Biologia de la reproducció
Vol. 16, p. 29-34 (2019)

RNAs CIRCULARES: NUEVOS TIPOS DE RNAs NO CODIFICANTES IDENTIFICADOS EN EL ESPERMATOZOIDE HUMANO

Ainitze Odriozola[1#], Ada Soler-Ventura[1#], Judit Castillo[1], David Delgado-Dueñas[1], Josep Lluís Ballescà[1,2], Rafael Oliva[1,3*], Meritxell Jodar[1*]

[1] Grupo de Biología Molecular de la Reproducción y el Desarrollo, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica, (FCRB), Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Barcelona, 08036 Barcelona.

[2] Instituto Clínico de Ginecología, Obstetrícia y Neonatología (ICGON), Hospital Clínic, 08036 Barcelona.

[3] Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, 08036 Barcelona.

[#] Estos autores han contribuido por igual en este trabajo.

*Autor de correspondencia: Meritxell Jodar. e-mail: meritxell.jodar@ub.edu; Rafael Oliva. e-mail: roliva@ub.edu

Resumen

Una gran proporción de los RNAs de espermatozoide corresponden a RNAs no codificantes (ncRNAs), entre los cuales encontramos unos elementos intrónicos (EI) que parecen retenerse de forma específica en el espermatozoide. Estudios previos *in silico* sugieren que estas regiones intrónicas podrían ser circulares. Los RNAs circulares (circRNAs) son más estables que los lineares y presentan papeles regulatorios tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. Su estabilidad, así como su potencial papel epigenético sugieren que los circRNAs presentes en el espermatozoide podrían ser importantes para la embriogénesis temprana. En el presente estudio se han validado experimentalmente 4 de los EI más abundantes en el espermatozoide, que derivan de los genes *QRICH1*, *AP2A1*, *ZMYND15* y *TRIM66*, como circRNAs. Para ello, primero se ha determinado el punto de circularización mediante la amplificación de estas regiones con *primers* divergentes, que amplifican específicamente las formas circulares, seguida de la secuenciación directa de los productos. A continuación, se ha probado la resistencia de estos 4 circRNAs al tratamiento de RNAsa R, que digiere específicamente los RNAs lineares. Además, los resultados derivados del test de resistencia al tratamiento de RNAsa R sugieren que las formas lineares de los 4 EI en estudio son minoritarias en el espermatozoide humano.

Palabras clave: RNA de espermatozoide, elementos intronicos, circRNAs, espermatozoide humano.

Abstract

Most of sperm RNAs are non coding RNAs (ncRNAs), which include some specific intronic retained elements (IRE). Previous *in silico* analysis suggest that such IREs could be potential circular RNAs (circRNAs). CircRNAs are more stable than their linear counterparts and play regulatory roles at both transcriptional and posttranscriptional levels. Their stability, together with their potential epigenetic role suggest that sperm circRNAs could be essential at early embryogenesis. In the current study, we have demonstrated that 4 of the most abundant sperm IREs, derived from *QRICH1, AP2A2, ZMYND15* and *TRIM66* genes are circRNAs. Firstly, we established the backsplice junctions of the 4 selected IREs by amplifying them with divergent primers, which can only amplify circular forms, followed by a direct sequencing of the products. Subsequently, we demonstrated that the 4 IREs were resistant to RNAse R treatment, which specifically digests linear RNAs. Moreover, the results derived from RNAse treatment indicate that the linear counterpart of the 4 sperm IREs are almost absent in the human sperm.

Key words: Sperm RNAs, intronic elements, circRNAs, human sperm.

