

Aus dem Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann M. Behre)

Expressionsprofile zirkulierender microRNA bei Patientinnen mit polyzystischem Ovarsyndrom

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Wiebke Würfl

geboren am 03.09.1988 in Dresden

Gutachter:

1. Univ.-Prof. Dr. med. H. M. Behre
2. Prof. Dr. rer. nat. H. Taubert, Erlangen
3. PD Dr. med. A. Udelnow, Magdeburg

10.11.2016

22.06.2017

Referat

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Konzentration ausgewählter microRNAs im Serum von Patientinnen mit Polyzystischem Ovarsyndrom (PCOS) zu analysieren. Dies erscheint sinnvoll, da es sich um eine weit verbreitete, volkswirtschaftlich relevante Erkrankung handelt, deren Diagnosekriterien stark umstritten sind. Dazu isolierten wir die RNA aus den Serumproben von 288 Probandinnen. Im Einklang mit den bestehenden Diagnosekriterien fanden wir bei unseren Probandinnen mit der Diagnose PCOS einen signifikant erhöhten LH-Spiegel und LH/FSH-Quotienten. Außerdem war bei den PCOS Patientinnen im Mittelwert das Gewicht deutlich erhöht. Anschließend führten wir mit dem Serum von 3 Probandinnen, die sich hinsichtlich des BMI und der Diagnose PCOS unterschieden, Microarray-Analysen durch. Für jede Patientin wurden semi-quantitativ 231 microRNA bestimmt. Von den insgesamt 44 differentiell exprimierten microRNA wählten wir 5 (miR-181, miR-200a, miR-203, miR-375, miR-411) aus, die die stärksten Expressionsunterschiede zeigten und in der Literatur Assoziationen zu anderen potentiell für die Entwicklung eines PCOS relevante Faktoren, wie Übergewicht, Diabetes oder Granulosazellproliferation, gezeigt hatten.

Um die gefundenen Unterschiede zu verifizieren, wurden anschließend in der gesamten Studienkohorte von 288 Probandinnen (134 mit PCOS, 154 ohne PCOS) quantitative RT-PCR Messungen durchgeführt und die Ergebnisse sowohl mit weiteren endokrinologischen Parametern als auch mit klinischen Parametern korreliert. Dabei ermittelten wir einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem BMI und dem Progesteronspiegel, sowie zwischen dem HOMA Diabetesindex und der Anzahl der Fehlgeburten. Zur Serum-Konzentration der ausgewählten microRNA konnten lediglich Ergebnisse gezeigt werden, die sich nahe der Signifikanzgrenze befinden. Zum Beispiel ein Zusammenhang miR-181 und dem HOMA Diabetesindex ($r_s=0,375$, $p=0,074$, $n=24$). Bei der Analyse der PCOS relevanten Diagnose-Kriterien konnte eine signifikante Korrelation zwischen einer erhöhten Serum-Konzentration der miR-200a und einem Hyperandrogenismus in der Studienkohorte detektiert werden ($p=0,001$; Mann-Whitney-U-Test). Weiterhin zeigte sich im Trend eine Korrelation zwischen dem Bestehen von Zyklusunregelmäßigkeiten und der Serum-Konzentration der miR-200a (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,086$).

Unsere Arbeit zeigt, dass es keine signifikante Korrelation zwischen der Serum-Konzentration der miR-181, miR-200a, miR-203, miR-375 oder miR-411 und der Diagnose des PCOS besteht. Allerdings konnte eine signifikante Korrelation zwischen der erhöhten Serum-Konzentration der miR-200a und Hyperandrogenismus gezeigt werden, die Gegenstand weiterer Forschung sein könnte.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Weibliche Infertilität	1
1.2. Das Polyzystische Ovarsyndrom	2
1.2.1. Geschichte	2
1.2.2. Charakteristik	2
1.2.3. Diagnose	3
1.2.4. Vererbung	4
1.2.5. Hormonelle Veränderungen	5
1.2.6. Metabolismus	6
1.2.7. Therapie	7
1.3. MicroRNA	8
1.3.1. Allgemein	8
1.3.2. Entstehung und Bearbeitung	8
1.3.3. Wirkung	10
1.3.4. Zirkulierende microRNA	11
2. Zielstellung	13
3. Material und Methodik	14
3.1. Material	14
3.1.1. Geräte	14
3.1.2. Reagenzien	14
3.1.3. Puffer und Lösungen	15
3.1.4. Kits	16
3.1.5. Verbrauchsmaterial	16
3.1.6. Das Patientenkollektiv	16
3.2. Methodik	17
3.2.1. Serumherstellung	17
3.2.2. RNA-Isolation	17
3.2.3. RNA-Konzentrationsmessung	17
3.2.4. MicroRNA-Array	18
3.2.5. MicroRNA-cDNA-Synthese	19
3.2.6. Quantitative real-time-PCR	20
3.2.7. Statistische Auswertung	21
4. Ergebnisse	22
4.1. Übersicht der Studienkohorte	22
4.2. Microarray-Untersuchungen- differentiell exprimierte microRNAs bei Übergewicht (BMI>25) oder PCOS	25

4.3. Bivariate Korrelationsanalysen der Serum-Konzentration der microRNA mit klinischen Parametern der Studienkohorte	26
4.4. Korrelation der microRNA und klinischer Parameter	28
5. Diskussion	34
5.1. Klinische und endokrinologische Parameter der untersuchten Patientinnenkohorte	34
5.2. Korrelation der endokrinologischen und klinischen Daten	36
5.3. MicroRNA- Microarrays im Serum von PCOS Patientinnen	37
5.4. Spezifische Untersuchung einzelner differentiell regulierter microRNAs im Serum von PCOS Patientinnen	41
5.5. MicroRNA-181	43
5.6. MicroRNA-200a, -c	45
5.7. MicroRNA-203	46
5.8. MicroRNA-375	48
5.9. MicroRNA-411	49
6. Zusammenfassung	51
7. Literaturverzeichnis	52
8. Thesen	67

Anlagen

- Bilder der Arrays und Übersicht der dargestellten microRNA
 - Array I
 - Array II
 - Array III
 - Array IV

Tabellarischer Lebenslauf

Selbstständigkeitserklärung

Danksagung

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AMH	Anti-Müller-Hormon
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
dsRNA	<i>Double strand ribonucleic acid</i>
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GNRH	<i>Gonadotropin releasing hormone</i>
HDL	<i>High-density Lipoprotein</i>
HOMA	<i>Homeostasis model assessment</i>
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IVF	In vitro Fertilisierung
LH	Luteinisierendes Hormon
miR/microRNA	<i>Micro ribonucleic acid</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MWU	Mann-Whitney-U Test
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NCEP	<i>National Cholesterol Education Program</i>
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
PCOS	Polyzystisches Ovarsyndrom
pre-microRNA	<i>Precursor ribonucleic acid</i>
pri-microRNA	<i>Primary ribonucleic acid</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative real time polymerase chain reaction</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SHBG	Sexualhormon-bindendes Globulin
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>

1. Einleitung

1.1. Weibliche Infertilität

Als Fruchtbarkeit wird die Fähigkeit eines Individuums bezeichnet, Nachwuchs zu zeugen. Klinische Infertilität ist im Gegensatz dazu definiert als das Ausbleiben einer Schwangerschaft nach 2 Jahren ungeschütztem Geschlechtsverkehr (Sauber und Weyerstahl, 2007). Einer Schätzung nach sind 15% aller Paare, vor allem in den Industriestaaten, von diesem Problem betroffen (Healy et al., 1994). Zusätzlich steigt die Tendenz durch den, zugunsten von anderen Lebensentscheidungen, immer später einsetzenden Kinderwunsch (Sauber und Weyerstahl, 2007). Zu sehen ist dies besonders gut an den Zahlen des deutschen IVF Registers. Im Jahr 2012 unterzogen sich in der Bundesrepublik Deutschland 47.807 Frauen einer Kinderwunschbehandlung, es wurden insgesamt 80.467 Zyklen durchgeführt, davon 56.340 mit einer Stimulation. Auf die Stimulation folgend wurden dann in 11.512 Zyklen eine IVF und 38.462 Zyklen eine ICSI durchgeführt (Blumenauer et al., 2013). Diese Aufstellung verdeutlicht, warum die Senkung der Zahl von Unfruchtbarkeit betroffener Paare mittlerweile als hohe Priorität bei vielen Gesundheitsorganisationen, wie zum Beispiel „Healthy People 2020“, angesehen wird (<http://healthypeople.gov>).

Die Ursachen für die Infertilität sind verschiedenster Art. In 30% der Fälle liegt das Problem beim Mann und in 50% bei der Frau, kombinierte Probleme bestehen bei etwa 10-20% der Paare (Sauber und Weyerstahl, 2007). Wenn man auf die genaueren Auslöser für Einschränkungen auf der weiblichen Seite eingeht, dann ist der Grund zu 30% tubar bedingt. Vor allem Adnexitiden durch Chlamydien oder Lues oder auch die Endometriose führen zu Verklebungen und schränken die Durchgängigkeit der Tube ein. Weitere 5% entfallen jeweils auf vaginale, zervikale und uterine Ursachen wie Fehlbildungen, Synechien, Entzündungen im Uterus auch häufig Myome oder auch in diesem Fall die Endometriose. Überdies finden sich zu 10% extragenitale Pathologien wie Diabetes, Substanzabusus oder psychische Erkrankungen. Ein weiterer wichtiger Aspekt sind die ovariellen Ursachen. Diese kommen in 30% der Fälle vor. Betrachtet man sie im Detail, dann ist diese Kategorie in sich sehr heterogen. Man unterscheidet hier die hypothalamisch-hypophysäre Ovarialinsuffizienz bei Anorexie, Leistungssport und psychischer Belastung, dann die normogonadotrope normoprolaktinämische Ovarialinsuffizienz mit oder ohne Menstruation, weiterhin die hypergonadotrope Ovarialinsuffizienz bei ovariellen Störungen, dem Ullrich-Turner-Syndrom oder Bestrahlungen und die hyperandrogenämische Ovarialinsuffizienz bei adrenogenitalem Syndrom, Hyperthecosis ovarii und dem polzystischen Ovarsyndrom (Sauber und Weyerstahl, 2007). Wegen

dieses Krankheitsbildes allein wurden 2012 5,21% der IVF und 4,52% der ICSIs durchgeführt (Blumenauer et al., 2013). Dies zeigt seine große klinische Relevanz.

