

Zirkulierende microRNAs miR-27b, miR-141, miR-191, miR-222
und miR-433 als relevante Faktoren der Implantation bei
Patientinnen mit Polyzystischem Ovar-Syndrom

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Sofiya Epstein

geboren am 30.06.1994 in Charkow, Ukraine

Betreuer: Univ.-Prof. Dr. Hermann M. Behre

Gutachter*innen: Apl. Prof. Dr. Martin Staege
 Apl. Prof. Dr. Holger Herlyn, Mainz

05.07.2022

26.01.2023

Referat:

Zielstellung: Zirkulierende microRNAs gewinnen in den letzten Jahren zunehmend an diagnostischem und prognostischem Wert für eine Vielzahl an Erkrankungen. Ziel dieser Arbeit war es, die klinische Relevanz von fünf als plazentaspezifisch beschriebenen microRNAs (miR-27b, miR-141, miR-191, miR-222 und miR-433) zu evaluieren. Darüber hinaus wurde die Regulierung der Zielgene TGF β 2, IGF2, PLCD1 und EGR1 durch miR-141 und miR-191 untersucht.

Material und Methoden: Das Patientinnenkollektiv (n = 49) setzte sich aus Frauen, welche eine assistierte Reproduktionstherapie (IVF, ICSI) erhalten haben, zusammen. Bei nahezu der Hälfte der Patientinnen (47%) wurde im Rahmen der Fertilitätsdiagnostik ein PCO-Syndrom diagnostiziert. Im Verlauf der ART wurde den Frauen zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten Serumproben gewonnen. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden mittels quantitativer real-time-PCR (qPCR) die Serumlevel von miR-27b, miR-141, miR-191, miR-222 und miR-433 vermessen und mit klinischen Parametern (HOMA-Index, PCOS, intakte Schwangerschaft, Untersuchungszeitpunkt) korreliert. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde mittels Luciferase-Reporter-Assay die Regulation von TGF β 2, IGF2, PLCD1 sowie EGR1 durch miR-141 oder miR-191 untersucht.

Ergebnisse: In den qPCR-Analysen konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Serumlevel von miR-27b und dem HOMA-Index (p = 0,027) und dem Serumlevel von miR-141 und einer Schwangerschaft (p = 0,033) festgestellt werden. Die Auswertung der bivariaten Korrelation ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen den Serumleveln von miR-27b und dem HbA1c (p = 0,025) und dem oralen Glukosetoleranztest (oGTT; p = 0,018), miR-141 und oGTT (p = 0,041) und dem Alter (p = 0,038), miR-191 und der Fertilisationsrate (p = 0,009) und miR-222 und dem oGTT (p = 0,043) und BMI (p = 0,027). Der Luciferase-Assay belegte eine signifikante posttranskriptionelle Repression von TGF β 2 oder IGF2 durch miR-141-mimics und von PLCD1 oder EGR1 durch miR-191-mimics.

Schlussfolgerung: In der vorliegenden Arbeit konnten wir belegen, dass signifikante quantitative Unterschiede in den Serumleveln der gewählten microRNAs und einer Schwangerschaft bzw. einem gestörten Glukosestoffwechsel bestehen. MiR-141 und miR-191 konnten als potentielle Marker einer erfolgreichen Implantation identifiziert werden. Möglicherweise können diese auch zur Beurteilung der Blastozystenqualität im Rahmen einer ART herangezogen werden. Der Luciferase-Assay belegte die regulatorische Wirkung von miR-141 und miR-191 auf die gewählten Zielgene. Es sind weitere Studien in größerem Umfang notwendig, um die Auswirkung der microRNA-Expression auf die Implantation im Detail zu ergründen.

Inhaltsverzeichnis

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE
1. EINLEITUNG	1
1.1. UNGEWOLLTE KINDERLOSIGKEIT	1
1.2. WEIBLICHE INFERTILITÄT	2
1.4. MICRORNA.....	7
1.4.1. Allgemeine Grundlagen	7
1.4.2 Biogenese.....	8
1.4.3 Zirkulierende microRNAs.....	10
1.5. MICRORNAS UND IMPLANTATION.....	11
2. ZIELSTELLUNG	14
3. MATERIAL UND METHODEN	15
3.1. PATIENTINNENPROBEN UND ETHIK-VOTUM	15
3.2. MATERIALIEN.....	16
3.2.1. Chemikalien	16
3.2.2. Kits	17
3.2.3. MicroRNAs, Oligonukleotide	17
3.2.4. Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	18
3.3. METHODEN.....	19
3.3.1. RNA-Isolation mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (Trizol)	19
3.3.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA	20
3.3.3. cDNA-Synthese.....	20
3.3.4. Quantitative real-time-PCR.....	21
3.3.5. Zellreihen und Zellkultur	21
3.3.6. Luciferase-Reporter-Assay	22
3.3.7. Identifizierung möglicher Zielgene.....	23
3.3.8. Synthese des 3`UTR des Zielgens aus cDNA	23
3.3.9. Klonierung von DNA-Fragmenten.....	24
3.3.10. Klonierung des 3`UTR des Zielgens mit T4-Klonierung.....	26
3.3.11. Transfektion der HTR8/ SVneo; AC1-M59- Zellen	28
3.3.12. Vermessung der Luciferase-Aktivität	29
3.4. STATISTIK.....	29
4. ERGEBNISSE	30
4.1. PATIENTENKOLLEKTIV	30

4.2. BIVARIATE KORRELATIONEN	32
4.3. MIKRO-RNA SERUMLEVEL IN ABHÄNGIGKEIT VOM UNTERSUCHUNGSZEITPUNKT, DEM HOMA-INDEX, DER DIAGNOSE UND EINER INTAKTEN SCHWANGERSCHAFT	34
4.3.1. miR-27b	35
4.3.2. miR-141	36
4.3.3. miR-191	37
4.3.4. miR-222	38
4.3.5. miR-433	39
4.4. LUCIFERASE-REPORTER-ASSAY	40
4.4.1. Zielgenauswahl	40
4.4.2. TGF β 2	41
4.4.3. IGF2	42
4.4.4. PLCD-1	43
4.4.5. EGR1	44
5. DISKUSSION	45
5.1. ANALYSE DER MICRORNA-SERUMLEVEL IM BLUTSERUM	45
5.1.1. MicroRNA-Expression in Abhängigkeit einer Schwangerschaft und der Schwangerschaftswoche	45
5.1.2. MicroRNA-Expression in Zusammenhang mit dem PCO-Syndrom	48
5.1.3. MicroRNA-Expression in Zusammenhang mit dem Glukosestoffwechsel	50
5.2. MICRORNA-VERMITTELTE POSTTRANSKRIPTIONALE GENREGULATION	53
5.2.1. miR-141	53
5.2.2. miR-191	55
6. ZUSAMMENFASSUNG	56
7. LITERATURVERZEICHNIS	57
8. THESEN	68
ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE UND SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	
DANKSAGUNG	

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
AGO2	argonaute RISC catalytic component 2
ART	assistierte Reproduktionstherapie
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
DGCR8	DiGeorge critical region 8
DIR	Deutsches IVF Register
DNA	Desoxyribonukleinsäuren
dNTP	desoxyribonukleosid-Triphosphat
EGR1	Early Growth Response Protein 1
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
g	Gramm
GnRH	Gonadotropin-releasing-Hormon
h	Stunden
HCG	humanes Choriongonadotropin
HDL	high density Lipoprotein
hESC	humane endometriale Stammzellen
HOMA	Homeostasis Model Assessment
ICSI	intrazytoplasmatische Spermien-Injektion
IGF-2	Insulin-like Growth Factor 2
IVF	in vitro Fertilisation
kg	Kilogramm
LH	Luteinisierendes Hormon
Max.	Maximum
MgCl ²	Magnesiumchlorid
min	Minuten
Min.	Minimum
miR	microRNA
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar

mRNA	messenger RNA
nm	Nanometer
o. b.	oben beschrieben
oGTT	oraler Glukosetoleranztest
PCOS	polyzystisches Ovar-Syndrom
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLCD-1	Phospholipase C δ 1
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RISC	RNA-induced silencing complex
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunden
s.	siehe
snoRNA	small nucleolar RNA
SSW	Schwangerschaftswoche
TGF β 2	Transforming Growth Factor beta 2
TRBP	trans-activation-responsive RNA-binding protein
tRNA	Transfer-RNA
UTR	untranslated Region
WHO	World Health Organization
°C	Grad Celsius
μ l	Mikroliter

1. Einleitung

1.1. Ungewollte Kinderlosigkeit

Nach einer langen Phase der sinkenden Geburtenrate ist in den letzten sechs Jahren der Kinderwunsch in Deutschland deutlich gestiegen. Im Jahr 2019 wurden 778 090 Lebendgeborene in Deutschland verzeichnet, das sind 96 021 mehr als man im Jahr 2013 in Deutschland zählte (Statistisches Bundesamt, 2021). Der Kinderwunsch scheint sich jedoch auf einen späteren Lebensabschnitt zu verlagern. So lag das Durchschnittsalter der deutschen Frauen bei der Geburt des ersten Kindes bei ca. 30 Jahren. Im Vergleich dazu lag 1990 das Durchschnittsalter bei knapp 27 Jahren (Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung, abgerufen am 7. Oktober 2021).

Leider werden viele Paare in diesem Lebensplanungsabschnitt mit ungewollter Kinderlosigkeit konfrontiert. Laut Bundesministerium für Familie, Senioren, Frauen und Jugend ist in Deutschland fast jedes zehnte Paar zwischen 25 und 59 Jahren ungewollt kinderlos (Wippermann, 2021). Weltweit wird die Zahl der Betroffenen auf über 186 Millionen Menschen geschätzt (Inhorn et al., 2015).

Die Definition der WHO besagt, dass eine Infertilität vorliegt, wenn bei einem Paar trotz regelmäßigem, ungeschütztem Geschlechtsverkehr nach 12 Monaten keine Schwangerschaft eingetreten ist (WHO, 2018). Es wird zwischen primärer und sekundärer Infertilität unterschieden (Farquhar et al., 2019). Betroffene mit primärer Infertilität haben noch nie eine spontane Schwangerschaft erzielt. Die sekundäre Infertilität wird durch mindestens eine bisher stattgehabte Schwangerschaft definiert (Farquhar et al., 2019).

Steht ein Paar vor solch einer Diagnose ist der Leidensdruck meist hoch. Mehrere Studien zeigten, dass Patientinnen, die sich einer Kinderwunschbehandlung unterziehen, häufiger an depressiven Störungen sowie Angststörungen leiden (Gdańska et al., 2017). Oft wird die Paar-Beziehung durch Gefühle wie Angst, Scham, Trauer und Wut belastet. In ca. 20% liegt die Ursache der Kinderlosigkeit ausschließlich bei den Männern, in ca. 39% ausschließlich bei der Frau. Jedoch bleibt in ca. 15% die Ursache der Kinderlosigkeit unklar (Nieschlag & Behre, 2009).

Die drei Hauptfaktoren, die die spontane Empfängniswahrscheinlichkeit beeinflussen, sind: die Zeit des unerfüllten Kinderwunsches, das Alter der Partnerin oder eine krankheitsbedingte Unfruchtbarkeit (Vander Borgh et al., 2018). Achtzig Prozent der Schwangerschaften treten in den ersten sechs Zyklen mit regelmäßigem Verkehr auf. Nach 12 erfolglosen Zyklen werden 10% der Paare als unfruchtbar bezeichnet, jedoch beläuft sich die Chance auf eine spontane Lebendgeburt in den nächsten 36 Monaten auf ca. 55 %. Nach 48 Monaten sind ca. 5% der Paare definitiv unfruchtbar mit nahezu keiner Chance auf eine spontane Schwangerschaft (Gnoth et al., 2005).

Durch den gesellschaftlichen Wandel und die Emanzipation der Frau verschiebt sich der Kinderwunsch häufiger auf ein späteres reproduktives Alter. Im Deutschen IVF Register (DIR) wird das Durchschnittsalter von Männern und Frauen dokumentiert, welche sich einer Kinderwunschbehandlung mittels in vitro Fertilisation (IVF) oder intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) unterzogen haben. Im Jahr 2019 lag das Durchschnittsalter des Mannes bei 38,9 Jahren und der Frau bei 35,5 Jahren – 1997 lag das Durchschnittsalter der Frau noch bei 32,6 Jahren (Blumenauer et al., 2020).

In vielen Fällen wird der Weg der aktiven Kinderwunschbehandlung gewählt. Im DIR werden die in Deutschland durchgeführten ART-Zyklen dokumentiert. Neben konservativen Therapieansätzen haben Paare die Möglichkeit minimalinvasive Verfahren wie die IVF und ICSI zu nutzen. Im Jahr 2018 wurden in Deutschland 106 397 Behandlungszyklen erfasst. Darin enthalten sind insgesamt 65 328 IVF und ICSI-Zyklen, darüber hinaus auch Auftauzyklen nach vorheriger Kryokonservierung von befruchteten Eizellen aus vorherigen ART-Zyklen. Die Rate der zustande gekommenen Schwangerschaften aus IVF/ ICSI betrug 32,2 %. Zu einer tatsächlichen Geburt kam es in 73,2% der eingetretenen Schwangerschaften (Blumenauer et al., 2020).

Doch trotz der Vielzahl an neuen diagnostischen Möglichkeiten und Therapieoptionen bleibt bei ca. 15% der Paare die Ursache der Kinderlosigkeit unklar (Nieschlag & Behre, 2009). Auf Grund dessen besteht weiterhin ein Interesse an der nachhaltigen Erforschung der Grundlagen von Infertilität, sowie anhand dessen an der Ableitung von neuen Ansätzen zur Verbesserung der reproduktionsmedizinischen Diagnostik und folglich der Therapiemöglichkeiten.

1.2. Weibliche Infertilität

Insgesamt wird die Prävalenz der Infertilität weltweit auf ca. 9 – 18 % geschätzt (Hanson et al., 2017). In 39% der Fälle liegt die Ursache ausschließlich bei der Frau (Nieschlag & Behre, 2009). Frauen haben im Gegensatz zu Männern eine biologisch begrenzte fruchtbare Phase. Eine Frau kommt mit einer definierten Menge an Eizellen zur Welt, von denen über die Hälfte bereits vor der Pubertät untergehen. Ab der ersten Menstruation treten 40-500 Oozyten monatlich den Reifungsprozess an, von denen nur eine zum sogenannten dominanten Follikel heranwächst und ovuliert (Weyerstahl & Stauber, 2013).

Die Ursachen weiblicher Fertilitätsstörungen sind teils sehr komplex und ähnlich wie bei Männern auf mehreren Ebenen lokalisiert. Grob kann man sie unterteilen in Störungen der Ovulation, des Eizelltransportes und der Implantation. Zusätzlich können sich Lebensstilfaktoren wie Stress, Übergewicht, Tabakkonsum und Alkohol negativ auf die Fortpflanzungsfähigkeit auswirken (Vander Borgh et al., 2018).

Eine häufige Ursache für die anovulatorische Infertilität ist das Polyzystische Ovar-Syndrom (PCOS). Das PCOS ist mit einer Prävalenz von 6-20% die häufigste endokrine Störung der Frau im reproduktiven Alter (Escobar-Morreale, 2018), welche Auswirkungen auf die Fertilität sowie die psychische, kardiovaskuläre und metabolische Gesundheit hat.

Die Diagnosestellung erfolgt in Europa nach den 2003 postulierten Rotterdam Kriterien, die wie folgt lauten: 1. Oligo- oder Anovulation, 2. Klinische oder biochemische Zeichen der Hyperandrogenämie und 3. Nachweis von polyzystischen Ovarien mittels Ultraschall. Treffen zwei der drei Kriterien zu und sind andere Erkrankungen ausgeschlossen, wird die Diagnose eines PCOSyndroms gestellt. („Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS)“, 2004).

Basierend auf den Rotterdam Kriterien wurden 2012 vom National Institutes of Health vier Phänotypen beschrieben (National Institutes of Health, 2012):

A – Hyperandrogenämie, Ovulationsstörungen, polyzystische Morphologie der Ovarien

B – Hyperandrogenämie, Ovulationsstörungen

C – Hyperandrogenämie, polyzystische Morphologie der Ovarien

D – Ovulationsstörungen, polyzystische Morphologie der Ovarien

Die Phänotypen A und B treten am häufigsten auf und weisen die größte Anzahl an metabolischen Risikofaktoren auf (Welt & Carmina, 2013). Neben einem erhöhten Risiko für Diabetes mellitus Typ II und kardiovaskulären Erkrankungen, erleiden Frauen mit einem PCO-Syndrom zusätzlich häufiger Komplikationen in der Schwangerschaft, wie beispielsweise Gestationsdiabetes oder Präeklampsie, und haben ein erhöhtes Frühgeburtsrisiko (Kjerulff et al., 2011).

Eine genaue Unterscheidung zwischen Ursache und Folge eines polyzystischen Ovar-Syndroms gestaltet sich oft schwierig (Bednarska & Siejka, 2017). Die große Variation an Symptomen lässt bereits darauf schließen, dass die Pathogenese äußerst komplex und multifaktoriell ist.

Mehrere Studien haben gezeigt, dass das Syndrom eine hohe genetische Komponente aufweist. So liegt das Risiko, ein PCO-Syndrom zu entwickeln, bei 30-50%, wenn bereits die Mutter oder Schwester daran leiden (Kahsar-Miller & Azziz, 1998; Lerchbaum et al., 2014). Die konkreten Ursachen sind immer noch unklar, jedoch weisen Frauen mit PCOS eine erhöhte pulsatile Freisetzung von GnRH aus dem Hypothalamus auf, welche zu einem gestörten LH: FSH Verhältnis führt, die eine erhöhte Ausschüttung an Androgenen bedingt, und dadurch die Follikelreifung und Ovulation behindert (Farquhar et al., 2019).

Die Therapie des PCOS sollte auf den Einzelnen zugeschnitten sein und ist oft multimodal. Erste Behandlungsmaßnahmen stellen Anpassungen des Lebensstils dar. Bereits kleine Änderungen

des Lebensstils können Stoffwechselstörungen, Eisprung, Fruchtbarkeit und Stimmung verbessern (Thomson et al., 2010). Andere, sowohl operative als auch medikamentöse Therapieoptionen zielen darauf ab, die metabolische Dysfunktion, den Hyperandrogenismus, die Fertilität sowie den psychischen und emotionalen Status zu verbessern (Azziz et al., 2016).

Eizelltransportstörungen sind meist bedingt durch Tubenpathologien und zählen mit ca. 30% zu den häufigsten Ursachen der weiblichen Unfruchtbarkeit (Briceag et al., 2015).

Die meisten Fälle der Tuben-bedingten Infertilität sind auf unbehandelte sexuell übertragbare Krankheiten zurückzuführen. Die Chlamydien-Infektion gehört weltweit zu den häufigsten sexuell übertragbaren Krankheiten und verläuft bei Männern und Frauen in bis zu 80% asymptomatisch (RKI, 2010; Buder et al., 2019). Aszendierende Erreger können Eileiterentzündungen, Schleimhautschäden und Adhäsionen verursachen, die den Eizelltransport behindern (RKI, 2010). Seit dem 01.01.2008 wird sexuell aktiven Frauen bis zum 25. Lebensjahr ein Chlamydien-Screening angeboten, um die Infektion frühzeitig zu erkennen und somit schwerwiegende Folgeschäden zu vermeiden (RKI, 2010).

Eine weitere Ursache von Transportstörungen im oberen Genitaltrakt ist die Endometriose. Dies ist eine chronisch entzündliche Erkrankung, welche durch Vorkommen von endometriumähnlichem Gewebe außerhalb des Uterus charakterisiert ist. Weltweit leiden ca. 6-10% der gebärfähigen weiblichen Bevölkerung an Endometriose (Chapron et al., 2019). Von den betroffenen Frauen sind 30-50% infertil (Lee et al., 2020). Knapp ein Drittel der Frauen weisen eine Beteiligung der Eierstöcke auf. Über verschiedene Mechanismen kommt es zu entzündlichen Veränderungen, Verwachsungen und Störungen der Zilienbeweglichkeit (Hill et al., 2020). In Abhängigkeit des Schweregrades variiert die Chance auf spontane Empfängnis. Bei Frauen mit milden Symptomen tritt in 50% eine spontane Schwangerschaft auf, wohingegen bei Frauen mit moderater Symptomatik die Chance nur noch bei 25% liegt (Lee et al., 2020).

Nach operativen Eingriffen wie Adhäsioolyse oder Entfernung von ektopem Endometrium konnte die Rate an Spontanschwangerschaften erhöht werden (Lee et al., 2020).

Die Implantation ist ein sehr komplexer Prozess, welcher von vielen Faktoren abhängig und sehr vulnerabel ist. Sie ist in erster Linie abhängig von der Uterusbeschaffenheit, der Qualität des Embryos/Blastozyte und der koordinierten Interaktion beider (Moustafa & Young, 2020). Darüber hinaus wurden mehrere Risikofaktoren auf verschiedenen Ebenen für das Fehlschlagen der Einnistung postuliert. Dazu zählen das Alter der Frau, postinfektiöse strukturelle und immunologische Veränderungen des Endometriums, Hormonstörungen und Lebensstilfaktoren wie Rauchen und Drogenkonsum, BMI sowie Stress (Bashiri et al., 2018).

1.3 Befruchtung, Implantation und Frühschwangerschaft

Durch die biologisch determinierte Anzahl an Eizellen ist die weibliche Fertilität zeitlich begrenzt. Bei Eintritt in die Pubertät existieren pro Ovar noch ca. 200 000 Eizellen. Diese bilden sich unter Einfluss von FSH und LH von Primordialfollikeln über Primär- und Sekundärfollikeln zu Tertiärfollikeln aus. Der Tertiärfollikel misst einen Durchmesser von ca. 20 mm und besteht aus einer flüssigkeitsgefüllten Follikelhöhle und dem aus Granulosazellen bestehenden Cumulus oophorus, welcher die Eizelle einschließt. Der sprungreife Follikel, auch Graaf-Follikel genannt, weist einen Durchmesser von um die 25 mm auf. Kurz vor der Ovulation löst sich der Cumulus oophorus aus dem Zellverband und die Eizelle schwimmt frei in der Follikelflüssigkeit (Weyerstahl & Stauber, 2013).

Der in der Regel um den 14. Tag des Zyklus zustande kommende LH-Peak initiiert die Ovulation. Unter Einfluss von proteolytischen Hormonen kommt es am dünnsten Punkt des Follikels zur Ruptur der Ovaroberfläche. Die von Granulosazellen umgebene Eizelle wird vom Fimbrientrichter der Tuba uterina aufgenommen. Nach der Ovulation ist die Eizelle 12-24 h befruchtungsfähig (Weyerstahl & Stauber, 2013). Die verbliebene leere Follikelhöhle im Ovar wird LH-abhängig in das progesteronproduzierende Corpus luteum transformiert. Dieses sezerniert hauptsächlich Progesteron, welches das Endometrium in Vorbereitung auf eine mögliche Implantation in die sekretorische Phase überführt. Findet keine Befruchtung statt degeneriert das Corpus luteum zum Corpus albicans (Schneider et al., 2016).

Bei der Kohabitation werden ca. 300-500 Millionen Spermien in den weiblichen Genitaltrakt abgegeben, wovon lediglich 500-800 den eigentlichen Befruchtungsort, die Eileiter, erreichen. Nach durchlaufener Kapazitation sind die Spermien befruchtungsfähig. An der Eizelle angelangt binden die Spermien an ZP3, einem Glykoprotein der Zona pellucida. Durch diese Bindung wird die Akrosomenreaktion getriggert. Dabei kommt es zur Ausschüttung von Akrosin, welches die Lyse der Zona pellucida ermöglicht. Nun besteht die Möglichkeit der Membranfusion von Spermium und Eizelle (Georgadaki et al., 2016). Nach Vollendung der Reifeteilung verschmelzen beide Pronuklei und bilden eine diploide Zygote. Diese vollzieht bereits während der Wanderung durch die Tuba uterina mehrere Furchungsteilungen. Um den dritten Tag hat die Zygote das 32-Zell-Stadium (Morula) erreicht und tritt in das Uteruslumen ein. Dort folgt die Weiterentwicklung zu einer Blastozyste, bei der sich bereits zwei Zellhaufen unterscheiden lassen – der zentral gelegene Embryoblast und der äußere Trophoblast. Ca. am 6-8. Tag nach der Befruchtung beginnt sich die Zona pellucida aufzulösen und die Blastozyste lagert sich zur Implantation an das Endometrium an (Weyerstahl & Stauber, 2013).

Die Implantation ist ein hochkomplexer und noch nicht vollständig erforschter Prozess. Beim Menschen ist die natürliche Empfängnis pro Zyklus mit ca. 30% sehr gering. 75% der gescheiterten Schwangerschaften werden auf einen Implantationsfehler zurückgeführt (Cha et al., 2012). Eine erfolgreiche Implantation erfordert eine Synchronisation zwischen dem Erwerb der Implantationskompetenz der Blastozyste und einem aufnahmefähigen Zustand des Endometriums (Zhang et al., 2013). Das Endometrium ist nur in einer geringen Zeitspanne empfänglich für eine Implantation der Blastozyste, dem sogenannten Implantationsfenster (window of implantation). Die Empfindlichkeit des menschlichen Uterus gegenüber der Implantation wird in drei Phasen unterteilt: prärezeptive Phase, rezeptive Phase und nicht rezeptive Phase. Die rezeptive Phase wird zwischen dem 6. und 10. Tag nach dem Eisprung erreicht (Zhang et al., 2013). Es wird angenommen, dass Progesteron, Östrogen und lokal ausgeschüttete Signalmoleküle durch autokrine, parakrine und juxtakrine Wechselwirkungen zusammenwirken, um den komplexen Prozess der Dezidualisierung und schließlich der Implantation zu ermöglichen (Zhang et al., 2013). Seitens der Blastozyste ist die Ausbildung eines Trophoblastepithels die Voraussetzung für eine Adhäsion und Einnistung in das rezeptive Endometrium (Schneider et al., 2016).