INTRODUCCIÓN

La contribución paterna durante las primeras etapas de la embriogénesis parece no limitarse solamente a la aportación del DNA genómico como previamente se había postulado. Varios estudios han demostrado que el espermatozoide presenta un DNA con varias marcas epigenéticas, así como una compleja población de proteínas y RNAs (Jodar *et al.*, 2013; Jodar *et al.*, 2016; Castillo *et al.*, 2018) que podrían tener un papel impor-

tante durante los primeros estadios del desarrollo embrionario. Durante las etapas finales de la espermatogénesis, los procesos de transcripción y traducción se bloquean debido a la compactación de la cromatina por la incorporación de las protaminas y a la pérdida de la mayor parte del citoplasma en forma de gota citoplasmática (Oliva *et al.*, 2006). Sin embargo, existe una pequeña población de RNAs que se retiene de forma específica en el espermatozoide maduro (Ostermeier *et al.*, 2004; Jodar *et al.*, 2013) y que ha sido caracterizada mediante estudios de RNA-seq (Jodar *et al.*, 2013).

Una gran proporción de los RNAs que se encuentran en el espermatozoide corresponden a RNAs no codificantes. Algunos de ellos han sido identificados en otros tipos celulares, pero otros parecen ser específicos del espermatozoide, como por ejemplo ciertos RNAs derivados de intrones que conocemos como elementos intrónicos (EI).

Recientemente, en otros tipos celulares, se ha identificado un nuevo tipo de RNA no codificante: los RNAs circulares (circRNAs) (Salzman *et al.*, 2012). Hasta día de hoy se han descrito tres tipos de circRNAs: los exónicos, los intrónicos y los compuestos por regiones exón-intrón (EIcircRNAs) (Greene, *et al*, 2017). La circularización de estos RNAs se produce por un enlace covalente, denominado *backsplicing*, dando lugar a un circRNA sin extremo 3'. La ausencia de este extremo 3´ hace que las formas circulares sean resistentes a la digestión por exonucleasas y puedan tener una vida mucho más larga que los RNAs lineares (Szabo & Salzman, 2016). Además, se ha descrito que los circRNAs podrían tener papeles regulatorios importantes tanto a nivel transcripcional como postranscipcional. Algunas de las funciones descritas hasta el momento incluyen la regulación del *splicing* alternativo (Zhang *et al.*, 2014), la modulación de la actividad de la RNA polimerasa II (Zhang *et al.*, 2013), la regulación de las *RNA-binding proteins* (Hentze & Preiss, 2013) o la función de esponja de miRNAs (Memczak *et al.*, 2013).

Diversos programas informáticos permiten la predicción *in silico* de circRNAs (Szabo & Salzman, 2016). Sin embargo, estas predicciones siempre deben ir acompañadas de una validación experimental (Barrett & Salzman, 2016). Para ello, primero se debe establecer el punto de circularización mediante la amplificación específica del circRNA elegido con *primers* divergentes y, seguidamente, proceder a su secuenciación (Figura 1A). A continuación, debe valorarse la resistencia tanto del circRNA como de su respectiva forma linear al tratamiento con RNasa R, que es una exoribonucleasa que hidroliza el extremo 3´ libre de los RNAs, degradando así los RNAs lineares y dejando los circRNAs intactos (Figura 1B).

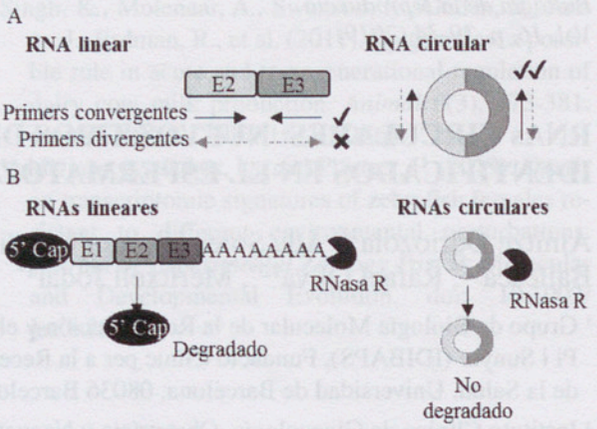

Figura 1. Validación experimental de circRNAs. **A)** Posibles amplificaciones de los RNAs lineares y circulares mediante RT-PCR usando primers convergentes y divergentes. **B)** Representación gráfica del funcionamiento del tratamiento con RNAsa R que hidroliza específicamente RNAs lineares y mantiene intactos los circRNAs.

