

L'epigenetica nello studio degli spermatozoi

Col termine “epigenetica” vuole intendersi lo studio delle modificazioni strutturali del genoma che influenzano l'espressione genica senza però alterare la sequenza nucleotidica sottostante (1,2). Tra i vari meccanismi epigenetici, uno dei principali, la metilazione del DNA, è stata spesso chiamata in causa in numerose funzioni biologiche tra cui la spermatogenesi, ed è considerata un meccanismo in grado di influenzare la fertilità maschile (3).

Molto brevemente, per “metilazione del DNA” s'intende la conversione della citosina, ad opera di almeno 5 tipi di DNA metil-transferasi (DNMTs), in 5-metilcitosina. Tale metilazione si verifica nelle cosiddette “isole CpG” (citosina-fosfato-guanina), cioè in quelle aree di DNA in cui la citosina è direttamente seguita da una guanina nella sequenza del DNA. Tale fenomeno, innesca un processo (potenziato dalla deacetilazione della lisina istonica) che si conclude con un addensamento della cromatina che inattiva i geni interessati, impedendo l'accesso dei fattori di trascrizione ai promotori. L'esito finale di tutto ciò consiste in una ridotta trascrizione genica e, *de facto*, in un silenziamento genico (4). Mentre nell'ovogenesi la metilazione si verifica solo in fase post-natale, nella gametogenesi maschile tale processo, pur completandosi durante la spermatogenesi, ha già inizio nella gonade fetale. Infatti l'andamento della metilazione nel genoma maschile è molto peculiare. In particolare, le PGC (Primordial germ cells), demetilate molto precocemente durante le prime fasi di sviluppo (4^a-6^a settimana di vita intrauterina), vengono successivamente rimetilate fino alla fecondazione e alla formazione dello zigote; quest'ultimo quindi subisce una nuova demetilazione.

Il motivo di tale intensa metilazione del DNA durante la spermatogenesi, oltre a regolare l'espressione genica, sembrerebbe legato alla necessità di organizzare adeguatamente la struttura cromatinica per le crescenti e nuove esigenze dei processi meiotici e spermio-genetici. Infatti recenti studi hanno dimostrato che topi knock-out per un tipo di DNA metil-transferasi sono sterili in quanto non riescono a terminare la meiosi. (5).

Il meccanismo della metilazione è strettamente legato al ben noto fenomeno dell' *imprinting* genomico in cui alcuni geni vengono espressi quando ereditati o per via paterna o per via materna. La metilazione del DNA rappresenta infatti quel meccanismo che, inattivando l'espressione di quel determinato allele in uno dei due sessi, lo fa esprimere solo se questo è stato ereditato dal sesso opposto. Tale fenomeno pertanto, altro non è che un meccanismo di regolazione genica (che riguarda centinaia di geni noti) che serve a “bilanciare” il grado di attività di geni paterni e materni durante lo sviluppo embrionale. L'imprinting genomico, pertanto, rende peculiari alcune malattie che risultano quindi ereditati solo se la mutazione occorre sul gene paterno o materno. Il fenomeno dell'imprinting è stato scoperto grazie allo studio condotto fatto in due particolari sindromi: **la sindrome di Angelman e sindrome di Prader-Willi**. Queste, seppur causate dalla mutazione dello stesso gene, presentano degli effetti diversi a seconda che questo sia stato ereditato dal padre o dalla madre.

Un'altra interessante patologia da alterato imprinting, **la sindrome di Beckwith-Wiedemann**, caratterizzata da macrosomia fetale, macroglossia, visceromegalia, ipoglicemie e aumentato rischio di sviluppare neoplasie, è stata recentemente oggetto di un intenso dibattito in quanto la sua incidenza è superiore in bambini nati con tecniche di PMA (3). Il motivo di tale riscontro ancora sfugge ad una completa spiegazione e non può essere ricondotto unicamente all'ormai dimostrato incremento di metilazione in bambini nati con tecniche di PMA rispetto a quelli nati per via naturale (6).

Studi recenti hanno dimostrato chiaramente che alterazioni dell'imprinting genomico sono correlati ad un'alterata spermatogenesi (7).

Infatti un'anomala metilazione del DNA genomico, pari a circa il 14,4% dei geni paterni, è associata con la presenza di oligo- o oligo-astenoterazoospermia (8). Inoltre, in spermatozoi di uomini oligozoospermici, la presenza di ipermetilazione in geni materni diversi o

l'ipometilazione dell' allele 19, è risultata aumentata, in particolare in pazienti con meno di 10 milioni/ml di spermatozoi (8).

Pacheco et al (9) ha inoltre dimostrato che un'ipometilazione del DNA, possibile causa di un'alterata compattazione della cromatina, può essere responsabile di diversi casi di astenozoospermia.

