

EXPRESSIÓ GÈNICA ALS DIFERENTS TIPUS CELLULARS DE LA LÍNIA GERMINAL DURANT L'ESPERMATOGÈNESI DEL LLOBARRO (*Dicentrarchus labrax*)

Jordi Viñas, Francesc Piferrer

Institut de Ciències del mar, CSIC, Barcelona

Passeig Marítim de la Barceloneta, 37-49. 08003 Barcelona. jvinas@icm.csic.es.

Resum

L'espermatogènesi és el procés de desenvolupament d'una gònada masculina immadura a una totalment madura. En el llobarro (*Dicentrarchus labrax*), una espècie de gran importància comercial, la maduració precoç d'una fracció de mascles comporta un dels grans problemes en el cultiu d'aquesta espècie. Així, un dels punts més importants per a establir la precocitat en els mascles és l'estudi dels patrons d'expressió gènica en les diferents poblacions cellulars que apareixen durant l'espermatogènesi del llobarro. En aquest estudi s'ha optimitzat una nova tècnica, la microdissecció làser (*laser capture microdissection*, LCM) que, juntament amb una PCR semiquantitativa, permet determinar l'expressió gènica en poblacions cellulars específiques. Concretament, s'ha determinat l'expressió de fins a set gens diferents, prèviament clonats en llobarro, durant la progressió espermàtica de les cèl·lules germinals, que va des de l'espermatogònia fins a l'espermatozoide. El coneixement dels patrons d'expressió d'aquests gens permet determinar quin és el seu paper en l'espermatogènesi i establir les seves possibles implicacions en la presència de mascles precoços.

Paraules clau Espermatogènesi, expressió gènica, Laser Capture Microdissection, llobarro.

Abstract

Spermatogenesis is developmental sequence of an immature testis into fully mature testis. The European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), is one the key species of the marine aquaculture in south Europe. A major disadvantage of sea bass culture is the presence of precocious males that mature at the first year of life. One of the key points for understanding the molecular basis of male precocity is the quantification of gene expression in specific cell populations. We optimized a newly developed technique, *Laser Capture Microdissection* (LCM), coupled with semiquantitative PCR that allows determining the precise expression pattern of genes in specific cell populations throughout testis development. We quantified the expression pattern of seven genes during the germ cell line progression from spermatogonia to spermatozoa that were already cloned in the sea bass. Knowledge of the specific expression levels of these genes will be useful to investigate their role in male spermatogenesis and their possible implications in the phenomenon of male precocity in sea bass aquaculture.

Key words Spermatogenesis, genic expression, Laser Capture Microdissection, sea bass.

INTRODUCCIÓ

L'espermatogènesi és un procés molt complex que involucra tota una sèrie d'interaccions cellulars perfectament ordenades en el temps i l'espai, i comporta la transformació d'una gònada masculina immadura a un testicle totalment madur i ple d'espermatozoides. Tot i aquesta complexitat, els aspectes essencials d'aquest procés són molt similars en totes les espècies de vertebrats (Callard *et al.*, 1989). El procés de l'espermatogènesi s'inicia mitjançant mitosi de les cèl·lules germinals inicials o es-

permatogònies, que dona lloc als espermatòcits primaris. Seguidament, una primera divisió meiòtica transforma els espermatòcits primaris en espermatòcits secundaris. La segona divisió meiòtica produeix les espermàtides, que finalment es transformen en espermatozoides. Tot aquest procés té un control genètic i endocrí molt complex que, malgrat els avenços realitzats en els darrers anys, dista molt de ser ben comprès.