Trifft nun eine reife Blastozyste auf ein rezeptives Endometrium kommt es durch komplexe Wechselwirkungen zwischen beiden zur Invasion des Trophoblasten in die Dezidua – der Implantation. Dies geschieht zwischen dem 7. und 12. Tag post conceptionem. Im Trophoblasten differenzieren sich anschließend zwei Zellschichten: der innere Zytotrophoblast und der äußere Synzytiotrophoblast. Während beim Zytotrophoblasten noch klare Zellgrenzen existieren, ist der Synzytiotrophoblast eine vielkernige Masse ohne abgrenzbare Zellmembranen, der durch das Verschmelzen multipler Zellen des Zytotrophoblasten entsteht. Im Weiteren entstehen durch starke Proliferation des Zytotrophoblasten die embryonalen Anteile der Plazenta. Ab dem 10. Tag ist die Blastozyste vollständig im Endometrium implantiert (Weyerstahl & Stauber, 2013).

In der zweiten und dritten Woche nach der Befruchtung bildet sich die Plazenta aus. Durch stetiges Einwachsen des Synzytiotrophoblasten in die Dezidua werden mütterliche Gefäße erreicht und arrodirt. Das entstandene Lakunenlabyrinth im Synzytiotrophoblasten wird nun von mütterlichem Blut durchflossen. Durch Invasion von Zytotrophoblastzellen in den Synzytiotrophoblasten entstehen die Primärzotten. Folgend bildet sich im Inneren des Zytotrophoblasten ein Mesenchymkern aus extraembryonalen Stammzellen (Sekundärzotten). In der dritten Woche bilden sich Gefäße und Blutzellen im Mesenchymkern der Sekundärzotten aus, welche dann als Tertiärzotten bezeichnet werden. Diese ragen in den intervillösen Raum, welcher von mütterlichem Blut durchspült wird. Dort kommt es zum Austausch von Gasen und Nährstoffen über die Plazentaschranke (Ulfig & Brand-Saberi, 2017).

Parallel zur Plazentation entwickelt sich aus dem Embryoblasten der Embryo. Vorerst bildet sich eine dreiblättrige Keimscheibe, welche nach mehrfachen Abfaltungen in der vierten Woche erstmals die typische Form eines Embryos annimmt (Ulfig & Brand-Saberi, 2017). In der letzten Woche der Embryonalperiode sind alle wichtigen Organsysteme bereits angelegt und der Embryo hat eine menschliche Gestalt angenommen. Mit dem Eintritt in die Fetalperiode sind die meisten vulnerablen Entwicklungsphasen überstanden und das Risiko von schweren Fehlbildungen bis gar Spontanaborten reduziert sich (Ulfig & Brand-Saberi, 2017).

Eine essentielle Rolle von microRNAs bei Differenzierungsprozessen ist gut beschrieben. Diese kurzen, nicht kodierenden einzelsträngigen RNA-Moleküle bergen ein hohes klinisches Potential, bei dem es zu klären gilt, ob diese zur Diagnostik oder Therapie der Infertilität beitragen können.

1.4. MicroRNA

1.4.1. Allgemeine Grundlagen

Die Informationen des menschlichen Genoms sind in Form von DNA gespeichert und werden durch die RNA-Polymerasen transkribiert. Bei den in diesem Prozess entstehenden Transkripten unterscheidet man zwischen kodierender und nicht-kodierender RNA. MicroRNAs zählen zu der Gruppe der nicht-kodierenden RNA, und spielen eine wichtige Rolle in dem komplexen Prozess der posttranskriptionellen Genregulation.

Die erste microRNA (*lin-4*) wurde von den Arbeitsgruppen um Ambros und Ruvkun im Jahr 1993 in der Fadenwurmspezies *Caenorhabditis elegans* beschrieben (Lee et al., 1993). Es handelt sich bei microRNAs um ca. 18-25 Nukleotid lange, einsträngige und nicht-kodierende RNAs endogenen Ursprungs, welche die Genexpression posttranskriptionell über sequenzspezifische Interaktion mit Zielstellen in mRNAs regulieren (Bartel, 2004).

Mittlerweile sind über 2000 microRNA-Gene im menschlichen Genom bekannt (Kozomara & Griffiths-Jones, 2010). Es wird geschätzt, dass microRNAs 30% der Protein-kodierenden Gene regulieren (Filipowicz et al., 2008). Sie haben eine wichtige Funktion in einer Vielzahl an biologischen Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Zelltod (Tüfekci et al., 2013).

Viele microRNAs werden ubiquitär exprimiert, jedoch können einige microRNAs bestimmten Organen zugeordnet werden und sind somit gewebespezifisch (Ludwig et al., 2016). Neben Geweben konnten microRNAs in einer Vielzahl an Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden, wie etwa Plasma und Serum, Tränenflüssigkeit, Kammerwasser, Sperma, Urin und Speichel.

Erstmals wurde der Zusammenhang von microRNA-Expressionsmustern und bestimmten Erkrankungen an dem Beispiel der chronisch lymphatischen Leukämie beschrieben (Calin et al.,

2002). Nach dem heutigen Wissensstand werden bestimmte microRNA-Profile mit verschiedenen Tumortypen und Stadien, einer Reihe von Krankheiten wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Übergewicht, Diabetes mellitus, neurodegenerativen Erkrankungen, sowie veränderten physiologischen Zuständen wie Schwangerschaft in Verbindung gebracht (Liu et al., 2021; Mori et al., 2019; Wessels et al., 2013).

Zirkulierende microRNAs weisen eine sehr hohe Stabilität auf. Sie widerstehen der Degradation bei Raumtemperatur bis zu vier Tage und halten anspruchsvollen Bedingungen wie Kochen, mehrfaches Einfrieren und Auftauen, sowie extremen pH-Werten stand (O'Brien et al., 2018).

Diese Eigenschaft macht microRNAs zu potenziell nützlichen Kandidaten für diagnostische und klinische Anwendungen. Die Rolle als biologischer Marker wird derzeit in zahlreichen Fachgebieten intensiv erforscht, um eine neue minimalinvasive Diagnostik zu etablieren.

1.4.2 Biogenese

Die Kodierung der bekannten microRNAs erfolgt entweder durch individuelle Gene (monocistronisch) oder in Form von Clustern, die die Erbinformation für bis zu hunderten von microRNAs tragen (polycistronisch). Die in einem Cluster kodierten microRNAs werden als ein langes Produkt transkribiert und anschließend in die einzelnen reifen microRNAs verarbeitet. Zusätzlich können microRNAs in Introns von proteinkodierenden Genen vorliegen (Treiber et al., 2019).

Die Biogenese der microRNAs ist ein mehrstufiger Prozess und kann unterteilt werden in Mikroprozessorkomplex-abhängig und -unabhängig (O'Brien et al., 2018; Treiber et al., 2019).

Bei der klassischen, Mikroprozessorkomplex-abhängigen Biosynthese erfolgt die Transkription mittels der RNA-Polymerase II. Das entstandene Transkript (pri-microRNA) hat eine spezifische Länge, besitzt am 5'-Ende eine Kappe und am 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz. Bereiche mit nichtkomplementären Basenpaaren falten sich in kleine doppelsträngige Schleifen (stem-loops) und bilden so die sogenannten Haarnadelstrukturen (Filipowicz et al., 2008; Bartel, 2018). Die primären microRNAs werden von einem Kernproteinkomplex, Mikroprozessorkomplex genannt, in einzelne ca. 60 bp lange loops (pre-microRNAs) gespalten. Dieser Mikroprozessorkomplex setzt sich aus Drosha, einer Endonuklease der RNase III-Familie, sowie einem RNA-bindenden Ko-Protein namens DGCR8 (DiGeorge critical region 8) und einigen noch wenig erforschten Hilfsfaktoren zusammen. Die entstandene pre-microRNA wird anschließend über aktiven Transport mittels Exportin 5 aus dem Zellkern in das Zytoplasma exportiert (Bartel, 2018; Treiber et al., 2019).

Im Zytoplasma bindet die pre-microRNA an eine weitere Endonuklease der RNase III-Familie namens Dicer. Diese prozessiert die pre-microRNA mit Hilfe eines TRBP (trans-activation-

responsive RNA-binding protein) in ca. 20-25 bp kurze doppelsträngige microRNA-Duplexe. Schließlich wird der doppelsträngige microRNA-Komplex vom RNA-induced silencing complex (RISC) gebunden. Diesem Komplex lagert sich AGO2, ein Mitglied der Argonaut Protein Familie, an und bildet mit einem Strang die reife, bioaktive microRNA aus. Der andere Strang wird abgebaut (Treiber et al., 2019). Anschließend bindet die an RISC gebundene microRNA an komplementäre Sequenzen im 3' UTR ihrer Ziel-mRNA und reguliert mit Hilfe des Effektorproteins AGO die Gen-Expression entweder durch Translationshemmung oder mRNA-Abbau (Fabian & Sonenberg, 2012; Treiber et al., 2019).

Abgesehen von der oben beschriebenen klassischen microRNA Biogenese, gibt es noch weitere Synthesewege, die Dicer oder Drosha-unabhängig sind. Ein Beispiel sind die „Mirtrons“. Dabei handelt es sich um pre-microRNAs, die durch Spleißen von Introns entstanden sind und Drosha-unabhängig in das Zytoplasma transportiert werden (Treiber et al., 2019). Die mirtron-Haarnadeln sind wesentlich länger, häufig 3'uridyliert und weisen an ihren Enden heterogenere Nukleotide auf (Wen et al., 2015). Im Zytoplasma folgen sie dem klassischen Weg, binden an Dicer und werden wie o. b. zur bioaktiven Form prozessiert.

Eine weitere mikroprozessorunabhängige Klasse von microRNAs stammt aus dem 5'-Ende von Polymerase II-transkribierten Genen, in denen sich das entstehende Transkript zu einer Stemloop-Struktur faltet und eine 7-Methylguanosin-Kappe am 5' UTR aufweist. Diese Kappe wird anders als bei den klassischen microRNAs nicht vom Mikroprozessorkomplex entfernt. Durch Exportin 5 findet der Transport in das Zytoplasma statt, wo die weitere Spaltung durch Dicer stattfindet. Die Kappe verhindert das Beladen von Ago mit dem 5p-Arm und daher ist die microRNA-Expression von solchen Vorläufern auf den 3p-Arm beschränkt (O'Brien et al., 2018; Treiber et al., 2019).

Weitere Drosha-unabhängige microRNAs stammen von anderen nicht kodierenden RNAs wie snoRNA oder tRNA. So ist die korrekte Faltung von tRNA-Transkripten entscheidend für die weitere Biogenese. Eine Prä-tRNA mit erweiterter Komplementarität der 3'- und 5'-Verlängerungen kann nicht automatisch die typische tRNA-Struktur annehmen und benötigt das RNA-Chaperon La um eine korrekte Faltung einzugehen. In Abwesenheit von La faltet sich die pre-tRNA in lange Haarnadelstrukturen, die ein Dicer-Substrat darstellen. Einige der durch Dicer gespaltenen pre-tRNAs können dann an RISC binden. Obwohl einige dieser Fragmente echte microRNAs darstellen, ist die Funktion der meisten AGO-assoziierten tRNA- oder snoRNA-Fragmente noch nicht ausreichend erforscht (O'Brien et al., 2018; Bartel, 2018; Treiber et al., 2019).

Dicer-unabhängige microRNAs finden sich deutlich seltener. Am besten erforscht ist die miR-451, welche von Säugetieren in Erythrozyten exprimiert wird. Die entsprechende pri-microRNA wird wie die klassisch synthetisierte pri-microRNA von Drosha gespalten und in das Zytoplasma

transportiert. Das dabei entstandene Produkt ist jedoch zu kurz, um von Dicer gespalten zu werden und bindet direkt an AGO2. Durch AGO2 wird der 3p-Arm abgespalten und das entstandene Produkt von einer Exonuklease in die bioaktive Form umgewandelt (Cifuentes et al., 2010; Lee et al., 2019; Treiber et al., 2019).

1.4.3 Zirkulierende microRNAs

Einige Jahre nach der Entdeckung der microRNAs wurden sie erstmals auch extrazellulär in Körperflüssigkeiten wie Serum und Plasma nachgewiesen (Chim et al., 2008; Lawrie et al., 2008). Chen et al. konnten das Vorhandensein von microRNAs nicht nur im Blut, sondern auch in Urin, Tränenflüssigkeit, Aszites und Fruchtwasser nachweisen und zeigten in ihrer Arbeit, dass die Spiegel der microRNAs im Serum bei Individuen derselben Spezies stabil, reproduzierbar und konsistent sind (Chen et al., 2008). Nachdem mehrere Arbeiten microRNAs in Mikrovesikeln nachgewiesen haben, wurde die Hypothese aufgestellt, dass microRNAs durch Transport in Mikrovesikeln nach extrazellulär gelangen und so vor Abbau durch RNasen geschützt werden (Valadi et al., 2007; Hunter et al., 2008). In den darauffolgenden Jahren wurde festgestellt, dass lediglich ein geringer Anteil der microRNAs in Vesikeln vorliegen (Arroyo et al., 2011; Turchinovich et al., 2012). Neuere Untersuchungen haben jedoch wiederum ergeben, dass microRNAs im Blut hauptsächlich in Exosomen oder extrazellulären Vesikeln vorliegen (Balusu et al., 2016; Wang et al., 2017) und widerlegen somit die vorherige Hypothese.

Aktuell existieren zwei Hypothesen zum Vorliegen extrazellulärer microRNAs: Zum einen wird vermutet, dass frei zirkulierende microRNAs durch Apoptose aus Zellen freigesetzt werden. Sowohl microRNAs, als auch AGO2 sind nach dem Zelltod mehrere Wochen ohne Zugabe von Protease-Inhibitoren stabil im Zelllysat nachweisbar (Turchinovich et al., 2011). Mehrere Arbeiten konnten zeigen, dass der Spiegel von gewebespezifischen microRNAs im Blutkreislauf bei erhöhter Toxizität und Zelltod in den entsprechenden Geweben zunimmt (Laterza et al., 2009; Corsten et al., 2010). Somit ist dieser Ansatz theoretisch nachvollziehbar.

Zum anderen geht man davon aus, dass microRNAs mittels spezifischer Transportmechanismen aktiv aus der Zelle sezerniert werden. In den letzten Jahren haben sich zwei Hypothesen herauskristallisiert, die den Transport und die Stabilität der zirkulierenden microRNAs beschreiben:

1. MicroRNAs werden in Mikrovesikel verpackt und von der Zelle exozytiert. Der genaue Mechanismus ist noch unklar, jedoch besteht die These, dass die Beladung der Mikrovesikel ein selektiver Prozess ist (Zhang et al., 2010) und die microRNAs auf diese Weise eine parakrine oder gar endokrine Funktion innehaben.

2. MicroRNAs werden in Verbindung mit Lipoproteinen hoher Dichte (HDL) aus Zellen ausgeschieden und durch die Bildung von Lipoprotein-microRNA-Komplexen geschützt. Da sich kleine RNAs leicht mit zwitterionischen Liposomen verbinden können, wird angenommen, dass HDL durch zweiwertige Kationenbrückenbildung an extrazelluläre Plasma-microRNAs bindet (Vickers et al., 2011; Liang et al., 2013). Es existieren unterschiedliche Meinungen über die Funktion von HDL-gebundenen microRNAs. Vickers et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass HDL-Moleküle die gebundenen microRNAs zu den Zielzellen transportieren und diese den intrazellulären microRNA-Pool beeinflussen (Vickers et al., 2011). Wagner et al. charakterisierten die Spiegel und den zellulären Transfer von extrazellulären Lipoprotein-gebundenen microRNAs und fanden keine effiziente Abgabe von Lipoprotein-gebundenen microRNAs an Endothel-, glatte Muskel- und periphere Blutzellen (Wagner et al., 2013). Ob und wie ein HDL-vermittelter microRNA-Transfer im Allgemeinen in verschiedenen Zelltypen auftritt, muss demnach weiter untersucht werden.

1.5. MicroRNAs und Implantation

Man geht davon aus, dass ca. 75% der Schwangerschaftsverluste durch eine gestörte Implantation bedingt werden (Cha et al., 2012). Eine erfolgreiche Implantation ist nur in einem definierten Zeitraum, dem Implantationsfenster („window of implantation“), möglich. Zu diesem Zeitpunkt, welcher nur wenige Tage anhält, muss eine Synchronisation zwischen Endometriumstatus und Blastozystenkompetenz stattfinden (Zhang et al., 2013). Dazu findet eine diffizile Kommunikation zwischen Blastozyste und Endometrium statt.

An der Regulation der Implantation sind mehrere Moleküle wie Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, Lipide, sowie die entsprechenden Rezeptoren durch autokrine, parakrine und juxtakrine Wege beteiligt (Zhang et al., 2013). Auch microRNAs werden aktiv sowohl von Blastozysten, als auch vom Endometrium sezerniert. Mit dem Nachweis zahlreicher zirkulierender microRNAs in Uterusluminalflüssigkeit, sowie in Embryokulturmedien wuchs die Annahme, dass diese ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Regulation der Implantation und der Embryonalentwicklung spielen.

Bei der Untersuchung von microRNA-Profilen des Endometriums während des Zyklus konnten unterschiedliche Expressionsprofile zwischen Endometriumzellen in der proliferativen und sekretorischen Phase festgestellt werden (Kuokkanen et al., 2010; Kresowik et al., 2014). MicroRNAs scheinen auch eine entscheidende Funktion bei der Dezidualisierung des Endometriums zu

spielen. So konnten unterschiedliche microRNA-Expressionsprofile zwischen in vitro dezidualisierten humanen endometrialen Stammzellen (hESC) und Kontroll-hESC festgestellt werden (Estrella et al., 2012; Tochigi et al., 2017).

Es konnten mehrere Plazenta-spezifische microRNA-Cluster identifiziert werden: das Chromosom 14 microRNA-Cluster (C14MC), C19MC und das miR-371-3 Cluster (Morales-Prieto et al., 2013). Die Expression der zugehörigen microRNAs verändert sich im Verlauf der Schwangerschaft (Miura et al., 2010). So werden beim Menschen die zum C14MC gehörenden microRNAs im ersten Trimester stark exprimiert, während die Expression von C19MC und miR-371-3 gegen Ende der Schwangerschaft ansteigt (Morales-Prieto et al., 2020). Dies deutet auf die prägende Rolle der microRNAs in Bezug auf die Plazenta- und Embryonalentwicklung hin. Interessanterweise befinden sich die genannten Cluster innerhalb von sogenannten Imprinting-Genen, von denen bekannt ist, dass sie an der menschlichen Embryonalentwicklung beteiligt sind und eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Zelldifferenzierung und des Zellschicksals spielen (Tsai et al., 2009).

Zwei Forschungsgruppen untersuchten die microRNA-Profile schwangerer Frauen am Implantationsort und an Interimplantationsstellen des Uterus. Dabei konnte eine unterschiedliche Expression von Mitgliedern der drei microRNA-Familien let-7, miR-30 und miR-200 und miR-17-92 festgestellt werden (Hu et al., 2008; Geng et al., 2014). Chakrabarty et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass miR-101a und miR-199a den Implantationsprozess durch direkte Interaktion mit der Cyclooxygenase-2 regulieren. Bei der Analyse von zirkulierenden microRNAs im Serum während des Implantationsfensters konnten vier microRNAs (miR-5739, miR-4327, miR-5001 und miR-4632) detektiert werden, welche als mögliche Biomarker für eine erfolgreiche Implantation in Frage kommen (Freis et al., 2017).

Auch bei der Entwicklung von Zygoten zu implantationskompetenten Blastozysten scheinen microRNAs beteiligt zu sein. Die Deletion von Drosha und Dicer führte bei murinen Zygoten zu einem Embryonalstillstand am Tag 7,5 post coitum (Bernstein et al., 2003; Chong et al., 2010). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass es bei murinen Dicer-Knockout-Embryonen zur Beeinträchtigung der Implantation kommt (Cheong et al., 2014). Mehrere Arbeitsgruppen untersuchten microRNA-Expressionsprofile von nicht implantierten mit erfolgreich implantierten Blastozysten und konnten signifikante Unterschiede darstellen. Rosenbluth et al. fanden eine signifikant höhere Expression von miR-191 und miR-372 im Kulturmedium von nicht implantierten Blastozysten im Gegensatz zu erfolgreich implantierten Blastozysten. In einer weiteren Analyse von microRNAs in Blastozystenbiopsien konnten Rosenbluth et al. eine stärkere Expression von miR-141, miR-27b, miR-339-3p und miR-345 in euploiden Embryonen im Vergleich zu aneuploiden feststellen.

Insgesamt sind die Ergebnisse der einzelnen Arbeitsgruppen teils different oder auf Grund von methodischen Unterschieden nicht miteinander vergleichbar. Aufgrund ihrer Stabilität und leichten Methoden zur Gewinnung und Isolierung der microRNAs, wird ihnen ein großes Potenzial für diagnostische und therapeutische Zwecke zugeschrieben. Um das Verständnis ihrer Rolle in Bezug auf die Implantation auszubauen sind weitere Studien in deutlich größerem Umfang notwendig.

2. Zielstellung

MicroRNAs gewinnen in den letzten Jahren zunehmend an diagnostischem und prognostischem Wert für eine Vielzahl an Erkrankungen. So konnten bereits zahlreiche zirkulierende microRNAs mit einer Schwangerschaft und diversen Schwangerschaftskomplikationen assoziiert werden.

Die Bedeutung von microRNAs im Zusammenhang mit Infertilität steht zunehmend im Fokus der Forschung. Die Evaluation des diagnostischen und prognostischen Potentials dieser in Bezug auf Infertilität und Implantation ist von hohem Interesse für Reproduktionsmediziner, Geburtshelfer und natürlich der betroffenen Paare.

Ziel dieser Arbeit war es daher im Rahmen der Grundlagenforschung die Rolle von fünf Schwangerschaftsassozierten microRNAs (miR-27b, miR-141, miR-191, miR-222 und miR-433) zu analysieren. Dazu wurde im ersten Teil der Arbeit mittels quantitativer real-time-PCR das Serumlevel der gewählten microRNAs bestimmt und anschließend der Zusammenhang mit der Etablierung einer Schwangerschaft, dem Schwangerschaftsverlauf, dem Vorliegen eines PCOS und einem gestörten Glukosestoffwechsel untersucht.

Im zweiten Teil wurde die Regulation von Genen, welche die Differenzierung, Implantation, Plazentation und Embryonalentwicklung beeinflussen, durch zwei gewählte microRNAs untersucht. Dazu wurden nach ausführlicher Literaturrecherche TGF β 2 und IGF2 als Zielgene für miR-141 sowie PLCD1 und EGR1 als Zielgene für miR-191 ausgewählt und die regulatorische Wirkung der microRNAs mittels Luciferase-Assay vermessen.

Folgende Fragen sollen in der Arbeit untersucht werden:

1. Unterscheidet sich der Serumlevel der gewählten microRNAs zwischen schwangeren und nicht schwangeren Frauen?
2. Verändern sich mit dem Voranschreiten der Schwangerschaft die Serumlevel der gewählten microRNAs?
3. Gibt es Unterschiede in dem microRNA-Serumlevel von Frauen mit PCOS und Frauen ohne PCOS?
4. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Höhe dem microRNA-Serumlevel und einem gestörten Glukosestoffwechsel?
5. Hemmen miR-141 und miR-191 die Expression von TGF β 1, IGF2 sowie PLCD1 und EGR1.

3. Material und Methoden

3.1. Patientinnenproben und Ethik-Votum

Das Forschungsthema „miRNA als Marker für plazentare Fehlfunktion bei Glukosestoffwechselstörungen“ (Bearbeitungs-Nr.: 2014-08) des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie Halle/ Saale wurde der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der MLU vorgelegt und befürwortet. Alle Patientinnen wurden durch Ärzte und Ärztinnen des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie ausführlich aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einwilligungserklärung zur Verwendung ihrer Proben und personenbezogenen Daten zu Forschungszwecken ab. Es wurden Proben von Frauen gesammelt, die sich im Zeitraum von 2014 bis 2017 einer assistierten reproduktiven Behandlung unterzogen haben. Einer Frau wurden insgesamt 4 Blutproben zu definierten Zeiten entnommen. Als *baseline* galt eine Blutprobe am 8. Zyklustag unter FSH-Stimulation. Im Folgenden wurden weitere Proben in der 4. SSW (2 Wochen nach Transfer; erste Schwangerschaftsfeststellung mittels HCG Blutspiegel), 5. SSW (3 Wochen nach Transfer; zweite Schwangerschaftsfeststellung mittels HCG Blutspiegel) und 8. SSW (6 Wochen nach Transfer; dritte Schwangerschaftsfeststellung mittels HCG Blutspiegel + Ultraschall) abgenommen.

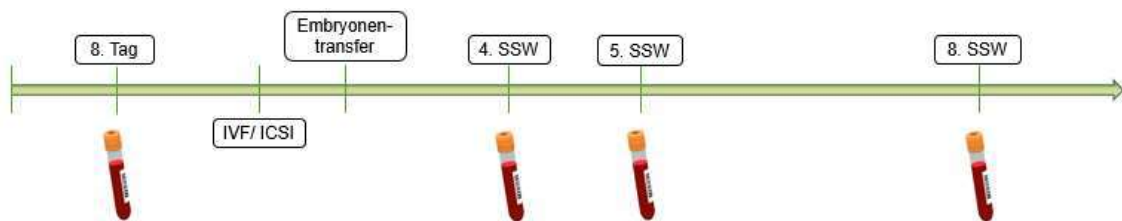


Abbildung 1: Zeitliche Abfolge der Probenentnahmen

Zur Gewinnung der Serumproben wurden die entsprechenden Vollblutproben 10 min bei 900 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Lagerung bei – 80°C.

In unsere Arbeit konnten insgesamt 49 Patientinnen eingeschlossen werden. Diese wurden in zwei Gruppen unterteilt. In der ersten Gruppe liegen pro Patientin Proben von Tag 8, SSW 4 oder 5 und SSW 8 vor. In der zweiten Gruppe liegen pro Patientin Proben von Tag 8, SSW 4 und SSW 5 vor. Zusätzlich wurden den entsprechenden Patientenakten relevante diagnostische Parameter entnommen.

