

ROLUL FACTORILOR EPIGENETICI ÎN PROCESUL DE DERULARE A SPERMATOGENEZEI

Ion Balan, dr. hab. șt. biol., conf. cercet., șef laborator

Nicolae Roșca, dr. șt. biol., conf. cerc., cercet. șt. coordonator

Sergiu Balacci, doctorand

Vladimir Buzan, cercet. științific

Vasile Harea, dr. șt. agr., conf. univ., cercet. șt. superior

Roman Crețu, doctorand

Gheorghe Bacu, doctorand

Parascovia Țurcanu, cercet. științific

Alexei Hanțațuc, cercet. șt. stagiar

Artiom Filippov, cercet. șt. stagiar

Vlad Temciuc, cercet. șt. stagiar

Laboratorul Fiziologia și Sănătatea Reproductivă, Institutul de
Fiziologie și Sanocreatologie,

Universitatea de Stat din Moldova, Chișinău, R. Moldova

balanion@rambler.ru

THE ROLE OF EPIGENETIC FACTORS IN THE PROCESS OF SPERMATOGENESIS

The special properties of spermatozoa are established by the processes of spermatogenesis and maturation simultaneously with their epigenome. It is known that there is a close correlation between environmental factors and the outcome of their action on the phenotype, which is particularly significant for spermatogenesis, reproduction and development. Environmental epigenetic effects on sperm genesis and maturation influence male reproductive health and the epigenetic inheritance of offspring. The effect of environmental factors in epigenetics and its reversibility can present intragenerational adaptive implications, with the subsequent transmission to the next generations through the semen of the acquired traits, and the adaptive responses will favor long-term natural selection, changing their frequency in the population.

Este cunoscut că există o strânsă corelație între factorii de mediu și rezultatul acțiunii lor asupra fenotipului, ceea ce este deosebit de semnifica-

tiv pentru spermatogeneză, reproducție și dezvoltare. În procesul spermatogenezei celulele germinale primare evoluează variabil în diverse etape de dezvoltare până la spermatozoizi maturi, care capătă proprietăți morfologice și fiziologice fundamentale caracteristice cu o intensitate suficientă a mobilității.

Cele mai remarcabile modificări apar în timpul depozitării epididimale, unde se stabilește un schimb molecular între spermatozoizi și epiteliul epididimal, ceea ce are ca rezultat transformarea conținutului molecular seminal al spermatozoizilor și al plasmiei.

Nivelul ridicat de transformări prin diferențiere morfologică și fiziologică al spermatozoizilor, adecvat reacționează la presiunea selectivă ridicată la care este supus în timp ce își dezvoltă funcția, iar protejarea conținutului său nuclear și citoplasmatic rămas se asigură prin compactizarea sporită a ADN-ului. Mai exact, compactizarea sporită a ADN-ului protejează materialul genetic de degradare, iar hidrodinamica citoplasmei facilitează deplasarea spermatozoidului, ceea ce este posibil numai datorită energiei proporționale a mitocondriilor și a structurii flagelilor. Concomitent, se inițiază mecanismele de reglare ale expresiei epigenomului prin modificarea accesibilității sau disponibilității elementelor implicate în procesele de transcripție și translație. Aceste mecanisme, care răspund la condițiile de mediu, definesc tipurile de celule reproductive, adică identitatea fenotipică a spermatozoidului. Activitatea epigenetică decurge din transcriptom și proteom, iar mecanismele epigenetice tradiționale sunt rezultatul acestora. În prezent, aceste mecanisme tradiționale sunt studiate independent, iar cercetarea transcriptomului și proteomului, cu orientare epigenetică este o minoritate.

Pe de o parte, modelele de metilare ale ADN-ului, distribuțiile și modificările variațiilor histonelor sunt asociate cu variația accesibilității la regiunile cromatinei și, în consecință, cu nivelul de expresie diferențială. Pe de altă parte, transcriptomul și proteomul intervin la multe niveluri de reglare prin interacțiunea cu cromatina și între ele. Interdependența acelor mecanisme epigenetice permite schimbul de informații, care este benefic în situații instabile, sau când unul dintre ele are integritatea compromisă. Pe lângă această dependență, agenții efectori (ARN-ul și proteinele) sunt, de asemenea, subordonați secvenței ADN-ului. Prin urmare, modificările genetice pot duce la o activitate epigenetică perturbată. În același mod, expresia epigenetică influențează secvența ADN-ului, așa cum se întâmplă

atunci când probabilitatea de mutație crește din cauza prezenței indicatorilor de metilare, sau când se produce fragmentarea ADN-ului, cauzată de un pachet neregulat de cromatină.

