



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

## IV. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a  
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

### OSASUN ZIENTZIAK

**RNA zirkular berrien bilaketak  
atzeranzko moztu-itsastearen  
kontserbazio altua frogatu du  
ardian**

*Endika Varela-Martínez,  
Martin Bilbao-Arribas,  
Naiara Abendaño, Jan Gorodkin  
eta Begoña M. Jugo*

107-113 or.  
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.04.13>



## RNA zirkular berrien bilaketak atzeranzko moztu-itsastearen kontserbazio altua frogatu du ardian

<sup>1</sup>Varela-Martínez, E., <sup>1</sup>Bilbao-Arribas, M., <sup>1</sup>Abendaño, N., <sup>2</sup>Gorodkin, J. eta <sup>1</sup>Jugo, B.M.

<sup>1</sup>Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU

<sup>2</sup>Department of Veterinary and Animal Sciences, Center for Non-Coding RNA in Technology and Health, University of Copenhagen, Denmark

*martin.bilbao@ehu.eus, begonamarina.jugo@ehu.eus*

### Laburpena

RNA zirkularrak (circRNAk) modu kobalentean itxitako RNA ez-kodetzaile zirkularrak dira. Duten egitura dela eta, circRNAk gaixotasunen biomarkatzaile gisa erabiltzeko aproposak dira. Molekula mota hauek garrantzi zientifikoa badute ere, animalia ez-ereduetan ikerketa garatu gabe dago oraindik. Lan honetan bi ehun desberdinen RNA-seq datuak aztertu dira ardiaren circRNAk identifikatzeko. Garun azalean eta odol-zelula mononuklearretan 2510 eta 3403 circRNA detektatu dira, horietatik 1379 guztiz berriak. Harrigarria da detektatu diren circRNA molekulen moztu-itsasteen %63a gizakiarekiko guztiz homologoak direla. Gainera, gizakian ikusi den bezala, emaitzek CDR1-AS circRNA ardiaren garunean dituen funtzioak babesten dituzte.

Hitz gakoak: RNA zirkularrak, ardia, RNA-seq, transkriptomika

### Abstract

*Circular RNAs (circRNAs) are covalently closed circular non-coding RNAs. Due to their structure, circRNAs are good candidates for disease biomarkers. Despite the scientific relevance of these molecules, the study of circRNAs in non-model organisms is still in its infancy. Here, we analyse RNA-seq data to identify circRNAs from two sheep tissues: peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and parietal lobe cortex. Out of 2510 and 3403 circRNAs detected in parietal lobe cortex and in PBMCs, a total of 1379 novel circRNAs were discovered. Remarkably, around 63% of all detected circRNAs were found to be completely homologous to a circRNA annotated in human. Besides, our results support the miRNA sponge function of CDR1-AS in sheep brain, as reported in human.*

*Keywords: Circular RNAs, sheep, RNA-seq, transcriptomics*

### 1. Sarrera eta motibazioa

RNA zirkularrak (circRNAk) modu kobalentean itxitako RNA zirkular ez-kodetzaile klase berri bat da, moztu-itsaste alternatiboaren ondorioz RNA lineal baten exon bat ur-gora dagoen beste exon batekin lotzean sortutakoa, *backsplicing* edo atzeranzko moztu-itsaste deituriko prozesuaren bitartez (1. Irudia) (Guo et al., 2014). Egitura zirkularraren ondorioz, circRNAk RNA linealak baino egonkorragoak dira, RNAasa R-rekiko erresistenteagoak dira eta erdibizitza luzeagoa dute (Bonizzato et al., 2016), gaixotasunen biomarkatzaile gisa erabiltzeko aproposagoak diren ezaugarriak. Duela urte asko aurkitu baziren ere, urte luzez uste izan zen circRNAk moztu-itsaste akatsetatik eratorriko ugaritasun baxuko azpiproduktuak zirela. Azkenaldian ekoizpen altuko sekuentziazio metodoek izan duten hedapena handiari esker, frogatu da molekula hauek pentsatu baino arruntagoak direla eta horietako batzuk bidezidor biologiko garrantzitsuetan parte hartzen dutela (Sekar & Liang, 2019; Wang et al., 2019).

