

Le rotture a doppia elica del DNA possono essere predittive dell'outcome riproduttivo

La formazione e maturazione degli spermatozoi nei mammiferi avviene attraverso un delicato e continuo processo, conservato attraverso le specie e di fondamentale importanza per la fertilità del maschio, chiamato spermatogenesi. Al fine di garantire una totale protezione del genoma paterno fino al momento della fecondazione, durante la spermatogenesi, il DNA spermatico subisce un ulteriore impacchettamento (packing) che prevede la sostituzione degli istoni con delle proteine più basiche, le protamine (1). Questo processo è molto delicato infatti durante il packing si possono verificare errori che, assieme ad altri fattori esterni come radicali liberi, radioterapia, chemioterapia, infezioni e stile di vita, possono danneggiare seriamente il DNA degli spermatozoi compromettendone la capacità fecondante e di conseguenza la fertilità dell'individuo (2,3). Negli anni perciò è emersa la necessità di analizzare il nucleo dello spermatozoo soprattutto in pazienti con infertilità idiopatica e a tal fine sono stati introdotti numerosi test che, sia direttamente, come il Comet (single-cell gel electrophoresis assay) e il TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate (dUTP)-nick end-labeling test) che indirettamente, come l'AO (Acridine Orange), SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) il test dell'Anilina e il test della condensazione, sono in grado di fornire informazioni sullo stato del DNA (4,5) (Tab 1.).

Studio funzionale dello spermatozoo		
Test	Oggetto di valutazione	Significato clinico
Annessina V	Esternalizzazione fosfatidilserina	Apoptosi in fase iniziale
JC-1	Potenziale di membrana mitocondriale	Apoptosi in fase iniziale
Arancio di acridina	Eterogeneità cromatinica	Stress ossidativo e alterazione dei meccanismi di riparazione del DNA
TUNEL	Frammentazione del DNA nucleare	Necrosi e apoptosi in fase avanzata
COMET	Frammentazione del DNA nucleare	Necrosi e apoptosi in fase avanzata
Anilina	Protaminazione del DNA nucleare	Alterazione dei processi di maturazione nucleare
Condensazione nucleare	Condensazione nucleare	Alterazione dei processi di condensazione nucleare

Tab 1. Tabella riassuntiva dei test funzionali degli spermatozoi.

Attualmente l'attenzione si sta focalizzando sempre di più sull'entità e sul tipo di rottura del DNA spermatico, che sembra essere predittivo ai fini della fecondazione. Lavori recenti, infatti, dimostrano che, anche se l'oocita è in grado di riparare più facilmente le DSBs (double strand breaks) piuttosto che le SSB (single strand breaks) del DNA paterno (6,7) la permanenza delle rotture a doppia elica durante il processo di fertilizzazione può essere responsabile di alterazioni genetiche e interruzioni dello sviluppo embrionale (8). A tal fine si è reso necessario sviluppare un metodo sensibile ed affidabile in grado di valutare le DSBs negli spermatozoi di pazienti infertili. Recentemente sulle cellule somatiche è stato applicato un nuovo test in grado di analizzare esclusivamente le rotture a doppia elica del DNA attraverso l'analisi diretta della forma fosforilata della variante istonica H2AX. Per capire la dinamica di questo test dobbiamo rifarci all'organizzazione del DNA all'interno di una cellula. La sistemazione di 2 m di DNA in 10 millimetri di nucleo di una cellula somatica è resa possibile grazie alla sua organizzazione in cromatina. L'unità di base della cromatina, chiamata nucleosoma, si compone di 147 paia di basi di DNA, avvolto intorno ad un ottamero che è separato dal successivo da una regione linker di lunghezza variabile (20–80 bp) ed è costituito da quattro piccole unità proteiche, H2A, H2B, H3 H4, chiamate istoni e presenti in coppia.

Ciascun istone presenta due code, una N-terminale che si estende al di fuori del nucleosoma (NH₂-) e una carbossi terminale (COOH-), che funzionano come target per modificazioni post trascrizionali (fosforilazione, acetilazione, metilazione, e ubiquitinazione). Oltre ai quattro tipi di istoni la cui natura è quasi esclusivamente strutturale ne esistono altri con diversi ruoli chiamati varianti istoniche, presenti in una piccola percentuale al livello del genoma, e che differiscono per piccole sequenze amminoacidiche nella loro struttura.

