Αντώνιος, Επίκουρος Καθηγητής

Ευθυμίουπουλος Σπυρίδων, Ανπληρωτής Καθηγητής

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι πρώιμες εμπειρίες που βιώνουν τα νεογνά των θηλαστικών κατά τις πρώτες μέρες της ζωής τους επηρεάζουν καθοριστικά της ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος τους. Η επίδραση αυτή μπορεί να είναι τόσο καθοριστική ώστε να δημιουργήσουν τις απαραίτητες συνθήκες για εμφάνιση γνωσιακών αλλά και ψυχικών δυσλειτουργιών τόσο κατά την παιδική όσο και κατά την ενήλικη ζωή. Από μελέτες που πραγματοποιούνται σε επίμυς φαίνεται ότι πρωταγωνιστικό ρόλο στις εμπειρίες που βιώνουν τα νεογνά αμέσως μετά τη γέννησή τους παίζει, ως επί το πλείστον, η παρουσία της μητέρας καθώς και ο τρόπος με τον οποίο αυτή αλληλεπιδρά με τα μικρά της. Καταδεικνύεται συνεχώς πως η εμπειρίες που βιώνουν στην ευαίσθητη μεταγεννητική περίοδο μπορούν να καθορίσουν τις μετέπειτα συμπεριφορές του ζώου όσον αφορά στην ικανότητα μάθησης και τη μνήμη ή ακόμα και την αντίδραση ή αντιμετώπιση μιας στρεσογόνας εμπειρίας που πιθανών να βιώσουν ως ενήλικα. Πλήθος μελετών στον τομέα της αναπτυξιακής νευροβιολογίας αναδεικνύουν πως επιγενετικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν στα νευρικά κύτταρα των ζώων στις διάφορες περιοχές του εγκεφάλου τους μεσολαβούν ως βασικοί ρυθμιστές στο γονιδιακό προγραμματισμό των κυττάρων αυτών.

Στην προσπάθεια μελέτης των επιγενετικών τροποποιήσεων που συντελούνται, ως αποτέλεσμα πρώιμων εμπειριών, πραγματοποιήθηκε εντοπισμός της φωσφορακετυλιωμένη ιστόνης 3 σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου ενήλικων επίμυων. Τα ζώα αυτά ως νεογνά είχαν εκπαιδευτεί σε ένα μοντέλο ήπιου στρες που βασίζεται στο λαβύρινθο σχήματος T, και στο οποίο τα ζώα βιώνουν είτε συνεχή ενίσχυση μέσω της απρόσκοπτης μητρικής επαφής, είτε συνεχή μη ενίσχυση (ματαιωτική μη ανταμοιβή) μέσω παρεμόδισσης της επαφής με τη μητέρα.

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιολογίας και Βιοχημείας του τμήματος Νοσηλευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του διατμηματικού Μ.Δ.Ε. Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική, κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2010-2011. Το θέμα υπέδειξε η καθηγήτρια του τμήματος Νοσηλευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Στυλιανοπούλου Φωτεινή την οποία και θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά,

τόσο για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με τον τομέα της Νευροβιολογίας, ένα πεδίο που πάντα με γοήτευε αλλά ποτέ μέχρι τώρα δεν είχα τη δυνατότητα να ασχοληθώ όσο και για την αμέριστη βοήθειά της στην εκπόνηση της εργασίας μου. Εκτός από το ενδιαφέρον που μου ενέπνευσε για τον τομέα της Επιγενετικής μέσα από τις διαλέξεις της, θα ήθελα, επίσης, να την ευχαριστήσω και για το συνεχές ενδιαφέρον της για την πρόοδο της δουλειάς μου. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω, ιδιαίτερος τον κύριο Σταματάκη Αντώνιο, επίκουρο καθηγητή του τμήματος Νοσηλευτικής, για την άριστη συνεργασία που μου προσέφερε, τη καθημερινή του καθοδήγηση στη διεξαγωγή των πειραμάτων μου αλλά και για τις συζητήσεις μας, οι οποίες μου γεννούσαν έναν γόνιμο προβληματισμό και τη διάθεση για περαιτέρω επιστημονική αναζήτηση. Κυρίως, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την υπομονή που έδειξε καθ' όλη την πραγματοποίηση της εργασίας μου καθώς και τη συνεχή προθυμία και διάθεση να με βοηθήσει στα διάφορα προβλήματα και ζητήματα που προέκυπταν. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Ευθυμιόπουλο Σπυρίδων, αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Βιολογίας τόσο για τις διαλέξεις του όσο και για τα ενδιαφέροντα θέματα που μας παρουσίασε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών καθώς έθεσε τα θεμέλια ώστε να μπορέσω να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα πτυχιακής εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συνεργάτες μου στο εργαστήριο, τους υποψήφιους διδάκτορες Νίκη Ραφτογιάννη και Βασίλη Μανάτο, τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Έφη Παπαθανασίου και ιδιαίτερος τη Δρ Αναστασία Διαμαντοπούλου τόσο για τη βοήθειά στην πραγματοποίηση των πειραμάτων και ιδιαίτερα τις πρώτες μέρες παρουσίας μου στο εργαστήριο όσο και για την ασταμάτητη διάθεσή της να εξυπηρετήσει και να συμβουλέψει όποιον τη χρειαζόταν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, η οποία με στήριξε υλικά και ψυχολογικά όχι μόνο αυτά τα δύο χρόνια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών, αλλά και σε οποιαδήποτε δυσκολία αντιμετώπισα, αλλά κυρίως για την αμέριστη ενθάρρυνση συμπαράσταση και κατανόηση που επιδεικνύουν σε κάθε μου βήμα.

Αθήνα, 2012

## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	viii
1.1 Πρώιμες εμπειρίες .....	viii
1.2 Ζωικά μοντέλα μελέτης των επιδράσεων των πρώιμων εμπειριών.....	xi
1.3 Πειραματικά μοντέλα μελέτης των επιδράσεων των πρώιμων εμπειριών σε τρωκτικά. .....	xii
1.3.1 Νεογνικός Χειρισμός.....	xii
1.3.2 Σχηματισμός δεσμού μητέρας-νεογνού.....	xiv
1.3.3 Η παρουσία της μητέρας δρα ως διακόπτης μεταξύ της μάθησης φόβου και έλξης στη νεογνική ηλικία .....	xv
1.3.4. Μητρική αποστέρηση.....	xvii
1.3.5. Η ποιότητα της μητρικής συμπεριφοράς προς το νεογνό και οι επιδράσεις της .....	xx
1.3.6. Δοκιμασία λαβυρίνθου σχήματος T (T-maze) .....	xxiii
1.4. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ.....	xxviii
1.4.1. Εισαγωγή .....	xxviii
1.4.2. Μεθυλίωση του DNA .....	xxxii
1.4.3 Τροποποιήσεις ιστονών.....	xxxvi
1.4.4 Επιγενετικές τροποποιήσεις και νευροβιολογία.....	xliv
1.4.5. Επιγενετικές τροποποιήσεις στον ανθρώπινο εγκέφαλο.....	li
2. ΣΚΟΠΟΣ .....	liii
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ.....	lvi
3.1 Πειραματόζωα.....	lvi
3.2. Έκθεση υπό συνεχόμενη ματαίωση ή συνεχόμενη ενίσχυση κατά τη νεογνική ηλικία .....	lvii
3.3. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός.....	lx
3.3.1. Παρασκευή Δειγμάτων.....	lx
3.3.2. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της φωσφοακετυλιωμένης ιστόνης H3 (P <sub>Ac</sub> H <sub>3</sub> ).....	lxi
3.3.3. Σήμανση αντισωμάτων με φθορίζουσες χρωστικές .....	lxii
3.3.4. Διπλός ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της φωσφοακετυλιωμένης ιστόνης H3 (P <sub>Ac</sub> H <sub>3</sub> ) και του c-Fos με αντισώματα σημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές .....	lxii
3.4 Χρώση νευρώνων με τη μέθοδο Golgi.....	lxiii
3.4.1. Παρασκευή Δειγμάτων.....	lxiv
3.4.2. Διαδικασία χρώσης των δειγμάτων.....	lxiv

3.5 Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.....	lxv
3.6. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων .....	lxviii
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	lxix
4.1. Ανοσοϊστοχημεία για τη φωσφοακετυλιωμένη ιστόνη 3 (P(Ser10)Ac(Lys14)) .....	lxix
4.1.1 Έσω κοχχομετωπιαίος φλοιός (MO).....	lxix
4.1.2 Έξω κοιλιακός κοχχομετωπιαίος φλοιός (VLO) .....	lxxi
4.1.3 Φλοιός έλικας προσαγωγίου, περιοχές 1 & 3 (Cg1 & Cg3-PrL).....	lxxii
4.1.4 Αμυγδαλή - περιοχές BLA & CeA.....	lxxiv
4.1.5 Ιππόκαμπος - περιοχές CA1 & CA3.....	lxxvi
4.2 Διπλός ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της φωσφοακετυλιωμένης ιστόνης H3 (PAC <sub>3</sub> H <sub>3</sub> ) και του c-Fos με αντισώματα σημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές.....	lxxviii
4.3. Κυτταροαρχιτεκτονική οργάνωση νευρώνων μετά από χρώση Golgi.....	lxxxi
4.3.1 Έσω κοχχομετωπιαίος φλοιός (MO).....	lxxxi
4.3.2 Έξω κοιλιακός κοχχομετωπιαίος φλοιός (VLO) .....	lxxxii
4.3.3. Ιππόκαμπος - περιοχές CA1 & CA3.....	lxxxiii
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	lxxxvi
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	xcv
ABSTRACT .....	xcvii
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	xcix

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Πρώιμες εμπειρίες

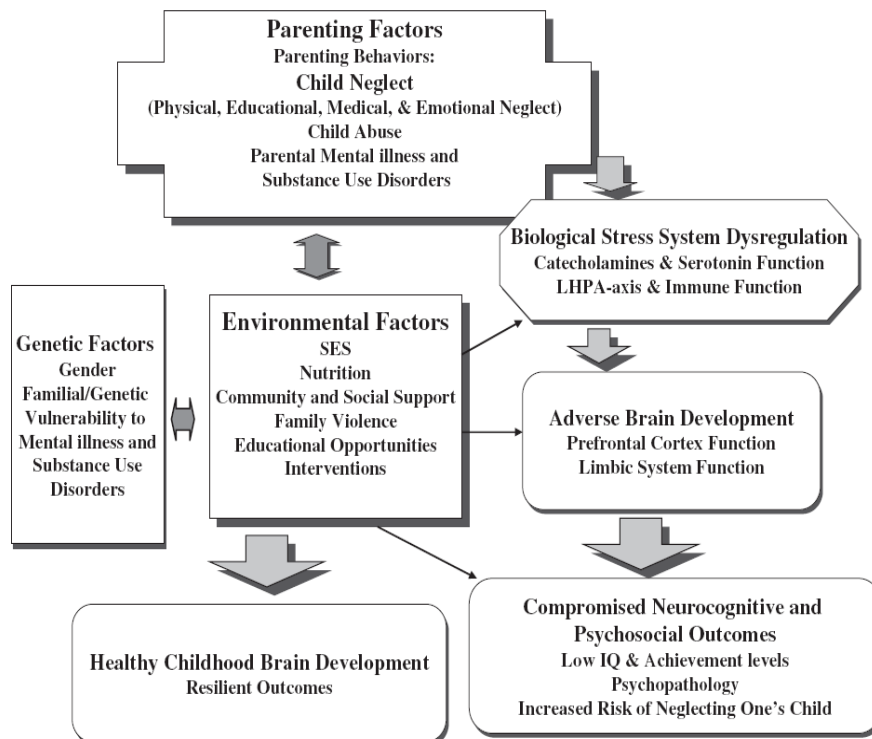
Οι πρώιμες εμπειρίες ενός οργανισμού διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μετέπειτα ζωή και επιβίωσή του, καθώς έχει γίνει πλέον αποδεκτό ότι γονίδια και περιβάλλον (nature vs nurture) αλληλεπιδρούν σε όλη τη διάρκεια της ζωής του. Συγκεκριμένα, οι δυσμενείς πρώιμες εμπειρίες και η παιδική παραμέληση (neglect) φαίνεται πως επιδρούν στο γονιδίωμα του ανθρώπινου οργανισμού επιγενετικά και επηρεάζουν τόσο την ανάπτυξή του όσο και τη φυσική και νοητική του υγεία. Ως προς τον εγκέφαλο και τις λειτουργίες του, οι δυσμενείς πρώιμες εμπειρίες έχουν επανειλημμένως συσχετισθεί με ψυχοπαθολογικές καταστάσεις σε παιδιά και ενήλικες (Nemeroff 1999; Schilling, Aseltine et al. 2007). Η εμπειρία αντίξων συνθηκών κατά την πρώιμη παιδική ηλικία όπως η κακοποίηση, η απόρριψη ή η στέρηση του γονέα επηρεάζουν το προφίλ των κινδύνων ανάπτυξης καρδιομεταβολικών διαταραχών και ενοχοποιούνται για την εμφάνιση σημαντικών ψυχιατρικών διαταραχών όπως η κατάθλιψη, το άγχος, η διαταραχή μετατραυματικού στρες (posttraumatic stress disorder), διάφορα είδη ψυχώσεων, η τάση για κατάχρηση ουσιών, η αντικοινωνική συμπεριφορά, η απώλεια συγκέντρωσης ή η υπερκινητικότητα. Τα άτομα αυτά είναι επίσης πιο επιρρεπή σε απόπειρες αυτοκτονίας και κατανάλωση ναρκωτικών ουσιών (Bunchman et al. 2010). επιβεβαιώνοντας την αρχική αντίληψη του Freud ότι τα πρώιμα ψυχικά τραύματα συσχετίζονται με παθολογικές αποκρίσεις σε επερχόμενα στρεσογόνα γεγονότα (Nemeroff 1999).

Μια σημαντική μερίδα ατόμων με τέτοιου είδους πρώιμες εμπειρίες αποτελούν ενήλικες που έχουν περάσει κάποια από τα πρώτα χρόνια της ζωής τους σε ιδρύματα ορφανών ή παραμελημένων παιδιών. Ο όρος παιδική παραμέληση περιγράφει τη σημαντική παράλειψη φροντίδας από γονέα ή κηδεμόνα, η οποία προκαλεί ή δημιουργεί επικείμενο κίνδυνο για σοβαρή φυσική ή νοητική βλάβη σε ένα παιδί ηλικίας κάτω των 18 ετών. Περιέχει τις παραμέτρους της φυσικής, ιατρικής, εκπαιδευτικής και συναισθηματικής παραμέλησης (Nemeroff 1999; De Bellis 2005). Σχετικές μελέτες έχουν δείξει



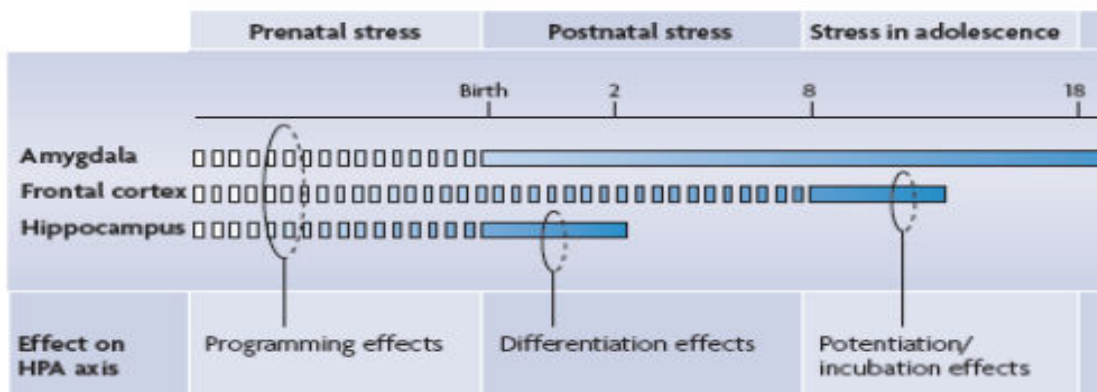
ότι παιδιά με εμπειρίες ιδρυματισμού από τον πρώτο χρόνο της ζωής τους εμφανίζουν μεγάλη ευπάθεια σε μολύνσεις, καθυστέρηση της φυσικής τους ανάπτυξης, φτωχές κοινωνικές δεξιότητες, καθυστέρηση στην ανάπτυξη της γλώσσας και των γνωστικών ικανοτήτων, αδυναμία προσοχής, υπερκινητικότητα, ενώ, όπως προαναφέρθηκε, διατρέχουν σημαντικό κίνδυνο να προσβληθούν από κάποια σημαντική ψυχιατρική διαταραχή όταν ενηλικιωθούν (MacMillan, Fleming et al. 2001; Chartier, Walker et al. 2007).

Τα παραπάνω αποτελέσματα της παιδικής παραμέλησης τείνουν να εξηγηθούν με βάση την υπόθεση ότι τέτοιου είδους εμπειρίες προκαλούν διαταραχές στα βιολογικά συστήματα απάντησης στο στρες και αποδιοργάνωση της ομαλής ανάπτυξης του εγκεφάλου, όπως προτείνει το μοντέλο της **αναπτυξιακής τραυματολογίας** (*Developmental Traumatology Model*) (Εικόνα 1). Σύμφωνα με αυτό, η παραμέληση κατά την παιδική ηλικία γίνεται αντιληπτή με τη μορφή τραυματικής εμπειρίας από το παιδί προκαλώντας του ανησυχία και λύπη, αισθήματα που θεωρούνται υπεύθυνα για την ενεργοποίηση των βιολογικών συστημάτων απάντησης στο στρες και τελικά για τη μη ομαλή ανάπτυξη του εγκεφάλου (De Bellis 2001).



**Εικόνα 1:** Επίδραση διαφόρων παραγόντων στην ανάπτυξη του εγκεφάλου σύμφωνα με το μοντέλο αναπτυξιακής τραυματολογίας.

Συγκεκριμένα σε μελέτες που έχουν γίνει σε έμβρυα, παιδιά και εφήβους φαίνεται ότι το στρες που υφίστανται στη προγεννητική περίοδο επηρεάζει πολλές από τις περιοχές που ρυθμίζονται από και ρυθμίζουν τον άξονα ΥΥΕ, και συγκεκριμένα στον προγραμματισμό του άξονα ΥΥΕ. Ένας από τους ρόλους του ιπποκάμπου είναι να ρυθμίζει τη δραστηριότητα του άξονα ΥΥΕ, άρα μια μεταβολή στη λειτουργία του μπορεί να προκαλέσει μειωμένη έκκριση γλυκοκορτικοειδών σε περιπτώσεις σοβαρής κακοποίησης, ή αυξημένα βασικά επίπεδα σε περιπτώσεις ήπιου στρες (Εικόνα 2). Τέλος, φαίνεται πως ο μετωπιαίος φλοιός είναι ευαίσθητος στην έκθεση στο στρες και κατά τη διάρκεια της εφηβείας, διότι υφίσταται σημαντική διαμόρφωση και σε αυτό το στάδιο ανάπτυξης.



**Εικόνα 2:** Επίδραση των πρώιμων εμπειριών σε περιοχές σημαντικές για την ανάπτυξη και λειτουργία του άξονα ΥΥΕ.

## 1.2 Ζωικά μοντέλα μελέτης των επιδράσεων των πρώιμων εμπειριών

Κλινικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ανθρώπους έχουν κατά καιρούς καταδείξει τη σχέση ανάμεσα στις πρώιμες εμπειρίες τις οποίες βίωσαν, κυρίως τον βαθμό, αλλά και την ποιότητα της μητρικής φροντίδας που δέχτηκαν, με τη μετέπειτα γνωστική τους ικανότητα καθώς και τη προδιάθεσή τους να αναπτύξουν συναισθηματικές διαταραχές κατά την ενήλικη ζωή τους. Εντούτοις, σε μελέτες ανθρώπων η αιτιότητα ανάμεσα στις πρώιμες εμπειρίες και τα μακροχρόνια αποτελέσματά τους είναι δύσκολο να τεκμηριωθεί, καθώς αναδρομικές μελέτες συνήθως επηρεάζονται από τις αναμνήσεις των εθελοντών και προοπτικές μελέτες επηρεάζονται σημαντικά από το γενετικό προφίλ των ατόμων που συμμετέχουν (Caspi et al. 2003). Τα ζωικά μοντέλα, συνεπώς, είναι απαραίτητα για τη κατανόηση της σχέσης ανάμεσα στις πρώιμες εμπειρίες και τη μετέπειτα γνωσιακή και συναισθηματική υγεία.

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα που προσφέρουν τα ζωικά μοντέλα (κυρίως μυών και επίμυων) είναι ότι μπορούμε να επιτύχουμε ένα ελεγχόμενο γενετικό υπόβαθρο αλλά και ανάπτυξη των νεογνών σε ένα καθορισμένο περιβάλλον, όπου όλα τα νεογνά έρχονται αντιμέτωπα με τις ίδιες εμπειρίες. Επιπλέον, δίνεται η δυνατότητα διερεύνησης αλλαγών σε συγκεκριμένα νευρωνικά κυκλώματα, νευροδιαβιβαστές καθώς και σε σηματοδοτικά μονοπάτια που πιθανότατα να μεσολαβούν στην επίδραση των πρώιμων εμπειριών στην ενήλικη ζωή.

Παίρνοντας ως δεδομένο ότι η μητέρα είναι ο βασικός παράγοντας που καθορίζει το περιβάλλον των νεογνών πριν και μετά τη γέννηση, οι κύριες στρατηγικές μελέτης του τρόπου με τον οποίο οι πρώιμες εμπειρίες επηρεάζουν την ανάπτυξη του εγκεφάλου βασίζονται στο δεσμό και τη συμπεριφορά της μητέρας απέναντι στο έμβρυο ή νεογνό (Korosi et al 2009). Το κριτήριο για το πιο από τα διάφορα μοντέλα επιλέγεται στην εκάστοτε μελέτη εξαρτάται από το ερώτημα που τίθεται, καθώς κάποια από τα μοντέλα επηρεάζουν τη προ ή μετά γέννηση περίοδο και κάποια και τις δύο. Τέλος, όσον αφορά στη συσχέτιση και στην αναλογία με αποτελέσματα σε μελέτες σε

ανθρώπους, έχει υπολογιστεί ότι η περίοδος μέχρι τη δέκατη ημέρα ζωής των αρουραίων αντιστοιχεί στο πρώτο τρίμηνο ζωής του ανθρώπου (Clacy B. Et al. 2007).

### **1.3 Πειραματικά μοντέλα μελέτης των επιδράσεων των πρώιμων εμπειριών σε τρωκτικά.**

#### **1.3.1 Νεογνικός Χειρισμός**

Πριν από τον απογαλακτισμό του, ο επίμυς περνά τον περισσότερο χρόνο του κουλουριασμένος μαζί με τα υπόλοιπα νεογνά και την μητέρα τους δημιουργώντας μια δυναμική και συνεκτική κοινωνική ομάδα. Η επίδραση της διατάραξης του δεσμού του νεογνού με τη μητέρα του έχει μελετηθεί με χρήση κυρίως δύο πειραματικών μοντέλων: α) το πειραματικό μοντέλο του *νεογνικού ή πρώιμου χειρισμού* (neonatal ή early handling), σύμφωνα με το οποίο τα μικρά απομακρύνονται σε καθημερινή βάση για μικρό χρονικό διάστημα από τη μητέρα τους, από την ημέρα γέννησης ως τον απογαλακτισμό τους, και β) το *μοντέλο της μητρικής αποστέρησης* (maternal deprivation) στο οποίο τα νεογνά απομακρύνονται από τη μητέρα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (τουλάχιστον 2 ώρες ημερησίως) κατά την περίοδο της γαλουχίας. Γενικά, αν το νεογνό απομακρυνθεί από τη μητέρα του για σχετικά μικρό χρονικό διάστημα υφίσταται μια περίοδο συμπεριφορικής ενεργοποίησης που χαρακτηρίζεται από αυξημένη κινητικότητα, καρδιακό και αναπνευστικό ρυθμό, έκκριση κορτικοστερόνης και παραγωγή υπέρηχων φωνήσεων (ultrasonic vocalizations) (Stevensin 0et al. 2009). Αυτό το μοτίβο συμπεριφοράς αντιπροσωπεύει την αντίδραση των περισσότερων θηλαστικών που υποβάλλονται σε κοινωνική απομόνωση κατά τη νεογνική ηλικία, και αποτελεί μια γενικευμένη έκφραση του άγχους αποχωρισμού (separation distress).

Στις αρχές της δεκαετίας του '50 ο Weininger (1954) πρώτος παρατήρησε ότι το χείδεμα των νεογνών (neonatal gentling) για δέκα λεπτά κάθε μέρα τις τρεις πρώτες εβδομάδες της ζωής τους μείωνε τη μετέπειτα συμπεριφορική εκδήλωση φόβου σε επίμυς. Η σημασία των πρώτων αυτών

εμπειριών καταδείχθηκε πιο έντονα όταν το 1959 οι Levine και Lewis έδειξαν πως η καθημερινή απομάκρυνση των νεογνών από τη μητέρα τους για 3 λεπτά είχε ανάλογα αποτελέσματα (νεογνικός χειρισμός). Αρκετές άλλες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει αυτά τα αποτελέσματα, δείχνοντας επιπροσθέτως, ότι τα θετικά αποτελέσματα του νεογνικού χειρισμού παρατηρούνται σε αρκετές ράτσες (strains/lines) αρουραίων και είναι εξαιρετικά μακροχρόνια (Levine et al 1956). Έχει δειχθεί ότι ο νεογνικός χειρισμός αυξάνει την δραστηριότητα των τρωκτικών και συγκεκριμένα προκαλεί αυξημένη συμπεριφορά εξερεύνησης σε ποικιλία δοκιμασιών που εμπλέκουν έκθεση σε καινοφανή ερεθίσματα (novelty), όπως οι δοκιμασίες «δειλίας» (timidity tests) και η έκθεση των ζώων σε οικεία και άγνωστα κελιά, η δοκιμασία hole-board, δοκιμασίες αναζήτησης απτικής ποικιλίας (tactual variation seeking), στη δοκιμασία του ανοικτού πεδίου (open field) και λαβύρινθοι-τούνελ. Επιπλέον, όταν χρησιμοποιούνται δοκιμασίες που εκτιμούν πιο ειδικά το στρες ή το φόβο του ζώου, φαίνεται ότι ο νεογνικός χειρισμός αυξάνει την εξερεύνηση των ανοιχτών βραχιόνων του ζώου στον υπερυψωμένο λαβύρινθο σχήματος σταυρού, αλλά και τον αριθμό και διάρκεια των επισκέψεων του στα ανοιχτά σημεία του λαβυρίνθου, στοιχεία ενδεικτικά μειωμένου άγχους (Fernandez-Teruel et al 2002). Από τα αποτελέσματα των παραπάνω δοκιμασιών, δεν είναι παράλογο να θεωρηθεί ότι ο νεογνικός χειρισμός φαίνεται να επιδρά θετικά στα ζώα που υπόκεινται σε αυτόν, όταν τα ζώα αυτά βρεθούν σε καταστάσεις εξαιρετικά προκλητικές και στρεσογόνες.

Όσον αφορά στην επίδραση του νεογνικού χειρισμού στην ορμονική λειτουργία, φαίνεται ότι αυτή οδηγεί σε πρόωρη ωρίμανση της απόκρισης του φλοιού των επινεφριδίων, σε μειωμένη έκκριση κορτικοστερόνης (CORT) (Levine 1962), ACTH και προλακτίνης μετά από διέγερση από διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα, καθώς και σε ταχύτερη επάνοδο στα φυσιολογικά επίπεδα των ορμονών (προ στρες), σε σχέση με τα ζώα που δεν έχουν υποστεί νεογνικό χειρισμό. Αξίζει επίσης να αναφερθεί, ότι αυτές οι επιδράσεις του νεογνικού χειρισμού τείνουν να επεκτείνονται καθ' όλη τη διάρκεια της ενήλικου ζωής και είναι πιο εμφανείς σε είδη επίμυων που θεωρούνται από τη φύση τους πιο ευαίσθητα σε στρεσογόνα ερεθίσματα

(Fernandez-Teruel et al 2002). Ως μηχανισμός εξήγησης του φαινομένου του νεογνικού χειρισμού προτάθηκε πρώτα η «υπόθεσης της άμεσης δράσης» (direct action hypothesis) (Levine 1962), σύμφωνα με την οποία τα αποτελέσματα του χειρισμού προέρχονται άμεσα, τουλάχιστον σε ένα βαθμό, από την διέγερση του αναπτυσσόμενου οργανισμού. Πιο πρόσφατα διατυπώθηκε η «υπόθεση της μητρικής μεσολάβησης» (maternal mediation hypothesis) (Liu et al. 1997) που υποστηρίζει ότι ο πρώιμος χειρισμός μπορεί να δρα έμμεσα στα νεογνά μέσω των συνεπειών του στην αλληλεπίδρασή τους με την μητέρα τους (Meaney 2001). Κατά την ενηλικίωση τα ζώα που ως νεογνά έχουν εκτεθεί σε νεογνικό χειρισμό παρουσιάζουν καλύτερη απόκριση στο στρες και μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα σε στρεσογόνες συνθήκες τόσο σε συμπεριφορικό όσο και σε νευροβιολογικό επίπεδο.

### **1.3.2 Σχηματισμός δεσμού μητέρας-νεογνού**

Παρόλο που η μητρική συμπεριφορά αποτελεί μια από τις λειτουργίες που ελέγχονται από τον εγκέφαλο, η απαρχή αυτής της λειτουργίας εξαρτάται από γεγονότα που συμβαίνουν στον πλακούντα, τα οποία με τη σειρά τους ρυθμίζονται από το γονιδίωμα του εμβρύου. Έτσι, η έναρξη, η διατήρηση και ο τερματισμός της μητρικής συμπεριφοράς ελέγχονται από ορμόνες που απελευθερώνονται ως απόκριση σε ερεθίσματα, τα οποία προέρχονται από το έμβρυο. Συγκεκριμένα, η ορμόνη που είναι κυρίως υπεύθυνη για την έκφραση της μητρικής συμπεριφοράς και τη δημιουργία δεσμού με το έμβρυο είναι η ωκυτοκίνη. Η ωκυτοκίνη είναι ένα νευροπεπτίδιο που δρα στο κεντρικό νευρικό σύστημα με στόχο να προάγει τη μητρική φροντίδα, ενώ η περιφερική της δράση οδηγεί στον τοκετό και την απελευθέρωση του γάλακτος. Κατά την προχωρημένη εγκυμοσύνη, ο αριθμός των υποδοχέων της ωκυτοκίνης αυξάνεται τόσο στον εγκέφαλο, όσο και στη μήτρα ως απόκριση στα αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων. Η ωκυτοκίνη συντίθεται σε νευρώνες του υποθαλάμου και απελευθερώνεται στον εγκέφαλο κατά τη γέννηση, διευκολύνοντας την οσφρητική αναγνώριση του βρέφους, βοηθώντας στον τοκετό και επάγοντας την έναρξη της μητρικής φροντίδας. Η διατήρηση της

μητρικής συμπεριφοράς κατά το θηλασμό απαιτεί επίσης την συντονισμένη επίδραση των συστημάτων της ωκυτοκίνης, της χολεκυστοκινίνης, της προλακτίνης και της ντοπαμίνης (Insel et al. 2001) . Οι νευρωνικοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη δημιουργία αυτού του επιλεκτικού δεσμού απαιτούν την ύπαρξη μιας κατάστασης κινητοποίησης από την πλευρά της μητέρας, η οποία εξαρτάται από τις ορμόνες της εγκυμοσύνης καθώς και την ύπαρξη μνήμης αναγνώρισης, η οποία εξαρτάται πρωτίστως από οσφρητικά ερεθίσματα. Στην πλειοψηφία των θηλαστικών με μικρό εγκέφαλο, συμπεριλαμβανομένων των τρωκτικών, ο σχηματισμός δεσμού προτίμησης για τη μητέρα ή το σύντροφο απαιτεί αναγνώριση των ατομικών χαρακτηριστικών μέσω οσφρητικών σημάτων και ενεργοποίηση των νευρωνικών μηχανισμών που αφορούν στην κοινωνική ανταμοιβή. Ωστόσο, η ακριβής φύση της δημιουργίας δεσμού θα πρέπει να εξετάζεται, και οι επιπτώσεις της να αξιολογούνται, στο πλαίσιο του βιολογικού του υποβάθρου και της οικολογικής ή /και κοινωνικής του σημασίας (Lim et al. 2006).

### **1.3.3 Η παρουσία της μητέρας δρα ως διακόπτης μεταξύ της μάθησης φόβου και έλξης στη νεογνική ηλικία**

Στα πρώιμα στάδια της ζωής τους, όταν τα νεογνά επίμυων περιορίζονται στη φωλιά («ευαίσθητη περίοδος»), εκδηλώνουν ενισχυμένη μάθηση προτίμησης και μειωμένη μάθηση αποστροφής. Αυτή η μάθηση χαρακτηρίζεται από προτίμηση για μια οσμή, η οποία επάγεται από συνδυασμό της οσμής με ηλεκτροσόκ, στα πλαίσια μάθησης κλασσικής εξάρτησης. Το παράδοξο μιας τέτοιας μορφής μάθησης δεν οφείλεται στην αδυναμία των νεογνών να νιώσουν πόνο, αλλά αντικατοπτρίζει την αδυναμία του συνδυασμού οσμής-ηλεκτροσόκ να ενεργοποιήσει την αμυγδαλή. Η ευαίσθητη περίοδος λήγει, καθώς η ικανότητα του νεογνού να περπατά αυξάνεται και ξεκινά η ζωή του εκτός φωλιάς, στην ηλικία των 10 ημερών, ενώ στην ηλικία των 21-23 ημερών πραγματοποιείται μια ταχεία μετάβαση από την εξάρτηση στην ανεξαρτησία από τη μητέρα, ο απογαλακτισμός. Τα νεογνά, χρειάζονται τόσο τη συνεχόμενη αλληλεπίδραση με τη μητέρα όσο και την

επιστράτευση της εξαρτημένης από το απρόοπτο μάθησης για την επιβίωση έξω από τη φωλιά. Η παρουσία της μητέρας στην εξαρτημένη μάθηση οσμής-πόνου εξασφαλίζει ότι τα νεογνά θα συνεχίσουν να μαθαίνουν μόνο την προσέγγιση ως απόκριση στις οσμές της μητέρας, ενώ απουσία της να μπορούν να μαθαίνουν πολύπλοκα ενδεχόμενα, όπως απαιτείται για την επιβίωση εκτός της φωλιάς (Sullivan et al. 2000)

Συγκεκριμένα, η ομάδα της R.Sullivan χρησιμοποίησε νεογνά επίμυων 12-15 ημερών, δηλαδή μετά το τέλος της ευαίσθητης περιόδου, σε ένα πρωτόκολλο εξαρτημένης μάθησης φόβου, στο οποίο μια οσμή συνδυάζεται με ηλεκτροσόκ (0.5-mA shock), παρόμοιο με αυτό που εμπλέκει την αμυγδαλή σε ενήλικα ζώα. Τα πειραματόζωα εκπαιδεύτηκαν είτε παρουσία είτε απουσία της μητέρας, η οποία βρισκόταν υπό αναισθησία, ενώ ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε την επόμενη μέρα σε ένα λαβύρινθο σχήματος Y (εξαρτημένη οσμή έναντι οικείας οσμής καθαρού επιστρώματος κλουβιού). Τα νεογνά που υποβλήθηκαν στη διαδικασία εξαρτημένης μάθησης χωρίς την παρουσία της μητέρας έμαθαν να αποφεύγουν την οσμή. Αντίθετα, αυτά που υποβλήθηκαν στην παραπάνω διαδικασία παρουσία της μητέρας εμφάνισαν την παράδοξη προτίμηση για αυτή τη μυρωδιά. Ο οσφρητικός βολβός συμμετείχε στην εμφάνιση προτίμησης της οσμής μόνο στην περίπτωση που η μητέρα ήταν παρούσα, ενώ αντίθετα, απουσία της μητέρας ανιχνεύθηκε συμμετοχή πυρήνων της αμυγδαλής (έσω, έξω βασικός και έξω πυρήνας). Συνοπτικά, αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι τα νεογνά των επίμυων πριν τον απογαλακτισμό διαθέτουν δύο κυκλώματα για τη μάθηση οσμών που έχουν συνδυαστεί με σοκ, με τη μητρική παρουσία να οδηγεί στην καταστολή της επαγόμενης από στρες απελευθέρωσης κορτικοστερόνης και στην επαγωγή του κυκλώματος της μάθησης προτίμησης οσμής που υποστηρίζει την προσκόλληση του νεογνού προς τη μητέρα (Moriceau and Sullivan, 2006).



