

## EXPRESIA DIFERENȚIATĂ A GENELOR CA FACTOR PRIMORDIAL ÎN DECLANȘAREA DEZVOLTĂRII EMBRIONARE. PARTEA I. ROLUL FACTORILOR EPIGENETICI (articol de sinteză)

Vrabie Valeria, Ciochină Valentina

*Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie*

### Rezumat

În articol este prezentată o sinteză a cercetărilor privind mecanismele epigenetice ce reglează expresia diferențiată a genelor la etapele timpurii de dezvoltare. Datele experimentale recente în domeniul biologiei moleculare, geneticii, embriologiei etc. au relevat că semnalele moleculare au un rol semnificativ, poate chiar cel mai important în procesele complexe care apar în timpul dezvoltării embrionare, precum diferențierea și migrarea celulelor, care contribuie la formarea diverselor tipuri de celule specifice, iar mai apoi de țesuturi. Utilizarea abordărilor moleculare a permis cercetătorilor să investigheze în detaliu aceste mecanisme fizice și chimice și să elucideze rolul determinant al expresiei diferențiate a genelor și a factorilor implicați în acest proces în inițierea dezvoltării și însăși dezvoltarea organismelor vii. Unul din factorii cu rol decisiv în expresia genelor în tranziția programului genetic al gameților la cel al zigotului, ulterior al embrionului, aparține modificărilor epigenetice, ce implică o reprogramare masivă de la structura generală a cromatinei, până la modificarea completă a patternului de metilare în genom și al modificărilor proteinelor histonice. Bibl. – 60.

*Cuvinte cheie:* expresia genelor, embriogeneza, cromatina, metilarea ADN, modificări ale histonelor.

*Depus la redacție:* 19 noiembrie 2020

-----  
Adresa pentru corespondență: Ciochină Valentina, Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie, str. Academiei, 1, MD-2028 Chișinău, Republica Moldova; e-mail: valentina.ciochina@gmail.com ; tel. (+373 22) 73-71-55.

Dezvoltarea embrionară presupune formarea mai multor tipuri de celule ca rezultat al activării unor gene sau al inhibării altora, adică a expresiei diferențiate a genelor. Astfel, expresia diferențiată a genelor reprezintă mecanismul cheie ce dictează și direcționează diferențierea celulelor, țesuturilor, formarea organelor pe parcursul embriogenezei.

Este binecunoscut faptul că expresia genelor în primul rând este dictată de particularitățile structurii genei, precum și a factorilor de transcripție ce contribuie la asamblarea complexului transcripțional și declanșarea activității acestuia. Însă, un rol nu mai puțin important în expresia (corectă) a genelor îl au și alți factori precum cei epigenetici, care determină locul și timpul de inițierii transcripției. Recent s-a demonstrat că modificările post-trancripționale ale ARNm, căile de localizare a ARNm în celulă, particularitățile procesului de translație și post-translație influențează semnificativ expresia genelor.

Astfel, expresia genelor poate fi reglată: *la nivel de transcripție, la nivel post-trancripțional, de translație și post-translațional*, determinând ca diferite tipuri de celule sintetizează diferite seturi de proteine, ceea ce la rândul său contribuie la definitivarea și ulterior formarea țesuturilor și organelor [18, 19].

Care este specificul și de ce este importantă reglarea expresiei genelor la etapele cele mai timpurii ale dezvoltării embrionului?

Ovulul și spermatozoizii sunt celule atipice, înalt specializate, comparativ cu celulele somatice. Cu toate acestea, după fecundare se formează *zigotul* – celulă totipotentă unică, dat fiind faptul că generează toate tipurile de celule și descendenți vii.

Acest mecanism de trecere de la celulele *germinale extrem de specializate* la o celulă *totipotentă (zigotul)* reprezintă un moment crucial în dezvoltarea embrionului și este determinat în special de *particularitățile de reglare transcripțională a expresiei genelor*.

Unul din factorii cu rol decisiv în expresia genelor în tranziția programului genetic al gameților la cel al zigotului, ulterior al embrionului, aparține modificărilor epigenetice [10, 57].

Rolul excepțional al epigeneticii în procesele (moleculare) de dezvoltare individuală a organismelor vii a fost stabilit, analizând mecanismele de reglare transcripțională a expresiei genelor. S-a stabilit că modificările epigenetice ce însoțesc tranziția maternă-zigotică (MZT) implică o reprogramare masivă de la structura generală a cromatinei, până la modificarea completă a patternului de metilare în genom și a modificărilor moleculelor de histone [57].

Astfel, o înțelegere mai completă a modificărilor epigenetice, care conduc la dezvoltarea embrionului va oferi o perspectivă importantă asupra multor domenii de cercetare și va contribui la dezvoltarea unor aplicații clinice importante, inclusiv biologia celulelor stem, medicina reproductivă etc.

### ***Mecanismele epigenetice de reglare a expresiei genelor la etapele timpurii ale dezvoltării embrionului***

*Particularitățile structurale ale cromatinei în gameți.* Cunoașterea schimbărilor epigenetice care apar atât în cromatina paternă (din spermatozoid), cât și cea maternă (din ovul) până și după fecundare și rolul acestor modificări în dezvoltarea embrionului este esențială pentru înțelegerea procesului de embriogeneză [41].

Cromatina și în general epigenomul spermatozoizilor maturi este specializat pentru a facilita rolul unic al acestora: de a livra, în condiții de siguranță ADN-ul patern corespunzător în concordanță cu genomul matern, ce are ca scop generarea unui descendent viabil. Proteinele nucleare ale spermatozoidului formează o structură, ce se deosebește de cromatina altor tipuri de celule și care e prevăzută pentru asigurarea funcției gametului masculin.

Anume *proteinele-protamine* sunt cele mai abundente proteine nucleare găsite în spermatozoizi și sunt *unice* pentru celulele spermatozoizilor. Aceste proteine au o sarcină puternic pozitivă, datorită conținutului ridicat al aminoacidului arginina, care facilitează funcția lor. În timpul spermatogenezei, protaminele înlocuiesc histonele din cromatina spermatozoizilor fie atât histonele obișnuite, cât și histonele specific testiculare, printr-un proces ce decurge în trepte. Mai întâi, proteinele de tranziție 1 și 2 (T1 și T2) substituie histonele care sunt legate de ADN. Apoi T1 și T2 sunt înlocuite cu protaminele – protamina 1 și protamina 2 (P1 și P2) [4]. Raportul P1:P2 este de aproximativ 1:1 la majoritatea bărbaților fertili. Odată ce protaminele sunt încorporate în cromatina paternă, resturile de cisteină între moleculele de protamină formează *punți*

*disulfidice* intermoleculare pe măsură ce celulele se maturizează. Un rol important în formarea punților disulfidice revine enzimei glutatation-peroxidaza, care este unică pentru spermatozoizi [13].

Sarcina pozitivă puternică a P1 și P2, precum și formarea punților disulfidice, conduce la o structură cromatinică extrem de compactă. De fapt, ADN-ul legat de protamină din spermă este de aproximativ de 6-20 de ori mai dens (compact) decât o structură nucleozomică a cromatinei din celulele somatice. Deși această structură nucleară unică contribuie la funcția adecvată a spermatozoizilor maturi, ea creează de asemenea o cromatină „*liniștită*” din punct de vedere epigenetic, în mare parte lipsită de modificări chimice ale histonelor [4].

În sperma matură prin procesul de protaminare, protaminele substituie majoritatea histonelor (85-95%) pentru a ajuta la compactizarea cromatinei. În acest proces, markerii de reglare sub formă de modificări ale cozii histonei, sunt înlăturați pentru a asigura o protecție mai stringentă a moleculei de ADN și un nivel înalt al motilității spermei.