Nuestro grupo ha identificado múltiples circRNAs exónicos en el espermatozoide mediante la aplicación de estos programas informáticos a datos propios de secuenciación masiva, sin embargo, no se ha detectado ningún circRNA intrónico. Dado que los EI son muy abundantes en el espermatozoide y que a día de hoy no existen herramientas bioinformáticas para una predicción rigurosa de circRNAs intrónicos, el objetivo de este trabajo es validar experimentalmente que los EI más abundantes en el espermatozoide son circRNAs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección *in silico* de circRNAs intrónicos

Los EI presentes en el espermatozoide fueron extraídos de la lista proporcionada en Jodar et al., 2015. De todos los candidatos, los más abundantes fueron visualizados mediante el software UCSC Genome Browser y las regiones intrónicas con mayor cantidad de lecturas fueron seleccionadas para analizar su posible forma circular.

Recolección de las muestras

Las muestras de semen utilizadas en el estudio fueron obtenidas de pacientes sometidos a un análisis rutinario de semen en la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Clínic de Barcelona, tras 3-5 días de abstinencia sexual y habiendo firmado un consentimiento informado. Los parámetros seminales fueron analizados mediante el sistema de análisis automático de semen

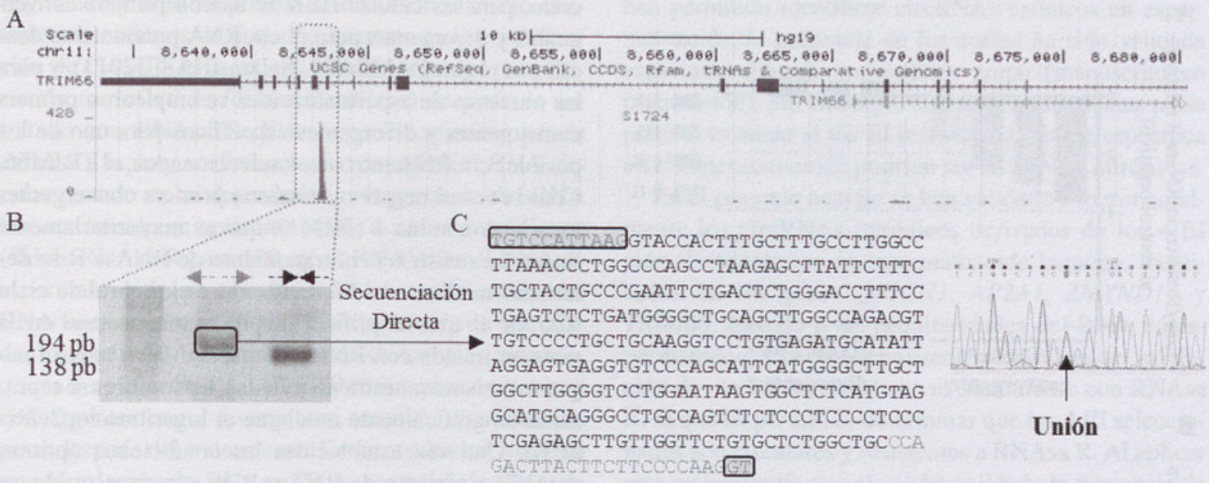

Figura 2. Selección *in sílico* de circRNAs y determinación de su punto de circularización. A) Visualización en el UCSC Genome Browser de los datos de RNA-seq de espermatozoide humano que muestra un RNA en un intrón específico del gen *TRIM66*. **B)** Productos del elemento intrónico TRIM66 obtenidos mediante RT-qPCR con *primers* convergentes y divergentes. **C)** La secuenciación directa del producto de PCR amplificado con *primers* divergentes que permite determinar el punto exacto de circularización del elemento intrónico TRIM66. Las cajas grises indican los exones circundantes y la secuencia específica del circRNA intrónico de TRIM66 está en negrita.

