

AÏLLAMENT DEL TRANSCRIPTOMA DE L'ESPERMATOZOIDE HUMÀ: IDENTIFICACIÓ DEL miRNA hsa-let-7a

Albert Salas-Huetos, Joan Blanco, Francesca Vidal i Ester Anton *

Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). 08193 Bellaterra.

ester.anton@uab.cat

Resum

Els microRNAs (miRNAs) són molècules de 22-24nt implicades en la regulació de l'expressió gènica. Recentment s'han identificat perfils alterats d'expressió de miRNAs en diversos casos d'infertilitat idiopàtica posant de manifest el paper fonamental d'aquestes molècules en la regulació de la fertilitat.

El treball que es presenta a continuació engloba l'optimització del procés d'aïllament del transcriptoma complet dels espermatozoides humans en el qual s'hi inclouen miRNAs. El protocol desenvolupat ha permès obtenir un RNA de bona qualitat i puresa, sense contaminació de DNA d'origen genòmic i amb un contingut de $51.8\% \pm 9.5$ miRNAs respecte la població total d'RNAs petits. La presència del miRNA hsa-let-7a ha estat confirmada en totes les mostres analitzades mitjançant assajos de PCR a temps real.

Paraules clau: transcriptoma, espermatozoide, miRNAs, hsa-let-7a, *TaqMan*.

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are molecules of 22-24nt involved in gene expression regulation. Some authors have recently identified altered expression profiles of miRNAs in cases of male idiopathic infertility showing its fundamental role in fertility regulation. This work includes the optimization of the isolation process of the total human sperm transcriptome, including miRNAs. Our methodology has allowed us to obtain RNA of high quality and purity, without contamination of somatic DNA, and with a mean content of miRNAs among total small RNAs of $51.8\% \pm 9.5$. The presence of the miRNA hsa-let-7a has been confirmed in all the samples by real time PCR.

Keywords: transcriptome, spermatozoa, miRNAs, hsa-let-7a, *TaqMan*.

INTRODUCCIÓ

Els microRNAs (miRNAs) són molècules d'RNA funcionals, formades per una cadena de 22-24nt, que formen estructures semi-complementàries a les regions 3' no traduïdes dels RNA missatgers (mRNA) (Ambros 2001, Boyd 2008). Els miRNAs es processen i es conjuguen amb proteïnes Argonauta (AGO) fins a formar els complexos miRISC en el citoplasma cel·lular (Inui et al. 2010). Aquests complexos regulen l'expressió gènica inhibint o activant la traducció de determinats mRNAs (Doench i Sharp 2004, Vasudevan et al. 2007).

En humans s'han identificat fins a 1048 miRNAs (Sanger miRBase, versió 16.0; <http://www.mirbase.org>), molts d'ells relacionats amb la regulació del cicle cel·lular (Chan et al. 2005, Lu et al. 2005), el desenvolupament embrionari (Boerke et al. 2007) i la regulació de l'espermatogènesi (Lian et al. 2009). D'altra banda, la presència d'un perfil alterat de miRNAs s'ha vinculat amb l'aparició d'un elevat nombre de processos biològics, com el càncer (Lu et al. 2005, Hwang et al. 2006, Esquela-Kerscher et al. 2006), afeccions cardíques (van Rooij et al. 2007), trastorns neuronals (Fiore et al. 2008) o alteracions respiratòries (Tan et al. 2007) entre altres.

Recentment també s'ha descrit la seva participació en la gametogènesi tant masculina (He et al. 2009) com femenina (Toloubeydokhti et al. 2008). Alguns autors han identificat perfils alterats d'expressió de miRNAs en diversos casos d'infertilitat masculina d'origen idiopàtic (Lian et al. 2009, McCallie et al. 2010), posant de manifest el paper fonamental d'aquestes molècules en la regulació de la fertilitat. Lian i col·laboradors descriuen que pacients amb azoospermia no obstructiva, tenen alterada l'expressió de miRNAs en línia germinal (teixit testicular). Per altra banda, McCallie i col·laboradors descriuen que blastocists d'embrions transferibles obtinguts de parelles amb ovaris poliquístics i infertilitat per factor masculí, mostren una disminució significativa en l'expressió de miRNAs en comparació amb els blastocists de donants fèrtils.