3.2. Materialien

3.2.1. Chemikalien

Für die Experimente wurden folgende Chemikalien verwendet:

Caspase Glo 3/7	Promega (Madison, WI, USA)
Chloroform	AppliChem (Darmstadt)
Countess Trypan Blue stain	Invitrogen (Karlsruhe)
dNTPs	Bioline (Luckenwalde)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem (Darmstadt)
DNase	Qiagen (Hilden)
Entwickler (Kodak)	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Ethanol	Sigma-Aldrich (Hamburg)
FuGENE HD Transfection Reagent	Promega (Madison, WI, USA)
HotStart- Taq- Polymerase	Solis Biodyne (Tartu)
Interferin siRNA Transfection Reagent	Polypus (Illkirch, Frankreich)
Isopropanol	AppliChem (Darmstadt)
LB Agar	Invitrogen (Darmstadt)
MgCl ₂	Qiagen (Hilden)
PBS	Biochrom GmbH (Berlin)
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich (Steinheim)
RNase freies Wasser	Roth (Karlsruhe)
RNase Inhibitor	Thermo Scientific (Vilnius, Litauen)
S.O.C. Medium	AppliChem (Darmstadt)
Trizol Reagenz	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin	Gibco (Paisley, Schottland)
Trypan Blue stain 0,4 %	Invitrogen (Darmstadt)
T4-DNA-Ligase	Fermentes (St. Leon-Rot)
Xho I	Fermentas (St. Leon-Rot)
Not I	Fermentas (St. Leon-Rot)
5x Puffer	Thermo Scientific (Vilnius, Litauen)
10x Puffer	Qiagen (Hilden)

3.2.2. Kits

Countess Cell Counting Chamber Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli	Invitrogen (Karlsruhe)
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas (St. Leon-Rot)
RNase-free DNase Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
ZR Plasmid Mini Prep Classic	Zymo Research (Freiburg)

3.2.3. MicroRNAs, Oligonukleotide

Tabelle 1: Primer des Taq-Man microRNA Assay

Primer	ID-Nr.	Anbieter
hsa-miR-27b	000409	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific
hsa-miR-141	000463	
hsa-miR-191	000490	
hsa-miR-222	000525	
hsa-miR-433	001028	
hsa-miR-016	000391	

Tabelle 2: Primer für die Synthese der 3'UTR der Zielgene

Oligo-Name	Sequenz 5' → 3'	Orientierung	Hersteller
EGR1-fw	AAACTCGAGTGGTCATA- TGCCTGACCCCTTGC	Sense	
EGR1-rw	AAAGCGGCCGCGTGCCA- CATGTGAGAGTACGG	Antisense	
PLCD1-fw	AAACTCGAGTGGCATAG- TGTCTGCTGCTGCCT	Sense	
PLCD1-rw	AAAGCGGCCGCGAATCC- TTGACCACTCGCTGG	Antisense	
IGF2-fw	AAACTCGAGTGGCGAGG- CACCCCAAATTACCT	Sense	
IGF2-rw	AAAGCGGCCGCGTGAAG- ACATTGGGGACACGG	Antisense	

TGFbeta2-fw	AAACTCGAGTGGACATT- GGCAAAACACCCAAGA	Sense	
TGFbeta2-rw	AAAGCGGCCCGCGGCGGG- ATAGGAACGGTACG	Antisense	
psiCheck2-fw	GGAGGACGCTCCAGATGAAA	Sense	Sigma-Aldrich
psiCheck2-se	GAGCGCGTGCTGAAGAACGA	Sense	
psiCheck2-rev	GCGAGGTCCGAAGACTCA- TTT	Antisense	

Tabelle 3: microRNA-mimics für die Transfektion

microRNA-mimic	ID-Nummer	Anbieter
hsa-miR-191-3p	PM10626	Ambion
hsa-miR-141-3p	PM10860	Applied Biosystems

3.2.4. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Analysenwaage	Kern (Balingen-Frommern)
Bechergläser	Merck (Darmstadt)
Bio Photometer	Eppendorf (Hamburg)
Brutschrank IG150	Jouan (Unterhaching)
Einweghandschuhe	Sempermed (Wien, Österreich)
Einweg-Plastik-Artikel (Pipetten, Wägeschälchen)	Greiner (Frickenhausen)
Falconröhrchen	Greiner (Frickenhausen)
Gefrierbehälter	Nalgene (Hereford, U. K.)
Küvetten	Eppendorf (Hamburg)
Labormikroskop Eclipse TS100F	Nikon (Düsseldorf)
Messzylinder	Merck (Darmstadt)
Mikroskop Eclipse TS 100	Nikon (Düsseldorf)
Microplattenreader (Lumineszenz) Tecan GENios	Tecan (Mennedorf)
Photometer BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg)
Pipetboy	IBS IntegraBiosciences (Fernwald)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen	Greiner (Frickenhausen)
qRT-PCR-Gefäße/ Deckel	Peqlab (Erlangen)
Reaktionsgefäße	Biozym (Hessisch Oldendorf)

Realtime-Cycler MyiQ	Bio Rad (München)
Rollenmischgerät	Kisker (Steinfurt)
Thermocycler T300	Biometra (Göttingen)
Sprout TM Tischzentrifuge	Kisker (Steinfurt)
Sterilbank Hera safe	Heraeus (Hanau)
Vortex Mixer	StarLab (Ahrensburg)
Wasserbad	Memmert (Schwabach)
X Cell Sure Lock TM (Elektrophoresekammer)	Invitrogen (Karlsruhe)
Zellkultur-Plastikartikel	Greiner (Frickenhausen)
Zentrifuge CR4 22	Jouan (Unterhaching)
Zentrifuge 5415D	Eppendorf (Hamburg)

3.3. Methoden

3.3.1. RNA-Isolation mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (Trizol)

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgt mittels der Phenol/Chloroform-Extraktions-Methode. Dafür wurden 300 µl Serum der Gesamtprobe entnommen und in einem 2 ml-Tube bei 2000 x g 5 Minuten lang zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde in ein Phase-Trap-Tube überführt, mit 600 µl Trizol-Reagenz versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Verstreichen der Inkubationszeit wurden 200 µl Chloroform zugesetzt und das Tube für 2 Minuten kräftig von Hand geschüttelt. Anschließend wurden die Tubes zur Phasentrennung 10 Minuten lang bei 12 000 x g und 4°C zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren bilden die Proteine und DNA zusammen mit der im Tube enthaltenen Wachsschicht die Interphase. Die RNA befindet sich nun in der oberen, organischen Phase gelöst und kann vorsichtig in ein 1,5 ml Tube pipettiert werden. Beim Pipettieren darf die Interphase nicht verletzt werden, sonst ist die Isolation verdorben. Zu der abgenommenen Oberphase werden 45 µl DNase-Puffer-Lösung hinzugefügt, welche aus 40 µl RDD-Puffer und 5 µl DNase besteht. Durch Invertieren wurde der Ansatz gemischt und anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen und eine Fällung zu induzieren wurden 500 µl Isopropanol hinzugefügt und das Gemisch gevortext. Die RNA-Fällung erfolgte bei -20°C über Nacht.

Am nächsten Morgen wurde der Ansatz bei 12 000 x g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Nach Zugabe von 1 ml 96%igem eisgekühltem Ethanol erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 Minuten bei 10 000 x g und 4°C. Der Überstand wurde dekantiert und 700 µl 70%iges eisgekühltes Ethanol hinzugegeben. Es folgte die letzte Zentrifugation für 10 Minuten bei 6 000 x g und 4°C. Schlussendlich erfolgte die möglichst vollständige Abnahme des

Überstandes. Das verbleibende RNA-Pellet wurde im umgedrehten Tube für ca. 20 min luftgetrocknet und danach in 15 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

Die Lagerung erfolgte kurzfristig bei -20°C und langfristig bei -80°C.

3.3.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Für die Konzentrationsbestimmung wurde 1 µl de RNA-Lösung mit 99 µl RNase-freiem-Wasser gemischt. Die Referenzlösung bestand aus 100 µl RNase-freiem Wasser. Mit dem BioPhotometer von Eppendorf erfolgte die Messung der Absorption der Proben bei 260 nm. Zusätzlich wurde eine Messung bei einer Absorption von 280 nm durchgeführt, welche das Absorptionsmaximum von Proteinen darstellt. Um den Reinheitsgrad der RNA-Lösung zu bestimmen wurde der Quotient beider Werte berechnet ($\frac{A_{260nm}}{A_{280nm}}$). Idealerweise sollte dieser Wert zwischen 1,8 und 2,2 liegen.

3.3.3. cDNA-Synthese

Mit Hilfe der reversen Transkriptase wurden 2 µl RNA-Lösung in cDNA umgeschrieben. Die verwendete RNA-Lösung wurde mit 3 µl RNase freiem Wasser verdünnt und dem Reaktionsansatz hinzugefügt.

Insgesamt setzte sich der Reaktionsansatz folgendermaßen zusammen:

2,0 µl	RNase freies Wasser
3,0 µl	5x Puffer
2,0 µl	dNTPs
1,0 µl	RNase Inhibitor
1,0 µl	stem-loop-Primer (microRNA-spezifisch)
1,0 µl	MLV-reverse Transkriptase
<hr/>	
10,0 µl	Reaktionsansatz
+ 5 µl	RNA-Lösung

Für die anschließende cDNA-Synthese im Thermocycler wurde folgendes Programm gewählt:

1.	16°C	30 min
2.	42°C	30 min
3.	85°C	05 min
4.	04°C	Kühlschritt

Die entstandenen cDNA-Proben wurden bei -20°C gelagert.

3.3.4. Quantitative real-time-PCR

Zur Serumlevelanalyse der fünf gewählten microRNAs (miR-27b, miR-141, miR-191, miR-222, miR-433) wurde die quantitative real-time-PCR mithilfe des microRNA-TaqMan-Primer-Kits durchgeführt. Als Referenz-Gen wurde nach hausinternem Standard die miR-16 eingesetzt.

Der PCR-Ansatz des verwendeten Hot-Star-Taq Kits bestand aus folgenden Komponenten:

2,3 µl	RNase freies Wasser
1,5 µl	10x Puffer
1,2 µl	MgCl ² (25mM)
1,0 µl	dNTPs (100mM)
0,8 µl	TaqMan-Primer
0,2 µl	HotStart-Taq-Polymerase
<hr/>	
7,0 µl	Reaktionsansatz
+ 8,0 µl	cDNA

Für die Reaktion im MyIQ real-time Cyclyer wurde folgendes Programm gewählt:

1.	95°C	15 min
2.	95°C	30 s
3.	60°C	60 s

Die Schritte 2 und 3 wurden 50 Mal wiederholt. Jeweils am Ende des dritten Schrittes wurde nach Anregung mittels Halogenlampe die Fluoreszenz gemessen.

3.3.5. Zellreihen und Zellkultur

Der Luciferase Assay wurde mit zwei unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt: HTR-8/SVneo, und AC1-M59. Bei der HTR-8/SVneo Linie handelt es sich um humane Trophoblastenzellen des ersten Trimesters, die durch Immortalisierung einer physiologischen extravillösen Trophoblastenzelle und durch Transfektion mit einem Plasmid, das das große T-Antigen des Affenvirus 40 (SV40) enthält, hergestellt wurden. Bei der Linie AC1-M59 handelt es sich um eine Hybridlinie aus AC1-Chorionkarzinom- und Trophoblastzellen des dritten Trimesters. Diese Zelllinien werden hauptsächlich zur Untersuchung von Trophoblastenfunktionen einschließlich Zellfusion, Migration und Invasion verwendet. Die Zelllinien wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. U. Markert vom Universitätsklinikum Jena bereitgestellt.

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien (HTR8/ SVneo; AC1-M59) erfolgte in RPMI Medium im Brutschrank bei 37°C, 5% (v/v) CO₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit. Das RPMI Medium wurde mit 10% FKS, GlutaMAX und 10 ml Penstrep versetzt. Nach entsprechender Vorbereitung erfolgte die Lagerung 1h bei -20°C, 2h bis 2d bei -80°C und bis zur weiteren Verwendung Langzeit in flüssigem Stickstoff.

Nach langzeitiger Lagerung in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen aus einem Gefrierrohrchen zur erneuten Kultivierung bei 37°C aufgetaut und in Zellkulturmedium überführt. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 1000 x g für 5 min. Der entstandene Überstand wurde verworfen, das Zell-Pellet in Zellkulturmedium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt. Im weiteren Verlauf fand zwei- bis dreimal wöchentlich eine Passagierung der adhären wachsenden Zellkulturen statt. Die dafür verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C vortemperiert.

Im ersten Schritt wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden zur Ablösung der Zellen 5 ml 0,05% Trypsin hinzugegeben und für 5 min bei 37°C inkubiert. Nach Verstreichen der Inkubationszeit wurde der gesamte Inhalt der Zellkulturflasche nach vorsichtigem Auf- und Abpipettieren in ein 15 ml Gefäß überführt und mit 5 ml Zellkulturmedium versetzt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 1000 x g wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl dieser Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau vermengt. 10 µl dieser Lösung wurden in eine Zählkammer überführt. Das Zellzählgerät misst sowohl die Gesamtzellzahl als auch die Lebend- und Totzellzahl in Bezug auf eine 1 ml Lösung. Es wurde stets mit den Lebendzellzahlen weitergearbeitet.

Nach der Messung wurden die Zellen im gewünschten Verhältnis in neue Zellkulturflaschen eingestreut und weiter kultiviert.

3.3.6. Luciferase-Reporter-Assay

Die Expressionsregulation bestimmter Zielgene durch die entsprechenden microRNAs kann mit Hilfe eines dualen Reporter-Gen-Assays untersucht werden. Wir verwendeten das Dual-Luciferase® Reporter Assay System. Dieses verwendet zwei Luciferasen, wobei den experimentellen Reporter die Renilla-Luciferase darstellt und die Firefly-Luciferase als Kontrollreporter fungiert, der in lytischen Endpunktmessungen zur Normalisierung verwendet wird. Das Emissionsmaximum der Firefly-Luciferase liegt bei 565 nm, das der Renilla-Luciferase hingegen bei 460 nm. Setzt man die gemessenen Lumineszenzen beider Luciferasen in Beziehung, kann die relative Aktivität der Luciferase-Aktivität ermittelt werden.

Der verwendete psiCHECK-2 Vektor wurde für eine schnelle quantitative RNA-Interferenz-Messung konzipiert. Mit diesem Vektor können Expressionsänderungen bestimmter Zielgene, welche an ein ausgewähltes Reporter gen gekoppelt sind, verfolgt werden.

Dafür wurde die 3`UTR-Region der gewählten Zielgene nach dem Reporter gen in eine multiple cloning site kloniert, die sich am 3`-Ende des Renilla-Translationsstoppcodons befindet. Initiiert nun die entsprechende microRNA den Interferenzprozess in Bezug auf das klonierte Zielgen, kommt es zur Spaltung und nachfolgend zur Degradation der fusionierten mRNA und somit zu einer verminderten Lumineszenz. Somit ist die Messung der Renilla-Luciferase-Lumineszenz eine geeignete Möglichkeit den Interferenzeffekt zu quantifizieren.

3.3.7. Identifizierung möglicher Zielgene

Mittels *in silico* Analysen (Targetscan.org, pubmed.ncbi.nlm.nih.gov) wurden für ausgewählte microRNAs mögliche Zielgene recherchiert. Präferiert wurden Gene, welche in Zusammenhang mit der Differenzierung und Proliferation der Plazenta, der Implantation oder mit der Frühschwangerschaft stehen. Insgesamt wurden vier Zielgene ausgewählt. Zwei Zielgene für die miR-141 (TGF β 2, IGF2) und zwei Zielgene für miR-191 (PLCD-1, EGR1).

3.3.8. Synthese des 3`UTR des Zielgens aus cDNA

Als DNA-Template dienten drei verschiedene bereits vorhandene cDNA-Proben (COV, KGN, FaDu). Die eingesetzten Primer wurden so designt, dass das entstandene Fragment sowohl eine Bindungsstelle für die entsprechende microRNA, als auch zwei Schnittstellen für das Restriktionsenzym XhoI enthält.

Zur Herstellung und Vervielfältigung der gewünschten Fragmente wurde eine Polymerase-Ketten-Reaktion durchgeführt. Der Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

9,1 μ l	Nuklease freies Wasser
1,5 μ l	10x Puffer
1,2 μ l	MgCl 2
1,0 μ l	dNTPs
1,0 μ l	Primer (je 0,5 μ l fw- und rw-Primer pro Reaktion)
0,2 μ l	Taq-Polymerase
<hr/>	
14,0 μ l	Reaktionsansatz
+ 1,0 μ l	cDNA

Pro Primerpaar der vier Zielgene wurden entsprechende Reaktionsansätze pipettiert (1x COV, 1x KNG, 1x FaDu, 1x Negativ-Kontrolle ohne cDNA).

Das verwendete Programm im Thermocycler setzte sich aus folgenden Schritten zusammen:

1. 95° für 5 min
2. 95° für 30 sec
3. 60° für 30 sec
4. 72° für 30 sec
5. 72° für 3 min
6. anschließende Kühlung bei 4°

Die Schritte 2.-4. wurden 45-mal wiederholt.

Anschließend wurden die Produkte der Polymerase-Ketten-Reaktion in einem einprozentigen Agarosegel (1g Agarose + 100 ml TBE + 1 µl Ethidiumbromid) aufgetrennt. Dafür wurde das Gel einer Spannung von 110 V für ca. 1 Stunde ausgesetzt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht analysiert, um Banden mit der zu erwartenden Größe zu identifizieren.

Diese wurden aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Tube überführt. Um die Fragmente aus dem Gel zu extrahieren wurde im ersten Schritt pro Reaktionsgefäß 700 µl QG-Puffer hinzugegeben. Dieses wurde bei 50°C so lange geschüttelt, bis sich das Gel aufgelöst hat. Im zweiten Schritt wurden 250 µl Isopropanol hinzugefügt. 700 µl dieser Lösung wurden auf in neuen 1,5 ml Tubes befindlichen Säulen pipettiert und 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Dieser Schritt wurde mit der verbleibenden Lösung wiederholt. Nachdem die Lösung vollständig abzentrifugiert wurde, wurden 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben und nochmals 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 20 µl RNase-freiem Wasser und erneuter Zentrifugation bei 11000 x g für 1 min befindet sich das ausgewählte DNA-Fragment in der flüssigen Phase.

3.3.9. Klonierung von DNA-Fragmenten

Für die Klonierung der DNA-Fragmente wurde das TOPO-TA-Cloning-Kit (Invitrogen) verwendet. Die erhaltenen Fragmente wurden in das lacZ-Gen des PCR™2.1 Vektors kloniert.

Der Ligationsansatz besteht aus folgenden Komponenten:

4,0 µl	cDNA-Fragment
1,0 µl	Vektor
2,0 µl	T4-Ligase
1,5 µl	T4-Puffer
6,5 µl	Aqua bidest

Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden 2 µl des Ligationsansatzes mit 50 µl chemokompetenter E. coli Zellen (ONE Shot TOP10 Chemically Competent E. coli) vorsichtig vermischt. Nach einer 10-20 minütigen Inkubation folgte der Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden. Anschließend folgte eine 10 minütige Kühlung auf Eis und folgend die Zugabe von 250 µl auf 37°C angewärmtes S.O.C.-Medium. Der Ansatz wurde unter leichtem horizontalem Schütteln (200 x g) bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. 60 µl des Transformationsansatzes wurden mit 40 µl X-Gal auf vorgewärmten Selektions-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am Folgetag wurden die positiven Kolonien (weiße Färbung) mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und unter Zugabe von 10 ml LB-Medium in ein locker verschlossenes 50 ml-Falcon-Gefäße überführt. Zur sicheren Selektion von positiven Kolonien wurde zusätzlich eine PCR durchgeführt. Der PCR-Ansatz besteht aus folgenden Komponenten:

1,5 µl	Puffer
1,2 µl	MgCl ²
1,0 µl	dNTPs
0,5 µl	Primer (fw, rw)
0,2 µl	Taq-Polymerase
9,1 µl	RNase freies Wasser

Mit einem sterilen Zahnstocher wurde eine Kolonie gepickt und kurz in den entsprechenden Ansatz getaucht. Es wurde folgendes Programm gewählt:

1. 96°C für 1 min
2. 96°C für 10 s
3. 50°C für 5 s
4. 60°C für 4 min

Die Schritte 2. Bis 4. Wurden 25-mal wiederholt. Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.



Abbildung 2: Gelelektrophorese der mit IGF2-transformierten E-coli-Kolonien zur Kontrolle eines vorliegenden Inserts

Die Kolonien, welche in der Gelelektrophorese Fragmente der gewünschten Länge enthielten (s. Abb. 2), wurden in den locker verschlossenen Falcon-Tubes bei 37°C unter leichtem Schwenken (200 x g) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ansatz 10 Minuten bei 3600 x g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Anschließend wurde mittels des ZR Plasmid Mini Prep Classic Kits eine Plasmidisolation für die weitere Sequenzanalyse nach Herstellerangaben durchgeführt. Final wurde das isolierte Plasmid mit 30 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert. Zur Herstellung des Sequenzierungs-Ansatzes (12 µl) wurde zuerst eine photometrische Konzentrationsbestimmung der Plasmid-Lösung durchgeführt. Das benötigte Volumen wurde mit Hilfe folgender Rechnung bestimmt:

$$v_1 = \frac{c_2 \cdot v_2}{c_1} \qquad v_1 = \frac{100 \text{ ng} / \mu\text{l} \cdot 12 \mu\text{l}}{c_1}$$

Pro Ansatz wurden 2 µl Nuklease-freies Wasser und 1 µl M13 Puffer hinzugegeben. Die anschließende Sequenzierung der Plasmide wurde von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt.

3.3.10. Klonierung des 3'UTR des Zielgens mit T4-Klonierung

Die mittels Sequenzierung nachgewiesenen Fragmente mussten für die Klonierung in den psi-CHECK-2 Vektor zunächst mittels Restriktionsverdau aus dem PCR2.1.-TOPO TA Vektor ausgeschnitten werden. Der dafür angefertigte Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

6,5 µl	Nuklease-freies Wasser
1,5 µl	O-Puffer
2,0 µl	Xho I
1,0 µl	Not I
4,0 µl	Plasmid-Lsg.

Die Proben wurden 1 Stunde bei 37°C im Thermocycler inkubiert.

Der Verdau des psiCHECK-2 Vektors erfolgte ähnlich dem oben genannten Protokoll. Dabei wurden abweichend 8,5 µl Nuklease-freies Wasser und nur 2 µl des Vektors eingesetzt.

Anschließend erfolgte eine Auftrennung der Proben mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese. Die Gelisolation erfolgte wie bereits in 3.3.8. beschrieben. Die Ligation erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase. Der Reaktionsansatz setzte ich wie folgt zusammen:

4,0 µl	Fragment
1,0 µl	Vektor
2,0 µl	T-4 Ligase
1,5 µl	T-4 Puffer
6,5 µl	Nuklease-freies Wasser

Es folgte eine Inkubation für 1 Stunde bei 21°C. Die Transformation der E. coli-Zellen erfolgte wie bereits unter 3.3.9. beschrieben. Je 60 µl des Transformationsansatzes wurden auf mit Ampicillin behandelte Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle des

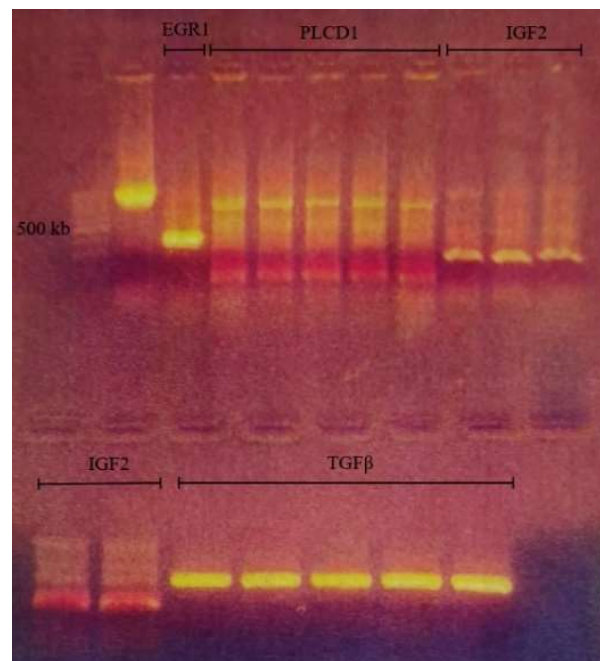


Abbildung 3: Gelelektrophorese der Kolonien nach Vektortransfektion

Transformationsergebnisses wurde am Folgetag eine Kolonie-PCR durchgeführt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sowie das verwendete Programm entsprechen dem aus Schritt 3.3.9. Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Kolonien, welche das gewünschte Fragment enthielten, zeigen dabei Banden bei der zu erwartenden Größe.

Die positiven Kolonien wurden gepickt, in je ein 50 ml Falcon-Gefäß unter Zugabe von 10 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C und leichtem Schwenken inkubiert. Es folgte wie bereits oben beschrieben eine Plasmidisolierung mit anschließender Sequenzierung.

Kolonien, die das gewünschte Fragment in der richtigen Orientierung enthielten, wurden erneut gepickt und pro Fragment in zwei Falcon-Gefäße mit 10 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C kultiviert. Jeweils eins der Gefäße wurde am nächsten Tag abzentrifugiert und das entstandene Pallet bei -80°C gefrostet. Die Bakterien aus dem zweiten Gefäß wurden abzentrifugiert und es wurde anschließend mit Hilfe des ZR Plasmid Mini Prep Classic Kits eine Plasmidisolierung nach Herstellerangaben durchgeführt. Die eluierte DNA wurde in ein 1,5 ml Gefäß überführt und ihre Konzentration photometrisch bestimmt.