Unele studii semnalează faptul, că performanța și coordonarea mecanismelor epigenetice la spermatozoizi au implicații pentru sănătate și evoluție. În mod specific, problemele de reproducere sunt o problemă de sănătate îngrijorătoare și în creștere masculină. Scăderea fertilității masculine este o problemă de îngrijorare la nivel mondial, deoarece studiile disponibile sugerează o calitate mai scăzută a spermei de-a lungul anilor.

Prin urmare, epigenetica spermatozoidelor constă în multiple aspecte din domeniul biologiei reproducerii și dezvoltării, în special, prin efectul epigenetic al factorilor de mediu asupra genezei și maturizării spermei se influențează sănătatea reproductivă masculină și moștenirea epigenetică a descendenților.

Epigenetica spermatozoidelor include, în primul rând, metilarea ADN-ului, care posedă variabilitate minimă. Spermatozoidii sunt metilați pe scară largă, deși unele regiuni, cum ar fi promotorii, sunt slab metilate, inclusiv și în alte dinucleotide din celulele spermatozoidelor, cel mai frecvent în transpozoni.

Altă proprietate epigenetică este compactizarea ADN-ului spermatozoidelor, care se bazează pe un sistem unic de protamine ușoare, cu o natură alcalină mai înaltă decât cea din histone, datorită abundenței argininei. Această proprietate permite de a neutraliza semnificativ aciditatea ADN-ului și de a genera o structură specifică, cu un nivel mai ridicat de compactizare. Modificările post-tranlaționale ale protaminelor variază afinitatea lor față de ADN. La fel, se produc și mai multe modificări ale histonelor, caracteristice spermatozoidelor, prin stabilirea distribuției și modificărilor post-tranlaționale, asociate cu procesele fiziologice. Aceste aspecte denotă, că modificarea histonelor este mai degrabă funcțională decât aleatorie cu un șir de neclarități.

În procesul epigenetic este inclus și transcriptomul, deși până de curând, s-a considerat că transcriptomul spermatozoidului a fost un remanent din perioadele anterioare. Acum este recunoscut ca un mecanism epigenetic esențial cu proporții variabile în materialul seminal. Spermatozoidii posedă un grup complex și caracteristic de ARN, uneori exclusiv pentru acest tip celular. Variabilitatea lor în spermatozoidii normali, are un rol remarcabil. În plus, unele ARN-uri sunt complete și funcționale, în timp ce altele, sunt

fragmentate. Mai mult, ele pot fi protejate de vezicule din ribonucleoproteine, rămân libere sau își pot crește stabilitatea prin adoptarea de structuri tridimensionale. ARN-ul este localizat în capul sau coada spermului și în plasma seminală. În capul spermatozoidelor, distribuția ARN-ului se găsește între compartimentele celulare și în membranele extranucleare și intranucleare și poate interacționa cu cromatina. În coadă, apare și ARN-ul mitocondrial și, ca urmare, poate fi considerat o parte a transcriptomului, deoarece intervine în funcția spermatozoidelor.

În epigenetica spermatozoidelor participă și protenomul, care constă din diverse proteine cu ambele tipuri de activitate *cis* sau *trans*, cu rol transversal și mecanisme epigenetice. Aceste proteine posedă activitate epigenetică potențială în modificarea histonelor, interacțiunea ARN-ului, organizarea cromatinei și al.

Proprietățile epigenetice ale spermatozoidelor se stabilesc la nivel morfologic și fiziologic de-a lungul etapelor prin care trece celula. Aceste modificări sunt induse de mediul extracelular, influențat de mediul extern al organismului. Transmiterea prin generații a elementelor epigenetice este limitată de două evenimente de reprogramare epigenetică. Prima este reprogramarea liniei germinale și a doua este reprogramarea preimplantare.

În timpul și după migrarea celulelor germinale, evenimentele de reprogramare au loc în gamet, inclusiv demetilarea activă și această perioadă este considerată prima perioadă susceptibilă la factorii de mediu datorită complexității implicate.

A doua perioadă de susceptibilitate apare în timpul reactivării spermatogoniei prin remetilare accelerată. Interacțiunile dintre ARN, metilom și histone determină expresia de tranziție în mai multe etape celulare, inclusiv și diferențierea. În același timp, ambele modificări sunt extinse în timpul diferențierii metilării și dezvoltării spermatozoidelor. În plus, menținerea punților intercelulare în timpul procesului asigură o transformare echilibrată și sincronă, incluzând și conținutul epigenetic cu reorganizarea cromatinei.

Reorganizarea cromatinei se produce prin compactarea cromatinei, care include stabilirea structurii toroidale pe bază de protamine și încorporarea unor varietăți de histone specifice spermatozoidelor în testicule. Tranziția către conformația toroidală începe cu modificări ale histonelor testiculare, fiind în mare parte înlocuite cu proteine de tranziție. Proteinele de tranziție sunt variabile, suferind cele mai mari modificări în regiunea cozii cu im-

plicarea histonelor. Regiunile histonelor din cromatină mențin un caracter flexibil și accesibil transcripțional. Există dovezi că transcriptomul intervine în această tranziție, contribuind la menținerea structurii cromatinei. Pe lângă această remodelare a cromatinei, are loc o transformare treptată a diversității de modificare a proteinelor de ambalare în timpul genezei spermatozoizilor.

