

СРАВНИТЕЛНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЕКСПРЕСИЯ НА CYP19 ГЕНА ЗА АРОМАТАЗА В БЪРЗО И БАВНОПОДВИЖНИ ЧОВЕШКИ СПЕРМАТОЗОИДИ

М. Попова¹, Г. Георгиев², Г. Николов¹, Р. Конакчиева²

1- Репробиомед ООД; 2- СУ-, Св. Климент Охридски“, София

Резюме: Цитохром P450 ароматаза е ензимът, отговорен за преобразуването на андрогени в естрогени. Последните изпълняват важна функция в мъжката репродуктивна система като контролират нормалното протичане на сперматогенезата. В настоящото проучване изследвахме наличието на транскрипти на гена за ароматаза CYP19 в бързо- (тип А съгласно класификацията на СЗО) и бавноподвижни (тип В и тип С) човешки сперматозоиди и сравнихме нивата на експресия между двата типа. За целта обработихме еякулирана човешка семенна течност с цел получаване на чисти фракции от бързо- и бавноподвижни сперматозоиди и с помощта на RT-qPCR изследвахме количествено и сравнихме нивата на генна експресия в двете фракции. В резултат доказахме експресия на CYP19 гена в изследваните спермални фракции и установихме повишено количество ароматазни транскрипти в бавноподвижните сперматозоиди в сравнение с бързоподвижните. В допълнение се установи, че експресията на гена за ароматаза в бавноподвижните гамети при астенозооспермични субфертилни мъже е достоверно по-висока в сравнение с тази във фертилната контролна група. Същото се установи и при бързоподвижните сперматозоиди, изолирани от семенна течност на мъже с астенозооспермия, като експресионните нива надвишават леко тези, установени в бързоподвижните сперматозоиди от контролната група.

Получените резултати насочват за вероятна роля на ароматазата в мотилитета на човешките сперматозоиди.

Въведение

Балансът между андрогени и естрогени е от изключителна важност за нормалното полово развитие и репродукцията при бозайниците. Поддържането на този баланс в тестиса се осъществява посредством фини ендокринни и паракринни механизми, но също така и с помощта на ензима цитохром P450 ароматаза, който катализира необратимото преобразуване на андрогени в естрогени [1], [2], [3], [4]. При човека ароматазата е продукт на *CYP19* гена, локализиран в дългото рамо на хромозома 15 [2]. *CYP19* принадлежи към цитохром P450 генното семейство, което има повече от 500 члена, генът се разполага на повече от 120 килобази дължина, съдържа 9 транслиращи се екзона, кодиращи протеин с големина 55 кДа и 11 нетранслиращи се екзона, разположени в началото на гена [5]. Транскрипцията на ароматазния ген се

регулира от няколко тъканно-специфични промотора, намиращи се под влиянието на различни хормони и растежни фактори - гонадотропини (gonadal promotor II), интерлевкин-6, интерлевкин-11 и тумор-некротичен фактор (adipose/bone promoter I.4) [6]. Ароматазни транскрипти се откриват в различни тестикуларни клетки при бозайници (мишка, маймуна, полевка, мечка, човек) - Лайдигови клетки, Сертолиевы клетки, сперматоцити и сперматиди, а също така и в еякулирани човешки сперматозоиди [7], [8], [9]. Ароматазата се експресира и в овариалните гранулозни клетки [10], плацентата [11], адипозните /мастни/ тъкани [12], както и в мозъка [13], [14].

Все още не е напълно изяснена ролята на ароматазата в репродуктивната функция на мъжа. Има данни, че при човек количеството на ароматазни транскрипти в подвижните сперматозоиди е по-голямо от това, установено в неподвижните гамети, което определя експресията на ароматаза в сперматозоидите като потенциален биомаркер за подвижност [15]. Имайки предвид всичко това ние изследвахме експресията на цитохром P450 ароматаза в бързо подвижни човешки сперматозоиди (тип А съгласно класификацията на СЗО) и бавноподвижни сперматозоиди (тип В и тип С) с цел установяване наличие на ароматазни транскрипти в еякулирани сперматозоиди от индивиди с различна степен на увреждане на спермограмата и диагностицирана субфертилност и извършване на количествена сравнителна оценка на тези транскрипти.