L'existència del miRNA hsa-let-7a va ser predita l'any 1993 en els laboratoris d'Ambros (Lee et al. 1993) i confirmada posteriorment en *Caenorhabditis elegans*, per Pasquinelli i col·laboradors (Pasquinelli et al. 2000). Aquest va ser el segon miRNA

identificat, i posteriorment s'ha observat que està conservat en totes les espècies estudiades, des de nematodes fins a humans (Ambros 2001). La seva expressió s'ha detectat en tota mena de teixits: pulmonar (Takamizawa et al. 2004), mamari (Iorio et al. 2005), gàstric (Yang et al. 2011) i en línia germinal masculina (Lian et al. 2009) entre d'altres. Per aquest motiu és d'esperar que aquest transcrit també estigui present en els espermatozoides humans.

OBJECTIU

Aquest treball s'emmarca dins d'un projecte global destinat a determinar si els patrons de miRNAs presents en espermatozoides d'individus amb infertilitat idiopàtica són diferents als patrons de miRNAs en espermatozoides d'individus control.

Com a primera aproximació a la consecució del projecte, ens hem plantejat optimitzar un mètode d'extracció del transcriptoma complet de l'espermatozoide humà incloent els miRNAs. De forma específica ens hem proposat determinar la presència del miRNA hsa-let-7a en totes les mostres analitzades per tal de confirmar la validesa de la metodologia utilitzada.

MATERIAL I MÈTODES

Recollida de mostres

Es van obtenir tres tipus de mostres biològiques:

1. Set mostres de semen amb paràmetres seminals normals procedents de tres individus control.
2. Quatre mostres de saliva procedents d'un mateix individu, utilitzades com a un control somàtic de la presència d'hsa-let-7a.
3. Cèl·lules de la línia cel·lular Jurkatt, utilitzades per determinar la integritat de l'RNA obtingut.

Tractament previ

Les mostres de semen es van tractar per tal d'aïllar la fracció espermàtica mitjançant l'adaptació del mètode de *Somatic Cell Lysis* (SCL) descrit per Goodrich i

col·laboradors (Goodrich et al. 2007). Aquest consisteix en lissar les cèl·lules somàtiques presents en l'ejaculat mitjançant una barreja de detergents (0.1% SDS i 0.5% Triton X-100), fins a obtenir una ratio màxima d'1 cèl·lula somàtica per cada 1.000 espermatozoides. Aquesta ratio s'ha establert en base a la proporció d'RNA aportat per cada cèl·lula somàtica en relació al contingut d'RNA dels espermatozoides. Les cèl·lules somàtiques contenen 100 vegades més RNA que un espermatozoide. Per aquest motiu, la obtenció d'una ratio < 1:1000 minimitza la presència d'RNA d'origen somàtic.

Extracció RNA

L'extracció d'RNA es va realitzar en totes les mostres a partir el protocol adaptat de Chomczynski i Sacchi (1987) comercialitzat amb el nom de *TRIzol* (Invitrogen™, USA). Seguidament es va aplicar un tractament amb DNasa per eliminar qualsevol traça de DNA genòmic (Ambion, USA).

L'RNA va ser analitzat amb un espectrofotòmetre UV/visible d'alta sensibilitat (Nanodrop 2000; Thermo Scientific, USA), per tal de determinar la concentració de l'RNA obtingut i la seva puresa.

Confirmació de l'absència de DNA

Per les mostres d'espermatozoides i mucosa bucal es va efectuar una RT-PCR amb encebadors aleatoris (Applied Biosystems, USA) per tal de transformar tot l'RNA obtingut en les extraccions a cDNA.