1.2. Das polyzystische Ovarsyndrom

1.2.1. Geschichte

Schon in der Antike waren Frauen mit männlichen sekundären Merkmalen (Escobar-Morreale et al., 2005) bekannt. Allerdings gab es die erste systematische Beschreibung zur Assoziation von hyperandrogenen Symptomen mit abnormalem Glukosestoffwechsel erst 1921 (Achard et al., 1921). Achard et al. betonten dabei besonders das Auftreten von polyzystischen Ovarien bei ihren Patientinnen. Aber erst sieben Fälle von Amenorrhoe und beidseitigen polyzystischen Ovarien, die 1935 von Stein und Leventhal beschrieben wurden, machten das Polyzystische Ovarsyndrom (PCOS) zu einer eigenen Entität (Stein et al., 1935; Escobar-Morreale et al., 2005).

1.2.2. Charakteristik

Das PCOS hat eine Prävalenz von circa 7% bei Frauen im reproduktionsfähigen Alter (Asuncion et al., 2000) und ist damit eine der häufigsten weiblichen endokrinologischen Störungen. Es ist definiert als normogonadotrope, normoöstrogene Anovulation mit hypothalamisch-hypophysärer Dysregulation und gehört der WHO-Gruppe 2 der Amenorrhoe an (Laven et al., 2002).

Die Erkrankung kann schwerwiegende Auswirkungen im Leben der Patientinnen haben, vor allem auf die reproduktive, metabolische und kardiovaskuläre Gesundheit (Ehrmann, 2005). Sie ist ein Syndrom der ovariellen Dysfunktion und eine Ausschlussdiagnose (The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group, 2003). Ihre Haupteigenschaften sind der Hyperandrogenismus und die polyzystischen Ovarien (Laven et al., 2002).

Die für das Syndrom charakteristische chronische Anovulation manifestiert sich als Oligo- oder Amenorrhoe und führt zu dysfunktionalen Blutungen und verringerter Fertilität. Hautmanifestationen der Hyperandrogenämie sind Akne, Hirsutismus, androgene Alopezie und Acanthosis nigrans als Ausdruck der Hyperinsulinämie (Ehrmann, 2005). Häufig sind die betroffenen Frauen übergewichtig bis extrem adipös (Ehrmann et al., 1999), wobei die Adipositas die

metabolischen und reproduktiven Entgleisungen möglicherweise verschlimmern kann (Ehrmann, 2005).

Die Symptome beginnen um die Zeit der Menarche (Frank, 2002), aber ein späteres Erscheinen ist durch modifizierte Umweltfaktoren auch möglich, da kein einzelner ätiologischer Faktor für die Entstehung der Krankheit verantwortlich ist (Ehrmann, 2005).

1.2.3. Diagnose

Aufbauend auf das National Institutes of Health (NIH) Treffen in Bethesda, MD 1990 wurde 1999 die chronische Anovulation und die klinischen oder biochemischen Zeichen des Hyperandrogenismus unter Ausschluss anderer Ätiologien als Diagnosekriterien festgelegt. In Rotterdam wurde 2003 die Einigung getroffen, dass bei 2 von 3 korrekten Angaben von Oligo- oder Anovulation, klinischen oder biochemischen Zeichen des Hyperandrogenismus und polyzystischen Ovarien, unter Ausschluss anderer Ätiologien, die Diagnose gestellt werden kann (The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group, 2003).

Weitere auftretende metabolische Veränderungen (Adipositas, Insulinresistenz, Hyperinsulinämie, Dyslipidämie) werden nicht in die Syndromdefinition einbezogen, da noch nicht geklärt ist, in welchem Zusammenhang sie zum PCOS stehen (Moran et al., 2009).

Ausschlussdiagnosen sind die kongenitale adrenale Hyperplasie, 21-Hydroxylase-Defekte, das Cushing Syndrom, die Hyperprolaktinämie beziehungsweise das Prolaktinom, die Hypothyreose, die Akromegalie, die vorzeitige Ovarinsuffizienz, der hypogonadotrope Hypogonadismus, die einfache Adipositas, virilisierende Neoplasien und medikamentenassoziierte Veränderungen (Ehrmann, 2005).

Trotz dieser genauen Festlegung gibt es Probleme bei der Diagnosefindung. Der Hirsutismus als stärkster Indikator für den Androgenüberschuss ist ein sehr subjektives und kaum standardisiertes Kriterium (The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group, 2003). Bei der Akne als Parameter für den Androgenüberschuss gibt es widersprüchliche Angaben bezüglich der genauen Prävalenz (Slayden et al., 2001). Die androgenetische Alopezie gilt als schlechter Marker für den Androgenüberschuss, außer bei oligo- oder anovulatorischen Patientinnen (Futterweit et al., 1988). Bei der laborchemischen Messung der Androgenspiegel ergeben sich die Probleme aus den inakkuraten und variablen Labormethoden (Rosner, 1997), der großen Streubreite in der (weiblichen) Normalbevölkerung (The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group,

2003) und dadurch, dass bei der Erhebung der Normwerte nicht für Alter und BMI angepasst wurde (Moran et al., 1999). Auch einzelne LH- und FSH-Messungen haben eine geringe diagnostische Sensitivität und sind daher im klinischen Alltag ungeeignet (Ehrmann, 2005).

Darüber hinaus gibt es weitere Kontroversen über die Rotterdam Kriterien, vor allem über die Diagnose bei Frauen ohne Hyperandrogenämie (Azziz, 2006; Frank, 2006). Die Diagnose PCOS kann laut Rotterdam Kriterien auch ohne Vorliegen der Hyperandrogenämie gestellt werden. Dafür müssen die Ultraschallkriterien von 12 oder mehr Follikel in jedem Ovar, die 2-9 mm Durchmesser haben, oder ein erhöhtes Ovarvolumen über 10 ml (van Santbrink et al., 1997; Jonard et al., 2003; Abb. 1) erfüllt sein, sowie eine Oligo- bis Anovulation vorliegen.

Allerdings zeigt sich eine Follikelanzahl über 10 selbst als Zeichen des Androgenexzess. Dasselbe gilt für hohe Anti-Müller-Hormonspiegel (AMH), einem in den Granulosazellen gebildeten Peptid (Dewailly et al., 2010). Es gibt eine hohe Korrelation zwischen erhöhter Follikelanzahl und AMH-Spiegel (Pigny et al., 2006). Deshalb wurde der Vorschlag für Oligo- bis Anovulation und Hyperandrogenismus als Diagnosevoraussetzung gebracht, wobei AMH-Spiegel und Follikelzahl als Surrogatparameter verwendet werden könnten (Dewailly et al., 2010). Diese Idee ergibt sich aus der Tatsache, dass die Grenze bei 12 Follikel unter Benutzung von neuer Ultraschalltechnik zu einer künstlichen Erhöhung der Prävalenz von polyzystischen Ovarien, vor allem bei Frauen unter 30, führt (Duijkers et al., 2009; Johnstone et al., 2010). Das beste Verhältnis aus Sensitivität (81%) und Spezifität (93%) wurde bei einer Follikelzahlgrenze von 19 pro Ovar erreicht. Diese Erhöhung des Schwellenwertes wird durch die bessere Auflösung der heutigen Ultraschallgeräte erreicht, da jetzt auch Follikel unter 2 mm Größe sichtbar sind. Dies sind keine Artefakte, da eine starke Korrelation mit dem AMH-Spiegel besteht. Dabei ist das AMH als Marker sogar verlässlicher als die Follikelzahl, mit einer Spezifität von 97% und einer Sensitivität von 92% bei einem Grenzwert von 35 pmol/l. Außerdem ist eine standardisierte Laborbestimmung besser vergleichbar als der relativ subjektive Ultraschall (Dewailly et al., 2011).

1.2.4. Vererbung

Die polyzystischen Ovarien und der Hyperandrogenismus treten gehäuft bei Verwandten ersten Grades (Azziz et al., 2000) auf und werden mit der Insulinresistenz und den metabolischen Störungen vererbt (Colilla et al., 2001). Allerdings handelt es sich um eine komplexe multigenetische Störung (Ehrmann, 2005) mit Konkordanzraten von 75% in monozygoten Zwillingen und 38% in dizygoten

Zwillingen (Diamanti-Kandarakis und Dunaif, 2012). Circa 40% der Schwestern von PCOS Patientinnen zeigen selbst den Phänotyp der Hyperandrogenämie (Legro et al., 1998). Es zeigte sich in neueren Erhebungen weiterhin eine vermehrte mütterliche statt väterliche Vererbbarkeit der Nüchtern-Dysglykämie (Kobaly et al., 2014). Die intrauterinen Bedingungen kommen als Grund der vermehrten mütterlichen Vererbbarkeit in Frage (Silverman et al., 2014). Es wurden mittlerweile auch reproduzierbare Genloci identifiziert, die als vererbare Faktoren für das PCOS in Frage kommen (Shi et al., 2012), zum Beispiel eine Variante im D19S884 Locus, der sich in Intron 55 des Fibrillin 3 Gens befindet und mit erhöhten Nüchterninsulinspiegeln bei betroffenen Frauen und mit defekter Insulinprozessierung in den β -Zellen der Brüder der Patientinnen in Zusammenhang steht (Urbanek et al., 2007). Des Weiteren konnte ein Polymorphismus des Gens gefunden werden, welches für das Sexual Hormon bindende Globulin kodiert. Dieser ist wahrscheinlich selten, wurde aber in PCOS Patientinnen bei idiopathischem Hirsutismus und ovariellen Versagen identifiziert (Hogeveen et al., 2002). Schwierigkeiten bei der weiteren Forschung entstehen vor allem durch die verringerte Fruchtbarkeit der Patientinnen und der so geringen Zahl der Kinder, die nachbeobachtet werden könnten, dem fehlenden männlichen Phänotyp und der Variabilität der diagnostischen Kriterien (Nam Menke and Strauss, 2007).