3.3.11. Transfektion der HTR8/ SVneo; AC1-M59- Zellen

In die verwendeten 96-Well-Platten wurden pro Well 10.000 Zellen in 100 µl Kulturmedium eingestreut und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Transfektion der Plasmide wurde FUGENE HD Transfection Reagent verwendet. Der Einfachansatz pro well für die Vektortransfektion ergab sich aus 0,25 µl Plasmid, 1,0 µl FuGene und 3,25 µl serumfreiem Medium. Vor Zugabe der Lösung zu den Zellen wurde diese 10 min bei 37°C inkubiert.

Der microRNA-Transfektionsansatz (je miR-191, miR-141, neg. Kontrolle) setzte sich aus 0,5 µl siRNA-Verdünnung (20 nM), 1,0 µl Interferin und 11,5 µl serumfreiem Medium zusammen. Vor Zugabe zu den Zellen erfolgte auch hier eine zehn-minütige Inkubation.

Pro Zellreihe wurde folgendermaßen behandelt:

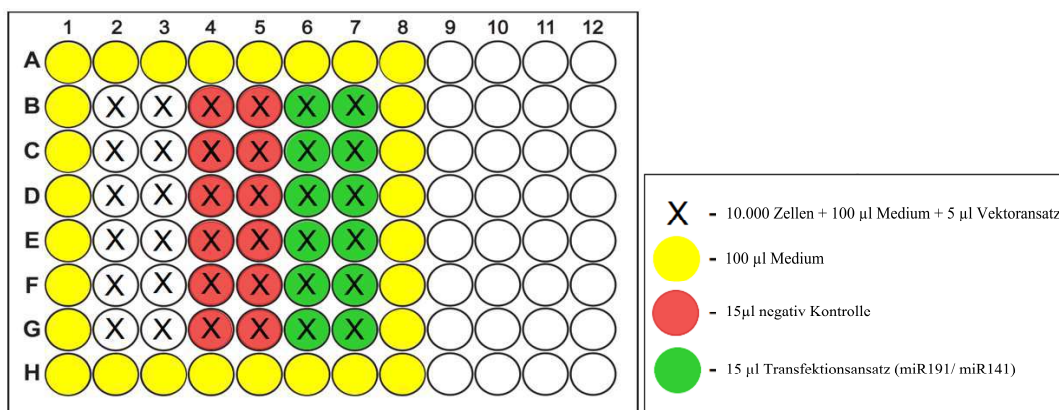


Abbildung 4: Behandlungsplan für die Transfektion pro Zellreihe

3.3.12. Vermessung der Luciferase-Aktivität

Die Vermessung erfolgte 16 bis 24 Stunden nach Transfektion. Zur Messung der Firefly-Luciferase-Aktivität wurde pro well 50 µl ihres Substrates pipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation im Dunkeln wurde anschließend die Lumineszenz im Plattenreader vermessen. Danach wurde pro well 50 µl eines Gemisches aus Dual-Glo-Stoplösung und Renilla-Luciferase-Substrat pipettiert. Damit wurde die Reaktion der Firefly-Luciferase unterbunden, sowie mittels Renilla-Substrat die Reaktion der Renilla-Luciferase induziert. Nach einer weiteren Inkubation im Dunkeln für 15 Minuten erfolgte die erneute Lumineszenz-Messung.

Zur Ermittlung der absoluten Luciferase-Aktivität wurde der Quotient aus Renilla-Luciferase-Lumineszenz und Firefly-Luciferae-Lumineszenz gebildet.

3.4. Statistik

Im ersten Teil diente der C_t -Wert (Threshold- Cycle) zur weiteren Auswertung. Dieser beschreibt die Anzahl an durchgeführten Zyklen nach denen die gemessene Fluoreszenz einen definierten Schwellenwert überschreitet. Zur Quantifizierung der unterschiedlichen Expressionen wurde der ΔC_t - Wert mittels folgender Formel berechnet: $\Delta C_t = C_t \text{ Gen} - C_t \text{ Referenz}$. Als Referenz wurde die miR-16 verwendet. Anschließend erfolgte die Berechnung des relativen Expressionsunterschieds nach der Methode von Livak und Schmittgen ($2^{-\Delta C_t}$).

Die statistische Auswertung der von uns erhobenen Daten mit der Software IBM SPSS Statistics, Version 25.0. Zur Beurteilung einer Korrelation zwischen den erhobenen Patientendaten und den ermittelten microRNA-Serumleveln erfolgte mittels Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman. Die bivariate Korrelationsanalyse von Spearman berechnet den linearen Zusammenhang zweier mindestens ordinalskalierter Variablen. Der Korrelationskoeffizient kann Werte zwischen +1 und -1 annehmen, wobei negative Werte eine gegenläufige oder auch negative Korrelation und positive Werte eine gleichsinnige oder auch positive Korrelation bedeuten. Im nächsten Schritt wurde ein Vergleich zwischen den einzelnen microRNA-Serumleveln zu den bereits beschriebenen definierten Zeitpunkten der Frühschwangerschaft gezogen. Die Ergebnisse wurden mittels Boxplot graphisch dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde hier der Kruskal-Wallis-Test herangezogen. Dieser wird verwendet, um festzustellen, ob es einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Medianwerten von drei oder mehr unabhängigen Gruppen gibt. Zuletzt erfolgte die Auswertung der Unterschiede in den microRNA-Serumleveln in Bezug auf zweiseitige patientenbezogenen Daten (z.B. PCOS – kein PCOS) mittels Mann-Whitney U Test. Dies ist ein nicht-parametrischer Test, welcher überprüft, ob sich die zentralen Tendenzen zweier unabhängiger Stichproben unterscheiden. Im zweiten Teil wurden die Lumineszenzunterschiede im Luciferase Assay mittels Student's t-Test ausgewertet. Als signifikant wurden alle p-Werte eingestuft, welche unterhalb der Signifikanzschwelle von $p \leq 0,05$ lagen.

4. Ergebnisse

4.1. Patientenkollektiv

Das Kollektiv bestand aus insgesamt 49 Patientinnen, davon 23 mit der Diagnose eines polyzystischen Ovar Syndroms und 26 mit entweder keiner oder einer abweichenden fertilitätsbeeinträchtigenden Diagnose. Von den genannten 26 Patientinnen hatten 11 keine fertilitätsrelevante Erkrankung, 7 eine Endometriose, 2 Tubenpathologien und 6 anderweitige Diagnosen, welche in Zusammenhang mit der Kinderlosigkeit stehen (s. Abb. 5). Das Altersspektrum reichte von 24 bis 40 Jahren (s. Abb. 6). Das Durchschnittsalter betrug sowohl im Kollektiv mit PCOS, als auch im Kollektiv ohne PCOS rund 32 Jahre. Bei Fehlen eines signifikanten Altersunterschieds zwischen den beiden Gruppen konnte auf eine Altersadjustierung zur Minimierung der Confounderwirkung verzichtet werden.

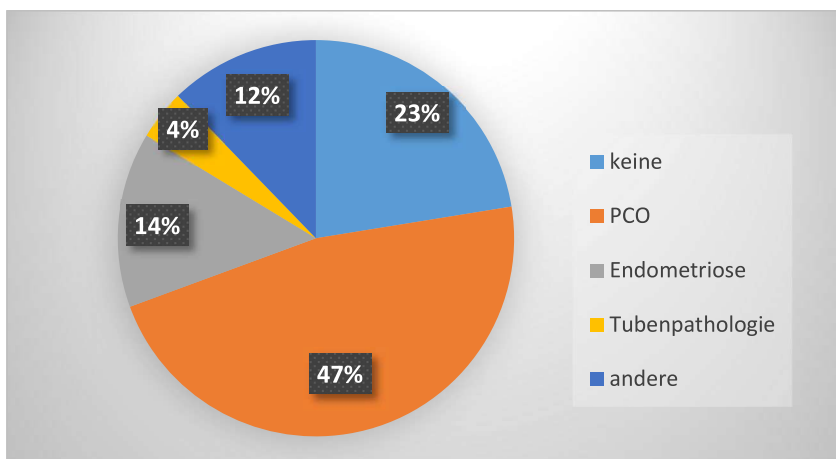


Abbildung 5: Zusammensetzung des Kollektivs aufgeteilt nach Diagnose

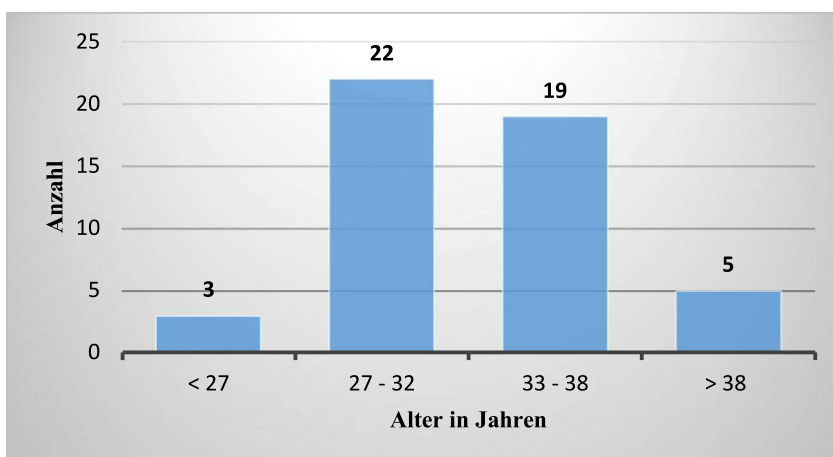


Abbildung 6: Altersverteilung des gesamten Kollektivs

Im Untersuchungskollektiv reichte der berechnete BMI von 18,0 bis 41,4 kg/m² (siehe Tab. 4), was laut WHO einem körperlichen Status von Untergewicht bis zu Adipositas Grad III entspricht. Im Durchschnitt bestand ein Kinderwunsch seit 4 Jahren (siehe Tab. 4).

Bei der durchgeführten assistierten Reproduktionstherapie handelte es sich in 10 Fällen um eine IVF-Behandlung, wobei in 90 % eine intakte Schwangerschaft erzielt werden konnte. In 39 Fällen wurde eine ICSI durchgeführt mit einer Schwangerschaftsrate von 85 %. Die Abortrate betrug bei den IVF-Behandlungen 11.1 % und bei den ICSI-Behandlungen 9 % (siehe Tab. 5).

Tabelle 4: Klinische Daten Patientinnenkollektiv

	Gewicht (kg)	Größe (cm)	BMI (kg/m²)	Dauer Kinderwunsch (Jahre)
Median	65	166	24,8	4
Min. – Max.	46 - 135	150 - 185	18,0 – 41,4	1 – 14

Tabelle 5: Verlauf ART-Behandlung

	Median Eizellen gewonnen (Min. – Max.)	Median Eizellen befruchtet (Min. – Max.)	Schwangerschaftsrate (%)	Abortrate (%)
IVF-Behandlung (n = 10)	13 (2 – 23)	8 (2 – 13)	90 %	11,1 %
ICSI-Behandlung (n = 39)	9 (3 – 25)	4 (1 – 13)	85%	9,0 %

4.2. Bivariate Korrelationen

Um eine Korrelation zwischen dem Serumlevel der untersuchten microRNAs und den relevanten diagnostischen Parametern zu identifizieren, wurde eine Rangkorrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. Es wurden folgende Parameter ausgewählt: Alter, Gewicht, Größe, BMI, Diagnose, oGTT, Blut-Glukose nach 1h, Blut-Glukose nach 2h, Basalinsulin, Insulin nach 2h, HOMA-Index und Fertilisationsrate bei ART.

Die Daten zu den unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 8, SSW 4, SSW 5 und SSW 8) wurden separat betrachtet. Beträgt der lineare Korrelationskoeffizient nach Spearman den Wert 0, so ist keine Korrelation vorhanden. Bei -1 liegt ein perfekter negativ korrelierter Zusammenhang vor, bei +1 liegt hingegen ein positiv korrelierter Zusammenhang vor.

Es zeigt sich, dass acht Tage nach Stimulationsbeginn eine signifikante inverse Korrelation zwischen dem Serumlevel von miR-27b und dem HbA1c ($p = 0,025$), dem Serumlevel von miR-141 dem oGTT ($p = 0,041$) und dem Alter ($p = 0,038$) besteht. Eine positive Korrelation zeigt sich zwischen dem Serumlevel von miR-433 und den Serumleveln von miR-141 ($p \leq 0,001$) und miR-222 ($p = 0,005$). Alle übrigen Parameter zeigten keine signifikante Korrelation zu den microRNA-Serumleveln acht Tage nach Stimulationsbeginn.

Tabelle 6: Rangkorrelationsanalyse nach Spearman Tag 8

Parameter A	Parameter B	r_s	p	N
Δ CT-miR-27b	HbA1c	-0,415	0,025	29
Δ CT-miR-141	oGTT	-0,353	0,041	34
Δ CT-miR-141	Alter	-0,298	0,038	49
Δ CT-miR-433	Δ CT-miR141	0,510	<0,001	49
Δ CT-miR-433	Δ CT-miR222	0,394	0,005	49

Zwei Wochen nach Transfer (4. SSW) liegt eine signifikante inverse Korrelation dem Serumlevel von miR-191 und der Fertilisationsrate ($p = 0,009$) vor. Eine signifikante positive Korrelation zeigt sich zwischen dem Serumlevel von miR-433 und den Serumleveln von miR-27b ($p = 0,046$), miR-191 ($p = 0,006$) und miR-222 ($p \leq 0,001$). Alle übrigen Parameter zeigten keine signifikante Korrelation zu den microRNA-Serumleveln 2 Wochen nach Embryonen-Transfer.

Tabelle 7: Rangkorrelationsanalyse nach Spearman SSW 4

Parameter A	Parameter B	r_s	p	N
Δ CT-miR-191	Fertilisationsrate	0,407	0,009	40
Δ CT-miR-433	Δ CT-miR27b	0,318	0,046	40
Δ CT-miR-433	Δ CT-miR191	0,428	0,006	40
Δ CT-miR-433	Δ CT-miR222	0,595	<0,001	40

Es zeigt sich, dass zum Zeitpunkt SSW 5 eine signifikante inverse Korrelation zwischen dem Serumlevel von miR-27b und dem oGTT ($p = 0,018$), dem Serumlevel von miR-141 und dem Alter ($p = 0,032$), dem Serumlevel von miR-222 und dem oGTT ($p = 0,043$) sowie dem BMI ($p = 0,027$) vorliegt. Eine positive Korrelation besteht zwischen dem Serumlevel von miR-222 und miR-191 ($p = 0,024$), sowie dem Serumlevel von miR-433 und den Serumleveln von miR-27b ($p = 0,007$), miR-141 ($p = 0,008$), miR-191 ($p = 0,030$) und miR-222 ($p \leq 0,001$).

Tabelle 8: Rangkorrelationsanalyse nach Spearman SSW 5

Parameter A	Parameter B	r_s	P	n
Δ CT-miR-27b	oGTT	-0,408	0,018	33
Δ CT-miR-141	Alter	-0,310	0,032	48
Δ CT-miR-222	oGTT	-0,355	0,043	33
Δ CT-miR-222	BMI	-0,319	0,027	48
Δ CT-miR-222	Δ CT-miR191	0,326	0,024	48
Δ CT-miR-433	Δ CT-miR27b	0,382	0,007	48
Δ CT-miR-433	Δ CT-miR141	0,378	0,008	48
Δ CT-miR-433	Δ CT-miR191	0,313	0,030	48
Δ CT-miR-433	Δ CT-miR222	0,525	<0,001	48

Es zeigt sich, dass zum Zeitpunkt SSW8 ein signifikanter, positiv korrelierter Zusammenhang zwischen dem Serumlevel von miR-191 und der Größe ($p = 0,016$) besteht. Der Serumlevel von miR-191 zeigt zudem eine inverse Korrelation mit dem Serumlevel von miR-141 ($p = 0,025$). Des Weiteren zeigt sich eine positive Korrelation zwischen dem Serumlevel von miR-222 und miR-191 ($p = 0,037$), sowie dem Serumlevel von miR-433 und den Serumleveln von miR-141 ($p = 0,019$) und miR-222 ($p = 0,026$). Alle übrigen Parameter zeigten keine signifikante Korrelation zu den microRNA-Serumleveln bei SSW8.

Tabelle 9: Rangkorrelationsanalyse nach Spearman SSW 8

Parameter A	Parameter B	r_s	P	N
Δ CT-miR-191	Größe	0,461	0,016	27
Δ CT-miR-191	Δ CT-miR141	-0,430	0,025	27
Δ CT-miR-222	Δ CT-miR191	0,403	0,037	27
Δ CT-miR-433	Δ CT-miR141	0,447	0,019	27
Δ CT-miR-433	Δ CT-miR222	0,427	0,026	27

4.3. Mikro-RNA Serumlevel in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt, dem HOMA-Index, der Diagnose und einer intakten Schwangerschaft

Die Serumlevel von miR-27b, miR-141, miR-191, miR-222 und miR-433 wurden in Blutserum-Proben von 49 Patientinnen zu den bereits beschriebenen Zeitpunkten mittels q-PCR vermessen.

Ein Mann-Whitney-U-Test wurde berechnet, um zu überprüfen, ob es einen statistisch signifikanten Unterschied in den microRNA-Serumleveln zwischen folgenden Gruppen gibt: Frauen mit PCOS und ohne PCOS, Frauen mit normwertigem HOMA-Index und pathologischem HOMA-Index und Frauen mit erfolgreicher Schwangerschaft und keinem Eintreten einer Schwangerschaft.

Zur diagnoseabhängigen Auswertung wurden die microRNA-Serumlevel zu Beginn der Untersuchungsreihe (Tag 8 nach Stimulationsbeginn) betrachtet. Der HOMA-Index wurde bei der Basisuntersuchung vor der Stimulation bestimmt und mit den microRNA-Serumleveln vor Embryonentransfer (Tag 8 nach Stimulationsbeginn) ausgewertet. Zur Berechnung von Unterschieden in den microRNA-Serumleveln zwischen Frauen mit erfolgreicher Schwangerschaft und keinem Schwangerschaftseintritt wurden die ermittelten Daten aus SSW 4 genutzt. Zusätzlich wurden die einzelnen microRNAs in ihren Serumleveln zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten ausgewertet.

Zur Visualisierung wurden die Daten mittels Box-Plot-Analysen dargestellt. Dabei handelt es sich um Diagramme, die die Möglichkeit bieten die Streuung und Verteilung der Daten übersichtlich darzustellen. Die Auswertung dieser ist den jeweiligen Unterkapiteln zu entnehmen.

4.3.1. miR-27b

Bei Betrachtung des Plots zur Auswertung der miR-27b-Serumlevel in Bezug auf die Diagnose lässt sich ein erhöhtes Serumlevel bei Frauen ohne PCOS erkennen. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant zwischen den Gruppen ($p = 0,190$). Ein statistisch signifikanter Unterschied des Serumlevels von miR-27b besteht zwischen Frauen mit normwertigem HOMA-Index ($< 2,5$) und pathologischem HOMA-Index ($> 2,5$; $p = 0,027$, $r = 0,384$). Zwischen Frauen mit erfolgreicher Schwangerschaft nach ART und keinem Schwangerschaftseintritt besteht kein signifikanter Unterschied im Serumlevel von miR-27b ($p = 0,541$). In der Auswertung der miR-27b-Serumlevel zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten zeigen sich geringe Abweichungen, jedoch besteht insgesamt kein signifikanter Unterschied im zeitlichen Verlauf ($p = 0,978$).

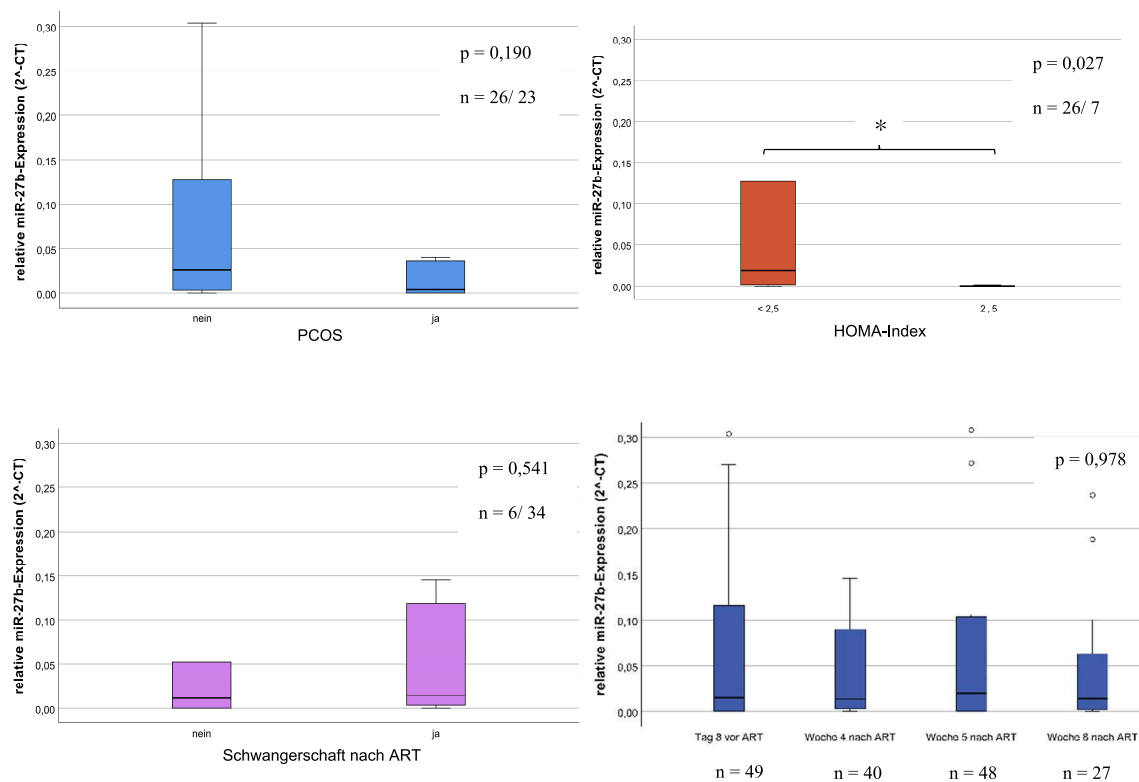


Abbildung 7: Box-Plot-Analyse der relativen miR-27b-Serumlevel in Abhängigkeit zu der Diagnose (oben links), dem HOMA-Index (oben rechts) und einem Schwangerschaftseintritt (unten links) und im zeitlichen Verlauf (unten rechts). * $p < 0,05$

4.3.2. miR-141

In Bezug auf die Diagnose lässt sich aus dem Box-Plot ein leicht erhöhtes Serumlevel in der Gruppe ohne PCOS ablesen, welches sich jedoch als statistisch nicht signifikant darstellt ($p = 0,538$). Zwischen der Gruppe mit einem normwertigen HOMA-Index und einem pathologischen HOMA-Index zeigt sich kein signifikanter Unterschied in dem Serumlevel von miR-141 ($p = 0,914$). Ein signifikant höheres miR-141-Serumlevel zeigte sich in der Gruppe von Frauen mit einer erfolgreichen Schwangerschaft gegenüber der Gruppe ohne Schwangerschaftseintritt ($p = 0,033$, $r = 0,337$). Vor Embryotransfer zeigte sich ein gering erhöhter Serumlevel von miR-141. Es besteht jedoch insgesamt kein statistisch signifikanter Unterschied in den Serumleveln zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten ($p = 0,253$).

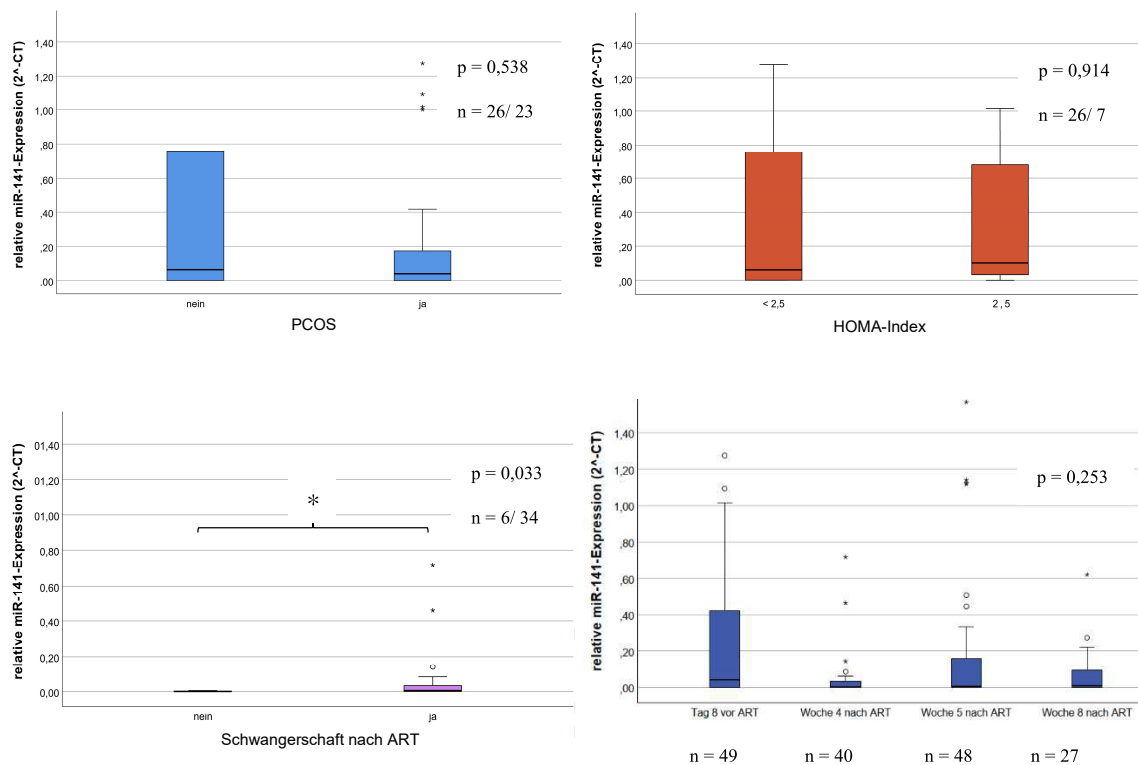


Abbildung 8: Box-Plot-Analyse der relativen miR-141-Serumlevel in Abhängigkeit zu der Diagnose (oben links), dem HOMA-Index (oben rechts) und einem Schwangerschaftseintritt (unten links) und im zeitlichen Verlauf (unten rechts). * $p < 0,05$

4.3.3. miR-191

Es besteht kein signifikanter Serumlevelunterschied in den einzelnen Gruppen in Bezug auf die Diagnose ($p = 0,417$), den HOMA-Index ($p = 0,450$) und das Eintreten einer Schwangerschaft ($p = 0,726$). Zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten zeigte sich kein signifikanter Unterschied in dem Serumlevel von miR-191 ($p = 0,574$).