El coneixement de la reproducció i la seva regulació és fonamental en espècies de gran importància comercial com, per exemple, el llobarro (*Dicen-*

Taula 1 Condicions de PCR per a cadascun dels gens.

gen	Nr. cicles	Vf PCR (μ l)	cDNA (μ l)	Quantitat de teixit (μ m ³)	Nr. cel.	Ref.
18s	25	25	1	10.000	230	1
<i>vasa</i>	30	12,5	0,5	500.000	11.500	<i>Unpl.</i>
AR	35	12,5	1	800.000	18.000	1
ER α	40	12,5	2	800.000	18.000	2
ER β 1	40	12,5	2	800.000	18.000	2
ER β 2	40	12,5	2	800.000	18.000	2
Arom	35	12,5	1	800.000	18.000	3

Referències 1: Blázquez i Piferrer (2005); 2: Halm *et al.* (2004); 3: Dalla Valle *et al.* (2002).

trarchus labrax). Aquest peix teleosti no solament constitueix una de les espècies més importants de l'aqüicultura del sud d'Europa, sinó que, a més, darrerament s'ha consolidat com un model en estudis de reproducció. Tot i així, existeixen aspectes relacionats amb la seva reproducció que necessiten ser estudiats més profundament. Per exemple, la maduració precoç, un any abans del que seria esperable, d'aproximadament un 30 % del mascles (Zanuy *et al.*, 2001), provoca pèrdues molt considerables en els cultius, ja que, en madurar, aquests animals aturen el seu creixement. Així doncs, és necessari estudiar en profunditat el control de l'espermatogènesi per a entendre les claus de la maduració normal i precoç.

La implementació a partir de finals dels anys noranta de la tècnica de microdissecció de teixits assistida per làser (*laser capture microdissection*, LCM) ha representat un avanç important en els mètodes de separació cel·lular (Emmert-Buck *et al.*, 1996). La LCM permet, de forma fiable i ràpida, l'extracció i

aïllament de poblacions cel·lulars pures, o fins i tot de cèl·lules individuals. Existeixen diferents variants de la LCM. En el cas de la LMPC (*laser microdissection pressure catapulting*), la metodologia es basa en un microscopi invertit al qual s'ha acoblat un làser d'infraroigs (IR). La secció de teixit, normalment conservada en congelació, es diposita sobre un portaobjectes recobert amb una membrana d'acetat vinil etilè (EVA). Un cop tenyida, la secció de teixit es visualitza en el microscopi i les cèl·lules a capturar són seleccionades, retallades amb el làser i catapultades en un tub de microcentrifuga mitjançant un pols de làser. A més, amb una manipulació curosa, el procediment permet extreure RNA amb una qualitat suficient per a estudis d'expressió de gens concrets o fins i tot de patrons globals d'expressió mitjançant la hibridació de l'RNA obtingut en un microxip.

L'objectiu d'aquest estudi fou determinar el patró d'expressió de diversos gens relacionat amb la reproducció del llobarro i esbrinar el seu possible paper en la regulació de l'espermatogènesi. Mitjançant

A. Identificació cel·lular



B. Microdissecció i catapultació

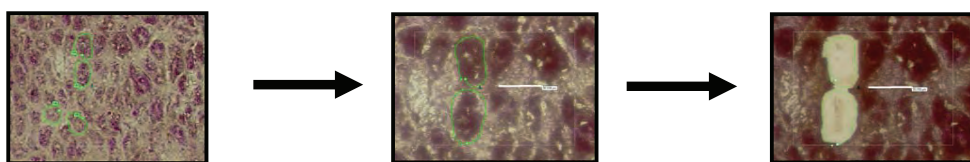


Figura 1 Procés de microdissecció d'un testicle de llobarro. A) Identificació dels tipus cel·lulars. B) Procés de catapultació.

l'ús de la LMPC es poden seleccionar específicament els quatre tipus principals de cèl·lules germinals presents en l'espermatogènesi: espermatogònies, espermatòcits, espermatides i espermatozoides. A partir de l'RNA total extret en cadascuna de les poblacions cel·lulars es van avaluar els patrons d'expressió de fins a set gens presumiblement involucrats en la regulació de l'espermatogènesi.