CASA (Proiser). Las muestras de este estudio fueron clasificadas como normozoospérmicas según los límites de referencia establecidos por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010). El uso del material biológico humano se ajustó a las directrices de la Junta de Revisión Interna y fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic de Barcelona. Los espermatozoides fueron purificados mediante gradientes de densidad con PureSperm® al 50 % (Nidacon) y se verificó que todas las muestras contuvieran < 1 % de contaminación somática. Posteriormente, las muestras se criopreservaron con Cryosperm™ (Origio) y se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta el momento de su procesamiento.

Extracción de RNA

La fracción de RNA de >200 nucleótidos (longRNAs) fue extraída a partir de 15 millones de espermatozoides o de 1 millón de células *Human Embryonic Kidney* (HEK), siguiendo el protocolo del RNeasy Mini Kit (Qiagen) con ciertas modificaciones previamente establecidas en Goodrich *et al.* 2013. A continuación, se eliminó cualquier resto de DNA con el *Turbo DNAse free kit* (Invitrogen) y su ausencia fue verificada mediante la amplificación específica por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) del gen de la protamina 1 (*PRM1*). Finalmente, se cuantificó el RNA con el *Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Assay Kit* (Invitrogen).

Determinación de los posibles circRNAs derivados de regiones intrónicas en el espermatozoide humano

En el presente estudio se diseñaron *primers* convergentes y divergentes para amplificar 4 de los EI más abundantes en el espermatozoide humano, los cuales derivan de los genes *QRICH1*, *AP2A1*, *ZMYND15* y *TRIM66*, y que podrían ser circRNAs intrónicos. La amplificación de un RNA con *primers* divergentes sugiere la existencia de una forma circular, y la secuenciación directa de su correspondiente producto permite determinar el punto de circularización.

Validación de circRNAs mediante el tratamiento con RNAsa R

Debido a las peculiaridades del RNA de espermatozoide, primero se optimizó el tratamiento de RNAsa R (Epicentre). Para ello, 100 ng de RNA proveniente de espermatozoides o de células HEK fueron sometidos a unidades decrecientes de RNAsa R (5 U, 1 U, 0.5 U o 0.1 U) durante 30 min a 37 ºC, junto con el control negativo que fue sometido al mismo tratamiento, pero sin RNasa R. La síntesis de cDNA se realizó utilizando random hexamers (Thermo Scientific) y Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Scientific). Para determinar la eficacia del tratamiento con RNAsa R se llevó a cabo una amplificación por qPCR con primers convergentes y divergentes específicos de cada tipo celular. En con-