Материали и методи

Семенна течност

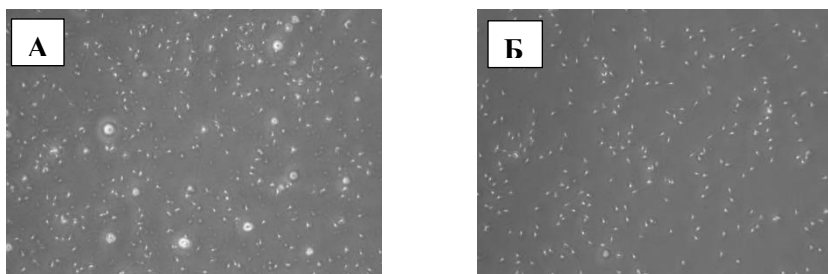
В настоящото изследване бяха включени общо 15 подбрани донори на семенна течност. От тях шест са диагностицирани с различна степен на астенозооспермия, шест - с нормозооспермия и трима доброволци с доказана фертилност (родени деца) са използвани за контроли.

Семенна течност е дарена в Медицински център по репродуктивна биология и медицина „РепроБиоМед“ – София след информирано съгласие на донорите. Събрана е чрез маструбация и след период на полово въздържание от 2 - 7 дни. На всеки нативен еякулат е направена скринингова спермограма чрез компютърно-асистиран спермален анализ (ISAS, Proiser company, Spain). Отчетени са физико-химичните характеристики на семенната течност и кинетичните параметри на сперматозоидите и е поставена диагноза съгласно критериите на СЗО (1999 г.). Проби, съдържащи повишен брой

левкоцити както и/или незрели полови клетки в концентрация по-висока от 10^6 /мл, не бяха включени в изследването.

Обработка на семенна течност

Семенната течност бе обработена чрез центрофугиране в градиент за отделяне на фракции от бързоподвижни (тип А) и бавноподвижни сперматозоиди (тип В + С). Обработката на еякулата стартира не по-късно от 1 час от отделянето му. Всеки нативен еякулат бе подложен на пречистване с помощта на 4-степенен колоиден плътностен градиент, съдържащ силициеви частици, като бяха използвани градиентни разтвори SilSelect (FertiPro) с процентна концентрация 20%, 40%, 60% и 80 % и центрофугиране на 300 g за 17 мин. В резултат на разделянето подвижните сперматозоиди се утаяват на дъното, а патологичните и по-бавните клетки се задържат от по-горните градиенти. Фракциите с бързи- и бавноподвижни сперматозоиди бяха разделяни, прехвърляни в две отделни епруветки и промивани последователно с HAMS F10 (Lonza) и PBS като всяко промиване бе последвано от центрофугиране за 5 мин на 300 g. Концентрацията на сперматозоидите и от двете фракции бе доведена до 1.10^6 клетки/мл. Към утайката, получена след последното промиване с PBS, бе добавян лизиращ буфер и β -меркаптоетанол и пробите се замразяваха на -80°C .



Фигура 1: Обработка на семенна течност – микроскопско изследване: А – нативен (необработен) еякулат; Б – суспензия от пречистени сперматозоиди, получени след обработка с плътностен градиент.

Изолиране на тотална РНК и обратна транскрипция

Тотална РНК от обработените проби сперматозоиди беше изолирана с помощта на RNeasy Mini RNA Isolation Kit (illustra, GE Healthcare). Получените проби РНК бяха измерени спектрофотометрично за определяне на чистотата и количественото съдържание с помощта на Epoch (Biotec). Изолираната тотална РНК бе доведена до кДНК с кит за RT-PCR на фирмата ABM (Канада) съгласно инструкциите на

производителя, посочени в листовката към кита.

Real-time qPCR (RT-qPCR)

Генната експресия беше определяна чрез RT-qPCR. Използвана бе qPCR система Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies) и софтуер MxPro, който позволява автоматично изчисление на ефективността на реакцията. С цел коректно провеждане на експресионния анализ бе изследвана експресията и на референтен ген – консервативния GAPDH (глицералдехидфосфатдеhidрогеназа). Праймерите за количествения анализ на експресията на CYP19 и референтния ген бяха конструирани с използване на програма за дизайн на праймери за RT-qPCR PearlPrimer, която е със свободен достъп (Таблица 1). Подбраните последователности бяха проверени в онлайн бази данни за специфичност и образуване на вторични структури.

Таблица 1: Олигонуклеотидни секвенции, използвани за RT-qPCR.