Se consideră, că compactizarea densă a ADN în spermatozoizii maturi are două roluri principale:

- Asigură mobilitatea (motilitatea) mare a spermatozoizilor: motilitatea spermatozoizilor se bazează pe o structură nucleară densă, deoarece capul spermatozoidului cu genomul în stare necompactă sau puțin compactă poate inhiba sau perturba mecanic motilitatea celulei;
- O structură cromatinică mai densă contribuie o protecție semnificativă față de deteriorarea ADN-ului, care ar putea apărea în canalele reproductive masculine și feminine înainte de fecundare, deoarece spermatozoizii maturi nu dispun de mecanisme puternice de reparație a ADN-ului [13].

Specificul legării protaminelor în cromatina spermatozoizilor și faptul că aceasta contribuie la o structură mai compactă, liniștită din punct de vedere epigenetic, a condus la conceptul despre funcțiile limitate (restrânse) ale epigeneticii în spermatozoizi pe parcursul embriogenezei [4]. Cu toate acestea, s-a demonstrat că înlocuirea histonelor în sperma în curs de dezvoltare este un proces incomplet, lăsând aproximativ 5-15% din ADN-ul spermatozoizilor împachetat sub formă de nucleozomi [51]. S-a stabilit (la bărbații fertili) că aceste rămășițe nucleozomice sunt de fapt programate și, că histonele se păstrează în locurile importante ce coincid *cu genele necesare pentru dezvoltarea embrionară*, precum *genele imprintate*, genele pentru microARN și clusterii genelor HOX [51]. Dat fiind faptul că aceste histone reținute (păstrate) conțin modificări post-tranlaționale la fel ca și în celulele somatice, ele pot funcționa ca mediatori ai moștenirii epigenetice între generații. Aceste date au stabilit rolul posibil al markerilor epigenetici paterni nu numai în sperma în curs de dezvoltare și cea matură, ci și în embriogeneza timpurie [4, 13, 51].

În ovocite, starea cromatinei se modifică pe parcursul fazelor de creștere. În experimente pe șoareci s-a constatat, că în timpul fazei de creștere timpurie cromatina ovocitelor există într-o configurație decondensată cunoscută sub numele de „*Nucleolus ne-înconjurat*” (NSN) [15]. Pe măsură ce ovocitele ajung în stadiul final al creșterii, acestea suferă o schimbare a stării cromatinei, formând inele condensate de cromatină (conținând heterocromatină pericentrică în jurul corpului prenucleolar), formând așa numitul „*Nucleolus înconjurat*” (SN) [15].

Activitatea transcripțională a ovocitelor corelează cu configurația cromatinei: ovocitele NSN prezintă activitate transcripțională înaltă, în timp ce ovocitele SN au activitate transcripțională joasă [15]. Cu toate acestea, activitate transcripțională joasă în ovulele mature nu depinde totalmente de statutul SN al cromatinei lor. *S-a stabilit, că configurația cromatinei ovocitului, totuși, corelează puternic cu capacitatea de dezvoltare embrionară.*

Pe măsură ce ovocitele cresc, configurația se deplasează la tipul SN. În experimente pe porcine s-a stabilit că odată cu formarea foliculilor antrali în ziua a 14-ea a dezvoltării postnatale, ovocitele capătă competență meiotică. În acest stadiu, genomul ovocitului este cel mai activ transcripțional. Începând cu ziua a 17-ea a dezvoltării postnatale, creșterea și diferențierea ulterioară a ovocitelor este asociată cu începutul remodelării totale a cromatinei și trecerea la starea SN ce este asociată cu tăcerea transcripțională în ovocite pre-ovulatorii. Astfel, la stadiul avansat de creștere a GV configurația de tip SN este observată pentru o mare parte din ovocite. Configurația de tip SN este strict corelată cu încetarea transcripției. În contrast, activitatea transcripțională înaltă este detectată în ovocitele de tip NSN de orice vârstă [46].

Prin urmare, modificarea configurației cromatinei poate juca un rol esențial în modificarea expresiei genei în timpul creșterii ovocitelor și pare să fie implicată în remodelarea genomului întreg, deși mecanismul care stă la baza acestei modificări urmează să fie elucidat.

*Particularitățile patternului de metilare în celulele reproductive.* Metilarea ADN-ului reprezintă modificarea epigenetică cel mai bine studiată ca mecanism de mediere a expresiei genelor și care este implicată în multe procese fiziologice cheie, cum ar fi imprimarea genomică, „tăcerea” elementelor transpozabile, inactivarea cromozomilor X și îmbătrânirea.

Procesul de metilare a ADN este catalizat de enzima ADN metiltransferaza (DNMT). Sunt cunoscute mai multe tipuri de ADN metiltransferaze implicate în stabilirea patternului de metilare a ADN (DNMT1, DNMT2, DNMT3 (DNMT3a/3b și DNMT3L)) prin transferul unei grupări metil de la S-adenozil metionină la citozină [59]. Enzima DNMT1 este responsabilă de menținerea locului (motifului) de metilare în timpul replicării ADN și este denumită metiltransferaza de întreținere. DNMT3 mediază metilarea *de novo* a citozinelor nemetilate și metilează ADN-ul genomic în faza incipientă a dezvoltării embrionare. Deși rolul DNMT2 nu a fost pe deplin elucidat, unele date sugerează, că activează ca ARNt metiltransferază [20, 36, 37].

Un rol important în calitatea spermei și dezvoltarea embrionară ulterioară îl are procesul de metilare a ADN-ului. S-a stabilit că patternul de metilare a ADN-ului spermatozoidelor corelează cu fertilitatea generală masculină. Prin inhibarea activității enzimei ADN metiltransferazei cu 5-aza-2'-deoxicitidină la șoarecii de sex masculin, în vârsta de șapte săptămâni, s-a constatat o hipometilare generală în ADN-ul spermatozoidelor. Când aceste animale au fost împerecheate cu femele virgine în vârstă de 8 săptămâni, la acestea s-a atestat o scădere semnificativă a ratei sarcinii și o pierdere crescută a embrionilor în perioada de preimplantare [14]. Rezultate similare au fost obținute în studiile pe șobolani, în care masculii au fost tratați cu 5-azacitidină. Embrionii de la șobolanii masculi tratați cu 5-azacitidină au rezultat cu diferite defecte și cu un potențial mic de dezvoltare (pierderea embrionilor la etapa de preimplantare) [14].

Datele recente obținute de la subiecții umani supuși unei fertilizării *in vitro* (FIV) sugerează, de asemenea, că modificarea procesului de metilare a ADN-ului poate influența dezvoltarea embrionilor. Într-un studiu recent, efectuat pe un eșantion de 63 de persoane, a realizat analiza în spermatozoizi a nivelului total de metilare a ADN-ului. S-a constatat că hipometilarea generală a spermatozoizilor este asociată cu probabilitatea mică de a prinde sarcină. Aceste date au demonstrat importanța metilării ADN-ului spermatozoizilor în dezvoltarea ulterioară embrionară [32].

În spermatogeneză, majoritatea situsurilor CpG sunt hipermetilate, iar nivelul global de metilare a ADN-ului în spermă este de aproximativ 90%.

Metilarea ADN-ului are un rol important în reglarea structurii cromatinei și exprimarea genelor în ovocite și a fost descrisă în ovogeneza timpurie și târzie. În experimente pe șoareci s-a stabilit că, în ovocite metilarea ADN-ului se restabilește după naștere în timpul creșterii acestora și anume în ovocitele ce au intrat în meioză și au fost stopate în stadiul de diploten al profazei meiotice I. Studiile au relevat, că metilarea coincide cu trecerea de la folicul primar la cel secundar și depinde de mărimea ovocitelor, astfel încât, un pattern complet de metilare se constată la etapa de creștere – veziculă germinală (GV) a ovocitelor, când aceasta devin silențioase d.p.d.v. transcripțional. În ovocitele ne-crescute, nivelul total de metilare a ADN-ului este de 2-3%, dar acest procent se majorează treptat, odată cu creșterea lor. Când un ovocit atinge stadiul de creștere completă, ADN-ul genomului este divizat în hipometilat (mai puțin de 10% din situsurile CpG sunt metilate) și hipermetilat (mai mult de 90% din situsurile CpG sunt metilate), iar nivelul mediu de metilare a ADN-ului este aproximativ 40% [43, 47].