### 1.3.4. Μητρική αποστέρηση

Η αποστέρηση του νεογνού από τη μητέρα, είτε εφάπαξ για 24 ώρες είτε επαναλαμβανόμενη για τρίωρα ή εξάωρα διαστήματα, φαίνεται να έχει ποικιλία μακροχρόνιων αποτελεσμάτων, που μπορεί να επεκταθούν μέχρι και την ενήλικη ζωή. Το εύρος, ωστόσο, των επιπτώσεων αυτών των εμπειριών παρουσιάζει αρκετές διακυμάνσεις και επηρεάζεται από έναν μεγάλο αριθμό παραγόντων, όπως η διάρκεια των απομακρύνσεων, η χρονική στιγμή της απομάκρυνσης, ο αριθμός των απομακρύνσεων, εάν το νεογνό αποχωρίζεται μόνο από τη μητέρα ή και από τα υπόλοιπα νεογνά της φωλιάς (littermates), το φύλο των ζώων καθώς και την ομάδα των ζώων ελέγχου (control). Για παράδειγμα, καθημερινή απομάκρυνση για 3 ώρες από την πρώτη μέχρι την δέκατη τέταρτη μέρα δεν επέφερε καμία αλλαγή (Caldji et al 2000) ενώ σε άλλες μελέτες μία εικοσιτετράωρη απομάκρυνση μείωσε ή αύξησε σημαντικά τα εκτιμώμενα επίπεδα άγχους του ζώου σε δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (Suchecki et al 2000). Η μητρική αποστέρηση φαίνεται ότι έχει διαφορούμενα αποτελέσματα και στη μάθηση κατά την ενήλικη ζωή. Σε ένα πρωτόκολλο εικοσιτετράωρης απομάκρυνσης από τη μητέρα, η χωρική μάθηση, εκτιμώμενη σε υδάτινο λαβύρινθο, διαταρασσόταν όταν η απομάκρυνση είχε λάβει χώρα την 3<sup>η</sup> μέρα από τη γέννηση και τα μισά νεογνά απομακρύνθηκαν από τη φωλιά, με τη μητέρα να παραμένει με τα άλλα μισά. Αντίθετα, όταν απομακρύνθηκε η μητέρα από τη φωλιά και όχι τα νεογνά την ένατη μέρα, η μάθηση φάνηκε να βελτιώνεται (Oitzl et al 2000). Σε άλλες μελέτες, που χρησιμοποιήθηκε επίσης ο υδάτινος λαβύρινθος, διαπιστώθηκε ότι είτε δεν επέρχεται καμία αλλαγή όταν τα νεογνά απομακρύνονταν καθημερινά για 6 ώρες από την 12η μέχρι την 18η μέρα από τη γέννηση, είτε ότι η μάθηση βελτιωνόταν όταν η απομάκρυνση είχε συμβεί με τον ίδιο τρόπο αλλά από τη 15η μέχρι την 20η μέρα (Lehman et al 2002).

Παρά τα αντικρουόμενα αποτελέσματα που προαναφέρθηκαν, είναι αποδεκτό από όλους ότι η μητρική αποστέρηση μπορεί να επιφέρει μακροχρόνια συμπεριφορικά αποτελέσματα. Δεν είναι ξεκάθαρο, βέβαια, το πού πρέπει να αποδοθούν αυτές οι επιφερόμενες αλλαγές, αν δηλαδή ευθύνεται η απουσία της μητέρας και τα ερεθίσματα από τη φωλιά κατά την

περίοδο της απομάκρυνσης, η συμπεριφορά της μάνας κατά την επανένωσή τους ή τα στρεσογόνα ερεθίσματα κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας. Από την άλλη, σημαντικό ρόλο στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων παίζει και το είδος των αρουραίων που αποτελούν την ομάδα ελέγχου, δηλαδή αν αποτελείται από ζώα που στερούνται παντελώς ερεθισμάτων ή είναι ομάδα που δέχεται περιποίηση κατά τακτά χρονικά διαστήματα (colony husbandry). Αυτές οι περιοδικές απομακρύνσεις δεν αποτελούν μόνο απομακρύνσεις από τη μητέρα και τα υπόλοιπα νεογνά της φωλιάς, αλλά ενέχουν και αλλαγές στη θερμοκρασία σώματος καθώς και περιόδους διατροφικής αποστέρησης (λόγω της απομάκρυνσης από τη μητέρα). Επιπλέον, στις δοκιμασίες μητρικής αποστέρησης, φαίνεται ότι κατά την επανένωση μητέρας ζώου (όταν η μητέρα έχει μείνει μόνη της στη φωλιά κατά την απομάκρυνση), η μητέρα γλείφει (licking) με μεγαλύτερη ενεργητικότητα τα νεογνά, προκαλώντας εντατική ενεργοποίηση παρόμοια με αυτή που λαμβάνουν τα νεογνά που έχουν υποστεί απλά νεογνικό χειρισμό (Pryce et al 2003). Ο βαθμός αναστολής αυτής της συμπεριφοράς, λόγω άγχους της μητέρας ως αποτέλεσμα του αποχωρισμού της από τα νεογνά, αποτελεί έναν ακόμη συγχυτικό παράγοντα στα αποτελέσματα πειραμάτων μητρικής αποστέρησης.

Μία εναλλακτική οπτική της μελέτης των επιδράσεων που έχει η μητρική αποστέρηση αποτελεί η μελέτη ζώων που έχουν κατά τη δοκιμασία απομακρυνθεί πλήρως και από τη μητέρα αλλά και από τα υπόλοιπα ζώα της φωλιάς. Στην περίπτωση αυτή, τα νεογνά τρέφονται τεχνητά με τη χρήση αντλίας (pump) και η θερμοκρασία του σώματος αλλά και η σίτιση ρυθμίζεται συστηματικά. Με αυτόν τον τρόπο δεν υφίσταται επανένωση, όπως με την παραπάνω μεθοδολογία, και συνεπώς καθόλου επιπλέον μητρική διέγερση. Σε αυτές τις πρακτικές, ωστόσο, είναι πιθανόν να πραγματοποιηθεί προσομοίωση του περιβάλλοντος της φωλιάς δίνοντας στο απομονωμένο νεογνό ερεθίσματα γλειψίματος, μυρωδιές της φωλιάς και επαφή με άλλα νεογνά. Στις λίγες αυτές μελέτες που έχει χρησιμοποιηθεί η παραπάνω μεθοδολογία, έχουν, όντως αναφερθεί μακροχρόνιες επιδράσεις στο ζώο. Για παράδειγμα, η ανατροφή χωρίς μητέρα οδηγεί σε αυξημένο άγχος των ζώων στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου και αλλάζει τη ενήλικη κοινωνική και μητρική

συμπεριφορά των υπό δοκιμασία ζώων. Επιπλέον, στα ίδια ζώα φαίνεται ότι επηρεάζεται και η ικανότητά τους για χωρική μάθηση (Gonzalez et al 2001).

Αρκετές μελέτες έχουν καταγράψει ότι παρατεταμένες ή επαναλαμβανόμενες περίοδοι κοινωνικής απομόνωσης των νεογνών οδηγούν σε επιβράδυνση των σχετιζόμενων με την ανάπτυξη ενζύμων, μειώσεις του καρδιακού ρυθμού, αυξημένη ευαισθησία του άξονα υποθαλάμου - υπόφυσης-επινεφριδίων (ΥΥΕ) (Rosenfeld et al 1992) και μια γενικευμένη συμπεριφορική καταστολή ανάλογη με αυτή που εμφανίζεται κατά την κατάθλιψη. Επίμυς που ως νεογνά εκτέθηκαν στο μοντέλο της μητρικής αποστέρησης αδυνατούν να ενταχθούν και να αλληλεπιδράσουν φυσιολογικά με άλλα μέλη του είδους. Τελευταία, η μητρική αποστέρηση για παρατεταμένο χρονικό διάστημα έχει προταθεί και ως ένα πιθανό ζωικό μοντέλο σχιζοφρένειας, αφού εκτός από τις μεταβολές στη λειτουργία του άξονα ΥΥΕ, προκαλεί αλλαγές στην επεξεργασία ακουστικών ερεθισμάτων και σε νευροχημικά συστήματα του εγκεφάλου καθώς και στις γνωστικές λειτουργίες του ζώου κατά την ενηλικίωσή του (π.χ. χωρική μάθηση-μνήμη στο λαβύρινθο σχήματος T, ή στον υδάτινο λαβύρινθο κατά Morris) (Lévy et al 2003).

Τέλος, οι πλειοψηφία των ερευνών που εξετάζουν τις μακροχρόνιες επιδράσεις της μητρικής αποστέρησης, επικεντρώνονται στον αντίκτυπο που μπορεί αυτή να έχει στον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων. Ερευνώντας, λοιπόν τον τρόπο που επηρεάζεται ο άξονας αυτός από το στρες που υφίστανται τα ζώα που έχουν αποχωριστεί από τη μητέρα τους, ο Vasquez και οι συνεργάτες του παρατήρησαν αυξημένα επίπεδα της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης (ACTH) και της κορτικοστερόνης στο πλάσμα των ζώων αυτών σε σχέση με τα ζώα ελέγχου (Vazquez et al 2000). Σε άλλη μελέτη, τα ζώα απομακρύνθηκαν από τη μητέρα για 6 ώρες καθημερινά από την 2η μέχρι την 20η μέρα. Στη συνέχεια, ως ενήλικα υπέστησαν ήπιο footshock στρες και όταν μετά από το ερέθισμα μετρήθηκαν τα επίπεδα της ACTH αυτά ήταν αυξημένα. Ωστόσο, όταν η απομάκρυνση έγινε την 11η-12η μέρα τα επίπεδα της ίδιας ορμόνης ήταν μειωμένα. Από τα αντικρουόμενα αυτά αποτελέσματα φαίνεται ότι η χρονική στιγμή αλλά και η διάρκεια της απομάκρυνσης μπορεί να επηρεάζουν ποικιλοτρόπως την απόκριση του άξονα ΥΥΕ σε στρεσογόνα ερεθίσματα (Van Oers et al 1998).

Επιπλέον, τα επίπεδα νευροτροφικών παραγόντων του υποθαλάμου, όπως ο παράγοντας BDNF και ο παράγοντας IGF-1 μεταβάλλονται (με διαφορετικό τρόπο στα θηλυκά και τα αρσενικά ζώα) κατά τη διάρκεια της μητρικής αποστέρησης και το γεγονός αυτό σχετίζεται με αλλαγές σε δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού και ωρίμανσης των νευρώνων. Άλλες ορμόνες, όπως η λεπτίνη (leptin), η οποία σχετίζεται με την ανάπτυξη του υποθαλάμου, μπορεί επίσης να εμπλέκεται στην παραπάνω διαδικασία, καθώς τα επίπεδά της κατά τη διάρκεια της μητρικής αποστέρησης μειώνονται. Τέλος, κατά τη μητρική αποστέρηση φαίνεται ότι επηρεάζεται και η συναπτική πλαστικότητα των νευρώνων, καθώς τα επίπεδα του BDNF εμφανίζονται σημαντικά μειωμένα στον ιππόκαμπο ενήλικων ζώων που είχαν απομακρυνθεί από τη μητέρα τους για 24 ώρες την ένατη μέρα μετά τη γέννησή τους (Viveros et al 2010).

### **1.3.5. Η ποιότητα της μητρικής συμπεριφοράς προς το νεογνό και οι επιδράσεις της**

Η μητρική φροντίδα και συμπεριφορά στους αρουραίους εκδηλώνεται με τη συχνότητα του θηλασμού όπου η μάνα προσεγγίζει τα μικρά της και τα συγκεντρώνει κάτω από το σώμα της ενώ ταυτόχρονα γλείφει τα νεογνά, και τελικά υιοθετεί μια στάση σώματος με αψιδωτή ράχη βάζοντας το σώμα της πάνω από όλα ή τουλάχιστον τα περισσότερα από τα μωρά της (εικόνα 3). Με αυτόν τον τρόπο δημιουργεί ένα προστατευτικό θόλο από πάνω τους με τη ράχη της. Η χρονική κατανομή των θηλασμών, δηλαδή η συχνότητα και η διάρκειά τους και πιθανόν κάποια ποιοτικά χαρακτηριστικά, όπως ο τρόπος στάσης της μάνας για το θηλασμό φαίνεται να πραγματοποιούνται μέσω ενός πολύπλοκου δικτύου επικοινωνίας που εξαρτάται τόσο από τα νεογνά όσο και από τη διάθεση της μάνας (Meaney 2001).

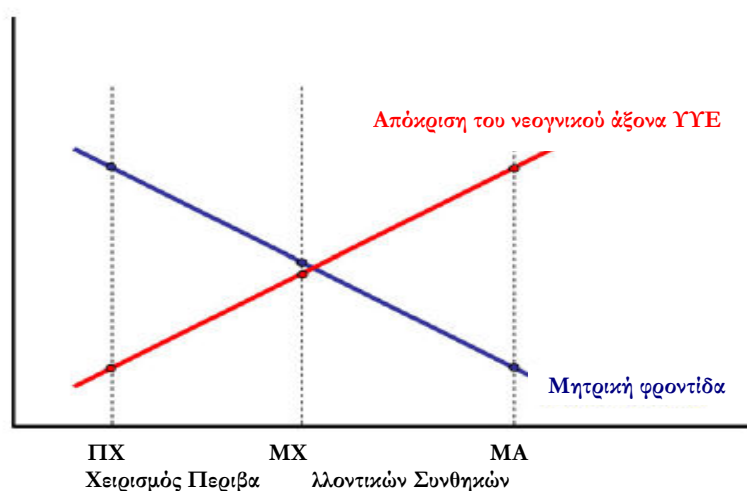


**Εικόνα 3:** Φωτογραφία μητέρας Long-Evans και των νεογνών της. Φαίνεται ο χαρακτηριστικός θόλος που σχηματίζεται με τη ράχη της, καλύπτοντας τα νεογνά της κατά τη διάρκεια του θηλασμού (Szyf et al 2005).

Τίθεται λοιπόν το ερώτημα κατά πόσο η ποιότητα της μητρικής φροντίδας και συμπεριφοράς προς το νεογνό μπορεί να επηρεάσει άμεσα τη νευρωνική ανάπτυξη και επιβίωση. Έτσι σε ενήλικα ζώα που είχαν ανατραφεί από μητέρες με λιγότερο ενεργή μητρική φροντίδα προς τα νεογνά τους, η επιβίωση των νευρώνων στον ιππόκαμπο μειώθηκε και η απόπτωση αυξήθηκε, ενώ δεν φαίνεται να επηρεάστηκε καθόλου ο πολλαπλασιασμός και η ωρίμανση των νευρικών κυττάρων. Οι αλλαγές αυτές σχετίζονται με μειωμένη διακλάδωση των δενδριτών και αδυναμία επαγωγής μακροχρόνιας συναπτικής ενδυνάμωσης (LTP), όπως παρατηρήθηκε σε τομές του ιπποκάμπου ζώων που είχαν προσλάβει μειωμένη μητρική φροντίδα, η οποία πιθανόν να οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα μάθησης και μνήμης των ζώων αυτών (Liu et al 2000).

Η «υπόθεση της μητρικής μεσολάβησης» που θεωρεί ότι αλλαγές στη μητρική συμπεριφορά ευθύνονται για τα αποτελέσματα του πρώιμου χειρισμού στα νεογνά, δεν είναι σε θέση να εξηγήσει πλήρως την αναπτυξιακή πλαστικότητα του άξονα ΥΥΕ και των αποκρίσεων φόβου. Έτσι τελευταία, προστέθηκε ο παράγοντας του περιβαλλοντικού στρες π.χ. από το χωρισμό από τη μητέρα, που επιδρά ανεξάρτητα και αντίστροφα από ότι η μητρική συμπεριφορά, στον άξονα ΥΥΕ και στις αποκρίσεις φόβου των νεογνών. Το μοντέλο που έχει προκύψει περιγράφει τα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης των δύο παραγόντων, μητρικής συμπεριφοράς και περιβαλλοντικού στρες, τόσο σε συνθήκες πρώιμου χειρισμού όσο και μητρικής αποστέρησης. Ο

Francis και οι συνεργάτες του, μελέτησαν τις αλλαγές της μητρικής συμπεριφοράς προς τα νεογνά μετά από νεογνικό χειρισμό και στη συνέχεια ανέλυσαν κατά πόσο αυτές οι ατομικές διαφορές της μητρικής φροντίδας κατά την επανένωση με τα νεογνά μπορούσαν να συσχετιστούν με τις αποκρίσεις στρες και φόβου των ζώων αυτών σε σχέση με τις αποκρίσεις των ζώων ελέγχου. Όντως, διαπίστωσαν ότι η αυξημένη ενεργή μητρική φροντίδα μετά το χειρισμό, εκφρασμένη μέσω αυξημένων γλειψιμάτων και στάσης αφίδας κατά το θηλασμό (LG-ABN) καθώς και τα αντίστοιχα επίπεδα φροντίδας στην ομάδα ελέγχου (τα νεογνά τους δεν είχαν υποστεί νεογνικό χειρισμό), σχετίζονταν αρνητικά με μετρήσεις στρες και άγχους των απογόνων τους (Francis et al 1999).



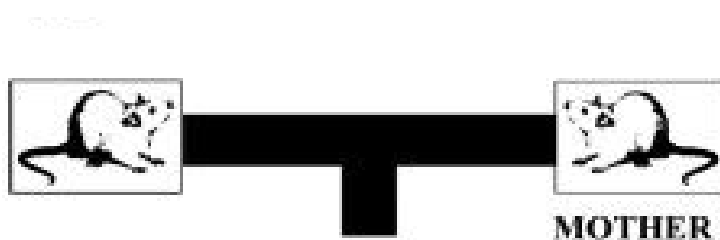
**Εικόνα 4:** Αναπαράσταση της υπόθεσης της μητρικής μεσολάβησης και της επίδρασής της στην απόκριση των νεογνών αρουραίων στο στρες (ΠΧ: πρώιμος χειρισμός, MX: μητρικός χειρισμός, MA: μητρική αποστέρηση) ( [Meaney, 2001](#) )

Επιπλέον, οι ενήλικοι απόγονοι μητέρων με υψηλά επίπεδα LG-ABN είχαν χαμηλότερα επίπεδα ACTH και CORT στο πλάσμα ως απόκριση σε στρεσογόνο ερέθισμα σε σχέση με τους απογόνους μητέρων με χαμηλά επίπεδα LG-ABN. Τα παραπάνω σχετίζονται με τη μειωμένη έκφραση της εκλυτικής ορμόνης της κορτικοτροπίνης (CRH) στον υποθάλαμο, κάτι που σημαίνει καταστολή του συστήματος στρες, και αυξημένη συγκέντρωση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) στον ιππόκαμπο, που παραπέμπει σε αυξημένη ευαισθησία αρνητικής ανάδρασης του συστήματος (Meaney

2001). Επιπλέον, οι απόγονοι των μητέρων με υψηλή συμπεριφορά LG-ABN εμφάνιζαν μειωμένη συναισθηματικότητα σε συμπεριφορικές δοκιμασίες άγχους και φόβου. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι οι παραπάνω αλλαγές διαμεσολαβούνται από αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA καθώς και σε αλλαγές της χρωματίνης (Fish et al 2004).

### 1.3.6. Δοκιμασία λαβυρίνθου σχήματος T (T-maze)

Προκειμένου να μελετηθεί ένας εναλλακτικός τρόπος μάθησης κατά τη νεογνική περίοδο, πριν ακόμα τα νεογνά ανοίξουν τα μάτια τους, σχεδιάστηκε στο εργαστήριο Βιολογίας Βιοχημείας του τμήματος Νοσηλευτικής μια καινοτόμος διαδικασία κατά την οποία τα νεογνά εκπαιδεύονται σε λαβύρινθο σχήματος T. Στη συγκεκριμένη διαδικασία, η επαφή με τη μητέρα θεωρείται ως θετικό ενθαρρυντικό ερέθισμα ενώ αντίθετα η άρνηση της επαφής ως μη ανταποδοτικό (Panagiotaropoulos et al 2009). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το να κάνουν τη σωστή επιλογή κατεύθυνσης αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό της συμπεριφορά των νεογνών αφού είναι απαραίτητο για να εξερευνήσει το μικροπεριβάλλον της φωλιάς αλλά και για την επαφή του με τη μητέρα ώστε να σχηματιστεί ο δεσμός μητέρας- νεογνού.



**Εικόνα 5:** Πειραματική διάταξη κατά την εκπαίδευση των νεογνών (Panagiotaropoulos 2009)

Κατά τη νεογνική περίοδο, τα ζώα που ακόμα έχουν άμεσα την ανάγκη της μητέρας για την επιβίωσή τους σχηματίζουν ένα δεσμό επαφής με τη μητέρα τους και η μητρική αυτή επαφή αποτελεί μια σημαντική πηγή των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων των νεογνών. Η σίτιση των νεογνών από τη μητέρα, ο θηλασμός, καθώς και η μητρική φροντίδα, η περιποίηση και το γλείψιμο (licking και grooming) αποτελούν ένα θετικό και ενθαρρυντικό ερέθισμα, ενώ αντίθετα η άρνηση της μητρικής επαφής επιδρά ως αρνητικό και ματαιωτικό ερέθισμα. Πριν τα νεογνά ανοίξουν τα μάτια τους, κάτι που συμβαίνει μεταξύ της 13ης και 14ης μέρας, τα νεογνά αλληλεπιδρούν με τα υπόλοιπα νεογνά της φωλιάς και κυρίως με τη μητέρα τους μέσω απτικών, οσφρητικών και ακουστικών ερεθισμάτων. Αυτά τα ερεθίσματα αποτελούν τις πρώτες εμπειρίες μάθησης που εστιάζουν κυρίως στο σχηματισμό και τη διατήρηση του δεσμού με τη μητέρα και χαράζουν τα πρώτα μονοπάτια μνήμης. Το να ψάχνει το νεογνό για τη μητέρα του και να έρθει σε επαφή μαζί της είναι ένα πολύ ισχυρό ένστικτο, με μεγάλη σημασία για την επιβίωση του ζώου (Leon M 1992). Έγινε λοιπόν η υπόθεση, ότι το ενθαρρυντικό ερέθισμα επιβράβευσης ( η επαφή με τη μάνα) μπορεί να εξυπηρετήσει τη μάθηση του μονοπατιού σε ένα λαβύρινθο σχήματος T, να στρίψει, δηλαδή, το νεογνό από το σημείο έναρξης στο λαβύρινθο προς τη μητέρα ακολουθώντας ένα μονοπάτι που οδηγεί προς αυτήν. Μέσα από επαναλαμβανόμενες δοκιμασίες, τα νεογνά αναμένεται ότι θα αναπτύξουν διαδικαστικού τύπου μνήμη, ανεξάρτητα από την παρουσία του ερεθίσματος. Από την άλλη μεριά, η άρνηση της αναμενόμενης ανταμοιβής μέσω της μη επαφής με τη μάνα δεν ευνοεί στο να μάθει το νεογνό να κάνει τη σωστή επιλογή μονοπατιού στο λαβύρινθο.

Προκειμένου να διερευνηθεί η νευρωνική ενεργοποίηση στον εγκέφαλο των αρουραίων πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία χρησιμοποιώντας το ογκογονίδιο c-Fos, ένα ογκογονίδιο που θεωρείται δείκτης νευρωνικής ενεργότητας. Όταν τα νεογνά εκπαιδεύτηκαν στην παραπάνω διαδικασία για 4 μέρες (κατά τη 10<sup>η</sup> με 13<sup>η</sup> μέρα ζωής), τα ζώα υπό ανταμοιβή έμαθαν να σχετίζουν το δεξιό βραχίονα του λαβυρίνθου με τη παρουσία της μητέρας, και μέσα από την επαναλαμβανόμενη εκπαίδευση τα ζώα ανέπτυξαν μια διαδικαστικού τύπου μνήμη. Στα ζώα που επιβραβεύτηκαν με την επαφή τους με τη μητέρα, τα επίπεδα του c-Fos ήταν αυξημένα στο ραχιαίο ραβδωτό



σώμα σε σχέση με τα ζώα με το ματαιωτικό ερέθισμα. Τα ζώα που υπέστησαν ματαίωση, καταφέρνουν επίσης να μάθουν τη θέση της μητέρας, κάτι το οποίο φαίνεται από την αύξηση των αριθμών των στροφών στο δεξιό βραχίονα (εκεί όπου βρίσκεται η μάνα), από την αύξηση των σωστών δοκιμών και από τη μείωση του χρόνου που χρειάζονται για να φτάσουν το κλουβί της μητέρα τους. Ωστόσο, η μείωση αυτή ήταν μικρότερη στα ζώα με το ματαιωτικό (DER) σε σχέση με τα ζώα με το ενθαρρυντικό (RER) ερέθισμα υποδηλώνοντας μειωμένη ικανότητα μάθησης. Τα ζώα αυτά είχαν επίσης αυξημένη ενεργοποίηση της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου καθώς και του ραχιαίου ραβδωτού, όπως φάνηκε από ανοσοιστοχημεία τομών εγκεφάλου για τον c-Fos (Panagiotaropoulos et al 2009). Όπως είναι γνωστό, η μη ανταμοιβή του ζώου, όταν αυτή αναμένεται, αποτελεί ένα ματαιωτικό ερέθισμα για το ζώο και φέρει ποικιλία επιπτώσεων, όπως καταστολή μιας ενεργής συμπεριφοράς, συμπεριφορική ακαμψία, εμμονή και παροδική αύξηση της κινητικότητας (Amsel 1992). Αξίζει να σημειωθεί, ωστόσο, ότι ενώ η παράλειψη της ανταμοιβής οδηγεί σε παροδικά αυξημένη κινητικότητα, η καθυστέρηση της ανταμοιβής (καθώς στο πείραμα το ζώο επιστρέφει στη φωλιά μετά το πέρας των 15 λεπτών) οδηγεί σε πτώση της κινητικότητας που οδηγεί σε μείωση της απόδοσης στη δοκιμασία.

Στη δοκιμασία μνήμης, απουσία της μητέρας τα νεογνά που δεν είχαν ανταμοιβή κατά την εκπαίδευση δεν έδειξαν καμία προτίμηση για το βραχίονα στον οποίο βρισκόταν η μητέρα (κατά την εκπαίδευση), γεγονός που μπορεί να θεωρηθεί ως ανεπιτυχής ανάκτηση μνήμης ή λήθη. Η ερμηνεία αυτή, ωστόσο, μπορεί να είναι παραπλανητική, καθώς η μη επιτυχής συμπεριφορά δεν σημαίνει απαραίτητα ελλειμματική μάθηση ή μνήμη αλλά μπορεί να αντικατοπτρίζει μια αναστολή της συμπεριφοράς λόγω της έλλειψης κινήτρου για το ζώο (Panagiotaropoulos et al 2009).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, στα DER ζώα υπήρχε μεγαλύτερη ενεργοποίηση στη CA1 περιοχή του ιπποκάμπου. Η περιοχή αυτή θεωρείται ότι δρα ως ανιχνευτής των ασυμφωνιών ανάμεσα στο αναμενόμενο, το οποίο αποθηκεύεται ως πληροφορία στην οδοντωτή έλικα και στην περιοχή CA3, και στην πληροφορία για το περιβάλλον που εισέρχεται από τον ενδορινικό φλοιό μέσω του μονοπατιού όσφρησης (Vinogradova 2001). Στη συγκεκριμένη δοκιμασία, η ασυμφωνία προκύπτει λόγω του ότι αφενός

υπάρχει αντίληψη της οσμής της μάνας και ακουστικών πληροφοριών στη συγκεκριμένη χωρική διάταξη στο λαβύρινθο αλλά αφετέρου το ζώο βιώνει την άρνηση της ανταμοιβής όταν φτάσει στο σημείο που βρίσκεται η μάνα. Από την άλλη, δεδομένου ότι η CA1 εμπλέκεται στην μάθηση και μνήμη μέσω πλαισίου, η ενεργοποίηση της περιοχής αυτής στα DER ζώα μπορεί να υποδηλώνει επεξεργασία της πληροφορίας πλαισίου, που απορρέει από την παρουσία της μάνας. Αντίθετα, τα μειωμένα επίπεδα ενεργοποίησης στα RER ζώα δύνανται να αντικατοπτρίζουν μειωμένη ευαισθησία στα στοιχεία της μάνας, ως αποτέλεσμα της συνεχούς ενθάρρυνσης που δέχτηκαν και άρα να πραγματοποιούν χαμηλότερη κωδικοποίηση του περιεχομένου της δοκιμασίας.

Χρησιμοποιώντας την ίδια πειραματική διαδικασία, εκτιμήθηκαν επιπλέον τα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα pCREB. Ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας παίζει ένα σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό της μακροχρόνιας μνήμης. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι πραγματοποιείται ενεργοποίηση του CREB μέσω φωσφορυλίωσης αλλά και έκφραση γονιδίων που εξαρτάται από τον παράγοντα αυτό, μετά από εκπαίδευση ανασταλτικής αποφυγής αντίδρασης (step-down inhibitory avoidance training), σε δοκιμασίες αντιμετώπισης φόβου και σε έκθεση με καινούργιο περιβάλλον, όπου τα επίπεδα του φωσφορυλιωμένου CREB (pCREB) σχετίζονται με την εξερεύνηση του καινούργιου περιβάλλοντος (Izquierdo et al 2001). Η ενεργοποίηση, ακόμα, του σηματοδοτικού μονοπατιού PKA/pCREB στον ιππόκαμπο εμπλέκεται στο σχηματισμό χωρικής μνήμης (Mizuno et al 2002). Αφού οι αρουραίοι ως νεογνά εκπαιδεύτηκαν με την πειραματική διαδικασία του λαβυρίνθου σχήματος T, χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με το αν δέχτηκαν την αναμενόμενη ανταμοιβή (την επαφή με τη μάνα) ή υπέστησαν ματαίωση, όπως και παραπάνω. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα του pCREB στην CA3 περιοχή του ιπποκάμπου νεογνών 13<sup>w</sup> ημερών που δέχτηκαν την ανταμοιβή (επαφή με τη μητέρα) ήταν χαμηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα των DER ζώων, των οποίων τα επίπεδα δεν διέφεραν από αυτά της ομάδας ελέγχου. Η περιοχή αυτή, είναι γνωστό, ότι παίζει ρόλο σε αρκετές παραμέτρους της διαδικασίας δημιουργίας χωρικής μνήμης, όπως είναι η διάκριση μοτίβου (pattern separation), η συσχέτιση και η ολοκλήρωση των πληροφοριών.

Στην συνέχεια εκτιμήθηκαν τα επίπεδα του φωσφορυλιωμένου μεταγραφικού παράγοντα pCREB και διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα ενεργοποίησης του παράγοντα ποίκιλαν στην περιοχή του ιπποκάμπου των νεογνών, ανάλογα με την ομάδα στην οποία ανήκε το ζώο. Επιπλέον, αυτή η πρώιμη εμπειρία είχε σαφώς μακροχρόνιες επιδράσεις στη συμπεριφορά του ζώου ως ενήλικο, πλέον, αφού τα ζώα που δεν είχαν λάβει την ανταμοιβή ως νεογνά είχαν διαφορετικά επίπεδα του παράγοντα μετά από εκπαίδευση στον υδάτινο λαβύρινθο κατά Morris, τα οποία αντιστοιχούσαν σε βελτιωμένες μνημονικές ικανότητες των ζώων αυτών σε σχέση με τα ζώα που δεν είχαν υποστεί ματαίωση (Diamantopoulou et al 2011). Ο pCREB σε άλλες μελέτες είχε βρεθεί ότι εμπλέκεται στη διαδικασία μάθησης μέσω της όσφρησης, αυξάνεται στον οσφρητικό βολβό των νεογνών που έχουν εκπαιδευτεί να προτιμούν μία συγκεκριμένη μυρωδιά ή τη μυρωδιά της μητέρας (Rainecki et al 2009). Συνεπώς, η μελέτη νεογνικής εκπαίδευσης στον λαβύρινθο T έδειξε ότι ο pCREB συμμετέχει και σε ένα διαφορετικό τύπο μάθησης και μέσω αυτής της μελέτης ενισχύεται συνολικά η συμμετοχή του παράγοντα αυτού στο σχηματισμό της μνήμης (Diamantopoulou et al 2011).

## 1.4. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

### 1.4.1. Εισαγωγή

Παρ' όλο που όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα περιέχουν την ίδια γενετική πληροφορία, οι πολυκύτταροι οργανισμοί έχουν αναπτύξει περίπλοκους μηχανισμούς που επιτρέπουν τη διαφορική γονιδιακή έκφραση ανάλογα με τον τύπο του γονιδίου καθώς με τον κυτταρικό τύπο. Η επιγενετική αναφέρεται στις μη κληρονομήσιμες αλλαγές που ελέγχουν τον τρόπο με τον οποίο εκφράζεται το γονιδίωμα στους διαφορετικούς τύπους κυττάρων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και την κυτταρική διαφοροποίηση. Αυτή η δυνατότητα εξυπηρετεί στην εξειδικευμένη λειτουργία του κάθε κυττάρου, χωρίς να επέρχεται αλλαγή στην αλληλουχία των βάσεων του DNA. Οι κυτταρικοί μηχανισμοί που πραγματοποιούν αυτές τις μη κληρονομήσιμες αλλαγές αποτελούν αντικείμενο μελέτης την τελευταία δεκαετία (Bernstein BE 2007).

Το επιγονιδίωμα αποτελεί μια ομάδα πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση και είναι υπεύθυνες για την κυτταρική διαφοροποίηση. Το μοτίβο σύμφωνα με το οποίο το γονιδίωμα είναι οργανωμένο αποτελεί τη χρωματίνη, δηλαδή, το σύμπλεγμα του DNA, των ιστονών και άλλων δομικών πρωτεϊνών, στοιχεία τα οποία είναι πακεταρισμένα με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι καταλλήλως διαθέσιμα και προσβάσιμα μέσα σε κάθε κύτταρο. Η κατάσταση της χρωματίνης και, κατά συνέπεια η πρόσβαση στη γενετική πληροφορία, ελέγχεται κυρίως από, συνήθως, αντιστρεπτές είτε μεταντιγραφικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν στο DNA είτε μετα-μεταφραστικές (PTMs) στις ιστόνες, αλλά και από την αναγνώριση αυτών των τροποποιήσεων από άλλες πρωτεΐνες ή πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Οι ιστόνες υπόκεινται σε ποικιλία μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως είναι η μεθυλίωση, η ακετυλίωση, η φωσφορυλίωση, η σουμοϋλίωση, ουβικιτινίωση και γλυκοσιλίωση (Gelato 2008). Παρ' όλο που για αρκετό καιρό θεωρείτο ότι αυτές οι αλλαγές είναι σταθερές, εντούτοις έχει φανεί ότι ψυχολογικοί, παθολογικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να τις τροποποιήσουν.

Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί την πιο γνωστή επιγενετική τροποποίηση και κατέχει έναν κρίσιμο ρόλο στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης καθώς και στην αρχιτεκτονική του πυρήνα των κυττάρων. Αυτή η τροποποίηση συμβαίνει κυρίως σε κυτοσίνες πριν από γουανίνες, οπότε και μετατρέπονται σε 5 μέθυλ-κυτοσίνες (5-meC). Αυτές οι περιοχές δινουκλεοτιδίων αναφέρονται συχνά και ως περιοχές CpGs (Herman 2003). Στο ανθρώπινο γονιδίωμα, αυτές οι CpGs περιοχές κατανέμονται ασύμμετρα με αποτέλεσμα να υπάρχουν τμήματα που είναι πλούσια ή φτωχά σε CpGs. Οι περιοχές πλούσιες σε CpGs λέγονται αλλιώς CpGs νησίδες (CpGs islands) και καλύπτουν τους υποκινητές περίπου των μισών γονιδίων. Σε φυσιολογικά κύτταρα, οι νησίδες αυτές είναι μη μεθυλιωμένες, ενώ οι αραιές CpGs περιοχές στο υπόλοιπο γονιδίωμα είναι συνήθως μεθυλιωμένες. Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί μια δυναμική διαδικασία που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των πολυκύτταρων οργανισμών και εξασφαλίζει τη διατήρηση ενός δεδομένου μοτίβου γονιδιακής έκφρασης. Συμμετέχει επίσης, στη διαδικασία του γονιδιακού εντυπώματος, στην απενεργοποίηση του Χ χρωμοσώματος στα θηλυκά άτομα και στην αποσιώπηση και απενεργοποίηση εξωγενών τμημάτων γενετικού υλικού. Από την άλλη μεριά, ωστόσο, υπερμεθυλιωμένες νησίδες CpGs σε περιοχές υποκινητών, συμμετέχουν στην γονιδιακή αποσιώπηση του ενδογενούς γενετικού υλικού. Σε αρκετές περιπτώσεις, τα γονίδια αυτά είναι γονίδια που συμμετέχουν στην καταστολή όγκων, γεγονός που οδηγεί στη δημιουργία καρκινικών κυττάρων (Esteller 2008).