Amb el producte obtingut es va efectuar una PCR convencional amb encebadors exó-exó pel gen de la Protamina 1 (PRM1) i del Gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH) (Taula 1), per les mostres de cDNA espermàtic i de mucosa bucal respectivament. Aquest disseny d'encebadors exó-exó va permetre distingir entre els productes resultants de la amplificació de cDNA i els de DNA.

Anàlisi del transcriptoma

El transcriptoma de la totes les mostres es va analitzar per nanoelectroforesi amb la plataforma *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies, Germany). Aquesta tecnologia es basa en la utilització d'uns xips amb canals gravats per on passen els diversos fragments d'RNA de la mostra marcats amb fluorescència. Un detector integra aquesta

informació i el resultat és un perfil de la composició de transcrits de la mostra segons la seva mida.

Per tal de valorar la presència de miRNAs, es va fer servir el xip *Small-RNA*. Aquest permet elaborar un perfil electroforètic amb tots els fragments d'RNA de mides compreses entre els 4 i els 150nt (rang que inclou els miRNAs), i per tant, determinar la presència i la proporció relativa dels miRNAs presents en les fraccions d'RNA aïllades.

També es va utilitzar el xip *Nano-RNA*, amb un rang de detecció més ampli (de 25 a 6,000nt). La utilització d'aquest xip amb les mostres d'RNA obtingudes a partir de cèl·lules Jurkatt va permetre calcular l'índex RIN (*RNA Integrity Number*). Aquest valor és calculat a partir de diversos indicadors entre els que s'hi inclouen les dues subunitats d'rRNA, el 18S (1869nt) i el 28S (5025nt) Aquest factor impossibilita utilitzar les mostres d'espermatozoides amb aquesta finalitat donat que són cèl·lules transcripcionalment inactives i per tant no tenen RNA ribosòmic (rRNA).

Anàlisi de la presència de hsa-let-7a

1.RT-PCR

Les mostres d'RNA provinents de les cèl·lules de mucosa bucal i d'espermatozoides es van diluir fins a 1-10ng/5µl i seguidament es va fer una RT-PCR específica per miRNAs amb el *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* seguint les indicacions descrites per la casa comercial (Applied Biosystems, USA).

2.PCR a temps real (*TaqMan*)

El cDNA obtingut es va diluir amb els encebadors específics del miRNA hsa-let-7a (*TaqMan MicroRNA Assay* ref.000377) i la *TaqMan Universal PCR Master Mix II* (Applied Biosystems, USA), aquesta mix conté els elements necessaris per detectar-lo mitjançant la plataforma *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, USA).

La valoració dels resultats de l'assaig *TaqMan* es va fer a partir de les mitjanes del valor Ct obtingudes amb les tres rèpliques utilitzades per a cada mostra. Aquest valor es calcula a partir del cicle de PCR en el que les mostres són detectades pel sensor de fluorescència, a partir d'un llindar determinat per l'usuari.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Extracció RNA

Els nostres resultats (Taula 2) van mostrar que el mètode *TRIzol* permet obtenir una mitjana de $2.4 \cdot 10^{-5}$ ng d'RNA (equivalent a 24fg) per espermatozoide, ajustant-se al que s'ha descrit a la bibliografia (Dadoune 2009). El grau de puresa d'aquestes mostres (ratio 260/280) va ser de 1.85 ± 0.2 en mitjana. Aquest valor és acceptable per mostres d'espermatozoides tenint en compte l'alta proporció de *TRIzol* utilitzat en les extraccions vers la reduïda quantitat d'RNA d'aquestes cèl·lules (Krebs et al. 2006).

Així doncs, a partir de les dades obtingudes, podem afirmar que el mètode d'extracció utilitzat permet obtenir mostres d'RNA d'espermatozoide amb pureses acceptables i amb concentracions finals coincidents amb les descrites a la bibliografia.

Confirmació de l'absència de DNA

Els resultats de les PCRs pels gens PRM1 (Figura 1) i GAPDH (Figura 2) realitzades a les mostres d'espermatozoides i mucosa bucal respectivament, van confirmar l'absència de DNA en tots els casos, ja que només van aparèixer amplificats els productes amb mides corresponents al cDNA.

