

Aus dem Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann M. Behre**

**Untersuchungen zur Relevanz der Dipeptidyl-Peptidase 4 für die weibliche  
Reproduktionsendokrinologie bei Frauen mit Polyzystischem Ovar-Syndrom und unerfülltem  
Kinderwunsch**

**Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)  
für das Fachgebiet Medizinische Physiologie und Pathophysiologie  
vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dipl. Biochem. Sindy Blauschmidt

geboren am 13. September 1987 in Rochlitz

Gutachter:

1. Prof. Dr. Hermann M. Behre
2. Prof. Dr. Jürgen Dittmer
3. PD Dr. Wolfgang Schäfer, Freiburg

24.11.2015

02.09.2016

## **Für meine Familie**

*Fang beim Anfang an und ende nicht, bis du am Ziel bist.*

*(J.K. Lavater)*

## Referat und bibliographische Beschreibung

Die Mechanismen der Entstehung des Polyzystischen Ovarsyndroms (PCOS) sind bis heute unbekannt. In dieser Arbeit sollte deshalb die Relevanz des Enzyms Dipeptidylpeptidase 4 (DPP4), einem Zielgen bei der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2, bei Frauen mit PCOS und unerfülltem Kinderwunsch analysiert werden. PCOS ist eine der am häufigsten auftretenden endokrinopathischen Erkrankungen in Verbindung mit Infertilität und wird bei etwa 7 % aller Frauen im gebärfähigen Alter diagnostiziert. Die Diagnose erfolgt nach den drei Rotterdam-Kriterien: (1) ovulatorische und menstruelle Dysfunktion wie Oligo- bzw. Amenorrhö und/oder (2) polyzystische Ovarien und/oder (3) das Auftreten eines klinischen oder biochemischen Hyperandrogenismus. Die betroffenen Frauen zeigen häufige begleitende Erkrankungen wie Adipositas, Insulinresistenz oder Diabetes mellitus Typ 2. In dieser Arbeit sollte deshalb die DPP4-Konzentration und Aktivität im Serum von PCOS-Patientinnen (n=134) und Nicht-PCOS-Patientinnen (n=154) untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die DPP4-Konzentration und Aktivität im Serum von PCOS-Patientinnen signifikant erhöht war. Frauen mit Hyperandrogenismus und/oder polyzystische Ovarien und/oder Menstruationsstörungen weisen ebenfalls eine signifikant höhere DPP4-Serumkonzentration oder Aktivität auf, unabhängig der Diagnose PCOS. *In vitro* Untersuchungen in den Granulosakarzinomzellen KGN zeigten, dass in Anwesenheit von Testosteron und DHT die DPP4 mRNA-Expression verstärkt induziert wird. Insulin und Glukose zeigten *in vitro* keinen Einfluss auf die DPP4 mRNA-Expression. Jedoch konnte eine Erhöhung der löslichen DPP4-Menge im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der DPP4-Konzentration und Aktivität im Serum von PCOS-Patientinnen sowohl durch erhöhte Mengen männlicher Geschlechtshormone (Hyperandrogenismus) als auch durch erhöhte Mengen Insulin und Glukose (Insulinresistenz, Hyperglykämie) hervorgerufen werden könnten. Die Rolle von DPP4 als ein verbindendes Element zwischen Insulinresistenz, Hyperandrogenismus und PCOS ist weiter zu untersuchen.

Desweiteren wurde die DPP4-Expressionsregulation durch microRNAs untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Expressionsrate der zirkulierenden microRNA miR-22 im Serum mit der DPP4-Aktivität bzw. -Konzentration indirekt korreliert ist. *In vitro* konnte eine direkte microRNA-mRNA-Bindung der miR-22 im 3'UTR der DPP4-mRNA nachgewiesen werden. Mittels Mutagenesestudien konnte der Bereich der komplementären Basenpaarung identifiziert und bestätigt werden. *In vitro* Untersuchungen zeigten zudem, dass eine Überexpression der microRNA miR-22 die DPP4 mRNA-Expression in der Granulosakarzinomzelllinie COV 434 um 50 % reduziert. In dieser Arbeit konnte damit erstmals gezeigt werden, dass die Expression der DPP4 unter anderem durch die miR-22 reguliert werden kann.

---

Blauschmidt, Sindy: Untersuchungen zur Relevanz der Dipeptidyl-Peptidase 4 für die weibliche Reproduktionsendokrinologie bei Frauen mit Polyzystischem Ovar-Syndrom und unerfülltem Kinderwunsch. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 75 Seiten, 2015

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1	Weibliche Unfruchtbarkeit	9
1.2	Das Polyzystische Ovar-Syndrom	9
1.2.1	Diagnose des PCOS	10
1.2.2	Pathogenese des PCOS	11
1.2.3	Behandlung des PCOS	12
1.2.4	Zusammenhang des PCOS mit anderen metabolischen Erkrankungen	13
1.3	Dipeptidyl-Peptidase 4	14
1.3.1	Allgemeines	14
1.3.2	Nicht-enzymatische Funktionen der DPP4	15
1.3.3	Enzymatische Funktion der DPP4	16
1.3.4	Endokrine Effekte der DPP4	16
1.3.5	Effekte der DPP4-Inhibierung	16
1.3.6	Regulation der DPP4	17
<b>2</b>	<b>Zielstellung</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
3.1.	Material	19
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien	19
3.1.2	Laborgeräte	20
3.1.3	Verbrauchsmittel	20
3.1.4	Enzyme	21
3.1.5	Reaktionskits	21
3.1.6	Oligonukleotide	21
3.1.7	Vektoren	22
3.1.8	Antikörper	22
3.1.9	Zellen	23
3.1.10	Puffer und Lösungen	23
3.1.11	verwendete Software	23
3.2	Statistische Methoden	24
3.2.1	Anlegen einer Blutbank und Ermitteln diagnostischer Parameter	24
3.2.2	Ethikantrag	24
3.2.3	Statistische Methoden	24
3.3	Analytik im Patientenserum	25
3.3.1	DPP4-Aktivitäts-Bestimmung	25
3.3.2	DPP4-Konzentrations-Bestimmung	25
3.3.3	RNA-Isolation aus Serum mittels Trizol-Chloroform-Extraktion	26

3.3.4	RNA-Konzentrationsbestimmung	26
3.3.5	microRNA cDNA-Synthese	26
3.3.6	Quantitative Realtime PCR (TaqMan™)	27
3.3.7	Nachweis zirkulierender microRNAs im Serum mittels MicroRNA Array	27
3.4	Zellbiologische Methoden	28
3.4.1	Zellkultivierung	28
3.4.2	Einstreuen der Zellen in verschiedene Zellkulturgefäße	28
3.4.3	Behandlung der Zellen	29
3.4.4	Transfektion von Vektoren	29
3.4.5	Transfektion von microRNA	30
3.4.6	Zellviabilitätstest	30
3.4.7	Zellproliferationstest	31
3.4.8	Zelltod-Test	31
3.5	Molekularbiologische Methoden	31
3.5.1	Proteinnachweis im Zellkulturüberstand mittels Western Blot	32
3.5.2	mRNA-Nachweis	33
3.5.3	cDNA-Synthese	33
3.5.4	Quantitative Realtime PCR (SYBR® Green)	33
3.5.5	Reporterstudien	34
3.5.6	Amplifikation des gewünschten Inserts mittels PCR	34
3.5.7	Agarose-Gelelektrophorese	35
3.5.8	Aufreinigung der PCR-Produkte aus Agarose-Gel	35
3.5.9	Ligation in den pcR2.1-Vektor	35
3.5.10	Transformation in E.coli	35
3.5.11	Übernachtskultur	36
3.5.12	Plasmidisolierung	36
3.5.13	DNA-Konzentrationsbestimmung	36
3.5.14	Sequenzierung	37
3.5.15	Restriktionsverdau mit XhoI und NotI	37
3.5.16	Ligation in Luziferase-Vektoren	38
3.5.17	Mutagenese	39
3.5.18	Dualer Reporter-Gen-Assay	40
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
4.1	Zusammensetzung der Studienkohorte	41
4.1.1	PCOS-Patientinnen haben ein erhöhtes DPP4-Serumlevel	42
4.1.2	Zusammenhänge mit weiteren klinischen Parametern	43
4.1.3	DPP4-Menge im Serum als Indikator für PCOS-Diagnose?	44

4.2	Einfluss der PCOS-typischen hormonellen Dysbalance auf DPP4-Expression	44
4.2.1	Einfluss der Steroidhormone Testosteron und DHT auf DPP4-Proteinexpression	45
4.2.2	Einfluss der Steroidhormone Testosteron und DHT auf DPP4-mRNA-Expression	46
4.2.3	Einfluss der Substanzen Insulin und Glukose auf DPP4-Proteinexpression	47
4.2.4	Einfluss der Substanzen Insulin und Glukose auf DPP4-mRNA Expression	48
4.2.5	Untersuchungen zur Promotorregulation mittels Luziferase-Reportergen-Assay	48
4.2.6	Zellbiologische Effekte der Hormonbehandlung	50
4.3	Untersuchungen zu putativen microRNA Regulatoren der DPP4-Expression	52
4.3.1	Identifikation putativer microRNA-Regulatoren der DPP4-Genexpression	53
4.3.2	Untersuchung zur Korrelation der microRNA- und DPP4-Expression im Serum	53
4.3.3	MicroRNA-mRNA-Bindungsstudien mittels Luziferase-Reportergen-Assay	54
4.3.4	Einfluss der microRNAs auf DPP4-mRNA Expression	55
4.3.5	Einfluss der microRNAs auf DPP4-Protein Expression	56
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>Thesen</b>	<b>75</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>76</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärungen</b>	<b>77</b>

## Abkürzungen und Symbole

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
2 <sup>-</sup> (-ΔΔCt)	relative Expressionsrate
3'UTR	3' untranslatierter Bereich
AMH	Anti-Müller-Hormon
ANOVA	analysis of variance
AUC	Area under the Curve
BMI	Bodymaßindex
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin
c	Konzentration
cDNA	complementary DNA
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
Dnase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPP4	Dipeptidyl-Peptidase 4
E.coli	Escherichia coli
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embryology
FKS	Fetales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
fw/rev	forward/ reverse
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GIP	Glukoseabhängiges insulinotropes Peptid
Glc	Glukose
GLP-1	Glukagon-ähnliches Peptid-1
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormonen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HNF-1	Hepatozyten-Nuklearer Faktor-1
HOMA	Homeostasis Model Assessment
HRP	horseradish peroxidase
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktoren
Ins	Insulin
Kg	Kilogramm
LB	Luria Broth mikrobielles Wachstumsmedium
LH	Luteinisierendes Hormon
mA	Milliampere
MES Puffer	2-(N -Morpholino)ethanesulfonic acid

mg/ml	Milligramm pro Milliliter
min	Minute
miR	microRNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteasen
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
NF-κB	Nuklearer Faktor κB
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD	optische Dichte
p	Signifikanz
PBS	Phosphate buffered Saline
PCOS	Polyzystisches Ovarsyndrom
PCR	Polymerase Chain Reaction
Penstrep	Penicillin Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonucleic acid
ROC	„Receiver Operating Characteristic“-Kurven
s	Sekunde
sCD26	soluble cluster of differentiation 26
SDF-1α	Stromal derived factor-1α
SHBG	Sexualhormon-bindendes Globulin
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
SRB	Sulforhodamin B
T	Testosteron
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-buffered Saline
TBST	Tris-Buffered Saline and Tween 20
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
U/min	Umdrehung pro Minute
U	Unit
V	Volt
V	Volumen
v/v	Volumenprozent
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
y	Jahre

# 1 Einleitung

## 1.1 Weibliche Unfruchtbarkeit

Unfruchtbarkeit bezeichnet das Unvermögen eines Paares, trotz ungeschützten regelmäßigen Geschlechtsverkehrs innerhalb eines Jahres schwanger zu werden [20]. Die Ursachen der Unfruchtbarkeit sind komplex und können medizinischer, psychosozialer oder ökonomischer Natur sein [65]. Ungewollte Kinderlosigkeit betrifft etwa 10 % der Paare in der westlichen Welt [33]. Bei 50 % der betroffenen Paare spielt weibliche Infertilität eine Rolle.

Weibliche Unfruchtbarkeit kann viele medizinische Ursachen haben. Durch sexuell übertragbare Krankheiten, wie der Infektion mit *Chlamydia trachomatis*, kann es zur Verklebung der Eileiter kommen [45]. Auch bei Frauen mit Endometriose, einer oft schmerzhaften chronischen Erkrankung, bei der Gebärmutterschleimhaut-ähnliches Gewebe außerhalb der Gebärmutterhöhle vorkommt, lässt sich eine eingeschränkte natürliche Fertilität mit organischen Veränderungen wie Verklebungen der Eileiter, Adhäsionen im Becken und weiteren pathologischen Veränderungen erklären [12]. Eine Störung des hormonellen Gleichgewichtes wirkt sich in den meisten Fällen auf die Fruchtbarkeit aus. Der Hypothalamus kontrolliert durch die Freisetzung von sogenannten Gonadotropin-Releasing-Hormonen (GnRH) die Hypophyse, welche einen Einfluss auf die Funktion der Ovarien besitzt [65]. Die Ovarien sind maßgeblich an der Synthese der Geschlechtshormone beteiligt und wichtig für die Follikelreifung. Eine der häufigsten hormonellen Störungen, sogenannte Endokrinopathien, ist das Polyzystische Ovar-Syndrom.

## 1.2 Das Polyzystische Ovar-Syndrom

Das Polyzystische Ovar-Syndrom (PCOS) ist eine der häufigsten weiblichen endokrinen Erkrankungen und betrifft etwa 5 - 10 % der Frauen im reproduktiven Alter [4]. 1935 wurde das Krankheitsbild PCOS erstmals durch Stein und Leventhal in einer Fallserie von 7 Frauen mit ausbleibender Regelblutung, verstärkter Körperbehaarung und multiplen Zysten an den Eierstöcken beschrieben [87]. Erst 2003 wurden von der *European Society of Human Reproduction and Embryology* im Consensus-Meeting in Rotterdam diagnostische Kriterien festgelegt, nach denen bis heute die Diagnose erfolgt [70].

Die drei Rotterdam-Kriterien, beinhalten: (1) ovulatorische und menstruelle Dysfunktion wie Oligo- bzw. Amenorrhö und/oder (2) polyzystische Ovarien und/oder (3) das Auftreten eines klinischen oder biochemischen Hyperandrogenismus. Mindestens zwei dieser drei Kriterien müssen für die Diagnose erfüllt sein. Das wiederum bedeutet, dass der Phänotyp von PCOS-Patientinnen sehr verschieden sein kann. Bei Frauen mit polyzystischen Ovarien und fehlendem monatlichen Eisprung liegt ebenso ein PCOS vor wie bei Frauen mit erhöhtem Anteil männlicher Geschlechtshormone im Körper und daraus resultierenden Unregelmäßigkeiten ihres monatlichen Zyklus. Desweiteren zeigen viele Betroffene

begleitende Erkrankungen wie Adipositas, Insulinresistenz oder Diabetes mellitus Typ 2 [75]. Die negativen Beeinträchtigungen dieser Erkrankung reichen von metabolischen Störungen über Fertilitätsproblemen bis hin zu Langzeitrisiken für Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Escobar-Morreale hat PCOS als eine komplexe genetische Erkrankung beschrieben [32]. Zum jetzigen Zeitpunkt konnte weder ein biochemischer noch genetische Marker identifiziert werden, der sich als Referenz zur Diagnose des PCOS durch einen einfachen diagnostischen Test eignet [3].

Die Diagnose des PCOS setzt außerdem voraus, dass andere Erkrankungen der Hirnanhangsdrüse, der Nebenniere, der Eierstöcke und der Schilddrüse ausgeschlossen werden, die zu einer ähnlichen Symptomatik führen können. Die häufigsten Endokrinopathien, die ausgeschlossen werden müssen, sind Schilddrüsenerkrankungen oder Hyperprolaktinämie. Auch weitaus seltener auftretende Erkrankungen wie das Cushing-Syndrom, Androgen-sekretierende Tumore oder ein adrenogenitales Syndrom müssen ausgeschlossen werden. Diese Erkrankungen können ebenfalls eine Erhöhung der Androgenkonzentration im Körper verursachen [3].

### 1.2.1 Diagnose des PCOS

Eine erhöhte Konzentration männlicher Geschlechtshormone ist ein häufiges Symptom bei Frauen mit PCOS und wird als Hyperandrogenismus bezeichnet. Um als einer der 3 Entscheidungskriterien zu gelten, muss der Hyperandrogenismus klinisch und/oder biochemisch nachweisbar sein. Optisch lässt er sich bereits diagnostizieren, wenn die Patientinnen an vermehrter Körperbehaarung (besonders Hirsutismus), Haarausfall oder Akne leiden. Biochemisch kann er unter anderem durch die Bestimmung der zirkulierenden Menge Testosteron bestätigt werden [3].



**Abbildung 1** zeigt ein polyzystisches Ovar im vaginalen Ultraschall. Die Aufnahme wurde freundlicherweise von Frau Dr. Kaltwaßer und Frau Dr. Köller zur Verfügung gestellt.

Um Ovarien als polyzystisch bezeichnen zu können, müssen im Ultraschall 12 oder mehr Follikel je Ovar mit einem Durchmesser zwischen 2 und 9 mm zu sehen sein. Das Volumen der polyzystischen Ovarien ist stark vergrößert, ab einem Volumen von über 10 ml kann ebenfalls die Diagnose bestätigt

werden [7]. In Abb. 1 ist eine Aufnahme eines vaginalen Ultraschalls zu sehen. Dieser Anblick ist typisch für polyzystische Ovarien. Die typische Aneinanderreihung von flüssigkeitsgefüllten Follikeln wird von Experten auch als „Perlschnur“ bezeichnet.

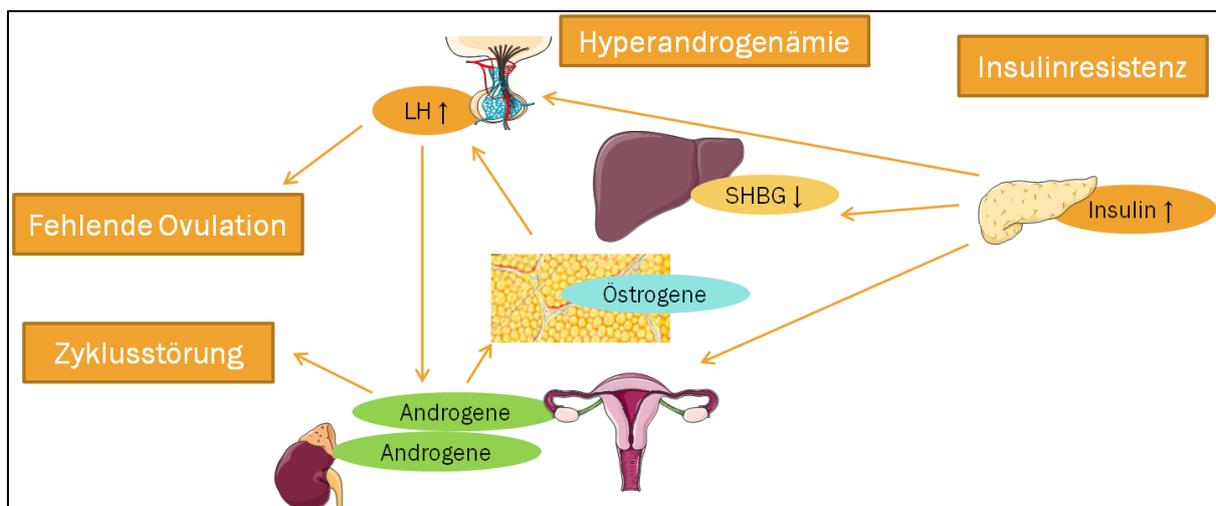
Störungen des monatlichen Menstruationszyklus sind ein weiteres Diagnosekriterium. Liegt der Abstand zwischen den Regelblutungen bei 35 Tagen und mehr, spricht man von Oligomenorrhö, bleibt die Regelblutung über 3 Monate und länger aus, von sekundärer Amenorrhö. Damit einhergehend kommt es bei der Patientin selten oder gar nicht zum Eisprung [92].

Sind zwei der drei Kriterien erfüllt, die sich meist gegenseitig begünstigen, erfolgt die Diagnose.

### 1.2.2 Pathogenese des PCOS

Trotz der Erstbeschreibung von Stein und Leventhal vor fast 80 Jahren sind die zugrunde liegenden Ursachen zur Entwicklung eines PCOS noch nicht vollständig geklärt. Das PCOS wird zum heutigen Zeitpunkt als eine komplexe genetische Erkrankung verstanden [32].

Es gibt keinen speziellen Einzelfaktor, der für die Vielzahl an Symptomen verantwortlich ist, viel mehr versteht man das PCOS als Krankheitsbild, bei dem sich mehrere endokrinologische Störungen gegenseitig begünstigen [29] (Abb. 2).



**Abbildung 2** Schematische Darstellung der Symptome und beteiligten Organe beim Polyzystischen Ovar-Syndrom. Übersicht modifiziert nach Ehrmann [29].

Patientinnen mit PCOS weisen häufig eine Erhöhung des LH-Spiegels auf [93]. Luteinisierendes Hormon (LH) stimuliert Thekazellen der Ovarien, Androgene zu synthetisieren. Dabei wird Androstendion in das Steroid Testosteron umgewandelt [29]. *In vivo* und *in vitro* Studien zeigten, dass Thekazellen betroffener Frauen eine verstärkte Testosteronsynthese aufweisen [64, 91]. Zudem leiden PCOS-Patientinnen häufig auch an einer Insulinresistenz, die mit erhöhten Insulinkonzentrationen einhergeht. Insulin stimuliert ebenfalls die Androgensynthese der Thekazellen und die Freisetzung insulinähnlicher Wachstumsfaktoren (IGF) [96]. IGF inhibiert das Enzym Aromatase, das für die

Umwandlung von Testosteron in Östrogen verantwortlich ist [30]. Desweiteren inhibiert Insulin die Expression und Freisetzung des Geschlechtshormon-bindenden Globulins SHBG, wodurch weniger zirkulierendes Testosteron im Blut gebunden wird und die Menge an freiem, biologisch verfügbarem Testosteron ansteigt [6].

Die erhöhte Konzentration männlicher Geschlechtshormone bringt den Menstruationszyklus aus dem Gleichgewicht und verstärkt die Ausbildung von Oligo- oder Amenorrhö. Der erhöhte LH-Spiegel und die hohe Testosteronmenge sorgen zudem dafür, dass das Heranreifen von Follikeln und das für die Fertilität wichtigste Ereignis, die Ovulation, gestört ist oder ausbleibt [3, 79].

### **1.2.3 Behandlung des PCOS**

Die Behandlung der betroffenen Frauen unterscheidet sich von Fall zu Fall und ist abhängig von den jeweiligen Beschwerden. Besteht der Kinderwunsch, wird in erster Linie ein Augenmerk auf die Wiederherstellung des hormonellen Gleichgewichtes gelegt. Dabei spielt das körperliche Allgemeinbefinden der Patientin eine große Rolle. Über 50 % der Patientinnen sind übergewichtig oder adipös. Viele Studien belegen, dass Gewichtsverlust durch eine konsequente Ernährungsumstellung assoziiert mit körperlicher Ertüchtigung bereits dazu beitragen kann, dass sich die Regelblutung wieder normalisiert [31].

Stark übergewichtige Patientinnen aber auch schlanke PCOS-Patientinnen mit Insulinresistenz oder Hyperinsulinämie profitieren von der Therapie mit dem Medikament Metformin. Diese Behandlung ist eine „off-Label“-Therapie, da die Behandlung eines PCOS mit Metformin außerhalb dessen Zulassungsbereiches liegt. Es konnte jedoch in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass die Therapie mit Metformin zu einer Normalisierung der Menstruation bei Frauen mit Oligo- oder Amenorrhö führt [38, 39]. Metformin fördert die Wiederherstellung eines ausgeglichenen Hormonhaushaltes, unterstützt die Senkung eines zu hohen Androgenspiegels und trägt zur Normalisierung des Menstruationszyklus bei [61, 21].

Zur Steigerung der Ovulationsrate kann Clomiphen-Citrat beitragen. Es steigert die Zahl der heranreifenden Follikel und bei 75 % der PCOS-Patientinnen kommt es unter Clomiphentherapie zur Ovulation [3].

Patientinnen mit sehr hohem LH-Spiegel, die durch die bisher genannten Therapieansätze nicht schwanger geworden sind oder jene die schwanger geworden sind, jedoch zahlreiche frühe Fehlgeburten erlitten haben, können mit Gonadotropinen allein oder in Kombination mit GnRH-Analoga behandelt werden. Diese Behandlung beruht darauf, das Missverhältnis zwischen den Gonadotropinen LH und FSH (Follikelstimulierendes Hormon) auszugleichen. Die Induktion der Ovulation bei PCOS Patientinnen ist durch FSH-Gabe sehr effektiv, jedoch bedarf es dieser Behandlung sehr viel Erfahrung, da sich sehr schnell ein Hyperstimulationssyndrom entwickeln kann

[3]. Dies kann zum einen sehr schmerzvoll für die Patientinnen sein, da das Ovarvolumen stark zunimmt, zum anderen steigt das Risiko für Mehrlingsschwangerschaften stark an [49].

#### **1.2.4 Zusammenhang des PCOS mit anderen metabolischen Erkrankungen**

Bis zu 50% der Frauen mit PCOS Patientinnen leiden an Insulinresistenz [25, 32]. Studien belegen, dass insulinresistente Frauen ein bis zu vierfach erhöhtes Risiko besitzen, einen Diabetes mellitus Typ 2 zu entwickeln [75]. Weiterhin steigt das Risiko für koronare Herzerkrankungen bei Frauen mit PCOS stark an [18].

Insulin, freigesetzt aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas, ist beteiligt an der Regulation des Glukose-Stoffwechsels [25]. Es stimuliert die Glukoseaufnahme vor allem in Muskel, Leber- und Fettzellen, um die Glukose-Homöostase im Körper aufrecht zu erhalten [96]. Bei 30 bis 40 % der Frauen mit PCOS ist die Glukose-Toleranz gestört, hervorgerufen durch eine Insulin-Resistenz [29].

Eine Insulin-Resistenz entwickelt sich entweder durch eine Hemmung der Insulin-induzierten Signalkaskade, durch sekretorische Defekte der  $\beta$ -Zellen oder vermehrten  $\beta$ -Zell-Tod [25]. Die Insulin-Sensitivität in den Ovarien bleibt jedoch erhalten [25]. So steigert Hyperinsulinämie zum einen die Androgenproduktion in den Ovarien exzessiv und geht somit mit dem Auftreten eines Hyperandrogenismus einher [96]. Zum anderen hemmt Hyperinsulinämie die Produktion von SHBG in der Leber. Dadurch kann weniger freies Testosteron in Körperflüssigkeiten gebunden und dessen biologische Wirkung dadurch gehemmt werden [96].

Seit langem ist bekannt, dass sich aus der Kombination des voranschreitenden Defektes Insulinproduzierender  $\beta$ -Zellen, einer zunehmenden Insulinresistenz und einer gesteigerten Glukose-Produktion der Leber ein Diabetes mellitus Typ 2 entwickeln kann [36].

Desweiteren spielt eine Reduktion des Inkretin-Effektes eine große Rolle bei der Ausbildung eines Diabetes mellitus Typ 2 [36]. Der Inkretin-Signalweg ist an der Regulation der Glukose-Homöostase beteiligt und reguliert unter anderem die Insulin-Freisetzung [37]. Binnen Minuten nach der Glukosehaltigen Nahrungsaufnahme werden die Inkretine GLP-1 (Glukagon-ähnliches Peptid-1) und GIP (Glukoseabhängiges insulinotropes Peptid) aus spezifischen Zellen des Darms freigesetzt und binden an  $\beta$ -Zell-Rezeptoren [24]. GLP-1 stimuliert die Insulinsekretion aus  $\beta$ -Zellen und steigert indirekt die Insulinsensitivität sowie Glukoseaufnahme in den Muskel- und Fettzellen. GIP reguliert den Fettstoffwechsel und verstärkt die Freisetzung von Glukagon, einem Gegenspieler des Insulins [5].

Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 kann häufig eine Reduktion des Inkretin-Effektes beobachtet werden, hervorgerufen durch eine verringerte Freisetzung von GLP-1 aus Darmzellen und einer beschleunigten Abbaurrate des Inkretins [36].

Metformin ist eines der wichtigsten Medikamente zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 [24]. Es senkt den Blutzuckerspiegel, indem es auf mehreren Wegen in den Glukose-Stoffwechsel eingreift. Die Neubildung von Glukose (Glukoneogenese) in der Leber wird gehemmt, so dass weniger Glukose

ins Blut ausgeschüttet werden kann. Die Muskeln sprechen besser auf Insulin an. Daher kann mehr Glukose aus dem Blut in die Muskeln geschleust und dort verwertet werden. Im Darm wird der Übertritt von Glukose aus der Nahrung ins Blut gehemmt [82].

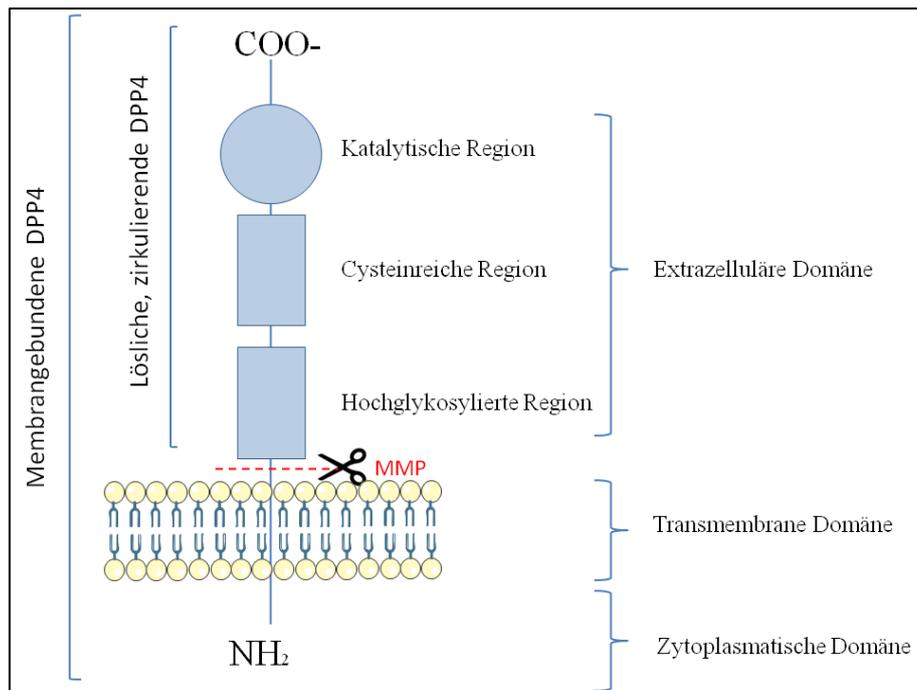
Neben der Metformintherapie spielen auch Inkretin-basierende Therapien eine Rolle bei der Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2. Zum einen können GLP-1 Rezeptor-Agonisten verabreicht werden, die stabil gegenüber dem GLP-1 Abbau sind. Diese können viele der regulatorischen Aufgaben von GLP-1 übernehmen. Zum anderen können Inhibitoren eingesetzt werden, die den Abbau des GLP-1 durch das Enzym Dipeptidyl-Peptidase 4 (DPP4) verhindern [88]. DPP4 ist aus metabolischer Sicht bis jetzt bereits als Schlüsselfaktor bei der Insulinresistenz und der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 bekannt und sehr gut untersucht. Denn die Regulatoren der Glucose-Homöostase, GLP-1 und GIP sind Substrate der DPP4 [37]. Das Enzym DPP4 setzt die Inkretine als Substrat in Minutenschnelle um, sodass sie nur für sehr kurze Zeit wirken können [73]. Eine Inhibition der DPP4-Aktivität ist aus diesem Grund eine der häufigsten Therapiemethoden zur Behandlung der Insulinresistenz bei Diabetes mellitus Typ 2 [1].

### **1.3 Dipeptidyl-Peptidase 4**

Die Dipeptidyl-Peptidase 4 (DPP4) wurde 1966 von Hopsu-Havu und Glenner erstmals beschrieben und charakterisiert [50]. Seit der Zulassung von DPP4-Inhibitoren in der Therapie von Diabetes mellitus Typ 2 rückt DPP4 in den Fokus vieler medizinischer Studien. DPP4-Inhibitoren, sogenannte Gliptine, sorgen für eine Zunahme der Inkretinmenge und fördern damit die Insulinwirkung [73].

#### **1.3.1 Allgemeines**

Die DPP4 ist ein Typ II Transmembranprotein und gehört zur Klasse der Serinproteasen [62]. Es enthält ein Signalpeptid, das für die Translokation vom Ort der Entstehung zum Wirkungsort auf der Zellmembran notwendig ist. Das Signalpeptid dient gleichzeitig als Membrananker und ermöglicht der DPP4 ihre Funktion als Rezeptor. Matrixmetalloproteasen (MMP) sind in der Lage, den extrazellulären Teil der membrangebundenen DPP4 abzuschneiden [72]. DPP4 kommt somit auch gelöst in Körperflüssigkeiten (bspw. Serum) vor [53]. DPP4 liegt hauptsächlich als Homodimer vor, da die Dimerisierung notwendig für die enzymatische Aktivität ist, doch sie kann außerdem auch als Monomer oder Homotetramer auftreten [17]. Viele Zelltypen exprimieren DPP4, abhängig vom jeweiligen Zelltypen und den Rahmenbedingungen, unter denen es exprimiert wird, kann DPP4 sehr viele verschiedene Funktionen einnehmen [10]. Das Protein kann in 4 Domänen unterteilt werden: eine kurze N-terminale zytoplasmatische Domäne, eine transmembrane Domäne, einen flexiblen Bereich und eine extrazelluläre Domäne, die sich nochmal aufgliedert in eine hoch glykosylierte, cysteinreiche und katalytische Region (s. Abb. 3) [73].



**Abbildung 3** Schematische Darstellung der primären Struktur der DPP4. Matrixmetalloproteasen (MMP) können im extrazellulären Bereich schneiden und die DPP4 als lösliche Form freisetzen. Abbildung modifiziert nach Röhrborn [73].

### 1.3.2 Nicht-enzymatische Funktionen der DPP4

Die membrangebundene Form von DPP4 kann als Rezeptor für verschiedene zelluläre Substrate fungieren und ist somit je nach Zelltyp; auf dem der Rezeptor gebunden ist, an verschiedenen Signalwegen und zelluläre Prozessen beteiligt. Auf Tumorzellen exprimiert kann die DPP4 Plasminogen Typ 2 binden, wodurch unter anderem die Expression einer Matrixmetalloprotease induziert wird, was bei Tumorzellen in einer Metastasierung resultieren kann [40].

Als ein Rezeptor ist DPP4 auch in der Lage, die Adenosin-Deaminase zu binden. Ist DPP4 ein Rezeptor auf B- und T-Zellen, ruft diese Bindung eine Aktivierung der T-Zellen hervor und stimuliert damit die Immunantwort eines Organismus [51]. Desweiteren kann die Bindung der Adenosin-Deaminase am DPP4-Rezeptor die Proliferation der T-Zellen stimulieren [57].

### 1.3.3 Enzymatische Funktion der DPP4

Eine weitaus größere Auswirkung auf zelluläre Signalwege besitzt die DPP4 aufgrund ihrer proteolytischen Funktion. Sie fungiert membrangebunden auf der Zelloberfläche oder gelöst in Körperflüssigkeiten als Peptidase. Peptidasen und Proteasen spielen im Allgemeinen eine entscheidende Rolle in zellulären Prozessen wie Proteinabbau, Zellmigration, Zellinvasion, Gewebeerneuerung, Entzündungsreaktionen oder anderen pathologischen Ereignissen [71].

Die DPP4 ist eine Serinprotease, die spezifisch Dipeptide vom N-Terminus ihrer Substrate abspaltet, die an vorletzter Stelle ein Prolin oder Alanin enthalten [76]. Die Spaltung erfolgt hydrolytisch im aktiven Zentrum der DPP4, das sich in der katalytischen Region der extrazellulären Domäne befindet.

Dort befinden sich die Protease-typischen Aminosäuren Serin, Aspartat und Histidin, die auch als katalytische Triade bezeichnet werden [10]. Die Abspaltung eines Dipeptides führt abhängig vom gespaltenen Substrat zur Aktivierung oder Inaktivierung dessen biologischer Funktion [71]. In Folge dessen werden verschiedene Signalwege durch die DPP4 an- oder ausgeschaltet. Es wurden bereits zahlreiche Substrate der DPP4 identifiziert, unter ihnen sind Neuropeptide (u.a. Substanz P), Hormone (Prolaktin), Zyto- und Chemokine (SDF-1 $\alpha$ ) [2, 97].

#### **1.3.4 Endokrine Effekte der DPP4**

Da die membrangebundene DPP4 durch Metalloproteasen von der Zelloberfläche abgeschnitten werden kann, kommt sie auch in gelöster Form zirkulierend in Körperflüssigkeiten vor [72]. Es gibt einige Studien, die zwischen der Menge zirkulierender DPP4 und pathophysiologischen Veränderungen im Körper einen Zusammenhang nachgewiesen haben. Eine erhöhte Menge DPP4 ist assoziiert mit erhöhtem Bodymaßindex (BMI), gesteigerter Glukosetoleranz und Insulinresistenz [78]. Lamers und Kollegen identifizierten DPP4 als neues Adipokin. Sie zeigten, dass die DPP4 autokrine und parakrine Effekte auf Adipozyten, Makrophagen und Muskelzellen ausübt und sprachen ihr die Bedeutung zu, die Krankheitsbilder Übergewicht und metabolisches Syndrom zu verknüpfen. Sie zeigten erstmals, dass DPP4 die Signaltransduktion von Insulin beeinflusst, in dem es in Adipozyten die von Insulin stimulierte Phosphorylierung des Akt-Proteins negativ beeinflusst. Damit verstärkt es den Effekt der Insulinresistenz [54].

#### **1.3.5 Effekte der DPP4-Inhibierung**

Die Inhibierung der enzymatischen Aktivität der DPP4 spielt bei der Therapie der Insulinresistenz eines Diabetes mellitus Typ 2 eine wichtige Rolle. Da die Hauptsubstrate der DPP4 die Inkretinhormone GLP-1 und GIP sind, verstärken DPP4-Inhibitoren deren biologische Verfügbarkeit und verlängern die Halbwertszeit der Insulin-Wirkung [73]. Bis heute sind 5 DPP4-Inhibitoren, sogenannte Gliptine, in Deutschland für die Diabetes mellitus Typ 2-Therapie zugelassen. Je nach der Bindungs- und Inhibierungsart können die Gliptine in drei Klassen unterteilt werden. Zur ersten Klasse gehören Saxa- und Vildagliptin. Diese Inhibitoren binden kovalent in der Substratbindestelle und verhindern somit, dass DPP4 andere Substrate binden kann. Zur zweiten Klasse gehören Lina- und Alogliptin. Die Bindung dieser Inhibitoren verursacht eine Konformationsänderung, ebenso wie Sitagliptin, das zur dritten Klasse gehört [63]. Der Unterschied der DPP4-Inhibierung zur Diabetes mellitus Typ 2-Therapie mit GLP-1 Substrat-Analoga besteht darin, dass die Inhibierung der DPP4-Aktivität neben der Verstärkung des Inkretin-Effektes auch andere Auswirkungen im Patienten bewirkt, da die generelle Substratbindung verhindert wird. Im Fettgewebe kann DPP4-Inhibierung zur Vergrößerung von Fettzellen und zu Entzündungsreaktionen führen [81]. Im Pankreas stimuliert die DPP4-Inhibierung die GLP-1-abhängige Insulin-Sekretion [66], die Transkription von anti-apoptotischen Genen wird aktiviert [47] und es konnte auch eine Zunahme der Zellmasse an  $\beta$ -Zellen beobachtet werden [28, 89].

### 1.3.6 Regulation der DPP4

Aufgrund der Beteiligung an zahlreichen physiologischen und metabolischen Prozessen im Organismus kann die Expression der DPP4 auf vielen Ebenen reguliert werden. Dazu zählt die Kontrolle der Gen- sowie Proteinexpression, Veränderung der enzymatischen Aktivität oder Interaktion mit Bindungspartnern [62]. Die Genexpression kann durch die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren im Promotorbereich des DPP4-Gens reguliert werden. Zu den Transkriptionsfaktoren der DPP4 zählen unter anderem TNF- $\alpha$  (Tumor-Nekrosefaktor  $\alpha$ ), HNF-1 (Hepatozyten-Nuklearer Faktor-1) und NF- $\kappa$ B (Nuklearer Faktor  $\kappa$ B) [9]. Es wurde ebenso beobachtet, dass unter den Stimuli von Entzündungsfaktoren oder Insulin die Menge der in Körperflüssigkeiten zirkulierenden DPP4 zunimmt [54]. Es gibt bereits viele Studien darüber, dass die Menge zirkulierender DPP4 mit verschiedenen Krankheitsbildern korreliert, jedoch gibt es noch keine Studien darüber, wie der Mechanismus reguliert wird, der für die Abspaltung der extrazellulären Komponente der DPP4 von der Zelloberfläche verantwortlich ist [62]. Desweiteren ist bis jetzt auch unklar, welches Organ maßgeblich an der Freisetzung zirkulierender DPP4 beteiligt ist. Studien zeigten bislang, dass die Niere eine eher untergeordnete Rolle zu spielen scheinen. Knochenmark hingegen scheint eine wichtige Rolle für die DPP4-Menge im Plasma zu spielen, allerdings ist nicht klar, welcher aus dem Knochenmark entstammende Zelltyp dafür verantwortlich ist [62].

Es wird deutlich, dass die DPP4 eine wichtige Rolle in metabolischen und physiologischen Prozessen im Organismus spielt. Die DPP4 wird als multifunktionales Protein bezeichnet, das viele verschiedene Funktionen besitzt, welche abhängig vom Zelltypen sowie intra- und extrazellulären Bedingungen sind [10].

Aufgrund ihrer zentralen Rolle in der Regulation der Insulin-Sekretion und der Tatsache, dass Insulinresistenz eines der häufigsten Begleitsymptome bei Frauen mit Polyzystischem Ovarsyndrom und unerfülltem Kinderwunsch ist, stellt sich die Frage, ob die DPP4 eine Relevanz für die Ausprägung dieses Krankheitsbild besitzt.

## 2 Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit sind Untersuchungen zur Relevanz der Dipeptidyl-Peptidase 4 für die weibliche Reproduktionsendokrinologie bei Frauen mit Polyzystischem Ovar-Syndrom und unerfülltem Kinderwunsch.

Das Polyzystische Ovar-Syndrom (PCOS) ist eine der häufigsten weiblichen endokrinen Erkrankungen und betrifft etwa 5 - 10 % der Frauen im reproduktiven Alter. Neben den diagnostisch relevanten Symptomen (ovulatorische und menstruelle Dysfunktion wie Oligo- bzw. Amenorrhö und/oder polyzystische Ovarien und/oder das Auftreten eines klinischen oder biochemischen Hyperandrogenismus) zeigen die Patientinnen häufig begleitende Erkrankungen wie Adipositas, Insulinresistenz oder Diabetes mellitus Typ 2.

Die DPP4 spaltet aufgrund seiner enzymatischen Aktivität Dipeptide von Substraten ab und kann damit deren biologische Aktivität modulieren, in dem diese durch die Spaltung aktiviert oder inaktiviert und für den proteolytischen Abbau markiert werden. Da die Substrate ein sehr großes Spektrum abdecken, ist die DPP4 an der Regulation vieler metabolischer und physiologischer Prozesse im Organismus beteiligt.

Die DPP4 ist an der Ausbildung einer Insulinresistenz maßgeblich beteiligt und so stellt sich die Frage, ob sie ebenfalls eine Relevanz in der Ausbildung des Krankheitsbildes PCOS besitzt.

Dazu soll zunächst die zirkulierenden DPP4-Mengen im Serum von Frauen ohne PCOS mit denen der Frauen mit PCOS verglichen werden. Um weitreichendere Aussagen über metabolische Zusammenhänge treffen zu können, sollen die bestimmten Messwerte der DPP4-Konzentration und -Aktivität im Serum statistisch untersucht werden. Dafür sollen weitere klinisch relevante Parameter in die statistische Auswertung einbezogen werden.

Weiterführend soll die Frage geklärt werden, ob PCOS-typische hormonelle Dysbalancen die Expression der DPP4 in ovariellen Zellen beeinflussen können. Zur Klärung dieser Fragestellung sollen *in vitro* in Granulosakarzinomzellen hormonelle Dysbalancen simuliert werden, um anschließend die Effekte auf Gen- und Proteinexpression untersuchen zu können.

Eine weitere Regulationsmöglichkeit der Genexpression stellen microRNAs dar. In den letzten Jahren stieg ihre Bedeutung in der Entwicklung verschiedenster Krankheitsbilder. Bis heute gibt es nur wenige Studien zur Regulation der DPP4-Genexpression durch microRNAs. In dieser Arbeit soll deshalb die Frage geklärt werden, welche microRNAs für die Regulation der DPP4-Genexpression in Frage kommen und ob sich daraus PCOS-relevante Zusammenhänge ergeben.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

0,05% Trypsin-EDTA mit Phenolrot	Invitrogen, Karlsruhe
100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
2-Propanol (70%)	Roth, Karlsruhe
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid (X-Gal)	Sigma-Aldrich, München
Aceton	AppliChem, Darmstadt
Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Buffer R (für XhoI und HindIII)	Fermentas, St Leon Rot
DEPC-H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat Serva, Heidelberg	Serva, Heidelberg
dNTP Mix 10 mM total	BIOLINE, Luckenwalde
Dulbecco,s modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, München
Essigsäure	Merk, Darmstadt
Ethanol (96%)	Sigma-Aldrich, München
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fast Digest Buffer (für NotI)	Fermentas, St Leon Rot
Formaldehyd-Lösung 37% für Molekularbiologie	AppliChem, Darmstadt
Formamid	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum	Sigma-Aldrich, München
FUGENE	Promega, Mannheim
GelPilot DNA Loading Dye	Qiagen, Hilden
Gly-Pro p-nitroanilide hydrochloride (DPP4 Substrat)	Sigma-Aldrich, München
InterFERin	Invitrogen, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kodak D-19 Developer	Sigma-Aldrich, München
LB Agar, powder (Lennox L Agar)	Invitrogen, Karlsruhe
LB Broth Base, powder (Lennox L Broth Base) <sup>®</sup>	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Maxima SYBR Green qPCR Mastermix	Fermentas, St. Leon Rot
Methanol (100% p.a.)	Sigma-Aldrich, München
Natriumacetat für Molekularbiologie	AppliChem, Darmstadt

Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat	Serva, Heidelberg
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Nu Page LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen, Karlsruhe
Nu Page MES SDS Running Buffer für Bis-Tris Gele (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
Nu Page Sample Reducing Agent	Invitrogen, Karlsruhe
Nu Page Transfer Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage 4-12% Bis-Tris-Gele	Invitrogen, Karlsruhe
Protein Standard 200 mg BSA/ml	Sigma-Aldrich, München
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, Karlsruhe

### 3.1.2 Laborgeräte

Analysewaage	ABJ	Kern&Sohn, Balingen
Brutschrank	Hera Cell 240i	Thermo Scientific, Bonn
Elektrophorese-Kammer	40-0911	peqLab, Erlangen
Inkubator	Unimax1011	Heidolph, Schwabach
Magnetrührer		IKA-Labortechnik, Staufen
PCR Thermo-Cycler	T3000	Biometra, Göttingen
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Plattenreader	Tecan	Tecan, Grödlig
Power Supplier	EPS 301	GE Healthcare, München
Sterilbank	Herasafe	Heraeus, Hanau
Realtime-Cycler	iCycler	Bio-Rad, München
Thermoblock	Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	Vortex IR	Starlab, Hamburg
Western Blot Elektrophorese-Kammer	XCell SureLock™ Electrophoresis Cell	Invitrogen, Karlsruhe
Western Blot Transfer-Kammer	Mini Trans-Blot® Cell	Biorad, München
Zellzählgerät	Countess	Invitrogen, Karlsruhe
Zentrifugen	Centrifuge 5415D 4-5L	Eppendorf, Hamburg Sigma, Osterode am Harz

### 3.1.3 Verbrauchsmittel

Gewebekulturflaschen	Sigma-Aldrich, München
Einmalhandschuh	Semperit, Wien
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pipetten	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,2-2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Wachstube Phasetrap	peqLab, Erlangen
Zentrifugationsröhrchen	Greiner, Frickenhausen

### 3.1.4 Enzyme

DNase, RNA-frei	Qiagen, Hilden
<i>HindIII</i>	Fermentas, St Leon Rot
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
<i>Not I</i>	Fermentas, St Leon Rot
Proteinase K	Serva, Heidelberg
RevertAid H Minus Reverse Transkriptase	ThermoFisher, Dreieich
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon Rot
<i>Xho I</i>	Fermentas, St. Leon Rot

### 3.1.5 Reaktionskits

Big Dye Terminator V1.1	Applied Biosystems, USA
Caspase-Glo 3/7 Assay	Promega, Mannheim
CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay	Promega, Mannheim
Dual Glo™ Luciferase Assay Systems	Promega, Mannheim
Human MicroRNA Array	Signosis, Heidelberg
Miniprep Kits	Zymo Research, Freiburg
Mycoplasma PCR Test Kit	AppliChem, Darmstadt
QIAquick Gel Extraction Kit (250)	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning® Kit (mit pCR®2.1 vector)	Invitrogen, Karlsruhe
ZR Plasmid Miniprep	Zymo Research, Freiburg

### 3.1.6 Oligonukleotide

<b>DPP4 Promotor</b>	Sequenz (5'-3')
Promotor_XhoI_fw	TGATGACTCGAGTTCGATAACTGCACAACCTAGCTACC
Promotor_HindIII_rev	TCATCAAAGCTTGATATACCTTGGAAGCTGAGTATCTG
<b>DPP4 3'UTR</b>	Sequenz (5'-3')
3'UTR_XhoI_fw	CTCGAGAGCTGGTATACTGATGAAGACCATGG
3'UTR_NotI_rev	GCGGCCGCAGGCACATTTATTAAATGACTGGG
<b>Mutageneseprimer</b>	Sequenz (5'-3')
miR 9_mt_C/T_fw	AAGACTCTAAAGAAATGTAA
miR9_mt_C/T_rev	TTACATTTCTTTAGAGTCTT
miR22_mt_G/T_fw	TGAAAGAGTCAGCTTGAAAC
miR22_mt_G/T_rev	GTTTCAAGCTGACTCTTTCA
<b>Sequenzierung</b>	Sequenz (5'-3')
pcR2.1_fw	CAGGAAACAGCTATGAC
pcR2.1_rev	GTAAAACGACGGCCAG

pGL4.10[luc2]_fw	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC
pGL4.10[luc2]_rev	GCCCTTCTTAATGTTTTTG
psiCheck2_fw	TGGTATACTGATGAAGACCATGG
psiCheck2_rev	GGCACATTTATTAAATGACTGGG

<b>GAPDH</b>	Sequenz (5'-3')
GAPDH_fw	CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG
GAPDH_rev	GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG

Hersteller aller oben genannten Primer: Sigma Aldrich, Taufkirchen

<b>TaqMan Sonden</b>	reife miRNA Sequenz
U18 (5x RT; 20x TM)	CAGTAGTGATGAAATCCACTTCATTGGTCCGTGTTT CTGAACCACATGATTTTCTCGGATGTTCTGATG
hsa-miR-9 (5x RT; 20x TM)	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
hsa-miR-22 (5x RT; 20x TM)	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU
hsa-miR-16 (5x RT; 20x TM)	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG

Hersteller aller oben genannten TaqMan microRNA-Sonden: ThermoFisher, Dreieich

<b>Ambion pre-miR Precursor</b>	Sequenz
hsa-miR-9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
hsa-miR-22-3p	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU
Negativkontrolle	random sequence Pre-miR™ molecule

Hersteller aller oben genannten Ambion pre-miR Precursor: ThermoFisher, Dreieich

Random Primer Invitrogen, Karlsruhe

### 3.1.7 Vektoren

psiCHECK™-2	Promega, Mannheim
pGL4.10[luc2]	Promega, Mannheim
pCR®2.1	Invitrogen, Karlsruhe

### 3.1.8 Antikörper

#### primärer DPP4-Antikörper

Anti-CD26 (ab86806)  
aus dem Kaninchen 1:1000 Abcam

#### sekundärer Antikörper

Anti-rabbit IgG  
Aus der Ziege 1:5000 CellSignaling

### 3.1.9 Zellen

Prokaryoten: chemisch kompetent

One Shot® TOP10 *E. coli*

Invitrogen, Karlsruhe

Eukaryoten: humane Granulosakarzinomzelllinien

COV 434 ECACC Nr. 07071909

ATCC, Wesel

KGN

Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Jana Ernst zur Verfügung gestellt

### 3.1.10 Puffer und Lösungen

Zellkulturmedium:

DMEM 500 ml

FKS 50 ml

5 ml Penstrep

10x TBS (für Western Blot):

NaCl 80,0 g

KCl 2,0 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11,6 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0 g

→ Aqua bidest. auf 1 l auffüllen

→ pH auf 7,4 einstellen

1x TBS-T (für Western Blot)

10x PBS 100 ml

Aqua dest 900 ml

Tween 20 (0,2%) 2 ml

LB-Medium:

20 g in 1 l Aqua bidest. lösen

→ autoklavieren

Nähragar für Bakterienkulturen:

32 g in 1 l Aqua bidest. lösen

→ autoklavieren

Zugabe von Ampicillin (50 µg/ml)

5x TBE-Puffer:

Tris-HCl 54,0 g

Borsäure 27,5 g

EDTA (0,5 M, pH 8) 20 ml

→ Aqua bidest. auf 1 l auffüllen

### 3.1.11 verwendete Software

Statistische Auswertung

SPSS Statistics 20.0 (IBM, Ehningen)

Quantitative Realtime-PCR

Bio-Rad iQ5 2.1 (Bio-Rad, München)

TF-Search

<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>

TargetScan

[www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)

PicTar

[pictar.mdc-berlin.de](http://pictar.mdc-berlin.de)

miRBase

[www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)

## 3.2 Statistische Methoden

### 3.2.1 Anlegen einer Blutbank und Ermitteln diagnostischer Parameter

Zur Untersuchung wurden Vollblutproben von Frauen gesammelt, die im Zeitraum von 2010 bis 2013 aus verschiedenen Gründen (u. a. unerfüllter Kinderwunsch, Zyklusstörungen, Endometriose) am Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie behandelt wurden. Zur Separierung des Vollblutes in Serum und zelluläre Fraktion wurde es bei 900 U/min für 20 min zentrifugiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Aus den dazugehörigen Patientenakten wurden relevante diagnostische Parameter entnommen und in eine anonymisierte Datenbank eingefügt.

### 3.2.2 Ethikantrag

Das Forschungsvorhaben „Untersuchung molekularer Faktoren der weiblichen Unfruchtbarkeit“ wurde durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg befürwortet. Alle Patientinnen wurden durch die Ärztinnen des Zentrums, Frau OÄ Dr. Kaltwaßer und Frau Dr. Köller, aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einverständniserklärung zur Nutzung ihrer Vollblutprobe für wissenschaftliche Untersuchungen.

### 3.2.3 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software *IBM SPSS Statistics 20.0*. Die Einteilung der Patientinnen in die Gruppen PCOS und Nicht-PCOS erfolgte nach den Rotterdam-Kriterien, welche 2003 durch die *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) festgelegt wurden.