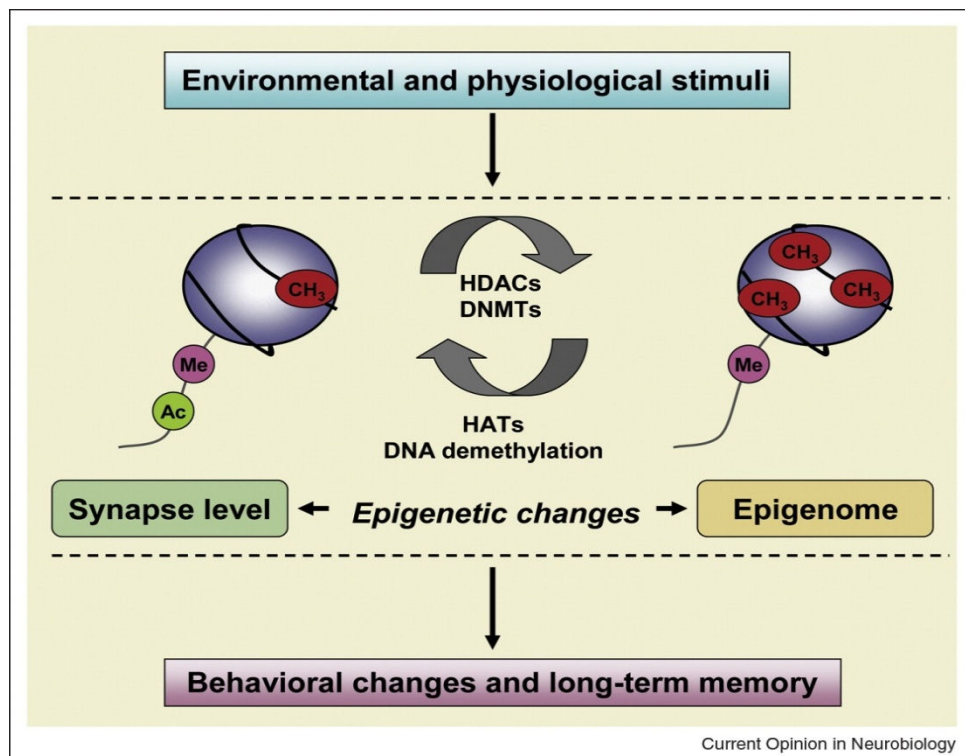
Ένας εξίσου καλά μελετημένος και πολύπλοκος επιγενετικός μηχανισμός είναι και η τροποποίηση των ιστονών. Οι κεντρικές ιστόνες (H2A, H2B, H3 και H4) μαζί με το τμήμα 146 ζευγών βάσεων του DNA που είναι τυλιγμένο γύρω από αυτές συνιστούν το νουκλεόσωμα που αποτελεί τη κύρια μονάδα οργάνωσης του γενετικού υλικού. Η κύρια λειτουργία των τροποποιήσεων των ιστονών είναι να δημιουργήσουν διαφορετικά μοτίβα-περιβάλλοντα ιστονών. Έτσι, δημιουργείται η ευχρωματίνη που είναι λιγότερο συμπυκνωμένη και περισσότερο προσιτή στους μεταγραφικούς παράγοντες και η ετεροχρωματίνη, που είναι ιδιαίτερα συμπυκνωμένη και απροσπέλαστη από μεταγραφικούς παράγοντες. Επιπρόσθετα, οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις παραπάνω τροποποιήσεις των ιστονών και στο DNA ρυθμίζουν αρκετές

βιολογικές διαδικασίες, όπως η γονιδιακή έκφραση, η επιδιόρθωση του DNA, η συμπύκνωση της χρωματίνης, η σταθερότητα του γονιδιώματος καθώς και γενετικές διαδικασίες, όπως η απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X (Feinberg 2007).

Παρ' όλο που κατά γενική ομολογία, οι επιγενετικές τροποποιήσεις θεωρούνται σχετικά σταθερές, φαίνεται τελικά από αρκετές μελέτες, ότι κατά το πέρασμα του χρόνου συντελούνται σε αυτές αρκετές αλλαγές. Η πρώτη φορά που αποτυπώθηκε η συσχέτιση μεταξύ γήρανσης και επιγενετικών τροποποιήσεων, ήταν σε μελέτη αυγών σολομού από τον Ειρηνικό, όπου και διαπιστώθηκε ότι η συνολική μεθυλίωση του DNA μειώνεται καθώς αυξάνεται η ηλικία. Από τότε αρκετές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, στη συνέχεια, σε επίμυες, μύς και ανθρώπους επιβεβαίωσαν τα ανωτέρω, υποστηρίζοντας, επίσης, ότι ίσως για την προαναφερθείσα μείωση να ευθύνεται είτε η παθητική απομεθυλίωση της ετεροχρωματίνης είτε δυσλειτουργίες των ενζύμων DNA μεθυλοτρανσφερασες (DNMT) (υπεύθυνα για τη μεθυλίωση του DNA) (Wilson et al 1987). Περιέργως, ωστόσο, ενώ συνολικά συμβαίνει υπομεθυλίωση του DNA, πραγματοποιείται, ταυτόχρονα, υπερμεθυλίωση σε υποκινητές συγκεκριμένων γονιδίων, με το πέρασμα της ηλικίας. Αυτό το παράδοξο, παρατηρείται, επίσης, και σε καρκινικά κύτταρα δημιουργώντας έτσι μια σύνδεση ανάμεσα στη γήρανση και στους μηχανισμούς καρκινογένεσης (Esteller 2008).

Παρόμοια αποτελέσματα αποτυπώνονται και μετά από μελέτη των μοτίβων των ακετυλιωμένων ιστονών καθώς και των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την ακετυλίωση των ιστονών, όπου φαίνεται ότι και η ακετυλίωση συσχετίζεται με την ηλικία (Calvanese et al 2009). Καθώς, λοιπόν, το γονιδίωμα συσσωρεύει αλλαγές με το πέρασμα του χρόνου, γεννάται το ερώτημα ποιοι παράγοντες είναι τελικά αυτοί που συμμετέχουν στην όλη διαδικασία. Τρεις είναι οι παράγοντες που θεωρείται ότι μπορούν να συμβάλλουν στις επιγενετικές τροποποιήσεις: ο γονότυπος του ατόμου (εσωτερικός παράγοντας), το περιβάλλον (εξωτερικός παράγοντας) και τυχαία-στοχαστικά γεγονότα (αστάθμητος παράγοντας). Αν και κάθε παράγοντας μελετάται αρκετά το τελευταίο διάστημα από αρκετές επιστημονικές ομάδες, η συμβολή του κάθε παράγοντα, ξεχωριστά, δεν μπορεί ακόμα να εκτιμηθεί επ' ακριβώς. Η συμβολή της κληρονομικότητας σε

επιγενετικές μεταβολές φαίνεται ιδιαίτερα μέσα από μελέτες μονοζυγωτικών και διζυγωτικών διδύμων καθώς και από μελέτες μεγάλου αριθμού οικογενειών. Οι στοχαστικοί παράγοντες από την άλλη, ταυτοποιούνται και ερευνώνται σε μελέτες με πειραματόζωα ίδιας γονιδιακής σύστασης που μεγαλώνουν στο ίδιο περιβάλλον και εκτίθενται στα ίδια ή σε διαφορετικά ερεθίσματα. Αρκετές τέτοιες μελέτες, επιβεβαιώνουν την επίδραση του περιβάλλοντος στη γονιδιακή φαινοτυπική έκφραση υποδηλώνοντας ότι οι επιγενετικές τροποποιήσεις αποτελούν το συνδετικό κρίκο ανάμεσα στο περιβάλλον και το γονιδίωμα, χωρίς ωστόσο να έχουν διευκρινιστεί πλήρως οι μηχανισμοί και τα μονοπάτια που συμμετέχουν (Fraga MF 2009).



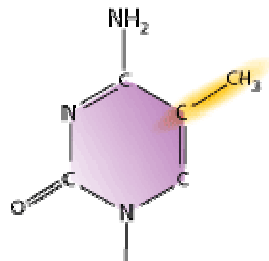
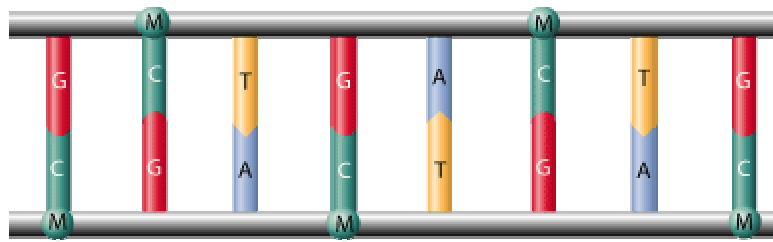
**Εικόνα 6:** Οι επιγενετικοί μηχανισμοί δημιουργούν ένα υπόβαθρο το οποίο επιδρά μακροχρόνια σε γονίδια που εμπλέκονται στη συμπεριφορά και στην ικανότητα μάθησης

### 1.4.2. Μεθυλίωση του DNA

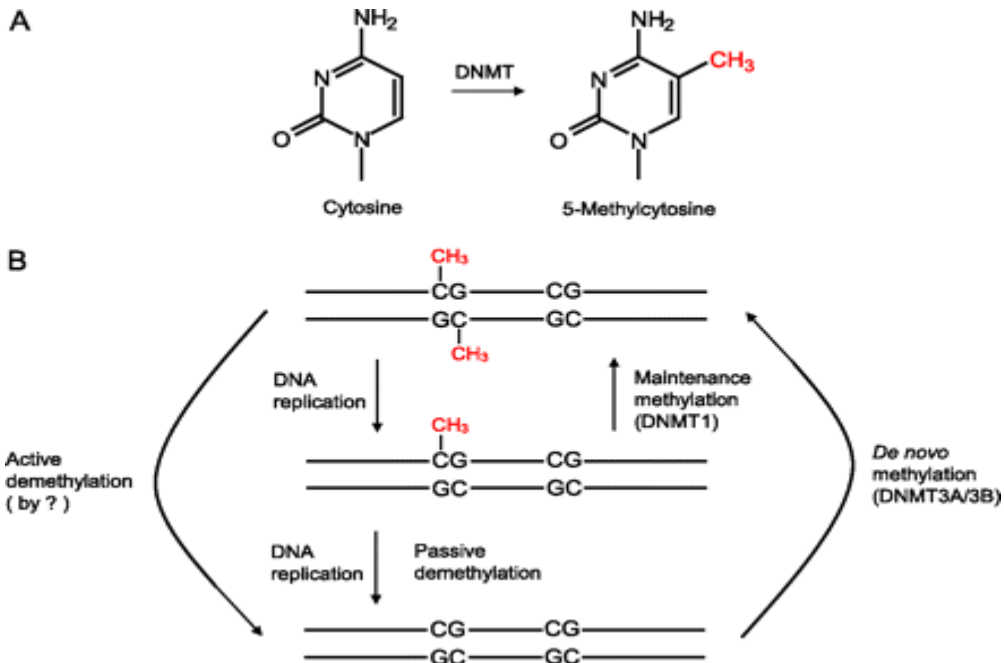
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η 5-μεθυλιωμένη κυτοσίνη στα θηλαστικά εντοπίζεται κυρίως σε CpG δινουκλεοτίδια. Περίπου, το 70-80% των CpG δυάδων είναι μεθυλιωμένες και στις δύο αλυσίδες στα ανθρώπινα σωματικά κύτταρα. Σχεδόν όλα τα πειραματικά αποτελέσματα συμφωνούν με την αντίληψη ότι η μεθυλίωση συμβάλλει στην σταθεροποίηση ή στο "κλείδωμα" ενός γονιδίου στην ανενεργή του κατάσταση. Εκτός, από την αποσιώπηση των γονιδίων, η μεθυλίωση συμμετέχει και σε άλλες σημαντικές διεργασίες όπως η απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X και το γονιδιακό αποτύπωμα. Αναμενόμενο είναι, λοιπόν, ότι ο μηχανισμός μεθυλίωσης είναι ιστοειδικός και αυστηρά ελεγχόμενος. Στην εικόνα 6 φαίνεται ο μηχανισμός με τον οποίο πραγματοποιείται η μεθυλίωση και απομεθυλίωση του DNA. Εντούτοις, η μεθυλίωση του DNA δεν είναι τέλεια, και η διατήρηση των μεθυλιωμένων μοτίβων απαιτεί την *de novo* μεθυλίωσή του μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση (Zhao-xia Chen et al 2011).

Στα κύτταρα των θηλαστικών, πραγματοποιούνται διαρκείς απομεθυλιώσεις και επαναμεθυλιώσεις κατά την εμβρυική ανάπτυξη και την κυτταρική διαφοροποίηση. Μετά τη γονιμοποίηση, το μεγαλύτερο μέρος του πατρικού γονιδιώματος απομεθυλιώνεται ταχύτατα, προτού πραγματοποιηθεί η αντιγραφή του DNA, φανερώνοντας την ύπαρξη μιας ενεργού ενζυματικής απομεθυλίωσης. Από την άλλη μεριά, το μητρικό γονιδίωμα υφίσταται μια παθητική διαδικασία απομεθυλίωσης μέχρι την εμφύτευση του εμβρύου, η οποία εξαρτάται από την αντιγραφή του γενετικού υλικού, που πραγματοποιείται κατά τις διαδοχικές κυτταρικές διαιρέσεις. Μετά την εμφύτευση του εμβρύου, πραγματοποιείται μια γενικευμένη μεθυλίωση του DNA, η οποία και θα ορίσει τα πρότυπα μεθυλίωσης που θα διατηρηθούν στη συνέχεια στα σωματικά κύτταρα. Παρόμοιες μεθυλιώσεις και απομεθυλιώσεις, πραγματοποιούνται και κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης εντός μιας κυτταρικής σειράς, όπως για παράδειγμα κατά τη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων (Calvanese et al 2009).





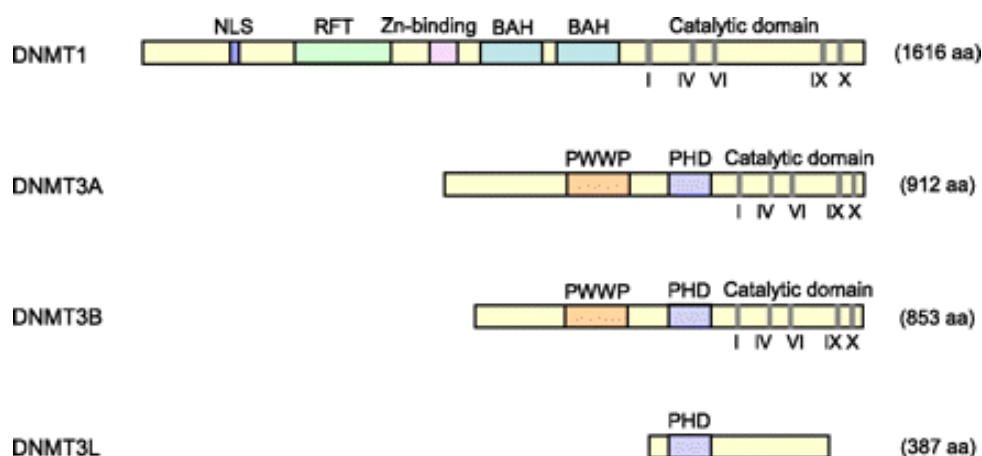
DNA methylation is the addition of a methyl group (M) to the DNA base cytosine (C).



**Εικόνα 7:** Σύνοψη του μηχανισμού μεθυλίωσης και απομεθυλίωσης του DNA των θηλαστικών (Zhao-xia Chen et al 2011).

Στα θηλαστικά, έχουν εντοπιστεί 4 ένζυμα που δρουν ως μεθυλοτρανσφεράσες οι DNMT1, DNMT3A, DNMT3B και DNMT3L. Από αυτές, η DNMT1 καταλύει τη διατήρηση του προτύπου μεθυλίωσης. Το ένζυμο αυτό λειτουργεί σαν να προτιμά τις ημιμεθυλιωμένες περιοχές, όπως αυτές που δημιουργούνται κατά το διπλασιασμό του DNA και είναι υπεύθυνο για τη μεθυλίωση της νεοσχηματιζόμενης αλυσίδας, κατά την αντιγραφή. Τα ένζυμα DNMT3A και DNMT3B είναι *de novo* μεθυλοτρανσφεράσες, χωρίς κάποια προτίμηση για ημιμεθυλιωμένες περιοχές και είναι υπεύθυνα για την

εγκατάσταση μεθυλιωμένων προτύπων κατά την πρώιμη ανάπτυξη (Okano et al 1999). Το ένζυμο DNMT3L, αν και όπως φαίνεται από την εικόνα 7 στερείται των βασικών δομικών μοτίβων των μεθυλοτρασφερασών και είναι καταλυτικά ανενεργό, μπορεί να διεγείρει την ενζυματική ενεργότητα των DNMT3A/3B.



**Εικόνα 8:** Σχηματική αναπαράσταση των δομικών μοτίβων των ανθρώπινων DNMTs (Zhao et al 2011)

Επιπροσθέτως, η αλληλεπίδραση ανάμεσα στην DNMT3L και στη μη-μεθυλιωμένη λυσίνη-4 στην ουρά της ιστόνης H3 (H3K4) παίζει σημαντικό ρόλο στη στόχευση εντυπωμένων περιοχών. Η DNMT3A μπορεί, επίσης, και αλληλεπιδρά με την H3K4 και επιλεκτικά να μεθυλιώνει τις περιοχές του DNA που γεινιάζουν. Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει τα πρότυπα μεθυλίωσης είναι ο G9, η μεθυλοτρασφεράση της λυσίνης 9 στην ιστόνη H3, μηχανισμός που θα συζητηθεί και παρακάτω. Εμβρυϊκά κύτταρα στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση αυτού του παράγοντα εμφανίζουν σημαντική μείωση της μεθυλίωσης στους υποκινητές-στόχους του G9, σε ρετροτρασποζόνια (retrotransposons) και στην πλειοψηφία των δορυφορικών επαναλήψεων. Επίσης, ο G9 συνεργάζεται και με τις DNMT3A και DNMT3B και συγκεκριμένα βοηθάει στη στρατολόγηση των DNMT3 στους υποκινητές, εξυπηρετώντας έτσι την *de novo* μεθυλίωση (Epsztejn-Litman S et al 2008).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το κυρίαρχο δόγμα για τις μεθυλιωμένες κυτοσίνες είναι ότι είναι μόνιμες, μη αναστρέψιμες και κατά

συνέπεια καταλήγουν σε αναστολή της μεταγραφής. Σε αρκετά βιολογικά συστήματα, ωστόσο, το προαναφερθέν αναιρείται. Όπως φάνηκε από μελέτες σε εμβρυονικά και εμβρυϊκά κύτταρα η μεθυλίωση μπορεί να αποτελεί μια εξαιρετικά δυναμική διαδικασία. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα, για παράδειγμα, η μεθυλίωση μπορεί να είναι παροδική και δεν σχετίζεται απαραίτητα με μειωμένη γονιδιακή έκφραση. Αντίθετα μπορεί να επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση καθώς και τη δομή της χρωματίνης με ποικίλους τρόπους. Ενδεικτικά, οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες μπορούν να λειτουργήσουν ως σημεία συγκέντρωσης πρωτεϊνών που ενώνονται σε μεθυλιωμένες κυτοσίνες, οι οποίες με τη σειρά τους στρατολογούν σύμπλοκα αναδιάταξης της χρωματίνης. Τα σύμπλοκα αυτά κατά κανόνα περιέχουν HDAC ένζυμα (histone deacetylase enzymes), των οποίων η δράση καταλήγει σε συσπείρωση της χρωματίνης (Bogdanovic O et al 2009). Πρωτεΐνες όπως η MeCP2 και οι MBD1,2,3 και 4 είναι κάποιες από τις πιο σημαντικές πρωτεΐνες με δυνατότητα ένωσής τους σε μεθυλιωμένες περιοχές. Ο τρόπος δράσης τους, ωστόσο, δεν είναι κοινός και καθολικός. Έτσι, η MeCP μπορεί είτε να διεγείρει είτε να αναστέλλει τη γονιδιακή έκφραση αλλά ασκεί και άλλες δράσεις, όπως η στρατολόγηση των ενζύμων HDAC. Παρομοίως, οι MBD2 και MBD4 που θεωρούνται ότι κυρίως συμμετέχουν στη μεταγραφική αποσιώπηση, έχουν συσχετιστεί και με υπομεθυλιωμένες καταστάσεις του DNA αλλά και με την επιδιόρθωση του γενετικού υλικού (Hendrich et al 1999).

Από τα παραπάνω συνεπάγεται ότι η μεθυλίωση του DNA μπορεί να εξυπηρετεί την θεμελίωση ανενεργών καταστάσεων της χρωματίνης. Μολοταύτα, η σχέση ανάμεσα στη μεθυλίωση του DNA και στη γονιδιακή έκφραση εγείρει το ερώτημα εάν οι μεθυλιωμένες περιοχές και η δομή της χρωματίνης είναι απαραίτητα η αιτία ή το αποτέλεσμα των αλλαγών στη γονιδιακή έκφραση. Η μεταγραφική ενεργοποίηση, που συνάδει με την αποδιοργάνωση της δομής του νουκλεοσώματος, επιβάλλει και το επαναπακετάρισμα της χρωματίνης μετά την ολοκλήρωση της μεταγραφής ενός γονιδίου. Ο τρόπος με τον οποίον συντελείται το εν λόγω επαναπακετάρισμα μπορεί να επηρεάσει δυνητικά την μελλοντική ενεργοποίηση και μεταγραφή αυτού του γονιδίου. Για παράδειγμα, αλλαγές στη δομή της χρωματίνης μπορούν να επανακαθορίσουν τις μεθυλιωμένες περιοχές του DNA και να επιδράσουν τόσο στη de novo μεθυλίωση μιας

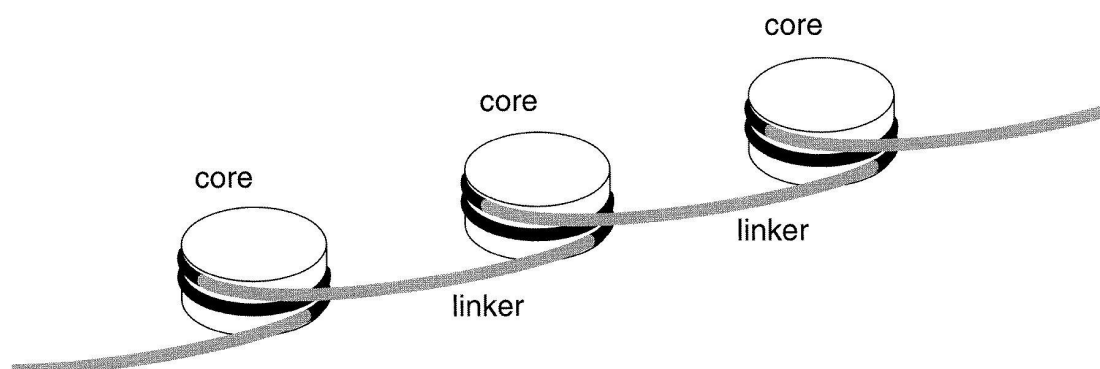
περιοχής όσο και στην επαναμεθυλίωσή της. Η αυξημένη ακετυλίωση των ιστονών (τροποποίηση που θα συζητηθεί παρακάτω) συντελεί στην απομεθυλίωση μιας περιοχής ή και στη πρόσδεση ενός μεταγραφικού παράγοντα σε περιοχή που ήταν παλαιότερα μεθυλιωμένη. Για παράδειγμα, κατά τη γλοιογένεση παρατηρείται αυξημένη σύνδεση του παράγοντα Stat3 στον υποκινητή του γονιδίου της GFAP με αποτέλεσμα την ενισχυμένη μεταγραφική ενεργότητα και την ιστοειδική απομεθυλίωση (Takizawa et al 2001). Αυτό σημαίνει πως αν και σταθερή η μεθυλίωση του DNA μπορεί και μεταβάλλεται ως απόκριση στο άνοιγμα της δομής της χρωματίνης αλλά και σε σήματα γονιδιακής ενεργοποίησης. Παρομοίως, η εξαρτώμενη από ασβέστιο νευρωνική εκπόλωση στον ιππόκαμπο συντελεί στην αυξημένη μεταγραφή του γονιδίου του BDNF στη περιοχή αυτή η οποία σχετίζεται με τη μειωμένη μεθυλίωση της περιοχής του υποκινητή του συγκεκριμένου γονιδίου (Martinowich et al 2003). Το γονίδιο αυτό σχετίζεται με την επαναδιάταξη των νευρωνικών συνάψεων. Συνάγεται, λοιπόν, από τα παραπάνω ότι περιβαλλοντο-εξαρτώμενες νευρωνικές λειτουργίες, όπως είναι οι διαδικασίες μάθησης και μνήμης, και οι οποίες προϋποθέτουν την επαναδιάταξη των νευρικών συνάψεων, σχετίζονται με αλλαγές στις μεθυλιωμένες ή μη καταστάσεις γονιδίων, των οποίων τα προϊόντα είναι απαραίτητα τόσο για τη μάθηση όσο και τη μνήμη (Sweatt J.D 2009).

### **1.4.3 Τροποποιήσεις ιστονών**

#### **I. Η δομή του νουκλεοσώματος**

Είναι δεδομένο και καθιερωμένο πλέον πως το νουκλεόσωμα αποτελεί τη βασική υπομονάδα της χρωματίνης. Αποτελείται από ένα σύμπλεγμα οχτώ πρωτεϊνών, τις ιστόνες, και ένα τμήμα DNA μήκους 146 ζευγών βάσεων, το οποίο τυλίγεται γύρω από τις ιστόνες (εικόνα 8). Για ένα αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα οι ιστόνες θεωρούνταν ότι αποτελούν το ίδιο το γενετικό μόριο, λόγω της παρουσίας τους σε όλα τα ευκαρυωτικά χρωμοσώματα αλλά και της μεγάλης τους συγκέντρωσης, η οποία είναι εφάμιλλη με την

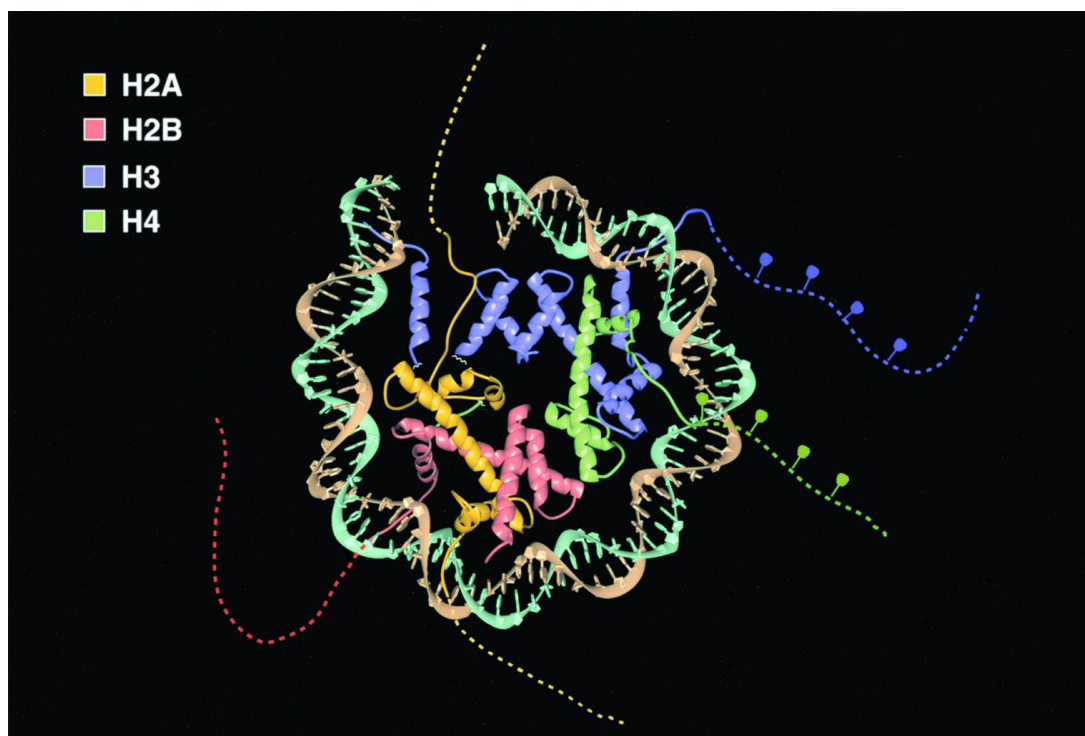
συγκέντρωση του DNA. Αργότερα, ταυτοποιήθηκε ο πραγματικός τους ρόλος, δηλαδή η συμμετοχή τους στην στήριξη και το πακετάρισμα της χρωματίνης αλλά και της συμμετοχής τους στη γονιδιακή ρύθμιση. Μετά από δεκαετίες ερευνών σχετικά με τη δομή, τη σύσταση και τις βιοχημικές ιδιότητες του νουκλεοσώματος ταυτοποιήθηκε η δομή του νουκλεοσώματος η οποία συνίσταται από τέσσερις ιστόνες τις H2A, H2B, H3 και H4, οι οποίες σχηματίζουν ένα οχταμερές. Η πέψη της χρωματίνης μέσω της μικροκοκκικής νουκλεάσης άνοιξε τον δρόμο προς τον προσδιορισμό της δομής του νουκλεοσώματος. Μετά το "κόψιμο" του DNA μεταξύ των νουκλεοσωμάτων, η μικροκοκκική νουκλεάση πέπτει τα άκρα του DNA που προεξέχουν από το νουκλεόσωμα έως το όριο των 146 ζευγών βάσεων. Το σύμπλοκο που προκύπτει, συμπεριλαμβάνει και τις 4 ιστόνες και το συνδεδεμένο σε αυτές DNA και είναι γνωστό ως πυρηνικό σωματίο του νουκλεοσώματος (Kornberg et al 2000).



**Εικόνα 9:** Σχηματική αναπαράσταση του νουκλεοσώματος. Το οχταμερές των ιστονών αναπαρίσταται ως δίσκος και το DNA ως κορδέλα. Η έντονα χρωματισμένη περιοχή αναφέρεται στα 146 ζεύγη βάσεων που τυλίγονται γύρω από το οχταμερές των ιστονών ενώ η γκριζα περιοχή της "κορδέλας" αποτελεί το συνδετικό τμήμα του DNA ανάμεσα σε δύο νουκλεοσώματα ( Kornberg et al 2000)

Τα πυρηνικά σωματία είναι αρκετά ομοιογενή ώστε να κρυσταλλωθούν. Ανάλυση διακριτικής ικανότητας/ορίου 7 Å μέσω συνδυασμού ακτίνων X και ηλεκτρονικής κρυσταλλογραφίας αποκάλυψε την περιέλιξη του DNA σε μια  $\frac{3}{4}$  αριστερόστροφη υπερέλικα γύρω από τις ιστόνες. Λεπτομέρειες στην διεύθυνση των ιστονών και στην δομή προέκυψαν από κρυσταλλογραφική ανάλυση αποκλειστικά του οχταμερούς. Οι ιστόνες έδειξαν να σχηματίζουν μια αριστερόστροφη πρωτεϊνική υπερέλικα αντίστοιχη με αυτή του DNA του πυρηνικού σωματίου. Το τετραμερές (H3)<sub>2</sub>(H4)<sub>2</sub> βρίσκεται στο κέντρο και τα διμερή H2A-H2B βρίσκονται στα άκρα του DNA. Οι ιστόνες παρουσιάζουν

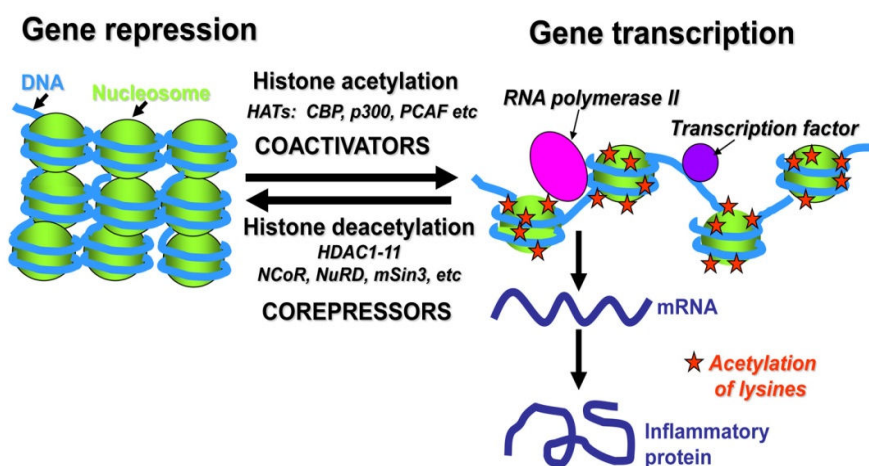
όμοια αναδίπλωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, η κάθε ιστόνη έχει μια μεγάλη κεντρική  $\alpha$ -έλικα στα 2 άκρα της οποίας υπάρχουν μικρότερες έλικες και βρόχοι που αλληλεπιδρούν με το DNA (εικόνα 9). Τέλος, για τα 15–30 αμινοξέα των αμινοτελικών άκρων όλων των ιστονών δεν έχει καθορισθεί η ακριβής δομή τους και συχνά αναφέρονται ως “ουρές”, όρος που χρησιμοποιείται και στη παρούσα μελέτη.



**Εικόνα 10:** Η δομή του νουκλεοσώματος μετά από κρυσταλλογραφία ( Kornberg et al 2000)

Η δομή υψηλής ανάλυσης του νουκλεοσώματος φανερώνει με λεπτομέρεια τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο DNA και τις ιστόνες, οι οποίες περιορίζονται στον φωσφοδιεστερικό σκελετό των ελίκων του DNA στην εσωτερική επιφάνεια της υπερέλικας. Κάθε 10 ζεύγη βάσεων, εκεί δηλαδή όπου η ελάσσων αύλακα της διπλής έλικας, συναντάται στο εσωτερικό, σχηματίζεται ένα πλήθος δεσμών, όπως ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και δεσμοί υδρογόνου με τις φωσφορικές ομάδες του DNA όπως και μη πολικοί δεσμοί με τις ομάδες της δεοξυριβόζης. Το γεγονός ότι απουσιάζουν δεσμοί ανάμεσα στις αζωτούχες βάσεις του DNA και τις ιστόνες έρχεται σε συμφωνία με την ικανότητα του οχταμερούς των ιστονών να πακετάρουν στην ουσία οποιοδήποτε DNA ανεξαρτήτως αλληλουχίας. Δύο ακόμη σημεία αναφορικά

με τη λειτουργία του νουκλεοσώματος είναι αξιοσημείωτα. Καταρχάς, η δομή των δύο στροφών της υπερέλικας του DNA και η στοίχιση των αυλάκων είναι ακριβώς τέτοια ώστε να ταιριάζει και να επιτρέπει στα αμινοτελικά άκρα (ουρές) των ιστονών H2B και H3 να προεξέχουν και να εκτείνονται προς την εξωτερική μεριά του νουκλεοσώματος. Με τον τρόπο αυτό οι ουρές των ιστονών παραμένουν εκτεθειμένες, γεγονός κρίσιμο για τη συμβολή τους στη ρύθμιση της μεταγραφής, όπως θα αναφερθεί και παρακάτω. Κατά δεύτερον, στη διπλή έλικα του DNA και στον τρόπο με τον οποίο αυτή τυλίγεται γύρω από το οχταμερές, παρατηρείται περίπου κάθε 10 ζευγάρια βάσεων μια ελαφρώς διαφοροποιημένη στροφή. Αυτή η δομική πλαστικότητα φαίνεται να βοηθά στην επαναδιάταξη της χρωματίνης, μια διαδικασία που απαιτείται για τη μεταγραφή (Luger K et al 1997).



**Εικόνα 11:** Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω της ακετυλίωσης των ιστονών

Μελέτες *in vitro* έχουν δείξει ότι το πακετάρισμα του DNA σε νουκλεοσώματα στους υποκινητές γονιδίων εμποδίζει τις ευκαρυωτικές και βακτηριακές RNA πολυμεράσες να ξεκινήσουν τη μεταγραφή. Τα νουκλεοσώματα δρουν με παρόμοιο τρόπο, ανασταλτικά δηλαδή, και *in vivo*, καθιερώνοντας τις ιστόνες ως γονιδιακούς αναστολείς. Ωστόσο, η δράση τους αυτή έρχεται σε αντίθεση με την παρουσία συμπλεγμάτων αναδιάταξης της χρωματίνης, όπως είναι οι ακετυλοτρανσφεράσες (HAT) και οι απακετυλάσες των ιστονών (DHAC) (Hebbes T.R et al 1994).

## II. Ακετυλίωση ιστονών

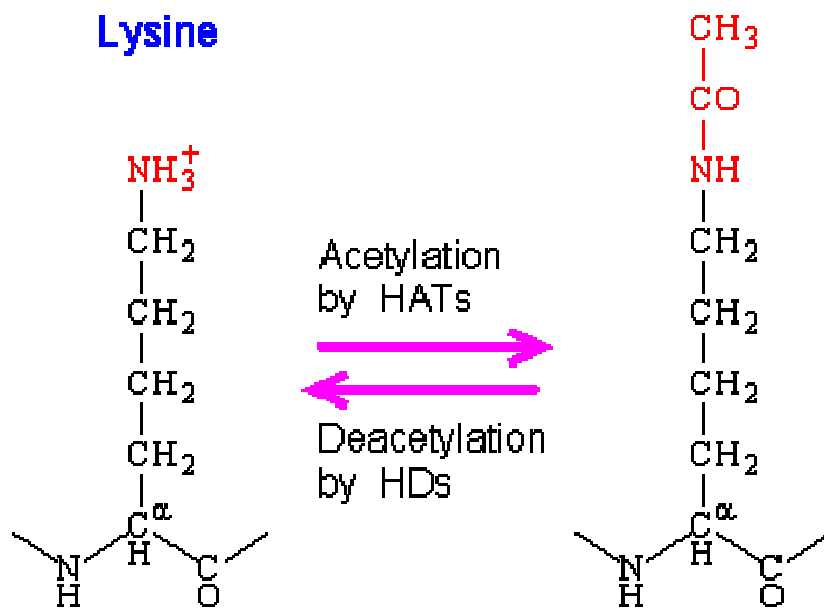
Η ανακάλυψη δράσης ακετυλοτρανσφερασών HAT στους μεταγραφικούς παράγοντες αποτέλεσε κλειδί στην καθιέρωση των νουκλεοσωμάτων ως ρυθμιστών της μεταγραφής. Αρχικά, θεωρούνταν ότι η ακετυλίωση πολλαπλών περιοχών στις ουρές των ιστονών σχετιζόταν με τη μεταγραφική δραστηριότητα σε πυρηνίσκους. Επιπλέον, περιοχές ετεροχρωματίνης η οποία παραμένει ανενεργή, εμφανίζουν πλήρη απώλεια ακετυλιωμένων ιστονών και μάλιστα σε περιοχές που είναι κρίσιμες και απαραίτητες για τη μεταγραφική ενεργοποίηση. Τέλος, όταν σε κύτταρα ζύμης, αντικαταστάθηκαν τα κατάλοιπα λυσίνης στην ιστόνη H4 με κατάλοιπα αργινίνης, η οποία δεν ακετυλιώνεται, οι δεδομένες ιστόνες δεν ακετυλιώθηκαν και αντίστοιχα τα γονίδια δεν μεταγράφηκαν (Bjorklund et al 1999). Η τελική επιβεβαίωση, ωστόσο, ήρθε με την ανακάλυψη ότι η πρωτεΐνη Gcn5 (ένας θετικός ρυθμιστής της μεταγραφής γονιδίων σε κύτταρα ζύμης) φέρει ενεργότητα ακετυλάσης των ιστονών και ότι αυτή η ενεργότητα είναι απαραίτητη για να μπορέσει η Gcn να διεγείρει τη μεταγραφή. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν στη συνέχεια και σε κύτταρα θηλαστικών, όπως για παράδειγμα στα πρωτεϊνικά συμπλέγματα PCAF, p300/CBP, TFIID και TFTC. Η δράση όλων των παραπάνω παραγόντων είναι εντοπισμένη αυστηρά στον υποκινητή των εκάστοτε γονιδίων (Struhl K 1998).

