

Das Genexpressionsprofil humaner Ejakulate aus einem IVF-Programm

Fragestellung

Sowohl bei der *in vitro*-Fertilisierung (IVF) als auch bei der intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) herrscht nach wie vor eine erhebliche Diskrepanz zwischen den Fertilisierungs- (IVF: 92,6%; ICSI: 96,3%) und erzielten Schwangerschaftsraten (IVF: 29,5%; ICSI: 28,6%). Neben offensichtlichen gynäkologischen Faktoren ist es möglich, dass auch Spermatozoen Merkmale in sich tragen, die im kleineren Maße die Fertilisierung, aber im größeren Maße die „Qualität“ des Embryos und dessen Fähigkeit zur Implantation beeinflussen. Hier scheinen klassische Parameter wie Morphologie und Motilität einen eher geringen prädiktiven Wert zu haben [1]. Mit der Beschreibung des Transkriptoms [2] hat das mRNA-Repertoire der humanen Spermatozoen in den letzten Jahren eine verstärkte Aufmerksamkeit gewonnen. In Zusammenarbeit mit dem Fertility Center Hamburg haben wir die Genexpressionsprofile humaner Spermatozoen aus einem IVF-Programm untersucht, um diese mit dem Outcome zu korrelieren und prognostisch relevante Gene zu identifizieren.

Ergebnisse

Auswahl der Ejakulate für die Microarray-Analyse

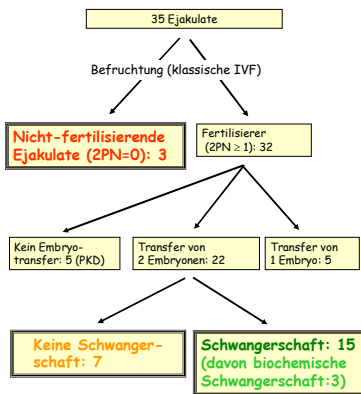


Abb. 1: Auswahl der Ejakulate für die Microarray-Analyse. Ausgewählte Ejakulate sind mit Dreifachrahmen gekennzeichnet. 2PN: Zygote mit zwei Pronuklei, PKD: Polkörperchendiagnostik

Es wurden Aliquots von 35 Ejakulaten gesammelt, die im Fertility Center Hamburg für eine klassische IVF-Behandlung verwendet und als normozoosperm eingeordnet wurden (WHO-Laborhandbuch, 2010). Aus diesen Ejakulaten wurde RNA extrahiert und diese auf Whole-Genome Microarrays (Codelink 55k) hybridisiert. Um den Einfluss von Faktoren auf der weiblichen Seite weitgehend ausschließen zu können, haben wir folgende IVF-Behandlungen von der Analyse ausgenommen: (1) mittels Polkörperchendiagnostik wurde eine Aneuploidie der Eizelle diagnostiziert und kein Embryotransfer vorgenommen (5 Fälle), (2) der Frau wurde nur ein Embryo übertragen (5 Fälle) (Abb. 1). Die verbleibenden 25 Proben wurden für die statistische Analyse der Genexpressionsdaten nach dem Outcome zu folgenden drei Gruppen zusammengefasst:

- (1) zur Schwangerschaft führende Ejakulate (Preg),
- (2) NICHT zur Schwangerschaft führende Ejakulate (NoPreg),
- (3) nicht-fertilisierende Ejakulate (NoFert).

Individuelle Heterogenität der Genexpressionsmuster von Ejakulaten

Zur Darstellung der Korrelation der Genexpressionsprofile mit dem Outcome diente die *Principle Component Analysis* (PCA) (Abb. 2). Die Ejakulate zeigen eine hohe individuelle Heterogenität in ihren Expressionsmustern. Die zum Vergleich herangezogenen Hodenbiopsien mit regelrechter Spermatogenese zeigen im Gegensatz dazu ein homogenes Genexpressionsmuster. Sie bilden in der dreidimensionalen Darstellung einen Cluster, der von den Ejakulaten getrennt ist. Bereits die durch die erste Hauptkomponente erfasste Varianz trennt Hodenbiopsien von Ejakulaten. Die durch die drei Hauptkomponenten erfasste Varianz ist nicht geeignet, die Gruppenzugehörigkeit der Ejakulate zu den drei Gruppen Preg, NoPreg und NoFert zu definieren.

Literatur:
[1] Hotaling JM, Smith JF, Rosen M, et al., *Fertil Steril*. 2011 Mar 1;95(3):1141-5.
[2] Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, et al., *Lancet*. 2002 Sep 7;360(9335):772-7.
[3] Platts AE, Dix DJ, Chemes HE, et al., *Hum Mol Genet*. 2007 Apr 1;16(7):763-73.
[4] Cappallo-Obermann H, Schulze W, Jastrow H, et al., *Mol Hum Reprod*. 2011 Nov;17(11):669-78.