Markers di metilazione del DNA sono stati rilevati in spermatogoni; pertanto alcune metilazioni anomale del DNA potrebbero esser dovute ad alterate ri-metilazioni in spermatogoni o ad alterato mantenimento delle metilazioni in spermatociti, spermatidi o spermatozoi. Infine un'alterata metilazione del DNA può essere associata ad anormale attivazione di DNMTs (10).

Tuttavia, anche se le alterazioni della metilazione nell'imprinting genomico sono stati osservati più frequentemente negli uomini con oligo- od oligo-asteno-terato-zoospermia, resta ancora da chiarire se i difetti di metilazione dei geni influenzano i processi di sviluppo e di crescita dei nati tramite tecniche di PMA. D'altronde, visto che modificazioni epigenetiche sono di certo un fattore chiave per la maturazione degli spermatozoi e che i bambini nati con tecniche di PMA presentano alterati livelli di metilazione se paragonati a bambini nati con fecondazione naturale, è ragionevole pensare che le tipiche complicanze delle tecniche di PMA (basso peso alla nascita, parto prematuro, aumento del tasso della mortalità perinatale e complicanze durante la gravidanza) possano essere associate ad alterazioni epigenetiche tipiche di molti maschi infertili (11,12). È stato infatti dimostrato che embrioni ottenuti da pazienti con ipospermatogenesi e quasi completa ipometilazione a carico dell'allele 19 dopo esseri sottoposti a tecniche di PMA presentavano tutti un arresto dello sviluppo (12). Inoltre, pazienti con oligo-asteno-terato-zoospermia e parziale ipometilazione sempre dell'allele 19 mostrano un tasso di fecondazione ridotta dopo ICSI. Zheng et al., in uno studio condotto su neonati tramite ICSI affetti da basso peso alla nascita, ha dimostrato la presenza di un'ipermetilazione del gene MEST (mesoderm specific transcript gene, improntato ed espresso preferenzialmente dall'allele paterno e con un importante ruolo nello sviluppo) in uno dei neonati inclusi nello studio (13).

Infine anche se diversi fattori ambientali e stili di vita (fumo, obesità, inquinanti ambientali, radiazioni, antiandrogeni, ecc.) sono stati associati ad alterata metilazione spermatica, ancora poche sono le evidenze in merito e saranno necessari ulteriori studi per chiarirne i meccanismi.

In conclusione, la metilazione del DNA è stata strettamente associata con infertilità maschile e ridotto outcome riproduttivo in tecniche di PMA, anche se gli intimi meccanismi devono essere ancora chiariti. Anche se gli studi su tali meccanismi sono ancora in fase iniziale e molte sono le domande che restano aperte, è certo che tali studi, specie nei pazienti in cui i classici test sul DNA spermatico non riescono ad evidenziare nulla di significativo, dovrebbero essere inseriti tra le tecniche di studio dello spermatozoo nel maschio infertile.

Bibliografia

- 1) Cawthon, R.M. et al. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*; 2014, 3: 662–73;
- 2) Klose, R.J. et al. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*; 2006, 31:89–97.
- 3) Carrell, D.T. et al. Epigenetics of the male gamete. *Fertil Steril*; 2012, 97: 267-274.
- 4) Kläver, R. et al. DNA methylation in spermatozoa as a prospective marker in andrology. *Andrology*; 2013, 1: 731-740.
- 5) Oakes C.C. et al. A Unique configuration of genome-wide DNA methylation pattern in the testis. *Proc Nat Acad Sci USA*; 2007, 104:228-33.

- 6) Katari, S., et al. DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo. *Hum Mol Genet*; 2009, 18:3769-78
- 7) Hartmann, S., et al. Genetic imprinting during impaired spermatogenesis. *Mol Hum Reprod*; 2006, 12: 407-11.
- 8) Dada, R., et al. Epigenetics and its role in male infertility. *J Assist Reprod Genet* 2012, 29: 213-223.
- 9) Pacheco, S.E., et al. Integrative DNA methylation and gene expression analyses identify DNA packaging and epigenetic regulatory genes associated with low motility sperm. *PLoS One*; 2011, 6: e20280.
- 10) Cui, X., et al. DNA methylation in spermatogenesis and male infertility. *Exp & Ther Med*; 2016, 12: 1973-79.
- 11) Montjean, D., et al. Methylation changes in mature sperm deoxyribonucleic acid from oligozoospermic men: Assessment of genetic variants and assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril*; 2013, 100:1241-47.
- 12) Kobayashi, H., et al. DNA methylation errors at imprinted loci after assisted conception originate in the parental sperm. *Eur J Hum Genet*; 2009, 17:1582-91.
- 13) Zheng, H-Y., et al. Study of DNA methylation patterns of imprinted genes in children born after assisted reproductive technologies reveals no imprinting errors: A pilot study. *Exp Ther Med*; 2011, 2: 751-755.