Zirkularizazioaren mekanismo zehatza ez da guztiz ezagutzen, baina hainbat faktore erlazionatu dira horrekin: Ikusi da RNA zirkularren biogenesisia RNA polimerasa II-ren elongazio tasarekin korrelazio positiboa izaten duela (Ebbesen et al., 2017). Gainera, atzeranzko moztu-itsastea eragiten duten exonen muturretan sekuentzia osagarriak egoteak exonen muturrak espazioan gertu kokatzea eragiten du, moztu-itsaste kanonikoan parte hartzen duen



## 2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gure ikerketa taldeak etxe-abereen RNA ez-kodetzaileen karakterizazioan egiten du lan, batez ere txertoen eta patogenoen aurkako erantzun immunearen baitan. Jadanik mikroRNAk eta RNA ez-kodetzaile luzeak (lncRNAk) aztertu ditugu eta orain RNA zirkularretan arreta jarri dugu. RNA-seq datuetatik circRNAk identifikatzeko metodologia bioinformatikoak badira, baina gutxitan aplikatu dira eredu ez diren espezieetan. Gizakian aldiz, analisi informatiko horiez gain, zeinbait circRNAren karakterizazio funtzionala ere burutu da. Etxe-abereen hainbat ehunetatik lortutako RNA-seq liburutegiak genoma osoko gene-adierazpena aztertzeke erabili izan dira behia, txerria, zaldia edo ardia bezalako etxe-abereetan batez ere. Ardian ikerketa gutxi batzuek soilik ikertu dituzte RNA mota hauek abeltzaintzarako ekonomikoki garrantzitsuak diren ehunak erabiliz. Ikerketa hauek muskuluaren garapenaren, ugalketaren kontrolaren edo ilajearen kalitatearen ikuspuntutik burutu izan dira. Hortaz, lan honetan lehen aldiz identifikatu dira ardiaren RNA zirkularrak immunitate sistemako eta nerbio-sistemako ehunetan.

Datuak gure taldearen RNA-seq eta miRNA-seq esperimenduetan lortutakoak dira, txertoen laguntzaile modura erabilitako aluminio hidroxidoak txertaketaren osteko erantzun immunean duen eragina ezagutzeko egitasmoan. Oraingoz sekuentziatu diren ehunak odol-zelula mononuklearrak (*PBMC*, *peripheral blood mononuclear cells*) (Varela-Martínez et al., 2018) eta entzefaloo (Varela-Martínez et al., 2020) izan dira. Aurrekari hauek kontuan izanda, analisi honen bitartez lortu nahi den helburua bikoitza da: Batetik, ardiaren RNA zirkularren identifikazioa egitea RNA-seq datuetatik, azterketa deskriptiboa eta ebolutiboa eginez. Bestetik, lan honek circRNAk mikroRNAekin lotu eta hauen funtzionamendua aldatzeko gai diren aztertzea du helburu.