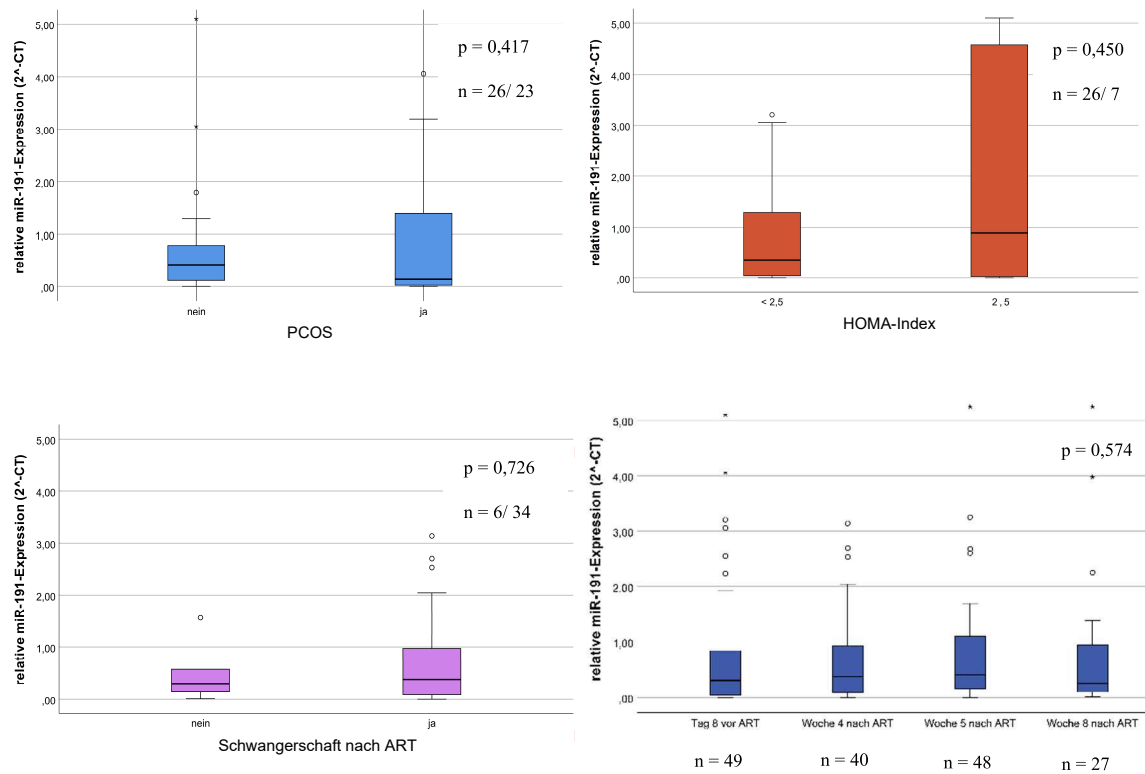


Abbildung 9: Box-Plot-Analyse der relativen miR-191-Serumlevel in Abhängigkeit zu der Diagnose (oben links), dem HOMA-Index (oben rechts) und einem Schwangerschaftseintritt (unten links) und im zeitlichen Verlauf (unten rechts).

4.3.4. miR-222

Der Serumlevel von miR-222 zeigt sich in der Gruppe der Frauen ohne PCOS leicht erhöht gegenüber der Gruppe ohne PCOS. Dieser Unterschied weist jedoch keine statistische Signifikanz auf ($p = 0,222$). Es ließ sich kein signifikanter Serumlevelunterschied zwischen der Gruppe mit normwertigem HOMA-Index und pathologischem HOMA-Index feststellen ($p = 1,0$). Der Serumlevel von miR-222 zeigte sich bei Frauen mit Schwangerschaftsnachweis leicht erhöht im Vergleich zu Frauen ohne Schwangerschaftseintritt ($p = 0,071$). Es zeigt sich jedoch lediglich ein statistischer Trend. Zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten lässt sich kein signifikanter Serumlevelunterschied feststellen ($p=0,795$).

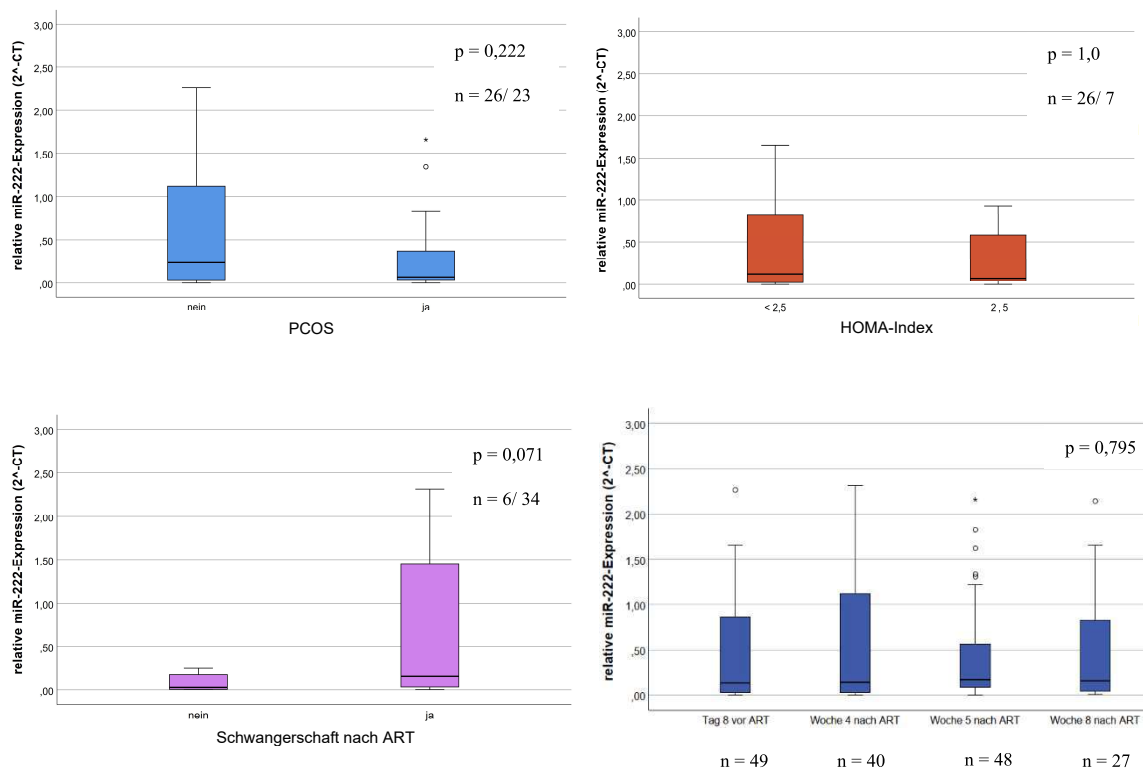


Abbildung 10: Box-Plot-Analyse der relativen miR-222-Serumlevel in Abhängigkeit zu der Diagnose (oben links), dem HOMA-Index (oben rechts) und einem Schwangerschaftseintritt (unten links) und im zeitlichen Verlauf (unten rechts).

4.3.5. miR-433

Der Serumlevel von miR-433 zeigte sich in der 5. Woche nach ART leicht erhöht gegenüber den anderen Untersuchungszeitpunkten. Dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,772$). Im Übrigen zeigte sich kein signifikanter Serumlevelunterschied von miR-433 in den einzelnen Gruppen in Bezug auf die Diagnose ($p = 0,602$), den HOMA-Index ($p = 0,268$) und das Eintreten einer Schwangerschaft ($p = 0,324$).

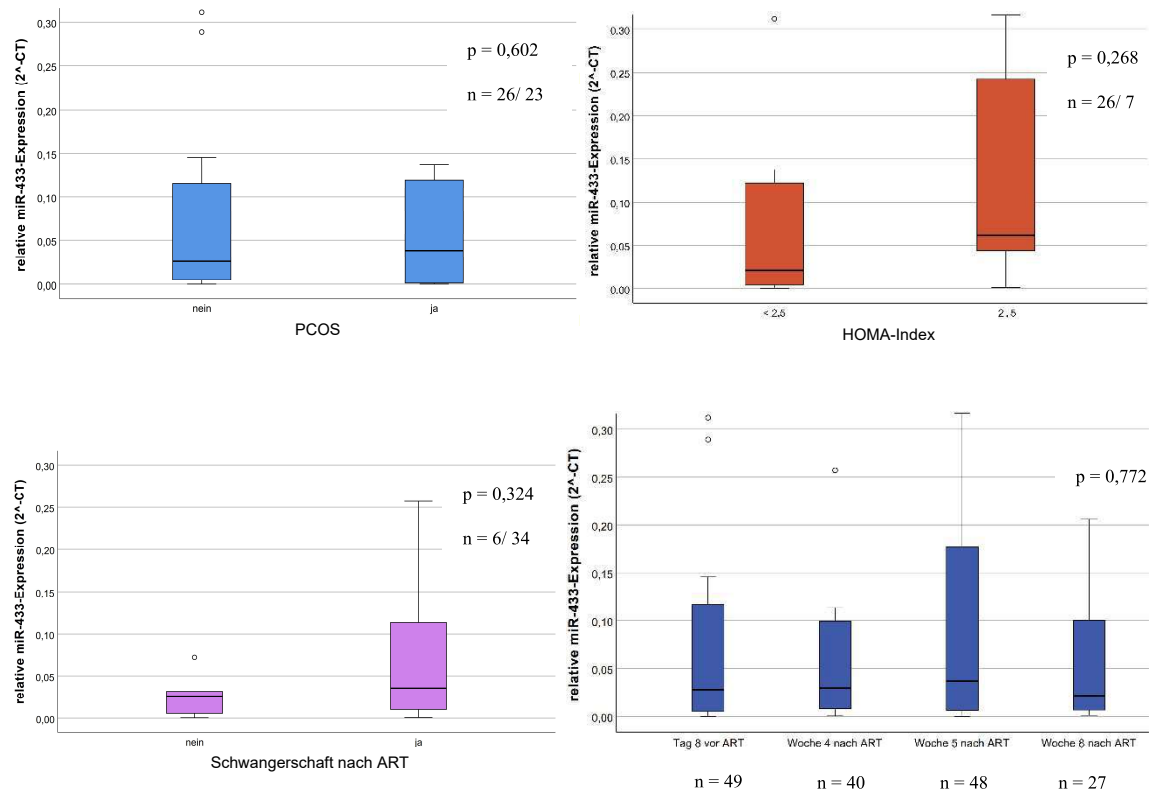


Abbildung 11: Box-Plot-Analyse der relativen miR-433-Serumlevel in Abhängigkeit zu der Diagnose (oben links), dem HOMA-Index (oben rechts) und einem Schwangerschaftseintritt (unten links) und im zeitlichen Verlauf (unten rechts).

4.4. Luciferase-Reporter-Assay

4.4.1. Zielgenauswahl

Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe des Luciferase-Reporter Assays die posttranskriptionelle Regulation durch microRNAs untersucht. Mittels *in silico* Analysen wurden pro microRNA (miR-141, miR-191) zwei Zielgene ausgewählt, welche in Zusammenhang mit der Differenzierung und Proliferation der Plazenta und der Frühschwangerschaft stehen. Dafür wurden die Datenbanken „Target Scan Human, Release 7.2: March 2018 (Agarwal et al., 2015)“, sowie NCBI PubMed genutzt.

Tabelle 10: Auswahl der Zielgene auf Basis der Datenbanken "Target Scan Human" und "PubMed"

Zielgen	Regulatorische microRNA	context score	Referenz
TGFβ2 (transforming growth factor beta 2)	hsa-miR-141-3p	-0,52	Lash et al., Biol Reprod. 2005
IGF2 (insulin-like growth factor 2)	hsa-miR-141-3p	-0,16	Kent et al., Int J Dev Biol. 2012
PLCD-1 (phospholipase C, delta 1)	hsa-miR-191-5p	-0.58	Nakamura & Fukami. J Biochem. 2017
EGR1 (early growth response 1)	hsa-miR-191-5p	-0.44	Guo et al., Cell Cycle. 2014

4.4.2. TGFβ2

Die Lumineszenz der nur mit den Vektoren transfizierten Zellen liegt in HTR knapp 30 % unter dem Referenzwert. In M59 ist die Lumineszenz der nur mit dem Vektor transfizierten Zellen auf 86 % reduziert. Es zeigt sich, dass in HTR nach miR-141-mimic-Behandlung die Luciferase-Aktivität auf 45% reduziert war ($p = 0,022$; Student's t-Test). In M59 reduzierte sich die Lumineszenz nach mimic-Behandlung auf 54 % ($p = 0,002$; Student's t-Test).

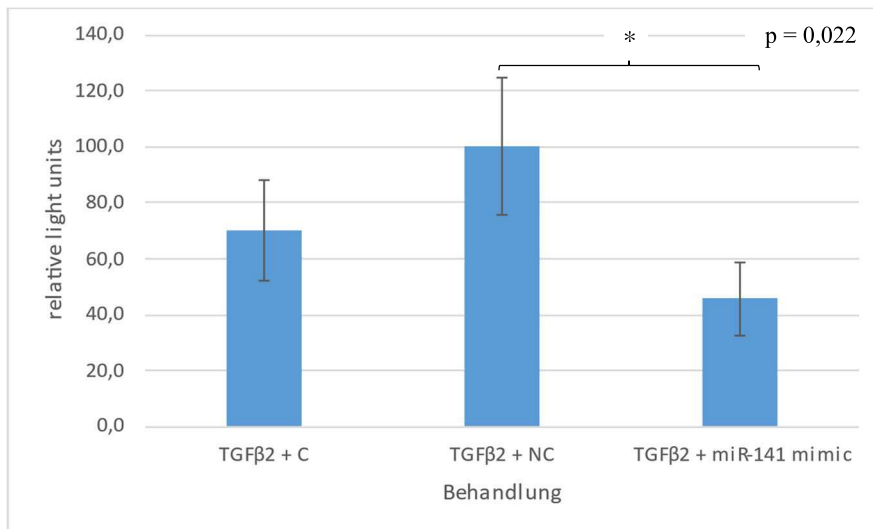


Abbildung 12: Boxplot-Analyse der Lumineszenz (relative light units) der mit TGFβ2 transfizierten HTR-8/SVneo-Zellen nach Behandlung nur mit dem Vektor, mit einer Negativkontrolle und mit dem miR-141-mimic. Abkürzungen C= Kontrolle, NC= negativ-Kontrolle. * $p < 0,05$

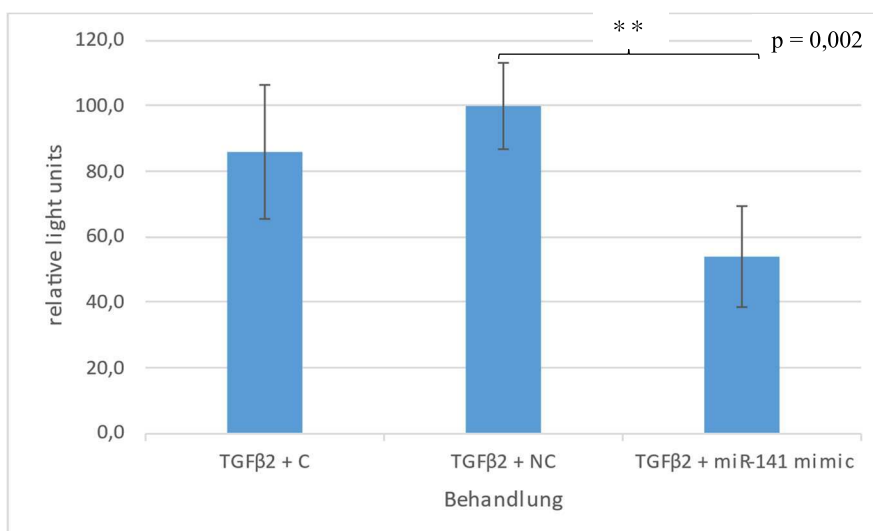


Abbildung 13: Boxplot-Analyse der Lumineszenz (relative light units) der mit TGFβ2 transfizierten AC1-M59-Zellen nach Behandlung nur mit dem Vektor, mit einer Negativkontrolle und mit dem miR-141-mimic. Abkürzungen C= Kontrolle, NC= negativ-Kontrolle. ** $p < 0,01$

4.4.3. IGF2

Die Lumineszenz der nur mit den Vektoren transfizierten Zellen ist in HTR gleich dem Referenzwert. In M59 liegt diese knapp 26 % unterhalb des Referenzwertes. Es zeigt sich, dass in HTR nach mimic-Behandlung die Luciferase-Aktivität auf 48 % reduziert war ($p = 0,041$; Students t-Test). In M59 reduzierte sich die Lumineszenz nach mimic-Behandlung auf 61,5 % ($p = 0,080$; Students t-Test).

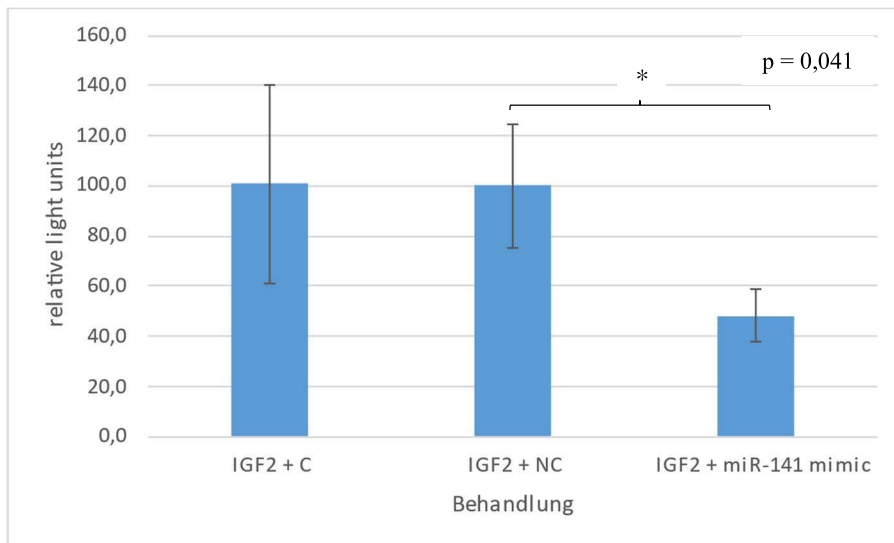


Abbildung 145: Boxplot-Analyse der Lumineszenz (relative light units) der mit IGF2 transfizierten HTR-8/SVneo-Zellen nach Behandlung nur mit dem Vektor, mit einer Negativkontrolle und mit dem miR-141-mimic. Abkürzungen C= Kontrolle, NC= negativ-Kontrolle. * $p < 0,05$

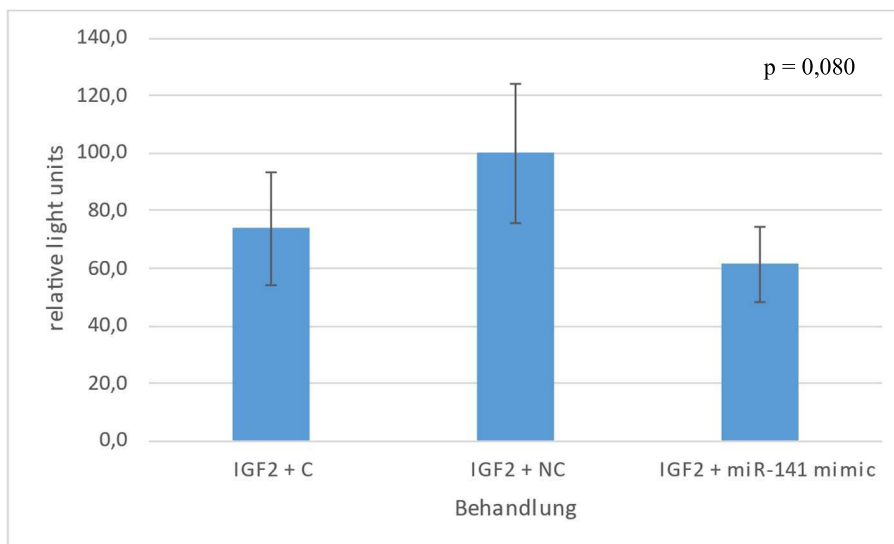


Abbildung 15: Boxplot-Analyse der Lumineszenz (relative light units) der mit IGF2 transfizierten AC1-M59-Zellen nach Behandlung nur mit dem Vektor, mit einer negativ-Kontrolle und mit dem miR-141-mimic. Abkürzungen C= Kontrolle, NC= negativ-Kontrolle.

4.4.4. PLCD-1

Die Lumineszenz der nur mit den Vektoren transfizierten Zellen ist in HTR um 31 % gegenüber dem Referenzwert reduziert. In M59 liegt diese knapp 18 % unterhalb des Referenzwertes. Es zeigt sich, dass in HTR nach mimic-Behandlung die Luciferase-Aktivität auf 81 % reduziert war ($p = 0,277$; Students t-Test). In M59 reduzierte sich die Lumineszenz nach mimic-Behandlung auf 53 % des Referenzwertes ($p = 0,003$; Students t-Test).

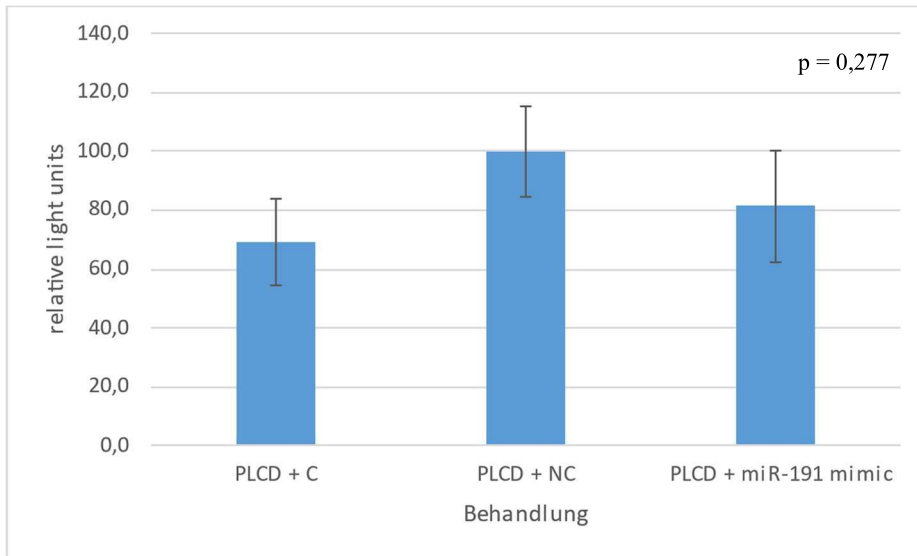


Abbildung 16: Boxplot-Analyse der Lumineszenz (relative light units) der mit PLCD-1 transfizierten HTR-8/SVneo -Zellen nach Behandlung nur mit dem Vektor, mit einer negativ-Kontrolle und mit dem miR-191-mimic. Abkürzungen C= Kontrolle, NC= negativ-Kontrolle.

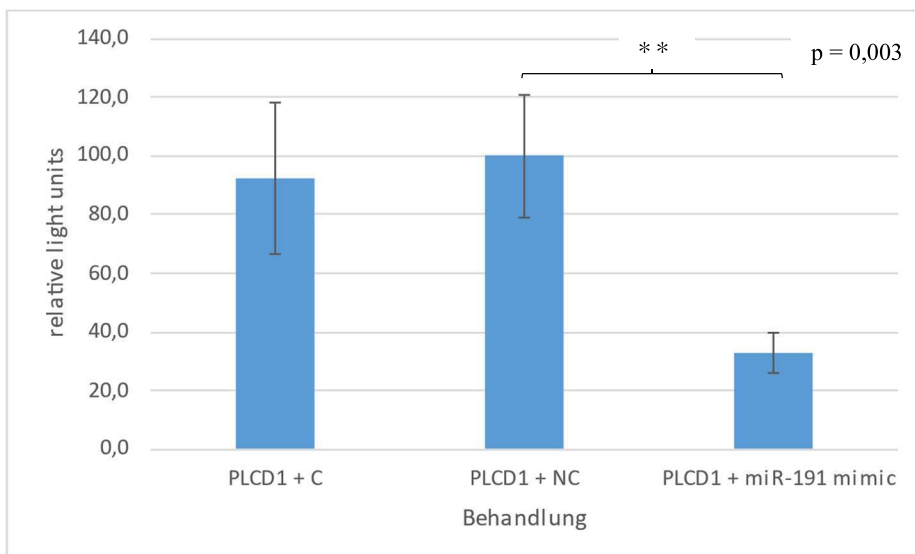


Abbildung 17: Boxplot-Analyse der Lumineszenz (relative light units) der mit PLCD-1 transfizierten AC1-M59-Zellen nach Behandlung nur mit dem Vektor, mit einer Negativkontrolle und mit dem miR-191-mimic. Abkürzungen C= Kontrolle, NC= negativ-Kontrolle. ** $p < 0,01$

4.4.5. EGR1

Die Lumineszenz der nur mit den Vektoren transfizierten Zellen ist in HTR um 73 % gegenüber dem Referenzwert reduziert. In M59 liegt diese knapp 9 % über dem Referenzwert. Es zeigt sich, dass in HTR nach mimic-Behandlung die Luciferase-Aktivität auf 56 % reduziert war ($p = 0,007$; Students t-Test). In M59 reduzierte sich die Lumineszenz nach mimic-Behandlung auf 53 % des Referenzwertes ($p = 0,006$; Students t-Test).