Metilarea ADN-ului în ovocite are o semnificație deosebită, deoarece poate contribui la reglarea expresiei genelor din ovocite și marchează genele specifice, necesare pentru dezvoltarea timpurie a embrionului (embriogeneză), ca și în cazul genelor imprintate.

Utilizarea metodelor contemporane de secvențiere au relevat particularități noi privind procesul de metilare a ADN-ului în ovocite. S-a observat, că procesul de transcripție depinde de metilarea genelor imprintate în ADN-ul ovocitelor. Cu alte cuvinte, ADN metiltransferazele, prin metilare, marchează acele gene din ADN-ul ovocitelor, care conțin histone modificate (variante de histone). Aceasta este necesar pentru a recunoaște și a transcrie genele cu rol în dezvoltare [45, 47].

În timpul creșterii ovocitelor, *stabilirea unor „amprente” specifice materne are loc pe locurile de metilare a dinucleotidelor CpG din secvențe de ADN reglatoare în genele cu o singură copie.*

Metilarea ADN-ului în gameți, reprezintă unul din *markerii epigenetici* cu un rol ulterior în reglarea exprimării genelor și, prin urmare, a funcției celulare.

*Modificările histonelor în gameți.* Ca mecanism epigenetic, modificarea moleculelor histonice este la fel de importantă ca metilarea ADN și are o influență considerabilă în inactivarea și activarea genelor. Modificările proteinelor histonice pot avea impact asupra exprimării genelor prin alipirea unor grupe chimice la moleculele de histone, modificând astfel structura cromatinei. Proteinele histonice ce participă în formarea cromatinei sunt de patru tipuri (H2A, H2B, H3 și H4), iar capetele lor N-terminale pot fi modificate chimic prin metilare, acetilare și fosforilare, ubiquitate, sumoilare etc. [3, 6, 36].

În procesul de diferențiere a celulelor germinale, patternul modificărilor histonelor suferă schimbări dramatice, ceea ce influențează spermatogeneza, maturarea ovocitelor și respectiv ovogeneza. Rolul acestora în spermatogeneză este mai puțin cunoscut comparativ cu ovogeneza [44].

S-a stabilit că modificările post-tranlaționale ale histonelor și citirea lor joacă un rol crucial în procesul de substituire a histonelor cu protamine și remodelarea cromatinei (formarea structurii supercompacte – toroid) la nivelul genomului în timpul spermatogenezei târzii [4, 9, 22, 23]. Defectele apărute fie la înlocuirea, fie la modificarea histonelor pot duce la azoospermie, oligospermie sau teratozoospermie, ceea ce duce la infertilitate masculine [50].

Histonele sunt hiperacetilate, începând de la stadiul de spermatidă rotundă. Un nivel mai mare de acetilare a histonelor este relevat la stadiul de spermatidă alungită. Se consideră că această hiperacetilare facilitează remodelarea globală a cromatinei prin crearea unui mediu cromatinic mai accesibil. Histonele hiperacetilate sunt recunoscute de către proteina Brdt, conținând bromodomină [25]. Recent, a fost identificată o nouă „formă” de modificare a histonei – crotonilarea, în special în spermatozoidul alungit. Crotonilarea histonei corelează cu expresia genelor ce specifică cromozomii sexuali în celulele spermatogene. Rolul exact pe care îl joacă crotonilarea histonelor în spermatogeneză (și în altă parte) rămâne a fi determinat [44, 50].

Schimbările în modificările moleculelor histonice în timpul ovogenezei au fost documentate în numeroase publicații, totuși, doar un număr limitat de studii au identificat rolul funcțional al acestor modificări. Dezvoltarea ovocitelor este asociată cu creșterea nivelului de acetilare a histonei, urmată de deacetilarea bruscă în timpul reluării meiozei. Modularea activității HDAC (histon-deacetilazei) în ovocite poate modifica gradul de condensare a cromatinei în aceste celule: activitatea crescută a HDAC poate conduce la condensarea prematură a cromatinei, iar inhibarea HDAC – la decondensarea cromatinei [8].

Deacetilarea histonei este, de asemenea, importantă pentru dezvoltarea ovocitelor după reluarea meiozei. În cazul, când deacetilarea histonelor nu are loc, este afectată alungirea și alinierea cromozomilor în timpul M-II [8].

Pe lângă modificările chimice ale histonelor se constată și transformarea histonelor nucleozomului în variante (alte forme) ale acestora.

În spermatozoizi unele variante de histone specifice cum ar fi varianta histonei H2b – TH2B și varianta histonei H1 – H1t, sunt prezente de la etapele timpurii de dezvoltare până la stadiul de spermatidă rotundă. Deficitul de H1t2 a determinat scăderea mobilității spermatozoidilor și a defectelor de condensare. Cu toate acestea, variantele de H2A, cum ar fi H2AL1/2, H2A.Bbd sau H1, cum ar fi H1t2 și Hils1 sunt încorporate în mod specific în timpul schimbului histonă-protamină în spermatozoidul rotund/alungit. Deoarece varianta H2AL1/2 marchează heterocromatina pericentrică în timpul spermatogenezei, aceasta este repede înlăturată din heterocromatina paternă după fecundare, restricționând rolul funcțional în ereditatea paternă. S-a descoperit că H2A.Bbd destabilizează nucleozomii, prin urmare s-a presupus că prezența sa în nucleozomi este pentru a facilita înlocuirea histonelor cu protamine. Recent, a fost descris, că o altă variantă H2A – H2A.Lap1 este încorporată în cromozomul X și autozomi în spermatozoidul rotund și s-a sugerat că are un rol în transcripția genelor

inhibate. Printre variantele H1 specifice testiculelor s-a detectat varianta Hils1 [22, 23, 50]. Deși sunt numeroase studii care elucidează rolul variantelor de histone și al reglatorilor cromatinici în reorganizarea genomului paternal, în general mecanismele acțiunilor lor rămân necunoscute. Mai multe studii recente au arătat că histonele (și modificările lor) păstrare în sperma umană nu sunt distribuite în mod aleatoriu, ci sunt asociate cu elementele de reglare a genelor. Modificările diferențiate ale histonelor corelează cu anumite gene, sugerând că transmiterea histonelor modificate din genomul patern (spermatozoizi) ar putea orienta transcripția în timpul dezvoltării embrionare timpurii [2, 50].

S-a stabilit, că variante ale histonelor au un rol semnificativ în timpul ovogenezei. Exemple de variante ale histonelor în ovocit (ovul) includ: H1foo, macroH2A, H3.3. Varianta H1foo a histonei H1 (de legătură) este exprimată în mod specific în ovocitele în creștere. Reducerea conținutului acestei variante – H1foo în ovocitele în creștere conduce la o capacitate redusă a acestora de a relua meioza [24]. Cromatina ovocitelor conține, de asemenea, varianta H2A – macroH2A pe parcursul fazei de creștere, precum și în timpul reluării meiotice. Această variantă rămâne asociată cu cromatina maternă după fecundare, fiind un mediator posibil pentru moștenire (imprintarea genelor) [55]. Ca și în cazul celulelor nerePLICATE, ovocitele în creștere nu încorporează variantele H3 dependente de replicare – H3.1 și H3.2. Totuși, acestea încorporează nesemnificativ varianta independentă de replicare H3.3, sugerând că schimbările continue în compoziția cromatinei au loc în timpul creșterii ovocitelor [54].

Rolul markerilor epigenetici (metilarea ADN-ului și modificările histonelor) ai gameților în dezvoltarea normală a embrionului a fost stabilit prin experimentele cu embrionii ginogenetici și androgenetici la mamifere, generați prin transplant pronuclear, stabilind faptul, că astfel de embrioni nu sunt capabili de a finaliza embriogeneza și, astfel, nu pot genera descendenți viabili.

Aceste date demonstrează că epigenomul ambilor părinți, inclusiv și cel paternal este necesar nu numai pentru gametogeneză și funcția gameților maturi, ci și pentru dezvoltarea embrionară normală [5].

