

## **Μαρία Καρβούνη**

### **“Study of the expression pattern of IGF-1 isoforms in human seminal plasma”**

#### **ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** Nowadays an increased trend of inability of achieving a pregnancy has been observed, with the underlying etiology of infertility to be unclear. This may hinder the optimal management of infertile couples. Albeit the great progress that has been observed, the complex male physiology along with the functioning mechanism of their reproductive system are complex and require intensive and continuous research. Insulin-like growth factor I (IGF-I) has been suggested as a factor that may play a pivotal role in male infertility due to its anabolic effect and differential expression pattern of its three isoforms, as it has been observed in many other pathological situations.

**PURPOSE:** The aim of the present study is to investigate the occurrence of differential expression of the three IGF-I isoforms between men presenting with abnormal semen parameters in semen analysis and normozoospermic males, as well as a possible association between a different expression pattern of the IGF-I isoforms and male infertility.

**METHODS:** Forty semen samples from men aged from 32 to 54 years old ( $43.9 \pm 4.6$ ) were collected for the present study. Each sample was evaluated for certain parameters according to the World Health Organization criteria. Written informed consent was obtained from all participants. Four study groups were identified according to the number of defects being identified in their semen analysis: “Normozoospermic”, “Single defect”, “Double defect” and “Oligoasthenoteratozoospermic (OAT)”. First, semen samples were diluted with phosphate-buffered saline (PBS) to  $10 \times 10^6$  spermatozoa per mL and underwent osmotic shock to eliminate the non-gamete component. Total RNA was extracted using TRIzol GTM according to the manufacturer’s instructions and its concentration and purity was determined using a BioSpec-nano Life Science spectrophotometer. Thereafter, complementary DNA (cDNA) synthesis was performed for each sample using Protoscript II First Strand cDNA synthesis kit. cDNA quantification was then conducted through real time polymerase chain reaction using specific primers for the three IGF-I isoforms. The mRNA level of each sample was normalized against 18s rRNA and expressed as fold change. At the same time, proteins were also isolated from spermatozoa using TRIzol GTM protocol and were used alongside with seminal plasma in western blot for detection of the IGF-IEc isoform at protein level. Statistical analysis was conducted using the R statistical programming language.

**RESULTS:** IGF-IEc mRNA was present in all 40 samples regardless of their semen pathology, however, the Ec isoform was not detectable at protein level given the amount of protein available. Moreover, IGF-IEa mRNA was not expressed except for a single individual where it appeared to be related to the subject’s temperament. Two out of 40 samples may have expressed the IGF-IEb isoform but only sequencing analysis could confirm that. The mean mRNA levels of IGF-IEc in the “Normozoospermic” group were statistically significant lower than those with “Double defect” ( $5.1 \pm 8.5$ ,  $p\text{-value}=0.0117^*$ ) and “OAT” ( $2.9 \pm 2.3$ ,  $p\text{-value}=0.0072^*$ ) and with a marginally non-significant difference with the “Single defect” group ( $4 \pm 3.9$ ,  $p\text{value}=0.0254$ ). Furthermore, a statistically negative correlation was found in the mRNA levels of IGF-IEc with three of the semen parameters: total sperm count ( $r=-0.3895225$ ,  $p\text{-value}=0.01298$ ), progressive motility

( $r = -0.4505146$ ,  $p\text{-value} = 0.003532$ ) and total motility ( $r = -0.3790446$ ,  $p\text{-value} = 0.01586$ ).

**CONCLUSIONS:** This study reported for the first time the distinct expression of the IGF-I isoforms in spermatozoa. The aforementioned results suggest a possible correlation between IGF-IEc mRNA levels and infertile men carrying two or more sperm defects and also that in spermatozoa the function of IGF-I is mediated mainly through the IGF-IEc isoform. Furthermore, the negative correlation of IGF-IEc mRNA levels with the aforementioned parameters indicates that high levels of IGF-IEc may negatively affect spermatogenesis and maturation process of spermatozoa. However, the conduction of larger, well-designed studies regarding the influence of the locally produced IGF-I isoforms on semen quality and spermatogenesis depending on their expression pattern, are needed in order to strengthen our findings.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### "Μελέτη του προτύπου έκφρασης των ισομορφών του IGF-1 στο ανθρώπινο σπερματικό πλάσμα"

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ:** Η υπογονιμότητα επηρεάζει όλο και περισσότερα ζευγάρια στις μέρες μας, καθιστώντας αναγκαία την ανεύρεση αιτιών και την εφαρμογή της καταλληλότερης θεραπείας. Η φυσιολογία των ανδρών, ωστόσο, και ο μηχανισμός του αναπαραγωγικού τους συστήματος είναι πολύπλοκοι και απαιτούν εντατική και συνεχή έρευνα. Ο ινσουλινο-μιμητικός αυξητικός παράγοντας 1 (insulin-like growth factor -I, IGF-I) έχει προταθεί ως ένας παράγοντας που μπορεί να διαδραματίσει κεντρικό ρόλο στην ανδρική υπογονιμότητα λόγω της δράσης του στον αναβολισμό και του διαφορετικού τρόπου έκφρασης των τριών ισομορφών του σε πολλές άλλες παθολογικές καταστάσεις.

