

DESCRIPCIÓ DEL TRANSCRIPTOMA GONADAL DEL LLOBARRO (*Dicentrarchus labrax*) AL LLARG DE DIFFERENTS ESTADIS DEL DESENVOLUPAMENT

Núria Sánchez-Baizán, Laia Ribas, Francesc Piferrer*

*Correspondència: Dr Francesc Piferrer, Institut de Ciències del Mar, Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC), Barcelona Passeig Marítim de la Barceloneta, 37-49, 08003, Barcelona. Tel. +34-932 309 567. piferrer@icm.csic.es

Resum

El llobarro (*Dicentrarchus labrax*) és una espècie de peix produïda en països de la conca Mediterrània, econòmicament important i del qual la demanda està augmentant ràpidament. No obstant, sota condicions de captivitat, encara s'obtenen poblacions amb major proporció de mascles. En aquesta espècie la proporció de sexes depèn d'uns quants loci i és influïble per factors mediambientals com la temperatura. Aquestes proporcions actuen en detriment de la producció, ja que les femelles creixen un ~30% més que els mascles. Per tal de comprendre millor els processos de determinació i diferenciació del sexe del llobarro, es va realitzar un estudi exhaustiu del transcriptoma gonadal a tres estadis diferents del desenvolupament: a 110, 250 i 350 dies després de la fecundació (dpf) mitjançant un microarray dissenyat específicament per aquesta espècie. Els resultats foren validats per PCR a temps real (qPCR). Es van obtenir un total de ~44.000 sondes. L'anàlisi de Significació Estadística de Microarrays (SAM), determinà 113 gens comuns diferencialment expressats (DE) quan es comparaven ovaris contra testicles al llarg de les tres etapes de desenvolupament, 98 gens DE comuns a 110 i 250 dpf, i 1.496 a 250 i 350 dpf. A més, es van identificar un conjunt de gens DE entre els ovaris i els testicles i que canvien significativament al llarg del desenvolupament gonadal. El perfil d'expressió de 16 gens canònics importants per a la reproducció i la diferenciació sexual en peixos va ser estudiada, així com el de les vies metabòliques relacionades. La proporció de factors de transcripció expressats (TFs) també es va comparar entre les gònades masculines i femenines. Aquesta llista proporciona informació de gens candidats per futures investigacions.

Paraules clau: Desenvolupament gonadal, llobarro, genòmica, reproducció, aqüicultura.

Abstract

The European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) is an economically important farmed species around the Mediterranean for which the demand is rapidly increasing. Nevertheless, under captivity male-biased populations still occur. In this species, since the sex ratio is determined by several loci and influenced by environmental factors such as temperature. Such bias in favour of males negatively affects production because females outgrow males by ~30% in weight. In order to better understand the sex determination and differentiation processes of the European sea bass we conducted a comprehensive study on the gonadal transcriptome at three different stages of development: at 110, 250 and 350 days post fertilization (dpf), using a custom-made microarray for the target species. Microarray results were validated by real time PCR (qPCR). A total of ~44.000 probes were obtained. The statistical Significance Analysis of Microarrays (SAM) test determined 113 common differentially expressed (DE) genes when comparing ovaries with testis along the three stages of gonadal development, 98 genes DE between 110 and 250 dpf, and 1,496 DE genes between 250 and 350 dpf. The expression profile of 16 canonical genes important for reproduction and sex differentiation in fish was studied as well as pathways known to be related with male or female gonad differentiation. The proportion of expressed transcription factors (TFs) was also compared between gonads along development. Furthermore, a set of genes were identified to be DE between ovaries and testis that significantly changed throughout development, providing a list of candidate genes enrichment for further investigation.

Key words: gonadal differentiation; European sea bass, genomics, reproduction, aquaculture.