A treia perioadă de susceptibilitate la factorii de mediu în spermatogeneză se consideră gravitatea modificării histonelor. Aceste schimbări produc spermatozoizii hipermetilați în comparație cu hipometilarea celulelor somatice.

Fluctuațiile ARN-ului pe durata procesului de spermatogeneză în compoziția transcriptomului, precum și cele suferite de proteom, reflectă rolul acestuia în reglarea meiozei și morfogenezei, împreună cu pregătirea pentru fazele posterioare. Totodată, transformarea proteomului și transcriptomului în structura sau metabolismul spermatozoizilor, se află sub controlul ARN-ului în funcție de transcrierile preformate. În mod similar, reducerea citoplasmei implică pierderea unei mari părți din proteom și transcriptom, care devin inactice din punct de vedere translațional și depind de proteomul resintetizat.

O parte semnificativă a moleculelor implicate în schimbul dintre spermatozoizi și epiteliile epididimale sunt elemente epigenetice, iar transcriptomul suferă transformări dramatice prin creștere. În cap și în coada epididimului, transcriptomul spermatozoizilor suferă modificări proeminente în diversificarea ARN-ului. Unele ARN-uri și proteine rămân în lichidul seminal, au loc modificări ale metilomului și interacțiuni mai mari de stabilizare a cromatinei, derivate din permutarea proteomului și transcriptomului.

Cu toate acestea, modularea epigenetică a spermatozoizilor are loc și după ejaculare. Mai mult, modificarea epigenetică a spermatozoizilor este influențată și de condițiile fizico-chimice. În plus, se emise ipoteza despre existența unui schimb de informații epigenetice între spermatozoizi.

Stabilitatea epigenomului asigură spermatozoizilor proprietățile necesare pentru funcțiile specifice, iar fluctuațiile factorilor externi sau interni ai mediu pot produce modificări și perturbări în epigenomul spermatic.

Prin urmare, fenotipul apare prin combinarea informațiilor genotipice și inducerea expresiei acestora de către factorii de mediu. Acei inductori pot proveni din mediul extern, independent de organism, sau din condiții

genetice ale organismului, care împreună cu mediul extern, influențează mediul corporal, compartimentat în medii extracelulare. Aceste medii locale modulează epigenetica celulară, determinând modul de expresie al acestora. În acest fel, interacțiunea epigenetică între mediu și genotip va defini un fenotip prin modificarea sau redistribuirea elementelor epigenetice. Perturbațiile mediului extracelular, de către factori externi sau genetici, influențează celulele reglatoare, modificând proprietățile epigenetice ale spermatozoizilor. Severitatea modificărilor depinde de faza de incidență, de intensitatea acestora și de calea parcursă, cu reflectare asupra moștenirii epigenetice.

În această ordine de idei, generațiile succesive posedă un caracter fenotipic comun, care nu poate fi explicat exclusiv prin moștenirea genetică. Moștenirea epigenetică poate fi între două generații consecutive sau între multiple generații consecutive. În același timp, nu sunt cunoscute mecanismele epigenetice de transmitere a fenotipului fără pierderea valorii între generații, dar se estimează că moștenirea se modulează de moleculele *cis* și *trans*. În plus, capacitatea lor de a se deplasa pe distanțe lungi le permite, de asemenea, să transfere informații de mediu către spermatozoizi din alte țesuturi. Când modificările în spermatozoizi influențează aspecte esențiale și conservate ale dezvoltării, la descendenți apar disfuncții epigenetice severe, sau schimbări de reglementare neutre, chiar și benefice pentru următoarea generație și le pot oferi avantaje adaptative la mediul preexistent.

Efectul factorilor de mediu în epigenetică și reversibilitatea acestuia poate prezenta implicații adaptative intrageneraționale cu transmiterea ulterioară către generațiile următoare prin materialul seminal a trăsăturilor dobândite. Aceste răspunsuri adaptative vor favoriza și selecția naturală pe termen lung, schimbându-și frecvența în populație.

Mai mult, influența bidirecțională dintre genom și epigenom face posibilă o nouă paradigmă a intensității factorilor de mediu cu natura răspunsului adaptativ în generațiile următoare. Ipotetic, factorii cu frecvență și intensitate scăzută pot induce un răspuns epigenetic reversibil, în timp ce, factorii cu frecvență și intensitate foarte puternică pot implica genomul și determina o adaptare stabilă.