Um Unterschiede in den klinischen Parametern besser einschätzen zu können und ebenso zum Vergleich der DPP4-Aktivität und Konzentration zwischen den Gruppen PCOS und Nicht-PCOS wurde der *Mann-Whitney-U* Test angewendet. Eine Signifikanz  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angenommen. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde zusätzlich eine einfache *ANOVA* durchgeführt. Dies diente der Überprüfung der Gleichheit zweier oder mehrerer Werteproben.

Die Verteilung der gemessenen DPP4-Aktivitäten und Konzentrationen innerhalb der Gruppen PCOS und Nicht-PCOS wurde in einer Kastengrafik genannt *Box Plot* dargestellt. Dabei entspricht der Kasten dem Bereich, in dem 50 % aller Messwerte der Gruppe liegen. Der Median ist als durchgehender Strich innerhalb des Kastens eingezeichnet. Dadurch kann gleichzeitig die Streuung der Messwerte beurteilt werden. Extremwerte werden in dieser Grafik als Kreise oder Sterne dargestellt.

Zur Beurteilung des Potentials der gemessenen DPP4-Aktivität und Konzentration, ein vorhandenes PCOS anzuzeigen, wurden *Receiver Operating Characteristic (ROC)*-Kurven erstellt. Zeigen die Messwerte ein hohes Potential, zwischen PCOS und Nicht-PCOS zu unterscheiden, weicht die ROC-Kurve signifikant von der Diagonale ab. Die Fläche unter der Kurve (AUC: *Area under the Curve*) wird zur Beurteilung der Güte des Tests herangezogen. Die Fläche kann Werte zwischen 0,5

und 1 annehmen, wobei ein höherer Wert die bessere Güte anzeigt. Die Signifikanz einer AUC gegenüber der Diagonale wird ebenfalls mit dem *Mann-Whitney-U* Test bestimmt.

Zur Beschreibung von statistischen Zusammenhängen von diagnostischen Parametern, sowie den gemessenen DPP4-Aktivitäten und Konzentrationen und zirkulierenden Mengen microRNA 9 und 22 untereinander wurde die bivariate Spearman-Rho Korrelation angewendet. Der ermittelte Korrelationskoeffizient R ist dabei ein Maß für die Korrelation und kann zwischen 0 und 1 liegen. Ein positiver R Wert zeigt dabei einen direkten Zusammenhang der Variablen, ein negativer R Wert einen indirekten Zusammenhang der Variablen. Der Spearman-Rho Korrelationskoeffizient ist dabei robust gegenüber Ausreißern. Eine Signifikanz  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angenommen.

### **3.3 Analytik im Patientenserum**

#### **3.3.1 DPP4-Aktivitäts-Bestimmung**

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte durch die Messung der Umsetzung des chromogenen DPP4-Substrates Glycyl-Prolin-4-Nitroanilid. Dafür wurden 20 µl Serum zu 200 µl 0.1 M HEPES pH 7.4 zugegeben und gut gemischt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 20 µl Substrat zum Proben-Puffergemisch gestartet. Über einen Zeitraum von 15 min wurde die Umwandlung des Substrates pro Minute bei 37°C mittels Bestimmung der optischen Dichte bei 405 nm gemessen. Dabei war eine Einheit (1 *Unit*) der Aktivität definiert als die Menge Enzym, welche 1 nM Substrat unter den angegebenen Bedingungen spaltet [77].

#### **3.3.2 DPP4-Konzentrations-Bestimmung**

Die Bestimmung der DPP4-Konzentration erfolgte unter Verwendung des *Human sCD26 Platinum ELISA* in einer 96-Lochplatte. Zu Beginn wurde die Lochplatte zweimal mit je 400 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend ausgeklopft. Vom mitgelieferten Standard sCD26 wurde eine Verdünnungsreihe auf die Platte gebracht. In die restlichen Löcher wurden jeweils 20 µl der Serumproben vorgelegt und anschließend mit 80 µl Probenverdünner 1:5 verdünnt. Dazu wurde je 50 µl frisch hergestelltes Biotinkonjugat gegeben. Die Platte wurde mit einer Klebefolie abgedichtet und 3 h bei 100 U/min und Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Folie entfernt, die Lochplatte im Ganzen ausgeschüttet und vier Mal mit jeweils 400 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde je Loch 100 µl frisch hergestellte Streptavidin/HRP-Lösung hinzugefügt, wieder mit Folie abgedichtet und für 1 h bei 100 U/min und Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Folie entfernt, die Lochplatte im Ganzen ausgeschüttet und vier Mal mit jeweils 400 µl Waschpuffer gewaschen. Zur Messung wurde je Loch 100 µl Substratlösung eingebracht. Nach einer Inkubationszeit von 10 min im Dunklen bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von jeweils 100 µl Stop-Lösung, um die Substratumwandlung abzustoppen. Anschließend erfolgte sofort die Messung der Absorption bei 450 nm sowie zur Referenz bei 620 nm.

Anhand der mitgeführten Verdünnungsreihe des Standards konnte eine Eichgerade erstellt werden, mit welcher die genaue Konzentration der DPP4 im Serum der einzelnen Patientinnen errechnet wurde.

### 3.3.3 RNA-Isolation aus Serum mittels Trizol-Chloroform-Extraktion

Die Isolation der zirkulierenden RNA und microRNA aus dem Serum der Patientinnen erfolgte mittels Trizol/Chloroform-Extraktion. Dazu wurden 750 µl Trizol-Reagenz und 400 µl Serum in ein Wachs-enthaltendes Reaktionsgefäß pipettiert. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform wurde die Probe für 15 s kräftig geschüttelt, um alle Komponenten gut miteinander zu vermischen. Zur Phasentrennung wurde die Probe anschließend bei 4°C und 13000 U/min für 15 min zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu dieser Phase wurde ein Gemisch aus 35 µl RD-Puffer und 5 µl DNase hinzugegeben, vorsichtig gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Fällung der RNA sowie microRNA unter Zugabe von 500 µl Isopropanol über Nacht bei -20°C. Die gefällte RNA/microRNA wird bei 4°C und 13000 U/min für 10 min abzentrifugiert, der Überstand wird verworfen. Das erhaltene RNA/microRNA-Pellet wird zweimal mit 1 ml eiskaltem Ethanol gewaschen, gevortext und anschließend bei 4°C und 7500 U/min für 5 min erneut pelletiert. Der Überstand wird danach jeweils verworfen. Nachdem das Pellet vollständig getrocknet ist, wurde es in 25 µl Aqua bidest. gelöst. Die Lagerung erfolgte kurzzeitig bei -20°C, langfristig bei -80°C.

### 3.3.4 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch. Dazu wurden die Proben verdünnt (1:50) und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gemessen. Der Konzentrationsbestimmung wurde folgender Richtwert zu Grunde gelegt: 1 OD<sub>260nm</sub> entspricht 40 µg RNA/ml

Die Reinheit der Präparation wurde anhand des Quotienten aus OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> beurteilt. Bei hoher Reinheit sollte dieser zwischen 1,8 und 2 liegen.

### 3.3.5 microRNA cDNA-Synthese

Die reverse Transkription von 400 ng Gesamt-RNA, isoliert aus Serum, erfolgte mit 200 U „RevertAid H Minus Reverse Transkriptase“ (Thermofisher) und den microRNA-spezifischen Stemloop TagMan™ Primern.

Der Einfachansatz setzte sich wie folgt zusammen:

3,72 µl	Nuklease-freies Wasser
3,30 µl	5x Reaktionspuffer
0,17 µl	dNTPs
1,50 µl	20x Stemloop TagMan™Primer
0,20 µl	Ribolock
0,70 µl	RevertAid H Minus Reverse Transkriptase
4,00 µl	RNA-Verdünnung (100 ng/µl)

Die microRNA-cDNA-Synthese wurde unter folgenden Standardbedingungen durchgeführt:

1.Schritt	16°C	30 min
2.Schritt	42°C	30 min
3.Schritt	85°C	5 min

Die Lagerung der synthetisierten cDNA erfolgte bei -20 °C.

### 3.3.6 Quantitative Realtime PCR (TaqMan™)

Alle PCR-Reaktionen wurden mit den Komponenten der Hotfire-Pol (Solis Biodyne) durchgeführt.

Der Einfachansatz setzte sich wie folgt zusammen:

9,4 µl	Nuklease-freies Wasser
1,5 µl	10x Puffer B
1,2 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
1,0 µl	dNTPs (100 mM)
0,7 µl	5x Primer TaqMan™ Primer
0,2 µl	HotStart Taq Polymerase
1,0 µl	spezifische microRNA-cDNA

Die quantitative Realtime PCR wurde unter folgenden Standardbedingungen durchgeführt:

1.Schritt	95°C	15 min
2.Schritt	95°C	20 s
3.Schritt	58°C	30 s
4.Schritt	72°C	2 min
5.Schritt	Schritt 2-4 65x wiederholen	
6.Schritt	72°C	10 min

Als Referenz-microRNA diente microRNA 16. Diese zeigte sich unabhängig von der PCOS-Diagnose als nahezu konstant exprimiert. Zur Auswertung wurde  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  der einzelnen Proben nach der Methode von Livak und Schmittgen berechnet. Die ermittelten Expressionsdaten wurden anschließend ebenfalls mittels SPSS statistisch ausgewertet.

### 3.3.7 Nachweis zirkulierender microRNAs im Serum mittels MicroRNA Array

Dieser *Human MicroRNA Array* von Signosis wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Wiebke Würfl durchgeführt nach Herstellerangaben durchgeführt, die detektierten Hybridisierungsmuster wurden selbstständig ausgewertet und bildeten die Grundlage der microRNA-mRNA-Bindungsstudien dieser Arbeit.

Das Prinzip beruht darauf, dass zirkulierende microRNAs über Ligation selektiert, mittels T7-Polymerase amplifiziert und anschließend über Hybridisierung auf einer Membran gebunden werden.

Die Detektion der hybridisierten microRNAs erfolgte durch einen Nachweis der Chemolumineszenz mittels Röntgenfilm in der Dunkelkammer.

### **3.4 Zellbiologische Methoden**

#### **3.4.1 Zellkultivierung**

Die verwendeten Granulosakarzinomzelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C, 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> und maximaler Luftfeuchtigkeit in mit 10 % FKS, 2 mM GlutaMAX<sup>TM</sup> und 1 % Penstrep versetzten DMEM Medium kultiviert.

Das Passagieren der adhärent wachsenden Monokulturen erfolgte zweimal wöchentlich, um eine konstante subkonfluente Kultur (60-70 % Zelldichte) zu erhalten. Dafür wurde das verbrauchte Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Inkubation mit 0,05 % Trypsin für 5 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von DMEM abgestoppt, die abgelösten Zellen in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 5 min bei 1000 U/min abzentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in Medium resuspendiert, die Lebendzellzahl ermittelt und zur Weiterkultivierung in geeigneter Verdünnung in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Zur Kryokonservierung wurden  $4 \times 10^6$  Zellen in 1,8 ml Gefriermedium aufgenommen (Medium mit 20 % DMSO) und in ein 2 ml Gefrier Röhrchen überführt. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zur Rekultivierung kryokonservierter Zellen wurde der Inhalt eines Gefrier Röhrchens rasch bei 37°C aufgetaut und in Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 1000 U/min pelletiert und in frischem Medium aufgenommen und erneut zentrifugiert, um das für die Zellen toxische DMSO zu entfernen. Das Pellet wurde in 3 ml Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. In regelmäßigen Abständen wurden alle Zelllinien unter Verwendung des Mycoplasma PCR Test Kit (AppliChem) auf Mykoplasmen getestet.

Die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in einer Einzelzellsuspension erfolgte mit Hilfe eines Zellzählgerätes. Hierfür wurde das Zellpellet nach dem Trypsinieren in ausreichend Medium sehr gut resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypanblau gemischt, 10 µl dieses Gemisches wurden in eine Zählkammer pipettiert und gezählt. Das Gerät gibt stets die Gesamt-, die Lebend- und die Totzellzahl an. Es wurde immer mit der Lebendzellzahl gearbeitet.

#### **3.4.2 Einstreuen der Zellen in verschiedene Zellkulturgefäße**

Je nach Versuchsansatz wurden die Zellen in unterschiedliche Kulturgefäße eingebracht. Zur einfachen Kultivierung wurden Zellen in 25-75cm<sup>2</sup> Kulturflaschen gehalten. Für Versuche zur RNA-Isolierung erfolgte die Kultivierung in 6-Lochplatten. Alle weiteren Tests zur Analyse der Zytotoxizität, Apoptose oder Luziferaseexpression erfolgten in 96-Lochplatten.

**Tabelle 1 Übersicht Kulturgefäße und dazugehörige eingestreute Zellzahl**

	Zellzahl COV 434	Zellzahl KGN	Volumen
<b>96-Lochplatte</b>	$2 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	200 $\mu$ l
<b>6-Lochplatte</b>	$1,6 \times 10^6$	$0,8 \times 10^6$	3 ml
<b>25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche</b>	$1,6 \times 10^6$	$0,8 \times 10^6$	5 ml

### 3.4.3 Behandlung der Zellen

Zur Untersuchungen des Einflusses der Steroidhormone Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT), sowie Insulin und Glucose auf die DPP4-Expression der Granulosakarzinomzellen COV 434 und KGN für 72 h mit jeweils drei verschiedenen Hormonkonzentrationen behandelt. In Tab. 2 ist eine Übersicht der genutzten Konzentrationen dargestellt.

**Tabelle 2 Übersicht Behandlung der Zellen**

Substanz	Testosteron ( $c_A=100 \mu\text{M}$ )			DHT ( $c_A=100 \mu\text{M}$ )			Insulin ( $c_A=100 \text{nM}$ )			Glucose ( $c_A=1 \text{M}$ )		
	[nM]			[nM]			[nM]			[mM]		
$c_E$	10	50	100	1	25	50	0,5	10	25	5	50	100
$V_{\text{Substanz}} [\mu\text{l}]$	1	5	10	0,1	2,5	5	50	1000	2500	50	500	1000
$V_{\text{Medium}}$	Ad 10 ml											

$c_A$ : Ausgangskonzentration;  $c_E$ : Endkonzentration; DMSO: Lösungsmittelkontrolle

### 3.4.4 Transfektion von Vektoren

Die Transfektion der selbstgenerierten Luziferase-Plasmide mit gewünschtem Insert erfolgte mit Hilfe des Transfektionsreagenz FuGENE (Promega) in einer 96-Lochplatte. Pro Loch wurde eine definierte Zahl Zellen in Kultivierungsmedium eingestreut und für 24 h anwachsen lassen. Vor der Transfektion wurde das Medium abgenommen und damit auch nicht angewachsene Zellen entfernt. Anschließend werden je Loch 100  $\mu$ l serumfreies Medium vorgelegt.

Das Protokoll der Promotorstudien unterscheidet sich von dem der microRNA-mRNA-Bindungsstudien dahingehend, dass unterschiedliche Vektorsysteme verwendet werden. Der psiCheck2<sup>TM</sup> Luziferasevektor enthält sowohl das Gen der *Renilla*fluy Luziferase mit dem zu untersuchenden inserierten DPP4-3'UTR als auch das konstitutiv exprimierte Gen der *Firefly* Luziferase, deren Lumineszenzwerte zur Normierung verwendet werden. Der pGL4.10[luc2] Luziferasevektor enthält nur das Gen der *Firefly* Luziferase mit dem zu untersuchenden inserierten DPP4-Promotor. Deshalb muss pGL4.74[hRluc/TK] als zweiter Luziferasevektor mit dem konstitutiv exprimierten Gen der *Renilla*fluy Luziferase in einem Verhältnis von 1:50 kotransfiziert werden.

Der Einfachansatz setzte sich wie folgt zusammen:

0,11 $\mu$ g	Plasmid-DNA (psiCheck2 <sup>TM</sup> oder pGL4.10[luc2]:pGL4.74[hRluc/TK]=50:1)
5,20 $\mu$ l	serumfreies Medium
0,30 $\mu$ l	FuGENE Transfektionsreagenz.

Dieser Ansatz wurde vorsichtig gemischt und zur Komplexbildung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 5 µl des Komplexes in 100 µl vorgelegtes serumfreies Medium pipettiert. Wurde ein größeres Volumen vorgelegt, wurde der Einfachansatz entsprechend angepasst.

### 3.4.5 Transfektion von microRNA

Die Transfektion der precursor microRNAs 9, 22 und Negativmimik erfolgte mit der Transfektionsreagenz INTERFERin (Polyplus). Für microRNA-mRNA-Bindungsstudien erfolgte die Transfektion in 96-Lochplatten im Anschluss an die Vektortransfektion, zur Untersuchung der Effekte auf DPP4-mRNA und Proteinexpression erfolgte sie in 6-Lochplatten. Pro Loch wurde eine definierte Zahl Zellen in Kultivierungsmedium eingestreut und für 24 h anwachsen lassen. Vor der Transfektion wurde das Medium abgenommen und damit auch nicht angewachsene Zellen entfernt. Anschließend wird je Loch eine definierte Menge serumfreies Medium vorgelegt.

Der Einfachansatz setzte sich wie folgt zusammen:

<u>96-Lochplatte:</u>	<u>6-Lochplatte:</u>	
0,0875 µl	4,0 µl	microRNA [für 25 nM]
ad 50 µl	ad 376 µl	serumfreies Medium
2,0 µl	20 µl	INTERFERin Transfektionsreagenz

Dieser Ansatz wurde vorsichtig gemischt und zur Komplexbildung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das gesamte Volumen des Komplexes in vorgelegtes serumfreies Medium pipettiert. Wurde ein größeres Volumen vorgelegt oder sollte eine andere Konzentration zu microRNAs transfiziert werden, wurde der Einfachansatz entsprechend angepasst.

### 3.4.6 Zellviabilitätstest

Der Sulforhodamin B (SRB)-Assay bringt Aufschluss darüber, ob die durchgeführte Behandlung der Zellen (bspw. Transfektion oder Hormonbehandlung) einen zytotoxischen Effekt auf die Viabilität der Zellen verursacht. Der Zytotoxizitätstest erfolgt in einer transparenten 96-Lochplatte.

Die Zellen werden in definierter Zellzahl eingestreut und vorkultiviert. Nach 24 h wird das Medium entfernt und die Zellen werden für weitere 72 h mit den zu untersuchenden Substanzen oder pre-microRNA mimics inkubiert. Zum Abstoppen der Behandlung wird das Medium abgenommen, die Zellen in 200 µl kalter 10 %-iger Trichloressigsäure für 1 h bei 4°C fixiert, anschließend 5 mal im Eiswasser gewaschen und die Platte danach gut trocken geklopft. Die vitalen Zellen werden für 10 min mit 100 µl 4,4 %-iger SRB-Lösung bei Raumtemperatur angefärbt. Danach wird die überstehende stark färbende Lösung mit 1 %-iger Essigsäure gut aus der Lochplatte ausgespült und am Ende die Platte wieder gut trocken geklopft. Die gefärbten Zellen trocknen anschließend entweder über Nacht bei Raumtemperatur oder 1 h bei 37°C. Zum Auflösen werden die getrockneten Zellen in 300 µl Tris-Puffer (20 nM, pH 10) 30 min bei 37°C geschüttelt (180 rpm). Anschließend wird die Extinktion bei 540 nm am Plattenreader gemessen.

### **3.4.7 Zellproliferationstest**

Der Assay bringt Aufschluss darüber, ob die durchgeführte Behandlung der Zellen (bspw. Transfektion oder Hormonbehandlung) einen Effekt auf das Proliferationsverhalten der Zellen verursacht. Der Zellproliferationstest erfolgt in einer transparenten 96-Lochplatte.

Die Zellen werden in definierter Zellzahl eingestreut und vorkultiviert. Nach 24 h wird das Medium entfernt und die Zellen werden für weitere 72 h mit den zu untersuchenden Substanzen oder pre-microRNA mimics inkubiert. Zum Messen der proliferierenden Zellen wird der CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay von Promega verwendet. Zu Beginn der Messung werden in jedes Loch 15 µl Dye-Solution pipettiert und die Platte für weitere 4 h bei 37 C inkubiert. Anschließend werden 100 µl Solubilization/Stop-Lösung dazupipettiert. Der dabei entstehende Farbumschlag durch Bildung eines Formazan-Produkts wird bei 570 nm photometrisch am Tecan Plattenreader gemessen. Eine Referenzmessung erfolgte zusätzlich bei 650 nm.

### **3.4.8 Zelltod-Test**

Der Caspase-Glo 3/7 Assay von Promega bringt Aufschluss darüber, ob die durchgeführte Behandlung (bspw. Transfektion oder Hormonbehandlung) einen Einfluss auf die Apoptoserate der Zellen hat.

Der Apoptose-Assay erfolgt in einer weißen 96-Lochplatte. Die Zellen werden in definierter Zellzahl eingestreut und vorkultiviert. Nach 24 h wird das Medium entfernt und die Zellen werden für weitere 72 h mit 200 µl Substanzhaltigen oder pre-microRNA mimics-haltigem Medium inkubiert. Zum Messen der Caspase 3 und 7 -Aktivität wird das Substrat nach Herstellerangaben frisch aufgelöst, davon 50 µl pro Loch pipettiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgt die Messung der Lumineszenz am Tecan Plattenreader.

## **3.5 Molekularbiologische Methoden**

### **3.5.1 Proteinnachweis im Zellkulturüberstand mittels Western Blot**

Das Enzym DPP4 kommt sowohl membranständig als auch gelöst in Körperflüssigkeit vor. Der Proteinnachweis im Zellkulturüberstand dient dazu, Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen besser mit den *in vivo* im Serum gefundenen Zusammenhängen vergleichen zu können. Der Nachweis von DPP4-Protein im Zellkulturüberstand erfolgte mit dem monoklonalen Primäntikörper Anti-CD26 von Abcam (1:1000) und dem Sekundäntikörper Anti-Maus von Thermofisher (1:1500). In jedem Versuch wurde die gleiche definierte Menge Zellen in der gleichen definierten Menge Medium kultiviert. Zum Proteinnachweis wurde je 1 , 2 , 5 oder 10 µl Zellkulturüberstand von jeder Probe für den Western Blot eingesetzt.

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in 4-12 % igen Bis-Tris-Acetat-Gelen (Invitrogen). Als Laufpuffer wurde 1x MES-Puffer verwendet (Invitrogen). Der Zellkulturüberstand wurde mit 6,25 µl 4x LDS-Probenpuffer (Invitrogen) und 2,5 µl Proben-reduzierendem Agenz (10x, Invitrogen) versetzt und mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Die Proben wurden

für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte 1 h bei 200 V und 4°C in einer XCell Sure Lock Electrophoresis Cell-Apparatur (Invitrogen). Zur Größenbestimmung wurde ein Protein-Molekulargewichtsstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen) mitgeführt. Nach dem Gellauf wurden die aufgetrennten Proteine durch die Tank-Blot Methode unter Nutzung einer Mini Trans-Blot® Cell-Apparatur (Biorad) auf eine PVDF-Membran (0,45 µm Porengröße, Millipore) übertragen. Die Membran wurde für 10 s in Methanol aktiviert, in Aqua bidest. gewaschen und in 1x Transferpuffer vorinkubiert. Die Geltaschen des Bis-Tris-Gels wurden vorsichtig abgetrennt. Auf die schwarze Seite der Tank-Blot-Kassette wurde ein in Transferpuffer getränkter Schwamm, ein Stück Filterpapier, das Bis-Tris-Gel, die PVDF-Membran, gefolgt von Filterpapier und Schwamm luftblasenfrei geschichtet. Der Transfer erfolgte bei 300 mA für 3 h bei 4°C.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur in 2 % Milchpulver-TBST unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper Anti-CD26 in 1:1000 in 2 % Milchpulver-TBST verdünnt und die Membran in 5 ml über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 15 min mit TBST gewaschen. Der entsprechende, mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte, Sekundärantikörper Anti-Hase wurde ebenfalls in 2 % Milchpulver-TBST 1:5000 verdünnt und die Membran 60 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Detektion musste die Membran erneut dreimal 15 min mit TBST und einmal 15 min mit TBS gewaschen werden. Zur Detektion der Proteinbanden wurde ECL Western Blotting Detection System (GE Health care) verwendet. Zur Entwicklung wurden die Lösung A und B 1:1 miteinander vermischt und die Membran für 1 min damit benetzt. Nachdem die Substratlösung gut abgetropft war, konnte der Nachweis der Chemolumineszenz mittels Röntgenfilm in der Dunkelkammer erfolgen. Die belichteten Filme wurden zum Sichtbarmachen der Nachweisbanden zuerst in Entwicklungslösung getaucht, anschließend in Aqua bidest. gut gewaschen und zum Schluss in Fixierlösung getaucht. Nach abschließendem Spülen mit Aqua bidest. wurden die Filme getrocknet und ausgewertet.

Zur Untersuchung der Effekte wurde zusätzlich die DPP4-Aktivität im Zellkulturüberstand bestimmt. Die Messung dazu erfolgte wie in 4.2.1 beschrieben mit dem Unterschied, dass für die Bestimmung der Aktivität im Zellkulturüberstand 60 µl Probe und 160 µl HEPES-Puffer verwendet wurde.

### **3.5.2 mRNA-Nachweis**

Zur Untersuchung der Effekte auf die DPP4-mRNA Expression wurde eine definierte Zellzahl je Versuch in eine 6-Lochplatte mit 5 ml Medium eingestreut. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und damit nicht angewachsene Zellen entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit substanzhaltigem Medium für 72 h oder mit pre-microRNA mimics-haltigem Medium für 48 h inkubiert. Anschließend wurde der Überstand für den Proteinnachweis abgenommen, die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und mit dem Zellschaber geerntet. Anschließend wurden die Zellen bei

1000 U/min für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml Trizol resuspendiert und anschließend erfolgte die RNA-Isolation mittels Trizol-Chloroform-Extraktion. Abschließend wurde die RNA-Konzentration bestimmt.

### 3.5.3 cDNA-Synthese

Die reverse Transkription von 1 µg Gesamt-RNA, isoliert aus Zellen, erfolgte mit 200 U „RevertAid H Minus Reverse Transkriptase“ (ThermoFisher).

Der preannealing-Mix setzt sich wie folgt zusammen:

10 µl	RNA-Verdünnung (100 ng/µg)
1 µl	Random Primer (100 µM)

Der Mix wurde bei 65°C für 5 min inkubiert. Anschließend wurde zugefügt:

4,0 µl	5x Reaktionspuffer
2,0 µl	dNTPs (100 mM)
0,5 µl	Ribolock
0,7 µl	RevertAid H Minus Reverse Transkriptase

Für die Synthese wurde das folgende Programm gewählt:

1.Schritt	25°C	10 min
2.Schritt	55°C	60 min
3.Schritt	85°C	5 min

Nach der Synthese wurde die cDNA bei -20 °C gelagert

### 3.5.4 Quantitative Realtime PCR (SYBR® Green)

Alle PCR-Reaktionen wurden mit den Komponenten der Hotfire-Pol (Solis Biodyne) durchgeführt.

Der Einfachansatz setzte sich wie folgt zusammen:

7,5 µl	SYBR® Green Mix
5,5 µl	Nukleasefreies Wasser
0,5 µl je	Primer fw/rev
1,0 µl	cDNA

Für die Synthese wurde das folgende Programm gewählt:

1.Schritt	95°C	10 min
2.Schritt	95°C	10 s
3.Schritt	60°C	20 s
4.Schritt	72°C	30 s
5.Schritt	Schritt 2-4 45x wiederholen	
6.Schritt	Schmelzkurve	

Als Referenzgen diente die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Diese zeigte sich unabhängig von der Behandlung der Zellen als nahezu konstant exprimiert. Zur Auswertung wurde  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  der einzelnen Proben nach der Methode von Livak und Schmittgen berechnet.