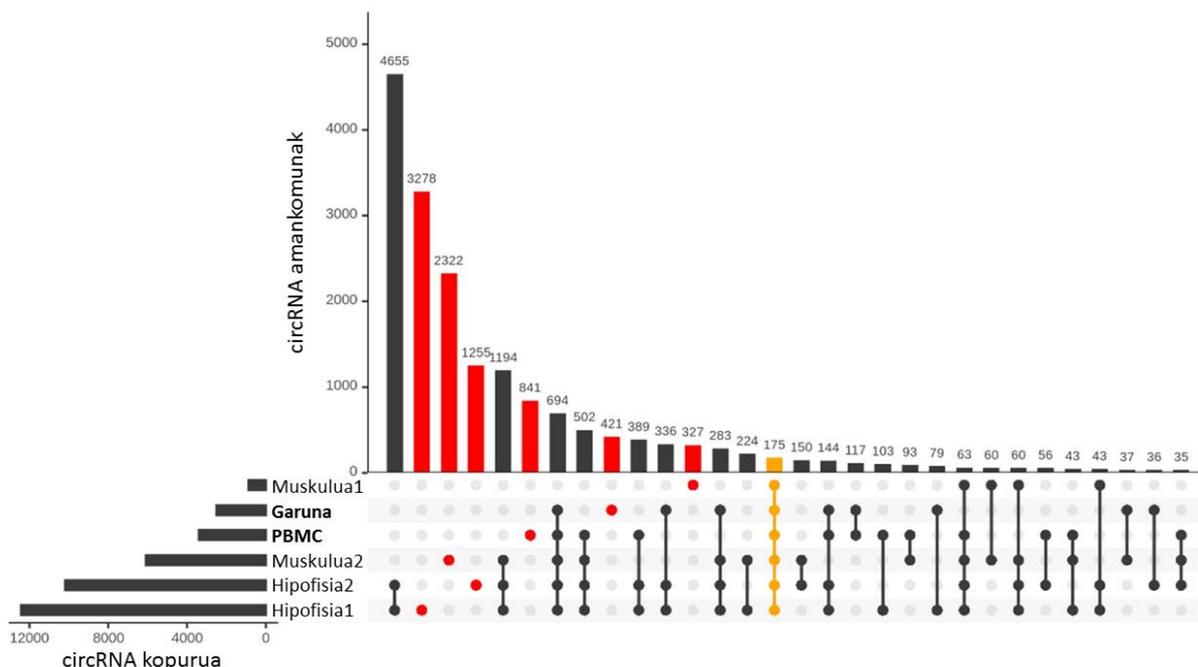
## 3. Ikerketaren muina

### 3.1. RNA zirkularren karakterizazioa

RNA zirkularrak identifikatzeko estrategia RNA-seq datuetan atzeranzko moztu-itsasteak bilatzean datza, hau da kontrako norabidean kokatzen diren bi exonez osatutako lotuneak dituzten irakurketak bilatzea. Horretarako, irakurketen kalitate kontrola Trimmomatic tresnarekin egin ondoren, sekuentzia guztiak ardiaren genomaren aurka mapatu ziren HISAT2 eta STAR programekin. Mapatzen ez zuten irakurketak erabiliz, atzeranzko moztu-itsasteak bilatzeko antzeko oinarria duten (Zeng et al., 2017) bi tresna bioinformatiko hautatu ziren, Segemehl (Hoffmann et al., 2014) eta DCC (Cheng et al., 2016). Garun ehunean 12475 eta 60375 circRNA aurkitu zituzten Segemehl eta DCC tresnek, hurrenez hurren. *PBMC* laginetan berriz, 19611 eta 63138 circRNA aurkitu zituzten. RNA zirkular guztiak iragazi egin ziren fidagarrienak soilik mantentzeko hurrengo arauak erabiliz: 2 irakurketako adierazpena izatea gutxienez, hiru lagin desberdinetan aurkitzea eta tresna biek identifikatzea. Honek circRNA kopurua murriztu zuen 2510era garunean eta 3403ra odol zeluletan. Bi ehunetan iragazkiak pasa zituzten circRNA amankomun kopurua 1236koa izan zen.

Bi ehunetan identifikatutako circRNA gehienak gene ezagunetatik datoz eta bi edo hiru exonez osatuak daude, lehendik gizakian eta saguan ikusi denarekin bat eginez. Gainera, espero bezala, ardietan circRNAen adierazpena oso hedatua dago bi ehunetan, gizakian ehun horietan bereziki circRNA kantitate handia aurkitu baita. Zenbait circRNAek ehunaren edo garapen-fasearen araberako adierazpen profila dutenez, azterketa honetan antzemandako circRNAak ardian egindako beste ikerketa batzuekin alderatu ziren, hipofisian eta muskulu eskeletikoan egindako bina lan (2. irudia). 175 circRNA bakarrik hauteman ziren ehun guztietan, ehunka circRNA ehun bakarrean bakarrik adierazten ziren bitartean.