Aquests resultats van indicar que l'extracció d'RNA seguit per un tractament amb DNasa permet l'obtenció d'un RNA lliure de contaminacions de DNA.

Anàlisi del transcriptoma

Els xips *Small-RNA* van confirmar la capacitat del mètode *TRIzol* per aïllar RNA de mides petites. Les mostres d'espermatozoides, van mostrar que en mitjana (\pm DE), un $51.8\% \pm 9.5$ dels RNA petits es corresponien a mides relatives a miRNAs (6-40nt). En les mostres provinents de mucosa bucal aquest percentatge va ser del $30.3\% \pm 4.9$. Per tant, els xips *Small-RNA* ens van indicar que el mètode *TRIzol* permet extreure el transcriptoma de l'espermatozoide englobant transcrits amb mides petites corresponents a miRNAs.

Per altra banda, els xips *Nano-RNA* van descartar la presència d'RNA d'origen somàtic ja que no es va observar cap pic electroforètic corresponent al rRNA (absent en espermatozoides). Aquests resultats van confirmar la validesa del mètode SCL per aïllar la fracció espermàtica. Per altra banda, també es va confirmar la integritat òptima de l'RNA obtingut ja que el valor de RIN calculat a partir de les mostres de cèl·lules Jurkatt va ser de 10 (0=fragmentat - 10=intacte). La extrapolació d'aquest índex a les

mostres d'espermatozoides va permetre concloure que les extraccions d'RNA es van realitzar correctament, evitant la seva fragmentació.

Anàlisi de la presència de hsa-let-7a

Els resultats obtinguts amb l'assaig de *TaqMan* per hsa-let-7a van revelar la presència d'aquest miRNA tant en les mostres d'espermatozoides, com en les de mucosa bucal. En els assajos realitzats, el valor de Ct es va situar entre 28.18 i 31.14 en espermatozoides i entre 27.17 i 29.36 en mucosa bucal (Figura 3 i Taula 3). En tots els casos aquests valors van ser inferiors a 32, límit a partir del qual l'expressió o la quantitat del miRNA es consideraria molt baixa. Aquestes dades corroboren que el hsa-let-7a és un miRNA d'expressió generalitzada i que es troba en la línia germinal masculina fins a l'espermatozoide.

Les dades recollides en aquest estudi han proporcionat evidències de que el mètode optimitzat d'extracció d'RNA permet l'aïllament del transcriptoma complet dels espermatozoides humans, incloent els miRNAs. Per tant es confirma la possibilitat de seguir endavant amb el desenvolupament del projecte, amb l'objectiu final d'avaluar la implicació de perfils alterats de miRNA com a causa subjacent dels problemes de fertilitat.

AGRAÏMENTS

Aquest treball ha estat possible gràcies als projectes 2009/SGR00282 i FIS PS-09-00330.

BIBLIOGRAFIA

- AMBROS, V. (2001). microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*, 107, 823-826.
- BOERKE, A.; DIELEMAN, S.J.; GADELLA, B.M. (2007). A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology*, 68 Suppl 1, S147-155.
- BOYD, S.D. (2008). Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask. *Lab Invest*, 88, 569-578.
- CHAN, J.A.; KRICHEVSKY, A.M.; KOSIK, K.S. (2005). MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.*, 65, 6029-6033.

- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159.
- DADOUNE, J.P. (2009). Spermatozoal RNAs: what about their functions? *Microsc Res Tech*, 72, 536-551.
- DOENCH, J.G.; SHARP, P.A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.*, 18, 504-511.
- ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F.J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6, 259-269.
- FIORE, R.; SIEGEL, G.; SCHRATT, G. (2008). MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1779, 471-478.
- GOODRICH, R.; JOHNSON, G.; KRAWETZ, S.A. (2007). The preparation of human spermatozoal RNA for clinical analysis. *Arch. Androl.*, 53, 161-167.
- HE, Z. [et al.] (2009). Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis. *Reproduction*, 137, 901-911.
- HWANG, H.W.; MENDELL, J.T. (2006). MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer*, 94, 776-780.
- INUI, M.; MARTELLO, G.; PICCOLO, S. (2010). MicroRNA control of signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11, 252-263.
- IOIRO, M.V. [et al.] (2005). MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. *Cancer Res.*, 65, 7065-7070.
- LEE, R.C.; FEINBAUM, L.; AMBROS, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843.
- LIAN, J. [et al.] (2009). Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. *Reprod Biol Endocrinol*, 7, 13.
- LU, J. [et al.] (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435, 834-838.
- MCCALLIE, B.; SCHOOLCRAFT, W.B.; KATZ-JAFFE, M.G. (2010). Aberration of blastocyst microRNA expression is associated with human infertility. *Fertil Steril*, 93, 2374-2382.
- PASQUINELLI, AE. [et al.] (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408, (6808): 86-89.
- TAKAMIZAWA, J. [et al.] (2004). Reduced Expression of the *let-7* MicroRNAs in Human Lung Cancers in Association with Shortened Postoperative Survival. *Cancer Res.*, 64, 3753-3756.
- TAN, Z., [et al.] (2007). Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am J Hum Genet*, 81, 829-834.
- TOLOUBEYDOKHTI [et al.] (2008). The expression and ovarian steroid regulation of endometrial micro-RNAs. *Semin Reprod*, 26, 469-478.
- VASUDEVAN, S.; TONG, Y.; STEITZ, J.A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318, 1931-1934.
- VAN ROOIJ, E. [et al.] (2007). Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*, 316, 575-579.

YANG, Q. [et al.] (2011). Low-level expression of *let-7a* in gastric cancer and its involvement in tumorigenesis by targeting *RAB40C*. *Carcinogenesis*, 32 [online].

Taula 1. Encebadors utilitzats en les PCRs d'amplificació dels productes corresponents a PRM1 i GAPDH.

Gen	Seqüències dels encebadors	Mida amplicó cDNA	Mida amplicó DNA
PRM1	5'-CAGAGTTCCACCTGCTCACA-3' 5'-GGATGGTGGCATTTC AAGA-3'	331pb	422pb
GAPDH	5'-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3' 5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3'	228pb	332pb

Taula 2. Resultats de les extraccions d'RNA en les mostres d'espermatozoides.

Mostra	Núm. espermatozoides (n)	RNA total (ng)	RNA/espermatozoide (ng)	Puresa
Z1.1	14.8*10 ⁶	445	3.0*10 ⁻⁵	1.68
Z1.2	15*10 ⁶	130	0.9*10 ⁻⁵	1.68
Z1.3	21.2*10 ⁶	545	2.6*10 ⁻⁵	1.74
Z1.4	12.6*10 ⁶	866	6.9*10 ⁻⁵	1.76
Z2.1	17.8*10 ⁶	219	1.2*10 ⁻⁵	2.09
Z2.2	23*10 ⁶	48	0.2*10 ⁻⁵	2.23
Z3	20.36*10 ⁶	417	2.0*10 ⁻⁵	1.83
mitjana±DE	17.8*10 ⁶ ±3.8*10 ⁶	381.4±279.1	2.4*10 ⁻⁵ ±2.0*10 ⁻⁵	1.85±0.2

Taula 3. Valors de la mitjana ±DE de Ct de les tres rèpliques de la mostra juntament amb el valor llindar marcat per l'usuari.

Mostra	Ct Mitjana ±DE	Llindar
Z1.1	29.326±0.17	0.064
Z1.2	29.734±0.35	0.064
Z1.3	30.079±0.02	0.064
Z1.4	30.139±0.13	0.064
Z2.1	31.143±0.12	0.064
Z2.2	29.322±0.24	0.064
Z3	28.181±0.18	0.064
MB4.1	27.389±0.16	0.064
MB4.2	27.169±0.10	0.064
MB4.3	29.359±0.16	0.064
MB4.4	29.298±0.15	0.064

DE= desviació estàndard