### 3.5.5 Reportergenstudien

Sowohl für die Promotorstudien als auch für die microRNA-mRNA-Bindungsstudien wurden die verwendeten Vektoren selbst generiert. Mittels spezifischer Primerpaare wurde aus Kontroll-DNA der gesamte Promotorbereich (2000 bp vor Startcodon) oder der gesamte 3'UTR (gesamtes Exon 25 der mRNA) des DPP4-Gens amplifiziert. Die Vorwärts-Primer enthielten dabei stets zusätzlich eine Restriktionsschnittstelle für *XhoI*, die Rückwärts-Primer eine Restriktionsschnittstelle für *NotI*(3'UTR) bzw. *HindIII* (Promotor). Diese waren nach der Amplifikation im PCR-Produkt enthalten. Nach der Aufreinigung wurden die Produkte in denpCR®2.1-Vektor ligiert. Dies ist notwendig, um anschließend einen optimalen Restriktionsverdau mit den Enzymen *XhoI* und *NotI/HindIII* durchführen zu können. Die Zielvektoren psiCheck2™ oder pGL4.10[luc2] wurden ebenfalls mit diesen Enzymen verdaut. Dadurch war eine Ligation der gewünschten Inserts mit der richtigen Orientierung (5'-3') gesichert. Mittels Sequenzierung wurde die erfolgreiche Generierung von Vektoren mit gewünschtem Insert bestätigt. Diese wurden in einem größeren Maßstab in E.coli vervielfältigt und anschließend für die Reportergenstudien eingesetzt.

### 3.5.6 Amplifikation des gewünschten Inserts mittels PCR

Alle PCR-Reaktionen wurden mit den Komponenten der Hotfire-Pol (Solis Biodyne) durchgeführt. Der Einfachansatz setzte sich wie folgt zusammen:

9,1 µl	Nukleasefreies Wasser
1,5 µl	10x Puffer B
1,2 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
1,0 µl	dNTPs (100 mM)
0,5 µl je	Primer (20 µM)
0,2 µl	HotStartTaqPolymerase

Dem Reaktionsansatz wurde je 1 µl cDNA hinzugefügt. Die Amplifikation der verschiedenen Bereiche erfolgte im PCR Thermo-Cycler nach folgenden Programmen:

	<u>Promotorbereich:</u>	<u>3'UTR Bereich:</u>
1.Schritt	95°C 15 min	
2.Schritt	95°C 20 s	95°C 20 s
3.Schritt	66°C 30 s	63°C 30 s
4.Schritt	72°C 1 min	72°C 30 s
5.Schritt	Schritt 2-4 35-40x wiederholen	
6.Schritt	72°C 10 min	
7.Schritt	4°C Kühlung	

Die ideale Annealing-Temperatur wurde mittels Gradienten-PCR zuvor ermittelt. Die Synthesezeit wurde in Abhängigkeit von der zu erwartenden Produktgröße variiert.

### **3.5.7 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Darstellung der Amplifikate erfolgte mittels einer Agarose-Gelelektrophorese. In Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentlänge wurden 1-2%-ige Agarosegele (jeweils in 100 ml 0,5x TBE-Puffer versetzt mit 5 µl Ethidiumbromid [10 mg/ml]) angefertigt. Die Elektrophorese erfolgte in Gelkammern der Firma peqLab mit 0,5x TBE-Laufpuffer. Es wurden jeweils 15 µl PCR-Produkt mit 1 µl Bromphenolblau gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V. Nach dem Gellauf erfolgte die Detektion der Banden mittels UV-Licht. Zur Größenbestimmung der PCR-Produkte diente die Auftragung einer 100 bp DNA-Leiter.

### **3.5.8 Aufreinigung der PCR-Produkte aus Agarose-Gel**

Für die Aufreinigung der Amplifikate aus dem Agarosegel wurden die Banden von Interesse mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Es wurde darauf geachtet, dass die Gele nur eine möglichst geringe Zeit dem UV-Licht ausgesetzt sind, um keine DNA-Veränderungen zu induzieren. Anschließend erfolgte die Reinigung unter Verwendung des QiaQuick Gelextraktionskits (Qiagen). Zuerst wurde das Gelstück in 450 µl QG-Puffer verflüssigt, in dem es für 10 min auf 50°C erhitzt wurde. Danach wurden 150 µl Isopropanol hinzugefügt, gut gevortext und das Gemisch anschließend auf eine Säule gegeben. Durch Zentrifugation der Säule für 1 min bei 10000 U/min durchwanderte das Gemisch die Säule, wobei die PCR-Produkte aufgrund ihrer negativen Ladung in der Säule gebunden wurden. Die Säule wurde anschließend zweimal mit 350 µl PE-Puffer für 1 min bei 10000 U/min gespült. Nachdem die Säule trocken zentrifugiert wurde, erfolgte die Elution der gereinigten PCR-Produkte mit 25 µl nukleasefreies Wasser.

### **3.5.9 Ligation in den pCR2.1-Vektor**

Die Ligation der PCR-Produkte erfolgte unter Verwendung des TOPO-TA-Cloning Kits (Invitrogen). Der für die Klonierung genutzte pCR®2.1-Vektor enthielt überhängende T-Enden, die eine direkte Ligation mit dem PCR-Produkt erlauben, welches durch die HotStart Taq Polymerase in der PCR überhängende A-Enden erhielt. Zusätzlich ist eine Topoisomerase am Vektor gebunden, welche diesen offen hält und nach Zugabe der Salzlösung sofort mit dem Einbau des gewünschten Inserts beginnt, ohne dass eine Zugabe von T4-Ligase nötig ist.

Für jeden Klonierungsansatz wurden 4 µl gereinigtes PCR-Produkt mit 1 µl Salzlösung und 1 µl pCR®2.1-TOPO TA Vektor vorsichtig vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

### **3.5.10 Transformation in *E.coli***

Für jede Transformation wurde ein 100 µl Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* Zellen (TOP10, Invitrogen) auf Eis aufgetaut. Die Bakterien wurden mit 2 µl des Ligationsansatzes vorsichtig vermischt und 15 min auf Eis inkubiert. Zur DNA-Aufnahme wurden die Zellen einem 30 s

andauerndem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 250 µl S.O.C Medium (Kitkomponente der TOP10-Zellen) wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C unter leichtem horizontalem Schütteln (200 U/min) inkubiert. 50 µl des Transformationsansatzes wurden auf vorgewärmten Selektionsagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Selektion positiver Transformanden erfolgte durch Zugabe von 50 µg/ml Ampicillin in den Selektionsagar und bei Verwendung des pCR@2.1-Vektors wurde zusätzlich eine Blau/Weiß-Selektion unter Verwendung von X-Gal (40 µg/ml) durchgeführt.

### **3.5.11 Übernachtskultur**

Zur Analyse positiver Transformanden wurden weiße Einzelkolonien mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in einen bereits vorbereiteten PCR-Ansatz überführt. Nach Amplifikation der Plasmid-DNA und anschließender Agarose-Gelelektrophorese wurden Kolonien, die das gewünschte Insert enthielten, zur Anzucht von Übernachtskulturen genutzt. Dafür wurden 5 µl LB-Medium mit 5 µl Ampicillin (100 mg/ml) versetzt und die Spitze des Zahnstochers eingebracht, mit welcher zuvor die in Frage kommende Einzelkolonie berührt wurde. Über Nacht erfolgt dann die Vermehrung der transformierten Bakterien bei 37°C unter leichtem Schütteln (200 U/min).

### **3.5.12 Plasmidisolierung**

Die erhaltene Übernachtskultur wurde 10 min bei 4.000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und aus dem erhaltenen Zellpellet erfolgte die Plasmidisolierung unter Verwendung des Miniprep Kits (ZymoResearch). Das Pellet wurde in 200 µl P1-Puffer gelöst und in ein geeignetes Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte die Zugabe von 200 µl P2-Puffer zum Aufschluss der Zellwände. Nach mehrmaligem Invertieren erfolgte die Zugabe von 400 µl gekühltem P3-Puffer. Anschließend wurde erneut gründlich invertiert, ein Farbumschlag zeigt an, wenn alles gut vermischt ist. Es folgt das Pelletieren der Zellreste durch Zentrifugation für 30 s bei 13000 U/min. Der Überstand wurde auf eine Säule gegeben. Durch Zentrifugation der Säule für 1 min bei 13000 U/min durchwanderte das Gemisch die Säule, wobei die Plasmid-DNA aufgrund ihrer negativen Ladung in der Säule gebunden wurde. Die Säule wurde anschließend zweimal mit 200 µl Waschpuffer für 1 min bei 13000 U/min gespült. Nachdem die Säule trocken zentrifugiert wurde, erfolgte die Elution der gereinigten PCR-Produkte mit 25 µl nukleasefreies Wasser.

### **3.5.13 DNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch. Dazu wurden die Proben verdünnt (1:50) und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gemessen. Der Konzentrationsbestimmung wurde folgender Richtwert zu Grunde gelegt:  $1 \text{ OD}_{260\text{nm}}$  entspricht 50 µg DNA/ml

Der Quotient aus  $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$  erlaubt eine Aussage über die Qualität der DNA-Präparation bezüglich eventueller Proteinverunreinigungen. Bei hoher Reinheit liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2.

### 3.5.14 Sequenzierung

Zur Überprüfung der inserierten DPP4-Genabschnitte erfolgte die Sequenzierung der generierten Vektoren mit Hilfe spezifischer Primer unter Nutzung des BigDye™ Terminator Sequencing Kits 1.1 (Applied Biosystems).

Der Einfachansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1,5 µl	5x Sequenzierpuffer
1,0 µl	BigDye™ Sequencing Mix
1,0 µl	spezifischer Primer (10 µM)
5,5 µl	Nukleasefreies Wasser
1,0 µl	Plasmid-DNA

Die Sequenzierreaktion lief in 0,5 ml Reaktionsgefäßen im Thermal-Cycler Tetrad2 (Biorad) nach folgendem Programm ab:

1.Schritt	96°C 1 min
2.Schritt	96 °C 10 s
3.Schritt	50 °C 5 s
4.Schritt	60°C 4 min
5.Schritt	Schritt 2-4 25x wiederholen
6.Schritt	4°C Kühlung

Anschließend erfolgte die Fällung des Sequenzierproduktes unter Vermeidung direkter Lichteinstrahlung auf die Reaktionsgefäße. Jedem Ansatz wurden 2 µl 125 mM EDTA, 2 µl 3 M Natriumacetat und 50 µl 96%-iger Ethanol zugegeben, gevortext und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die gefällte DNA wurde anschließend für 20 min bei 4°C und 6000 U/min abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes und Waschen des Pellets mit 70 µl 70 %-igem Ethanol wurde 10 min bei 4°C und 6000 U/min zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abpipettieren des Ethanols wurde das Pellet ca. 10 min bei 80°C im Thermocycler getrocknet. Die Analyse der Proben erfolgte am Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durch Frau Dr. Darmer und Herrn Dr. Christov unter Nutzung eines ABI Prism DNA-Sequencers.

### 3.5.15 Restriktionsverdau mit *XhoI* und *NotI*

Um den 3'UTR des DPP4 Gens in den Zielvektor psiCheck2™ zu klonieren, erfolgte nacheinander der Restriktionsverdau mit *XhoI* und *NotI*, da beide Enzyme unterschiedliche Pufferbedingungen benötigen, um optimal arbeiten zu können. Zuerst erfolgte der Verdau sowohl des Insert-enthaltendem pCR@2.1-Vektors als auch des Zielvektoren psiCheck2™ mit *XhoI* für 3 h bei 37°C.

Der Einfachansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1 µl / 3µl	psiCheck2™ / Insert-enthaltender pCR@2.1-Vektor
6 µl / 4 µl	Aqua bidest.

1 µl	Puffer R
2 µl	<i>XhoI</i>

Nach Aufreinigung der geschnittenen Plasmide mittels Agarose-Gelelektrophorese erfolgte nach der Isolation aus dem Gel anschließend der schnelle Restriktionsverdau mit FD *NotI* für 5 min bei 37°C.

Der Einfachansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1 µl / 2µl	psiCheck2 <sup>TM</sup> / Insert-enthaltender pCR®2.1-Vektor
15 µl	Aqua bidest.
2 µl	10x Fast Digest Puffer
1 µl	Fast Digest <i>NotI</i>

Nach Aufreinigung der geschnittenen Plasmide mittels Agarose-Gelelektrophorese erfolgte die Isolation aus dem Gel.

Um den Promotorbereich des DPP4-Gens in den Zielvektor pGL4.10[*luc2*] zu klonieren, erfolgte ein Doppelverdau mit *XhoI* und *HindIII*, da beide Enzyme für die optimale Aktivität denselben Puffer benötigen. Der Doppelverdau erfolgte für 2 h bei 37°C.

Der Einfachansatz setzte sich wie folgt zusammen:

5,0 µl	pGL4.10[ <i>luc2</i> ] / Insert-enthaltender pCR®2.1-Vektor
2,0 µl	Puffer R
4,0 µl	Aqua bidest.
1,5 µl	<i>XhoI</i>
1,5 µl	<i>HindIII</i>

Nach Aufreinigung der geschnittenen Plasmide mittels Agarose-Gelelektrophorese erfolgte die Isolation aus dem Gel.

### 3.5.16 Ligation in Luziferase-Vektoren

Durch den zweifachen Restriktionsverdau mit *XhoI* und *NotI* bzw. *HindIII* wurden spezifische Enden am gewünschten Insert und den Zielvektoren erzeugt, was ein Zusammenfügen mittels Ligase in der richtigen Orientierung (5' nach 3') ermöglicht.

Der Einfachansatz setzte sich wie folgt zusammen:

2 µl	Aqua bidest.
1 µl	doppelt verdauter Zielvektor psiCheck2 <sup>TM</sup> oder pGL4.10[ <i>luc2</i> ]
4 µl	doppelt verdautes Insert (3'UTR oder Promotor)
2 µl	10x T4-Ligationspuffer
1 µl	T4-Ligase

Die Ligation des gewünschten Inserts in den jeweiligen Zielvektor erfolgt für 30 min bei 22°C.

Anschließend erfolgt die Transformation der Vektoren in *E.coli* Top10 Zellen. Zur Analyse positiver Transformanden wurden Übernachtskulturen angelegt und deren Plasmid-DNA isoliert. Mittels Sequenzierung wurde die erfolgreiche Generierung von Vektoren mit gewünschtem Insert bestätigt. Diese wurden in einem größeren Maßstab in *E.coli* vervielfältigt und anschließend für die Reporterstudien eingesetzt.

### 3.5.17 Mutagenese

Mittels des *Quik Change Site-Directed Mutagenesis Kit* von Agilent wurde in die putative microRNA-Bindestelle eine gezielte Punktmutation eingefügt. Die spezifischen Mutagenese-Primer wurden so gewählt, dass sie in einem Bereich von 10 Nukleotiden vor und hinter der Bindestelle binden und eine der 6 Nukleotiden aus der Bindestelle gegen eine andere Base ausgetauscht wurde. Die Mutagenese folgt dem einfachen Prinzip einer PCR.

Der Einfachansatz setzte sich wie folgt zusammen:

19,75 µl	Aqua bidest.
2,50 µl	10x Puffer
0,75 µl	Quick-Solution Reagenz
0,50 µl	dNTPs
0,50 µl je	spezifische Mutageneseprimer (20 µM)
0,50 µl	QC-Lightning-Enzym
0,50 µl	Wildtypvektor psiCHECK <sup>TM</sup> -2[3'UTR-wt]

Die Mutagenese-Reaktion lief nach folgendem Programm ab:

1.Schritt	95°C	2 min
2.Schritt	95°C	20 s
3.Schritt	60°C	10 s
4.Schritt	47,2°C (miR-9)	4 min oder
	57,2°C (miR-22)	4 min
5.Schritt	Schritt 2-4 25x wiederholen	
6.Schritt	68°C	5 min

Nach erfolgter Mutagenese-Reaktion wurden die Ansätze auf Eis auf 37°C abgekühlt. Anschließend wurde dem Ansatz sofort je 1 µl *DpnI* Restriktionsenzym zugefügt, die Lösung vorsichtig resuspendiert und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. *DpnI* verdaut methylierte DNA, welche in diesem Fall das Ausgangs-Plasmid ohne Mutation ist. Diese wird dabei aus dem Ansatz entfernt, sodass nach dem Verdau nur noch Plasmide enthalten sind, welche die Punktmutation in der Bindestelle tragen. Diese wurden in einem größeren Maßstab in *E.coli* vervielfältigt, mittels Sequenzierung wurde die erfolgreiche Punktmutation überprüft. Anschließend konnten diese Plasmide ebenfalls für die Reporterstudien eingesetzt werden.

### 3.5.18 Dualer Reporter-Gen-Assay

Mit Hilfe eines dualen Reporter-Gen-Assays kann untersucht werden, ob Substanzen die Expression des Zielgens beeinflussen. Der verwendete psiCHECK<sup>TM</sup>-2 Vektor bietet die Möglichkeit, RNA Interferenz durch microRNAs zu untersuchen. Dafür wurde die 3'UTR-Region des DPP4 Gens nach dem Reporter-Gen *Renilla*fly Luziferase in eine Multiple Klonierungsstelle vor dem Stop-Codon kloniert. Initiiert die untersuchte microRNA RNA Interferenz gegen den 3'UTR Bereich, führt dies zur Spaltung und nachfolgenden Degradation der fusionierten mRNA. Die Messung der Abnahme der *Renilla*fly Luziferase Aktivität ist ein geeigneter Indikator des RNA Interferenz Effektes.

Der Expressionsvektor pGL4.10[luc2]enthält keinen eigenen Promotor, sodass die Promotorregion des DPP4-Gens in die Multiple Klonierungsstelle des *Firefly* Luziferase Reporter-Gen eingbracht wurde. Die Messung der Zunahme der *Firefly* Luziferase Aktivität ist ein geeigneter Indikator für die transkriptionsfördernde Wirkung der untersuchten Substanzen.

Im ersten Schritt wurden pro Loch je  $2 \times 10^5$  COV 434 Zellen in eine weiße 96-Lochplatte (Greiner) eingestreut. Nach 24 h wurden die Zellen mit den Luziferasevektoren transfiziert, für die microRNA-mRNA-Bindungsstudie erfolgte zusätzlich eine Kotransfektion der pre-microRNA mimics. Für die Promotorstudien erfolgte im Gegensatz dazu 24 h nach der Vektortransfektion für weitere 24 h eine Behandlung mit den zu untersuchenden Substanzen. Abschließend wurde die Luziferase-Aktivität 24 h nach der jeweiligen Behandlung gemessen.

Die Lumineszenzmessung erfolgte unter Verwendung des Dual Glo<sup>TM</sup> Luciferase Assay Systems (Promega) am Plattenreader infinite M200 (Tecan). Zunächst wurde eine Substratlösung (Dual Glo<sup>TM</sup> Luciferase Reagent) zur Messung der *Firefly* Luziferase-Aktivität hergestellt und 50 µl je Loch auf die Zellen gegeben. Die Lumineszenzmessung erfolgte nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur. Nach Beendigung der Messung wurden 50 µl einer zweiten Substratlösung (Dual Glo<sup>TM</sup> Stop&Glo® Reagent) pro Loch dazugegeben, welches gleichzeitig ein Inhibitor der *Firefly* Luziferase und ein Substrat für die *Renilla*fly Luziferase darstellt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde die *Renilla*fly Luziferase-Aktivität gemessen. Die beiden Werte wurden dann in Beziehung gesetzt, um den relativen Wert der Luziferase-Aktivität zu bestimmen.

## 4 Ergebnisse

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, ob Patientinnen mit polyzystischem Ovarsyndrom eine veränderte DPP4-Expression aufweisen und wodurch Abweichungen hervorgerufen werden könnten. Das Forschungsvorhaben „Untersuchung molekularer Faktoren der weiblichen Unfruchtbarkeit“ wurde durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg befürwortet. Zur Untersuchung der Fragestellung wurden zunächst Blutproben von Patientinnen des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie gesammelt und aufgearbeitet.

Mittels eines antikörperbasierten Nachweisverfahrens (ELISA) wurde die DPP4-Konzentration bestimmt. In einem anderen Verfahren der photometrischen Detektion des Substratumsatzes wurde die DPP4-Aktivität im Serum der Patientinnen ermittelt. Alle anderen zur Auswertung hinzugezogenen klinischen Parameter wurden im Rahmen der ärztlichen Behandlung ermittelt und aus den Patientenakten entnommen.

### 4.1 Zusammensetzung der Studienkohorte

Es wurden Blutproben von 288 Patientinnen des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie gesammelt. Die relevanten klinischen Parameter für statistische Untersuchungen sind in Tab. 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3**      **Klinische Parameter**

	<b>Nicht-PCOS</b>		<b>PCOS</b>		
	<i>n</i>	<i>Median</i>	<i>n</i>	<i>Median</i>	
<b>Alter [y]</b>	154 (100%)	32,00	134 (100%)	29,00	
<b>Gewicht [kg]</b>	152 (98,7%)	63,00	132 (98,5%)	73,00	
<b>BMI[kg/m<sup>2</sup>]</b>	152 (98,7%)	22,31	132 (98,5%)	25,90	
<b>HOMA</b>	7 (4,5%)	2,00	17 (12,7%)	2,24	
<b>Progesteron [nmol/l]</b>	63 (40,9%)	21,50	84 (62,7%)	3,00	***
<b>LH[U/l]</b>	39 (25,3%)	6,00	83 (61,9%)	11,24	***
<b>FSH [U/l]</b>	37 (24,0%)	5,43	83 (61,9%)	6,10	*
<b>LH/FSH Ratio</b>	37 (24,0%)	1,09	83 (61,9%)	1,90	***
<b>Prolaktin [mU/l]</b>	58 (37,7%)	246,00	77 (57,5%)	240,00	

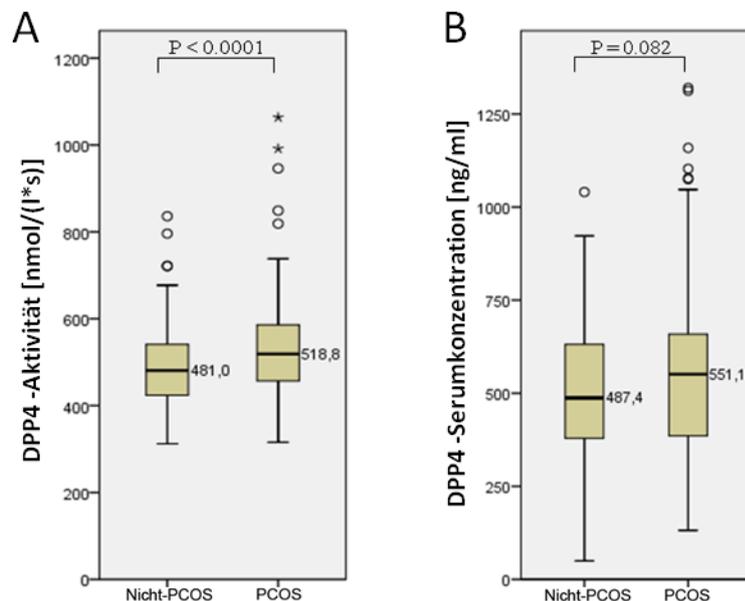
<b>Estradiol [pmol/l]</b>	100 (64,9%)	76 (56,7%)		
		504,94	453,42	
<b>AMH [pmol/l]</b>	100 (64,9%)	76 (56,7%)		
		1,67	4,19	***
<b>DPP4 Aktivität [nmol/(l*s)]</b>	154 (100%)	134 (100%)		
		486,93	536,87	***
<b>DPP4 Konzentration [ng/ml]</b>	154 (100%)	134 (100%)		
		506,78	560,44	

ANOVA: \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,0001

Um sicher zu gehen, dass das erstellte Kollektiv die wissenschaftlich bereits im Zusammenhang mit der Diagnose PCOS publizierten Fakten repräsentiert, werden zunächst die allgemeinen klinischen Parameter betrachtet. PCOS-Patientinnen zeigen eine teils hoch signifikante Erhöhung des LH-Spiegels, der FSH-Menge und des AMH-Wertes, jedoch geringere Estradiol- und Progesteron-Werte im Vergleich zu Kinderwunschpatientinnen ohne PCOS.

Die Diagnose erfolgte durch Frau OÄ Dr. Kaltwaßer und Frau Dr. Köller nach den Rotterdam-Kriterien, welche 2011 durch die *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) festgelegt wurden.

#### 4.1.1 PCOS-Patientinnen haben ein erhöhtes DPP4-Serumlevel



**Abbildung 4** Box Plots. Das untere und obere Ende der Box zeigt das 5. sowie 95. Perzentil, die mittlere Bande den Median. Extremwerte sind als Kreise und Sterne dargestellt. Vergleich der [A] DPP4-Aktivität und [B] DPP4-Konzentration im Serum von PCOS- und Nicht-PCOS-Patientinnen.

Die statistische Analyse der Daten zeigte eine Erhöhung der DPP4 Menge um 10 % im Serum von PCOS Patientinnen (Mann-Whitney-U  $P < 0.0001$ ; ANOVA  $P < 0.0001$ ). Die mittlere DPP4-Serumaktivität (Abb. 4A) der PCOS Patientinnen liegt bei  $536,87 \pm 120,30$  nmol/(l\*s) (n=134) und

Nicht-PCOS Patientinnen bei  $486,93 \pm 92,67$  nmol/(l\*s) (n=154). Ein ebenso auffälliger Unterschied zeigt sich für die DPP4-Serumkonzentration (Abb. 4B), auch wenn er statistisch nicht signifikant ist (Mann-Whitney-U P = 0.082; ANOVA P = 0.028). Die mittlere DPP4-Serumkonzentration der PCOS Patientinnen liegt bei  $560,44 \pm 228,87$  ng/ml und (n=134) und Nicht-PCOS Patientinnen bei  $506,78 \pm 169,95$  ng/ml (n=154).

Die Analyse möglicher Ursachen für die unterschiedliche DPP4-Menge zwischen den Gruppen zeigt, dass Übergewicht allein keine signifikante Assoziation zur erhöhten DPP4-Expression darstellt (Tab. 4).

**Tabelle 4 Aktivität und Konzentration der DPP4 im Serum abhängig vom BMI**

		DPP4 Aktivität [nmol/(l*s)]		DPP4 Konzentration [ng/ml]	
<b>Nicht-PCOS</b>	BMI<29	n = 135	484,50	P = 0,560	487,44
	BMI≥30	n = 16	471,50		491,22
<b>PCOS</b>	BMI<29	n = 86	523,50	P = 0,944	569,54
	BMI≥30	n = 45	518,00		505,53

Als nächstes soll untersucht werden, ob eines der Rotterdam-Kriterien den Unterschied der DPP4-Menge besonders hervorruft. Dafür wurden die Gruppen für die statistischen Tests nach den einzelnen Rotterdam-Kriterien aufgeteilt (Tab. 5). Die DPP4-Aktivität und Konzentration war beim Auftreten der einzelnen Symptome ebenso stark erhöht, in den meisten Fällen waren diese Unterschiede hoch signifikant.

**Tabelle 5 Aktivität und Konzentration der DPP4 im Serum abhängig von Rotterdam-Kriterien**

		DPP4 Aktivität [nmol/(l*s)]		DPP4 Konzentration [ng/ml]	
<i>Polyzystische Ovarien</i>	ja	n = 107	529,00	P < 0,0001	565,52
	nein	n = 158	478,75		473,72
<i>Oligomenorrhö</i>	ja	n = 147	507,00	P = 0,004	536,70
	nein	n = 122	483,00		497,00
<i>Hyperandrogenismus</i>	ja	n = 39	531,00	P = 0,002	586,30
	nein	n = 177	486,00		467,80

#### 4.1.2 Zusammenhänge mit weiteren klinischen Parametern

Zur Untersuchung von Korrelationen zwischen der gemessenen DPP4-Aktivität und Konzentration sowie klinischer Parameter wurde die Methode nach Spearman-Rho genutzt. Der Korrelationskoeffizient R sowie dazugehörige Signifikanzwerte sind in Tab. 6 dargestellt.