**2. irudia. Hainbat lanetan identifikatu diren RNA zirkularren adierazpenaren konparaketa (Varela-Martínez et al.-etik moldatua (2021). Ehunen erreferentziak artikuluan daude. Barra horizontalek lan bakoitzean identifikatu diren circRNA kopuru totala adierazten dute eta barra bertikalek lanen arteko circRNA amankomunak.**

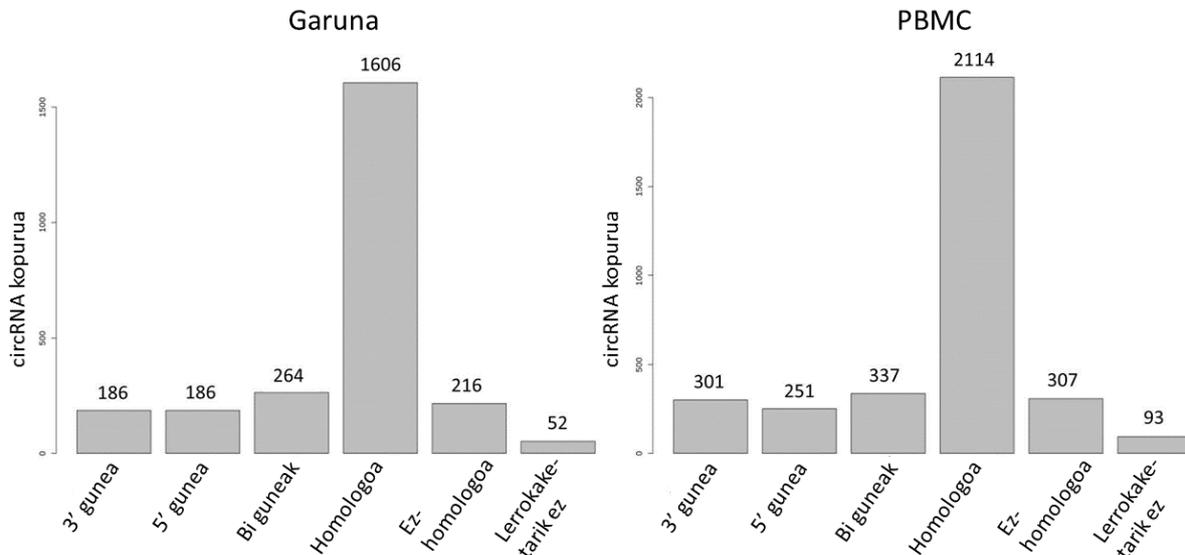


### 3.2. RNA zirkularrak kontserbatuta daude

Antzemandako circRNAk CIRCpedia datu baseko giza RNA zirkularrekin alderatu ziren. Ardien circRNA koordinatuak gizakien genomara pasa ziren, eta atzeranzko moztu-itsaste loturaren kontserbazio mailaren arabera sailkatu ziren (3. Irudia). CircRNA batek ardian eta gizakian exon beraren muturretako bat (3' edo 5' guneak) erabiltzen badu gune horiek kontserbatuta daudela esan dezakegu, baina circRNA bat guztiz homologoa izateko bi guneak kontserbatuta egon behar dira eta, gainera, lotutako bi exonak homologoak izan behar dira ardiaren eta gizakiaren artean. Sekuentzia mailan bi espezieen artean kontserbaziorik ez dagoenean, lerrokatarik ez dagoelako, ezin da moztu-itsaste guneen kontserbazioa neurtu.

Analisi honetan identifikatu ziren circRNA ia guztiek zuten, gutxienez, giza circRNA ezagun homologo bat moztu-itsaste guneetako bat erabiltzen zuena. Guztira, 1606 (%63,98) eta 2114 (%62,12) circRNA giza circRNA baten guztiz homologoak ziren garunean eta odol zeluletan, hurrenez hurren. Adierazpen maila altuena zuten bi circRNAk, zeinak HOMER eta ZNF609 geneetatik eratortzen baitira, hainbat espezieetan kontserbatuta daude eta esperimendu funtzionalen bidez minbizi zelulen edo zelula osasunen hazkundean parte hartzen dutela ikusi da.

**3. irudia. Ardia eta gizakiaren arteko kontserbazioaren analisia garunean eta *PBMC*etan (Varela-Martínez et al.-etik moldatua (2021). Barra bakoitzak kontserbazio maila bat adierazten du. Ez-homologoak eta lerrokaketarik ez dutenak kontserbaziorik gabeko circRNAk dira.**



**3.3. RNA zirkularrak miRNA itu gisa**

Ardian circRNAk miRNA molekulen funtzionamenduan eragiten ahal duten ikusteko, miRNA lotura-gune klusterrak bilatu ziren, hau da, miRNA molekulen itu asko gertu dituzten sekuentziak. Aurretik giza-genoman miRNAk ituen klusterrak identifikatu izan direnez, gune horiek ardiaren genomarekin konparatu ziren eta circRNA locus batean zeudenak hautatu ziren. Itiak kontserbatuta zeudela konfirmatzeko Rsearch2 tresna erabili zen miRNA itiak ardiaren genomari aurrezteko. Garunean eta *PBMC*etan, hurrenez hurren, 3 eta 4 bat-egite aurkitu ziren.