### **III. Απακετυλίωση ιστονών**

Η σύνδεση ανάμεσα στην ακετυλίωση και τη μεταγραφή ενισχύεται ακόμα παραπάνω από το γεγονός ότι η απακετυλίωση οδηγεί στην καταστολή της. Το παραπάνω επιβεβαιώθηκε μετά την απομόνωση της ανθρώπινης απακετυλάσης HDAC1, της οποίας η αλληλουχία είναι εξαιρετικά όμοια με αυτή της πρωτεΐνης Rpd3 της ζύμης, η οποία ρυθμίζει αρνητικά τη μεταγραφή. Από τότε έχει απομονωθεί ένα πλήθος απακετυλασών, τόσο σε κύτταρα ζύμης όσο και σε ανθρώπινα κύτταρα, και όλες αποτελούν στοιχεία πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων, γεγονός που καθορίζει και τη δράση τους. Τα υπόλοιπα μέλη των πρωτεϊνικών αυτών συμπλόκων είναι πρωτεΐνες με ικανότητα σύνδεσης σε χρωματίνη, όπως πρωτεΐνες σχετιζόμενες με το ρετινοβλάστωμα και η Sin3. Η περιοχή της χρωματίνης με την οποία



συνδέονται εδράζεται κυρίως στην περιοχή της ετεροχρωματίνης, όπου το εξαιρετικά χαμηλό επίπεδο ακετυλιωμένων ιστονών σχετίζεται με την απουσία γονιδιακής έκφρασης. Αξιοσημείωτο είναι ότι η Sin3 συγκροτεί σύμπλοκο με πρωτεΐνες που ενώνονται σε CpG μεθυλιωμένες περιοχές, στρατολογώντας έτσι τις απακετυλάσες στις μεθυλιωμένες αυτές περιοχές του DNA, με αποτέλεσμα την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης στις περιοχές αυτές (Struhl K 1998).



**Εικόνα 12:** Ακετυλίωση και απακετυλίωση του καταλοίπου λυσίνης

#### IV. Άλλες τροποποιήσεις ιστονών

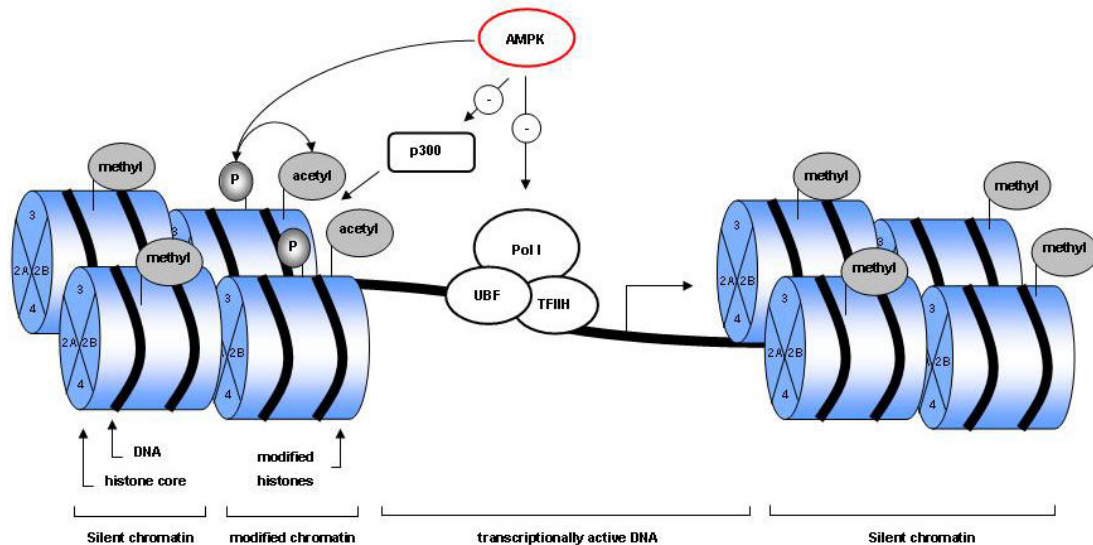
Όπως έγινε φανερό και από τα παραπάνω, το αποτέλεσμα που θα έχουν οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών στη γονιδιακή έκφραση, εξαρτάται από το ίδιο το είδος των τροποποιήσεων, την ουρά που τροποποιείται αλλά και το αμινοξύ που θα τροποποιηθεί. Λόγω της θέσης της στη δομή του νουκλεοσώματος, η ιστόνη που τροποποιείται συνήθως είναι η H3. Εκτός από την ακετυλίωσή της και η φωσφορυλίωσή της σε συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα ενισχύει τη μεταγραφή. Η ακετυλομάδα που προστίθεται στην ιστόνη H3 επιτρέπει τη παροδική απελευθέρωση του DNA από το νουκλεόσωμα και έτσι γίνεται προσβάσιμο στη μεταγραφική μηχανή (Kuo et al 1998). Άλλες τροποποιήσεις που υφίστανται οι ιστόνες όπως η μεθυλίωση και

η ουβικιτινίωση, δεν επηρεάζουν τα ηλεκτρομαγνητικά φορτία του νουκλεοσώματος αλλά μπορούν, ωστόσο, και επηρεάζουν ποικιλοτρόπως τη μεταγραφή, ανάλογα με τον τύπο τους και την περιοχή τροποποίησης. Για παράδειγμα, η μεθυλίωση της λυσίνης 9 στην ιστόνη H3 σχετίζεται με γονιδιακή ενεργοποίηση, ενώ η δι- ή τρι- μεθυλίωση του ίδιο αμινοξικού καταλοίπου οδηγεί σε συμπύκνωση της χρωματίνης. Αν, και δεν είναι ακόμα αρκετά γνωστό το πώς δρα επακριβώς η ουβικιτινίωση των ιστονών, γνωρίζουμε, ωστόσο, ότι η τροποποίηση αυτή στην ιστόνη H2A καταστέλλει τη γονιδιακή μεταγραφή ενώ στην H2B μπορεί είτε να οδηγήσει σε ενεργοποίηση είτε σε αποσιώπηση. Επίσης, η αναστρέψιμη μονοουβικιτινίωση των ιστονών ασκεί ένα ρόλο σηματοδοτικού μηχανισμού σε ένα δεδομένο υπόστρωμα και συγκεντρώνει ή προσελκύει άλλους μηχανισμούς τροποποίησης ιστονών, όπως της μεθυλίωσης. Η σουμοϋλίωση φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά τη μεταγραφική ενεργότητα, αναστέλλοντας την επαναδιάταξη της χρωματίνης και τη γονιδιακή ενεργοποίηση που κανονικά επάγεται μετά από ακετυλίωση ιστονών. Η παραπάνω τροποποίηση πραγματοποιείται από τις πρωτεΐνες SUMO, οι οποίες τροποποιούν ουβικιτινωμένες πρωτεΐνες και σχετίζονται κυρίως με την ετεροχρωματίνη μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τις απακετυλάσες των ιστονών (Garcia et al 2009).

## **V. Φωσφοακετυλιωμένη H3**

Από το πλήθος των τροποποιήσεων που αναφέρθηκαν παραπάνω, αυτή που έχει περισσότερο καταγραφεί ως σχετιζόμενη με γονιδιακή ενεργοποίηση είναι η ακετυλίωση στις λυσίνες 9(K9) και 14(K14) στην ιστόνη H3. Τα ακετυλιωμένα αυτά κατάλοιπα μπορούν είτε να υφίστανται μόνα τους είτε σε συνδυασμό με φωσφορυλίωση στη σερίνη 10(S10), δημιουργώντας μια φωσφοακετυλιωμένη ιστόνη. Η H3 φωσφορυλιώνεται άμεσα και παροδικά μετά από διέγερση από διάφορους τροφικούς παράγοντες ή αναστολείς σύνθεσης πρωτεϊνών. Το παραπάνω χαρακτηρίζεται ως *νουκλεοσωμική απόκριση* και θεωρείται ότι είναι σχετικά εντοπισμένη σε συγκεκριμένα νουκλεοσώματα χωρίς να εκτείνεται κατά μήκος ενός ενεργού γονιδίου. Ως

διεγέρτες αυτής της απόκρισης θεωρείται ότι δρουν παράγοντες όπως η ERK 1/2 και το τμήμα του σηματοδοτικού μονοπατιού MAPK που ενεργοποιεί τον p38. Σημείο σύγκλισης των ERK1/2 και p38 είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες που επάγονται από τη μίτωση ή το στρες (MSK1/2) και οι οποίες εμφανίζονται ως οι κατεχοχίν κινάσες των ιστονών για τη νουκλεοσωμική απόκριση (Soloaga et al 2003).



**Εικόνα 13:** Η φωσφορυλίωση της ser10 επάγει και την ακετυλίωση της ιστόνης H3, γεγονός που επιφέρει την επαναδιάταξη της χρωματίνης και γονιδιακή ενεργοποίηση

Η ουρά της ιστόνης H3 μπορεί εκτός από τη σερίνη στη θέση 10 να φωσφορυλιωθεί και στη σερίνη 28. Και στις δύο περιπτώσεις, πριν τα κατάλοιπα αυτά υπάρχει η αλληλουχία αλανίνη-αργινίνη-λυσίνη-σερίνη (ARK-S) (Clayton et al 2000). Το κατάλοιπο λυσίνης που βρίσκεται ακριβώς πριν από τη φωσφοσερίνη μπορεί να υποστεί είτε ακετυλίωση είτε μεθυλίωση. Η φωσφο-σερίνη 10 είναι ο κύριος στόχος φωσφορυλίωσης κατά τη μίτωση στα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα. Και η σερίνη 28 έχει εντοπιστεί φωσφορυλιωμένη στα χρωμοσώματα αν και ακόμα δεν έχει εκτιμηθεί το εύρος και η αναλογία των συγκεκριμένων φωσφορυλιώσεων (Goto et al 2002). Οι κινάσες MSK1/2 φωσφορυλιώνουν και τη σερίνη 28 εκτός από τη σερίνη 10. Τα παραπάνω γεννούν το ερώτημα κατά πόσο οι τροποποιήσεις αυτές επάγονται και συνδέονται με τη γονιδιακή ενεργοποίηση ή απλώς εξυπηρετούν τις διαδικασίες του κυτταρικού κύκλου. Η απάντηση δόθηκε μετά

από πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα με πολλαπλούς στόχους όπως η pS10 σε συνδυασμό με AcL9 ή AcL14 αλλά και από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης (ChIP assays). Φάνηκε λοιπόν ότι η φωσφοακετυλίωση της H3 είναι επαγόμενη, συμβαίνει σε συγκεκριμένες περιοχές του πυρήνα και συνάδει με τη γονιδιακή ενεργοποίηση (Clayton et al 2003). Με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας φάνηκε επίσης ότι οι πρωτεΐνες που μπορούν και συνδέονται στην φωσφορυλιωμένη ιστόνη είναι μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών 14-3-3, μια αρκετά συντηρημένη και μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών που ενώνονται σε φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα. Τα ακετυλιωμένα κατάλοιπα που συχνά υπάρχουν στις περιοχές αυτές δεν φαίνεται να επηρεάζουν τη σύνδεση των πρωτεϊνών στα σημεία αυτά (πιθανολογείται πάντως ότι σταθεροποιούν τη σύνδεση), οπότε και οι φωσφοακετυλιωμένες ιστόνες αποτελούν στόχο των πρωτεϊνών αυτών. Το σημαντικό είναι ότι αυτές οι πρωτεΐνες έχουν περιοχές πρόσδεσης στο DNA και σχετίζονται με τη στρατολόγηση μεταγραφικών παραγόντων, δίνοντας επιπλέον στοιχεία για το μηχανισμό με τον οποίο η τροποποίηση των ιστονών εγείρει τη γονιδιακή ενεργοποίηση (Yaffe et al 2001).

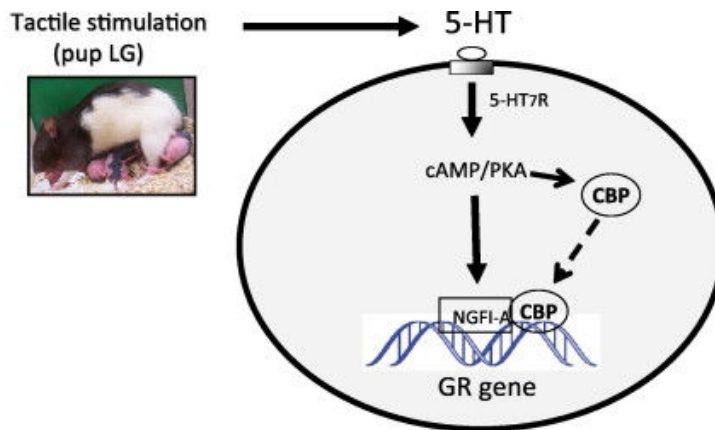
Τέλος, όπως προαναφέρθηκε, η φωσφορυλίωση της ακετυλιωμένης H3 καταλύεται από τις κινάσες MSK1/2, οι οποίες είναι καθοδικά των κινασών ERK (p42/44) ή του p38 του μονοπατιού MAPK. Η φωσφορυλίωση αυτή επάγει την ενεργοποίηση των άμεσα επαγόμενων (immediate early-IE) γονιδίων *c-jun* και *c-fos* (Soloaga et al 2003). Το τελευταίο χρησιμοποιείται ως δείκτης νευρωνικής ενεργότητας στη δεδομένη μελέτη και θα συζητηθεί παρακάτω.

#### 1.4.4 Επιγενετικές τροποποιήσεις και νευροβιολογία.

Οι περισσότερες πληροφορίες που έχουμε για τις επιγενετικές διαδικασίες προέρχονται από μελέτες που διερευνούν τους μηχανισμούς κυτταρικής διαφοροποίησης κατά την εμβρυογένεση αλλά και την καρκινογένεση. Σχετικά πρόσφατα, παρατηρήθηκαν επιγενετικές τροποποιήσεις στον εγκέφαλο ως αποτέλεσμα διάφορων εξωτερικών ερεθισμάτων, όπως είναι η μητρική φροντίδα, οι φαρμακευτικές ουσίες και η μάθηση. Η δουλειά, ωστόσο, που πυροδότησε το ενδιαφέρον για τη συμβολή της επιγενετικής στον κλάδο των νευροεπιστημών, ήταν του Michael Meaney και των συνεργατών του που διαπίστωσαν ότι η ποιότητα της μητρικής φροντίδας που λαμβάνουν τα νεογνά προκαλεί επιγενετικές τροποποιήσεις στο γονίδιο των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών και επηρεάζει τη λειτουργία του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων κατά την ενήλικη ζωή. Στο συγκεκριμένο μοντέλο, τα νεογνά αρουραίων που δέχτηκαν χαμηλά επίπεδα μητρικής φροντίδας (licking/grooming) από τη μητέρα τους εμφάνιζαν χαμηλότερα επίπεδα ακετυλιωμένης λυσίνης 9 στην ιστόνη H3, αυξημένη μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) και μειωμένη πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων σε αυτόν. Αξιοσημείωτο είναι ότι οι αλλαγές αυτές διατηρήθηκαν και στην ενήλικη ζωή των ζώων, όπου και η λειτουργία του άξονα ήταν διαταραγμένη. Επιπλέον, η μειωμένη μητρική φροντίδα συσχετίστηκε με αυξημένη μεθυλίωση του υποκινητή του υποδοχέα των οιστρογόνων ERα-1b με αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση των υποδοχέων αυτών στην προοπτική περιοχή του υποθαλάμου των θηλυκών ζώων, κατά την ενήλικη ζωή με αποτέλεσμα την εκδήλωση μειωμένης μητρικής φροντίδας από τα ζώα αυτά προς τους απογόνους τους (Cameron et al 2008).

Είναι αποδεκτό πλέον ότι υπάρχουν κάποιες περιόδους κατά τη μεταγεννητική ανάπτυξη, κατά τη διάρκεια των οποίων ο εγκέφαλος εμφανίζει αυξημένη ευαισθησία στα ερεθίσματα του περιβάλλοντος. Αυτή η περίοδος αντιπροσωπεύει μια περίοδο αυξημένης πλαστικότητας του εγκεφάλου, κατά την οποία το πρώιμο περιβάλλον μπορεί να καθορίσει τη διάταξη των νευρικών δικτύων και έτσι να διαμορφώσει δομικές και λειτουργικές περιοχές

του εγκεφάλου καθώς και στοιχεία της συμπεριφοράς του ατόμου ή του ζώου κατά την ενήλικη ζωή (Roth et al 2011). Με άξονα τα παραπάνω, πληθαίνουν οι μελέτες που αναδεικνύουν τη συμβολή των επιγενετικών τροποποιήσεων είτε του γενετικού υλικού είτε των ιστονών κατά την ανάπτυξη που επάγονται από διάφορους παράγοντες και κυρίως από το είδος της μητρικής φροντίδας που δέχονται τα υποκείμενα (Roth et al 2011). Συγκεκριμένα, ο Caldji και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι τα ενήλικα ζώα που μεγάλωσαν από μητέρες ιδιαίτερα στοργικές (high LG) είχαν μέτρια απόκριση σε στρεσογόνες καταστάσεις (μειωμένη ενεργοποίηση του HPA άξονα) καθώς και χαμηλότερη αίσθηση του φόβου κατά την εξερεύνηση ενός καινούργιου και άγνωστου περιβάλλοντος σε σχέση με τα ζώα που δέχτηκαν λιγότερο στοργική συμπεριφορά από τις μητέρες τους. Η ίδια ερευνητική ομάδα είχε δείξει και στον παρελθόν ότι αντίστοιχες συμπεριφορές σε ενήλικα ζώα αποδίδονταν σε συγκεκριμένες μοριακές αλλαγές που είχαν ως συνέπεια αυξημένη έκφραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στον ιππόκαμπο: Η καλύτερη μητρική φροντίδα οδηγεί σε αυξημένη σεροτονεργική δραστηριότητα μέσω του υποδοχέα της σεροτονίνης τύπου 7 (5HT7R), αυξημένη ενεργοποίηση της οδού ενδοκυττάριας μεταγωγής σήματος cAMP/PKA/CREB/CBP (CREB binding protein) με συνεπακόλουθη αυξημένη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NGFI-A, ο οποίος προσδένεται ευκολότερα στον υποκινητή του γονιδίου του GR, λόγω των επιγενετικών τροποποιήσεων της χρωματίνης στη περιοχή του υποκινητή (βλέπε παραπάνω και παρακάτω). Επιπροσθέτως υπάρχει μειωμένη έκφραση του παράγοντα απελευθέρωσης της κορτικοτροπίνης στον υποθάλαμο και αυξημένη ανάδραση των γλυκοκορτικοειδών στον υποθάλαμο (Caldji C et al 1998).



**Εικόνα 14:** Η ποιότητα της μητρικής φροντίδας επηρεάζει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NGFI-A και κατά συνέπεια την έκφραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (Caldji C et al 1998)

Μερικά χρόνια αργότερα, ο Weaver και οι συνεργάτες του προσπάθησαν να εξερευνήσουν πώς αυτές οι μορφές της μητρικής φροντίδας έχουν τη δυνατότητα να επηρεάζουν τη γονιδιακή μεταγραφή αλλά και τη συμπεριφορά κατά την ενήλικη ζωή των ζώων. Παρατήρησαν, λοιπόν, ότι οι διαφορές στα μοτίβα των μεθυλίωσεων στο γονίδιο GR στον ιππόκαμπο συνδέονταν άμεσα με τη μητρική φροντίδα που είχαν δεχτεί τα ζώα της μελέτης. Συγκεκριμένα, στα ενήλικα ζώα των μητέρων που είχαν επιδείξει υψηλά επίπεδα LG-ABN (licking/grooming arched-back nursing) παρατηρήθηκαν αισθητά χαμηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης στο GR γονίδιο και αρκετά πιο αυξημένα επίπεδα ακετυλιωμένων ιστονών στον ιππόκαμπο σε σχέση με τα ζώα που ανατράφηκαν από λιγότερο στοργικές μητέρες (Weaver et al 2004). Στη συνέχεια ακολούθησαν και άλλες μελέτες από τους ίδιους ερευνητές, όπου τα νεογνά μεγάλωναν από διαφορετικές και όχι από τις βιολογικές τους μητέρες (cross-fostering), όπου και φάνηκε ότι τα επίπεδα των μεθυλίωσεων συνδέονταν μόνο με τα επίπεδα των LG συμπεριφορών των τροφών και όχι με την προτίμηση που μπορεί να έδειχναν οι βιολογικές μητέρες στα νεογνά τους. Εν τέλει, χορηγήθηκαν στα ζώα αναστολείς των απακετυλασών των ιστονών (HDAC) προκειμένου να επιβεβαιωθεί η σύνδεση ανάμεσα στις παρατηρούμενες επιγενετικές τροποποιήσεις, τη διαφορετική γονιδιακή έκφραση και την ενήλικη συμπεριφορά. Όπως αναμενόταν, μετά τη χορήγηση των αναστολέων οι παρατηρούμενες αλλαγές ανάμεσα στις ομάδες των ζώων αναιρέθηκαν, επιβεβαιώνοντας τη συμβολή των επιγενετικών

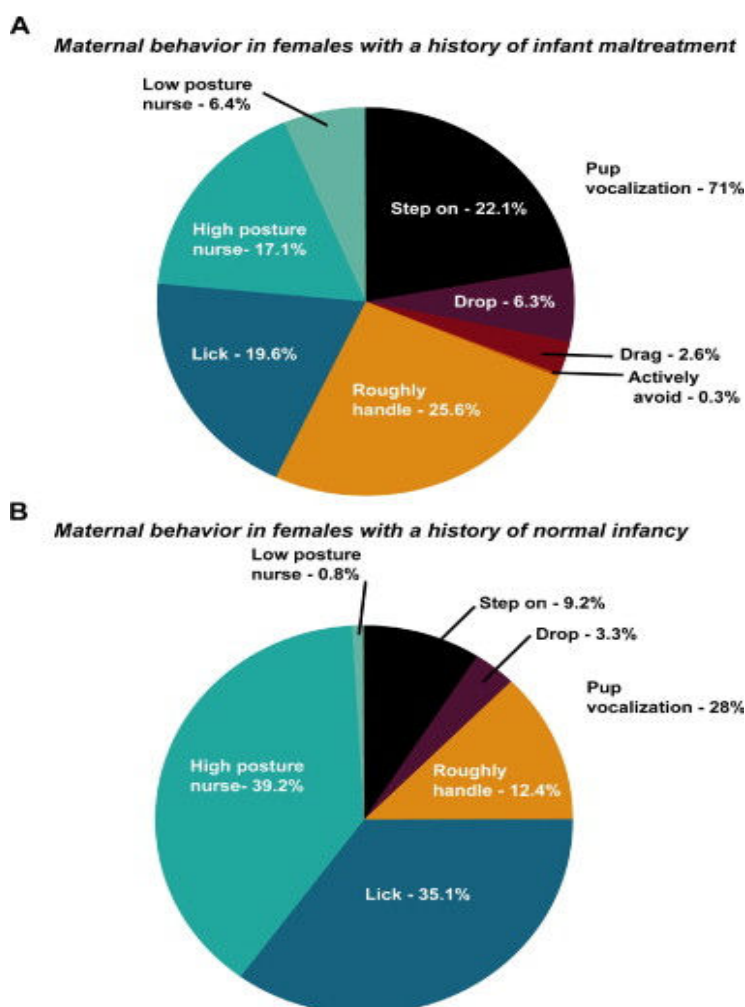
τροποποιήσεων στη γονιδιακή ρύθμιση και τη ρύθμιση της συμπεριφοράς του ζώου ως ενήλικο (Weaver et al 2004).

Ακολούθησε αντίστοιχη μελέτη από άλλη ερευνητική ομάδα, η οποία και έδειξε ότι η ποιότητα της LG-ABN συμπεριφοράς των τροφών μπορεί να επηρεάσει τη μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου του υποδοχέα των οιστρογόνων τύπου A (ER-alpha), ενός γονιδίου του οποίου η έκφραση αλλά και οι δράσεις του επηρεάζουν και ενισχύουν την εκδήλωση της μητρικής φροντίδας και συμπεριφοράς από τα ζώα. Στη μελέτη αυτή, λοιπόν, υπήρχαν διαφοροποιήσεις τόσο στην έκφραση του ER-alpha γονιδίου αλλά και στη μητρική συμπεριφορά που εκδήλωσαν τα πειραματόζωα μετά την ενηλικίωσή τους. Επίσης τα ενήλικα θηλυκά ζώα που ετράφηκαν από μητέρες με υψηλά επίπεδα LG-ABN είχαν χαμηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης στον υποκινητή του ER-alpha γονιδίου και αυξημένη σύνδεση του μεταγραφικού παράγοντα STAT5 σε περιοχή πρόσδεσης εντός του υποκινητή. Συγκεντρωτικά από τα παραπάνω, φαίνεται ότι τα υψηλότερα επίπεδα LG-ABN που δέχονται τα ζώα κατά τις πρώτες μέρες της ζωής τους αλλάζουν τη γονιδιακή μεταγραφή σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους και ενισχύουν συμπεριφορές ανθεκτικότητας σε στρεσογόνα ερεθίσματα και εκδήλωση αυξημένης μητρικής φροντίδας κατά την ενήλικη ζωή (Champagne et al 2006).

Ένα ακόμα γονίδιο που θεωρείται ότι εμπλέκεται σε διεργασίες νευρωνικής πλαστικότητας και επηρεάζεται από επιγενετικές τροποποιήσεις είναι αυτό του νευροτροφικού παράγοντα BDNF. Οι αλλαγές στην ενεργότητα αυτού του γονιδίου θεωρούνται ως ένας μοριακός μηχανισμός μέσω του οποίου οι πρώιμες εμπειρίες μπορούν να επηρεάσουν μόνιμα τη δομή του εγκεφάλου και τις εγκεφαλικές λειτουργίες. Πράγματι, ζώα που κακοποιήθηκαν τις πρώτες μέρες της ζωής τους από τις τροφούς εμφάνισαν αυξημένη μεθυλίωση στο γονίδιο του παράγοντα BDNF στον προμετωπιαίο φλοιό και η υπερμεθυλίωση αυτή διατηρήθηκε και στην ενήλικη ζωή, τόσο στα θηλυκά όσο και στα αρσενικά ζώα. Το σημαντικότερο, ωστόσο, ήταν ότι στη συγκεκριμένη μελέτη τα επίπεδα της μεθυλίωσης αυτής μειώθηκαν μετά από ενδοκρανιακή χορήγηση ενός αναστολέα των μεθυλιώσεων γνωστού ως zebularine. Το συγκεκριμένο σκεύασμα κατάφερε να απομακρύνει τις μεθυλιώσεις από το DNA καθώς και να αλλάξει τα μοτίβα γονιδιακής έκφρασης που είχαν δημιουργηθεί μετά την κακοποίηση. Το γεγονός αυτό



συνδέει άμεσα τα επίπεδα μεθυλίωσης του γονιδίου με τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου αυτού. Συνάμα, η επίδραση αυτή του αναστολέα ήταν εμφανής μόνο στην ομάδα των κακοποιημένων ζώων και όχι στα ζώα της ομάδας ελέγχου. Τα παραπάνω φανερώνουν μια σαφή συμμετοχή των πρώιμων εμπειριών στη καθιέρωση αυτών μεθυλιώσεων (Roth et al 2009). Στην ίδια μελέτη εκτιμήθηκε και η μητρική συμπεριφορά αυτών των ζώων που ως νεογνά είχαν υποστεί κακοποίηση από τις μητέρες τους. Τα ζώα αυτά, εμφάνισαν όντως μια βίαιη συμπεριφορά απέναντι στα μικρά τους, αντίστοιχη με αυτή που είχαν δεχτεί ως νεογνά (εικόνα 14). Ακόμα πιο εντυπωσιακό είναι το γεγονός, ότι το γονίδιο του παράγοντα BDNF στα ζώα αυτά ήταν ιδιαίτερα μεθυλιωμένο τόσο στον προμετωπιαίο φλοιό όσο και στον ιππόκαμπο (Roth et al 2009).



**Εικόνα 15:** Η επίδραση της ποιότητας της μητρικής φροντίδας που δέχεται ένα ζώο στη μητρική συμπεριφορά του ίδιου ως ενήλικο (Roth et al 2009)

Επιπλέον, οι επιγενετικές τροποποιήσεις συνδέονται και με άλλες λειτουργίες όπως είναι η ικανότητα μάθησης και μνήμης των ζώων. Ο Levenson και οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που πρότειναν ότι η διαδικασία που οδηγεί στο σχηματισμό της μακροχρόνιας μνήμης είναι η ίδια που συμβάλει στην επιγενετική σηματοδότηση στο γονιδίωμα των κυττάρων του εγκεφάλου. Οι δοκιμασίες εξαρτημένης μάθησης φόβου μέσω πλαισίου (contextual fear conditioning) αποτελούν ένα παράδειγμα μάθησης που εξαρτάται από τον ιππόκαμπο, όπου το ζώο μαθαίνει στην ουσία να συνδέει ένα καινοφανές περιβάλλον με ένα επώδυνο ερέθισμα. Μετά από μία τέτοια δοκιμασία η ιστόνη H3 στον ιππόκαμπο εμφανίζεται ιδιαίτερα ακετυλιωμένη κάτι που δεν ισχύει και για την ιστόνη H4. Για να καθιερωθεί αυτού του είδους η μνήμη απαιτείται η συναπτική μεταβίβαση σήματος εξαρτώμενη από τον υποδοχέα NMDA καθώς και η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού καταρράκτη ERK/MAPK στον ιππόκαμπο. Η αναστολή οποιοδήποτε από αυτά τα δύο σηματοδοτικά μονοπάτια παρεμποδίζει και τη σχετιζόμενη με τη καθιέρωση μνήμης αύξηση στην ακετυλίωση της ιστόνης H3 (Levenson et al 2004). Μετέπειτα η ίδια ερευνητική ομάδα, διαπίστωσε ότι μία διαφορετική μορφή μακροχρόνιας μνήμης η άδηλη αναστολή (latent inhibition) σχετιζόταν με μεταβολές στην ακετυλίωση όχι της ιστόνης H3, όπως προηγουμένως, αλλά της ιστόνης H4. Το γεγονός αυτό πιθανόν να σημαίνει ότι υπάρχει επιγενετικός κώδικας για το σχηματισμό της μνήμης, ενώ συγκεκριμένες επιγενετικές τροποποιήσεις συμβάλλουν σε συγκεκριμένους τύπους μνήμης (Graff et al 2008). Θα μπορούσε λοιπόν κάποιος να υποθέσει, ότι μία ενεργότητα ακετυλοτρασφεράσης των ιστονών (HAT) θα μπορούσε να παρεμβαίνει στο σχηματισμό της μακροχρόνιας μνήμης. Η πρωτεΐνη CBP φέρει την ενεργότητα αυτή, και έτσι σε πολλές μελέτες χρησιμοποιείται η πρωτεΐνη αυτή για να μελετηθεί ο σχηματισμός της μνήμης σε διαγονιδιακά ποντίκια με ελλειμματική λειτουργία της CBP. Στις μελέτες αυτές τα εν λόγω πειραματόζωα εμφάνιζαν μειωμένη ικανότητα σχηματισμού μακροχρόνιας μνήμης (Bredy et al 2008). Συνεπώς, συγκεντρωτικά από τις μελέτες που ασχολούνται με το σχηματισμό της μνήμης φαίνεται ότι η ακετυλίωση των ιστονών ρυθμίζεται κατά το σχηματισμό της μνήμης και αυτή η ρύθμιση συμβάλλει στην ικανότητα των ζώων να σχηματίζουν νέες μνήμες (Fischer et al 2007).

Ανάλογες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και για την ικανότητα της μεθυλίωσης του DNA να ρυθμίζει τη συναπτική πλαστικότητα και το σχηματισμό μνήμης στα ενήλικα ζώα. Έχει φανεί, λοιπόν, ότι οι αναστολείς των μεθυλοτρανσφερασών αλλάζουν τα πρότυπα μεθυλίωσης στο κεντρικό νευρικό σύστημα των ενήλικων ζώων και παρεμποδίζουν τη μακροχρόνια ενδυνάμωση ( LTP long term potentiation) στον ιππόκάμπο. Άλλα στοιχεία δείχνουν επίσης ότι οι δοκιμασίες αντιμετώπισης φόβου σχετίζονται με την ταχύτατη μεθυλίωση και μεταγραφική αποσιώπηση του γονιδίου PP1 που συμμετέχει στην αναστολή της μνήμης αυτής. Παράλληλα, σχετίζονται με την απομεθυλίωση και και τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου *reelin* που συμμετέχει στη πλαστικότητα των συνάψεων, καθώς και με την έναρξη ιστοειδικής μεταγραφής του γονιδίου BDNF. Φαίνεται, λοιπόν, από τα παραπάνω ότι τόσο η μεθυλίωση όσο και η απομεθυλίωση συμμετέχουν ενεργά και λειτουργούν παράλληλα για το σχηματισμό της μνήμης (Lubin et al 2008).

#### **1.4.5. Επιγενετικές τροποποιήσεις στον ανθρώπινο εγκέφαλο**

Όλες οι μελέτες που αναφέρθηκαν παραπάνω, εμπλέκουν πειραματικές διατάξεις και αποτελέσματα από μελέτες σε πειραματόζωα και συγκεκριμένα σε μυσ και επίμυς. Γεννάται λοιπόν το ερώτημα κατά πόσον όλες οι προαναφερθείσες διαδικασίες επιγενετικών τροποποιήσεων πραγματοποιούνται και στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Προκειμένου να απαντήσουν στο συγκεκριμένο ερώτημα, οι ερευνητές Michael Meaney και Moshe Szyf μελέτησαν την έκφραση αλλά και τη μεθυλίωση του DNA του ανθρώπινου γονιδίου του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (*Nr3c1*) σε δείγματα από τον ιππόκαμπο αυτοχείρων αντρών που είχαν δεχτεί κακοποίηση σε παιδική ηλικία, αυτόχειρων που δεν είχαν υποστεί κακοποίηση και σε μια ομάδα ελέγχου. Στα δείγματα των αυτόχειρων με παιδική κακοποίηση εντοπίστηκαν μειωμένα επίπεδα mRNA του υποδοχέα των

γλυκοκορτικοειδών (GR), τα οποία σχετίζονταν με υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου του GR (γονίδιο Nr3c1). Φαίνεται, λοιπόν, ότι οι πρώιμες εμπειρίες αυτών των αντρών επέδρασαν στα εγκεφαλικά κύτταρα με τρόπο παρόμοιο με αυτόν που έχει παρατηρηθεί στα ζωικά μοντέλα (McGowan et al 2009).

Υπάρχουν και άλλα στοιχεία, ωστόσο, που δείχνουν την πρόκληση επιγενετικών τροποποιήσεων μετά από περιβαλλοντικά ερεθίσματα και τη συμβολή τους σε ανθρώπινες λειτουργίες και συμπεριφορές. Για παράδειγμα, η ερευνητική ομάδα του Tom Oberlander έδειξε ότι τα έμβρυα μητέρων με κατάθλιψη στο τρίτο τρίμηνο της κύησης είχαν αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης του Nr3c1 γονιδίου σε κύτταρα από ομφάλιο λώρο. Επίσης, νεογνά που γεννήθηκαν με καισαρική επέμβαση και όχι με φυσιολογικό τοκετό είχαν εξαιρετικά αυξημένα επίπεδα μεθυλιωμένων γονιδίων στα λευκά τους αιμοσφαίρια. Φαίνεται, συνεπώς, ότι το γονιδίωμα των εμβρύων είναι εκτεθειμένο και επηρεάζεται τόσο από τις εμπειρίες που βιώνει η μητέρα κατά την κύηση, τις εμπειρίες κατά την περιγεννητική περίοδο αλλά και από την ίδια την εμπειρία του τοκετού. Εντούτοις, παραμένει αβέβαιο το κατά πόσο αυτές οι επιγενετικές τροποποιήσεις σε κύτταρα της περιφέρειας συμβαίνουν στον ίδιο βαθμό και σε κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος. Ωστόσο, αναδεικνύεται η ανάγκη για περαιτέρω μελέτη των λειτουργιών και διαδικασιών αυτών στον ανθρώπινο οργανισμό καθώς και η προοπτική να χρησιμοποιηθούν ως κλινικοί δείκτες διάγνωσης ψυχιατρικών ασθενειών (Gavin et al 2009).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο εγκέφαλος των θηλαστικών συνεχίζει να αναπτύσσεται και μετά τη γέννηση και συγκεκριμένα στην πρώιμη νεογνική ηλικία διαμορφώνονται και ωριμάζουν οι πιο πρόσφατες εξελικτικά περιοχές (Pechtel και Pizzagalli, 2011). Μεταξύ αυτών και οι περιοχές του μετωπιαίου φλοιού που θεωρούνται υπεύθυνες για τις ανώτερες γνωστικές λειτουργίες (Leh et al 2010) αλλά και του ιππόκαμπου που παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση του καινοφανούς, στην ικανότητα προσαρμογής σε στρεσογόνες καταστάσεις αλλά και στην ικανότητα μάθησης και μνήμης (Chandramohan et al 2007).