Es zeigt sich eine hoch signifikante Korrelation zwischen der DPP4-Menge im Serum der Patientinnen und dem AMH-Wert. Kein Zusammenhang zeigte sich hingegen zum LH:FSH-Quotienten, einem zuverlässigen Indikator für das PCOS. Progesteron- und Prolaktinmenge der Patientinnen korrelierte indirekt mit der DPP4-Menge, jedoch nicht signifikant.

**Tabelle 6 Bivariate Korrelation nach Spearman-Rho**

Spearman-Rho	DPP4 Aktivität [nmol/(l*s)]			DPP4 Konzentration [ng/ml]		
	n	R	P	n	R	P
AMH	179	0,257	<0,0001	175	0,146	0,054
Estradiol	143	-0,055	0,518	133	-0,094	0,280
HOMA	24	0,737	<0,0001	23	0,460	0,027
LH/FSH	120	0,068	0,458	108	-0,016	0,866
Progesteron	149	-0,138	0,094	138	-0,155	0,069
Prolaktin	137	-0,123	0,153	127	-0,157	0,078

#### 4.1.3 DPP4-Menge im Serum als Indikator für PCOS-Diagnose?

Die Receiver Operating Characteristic (ROC) analysiert, welche diagnostische Güte die Bestimmung der DPP4-Menge im Serum für die Diagnose des PCOS besitzt. Die dazu gehörigen Flächen unter der Kurve (AUC) sind in Tab. 7 zusammengefasst. Es zeigt sich, dass die alleinige Bestimmung der DPP4-Aktivität oder -Konzentration im Serum von Patientinnen kein aussagekräftiger Test ist, um ein PCOS zu diagnostizieren (AUC 0.561, P =0.082), obwohl ein signifikanter Anstieg der DPP4-Menge im Serum von PCOS-Patientinnen ermittelt werden konnte (Abb. 4).

Der AMH-Wert im Serum von PCOS-Patientinnen ist ebenso hoch signifikant erhöht und korreliert zudem nach Spearman-Rho sehr stark mit dem DPP4-Serum Level. Die statistische ROC-Analyse zeigt, dass das Serumlevel von AMH als Diskriminator dienen kann, um PCOS Patientinnen sehr gut von Nicht-PCOS-Patientinnen zu unterscheiden (AUC 0.827, P < 0.0001).

**Tabelle 7 Receiver Operating Characteristics (ROC)**

	DPP4 Aktivität [nmol/(l*s)]	DPP4 Konzentration [ng/ml]	AMH [pmol/l]
AUC	0,609	0,561	0,827
P	0,002	0,082	< 0,0001

## 4.2 Einfluss der PCOS-typischen hormonellen Dysbalance auf DPP4-Expression

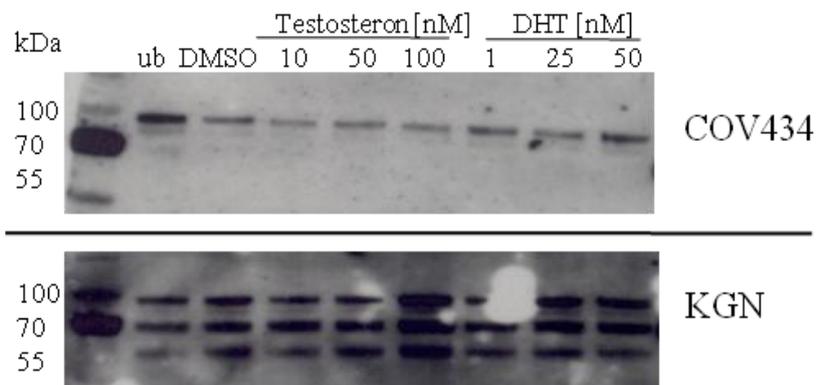
Im Mittelpunkt dieser Versuche steht die Fragestellung, ob die bei PCOS typischerweise vorkommenden hormonellen Dysbalancen (Hyperandrogenismus, Hyperinsulinämie oder Hyperglykämie) die *in vivo* nachgewiesene erhöhte DPP4-Menge im Serum von PCOS-Patientinnen verursachen. Dafür werden *in vitro* die Granulosakarzinomzelllinien COV434 und KGN für 72h mit verschiedenen Konzentrationen Testosteron, Dihydrotestosteron (DHT), Insulin oder Glucose inkubiert. Anschließend wird der Einfluss auf die DPP4-Protein - bzw. mRNA-Expression untersucht.

### 4.2.1 Einfluss der Steroidhormone Testosteron und DHT auf DPP4-Proteinexpression

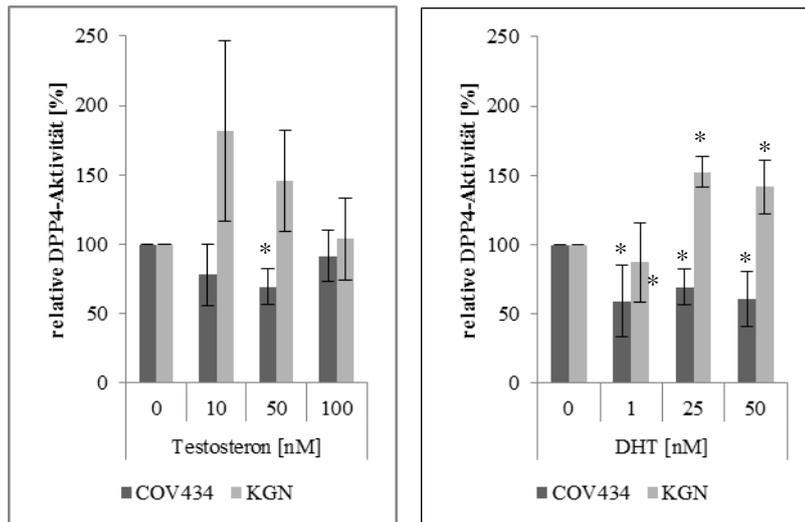
Da in den vorangegangenen statistischen Analysen die zirkulierende Form der DPP4 untersucht wurde, sollte auch die *in vitro* Analyse des Einflusses der Hormone auf die DPP4-Proteinexpression im Zellkulturüberstand untersucht werden. Der Nachweis von DPP4-Protein im Zellkulturüberstand

erfolgte mit dem monoklonalen Primärantikörper Anti-CD26 von Abcam (1:1000) und dem Sekundärantikörper Anti-Maus von Thermofisher (1:1500) (Abb. 5). Außerdem wurde in den Zellkulturüberständen die DPP4-Aktivität mittels eines Verfahrens der photometrischen Detektion des Substratumsatzes bestimmt (Abb. 6). Die erwartete Bandengröße für den Nachweis von DPP4 mit dem Anti-CD26 Antikörper von Abcam liegt bei 88 kDa. Treten kleinere Banden ober- und unterhalb der erwarteten Produktbande auf, handelt es sich laut Herstellerangaben um Modifikationen des Zielproteins.

Die Testosteronbehandlung der COV434 Zellen führt unabhängig von der eingesetzten Konzentration zu einer leichten Abnahme der Proteinmenge und Aktivität des DPP4-Proteins im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle. Die Behandlung der Zellen mit der biologisch aktiven Form des Testosteron, DHT, zeigt eine leichte Zunahme der Proteinmenge im Zellkulturüberstand, die gemessene DPP4-Aktivität hingegen ist unabhängig von der Konzentration geringer im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle. Die KGN-Zellen zeigen nach der Behandlung mit einer sehr hohen Testosteronkonzentration sowie durch Behandlung mit der aktivierten Form DHT eine Zunahme der DPP4-Proteinmenge im Zellkulturüberstand. Dies zeigt sich auch in der Messung der DPP4-Aktivität.



**Abbildung 5** Western Blot. Nachweis von ca 88 kDa großen DPP4-Protein im Zellkulturüberstand. Es wurden je 2 µl Probe aufgetragen. (ub-unbehandelte Kontrolle; DMSO-Lösungsmittelkontrolle)

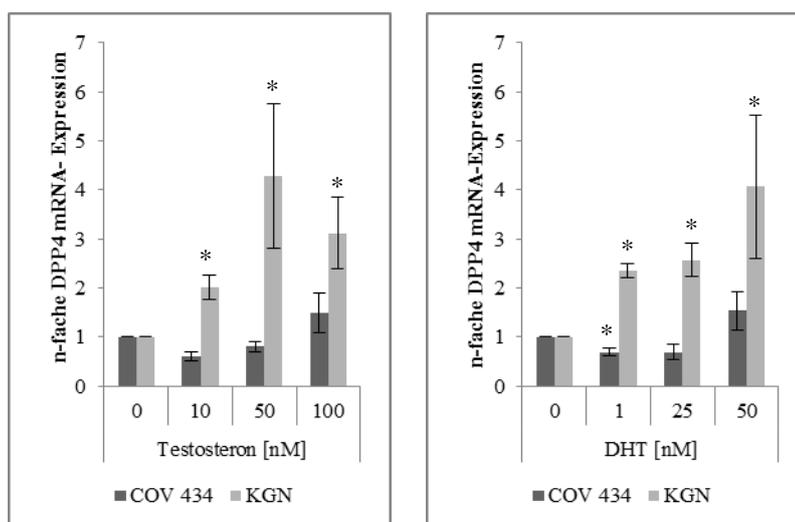


**Abbildung 6** Relative DPP4-Aktivität im Zellkulturüberstand der Granulosakarzinomzelllinien COV434 und KGN (t-Test, n=9; \* p<0,05).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass ein *in vitro* simulierter Hyperandrogenismus zu leichten Änderungen der freigesetzten DPP4-Menge in den Zellkulturüberstand führt. Dabei reagieren die beiden Granulosazelllinien KGN und COV434 nicht homogen. Während die DPP4-Aktivität im Überstand der COV434-Zellen unverändert bleibt oder eher sinkt, nimmt sie im Überstand der KGN-Zellen durch Steroidbehandlung signifikant zu.

#### 4.2.2 Einfluss der Steroidhormone Testosteron und DHT auf DPP4-mRNA-Expression

Es soll eine mögliche transkriptionelle Regulation der DPP4 mRNA-Expression durch die Behandlung der Granulosakarzinomzellen mit den Steroidhormonen untersucht werden. Dafür wird die RNA nach 72 h isoliert, in cDNA transkribiert und die DPP4 mRNA-Expression mit Hilfe einer quantitativen Realtime PCR ermittelt (Abb. 7).

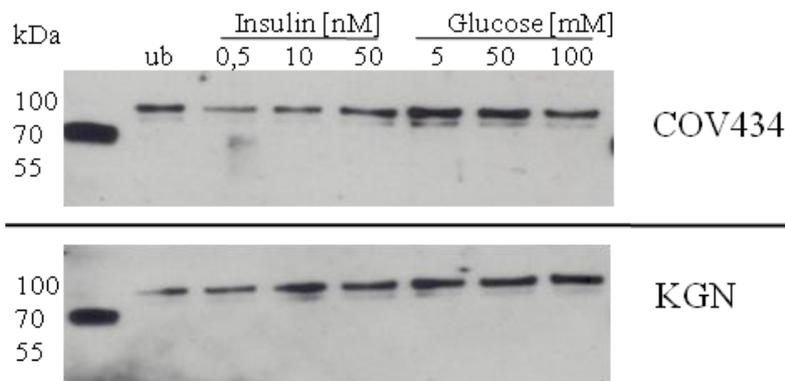


**Abbildung 7** Quantitative Realtime-PCR. Darstellung der n-fachen DPP4-mRNA-Expression bezüglich der DMSO-Lösungsmittelkontrolle (t-Test, n=9; \* p<0,05).

Es wird deutlich, dass die DPP4 mRNA-Expression in den KGN-Zellen mit steigender Hormonkonzentration um das zwei- bis vierfache zunimmt. Die mRNA-Expression in den COV434-Zellen hingegen nimmt nach Behandlung mit 10 nM Testosteron oder 1 bzw. 25 nM DHT zunächst ab, steigt jedoch nach Behandlung mit supraphysiologischen Hormonkonzentrationen ebenfalls leicht an.

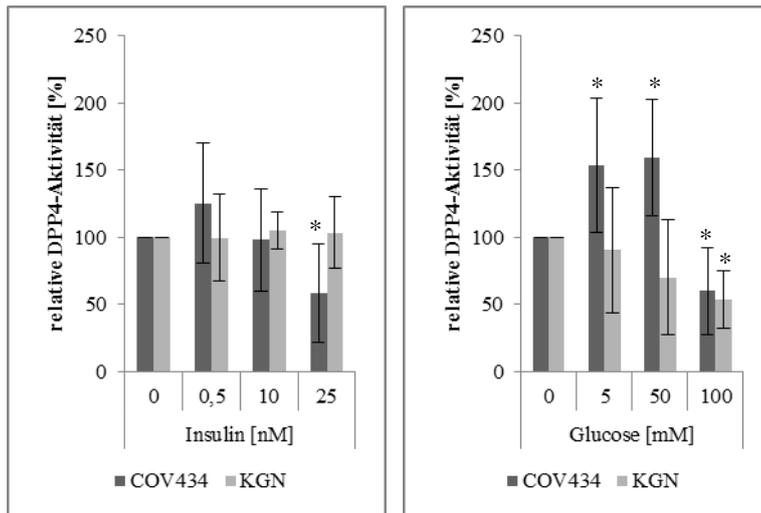
#### 4.2.3 Einfluss der Substanzen Insulin und Glukose auf DPP4-Proteinexpression

Die Analyse des Einflusses von Insulin und Glukose auf die DPP4-Proteinexpression soll im Zellkulturüberstand der Granulosakarzinomzellen COV434 und KGN nach 72 stündiger simulierter Hyperinsulinämie bzw. Hyperglykämie untersucht werden. Der Nachweis von DPP4-Protein im Zellkulturüberstand erfolgte ebenso mit dem monoklonalen Primärantikörper Anti-CD26 von Abcam (1:1000) und dem Sekundärantikörper Anti-Maus von Thermofisher (1:1500) (Abb. 8). Zudem wurde in den Zellkulturüberständen die DPP4-Aktivität mittels eines Verfahrens der photometrischen Detektion des Substratumsatzes bestimmt (Abb. 9).



**Abbildung 8** Western Blot. Nachweis von ca 88 kDa DPP4-Protein im Zellkulturüberstand. Es wurden je 2 µl Probe aufgetragen. (ub-unbehandelte Kontrolle)

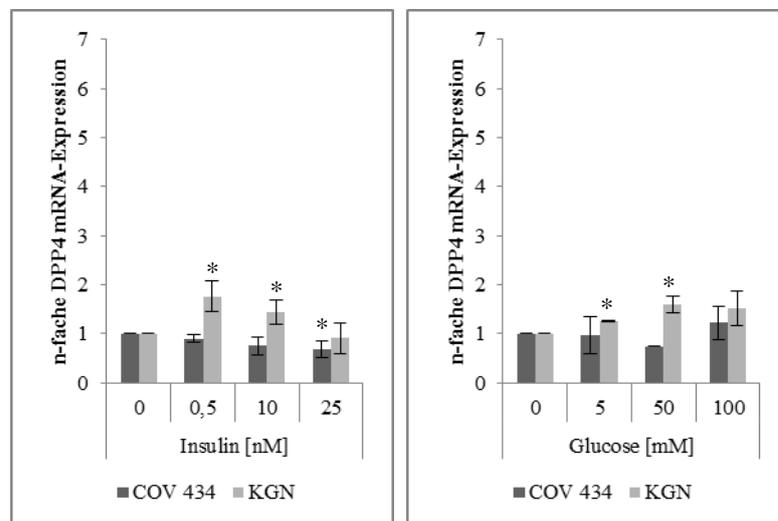
Die DPP4-Proteinmenge im Zellkulturüberstand der COV434- und KGN-Zellen verändert sich mit steigender Insulinkonzentration etwas, die DPP4-Aktivität im Überstand der KGN-Zellen bleibt jedoch konstant, im Überstand der COV434 nimmt sie ab. Eine Behandlung mit Glukose zeigt unabhängig von der Konzentration eine Zunahme der Proteinmenge der COV434-Zellkulturüberstände. Die Aktivität ist bei einer Behandlung mit 5 mM bzw. 50 mM Glukose ebenfalls erhöht, im supraphysiologischen Konzentrationsbereich sinkt sie hingegen ab. Im Gegensatz dazu zeigt die Glukose-Behandlung der KGN-Zellen unabhängig von der Konzentration eine Abnahme der DPP4-Aktivität, obwohl die Proteinmenge ähnlich wie bei den COV434-Zellen zunimmt.



**Abbildung 9** Relative DPP4-Aktivität im Zellkulturüberstand der Granulosakarzinomzelllinien COV434 und KGN (t-Test, n=9; \* p<0,05).

#### 4.2.4 Einfluss der Substanzen Insulin und Glukose auf DPP4-mRNA Expression

Im Gegensatz zur Proteinexpression zeigt die Untersuchung der DPP4 mRNA-Expression in COV434-Zellen mittels quantitativer Realtime-PCR keine Veränderung unabhängig der eingesetzten Konzentrationen Insulin oder Glucose. Auch in den KGN-Zellen bleibt die Expressionsrate nahezu konstant.



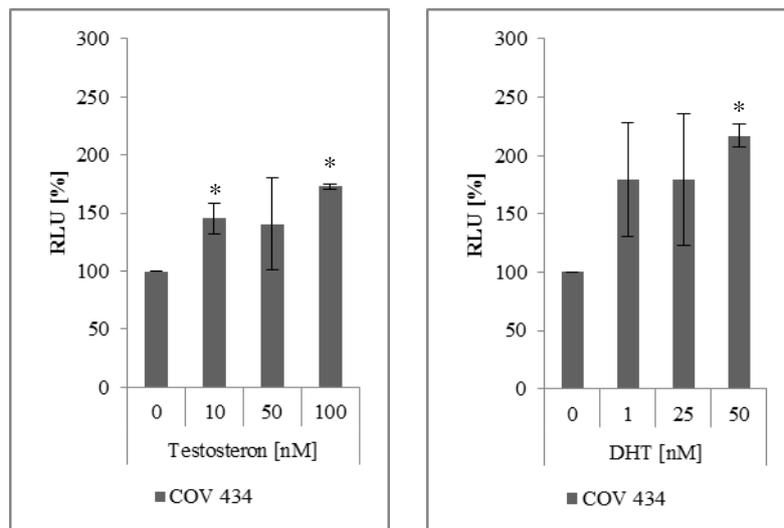
**Abbildung 10** Quantitative Realtime-PCR. Darstellung der n-fachen DPP4-mRNA-Expression bezüglich der unbehandelten Kontrolle (t-Test, n=9; \* p<0,05).

#### 4.2.5 Untersuchungen zur Promotorregulation mittels Luziferase-Reportergen-Assay

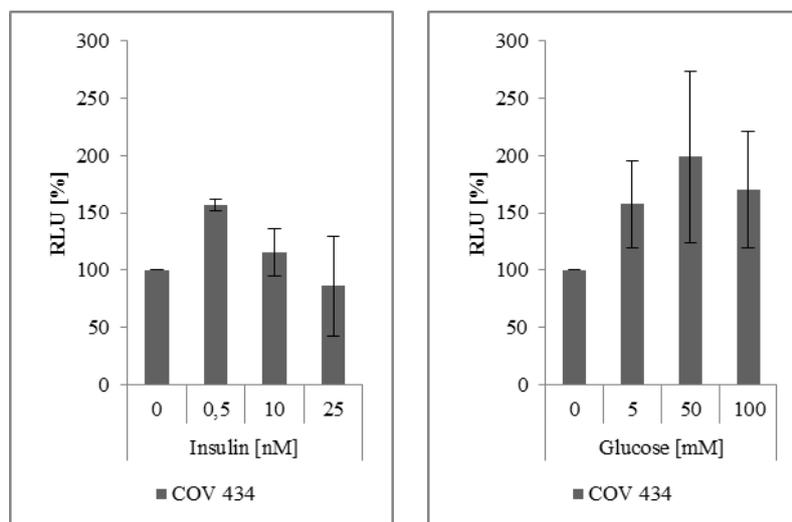
Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Granulosazellen mit den Steroidhormonen Testosteron und DHT zur Steigerung der DPP4-mRNA-Expression führt. Unter Zuhilfenahme eines Transkriptionsfaktor-Suchprogrammes TFSearch konnten *in silico* jedoch keine kanonischen Androgenrezeptor-Bindestellen in der Promotorregion des DPP4-Gens identifiziert werden. Deshalb

soll mittels Luziferase-Reportergen-Assay die Frage geklärt werden, ob die Steroidhormone die Genexpression über die Wechselwirkung mit der Promotorregion bewirken. Dafür wurde die fast 2000 bp lange Promotorsequenz in ein passendes Vektorsystem kloniert. Das enthaltene Luziferasegen wird demzufolge transkribiert, wenn die Hormone eine DPP4-Promotor aktivierende Wirkung besitzen. Ein Anstieg des durch Luziferaseaktivität verursachten Lumineszenzsignals korreliert deshalb mit der Wirkung des Hormons auf die DPP4-Promotorregion.

Die Plasmide konnten in COV434-Zellen erfolgreich eingebracht werden, sodass die Promotorstudien in dieser Zelllinie durchgeführt werden.



**Abbildung 11** Luziferase-Reportergenassay. Relative Lumineszenz nach Behandlung mit Steroidhormonen Testosteron und DHT (t-Test, n=9; \* p<0,05).



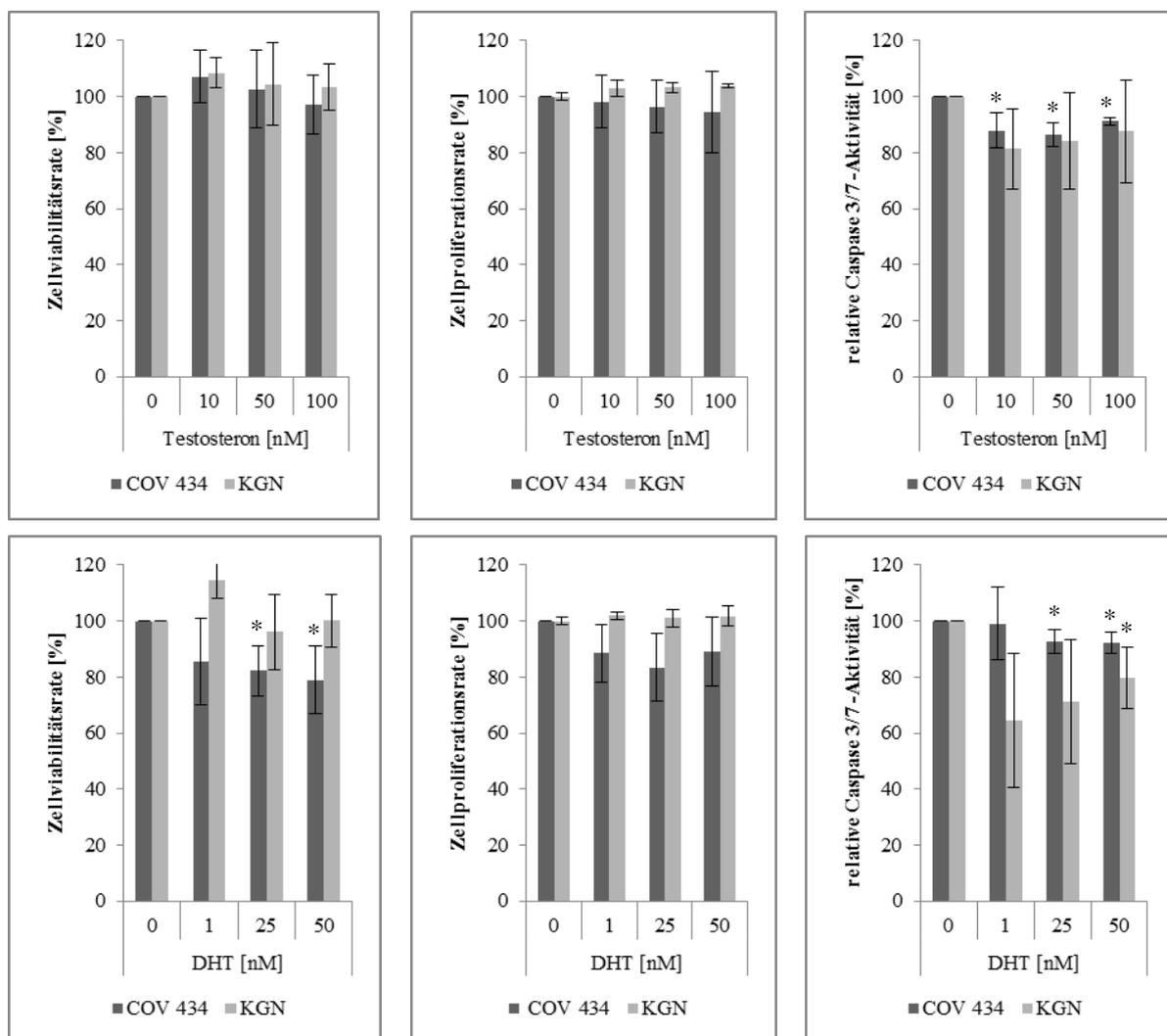
**Abbildung 12** Luziferase-Reportergenassay. Relative Lumineszenz nach Behandlung mit Insulin oder Glukose (t-Test, n=9; \* p<0,05).

In Abbildung 11 und 12 sieht man eine konzentrationsunabhängige Zunahme des Lumineszenzsignals nach 48 stündiger Inkubation der Zellen mit den Steroidhormonen Testosteron

und DHT oder Glucose. Mit steigender Insulin-Konzentration nimmt die Promotorstimulation ab (Abb. 12).

#### 4.2.6 Zellbiologische Effekte der Hormonbehandlung

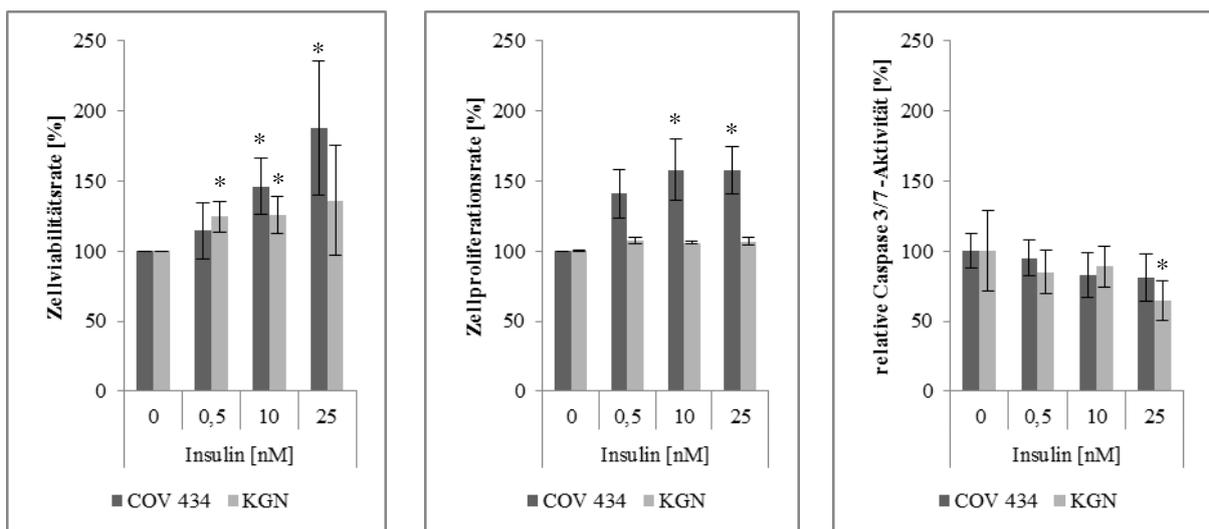
Ziel der Untersuchungen ist es, den Einfluss der Hormonbehandlung auf die Viabilität und das Proliferations- sowie Apoptoseverhalten der Zellen zu untersuchen. Zur Bestimmung der Zellviabilitätsrate wurde ein Sulforhodamin B (SRB) –Assay durchgeführt, welcher auf der Anfärbung lebender Zellen beruht. Bei zu Beginn identisch eingestreuten Zellzahlen kann bei einer Änderung der Farbintensität auf eine Veränderung der Zahl vitaler Zellen geschlossen werden. Die Bestimmung der Proliferationsrate erfolgte über die Messung eines Farbumschlages hervorgerufen durch Substratspaltung in metabolisch aktiven Zellen. Das Apoptoseverhalten der Zellen wurde untersucht, in dem das Verhältnis der Aktivität der Caspasen 3 und 7 ermittelt wurde.