INTRODUCCIÓ

La reproducció és un fenomen molt divers entre les espècies de peixos, en part, degut a l'especificitat dels processos de determinació i diferenciació del sexe. La determinació del sexe és el procés mitjançant el qual

factors genètics i/o ambientals estableixen el sexe de l'organisme i, en última instància modula la proporció de sexes, un paràmetre demogràfic clau per a la viabilitat de les poblacions i la viabilitat de espècies (Penman i Piferrer, 2008). La determinació del sexe és seguida per la diferenciació sexual, consistent en la transforma-

ció d'una gònada indiferenciada en un testicle o en un ovari (Devlin i Nagahama, 2002; Piferrer i Guiguen, 2008). La complexitat dels mecanismes moleculars i l'àmplia varietat de sistemes entre espècies de teleostis ha fet que el procés de determinació i diferenciació del sexe sigui un tema de debat durant dècades (Liew et al., 2012). Depenent de l'espècie, doncs, la determinació del sexe en teleostis és controlada per diferents factors genètics i/o ambientals que tenen una contribució relativa variable (Piferrer et al., 2012).

Tot i que existeix una àmplia diversitat entre els processos de determinació i diferenciació dels teleostis, se sospita que els gens principals involucrats són conservats al llarg de l'evolució. Alguns dels gens clau han estat identificats (Martínez et al., 2014), com per exemple el SRY-Box 9 (*sox9*) i el Doublesex And Mab-3 Related Transcription Factor 1 (*dmrt1*), que codifiquen per proteïnes que desencadenen el desenvolupament testicular en l'esturió siberià (*Acipenser baerii*; Berbejillo et al., 2013). Tanmateix, el gen responsable de la síntesi de l'hormona anti-mülleriana (*amh*) té un paper crític per a la diferenciació testicular del pejerrey (*Odontesthes bonariensis*; Fernandino et al., 2008). Altres gens són coneguts per la seva importància en el desenvolupament d'ovari, com el Citocrom P450, família 19, subfamília A, polipèptid 1a (*cyp19a1a*) que codifica l'enzim de l'aromatasa, o factors de transcripció com el forkhead box L2 (*foxl2*) i el factor esteroïdogenètic 1 (*sf-1*) (Navarro-Martín et al., 2011). Aquests factors de transcripció expressats en les gònades regulen la síntesi d'enzims que controlen la proporció d'hormones esteroïdes: d'andrògens (11-ketotestosterona) i estrògens (estradiol-17 β ; Martínez et al., 2014).

El llobarro (*Dicentrarchus labrax*) pertany al grup més abundant dels peixos teleostis, els Perciformes. Per tant, no només per el valor econòmic de la seva producció en l'aqüicultura sinó que també per la seva posició filogenètica, ha estat utilitzat com a espècie model en la recerca. El llobarro és una espècie gonocorista tipus diferenciada amb una determinació del sexe que inclou l'efecte tant de factors genètics com d'ambientals, com la temperatura (Piferrer et al., 2005; Vandeputte et al., 2007). El llobarro mostra un cicle anual de reproducció, fressant durant la temporada d'hivern, del gener al març al Mediterrani occidental.

En el llobarro, l'activitat androgènica sexual està regulada pels receptors nuclears sbDAX1 (*nr0b1*) i *sf-1*, que actuen com a repressors i inductors de diversos gens expressats en les gònades (proteïna reguladora aguda esteroïdogenètica; *star*, citocrom P450, família 11, subfamília A, polipèptid 1; *cyp11a1*, citocrom P450, família 17, subfamília A, membre 1; *cyp17*, els receptors d'estrògens alfa i beta, i receptor d'andrògens). L'expressió d'aquests gens regula la biosíntesi d'enzims es-

teroidogènics que al seu torn controlen la proporció i concentració d'esteroïdes sexuals en les gònades (Martins et al., 2007). Durant el desenvolupament primerenc, les gònades es diferencien en testicles o ovaris a causa de la relació endocrina, d'andrògens a estrògens. Aquesta relació es controla i es manté per l'enzim de l'aromatasa (CYP19A), traduït i transcrit a partir del gen *cyp19a1a* (Navarro-Martín et al., 2011).

Tot i que alguns gens clau per la determinació i la diferenciació gonadal ja estan identificats, en aquest estudi es pretén fer una descripció el més complert possible del transcriptoma gonadal del llobarro al llarg del desenvolupament a 110, 250 i 350 dpf, per tal d'elucidar patrons d'expressió gènica relacionats amb la diferenciació sexual pròpia de cada sexe.