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζει την ανάπτυξη του νεογνικού εγκεφάλου αλλά και όλη τη μετέπειτα εξέλιξη του είναι η μητρική επαφή. Στην προσπάθεια μελέτης των συμπεριφορικών μηχανισμών της ενίσχυσης ή της ματαίωσης μέσω της μητρικής επαφής κατά τη νεογνική ηλικία, αναπτύχθηκε ένα νέο ζωικό μοντέλο βασισμένο στην έκθεση νεογνών επίμυων (ηλικίας 10-13 ημερών) σε έναν λαβύρινθο σχήματος T (T-maze), στην άκρη του ενός βραχίονα του οποίου βρίσκεται το κλουβί με την μητέρα και στην άκρη του άλλου βραχίονα ένα κλουβί με ένα άσχετο, παρθένο θηλυκό. Το μοντέλο αυτό αναπτύχθηκε στο εργαστήριο Βιολογίας- Βιοχημείας του Τμήματος Νοσηλευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής του Θ. Παναγιωταρόπουλου (2005) και από τότε διάφορες μελέτες διερευνούν τις συνέπειες σε συγκινησιακές και γνωστικές πλευρές της συμπεριφοράς (Τζανουλίνου, 2008, Panagiotaropoulos, 2009, Διαμαντοπούλου, 2007, Diamantopoulou, 2011).

Όλο και περισσότερες μελέτες, καταδεικνύουν τη συμβολή των επιγενετικών τροποποιήσεων είτε του DNA είτε των ιστονών του νουκλεοσώματος στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Ακόμα πιο ουσιώδες είναι το γεγονός ότι αυτές οι χημικές τροποποιήσεις μεταβάλλονται ανάλογα με το περιβάλλον αλλά και τις εμπειρίες που βιώνουν τα νεογνά τις πρώτες μέρες της ζωής τους (πρώιμες εμπειρίες).

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι να εξετάσει το κατά πόσο η νεογνική εκπαίδευση επίμυων στον λαβύρινθο σχήματος «T» δύναται να

επιφέρει ή να επηρεάσει τις επιγενετικές τροποποιήσεις στο DNA του εγκεφάλου ενήλικου επίμου. Η συγκεκριμένη νεογνική εκπαίδευση αντιμετωπίζεται ως ήπιο κοινωνικό στρες, όπου η μία ομάδα «επιβραβεύεται» μέσω της μητρική επαφής, ενώ η άλλη «ματαιώνεται» μέσω της μη-ενίσχυσης από την παρεμπόδιση της αναμενόμενης μητρικής επαφής. Η συγκεκριμένη επιγενετική τροποποίηση που μελετήθηκε ήταν η φωσφορυλίωση στην σερίνη 10 και η ακετυλίωση στην λυσίνη 14 της ιστόνης H3. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της φωσφοακετυλιωμένης ιστόνης H3 (P(Ser10)Ac(Lys14) H3) σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου (προμετωπιαίος φλοιός, ιππόκαμπος και αμυγδαλή) των ενήλικων ζώων, που είχαν εκτεθεί ως νεογνά στις πρώιμες εμπειρίες του παραπάνω πειραματικού μοντέλου. Οι περιοχές επιλέχθηκαν επειδή έχει δειχθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι επηρεάζονται τόσο από το συγκεκριμένο μοντέλο που χρησιμοποιήσαμε (Panagiotaropoulos et al 2009, Diamantopoulou et al 2011 ) όσο και εν γένει από τις πρώιμες εμπειρίες (Roth et al 2011). Η επιλογή μελέτης της συγκεκριμένης επιγενετικής τροποποίησης βασίστηκε στα αποτελέσματα άλλων μελετών που δείχνουν ότι σχετίζεται με το τοπικό ξετύλιγμα της συμπυκνωμένης χρωματίνης, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τη μεταγραφική ενεργοποίηση συγκεκριμένων και κανονικά ανενεργών γονιδίων (Chandramohan et al 2007).

Εξετάστηκε ακόμα (με χρώση κατά Golgi) η δομή των νευρικών κυττάρων (η έκταση των δενδριτικών πεδίων), καθώς η ικανότητα δημιουργίας νευρικών αποφυάδων και νευρικών συνάψεων επηρεάζεται από τη γονιδιακή λειτουργία των νευρώνων.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε διπλός ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της φωσφοακετυλιωμένης ιστόνης H3 (PAcH3) και του c-Fos με αντισώματα σημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές στον προμετωπιαίο φλοιό ζώων (που είχαν επιπλέον υποβληθεί σε μία συμπεριφορική δοκιμασία ASST- Attention Set Shift Assay) που απαιτεί την ενεργοποίηση προμετωπιαίων δομών. Στόχος του παραπάνω πειράματος ήταν να εξεταστεί το κατά πόσο τα κύτταρα που εμφάνιζαν γονιδιακή ενεργοποίηση (δίνοντας θετικό σήμα για τη PAcH3) εμφάνιζαν και ενεργό νευρωνική λειτουργία, χρησιμοποιώντας την έκφραση του c-fos ως δείκτη νευρωνικής ενεργοποίησης (Hoffman and Lyo 2002).



### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

#### 3.1 Πειραματόζωα

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα πειράματα της παρούσας μελέτης ήταν επίμυες στελέχους **Wistar** (εικόνα 16), που ανατράφηκαν στην αποικία πειραματόζωων του εργαστηρίου Βιολογίας-Βιοχημείας του τμήματος Νοσηλευτικής. Οι συνθήκες διαβίωσης των πειραματόζωων ήταν σταθερές και ελεγχόμενες, με σταθερή θερμοκρασία 24<sup>o</sup>C και σταθερό κύκλο φωτισμού (8:00- 20:00 φως και 20:00- 8:00 σκοτάδι).



Εικόνα 16: Επίμυς στελέχους Wistar

Οι επίμυς του στελέχους wistar αποτελούν ένα ετερόμικτο στέλεχος αλφικών επίμυων που ανήκουν στο είδος *Rattus norvegicus*. Το εν λόγω στέλεχος αναπτύχθηκε στο Ίδρυμα Wistar με σκοπό να χρησιμοποιηθεί για έρευνα βιολογικού και ιατρικού περιεχομένου, και αποτελεί το πρώτο στέλεχος που αναπτύχθηκε για να υπηρετήσει το σκοπό αυτό σε μια περίοδο που όλα τα εργαστήρια χρησιμοποιούσαν μυς του είδους *Mus musculus* ως πειραματόζωα. Τα στελέχη αυτά χαρακτηρίζονται από φαρδύ κεφάλι, μακριά αυτιά και από ουρά, το μήκος της οποίας δεν υπερβαίνει το μήκος του σώματος. Τα στελέχη Sprague Dawley και Long-Evans αναπτύχθηκαν από το στέλεχος Wistar.



### 3.2. Έκθεση υπό συνεχόμενη ματαίωση ή συνεχόμενη ενίσχυση κατά τη νεογνική ηλικία

Η εκπαίδευση υπό συνεχόμενη ματαίωση ή συνεχόμενη ενίσχυση πραγματοποιήθηκε (εικ. 9) χρησιμοποιώντας έναν λαβύρινθο σχήματος T (T-maze) προσαρμοσμένο στο μέγεθος των νεογνών επίμυων. Το κουτί έναρξης (start box) του λαβυρίνθου είχε διαστάσεις 8 x 6 εκατοστά και οδηγούσε άμεσα, χωρίς την παρεμβολή κάποιου διαχωριστικού, σε δύο βραχίονες οι οποίοι οδηγούσαν σε δύο ξεχωριστά κλουβιά. Συγκεκριμένα, ο δεξιός βραχίονας του λαβυρίνθου οδηγούσε σε ένα κλουβί με διαστάσεις 30 x 22 εκατοστά, στρωμένο με ροκανίδι, μέσα στο οποίο βρισκόταν η μητέρα των νεογνών. Ο αριστερός βραχίονας του λαβυρίνθου οδηγούσε σε ένα δεύτερο κλουβί, ίδιων διαστάσεων με το πρώτο, στρωμένο επίσης με ροκανίδι, μέσα στο οποίο βρισκόταν ένα άλλο θηλυκό ζώο. Το πλάτος των δύο βραχιόνων ήταν 7 εκατοστά ενώ το μήκος τους ήταν συνολικά 70 εκατοστά, το οποίο αντιστοιχούσε σε 30 εκατοστά για κάθε βραχίονα και 10 εκατοστά για την περιοχή που αποτελούσε την άμεση προέκταση του κουτιού έναρξης. Στο τέλος του δεξιού βραχίονα μια μικρή ανασυρόμενη θυρίδα με διαστάσεις 9 x 11 εκατοστά οδηγούσε στο εσωτερικό του κλουβιού της μητέρας.



**Εικόνα 17:** Σχηματική κάτοψη της πειραματικής διάταξης για τη μελέτη της επίδρασης της ενίσχυσης ή της ματαίωσης στη μάθηση και μνήμη κατά τη νεογνική ηλικία.

Για την εκπαίδευση χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά και θηλυκά πειραματόζωα ηλικίας 10-13 ημερών. Ως πρώτη μεταγεννητική ημέρα (postnatal day 1, P1) ορίσθηκε η πρώτη ημέρα μετά τη γέννηση των ζώων. Πριν από τη γέννησή τους, όλα τα πειραματόζωα κάθε γέννας, κατατάσσονταν τυχαία σε μία από τις δύο κατηγορίες (ματαίωση ή ενίσχυση).

Τα πειραματόζωα που εκτέθηκαν στη συνεχόμενη ενίσχυση, υποβλήθηκαν σε δέκα δοκιμασίες καθημερινά (σύνολο 40 δοκιμασίες για τις τέσσερις ημέρες εκπαίδευσης). Αρχικά, η μητέρα των πειραματόζωων απομακρυνόταν από το κλουβί μέσα στο οποίο διαβίωνε με τα νεογνά και τοποθετούνταν στο δεξιό κλουβί της πειραματικής διάταξης του λαβυρίνθου σε σχήμα Τ. Στη συνέχεια, όλα τα ζώα της γέννας τοποθετούνταν επίσης στο δεξιό κλουβί της πειραματικής διάταξης. Έπειτα, με τη σειρά, κάθε νεογνό τοποθετούνταν στο κουτί έναρξης του λαβυρίνθου και παρέμενε σε αυτόν για 60 δευτερόλεπτα. Όταν το πειραματόζωο έβρισκε το κλουβί της μητέρας, η θυρίδα του κλουβιού άνοιγε και το πειραματόζωο έμπαινε μέσα στο κλουβί. Τη χρονική στιγμή εύρεσης του κλουβιού της μητέρας η καταγραφή των συμπεριφορικών δεδομένων σταματούσε. Σε κάθε άλλη περίπτωση μη-εύρεσης του κλουβιού, η καταγραφή των συμπεριφορικών δεδομένων σταματούσε αμέσως μετά την ολοκλήρωση των 60 δευτερολέπτων και ο πειραματιστής οδηγούσε με απαλές κινήσεις το πειραματόζωο στην είσοδο του κλουβιού της μητέρας. Εκεί η θυρίδα άνοιγε και το ζώο έμπαινε μέσα στο κλουβί. Στη συνέχεια, ο πειραματιστής έπαιρνε το επόμενο πειραματόζωο από το κλουβί της διάταξης και το τοποθετούσε στο κουτί έναρξης. Μετά το τέλος κάθε δοκιμασίας ο λαβύρινθος καθαριζόταν με διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης προκειμένου να απομακρυνθούν οσμές που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν από τα πειραματόζωα προκειμένου να προσανατολιστούν στο χώρο. Όταν όλα τα πειραματόζωα είχαν εκτεθεί στην πρώτη διαδικασία με τον ίδιο τρόπο εκτίθονταν και στη δεύτερη κ.ο.κ. Στο τέλος των δέκα δοκιμασιών, η μητέρα των πειραματόζωων και αμέσως μετά τα πειραματόζωα, επέστρεφαν στο κλουβί διαβίωσής τους και στο δωμάτιο των πειραματόζωων.

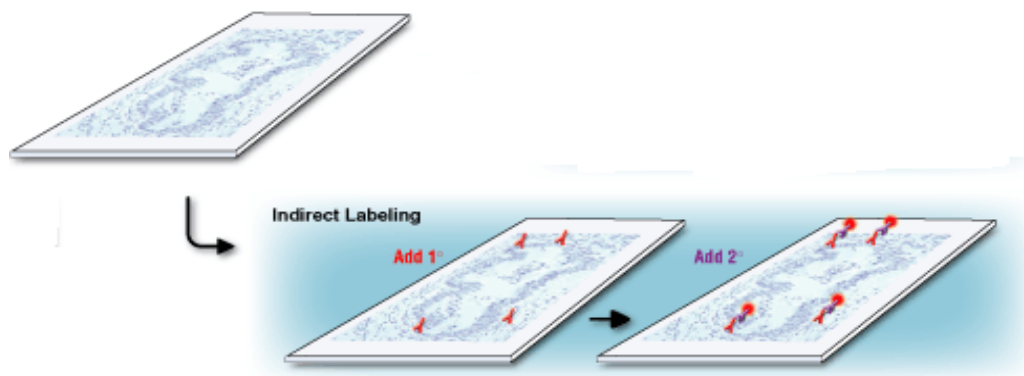
Τα πειραματόζωα που εκτέθηκαν στη συνεχόμενη ματαίωση υποβάλλονταν σε 10 δοκιμασίες καθημερινά (σύνολο 40 δοκιμασίες για τις 4 ημέρες εκπαίδευσης). Όπως και στη συνθήκη της συνεχόμενης ενίσχυσης, αρχικά η μητέρα των πειραματόζωων και στη συνέχεια τα νεογνά τοποθετούνταν στο κλουβί της πειραματικής διάταξης. Στη συνέχεια, κάθε πειραματόζωο τοποθετούνταν στο κουτί έναρξης του λαβυρίνθου και υποβαλλόταν σε δέκα συνεχόμενες δοκιμασίες. Όταν το πειραματόζωο έβρισκε το κλουβί της μητέρας, η θυρίδα που οδηγούσε στο κλουβί παρέμενε

κλειστή και το νεογνό παρέμενε σε αυτό το σημείο για 20 δευτερόλεπτα. Αμέσως μετά, ο πειραματιστής επέστρεψε το πειραματόζωο στο κουτί έναρξης του λαβυρίνθου όπου υποβαλλόταν στην επόμενη δοκιμασία. Όπως και στη συνθήκη της συνεχόμενης ενίσχυσης, η διάρκεια της δοκιμασίας ήταν 60 δευτερόλεπτα. Όταν το πειραματόζωο έβρισκε το κλουβί, η καταγραφή των συμπεριφορικών δεδομένων σταματούσε και άρχιζε η περίοδος των 20 δευτερολέπτων. Σε κάθε περίπτωση, αν το πειραματόζωο δεν κατάφερνε να βρει το στόχο (κλουβί της μητέρας) μέσα στο διαθέσιμο χρόνο των 60 δευτερολέπτων, οδηγούνταν μέχρι εκεί από τον πειραματιστή. Στο τέλος των δέκα συνεχόμενων δοκιμασιών ο πειραματιστής απομάκρυνε το ζώο από το λαβύρινθο και το επέστρεψε στο κλουβί της μητέρας μέσα στην πειραματική διάταξη. Μετά την ολοκλήρωση της εκπαίδευσης όλων των πειραματόζωων, η μητέρα και στη συνέχεια τα νεογνά της επέστρεφαν στο κλουβί διαβίωσής τους.

Σημειώνεται ότι στη συνθήκη της ματαίωσης, η θυρίδα παρέμενε κλειστή, ενώ παράλληλα υπήρχε η προσθήκη ενός δεύτερου συρμάτινου πλέγματος, μπροστά από αυτή. Η τροποποίηση αυτή έγινε προκειμένου να αυξηθεί η απόσταση μεταξύ κλουβιού και πειραματόζωου στην άκρη του βραχίονα (2 εκατοστά), με σκοπό την απουσία απτικών ερεθισμάτων από τη μητέρα προς το νεογνό. Γίνεται αντιληπτό ότι το πειραματόζωο κατά τη διάρκεια της έκθεσής του στο λαβύρινθο δεν είχε οπτικά ή απτικά ερεθίσματα από τη μητέρα που να το οδηγούν προς το κλουβί. Τα οπτικά ερεθίσματα απουσίαζαν καθώς οι επίμυς στελέχους Wistar έχουν τα μάτια τους κλειστά έως και τη 13<sup>η</sup> μεταγεννητική ημέρα (ανοίγουν τα μάτια τους κατά την 14<sup>η</sup> μεταγεννητική ημέρα). Αν και δεν υπήρχε δυνατότητα ελέγχου της συμβολής των εξωτερικών ερεθισμάτων στη συμπεριφορά του πειραματόζωου, φαίνεται ότι ο προσανατολισμός γινόταν βάσει ιδιοδεκτικών ερεθισμάτων, πιθανόν από τα τοιχώματα του λαβυρίνθου καθώς και μέσω οσφρητικών και ακουστικών ερεθισμάτων από τη μητέρα.

### 3.3. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός

Σε αυτή την τεχνική γίνεται χρήση ενός αντισώματος, προκειμένου να γίνει σύνδεση ενός κυτταρικού αντιγόνου με έναν ιχνηθέτη ώστε να καθίσταται δυνατή η παρατήρηση του αντιγόνου με το μικροσκόπιο.



**Εικόνα 18:** Στην εικόνα φαίνεται σχηματικά η χρήση του πρώτου αντισώματος (σκούρο κόκκινο χρώμα), ειδικό για το κυτταρικό αντιγόνο και η χρήση ενός δεύτερου αντισώματος (μωβ χρώμα), το οποίο χρησιμοποιείται για τη σύνδεση του ιχνηθέτη (ανοιχτό κόκκινο χρώμα) και καθιστά εύκολη την παρατήρηση της κατανομής του αντιγόνου.

#### 3.3.1. Παρασκευή Δειγμάτων

Μεταξύ 55ης και 60ης ημέρας μετά τη γέννηση και ενώ τα πειραματόζωα βρισκόταν σε βαθιά αναισθησία (με χρήση αιθέρα), αυτά θυσιαζόταν.

Αμέσως μετά τη θυσία, οι εγκεφαλοι των πειραματόζωων αφαιρούνταν και εμβαπτίζονταν σε ισοπεντάνιο ( $-30^{\circ}\text{C}$ ) και τη συνέχεια αποθηκεύονταν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Στεφανιαίες τομές (coronal) πάχους 20  $\mu\text{m}$  κόβονταν σε ψυχόμενο μικροτόμο, συλλέγονταν σε αντικειμενοφόρους πλάκες καλυμμένες με σιλάνιο (2% 3- αμινοπροπυλτριαιθοξυσιλάνιο της Sigma, διαλυμένο σε ακετόνη) και φυλάσσονταν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.2. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της φωσφοακετυλιωμένης ιστόνης H3 (PAcH3)

Αρχικά οι τομές αφήνονταν σε θερμοκρασία δωματίου για 15-20 λεπτά ώστε να εξισορροπηθεί η θερμοκρασία τους και να στεγνώσουν. Στη συνέχεια οι τομές μονιμοποιούνταν για 1 ώρα σε 4% παραφορμαλδεΐδη σε 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) pH 7,4 στους 4° C. Ακολουθούσαν 3 ξεπλύματα σε PBS, 5 λεπτά το καθένα, σε θερμοκρασία δωματίου και ακόμα δύο (5 και 10 λεπτών) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH7,4 , που περιείχε απορρυπαντικό Triton X- 100 συγκέντρωσης 0,4% για την αύξηση της διεισδυτικότητας των αντισωμάτων. Ακολούθως, οι τομές επώασθησαν με ένα διάλυμα παρεμπόδισης της μη ειδικής σύνδεσης των αντισωμάτων στον ιστό (διάλυμα PBS, το οποίο περιείχε τον απαιτούμενο ορό (κατσίκας) σε συγκέντρωση 10% καθώς και 0,4% Triton X-100 ) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Αμέσως μετά, και χωρίς να μεσολαβήσει πλύσιμο των τομών, οι τομές επώασθησαν στους 4° C με διάλυμα που περιέχει το πρώτο αντίσωμα, καθώς και τον απαιτούμενο ορό σε συγκέντρωση 10% και Triton X-100 (0,4%). Η επώαση με το πολυκλωνικό αντίσωμα αντί-P(Ser10)-Ac(Lys14)H3 κουνελιού (1/500 αραιώση) είχε διάρκεια 24 ώρες.

Μετά την επώαση αυτή οι τομές πλύθηκαν σε PBS (3x5 λεπτά) και ακολούθησε η επώασή τους με το αντίστοιχο δεύτερο βιοτινυλιωμένο αντίσωμα (IgG κατσίκας έναντι κουνελιού), σε αραιώση 1/200 για 120 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου μαζί με 10% από τον αντίστοιχο ορό. Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνθηκε με πλύσιμο των τομών σε PBS (3x5 λεπτά) και ακολούθησε επώαση με διάλυμα Αβιδίνης- Βιοτίνης (AB complex) 1:100 συνδεδεμένης με υπεροξειδάση, για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η περίσσεια του διαλύματος AB complex ξεπλύθηκε με PBS (3x5 λεπτά). Τέλος, η ανοσοϊστοχημική χρώση επιτεύχθηκε με την αντίδραση της υπεροξειδάσης με το χρωμογόνο υπόστρωμα DAB παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για περίπου 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Για τη διατήρηση, αποθήκευση και παρατήρηση των τομών ακολούθησε σταδιακή αφυδάτωσή τους σε διάλυμα αιθανόλης σταδιακά αυξανόμενης συγκέντρωσης και τοποθέτηση καλυπτρίδων με τη χρήση ειδικής ρητίνης κάλυψης (DePeX). Ως μάρτυρες της πειραματικής

αυτής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν τομές, οι οποίες δεν επωάστηκαν με το πρώτο ειδικό αντίσωμα και οι οποίες δεν έδωσαν καμία ανοσοϊστοχημική χρώση.

### **3.3.3. Σήμανση αντισωμάτων με φθορίζουσες χρωστικές**

Τα αντισώματα c-Fos και P(Ser10)-Ac(Lys14) σημάνθηκαν με ειδικές χρωστικές προκειμένου, οι σημασμένες με αυτά τομές (διπλή σήμανση), να παρατηρηθούν σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού. Κάθε αντίσωμα σημάνθηκε με διαφορετική χρωστική, κάθε μία με απορρόφηση σε διαφορετικό μήκος κύματος. Συγκεκριμένα, το αντίσωμα P(Ser10)-Ac(Lys14) σημάνθηκε με χρωστική που απορροφά στα 555 nm και δίνει σήμα κόκκινου χρώματος ενώ το αντίσωμα c-fos με χρωστική που απορροφά στα 488 nm, με σήμα πράσινου χρώματος. Η χρώση των αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας παρασκευής (Biotium).

### **3.3.4. Διπλός ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της φωσφοακετυλιωμένης ιστόνης H3 (PAcH3) και του c-Fos με αντισώματα σημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές**

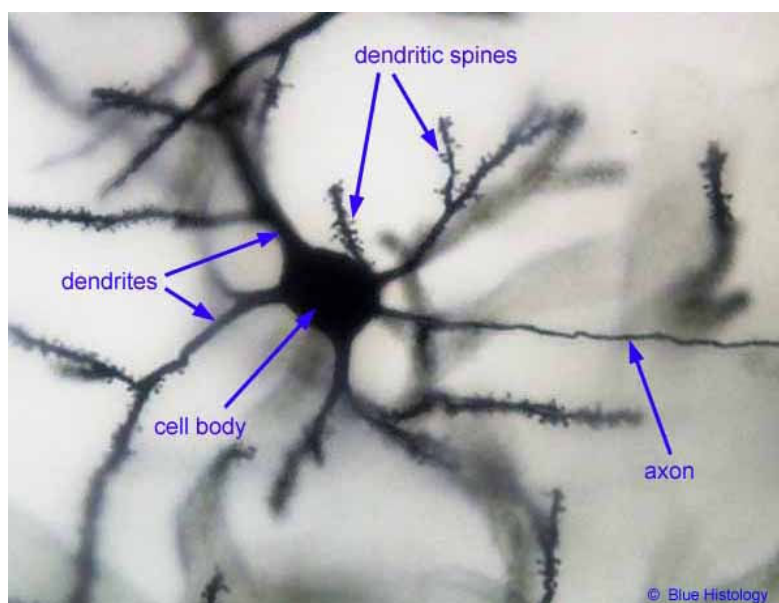
Οι τομές παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 15-20 λεπτά ώσπου να στεγνώσουν. Στη συνέχεια οι ιστοί μονιμοποιούνταν για 1 ώρα σε 4% παραφορμαλδεΐδη σε 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) pH 7.4 στους 4° C. Ακολουθούσαν 3 ξεπλύματα σε PBS pH 7.4, 5 λεπτά το καθένα, σε θερμοκρασία δωματίου και ακόμα δύο (5 και 10 λεπτών) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 7.4, που περιείχε απορρυπαντικό Triton X- 100 συγκέντρωσης 0,4% για την αύξηση της διεισδυτικότητας των αντισωμάτων. Αμέσως μετά, και χωρίς να μεσολαβηθεί πλύσιμο των τομών, οι τομές επωάστηκαν στους 4° C με διάλυμα που περιέχει το σημασμένο πολυκλωνικό

αντίσωμα αντί-P(Ser10)-Ac(Lys14)H3 κουνελιού (1/500 αραίωση), καθώς και Triton X-100 (0,4%). Η επώαση είχε διάρκεια 48 ώρες.

Μετά το πέρας της επώασης, οι τομές ξεπλύθηκαν 3 φορές σε PBS (5 λεπτά το κάθε πλύσιμο). Ακολούθως, επωάστηκαν στους 4°C για 72 ώρες με το σημασμένο αντι-c-Fos αντίσωμα κατσίκας με αραίωση 1/400. Ακολούθησαν 3 ξεπλύματα σε PBS, 5 λεπτά το καθένα. Για τη διατήρηση, αποθήκευση και παρατήρηση των τομών πραγματοποιήθηκε τοποθέτηση καλυπτριδων με τη χρήση διαλύματος γλυκερόλης (90%) σε PBS pH 7.4.

### 3.4 Χρώση νευρώνων με τη μέθοδο Golgi

Η μέθοδος Golgi είναι μια τεχνική χρώσης του νευρικού ιστού η οποία παλαιότερα ήταν γνωστή ως μαύρη αντίδραση (black reaction) λόγω του χαρακτηριστικού μύρου χρώματος που αποκτούν τα νευρικά κύτταρα. Χρησιμοποιείται για τη μελέτη της οργάνωσης του νευρικού συστήματος. Έχει την ικανότητα να βάφει με τυχαίο τρόπο μερικά μόνο από τα κύτταρα μιας περιοχής, αποκαλύπτοντας ωστόσο τα δομικά χαρακτηριστικά του κυτταρικού σώματος, του νευράξονα, των δενδριτών και των αποφυάδων σε όλο το μήκος τους.



**Εικόνα 19:** Νευρικό κύτταρο μετά από χρώση Golgi

### **3.4.1. Παρασκευή Δειγμάτων**

Μετά τη θανάτωση των ζώων υπό βαθιά αναισθησία και την αφαίρεση των εγκεφάλων, οι ιστοί ξεπλύθηκαν σε αποσταγμένο νερό για την απομάκρυνση του περιβάλλοντος αίματος από τον ιστό. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν για 2 εβδομάδες σε διάλυμα χρωμικού και διχρωμικού νατρίου και χλωριούχου υδραργύρου (που παρασκευάστηκε αναμιγνύοντας ίση ποσότητα των διαλυμάτων A και B, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας παρασκευής του kit FD Rapid Golgistain, FD NeuroTechnologies) με σκοπό τη μονιμοποίηση του εγκεφάλου. Μετά την επώαση, οι εγκεφαλοι μεταφέρθηκαν σε διάλυμα κρυστασίας (διάλυμα C το οποίο περιέχει γλυκερόλη) θερμοκρασίας 4°C και σε συνθήκες πλήρους έλλειψης φωτισμού, όπου και παρέμειναν για 48 ώρες. Στη συνέχεια κόπηκαν στεφανιαίες τομές (coronal) πάχους 40 μm σε ψυχόμενο μικροτόμο, συλλέχθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες καλυμμένες με ζελατίνη (3 gr ζελατίνης, 0,3 gr θειικό χρώμιο-κάλιο, 0,5 lt αποσταγμένο νερό) και φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, σε συνθήκες έλλειψης φωτισμού, για μέγιστο διάστημα μιας εβδομάδας μέχρι την παραπέρα κατεργασία τους.

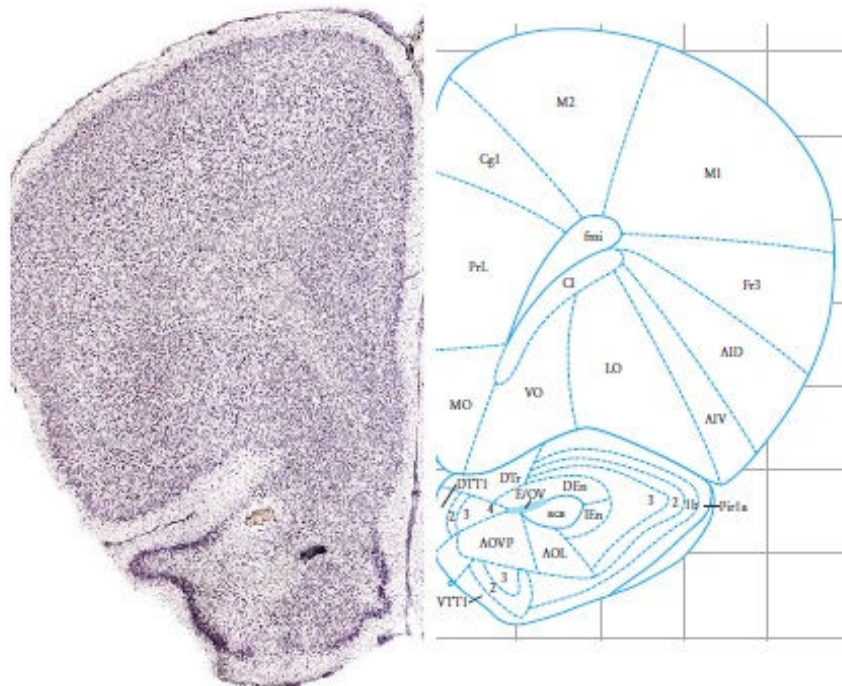
### **3.4.2. Διαδικασία χρώσης των δειγμάτων**

Αρχικά οι τομές ξεπλύθηκαν 2 φορές για 2 λεπτά σε αποσταγμένο νερό. Ακολούθησε η χρώση όπου τοποθετήθηκαν για 10 λεπτά σε διάλυμα νιτρικού αργύρου και αντιδραστηρίων εμφάνισης χρωμικού αργύρου (που παρασκευάστηκε αναμιγνύοντας ίση ποσότητα των χρωστικών D και E, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας παρασκευής του kit FD Rapid Golgistain, FD NeuroTechnologies). Ακολούθησαν 2 ξεπλύματα τεσσάρων λεπτών το καθένα και σταδιακή αφυδάτωση των τομών σε διάλυμα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης. Τέλος, για τη διατήρηση και αποθήκευση των τομών τοποθετήθηκαν καλυπτρίδες μετά την κάλυψη με ειδική ρητίνη (DePeX).

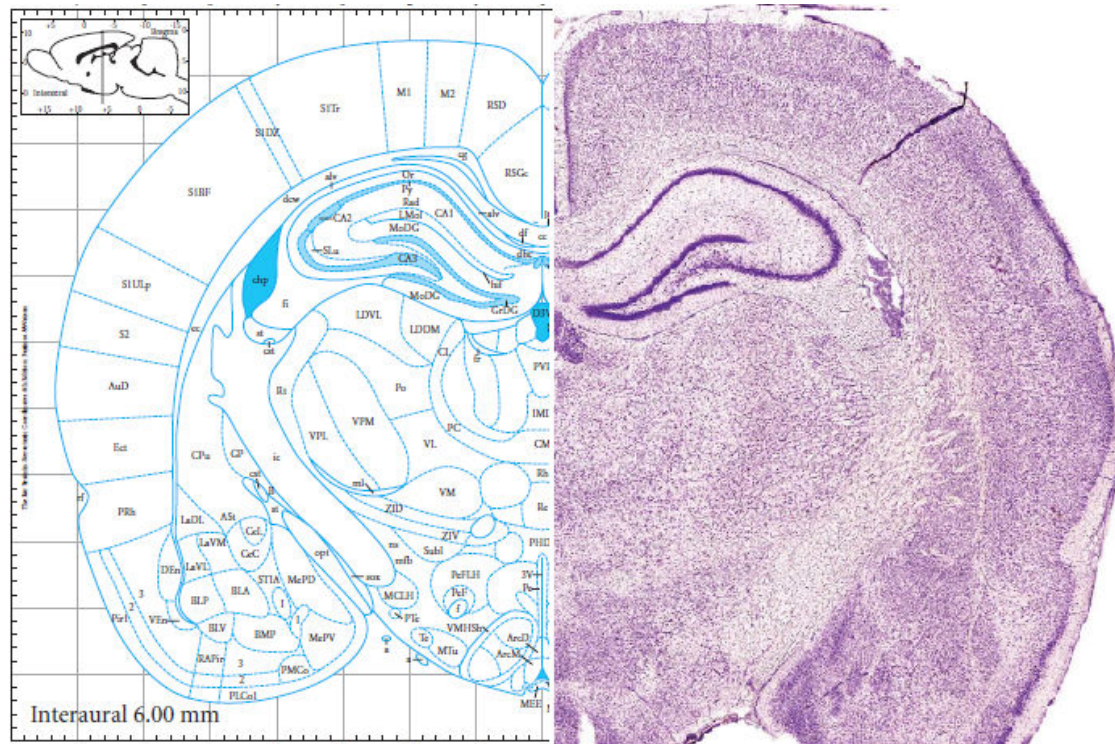


### 3.5 Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων

Για κάθε ένα από τα ζώα, μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων που ήταν ανοσοθετικά για τη P(Ser10)Ac(Lys14) σε δύο-τρία οπτικά πεδία ανά περιοχή, σε τρεις διαδοχικές τομές και υπολογίστηκε ο μέσος όρος ανά περιοχή και ζώο. Η μεγέθυνση του μικροσκοπίου ήταν 20x και οι περιοχές που μελετήθηκαν ήταν ο μέσος (mOFC) και ο έξω κοιλιακός (VLOFC) κογχομετωπιαίος, οι περιοχές 1 και 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου (Cg1 και Cg3-PrL) (εικόνα 20), οι περιοχές BLA και CeA της αμυγδαλής καθώς και οι περιοχές CA1 και CA3 του ιπποκάμπου (εικόνα 21).

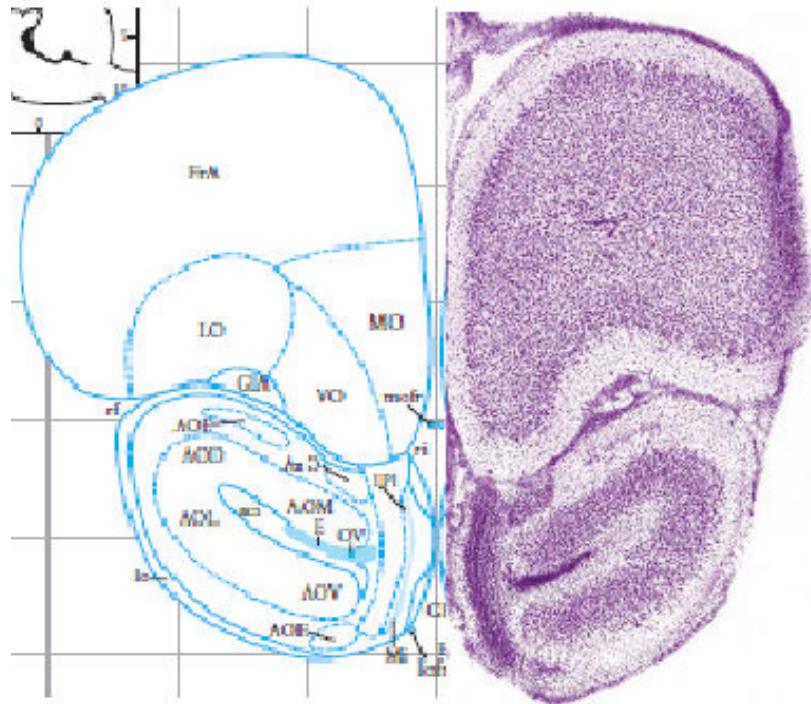


**Εικόνα 20:** Εικόνα του επιπέδου όπου μελετήθηκαν οι περιοχές: Cg1, Cg3 (PrL, MO, VLO)



**Εικόνα 21:** Εικόνα του επιπέδου όπου μελετήθηκαν οι περιοχές CA1 και CA3 του ιπποκάμπου και οι περιοχές CeA και BLA της αμυγδαλής.

Στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκε η χρώση Golgi παρατηρήθηκαν και οι περιοχές μέσος (mOFC) και ο έξω κοιλιακός (VLOFC) κογχομετωπιαίος οι περιοχές CA1 και CA3 του ιπποκάμπου και οι περιοχές AOD και AOV στον οσφρητικό βολβό (εικόνα 22) και η έκταση του δενδριτικού πεδίου ανά νευρώνα προσδιορίστηκε με μέτρηση επιφάνειας (pixel) με το πρόγραμμα Scion Image.



**Εικόνα 22:** Εικόνα του επιπέδου όπου μελετήθηκαν οι περιοχές AOD και AOV του οσφρητικού βολβού μετά από χρώση Golgi.

Πιο αναλυτικά, οριοθετήθηκε στο πρόγραμμα μια συγκεκριμένη επιφάνεια και μετρήθηκαν τα pixels που κάλυπτε. Στη συνέχεια εκτιμήθηκαν από το πρόγραμμα τα pixels που κάλυπταν οι βαμμένες επιφάνειες καθώς και ο αριθμός των νευρικών σωμάτων που περιείχε. Τέλος, αφού εκτιμήθηκε ο λόγος σημασμένης/συνολικής επιφάνειας, διαιρέθηκε με τον αριθμό των νευρικών σωμάτων, με σκοπό να υπολογιστεί η έκταση του δενδριτικού πεδίου ανά νευρώνα.

### **3.6. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων**

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης, με ανεξάρτητη μεταβλητή την πειραματική ομάδα. Οι επιμέρους διαφορές προσδιορίστηκαν με post-hoc δοκιμασίες Least Square Differences (LSD).

## **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

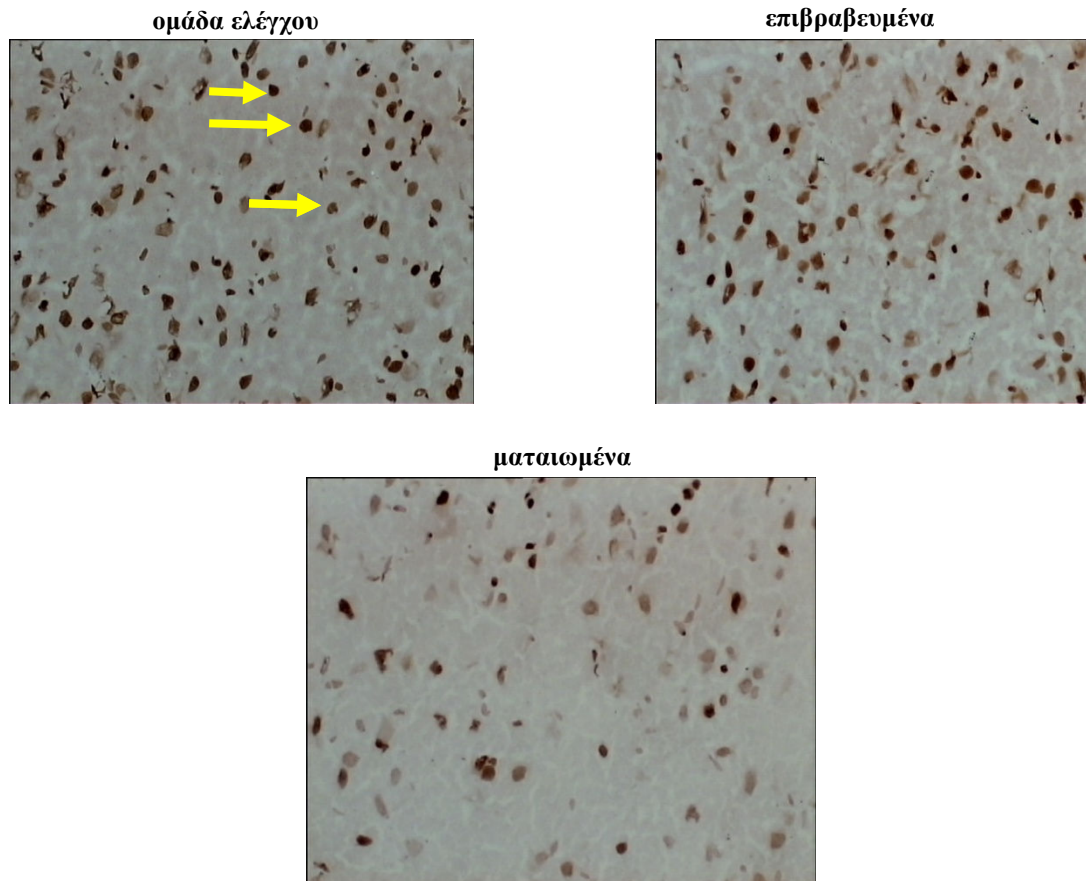
### **4.1. Ανοσοϊστοχημεία για τη φωσφοακετυλιωμένη ιστόνη 3 (P(Ser10)Ac(Lys14))**

Στα γραφήματα που ακολουθούν παρουσιάζονται οι αριθμοί των P(Ser10)Ac(Lys14) θετικών κυττάρων μετά τον ανοσοϊστοχημικό έλεγχο σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου των ενήλικων επίμυων και των τριών πειραματικών ομάδων, μετά την εκπαίδευσή τους υπό συνεχόμενη ματαίωση ή συνεχόμενη επιβράβευση κατά τη νεογνική ηλικία σε λαβύρινθο σχήματος T καθώς και ζώα μάρτυρες (ομάδα ελέγχου). Στη συνέχεια τα ζώα, ως ενήλικα, πραγματοποίησαν τη δοκιμασία μετατόπισης προσοχής (ASST). Μεταξύ του αριστερού και του δεξιού ημισφαιρίου του εγκεφάλου των επίμυων δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων, οπότε παρουσιάζεται ο μέσος όρος τους.

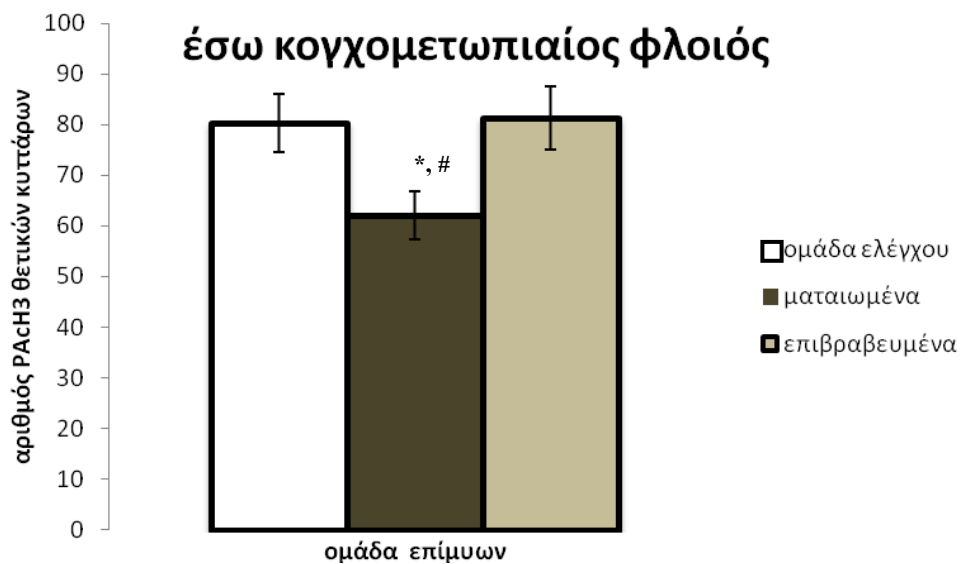
#### **4.1.1 Έσω κογχομετωπιαίος φλοιός (ΜΟ)**

Η ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης με ανεξάρτητη μεταβλητή την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για την φωσφοακετυλιωμένη ιστόνη 3 ( $p=0.037$ ) στον έσω κογχομετωπιαίο φλοιό. Πιο συγκεκριμένα, ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για την φωσφοακετυλιωμένη ιστόνη 3 ήταν μειωμένος στα ζώα που είχαν εκτεθεί ως νεογνά σε εκπαίδευση με συνεχόμενη ματαίωση σε σχέση με ζώα που είχαν εκτεθεί σε εκπαίδευση με επιβράβευση και με ζώα της ομάδας ελέγχου (post hoc,  $p=0.030$  «ματαιωμένα» vs. ομάδα ελέγχου,  $p=0.024$  «ματαιωμένα» vs. «επιβραβευμένα»).





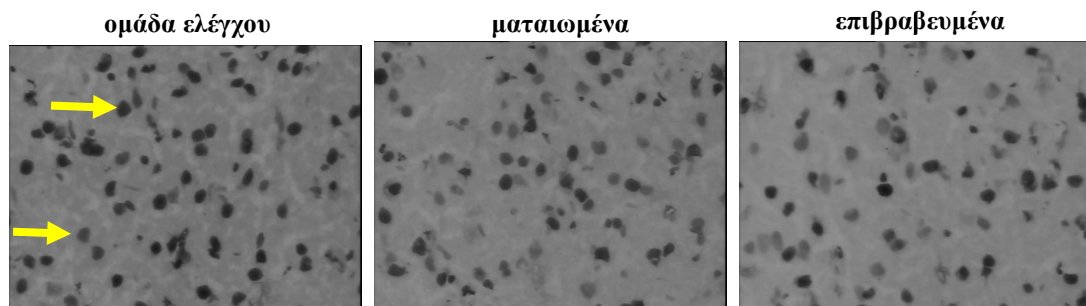
**Εικόνα 23:** Ανοσοθετικά κύτταρα για την φωσφοακετυλιωμένη ιστόνη H3 στον έσω κορχομετωπιαίο φλοιό



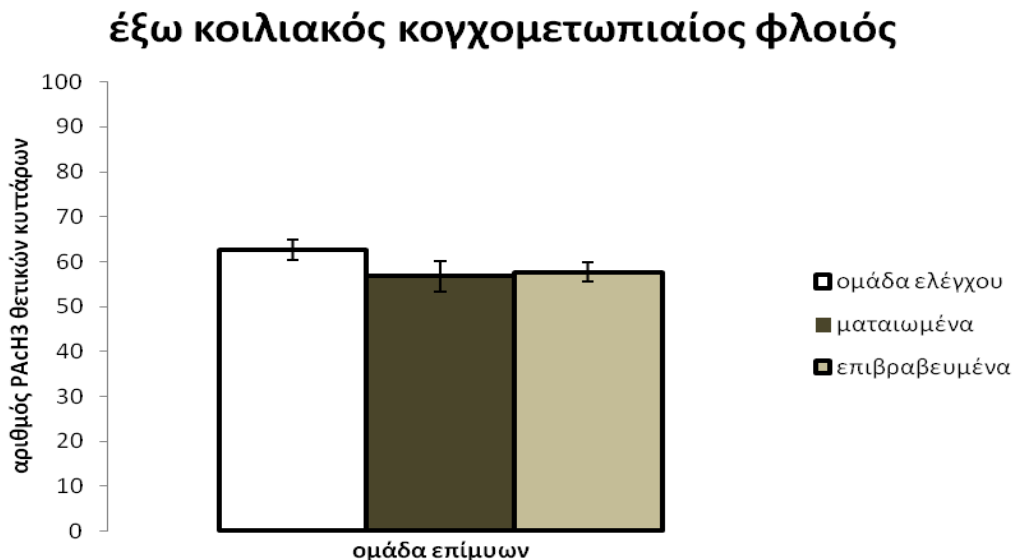
**Γράφημα 1:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στον έσω κορχομετωπιαίο φλοιό. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για την PAcH3 στον έσω κορχομετωπιαίο φλοιό ήταν μειωμένος στην ομάδα των «ματαιωμένων» ζώων σε σχέση με ζώα που ανήκουν στην ομάδα των «επιβραβευμένων» (post hoc #,  $p=0.024$ ), καθώς και σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (post hoc \*,  $p=0.030$ ).

#### 4.1.2 Έξω κοιλιακός κογχομετωπιαίος φλοιός (VLO)

Η ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης με ανεξάρτητη μεταβλητή την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για την φωσφοακετυλιωμένη ιστόνη 3 στον έξω κοιλιακό κογχομετωπιαίο φλοιό. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για την φωσφοακετυλιωμένη ιστόνη 3 τόσο σε νεογνικά «ματαιωμένα» ζώα, όσο και σε «επιβραβευμένα» δεν διέφερε στατιστικά σε σχέση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου.



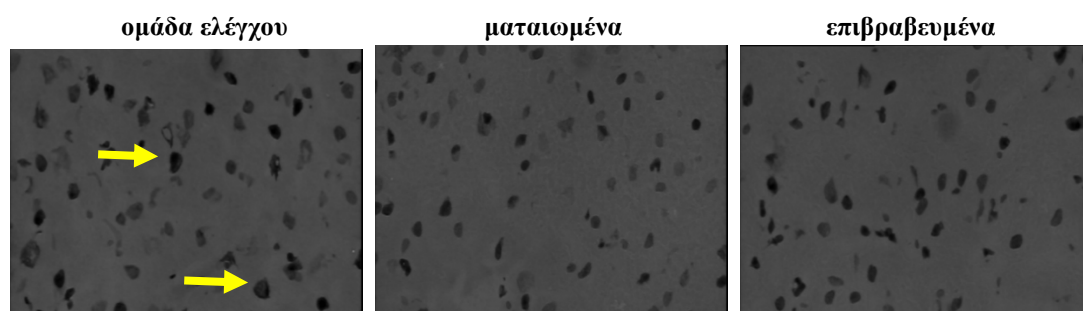
**Εικόνα 24:** Ανοσοθετικά κύτταρα για την φωσφοακετυλιωμένη ιστόνη H3 στον έξω κοιλιακό κογχομετωπιαίο φλοιό



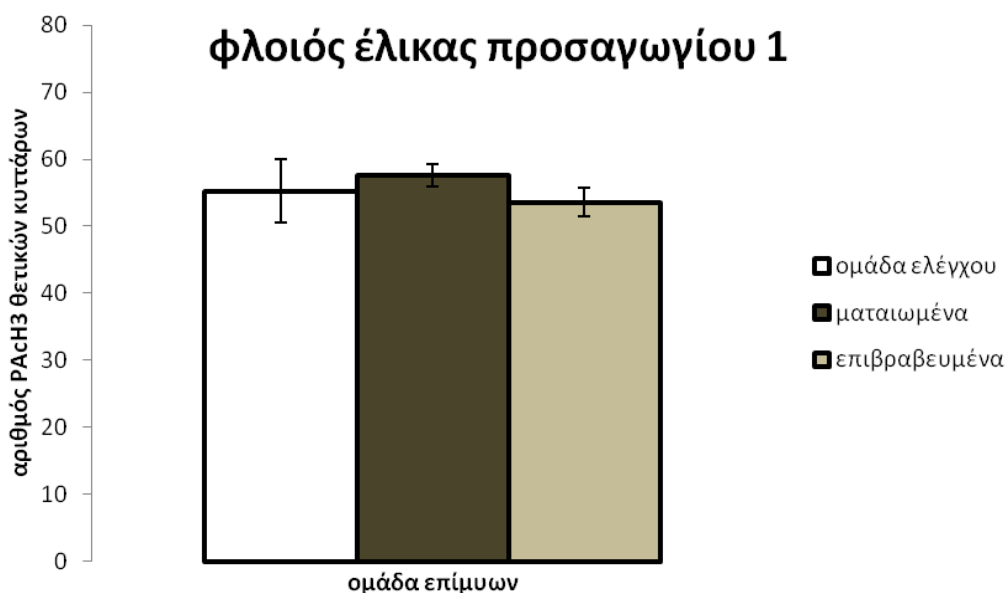
**Γράφημα 2:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στον έξω κοιλιακό κογχομετωπιαίο φλοιό. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM.

### 4.1.3 Φλοιός έλικας προσαγωγίου, περιοχές 1 & 3 (Cg1 & Cg3-PrL)

Η ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης με ανεξάρτητη μεταβλητή την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών ομάδων στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για την φωσφοακετυλιωμένη ιστόνη 3 στην περιοχή 1 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου (Cg1).



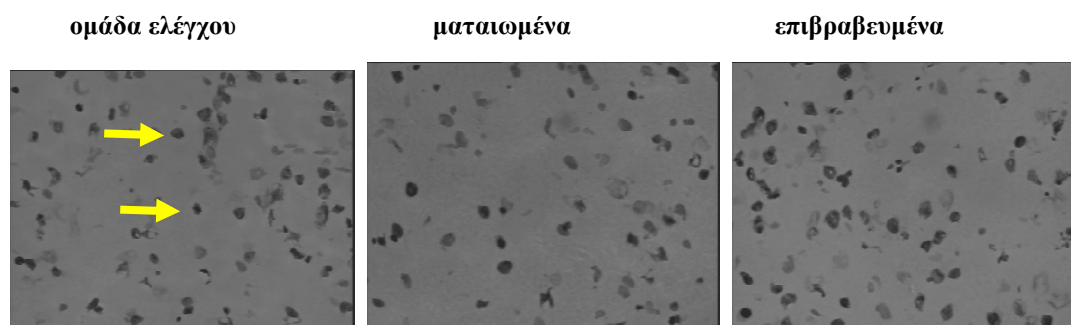
**Εικόνα 25:** Ανοσοθετικά κύτταρα για την PAcH3 στην περιοχή 1 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου



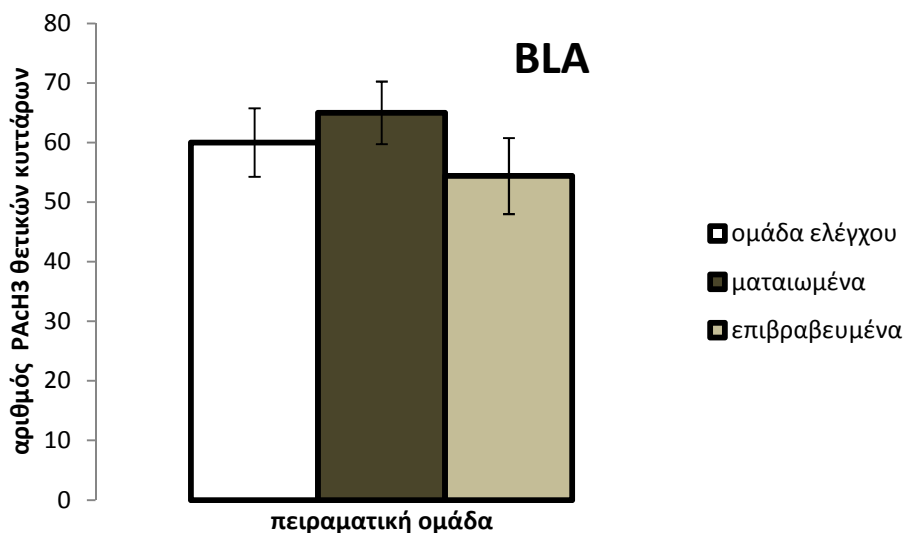
**Γράφημα 3:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή 1 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM



Αντίθετα η ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης με ανεξάρτητη μεταβλητή την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για την φωσφοακετυλιωμένη ιστόνη H3 στην περιοχή 3 (Cg3) ( $p=0.022$ ). Πιο συγκεκριμένα, ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τη φωσφοακετυλιωμένη ιστόνη 3 ήταν μειωμένος τόσο στα ζώα που είχαν εκτεθεί ως νεογνά σε εκπαίδευση με συνεχόμενη ματαίωση όσο και στα επιβραβευμένα ζώα σε σχέση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου (*post hoc*,  $p=0.041$  ομάδα ελέγχου vs "ματαιωμένα",  $p=0.007$  ομάδα ελέγχου vs "επιβραβευμένα")



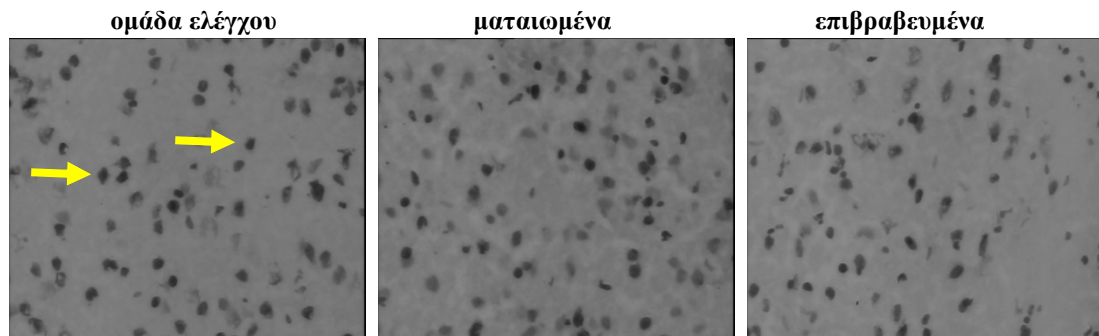
**Εικόνα 26:** Ανοσοθετικά κύτταρα για την PAcH3 στην περιοχή 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου



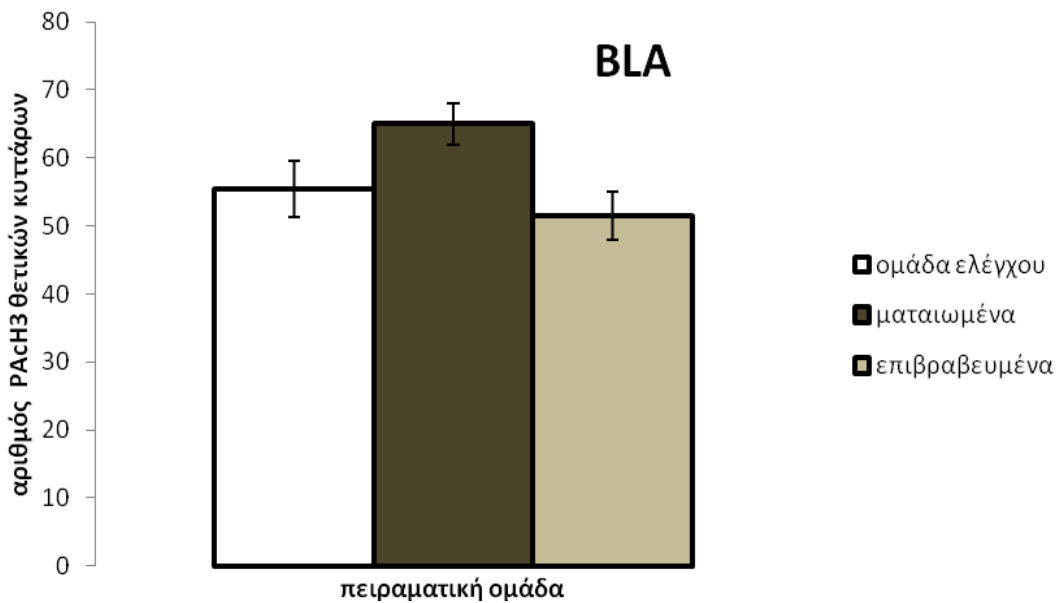
**Γράφημα 4:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στη περιοχή 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για την PAcH3 στη Cg3 ήταν μειωμένος τόσο στην ομάδα των "ματαιωμένων" ζώων (*post hoc* \*,  $p=0.041$ ) όσο και των "επιβραβευμένων" (*post hoc* + ,  $p=0.007$ ) σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου.

#### 4.1.4 Αμυγδαλή - περιοχές BLA & CeA

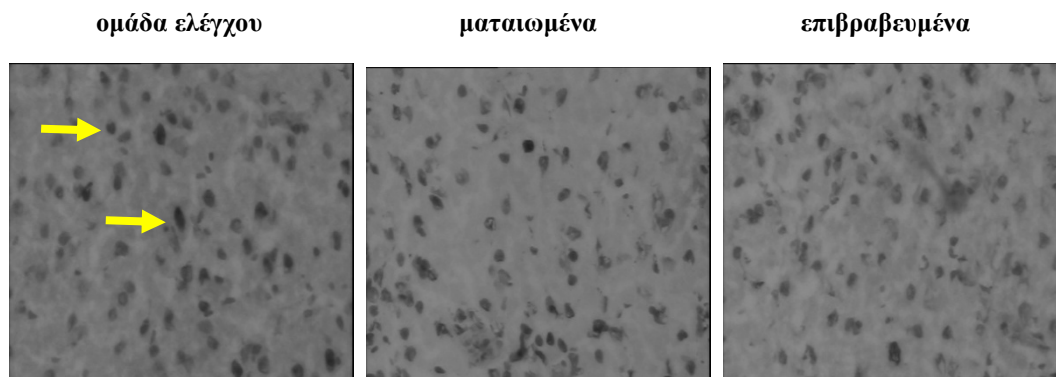
Η ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης με ανεξάρτητη μεταβλητή την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών ομάδων στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τη φωσφοακετυλιωμένη ιστόνη 3 στις περιοχές BLA και CeA της αμυγδαλής.



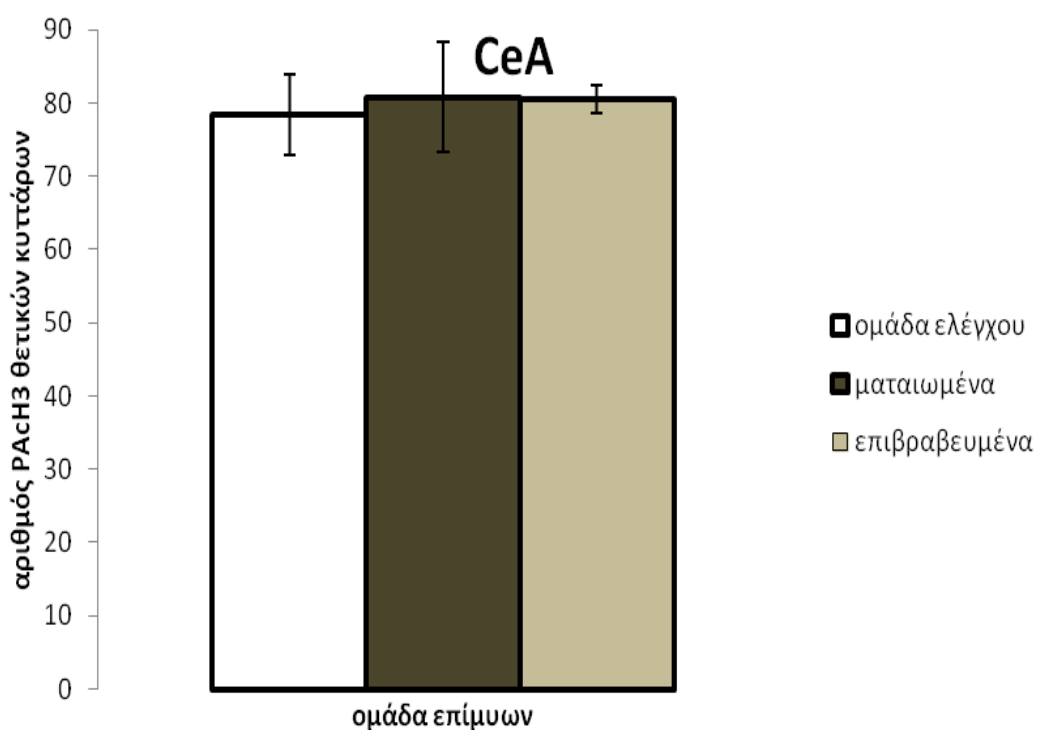
Εικόνα 27: Ανοσοθετικά κύτταρα για την PAcH3 στην περιοχή BLA της αμυγδαλής



Γράφημα 5: Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή BLA της αμυγδαλής. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM



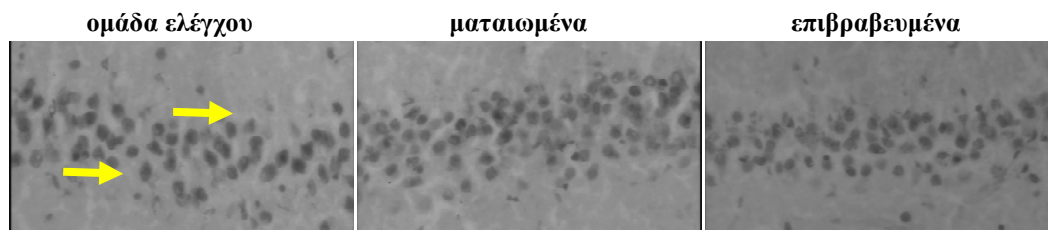
**Εικόνα 28:** Ανοσοθετικά κύτταρα για την PAcH3 στην περιοχή CeA της αμυγδαλής



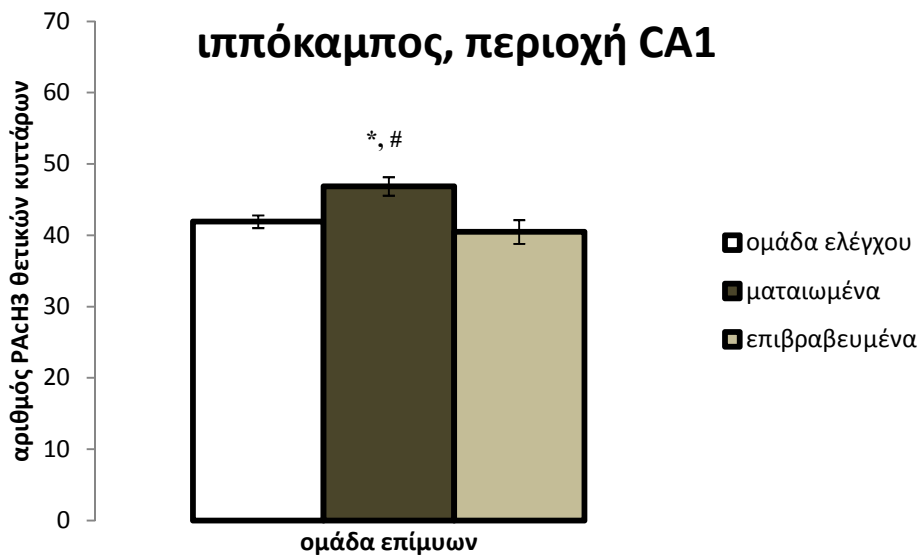
**Γράφημα 6:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή CeA της αμυγδαλής. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM

#### 4.1.5 Ιππόκαμπος - περιοχές CA1 & CA3

Η ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης με ανεξάρτητη μεταβλητή την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για την φωσφοακετυλιωμένη ιστόνη H3 στην περιοχή CA1 του ιππόκαμπου ( $p=0.019$ ). Πιο συγκεκριμένα, ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τη φωσφοακετυλιωμένη ιστόνη 3 ήταν αυξημένος στα ζώα που είχαν εκτεθεί ως νεογνά σε εκπαίδευση με συνεχόμενη "ματαίωση" τόσο σε σχέση με τα "επιβραβευμένα" ζώα όσο και με τα ζώα της ομάδας ελέγχου (post hoc,  $p=0.027$  "ματαιωμένα" vs ομάδα ελέγχου,  $p=0.008$  "ματαιωμένα" vs "επιβραβευμένα")

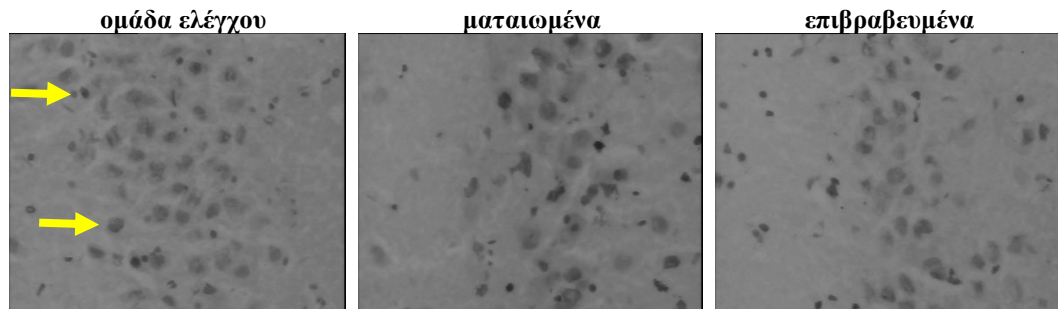


Εικόνα 29: Ανοσοθετικά κύτταρα για την PAcH3 στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου

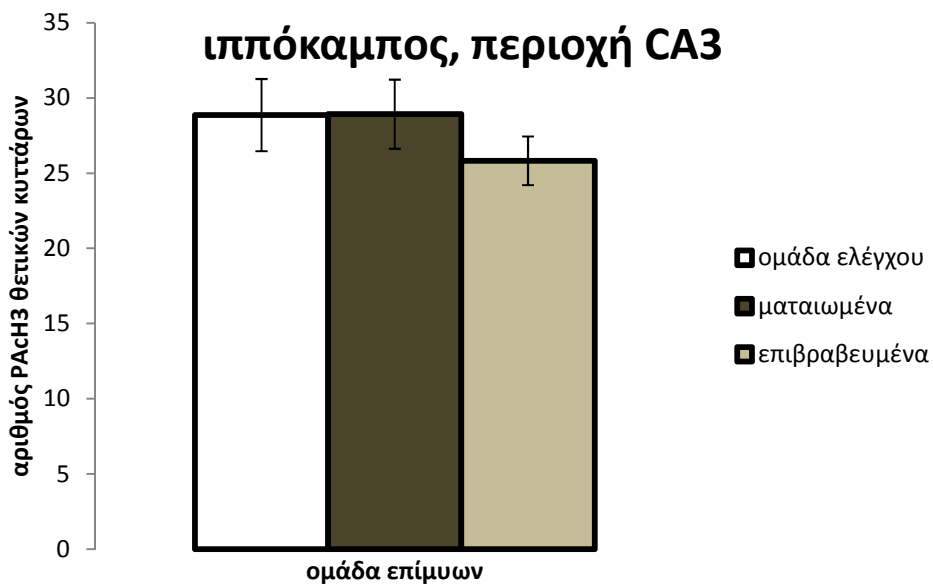


Γράφημα 7: Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στη CA 1 περιοχή του ιππόκαμπου. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για την PAcH3 στη CA1 ήταν αυξημένος στην ομάδα των "ματαιωμένων" ζώων σε σχέση με ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (post hoc \*,  $p=0.027$ ), καθώς και σε σχέση με τα "επιβραβευμένα" (post hoc #,  $p=0.007$ ).

Η ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης με ανεξάρτητη μεταβλητή την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών ομάδων στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για την φωσφοακετυλιωμένη ιστόνη 3 στην περιοχή CA3 του ιππόκαμπτου.



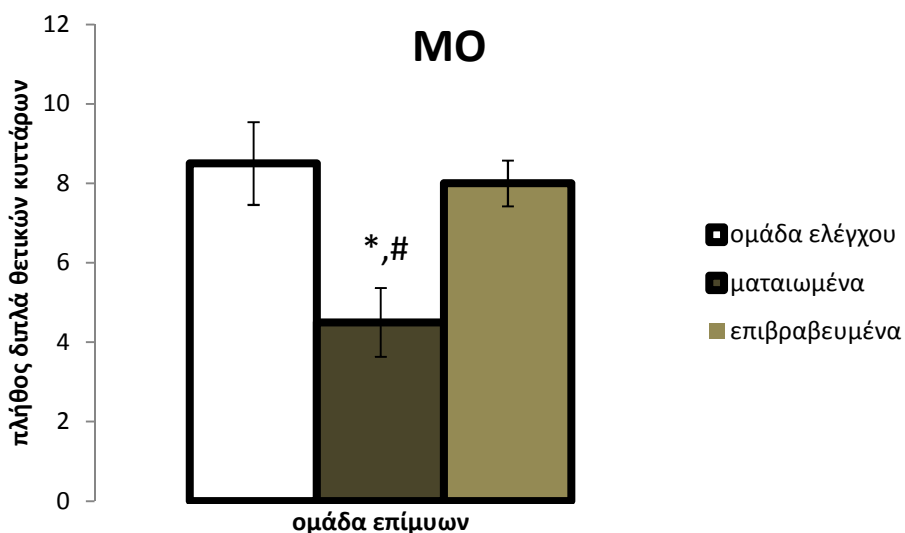
**Εικόνα 30:** Ανοσοθετικά κύτταρα για την PAcH3 στην περιοχή CA3 του ιππόκαμπτου



**Γράφημα 8:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή CA3 του ιππόκαμπτου. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM

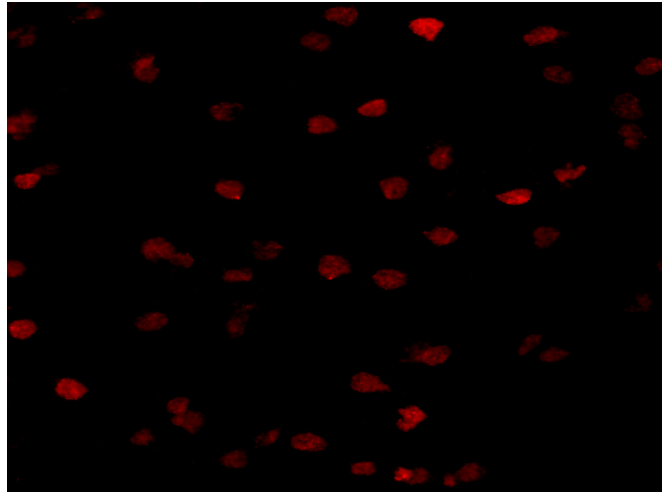
## 4.2 Διπλός ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της φωσφοακετυλιωμένης ιστόνης H3 (PAcH3) και του c-Fos με αντισώματα σημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές

Ο συνεντοπισμός PAcH3 και c-Fos πραγματοποιήθηκε στον προμετωπιαίο φλοιό ζώων και των τριών πειραματικών ομάδων που είχαν εκτεθεί σε μια συμπεριφορική δοκιμασία (ASST) που ενεργοποιεί δομές του προμετωπιαίου. Τα αντισώματα c-Fos και P(Ser10)-Ac(Lys14) σημάνθηκαν με ειδικές χρωστικές προκειμένου οι σημασμένες με αυτά τομές (διπλή σήμανση), να παρατηρηθούν σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού. Κάθε αντίσωμα σημάνθηκε με διαφορετική χρωστική, κάθε μία με απορρόφηση σε διαφορετικό μήκος κύματος. Συγκεκριμένα, το αντίσωμα αντι- P(Ser10)-Ac(Lys14) σημάνθηκε με χρωστική που εκπέμπει στα 555 nm και δίνει σήμα κόκκινου χρώματος (εικόνα 39), ενώ το αντίσωμα αντι-c-Fos σημάνθηκε με χρωστική που εκπέμπει στα 488 nm δίνοντας σήμα πράσινου χρώματος (εικόνα 10).