**Abbildung 13** Effekte der Steroidhormone auf Viabilität, Proliferations- und Apoptoseverhalten der Granulosazellen (t-Test, n=9; \* p<0,05).

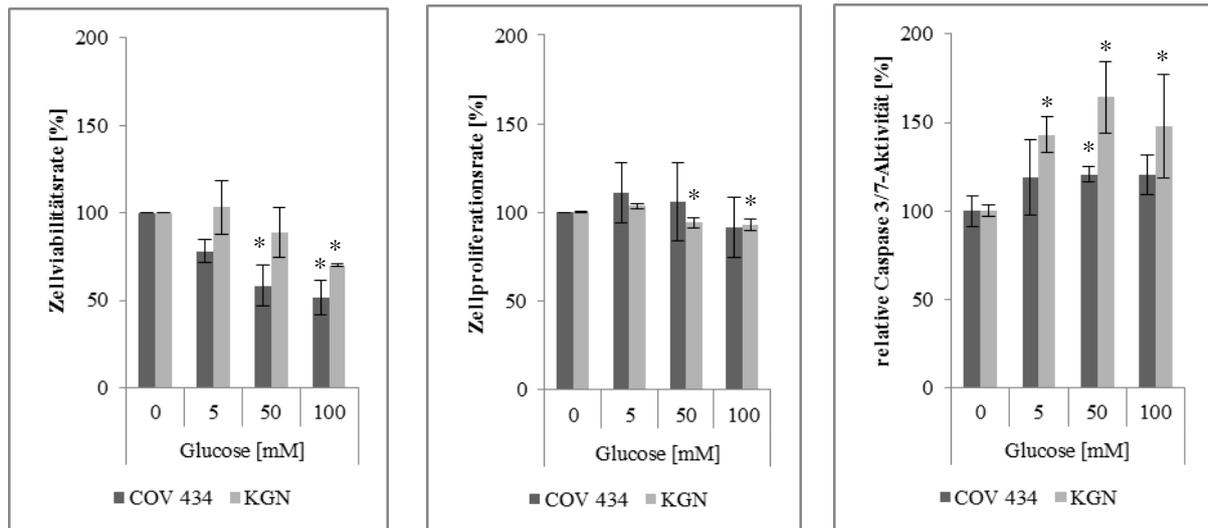
Die Behandlung mit Testosteron beeinträchtigt Viabilität und Proliferationsverhalten der Granulosazellen nicht, eine konzentrationsunabhängige Abnahme der Apoptoserate konnte jedoch detektiert werden (Abb. 13). Die aktivierte Form DHT senkt die Vitalität der COV434-Zellen, auch eine verminderte Proliferationsrate ist zu erkennen. Das Apoptoseverhalten nimmt jedoch nicht zu, sondern sinkt mit steigender Konzentration ebenfalls leicht. Die KGN-Zellen hingegen zeigen eine deutlich verminderte Apoptoserate, mit steigender Konzentration wird dieser Effekt aber wieder schwächer. Das Proliferationsverhalten der KGN-Zellen verändert sich nicht, die Viabilität nimmt nur in Anwesenheit geringer DHT-Konzentration zu, bei höheren DHT-Konzentrationen zeigt sich kein Unterschied zu den unbehandelten Zellen.

Die Behandlung der Zellen mit Insulin (Abb. 14) zeigt eine konzentrationsabhängige positive Wirkung auf die Viabilität der COV434-Zellen. Gleichzeitig steigt auch die Proliferationsrate durch die Behandlung mit Insulin stark an. Bei den KGN-Zellen konnte ebenfalls ein positiver, wenn auch nicht so starker Effekt auf die Viabilität detektiert werden, die Proliferation der Zellen bleibt jedoch unverändert. Die Apoptoserate nimmt bei beiden Zelllinien abhängig von der Insulinkonzentration ab.



**Abbildung 14** Effekte von Insulin auf Viabilität, Proliferations- und Apoptoseverhalten der Granulosazellen (t-Test, n=9; \* p<0,05).

Glukose bewirkt in den Granulosazellen eine entgegengesetzte Wirkung im Vergleich zu Insulin (Abb. 15). Die Viabilität beider Zelllinien nimmt mit steigender Glukosekonzentration immer stärker ab, ebenso sinkt die Proliferationsrate. Glukose steigert das Apoptoseverhalten der Zellen, wobei für die KGN-Zellen ein viel stärkerer Effekt eintritt als bei COV434-Zellen.



**Abbildung 15** Effekte von Glukose auf Viabilität, Proliferations- und Apoptoseverhalten der Granulosazellen (t-Test, n=9; \* p<0,05).

Zusammenfassend konnten *in vitro* Simulationsversuche zeigen, dass eine hohe Konzentration der Steroidhormone Testosteron und DHT eine Zunahme der DPP4-mRNA Expression hervorrufen kann. Im Zellkulturüberstand war ebenso eine Änderung der DPP4-Proteinmenge und Aktivität detektierbar. In Promotorstudien zeigte sich schließlich, dass die Steroidhormone einen direkten Einfluss auf die Promotoraktivierung zu haben scheinen, auch wenn *in silico* Studien zu Folge keine direkte Bindungsregion im Promotorbereich nachweisbar war.

In Promotorstudien zeigte die Behandlung mit Glucose ebenso eine Verstärkung der Promotoraktivität. Erstaunlicherweise war jedoch kaum eine Steigerung der mRNA-Expression zu verzeichnen, obwohl im Zellkulturüberstand beider Zelllinien eine erhöhte DPP4-Proteinmenge nachgewiesen werden konnte. Eine Behandlung mit Insulin bewirkt im Vergleich dazu die wenigsten Veränderungen in mRNA- oder Proteinexpression. Promotorstudien bestätigen, dass Insulin kaum einen Einfluss auf die Aktivität des DPP4-Promotors zeigt.

### 4.3 Untersuchungen zu putativen microRNA Regulatoren der DPP4-Expression

Im Mittelpunkt dieser Versuche steht die Fragestellung, ob die DPP4-Expression möglicherweise einer Regulation durch microRNAs unterliegt und ob eben diese an der Zunahme der DPP4-Konzentration und Aktivität im Serum von PCOS-Patientinnen beteiligt sein könnten.

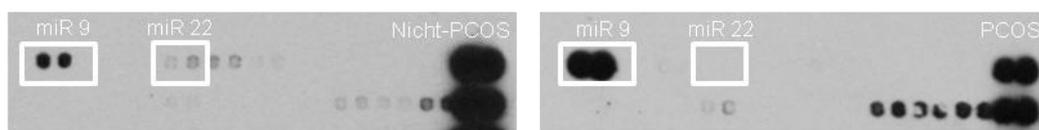
Zunächst war das Ziel der Untersuchungen, microRNAs zu identifizieren, die als potentielle Regulatoren der DPP4-Expression in Frage kommen. Dazu erfolgte *in silico* die Auswahl in Frage kommender microRNAs mit potentieller Bindestelle im 3'-UTR-Bereich des DPP4-Gens mit Hilfe 3 verschiedener Datenbanken (TargetScan, Pictar und miRBase). In einem anschließenden *micro Array* konnten für die microRNAs hsa-miR-9 und hsa-miR-22 Expressionsunterschiede im Serum von PCOS-Patientinnen und Nicht-PCOS-Patientinnen nachgewiesen werden. Mittels quantitativer

Realtime-PCR wurde die Expression dieser microRNAs im Serum aller Patientenproben untersucht. Zusätzlich erfolgten *in vitro* mRNA-microRNA-Bindungsstudien, um Aussagen über eine mögliche microRNA-Regulation zu erhalten.

#### 4.3.1 Identifikation putativer microRNA-Regulatoren der DPP4-Genexpression

Zur ersten Analyse der microRNA-Expressionsmuster im Serum von PCOS-Patientinnen im Vergleich zu Nicht-PCOS-Patientinnen wurde ein kommerzieller microRNA micro-Array durchgeführt. Die Dots zeigen dabei immer in Doppelbestimmung einen Nachweis spezieller microRNAs und werden nach einem Muster nach Herstellerangaben entsprechend ausgewertet.

Gleichzeitig erfolgte *in silico* die Auswahl von microRNAs mit potentieller Bindestelle im 3'-UTR-Bereich des DPP4-Gens mittels der microRNA-Datenbanken miRanda, TargetScan und Pictar. In Tabelle 8 sind die potentiellen Bindestellen der beiden ausgewählten microRNAs 9 und 22 dargestellt. MicroRNA 9 war im Serum der PCOS-Patientin viel stärker exprimiert, während microRNA 22 im microArray nicht nachgewiesen werden konnte. In weiterführenden Untersuchungen soll die Expression dieser beiden microRNAs im Serum des gesamten Kollektivs analysiert werden.



**Abbildung 16** Ausschnitt aus microRNA-microArray Membran. Nachweis von im Serum zirkulierenden microRNAs.

**Tabelle 8** microRNAs mit putativer Bindestelle im DPP4 3'UTR

Datenbanken			Seed-Sequenz	Bereich in DPP4-mRNA (3'UTR)
Pictar	miRanda	Target Scan		
9	9	9	3' AGUAUGUCGAUCUAUUG <u>GGUUUCU</u>	3487-3493
22	22	22	3' UGUCAAGAAGUUGAC <u>CCGUCGAA</u>	3632-3638

#### 4.3.2 Untersuchung zur Korrelation der microRNA- und DPP4-Expression im Serum

Mittels quantitativer Realtime-PCR soll die Expression der microRNAs 9 und 22 im Serum aller Patientenproben untersucht werden. Dazu erfolgte mittels Trizol/Chloroform-Fällung die Extraktion der microRNAs aus dem Serum. Diese wurden anschließend mit Hilfe des TaqMan-Systems in cDNA transkribiert und mittels quantitativer Realtime-PCR die Expressionsrate im Serum analysiert. Als Referenz-microRNA diente microRNA 16. Diese zeigte sich unabhängig von der PCOS-Diagnose als nahezu konstant exprimiert. Die ermittelten Expressionsdaten wurden anschließend ebenfalls mittels SPSS statistisch ausgewertet.

**Tabelle 9 Bivariate Korrelation nach Spearman-Rho**

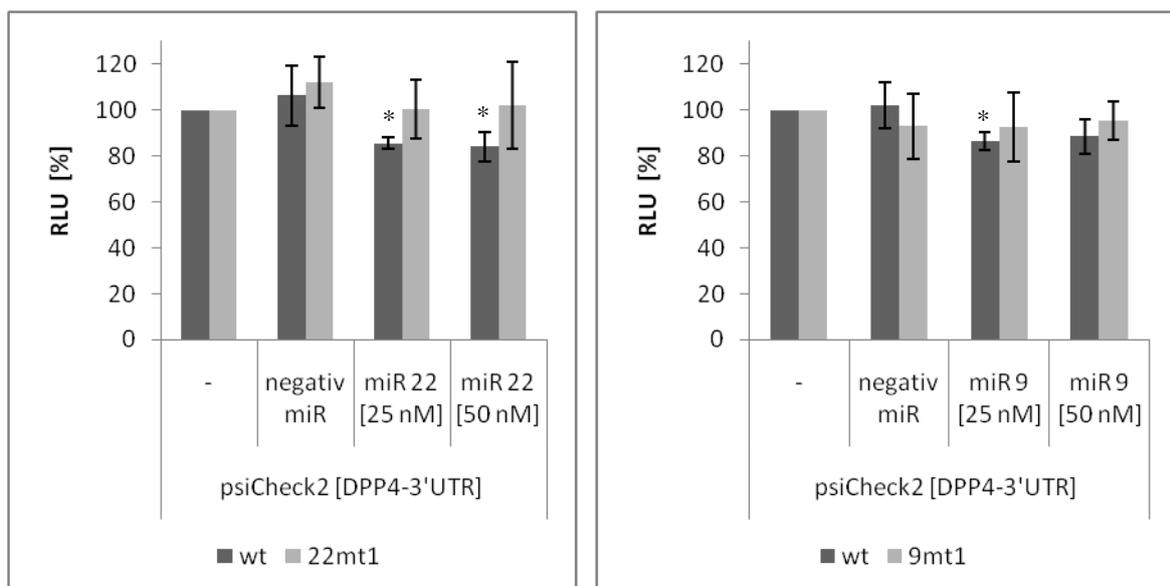
Spearman-Rho	DPP4 Aktivität [nmol/(l*s)]			DPP4 Konzentration [ng/ml]		
	n	R	P	n	R	P
<i>microRNA 22</i>	277	-0,137	0,022	266	-0,207	0,001
<i>microRNA 9</i>	277	-0,034	0,572	266	0,065	0,288

Für die Expression der miR-22 kann ein signifikanter indirekter Zusammenhang mit der gemessenen DPP4-Konzentration bzw. DPP4-Aktivität im Serum gezeigt werden (Tab. 9). Für die Expression der miR-9 trifft dies hingegen nicht zu.

Es zeigt sich kein signifikanter Expressionsunterschied der im Serum zirkulierenden microRNAs zwischen PCOS-Patientinnen und Nicht-PCOS-Patientinnen.

#### 4.3.3 microRNA-mRNA-Bindungsstudien mittels Luziferase-Reportergen-Assay

Ein Luziferase-Reportergen-Assay soll Aufschluss darüber bringen, ob die microRNAs tatsächlich an die *in silico* gefundenen Bindesequenzen binden und dadurch die DPP4-Expression regulieren können. Dazu wurden Plasmide generiert, die nach dem *Renilla*fly Luziferase-Gen den gesamten DPP4 3'UTR enthalten. Durch Mutagenese wurde zusätzlich entweder an der microRNA 9 Bindestelle oder microRNA 22 Bindestelle jeweils eine Base verändert. Somit wurden insgesamt 3 Plasmide für die Bindungsstudien generiert und sind wie folgt bezeichnet: Wildtyp 3'UTR - wt; Mutation in Bindestelle der microRNA 9 - 9mt1; Mutation in Bindestelle der microRNA 22 - 22mt1. Ist die Bindestelle mutiert, sollte ein Binden der microRNA nicht stattfinden und dadurch eine Aufhebung des reprimierenden Effektes zu beobachten sein. In Abbildung 17 ist die relative Lumineszenz dargestellt.



**Abbildung 17** Luziferase-Reportergenassay in COV434. Relative Lumineszenz nach Zugabe von microRNA 9 oder microRNA 22 (t-Test, n=9; \* p<0,05). (wt-Wildtyp; mt1-1 Mutation in Bindestelle)

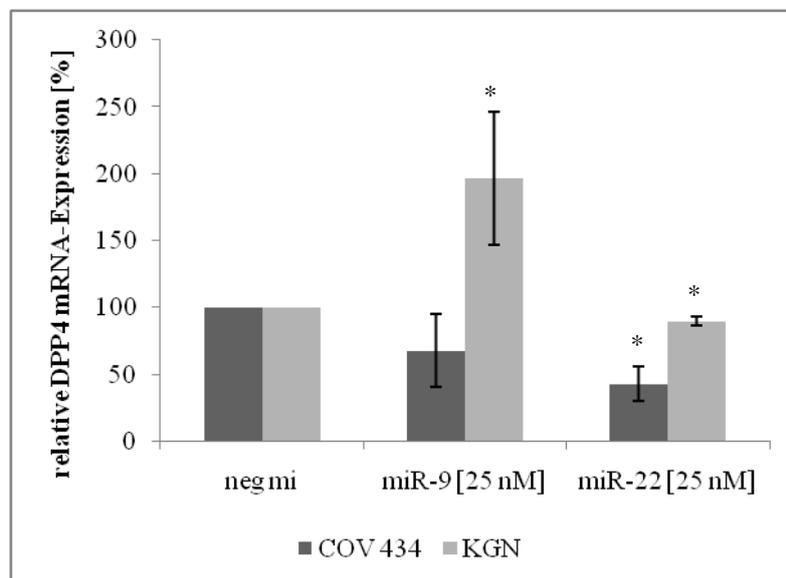
Das Renillafluy Luziferasegen wird über einen T7-Promotor konstitutiv exprimiert und enthält jeweils den Wildtyp bzw. mutierten 3'UTR des DPP4-Gens. Durch Zugabe der microRNAs 9 und 22 zum Wildtyp 3'UTR (wt) nimmt die Lumineszenz um etwa 15 bis 20% signifikant ab. Ist die Bindestelle mutiert, zeigt sich keine Lumineszenzabnahme.

Damit konnte gezeigt werden, dass die microRNAs 9 und 22 an den 3'UTR der DPP4-mRNA binden können und dass die *in silico* ermittelten Bindesequenzen *in vitro* bestätigt werden konnten.

#### 4.3.4 Einfluss der microRNAs auf DPP4-mRNA Expression

Mittels Luziferase-Reportergen-Assay konnte eine direkte microRNA-Bindung an dem 3'UTR der DPP4-mRNA nachgewiesen werden. In weiterführenden Expressionsanalysen soll untersucht werden, ob die microRNAs *in vitro* als Regulatoren der mRNA-Expression fungieren.

Dazu wurden die COV434 und KGN Zellen mit 25 nM Vorläufer microRNA behandelt. Nach 48 Stunden erfolgte die RNA-Isolation und cDNA-Synthese. Eine mögliche transkriptionelle Regulation der mRNA wurde mittels quantitativer Realtime-PCR untersucht (Abb. 18). Mittels Western Blot soll untersucht werden, ob eine Regulation der DPP4 Expression auch auf translationaler Ebene nachweisbar ist. Der Nachweis von DPP4-Protein im Zellkulturüberstand erfolgte ebenso mit dem monoklonalen Primärantikörper Anti-CD26 von Abcam (1:1000) und dem Sekundärantikörper Anti-Maus von Thermofisher (1:1500) (Abb. 19).



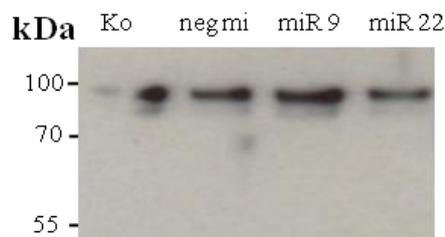
**Abbildung 18** Quantitative Realtime-PCR. Darstellung der relativen DPP4-mRNA-Expression bezüglich der mit negativ-mimic behandelten Kontrolle (t-Test, n=9; \* p<0,05).

In den COV434 Zellen nahm die DPP4 mRNA-Expressionsrate nach Behandlung mit microRNA 22 signifikant um fast 50% ab, in den KGN-Zellen sank sie auch signifikant um etwa 10 %. Der Effekt der microRNA 9 war in den Granulosazelllinien hingegen nicht homogen. Während die Expression in den COV434 Zellen abnahm, nahm sie in den KGN-Zellen signifikant stark zu.

#### 4.3.5 Einfluss der microRNAs auf DPP4-Protein Expression

Da mittels quantitativer Realtime PCR-Analyse ein regulierender Effekt der microRNA22 nachgewiesen werden konnte, soll nun auch die DPP4-Proteinmenge im Zellkulturüberstand der COV434 überprüft werden.

Im Western Blot lässt sich eine leichte Reduktion der DPP4-Proteinmenge nach Behandlung mit microRNA 22 vermuten. Jedoch nur bei einer minimalen Auftragungsmenge von 1 µl Zellkulturüberstand und einer sehr geringen Belichtungszeit von 3 Sekunden.



**Abbildung 19** Western Blot. Nachweis von ca 88 kDa DPP4-Protein im Zellkulturüberstand der COV434 Zellen. Es wurde je 1 µl Probe aufgetragen. Belichtungszeit 3 Sekunden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die microRNA 9 und 22 an der 3'UTR DPP4 mRNA bindet. Bei Anwesenheit der microRNA 22 erfolgte eine Reduktion der DPP4-Expression in den Granulosakarzinomzelllinien COV 434 und KGN. Diese *in vitro* gewonnenen Ergebnisse bieten eine mögliche Erklärung für den *in vivo* statistisch ermittelten indirekten Zusammenhang von microRNA-Menge und DPP4-Menge im Serum der Patientinnen.

## 5 Diskussion

Das Polyzystische Ovarsyndrom (PCOS) ist eine der häufigsten weiblichen endokrinen Erkrankungen und betrifft etwa 5 - 10 % der Frauen im reproduktiven Alter [4]. 2003 wurden von der *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) diagnostische Kriterien festgelegt, nach denen die Diagnose erfolgt [70]. Die Rotterdam-Kriterien beinhalten: (1) ovulatorische und menstruelle Dysfunktion wie Oligo- bzw. Amenorrhö und/oder (2) polyzystische Ovarien und/oder (3) das Auftreten eines klinischen oder biochemischen Hyperandrogenismus. Desweiteren zeigen die Betroffenen begleitende Erkrankungen wie Adipositas, Insulinresistenz oder Diabetes mellitus Typ 2 [75]. Escobar-Morreale hat PCOS als eine komplexe genetische Erkrankung beschrieben [32]. Zum jetzigen Zeitpunkt konnte weder ein biochemischer noch genetische Marker identifiziert werden, der sich als Referenz zur Diagnose des PCOS durch einen einfachen diagnostischen Test eignet [3]. Generell sollte ein potentieller Referenzgen mit der Steroidsynthese, der Follikulogenese sowie dem Insulin- und Glukose-Stoffwechsel in Verbindung gebracht werden können [32].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die zirkulierende DPP4-Menge im Serum von PCOS-Patientinnen und Nicht-PCOS Patientinnen unterscheidet. Die DPP4 spielt in der Regulation des Insulin- und Glukose-Stoffwechsels eine wichtige Rolle [73]. Um zu untersuchen, ob die DPP4 einen möglicher Verknüpfungspunkt der metabolischen und reproduktiven Prozesse darstellen könnte, wurde die Aktivität und Konzentration der DPP4 im Serum von 288 Patientinnen (134 PCOS-Patientinnen und 154 Nicht-PCOS Patientinnen) bestimmt. Lamers *et al.* beschrieben eine basale DPP4-Serumkonzentration von 200 bis 600 ng/ml [54]. In dieser Arbeit zeigte sich ein Konzentrationsbereich von 330 bis 780 ng/ml in beiden Gruppen. Jedoch ist die mediale Serumkonzentration der DPP4 bei PCOS-Patientinnen signifikant höher als bei Nicht-PCOS-Patientinnen. Die DPP4 Serumaktivität war ebenfalls in PCOS-Patientinnen signifikant erhöht. Unabhängig von der PCOS-Diagnose waren DPP4-Konzentration und Aktivität bei Frauen mit Hyperandrogenismus und/oder polyzystische Ovarien und/oder Menstruationsstörungen signifikant erhöht. Dass eine höhere Menge männliche Geschlechtshormone eine Erhöhung der DPP4-Aktivität im Serum begünstigt, zeigt eine Studie von Durinx *et al.*, in der die DPP4-Serum-Aktivität im Serum von Männern und Frauen ohne hormonelle Therapien (Kontrazeption oder Hormonersatz) verglichen wurde [26].

Im Gegensatz zu anderen Studien [54, 52] zeigte sich in dieser Arbeit kein Zusammenhang zum Bodymaßindex (BMI) der Patientinnen. In der Literatur wird beschrieben, dass das Alter [58] und die Medikation mit Anti-Diabetes-Therapeutika wie zum Beispiel Metformin [34] die DPP4 Aktivität beeinflussen kann. Dies könnten mögliche Gründe dafür sein, dass in dieser Studie kein Unterschied in der DPP4-Aktivität von leichten, normalgewichtigen und übergewichtigen Patientinnen zeigte. Kirino *et al.* beschreiben, dass es schwierig ist, aus den bisherigen Studien eine Beziehung zwischen DPP4-Aktivität und der Menge Blutglukose und BMI zu definieren. Zum einen sind die Ergebnisse der

einzelnen Studien untereinander kontrovers und die untersuchten Patienten haben unterschiedliche klinische Hintergründe, welche in den Studien nicht beachtet wurden [52]. Kirino und sein Team zeigten erstmals in einer Patientengruppe von 165 gesunden jungen Männern und Frauen ohne Medikation, dass die DPP4-Aktivität im Plasma hoch signifikant mit dem BMI korreliert [52]. Desweiteren wurde DPP4 als Adipokin identifiziert und als potentieller Verknüpfer von Übergewicht und metabolischen Syndrom diskutiert [54]. Bis zu diesem Zeitpunkt gibt es keine Studien darüber, die untersucht haben, ob DPP4 eine Rolle bei der Ausbildung des PCOS spielen könnte. DPP4 ist aus metabolischer Sicht bis jetzt bereits als Schlüsselfaktor bei der Insulinresistenz und der Entwicklung eines Diabetes mellitus bekannt und sehr gut untersucht. Denn die Regulatoren der Glukose-Homöostase, GLP-1 (Glukagon-ähnliches Peptid-1) und GIP (Glukoseabhängiges insulinotropes Peptid), sind Substrate der DPP4 [37]. Zur Behandlung von Diabetes mellitus gibt es eine Reihe von Medikamenten, die zusätzlich zur herkömmlichen Metformin-Therapie verabreicht werden [24]. In dieser Studie erhielten 68 % der PCOS Patientinnen Metformin, obwohl nur die Hälfte von ihnen tatsächlich an Diabetes mellitus leiden oder erblich vorbelastet sind. Metformin wird in der PCOS Therapie häufig als Medikament eingesetzt, obwohl dies außerhalb seines Zulassungsbereiches liegt. Doch es konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass die Metformingabe zu einer Normalisierung des Menstruationszykluses bei Frauen mit Oligo- oder Amenorrhö führt [38, 39]. Metformin fördert die Wiederherstellung eines ausgeglichen Hormonhaushaltes, unterstützt die Senkung eines zu hohen Androgenspiegels und trägt zur Normalisierung des Menstruationszykluses bei [61, 21]. Der niedrige Progesteron-Wert der PCOS-Patientinnen im Vergleich zu Nicht-PCOS-Patientinnen weist deutlich darauf hin, dass die meisten PCOS-Patientinnen keinen natürlichen Monatszyklus haben. Progesteron wird am Ende des Monatszyklus nach dem Eisprung vom Gelbkörper verstärkt produziert und soll den weiblichen Körper unter anderem auf eine mögliche Schwangerschaft vorbereiten [60]. Kommt es zu keiner Befruchtung und Einnistung der Eizelle, wird der Gelbkörper abgebaut und der Progesteron-Wert fällt wieder ab. Anschließend setzt die Monatsblutung ein [60]. Häufig bleibt bei PCOS-Patientinnen der Eisprung aus, wodurch kein Gelbkörper entsteht und somit auch kein Progesteron gebildet wird. Es ist anzumerken, dass in der Nicht-PCOS-Gruppe Frauen zusammengefasst wurden, die in unterschiedlichen Stadien ihres Zyklus sind. Der tatsächliche mediale Progesteron-Wert am Zyklusende kann durchaus noch vielfach höher sein, als der angegebene Wert in Tab. 3.

Auch wenn bis jetzt noch kein eindeutiger diagnostischer Marker für PCOS gefunden wurde, werden im klinischen Alltag diagnostische Parameter wie beispielsweise der AMH-Wert zusätzlich zur Diagnose mittels Rotterdam-Kriterien zu Rate gezogen. Das Anti-Müller-Hormon wird von Granulosazellen heranreifender Follikel freigesetzt und korreliert stark mit der Antralfollikel-Anzahl [27]. Mit zunehmendem Alter nimmt die Zahl der Antral-Follikel und somit auch der AMH-Spiegel ab [80]. In dieser Arbeit zeigte sich wie auch in anderen Studien eine signifikante vierfache Erhöhung des Serum-AMH Spiegels in PCOS Patientinnen [55, 90]. Es kann ausgeschlossen werden, dass dieser

Unterschied altersbedingt ist, da das Durchschnittsalter der beiden Gruppen mit 29 Jahren (PCOS) und 32 Jahren (Nicht-PCOS) nicht stark voneinander abweicht. Dewailly *et al.* publizierten bereits 2010, dass ein erhöhte AMH Serumspiegel sehr typisch für PCOS Patientinnen ist und sprach sich dafür aus, dies mit in die Reihe der diagnostischen Kriterien aufzunehmen, um die Zahl der Fehldiagnosen (Falschpositive und Falschnegative Diagnosen gleichermaßen) zu verringern [23].