Astfel, markerii epigenetici au un rol decisiv în asigurarea procesului de gametogeneză. S-a stabilit, că perturbările semnelor epigenetice sunt asociate cu spermatogeneza neefectivă, ce cauzează fertilitatea joasă, capacitatea de fecundare redusă, influențează calitatea embrionilor și chiar rezultatul sarcinii.

Modificările epigenetice (metilarea ADN-ului și modificările histonelor) în ovogeneză reglează structura cromatinei și exprimarea genelor, ceea ce nemijlocit influențează dezvoltarea embrionului, deoarece ARNm-urile și proteinele, care se formează în ovogeneză sunt cruciale în embriogeneză, imediat după fecundare.

### ***Modificările cromatinei, patternului de metilare și ale histonelor după fecundare***

La momentul fecundării patternul de transcripție al genomului parental este în stare „tăcută”.

Pentru a fi activat sunt necesare modificări ale cromatinei, care ar declanșa activitatea transcripțională a embrionului, precum și reprogramarea epigenetică – modificarea patternului de metilare a ADN-ului și a modificărilor proteinelor histonice și stabilirea epigenomului propriu embrionului [17].

Fecundarea declanșează: finalizarea diviziunii meiotice II (M-II) a ovulului; remodelarea cromatinei parentale, în special a cromatinei paterne; reprogramarea epigenetică a genomului patern și matern (în special demetilarea gameților și stabilirea unui pattern de metilare a ADN propriu embrionului); generarea unei linii celulare diploide prin sangamie (unirea pronucleului patern și matern); activarea transcripției și inițierea programului de dezvoltare embrionară; restabilirea stării epigenetice adecvate dezvoltării embrionare, ca urmare a reprogramării markerilor epigenetici atât în pronucleul patern, cât și în cel matern imediat după fecundare, și reprogramarea ulterioară a dezvoltării embrionare directe.

*Remodelarea cromatinei parentale.* În perioada imediat după fecundare se atestă modificări ale cromatinei în pronucleele parentale. După fecundare genomurile parentale rămân fizic separate (pronuclee – patern și matern), până când se produce *singamia* și pe parcursul acestei perioade (aproximativ 24 de ore) genomul patern și matern au semne epigenetice diferite [7, 42].

Astfel, cromatina compactă a spermei este reorganizată din starea ei extrem de compactă și silențioasă transcripțional la starea activă pentru a forma genomul zigotului și a embrionului timpuriu.

ADN-ul spermei este extrem de compact datorită legării cu protaminele. În acest scop protaminele din genomul patern sunt substituite cu histonele materne din ovul (de regulă histonele sunt deja acetilate). Această substituție a protaminelor cu histonele acetilate permite menținerea cromatinei nou formate într-o conformație „deschisă” [33].

Ca urmare a dificultăților de a studia remodelarea epigenetică a cromatinei paterne la începutul embriogenezei, cele mai multe date privind înlocuirea protaminei sunt obținute din diferite studii pe modele a mamiferelor sau din sperma umană prin tehnica de injectare intracitoplasmatică a spermei (ICSI).

Timpul necesar pentru îndepărtarea protaminei în perioada de post-fecundare la diferite specii de animale diferă, iar însăși procesul este puțin descris, dar este clar că acest proces trebuie să fie finalizat înainte de replicarea și transcripția ADN-ului paternal și ca atare trebuie să decurgă imediat după fecundare [33].

Majoritatea protaminelor (aproximativ 80%) sunt îndepărtate în decurs de 3 ore, moment în care se începe asocierea histonelor cu ADN ce se termină în 4 ore după fecundare. De asemenea, s-a remarcat faptul că atât îndepărtarea protaminelor, cât și încorporarea histonelor au loc înainte de decondensarea completă a cromatinei și *formarea pronucleului paternal* [11].

În studiile pe porcine a fost determinat că trecerea de la protamine la histone are loc între 2 și 4 ore după fecundare. La șoareci, timpul necesar pentru îndepărtarea protaminei variază din momentul imediat după pătrunderea spermatozoidului în ovul, până la 8 ore după fecundare. Într-un studiu recent (privind sperma umană), utilizând tehnica ICSI, s-a stabilit că îndepărtarea protaminei a fost finalizată în decurs de o oră după injectare.

Astfel, în timp scurt după fecundare prin modificările proteinelor cromatinice se formează *pronucleul paternal*. Pronucleul paternal se mărește substanțial și prin încorporarea altor proteine materne, cum ar fi STELLA (cunoscută și ca PGC7 și DPPA3, cu rol de pluripotență asociată dezvoltării) și nucleoplazminul 2 (NPM2) [27].



Ovulul joacă un rol important în îndepărtarea proteinelor protaminice din cromatina paternă. În baza studiilor efectuate pe bovine și pe hamsteri s-a stabilit, că îndepărtarea protaminei este ajutată de acțiunea glutatationului matern, care reduce legăturile disulfidice între proteine. Rolul acestui antioxidant important în ruperea legăturilor disulfidice și facilitarea decondensării cromatinei paterne este dovedit prin constatarea activității înalte a glutatationului în ovulul matur la mamiferele adulte ce coincide în timp cu relaxarea cromatinei [31].

Se pare că glutatationul și glutatation-peroxidaza sunt factorii cheie atât pentru compactizarea cromatinei în nucleul spermatozoidului, cât și în relaxarea acesteia după fecundare.

Mecanismele concrete ce descriu procesul de înlocuire a protaminelor cu histone după fecundare nu au fost detaliat caracterizate, deoarece este dificil de studiat la toate mamiferele, în special la oameni, datorită restricțiilor etice și tehnice.

Ca rezultat al remodelării cromatinei spermatozoidilor, prin substituirea protaminelor, aceasta devine decondensată (în stare necompactă) și atinge dimensiuni aproximativ de trei ori mai mari decât dimensiunea nucleului matur al spermatozoidilor, rezultând cu formarea *pronucleului patern*.

Acest proces necesită studii suplimentare pentru a determina rolul cromatinei paterne în embriogeneza timpurie și care este rolul reglator al ovocitelor. O mai bună înțelegere a acestor mecanisme duce la îmbunătățirea diagnosticării și tratamentului pacienților supuși terapiilor de reproducere asistată, cum ar fi fertilizarea *in vitro* – FIV (*in vitro fertilisation* – IVF).

S-a stabilit că și genomul ce derivă din ovul, pierde multe dintre trăsăturile organizaționale ale cromatinei proprii lor care, însă, trebuie restabilite în embrionul timpuriu.

Un studiu recent a arătat că *pronucleul patern* al zigotului unicelular conține structuri globulare cunoscute sub numele de compartimente, în care regiunile mai active ale genomului se asociază cu alte regiuni active, iar regiunile mai puțin active se asociază mai strâns unele cu altele. În *pronucleul matern*, în mare parte, astfel de compartimente nu se detectă. În acest studiu, ambele pronuclee au avut structuri cunoscute ca domenii asociate topologic (TAD), deși alte studii nu au reușit să identifice aceste caracteristici organizaționale decât mai târziu, în prima săptămână de dezvoltare [16, 48]. Depistarea acestor structuri TAD a fost posibilă prin metoda cunoscută sub numele de Hi-C (captura conformației cromozomului de înaltă rezoluție – high-resolution chromosome conformation capture), astfel încât, aceasta poate fi aplicată și nucleelor individuale. Principiul metodei Hi-C, constă în faptul că fragmentele de ADN care sunt aproape în spațiu, indiferent de distanța lor genomică, sunt lipite împreună la punctele de contact, înainte ca enzimele să scindeze ADN-ul. Piesele lipite sunt apoi legate chimic în fragmente de ADN unice. Aceste molecule de ADN hibride sunt secvențiate, iar cercetătorii folosesc tehnici computaționale pentru a cartografia secvențele și a determina structura 3-D de rezoluție înaltă a genomului intact [16, 48].

Diferența stabilită în structura cromatinei între pronucleul masculin și feminin poate explica, de asemenea, legarea preferențială a factorilor de transcripție materni la cromatina paternă, eveniment ce se constată la etapele incipiente ale dezvoltării embrionare.