Gure predikzioetan oinarrituta, CDR1-AS circRNAk, hobekien ezagutzen den garuneko RNA zirkularra dena eta CDR1 genetik eratortzen dena (Piwecka et al., 2017), miR-7 eta miR-1224 miRNAk lotzeko gune ugari ditu. Bi miRNA hauek ugaztunen garunean adierazten direla ezaguna da eta CDR1-AS gure garun laginetan soilik adierazten da, maila oso altuan. Gainera, hirugarren miRNA batek, miR-671, CDR1-AS RNA zirkularraren sekuentziarekin osagarritasun oso antzekoa du gizakian eta ardiaren. Honen ondorioz, circRNA honek ardiaren gizakian duen funtzio bera betetzen duela aurrean genezake. Izan ere, garunaren funtzionamendu normala mantentzen du, sinapsien transmisioaren doiketan zeregin bat betetzen baitu (Piwecka et al., 2017).

**4. Ondorioak**

Lan honetan RNA-seq datu-multzo bat erabilita ardiaren circRNAk identifikatu dira, euren kontserbazioa aztertu da eta miRNA molekulen funtzioa aldatzen ahal duten aztertu da tresna bioinformatikoak erabiliz. Ugaztunen transkriptomak oso konplexuak direla argi geratu da azkenaldian eta mRNA klaseaz haraindi bestelako funtzioak dituzten RNA klaseak garrantzia hartzen ari dira. Ardiaren bi ehun garrantzitsu, garuna eta *PBMC*ak, lehen aldiz analizatu dira circRNAk lortzeko eta ehun zehatzetan adierazten direla ikusteaz gain, kopuru handi bat kontserbatuta dagoela ikusi da. Bestalde, miRNA lotze-guneak ere kontserbatuta aurkitu dira erkatutako bi espezieen artean.

**5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea**

Eskura ditugun RNA-seq sekuentziazio datuak eta datu baseetan eskuragarri dauden datuak erabiliz, analisi konparatiboen bitartez ugaztunen circRNAk kontserbatuta dauden aztertzea

litzateke hurrengo pausua, eta beren adierazpena nolakoa den aztertzea, gizakian ikusi diren circRNAk eta hauen adierazpen maila kontserbatuta dauden ez baitago argi. RNA mota hauen elkarrekintzak miRNA molekulekin espezie batetik bestera modu orokor batean mantentzen ote diren ezezaguna da oraindik ere. Horrela, ugaztunen genomak ezagutza zabaldu eta etxe-abereen osasunerako garrantzitsuak izaten ahal diren markatzaileak aurkituko genituzke.