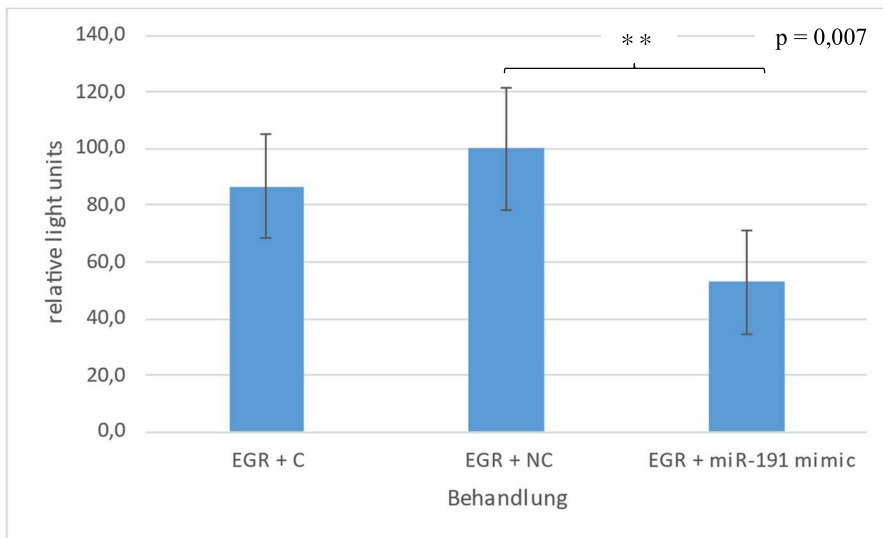


Abbildung 18: Boxplot-Analyse der Lumineszenz (relative light units) der mit EGR1 transfizierten HTR-8/SVneo-Zellen nach Behandlung nur mit dem Vektor, mit einer Negativkontrolle und mit dem miR-191-mimic. Abkürzungen C= Kontrolle, NC= negativ-Kontrolle. ** $p < 0,01$

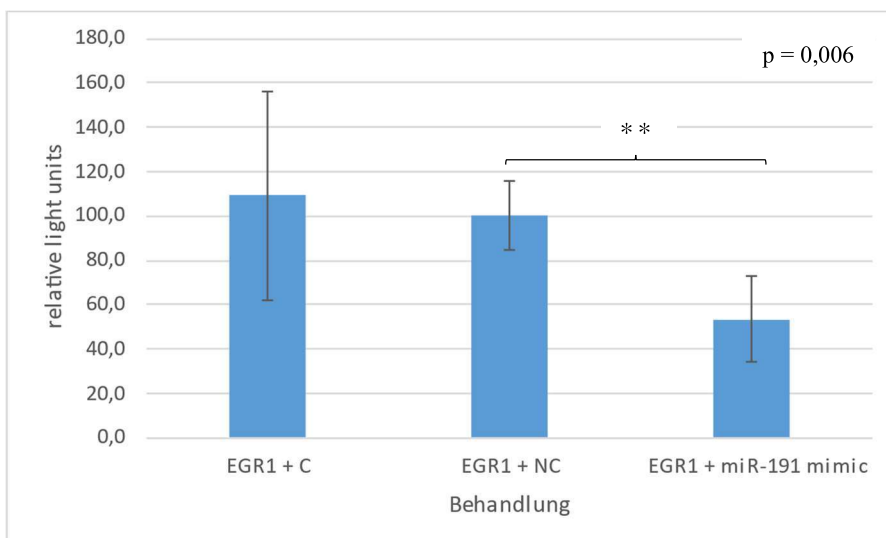


Abbildung 19: Boxplot-Analyse der Lumineszenz (relative light units) der mit EGR1 transfizierten AC1-M59-Zellen nach Behandlung nur mit dem Vektor, mit einer Negativkontrolle und mit dem miR-191-mimic. Abkürzungen C= Kontrolle, NC= negativ-Kontrolle. ** $p < 0,01$

5. Diskussion

5.1. Analyse der microRNA-Serumlevel im Blutserum

5.1.1. MicroRNA-Expression in Abhängigkeit einer Schwangerschaft und der Schwangerschaftswoche

Zahlreiche Arbeiten haben bereits seit 2008 plazentare microRNAs im mütterlichen Kreislauf identifizieren können (Übersicht in Morales-Prieto et al., 2013). Auf Grund ihrer einfachen Isolierung sowie der Stabilität gegenüber dem RNase-vermittelten Abbau besteht die Annahme, dass zirkulierende microRNAs potentielle Biomarker für eine Vielzahl von physiologischen Entwicklungsprozessen und pathologischen Abweichungen darstellen können.

In einer Vielzahl von onkologischen Erkrankungen konnten bereits abweichende microRNA-Expressionsmuster festgestellt werden und in Verbindung mit dem Krankheitsverlauf bzw. der Prognose gebracht werden (Übersicht in Iorio et al., 2012). Diese konnten ebenso bei einer großen Zahl an Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie (Ospina-Prieto et al., 2016; Lv et al., 2019), Gestationsdiabetes (Zhu et al., 2015; Filardi et al., 2020), Makrosomie (Ortiz-Dosal et al., 2020), fetaler Wachstumsretardierung (Li & Liu, 2020) und Frühgeburtlichkeit (Cook et al., 2019) erfasst werden. In welchem Zusammenhang zirkulierende trophoblastäre microRNAs mit der Implantation stehen ist bisher nur unzureichend erforscht.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass zirkulierende microRNAs im mütterlichen Blut Störungen der Implantation bzw. Plazentation widerspiegeln und somit potentielle diagnostische Marker in der Frühschwangerschaft darstellen können.

Dazu wurde im ersten Teil der Arbeit mittels qPCR-Analysen der Zusammenhang zwischen dem Serumlevel von miR-27b, miR-141, miR-191, miR-222 und miR-433 im mütterlichen Blut mit dem Eintreten einer intakten Schwangerschaft und dem Schwangerschaftsverlauf an vier definierten Zeitpunkten (Tag 8 der Follikelstimulation als *baseline* sowie die potentielle Schwangerschaftswoche 4, 5 und 8) untersucht.

Es konnte ein signifikant erhöhter Level von miR-141 im Serum von schwangeren Frauen in der 4. SSW festgestellt werden. Des Weiteren zeigte sich eine positive Korrelation zwischen dem Serumlevel von miR-191 und dem Vorliegen einer intakten Schwangerschaft. Bei den vier weiteren microRNAs konnten keine signifikanten Serumlevelunterschiede zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Schwangerschaft (bis SSW 8) zeigten sich keine signifikanten Änderungen in der Höhe der Serumlevel aller gewählten microRNAs.

miR-141 ist dem miR-200/141-Cluster zugehörig und ist genomisch auf dem Chromosom 12 lokalisiert. Sie zählt zu den plazentaspezifischen microRNAs, wird jedoch in geringen Mengen in anderen Geweben wie Gehirn, Thymus, Hoden und Leber exprimiert (Barad et al., 2004).

Chim et al. konnten in ihrer Arbeit plazentaspezifische microRNAs im Blutserum von schwangeren Frauen identifizieren, welche ihr Serumlevel im Verlauf der Schwangerschaft änderten. Vier microRNAs (miR-141, miR-149, miR-299-5p, miR-135b) mit der höchsten Konzentration in der Plazenta waren während der Schwangerschaft auch im mütterlichen Plasma nachweisbar und zeigten eine deutlich reduzierte Plasmakonzentration nach der Geburt. Es konnte gezeigt werden, dass der Serumlevel von miR-141 zum dritten Trimester deutlich ansteigt und im Plasma von Frauen, die bereits entbunden haben, kaum noch nachweisbar ist (Chim et al. 2008).

Morales-Prieto et al. kamen zu einem ähnlichen Ergebnis. Sie konnten zeigen, dass miR-141 eine deutlich erhöhte Expression in Trophoblastzellen aufweist und signifikant im mütterlichen Blut nachweisbar ist. Eine Herunterregulierung von miR-141 führte zu einer Abnahme der Trophoblastenproliferation (Morales-Prieto et al., 2011).

Im Gegensatz zu den oben genannten Expressionsmustern in menschlichen Trophoblastzellen zeigt sich im Tierexperiment an Mäusen ein umgekehrtes Expressionsverhältnis. Die Expression von miR-141 ist in Stromazellen des murinen Uterus vor der Implantation höher als nach der Implantation (Liu et al., 2013). Eine Reduktion der miR-141-Expression führte zu einer verminderten Proliferationsrate und zu einer vermehrten Apoptose. Daher stellten Liu et al. die Hypothese auf, dass die unterschiedliche Expression von miR-141 vor und nach der Implantation mit zellulärer Proliferation und Apoptose verbunden war, durch die sich Stromazellen in Dezidualzellen differenzierten (Liu et al., 2013).

Rosenbluth et al. untersuchten die microRNA-Expressionsmuster von 14 humanen Blastozysten mittels qPCR. Euploide Blastozysten zeigten eine signifikant höhere Expression von miR-141 als aneuploide Blastozysten (Rosenbluth et al., 2013). Es kann daher spekuliert werden, dass ein erhöhter miR-141-Serumlevel auch mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Implantation assoziiert ist.

Darüber hinaus konnten einige Arbeitsgruppen einen Zusammenhang zwischen der miR-141-Expression und bestimmten Schwangerschaftskomplikationen darstellen. So findet sich eine erhöhte plazentare Expression vom miR-141 bei Präeklampsie (Ospina-Prieto et al. 2016), fetaler Wachstumsretardierung (Tang et al. 2013) und fetaler Makrosomie (Guo et al. 2018).

In Zusammenschau der Datenlage sowie unserer Ergebnisse kann der Serumlevel von miR-141 im Blutserum als Indikator für eine erfolgreiche Implantation dienen. Da wir einen signifikant erhöhten miR-141-Serumlevel bereits in der 4. SSW feststellen konnten, besteht die Annahme,

dass diese bereits in der Frühschwangerschaft als Surrogatmarker für Komplikationen in der Frühschwangerschaft verwendet werden kann. Der fehlende Anstieg des Serumlevels im Verlauf der Schwangerschaft lässt sich mutmaßlich auf die kurze Untersuchungsspanne (bis SSW8) zurückführen, wobei dies der letzte Termin war, an dem sich die Patientinnen regulär in der Kinderwunschprechstunde vorstellten.

Die genomische Lokalisation von miR-191 befindet sich auf dem Chromosom 3 und gehört zum miR-191/425-Cluster. Eine fehlregulierte miR-191-Expression wurde bereits in einer Vielzahl an Tumorerkrankungen festgestellt. Darunter zählen unter anderem die akute myeloische Leukämie (Garzon et al. 2008), Prostata-Karzinome (Liu et al., 2019) und das hepatozelluläre Karzinom HCC (Gao et al., 2020). Eine abweichende Expression wird häufig mit einer erhöhten Invasivität und einer schlechteren Prognose assoziiert.

Mehrere Arbeiten deuten darauf hin, dass miR-191 auch an der Embryonalentwicklung, sowie der Implantation beteiligt ist. Morales-Prieto et al. untersuchten microRNA-Expressionsprofile in Trophoblastzellen von schwangeren Frauen. MiR-191 zeigte dabei eine hohe Expression in der Plazenta während des ersten Trimesters (Luo et al. 2009; Morales-Prieto et al. 2012).

Wang et al. konnten jedoch einen gegenteiligen Zusammenhang zwischen der Expression von miR-191 und einer erfolgreichen Implantation feststellen. Bei erfolgreicher Implantation konnte eine signifikant verringerte miR-191-Expression in den Deziduazellen festgestellt werden (Wang et al., 2016).

Rosenbluth et al. untersuchten microRNA-Expressionsprofile in Kulturmedien von insgesamt 28 Blastozysten aus anfänglich 91 kryokonservierten befruchteten Eizellen, welche nach einer vollständigen IVF-Behandlung entstanden und eingefroren wurden. Sie stellten fest, dass unterschiedliche Expressionsmuster in Abhängigkeit der Befruchtungsmethode (IVF oder ICSI), Chromosomenstatus und Schwangerschaftsausgang vorlagen. Eine erhöhte Expression von miR-191 wurde festgestellt im Kulturmedium von aneuploiden Blastozysten sowie von Blastozysten, welche nach dem Transfer nicht erfolgreich implantierten (Rosenbluth et al., 2014).

Die einzelnen Studien sind auf Grund methodischer Unterschiede nur bedingt miteinander vergleichbar. Unsere Ergebnisse zeigen eine positive Korrelation zwischen der miR-191-Expression und der Implantation. Damit stehen diese im Widerspruch zu den Ergebnissen von Wang et al. 2016 (wobei diese microRNA-Expressionen aus Endometriumbiopsien untersuchen), jedoch im Einklang mit den Erkenntnissen von Morales-Prieto et al. (2012) und Luo et al. (2009). Es ist hervorzuheben, dass unsere Studienpopulation mit 49 Patientinnen mehr als doppelt so umfangreich ist wie die der oben genannten Arbeiten und somit als aussagekräftiger einzuschätzen ist.

Pendzialek et al. (2019) stellten einen reduzierten Serumlevel von miR-191 im mütterlichen Blut von diabetischen Kaninchen fest. Darüber hinaus wurde ein signifikant verminderter Serumlevel von miR-191 im Blutserum von Schwangeren mit einer diagnostizierten Präeklampsie beobachtet (Akgör et al. 2021). Es kann daher vermutet werden, dass ein reduzierter Serumlevel negative Auswirkungen auf die Implantation und Plazentation hat. Da miR-191 vorrangig von Trophoblastzellen im ersten Trimester exprimiert wird, könnte sie als diagnostischer Marker einer physiologischen Entwicklung in der Frühschwangerschaft genutzt werden.

Die Ergebnisse der Studien an Blastozysten lassen den Schluss zu, dass deren miR-191-Expression separat betrachtet werden muss. Im Gegensatz zu Trophoblastzellen sind hier hohe Expressionsraten mit einem negativen Outcome assoziiert (Rosenbluth et al., 2014). Daraus ergibt sich, dass die Bestimmung der miR-191-Expression im Kulturmedium von Blastozysten einen prognostischen Wert auf die Implantationsrate im Rahmen einer ART innehat. Damit ist eine bessere Selektion von potenten Blastozysten für den Transfer denkbar, um die Chancen auf eine erfolgreiche Implantation zu erhöhen.

5.1.2. MicroRNA-Expression in Zusammenhang mit dem PCO-Syndrom

Das PCOS betrifft vor allem junge Frauen im gebärfähigen Alter. Es handelt sich um eine Störung im hormonellen Regelkreis. Der genaue Pathomechanismus, sowie die Ätiologie sind jedoch nicht vollständig bekannt. Die vorherrschenden endokrinen und metabolischen Störungen führen meist zu einer gestörten Endometriumfunktion, welche eine verminderte Implantationsrate bis hin zur Unfruchtbarkeit verursacht (Ferreira & Motta 2018; Palomba et al. 2021). Von mehreren Interventionen zur Verbesserung der Endometriumfunktion bei Frauen mit PCOS haben bisher nur die Änderung des Lebensstils, Metformin und die bariatrische Chirurgie die höchste wissenschaftliche Evidenz für den klinischen Nutzen (Palomba et al. 2021).

Ein großes Potential der microRNAs käme vorerst in der Diagnostik diverser Pathologien im Rahmen des PCOS zu tragen. Für globale Aussagen und die Erforschung ihres Stellenwertes in der Therapie erfordert es noch weitere umfangreichere Studien. Unsere Arbeit dient der Grundlagenforschung in Bezug auf die Fähigkeit bestimmter microRNAs als Biomarker zu fungieren. Zusätzlich zum primären Endpunkt Implantation und Schwangerschaft konnten wir in unserer Arbeit auch als sekundären Endpunkt die Diagnose PCOS untersuchen.

Bei der Analyse der Serumlevel von miR-27b, miR-141, miR-191, miR-222 und miR-433 im Serum von 23 Frauen mit PCOS verglichen mit 26 Frauen ohne PCOS konnten wir keine signi-

fikanten Unterschiede beobachten. Entgegen unserer Ergebnisse konnten mehrere Arbeitsgruppen in Serumproben signifikante Unterschiede in der microRNA-Level zwischen Frauen mit und Frauen ohne PCOS feststellen.

Long et al. (2014) untersuchten Serumproben von 68 PCO-Patientinnen im Vergleich mit 68 Kontroll-Patientinnen mittels qPCR-Analysen. Von insgesamt neun ausgewählten microRNAs (miR-16, miR-222, miR-106b, miR-19a, miR-146a, miR-30c, miR-186 und miR-24), waren drei (miR-222, miR-30c und miR-146a) in der Gruppe der PCO-Patientinnen signifikant überexprimiert.

Murri et al. (2013) erforschten die Auswirkungen von Geschlecht, Sexualhormonen, PCOS und damit assoziiertem Übergewicht auf die Serumlevel von vier zirkulierenden microRNAs. In die Studie eingeschlossen waren 12 Frauen ohne PCOS, 12 Frauen mit PCOS und 12 Männer. Die Hälfte der Proband*innen der einzelnen Gruppen waren normalgewichtig, die andere Hälfte übergewichtig ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$). Adipositas führte in der Frauen-Kontrollgruppe, sowie in der Männergruppe zu einem signifikant verminderten Serumlevel von miR-21, miR-27b und miR-103. In der Gruppe mit PCOS konnten jedoch leicht erhöhte Level der genannten microRNAs verzeichnet werden.

Darüber hinaus wurden mehrere Studien an Follikelflüssigkeit, Granulosazellen, Thekazellen und Adipozyten durchgeführt. He et al. (2018) untersuchten die Expression von miR-141 und miR-200 in Granulosazellen von 62 PCO-Patientinnen im Vergleich mit 61 Kontrollpatientinnen. Frauen mit PCOS zeigten eine signifikant höhere Expression beider microRNAs in den extrahierten Zellen. Darüber hinaus konnte ein signifikant höheres Risiko von Schwangerschaftskomplikationen mit einer geringen Expression von miR-141 und miR-200 bei Frauen mit PCOS festgestellt werden.

Xue et al. (2018) fanden in der Follikelflüssigkeit von Frauen mit PCO-Syndrom 263 different exprimierte microRNAs im Vergleich zu Frauen ohne PCOS. 177 microRNAs waren über- und 86 microRNAs waren unterexprimiert im Vergleich zu Frauen ohne PCOS.

Huang et al. (2019) stellten fest, dass miR-222 im Gewebe von PCO-Patientinnen im Vergleich zu Kontrollpatientinnen stark überexprimiert war. In *gain-of-function-* und *loss-of-function-* Assays zeigten sie, dass miR-222-mimics die Zellproliferation signifikant förderten, während ein miR-222-Inhibitor die Zellapoptose induzierte und den Zellzyklus stoppte.

Guo et al. (2021) untersuchten die Expression von miR-433 in Granulosazellen und konnten eine verringerte Expression bei Frauen mit PCOS feststellen. Eine induzierte Überexpression von miR-433 ergab eine gesteigerte proliferative Fähigkeit und reduzierte Apoptoserate in KGN Zellen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die oben beschriebenen microRNAs eine wichtige Rolle in der Pathogenese und der Ausprägung des PCOS spielen könnten. Es ist kritisch anzumerken, dass die Arbeiten teils nur eine geringe Studienpopulation aufweisen und damit generalisierte Aussagen nur eingeschränkt möglich sind. Zudem lässt sich anmerken, dass in keiner der Studien die unterschiedlichen PCO-Phänotypen berücksichtigt werden. Palomba et al. konnten bereits 2010 ein differentes klinisches Outcome einer Schwangerschaft unter Frauen mit unterschiedlichen Phänotypen eines PCOS festhalten. Auf Grund dieser Erkenntnisse lässt sich vermuten, dass sich auch die microRNA-Expressionsmuster unter den einzelnen Phänotypen unterscheiden.

Insgesamt befindet sich das Verständnis der Beziehung zwischen microRNAs und PCOS noch in einem Vorstadium, und die möglichen Rollen von microRNAs in der Pathogenese von PCOS sind noch nicht geklärt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen die Hypothese nicht, dass es mit einem PCOS zu abweichenden microRNA-Leveln im mütterlichen Blut kommt. Limitierend ist jedoch unser begrenztes Patientinnenkollektiv (23 PCO-Fälle) zu erwähnen, daher lassen sich keine endgültigen Schlussfolgerungen ziehen. An dieser Stelle empfiehlt es sich weitere Untersuchungen mit zum einen einem größeren Patientinnenkollektiv sowie zum anderen dem Einfluss unterschiedlicher Phänotypen voranzutreiben.

5.1.3. MicroRNA-Expression in Zusammenhang mit dem Glukosestoffwechsel

Die Arbeit von Chang et al. (2013) verdeutlichte die Bedeutung von Glukosestoffwechselstörungen für eine erfolgreiche Implantation. In ihrer Studie untersuchten sie das klinische Outcome von Frauen mit PCOS mit einer Insulinresistenz (n=51) und ohne Insulinresistenz (n=64) nach IVF-Zyklen. In der Gruppe der Frauen mit Insulinresistenz wurde eine signifikant niedrigere Implantationsrate beobachtet, trotz vergleichbarer Entwicklung der befruchteten Eizellen bis zum Transfer.

50–70% der Frauen mit PCOS weisen eine Insulinresistenz auf, verglichen mit einer Prävalenz von nur 10–25% in der Allgemeinbevölkerung (DeUgarte et al., 2005). Unter Insulinresistenz versteht man die verminderte zelluläre Antwort auf das zirkulierende Insulin, was eine erhöhte Insulinsekretion zur Folge hat. Mehrere Studien haben bereits differente microRNA-Expressionsmuster bei Frauen mit PCOS und Glukosestoffwechselstörungen, sowie deren Auswirkungen auf bestimmte Signalwege beschrieben (Chen et al., 2019).

Die Auswertung unserer Ergebnisse zeigte eine signifikante inverse Korrelation zwischen dem Serumlevel von miR-27b, miR-141 und miR-222 und von der Norm abweichenden Glukosestoffwechselfparametern wie dem HbA1c, dem oGTT und dem HOMA-Index.

Es ist bekannt, dass miR-27b in Hepatozyten stark exprimiert wird und an der Regulation des Fettstoffwechsels beteiligt ist (Vickers et al., 2013). Da die Veränderung des Lipidstoffwechsels eng mit der Insulinresistenz zusammenhängt, untersuchten Benito-Vicente et al. (2020) die Auswirkungen von miR-27b auf den hepatischen Insulinstoffwechsel. Sie stellten fest, dass miR-27b die posttranskriptionelle Expression zahlreicher Komponenten des Insulin-Signalwegs einschließlich des Insulinrezeptors (INSR) und des Insulinrezeptorsubstrats 1 (IRS1) in menschlichen Hepatozyten reguliert. Auf Grund dieser Ergebnisse vermuten die Autoren, dass eine erhöhte miR-27b-Expression zur frühen Entwicklung einer hepatischen Insulinresistenz beitragen könnte.

Dem gegenüber beobachteten Jiang et al. (2021) eine gestörte Glukosetoleranz bei miR-23b/27b/24-1 Cluster knockout Mäusen. Auch Pendzialek et al. (2019) konnten im Tierexperiment eine Veränderung der microRNA-Level im maternalen Blut sowie im Endometrium bei einer diabetischen Gravidität gegenüber einer normalen Gravidität feststellen. So waren die Level von miR-27b, miR-141, miR-191, miR-222 und miR-433 im Serum von schwangeren diabetischen Kaninchen gegenüber nicht diabetischer schwangerer Kaninchen verringert. Des Weiteren wurde erkannt, dass Insulin eine regulatorische Wirkung auf die embryonale microRNA-Expression ausübt. Nach Zugabe von Insulin zu Blastozysten in vitro konnte ein Anstieg der Expression von miR-27b und miR-191 verzeichnet werden (Pendzialek et al.; 2019).

Der miR-141-3p-Knockdown in AML12-Zellen unterdrückte deren Glukoseaufnahme und Insulinreaktion (Dang et al., 2019). Die Hemmung von miR-141-3p in HTR-8/SVneo-Zellen führte zu einer verminderten Zellproliferation und -invasion, wobei eine Überexpression zu einer erhöhten Zellproliferation, Invasion und Migration beitrug (Guo et al., 2018). Es kann somit begründet angenommen werden, dass eine verringerte Expression von miR-141 einen negativen Effekt auf den Glukosestoffwechsel ausübt und darüber hinaus proliferative Prozesse wie etwa die Implantation hemmen kann.

Herrera-Van Oostdam et al. (2020) stellten fest, dass sich das Level von fünf microRNAs (miR-516-5p, miR-517-3p, miR-518-5p, miR-222-3p und miR-16-5p) im Urin von schwangeren Frauen mit diagnostiziertem Gestationsdiabetes signifikant von dem Level von gesunden Frauen unterscheidet. So erwies sich der Level von miR-222 im dritten Trimester bei Frauen mit Gestationsdiabetes deutlich verringert. Ähnliches beobachteten bereits früher Zhao et al. ab dem zweiten Trimester (Zhao et al., 2011). Ein erhöhter Level von miR-222 im Serum von PCO-Frauen weist hingegen eine starke positive Korrelation mit dem Seruminsulin auf und ist assoziiert mit dem Auftreten von Diabetes mellitus Typ II (Sørensen et al., 2014; Long et al., 2014). Die beschriebenen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass ein niedriger miR-222-Level im maternalen Blut als früher Indikator der Entwicklung eines Gestationsdiabetes sein könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Expressionsalterationen, sowie der Auswertung unserer Ergebnisse, miR-27b, miR-141 und miR-222 potentielle Biomarker bzw. Verlaufparameter für den Glukosestoffwechsel während der Schwangerschaft darstellen. Möglicherweise zeugt ein niedriger Level der genannten microRNAs im mütterlichen Blut auf Grund ihrer angiogenen (Urbich et al., 2008) sowie proliferativen und Zellmigrations-fördernden Eigenschaften (Ospina-Prieto et al., 2016; Guo et al., 2018; Dong et al., 2020) von einer gestörten Implantation sowie Plazentation. Um diese Theorie zu prüfen sind jedoch weiterführende Studien notwendig.