1.2.5. Hormonelle Veränderungen

Fast alle betroffenen Frauen haben eine veränderte Gonadotropinsekretion im Vergleich zu Frauen mit einem normalen Menstruationszyklus (Waldstreicher et al., 1988). Bei ihnen ist sowohl das luteinisierende Hormon (LH) als auch das Verhältnis zum follikelstimulierenden Hormon (FSH) im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. Bei 95% war der LH/FSH-Quotient erhöht (Taylor et al., 1997) und der LH-Spiegel befand sich bei 60% Studienteilnehmerinnen über der 95. Perzentile (van Santbrink et al., 1997).

Die Thekazellen des Follikels produzieren Androgene als Antwort auf die LH-Stimulation. Androstendion als Zwischenstufe kann zu Testosteron umgewandelt werden oder zu Östrogen aromatisiert werden (Abb. 2). Folgerichtig reagieren die Thekazellen von Betroffenen auf den erhöhten LH/FSH-Quotient mit der vermehrten Androgenproduktion im Vergleich zu gesunden Frauen (Nelson et al., 2001). Außerdem stimuliert FSH die Aromataseaktivität in Granulosazellen (Abb. 2). Da Frauen mit PCOS einen höheren LH-Spiegel im Vergleich zum FSH-Spiegel haben, werden allerdings weniger Androgene in Östrogene umgewandelt (Ehrmann, 2005).

Auch eine erhöhte Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Pulsatilität erhöht die LH-Produktion (Haisenleder et al., 1991). Deshalb gab es auch die Vermutung einer erhöhten GnRH-Frequenz bei PCOS Patientinnen, aber es ist unklar ob ein pathologischer GnRH-Sekretionsmechanismus zugrunde liegt oder der niedrige Progesteronspiegel aufgrund der seltenen Ovulation (Ehrmann, 2005) ursächlich ist. Dieser könnte die akzelerierte GnRH Pulsatilität verursachen (Eagleson et al., 2000).

Insulin agiert synergistisch mit LH in der Steigerung der thekalen Androgenproduktion, es inhibiert auch die Synthese des sexhormonbindenden Globulins (SHBG), wodurch der Anteil des freien Testosterons erhöht wird (Ehrmann, 2005). Die Insulinresistenz verstärkt somit die Symptome des PCOS noch weiter.

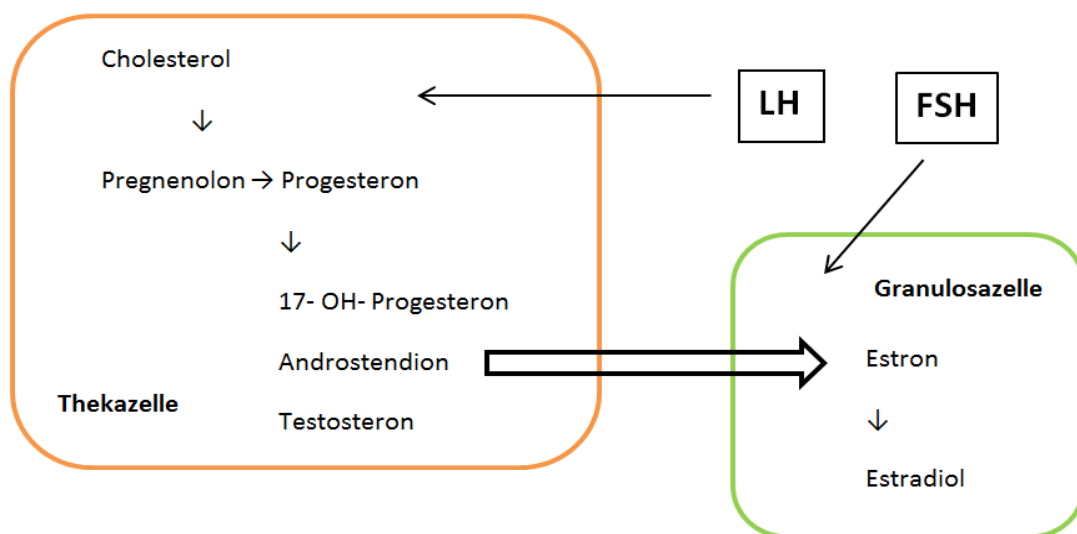


Abb. 1: Übersicht der hormonellen Veränderungen beim PCOS

1.2.6. Metabolismus

Das PCOS und das metabolische Syndrom haben die Insulinresistenz als gemeinsamen Faktor (Ehrmann, 2005). Teilweise wird das PCOS sogar als geschlechtsspezifische Form des metabolischen Syndroms angesehen (National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), 2002).

Adipositas tritt in 30% der Fälle (Ehrmann, 2005), in manchen Studien sogar in 75% der Fälle auf (Azziz et al., 2001). Diese vermehrte (vor allem viszerale) Adipositas geht mit Hyperandrogenämie, Insulinresistenz, Glukoseintoleranz und Dyslipidämie einher (National Cholesterol Education Program

(NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), 2002). In der Tat weisen 30-40% der Patientinnen eine eingeschränkte Glukosetoleranz auf und 10% haben einen manifesten Typ 2 Diabetes mellitus in der vierten Lebensdekade (Legro et al., 1999). Tatsächlich zeigen betroffene Frauen sogar dann häufiger eine Insulinresistenz als Frauen der Vergleichsgruppen, wenn diese für BMI, fettfreie Körpermasse und Körperfettverteilung gematcht wurden (Dunaif et al., 1989). Dunaif et al. (2001) beschreiben eine Verminderung der Insulinrezeptorsubstrat assoziierten Phosphatidylinositol-3-Kinase Aktivität bei betroffenen Frauen. Dieses Phänomen führt zu einer verminderten Glukoseaufnahme in die Zelle trotz adäquater Insulinausschüttung.

Für die Klassifikation der metabolischen Entgleisungen wurde ein Konsens gefunden. Es ist kein Test auf Insulinresistenz für die Diagnose nötig, allerdings sollen adipöse Frauen mit PCOS für das metabolische Syndrom gescreent werden. Dafür gibt es folgende Grenzwerte: (1) Taille >88cm, (2) Triglyceride ≥ 150 mg/dl, (3) HDL <50 mg/dl, (4) Blutdruck $\geq 130/\geq 85$ mmHg, (5) Nüchternblutzucker 110-126 mg/dl und 2-Stunden-OGTT 140-199 mg/dl. Bei drei von fünf zutreffenden Angaben kann die Diagnose metabolisches Syndrom gestellt werden (The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group, 2003).

Des Weiteren treten bei Patientinnen Einschränkungen der vaskulären Reagibilität auf, die größer sind als dass sie allein mit dem erhöhten Gewicht erklärbar wäre (Kelly et al., 2002). Auch verbessern insulinsenkende Therapien die vaskuläre endotheliale Dysfunktion (Paradisi et al., 2003).

Außerdem haben PCOS Patientinnen ein 30fach höheres Risiko für gestörte Schlafatmung, sogar nach Kontrolle auf den BMI (Fogel et al., 2001).

Weiterhin konnte eine erhöhte Prävalenz von Endometriumhyperplasie und –karzinomen beim PCOS (Hardiman et al., 2003) festgestellt werden. Die konstante östrogene Proliferationsstimulation ohne den Differenzierungsreiz des Progesteron nach der Ovulation und die Assoziation des Typ 2 Endometriumkarzinom mit Diabetes und Adipositas (Ehrmann, 2005) scheinen dafür ursächlich zu sein.

1.2.7. Therapie

Orale Kontrazeptiva als Östrogen- Progesteronkombination sind die Standardtherapie gegen Hirsutismus und Akne. Das enthaltene Östrogen verringert den LH-Spiegel und stimuliert die

Produktion des sexhormonbindenden Globulins (SHBG). Allerdings ist diese Therapie umstritten, vor allem wegen der negativen Effekte auf die Insulinresistenz, die Glukosetoleranz, die vaskuläre Reagibilität und Störungen in der Koagulation (Ehrmann, 2005).

Als Mittel der ersten Wahl in der Behandlung der metabolischen Unregelmäßigkeiten verringert Metformin die hepatische Glukoseproduktion, weshalb die Insulin- und Testosteronspiegel sinken (Ehrmann, 2005). Des Weiteren wurden unter Metformin bei schwangeren PCOS Patientinnen seltener ein Gestationsdiabetes (Glueck et al., 2002) und weniger spontane Aborte (Glueck et al., 2001) beobachtet.

Unter dem nicht mehr zugelassenen Troglitazon wurden häufigere Ovulationen als unter Placebo beobachtet, sowie eine niedrigere Testosteron-Konzentration und eine höhere SHBG-Konzentration im Serum gemessen (Azziz et al., 2001). Ähnliche Effekte wurden bei Rosiglitazon (Belli et al., 2004) und Pioglitazon (Romualdi et al., 2003) festgestellt.

Als nichtmedikamentöse Therapie führte auch eine Gewichtsreduktion von 2-7% zu einem reduzierten Androgenspiegel und einer verbesserten Ovulationsfunktion (Hoeger et al., 2004).

1.3. MicroRNA

1.3.1. Allgemein

MicroRNA sind hoch konservierte 9-22 Nukleotide lange, nicht proteinkodierende RNAs, die nur 0,01% der gesamten RNA-Menge in der Zelle ausmachen. Seit ihrer Entdeckung vor zwanzig Jahren in *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1993) wurde beschrieben, dass sie mehr als 30% aller menschlichen Gene regulieren (Bartel, 2009) und an vielen zellulären Prozessen beteiligt sind.

1.3.2. Entstehung und Bearbeitung

MicroRNA codieren in der Regel intergenisch und antisense orientiert zu ihren benachbarten Genen und besitzen einen eigenen Promoter (Hull and Nisenblatt, 2013). Allerdings befinden sich ungefähr ein Drittel der microRNA-Gene in Intronregionen, und zwar auf dem codogenen Strang (Rodriguez et al., 2004; Baskerville and Bartel, 2005).