MATERIALS I MÈTODES

Animals i disseny del microarray

Per tal d'estudiar el transcriptoma al llarg del desenvolupament, es van mostrejar teixits gonadals de peixos de diferents edats: a 110 (4 femelles i 6 mascles), 250 (6 femelles i 6 mascles) i 350 dpf (9 femelles i 9 mascles). Mentre que a 110 dpf la distinció del sexe dels individus a partir del fenotip encara no és possible, a 350 dpf les gònades ja són diferenciades. La longitud total mitjana és de 18 i 17 cm en les femelles i els mascles, respectivament (Piferrer et al., 2012). Es van recollir un total de 40 mostres de llobarro d'un conjunt de famílies no relacionades i establades a l'Institut de Ciències Mar (Barcelona).

L'anàlisi del transcriptoma gonadal del llobarro es va poder realitzar a partir de la base de dades obtingudes d'un experiment de pirosequenciació del qual va sorgir el disseny d'un oligo-microarray enriquit per a la reproducció, és a dir construït a mida i amb un nombre més elevat de sondes híbrides amb gens relacionats amb processos de reproducció (Ribas et al., en preparació). Les sondes (43.802 transcrits) utilitzades per construir l'experiment del microarray es van basar en el format de disseny 4 x 44k d'Agilent (GPL13443). Donat que diverses sondes del microarray imprimeixen l'expressió per un mateix gen, les 43.802 sondes es van agrupar en un total de 20.977 gens, dels quals 20.028 són representats per 2 còpies i la resta per entre 3 i 6 còpies de les sondes. L'experiment va ser validat mitjançant qPCR en 4 gens de mostres a les 3 edats.

Anàlisi estadística

La base de dades analitzada consisteix en un conjunt de valors d'intensitats de les sondes per cada mostra, nor-

malitzades mitjançant el paquet Limma de R (models lineals per a dades de microarrays, www.R-project.org). La taxa de falsos descobriments (FDR) es va controlar aplicant un filtre estadístic amb $p < 0.05$. El potencial efecte biològic causat per la combinació de lots es va eliminar amb la correcció ComBat. Aquestes dades es van introduir al programa informàtic TIGR Multiexperiment Viewer (TMeV), en la versió v.4.9 (Saeed et al., 2003). Aquest programa especialitzat proporciona diverses eines dissenyades per a l'anàlisi de dades de microarrays. En primer lloc es va poder visualitzar el conjunt de dades a través de l'Anàlisi de Components Principals (PCA), en el qual s'aplica la fórmula de correlació de Pearson per determinar la correlació lineal entre vectors de gens o mostres (Fryer et al., 2002). Arrossegant el conjunt de dades dins del programari de visualització va ser possible observar les dades des de diferents perspectives i així identificar clústers i possibles valors atípics (dues mostres van ser identificades com a valors atípics i excloses per a posteriors anàlisis: M10 i F9). Per determinar el nombre de gens diferencialment expressats entre les gònades dels mascles i femelles en cada punt del desenvolupament de la gònada es va aplicar l'anàlisi de Significació Estadística de Microarrays (SAM) que permet calcular el nivell d'expressió ($\text{Log}_2 \text{ Fold Change}$) i el nivell de significació (p -valor).

El llistat de gens canònics i vies metabòliques estudiades en detall van ser seleccionats a partir d'estudis previs similars en altres espècies: de rèmol (*Scophthalmus maximus*; Ribas et al., 2016) i de peix zebra (*Danio rerio*; Ribas et al., 2017).