Ген	Праймер	Секвенция	Големина на PCR продукт
CYP19	Прав праймер	5'-GCAGGTA CT TAGTTAGCTAC-3'	276 bp
	Обратен праймер	5'-TTACAGTGAGCCAAGGTCGT-3'	
GAPDH	Прав праймер	5'-AGT CAA CGG ATT TGG TCG-3'	500 bp
	Обратен праймер	5'-AGT CCT TCC ACG ATA CCA-3'	

Избран бе подход за анализ с използване на флуоресцентна боя EvaGreen 2X qPCR в комбинация с референтно багрило ROX на фирмата ABM (Канада). Условието на протичане на полимеразната верижна реакция бяха следните: активация на ензима при 95° C за 10 мин. – 1 цикъл; денатурация за 45 сек при 95° C, подравняване-60 сек на 62° C, удължаване - 45 сек на 72° C – 40 цикъла. С цел установяване адекватността на получените резултати след края на всеки амплификационен цикъл бе провеждан анализ чрез крива на топене (melting curve analysis) и получаване на дисоциационна крива – 10 мин при 72° C – 1 цикъл.

Статистическа обработка

Данните за нивата на експресия в пробите бяха изчислени с използване на метод на Pfaffl (Pfaffl, M.W.-2001). Статистическата обработка беше извършена с програмата REST 2009 (Qiagen) за PCR приложения. Където е било необходимо е използван Student

t-test, като за ниво на достоверност е прието $p < 0.05$.

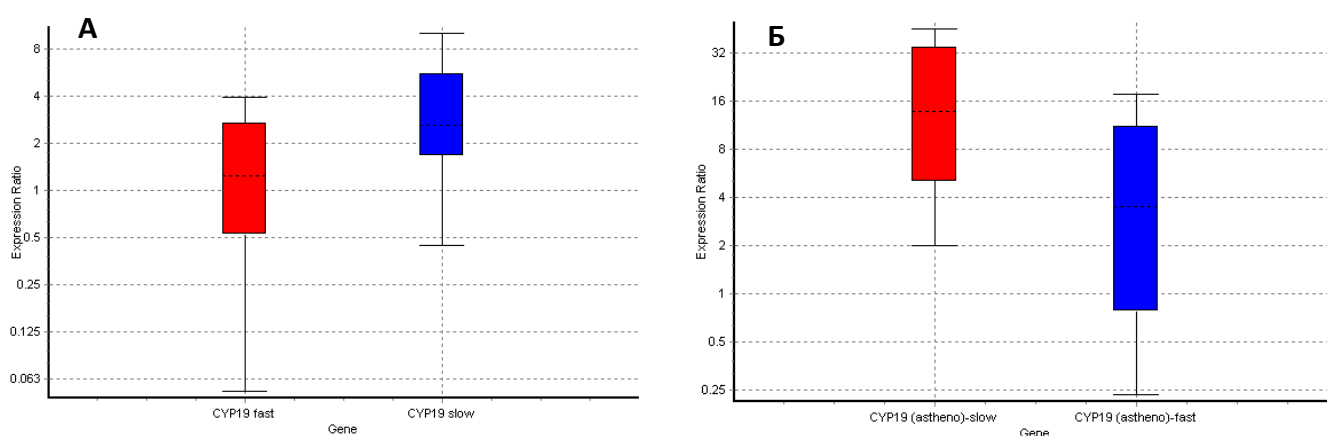
Резултати

Установяване наличие на експресия на ароматаза в изследваните проби

Продукти на ароматазния ген бяха отчетени във всички проби. При всички изследвани фракции праговата стойност на реакцията беше преминала след 30-ти цикъл на реакцията, което показва относително ниска експресия на продукта на ароматазния ген. Това би могло да се обясни с ниската концентрация на иРНК в сперматозоидите и в частност на иРНК за ароматаза в тях. Продуктът на референтния ген GAPDH беше отчетен след 22 цикъл на PCR реакцията, като експресията при повечето проби бе сравнително постоянна.

Резултати за относителна експресия на CYP19 гена

В резултат на статистическата обработка на получените данни от real-time qRT-PCR анализа се откриха следните по-важни резултати.



Фигура 2: Относително сравнение на генната експресия на ароматаза. А - сравнение на генната експресия на ароматаза в контролна група (n=6), обогатени фракции от бързи (n=12) и от бавни сперматозоиди (n=12) независимо от диагнозата; Б - сравнение на генната експресия на ароматаза в обогатени проби с бързи (n=6) и бавни (n=6) сперматозоиди от пациенти с астенозооспермия спрямо контролна група (n=6).