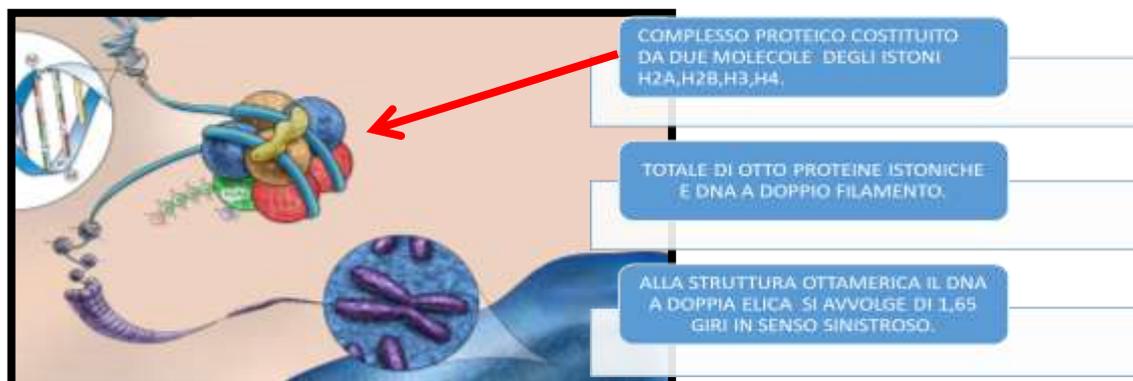


Fig 1.

Organizzazione del DNA nella cromatina. Centoquarantasette paia di basi di DNA sono avvolti intorno ad un nucleosoma composto da otto proteine istoniche (due dimeri H2A/H2B e due dimeri H3/H4).

Negli ultimi anni l'attenzione si è focalizzata sulla variante H2AX dell'istone H2A e in particolare sulla sua forma fosforilata γ H2AX. H2AX è un istone molto frequente nel genoma eucariotico e la sua funzione è implicata nella riparazione del DNA, specie nel danno indotto da radiazioni. Infatti in caso di DSBs viene fosforilato l'istone H2AX più vicino al sito di rottura fungendo da segnale per richiamare in loco tutte le proteine e gli enzimi necessari alla riparazione del genoma.

Recenti studi hanno evidenziato che la fosforilazione di questo istone avviene grazie all'intervento di proteine di riparazione richiamate dal sistema di difesa cellulare nel momento in cui il DNA subisce una rottura a doppia elica. Questa reazione a catena, che vede coinvolte molte proteine appartenenti alla famiglia della phosphoinositide 3-kinase (PIKK) come per esempio Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM), Ataxia Telangiectasia e Rad3 (ATR), si conclude con la fosforilazione della Serina 139 posizionata presso la porzione carbossilica dell'istone H2AX, generando così la forma fosforilata γ H2AX (9).

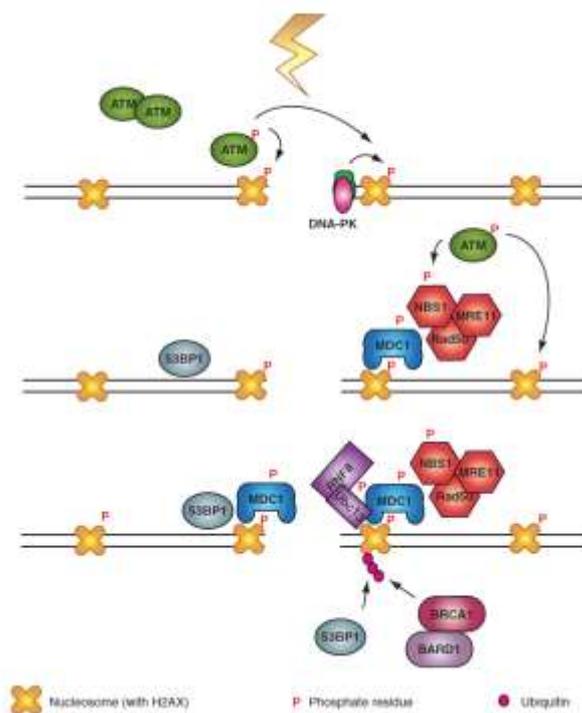


Fig 2.