MATERIAL I MÈTODES

Identificació i obtenció de cèl·lules

Els testicles s'obtingueren de llobarros mascles mantinguts a la Zona d'Aquaris Experimentals de l'Institut de Ciències del Mar de Barcelona (CSIC). Els mascles foren escollits segons el seu estadi de maduració, per a obtenir tots els estadis cel·lulars necessaris. El teixit va ser hemiseccionat i una part va ser immediatament congelada en nitrogen líquid per a una anàlisi posterior per LMPC, mentre que l'altra va ser processada per histologia convencional a fi de determinar amb precisió l'estadi de desenvolupament i els diferents tipus cel·lulars presents. La preparació de les mostres per a una correcta microdissecció requereix molta cura i l'ús de material lliure de RNAses. A grans trets, les fraccions de teixit congelades a -80°C s'inclogueren en un medi apropiat (*optimal cutting compound*, OCT), i posteriorment se seccionaren a un gruix de $10\ \mu\text{m}$ en un criostat i es dipositaren en un portaobjectes amb una membra-

na d'EVA (*PALM slide membrane*). Just abans de la microdissecció les mostres es van tenyir 30 s amb hematoxilina. El procés de microdissecció es realitzà amb l'ajuda d'un robot microBeam (PALM Microlaser Technologies, Alemanya) durant uns 30 min fins a obtenir aproximadament $1 \times 10^6\ \mu\text{m}^3$ de cèl·lules (figura 1). Per a l'extracció de l'RNA total es va utilitzar el *kit* RNAeasy Microkit (QIAGEN) amb petites modificacions del protocol descrit. La quantitat i qualitat de l'RNA es va determinar amb un *bionalyzer* (Agilent) i *nanodrop* (NanoDrop Technologies), respectivament.

Amplificació dels gens i PCR semiquantitativa

Els gens escollits per a observar-ne el patró d'expressió, per als quals ja es disposava de les seqüències, estan tots relacionats en un possible control de l'espermatogènesi. Aquests gens foren: *vasa*, un marcador específic de les cèl·lules germinals (seqüència per publicar); les tres isoformes del receptor d'estrogen (Halm *et al.*, 2004); el receptor d'androgen (Blázquez i Piferrer, 2005) i el citocrom P450-aromatasa (Dalla Valle *et al.*, 2002). En tots els casos l'expressió relativa es va mesurar utilitzant el 18S com a gen de referència. Per a cadascun dels gens es va comprovar tant la cinètica de la reacció com les condicions òptimes de PCR. La comprovació dels productes es va realitzar en gels d'agarosa a l'1,5 %. A la taula 1 s'indiquen les condicions de PCR per a cadascun dels gens estudiats.

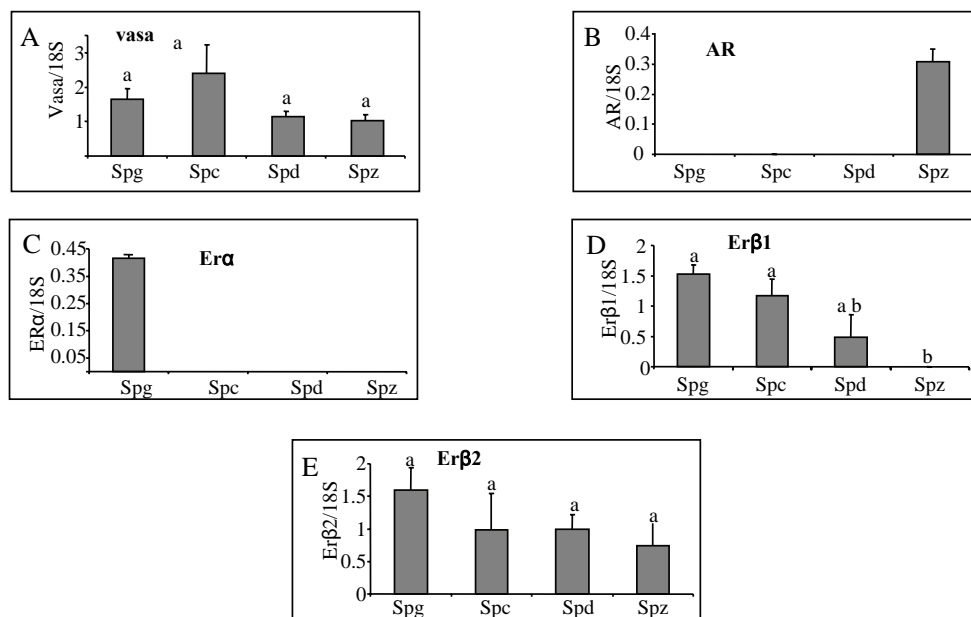


Figura 2 Patrons d'expressió dels gens analitzats. A: *vasa*; B: Receptor d'androgen (AR); C: Receptor d'estrogen α (ER α); D: Receptor d'estrogen β 1 (ER β 1); E: Receptor d'estrogen (ER β 1). Spg: espermatogònies; Spc: espermatòcits; Spd: espermatides; Spz: espermatozoides.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