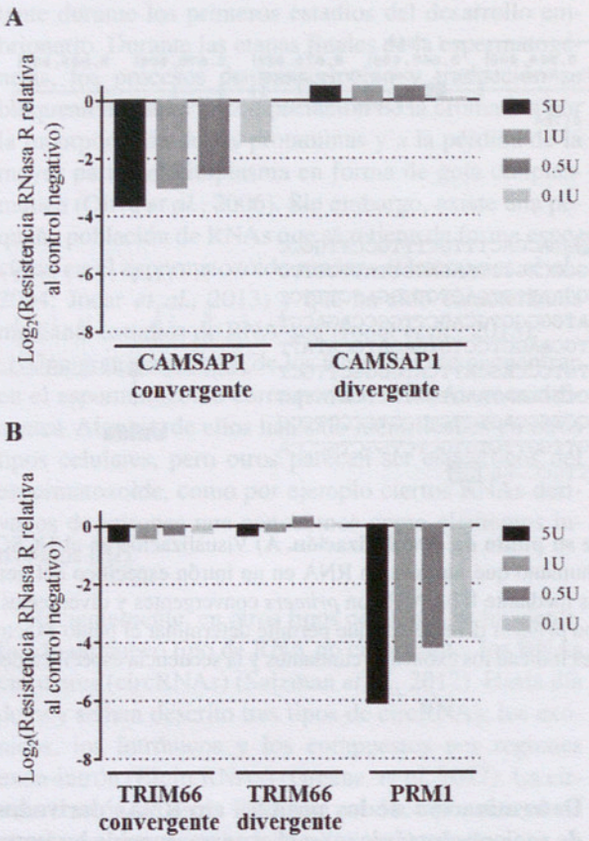

Figura 3. Optimización del tratamiento de RNAsa R en espermatozoide. A) Resistencia a unidades decrecientes de RNAsa R relativa al control negativo de la forma lineal y circular del RNA CAMPSA1 en células HEK. **B)** Resistencia a unidades decrecientes de RNAsa R relativa al control negativo de la forma circular del EI TRIM66 y de las formas lineares de los RNAs de PRM1 y del EI TRIM66 en espermatozoide humano.

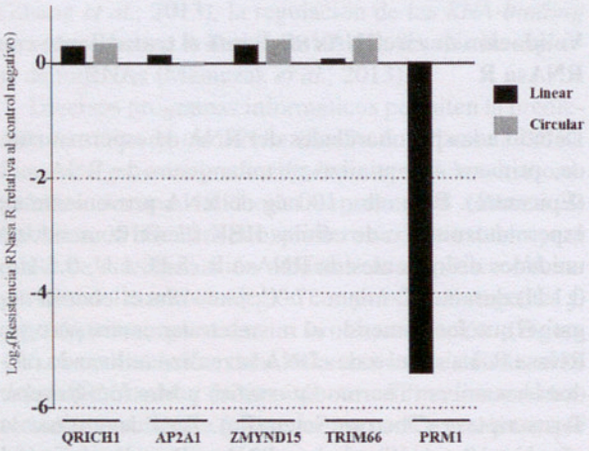

Figura 4. Validación de la resistencia al tratamiento con RNAsa R de los 4 EI seleccionados.

creto, para las células HEK se usaron primers convergentes y divergentes para el circRNA previamente descrito en el gen CAMSAP1 (Salzman et al., 2013), y para las muestras de espermatozoides se emplearon primers convergentes y divergentes específicos para uno de los posibles circRNA intrónicos seleccionados, el TRIM66. Como control negativo se usaron primers convergentes para la protamina 1 (PRM1), que es mayoritariamente linear. La resistencia al tratamiento de RNAsa R se determinó mediante la diferencia entre el umbral de ciclo (Ct) en el que amplifica un producto concreto en la muestra tratada con RNasa R respecto a su control negativo (misma muestra no tratada). Los valores se representaron gráficamente mediante el logaritmo log2(2^(-ΔCt)). Una vez establecidas las condiciones óptimas para el tratamiento de RNAsa R en espermatozoide, se procedió al análisis de la resistencia de los circRNAs intrónicos de interés.

RESULTADOS

Predicción de circRNAs intrónicos

Un total de 112 EI fueron extraídos del artículo Jodar *et al.* 2015 y se eligieron 4 de los más abundantes para determinar posibles circRNAs intrónicos. Los EI seleccionados derivan de los genes *QRICH1*, *AP2A1*, *ZMYND15* y *TRIM66*. Estos genes están implicados en la regulación de la transcripción de la RNA polimerasa II, en la regulación del transporte de vesículas por la membrana plasmática, en la regulación de histona desacetilasa y la espermiogénesis y en la represión transcripcional, respectivamente.

Determinación de los posibles circRNA intrónicos y del punto de circularización

Los 4 EI seleccionados amplificaron con los *primers* divergentes diseñados y la secuenciación de los productos de PCR permitió identificar de manera precisa el punto de circularización de los mismos (Figura 2).