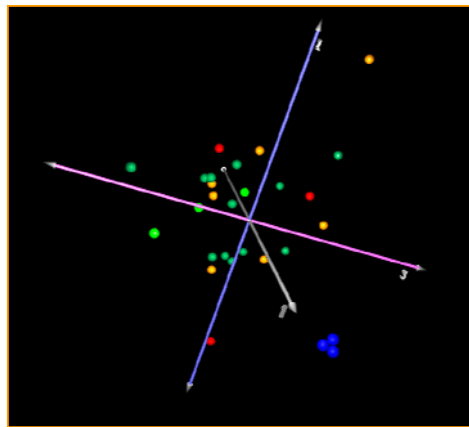


Abb. 2: Principle Component Analysis aller Gene. Darstellung der Proben. Der Farbcode markiert die Zuordnung zu den Gruppen: grün: Preg, orange: NoPreg, rot: NoFert, hellgrün: zur biochemischen Schwangerschaft führende Ejakulate, blau: Hodenbiopsien.

Durch ANOVA wird eine Gruppe von 278 Transkripten gefiltert, die den Outcome definieren

Zur Filterung von Genen, die die drei Gruppen von Ejakulaten trennen, wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Es wurden 278 signifikante Transkripte ermittelt. Führt man ein hierarchisches Clustering mit diesen Transkripten durch, so werden die Proben gemäß ihrer Zugehörigkeit zu den Gruppen Preg, NoPreg, NoFert in drei scharf abgegrenzte Cluster aufgetrennt (Abb. 3). Die Datenbankanalyse (DAVID Functional Annotation) ergab eine Überrepräsentation von Transkripten, deren Proteine eine Funktion in der zellulären Signaltransduktion haben: (1) *Rho*-vermittelt: PLEKHG4, OBSCN, AKAP13, FARP2, TTN, DNMBP, (2) *Ras*-vermittelt: RREB1, RAS2, RALB, RALGDS, FARP2, (3) *Notch*-vermittelt: DTX4, MAML2, NOTCH2NL, MAML3. Auch Transkripte des „Chromatin-Remodeling“ und Pyruvatstoffwechsel waren überrepräsentiert.

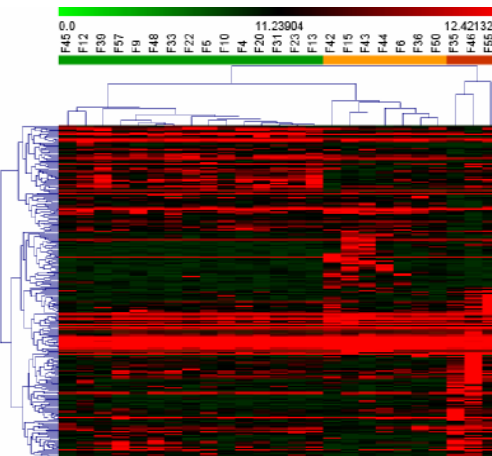


Abb. 3: Hierarchisches Clustering der Ejakulate und Gene nach ANOVA. Das Clustering erfolgte mit den 278 Genen, die die drei Gruppen in der ANOVA signifikant trennen (Pearson correlation, average linkage). F*: Nummern einzelner Ejakulate. Zuordnung der Ejakulate zu den Gruppen: grün: Preg, orange: NoPreg, rot: NoFert. Heat map: grün: niedrige Expression, rot: hohe Expression.

Schlussfolgerung und Ausblick

Die Genexpressionsprofile humaner Ejakulate zeichnen sich durch eine sehr hohe Variabilität aus. Eine mögliche Ursache hierfür ist in der Heterogenität der Ursachen für die Infertilität (auch auf weiblicher Seite) zu suchen. Wir haben einen begrenzten Pool an Transkripten identifiziert, die mit dem Erfolg der IVF-Behandlung korrelieren. Transkripte, die eine signifikante Funktion in der Spermatogenese haben, sind als Ausdruck der „testikulären Vergangenheit“ anzusehen. Analog dazu spiegeln Transkripte mit Funktionen in der frühen Embryonalentwicklung die „Zukunft“ der Spermatozoen wider. Der Effekt somatischer Transkripte bringt ein starkes Rauschen in die Ergebnisse.

Korrelationsanalysen zu einzelnen Parametern des Spermogramms wie der Fertilisierungsrate und dem Embryoscore stellen eine sinnvolle Analysemethoden dar, weil sie sich auf die einzelnen Proben beziehen.

Um die Ergebnisse zu verbessern und die bereits erhaltenen Daten zu bestätigen, bedarf es eines zweiten unabhängigen Satzes von Ejakulaten (test set).