*Reprogramarea markerilor de metilare.* Printre numeroasele schimbări epigenetice apărute la scurt timp după fecundare, una dintre cele mai relevante este „ștergerea globală” a metilării ADN-ului – *demetilare* în pronucleul patern și matern, care elimină majoritatea markerilor de metilare în genomul parental. Cu toate acestea, există regiuni distincte în genomul paternal care nu sunt supuse demetilării. Aceste regiuni includ clustere imprimante (gene imprimante) și retrotranspozomi. Acest proces de demetilare masivă trebuie să aibă loc pentru a elimina *mărkarii reglatori specifici gameților*, care au fost stabiliți pentru a facilita funcția acestora și pentru a permite *fixarea markerilor proprii embrionului, competenți pentru embriogeneza directă* [40].

Genomul patern suferă o demetilare rapidă activă, în timp ce în genomul matern acest proces decurge mai lent pe parcursul a primelor două diviziuni celulare.

Totodată, genomul embrionar capătă markeri de metilare proprii, tisular specifici, deoarece celulele încep să diferențieze.

Există multe mecanisme care sunt implicate în reglarea procesului de demetilare a genomului zigotului.

Mai multe date au arătat că genomul patern suferă o demetilare a ADN-ului înainte de replicarea ADN-ului său printr-un mecanism activ. În decurs de 7-8 ore după fecundare, genomul patern pierde o cantitate substanțială de markeri ai metilării – 5mC, în timp ce genomul matern păstrează acești markeri [40, 60].

Astfel, s-a stabilit că în pronucleul patern are loc demetilarea activă, iar în pronucleul matern – demetilarea pasivă.

Demetilarea activă a pronucleului patern este mai puternică în comparație cu cea pasivă (dependentă de replicare) din genomul matern [12, 60].

Sunt date care sugerează că demetilarea pasivă în pronucleul matern se datorează atât modificărilor represive ale histonelor specifice cromatinei materne, cât și/sau localizării factorului PGC7/STELLA (un factor matern important în dezvoltare) în pronucleul matern. Adică, genomul matern este protejat de demetilare de către proteinele STELLA [31, 34]. Prin urmare, STELLA protejează unele gene imprimante de demetilare (atât materne, cât și paterne). Motivul că STELLA poate proteja numai genele paterne imprimante și genomul matern rămâne necunoscut, în special pentru că STELLA se localizează atât la pronucleul patern, cât și la cel matern. Diferențele în modificările cromatinei între genomul patern și cel matern pot explica, cel puțin parțial, această acțiune a proteinelor STELLA [34].

Timpul necesar pentru demetilarea genomului patern după fecundare nu a fost elucidat pe deplin, datorită gradului ridicat de variabilitate între specii și între tehnicile folosite pentru acest studiu. La șoareci, demetilarea completă a pronucleului patern se finalizează în 10 ore după fecundare. La șobolani, demetilarea relativă are loc într-un timp mai scurt comparativ cu șoarecii, însă, demetilarea completă se atestă în 16 ore după fecundare. Timpul necesar pentru finalizarea demetilării la bovine este de 6 ore în cazul utilizării tehnicii ICSI [21].

S-a stabilit că pierderea markerilor metilării în pronucleul patern are loc independent de replicare, se constată în zigotul timpuriu și este completat de prima diviziune celulară. Demetilarea activă a ADN-ului în pronucleul paternal se va termina înainte de începerea replicării ADN-ului.

Astfel, după fecundare, genele care sunt hipermetilate în spermă sunt demetilate rapid în zigot. ADN-ul matern este demetilat mai încet, iar genele materne derivate din ovul nu sunt supuse modificării.

În general, demetilarea genomului corelează cu cromatina permisivă, activă d.p.d.v. transcripțional. Semimetilarea (hemimetilarea) citozinei în CpG corelează cu statutul represiv al genomului.

Numai mai târziu, după a doua și a treia etapă a clivării, genomul matern va fi treptat demetilat printr-un mecanism dependent de replicare (diluare prin replicare).

În același timp *genele imprimatate* rămân nemodificate, adică păstrează markerii epigenetici (grupele metil) stabiliți în gametogeneză, deoarece sunt esențiale pentru formarea unui zigot viabil.

*Modificări ale histonelor după fecundare.* Modificările histonelor sunt diferite în pronucleul matern și cel patern al zigotului și suferă modificări dinamice în timpul tranziției maternal-zigotice (MZT). După fecundare, histonele hiperacetilate sunt încorporate în genomul patern și pot condiționa activitatea transcripțională relativ mai mare comparativ cu pronucleul matern. H3.3 este o variantă independentă de replicare a H3 și indică o stare permisivă pentru transcripție. După fecundare, această variantă de histone este încorporată preferențial în pronucleul patern, formând *chaperoni histonici* – HIRA [12].

Pe de altă parte, în pronucleul matern este detectată di- și tri-K9 și K27 metilarea a H3, ce asigură protecția genomului matern de demetilarea activă a ADN-ului. Aceste modificări, însă, nu sunt observate în pronucleul patern. Având în vedere complexitatea modificărilor moleculelor histonice, mecanismele care ar explica acest proces sau ar descifra modificările histonelor în timpul MZT rămân a fi elucidate [56].

Dezvoltarea de mai departe a embrionului presupune modificări epigenetice proprii ce îi asigură dezvoltarea normală în ontogeneză.

*Procesele transcripționale în embrionul timpuriu (preimplantare).* Este bine cunoscut faptul, că inițierea transcripției este „*direcționată de genomul matern*”, adică factorii materni din ovule determină procesele de transcripție în zigot și embrionul timpuriu.

Epigenomul patern este esențial pentru dezvoltarea descendenților viabili, iar cromatina paternă este necesară *pentru tăcerea ADN-ului zigotic la etapa de două până la patru celule*. De asemenea, s-a stabilit că această capacitate este dobândită pe parcursul spermatogenezei, sugerând din nou că aceasta este o funcție a epigenomului patern [11, 12].

Multe studii au descris o stare de reprimare transcripțională la etapa de două și patru celule la șoarece, perioadă esențială pentru dezvoltarea normală a embrionului.

Reactivarea transcripției genelor necesită remodelarea extensivă a cromatinei de către factorii materni din ovocite [12, 38].

Moleculele de ARNm matern se formează și se acumulează în timpul ovogenezei și se asociază cu proteinele în complexe numite RNP (ribonucleoproteine). În așa formă, moleculele de ARNm matern sunt păstrate într-o stare „*mascată inactivă*”, până când sunt utilizate în procesul de translație. Imediat după fecundare, moleculele de ARNm

matern se asociază pe polizomi pentru a începe procesul de translație și a produce proteine (factori de transcripție) necesari zigotului nou format, înainte de activarea completă a genomului său [12].

Conținutul de ARNm matern se reduce la etapa de 1 celulă, iar la etapa de 2 celule, 90% din ARNm matern va fi degradat. Cu toate acestea, sinteza proteinelor specifice materne va continua până la etapa de 8 celule (adică ARNm matern va continua să fie implicat în procesul de translație) [1, 58].

S-a stabilit că anumite molecule de ARN mici necodante (care nu sunt implicate în procesul de translație) – microARN și siARN au semnificație în homeostazia moleculelor de ARNm a ovulelor și a embrionilor timpurii.

Distribuirea transcriptelor (ARNm) conform gradientului și localizarea lor specifică în compartimentele citoplasmice, de fapt reprezintă mecanismele celulare de reglare a translării unor molecule de ARNm specifice.

Astfel, localizarea intracelulară a ARNm direcționează sinteza proteinelor în anumite domenii subcelulare, stabilind ulterior polaritatea embrionului. De exemplu, ARNm *Bicoid* (*bcd*) la *Drosophila*.

Când moleculele de ARNm nu sunt implicate în translația proteinelor, ele pot fi salvate de degradare prin legarea cu proteinele în complexe numite ribonucleoproteine (RNP). Ulterior aceste RNP pot fi organizate în structuri multimoleculare numite granule ARN, care diferă după mărime și formă [1].