RESULTATS

Expressió gènica diferencial entre les gònades femenines i masculines

L'anàlisi estadístic del microarray comparant les gònades masculines amb les femenines al llarg del desenvolupament va revelar un increment constant del nombre gens DE en gònades de femelles durant tot el temps estudiat. En canvi, durant el desenvolupament testicular s'observa un increment de gens DE entre 110 i 250 dpf, seguit d'una disminució de gens DE entre 250 i 350 dpf, en el qual una gran proporció de gens s'inhibeixen en mascles. Així, quan les gònades ja són diferenciades a 350 dpf, un 95,62% dels gens DE es sobre expressen en ovaris i només un 4,38% dels gens DE ho fan per als testicles (Figura 1). Entre aquests gens DE hi ha 113 gens que es mantenen així durant tot el període estudiat, i 98 gens DE són comuns entre individus a 110 i 250 dpf. Es van identificar fins a 1.496 gens DE en comú entre

les mostres de 250 i 350 dpf (Figura 2) comparant femelles contra mascles.

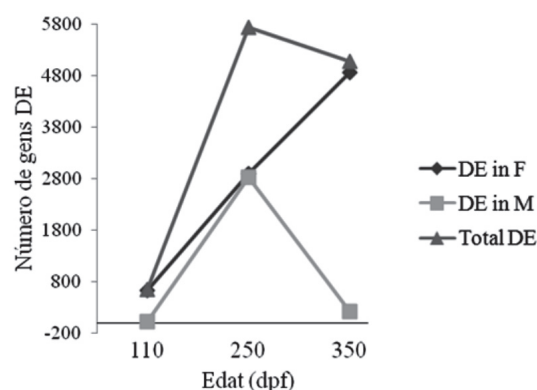


Figura 1. Gens diferencialment expressats en les gònades de llobarro comparant ovaris contra testicles al llarg del desenvolupament, amb límit de significació $p < 0.001$.

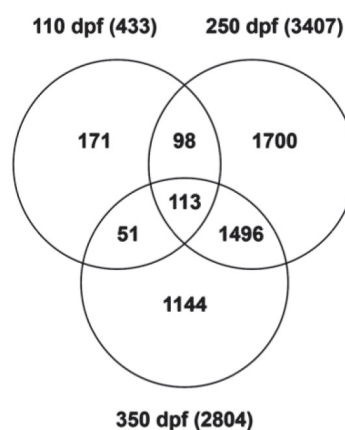


Figura 2. Gens diferencialment expressats i en comú al llarg dels tres estadis de desenvolupament de les gònades comparant ovaris contra testicles amb límit de significació $p < 0.001$.

També cal destacar que hi ha un grup de gens en comú (51 gens) en el primer punt i l'últim del procés. Una raó que podria explicar aquest fet és que, com és conegut, existeixen gens importants en el desenvolupament que segons el context i el moment en el que s'expressen participen en diferents funcions al llarg del desenvolupament (Gilbert, 2003).

Gens relacionats amb la reproducció

Entre els 16 gens seleccionats per la seva relació amb la diferenciació de la gònada se'n trobaren 8 que pertanyen a la via esteroidogènica i 8 factors de transcripció. En la majoria, comparant mascles i femelles, es va observar un patró similar al prèviament documentat en altres espècies o estudis en la mateixa espècie d'un sol

gen. Tal com mostra la Figura 3, es pot observar com el citocrom 11-beta hidroxilasa (*cyp11b*, A) augmenta significativament al llarg del temps en que es formen els testicles; i l'expressió de 17 β -hidroxiesteroid deshidrogenasa (17 β -*hsd*) és més elevada al llarg de la formació d'ovaris.