La LMPC, justament un mètode molt eficient d'extracció de RNA de quantitats extremadament petites de teixit, ha premès estudiar el patró d'expressió de gens rellevants durant la progressió espermatogènica del llobarro.

En primer lloc, cal destacar que s'observà una expressió uniforme del gen 18S al llarg de tota l'espermatogènesi. Aquest fet és molt important, ja que aquest gen es va utilitzar com a referència per a estimar l'expressió de tots els altres gens. Per la seva part, *vasa*, un marcador específic de cèl·lules germinals en animals (Olsen *et al.*, 1997) fou detectat en totes les poblacions de cèl·lules catapultades, fet que indicava la presència de cèl·lules germinals en tots els casos (figura 2A). Tot i així, la seva expressió no fou contínua al llarg de la progressió espermatogènica, amb un màxim als espermatòcits. Aquest resultat és similar al de la carpa Gibel (*Carassius auratus gibelio*), en la qual també s'observà, mitjançant la tècnica d'hibridació *in situ*, un màxim d'expressió en els espermatòcits, encara que la seva expressió desaparegué totalment en les espermatòides i espermatozoides (Xu *et al.*, 2005).

Un altre gen estudiat fou el receptor d'androgen (AR), clonat en el llobarro per Blázquez i Piferrer (2005). Els andrògens són els esteroides sexuals amb l'efecte regulador més important sobre l'espermatogènesi (Schulz i Miura, 2002). En estudis anteriors realitzat en peixos i mamífers, l'AR només fou detectat en les cèl·lules de Sertoli i al principi de l'espermatogènesi (Callard *et al.*, 1989; Ikeuchi *et al.*, 2001). En el present estudi, però, fou possible detectar expressió, encara que a un nivell molt baix, en els espermatozoides (figura 2B). Els espermatozoides, per la seva abundància i posició dintre del lòbul testicular, són relativament fàcils d'aïllar per LCM. Això suggereix que la seva detecció no és deguda a contaminació d'aquest tipus cel·lulars amb cèl·lules de Sertoli, per la qual cosa cal determinar amb més precisió el significat o funció d'AR en aquest tipus cel·lular.

També es van avaluar canvis en l'expressió de les tres isoformes del receptor d'estrogen com a veritables efectors de l'estrogen al testicle mitjançant l'anàlisi de l'expressió dels tres receptors d'estrogen (E α , Er β 1 i Er β 2) (Halm *et al.*, 2004), i de l'enzim que el produeix analitzant l'expressió del gen de l'aromatasa (*cyt P450arom*) (Dalla Valle *et al.*, 2002) L'aromatasa és l'enzim responsable de la transformació d'andrògens a estrògens. Malgrat que la funció de l'estrogen en l'espermatogènesi no sigui tan important com la dels andrògens, s'ha demostrat que aquest esteroide sexual hi té també una implicació