На фиг. 2А е представено сравнение в генната експресия на ароматазния ген в пробите с бързи сперматозоиди и пробите с бавни сперматозоиди спрямо контролната група. Бе установено статистически достоверно по-високо ниво на експресия на *CYP 19* в групата проби с бавни сперматозоиди спрямо контролната група. При сравнение на

нивата на генната експресия на ароматазния ген в обогатени проби с бързи, съответно бавни сперматозоиди, изолирани от пациенти с астенозооспермия спрямо контролната група, бе установено, че в пробите с бавни сперматозоиди има статистически достоверно повишение на експресията на ароматазния ген спрямо тази, установена в пробите от контролната група (фиг. 2Б).

Обсъждане

С настоящото научно изследване за първи път е извършена оценка на експресията на гена за ароматаза на база диференциална характеристика на бързо- и бавноподвижни човешки сперматозоиди. В резултат потвърдихме присъствието на транскрипти на ароматазата както в нативен еякулат, така и във всички изследвани фракции на сперматозоиди с различна подвижност. Същевременно установихме различия в нивата на експресия на ароматазния ген между фракциите от бързоподвижни и бавноподвижни сперматозоиди, и отделно при сравнение с нормоспермични и контролни проби, като повишената транскрипция е характерна за клетките получени във фракциите с бавноподвижни сперматозоиди. Тази зависимост се потвърди и при всички изследвани пациенти, независимо от показателите на семенната им течност. При бавноподвижните сперматозоиди, изолирани от астенозооспермичните проби, ароматазният ген се експресира в значително по-високи нива от тези, установени за същата фракция сперматозоиди от контролната група.

Счита се, че в зрели сперматозоиди могат да бъдат установени около 5000 mRNA транскрипти, като 25% от тях кодират протеини, участващи в процесите на зреене, капацитация и оплождане. Тъй като тестис специфичните mRNA се синтезират и транслират под стриктен контрол, установените рибонуклеинови киселини в зрели сперматозоиди могат да представляват нетранслирани продукти от затихналата в последните етапи на зреенето транскрипционна дейност. Важно е да бъдат конкретно идентифицирани транскриптите, за да се проследи как промените в техните количества биха могли да се отразят на качеството на клетките. Повечето от РНКите имат отношение към клетъчната пролиферация, сигналната трансдукция и онкогенезата, процеси пряко засягащи сперматогенезата. В тази връзка ароматазата може да бъде ценен индикатор за генната активност по време на критичните стъпки в сперматогенезата и да даде информация за механизмите на клетъчните увреждания.

Сред пула от матрични РНКи може да се детектират разлики в относителните нива на транскриптите при фертилни и инфертилни донори. Нашето изследване за

връзката на нивото на експресия на ароматазния ген с морфологични и функционални характеристики на половите клетки показва, че нивата на транскрипта са повишени при неподвижните или бавно подвижните спрямо подвижните сперматозоиди. Това може да е следствие от повишен индекс T/E2, който на ниво кръгли и удължени сперматиди може да възпрепятства придобиването на подвижност.

В заключение резултатите от представеното изследване показват че: 1/ експресията на *CYP 19* в нативен еякулат не носи достоверна информация за качеството на гаметите по отношение на техния репродуктивен потенциал; 2/ обогатените проби от бавни сперматозоиди от астенозооспермични пациенти съдържат повишено ниво на експресия на *CYP 19* спрямо контролни семенни проби от пациенти с доказан фертилитет; 3/ диференциалното разделяне на бързи и бавни сперматозоиди за оценка на сравнителната експресия на *CYP 19* чрез qRT-PCR може да се използва за индивидуална диагностика на пациенти с различна степен на увреждане в кинетичните параметри на сперматозидите.