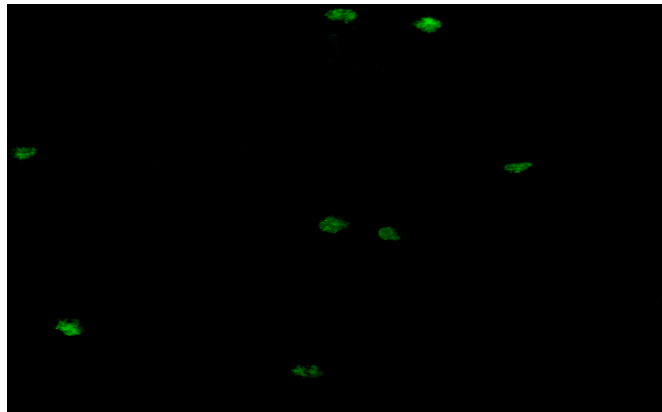


**Γράφημα 9:** Ο αριθμός των διπλά θετικών κυττάρων για τον παράγοντα c-Fos και την φωσφοακετυλιωμένη ιστόνη 3.

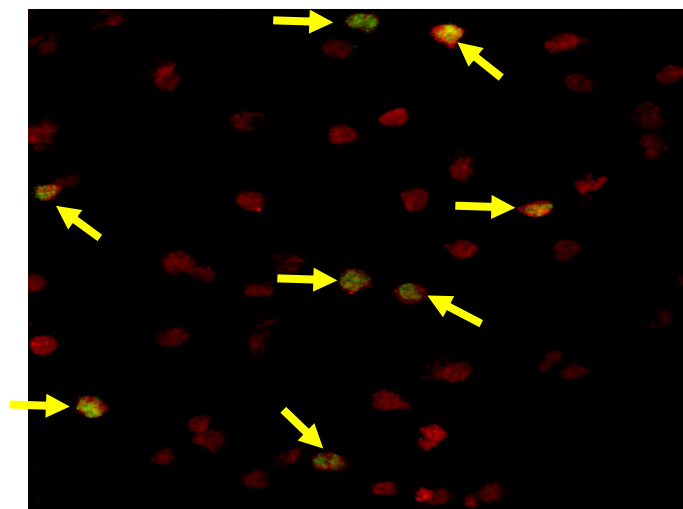
Σε όλες τις πειραματικές ομάδες εντοπίστηκε στον προμετωπιαίο φλοιό σημαντικός αριθμός κυττάρων ανοσοθετικών για την PAcH3 ενώ ένας αρκετά μικρότερος αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων για τη c-Fos. Αυτό που είναι αξιοσημείωτο, ωστόσο, είναι πως όσα κύτταρα ήταν ενεργοποιημένα από τη συμπεριφορική δοκιμασία (ASST), όπως φαίνεται από την ανίχνευση του νευρωνικού δείκτη c-Fos, ήταν ταυτοχρόνως και γονιδιακώς ενεργά, όπως φαίνεται από την εντόπιση της PAcH3 (εικόνα 11). Ο αριθμός των διπλά θετικών κυττάρων ήταν μικρότερος στην ομάδα των ματαιωμένων ζώων σε σχέση τόσο με τα επιβραβευμένα όσο και με τα ζώα μάρτυρες όπως έδειξε η ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης με ανεξάρτητη μεταβλητή την πειραματική ομάδα ( $p=0.024$ , post hoc,  $p=0.011$  "ματαιωμένα" vs ομάδα ελέγχου,  $p=0.029$  "ματαιωμένα" vs "επιβραβευμένα") (Γράφημα 9).



**Εικόνα 9:** Εικόνα από συνεστιακό μικροσκόπιο έσω κοιλιακού (ΜΟ) προμετωπιαίου φλοιού σημασμένου με αντίσωμα για την PACH3 (κόκκινο).



**Εικόνα 10:** Εικόνα από συνεστιακό μικροσκόπιο έσω κοιλιακού (ΜΟ) προμετωπιαίου φλοιού σημασμένου με αντίσωμα για τον c-Fos (πράσινο).



**Εικόνα 11:** Συνεντοπισμός των πρωτεϊνών PACH3 και c-Fos σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Το αποτέλεσμα του συνεντοπισμού τους φαίνεται με το χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα.

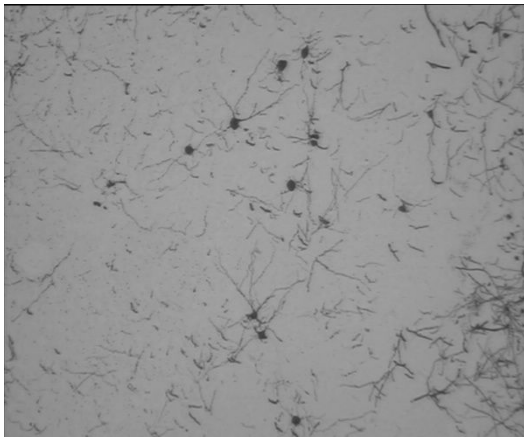


### 4.3. Κυτταροαρχιτεκτονική οργάνωση νευρώνων μετά από χρώση Golgi

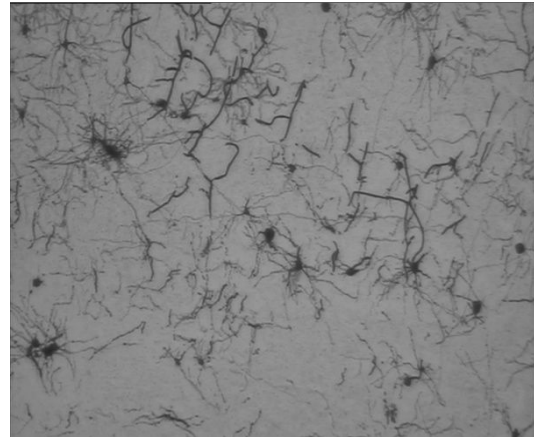
#### 4.3.1 Έσω κογχομετωπιαίος φλοιός (ΜΟ)

Η ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης με ανεξάρτητη μεταβλητή την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας στην έκταση του δενδριτικού πεδίου ανά νευρώνα στην περιοχή του έσω κογχομετωπιαίου φλοιού. Πιο συγκεκριμένα, η έκταση του δενδριτικού πεδίου ανά νευρώνα ήταν μεγαλύτερη στα "ματαιωμένα" ζώα σε σχέση με τα ζώα ελέγχου ( $p=0.05$ ). Αξίζει να σημειωθεί, ότι η συγκεκριμένη κοόρτη επίμυων διέφερα από την προηγούμενη καθώς τα ζώα αυτά δεν πραγματοποίησαν ως ενήλικα τη δοκιμασία μετατόπισης του κανόνα (ASST) παρά μόνο εκπαιδεύτηκαν ως νεογνά στο λαβύρινθο σχήματος T, με την ίδιο τρόπο που περιγράφηκε και παραπάνω.

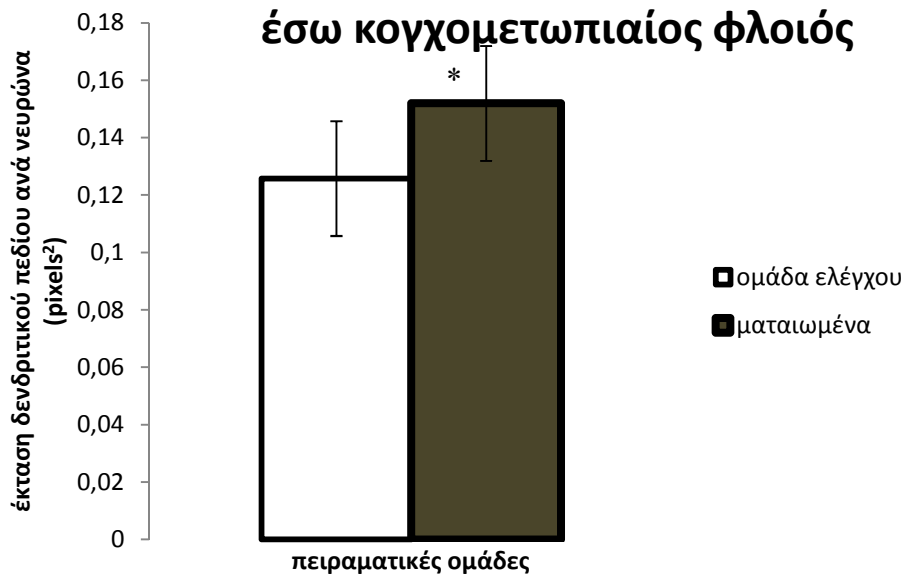
ομάδα ελέγχου



ματαιωμένα



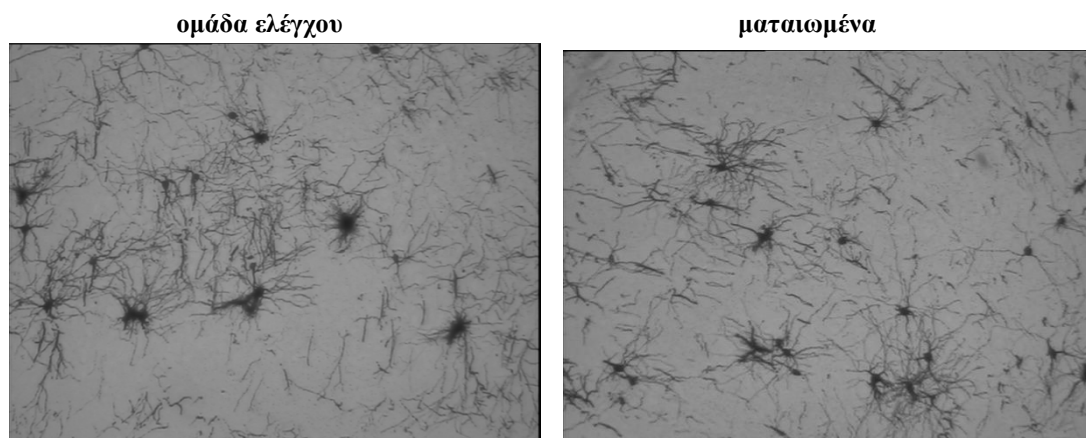
**Εικόνα 12:** Κύτταρα στον έσω κογχομετωπιαίο φλοιό μετά από χρώση Golgi



**Γράφημα 10:** Έκταση δενδριτικού πεδίου ανά νευρώνα στον έσω κογχομετωπιαίο φλοιό, μετά από χρώση Golgi. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο της έκτασης του δενδριτικού πεδίου για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM. Η έκταση του δενδριτικού πεδίου ήταν αυξημένη στην ομάδα των "ματαιωμένων" ζώων σε σχέση με ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (\*  $p=0.05$ ).

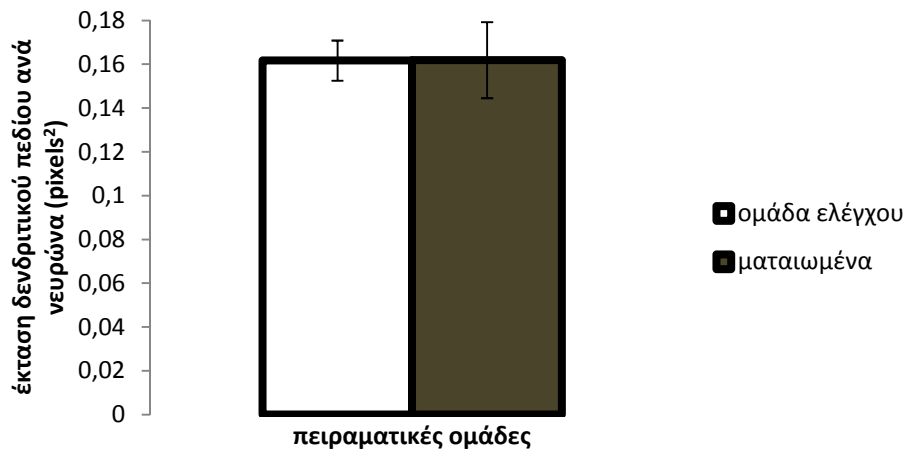
#### 4.3.2 Έξω κοιλιακός κογχομετωπιαίος φλοιός (VLO)

Η ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης με ανεξάρτητη μεταβλητή την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δενδριτικών πεδίων ανά νευρώνα των πειραματικών ομάδων στην περιοχή του έξω κοιλιακού κογχομετωπιαίου φλοιού.



**Εικόνα 13:** Κύτταρα στον έξω κοιλιακό κογχομετωπιαίο φλοιό μετά από χρώση Golgi

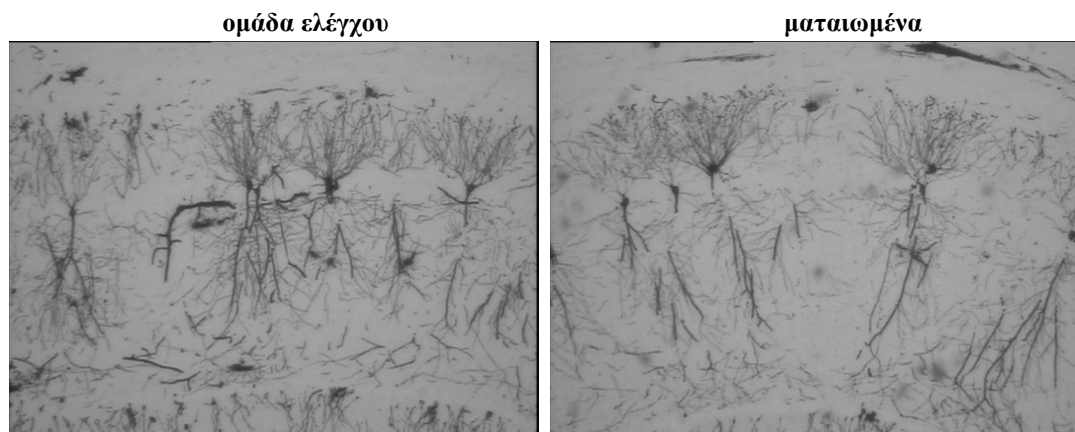
## έξω κογχομετωπιαίος φλοιός



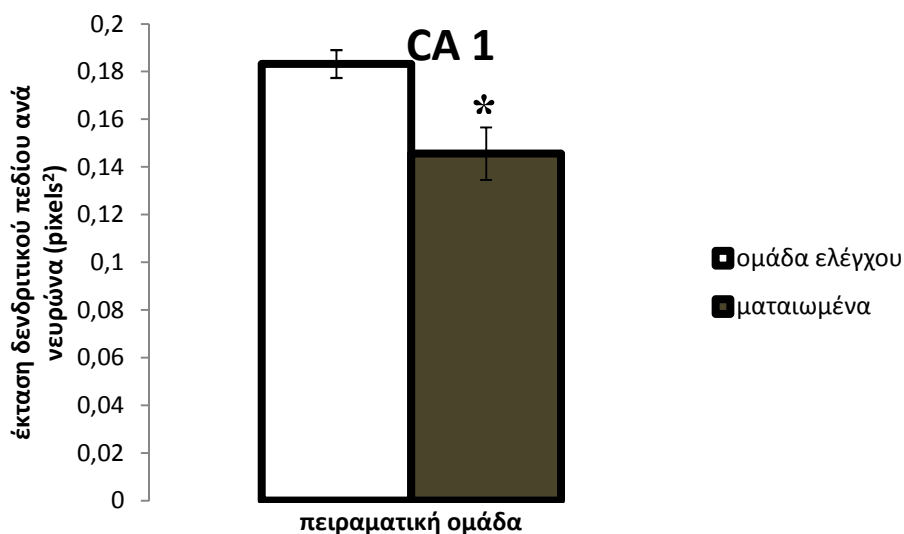
**Γράφημα 10:** Έκταση δενδριτικού πεδίου ανά νευρώνα στον έξω κογχομετωπιαίο φλοιό, μετά από χρώση Golgi. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο της έκτασης του δενδριτικού πεδίου για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM.

### 4.3.3. Ιππόκαμπος - περιοχές CA1 & CA3

Η ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης με ανεξάρτητη μεταβλητή την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας στην έκταση του δενδριτικού πεδίου ανά νευρώνα στην περιοχή CA1 του ιππόκαμπου. Πιο συγκεκριμένα, η έκταση του βαμμένου δενδριτικού πεδίου ανά νευρώνα ήταν μικρότερη στα "ματαιωμένα" ζώα σε σχέση με τα ζώα ελέγχου ( $p=0.039$ ).

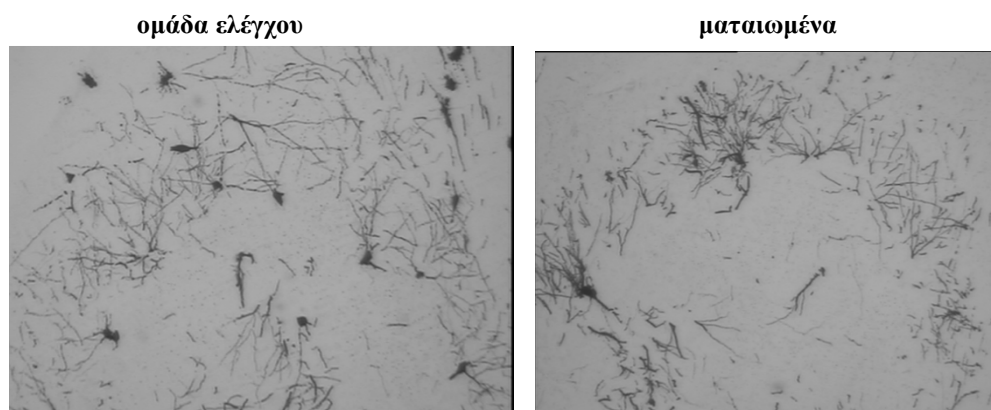


**Εικόνα 14:** Κύτταρα στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου, μετά από χρώση Golgi

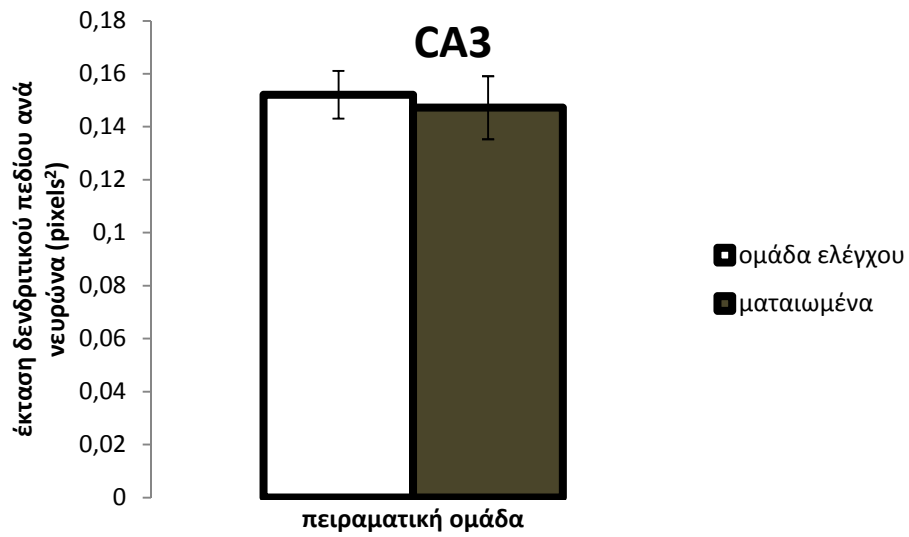


**Γράφημα 12:** Έκταση δενδριτικού πεδίου ανά νευρώνα στην περιοχή **CA1** του ιπποκάμπτου, μετά από χρώση Golgi. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο της έκτασης του δενδριτικού πεδίου για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM. Η έκταση του δενδριτικού πεδίου ήταν ελαττωμένη στην ομάδα των "ματαιωμένων" ζώων σε σχέση με ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (\*  $p=0.039$ ).

Η ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης με ανεξάρτητη μεταβλητή την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δενδριτικών πεδίων ανά νευρώνα των πειραματικών ομάδων στην περιοχή CA3 του ιπποκάμπτου.



**Εικόνα 15:** Κύτταρα στην περιοχή **CA3** του ιπποκάμπτου, μετά από χρώση Golgi



**Γράφημα 13:** Έκταση δενδριτικού πεδίου ανά νευρώνα στην περιοχή **CA3** του ιππόκαμπου, μετά από χρώση Golgi. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο της έκτασης του δενδριτικού πεδίου για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι κοινώς αποδεκτό πλέον, και υποστηρίζεται από ένα μεγάλο εύρος ερευνών ότι η έκθεση στο στρες στα αρχικά στάδια της ζωής, τόσο προγεννητικά (Glover et al 1997) όσο και μεταγεννητικά (Pollak et al 2010), μπορεί να επιδράσει στις συναισθηματικές και γνωστικές ικανότητες του ατόμου κατά την ενήλικη ζωή (Lurien et al 2009). Όπως έχει φανεί από αρκετές μελέτες σε επίμους, οι αλλαγές αυτές μπορούν, επίσης, να επηρεάσουν και να μεταβάλλουν τον προγραμματισμό των νευροενδοκρινικών και νευροανοσολογικών συστημάτων των ζώων, όπως για παράδειγμα τον άξονα ΥΥΕ (υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων) (Meagher et al 2010). Οι αλλαγές αυτές μπορεί να υφίστανται κατά τις πρώτες μέρες ζωής, διατηρούνται ωστόσο και εκδηλώνονται και κατά την ενήλικη ζωή των ζώων (Craft et al 2006). Έτσι, υπάρχει ένα τεράστιο ενδιαφέρον για τη μελέτη της επίδρασης των πρώιμων εμπειριών στο εγκέφαλο των νεαρών επίμυσων αλλά και των μηχανισμών που συμμετέχουν για την διατήρηση αυτών των αλλαγών στην ενήλικη ζωή τους, και κατά πόσο αυτά τα ευρήματα μπορούν να συσχετιστούν και με την ανθρώπινη φυσιολογία και συμπεριφορά.

Με γνώμονα τη μελέτη των εμπειριών που μπορεί να βιώσει ένας επίμυς και πώς αυτές επιδρούν στην φυσιολογία του εγκεφάλου του, έχει χρησιμοποιηθεί μια σειρά μοντέλων ανάλογα με το ερώτημα που τίθεται στην εκάστοτε μελέτη. Στην παρούσα εργασία, στόχος ήταν η μελέτη των επιγενετικών τροποποιήσεων στον εγκέφαλο ενήλικων επίμυσων μετά από μια εμπειρία ήπιου στρες που βίωσαν τα ζώα αυτά σε νεογνική ηλικία. Για την επίτευξη του παραπάνω στόχου πραγματοποιήθηκε η εκπαίδευση των νεαρών επίμυσων σε λαβύρινθο σχήματος "T". Η εκπαίδευση σε λαβύρινθο σχήματος «T» (Panagiotaropoulos et al., 2009), αν και αναπτύχθηκε με αρχικό στόχο τον έλεγχο της χωρικής μάθησης στους επίμους, στην παρούσα μελέτη θα μπορούσε η δοκιμασία αυτή να ειδωθεί ως ένα ήπιο στρες κατά την πρώιμη ηλικία. Τη μία πειραματική ομάδα που εκπαιδεύτηκε υπό συνεχόμενη ενίσχυση, μπορούμε να την προσεγγίσουμε ως νεογνά τα οποία εκτέθηκαν σε ήπιο στρες και έπειτα έλαβαν μητρική φροντίδα η οποία έδρασε

επανορθωτικά, ενώ η άλλη πειραματική ομάδα, που εκπαιδεύτηκε υπό συνεχόμενη ματαίωση, εκτέθηκε στο ίδιο ήπιο στρες, μόνο που δεν έλαβε την «προσδοκώμενη» φροντίδα, γεγονός που μπορεί να θεωρηθεί ως επιπλέον στρες (Panagiotaropoulos et al., 2009).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στη νεογνική ηλικία η επαφή με τη μητέρα κατέχει εξέχουσα σημασία για την επιβίωση και την ομαλή ανάπτυξη του εγκεφάλου του οργανισμού και συγκαταλέγεται σε αυτή την ομάδα των ερεθισμάτων ανταμοιβής που καλούνται πρωτογενείς ενισχυτές (Rolls 2004). Έτσι, η όλη εμπειρία επαφής με τη μητέρα ή αποστέρησής της προκαλεί τη γέννηση συναισθηματικών αποκρίσεων από τα νεογνά. Σύμφωνα με αυτό, τα συναισθήματα μπορούν να προσδιοριστούν ως αποκρίσεις που προκαλούνται από την επίδραση ερεθισμάτων ανταμοιβής ή τιμωρίας. Η απογοήτευση (ή ματαίωση), ο θυμός ή η λύπη μπορεί να προκύψουν από την παράλειψη μιας αναμενόμενης ανταμοιβής ή τον τερματισμό μιας ανταμοιβής (Rolls 2000). Η γαλουχία και η μητρική φροντίδα (licking and grooming) παρέχει θετικά, ενισχυτικά ερεθίσματα, ενώ η άρνηση της μητρικής επαφής επιδρά ως αρνητικό, ματαιωτικό ερέθισμα (Li et al 1992).

Τα αποτελέσματα ερευνών του εργαστηρίου μας που αφορούν τη συμπεριφορά των νεογνών κατά την εκπαίδευσή τους στο λαβύρινθο σχήματος T, κατά τις μεταγεννητικές ημέρες 10-13, δείχνουν ότι ναι μεν τα νεογνά της πειραματικής ομάδας που έχουν εκπαιδευθεί υπό συνεχόμενη μη ενίσχυση (**ματαιωμένα**) μαθαίνουν τη διαδρομή προσέγγισης της μητέρας, βελτιώνοντας το χρόνο εύρεσης της εισόδου του κλουβιού της από μέρα σε μέρα, όμως αυτή η μάθηση είναι λιγότερο αποτελεσματική σε σχέση με τα ζώα που έχουν εκπαιδευθεί υπό συνεχόμενη ενίσχυση (**επιβραβευμένα**). Έτσι, παρόλο που δεν ενισχύονται, τα ζώα υπό συνεχόμενη μη ενίσχυση, καταφέρνουν να μάθουν τη θέση της μητέρας, κάτι όμως που δε φαίνεται να μπορούν να εκφράσουν κατά τη δοκιμασία της μνήμης (Panagiotaropoulos 2009). Στη συνέχεια, τα ζώα αυτά, ως ενήλικα, πραγματοποίησαν τη Δοκιμασία Μετατόπισης Προσοχής (Attentional Set-Shifting Task- ASST). Η δοκιμασία αυτή είναι το ανάλογο της Δοκιμασίας Ταξινόμησης Καρτών του Wisconsin (WCST, Demakis 2003) σε ανθρώπους που ως γνωστόν χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση των γνωστικών ελλειμμάτων που συνδέονται με δυσλειτουργίες του προμετωπιαίου φλοιού. Στη δοκιμασία αυτή

τα ζώα που είχαν υποστεί ως νεογνά την εκπαίδευση υπό ματαίωση, εμφάνισαν ελλείμματα (αδυναμία αλλαγής κανόνα/στρατηγικής στην επίλυση προβλημάτων) (Stamatakis et al 2011) ενδεικτικά δυσλειτουργίας του προμετωπιαίου φλοιού και ειδικά του Έσω Κογχομετωπιαίου τμήματός του. Επιπλέον, κατά τη δοκιμασία ASST τα ζώα που είχαν εκπαιδευτεί υπό ματαίωση, εμφάνισαν μειωμένη ενεργοποίηση ειδικά αυτού του τμήματος του προμετωπιαίου, όπως φαίνεται από τη μειωμένη έκφραση του δείκτη νευρωνικής ενεργότητας c-Fos. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η πρώιμη εμπειρία που βίωσαν τα πειραματόζωα ως νεογνά μπορούσε να επηρεάσει τη λειτουργία συγκεκριμένων περιοχών του εγκεφάλου τους καθώς και την απόδοση τους σε δοκιμασία που ελέγχεται από αυτές τις εγκεφαλικές δομές. (Stamatakis et al., 2011).

Παράλληλα, πλήθος μελετών στον τομέα της νευροβιολογίας αναδεικνύουν τη συμμετοχή επιγενετικών τροποποιήσεων ως την οδό με την οποία "αποτυπώνονται" οι πρώιμες εμπειρίες αλλά και γενικά οι επιδράσεις του περιβάλλοντος στον εγκέφαλο, επηρεάζοντας δομικές και λειτουργικές διαδικασίες του (Roth et al 2010). Οι τροποποιήσεις αυτές, είτε συμβαίνουν στο ίδιο το γενετικό υλικό είτε στις ιστόνες του νουκλεοσώματος, και έχουν ως αποτέλεσμα την αλλαγή της γονιδιακής μεταγραφής, μια αλλαγή που στο πλείστο των περιπτώσεων καθιερώνεται για όλη την ενήλικη ζωή (Weaver 2007). Η απόκριση των ενήλικων αρουραίων στο στρες, για παράδειγμα, προγραμματίζεται στα πρώτα στάδια της ζωής τους και επηρεάζεται από το είδος της μητρικής φροντίδας, καθώς αυτή μπορεί να προκαλεί επιγενετικές τροποποιήσεις (μεθυλίωση) στον υποκινητή του γονιδίου του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (Weaver et al 2005). Ως τροποποίηση, η μεθυλίωση, επιφέρει συνήθως ένα ανασταλτικό αποτέλεσμα, καθώς οδηγεί στην απενεργοποίηση του εκάστοτε γονιδίου (Wilson et al 1987). Αξιοσημείωτο είναι, ωστόσο, πως αυτές οι αλλαγές είναι αναστρέψιμες με την χορήγηση κατάλληλων χημικών ουσιών (Weaver et al 2005). Αντίθετα, η αυξημένη μητρική φροντίδα οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) μέσω ακετυλίωσης ιστονών και απομεθυλίωσης του DNA (Weaver 2007).

Προκειμένου λοιπόν να μελετηθεί η εμπλοκή των επιγενετικών τροποποιήσεων στις επιπτώσεις των πρώιμων εμπειριών του μοντέλου μας



στη λειτουργία του προμετωπιαίου φλοιού και εν γένει του εγκεφάλου, επιλέχθηκε να μελετηθεί ανοσοϊστοχημικά η εντόπιση και τα επίπεδα της φωσφοακετυλιωμένης ιστόνης H3 (PAc-H3). Η επιλογή της συγκεκριμένης τροποποίησης δεν ήταν τυχαία. Αντίθετα, έχει καταγραφεί από αρκετές μελέτες ότι η διπλή αυτή τροποποίηση της ιστόνης H3 είναι απαραίτητη για το "άνοιγμα" της χρωματίνης και τη γονιδιακή ενεργοποίηση (Chandramohan et al 2007, Macdonald et al 2005 και Winter et al 2008). Ακόμα, έχει αναφερθεί ότι η φωσφοακετυλίωση της ιστόνης H3 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του νευρωνικού δείκτη c-Fos (Chandramohan et al 2007). Το γονίδιο c-fos είναι ένα άμεσα επαγόμενο γονίδιο το οποίο εκφράζεται από τους νευρώνες ως αποτέλεσμα της διέγερσής τους (Sagar et al 1988). Η έκφραση του γονιδίου c-fos αποτελεί τον πιο συχνά χρησιμοποιούμενο δείκτη λειτουργικής ανατομίας των ενεργοποιημένων νευρώνων στο κεντρικό νευρικό σύστημα και χρησιμοποιείται από πολύ παλιά ως δείκτης νευρικής λειτουργίας. Εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα ή καθόλου στον εγκέφαλο σε συνθήκες ηρεμίας, ενώ εκφράζεται σταθερά ως απάντηση σε ένα εύρος εξωκυττάρων ερεθισμάτων, συμπεριλαμβανομένων νευροδιαβιβαστών, αυξητικών παραγόντων και διάφορων φαρμακοδραστικών ουσιών (Morgan et al 1987). Έπειτα από οποιονδήποτε ερεθισμό, το γονίδιο c-fos εκφράζεται ταχύτατα αλλά παροδικά στους νευρώνες, ενώ η πρωτεΐνη που παράγεται παραμένει στα υψηλότερα επίπεδα μεταξύ 60 και 120 λεπτών μετά τον ερεθισμό, ενώ παρατηρούνται υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης μέχρι και 2 με 5 ώρες μετά (Morgan et al 1987). Αυτά τα χαρακτηριστικά του c-fos το κάνουν έναν καλό και οικονομικό δείκτη ελέγχου της νευρωνικής δραστηριότητας των πειραματόζωνων έπειτα από την εκτέλεση διάφορων συμπεριφορικών δοκιμασιών, δεδομένου ότι η εντόπιση του δεν είναι ιδιαίτερα δύσκολη.

Προκειμένου, λοιπόν, να εξεταστεί αν υπάρχει μια αντιστοιχία ανάμεσα στη φωσφοακετυλιωμένη ιστόνη 3 και στην παρουσία του δείκτη c-Fos, πραγματοποιήθηκε, διπλός ανοσοφθορισμός για τους δύο αυτούς επιτόπους στον έσω κογχομετωπιαίο φλοιό ενήλικων επίμυων. Τα αποτελέσματα ήταν σαφή και αντίστοιχα με αυτά που έχουν αναφερθεί από τον Chandramohan και τους συνεργάτες του (Chandramohan et al 2007) όπου όταν αποτρεπόταν η φωσφοακετυλίωση της ιστόνης H3 δεν επαγόταν η ενεργοποίηση του γονιδίου c-fos, μετά από στρες. Στη δική μας μελέτη ο αριθμός των c-Fos

θετικών κυττάρων ήταν σαφώς μικρότερος σε σχέση με τα PAcH3 θετικά κύτταρα. Αυτό, όμως, που είναι σημαντικό είναι ο συνεντοπισμός που εμφανίζεται καθώς όσα κύτταρα είναι c-Fos θετικά είναι ταυτόχρονα PAcH3 θετικά ενισχύοντας τη θεώρηση πως η ενεργοποίηση του γονιδίου c-fos απαιτεί την "ανοιγμένη" χρωματίνη, και συγκεκριμένα την παρουσία της φωσφοακετυλίωσης της ιστόνης 3 (MacDonald et al 2003).

Είναι αξιοσημείωτο ότι τα επίπεδα της ίδιας της φωσφοακετυλιωμένης ιστόνης H3 ήταν διαφορετικά μεταξύ των πειραματικών μας ομάδων σε ορισμένες μόνο εγκεφαλικές δομές. Συγκεκριμένα, από τις περιοχές του προμετωπιαίου φλοιού που εξετάστηκαν εκεί που παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις τρεις κατηγορίες πειραματόζωων (ομάδα ελέγχου, "επιβραβευμένα" και "ματαιωμένα") είναι ο έσω κογχομετωπιαίος φλοιός (MO) και η περιοχή 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου-υπομεταιχμιακός φλοιός (IL). Στον MO φλοιό τα ζώα που είχαν υποστεί ως νεογνά τη ματαίωση εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα PAc-H3 ενώ στον IL τόσο τα ματαιωμένα όσο και τα επιβραβευμένα ζώα είχαν μειωμένη έκφραση PAc-H3 σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες. Τα ευρήματα αυτά είναι σε αντιστοιχία με τα επίπεδα έκφρασης του c-Fos τόσο στον MO –όπως ήδη αναφέρθηκε πιο πάνω- όσο και στον IL όπου κατά τη δοκιμασία ASST παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση του c-Fos τόσο στα ματαιωμένα όσο και στα επιβραβευμένα ως νεογνά ζώα, ενδεικτικό πιθανόν μειωμένων επιπέδων άγχους κατά τη δοκιμασία ASST σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες (Stamatakis et al., 2011). Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι «ματαιωμένοι» επίμυοι έχουν χαμηλότερα επίπεδα ντοπαμίνης στον προμετωπιαίο φλοιό σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου και «επιβραβευμένων», όπως έχει δειχθεί σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας (Stamatakis et al., 2011) και η ντοπαμίνη είναι ο κατεξοχήν νευροδιαβιβαστής ρύθμισης της λειτουργίας του προμετωπιαίου φλοιού (Everitt et al 2000).