(O'Donnell *et al.*, 2001). Curiosament, però, no es va detectar l'expressió del *cyt P450arom* en cap estadi cel·lular de l'espermatogènesi, tot i que en estudis anteriors realitzats en mamífers sí que s'observava expressió d'aquest gen en les espermatòides (O'Donnell *et al.*, 2001). Cal dir que en una anàlisi de LMPC en ovaris de llobarro si que es va detectar expressió del *cyt P450arom*. Malgrat aquest resultat negatiu, aquest fet confirmaria l'expressió molt més elevada del gen de l'aromatasa en ovaris que en testicles en llobarro (M. Blázquez, comunicació personal). Pel que fa als tres receptors d'estrogen, s'observà un alt nivell d'expressió molt elevat (figura 2C, 2D i 2E). Tot i així, l'expressió de l'E α està restringida al principi de l'espermatogènesi, en les espermatogònies, amb una manca d'expressió en els següents estadis. Per altra banda, els receptors Er β 1 i Er β 2 presentaren un patró d'expressió similar amb una reducció de la seva expressió a mesura que l'espermatogènesi avança. El patró similar d'expressió dels tres receptors d'estrogen, amb una disminució de l'expressió al llarg de la progressió espermatogènica, suposa un major efecte d'aquest esteroide sexual al principi de l'espermatogènesi. En canvi, la falta d'expressió del gen de l'aromatasa durant l'espermatogènesi estaria d'acord amb la seva síntesi a les cèl·lules somàtiques. Tot i així, la implicació de l'estrogen al llarg de l'espermatogènesi necessitaria ser investigada més profundament.

En conclusió, aquesta metodologia permet estudiar l'expressió gènica durant l'espermatogènesi. De fet, la tècnica de la LCM permet investigar els patrons d'expressió a qualsevol teixit que tingui diferents estadis cel·lulars. En el nostre cas l'ús d'aquesta metodologia ha permès estudiar una bateria de fins a set gens diferents relacionats amb l'espermatogènesi. Actualment s'està augmentant el nombre de gens a estudiar, i també s'estan aplicant metodologies més sensibles, tals com la PCR a temps real, per a aprofundir millor en l'estudi de l'espermatogènesi.

BIBLIOGRAFIA

- BLÁZQUEZ, M.; PIFERRER, F. (2005). «Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) androgen receptor: cDNA cloning, tissue-specific expression, and mRNA levels during early development and sex differentiation». *Mol. Cel. Endocrinol.*, 237: 37-48.
- CALLARD, G.; MAK, P.; DUBOIS, W.; CUEVAS, M. E. (1989). «Regulation of Spermatogenesis - the Shark Testis Model». *J. Exp. Zool.*, 2: 23-34.
- DALLA VALLE, L.; LUNARDI, L.; COLOMBO, L.; BELVEDERE, P. (2002). «European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) cytochrome P450arom: cDNA

- cloning, expression and genomic organization». *J. Steroid. Biochem.*, 80: 25-34.
- EMMERT-BUCK, M. R.; BONNER, R. F.; SMITH, P. D.; CHUAQUI, R. F.; ZHUANG, Z.; GOLDSTEIN, S. R.; WEISS, R. A.; LIOTTA, L. A. (1996). «Laser capture microdissection». *Science*, 274: 998-1001.
- HALM, S.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, G.; RODRIGUEZ, L.; PRAT, F.; MYLONAS, C. C.; CARRILLO, M.; ZANUY, S. (2004). «Cloning, characterisation, and expression of three oestrogen receptors (ER α , ER β 1 and ER β 2) in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*». *Mol. Cel. Endocrinol.*, 63-75.
- IKEUCHI, T.; TODO, T.; KOBAYASHI, T.; NAGAHAMA, Y. (2001). «Two subtypes of androgen and progestogen receptors in fish testes». *Comp. Biochem. Phys.*, 129: 449-455.
- O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K. M.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R. (2001). «Estrogen and spermatogenesis». *Endocr. Rev.*, 22: 289-318.
- OLSEN, L. C.; AASLAND, R.; FJOSE, A. (1997). «A vasa-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells». *Mech. Dev.*, 66: 95-105.
- SCHULZ, R. W.; MIURA, T. (2002). «Spermatogenesis and its endocrine regulation». *Fish Physiol. Biochem.*, 26: 43-56.
- XU, H. Y.; GUI, J. F.; HONG, Y. H. (2005). «Differential expression of vasa RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate». *Dev. Dynam.*, 233: 872-882.
- ZANUY, S.; CARRILLO, M.; FELIP, A.; RODRIGUEZ, L.; BLAZQUEZ, M.; RAMOS, J.; PIFERRER, F. (2001). «Genetic, hormonal and environmental approaches for the control of reproduction in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)». *Aquaculture*, 202: 187-203.