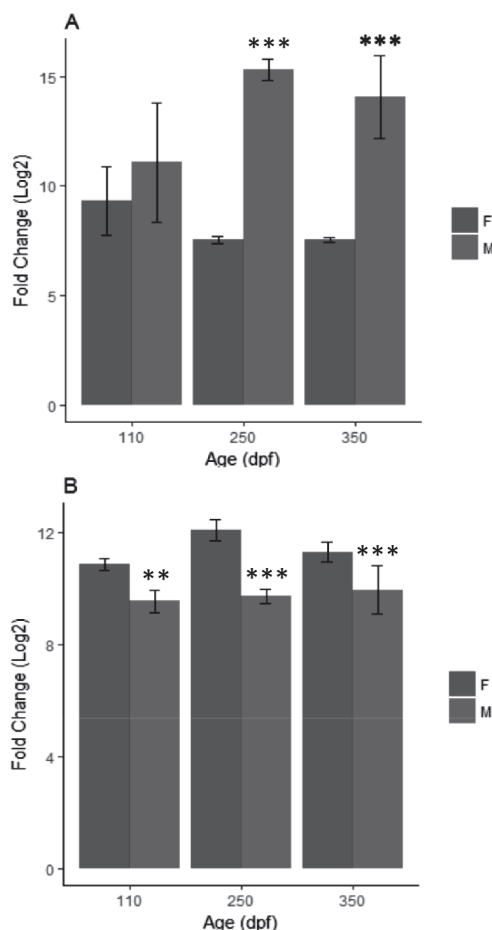


Figura 3. Expressió gènica diferencial entre mascles i femelles dels gens andrògens: A) *cyp11b* B) *17β-hsd*, amb els corresponents nivells de significació entre F i M en el mateix punt del desenvolupament: ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$. F: femelles, M: mascles.

Quan es va comparar la proporció de factors de transcripció sobreexpressats en mascles i en femelles entre els gens DE durant tot el desenvolupament, es va calcular que en mascles n'hi ha més amb una significació del p -valor < 0.01 . D'acord amb un estudi recent de Pérez-Lluch et al., (2015), els factors de transcripció podrien tenir un paper important, inclús més que les marques epigenètiques, en els processos de desenvolupament atesa la seva capacitat per facilitar canvis d'expressió en un termini de temps curt. Per tant, el conjunt de gens expressats identificats en un moment rellevant

de la diferenciació testicular, aporten informació per a futures investigacions. Tanmateix, el conjunt de gens DE que significativament canvien al llarg del procés i que són únics en la formació de l'ovari o testicle de llobarro es presenten per primera vegada amb aquest estudi. La identificació de gens candidats podria contribuir a la comprensió dels processos de determinació i diferenciació gonadal en peixos i a millorar protocols de producció aquícola.

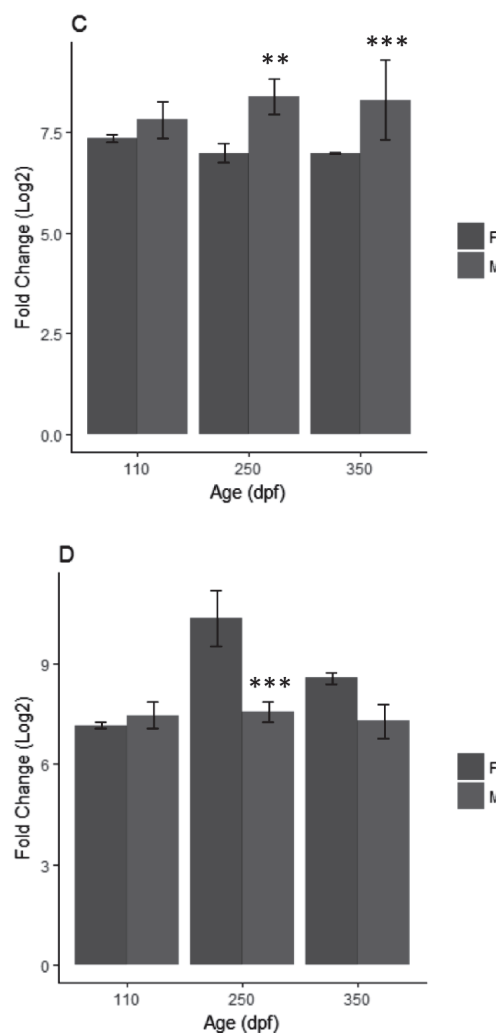


Figura 4. Expressió gènica diferencial entre mascles i femelles dels factors de transcripció: A) *sox9* B) *foxl2*, amb els corresponents nivells de significació entre F i M en el mateix punt del desenvolupament: ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$. F: femelles, M: mascles.

AGRAÏMENTS

Aquest treball ha estat finançat pel projecte "Aquagenomics", Consolider-Ingenio 2010 (ref. CDS2007-0002) concedida FP.