## 6. Erreferentziak

- Akhter, R. (2018). Circular RNA and Alzheimer's Disease. In J. Xiao (Ed.), *Circular RNAs: Biogenesis and Functions* (pp. 239–243). Singapore: Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-1426-1\\_19](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1426-1_19)
- Bonizzato, A., Gaffo, E., Te Kronnie, G., & Bortoluzzi, S. (2016). CircRNAs in hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood Cancer Journal*, 6(10). <https://doi.org/10.1038/bcj.2016.81>
- Cheng, J., Metge, F., & Dieterich, C. (2016). Specific identification and quantification of circular RNAs from sequencing data. *Bioinformatics*, 32(7), 1094–1096. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv656>
- Chioccarelli, T., Pierantoni, R., Manfredola, F., Porreca, V., Fasano, S., Chianese, R., & Cobellis, G. (2020). Histone Post-Translational Modifications and CircRNAs in Mouse and Human Spermatozoa: Potential Epigenetic Marks to Assess Human Sperm Quality. *Journal of Clinical Medicine*, 9(3), 640. <https://doi.org/10.3390/jcm9030640>
- Ebbesen, K. K., Hansen, T. B., & Kjems, J. (2017). Insights into circular RNA biology. *RNA Biology*, 14(8), 1035–1045. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1271524>
- Guo, J. U., Agarwal, V., Guo, H., & Bartel, D. P. (2014). Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome Biology*, 15(7), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0409-z>
- Hoffmann, S., Otto, C., Dose, G., Tanzer, A., Langenberger, D., Christ, S., Kunz, M., Holdt, L. M., Teupser, D., Hackermüller, J., & Stadler, P. F. (2014). A multi-split mapping algorithm for circular RNA, splicing, trans-splicing and fusion detection. *Genome Biology*, 15(2). <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r34>
- Patop, I. L., Wüst, S., & Kadener, S. (2019). Past, present, and future of circRNAs. *The EMBO Journal*, 38(16), 1–13. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100836>
- Piwecka, M., Glažar, P., Hernandez-Miranda, L. R., Memczak, S., Wolf, S. A., Rybak-Wolf, A., Filipchyk, A., Klironomos, F., Jara, C. A. C., Fenske, P., Trimbuch, T., Zywicka, V., Plass, M., Schreyer, L., Ayoub, S., Kocks, C., Kühn, R., Rosenmund, C., Birchmeier, C., & Rajewsky, N. (2017). Loss of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function. *Science*, 357(6357). <https://doi.org/10.1126/science.aam8526>
- Sekar, S., & Liang, W. S. (2019). Circular RNA expression and function in the brain. *Non-Coding RNA Research*, 4(1), 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2019.01.001>
- Varela-Martínez, E., Abendaño, N., Asín, J., Sistiaga-Poveda, M., Pérez, M. M., Reina, R., De Andrés, D., Luján, L., & Jugo, B. M. (2018). Molecular signature of aluminum hydroxide adjuvant in ovine PBMCs by integrated mRNA and microRNA transcriptome sequencing. *Frontiers in Immunology*, 9(OCT), 2406. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02406>
- Varela-Martínez, E., Bilbao-Arribas, M., Abendaño, N., Asín, J., Pérez, M., de Andrés, D., Luján, L., & Jugo, B. M. (2020). Whole transcriptome approach to evaluate the effect of aluminium hydroxide in ovine encephalon. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71905-y>
- Varela-Martínez, E., Corsi, G. I., Anthon, C., Gorodkin, J., & Jugo, B. M. (2021). Novel circRNA discovery in sheep shows evidence of high backsplice junction conservation. *Scientific Reports*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79781-2>
- Wang, D., Luo, Y., Wang, G., & Yang, Q. (2019). Circular RNA expression profiles and bioinformatics analysis in ovarian endometriosis. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, 7(7), 1–13. <https://doi.org/10.1002/mgg3.756>
- Xia, X., Tang, X., & Wang, S. (2019). Roles of CircRNAs in autoimmune diseases. *Frontiers in Immunology*, 10(APR), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00639>

- Zeng, X., Lin, W., Guo, M., & Zou, Q. (2017). A comprehensive overview and evaluation of circular RNA detection tools. *PLOS Computational Biology*, 13(6), e1005420. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005420>
- Zhang, H. da, Jiang, L. hong, Sun, D. wei, Hou, J. chen, & Ji, Z. ling. (2018). CircRNA: a novel type of biomarker for cancer. *Breast Cancer*, 25(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s12282-017-0793-9>

## 7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau E. Varela-Martínez-en tesiaren barnean Kopenhageko Unibertsitatean eginiko egonaldiaren ondorioa da, Europar Batasuneko CA15112 COST Action programaren baitan. Lana Scientific Reports aldizkarian argitaratu da aurtan (Varela-Martínez et al., 2021). Eskerrak lan honetan lagundu duten beste ikertzaileei: G. I. Corsi eta C. Anthon.

Lan hau Nafarroako Agrobioteknologia Institutuarekin eta Zaragozako Unibertsitateko Albaitaritza Fakultatearekin batera izan dugun proiektuari (MINECO: AGL2013-49137-C3) esker burutu da. UPV/EHUKo doktorego aurreko kontratua lortu dute E. Varela-Martínez-ek (PIF15/361) eta M. Bilbao-Arribas-ek (PIF17/306).