Optimización del tratamiento con RNAsa R en el espermatozoide

El protocolo estándar para determinar la resistencia del RNA al tratamiento con RNAsa R indica el uso de 5 unidades de RNAsa R por 100 ng de RNA. Como podemos observar en la Figura 3A, la amplificación en células HEK del producto CAMPSAP1 con *primers* convergentes (amplificación de formas lineares y circulares) disminuye 4 unidades después del tratamiento con RNAsa R, ya que la mayor parte de la forma linear se ha

degradado y solo amplifica la forma circular. No obstante, observamos un pequeño aumento en la amplificación de CAMPSAP1 con *primers* divergentes (amplificación exclusiva de formas circulares) después de ser tratado con RNAsa R. Este pequeño aumento puede deberse a la mayor eficiencia en transcribir el RNA circular cuando se ha degradado la mayor parte del RNA linear. Cuando se aplicaron estas mismas condiciones (5U de RNAsa R para 100 ng de RNA) para el RNA de espermatozoide, se observó que la amplificación del RNA linear control (PRM1) disminuía más de 6 unidades después del tratamiento con RNAsa R y, además, que la amplificación del EI TRIM66, tanto con *primers* convergentes como divergentes, también disminuía un poco después del tratamiento. Estos resultados sugieren que la relación de RNAsa R por cantidad de RNA de espermatozoide es demasiado elevada y esta enzima podría estar degradando también los RNAs circulares.

Para optimizar el tratamiento del RNA de espermatozoide con RNAsa R analizamos la resistencia al tratamiento de los RNAs lineares y circulares con unidades decrecientes de RNAsa R (Figura 3). La disminución de 4 unidades en la amplificación de PRM1 con *primers* convergentes, así como el pequeño aumento en la amplificación de TRIM66 con *primers* divergentes en la condición de 0.5 U de RNAsa R por 100 ng de RNA, mimetizan los resultados obtenidos en células somáticas con el tratamiento estándar (5 U por 100 ng), sugiriendo que ésta es la cantidad óptima para el tratamiento con RNAsa R de RNA de espermatozoide (Figura 3B). No obstante, cabe destacar que no se observa una gran disminución de la amplificación de TRIM66 con *primers* convergentes una vez el RNA de espermatozoide es tratado con 0.5 U de RNAsa R, sugiriendo que la forma linear del EI TRIM66 es minoritaria (Figura 3B).

Validación de los circRNAs intrónicos candidatos

Los 4 EI seleccionados muestran resistencia al tratamiento con RNasa R (0.5 U) tanto para su amplificación con *primers* convergentes como divergentes. Estos resultados junto con la susceptibilidad del RNA linear de PRM1, que verifica la efectividad del tratamiento con RNAsa R, indican que los EI seleccionados se encuentran mayoritariamente en forma circular (Figura 4).

DISCUSIÓN

Tras el descubrimiento de los circRNAs, muchos estudios han identificado este nuevo tipo de RNA en diferentes tipos celulares, pero su presencia en el gameto masculino no se había descrito hasta el momento. Las herramientas bioinformáticas de predicción de circRNAs han permitido identificar circRNAs exónicos en espermatozoide, la presencia de los cuales ha sido validada experimentalmente por nuestro grupo (manuscrito en preparación). Sin embargo, con éstas herramientas no se pudo determinar si los EI retenidos de forma específica en el espermatozoide podrían ser circRNAs intrónicos.

En el presente estudio se han validado experimentalmente los circRNAs intrónicos derivados de los 4 EI más abundantes en el espermatozoide humano, localizados en los genes *QRICH1*, *AP2A1*, *ZMYND15* y *TRIM66*. Debido a las peculiaridades del RNA de espermatozoide, se ha optimizado el método de validación de circRNAs basado en el tratamiento con RNAsa R, lo que ha permitido determinar que los 4 EI seleccionados son circulares y resistentes a RNAsa R. Al aplicar esta metodología no solo se ha validado la presencia de circRNAs, sino que también se ha observado que son la forma mayoritaria en la que se presentan los EI seleccionados. Estos resultados apuntan que el resto de los EI retenidos en el espermatozoide también puedan ser circRNAs. Además, nuestros resultados nos brindan la posibilidad de utilizar los circRNAs intrónicos descritos en este estudio como controles positivos de circularización que permiten ver si la muestra tratada con RNAsa R está altamente degradada. De la misma forma, observamos que PRM1 es un buen control negativo de circularización, presentando gran degradación ante el tratamiento con RNAsa R.