**ΣΚΟΠΟΣ:** Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της ενδεχόμενης ύπαρξης διαφορετικής έκφρασης των τριών ισομορφών του IGF-I μεταξύ νορμοζωοσπερμικών ανδρών και εκείνων με μη φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος, καθώς και η πιθανή συσχέτιση ενός διαφορετικού προτύπου έκφρασης των ισομορφών με την ανδρική υπογονιμότητα.

**ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ:** Σαράντα δείγματα σπέρματος συλλέχθηκαν από άνδρες ηλικίας 32 έως 54 ετών ( $43.9 \pm 4.6$ ). Κάθε δείγμα σπέρματος εκτιμήθηκε για την ποιότητά του σύμφωνα τα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας. Όλοι οι συμμετέχοντες έδωσαν την έντυπη συγκατάθεσή τους. Σύμφωνα με τον αριθμό των ανώμαλων παραμέτρων που παρατηρήθηκαν στην ανάλυση σπέρματος τους, οι συμμετέχοντες κατηγοριοποιήθηκαν σε 4 ομάδες μελέτης: «Normozoospermic», «Single defect», «Double defect» και «Oligoastheno-teratozoospermic (OAT)». Αρχικά, τα δείγματα αραιώθηκαν με PBS σε τελική συγκέντρωση  $10 \times 10^6$  σπερματοζωάρια ανά mL και υποβλήθηκαν σε οσμωτικό σοκ για την εξάλειψη των μη γαμετικών κυττάρων. Το ολικό RNA απομονώθηκε από τα σπερματοζωάρια με το πρωτόκολλο TRIzol GTM σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του RNA προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο. Ακολούθησε η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) για κάθε δείγμα με το Protoscript II First Strand cDNA synthesis kit. Η ποσοτικοποίηση του cDNA στη συνέχεια διεξήχθη μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (q-PCR) χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για τις τρεις ισομορφές του IGF-I και το 18s rRNA ως γονίδιο αναφοράς. Ταυτόχρονα, οι πρωτεΐνες των σπερματοζωαρίων απομονώθηκαν με το πρωτόκολλο TRIzol GTM και χρησιμοποιήθηκαν παράλληλα

με το σπερματικό πλάσμα για την ανίχνευση της ισόμορφης IGF-IEc σε πρωτεϊνικό επίπεδο μέσω της τεχνικής Western Blot. Η στατιστική ανάλυση των παραπάνω δεδομένων διεξήχθη στο υπολογιστικό περιβάλλον της R.

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:** Το IGF-IEc mRNA ανιχνεύθηκε και στα 40 δείγματα της μελέτης ανεξάρτητα από την παθολογία του σπέρματός τους, ωστόσο, η ισομορφή IGF-IEc δεν ήταν ανιχνεύσιμη σε επίπεδο πρωτεΐνης, ενδεχομένως λόγω της μη επαρκούς ποσότητας πρωτεΐνης που απομονώθηκε και χρησιμοποιήθηκε κατά την ανάλυση ανοσοαποτύπωσης (western blot). Επιπλέον, το mRNA της ισομορφής IGFIEa ανιχνεύθηκε σε ένα μεμονωμένο άτομο. Δύο από τα 40 δείγματα φάνηκε να εκφράζουν την ισομορφή IGF-IEb, αλλά μόνο η αλληλούχιση του προϊόντος της PCR θα μπορούσε να το επιβεβαιώσει. Ακόμα, τα επίπεδα mRNA του IGF-IEc στην ομάδα "Normozoospermic" ήταν χαμηλότερα από την ομάδα "Double defect" ( $5.1 \pm 8.5$ ,  $p\text{-value}=0.0117^*$ ) και τους "OAT" ( $2.9 \pm 2.3$ ,  $p\text{-value}=0.0072^*$ ). Επιπλέον, βρέθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων mRNA της ισομορφής IGF-IEc και τριών από τις παραμέτρους του σπέρματος: ολικός αριθμός σπερματοζωαρίων ( $r=-0.3895225$ ,  $p\text{-value}=0.01298$ ), προωθητική κινητικότητα ( $r=-0.4505146$ ,  $p\text{-value}=0.003532$ ) και ολική κινητικότητα ( $r=-0.3790446$ ,  $p\text{-value}=0.01586$ ).

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:** Αυτή η μελέτη ανέδειξε για πρώτη φορά την έκφραση των ισομορφών του IGF-I σε επίπεδο mRNA σε σπερματοζωάρια. Ειδικότερα, τα ευρήματα της μελέτης υποδηλώνουν πιθανή συσχέτιση των επιπέδων mRNA του IGFIEc με την ανδρική υπογονιμότητα, οφειλόμενη σε 2 ή περισσότερες ανωμαλίες στις παραμέτρους του σπέρματος, και φαίνεται ότι στα σπερματοζωάρια οι δράσεις του IGF-I διαμεσολαβούνται κυρίως από την ισομορφή IGF-IEc. Επιπλέον, η αρνητική συσχέτιση των επιπέδων mRNA του IGF-IEc με τον ολικό αριθμό σπερματοζωαρίων, την προωθητική και την ολική κινητικότητα τους υποδεικνύει ότι τα υψηλά επίπεδα της ισομορφής IGF-IEc επηρεάζουν αρνητικά τη σπερματογένεση και τη διαδικασία ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος απαιτούνται για να εξακριβωθεί το πρότυπο έκφρασης των ισομορφών και η επίδραση τους στην ποιότητα του σπέρματος και στη σπερματογένεση.