5.2. microRNA-vermittelte posttranskriptionale Genregulation

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von zwei gewählten microRNAs auf putative Zielgene analysiert. Mittels *in silico*-Analysen wurden für miR-141 und miR-191 je zwei mögliche Zielgene selektiert. Dazu wurden für miR-141 der *Transforming Growth Factor beta 2* (TGF β 2) und der *Insulin-like Growth Factor 2* (IGF 2), sowie für miR-191 das *early growth response protein 1* (EGR 1) und die *Phospholipase C δ 1* (PLCD-1) gewählt. Anschließend wurde mittels Luciferase-Assay die Annahme untersucht, dass sich die Genexpression durch Einfluss der microRNAs verringert. Unterstützt wird diese These durch mehrere Studien, die belegen, dass microRNAs im Allgemeinen eine posttranskriptionale Repression induzieren (Fabian & Sonenberg, 2012; Treiber et al., 2019).

5.2.1. miR-141

Nach miR-141-mimic-Transfektion zeigte sich sowohl in den TGF β -transfizierten HTR-Zellen, als auch in den TGF β -transfizierten M59-Zellen eine signifikant verminderte Luciferase-Aktivität im Vergleich zur Negativkontrolle. In den IGF2-transfizierten Zellen ergab sich lediglich in der HTR-Zelllinie eine signifikante Reduktion der Luciferase-Aktivität. Die M59-Zelllinie zeigte keine signifikante Lumineszenz-Änderung nach Behandlung mit miR-141-mimics. Somit belegen unsere Ergebnisse die negativ regulatorische Wirkung von miR-141 auf die gewählten Zielgene.

Der *Transforming Growth Factor beta*, TGF β , ist ein multifunktionelles Zytokin, welches bei Wirbeltieren in drei Isoformen vorkommt (TGF β 1, TGF β 2 und TGF β 3). Sie regulieren eine Vielzahl an biologischen Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Angiogenese, Apoptose und Bildung von Extrazellulärmatrix. Sanford et al. konnten die regulatorische Wirkung von TGF β 2 im Rahmen der Embryogenese aufzeigen. Der gezielte Knock-out des TGF β 2-Gens in Mäusen führte zu einer erhöhten perinatalen Mortalität, sowie zu multiplen Entwicklungsdefekten. Dazu zählten Herz-, Lungen-, Schädel-, Gesichts-, Gliedmaßen-, Wirbelsäulen-, Augen-, Innenohr- und Urogenitaldefekte (Sanford et al., 1997). Darüber hinaus scheinen TGF β 1, TGF β 2 und TGF β 3 eine Rolle bei der Implantation zu spielen, indem sie durch Reduktion der Protease-Aktivität die Trophoblasteninvasion hemmen (Lash et al., 2005). Wang et al. (2019) beobachteten eine signifikant erniedrigte Expression von TGF β bei Frauen mit rezidivierendem Implantationsversagen bei chronischer Endometritis.

Der *Insulin-like Growth Factor 2* (IGF-2) gehört mit IGF-1 und IGF-3 zu der kleinen Klasse von insulinähnlichen Wachstumsfaktoren. Sie weisen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu Insulin auf, wobei sich auch die Rezeptoren und intrazellulären Signalkaskaden sehr ähneln (Denley et

al., 2005). Eine wesentliche Funktion der insulinähnlichen Wachstumsfaktoren ist die Regulation der Zelldifferenzierung und des Wachstums in der Embryonalphase. So kommt es bei Mutationen des IGF1-Gens zu einer schweren Wachstumsretardierung und geistigen Behinderungen (Denley et al. 2005). Kommt es durch Hyper- oder Hypomethylierungen zu fehlerhaftem Imprinting des mütterlichen IGF2-Allels entstehen unterschiedliche Syndrome, die meist mit Wachstumsstörungen assoziiert sind wie das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (Chao et al. 2008) und das Russell-Silver-Syndrom. Kent et al. (2012) demonstrierten, dass IGF2 sich ebenfalls auf das plazentare Wachstum auswirkt.

Auf Grund der proliferativen, angiogenen und Zellmigration-fördernden Eigenschaften, ist eine Beteiligung von TGF β und IGF2 an der Implantation denkbar. Die regulatorische Rolle in Bezug auf die Plazentaentwicklung wurde in wenigen Studien bereits beleuchtet (Kent et al. 2012; Lash et al., 2005). Kent et al. (2012) beobachteten, dass IGF2-knock-out-Mäuse ein vermindertes Plazentagewicht, Fetalgewicht und eine verminderte Lebensfähigkeit zeigten. Lash et al. (2005) vermerkten eine erhöhte invasive Kapazität extravillöser Trophoblastzellen nach Hemmung von TGF β 1, 2 und 3 mit neutralisierenden Antikörpern. Wie microRNAs an der Regulation beider Gene beteiligt sind ist noch nicht umfassend erforscht.

Es ist bekannt, dass miR-141 bei einer Vielzahl an Krebserkrankungen als eine Art Tumorsuppressor fungiert (Peng et al. 2016). Die Arbeit von Tang et al. (2013) ließ bereits die Hypothese zu, dass miR-141 den IGF2-Signalweg beeinflusst. Diese wurde in den folgenden Jahren sowohl an Tumorzellen (Peng et al. 2016), als auch an murinen Trophoblast-Stammzellen (Saha et al. 2015) belegt. Diese Studien, sowie die Auswertung unserer Ergebnisse belegen somit die Hypothese, dass miR-141 eine regulatorische Wirkung auf TGF β 2 und IGF2 ausübt und auf diese Weise an den Prozessen der Implantation teilhaben könnte. Unsere Arbeit kann als Grundlage für detailliertere Studien genutzt werden. In weiterführenden Studien wäre die Untersuchung der konkreten Rolle von TGF β 2 und IGF2 im Rahmen der Implantation von Interesse. Darüber hinaus ist die Aufdeckung der entsprechenden Signalwege notwendig, um miR-141 als möglichen therapeutischen Angriffspunkt zu beleuchten.

5.2.2. miR-191

Phospholipase C $\delta 1$ (PLCD-1) ist ein Isoenzym der Phospholipase C. Sie zählt zu der Gruppe der Hydrolasen und ist als Schlüsselenzym im Phosphoinositolstoffwechsel zentral an der Signaltransduktion beteiligt. In Säugetieren sind drei Isoformen von PLCD bekannt: PLCD1, PLCD3 und PLCD4 (Nakamura et al. 2017). Die einzelnen Funktionen der Isoformen wurden im Tierversuch mittels Knock-out-Mäusen erforscht. Es zeigte sich, dass der gleichzeitige Verlust von PLCD1 und PLCD3 zu einer übermäßigen Apoptose von Trophoblastzellen führte (Nakamura et al. 2005). PLCD4 wird reichlich in Spermien exprimiert – männliche PLCD4-knock out Mäuse zeigten eine verminderte Fertilität (Fukami et al. 2001). Aktuell liegen keine Studien zur Regulation von PLCD durch miR-191 vor.

Early Growth Response Protein 1 (EGR1) ist ein Zinkfingertranskriptionsfaktor und gehört neben EGR-2, EGR-3 und EGR-4 zu der EGR-Familie. Diese werden durch diverse extrazelluläre Stimuli wie Wachstumshormone, Zytokine, Hormone und Umweltbelastungen aktiviert, binden anschließend an ähnliche GC-reiche Zielgene und wirken als transkriptionelle Aktivatoren. EGR-1 ist beteiligt an der Regulation der Proliferation, Differenzierung und Apoptose in verschiedenen Bereichen wie dem Nervensystem, Immunsystem, kardiovaskulärem System und der Reproduktion. Es gibt Hinweise darauf, dass EGR1 eine zentrale Rolle bei der Regulation der Eierstockfunktion, sowie der Implantation und der frühen Embryonalentwicklung spielt. (Guo et al. 2014; Park et al. 2018; Yang et al. 2019). Bisher gibt es noch keine Arbeiten, die die regulatorische Wirkung von miR-191 auf EGR1 an Trophoblastzellen untersuchen. Jedoch gibt es eine Studie an Zellen des ösophagealen Plattenepithelkarzinoms, in der mittels Luciferase-Reporter- und Western-Blot-Assays bewiesen wurde, dass miR-191 die EGR1-Expression reduzierte, indem es direkt seine 3'-untranslatierte Region bindet (Gao et al. 2017).

Die Auswertung unserer Ergebnisse belegt die Hypothese, dass miR-191 die Expression von PLCD1 und EGR1 hemmt. In der PLCD-1 transfizierten M59-Zellreihe konnte nach miR-191-mimic Behandlung eine signifikant verminderte Luciferase-Aktivität gemessen werden, in der HTR-Zellreihe jedoch nicht. Beide mit EGR1 transfizierten Zellreihen zeigten nach miR-191-mimic Behandlung eine signifikante Reduktion der Lumineszenz. Es ist hervorzuheben, dass wir aktuell erstmalig die Regulation der gewählten Zielgene durch miR-191 an Trophoblastzellen nachgewiesen haben. Auf Grund des beschriebenen Einflusses von PLCD1/ EGR1 auf Trophoblastzellen bzw. die Implantation liegt die Vermutung nahe, dass ein Zusammenhang zwischen dem miR-191-Level im maternalen Plasma und einer gestörten Implantation/ Plazentation besteht. An dieser Stelle empfehlen sich weitere Untersuchungen, welche zum einen die exakte Rolle von PLCD1/ EGR1 bei der Implantation spielen und zum anderen welchen regulatorischen Einfluss miR-191 dabei ausübt.

6. Zusammenfassung

Ca. 10% aller Paare in Deutschland sind ungewollt kinderlos. Die häufigsten Ursachen der weiblichen Infertilität beruhen auf Störungen der Ovulation, des Eizelltransportes und der Implantation. Es ist bekannt, dass das PCO-Syndrom sowohl zu einer gestörten Ovulation, als auch zu einer gestörten Implantation führt.

MicroRNAs sind kleine, einsträngige und nicht-kodierende RNAs endogenen Ursprungs, welche in der Lage sind die Genexpression posttranskriptionell zu regulieren. Es konnten bereits plazentaspezifische microRNAs identifiziert und im mütterlichen Kreislauf nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden deregulierte microRNA-Expressionsmuster im Zusammenhang mit diversen Schwangerschaftskomplikationen belegt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Serumlevel von fünf schwangerschaftsassozierten microRNAs (miR-27b, miR-141, miR-191, miR-222, miR-433) von Patientinnen, welche sich einer ART unterzogen haben, untersucht. Das Kollektiv (n=49) setzte sich aus zwei Gruppen zusammen: Frauen mit diagnostiziertem PCOS (n=23) und Frauen ohne PCOS (26). Im Rahmen der Studie wurde den Patientinnen an vier definierten Zeitpunkten Blut abgenommen.

Im ersten Teil der Arbeit wurden mittels quantitativer real-time-PCR die Level der genannten microRNAs aus den Serumproben vermessen und zu klinischen Parametern korreliert. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen den miR-141- und miR-191-Serumleveln und einer intakten Schwangerschaft beobachtet werden. Des Weiteren konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem Level von miR-27b, miR-141 und miR-222 und einem gestörten Glukosestoffwechsel festgestellt werden.

Im zweiten Schritt konnte mittels Luciferase-Assay die posttranskriptionelle Genrepression von miR-141 auf den *Transforming Growth Factor beta* (TGF β) und den *Insulin-like Growth Factor 2* (IGF-2), sowie von miR-191 auf die *Phospholipase C δ 1* (PLCD-1) und das *Early Growth Response Protein 1* (EGR1) an HTR-8/SVneo und AC1-M59-Zellen belegt werden.

In Zusammenschau der Literatur und unserer Ergebnisse konnten miR-141 und miR-191 als potenzielle Marker einer erfolgreichen Implantation identifiziert werden. Es besteht die Annahme, dass diese als Surrogatmarker für Komplikationen in der Frühschwangerschaft verwendet werden können. Es sind weitere Studien in größerem Umfang notwendig, um die Auswirkung der microRNA-Expression/ Serumlevel auf die Implantation im Detail zu ergründen.

7. Literaturverzeichnis

- Akgör, U., Ayaz, L., & Çayan, F. (2021). Expression levels of maternal plasma microRNAs in preeclamptic pregnancies. *Journal of obstetrics and gynaecology: the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*, 41(6), 910–914. <https://doi.org/10.1080/01443615.2020.1820465>
- Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., Mitchell, P. S., Bennett, C. F., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Stirewalt, D. L., Tait, J. F., & Tewari, M. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12), 5003–5008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019055108>
- Azziz, R., Carmina, E., Chen, Z., Dunaif, A., Laven, J. S., Legro, R. S., Lizneva, D., Natterson-Horowitz, B., Teede, H. J., & Yildiz, B. O. (2016). Polycystic ovary syndrome. *Nature reviews. Disease primers*, 2, 16057. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.57>
- Balusu, S., van Wonterghem, E., de Rycke, R., Raemdonck, K., Stremersch, S., Gevaert, K., Brkic, M., Demeestere, D., Vanhooren, V., Hendrix, A., Libert, C., & Vandembroucke, R. E. (2016). Identification of a novel mechanism of blood–brain communication during peripheral inflammation via choroid plexus-derived extracellular vesicles. *EMBO Molecular Medicine*, 8(10), 1162–1183. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606271>
- Barad, O., Meiri, E., Avniel, A., Aharonov, R., Barzilai, A., Bentwich, I., Einav, U., Gilad, S., Hurban, P., Karov, Y., Lobenhofer, E. K., Sharon, E., Shibolet, Y. M., Shtutman, M., Bentwich, Z., & Einat, P. (2004). MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome research*, 14(12), 2486–2494. <https://doi.org/10.1101/gr.2845604>
- Bashiri, A., Halper, K. I., & Orvieto, R. (2018). Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 16(1), 121. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0414-2>
- Bednarska, S. & Siejka, A. (2017). The pathogenesis and treatment of polycystic ovary syndrome: What's new? *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 26(2), 359–367. <https://doi.org/10.17219/acem/59380>
- Benito-Vicente, A., Uribe, K. B., Rotllan, N., Ramírez, C. M., Jebari-Benslaiman, S., Goedeke, L., Canfrán-Duque, A., Galicia-García, U., Saenz De Urturi, D., Aspichueta, P., Suárez, Y., Fernández-Hernando, C., & Martín, C. (2020). miR-27b Modulates Insulin Signaling in Hepatocytes by Regulating Insulin Receptor Expression. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8675. <https://doi.org/10.3390/ijms21228675>
- Bernstein, E., Kim, S. Y., Carmell, M. A., Murchison, E. P., Alcorn, H., Li, M. Z., Mills, A. A., Elledge, S. J., Anderson, K. V. & Hannon, G. J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nature Genetics*, 35(3), 215–217. <https://doi.org/10.1038/ng1253>
- BiB – Fakten – Durchschnittliches Alter der Mütter bei Geburt des 1. Kindes in der bestehenden Ehe in Deutschland, West- und Ostdeutschland (1960–2019). (o. D.). Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung. Abgerufen am 7. Oktober 2021, von <https://www.bib.bund.de/DE/Fakten/Fakt/F20-Alter-Muetter-bei-Erstgeburt-Deutschland-West-Ost-ab-1960.html>
- Blumenauer, V., Czeromin, U., Fehr, D., Fiedler, K., Gnoth, C., Krüssel, J.S., Kupka, M.S., Ott, A., Tandler-Schneider, A. (2020) D.I.R.-Annual 2020 – German IVF Registry. *J. Reproduktionsmed. Endokrinology* 17. 199-239.
- Briceag, I., Costache, A., Purcarea, V. L., Cergan, R., Dumitru, M., Briceag, I., Sajin, M., & Ispas, A. T. (2015). Fallopian tubes--literature review of anatomy and etiology in female infertility. *Journal of medicine and life*, 8(2), 129–131.

- Buder, S., Schöfer, H., Meyer, T., Bremer, V., Kohl, P. K., Skaletz-Rorowski, A., & Brockmeyer, N. (2019). Bacterial sexually transmitted infections. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*, 17(3), 287–315. <https://doi.org/10.1111/ddg.13804>
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., & Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15524–15529. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>
- Cha, J., Sun, X., & Dey, S. K. (2012). Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nature medicine*, 18(12), 1754–1767. <https://doi.org/10.1038/nm.3012>
- Chakrabarty, A., Tranguch, S., Daikoku, T., Jensen, K., Furneaux, H. & Dey, S. K. (2007). MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(38), 15144–15149. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705917104>
- Chang, E. M., Han, J. E., Seok, H. H., Lee, D. R., Yoon, T. K., & Lee, W. S. (2013). Insulin resistance does not affect early embryo development but lowers implantation rate in in vitro maturation-in vitro fertilization-embryo transfer cycle. *Clinical endocrinology*, 79(1), 93–99. <https://doi.org/10.1111/cen.12099>
- Chao, W., & D'Amore, P. A. (2008). IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease. *Cytokine & growth factor reviews*, 19(2), 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2008.01.005>
- Chapron, C., Marcellin, L., Borghese, B., & Santulli, P. (2019). Rethinking mechanisms, diagnosis and management of endometriosis. *Nature reviews. Endocrinology*, 15(11), 666–682. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0245-z>
- Chen, B., Xu, P., Wang, J., & Zhang, C. (2019). The role of MiRNA in polycystic ovary syndrome (PCOS). *Gene*, 706, 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.04.082>
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., Zhang, J., ... Zhang, C. Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell research*, 18(10), 997–1006. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.282>
- Cheong, A. W. Y., Pang, R. T. K., Liu, W. M., Kottawatta, K. S. A., Lee, K. F. & Yeung, W. S. B. (2014). MicroRNA Let-7a and dicer are important in the activation and implantation of delayed implanting mouse embryos. *Human Reproduction*, 29(4), 750–762. <https://doi.org/10.1093/hum-rep/det462>
- Chim, S. S. C., Shing, T. K. F., Hung, E. C. W., Leung, T. Y., Lau, T. K., Chiu, R. W. K. & Dennis Lo, Y. M. (2008). Detection and Characterization of Placental MicroRNAs in Maternal Plasma. *Clinical Chemistry*, 54(3), 482–490. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.097972>
- Chong, M. M. W., Zhang, G., Cheloufi, S., Neubert, T. A., Hannon, G. J. & Littman, D. R. (2010). Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery. *Genes & Development*, 24(17), 1951–1960. <https://doi.org/10.1101/gad.1953310>
- Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D. W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S., Ma, E., Mane, S., Hannon, G. J., Lawson, N. D., Wolfe, S. A., & Giraldez, A. J. (2010). A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5986), 1694–1698. <https://doi.org/10.1126/science.1190809>
- Cook, J., Bennett, P. R., Kim, S. H., Teoh, T. G., Sykes, L., Kindinger, L. M., Garrett, A., Binkhamis, R., MacIntyre, D. A., & Terzidou, V. (2019). First Trimester Circulating MicroRNA

- Biomarkers Predictive of Subsequent Preterm Delivery and Cervical Shortening. *Scientific reports*, 9(1), 5861. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42166-1>
- Corsten, M. F., Dennert, R., Jochems, S., Kuznetsova, T., Devaux, Y., Hofstra, L., Wagner, D. R., Staessen, J. A., Heymans, S. & Schroen, B. (2010). Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 Reflect Myocardial Damage in Cardiovascular Disease. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 3(6), 499–506. <https://doi.org/10.1161/circgenetics.110.957415>
- Dang, S. Y., Leng, Y., Wang, Z. X., Xiao, X., Zhang, X., Wen, T., Gong, H. Z., Hong, A., & Ma, Y. (2019). Exosomal transfer of obesity adipose tissue for decreased miR-141-3p mediate insulin resistance of hepatocytes. *International journal of biological sciences*, 15(2), 351–368. <https://doi.org/10.7150/ijbs.28522>
- Denley, A., Cosgrove, L. J., Booker, G. W., Wallace, J. C., & Forbes, B. E. (2005). Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine & growth factor reviews*, 16(4-5), 421–439. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.04.004>
- Denley, A., Wang, C. C., McNeil, K. A., Walenkamp, M. J., van Duyvenvoorde, H., Wit, J. M., Wallace, J. C., Norton, R. S., Karperien, M., & Forbes, B. E. (2005). Structural and functional characteristics of the Val44Met insulin-like growth factor I missense mutation: correlation with effects on growth and development. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 19(3), 711–721. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0409>
- DeUgarte, C. M., Bartolucci, A. A., & Azziz, R. (2005). Prevalence of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment. *Fertility and sterility*, 83(5), 1454–1460. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.11.070>
- Dong, X., Zhao, J., Han, J., Han, X. J., Zhao, C. M., Zou, A. X., & Qi, H. G. (2020). MiR-222-5p promotes the growth and migration of trophoblasts by targeting AHNAK. *European review for medical and pharmacological sciences*, 24(21), 10954–10959. https://doi.org/10.26355/eurev_202011_23578
- Escobar-Morreale, H. F. (2018). Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment. *Nature reviews. Endocrinology*, 14(5), 270–284. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2018.24>
- Estella, C., Herrer, I., Moreno-Moya, J. M., Quiñonero, A., Martínez, S., Pellicer, A. & Simón, C. (2012). miRNA Signature and Dicer Requirement during Human Endometrial Stromal Decidualization In Vitro. *PLoS ONE*, 7(7), e41080. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041080>
- Evidence-based Methodology Workshop on Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). (2012, 3. Dezember). Office of Disease Prevention. Abgerufen am 2. Oktober 2021, von <https://prevention.nih.gov/research-priorities/research-needs-and-gaps/pathways-prevention/evidence-based-methodology-workshop-polycystic-ovary-syndrome-pcos>
- Fabian, M. R., & Sonenberg, N. (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nature structural & molecular biology*, 19(6), 586–593. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2296>
- Farquhar, C. M., Bhattacharya, S., Repping, S., Mastenbroek, S., Kamath, M. S., Marjoribanks, J., & Boivin, J. (2019). Female subfertility. *Nature reviews. Disease primers*, 5(1), 7. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0058-8>
- Ferreira, S. R., & Motta, A. B. (2018). Uterine Function: From Normal to Polycystic Ovarian Syndrome Alterations. *Current medicinal chemistry*, 25(15), 1792–1804. <https://doi.org/10.2174/0929867325666171205144119>

- Filardi, T., Catanzaro, G., Mardente, S., Zicari, A., Santangelo, C., Lenzi, A., Morano, S., & Ferretti, E. (2020). Non-Coding RNA: Role in Gestational Diabetes Pathophysiology and Complications. *International journal of molecular sciences*, 21(11), 4020. <https://doi.org/10.3390/ijms21114020>
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., & Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. *Nature reviews. Genetics*, 9(2), 102–114. <https://doi.org/10.1038/nrg2290>
- Freis, A., Keller, A., Ludwig, N., Meese, E., Jauckus, J., Rehnitz, J., Capp, E., Strowitzki, T. & Germeyer, A. (2017). Altered miRNA-profile dependent on ART outcome in early pregnancy targets Wnt-pathway. *Reproduction*, 154(6), 799–805. <https://doi.org/10.1530/rep-17-0396>
- Fukami, K., Nakao, K., Inoue, T., Kataoka, Y., Kurokawa, M., Fissore, R. A., Nakamura, K., Katsuki, M., Mikoshiba, K., Yoshida, N. & Takenawa, T. (2001). Requirement of Phospholipase C δ for the Zona Pellucida-Induced Acrosome Reaction. *Science*, 292(5518), 920–923. <https://doi.org/10.1126/science.1059042>
- Gao, X., Xie, Z., Wang, Z., Cheng, K., Liang, K., & Song, Z. (2017). Overexpression of miR-191 Predicts Poor Prognosis and Promotes Proliferation and Invasion in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Yonsei medical journal*, 58(6), 1101–1110. <https://doi.org/10.3349/ymj.2017.58.6.1101>
- Gao, Y., Luo, T., Ouyang, X., Zhu, C., Zhu, J., & Qin, X. (2020). IGF2BP3 and miR191-5p synergistically increase HCC cell invasiveness by altering ZO-1 expression. *Oncology letters*, 20(2), 1423–1431. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11693>
- Garzon, R., Volinia, S., Liu, C. G., Fernandez-Cymering, C., Palumbo, T., Pichiorri, F., Fabbri, M., Coombes, K., Alder, H., Nakamura, T., Flomenberg, N., Marcucci, G., Calin, G. A., Kornblau, S. M., Kantarjian, H., Bloomfield, C. D., Andreeff, M., & Croce, C. M. (2008). MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*, 111(6), 3183–3189. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-098749>
- Gdańska, P., Drozdowicz-Jastrzębska, E., Grzechocińska, B., Radziwon-Zaleska, M., Węgrzyn, P., & Wielgoś, M. (2017). Anxiety and depression in women undergoing infertility treatment. *Ginekologia polska*, 88(2), 109–112. <https://doi.org/10.5603/GP.a2017.0019>
- Geng, Y., He, J., Ding, Y., Chen, X., Zhou, Y., Liu, S., Liu, X. & Wang, Y. (2014). The Differential Expression of MicroRNAs Between Implantation Sites and Interimplantation Sites in Early Pregnancy in Mice and Their Potential Functions. *Reproductive Sciences*, 21(10), 1296–1306. <https://doi.org/10.1177/1933719114525273>
- Georgadaki, K., Khoury, N., Spandidos, D. A., & Zoumpourlis, V. (2016). The molecular basis of fertilization (Review). *International journal of molecular medicine*, 38(4), 979–986. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2723>
- Gnoth, C., Godehardt, E., Frank-Herrmann, P., Friol, K., Tigges, J., & Freundl, G. (2005). Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Human reproduction (Oxford, England)*, 20(5), 1144–1147. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh870>
- Guo, B., Tian, X. C., Li, D. D., Yang, Z. Q., Cao, H., Zhang, Q. L., Liu, J. X. & Yue, Z. P. (2014). Expression, regulation and function of Egr1 during implantation and decidualization in mice. *Cell Cycle*, 13(16), 2626–2640. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.943581>
- Guo, D., Jiang, H., Chen, Y., Yang, J., Fu, Z., Li, J., Han, X., Wu, X., Xia, Y., Wang, X., Chen, L., Tang, Q., & Wu, W. (2018). Elevated microRNA-141-3p in placenta of non-diabetic macrosomia regulate trophoblast proliferation. *EBioMedicine*, 38, 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.11.002>