La fosforilazione di H2AX viene effettuata dai membri della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3KK) famiglia che include ATM, ATR, e PK DNA. La chinasi ATM è attivata, a monte dal legame del complesso Mre11 / Rad50 / Nbs1 al punto di rottura del DNA.

Da Andrea Kinner, *et al.*, 2008 (10)

Grazie all' utilizzo di un anticorpo anti γ H2AX è stato possibile, quindi, individuare e analizzare specificatamente le DSBs delle cellule somatiche (10-11-12). Negli spermatozoi maturi la sostituzione degli istoni con le protamine non è completa; infatti una piccola frazione del DNA, circa il 15%, rimane legata agli istoni; tra questi è presente la variante istonica H2AX (13-15) grazie alla quale è stato possibile studiare il danno specifico a doppia elica anche negli spermatozoi. Una aumentata presenza di γ H2AX è stata infatti dimostrata in spermatozoi maturi dopo esposizione a stress ossidativo mediante incubazioni in H₂O₂ o con agenti mutageni come l' Adriamicina (16,17). In questi studi la frammentazione è stata valutata in parallelo con γ H2AX e COMET test: quest'ultimo però si è dimostrato meno sensibile rispetto al primo.

DISCUSSIONE

Attualmente sono disponibili numerosi test per lo studio del nucleo spermatico, ma manca un esame specifico per determinare e quantificare la presenza di rotture a doppia elica sul filamento di DNA. A questo scopo, la valutazione della fosforilazione dell'istone H2AX è stata proposta recentemente come test diagnostico sulle cellule somatiche (11). Essendo questa variante istonica presente anche negli spermatozoi, il test è stato utilizzato per la valutazione delle rotture a doppia elica del DNA spermatico. Da studi recenti è emerso che l'analisi della frammentazione del DNA mediante anticorpo anti- γ H2AX negli spermatozoi sembra essere più predittiva del successo riproduttivo rispetto ad altri test perciò può essere considerato come più specifico e sensibile per predire il successo di ICSI in pazienti infertili. Pertanto, in futuro, l'analisi della fosforilazione dell'istone H2AX potrà essere presa in considerazione come strumento predittivo per la fertilità naturale e assistita e per valutare l'efficacia della terapia nel trattamento dell'infertilità maschile.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Rathke, C. et al. Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1839: 155-68.
- 2) Harrouk, W. et al. Paternal exposure to cyclophosphamide dysregulates the gene activation program in rat preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev*. 2000; 57: 214-223.
- 3) Sakkas, D et al. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome and analysis. *Fertil Steril*. 2010; 93: 1027-1036.
- 4) Chohan, K.R. et al. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl*. 2006; 27: 53-9.

- 5) Ribas-Maynou, J. et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology* 2013; 1:715-722.
- 6) Ribas-Maynou, J. Et al. Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PLoS One*. 2012; 7(9): e44679.
- 7) Ribas-Maynou, J. et al. Double-stranded DNA breaks hidden in the neutral Comet assay suggest a role of the sperm nuclear matrix in DNA integrity maintenance. *Mol Hum Reprod*. 2014; 20: 330-40.
- 8) Derijck, A. et al. DNA double-strand break repair in parental chromatin of mouse zygotes, the first cell cycle as an origin of de novo mutation. *Hum Mol Genet*. 2008; 17: 1922-1937.
- 9) Revet, I. Et al. Functional relevance of the histone gamma H2AX in the response to DNA damaging agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 8663-8667.
- 10) Fernandez-Capetillo, O. et al. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)*. 2004; 3: 959-967.
- 10) Kinner, A. et al. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36: 5678-5694.
- 11) Hernández, L. et al. Highly sensitive automated method for DNA damage assessment: gamma-H2AX foci counting and cell cycle sorting. *Int J Mol*. 2013; 30: 15810-26.
- 13) Gatewood, J.M. Et al. Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *J Biol Chem*. 1990; 265: 20662-6.
- 14) Oliva, R. et al. Vertebrate protamine genes and the histone to protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1991A; 40: 25-94.
- 15) Wykes, S.M. Et al. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem*. 2003; 278: 29471-29477.
- 16) Li, Z. et al. Oxidative stress induces H2AX phosphorylation in human spermatozoa. *FEBS Lett*. 2006; 580: 6161-6168.
- 17) Li, Z.X. et al. Adriamycin induces H2AX phosphorylation in human spermatozoa. *Asian J Androl*. 2008; 10: 749-57.