Es zeigte sich in der statistischen Analyse dieser Arbeit nach Spearman-Rho ein hoch signifikanter positiver Zusammenhang zwischen dem AMH-Spiegel und der DPP4-Aktivität sowie Konzentration im Serum aller Patientinnen unabhängig von der Diagnose. Aus der Literatur ist dazu bis heute keine Studie veröffentlicht. Der statistische Test zur Beurteilung des Potentials des AMH-Serumspiegels, auf ein vorhandenes PCOS hinzuweisen, zeigte mit einem AUC von 0,8 deutlich die Tauglichkeit des Hormons als Marker für PCOS-Diagnose. Die Fläche kann Werte zwischen 0,5 und 1 annehmen, wobei ein höherer Wert die bessere Güte anzeigt, zwischen positiven und negativen (falschpositiven bzw. falschnegativen) Diagnosen zu unterscheiden. Die gemessene DPP4-Aktivität bzw. Konzentration zeigte mit einer AUC von 0,6 nur eine schwache diagnostische Relevanz für einen geeigneten Marker. Bezüglich des signifikanten Zusammenhanges zwischen DPP4-Menge und dem AMH-Spiegel im Serum sowie der Tatsache, dass PCOS-Patientinnen eine signifikant höhere DPP4-Menge im Serum aufzeigen, sollte die DPP4 bei der Aufklärung des Mechanismus des PCOS im Rahmen dieser Arbeit dennoch weiter untersucht werden.

Im Anschluss an die klinische statistische Studie stellte sich die Frage, wodurch der erhöhte DPP4-Serumspiegel in Frauen mit PCOS hervorgerufen wird. Da die Betroffenen zumeist an einem hormonellen Ungleichgewicht leiden, sollten *in vitro* die verschiedenen PCOS-typischen Symptome simuliert werden. Für die Untersuchungen wurden die Zelllinien COV 434 und KGN verwendet. Diese humanen Zellen entstammen aus hochgradigen Granulosazelltumoren des Ovars, wobei die der Ursprungstumor der COV 434 Zellen bereits metastasiert war, der der KGN-Zellen noch nicht [48].

Es ist bekannt, dass Androgene eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Funktion der Ovarien spielen [79]. Sen und Hammes zeigten mit einem *knockout* Mausmodell, in dem das Androgenrezeptor-Gen deaktiviert war, dass die Ovulationsrate abnahm, was unter anderem die Fertilität der weiblichen Mäuse beeinträchtigte. Desweiteren stellten sie fest, dass die Oozytenreifung nach Stimulation mit Androgenzugabe ausblieb [79]. Ebenso wird angenommen, dass Androgene für das stagnierende Follikelwachstum in PCOS-Patientinnen mit polyzystischen Ovarien verantwortlich sind, welches aus einem Hyperandrogenismus hervorgehen kann [41, 29]. Es sind bis jetzt nur wenige Gene im Ovar bekannt, die über die Aktivierung des Androgenrezeptors durch Androgene reguliert werden [95]. Unter anderem wird darüber die Expression des FSH-Rezeptors verstärkt [94].

Es ist weiterhin bekannt, dass Testosteron die Aromatase-Expression in Granulosazellen über Stimulation des Promotors verstärkt [35, 46, 95]. Der molekulare Wirkmechanismus der Androgene ist schon seit langem bekannt und gut untersucht. Ein Teil des Testosterons wird durch eine

Steroid-5 $\alpha$ -Reduktase in das stärkere Androgen DHT umgewandelt, beide Androgene interagieren mit dem intrazellulären Androgenrezeptor [14, 15]. Dieser Komplex kann eine Expressionssteigerung oder Hemmung Androgen-responsiver Gene hervorrufen, in dem er an Androgen-responsive Elemente (ARE) in deren Promotorbereich bindet [16].

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob ein für PCOS typischer Hyperandrogenismus und damit verbunden die erhöhte Steroidkonzentration die Erhöhung der DPP4-Menge im Serum von PCOS-Patientinnen hervorrufen könnte. Zur Simulation eines Hyperandrogenismus wurden die Granulosakarzinomzellen COV 434 und KGN mit verschiedenen Konzentrationen der Steroidhormone Testosteron und Dihydrotestosteron inkubiert. Die Effekte auf die DPP4-mRNA Expression wurden im Isolat der zellulären RNA untersucht. Der Einfluss auf die Proteinexpression sollte am Gehalt der DPP4-Menge im Zellkulturüberstand untersucht werden. Dies ermöglicht einen besseren Vergleich *in vivo* ermittelter Zusammenhänge mit *in vitro* gemessenen Daten. Untersuchungen in diesem Zusammenhang sind aus der Literatur nicht bekannt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Behandlung der Granulosazellen mit Androgenen eine Steigerung der DPP4-mRNA-Expressionrate hervorruft. Dabei reagierten die KGN-Zellen bereits in der Anwesenheit physiologischer Konzentrationen Testosteron und DHT mit einer Verdopplung der Expressionsrate. Wurden die Zellen mit höheren Konzentrationen Steroide behandelt, stieg die DPP4-Expressionsrate sogar um das 3 bis 4,5-fache. In den COV 434 Zellen stieg die Expression nur unter Behandlung mit supraphysiologischen Konzentrationen Testosteron und DHT leicht an. Betrachtet man die Menge freigesetztes DPP4 im Zellkulturüberstand der Granulosakarzinomzellen, lässt sich keine Zunahme in dieser Größenordnung feststellen. Es scheint, dass nur die Behandlung mit der biologisch aktiveren Form DHT eine leichte Zunahme der Proteinmenge im Überstand der beiden Zelllinien COV 434 und KGN hervorruft. Untersucht man die dazugehörige Aktivität der DPP4, zeigt sich auch hier für die KGN-Zellen eine erhöhte DPP4-Aktivität im Zellkulturüberstand nach Behandlung der Zellen mit supraphysiologischen Konzentrationen DHT. Im Überstand der COV 434 Zellen veränderte sich die Aktivität der DPP4 im Überstand kaum, die Behandlung mit DHT verursachte sogar eine leichte Abnahme. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Androgene prinzipiell einen stimulierenden Effekt auf die DPP4-Genexpression haben. Wie stark dieser ausgeprägt ist, scheint abhängig von den Eigenschaften der verwendeten Granulosakarzinomzelllinien zu sein.

Es stellte sich anschließend die Frage, ob diese Effekte durch eine direkte Stimulation des DPP4-Promotors durch die Androgene hervorgerufen werden. Dazu wurden Luziferase-Reportergen-Studien durchgeführt. Dafür wurde ein Fragment in einen Luziferase-Expressionsvektor kloniert, welches den fast 2000 bp langen Promotorbereich des DPP4-Gens kodiert. Das Prinzip des Assay besteht darin, dass das Luziferasegen nur dann exprimiert werden kann, wenn der künstlich eingefügte DPP4-Promotor aktiviert wird. Im Versuch zeigte sich eine Verdopplung des Lumineszenzsignals

durch die Zugabe von DHT, bei einer Behandlung mit Testosteron stieg die Lumineszenz um das 1,5 fache an. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der DPP4-Promotor durch Testosteron, etwas stärker noch durch DHT aktiviert werden kann. *In silico* konnte zunächst kein Motiv eines Androgenresponsiven Elementes gefunden werden. Möglicherweise bindet der Androgen-Rezeptor-Komplex nur schwach, doch da er im Überschuss vorliegt, reicht diese schwache Bindung vielleicht aus, um die Transkription zu verstärken. Ob es vielleicht doch Bindungsmotive gibt und in welchem Bereich des DPP4-Promotors diese liegen, könnte untersucht werden, wenn man einzelne Promotorfragmente untersucht. Dabei wäre zu erwarten, dass nur dann eine Änderung des Lumineszenzsignals auftritt, wenn ein Bereich des Promotors im Luziferase-Expressionsvektor enthalten ist, der die Bindestelle enthält. Untersucht man viele kleine Promotorfragmente, ließe sich der Bereich der Bindestelle genauer lokalisieren.

Ein signifikanter Anteil der PCOS-Patientinnen leidet auch an Insulinresistenz [25, 32]. Insulin, freigesetzt aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas, ist beteiligt an der Regulation des Glukose-Stoffwechsels [25]. Es stimuliert die Glukoseaufnahme vor allem in Muskel, Leber- und Fettzellen, um die Glukose-Homöostase im Körper aufrecht zu erhalten [96]. Ist die Insulin-Toleranz gestört, entweder durch defekte Insulinrezeptoren oder durch defekte  $\beta$ -Zellen [25], entwickelt sich eine Insulin-Resistenz. Diese wiederum stört die Glukose-Toleranz, wie es in 30 bis 40 % der Frauen mit PCOS der Fall ist [29]. Die Insulin-Sensitivität in den Ovarien bleibt jedoch erhalten [25]. So steigert Hyperinsulinämie zum einen die Androgenproduktion in den Ovarien exzessiv und geht somit mit dem Auftreten eines Hyperandrogenismus einher [96]. Zum anderen hemmt Hyperinsulinämie die Produktion von SHBG (Sexualhormon-bindendes Globulin) in der Leber. Dadurch kann weniger freies Testosteron in Körperflüssigkeiten gebunden und dessen biologische Wirkung weniger gehemmt werden [96]. Wie bereits erwähnt ist DPP4 aus metabolischer Sicht bis jetzt bereits als Schlüsselfaktor bei der Insulinresistenz und der Entwicklung eines Diabetes mellitus bekannt und sehr gut untersucht. Denn die Inkretinhormone GLP-1 und GIP sind einerseits hauptverantwortlich für die Regulation der Insulinsekretion und andererseits selbst Substrate der DPP4 [37]. Das Enzym DPP4 baut Inkretine, also GLP-1 und GIP, normalerweise in Minutenschnelle ab. So können diese nur für sehr kurze Zeit wirken [73]. Eine Inhibition der DPP4-Aktivität ist aus diesem Grund eine der häufigsten Therapiemethoden zur Behandlung der Insulinresistenz bei Diabetes mellitus [1].

Es gibt bereits Untersuchungen über die Regulation der DPP4-Genexpression durch Insulin und Glukose. Versuche in der Kolonkarzinomzelllinie CaCo-2 zeigten eine negative Korrelation der DPP4-Expression und den Glukosekonzentrationen, mit denen die Zellen behandelt wurden [42]. Eine weitere Untersuchung zeigte diesen Zusammenhang in Adipozyten [22]. Das Team um Lamers beschrieb einerseits erstmals die DPP4 als Adipokine, welches eine Bedeutung für die Verbindung von Übergewicht und metabolischem Syndrom haben könnte. Andererseits zeigten sie eine Zunahme der DPP4-Menge im Überstand kultivierter Adipozyten nach Behandlung der Zellen mit Insulin [54].

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie Insulin und Glukose die DPP4-Expression in den Granulosakarzinomzelllinien COV 434 und KGN regulieren. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Insulin und Glukose behandelt. Die Effekte auf die DPP4-mRNA Expression wurden im Isolat der zellulären RNA untersucht. Der Einfluss auf die Proteinexpression sollte am Gehalt der DPP4-Menge im Zellkulturüberstand untersucht werden.

Weder Insulin noch Glukose induzierte eine nennenswerte Veränderung der DPP4 mRNA-Expression in den Granulosazellen. Im Gegensatz zur Steroidbehandlung reagierten die Zelllinien einheitlich. Allerdings konnte im Zellkulturüberstand der COV 434 und KGN Zellen eine Erhöhung der löslichen DPP4-Menge nach Behandlung mit Glukose nachgewiesen werden. Im Überstand der COV 434 konnte zudem eine erhöhte DPP4-Aktivität detektiert werden, im Überstand der KGN-Zellen nahm die Aktivität hingegen leicht ab. Die Zunahme der DPP4-Menge im Überstand widerspricht den Daten der Studien von Gu *et al.* und Das *et al.*, die eine Abnahme der DPP4-Expression durch Glukose beobachtet haben [22, 42]. Dieser Unterschied könnte auf die verwendeten Zelllinien zurück geführt werden. Während die vorangegangenen Studien in Kolonkarzinomzellen und differenzierten Adipozyten durchgeführt wurde, sind die Zellmodelle dieser Arbeit Granulosazellen. Zellmodell-unabhängig kann jedoch der Luziferase-Reportergen-Assay betrachtet werden. Hierfür wurde derselbe DPP4 Promotor-Fragment enthaltende Luziferase-Expressionsvektor verwendet, wie in den Studien der Steroidhormone. Die Zugabe von Insulin stimuliert nur in geringer Konzentration die Promotoraktivität. Mit steigender Konzentration sinkt die Lumineszenz, somit auch die Aktivität des Promotors. Glukose stimuliert konzentrationsunabhängig im Vergleich zu Insulin leicht die Promotoraktivität.

Neben den Untersuchungen des Einflusses PCOS-typischer Symptome auf die DPP4-Genexpression soll auch der Einfluss auf die Granulosazellen untersucht werden.

Die Behandlung der COV 434 und KGN Zellen mit Testosteron zeigt einen anti-apoptotischen Effekt in den Granulosakarzinomzelllinien COV 434 und KGN. Dies ergänzt Studien von Ono *et al.*, in der gezeigt wurde, dass Testosteronmangel mit der Apoptose von COV 434 Granulosazellen einhergeht [67]. Die aktivierte Steroidform DHT wirkte anti-apoptotisch auf KGN-Zellen, hat jedoch keinen Einfluss auf deren Proliferationsverhalten. Die Proliferationsrate und Viabilität von COV 434 Zellen nimmt in Anwesenheit von DHT hingegen ab, ein Effekt auf das Apoptoseverhalten wurde nicht detektiert. Untersuchungen in Ratten-Granulosazellen zeigten, dass eine Hemmung der Zellproliferation durch DHT dadurch vermittelt wird, dass es unter anderem die Cyclin D2 mRNA-Expression reprimiert [68]. Cyclin D2 ist ein positiver Zellzyklusregulator, eine Reduktion führt zur Blockierung des Zellzyklus im Stadium der G1/S-Phase. Dadurch kann die Zelle nicht in die DNA-Replikationsphase übergehen. Da für eine erfolgreiche Follikelreifung und Ovulation das Wachstum der Granulosazellen wichtig ist, könnten die pathophysiologischen Bedingungen eines Hyperandrogenismus an der Ausbildung polyzystischer Ovarien mitverantwortlich sein.

Je höher die Konzentration war, mit der COV 434 Zellen inkubiert wurden, stieg auch die Proliferationsrate der Zellen. Auf die Proliferation von KGN-Zellen hatte Insulin keinen Einfluss. Ein zunehmend anti-apoptotischer Effekt wurde bei beiden Zelllinien mit steigender Insulinkonzentration beobachtet. Der Literatur ist zu entnehmen, dass den Insulinähnlichen-Wachstumshormonen IGF-1 und IGF-2 bereits eine Beteiligung an der Induktion mitogener und anti-apoptotischer Signalwege nachgewiesen werden konnte [59].

Glukose bewirkt in den Granulosazellen genau entgegengesetzte Effekte wie Insulin. Die Viabilität beider Zelllinien sinkt zunehmend mit steigender Konzentration. Glukose steigert zudem das Apoptoseverhalten der Zellen, wobei die pro-apoptotische Wirkung in KGN-Zellen stärker ausgeprägt war als bei COV 434-Zellen. Laut Literatur kann Glucose sowohl pro- als auch anti-apoptotische Signalwege in Zellen beeinflussen. Die jeweilige Wirkung ist scheinbar Zelltyp-abhängig. Studien mit primären humanen Zellen aus dem Pankreas zeigten ebenfalls eine Apoptose-Induktion nach Behandlung der Zellen mit Glukose [56]. Die Arbeit von Maedler *et al.* zeigte, dass die pro-apoptotische Wirkung in den Zellen durch eine Hochregulation des Fas-Rezeptors verursacht wird, einem Mitglied der Familie der sogenannten „Todesrezeptoren“. Untersuchungen in Schaf-Granulosazellen hingegen zeigten eine Zunahme der Zellzahl nach Inkubation der Zellen mit Glucose für 8 Tage [11]. In Studien über die Oozytenreifung wurden ebenfalls hemmende und fördernde Wirkung auf die Reifung selbst beobachtet. Zum einen ist Glukose für eine Hormoninduzierte Reifung notwendig, jedoch konnte unter bestimmten Kultivierungsbedingungen beobachtet werden, dass erhöhte Glukosemengen die Reifung von Maus-Oozyten unterdrücken können [13, 19].

Eine völlig andere Art der Gen-Expressionsregulation kann durch microRNA-Bindung am 3'UTR von mRNAs erfolgen. MicroRNAs sind kurze, endogene, nicht kodierende Einzelstrang-RNA Moleküle, die durch komplementäre Basenpaarung an den 3'UTR einer Ziel-mRNA binden können, wodurch es sowohl zur Inhibierung der Translation als auch zur Destabilisierung der mRNA kommen kann [8, 86]. Es gibt bereits viele Studien, welche die Expression von microRNAs in verschiedenen Komponenten des Ovars untersuchen [86], unter anderem auch in Granulosazellen [83]. Es existieren zudem bereits einige Untersuchungen zur Bedeutung der microRNAs für die Ausprägung der pathophysiologischen Symptome eines PCOS. So wurden microRNAs identifiziert, die negativ mit dem Testosteronspiegel der PCOS-Patientinnen korrelieren [84] oder mit dem Auftreten einer Insulinresistenz einhergehen [74]. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die erhöhte DPP4-Expression im Serum von PCOS-Patientinnen durch DPP4-spezifische microRNAs hervorgerufen werden könnte. Mittels Computertechnik-gestützter Untersuchungen konnten einige potentielle microRNAs identifiziert werden, die eine komplementäre Bindung im 3'UTR der DPP4-mRNA eingehen könnten. Doch in der Literatur gibt es zu keiner dieser microRNAs Studien über eine mögliche Beteiligung an der Regulation der DPP4-Expression. In einem anschließenden *micro Array* wurde die Expression vieler verschiedener microRNAs im Serum einer PCOS-Patientin und Nicht-

PCOS-Patientin untersucht. Es zeigte sich ein stark verändertes microRNA-Expressionsmuster im Serum der PCOS-Patientin. Gestützt durch diesen *micro Array* wurden die beiden microRNAs miR-9 und miR-22 für weiterführende *in vitro* Untersuchungen ausgewählt. Für diese beiden microRNAs konnte sowohl eine putative mögliche Bindestelle im 3'UTR der DPP4-mRNA, als auch ein verändertes Expressionsmuster im *micro Array* nachgewiesen werden. Anschließend wurden von allen 288 Patientinnen die zirkulierenden microRNAs miR-9 und miR-22 aus dem Serum isoliert. Mittels quantitativer Realtime-PCR erfolgte die Bestimmung der jeweiligen Expressionsrate im Serum bezogen auf die Referenz-microRNA 16. Diese zeigte sich in allen Proben unabhängig von der jeweiligen Diagnose als nahezu konstant exprimiert. Zudem beschrieb die Gruppe um Song *et al.* die microRNA miR-16 als geeignetes Referenzgen für die microRNA-Analyse im Serum [85].

Die statistische Analyse der ermittelten Daten zeigte einen signifikanten indirekten Zusammenhang zwischen der zirkulierenden microRNA miR-22 und der im Serum gemessenen DPP4-Aktivität sowie Konzentration. Eine Korrelation zum Auftreten eines PCOS konnte nicht nachgewiesen werden.

Der Zusammenhang zwischen zirkulierender miR-22 und DPP4-Menge im Serum könnte ein erster Hinweis auf eine mögliche microRNA-Regulation der DPP4-Expression durch die microRNA miR-22 sein. Dieser Zusammenhang wurde in Luziferase-Reportergen-Studien näher untersucht. Dazu wurde der gesamte 3'UTR der DPP4-mRNA in einen geeigneten Luziferase-Expressionsvektor kloniert.

Der verwendete psiCHECK<sup>TM</sup>-2 Vektor bietet die Möglichkeit, RNA Interferenz durch microRNAs zu untersuchen. Durch einen dem Luziferasegen vorangeschalteten T7-Promotor wird die fusionierte mRNA konstitutiv exprimiert. Initiiert die untersuchte microRNA RNA Interferenz gegen den 3'UTR Bereich, führt dies zur Spaltung und nachfolgenden Degradation der fusionierten mRNA. Die Messung der Abnahme der Luziferase Aktivität ist ein geeigneter Indikator des RNA Interferenzeffektes.

Es konnte eine signifikante Lumineszenzabnahme durch die Behandlung der Zellen mit miR-22 nachgewiesen werden, unabhängig von der eingebrachten microRNA-Konzentration. Dies ist ein deutliches Zeichen dafür, dass die DPP4-mRNA ein Zielgen für die microRNA miR-22 darstellt. Zur Überprüfung, in welchem Bereich die microRNA-Bindung am 3'UTR stattfindet, wurde in den *in silico* ermittelten Bereich für eine komplementäre Basenpaarung an einer Stelle eine Punktmutation eingefügt. In diesem Fall kam es zu keiner Lumineszenzabnahme trotz Anwesenheit erhöhter Mengen microRNA. Dies bestätigt, dass es sich bei der *in silico* ermittelten Bindestelle um eine tatsächliche Bindestelle der microRNA miR-22 im 3'UTR der DPP4-mRNA handelt. Da *in silico* nur dieser eine Bereich für eine komplementäre Basenpaarung identifiziert wurde und ausschließlich eine Punktmutation ausreichte, um den RNA Interferenzeffekt aufzuheben, kann angenommen werden, dass es sich um die einzige Bindestelle der microRNA miR-22 im 3'UTR der DPP4-mRNA handelt. Anderenfalls hätte der Interferenzeffekt nicht nahezu vollständig aufgehoben werden können.

In weiterführenden Expressionsstudien wurde der RNA-Interferenzeffekt der microRNA miR-22 auf die intrazelluläre DPP4-Expression in den Granulosazelllinien COV 434 und KGN untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die DPP4-mRNA Expression durch eine Behandlung der COV 434 Zellen mit miR-22 um über 50 % reduziert war. In den KGN-Zellen konnte ebenfalls eine Reduktion nachgewiesen werden, auch wenn diese nicht so stark ausgeprägt war. Auch im Zellkulturüberstand von COV 434 Zellen konnte eine leichte Reduktion der DPP4-Menge detektiert werden.

Untersuchungen der microRNA miR-9 zeigte in den Luziferase-Reportergen-Studien ebenfalls einen RNA-Interferenzeffekt auf die fusionierte mRNA. Dieser Effekt konnte durch das Einfügen einer Punktmutation in den *in silico* ermittelten Bereich für eine komplementäre Basenpaarung jedoch nicht vollständig aufgehoben werden. Dies lässt vermuten, dass sich neben der untersuchten Bindestelle noch weitere komplementäre Bereiche im 3'UTR der DPP4-mRNA befinden. *In silico* konnten jedoch keine zusätzlichen Bereiche identifiziert werden. Interessanterweise zeigte die statistische Analyse der Expressionsdaten der zirkulierenden microRNA miR-9 und der im Serum gemessenen DPP4-Aktivität sowie Konzentration keinen Zusammenhang, obwohl eine microRNA-mRNA-Bindung *in vitro* nachgewiesen werden konnte. Mehr Aufschluss über mögliche RNA-Interferenzeffekte der microRNA miR-9 auf die intrazelluläre DPP4-Expression sollten *in vitro* Untersuchungen in den Granulosazelllinien COV 434 und KGN liefern. Hier zeigten sich überraschenderweise konträre Effekte auf die DPP4-mRNA-Expression in den verschiedenen Granulosazelllinien. In COV 434 Zellen führte die Behandlung mit miR-9 ebenfalls zu einer Reduktion der DPP4-mRNA Expression, wengleich der reduzierende Effekt der microRNA miR-22 stärker war. In den KGN Zellen hingegen sorgte die Behandlung mit miR-9 für eine starke Zunahme der DPP4-mRNA Expressionsrate.

In dieser Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass DPP4 ein Zielgen für die microRNA miR-22 darstellt. Eine 50 % -ige Reduktion der DPP4-mRNA Expression lässt vermuten, dass die microRNA auch intrazellulär eine Rolle in der Regulation der DPP4-Expression spielen könnte.

Pandey und Picard zeigten mit ähnlichen Experimenten, dass die Estrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ )-mRNA ein direktes Zielgen der microRNA miR-22 darstellt. Eine Überexpression der miR-22 in Brustkarzinomzellen führte durch die miR-22 induzierte Degradation der Rezeptor-mRNA zu einer verringerten ER $\alpha$ -abhängigen Zellproliferation [69]. In weiteren Studien wurde eine miR-22-Expression mit einer Hemmung der Zellproliferation in Verbindung gebracht [98, 44]. In diesen Studien wurde der miR-22 eine biologische Bedeutung in der Tumorentstehung [98] und Herzfunktionalität zugesprochen [44]. Es wäre somit durchaus möglich, dass die microRNA miR-22 aus pathophysiologischer Sicht auch eine Bedeutung in der Ausprägung eines PCOS spielt.

Die micro-RNA miR-9 hat eine Bindestelle im 3'UTR des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und reguliert dessen mRNA- und Proteinexpression negativ [43]. Im DPP4-Promotorbereich sind Konsensussequenzen für diesen Transkriptionsfaktor nachgewiesen worden [9]. Dies könnte möglicherweise einen indirekten regulierenden Einfluss auf die DPP4-Expression haben.

## 6 Zusammenfassung

Endokrinopathische Erkrankungen sind die häufigste Ursache für weibliche Infertilität. Das Polyzystische Ovarsyndrom (PCOS) ist eine der am häufigsten auftretenden endokrinopathischen Erkrankung und wird bei etwa 7 % aller Frauen im gebärfähigen Alter diagnostiziert. Die Diagnose erfolgt nach Vorgaben der Europäischen Gesellschaft humaner Reproduktion und Embryologie (ESHRE), den Rotterdam-Kriterien: (1) ovulatorische und menstruelle Dysfunktion wie Oligo- bzw. Amenorrhö und/oder (2) polyzystische Ovarien und/oder (3) das Auftreten eines klinischen oder biochemischen Hyperandrogenismus. Molekulare Mechanismen zur Entstehung des PCOS sind bis heute jedoch unbekannt. Die betroffenen Frauen zeigen zudem häufige begleitende Erkrankungen wie Adipositas, Insulinresistenz oder Diabetes mellitus Typ 2. In dieser Arbeit wurde die Relevanz des Enzyms Dipeptidylpeptidase 4, einem Zielgen bei der Therapie von Diabetes mellitus, bei Frauen mit PCOS und unerfülltem Kinderwunsch analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die DPP4-Menge im Serum von PCOS-Patientinnen signifikant erhöht war. Frauen mit Hyperandrogenismus und/oder polyzystische Ovarien und/oder Menstruationsstörungen haben ebenfalls eine signifikant höhere DPP4-Serumkonzentration oder Aktivität, unabhängig der Diagnose PCOS. *In vitro* Untersuchungen in Granulosakarzinomzellen COV 434 und KGN zeigten, dass erhöhte Mengen Testosteron und DHT die DPP4 mRNA-Expression steigern, in dem sie den Promotor aktivieren. Erhöhte Mengen Insulin und Glukose zeigten *in vitro* keinen Einfluss auf die DPP4 mRNA-Expression. Jedoch konnte eine Erhöhung der löslichen DPP4-Menge im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden.