Deci, s-a dovedit că există un mecanism (sau mai multe mecanisme) sofisticate de protecție și reglare a acumulării și eliberării ARNm matern în zigot.

Recent, oamenii de știință au descris și clasificat moleculele de ARN, care se acumulează în timpul spermatogenezei și care există într-o stare inertă în spermatozoizii maturi. A fost identificat un set de ARN din spermatozoizi, caracteristic preponderent pentru bărbații fertili. Prin diverse studii și investigații s-a stabilit, că conținutul de ARN matur în spermă este constant și nu este rezultatul menținerii (păstrării) aleatorii [35].

Totodată, aceste ARN paterne sunt unice pentru celula spermei, însă în rezultatul fecundării pot fi detectate în zigotul în curs de dezvoltare. Aceste date sunt dovedite și de ultimele descoperiri ale moleculelor de ARN mici nucleare în sperma bărbaților fertili, ceea ce sugerează că moleculele de ARN mici (miRNAs și piARN) contribuie la asigurarea compatibilității celor două genomuri imediat după fecundare [26, 35].

Astfel, nu numai ARNm matern are rol în dezvoltarea embrionară timpurie, dar și moleculele de ARN mici necodante (ARNnc) și de ARNm paternal sunt esențiale în dezvoltarea embrionară timpurie, cu toate că rolul specific al fiecăruia nu a fost elucidat pe deplin.

La începutul dezvoltării zigotului, la stadiul inițial de două celule sunt transcrise cantități mici de microARN (miARN), iar la stadiul de opt celule la șoareci, miARN specifici zigotului încep să apară în cantități mai mari, în timp ce alte molecule de miARN derivate din siARN și piARN ale gameților degradează. Se consideră că aceste miARN funcționează în concordanță cu markerii de metilare ai ADN-ului care se modifică după fecundare și cu modificările histonelor pentru a crea „peisajul” epigenetic adecvat pentru embriogeneza [38, 39].

Inițierea metilării *de novo* proprie zigotului are loc după al 5-lea ciclu celular și coincide cu perioada primei diferențieri. Stabilirea celor două linii celulare rezultă

într-o asimetrie semnificativă. Masa celulară internă (ICM), ce va forma toate țesuturile în organism, este hipermetilată, iar trofodermul (TE), ce formează structurile extraembrionale (placenta) este hipometilat. Această diferență este menținută și reflectată în țesuturile somatice extrem (înalte) de metilate și țesuturile extraembrionale ale placentei care sunt hipometilate. Printre țesuturile somatice ce derivă din ICM, un nivel înalt de metilare se constată în PGCs (primordiile celulelor germinative) ce se formează ~ în a 7-ea zi în mezodermul extraembrional [40, 60].

Un nivel înalt de metilare al ADN-ului este ulterior restabilit în epiblast (din care se formează cele trei foițe embrionare – endodermul, mezodermul și ectodermul), imediat după implantarea embrionului.

La sangamie (contopirea pronucleului patern și matern), cromozomii materni și paterni capătă o configurație unică, păstrând-uși legăturile parentale. În cromozomii materni persistă metilarea ADN-ului de-a lungul întregului cromozom. Cromozomii paterni au markerii metilării în regiunea centromerică (centromeric methylation), unde s-au păstrat histonele din spermatozoizi [40, 60].

Astfel, evenimentele legate de inițierea transcripției în zigot și respectiv în embrion după fecundare pot fi descrise în felul următor:

- Conținutul de ARNm matern din ovul este epuizat (ARNm este tradus în proteine) treptat în prima săptămână de dezvoltare.
- Genomul zigotic suferă mai multe runde de activare, iar genele din genomul zigotic încep destul de devreme să fie expresate (active), în special cele cu roluri cheie în organizarea embrionară și determinarea destinului celulei (determinarea celulară).
- De la stadiul cu patru celule, unele celule încep să exprime gene care le determină să devină linia embrionară care va forma fătul, în timp ce alte celule încep să exprime gene asociate cu linia extraembrionară ce va forma placenta.

Un rol substanțial în embriogeneza timpurie și ulterior în dezvoltare aparține procesului de imprimare genomică sau chiar genelor imprimate.

**Imprimarea genomică sau parentală** este un proces de moștenire independent de moștenirea clasică mendeliană este fenomenul, în care expresia unei gene depinde de faptul că este moștenită de la tată sau mamă, astfel încât atunci, când copia moștenită de la mamă este activă, cea de la tată este tăcută (inactivă) și invers [53].

Imprimarea genomică are un impact mare asupra dezvoltării normale a embrionului și ulterior a organismului, influențează metabolismul și comportamentul la subiecții adulți. Amprelele epigenetice privind originea parentală sunt stabilite în timpul gametogenezei masculine și feminine, persistă după fecundare și sunt prezente în zigot, se mențin pe parcursul dezvoltării și vieții adulte și sunt șterse în celulele germinale primordiale înainte de stabilirea noilor amprente [28].

Imprimarea genomică este un fenomen epigenetic, care induce expresia genelor într-o manieră specifică originii parentale. Forme de imprimare genomică au fost relevate în ciuperci, plante și animale.

Au fost documentate circa 600 de gene imprimate [29, 30].

De regulă imprimarea genomică implică metilarea ADN-ului și modificarea histonelor fără a schimba secvența de ADN. Aceste semne epigenetice sunt moștenite de la părinți prin gameții lor (sunt „imprimate” în linia germinativă a spermatozoidelor

și ovulelor), sunt menținute (păstrate) în decursul dezvoltării ontogenetice a descendentului (copilului) prin diviziuni mitotice ale celulelor somatice [30].

Imprintarea adecvată a anumitor gene este importantă pentru dezvoltarea normală.

Semnele epigenetice ale acestor gene se imprintează la formarea gameților și nu sunt șterse și nici scrise din nou pe parcursul dezvoltării organismului, ceea ce determină expresia selectivă a genelor fie de la mamă, fie de la tată.

După fecundare unele celulele ale embrionului nou format migrează spre creasta germinală, unde devin celule germinale (spermatozoid sau ovocit). Datorită fenomenului de imprintare genomică, genomurile patern și matern sunt marcate diferențiat și trebuie reprogramate corespunzător de fiecare dată, când trec prin linia germinală. Prin urmare, pe parcursul procesului de gametogeneză celulele germinale primordiale trebuie să aibă propriul pattern de metilare al ADN-ului. De aceea, patternul de metilare vechi se șterge și se restabilește unul nou [30].

Ștergerea semnelor epigenetice de pe genele imprintate are loc în embriogeneză numai în liniile de celule din care se vor forma gameții (celulele sexuale) masculini și feminini.

Bolile umane care implică imprintarea genomică includ sindromul Angelman și sindromul Prader-Willi.

Fenomenul de imprintare genomică este evident în cazul încrucișării calului cu măgarul, care dau descendenți – catârul sau bardoul, ce diferă fenotipic în funcție cine este mama și tata. Catârul este un animal hibrid obținut prin încrucișarea dintre iapă și măgar, iar *bardoul* este un animal hibrid obținut prin încrucișarea dintre armăsar și măgăriță și este steril.

Au fost semnalate exemple de moștenire legată de imprintarea genomică la animalele ținute în captivitate, care nu se întâlnesc în mod natural în natură. Astfel, leii și tigrii se pot cupla (cazuri întâlnite în grădinile Zoo), dând naștere la pui hibridi. Urmașii acestora arată diferit în funcție de cine este mama și tata. Masculul leu și femela tigrău produc cea mai mare felină din lume – *Liger*, iar masculul tigrău și femela leu produc *Tigonul* ce are aceeași mărime ca și părinții. În Alaska și Canada au fost întâlnite cazuri de astfel de hibridi dintre ursul polar și ursul Grizzly.