Die Genese der microRNAs ist ein vielstufiger, komplexer Prozess innerhalb des Nucleus beziehungsweise des Zytoplasmas (s. Abb. 2).

Die *primary microRNA (pri-microRNA)* werden typischerweise, aber nicht in allen Fällen, von der RNA Polymerase II im Zellkern transkribiert, und sie enthalten eine oder mehrere invertierte Wiederholungen, die das Substrat für die weitere Prozessierung bilden (Westholm and Lai, 2011).

Die *pri-microRNA* wird nah ihrer Haarnadelbasis geschnitten, dies erfolgt im Nucleus durch die RNase III Drosha und seinem dsRNA-Bindepartner DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*), bekannt als Pasha in Wirbellosen (Westholm and Lai, 2011). Durch die Spaltung mittels Drosha bleibt in den meisten Fällen eine 55 bis 70 Nukleotide lange *precursor microRNA (pre-microRNA)*, organisiert in einer Haarnadelstruktur, zurück (Ruby, Starck et al., 2007), welche einen 2 Nukleotide langen 3' Überhang aufweist.

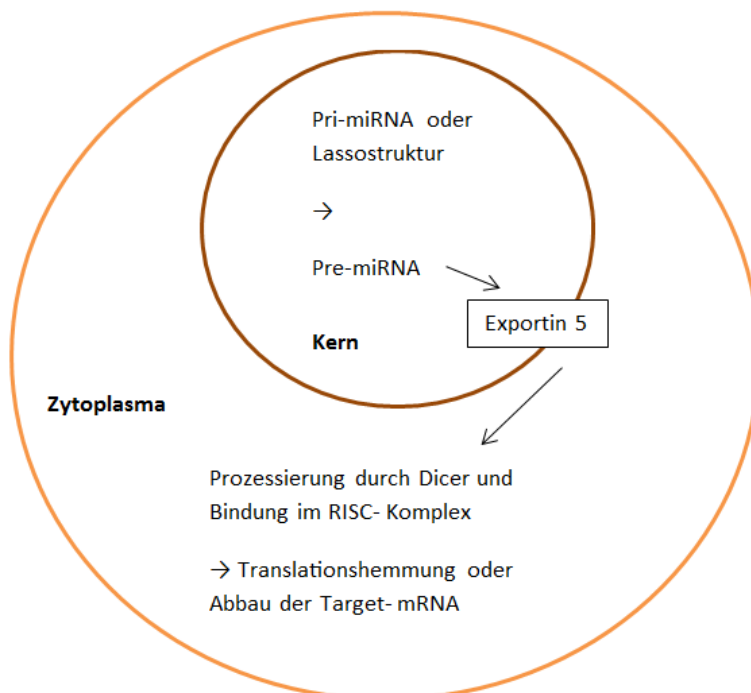


Abb. 2: Intrazelluläre microRNA-Prozessierung und –wirkung

Dieser wird vom Exportfaktor Exportin-5 erkannt (Okada et al., 2009), der die *pre-microRNA* in das Zytoplasma transloziert. Dort angelangt werden die *pre-microRNA* von der RNase III Dicer und seinem dsRNA-Bindepartner TRBP erkannt und geschnitten. Dadurch entstehen um die 22 Nukleotide lange gepaarte RNA, die *microRNA/microRNA*-Duplex* genannt wird, und an jedem Ende einen charakteristischen 3' Überhang hat (Kim et al., 2009).

Der Duplex entwindet sich und die reife microRNA, auch „*guide strand*“ genannt, bindet an das Argonauteprotein im „*RNA induced silencing complex*“ (RISC) (Hull and Nisenblatt, 2013) und entfaltet seine Wirkung über Interaktion mit der *messengerRNA*. Die deaktivierte, an den microRNA-RISC-Komplex gebundene mRNA akkumuliert im Zytoplasma in *p-bodies (processing bodies)*, wo sie gelagert und gegebenenfalls abgebaut wird (Filipowicz et al., 2008). Es gibt allerdings auch Anhaltspunkte dafür, dass microRNA-gebundene mRNA wieder aus den *p-bodies* entlassen und translatiert werden kann (Bhattachryya et al., 2006).

Alternativ können die *pre-microRNA*-Haarnadelstrukturen auch Drosha-unabhängig durch Spleißen und „Entzweigen“ mittels des *Lariat debranching*-Enzyms generiert werden (Ruby et al., 2007; Westholm and Lai, 2011). Dieser sogenannte Mirtronpfad kreiert *pre-microRNA*-Imitate durch Spleißen von kurzen Introns mit der Möglichkeit zur Haarnadelbildung. Das initiale gespleißte Intron ist nicht linear, sondern bildet ein Lasso bei dem der 3' Verzweigungspunkt mit dem 5' Ende des Introns ligiert wird. Aber nach der Entzweigung durch das *Lariat debranching*-Enzym kann dann auch dieses Produkt eine Haarnadelstruktur annehmen und durch Exportin-5 ins Zytoplasma befördert, von Dicer geschnitten und zur Regulation auf Argonauteproteine geladen werden (Ruby, Jan et al., 2007; Okamura et al., 2007). Die Unabhängigkeit dieses Mirtronpfads von Drosha und DGCR8 wurde validiert (Martin et al., 2009).

1.3.3. Wirkung

Normalerweise hemmen microRNA die Transkription ihrer Ziel-mRNA (*targets*), aber es gibt auch Berichte, wonach die Translation gefördert wird (Vasudevan et al., 2007). Es handelt sich hierbei um komplexe Zusammenhänge, denn eine microRNA kann viele Zielgene haben und viele Zielgene werden von mehreren microRNA reguliert (Bartel, 2009). Des Weiteren können microRNAs mit einem gemeinsamen Zielgen aus einem Gencluster transkribiert werden und so ihre Wirkung vervielfachen (Hull and Nisenblatt, 2013). MicroRNA und Transkriptionsfaktoren wirken dabei gegensätzlich in diesen Kontrollmechanismen, so wird das System sehr eng kontrolliert (Flynt and Lai, 2008).

Die Effekte der microRNA variieren zwischen schwacher Repression der Translation der mRNA und vollständigem Abbau derselben. Der Grad der Wirkung richtet sich nach der Übereinstimmung zwischen den Sequenzen der mRNA und der microRNA (Schrauder et al., 2012). Die genannte Translationshemmung wird erreicht durch das Binden des RISC an den 3' untranslatierten Bereich der

mRNA (Filipowicz et al., 2008), allerdings wurden auch andere Mechanismen beschrieben (Lytle et al., 2007).

Tierische microRNAs können Zielgene regulieren, die nur in 7 Nukleotiden im 3'-UTR (*seed sequence*) komplementär sind (Lai, 2002; Brennecke et al., 2005; Doench and Sharp, 2004), dadurch erfassen microRNA hunderte konservierte Ziele (Bartel, 2009). Auf diese Art und Weise könnte jeder Prozess in der Zelle unter Kontrolle von microRNA sein (Westholm and Lai, 2011).

1.3.4. Zirkulierende MicroRNA

Die extreme Stabilität der zirkulierenden microRNA im Serum, trotz der vielen sie umgebenden RNasen, ist die Grundlage ihres Wertes als Biomarker. Sie bietet die Möglichkeit für frühe, nicht invasive, sensitive und spezifische Krankheitserkennung (Schrauder et al., 2012). Des Weiteren ist die Konzentration von Serum-microRNA reproduzierbar und konsistent zwischen einzelnen Individuen (Chen et al., 2008; Mitchell et al., 2008). Außerdem verändern die microRNA-Spiegel im Serum oder Plasma sich nicht nennenswert durch Einfrieren, anschließendes Auftauen, kochen oder die Bearbeitung bei Zimmertemperatur (Mitchell et al., 2008; Gilad et al., 2008). Deswegen haben viele Studien die Präsenz von zirkulierenden microRNA und ihr Potenzial als neue Biomarker vor allem bei Krebserkrankungen untersucht. Beispiele dafür sind das Prostatakarzinom (Mitchell et al., 2008), die Leukämie (Lawrie et al., 2008), das Pankreaskarzinom (Wang et al., 2009), das Ovarkarzinom (Resnick et al., 2009) oder das Mammakarzinom (Heneghan et al., 2010). Die untersuchten microRNA waren detektierbar in Vollblut, Plasma und Serum von Karzinompatienten und Kontrollen (Heneghan et al., 2010). Allerdings waren Konzentration und Ausbeute von *small RNA* aus Serum größer als aus Plasma (van Schooneveld et al., 2012).

MicroRNA können über die Zellmembran hinweg transportiert werden, im Blutstrom sind sie dann zellfrei (Hull and Nisenblatt, 2013). Diese zirkulierenden microRNA gibt es in Mikrovesikeln wie Exosomen, Mikropartikeln und Apoptosekörperchen, die Schutz vor endogenen RNasen bieten (Hunter et al., 2008; Pegtel et al., 2010; Taylor and Gercel-Taylor, 2008; Valadi et al., 2007; Wang et al., 2010). Exosomen und Mikropartikel werden durch einwärtsgerichtete Aussprossung der Zellmembran um die microRNA herum gebildet, später werden sie durch Verschmelzung der Zellmembran an den Blutstrom abgegeben (Kosaka et al., 2010; Pegtel et al., 2010; Wang et al., 2010). Beobachtet werden diese Mikrovesikel jedoch nicht nur in der Blutbahn, sondern unter anderem auch in der Follikelflüssigkeit der Ovarien (Sang et al., 2013). Allerdings verbinden sich über

90% der zirkulierenden microRNA mit Plasmaproteinen und Lipoproteinkomplexen (Cortez et al., 2011), daher rührt auch ihre Stabilität. Bei der Durchführung eines Proteaseverdauens des Plasmas werden auch die microRNA abgebaut (Arroyo et al., 2011). High-Density Lipoproteine (Vickers et al., 2011), die Argonaute2-Komponente des RISC (Arroyo et al., 2011; Turchinovich et al., 2011) und Nukleophosmin (Wang et al., 2010) sind einige der Komplexpartner für intravaskuläre microRNA.