Литература:

- [1] J. M. SAEZ, "Leydig Cells: Endocrine, Paracrine, and Autocrine Regulation," *Endocr. Rev.*, vol. 15, no. 5, pp. 574–626, Oct. 1994.
- [2] E. R. SIMPSON *et al.*, "Aromatase Cytochrome P450, The Enzyme Responsible for Estrogen Biosynthesis*," *Endocr. Rev.*, vol. 15, no. 3, pp. 342–355, Jun. 1994.
- [3] A. Conley and M. Hinshelwood, "Mammalian aromatases," *Reproduction*, vol. 121, no. 5, pp. 685–695, 2001.
- [4] S. Carreau, S. Lambard, C. Delalande, I. Denis-Galeraud, B. Bilinska, and S. Bourguiba, "Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review.," *Reprod. Biol. Endocrinol.*, vol. 1, p. 35, 2003.
- [5] J. D. Y. Chow, E. R. Simpson, and W. C. Boon, "Alternative 5'-untranslated first exons of the mouse *Cyp19A1* (aromatase) gene," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 115, no. 3–5, pp. 115–125, Jul. 2009.
- [6] E. R. Simpson and S. R. Davis, "Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis--some new perspectives.," *Endocrinology*, vol. 142, no. 11, pp. 4589–94, 2001.
- [7] S. Lambard, I. Galeraud-Denis, P. T. K. Saunders, and S. Carreau, "Human immature germ cells and ejaculated spermatozoa contain aromatase and oestrogen receptors.," *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 32, no. 1, pp. 279–89, Feb. 2004.
- [8] S. Aquila, D. Sisci, M. Gentile, E. Middea, L. Siciliano, and S. Andò, "Human Ejaculated Spermatozoa Contain Active P450 Aromatase," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 87, no. 7, pp. 3385–3390, Jul. 2002.

- [9] S. Lambard, D. Silandre, C. Delalande, I. Denis-Galeraud, S. Bourguiba, and S. Carreau, "Aromatase in testis: expression and role in male reproduction.," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 95, no. 1–5, pp. 63–69, 2005.
- [10] K. P. McNATTY, A. MAKRIS, C. DEGRAZIA, O. RAPIN, and K. J. RYAN, "The Production of Progesterone, Androgens, and Estrogens by Granulosa Cells, Thecal Tissue, and Stromal Tissue from Human Ovaries in Vitro *," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 49, no. 5, pp. 687–699, Nov. 1979.
- [11] K. J. RYAN, "Biological aromatization of steroids.," *J. Biol. Chem.*, vol. 234, no. 2, pp. 268–72, Feb. 1959.
- [12] J. M. GRODIN, P. K. SIITERI, and P. C. MACDONALD, "Source of Estrogen Production in Postmenopausal Women1," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 36, no. 2, pp. 207–214, Feb. 1973.
- [13] F. Naftolin *et al.*, "The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues.," *Recent Prog. Horm. Res.*, vol. 31, pp. 295–319, 1975.
- [14] C. E. ROSELLI, L. E. HORTON, and J. A. RESKO, "Distribution and Regulation of Aromatase Activity in the Rat Hypothalamus and Limbic System*," *Endocrinology*, vol. 117, no. 6, pp. 2471–2477, Dec. 1985.
- [15] S. Lambard, I. Galeraud-Denis, H. Bouraïma, S. Bourguiba, A. Chocat, and S. Carreau, "Expression of aromatase in human ejaculated spermatozoa: A putative marker of motility," *Mol. Hum. Reprod.*, vol. 9, no. 3, pp. 117–124, 2003.
- [16] S. Lambard, I. Galeraud-Denis, G. Martin, R. Levy, A. Chocat, and S. Carreau, "Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: Relationship to sperm motility and capacitation," *Mol. Hum. Reprod.*, vol. 10, no. 7, pp. 535–541, 2004.
- [17] S. Carreau, C. Delalande, and I. Galeraud-Denis, "Mammalian sperm quality and aromatase expression," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 72, no. 8, pp. 552–557, Aug. 2009.
- [18] S. Aquila *et al.*, "Estrogen Receptor (ER) α and ER β Are Both Expressed in Human Ejaculated Spermatozoa: Evidence of Their Direct Interaction with Phosphatidylinositol-3-OH Kinase/Akt Pathway," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 89, no. 3, pp. 1443–1451, Mar. 2004.
- [19] I. Galeraud-Denis, S. Lambard, and S. Carreau, "Relationship between chromatin organization, mRNAs profile and human male gamete quality," *Asian J AndrolAsian J Androl*, vol. 9, no. 9, pp. 587–592, 2007.
- [20] K. A. Mattingly, M. M. Ivanova, K. A. Riggs, N. S. Wickramasinghe, M. J. Barch, and C. M. Klinge, "Estradiol stimulates transcription of nuclear respiratory factor-1 and increases mitochondrial biogenesis.," *Mol. Endocrinol.*, vol. 22, no. 3, pp. 609–22, Mar. 2008.