Es gibt Studien, die belegen, dass das PCOS, Hyperandrogenismus oder auch Diabetes mellitus Typ 2 die Expression zirkulierender microRNAs beeinflussen. MicroRNAs sind kurze, endogene, nicht kodierende Einzelstrang-RNA Moleküle, die durch komplementäre Basenpaarung an den 3'UTR einer Ziel-mRNA binden können, wodurch es sowohl zur Inhibierung der Translation als auch zur Destabilisierung der mRNA kommen kann. Klinische Analysen dieser Arbeit zeigten, dass die Expressionsrate der zirkulierenden microRNA miR-22 mit der DPP4-Aktivität bzw. Konzentration im Serum indirekt im Zusammenhang stehen. *In vitro* konnte eine direkte microRNA-mRNA-Bindung der miR-22 im 3'UTR der DPP4-mRNA nachgewiesen werden. Mittels Mutagenesestudien konnte der Bereich der komplementären Basenpaarung identifiziert und bestätigt werden. *In vitro* Untersuchungen zeigten zudem, dass eine Überexpression der microRNA miR-22 die DPP4 mRNA-Expression in der Granulosakarzinomzelllinie COV 434 um 50 % reduziert. In dieser Arbeit konnte damit erstmals gezeigt werden, dass die Expression der DPP4 unter anderem durch die miR-22 reguliert werden kann.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der DPP4-Menge im Serum von PCOS-Patientinnen sowohl durch erhöhte Mengen männlicher Geschlechtshormone (Hyperandrogenismus) als auch durch erhöhte Mengen Insulin und Glukose (Insulinresistenz, Hyperglykämie) hervorgerufen werden könnten. Damit könnte die DPP4 ein verbindendes Element zwischen Insulinresistenz, Hyperandrogenismus und PCOS darstellen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Ahrén B (2007) Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: clinical data and clinical implications. *Diabetes care* 30(6): 1344–1350
2. Ansorge S, Bank U, Heimburg A, Helmuth M, Koch G, Tadge J, Lendeckel U, Wolke C, Neubert K, Faust J, Fuchs P, Reinhold D, Thielitz A, Täger M (2009) Recent insights into the role of dipeptidyl aminopeptidase IV (DPIV) and aminopeptidase N (APN) families in immune functions. *Clin Chem Lab Med* 47(3): 253–261
3. Artini PG, Di Bernardino OM, Simi G, Papini F, Ruggiero M, Monteleone P, Cela V (2010) Best methods for identification and treatment of PCOS. *Minerva Ginecol* 62(1): 33–48
4. Azziz R, Marin C, Hoq L, Badamgarav E, Song P (2005) Health care-related economic burden of the polycystic ovary syndrome during the reproductive life span. *J Clin Endocrinol Metab* 90(8): 4650–4658
5. Baggio LL, Drucker DJ (2007) Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 132(6): 2131–2157
6. Balen A (2004) The pathophysiology of polycystic ovary syndrome: trying to understand PCOS and its endocrinology. *Best practice & research. Clin Obstet Gynecol* 18(5): 685–706
7. Balen AH, Laven JSE, Tan S, Dewailly D (2003) Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions. *Hum Reprod Update* 9(6): 505–514
8. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116(2): 281–297
9. Böhm SK, Gum JR, Erickson RH, Hicks JW, Kim YS (1995) Human dipeptidyl peptidase IV gene promoter: tissue-specific regulation from a TATA-less GC-rich sequence characteristic of a housekeeping gene promoter. *Biochem J* 311 (Pt 3): 835–843
10. Boonacker E, Van Noorden, Cornelis J F (2003) The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur J Cell Biol* 82(2): 53–73
11. Campbell BK, Onions V, Kendall NR, Guo L, Scaramuzzi RJ (2010) The effect of monosaccharide sugars and pyruvate on the differentiation and metabolism of sheep granulosa cells in vitro. *Reprod* 140(4): 541–550
12. Catenacci M, Falcone T (2008) The effect of endometriosis on in vitro fertilization outcome. *Minerva Ginecol* 60(3): 209–221
13. Chabrolle C, Jeanpierre E, Tosca L, Ramé C, Dupont J (2008) Effects of high levels of glucose on the steroidogenesis and the expression of adiponectin receptors in rat ovarian cells. *Reprod Biol Endocrinol* 6: 11
14. Chang CS, Kokontis J, Liao ST (1988) Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science (New York, N.Y.)* 240(4850): 324–326
15. Chang CS, Kokontis J, Liao ST (1988) Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(19): 7211–7215

16. Chang CS, Lin TM, Hsiao P, Su CY, Riebe J, Chang CT, Lin DL (1996) Androgene-responsive Genes. In: Bhasin S (ed) Pharmacology, biology, and clinical applications of androgens. Current status and future prospects ; proceedings of the second International Androgen Workshop, Long Beach, California, 17-20 February 1995. Wiley, New York NY u.a., p. 65–71
17. Chien C, Huang L, Chou C, Chen Y, Han Y, Chang G, Liang P, Chen X (2004) One site mutation disrupts dimer formation in human DPP-IV proteins. *J Biol Chem* 279(50): 52338–52345
18. Christian RC, Dumesic DA, Behrenbeck T, Oberg AL, Sheedy PF, Fitzpatrick LA (2003) Prevalence and predictors of coronary artery calcification in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88(6): 2562–2568
19. Colton SA (2002) Altered Meiotic Regulation in Oocytes from Diabetic Mice. *Biol Reprod* 67(1): 220–231
20. Cooper TG, Noonan E, Eckardstein S von, Auger J, Baker HWG, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM (2010) World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 16(3): 231–245
21. Creanga AA, Bradley HM, McCormick C, Witkop CT (2008) Use of metformin in polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 111(4): 959–968
22. Das SS, Hayashi H, Sato T, Yamada R, Hiratsuka M, Hirasawa N (2014) Regulation of dipeptidyl peptidase 4 production in adipocytes by glucose. *Diabetes Metab Syndr Obes* 7: 185–194
23. Dewailly D, Pigny P, Soudan B, Catteau-Jonard S, Decanter C, Poncelet E, Duhamel A (2010) Reconciling the definitions of polycystic ovary syndrome: the ovarian follicle number and serum anti-Müllerian hormone concentrations aggregate with the markers of hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 95(9): 4399–4405
24. Drucker DJ, Nauck MA (2006) The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 368(9548): 1696–1705
25. Dunaif A (1997) Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 18(6): 774–800
26. Durinx C, Neels H, Auwera JC Vd, Nealarts K, Scharpé, Meester Id (2001) Reference Values for Plasma Dipeptidyl-Peptidase IV Activity and Their Association with Other Laboratory Parameters. *Clin Chem Lab Med*(39(2)): 155–159
27. Durlinger ALL, Visser JA, Themmen APN (2002) Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reprod* 124(5): 601–609
28. Duttaroy A, Voelker F, Merriam K, Zhang X, Ren X, Subramanian K, Hughes TE, Burkey BF (2011) The DPP-4 inhibitor vildagliptin increases pancreatic beta cell mass in neonatal rats. *Eur J Pharmacol* 650(2-3): 703–707
29. Ehrmann DA (2005) Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 352(12): 1223–1236
30. Erickson GF, Garzo VG, Magoffin DA (1989) Insulin-like growth factor-I regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 69(4): 716–724

31. Escobar-Morreale HF, Botella-Carretero JI, Alvarez-Blasco F, Sancho J, San Millán JL (2005) The polycystic ovary syndrome associated with morbid obesity may resolve after weight loss induced by bariatric surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 90(12): 6364–6369
32. Escobar-Morreale HF, Luque-Ramírez M, San Millán JL (2005) The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev* 26(2): 251–282
33. Evers JLH, Collins JA (2003) Assessment of efficacy of varicocele repair for male subfertility. A systematic review. *Lancet* 361(9372): 1849–1852
34. Fadini GP, Albiero M, Menegazzo L, Kreutzenberg SV de, Avogaro A (2012) The increased dipeptidyl peptidase-4 activity is not counteracted by optimized glucose control in type 2 diabetes, but is lower in metformin-treated patients. *Diabetes Obes Metab* 14(6): 518–522
35. Fitzpatrick SL, Richards JS (1991) Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells. *Endocrinology* 129(3): 1452–1462
36. Freeman JS (2009) Role of the incretin pathway in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Cleve Clin J Med* 76 Suppl 5: S12-9
37. Gallwitz B (2010) The evolving place of incretin-based therapies in type 2 diabetes. *Pediatr Nephrol* 25(7): 1207–1217
38. Glueck CJ, Wang P, Fontaine R, Tracy T, Sieve-Smith L (1999) Metformin-induced resumption of normal menses in 39 of 43 (91%) previously amenorrheic women with the polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 48(4): 511–519
39. Glueck CJ, Wang P, Fontaine R, Tracy T, Sieve-Smith L (2001) Metformin to restore normal menses in oligo-amenorrheic teenage girls with polycystic ovary syndrome (PCOS). *J Adolesc Health* 29(3): 160–169
40. Gonzalez-Gronow M, Grenett HE, Weber MR, Gawdi G, Pizzo SV (2001) Interaction of plasminogen with dipeptidyl peptidase IV initiates a signal transduction mechanism which regulates expression of matrix metalloproteinase-9 by prostate cancer cells. *Biochem J* 355(Pt2): 397–407
41. Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, Azziz R (2011) Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nature reviews. Endocrinology* 7(4): 219–231
42. Gu N, Tsuda M, Matsunaga T, Adachi T, Yasuda K, Ishihara A, Tsuda K (2008) Glucose regulation of dipeptidyl peptidase IV gene expression is mediated by hepatocyte nuclear factor-1alpha in epithelial intestinal cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35(12): 1433–1439
43. Guo L, Pu Y, Han Z, Liu T, Li Y, Liu M, Li X, Tang H (2009) MicroRNA-9 inhibits ovarian cancer cell growth through regulation of NF-kappaB1. *FEBS J* 276(19): 5537–5546
44. Gurha P, Abreu-Goodger C, Wang T, Ramirez MO, Drummond AL, van Dongen S, Chen Y, Bartonicek N, Enright AJ, Lee B, Kelm RJ, Reddy AK, Taffet GE, Bradley A, Wehrens XH,

- Entman ML, Rodriguez A (2012) Targeted deletion of microRNA-22 promotes stress-induced cardiac dilation and contractile dysfunction. *Circulation* 125(22): 2751–2761
45. Guven MA, Dilek U, Pata O, Dilek S, Ciragil P (2007) Prevalance of Chlamydia trochomatis, Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis infections in the unexplained infertile women. *Arch Gynecol Obstet* 276(3): 219–223
  46. Hamel M, Vanselow J, Nicola ES, Price CA (2005) Androstenedione increases cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid transcripts in nonluteinizing bovine granulosa cells. *Mol Reprod Dev* 70(2): 175–183
  47. Han SJ, Choi S, Kang Y, Jung JG, Yi S, Kim HJ, Lee KW, Kim DJ (2011) Effect of sitagliptin plus metformin on  $\beta$ -cell function, islet integrity and islet gene expression in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes Res Clin Pract* 92(2): 213–222
  48. Havelock JC, Rainey WE, Carr BR (2004) Ovarian granulosa cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 228(1-2): 67–78
  49. Homburg R, Eshel A, Kilborn J, Adams J, Jacobs HS (1990) Combined luteinizing hormone releasing hormone analogue and exogenous gonadotrophins for the treatment of infertility associated with polycystic ovaries. *Hum Reprod* 5(1): 32–35
  50. Hopsu-Havu VK, Glenner GG (1966) A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. *Histochem J* 7(3): 197–201
  51. Kameoka J, Tanaka T, Nojima Y, Schlossman SF, Morimoto C (1993) Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science* 261(5120): 466–469
  52. Kirino Y, Sei M, Kawazoe K, Minakuchi K, Sato Y (2012) Plasma dipeptidyl peptidase 4 activity correlates with body mass index and the plasma adiponectin concentration in healthy young people. *Endocr J* 59(10): 949–953
  53. Lambeir A, Durinx C, Scharpé S, Meester I de (2003) Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci* 40(3): 209–294
  54. Lamers D, Famulla S, Wronkowitz N, Hartwig S, Lehr S, Ouwens DM, Eckardt K, Kaufman JM, Ryden M, Müller S, Hanisch F, Ruige J, Arner P, Sell H, Eckel J (2011) Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. *Diabetes* 60(7): 1917–1925
  55. Lenski M, Kazakov A, Marx N, Böhm M, Laufs U (2011) Effects of DPP-4 inhibition on cardiac metabolism and function in mice. *J Mol Cell Cardiol* 51(6): 906–918
  56. Maedler K, Spinas GA, Lehmann R, Sergeev P, Weber M, Fontana A, Kaiser N, Donath MY (2001) Glucose Induces  $\beta$ -Cell Apoptosis Via Upregulation of the Fas Receptor in Human Islets. *Diabetes* 50(8): 1683–1690

57. Martín M, Huguet J, Centelles JJ, Franco R (1995) Expression of ecto-adenosine deaminase and CD26 in human T cells triggered by the TCR-CD3 complex. Possible role of adenosine deaminase as costimulatory molecule. *J Immunol* 155(10): 4630–4643
58. Meneilly GS, Demuth H, McIntosh CHS, Pederson RA (2000) Effect of ageing and diabetes on glucose-dependent insulinotropic polypeptide and dipeptidyl peptidase IV responses to oral glucose. *Diabet Med* 17(5): 346–350
59. Meyts P de, Whittaker J (2002) Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nature reviews. Drug Discov* 1(10): 769–783
60. Mihm M, Gangooly S, Muttukrishna S (2011) The normal menstrual cycle in women. *Anim Reprod Sci* 124(3-4): 229–236
61. Misso ML, Costello MF, Garrubba M, Wong J, Hart R, Rombauts L, Melder AM, Norman RJ, Teede HJ (2013) Metformin versus clomiphene citrate for infertility in non-obese women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 19(1): 2–11
62. Mulvihill EE, Drucker DJ (2014) Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Endocr Rev* 35(6): 992–1019
63. Nabeno M, Akahoshi F, Kishida H, Miyaguchi I, Tanaka Y, Ishii S, Kadowaki T (2013) A comparative study of the binding modes of recently launched dipeptidyl peptidase IV inhibitors in the active site. *Biochem Biophys Res Commun* 434(2): 191–196
64. Nelson VL (1999) Augmented Androgen Production Is a Stable Steroidogenic Phenotype of Propagated Theca Cells from Polycystic Ovaries. *Mol Endocrinol* 13(6): 946–957
65. Olooto WE, Amballi AA, and Banjo TA (2012) A review of Female Infertility; important etiological factors and management. *J Microbiol Biotechnol Res* 2(3): 379–385
66. Omar BA, Liehua L, Yamada Y, Seino Y, Marchetti P, Ahrén B (2014) Dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) is expressed in mouse and human islets and its activity is decreased in human islets from individuals with type 2 diabetes. *Diabetologia* 57(9): 1876–1883
67. Ono YJ, Tanabe A, Nakamura Y, Yamamoto H, Hayashi A, Tanaka T, Sasaki H, Hayashi M, Terai Y, Ohmichi M (2014) A low-testosterone state associated with endometrioma leads to the apoptosis of granulosa cells. *PloS one* 9(12): e115618
68. Pradeep PK, Li XL, Peegel H, Menon KMJ (2002) Dihydrotestosterone Inhibits Granulosa Cell Proliferation by Decreasing the Cyclin D2 mRNA Expression and Cell Cycle Arrest at G1 Phase. *Endocrinology* 143(8): 2930-5.
69. Pandey DP, Picard D (2009) miR-22 inhibits estrogen signaling by directly targeting the estrogen receptor alpha mRNA. *Mol Cell Biol* 29(13): 3783–3790
70. (2004) Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 81(1): 19–25

71. Riemann D, Hansen GH, Niels-Christiansen L, Thorsen E, Immerdal L, Santos AN, Kehlen A, Langner J, Danielsen EM (2001) Caveolae/lipid rafts in fibroblast-like synoviocytes: ectopeptidase-rich membrane microdomains. *Biochem J* 354(Pt 1): 47–55
72. Röhrborn D, Eckel J, Sell H (2014) Shedding of dipeptidyl peptidase 4 is mediated by metalloproteases and up-regulated by hypoxia in human adipocytes and smooth muscle cells. *FEBS Lett* 588(21): 3870–3877
73. Röhrborn D, Wronkowitz N, Eckel J (2015) DPP4 in Diabetes. *Front Immunol* 6: 386
74. Sang Q, Yao Z, Wang H, Feng R, Wang H, Zhao X, Xing Q, Jin L, He L, Wu L, Wang L (2013) Identification of microRNAs in human follicular fluid: characterization of microRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 98(7): 3068–3079
75. Sattar N (2007) polycystic ovarian syndrome: vascular and metabolic issues. In: Greer IA, Ginsberg J, Forbes CD (eds) *Women's vascular health*. Hodder Arnold; Distributed in the United States by Oxford University Press, London, New York, pp 265–279
76. Sedo A, Malík R, Krepela E (1998) Dipeptidyl peptidase IV in C6 rat glioma cell line differentiation. *Biol Chem* 379(1): 39–44
77. Seliger E, Blumenauer V, Kaltwaßer P, Bergleiter R, Heinz J, Neubert K, Röpke F (1992) Die Aktivität der Dipeptidyl-Peptidase IV (DP IV) im Serum unter HMG-Stimulation und Spontanzyklen. *Fertilität* (8): 188–192
78. Sell H, Blüher M, Klötting N, Schlich R, Willems M, Ruppe F, Knoefel WT, Dietrich A, Fielding BA, Arner P, Frayn KN, Eckel J (2013) Adipose dipeptidyl peptidase-4 and obesity: correlation with insulin resistance and depot-specific release from adipose tissue in vivo and in vitro. *Diabetes care* 36(12): 4083–4090
79. Sen A, Hammes SR (2010) Granulosa cell-specific androgen receptors are critical regulators of ovarian development and function. *Mol Endocrinol* 24(7): 1393–1403
80. Shebl O, Ebner T, Sir A, Schreier-Lechner E, Mayer RB, Tews G, Sommergruber M (2011) Age-related distribution of basal serum AMH level in women of reproductive age and a presumably healthy cohort. *Fertil Steril* 95(2): 832–834
81. Shirakawa J, Fujii H, Ohnuma K, Sato K, Ito Y, Kaji M, Sakamoto E, Koganei M, Sasaki H, Nagashima Y, Amo K, Aoki K, Morimoto C, Takeda E, Terauchi Y (2011) Diet-induced adipose tissue inflammation and liver steatosis are prevented by DPP-4 inhibition in diabetic mice. *Diabetes* 60(4): 1246–1257
82. Simmons D (2010) Metformin treatment for Type 2 diabetes in pregnancy? Best practice & research. *Clin Endocrinol Metab* 24(4): 625–634
83. Sirotkin AV, Lauková M, Ovcharenko D, Brenaut P, Mlyncek M (2010) Identification of microRNAs controlling human ovarian cell proliferation and apoptosis. *J Cell Physiol* 223(1): 49–56

84. Sirotkin AV, Ovcharenko D, Grossmann R, Lauková M, Mlynček M (2009) Identification of microRNAs controlling human ovarian cell steroidogenesis via a genome-scale screen. *J Cell Physiol* 219(2): 415–420
85. Song J, Bai Z, Han W, Zhang J, Meng H, Bi J, Ma X, Han S, Zhang Z (2012) Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. *Dig Dis Sci* 57(4): 897–904
86. Sørensen AE, Wissing ML, Salö S, Englund ALM, Dalgaard LT (2014) MicroRNAs Related to Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Genes* 5(3): 684–708
87. Stein I LM (1935) Amenorrhoea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol*: 181–185
88. Stonehouse A, Okerson T, Kendall D, Maggs D (2008) Emerging incretin based therapies for type 2 diabetes: incretin mimetics and DPP-4 inhibitors. *Curr Diab Rev* 4(2): 101–109
89. Takeda Y, Fujita Y, Honjo J, Yanagimachi T, Sakagami H, Takiyama Y, Makino Y, Abiko A, Kieffer TJ, Haneda M (2012) Reduction of both beta cell death and alpha cell proliferation by dipeptidyl peptidase-4 inhibition in a streptozotocin-induced model of diabetes in mice. *Diabetologia* 55(2): 404–412
90. Tosca L, Froment P, Rame C, McNeilly JR, McNeilly AS, Maillard V, Dupont J (2011) Metformin decreases GnRH- and activin-induced gonadotropin secretion in rat pituitary cells: potential involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (PRKA). *Biol Reprod* 84(2): 351–362
91. Nelson VL, Qin KN, Rosenfield RL, Wood JR, Penning TM, Legro RS, Strauss JF, McAllister JM (2001) The Biochemical Basis for Increased Testosterone Production in Theca Cells Propagated from Patients with Polycystic Ovary Syndrome *J Clin Endocrinol Metab* 86(12): 5925-33
92. Villarroel C, López P, Merino PM, Iñiguez G, Sir-Petermann T, Codner E (2015) Hirsutism and oligomenorrhea are appropriate screening criteria for polycystic ovary syndrome in adolescents. *Gynecol Endocrinol* 31(8): 625–629
93. Waldstreicher J, Santoro NF, Hall JE, Filicori M, Crowley WF (1988) Hyperfunction of the hypothalamic-pituitary axis in women with polycystic ovarian disease: indirect evidence for partial gonadotroph desensitization. *J Clin Endocrinol Metab* 66(1): 165–172
94. Weil S, Vendola K, Zhou J, and Bondy CA (1999) Androgen and Follicle-Stimulating Hormone Interactions in Primate Ovarian Follicle Development *J Clin Endocrinol Metab* 84(8): 2951-695.
95. Wu Y, Bennett J, Talla D, Stocco C (2011) Testosterone, not 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone, stimulates LRH-1 leading to FSH-independent expression of Cyp19 and P450scc in granulosa cells. *Mol Endocrinol* 25(4): 656–668

96. Yarak S, Bagatin E, Hassun KM, Parada, Meire Odete Américo Brasil, Talarico Filho S (2005) Hiperandrogenismo e pele. Síndrome do ovário policístico e resistência periférica à insulina. *An Bras Dermatol* 80(4): 395–410
97. Yaron A, Naider F (1993) Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit Rev Biochem Mol Bio* 28(1): 31–81
98. Zhang J, Yang Y, Yang T, Liu Y, Li A, Fu S, Wu M, Pan Z, Zhou W (2010) microRNA-22, downregulated in hepatocellular carcinoma and correlated with prognosis, suppresses cell proliferation and tumorigenicity. *Br J Cancer* 103(8): 1215–1220

## 8 Thesen

1. Die Diagnose des PCOS erfolgt nach den Rotterdam-Kriterien: (1) ovulatorische und menstruelle Dysfunktion wie Oligo- bzw. Amenorrhö und/oder (2) polyzystische Ovarien und/oder (3) das Auftreten eines klinischen oder biochemischen Hyperandrogenismus. Desweiteren zeigen die Betroffenen begleitende Erkrankungen wie Adipositas, Insulinresistenz oder Diabetes mellitus Typ 2.
2. Die Dipeptidylpeptidase 4 (DPP4) spielt in der Regulation des Insulin- und Glukose-Stoffwechsels eine wichtige Rolle. DPP4-Inhibitoren werden bereits erfolgreich in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 angewendet.
3. Die DPP4-Konzentration und Aktivität ist bei Frauen mit Hyperandrogenismus und/oder polyzystische Ovarien und/oder Menstruationsstörungen signifikant erhöht.
4. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass erhöhte Mengen männlicher Geschlechtshormone, Testosteron und DHT (Hyperandrogenismus) die DPP4 mRNA-Expression steigern, in dem sie den Promotor aktivieren.
5. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass erhöhte Mengen Insulin und Glucose (Insulinresistenz, Hyperglykämie) die DPP4 mRNA-Expression nicht beeinflussen. Jedoch konnte eine Erhöhung der löslichen DPP4-Menge im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden.
6. *In vivo* konnte ein signifikanter indirekter Zusammenhang zwischen der Serumkonzentration und Aktivität der DPP4 und der im Serum zirkulierenden microRNA miR-22 gezeigt werden.
7. *In vitro* Untersuchungen bestätigten eine direkte microRNA-mRNA-Bindung der miR-22 im 3'UTR der DPP4-mRNA. Mittels Mutagenesestudien konnte die *in silico* identifizierte Bindestelle *in vitro* bestätigt werden.
8. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass eine Überexpression der microRNA miR-22 die DPP4 mRNA-Expression in der Granulosakarzinomzelllinie COV 434 um 50 % reduziert.

## Lebenslauf

### Persönliche Informationen

Name Sindy Blauschmidt, geb. Pelka  
Geburtsdatum/-ort 13.09.1987 in Rochlitz  
Familienstand verheiratet, eine Tochter (\*2013)  
Staatsangehörigkeit Deutsch

### Ausbildung

09/1998 - 07/2006 **Martin-Luther-Gymnasium, Hartha**  
Allgemeine Hochschulreife

10/2006 - 09/2011 **Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**  
Diplomstudiengang Biochemie  
Vertiefungsrichtung Molekulare Medizin, Pathobiochemie

04/2011 - 09/2011 **Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**  
**Institut für Pathologie, AG PD Dr. Frank Bartel**  
Diplomarbeit

10/2011 - heute **Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und**  
**Universitätsklinikum Halle, Zentrum für Reproduktionsmedizin und**  
**Andrologie, Prof. Dr. Hermann M. Behre**  
Promotionsstudium

### Tätigkeit

10/2011 - heute **Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und**  
**Universitätsklinikum Halle, Zentrum für Reproduktionsmedizin und**  
**Andrologie, Prof. Dr. Hermann M. Behre**  
Wissenschaftliche Mitarbeiterin

---

Sindy Blauschmidt, Dieskau, den 17. November 2015

### **8.1.1 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen meiner Arbeit angegeben sind. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials und Erstellung des Manuskripts haben mich folgende Personen unterstützt: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann M. Behre und Dr. Thomas Greither. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen und Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für die Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Ich habe die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

---

Sindy Blauschmidt, Dieskau, den 17. November 2015

### **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, dass bei mir keine früheren Promotionsversuche vorliegen.

---

Sindy Blauschmidt, Dieskau, den 17. November 2015

## **Danksagung**

Diese Arbeit wurde am Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg angefertigt. Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während der Zeit der Durchführung und Anfertigung dieser Dissertationsschrift unterstützt haben.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Hermann M. Behre möchte ich mich recht herzlich für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Desweiteren möchte ich mich für seine Diskussionsbereitschaft und sein Interesse an den in dieser Arbeit behandelten Themen bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Thomas Greither, der mich stets bei Problemen und Fragestellungen in diesem interessanten und vielseitigen Thema unterstützt hat und immer zu ausführlichen und inspirierenden Diskussionen bereit war. Durch ihn wurde ich zum selbstständigen und eigenverantwortlichen wissenschaftlichen Denken und Arbeiten angeleitet und angeregt.

Für die große Unterstützung beim Sammeln der Blutproben und der damit verbundenen Aufklärungsgespräche mit den Patientinnen möchte ich mich bei Frau OÄ Dr. Kaltwaßer und Frau Dr. Köller recht herzlich bedanken. Desweiteren möchte ich mich bei ihnen und Dr. Seliger für Anmerkungen und Verbesserungsvorschläge zu dieser Arbeit bedanken.

Für die technische Unterstützung bei der photometrischen Bestimmung der DPP4-Aktivität möchte ich Frau Sobisch recht herzlich danken.

Frau Dr. Darmer möchte ich für ihre herzliche Art und die Hilfsbereitschaft bei nicht-gelingenden Sequenzanalysen danken.

Weiterhin möchte ich mich bei Maria Giebler, Matthias Kraus und allen anderen Kollegen des FG05 E01 für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Laboralltag bedanken.

Meinen Freunden danke ich für die wunderbaren gemeinsamen Studienjahre, das Zuhören, die motivierende Worte und aufbauende Gespräche.

Mein herzlichster Dank gilt meinem Mann und meiner Tochter, sowie meinen Eltern und meiner Schwester. Ihre aufbauenden und Mut machenden Worte, motivierende Gespräche und ihr Interesse an meiner wissenschaftlichen Arbeit trugen einen großen Teil dazu bei, dass diese Arbeit eingereicht werden kann.