Genele imprintate sunt sub o presiune selectivă mai mare decât genele normale. Acest lucru se datorează faptului că o singură copie este activă la un moment dat. Nu există nici o copie (alelă) de rezervă sau de siguranță pentru a masca efectele. Ca rezultat, genele imprintate evoluează mai rapid decât alte gene. Și patternul de imprintare (semnele epigenetice) pe genele care sunt tăcute în ovul și spermatozoid, de asemenea, evoluează rapid și pot fi destul de diferite la specii înrudite.

Genele imprintate sunt deosebit de sensibile la semnalele mediului extern. Deoarece genele imprintate nu au decât o singură copie activă și nici un „back-up”, orice schimbări epigenetice sau „epimutații” vor avea un impact mai mare asupra expresiei genei [49, 52].

Semnalele de mediu pot afecta procesul de imprintare în sine. Imprintarea are loc în timpul formării ovulelor și spermatozoizilor, când se adaugă semne (markeri) epigenetice pentru a induce tăcerea genelor specifice. Dieta, hormonii și toxinele sau modul de viață pot afecta acest proces (în special în timpul sarcinii), influențând expresia genelor în următoarea generație.

## Concluzii

Expresia diferențiată a genelor la etapele timpurii de dezvoltare a embrionului este determinată în special de reprogramarea epigenetică a genomului gameților și ulterior stabilirea celui propriu al zigotului (embrionului), proces ce implică modificarea structurii cromatinei, patternului de metilare a ADN-ului și restructurării (modificări) chimice ale histonelor.

Modificarea structurii cromatinei este esențială pentru procesul transcripțional, întrucât facilitează sau blochează accesul factorilor de transcripție și asamblarea complexului de transcripție. Particularitățile organizării structurale ale cromatinei parentale după fecundare sunt determinate de procesul de substituire a protaminelor din pronucleul patern cu histonele acetilate maternelle, precum și de formarea unor structuri cunoscute ca domenii asociate topologic (TAD), care diferă după organizarea spațială în funcție de pronucleul patern sau matern, ceea ce explică, legarea preferențială a factorilor de transcripție materni la cromatina paternă, la etapele incipiente ale dezvoltării embrionare.

Metilarea ADN-ului are un rol important în reglarea structurii cromatinei și exprimarea genelor în gameți, precum și în dezvoltarea embrionară ulterioară. Prin procesul de metilare a ADN-ului în gametogeneză se marchează genele specifice, necesare pentru dezvoltarea timpurie a embrionului. După fecundare, patternul de metilare al ADN-ului care se modifică astfel încât se stabilesc diferențe dintre masa celulară internă (ICM) și trofotodermul (TE), fapt care determină embriogeneza propriu-zisă: masa celulară internă (ICM), ce va forma toate țesuturile în organism, este *hipermetilată*, iar trofotodermul (TE), ce formează structurile extraembrionale (placenta) este *hipometilat*. Un nivel înalt de metilare al ADN-ului este ulterior restabilit în epiblast (din care se formează cele trei foițe embrionare – endodermul, mezodermul și ectodermul), imediat după implantarea embrionului.

Ca mecanism epigenetic, modificările chimice ale histonelor și variantele de histone stabilite în gametogeneză și ulterior în embriogeneza timpurie, are o influență considerabilă în inactivarea și activarea genelor prin alipirea unor grupe chimice la moleculele de histone, modificând structura cromatinei și accesibilitatea factorilor de transcripție.

Un rol important în moștenirea epigenetică și în dezvoltarea unui embrion viabil îl au genele imprimante, care în mare parte, dictează expresia oportună a genelor în embriogeneza.

*Lucrarea a fost efectuată în cadrul proiectului „Program de stat” (2020-2023) 20.80009.7007.25 „Metode și procedee de menținere și conservare a biodiversității în funcție de integritatea gametogenezei și variabilitatea alimentară”*

## Bibliografie

1. Assou S., Boumela I., Haouzi D. et al. Dynamic changes in gene expression during human early embryo development: from fundamental aspects to clinical applications. // Hum Reprod Update. 2011, 17(2), p. 272-290. doi:10.1093/humupd/dmq036.
2. Ausio J., Zhang Y., Ishibashi T. Histone variants and posttranslational modifications in spermatogenesis and infertility. In: Epigenetic Biomarkers and Diagnostics. Ed.: J.L. Garcia-Gimenez. London, UK: Academic Press, 2016, p. 479-496, Ch. 24, ISBN 9780128018996.
3. Bannister A., Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. // Cell Res. 2011, 21, p. 381-395 <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>.

4. Bao J., Bedford M.T. Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. // *Reproduction*. 2016, 151(5), p.R55-R70. doi:10.1530/REP-15-0562.
5. Barton S.C., Surani M.A., Norris M.L., Surani M.A., Norris M.L., Norris M.L. Role of paternal and maternal genomes in mouse development. // *Nature*. 1984, 311, p. 374-376.
6. Berger S.L. Histone modifications in transcriptional regulation. // *Curr Opin Genet Dev*. 2002, 12, p. 142-148.
7. Biechele S., Lin C.J., Rinaudo P.F., Ramalho-Santos M. Unwind and transcribe: chromatin reprogramming in the early mammalian embryo. // *Current Opinion in Genetics & Development*. 2015, 34, p. 17-23. 10.1016/j.gde.2015.06.003.
8. Bogolyubova I., Bogolyubov D. Heterochromatin morphodynamics in late oogenesis and early embryogenesis of mammals. // *Cells*. 2020, 9(6), E1497. doi:10.3390/cells9061497.
9. Boskovic A., Torres-Padilla M.E. How mammals pack their sperm: a variant matter. // *Genes Dev*. 2013, 27, p.1635-1639. doi: 10.1101/gad.226167.113
10. Breton-Larrivée M., Elder E., McGraw S. DNA methylation, environmental exposures and early embryo development. // *Animal Reproduction*. 2019, 16(3), p. 465-474. https://doi.org/10.21451/1984-3143-ar2019-0062.
11. Bui H.T., Wakayama S., Mizutani E. et al. Essential role of paternal chromatin in the regulation of transcriptional activity during mouse preimplantation development. // *Reproduction*. 2011, 141(1), p.67-77. doi:10.1530/REP-10-0109.
12. Canovas S., Ross P.J. Epigenetics in preimplantation mammalian development. // *Theriogenology*. 2016, 86(1), p. 69-79. doi:10.1016/j.theriogenology.
13. Champroux A., Torres-Carreira J., Gharagozloo P., Drevet J.R., Kocer A. Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities. // *Basic Clin Androl*. 2016, 26, 17. Published doi:10.1186/s12610-016-0044-5.
14. Cui X., Jing X., Wu X. et al. DNA methylation in spermatogenesis and male infertility. // *Exp Ther Med*. 2016, 12(4), p. 1973-1979. doi:10.3892/etm.2016.3569.
15. De La Fuente R. Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. // *Dev Biol*. 2006, 292(1), p. 1-12. doi:10.1016/j.ydbio.2006.01.008.
16. Flyamer I.M., Gassler J., Imakaev M., Brandão H.B., Ulianov S.V., Abdennur N., Razin S.V., Mirny L.A., Tachibana-Konwalski K. Single-nucleus Hi-C reveals unique chromatin reorganization at oocyte-to-zygote transition. // *Nature*. 2017, 544, p.110-114.
17. Fraser R., Lin C.J. Epigenetic reprogramming of the zygote in mice and men: on your marks, get set, go! // *Reproduction*. 2016, 152(6), p. R211-R222. doi:10.1530/REP-16-0376.
18. Gilbert S.F. *Developmental biology*. 9th Edition. Sunderland: Sinauer Associates, 2010. Inc. - 685 p.
19. Gilbert S.F. *Developmental biology*. 6th Edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000. Inc. ISBN-10: 0-87893-243-7.
20. Güneş S., Kulaç T. The role of epigenetics in spermatogenesis. // *Turk J Urol*. 2013, 39(3), p. 181-187. doi:10.5152/tud.2013.037
21. Haaf T. Methylation dynamics in the early mammalian embryo: implications of genome reprogramming defects for development. // *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006, 310, p. 13-22. doi:10.1007/3-540-31181-5\_2.
22. Hada M., Masuda K., Yamaguchi K., Shirahige K., Okada Y. Identification of a variant-specific phosphorylation of TH2A during spermiogenesis. // *Sci. Rep*. 2017, 7, 1-13. doi: 10.1038/srep46228
23. Hao S.L., Ni F.D., Yang W.X. The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. // *Gene*. 2019, 706, p. 201-210. doi: 10.1016/j.gene.2019.05.027
24. Hayakawa K., Ohgane J., Tanaka S., Yagi S., Shiota K. Oocyte-specific linker histone H1foo is an epigenomic modulator that decondenses chromatin and impairs pluripotency. // *Epigenetics*. 2012, 7(9), p. 1029-1036. doi:10.4161/epi.21492.