Zirkulierende microRNA können entfernt von ihrem Entstehungsort als interzelluläre Transmitter wirken (Valadi et al., 2007). Die Zielzelle nimmt die microRNA dann mittels Endozytose oder durch Rezeptorbindung der Transportproteine auf (Hull and Nisenblatt, 2013). Die Expressionsprofile der mikrovesikulären microRNA korrelieren allerdings nur schlecht mit denen ihrer Ausgangszelle (Valadi et al., 2007). Dadurch liegt der Rückschluss nahe, dass bestimmte microRNA ausgewählt werden, um entweder in der Zelle zu verbleiben oder abgegeben zu werden (Hull and Nisenblatt, 2013). Die Vermutung wird auch bestätigt von der Erkenntnis, dass verschiedene Stimuli die Anzahl, Zusammensetzung, Freisetzung und Herkunft der Mikropartikel verändern (Pula et al., 2008).

2. Zielstellung

Eine häufige Ursache für weibliche Infertilität ist das Vorliegen eines PCOS. Das PCOS ist mit einer Prävalenz von circa 7% bei Frauen im reproduktionsfähigen Alter eine der häufigsten weiblichen endokrinologischen Störungen. Ihre Haupteigenschaften sind der Hyperandrogenismus und die polyzystischen Ovarien, charakteristisch ist daneben eine chronische Anovulation, die sich als Oligo- oder Amenorrhoe manifestiert und zu verringerter Fertilität führt. Die bisherigen Diagnosekriterien des PCOS stammen bereits von 2003 und beinhalten mit den Zeichen des Hyperandrogenismus und dem Bild der polyzystischen Ovarien zwei sehr subjektive Unterscheidungszeichen. Mit der Untersuchung des Serums der Patientinnen könnte für diese sehr häufige und volkswirtschaftlich relevante Erkrankung, die objektivierbare Untersuchung eines leicht gewinnbaren Materials etabliert werden.

Ziel dieser Arbeit war es die Expressionmuster zirkulierender microRNAs bei Patientinnen mit PCOS im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne PCOS zu beschreiben und mögliche differentiell exprimierte Kandidaten auszuwählen. Weiterhin sollte die Serum-Konzentration der ausgewählten Kandidaten-microRNAs auf Korrelationen zu klinischen und endokrinologischen Parametern der Patientinnen der Studienkohorte untersucht werden. Im Detail sollten dabei potentielle Korrelationen der Serum-Konzentration der ausgewählten microRNAs mit den Diagnose-Kriterien und Charakteristika des PCOS (Diagnose PCOS, Oligomenorrhoe, Zyklusunregelmäßigkeiten, polyzystische Ovarien im Ultraschall, Hyperandrogenismus, androgener Phänotyp) analysiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit untersuchten wir folgende Hypothesen:

1. Es lassen sich differentiell exprimierte microRNA für die Diagnose des polyzystischen Ovarsyndroms finden.
2. Die Expressionsprofile der microRNA miR-181, miR-200a, miR-203, miR-375 und miR-411 unterscheiden sich signifikant zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe.
3. Es gibt Zusammenhänge zwischen den erhobenen Messdaten und der Serum-Konzentration der ausgewählten microRNAs.
4. Es gibt Zusammenhänge zwischen klinischen Parametern und der Serum-Konzentration der ausgewählten microRNAs.

3. Material und Methodik

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
Biofuge pico	Heraeus Instruments
Gefriertruhe	Gram bioline, Vojens, Dänemark
iCycler™ Thermal Cycler (real-time-cycler)	Bio-Rad, München
Kühlschrank	Liebherr Profi Line, Biberach an der Riss
Magnetständer	Ambion Inc., Austin TX, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilmkammer	Roth, Karlsruhe
Sprout™ Tischzentrifuge	Kisker, Steinfurt
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
Vortex Mixer	StarLab, Ahrensburg

3.1.2. Reagenzien

Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg
BD-Puffer	Solis Biodyne, Tartu, Estland
Chloroform	AppliChem, Darmstadt
DNase	Qiagen, Hilden

Entwickler (Kodak)	Sigma Aldrich, Hamburg
Ethanol absolut	Sigma Aldrich, Steinheim
Fixierer (Kodak)	Sigma Aldrich, Steinheim
HOT FIREPol® DNA Polymerase	Solis Biodyne, Tartu, Estland
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt
MgCl ₂	Solis Biodyne, Tartu, Estland
RDD-Puffer	Qiagen, Hilden
Reverse Transkriptase	ThermoScientific, Rockford, USA
Ribolock	ThermoScientific, Rockford, USA
RNAse-freies Wasser	Qiagen, Hilden
TaqMan Primer	Applied Biosystems, Darmstadt
Trizol	Invitrogen, Carlsbad CA, USA

3.1.3. Puffer und Lösungen

Hybridisierungspuffer (MicroRNA-Array)	30 ml 5x Hybridization washing buffer 120 ml Aqua bidest.
Detektionspuffer (MicroRNA-Array)	40 ml 5x Detection washing buffer 160 ml Aqua bidest.
Entwickler (MicroRNA-Array)	80 g Entwickler 500 ml Aqua bidest.
Fixierer (MicroRNA-Array)	100 ml Fixiererkonzentrat 300 ml Aqua bidest.

3.1.4. Kits

Human MicroRNA-Array I-IV	Signosis Inc., Santa Clara, USA
RevertAid™ H Minus Strand cDNA Synthesis Kit	ThermoScientific, Rockford, USA

3.1.5. Verbrauchsmaterial

Einweghandschuhe	Semper Care, Wien, Österreich
Falconröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago IL, USA
Pipettenspitzen mit Filter	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen ohne Filter	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
qPCR-Gefäße und Deckel	Thermo Scientific, Rockford, USA
Reaktionsgefäße 0,5 / 1,5 / 2,0 ml	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Röntgenfilm Cl-Xposure™ Film	Thermo Scientific, Rockford, USA
UVette® routine pack (Küvette)	Eppendorf, Hamburg
peqGOLD PhaseTrap	peqlab, Erlangen

3.1.6. Das Patientenkollektiv

Die Blutproben für die weiteren Untersuchungen stammen von 288 infertilen Patientinnen. Sie wurden in der Zeit von 2010 bis 2013 aus der Kinderwunschsprechstunde des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie im Universitätsklinikum Halle (Saale), Direktor: Prof. Behre, rekrutiert. Bei 134 von ihnen wurde die Diagnose Polyzystisches Ovarsyndrom gestellt und 154 erhielten diese nicht. Auch die retrospektiven Angaben zu den klinischen Parametern der Patientinnen wurden den Akten der Ambulanz entnommen.

Die Proben wurden im Rahmen des durch die Ethikkommission befürworteten Antrags „Polyzystisches Ovarsyndrom und weibliche Infertilität“ gesammelt.

3.2. Methodik

3.2.1. Serumherstellung

Um das Serum zu erhalten wurden mittels Zentrifugation die zellulären Bestandteile abgetrennt, das überstehende Serum abgenommen und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

3.2.2. RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurden 400 µl des gewonnenen Serums nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein *PhaseTrap*-Reaktionsgefäß überführt und mit 750 µl Trizol-Reagenz versetzt. Anschließend wurde gevortext und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde 200 µl Chloroform zugesetzt und kräftig für 2 min per Hand geschüttelt. Dann wurde 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, um Phasentrennung zu erhalten. Die wässrige Oberphase wurde vorsichtig abgenommen ohne die Interphase zu verletzen und zum Weiterarbeiten in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Danach wurde 45 µl DNase-Puffer-Lösung (40 µl RDD-Puffer + 5 µl DNase) zugefügt, durch Invertieren gemischt und inkubiert. Nach der Zugabe von 500µl Isopropanol wurde gevortext und über Nacht bei -20°C zur RNA-Fällung gelagert.

Im Anschluss an die 10- minütige Zentrifugation bei 4°C wurde der Überstand dekantiert und mit 1 ml 96%igem eisgekühltem Ethanol versetzt. Es wurde ein weiterer Zentrifugationsschritt angeschlossen, der Überstand erneut dekantiert und 700 µl 70%iger eisgekühlter Ethanol zugegeben. Noch einmal wurde zentrifugiert und danach der Überstand möglichst vollständig abgenommen und das RNA-Pellet im umgedrehten Tube luftgetrocknet. Nachfolgend wurde das Pellet in 25 µl RNase-freiem Wasser gelöst und bei -20°C oder für längere Zeit bei -80°C gelagert.

3.2.3. RNA-Konzentrationsmessung

Die Konzentration wurde mit einer 1:50 Verdünnung mit RNase-freiem Wasser am Photometer vermessen. Dazu wurde die Extinktion bei 260 und 280 nm Wellenlänge bestimmt. Der Quotient

OD_{260nm}/OD_{280nm} bezeichnet den Reinheitsgrad der Probe. Im Idealfall liegt dieser Wert bei biologischen Proben zwischen 1,7 und 2,1.

3.2.4. MicroRNA-Mikrorarray

Um die microRNA-Konzentrationsprofile im Serum von 3 Patientinnen (1x normalgewichtig, ohne PCOS; 1x Adipositas, ohne PCOS; 1x Adipositas, mit PCOS) zu bestimmen, wurde das Human MicroRNA Array von Signosis Inc. verwendet. Hierbei handelt es sich um ein nicht-radioaktives Northern-Blot-Verfahren. Zur Durchführung wurden zuerst einfache Verdünnungen des Hybridisierungspuffer und des Detektionspuffer, wie in 2.1.3. beschrieben, hergestellt und auf 42°C erwärmt. Danach wurde der Ansatz für das Annealing der microRNA mit den Oligonukleotiden wie folgt pipettiert:

X μ l 5 μ g RNA
10 μ l Oligo Mix
2 μ l Array Detection Oligo
20 μ l Annealing buffer
Ad 14 μ l Aqua bidest.