- Guo, H., Li, T., & Sun, X. (2021). LncRNA HOTAIRM1, miR-433-5p and PIK3CD function as a ceRNA network to exacerbate the development of PCOS. *Journal of ovarian research*, 14(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s13048-020-00742-4>
- Hanson, B., Johnstone, E., Dorais, J., Silver, B., Peterson, C. M., & Hotaling, J. (2017). Female infertility, infertility-associated diagnoses, and comorbidities: a review. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 34(2), 167–177. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0836-8>
- He, T., Liu, Y., Jia, Y., Wang, H., Yang, X., Lu, G., Liu, H., & Shi, Y. (2018). MicroRNA-141 and MicroRNA-200c Are Overexpressed in Granulosa Cells of Polycystic Ovary Syndrome Patients. *Frontiers in medicine*, 5, 299. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00299>
- Herrera-Van Oostdam, A. S., Toro-Ortíz, J. C., López, J. A., Noyola, D. E., García-López, D. A., Durán-Figueroa, N. V., Martínez-Martínez, E., Portales-Pérez, D. P., Salgado-Bustamante, M., & López-Hernández, Y. (2020). Placental exosomes isolated from urine of patients with gestational diabetes exhibit a differential profile expression of microRNAs across gestation. *International journal of molecular medicine*, 46(2), 546–560. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4626>
- Hill, C. J., Fakhreldin, M., Maclean, A., Dobson, L., Nancarrow, L., Bradfield, A., Choi, F., Daley, D., Tempest, N., & Hapangama, D. K. (2020). Endometriosis and the Fallopian Tubes: Theories of Origin and Clinical Implications. *Journal of clinical medicine*, 9(6), 1905. <https://doi.org/10.3390/jcm9061905>
- Hu, S. J., Ren, G., Liu, J. L., Zhao, Z. A., Yu, Y. S., Su, R. W., Ma, X. H., Ni, H., Lei, W. & Yang, Z. M. (2008). MicroRNA Expression and Regulation in Mouse Uterus during Embryo Implantation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(34), 23473–23484. <https://doi.org/10.1074/jbc.m800406200>
- Huang, X., She, L., Luo, X., Huang, S., & Wu, J. (2019). MiR-222 promotes the progression of polycystic ovary syndrome by targeting p27 Kip1. *Pathology, research and practice*, 215(5), 918–923. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.01.038>
- Hunter, M. P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B. D., Lee, E. J., Yu, L., Xiao, T., Schafer, J., Lee, M. L. T., Schmittgen, T. D., Nana-Sinkam, S. P., Jarjoura, D. & Marsh, C. B. (2008). Detection of microRNA Expression in Human Peripheral Blood Microvesicles. *PLoS ONE*, 3(11), e3694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003694>
- Inhorn, M. C., & Patrizio, P. (2015). Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human reproduction update*, 21(4), 411–426. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv016>
- Iorio, M. V., & Croce, C. M. (2012). MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO molecular medicine*, 4(3), 143–159. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100209>
- Jiang, Y. H., Man, Y. Y., Liu, Y., Yin, C. J., Li, J. L., Shi, H. C., Zhao, H., & Zhao, S. G. (2021). Loss of miR-23b/27b/24-1 Cluster Impairs Glucose Tolerance via Glycolysis Pathway in Mice. *International journal of molecular sciences*, 22(2), 550. <https://doi.org/10.3390/ijms22020550>
- Kahsar-Miller, M. & Azziz, R. (1998). The Development of the Polycystic Ovary Syndrome: Family History as a Risk Factor. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 9(2), 55–58. [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(98\)00021-6](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(98)00021-6)
- Kent, L. N., Ohboshi, S., & Soares, M. J. (2012). Akt1 and insulin-like growth factor 2 (Igf2) regulate placentation and fetal/postnatal development. *The International journal of developmental biology*, 56(4), 255–261. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113407lk>
- Kjerulff, L. E., Sanchez-Ramos, L., & Duffy, D. (2011). Pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome: a metaanalysis. *American journal of obstetrics and gynecology*, 204(6), 558.e1–558.e5586. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2011.03.021>

- Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S. (2010). miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 39(Database), D152–D157. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1027>
- Kresowik, J. D., Devor, E. J., van Voorhis, B. J. & Leslie, K. K. (2014). MicroRNA-31 is Significantly Elevated in Both Human Endometrium and Serum During the Window of Implantation: A Potential Biomarker for Optimum Receptivity¹. *Biology of Reproduction*, 91(1). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.116590>
- Kuokkanen, S., Chen, B., Ojalvo, L., Benard, L., Santoro, N. & Pollard, J. W. (2010). Genomic Profiling of MicroRNAs and Messenger RNAs Reveals Hormonal Regulation in MicroRNA Expression in Human Endometrium¹. *Biology of Reproduction*, 82(4), 791–801. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.081059>
- Lash, G. E., Otun, H. A., Innes, B. A., Bulmer, J. N., Searle, R. F., & Robson, S. C. (2005). Inhibition of trophoblast cell invasion by TGF β 1, 2, and 3 is associated with a decrease in active proteases. *Biology of reproduction*, 73(2), 374–381. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.040337>
- Laterza, O. F., Lim, L., Garrett-Engele, P. W., Vlasakova, K., Muniappa, N., Tanaka, W. K., Johnson, J. M., Sina, J. F., Fare, T. L., Sistare, F. D. & Glaab, W. E. (2009). Plasma MicroRNAs as Sensitive and Specific Biomarkers of Tissue Injury. *Clinical Chemistry*, 55(11), 1977–1983. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.131797>
- Lawrie, C. H., Gal, S., Dunlop, H. M., Pushkaran, B., Liggins, A. P., Pulford, K., Banham, A. H., Pezzella, F., Boulwood, J., Wainscoat, J. S., Hatton, C. S., & Harris, A. L. (2008). Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British journal of haematology*, 141(5), 672–675. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07077.x>
- Lee, D., Kim, S. K., Lee, J. R., & Jee, B. C. (2020). Management of endometriosis-related infertility: Considerations and treatment options. *Clinical and experimental reproductive medicine*, 47(1), 1–11. <https://doi.org/10.5653/cerm.2019.02971>
- Lee, D., Park, D., Park, J. H., Kim, J. H., & Shin, C. (2019). Poly(A)-specific ribonuclease sculpts the 3' ends of microRNAs. *RNA (New York, N.Y.)*, 25(3), 388–405. <https://doi.org/10.1261/rna.069633.118>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y)
- Lerchbaum, E., Schwetz, V., Giuliani, A. & Obermayer-Pietsch, B. (2014). Influence of a positive family history of both type 2 diabetes and PCOS on metabolic and endocrine parameters in a large cohort of PCOS women. *European Journal of Endocrinology*, 170(5), 727–739. <https://doi.org/10.1530/eje-13-1035>
- Li, Y., & Liu, J. (2020). MicroRNA-206 predicts raised fetal growth retardation risk through the interaction with vascular endothelial growth factor in pregnancies. *Medicine*, 99(7), e18897. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000018897>
- Liang, H., Gong, F., Zhang, S., Zhang, C. Y., Zen, K. & Chen, X. (2013). The origin, function, and diagnostic potential of extracellular microRNAs in human body fluids. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 5(2), 285–300. <https://doi.org/10.1002/wrna.1208>
- Liu, J. B., Yan, Y. J., Shi, J., Wu, Y. B., Li, Y. F., Dai, L. F., & Ma, X. T. (2019). Upregulation of microRNA-191 can serve as an independent prognostic marker for poor survival in prostate cancer. *Medicine*, 98(29), e16193. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000016193>

- Liu, R., Kong, W., Zheng, S., Yu, C., Yu, Y., Xu, Y., Ye, L., & Shao, Y. (2021). Prognostic significance of microRNA miR-24 in cancers: a meta-analysis. *Bioengineered*, 12(1), 450–460. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1875662>
- Liu, X., Gao, R., Chen, X., Zhang, H., Zheng, A., Yang, D., Ding, Y., Wang, Y. & He, J. (2013). Possible Roles of mmu-miR-141 in the Endometrium of Mice in Early Pregnancy Following Embryo Implantation. *PLoS ONE*, 8(6), e67382. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067382>
- Long, W., Zhao, C., Ji, C., Ding, H., Cui, Y., Guo, X., Shen, R. & Liu, J. (2014). Characterization of Serum MicroRNAs Profile of PCOS and Identification of Novel Non-Invasive Biomarkers. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 33(5), 1304–1315. <https://doi.org/10.1159/000358698>
- Ludwig, N., Leidinger, P., Becker, K., Backes, C., Fehlmann, T., Pallasch, C., Rheinheimer, S., Meder, B., Stähler, C., Meese, E., & Keller, A. (2016). Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic acids research*, 44(8), 3865–3877. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw116>
- Luo, S. S., Ishibashi, O., Ishikawa, G., Ishikawa, T., Katayama, A., Mishima, T., Takizawa, T., Shigihara, T., Goto, T., Izumi, A., Ohkuchi, A., Matsubara, S., Takeshita, T., & Takizawa, T. (2009). Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes. *Biology of reproduction*, 81(4), 717–729. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075481>
- Lv, Y., Lu, C., Ji, X., Miao, Z., Long, W., Ding, H., & Lv, M. (2019). Roles of microRNAs in preeclampsia. *Journal of cellular physiology*, 234(2), 1052–1061. <https://doi.org/10.1002/jcp.27291>
- Miura, K., Miura, S., Yamasaki, K., Higashijima, A., Kinoshita, A., Yoshiura, K., & Masuzaki, H. (2010). Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma. *Clinical chemistry*, 56(11), 1767–1771. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147660>
- Morales-Prieto, D. M., Favaro, R. R., & Markert, U. R. (2020). Placental miRNAs in feto-maternal communication mediated by extracellular vesicles. *Placenta*, 102, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2020.07.001>
- Morales-Prieto, D. M., Ospina-Prieto, S., Chaiwangyen, W., Schoenleben, M., & Markert, U. R. (2013). Pregnancy-associated miRNA-clusters. *Journal of reproductive immunology*, 97(1), 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.11.001>
- Morales-Prieto, D. M., Schleussner, E., & Markert, U. R. (2011). Reduction in miR-141 is induced by leukemia inhibitory factor and inhibits proliferation in choriocarcinoma cell line JEG-3. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 66 Suppl 1, 57–62. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01037.x>
- Morales-Prieto, D., Chaiwangyen, W., Ospina-Prieto, S., Schneider, U., Herrmann, J., Gruhn, B. & Markert, U. (2012). MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells. *Placenta*, 33(9), 725–734. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.05.009>
- Mori, M. A., Ludwig, R. G., Garcia-Martin, R., Brandão, B. B., & Kahn, C. R. (2019). Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. *Cell metabolism*, 30(4), 656–673. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.07.011>
- Moustafa, S. & Young, S. (2020). Diagnostic and therapeutic options in recurrent implantation failure. *F1000Research*, 9, 208. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22403.1>
- Murri, M., Insenser, M., Fernández-Durán, E., San-Millán, J. L. & Escobar-Morreale, H. F. (2013). Effects of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), Sex Hormones, and Obesity on Circulating miRNA-21, miRNA-27b, miRNA-103, and miRNA-155 Expression. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(11), E1835–E1844. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2218>

- Nakamura, Y., & Fukami, K. (2017). Regulation and physiological functions of mammalian phospholipase C. *Journal of biochemistry*, 161(4), 315–321. <https://doi.org/10.1093/jb/mvw094>
- Nakamura, Y., Hamada, Y., Fujiwara, T., Enomoto, H., Hiroe, T., Tanaka, S., Nose, M., Nakahara, M., Yoshida, N., Takenawa, T. & Fukami, K. (2005). Phospholipase C- δ 1 and - δ 3 Are Essential in the Trophoblast for Placental Development. *Molecular and Cellular Biology*, 25(24), 10979–10988. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.24.10979-10988.2005>
- Nieschlag, E., Behre, H. M. & Nieschlag, S. (2009). *Andrologie: Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes* (3. Aufl. 2009 Aufl.). Springer.
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in endocrinology*, 9, 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
- Ortiz-Dosal, A., Arellanes-Licea, E., Rodil-García, P., & Salazar-Olivo, L. A. (2020). Circulating microRNAs overexpressed in macrosomia: an experimental and bioinformatic approach. *Journal of developmental origins of health and disease*, 11(5), 464–472. <https://doi.org/10.1017/S2040174420000422>
- Ospina-Prieto, S., Chaiwangyen, W., Herrmann, J., Groten, T., Schleussner, E., Markert, U. R. & Morales-Prieto, D. M. (2016). MicroRNA-141 is upregulated in preeclamptic placentae and regulates trophoblast invasion and intercellular communication. *Translational Research*, 172, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.02.012>
- Palomba, S., Falbo, A., Russo, T., Tolino, A., Orio, F., & Zullo, F. (2010). Pregnancy in women with polycystic ovary syndrome: the effect of different phenotypes and features on obstetric and neonatal outcomes. *Fertility and sterility*, 94(5), 1805–1811. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.10.043>
- Palomba, S., Piltonen, T. T., & Giudice, L. C. (2021). Endometrial function in women with polycystic ovary syndrome: a comprehensive review. *Human reproduction update*, 27(3), 584–618. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa051>
- Park, M., Kim, H. R., Kim, Y. S., Yang, S. C., Yoon, J. A., Lyu, S. W., Lim, H. J., Hong, S. H., & Song, H. (2018). Estrogen-induced transcription factor EGR1 regulates c-Kit transcription in the mouse uterus to maintain uterine receptivity for embryo implantation. *Molecular and cellular endocrinology*, 470, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.09.033>
- Pendzialek, S. M., Knelangen, J. M., Schindler, M., Gürke, J., Grybel, K. J., Gocza, E., Fischer, B., & Navarrete Santos, A. (2019). Trophoblastic microRNAs are downregulated in a diabetic pregnancy through an inhibition of Drosha. *Molecular and cellular endocrinology*, 480, 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.11.002>
- Peng, T., Zhang, S., Li, W., Fu, S., Luan, Y., & Zuo, L. (2016). MicroRNA-141 inhibits glioma cells growth and metastasis by targeting TGF- β 2. *American journal of translational research*, 8(8), 3513–3521.
- RKI. (2010, 21. Dezember). RKI - RKI-Ratgeber - Chlamydiosen (Teil 1): Erkrankungen durch Chlamydia trachomatis. Robert-Koch-Institut. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Epi-dBull/Merkblaetter/Ratgeber_Chlamydiosen_Teil1.html;jsessionid=1B205A8E105E5DE26615BEFE6BCBC480.internet082
- Rosenbluth, E. M., Shelton, D. N., Sparks, A. E., Devor, E., Christenson, L., & Van Voorhis, B. J. (2013). MicroRNA expression in the human blastocyst. *Fertility and sterility*, 99(3), 855–861.e3. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.001>
- Rosenbluth, E. M., Shelton, D. N., Wells, L. M., Sparks, A. E., & Van Voorhis, B. J. (2014). Human embryos secrete microRNAs into culture media—a potential biomarker for implantation. *Fertility and sterility*, 101(5), 1493–1500. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.01.058>

- Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group (2004). Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Human reproduction* (Oxford, England), 19(1), 41–47. <https://doi.org/10.1093/hum-rep/deh098>
- Sanford, L. P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A. C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G. P., Cardell, E. L., & Doetschman, T. (1997). TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* (Cambridge, England), 124(13), 2659–2670.
- Schneider, H., Husslein, P. & Schneider, K. M. (2016). *Die Geburtshilfe* (Springer Reference Medizin) (5. Aufl. 2016 Aufl.) [E-Book]. Springer.
- Sørensen, A. E., Wissing, M. L., Salö, S., Englund, A. L., & Dalgaard, L. T. (2014). MicroRNAs Related to Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Genes*, 5(3), 684–708. <https://doi.org/10.3390/genes5030684>
- Statistisches Bundesamt (2021, 1. Juli): Veränderung der Zahl der Lebendgeborenen zum jeweiligen Vorjahr - statistisches Bundesamt. URL: www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Bevoelkerung/Geburten/Tabellen/lebendgeborene-differenz.html [18.08.2021]
- Tang, Q., Wu, W., Xu, X., Huang, L., Gao, Q., Chen, H., Sun, H., Xia, Y., Sha, J., Wang, X., Chen, D. & Xu, Q. (2013). miR-141 Contributes to Fetal Growth Restriction by Regulating PLAG1 Expression. *PLoS ONE*, 8(3), e58737. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058737>
- Thomson, R. L., Buckley, J. D., Lim, S. S., Noakes, M., Clifton, P. M., Norman, R. J. & Brinkworth, G. D. (2010). Lifestyle management improves quality of life and depression in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 94(5), 1812–1816. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.11.001>
- Tochigi, H., Kajihara, T., Mizuno, Y., Mizuno, Y., Tamaru, S., Kamei, Y., Okazaki, Y., Brosens, J. J. & Ishihara, O. (2017). Loss of miR-542-3p enhances IGFBP-1 expression in decidualizing human endometrial stromal cells. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/srep40001>
- Treiber, T., Treiber, N., & Meister, G. (2019). Regulation of microRNA biogenesis and its cross-talk with other cellular pathways. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(1), 5–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0059-1>
- Tsai, K. W., Kao, H. W., Chen, H. C., Chen, S. J., & Lin, W. C. (2009). Epigenetic control of the expression of a primate-specific microRNA cluster in human cancer cells. *Epigenetics*, 4(8), 587–592. <https://doi.org/10.4161/epi.4.8.10230>
- Tüfekci, K. U., Öner, M. G., Meuwissen, R. L. J. & Genç, E. (2013). The Role of MicroRNAs in Human Diseases. *miRNomics: MicroRNA Biology and Computational Analysis*, 33–50. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-748-8_3
- Turchinovich, A., Weiz, L. & Burwinkel, B. (2012). Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(11), 460–465. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.08.003>
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinze, A. & Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Research*, 39(16), 7223–7233. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr254>
- Ulfig, N. & Brand-Saberi, B. (2017). *Kurzlehrbuch Embryologie* (3. aktualisierte Aufl.) [E-Book]. Thieme.
- Urbich, C., Kuehbacher, A., & Dimmeler, S. (2008). Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovascular research*, 79(4), 581–588. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn156>

- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötval, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, 9(6), 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- Vander Borcht, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical biochemistry*, 62, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>
- Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D., & Remaley, A. T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology*, 13(4), 423–433. <https://doi.org/10.1038/ncb2210>
- Vickers, K. C., Shoucri, B. M., Levin, M. G., Wu, H., Pearson, D. S., Osei-Hwedieh, D., Collins, F. S., Remaley, A. T., & Sethupathy, P. (2013). MicroRNA-27b is a regulatory hub in lipid metabolism and is altered in dyslipidemia. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 57(2), 533–542. <https://doi.org/10.1002/hep.25846>
- Wagner, J., Riwanto, M., Besler, C., Knau, A., Fichtlscherer, S., Röxe, T., Zeiher, A. M., Landmesser, U., & Dimmeler, S. (2013). Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 33(6), 1392–1400. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300741>
- Wang, J., Sun, X., Zhao, J., Yang, Y., Cai, X., Xu, J. & Cao, P. (2017). Exosomes: A Novel Strategy for Treatment and Prevention of Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00300>
- Wang, Y., Lv, Y., Gao, S., Zhang, Y., Sun, J., Gong, C., Chen, X., & Li, G. (2016). MicroRNA Profiles in Spontaneous Decidualized Menstrual Endometrium and Early Pregnancy Decidua with Successfully Implanted Embryos. *PloS one*, 11(1), e0143116. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143116>
- Welt, C. K. & Carmina, E. (2013). Lifecycle of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): From in utero to Menopause. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(12), 4629–4638. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2375>
- Wen, J., Ladewig, E., Shenker, S., Mohammed, J., & Lai, E. C. (2015). Analysis of Nearly One Thousand Mammalian Mirtrons Reveals Novel Features of Dicer Substrates. *PLoS computational biology*, 11(9), e1004441. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004441>
- Wessels, J. M., Edwards, A. K., Khalaj, K., Kridli, R. T., Bidarimath, M., & Tayade, C. (2013). The microRNAome of pregnancy: deciphering miRNA networks at the maternal-fetal interface. *PloS one*, 8(11), e72264. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072264>
- Weyerstahl, T. & Stauber, M. (2013). *Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe (4. Aufl.)* [E-Book]. Thieme. <https://doi.org/10.1055/b-002-94109>
- Wippermann, Carsten (2021): *Ungewollte Kinderlosigkeit. Leiden-Hemmungen-Lösungen*. Broschüre des Bundesministeriums für Familie, Senioren, Frauen und Jugend, Berlin
- World Health Organization (WHO). *International Classification of Diseases, 11th Revision (ICD-11)* Geneva: WHO 2018
- Xue, Y., Lv, J., Xu, P., Gu, L., Cao, J., Xu, L., Xue, K., & Li, Q. (2018). Identification of microRNAs and genes associated with hyperandrogenism in the follicular fluid of women with polycystic ovary syndrome. *Journal of cellular biochemistry*, 119(5), 3913–3921. <https://doi.org/10.1002/jcb.26531>
- Yang, W., Lu, Z., Zhi, Z., Liu, L., Deng, L., Jiang, X. & Pang, L. (2019). High-throughput transcriptome-Seq and small RNA-Seq reveal novel functional genes and microRNAs for early embryonic arrest in humans. *Gene*, 697, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.12.084>

Zhang, S., Lin, H., Kong, S., Wang, S., Wang, H., Wang, H., & Armant, D. R. (2013). Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Molecular aspects of medicine*, 34(5), 939–980. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.12.011>

Zhang, Y., Liu, D., Chen, X., Li, J., Li, L., Bian, Z., Sun, F., Lu, J., Yin, Y., Cai, X., Sun, Q., Wang, K., Ba, Y., Wang, Q., Wang, D., Yang, J., Liu, P., Xu, T., Yan, Q., . . . Zhang, C. Y. (2010). Secreted Monocytic miR-150 Enhances Targeted Endothelial Cell Migration. *Molecular Cell*, 39(1), 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.010>

Zhu, Y., Tian, F., Li, H., Zhou, Y., Lu, J., & Ge, Q. (2015). Profiling maternal plasma microRNA expression in early pregnancy to predict gestational diabetes mellitus. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 130(1), 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2015.01.010>

8. Thesen

- 1) Ziel dieser Arbeit war es das diagnostische und prognostische Potential von miR-27b, miR-141, miR-191, miR-222 und miR-433 im Rahmen einer Kinderwunschbehandlung zu evaluieren.
- 2) Es konnte eine signifikante Assoziation zwischen dem Serumlevel von miR-141 und miR-191 und dem Etablieren einer Schwangerschaft festgestellt werden.
- 3) Die Vermessung der microRNA-Expressionen mittels quantitativer real-time-PCR ergab keine signifikante Expressionsänderung im Verlauf der Frühschwangerschaft.
- 4) Es konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Frauen mit PCOS und Frauen ohne PCOS festgestellt werden.
- 5) Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem gestörten Glukosestoffwechsel und den Serumleveln von miR-27b, miR-141 und miR-222 beobachtet werden.
- 6) Im Luciferase-Assay konnte belegt werden, dass miR-141 bzw. miR-191 die Expression der gewählten Zielgene TGF β 2, IGF2 sowie PLCD1 und EGR1 hemmen und damit einen Einfluss auf die Implantation und Plazentation ausüben könnten.
- 7) Weitere Studien sind notwendig, um die Rolle der microRNAs im mütterlichen Blut zu analysieren und das Potential als diagnostisches und prognostisches Mittel in der Infertilitätsdiagnostik zu eruieren.

Erklärung über frühere Promotionsversuche und Selbständigkeitserklärung

Erklärungen

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Sofiya Epstein, Leipzig, den 18.07.2022

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen meinen Dank aussprechen, die mich in dieser Zeit sowohl in fachlicher, als auch in persönlicher Hinsicht unterstützt haben und somit zur Verwirklichung dieses Projektes beigetragen haben.

An erster Stelle bedanke ich mich bei **Univ.-Prof. Dr. med. Hermann M. Behre** für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Zentrum anfertigen zu dürfen. Darüber hinaus möchte ich mich für die konstruktive Begleitung bis zur Fertigstellung der Arbeit bedanken.

Mein außerordentlicher Dank geht an **Dr. rer. nat. Thomas Greither** für die engagierte und geduldige Betreuung während der Erstellung der Dissertation. Insbesondere für die fachliche und persönliche Unterstützung in schwierigen Phasen.

Großer Dank geht auch an **Dr. rer. nat. Maria Giebler**, die mit ihrer stets freundlichen und kollegialen Art für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und eine absolut unvergessliche Zeit gesorgt hat.

Meinem Ehemann, **Florian Epstein**, gilt ein besonders herzlicher Dank für die außerordentliche emotionale Unterstützung. Er gab mir sehr großen Halt mit seinem festen Glauben an den Erfolg dieser Arbeit, seiner stetigen Motivation und Hilfe bei technischen Problemen bezüglich des Layouts.

Meinem besten Freund, **Christoph Angerhöfer**, danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit sowie das jahrelange Zuhören, Aufmuntern und die vielen aufbauenden Worte.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern, **Oksana und Oleksandr Epstein**, für die Unterstützung und Motivation während des gesamten Studiums sowie der Promotion bedanken.