Auf Transkriptionsebene korrelieren erniedrigte Schwangerschaftsraten und Teratozoospermie

Die Filterung mittels T-test ergab 865 Transkripte, die in den Gruppen Preg und NoPreg signifikant differentiell exprimiert sind ($p \leq 0.05$). Von diesen waren 83 mit einer Ratio ≥ 2 in der Gruppe NoPreg höher und 45 niedriger exprimiert. Abb. 4 zeigt die Expression der 25 Transkripte mit den höchsten Ratios. Transkripte, die in der Spermatogenese eine signifikante Rolle spielen, wurden in Abb. 4 rot markiert (z.B. KIF18, PVRL3, DMC1). Transkripte, die mit Teratozoospermie in Verbindung gebracht werden, wurden in Abb. 4 blau markiert (z.B. CAPS, VGF, F10) (GEO DataSets, NCBI, [3]). Die funktionelle Analyse dieser 128 Transkripte ($p \leq 0.05$ und Ratio ≥ 2) ergab eine Überrepräsentation von Genen, deren Proteine eine Funktion in der Regulation der Transkription (z.B. FOS, ACOT11, VGF) und des Nucleinsäurestoffwechsels (z.B. FOS, IL3, ETS1, ELF4) präsentieren.

Unter den in die drei Gruppen trennenden Transkripten finden sich insbesondere auch einige, die Proteine der ektoplastischen Spezialisierung und des Akrosoms kodieren (PVRL3, PFN4, ESP, SORBS1).

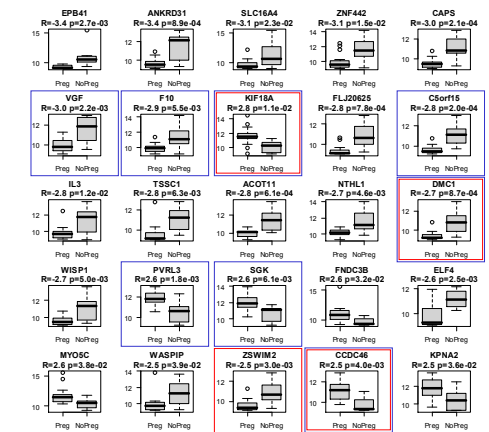


Abb. 4: T-Test der Gruppen Preg und NoPreg. Dargestellt sind die Transkriptionslevel der 25 Transkripte mit den höchsten bzw. niedrigsten Ratios und p-Werten ≤ 0.05 zwischen den Gruppen als Boxplots. R: Ratio, p: p-Wert, rot: Transkripte, die eine signifikante Rolle in der Spermatogenese spielen, blau: Transkripte, die mit teratozoospermien Ejakulaten einhergehen [3].

Die Fertilisierungsrate der Ejakulate korreliert signifikant mit der Expression mitochondrialer und ribosomaler Transkripte

Um zu testen, ob es einen Zusammenhang zwischen Outcome und Genexpression auf Ebene der einzelnen Ejakulate, also unabhängig von der Gruppeneinteilung Preg, NoPreg, NoFert gibt, haben wir die Korrelation von Parametern wie der Fertilisierungsrate und dem kumulativem Embryoscore mit der Genexpression untersucht. Abb. 5 zeigt die Transkripte mit den höchsten Korrelationskoeffizienten zur Fertilisierungsrate (Anteil der befruchteten Eizellen pro Zyklus). Die 100 Transkripte mit den höchsten Korrelationskoeffizienten wurden einer Datenbankanalyse unterzogen (DAVID, funktionelle Analyse). Mitochondriale und ribosomale Transkripte waren überrepräsentiert. Dieser Aspekt ist interessant, weil wir bereits zeigen konnten, dass sich nicht-fertilisierende Ejakulate durch hohe Mengen an ribosomaler RNA auszeichnen [4]. Andere Transkripte kodieren Proteine, die an der Organisation der Chromosomen bzw. der Regulation der Transkription oder dem Zellzyklus beteiligt sind.

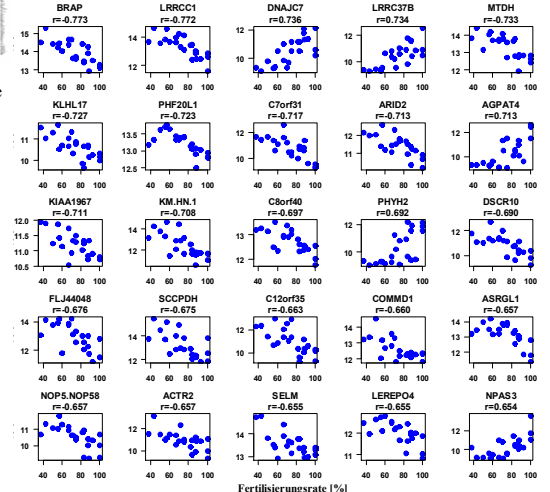


Abb. 5: Pearson Korrelationsanalyse. Dargestellt sind die Transkriptionslevel der 25 Transkripte mit der höchsten Korrelation zur Fertilisierungsrate (Anzahl der fertilisierten Eizellen pro Zyklus in %). r: Korrelationskoeffizient.