Um X zu berechnen wurde folgende Formel angewandt:

$$\text{Volumen für } 5\mu\text{g RNA} = \frac{5000\text{ng}}{c \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}\right)}$$

Dieser Ansatz wurde im Thermocycler bei 72°C für 5 Minuten und anschließend bei 53°C für 90 Minuten inkubiert. Währenddessen wurden 5 μ l der *Beads* mit Annealing Puffer gewaschen. Anschließend wurde der fertig inkubierte Ansatz mit *Bead Binding Buffer* und den gewaschenen *Beads* versetzt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden die *Beads* mit *Bead Wash* Puffer doppelt gewaschen und der Überstand verworfen. Als nächstes wurden zur Ligation der microRNA/Oligonukleotidhybride die *Beads* mit 50 μ l Ligationspuffer gewaschen und dann mit 20 μ l desselben Puffers und 5 μ l der Ligase versetzt. Die Inkubation erfolgt für 90 Minuten bei 37°C. Als nächstes wurde ein weiterer Waschschrift mit 100 μ l *Bead Washing Buffer* durchgeführt. Dann wurden 20 μ l des Extension-Mixs zur Resuspension der *Beads* zugegeben. Diese Mischung wurde wie folgt inkubiert:

94°C 2 Minuten
54°C 1 Minute

72°C 1,5 Minuten
94°C 30 Sekunden

Nun wurden die 20 µl des Extension Mixes in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und die *Beads* verworfen. Nach Zugabe von 20 µl *Labeling Mix* und 1 µl T7 RNA Polymerase wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Die Arraymembranen wurden nun in ein 50 ml Falcon überführt, mit destilliertem Wasser befeuchtet und nach dem Verwerfen des Wasser mit 40 ml des *Hybridization Buffer* für mindestens 30 Minuten bei 42°C inkubiert. Der Puffer wurde anschließend dekantiert und durch 4 ml neuen *Hybridization Buffer* ersetzt. Die 40 µl der transkribierten RNA wurden hinzugefügt und die so behandelten Membranen über Nacht im Hybridisierungssofen bei 42°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Membranen zweifach mit *Hybridization Buffer* gewaschen. Danach erfolgte die Detektion.

Die Membranen wurden aus den Falcons entnommen, in ein anderes Gefäß überführt und mit 10 ml *Detection Buffer* abgespült. Unter stetiger Bewegung wurden sie im folgenden Schritt mit 25 ml *Blocking Buffer* geblockt. Anschließend wurde eine Mischung aus 1 ml *Blocking Puffer* und 15 µl Streptavidin-HRP-Konjugat auf die Membranen gegeben und weitere 45 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde der Puffer dekantiert und dreimal für jeweils 10 Minuten mit 15 ml *Detection Buffer* gewaschen.

Nun wurde 1 ml des Detektionsreagenz angemischt und auf die Membranen gegeben. Nach Ablauf von 5 Minuten wurden Röntgenfilme in der Dunkelkammer zu unterschiedlichen Zeitpunkte (0,5, 2 und 5 Minuten) belichtet. Die belichteten Röntgenfilme wurden anschließend entwickelt und fixiert. Mit Hilfe der schematischen Diagramme, die von Signosis Inc. bereitgestellt wurden, wurden die Arrays ausgewertet.

3.2.5. MicroRNA-cDNA-Synthese

Zur Quantifizierung der microRNA-Konzentration im Serum mittels qRT-PCR erfolgte zunächst eine cDNA-Synthese mittels RevertAid H Minus. Es wurden bei RNA-Konzentrationen unter 200 µg/ml 100 ng und bei Konzentrationen über 200 µg/ml 200 ng RNA umgeschrieben. Das benötigte Volumen der isolierten RNA wurde mit folgenden Formeln berechnet:

$$\text{Volumen für } 100\text{ng RNA} = \frac{100\text{ng RNA}}{c (\mu\text{g/ml})}$$

oder $Volumen \text{ für } 200ng \text{ RNA} = \frac{200ng \text{ RNA}}{c (\mu g/ml)}$

Als Reaktionsansatz wurde pipettiert:

3,72 μ l RNase freies Wasser
3,3 μ l 5x Puffer
0,17 μ l dNTPs
1,5 μ l 5x Primer
0,21 μ l Ribolock RNase-Inhibitor
0,7 μ l reverse Transkriptase
X μ l RNA (100ng oder 200ng)
Ad 14,6 μ l RNase freies Wasser

Dieser Mix wurde wie folgt im Thermocycler inkubiert:

16°C 30 Minuten
42°C 30 Minuten
85°C 5 Minuten

Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.6. Quantitative real-time-PCR

Die Analyse der microRNA-Expression erfolgte mittels TaqMan Assay in einer quantitativen Realtime PCR.

Der PCR-Ansatz war wie folgt zusammengesetzt:

9,4 μ l destilliertes Wasser
1,5 μ l BD-Puffer
1,2 μ l MgCl₂
1 μ l dNTPs
0,7 μ l 20x Primer

0,2µl Taq Polymerase
Xµl cDNA

Zum Reaktionsgemisch wurden 400 ng cDNA hinzugefügt.

Die PCR-Reaktion wurde im real-time Cycler mit folgendem Programm durchgeführt:

1. Zyklus (1x): 95°C 15 Minuten
2. Zyklus (15x): 95°C 10 Sekunden
60°C 15 Sekunden
3. Zyklus (45x): 95°C 10 Sekunden
60°C 40 Sekunden

3.2.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software SPSS 20.0 (IBM, Chicago, IL, USA). Die statistischen Analysen umfassten bivariate Korrelationen nach Spearman-Rho und nicht-parametrische Tests (Mann-Whitney-U Test) sowie eine *Analysis of variance* (einseitige ANOVA). Alle Werte $p < 0,05$ wurden als signifikant eingestuft.

4. Ergebnisse

4.1. Übersicht der Studienkohorte

Die Studienkohorte im Rahmen der vorliegenden Promotion bestand aus 288 Probandinnen, die aus dem Patientengut des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg rekrutiert wurden. Die Studienpopulation teilt sich in eine Gruppe von Patientinnen mit der Diagnose „Polyzystisches Ovarsyndrom“ der 134 Teilnehmerinnen angehören und eine Kontrollgruppe mit 154 Probandinnen, die nicht an diesem Krankheitsbild leiden.

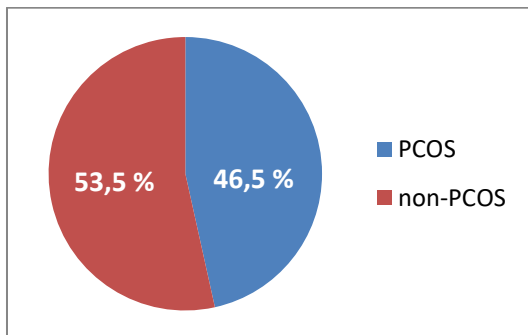


Abb. 3: Verhältnis von PCOS- und Kontrollgruppe

Der Mittelwert des Alters lag in der PCOS Gruppe bei 28,9 Jahren, der Median bei 29 Jahren. In der Kontrollgruppe hingegen belief sich der Mittelwert auf 31,8 Jahre und der Median auf 32 Jahre (s. Abb. 4A). Der Mittelwert des Gewichtes lag bei der PCOS Gruppe bei 77 kg, bei der Kontrollgruppe hingegen nur bei 66,26 kg. Der Median des Gewichtes belief sich auf 73 kg in der PCOS Gruppe und 63 kg in der Kontrollgruppe (s. Abb. 4B). Diese Werte ergeben einen Mittelwert des BMI von 27,6 für die PCOS Gruppe und von 23,5 für die Kontrollgruppe. Die Frauen in der PCOS Gruppe hatten im Mittel 0,75 Schwangerschaften und 0,19 Schwangerschaften während der Therapie. Im Gegensatz dazu traten in der Kontrollgruppe 0,88 Schwangerschaften und 0,33 Schwangerschaften während der Therapie auf. Der Mittelwert der Anzahl an Fehlgeburten lag bei den PCOS Patientinnen bei 0,4 und in der Kontrollgruppe bei 0,38. Der Mittelwert des HOMA-Index lag bei PCOS Patientinnen bei 3,28 und bei der Kontrollgruppe bei 2,7.