Επιπλέον, ένα επίσης σημαντικό εύρημα, που ενισχύει τα παραπάνω αποτελέσματα, είναι ότι τα δενδριτικά πεδία στον έσω κογχομετωπιαίο φλοιό των «ματαιωμένων» επίμυων είναι παραμορφωμένα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Συγκεκριμένα, οι εικόνες που λαμβάνονται από τομές μετά από χρώση Golgi είναι πολύ χαρακτηριστικές, αφού στα ματαιωμένα ζώα εμφανίζεται πολύ μεγαλύτερη έκταση δενδριτικού πεδίου σε σχέση με τα ζώα

ελέγχου. Αντίστοιχα αποτελέσματα με αυξημένη πολυπλοκότητα δενδριτικών πεδίων στον προμετωπιαίο φλοιό έχουν αναφερθεί σε ζωικά μοντέλα εθισμού σε κοκαΐνη (Robinson et al., 2001) και υπερέκφρασης της πρωτεΐνης tau που έχει συσχετισθεί με νευροεκφυλιστικές παθήσεις όπως η νόσος Alzheimer (Dickstein et al., 2010). Επίσης, αντίστοιχα ευρήματα έχουν αναφερθεί σε μελέτες ατόμων με αυτισμό στα οποία η έκταση των δενδριτικών πεδίων των πυραμιδικών νευρώνων του φλοιού ήταν πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Hutsler et al. 2010). Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις εμφανίζεται, δηλαδή, μια εικόνα εγκεφαλικών περιοχών με πλήθος δενδριτικών δομών οι οποίες ωστόσο πιθανόν δεν είναι αποτελεσματικές στη δημιουργία λειτουργικών συνάψεων. Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι η έκταση των δενδριτικών πεδίων προσδιορίστηκε σε ζώα που είχαν βιώσει μόνο την εκπαίδευση στο λαβύρινθο σχήματος T και όχι τη δοκιμασία ASST.

Το γεγονός αυτό είναι σημαντικό καθώς μας επιτρέπει να εξάγουμε συμπεράσματα για το πώς επέδρασε στην έκταση του δενδριτικού πεδίου αυτή καθεαυτή η πρώιμη εμπειρία και όχι και οι μετέπειτα δοκιμασίες ως ενήλικα. Συνδυάζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, μπορούμε να βγάλουμε το συμπέρασμα, πως μια στρεσογόνος εμπειρία κατά τα αρχικά στάδια της ζωής, η οποία δεν ακολουθείται ή δεν «επανορθώνεται» από μία θετική ενίσχυση (την μητρική φροντίδα) όπως στους «επιβραβευμένους» επίμους, μπορεί να επιδράσει στην αρχιτεκτονική των νευρώνων στον έσω κογχομετωπιαίο φλοιό και πιθανόν πιο συγκεκριμένα στις ντοπαμινεργικές συνάψεις. Ο κογχομετωπιαίος φλοιός στους επίμους, αλλά και στα πρωτεύοντα και στον άνθρωπο, συνδέεται με τον έλεγχο των παρορμήσεων και τις «εμμονικές» συμπεριφορές. Οι κακές επιδόσεις των «ματαιωμένων» επίμους στο ASST, αφενός επιβεβαιώνουν τη σύνδεση του κογχομετωπιαίου φλοιού με «παρορμητικές»/ «εμμονικές» συμπεριφορές και αφετέρου υποδεικνύουν πως αυτές οι συμπεριφορές συνδέονται σε έναν βαθμό με αρνητικές πρώιμες εμπειρίες. Ακόμα, συμπεραίνει κανείς πως αυτή η πρώιμη εμπειρία ήπιου στρες οδήγησε σε λιγότερο "ανοιχτή" χρωματίνη στα ματαιωμένα ζώα και ακολούθως μικρότερη γονιδιακή ενεργοποίηση όπως αυτή φαίνεται από τα μειωμένα επίπεδα του c-Fos. Περαιτέρω αυτό θα μπορούσε και να εξηγήσει την "κακή" επίδοση των ζώων στη δοκιμασία ASST

στην οποία, όπως είναι γνωστό, ελέγχονται οι επιτελικές λειτουργίες των πειραματόζων και συμμετέχει ενεργά ο προμετωπιαίος φλοιός.

Στις υπόλοιπες περιοχές (έξω κοιλιακός κογχομετωπιαίος φλοιός και περιοχή 1 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου) δεν διέφερε ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για την φωσφοακετυλιωμένη H3. Και αυτά τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου μας ως προς τα επίπεδα του c-Fos στις περιοχές αυτές που δεν διέφεραν μεταξύ των πειραματικών ομάδων κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας ASST (Stamatakis et al., 2011).

Από την άλλη μεριά, στον ιππόκαμπο, και συγκεκριμένα στην περιοχή CA1, τα ματαιωμένα ζώα είχαν υψηλότερα επίπεδα φωσφοακετυλιωμένης ιστόνης H3 (PAC-H3) σε σχέση με τα επιβραβευμένα και τα ζώα ελέγχου, ενδεικτικό αυξημένης γονιδιακής ενεργοποίησης. Το εύρημα αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα από το εργαστήριο μας, σύμφωνα με τα οποία τα ματαιωμένα ζώα εμφάνισαν αυξημένη ενεργοποίηση μετά από έκθεση στον υδάτινο λαβύρινθο τύπου Morris (Morris water maze) ειδικά της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου (επίπεδα μεταγραφικού παράγοντα pCREB) καθώς και ανώτερη επίδοση στη δοκιμασία αυτή χωρικής μνήμης που ελέγχεται από τον ιππόκαμπο (Diamantopoulou et al., 2011). Μάλιστα, η έκταση των δενδριτικών πεδίων στην περιοχή αυτή στα ματαιωμένα ζώα είναι σαφώς μικρότερη από ό,τι σε ζώα ελέγχου. Είναι λοιπόν, πιθανό στην περιοχή αυτή του ιπποκάμπου, η αυξημένη δυνατότητα γονιδιακής έκφρασης να οδηγεί σε περιορισμό των δενδριτικών απολήξεων με ωρίμανση των συνάψεων και διατήρηση μόνο των λειτουργικών νευρωνικών συνδέσεων.

Φαίνεται λοιπόν ότι εγκεφαλικές περιοχές που παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα φωσφοακετυλιωμένης ιστόνης H3, εμφανίζουν και υψηλότερη νευρωνική ενεργοποίηση, αλλά και το αντίστροφο: δομές με χαμηλά επίπεδα PAC-H3 είναι λιγότερο ενεργές. Κι αυτές οι μεταβολές έχουν αντίκτυπο και σε λειτουργίες/συμπεριφορές που ελέγχονται από τις περιοχές αυτές.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα, συμπεραίνουμε πως η συγκεκριμένη πρώιμη εμπειρία με τη μορφή ήπιου στρες μπορεί, ως ένα βαθμό, να προγραμματίσει τη γονιδιακή έκφραση στον εγκέφαλο των επίμυων. Ο προγραμματισμός αυτός δεν είναι καθολικός αλλά εξαρτάται από

τις περιοχές και επηρεάζεται σαφώς από την κύρια λειτουργία των περιοχών αυτών αλλά και τη χρήση και ωρίμανση τους στην πρώιμη ηλικία των ζώων. Τα αποτελέσματα αυτά, ωστόσο, ανοίγουν το δρόμο για τη μελέτη ενός πλήθους ακόμα ερωτημάτων σχετικά με την επίδραση του περιβάλλοντος στον νεογνικό εγκέφαλο. Καταρχάς, είναι σημαντικό παρόμοια πειράματα να πραγματοποιηθούν και για άλλους τύπους επιγενετικών τροποποιήσεων όπως είναι η μεθυλίωση, η απακετυλίωση, η ουβικιτινίωση και η τροποποίησή τους από τις πρωτεΐνες SUMO. Ακόμα, ενδιαφέρον θα ήταν και η μελέτη των παραπάνω τροποποιήσεων σε σχέση και με άλλους παράγοντες όπως είναι ο νευροτροφικός παράγοντας BDNF ή με ένζυμα που συμμετέχουν στη σύνθεση συγκεκριμένων νευροδιαβιβαστών ή υποδοχέων νευροδιαβιβαστών, όπως της ντοπαμίνης. Επίσης, όσον αφορά τη μελέτη της κυτταρο-αρχιτεκτονικής οργάνωσης των νευρώνων είναι σημαντικό να εκτιμηθεί το πλήθος των συνάψεων που έχουν οι επίμυς στις τρεις αυτές πειραματικές ομάδες αλλά και το είδος αυτών. Υποθέτουμε, πως οι επίμυς που βιώνουν διαφορετική συμπεριφορά από τη μητέρα, δηλαδή επιβράβευση ή ματαίωση κατά τη νεογνική εκπαίδευση, θα εμφανίζουν και διαφορετικό μοτίβο νευρωνικών συνάψεων. Ακολούθως, με παρόμοια μεθοδολογία μπορούν να μελετηθούν και άλλα μοντέλα πρώιμων εμπειριών όπως η μητρική αποστέρηση. Τέλος, θα μπορούσε να εφαρμοστεί και μια φαρμακευτική παρέμβαση σε ενήλικα πειραματόζωα τέτοιων μοντέλων πρώιμων εμπειριών με σκοπό να διερευνηθεί εάν μπορεί να ανατραπεί μια πιθανή αρνητική επίδραση στην εγκεφαλική λειτουργία, ως αποτέλεσμα της εμπειρίας που βίωσαν ως νεογνά, αντιστρέφοντας τις επιγενετικές τροποποιήσεις.

Ο τομέας της επιγενετικής ανοίγει πολλούς ορίζοντες μελέτης και αξίζει να μελετηθεί με λεπτομέρεια η επίδραση του πρώιμου περιβάλλοντος στον εγκέφαλο των νεογνών και τη επιρροή του στην ενήλικη ζωή τους. Τέλος, τα αποτελέσματα των παραπάνω ερωτημάτων αλλά και η μελέτη και άλλων μοτίβων πρώιμων εμπειριών μπορούν να συντελέσουν στη καλύτερη κατανόηση του τρόπου με τον οποίο το περιβάλλον επιδρά στην εγκεφαλική λειτουργία και να εξεταστεί κατά πόσο μπορούν να υπάρξουν αναλογίες και αντιστοιχίες με τον ανθρώπινο εγκέφαλο, συμβάλλοντας έτσι στην καλύτερη κατανόηση της ανθρώπινης ψυχοπαθολογίας.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πρώιμες εμπειρίες θεωρούνται κύριοι παράγοντες στη διαμόρφωση της συμπεριφοράς και της λειτουργίας του εγκεφάλου των ενηλίκων. Τα αρνητικά γεγονότα που μπορεί να βιώσει το νεογνό έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη αρκετών περιοχών του εγκεφάλου, όπως ο προμετωπιαίος φλοιός και ο ιππόκαμπος, δημιουργώντας στα άτομα αυτά μια προδιάθεση για μη προσαρμοστικές ή και ψυχοπαθολογικές συμπεριφορές. Αρκετές μελέτες στον κλάδο της νευροεπιστήμης αναδεικνύουν τις επιγενετικές τροποποιήσεις που πραγματοποιούνται στο γονιδίωμα ως την οδό για τον προγραμματισμό των παραπάνω συμπεριφορών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε το ζωικό μοντέλο νεογνικής εκπαίδευσης σε λαβύρινθο σχήματος T υπό συνθήκες ανταμοιβής (επαφή με τη μητέρα) ή ματαίωσης της συγκεκριμένης ανταμοιβής, προκειμένου να μελετήσουμε τις, επαγόμενες από τις δύο αυτές νεογνικές εμπειρίες, επιγενετικές τροποποιήσεις στη χρωματίνη κυττάρων του ενήλικου εγκεφάλου. Όταν τα ζώα αυτά ενηλικιώθηκαν εκτέθηκαν στη δοκιμασία μετατόπισης προσοχής (ASST), το ανάλογο της δοκιμασίας ταξινόμησης καρτών (WCST) σε ανθρώπους που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της λειτουργίας του προμετωπιαίου φλοιού. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τη φωσφοακετυλιωμένη ιστόνη H3 (PAcH3). Επίσης έγινε διπλός ανοσοφθορισμός για την PAcH3 και το δείκτη νευρωνικής ενεργοποίησης c-Fos, ώστε να διερευνηθεί η εμπλοκή της συγκεκριμένης επιγενετικής τροποποίησης στην επαγωγή του γονιδίου c-fos. Τέλος, σε διαφορετική κοόρτη ζώων, που δεν είχαν εκτεθεί ως ενήλικα στη δοκιμασία ASST, μελετήθηκε η δομή και η έκταση των δενδριτικών πεδίων με χρώση κατά Golgi.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τα ενήλικα ματαιωμένα ζώα είχαν χαμηλότερη ενεργοποίηση της χρωματίνης, όπως αυτό φαίνεται από το μειωμένο αριθμό PAcH3 θετικών κυττάρων στον έσω κογχομετωπιαίο φλοιό. Αντίστοιχα, τα επίπεδα του παράγοντα c-Fos μετά τη δοκιμασία ASST ήταν επίσης χαμηλότερα στην περιοχή αυτή, και μάλιστα παρατηρήθηκε συνεντοπισμός του παράγοντα c-Fos και της PAcH3, καθώς όλα τα κύτταρα

που εξέφραζαν τον c-Fos ήταν ανοσοθετικά και για την PAcH3, ενισχύοντας την άποψη ότι απαιτούνται οι συγκεκριμένες τροποποιήσεις στην ιστόνη 3 για να ενεργοποιηθεί το γονίδιο c-fos μετά από κάποιο ερέθισμα. Επιπλέον, ο έσω κογχομετωπιαίος φλοιός των ματαιωμένων ζώων είχε διαφορετική κυτταροαρχιτεκτονική δομή σε σχέση με αυτόν των ζώων ελέγχου με μεγαλύτερη έκταση δενδριτικού πεδίου, όπως φάνηκε μετά από χρώση Golgi.

Αντίθετα από τον έσω κογχομετωπιαίο φλοιό, στην CA1 περιοχή του ιππόκαμπου, ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για την PAcH3 ήταν αυξημένα στα ματαιωμένα ζώα, εύρημα που έρχεται σε συμφωνία με παλαιότερα ευρήματα σύμφωνα με τα οποία τα επίπεδα του φωσφορυλιωμένου μεταγραφικού παράγοντα CREB ήταν αυξημένα, ειδικά στη συγκεκριμένη περιοχή του ιππόκαμπου μετά από εκπαίδευση στον υδάτινο λαβύρινθο κατά Morris. Επίσης, στην CA1 η έκταση των δενδριτικών πεδίων ήταν μειωμένη σε σχέση με τα ζώα ελέγχου. Είναι λοιπόν πιθανό, η αυξημένη ενεργοποίηση της χρωματίνης να οδηγεί σε μείωση της έκτασης των δενδριτικών πεδίων, επιτρέποντας τη διατήρηση μόνο των λειτουργικών, ώριμων συνάψεων.

Φαίνεται ότι η συγκεκριμένη νεογνική εμπειρία της εκπαίδευσης υπό συνεχόμενη ματαίωση έχει μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στον προμετωπιαίο φλοιό και στον ιππόκαμπο σε μοριακό, δομικό και λειτουργικό επίπεδο, υποστηρίζοντας τη θεώρηση ότι οι πρώιμες εμπειρίες μπορούν να προγραμματίσουν με πολύ ειδικό τρόπο τη λειτουργία του εγκεφάλου των ενηλίκων και επομένως και τη συμπεριφορά τους.



## ABSTRACT

Early life experiences are considered as major determinants of adult behavior and brain function. Adverse events have a profound impact on the development of brain areas such as the prefrontal cortex and the hippocampus and predispose individuals for maladaptive reactions and even psychopathology. Work in the field of developmental neuroscience provided compelling data that epigenetic modifications of the genome may underlie aspects of this process. We utilized the animal model of neonatal training in a T-maze under conditions of reward through maternal contact or denial of this expected reward (DER) to investigate the neonatal experience-induced epigenetic changes of chromatin in neuronal cells in the adult brain. As adults, these animals were exposed to the Attention Set Shift Task (ASST), a rat analogue of the Wisconsin Card Sorting Test for humans (WCT), a task generally used to estimate prefrontal cortex function. Following ASST, we estimated immunohistochemically the levels of phospho-acetylated Histone 3 (PAcH3) positive cells. Moreover, we determined the co-localization of c-Fos and PAcH3 by double immunofluorescent labeling, in order to investigate the contribution of the specific epigenetic modification on c-fos activation. In a different cohort of animals, not exposed to the ASST, we determined the structure and extent of the dendritic branching using the Golgi stain.

Adult DER rats had lower chromatin activation in the medial orbitofrontal cortex as shown by the lower number of PAcH3 immunopositive cells. Likewise, c-fos levels were also lower in this specific area, following ASST and indeed there was co-localization of c-Fos and PAcH3 – all c-Fos immunopositive cells were also PAcH3 positive- confirming that phospho-acetylation of H3 is necessary for c-fos activation following a stimulus. In addition, the dendritic morphology was altered in the animals denied the expected reward as neonates, with aberrant dendritic arborizations, as revealed by Golgi staining.

Contrary to the medial orbitofrontal cortex, PAcH3 levels in the CA1 area of the hippocampus were elevated in DER animals. This result is in accordance with our previously reported finding that pCREB levels were

higher in the CA1 area of DER animals following exposure to the Morris water maze task. Moreover, in the CA1 the dendritic tree was reduced in the DER animals. Hence, it is possible that the higher levels of activated chromatin could allow a decrease in dendritic branching, enabling the maintenance of only functional mature synapses.

Our findings that the neonatal experience of learning under conditions of denial of the expected reward of maternal contact had long-term effects on the prefrontal cortex and the hippocampus at the molecular, structural and functional levels, support the concept that early-life experiences can program in an experience-specific way, adult brain function and thus behavior.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Amsel CD. Frustration theory: An analysis of dispositional learning and memory. *New York: Cambridge University Press* 1992;**112**:396-399
- Bernstein BE, Meissener A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell* 2007;**128**:669-81
- Bjorklund S, Almozni G, Davidson I, Nightingale K.P, Weiss K. Global transcription regulators of eukaryotes *Cell* 1999;**96**:759–767
- Bogdanovic O, Veenstra GJC. Dna methylation and methyl-CpG-binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma* 2009;**5**:549-565
- Bredy T.W, Barad M. The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear. *Learn Mem* 2008;**15**:39-45
- Bunchman AF, Kopf D, Westphal S, et al. Impact of early parental child-rearing behaviour on young adults' cardiometabolic risk profile: a prospective study. *Psychosom Med* 2010;**72**:156-62
- Caldji C., Francis D., Sharma S., Plotsky P., Meaney M. The effects of early rearing environment on the development of ABA(A) and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropsychopharmacology* 2000;**22**:219-229
- Caldji [C](#), [Tannenbaum B](#), [Sharma S](#), [Francis D](#), [Plotsky PM](#), [Meaney MJ](#) Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. [Proc Natl Acad Sci U S A](#) 1998;**95**(9):5335-40
- Calvanese V, Lara E, Kahn A, Fraga MF. The role of epigenetics in aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 2009;**8**:268-276
- [Cameron NM](#), [Shahrokh D](#), [Del Corpo A](#), [Dhir SK](#), [Szyf M](#), [Champagne FA](#), [Meaney MJ](#) Epigenetic programming of phenotypic variations in reproductive strategies in the rat through maternal care [J Neuroendocrinol](#) 2008;**6**:795-801
- Caspi A, Sugden K, Moffit T, Taylor A, Craig I, Harrington H, et al. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 2003;**301**:386-9
- Champagne FA, Weaver IC, Diorio J, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor-alpha1b promoter and estrogen receptor-alpha expression in the medial preoptic area of female offspring *Endocrinology* 2006;**147**(6):2909-15
- Chandramohan Y, Droste S.K., Reul Johannes M.H.M. Novelty stress induces phospho acetylation of histone H3 in rat dentate gyrus granule neurons through coincident signalling via the N-methyl-D-aspartate receptor and the glucocorticoid receptor: relevance for c-fos induction. *Journal of Neurochemistry* 2007;**101**:815-828
- Chartier, M. J. Walker, J. R. Naimark, B. (2007). Childhood abuse, adult health, and health care utilization: results from a representative community sample. *Am J Epidemiol* **165** (9): 1031-8

- Chaudhuri, A., S. Zangenehpour, et al. Molecular maps of neural activity and quiescence. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2000;**60**:403-10
- Clancy B, Finlay BL, Darlington RB, Anand KJ Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology* 2007;**28**:931-7
- Clayton AL, Mahadevan LC. MAP kinase-mediated phosphoacetylation of histone H3 and inducible gene regulation. *FEBS Lett.* 2003;**546**:51-58
- Clayton AL, Rose S, Barratt MJ, Mahadevan LC. Phosphoacetylation of histone H3 on c-fos and c-jun-associated nucleosomes upon gene activation. *EMBO* 2000;**19**:3714-3726
- Craft TK, Zhang N, Glasper ER, Hurn PD, Devries AC. Neonatal factors influence adult stroke outcome. *Psychoneuroendocrinology* 2006;**31**:601-13
- De Bellis, M. D. (2001). Developmental traumatology: the psychobiological development of maltreated children and its implications for research, treatment, and policy. *Dev Psychopathol* **13** (3): 539-64
- De Bellis, M. D. (2005). The psychobiology of neglect. *Child Maltreat* **10** (2): 150-72
- Demakis GJ. A meta-analytic review of the sensitivity of the Wisconsin Card Sorting Test to frontal and lateralized frontal brain damage. *Neuropsychology* 2003;**17**:255–264.
- Diamantopoulou A, Stamatakis A, Panagiotaropoulos T, Stylianopoulou F. Reward or its denial during the neonatal period affects adult spatial memory and hippocampal phosphorylated cAMP response element-binding protein levels of both the neonatal and adult rat. *Neuroscience* 2011;**181**:89-99
- [Dickstein DL](#), [Brautigam H](#), [Stockton SD Jr](#), [Schmeidler J](#), [Hof PR](#). Changes in dendritic complexity and spine morphology in transgenic mice expressing human wild-type tau. *Brain Struct Funct.* 2010;**214**(2-3):161-79
- Epsztejn-Litman S, Feldman N, Abu-Remaileh M, Shufaro Y, Gerson A, Ueda j, Delpus R, Fuks F, Shinkai Y, Cedar H, Berman Y. De novo DNA methylation promoted by G9a prevents reprogramming of embryonically silenced genes. *Nat Struct Mol Biol* 2008;**11**:1176-83
- Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl Med* 2008;**358**:1148-1159
- Everitt BJ, Robbins TW. Second-order schedules of drug reinforcement in rats and monkeys: measurement of reinforcing efficacy and drug-seeking behavior. *Psychopharmacology (Berl)* 2000;**153**:12–30.
- Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 2007;**447**:433-440
- Fernandez-Teruel A, Gimenez-Llort L, Escorihuela Rosa M, Gil L, et al. Early-life handling and environmental enrichment. Are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacology Biochemistry and Behaviour* 2002;**73**:233-245
- Fischer A, Sananbenesi F, Wang X, Dobbin M, Tsai L-H. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodeling *Nature* 2007;**447**:178-182
- Fish EW, Shahrokh D, Bagot R, Caldji C, Bredy T, Szyf M, Meaney MJ. Epigenetic programming of stress responses through variations in maternal care. *Ann NY Acad Sci* 2004;**1036**:167-180
- Fraga MF. Genetic and epigenetic regulation of aging. *Curr opin Immun* 2009;**21**:446-453

- Francis D, Diorio J, Liu D, Meaney JM. Nongenomic transmission across generations of across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science* 1999;**286**:1155-1158
- Garcia-Dominguez M, Reyes JC. SUMO association with repressor complexes, emerging routes for transcriptional control. *Biochim Biophys Acta* 2009;**6-8**:451-459
- Gavin [DP](#), Sharma [RP](#) Chromatin from peripheral blood mononuclear cells as biomarkers for epigenetic abnormalities in schizophrenia. [Cardiovasc Psychiatry Neurol.](#) 2009;(2009)
- Gelato KA, Fischle W. Role of histone modifications in defining chromatin structure and function. *Biol Chem* 2008;**389**:353-63
- Glover, V. Maternal stress or anxiety in pregnancy and emotional development of the child. *Br. J. Psychiatry* 1997;**171**, 105–106
- Gogtay N, Thompson PM Mapping gray matter development: implications for typical development and vulnerability to psychopathology. *Brain Cogn* 2010;**72**:6–15
- Gonzalez A., Lovic V., Ward G.R., Wainwright P.E, Fleming A.S. Intergenerational effects of complete maternal deprivation and replacement stimulation on maternal behavior and emotionality in female rats. *Developmental Psychobiology* 2001;**38**:11-32
- Goto H, Yasui Y, Nigg EA, Inagaki M. Arora-B phosphorylates Histone H3 at serine 28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells* 2002;**7**:11-17
- Graff J, Mansuy IM. Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behav Brain Res* 2008;**192**:70-87
- Hebbes T.R, Clayton A.L, Thorne A.W, Crane-Robinson C. Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken  $\beta$ -globin chromosomal domain. *EMBO J.* 1994;**13**:1823–1830
- Hendrich B, Hardeland U, Ng HH, Jiricny J, Bird A. The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG site. *Nature* 1999;**6750**:301-304
- Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;**349**:2042-2054
- Hoffman, G. E. and Lyo D. (2002). Anatomical Markers of Activity in Neuroendocrine Systems: Are we all 'Fos-ed out'? *Journal of Neuroendocrinology*, 2002, Vol. 14, 259–268
- [Hutsler JJ](#), [Zhang H](#). Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. [Brain Res.](#) 2010;**1309**:83-94
- Insel, T.R. and L.J. Young. The neurobiology of attachment. *Nat Rev Neurosci* ;2001. **2**(2):129-36
- Izquierdo LA, Viola H, Barros DM, Alonso M, Vianna MR, Furman M, Levi de Stein M, Szapiro G, Rodrigues C, Choi H, Medina JH. Novelty enhances retrieval: molecular mechanisms involved in rat hippocampus. *Eur J Neuroscience* 2001;**13**:1464-1467
- K. Martinowich, D. Hattori, H. Wu *et al.* DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation *Science* 2003;**302**:890–893

- Kornberg RD, Lorch Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote Chromosome. *Cell* 1999;**3**:285-294
- Korossi A, Baram TZ. The pathways from mother's love to baby's future. *Front Behav Neurosci* 2009;**3**:27
- Kovacs, K. J. (2008). Measurement of Immediate-Early Gene Activation- c-fos and Beyond. *Journal of Neuroendocrinology* 20, 665–672
- Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyl-transferases and deacetylases in gene regulation. *Bioassays* 1998;**8**:615-626
- Leh S, Petrides M, Strafella A The neural circuitry of executive functions in healthy subjects and Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacolog* 2010;**35**:70–85
- Lehman J., Pryce C.R., Jongen-Relo A., Stohr T., Pothuizen H., Feldo J. Comparison of maternal separation and early handling in terms of their neurobehavioral effects in aged rats. *Neurobiology of Aging* 2002;**23**:457-466
- Lenroot RK, Giedd JN The changing impact of genes and environment on brain development during childhood and adolescence: initial findings from a neuroimaging study of pediatric twins. *Dev Psychopathol* 2008;**20**:1161–1175
- Lenroot RK, Schmitt JE, Ordaz SJ, Wallace GL, Neale MC, Lerch JP et al Differences in genetic and environmental influences on the human cerebral cortex associated with development during childhood and adolescence. *Hum Brain Mapp* 2009;**30**:163–174
- Leon M. The neurobiology of filial learning. *Annual Review of Psychology* 1992;**43**:377-398
- Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem* 2004;**279**:40545-40559
- Levine S. Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science* 1957;**126**:405-6
- Levine, S. (1962). Plasma-free corticosteroid response to electric shock in rats stimulated in infancy. *Science* **135** : 795-6
- Levy, F. Melo, A. I. Galef, B. G., Jr. Madden, M. Fleming, A. S. (2003). Complete maternal deprivation affects social, but not spatial, learning in adult rats. *Dev Psychobiol* **43** (3): 177-91
- Li, X., L. Song, et al. Adrenalectomy potentiates immediate early gene expression in rat brain. *J Neurochem* 1992;**58**(6): 2330-3
- Lim, M.M. and L.J. Young. Neuropeptidergic regulation of affiliative behaviour and social bonding in animals. *Horm Behav* 2006;**50**(4):506-17
- Liu D, Diorio J, Day JC, Francis DD, Meaney MJ. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat Neuroscience* 2000;**3**:799-806
- Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 1997;**277**:1659-62
- Liu, D. Diorio, J. Tannenbaum, B. Caldji, C. Francis, D. Freedman, A. Sharma, S. Pearson, D. Plotsky, P. M. Meaney, M. J. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* **277** (5332):1659-62

- Lubin F.D, Roth T.L, Sweatt J.D. Epigenetic regulation of bdnf gene transcription in the consolidation of fear memory. *J Neurosci* 2008;**28**:10576-10586
- Luger K, Mader A.W, Richmond R.K, Sargent D.F, Richmond T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution *Nature* 1997; **389**: 251–260
- Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci* 2009;**10**:434–445
- Macdonald N, Welburn J, Martin E.M, Nguyen A, Yaffe MB, Clynes D, Moggs JG, Orphanides G, Thomson S, Edmunds JW, Clayton AL, Endicott JA, Mahadevan LC. Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone H3 by 14-3-3. *Molecul Cell* 2005;**20**:199-211
- MacMillan, H. L. Fleming, J. E. Streiner, D. L. Lin, E. Boyle, M. H. Jamieson, E. Duku, E. K. Walsh, C. A. Wong, M. Y. Beardslee, W. R. (2001). Childhood abuse and lifetime psychopathology in a community sample. *Am J Psychiatry* **158** (11): 1878-83
- McGowan [PO](#), [Sasaki A](#), [D'Alessio AC](#), [Dymov S](#), [Labonté B](#), Szyf [M](#), [Turecki G](#), Meaney [MJ](#). Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci*. 2009;**(3)**:342-8
- Meagher MW, Sieve AN, Johnson RR. Neonatal maternal separation alters immune, endocrine and behavioral responses to acute Theiler' virus infection in adult mice. *Behav Genet* 2010;**40**:233-49
- Meaney M.J. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci* 2001;**24**:1161-1192
- Meaney, M. J. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci* ;**24** :1161-92
- Mizuno M, Yamada K, Maekawa N, Saito K, Seishima M, Nabeshima T. CREB phosphorylation as a molecular marker of memory processing in the hippocampus for spatial learning. *Behav Brain Res* 2002;**133**:135-141
- Morgan, J.I., Curran, T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *TINS* 1989;**12**: 459-462
- Moriceau, S. Sullivan, R. M. (2006). Maternal presence serves as a switch between learning fear and attraction in infancy. *Nat Neurosci* **9** (8): 1004-6
- Moriceau, S. Sullivan, R. M. Neurobiology of infant attachment. *Dev Psychobiol* 2005;**47**(3): 230-42
- Nemeroff, C. B. (1999). The preeminent role of early untoward experience on vulnerability to major psychiatric disorders: the nature-nurture controversy revisited and soon to be resolved. *Mol Psychiatry* **4** (2): 106-8
- Oitz M., Workel J., Fluttert M., Frosch F., De Kloet E. Maternal deprivation affects behaviour from youth to senescence: Amplification of individual differences in spatial learning and memory in senescent brown Norway rats. *European Journal of Neuroscience*. 2000;**12**:3771-3780
- Okano M, Bell DW, Haber D, Li E. *Cell* 1999;**99**:247-257



- Panagitaropoulos T, Diamantopoulou A, Stamatakis A, Dimitropoulou M, Stylianopoulou F. Learning of a T-maze by rats when contact with the mother is either permitted or denied. *Neurobiology of learning and Memory* 2009;**91**:2-12
- [Pechtel P](#), [Pizzagalli DA](#) Effects of early life stress on cognitive and affective function: an integrated review of human literature. *Psychopharmacology (Berl)* 2011;**214**:55-70
- Pollak SD, Nelson CA, Schlaak MF, Roeber BJ, Wewerka SS, Wiik KL et al Neurodevelopmental effects of early deprivation in postinstitutionalized children. *Child Dev* 2010;**81**:224–236
- Pryce C.R., Feldon J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in ratsQ Manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*. 2003;**27**:57-71
- [Ragozzino ME](#), [Rozman S](#). The effect of rat anterior cingulate inactivation on cognitive flexibility. *Behav Neurosci* 2007;**121**(4):698-706
- Raineki C, De Souza MA, Szawka RE, Lutz ML, De Vasconcellos LF, Sanvito GL, Izquierdo I, Bevilaqua LR, Cammarota M, Lucion AB. Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: involvement of monoamines and cyclic AMP response element binding protein pathway in the olfactory bulb. *Neuroscience* 2009;**159**:131-38
- [Robinson TE](#), [Gorny G](#), [Mitton E](#), [Kolb B](#). Cocaine self-administration alters the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and neocortex. *Synapse* 200;**39**(3):257-66
- Rolls, E. T. The functions of the orbitofrontal cortex. *Brain Cogn* 2004;**55** (1):11-29
- Rolls, E. T. The orbitofrontal cortex and reward. *Cereb Cortex* 2000;**10**(3): 284-94
- Rosenfeld, P. Suchecki, D. Levine, S. (1992). Multifactorial regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during development. *Neurosci Biobehav Rev* **16** (4): 553-68
- Roth TL, Sweatt JD. Annual Research Review: Epigenetic mechanisms and environmental shaping of the brain during sensitive periods of development. *J Child Psychol Psychiatry* 2011;**52**(4):398-408
- Roth [TL](#), [Lubin FD](#), [Funk AJ](#), [Sweatt JD](#) Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene. *Biol Psychiatry* 2009;**65**(9):760-9
- Sagar, S. M. Sharp, F. R. Curran, T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240 (4857): 1328-31
- Schilling, E. A. Aseltine, R. H., Jr. Gore, S. (2007). Adverse childhood experiences and mental health in young adults: a longitudinal survey. *BMC Public Health* **7** : 30
- Soloaga A, Thomson S, Wiggin GR, Rampersaud N, Dyson MH, Hazzalin CA, Mahadevan LC, Arthur JS. MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of Histone H3 and HMG-14. *EMBO J* 2003;**22**:2788-2797
- [Soloaga A](#), [Thomson S](#), [Wiggin GR](#), [Rampersaud N](#), [Dyson MH](#), [Hazzalin CA](#), [Mahadevan LC](#), [Arthur JS](#) MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *EMBO J*. 2003 ;**22**:2788-97
- Stamatakis A., Manatos V., Diamantopoulou A., Stylianopoulou F. Effects of neonatal T-maze learning under conditions of reward or denial of expected



reward on prefrontal cortex function. 43rd European Brain and Behaviour Society Meeting, Seville, September, 9-12/2011

- Stevenson CW, Goodwin PE, Tunstall B, Spicer CH, Marsden CA, Mason R. Neonatal maternal separation alters reward-related ultrasonic vocalizations in rat dams. *Behav Brain Res* 2009;**200**:232-6
- Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms *Genes Dev* 1998;**12**:599–606
- Suchecki D., Duarte P.B., Tufik S. Pituitary-adrenal axis and behavioural responses of maternally deprived juvenile rats to the open field. *Behavioral Brain Research* 2000;**111**:99-106
- Sullivan R.M. et al. Association of an odor with activation of olfactory bulb noradrenergic beta-receptors or locus coeruleus stimulation is sufficient to produce learned approach to that odor in neonatal rats. *Behav Neurosci* 2000;**114**(5):957-62
- Sweatt J.D. Experience-dependent epigenetic modifications in the central nervous system *Biol. Psychiatry* 2009;**65**:191–197
- Takizawa T, Nakashima K, M. Namihira *et al.* DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain *Dev. Cell* 2001;**7**:49–758
- Van Oers HJ., de Kloet ER., Levine S. Early vs late maternal deprivation differentially alters the endocrine and hypothalamic responses to stress. *Bran Res Dev Brain Res* 1998;**111**(2):245-52
- Vazquez SI., Vazquez A., Pena de Ortiz S. Different hippocampal activity profiles for PKA and PKC in spatial discrimination learning. *Behav Neurosci* 2000;**114**(6):1109-18
- Vinogradova OS. Hippocampus as a comparator: Role of the two input and two output systems of the hippocampus in selection and registration of information. *Hippocampus* 2001;**11**:578-598
- Viveros M-P, Diaz F, Mateos B, Rodriguez N, Chowen JA. Maternal deprivation induces a rapid decline in circulating leptin levels and sexually dimorphic modifications in hypothalamic trophic factors and cell turnover. *Horm Behav* 2010;**57**:405-414
- Warburton, E. C., Aggleton, J. P., & Muir, J. L.. Comparing the effects of selective cingulate cortex lesions and cingulum bundle lesions on water maze performance by rats. *European Journal of Neuroscience* 1998;**10**, 622–634
- Weaver Ian C.G. Epigenetic programming by maternal behavior and Pharmacological Intervention. *Epigenetics* 2007;**2**:22-28
- Weaver IC, Diorio J, Seckl JR, Szyf M, Meaney MJ Early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression: characterization of intracellular mediators and potential genomic target sites *Ann N Y Acad Sci* 2004;**1024**:182-212
- [Weaver IC](#), [Champagne FA](#), [Brown SE](#), [Dymov S](#), [Sharma S](#), [Meaney MJ](#), [Szyf M](#) Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life 2005;**25**(47):11045-54
- Wilson VL, Smith RA, Ma S, Cutler RG. Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. *J Biol Chem* 1987;**262**:9948-9951

- Winter S, Simboeck E, Fischle W, Zupkovitz G, Dohnal I, Mechtler K, Ammerer G, Seiser C. 14-3-3 proteins recognize a histone code at histone H3 and are required for transcriptional activation. *EMBO* 2008;**27**:88-99
- Yaffe MB, Elia AE. Phosphoserine/threonine-binding domains. *Curr Opin Cell Biol* 2001;**13**:131-138
- Zhao-xia Chen, Riggs D. Dna methylation and demethylation in mammals. *Journal of biological chemistry* 2011;**286**:18347-18353