El hecho de que algunos EI se retengan específicamente en el espermatozoide maduro y se presenten en forma circular adquiriendo mayor estabilidad sugiere que estos circRNAs intrónicos són más que simples lariat RNAs, productos descartados durante el *splicing* del RNA. De hecho, cabe destacar que los genes en los que están retenidos los circRNAs intrónicos tienen funciones reguladoras (Zhang *et al.*, 2013).

En resumen, los resultados de este estudio describen por primera vez la presencia de circRNAs intrónicos en el espermatozoide y sugieren la existencia de una mayor cantidad de los mismos en el gameto masculino. Aunque no está clara su función, la metodología de validación y la población descrita en este estudio se establecen como una herramienta de trabajo útil para futuros estudios de validación de circRNAs. De esta forma, se pretende estudiar más a fondo la población específica de los circRNAs retenidos en el espermatozoide maduro y la función que estos podrían desempeñar en el desarrollo embrionario temprano.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio está subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad (fondos FEDER "una ma-

nera de hacer Europa" y Acción Estratégica en Salud) para R.O. (PI13/00699, PI16/00346) y J.C (CD17/00109). M.J está subvencionada por la Generalitat de Catalunya (Pla Estratègic de Recerca i Innovació en Salut, PERIS 2016-2020, SLT002/16/00337) y por el premio PROLAB 2017.

REFERENCIAS

BARRETT, SP and Salzman J. (2016) «Circular RNAs: analysis, expression and potential functions». *Development*, vol. 143, núm.11, p. 1838-47.

GREENE, J. [et al.] (2017). «Circular RNAs: Biogenesis, Function and Role in Human Diseases». *Frontiers in molecular biosciences*, Vol. 4, núm. 38.

GOODRICH, R.J. [et al.] (2013). «Isolating mRNA and small noncoding RNAs from human sperm». *Methods in molecular biology*, vol. 96, p. 927-385.

HENTZE, M.W. and Preiss, T. (2013). «Circular RNAs: splicing & rsquo;s enigma variations». *The EMBO journal*. vol 32, p. 923–925.

JODAR, M. [et al.] (2013). «The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs». *Human reproduction update,* vol. 19, núm. 6, p. 604-24.

JODAR, M. [et al.] (2015). «Absence of sperm RNA elements correlates with idiopathic male infertility». *Science translational medicine*, vol. 7, núm 295.

CASTILLO, J. [et al.] (2018). «The contribution of human sperm proteins to the development and epigenome of the preimplantation embryo». *Human reproduction update*, vol. 24, núm.5, p. 535–555.

MEMCZAK, S. [et al.] (2013). «Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency». *Nature*, vol. 495, p. 333–338.

OLIVA R [et al.] (2006). «Protamines and male infertility». *Human reproduction update,* vol. 12, p. 417-435.

OSTERMEIER, C. [et al.] (2004). «Delivering spermatozoan RNA to the oocyte». *Nature,* vol 429, núm. 154.

SALZMAN, J. [et al.] (2012). «Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types». *PLoS ONE*, vol. 7, núm. 2.

ZHANG, X.O. [et al.] (2013). «Complementary sequence-mediated exon circularization». *Cell*, vol. 159, p. 134–147.

ZHANG, Y. [et al.] (2013). «Circular Intronic Long Noncoding RNAs». *Molecular cell*, vol. 51, p. 792–806.