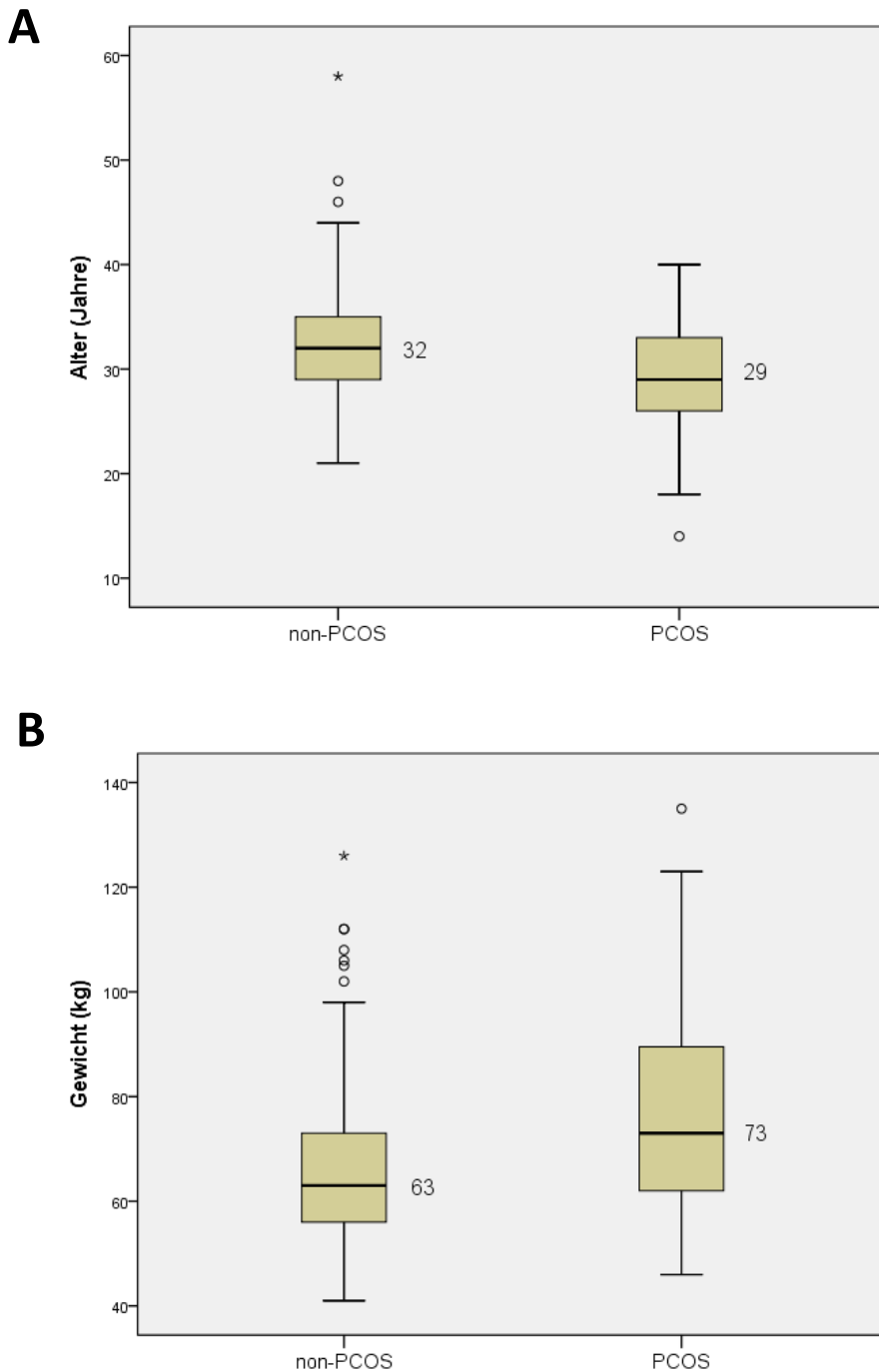


Abb. 4: Verteilung der Parameter Alter (A) und Gewicht (B) bei Probandinnen mit und ohne PCOS.

Bei einem Teil der Probandinnen wurden Hormonanalysen durchgeführt (s. Abb. 5). Bei 62,7% der PCOS Patientinnen wurde der Progesteronspiegel bestimmt, dessen Mittelwert in dieser Patientinnengruppe bei 12,5 nmol/l lag. Im Gegensatz dazu wurde bei 40,9% der Probandinnen der Kontrollgruppe die Progesteronbestimmung durchgeführt, wobei der Mittelwert hier bei 25,12

nmol/l lag. Die Mittelwerte der beiden Gruppen unterscheiden sich hier signifikant mit einem p-Wert von $p < 0,0001$ (einfaktorielle ANOVA). Des Weiteren wurde bei 61,7% der PCOS Patientinnen der LH-Spiegel bestimmt. Der Mittelwert lag hier bei 37,9 U/l. In der Kontrollgruppe wurde bei 25,3% der Patientinnen der LH-Spiegel bestimmt, wobei der Mittelwert bei 10,8 U/l lag. Damit unterscheiden sich die Mittelwerte der beiden Gruppen mit einem p-Wert von $p < 0,0001$ signifikant voneinander (einfaktorielle ANOVA). Außerdem wurden in bei 61,9% in PCOS Gruppe und bei 24% in Kontrollgruppe der FSH-Spiegel bestimmt. Dabei lag der Mittelwert der PCOS Gruppe bei 6,1 U/l und bei der Kontrollgruppe bei 11,16 U/l. Die Mittelwerte unterscheiden sich bei dieser Bestimmung signifikant voneinander bei einem p-Wert von $p = 0,026$ (einfaktorielle ANOVA). Damit liegt der Mittelwert des LH/FSH-Quotienten in der PCOS Gruppe bei 1,9 und in der Kontrollgruppe bei 1,09. Die Mittelwerte unterscheiden sich damit signifikant voneinander bei einem p-Wert von $p < 0,0001$ (einfaktorielle ANOVA).

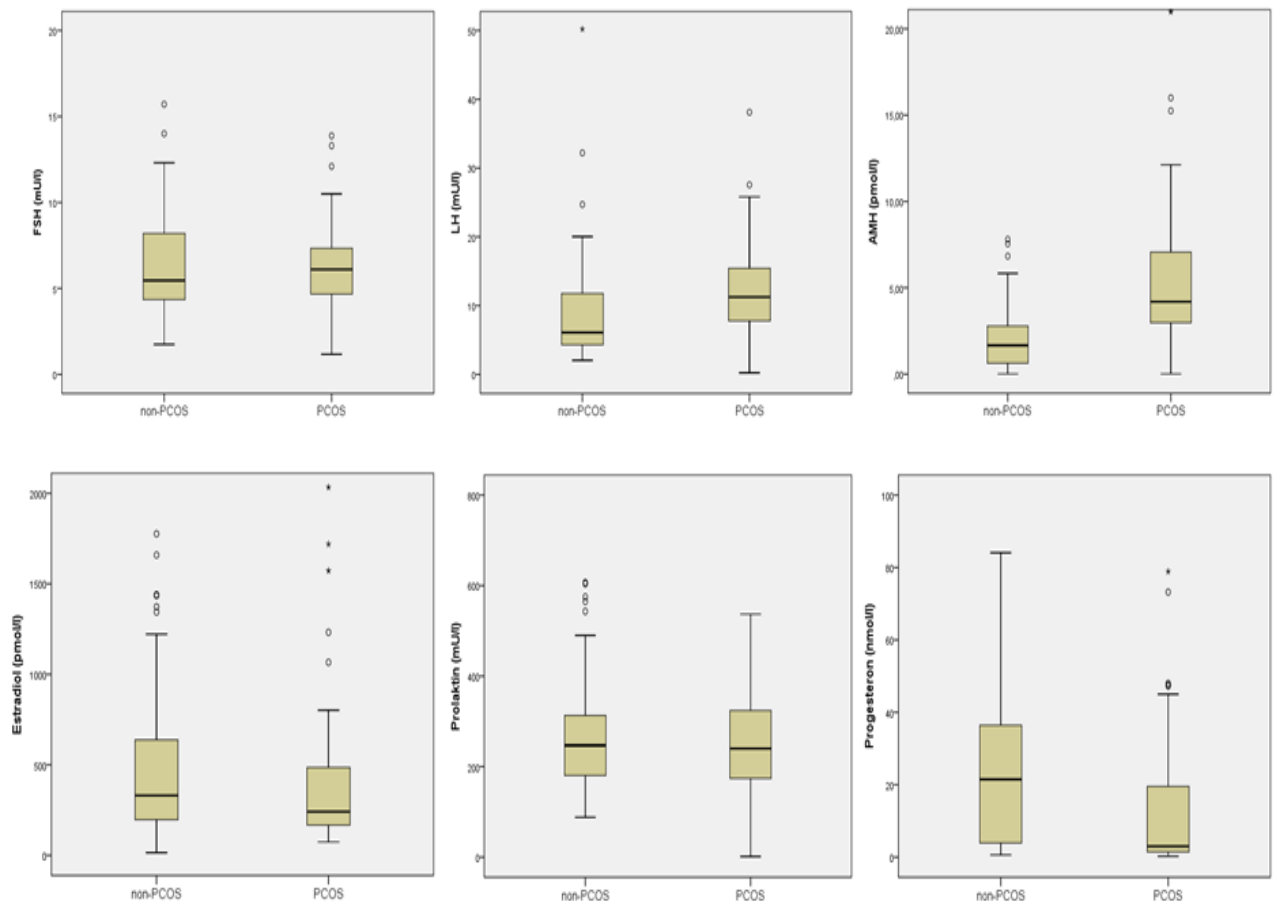


Abb. 5: Darstellung und Verteilung der Ergebnisse der Hormonbestimmungen bei Probandinnen mit und ohne PCOS.

Zusätzlich wurden bei 57,5% der Teilnehmerinnen mit PCOS der Prolaktinspiegel bestimmt, dessen Mittelwert bei 258,9 mU/l lag, wohingegen in der Kontrollgruppe bei 37,7% der Patientinnen diese Bestimmung durchgeführt wurde, und der Mittelwert der Ergebnisse bei 271,3 mU/l lag. Eine Estradiolspiegelbestimmung wurde in der PCOS Gruppe bei 56,7% der Patientinnen durchgeführt, dabei befand sich der Mittelwert bei 453,42 pmol/l. In der Kontrollgruppe wurde die Bestimmung bei 64,9% der Patientinnen durchgeführt und ergab einen Mittelwert von 504,94 pmol/l. Weiterhin wurde auch eine Bestimmung des Anti-Müller-Hormons durchgeführt, in der PCOS Gruppe bei 56,7% der Patientinnen und in der Kontrollgruppe bei 64,9% der Patientinnen. Die Mittelwerte bei den PCOS Patientinnen lagen bei 5,37 pmol/l und bei den Patientinnen der Kontrollgruppe bei 1,95 pmol/l. Dies ergibt einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,0001$ (einfaktorielle ANOVA).

4.2. Microarray-Untersuchungen- differentiell exprimierte microRNAs bei Übergewicht (BMI>25) oder PCOS

Die Microarrays wurde für drei Patientinnen durchgeführt. Davon war eine (1) normalgewichtig (BMI<25), ohne PCOS; die zweite (2) übergewichtig (BMI>25), aber ohne PCOS; und die dritte (3) übergewichtig (BMI>25) und mit einer PCOS Diagnose.

Für jede Patientin wurden 231 verschiedene microRNA und deren Isoformen untersucht, teilweise waren diese auf den Arrays zweimal vorhanden und es erfolgte somit eine Doppelbestimmung. Beispiel-Abbildungen der Mikroarrays I-IV für die normalgewichtige Patientin ohne PCOS finden sich im Anhang.