REFERÈNCIES

- Berbejillo, J., Martínez-Bengochea, A., Bedó, G., Viziano-Cantonnet, D., (2013). «Expression of *dmrt1* and *sox9* during gonadal development in the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) ». *Fish Physiol. Biochem.* 39, 91–4.
- Devlin, R.H., Nagahama, Y., (2002). «Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences». *Aquaculture* 208, 191– 364.
- Fernandino, J.I., Hattori, R.S., Kimura, H., Strüssmann, C.A., Somoza, G.M., (2008). «Expression profile and estrogenic regulation of anti-Müllerian hormone during gonadal development in pejerrey *Odontesthes bonariensis*, a teleost fish with strong temperature-dependent sex determination». *Dev. Dyn.* 237, 3192–9.
- Fryer, R.M., Randall, J., Yoshida, T., Hsiao, L.-L., Blumenstock, J., Jensen, K.E., Dimofte, T., Jensen, R. V, Gullans, S.R., (2002). «Global analysis of gene expression: methods, interpretation, and pitfalls». *Exp. Nephrol.* 10, 64–74.
- Gilbert, S. (2003). «Developmental biology». 10th ed. Sunderland, Mass. *Sinauer Associates*.
- Liew, W.C., Bartfai, R., Lim, Z., Sreenivasan, R., Siegfried, K.R., Orban, L., (2012). «Polygenic sex determination system in zebrafish». *PLoS One* 7, e34397.
- Martínez, P., Viñas, A.M., Sánchez, L., Díaz, N., Ribas, L., Piferrer, F., (2014). «Genetic architecture of sex determination in fish: applications to sex ratio control in aquaculture». *Front. Genet.* 5, 340.
- Martins, R.S.T., Deloffre, L. a M., Mylonas, C.C., Power, D.M., Canário, A.V.M., (2007). «Developmental expression of DAX1 in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*: lack of evidence for sexual dimorphism during sex differentiation». *Reprod. Biol. Endocrinol.* 5, 19.
- Navarro-Martín, L., Viñas, J., Ribas, L., Díaz, N., Gutiérrez, A., Di Croce, L., & Piferrer, F. (2011). «DNA methylation of the gonadal aromatase (*cyp19a*) promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European sea bass». *PLoS Genetics*, vol. 7, p. e1002447.
- Penman DJ, Piferrer F. (2008). «Fish gonadogenesis. Part I: genetic and environmental mechanisms of sex determination». *Rev Fish Sci.* 16(S1):16–34.
- Pérez-Lluch, S., Blanco, E., Tilgner, H., Curado, J., Ruiz-Romero, M., Corominas, M. and Guigó, R. (2015). «Absence of canonical marks of active chromatin in developmentally regulated genes». *Nature Genetics*, 47(10), pp.1158-1167.
- Piferrer F, Blázquez M, Navarro L, Gonzalez A. (2005). «Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) ». *Gen Comp Endocrinol.* 142:102–110.
- Piferrer F, Guiguen Y. (2008). «Fish gonadogenesis. Part II: molecular biology and genomics of sex differentiation». *Rev Fish Sci.* 2008;16(S1):35–55.
- Piferrer, F., Ribas, L., Díaz, N., (2012). «Genomic approaches to study genetic and environmental influences on fish sex determination and differentiation». *Mar. Biotechnol.* (NY). 14, 591–604.
- Ribas, L., Robledo, D., Gómez-Tato, A., Viñas, A., Martínez, P., & Piferrer, F. (2016). «Comprehensive transcriptomic analysis of the process of gonadal sex differentiation in the turbot (*Scophthalmus maximus*)». *Molecular and Cellular Endocrinology*, 422, 132–149.
- Ribas, L., Liew, W. C., Díaz, N., Sreenivasan, R., Orbán, L., & Piferrer, F. (2017). «Heat-induced masculinization in domesticated zebrafish is family-specific and yields a set of different gonadal transcriptomes». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (8), 201609411.
- Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J. (2003). «TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis». *Biotechniques.* 34(2):374-8.
- Vandeputte M, Dupont-Nivet M, Chavanne H, Chatain B. (2007). «A polygenic hypothesis for sex determination in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*». *Genetics.* 176:1049–1057.