25. *Hoghoughi N., Barral S., Vargas A., Rousseaux S., Khochbin S.* Histone variants: essential actors in male genome programming. // *J Biochem.* 2018, 163(2), p. 97-103. doi:10.1093/jb/mvx079.
26. *Hua M., Liu W., Chen Y. et al.* Identification of small non-coding RNAs as sperm quality biomarkers for in vitro fertilization. // *Cell Discov.* 2019, 5, p. 20. <https://doi.org/10.1038/s41421-019-0087-9>.
27. *Li L., Zheng P., Dean J.* Maternal control of early mouse development. // *Development.* 2010, 137(6), p. 859-870. doi:10.1242/dev.039487.
28. *Li Y., Sasaki H.* Genomic imprinting in mammals: its life cycle, molecular mechanisms and reprogramming. // *Cell Res.* 2011, 21(3), p. 466-73. doi: 10.1038/cr.2011.15.
29. *Luedi P.P., Hartemink A.J., Jirtle R.L.* Genome-wide prediction of imprinted murine genes. // *Genome Res.* 2005, 15(6), p. 875-884. doi:10.1101/gr.3303505.
30. *Macdonald W.A.* Epigenetic mechanisms of genomic imprinting: common themes in the regulation of imprinted regions in mammals, plants, and insects. // *Genet Res Int.* 2012, 585024. doi:10.1155/2012/585024.
31. *Marlow F.L.* Maternal control of development in vertebrates: my mother made me do it! San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences. *Reprogramming: Epigenetic Modifications and Zygotic Genome Activation.* 2010. Disponibil pe: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53182/>
32. *Marques C.J., Francisco T., Sousa S., Carvalho F., Barros A., Sousa M.* Methylation defects of imprinted genes in human testicular spermatozoa. // *Fertil Steril.* 2010, 94(2), p. 585-594. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.02.051.
33. *McLay D.W., Clarke H.J.* Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. // *Reproduction.* 2003, 125(5), p. 625-633. doi:10.1530/rep.0.1250625
34. *Nakamura T., Arai Y., Umehara H., et al.* PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. // *Nat Cell Biol.* 2007, 9(1), p. 64-71. doi:10.1038/ncb1519.
35. *Nanassy L., Carrell D.T.* Paternal effects on early embryogenesis. // *J Exp Clin Assist Reprod.* 2008, 5, 2. doi:10.1186/1743-1050-5-2.
36. *Nelson D.L., Cox M. M.* Lehninger Principles of Biochemistry - 4th edition. Publisher: W. H. Freeman, 2004, 1100 pp., hard cover. ISBN13: 9780716743392.
37. *Okano M., Xie S., Li E.* Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet.* 1998;19:219-20
38. *O'Neill Ch.* The epigenetics of embryo development. // *Animal Frontiers.* 2015, 5(1), p. 42-49, <https://doi.org/10.2527/af.2015-0007>.
39. *Pauli A., Rinn J.L., Schier A.F.* Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis. // *Nat Rev Genet.* 2011, 12(2), p. 136-149. doi:10.1038/nrg2904.
40. *Reik W., Dean W., Walter J.* Epigenetic reprogramming in mammalian development. // *Science.* 2001, 293(5532), p. 1089-1093. doi:10.1126/science.1063443.
41. *Ren Y.X., Chang W., Qiao J.* Epigenetic modification in oocyte and preimplantation embryonic development. // *Reprod Dev Med.* 2017, 1, p. 13-17.
42. *Rivera R.M., Ross J.W.* Epigenetics in fertilization and preimplantation embryo development. // *Prog Biophys Mol Biol.* 2013, 113(3), p. 423-432. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.
43. *Sendzikaitė G., Kelsey G.* The role and mechanisms of DNA methylation in the oocyte. // *Essays Biochem.* 2019, 63(6), p. 691-705. doi:10.1042/EBC20190043.
44. *Shirakata Y., Hiradate Y., Inoue H., Sato E., Tanemura K.* Histone H4 modification during mouse spermatogenesis. // *J Reprod Dev.* 2014, 60(5), p. 383-387. doi:10.1262/jrd.2014-018.
45. *Smith Z.D., Meissner A.* DNA methylation: roles in mammalian development. // *Nat Rev Genet.* 2013, 14, p. 204-220.

46. Sun M., Zhu S., Li Y. et al. An essential role for the intra-oocyte MAPK activity in the NSN-to-SN transition of germinal vesicle chromatin configuration in porcine oocytes. // *Sci Rep.* 2016, 6, 23555. <https://doi.org/10.1038/srep23555>.
47. Tomizawa S., Nowacka-Woszek J., Kelsey G. DNA methylation establishment during oocyte growth: mechanisms and significance. // *Int J Dev Biol.* 2012, 56(10-12), p. 867-875. doi:10.1387/ijdb.120152gk.
48. Vallot A., Tachibana K. The emergence of genome architecture and zygotic genome activation. // *Curr Opin Cell Biol.* 2020, 64, p. 50-57. doi:10.1016/j.ceb.2020.02.002.
49. Vinci MC Sensing the Environment: Epigenetic Regulation of Gene Expression. // *J Physic Chem Biophysic.* 2012, S3:001. doi:10.4172/2161-0398.S3- 001.
50. Wang T., Gao H., Li W., Liu C. Essential role of histone replacement and modifications in male fertility. // *Front Genet.* 2019, 10, 962. doi:10.3389/fgene.2019.00962.
51. Ward W.S. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. // *Mol Hum Reprod.* 2010, 16(1), p. 30-36. doi:10.1093/molehr/gap080.
52. Waterland R.A. Early environmental effects on epigenetic regulation in humans. // *Epigenetics.* 2009, 4(8), p. 523-525. doi: 10.4161/epi.4.8.10155.
53. Wood A.J., Oakey R.J. Genomic imprinting in mammals: emerging themes and established theories. // *PLoS Genet.* 2006, 2(11), e147. doi:10.1371/journal.pgen.0020147.
54. Woolcock K. Replication- and transcription-independent histone exchange in oocytes. // *Nat Struct Mol Biol.* 2015, 22, 947. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3143>.
55. Wu B.J., Dong F.L., Ma X.S., Wang X.G., Lin F., Liu H.L. Localization and expression of histone H2A variants during mouse oogenesis and preimplantation embryo development. // *Genet Mol Res.* 2014, 13(3), p. 5929-5939. doi:10.4238.
56. Xia W., Xu J., Yu G., Yao G., Xu K., Ma X. et al. Resetting histone modifications during human parental-to-zygotic transition. // *Science.* 2019, 365, p. 353-360. doi:10.1126/science.aaw5118.
57. Xu R., Li C., Liu X. et al. Insights into epigenetic patterns in mammalian early embryos. // *Protein Cell.* 2020. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00757-z>.
58. Yamamoto R., Aoki F. A unique mechanism regulating gene expression in 1-cell embryos. // *J Reprod Dev.* 2017, 63(1), p. 9-11. doi:10.1262/jrd.2016-133.
59. Yi S.V., Goodisman M.A. Computational approaches for understanding the evolution of DNA methylation in animals. // *Epigenetics.* 2009, 4, p. 551-556
60. Zeng Y., Chen T. DNA methylation reprogramming during mammalian development. // *Genes (Basel).* 2019, 10(4), p. 257. doi:10.3390/genes10040257.