Für den Faktor Normalgewicht (BMI<25) wurden 14 microRNA differentiell exprimiert. Es handelt sich dabei um let-7e, miR-17-5p, miR-21, miR-28, miR-124a, miR-126, miR-131, miR-143, miR-145, miR-181d, miR-185, miR-186, miR-192 und miR-199a*. Jede der genannten microRNA wurde in zwei Arrays bestimmt. Die miR-145 wurde auf beiden als differentiell exprimiert bestimmt, die anderen waren jeweils nur auf einem der Arrays differentiell exprimiert.

Für den Faktor Übergewicht (BMI>25) wurden 8 microRNA ermittelt, die differentiell exprimiert waren. Diese sind folgende: miR-92b, miR-95, miR-142-3p, miR-183, miR-221, miR-222, miR-296 und miR-372. Jede der genannten microRNA wurde in zwei Arrays bestimmt. Es waren alle microRNAs jeweils nur auf einem der Arrays differentiell exprimiert.

Bei der Patientin der Kontrollgruppe waren im Vergleich zur Patientin mit PCOS 22 microRNA auffällig. Es zeigten sich let 7e-5p, miR-9, miR-17-5p, miR-22, miR-23a, miR-30a-3p, miR-126-3p, miR-148a, miR-155, miR-181a, miR-181b, miR-182, miR-199a, miR-200a, miR-200c, miR-204, miR-216, miR-221, miR-222, miR-223, miR-296 und miR-368. Auch jede dieser microRNA wurde doppelt bestimmt, davon waren die miR-200a, miR-200c und miR-204 in beiden Bestimmungen differentiell exprimiert. Weiterhin überschneidet sich die Bestimmung der differentiellen Expression von let-7e, miR-17-5p und miR-126 auf einem Array mit der des Normalgewichtes und die von miR-221, miR-222 sowie miR-296 mit der des Übergewichtes.

Der letzte die Patientinnen unterscheidende Faktor ist das Vorhandensein eines PCOS. Hier konnte in den Microarray-Untersuchungen keine microRNA als differentiell exprimiert identifiziert werden.

4.3. Bivariate Korrelationsanalysen der Serum-Konzentration der microRNA mit klinischen Parametern der Studienkohorte

Die bivariate Korrelationsanalyse nach Spearman-Rho wurde verwendet, um mögliche Verbindungen zwischen den von uns erhobenen klinischen Messdaten und der microRNA-Konzentration im Serum der Patientinnen zu erkennen, aber auch um Assoziationen zwischen der Serum-Konzentration einzelner microRNAs oder zwischen klinischen Messdaten zu evaluieren.

Die microRNA-Messungen wurden bei allen der 288 Probandinnen durchgeführt. Dabei wurden die microRNA miR-375 in 93 Probandinnen nachgewiesen, der Mittelwert der ΔC_T -Werte betrug 0,0134. Die microRNA miR-181 konnte bei 284 Teilnehmerinnen nachgewiesen werden, der Mittelwert der ΔC_T -Werte betrug 0,0491. Die microRNA miR-200a war bei 272 Probandinnen nachweisbar, mit einem Mittelwert der ΔC_T -Werte von 0,0018. Die microRNA miR-203 wiederum war bei 93 Studienteilnehmerinnen nachweisbar, hier mit einem Mittelwert der ΔC_T -Werte von 0,0001. Außerdem wurde die microRNA miR-411 in 92 Probandinnen nachgewiesen, wobei der Mittelwert ΔC_T -Werte 0,4338 betrug.

Weiterhin wurden Daten erhoben zu Alter, Körpergröße, Gewicht, BMI, Alter, Beginn der Menstruation, Anzahl der wirklichen Geburten, Anzahl der Fehlgeburten, Anzahl der Schwangerschaftsabbrüche, HOMA-Diabetesindex, und Hormonbestimmungen von Progesteron, LH, FSH, Estradiol und Prolaktin. Es wurde weiterhin dokumentiert, an welchem Zyklustag die Blutprobe entnommen wurde.

Hierbei zeigten sich signifikante Korrelation zwischen des BMI und dem Progesteronspiegel ($r_s = -0,179$; $p = 0,030$), sowie zwischen dem Zyklustag der Blutentnahme und der Anzahl der wirklichen Geburten ($r_s = -0,175$, $p = 0,021$). Außerdem konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem Ergebnis des HOMA-Index und der Anzahl der Fehlgeburten ($r_s = 0,432$; $p = 0,035$) und zwischen dem Estradiolspiegel und der Anzahl der wirklichen Geburten ($r_s = 0,181$; $p = 0,031$) ermittelt werden. Zudem zeigte sich- wie zu erwarten- eine signifikante Korrelation zwischen dem Zyklustag der Blutentnahme und den Serumspiegeln von Progesteron ($r_s = 0,267$; $p = 0,003$), FSH ($r_s = -0,370$; $p < 0,0001$), Estradiol ($r_s = 0,322$; $p = 0,002$) sowie des LH/FSH-Quotienten ($r_s = 0,399$; $p < 0,0001$) und Östradiol und Progesteron untereinander ($r_s = 0,216$; $p = 0,024$).

Zwischen der microRNA-Konzentration im Serum und den klinischen Parametern konnten keine signifikanten Zusammenhänge gefunden werden. Es zeigten sich allerdings Korrelationen, die nahe der Signifikanzgrenze von $p < 0,05$ liegen. Die Serum-Konzentration der microRNA miR-181 korrelierte im Trend mit dem HOMA Diabetesindex ($r_s = 0,375$; $p = 0,074$) und dem Menarche-Alter ($r_s = -0,109$; $p = 0,088$). Weiterhin korrelierte im Trend die Serum-Konzentration der microRNA miR-200a und der Zyklustag der Blutentnahme ($r_s = -0,135$, $p = 0,095$), der FSH-Spiegel ($r_s = 0,184$, $p = 0,062$), der LH/FSH-Quotient ($r_s = -0,172$; $p = 0,082$) und der Prolaktinspiegel ($r_s = 0,154$; $p = 0,094$). Darüber hinaus korrelierte im Trend die Serum-Konzentration der microRNA miR-203 und die Körpergröße ($r_s = 0,176$, $p = 0,093$) sowie das Menarche-Alter ($r_s = 0,183$; $p = 0,094$). Ferner korrelierte im Trend die Serum-Konzentration der microRNA miR-411 und die Anzahl der Fehlgeburten ($r_s = -0,188$; $p = 0,074$) sowie der Progesteronspiegel ($r_s = 0,189$; $p = 0,097$).

Der Vergleich der microRNA-Konzentration im Serum untereinander ergab wiederum signifikante Ergebnisse. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Serum-Konzentration der microRNAs miR-375 und miR-181 ($r_s = 0,284$; $p = 0,006$), sowie zwischen der Serum-Konzentration der microRNAs miR-375 und miR-203 ($r_s = 0,390$; $p < 0,001$). Des Weiteren ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen der Serum-Konzentration der microRNAs miR-181 und miR-200a ($r_s = 0,268$; $p < 0,001$), wie auch zwischen der Serum-Konzentration der microRNAs miR-181 und miR-203 ($r_s = 0,306$; $p = 0,003$). Außerdem konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Serum-Konzentration der microRNAs miR-200a und miR-203 ($r_s = 0,217$; $p = 0,037$) wie auch zwischen der Serum-Konzentration der microRNAs miR-200a und miR-411 ($r_s = 0,365$; $p < 0,0001$) festgestellt werden.

4.4. Korrelation der microRNA und klinischer Parameter

Der Mann-Whitney-U-Test wurde verwendet um Unterschiede in der Studienpopulation hinsichtlich der Stärke der Expression einzelner microRNAs in Abhängigkeit von klinischen Parametern deutlich zu machen.

Die klinischen Parameter, nach denen ausgewertet wurde, waren (1) das Vorliegen der Diagnose PCOS, die (2) Oligomenorrhoe, die (3) erfüllten Ultraschallkriterien eines PCOS, der (4) androgene Phänotyp, der (5) Hyperandrogenismus und (6) bestehende Zyklusunregelmäßigkeiten.

Für die Kriterien der Diagnose PCOS und der Oligomenorrhoe zeigten sich keine signifikanten Korrelationen zur Serum-Konzentration der microRNAs miR-375, miR-181, miR-200a, miR-203 oder miR-411.

Tabelle 1: Nichtparametrische Tests zur Assoziation zwischen der Serum-Konzentration der untersuchten microRNAs und der klinischen Diagnose eines PCOS. Angegeben sind die p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests (MWU).

PCOS	miR-375	miR-181	miR-200a	miR-203	miR-411
P (MWU)	0,292	0,404	0,951	0,681	0,662

Tabelle 2: Nichtparametrische Tests zur Assoziation zwischen der Serum-Konzentration der untersuchten microRNAs und dem Vorliegen einer Oligomenorrhoe. Angegeben sind die p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests (MWU).

Oligomenorrhoe	miR-375	miR-181	miR-200a	miR-203	miR-411
P (MWU)	0,582	0,425	0,343	0,812	0,542

Bei der nicht-parametrischen Korrelationsanalyse nach Mann-Whitney-U zwischen dem Vorliegen der Ultraschallkriterien des PCOS und der Serum-Konzentration der analysierten microRNAs konnte hinsichtlich der microRNA miR-181 eine Assoziation nahe der Signifikanzgrenze ermittelt werden (MWU: $p=0,136$). Detektiert werden konnte eine im Mittel leicht erhöhte Serum-Konzentration der miR-181 bei Patientinnen mit dem Nachweis von polyzystischen Ovarien im Ultraschall (s. Abb. 6).

Tabelle 3: Nichtparametrische Tests zur Assoziation zwischen der Serum-Konzentration der untersuchten microRNAs und dem Vorliegen der Ultraschallkriterien eines PCOS (US PCOS). Angegeben sind die p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests (MWU). Farblich markiert ist eine Assoziation in Umgebung der Signifikanzschwelle.

US PCOS	miR-375	miR-181	miR-200a	miR-203	miR-411
MWU	0,493	0,136	0,727	0,411	0,842

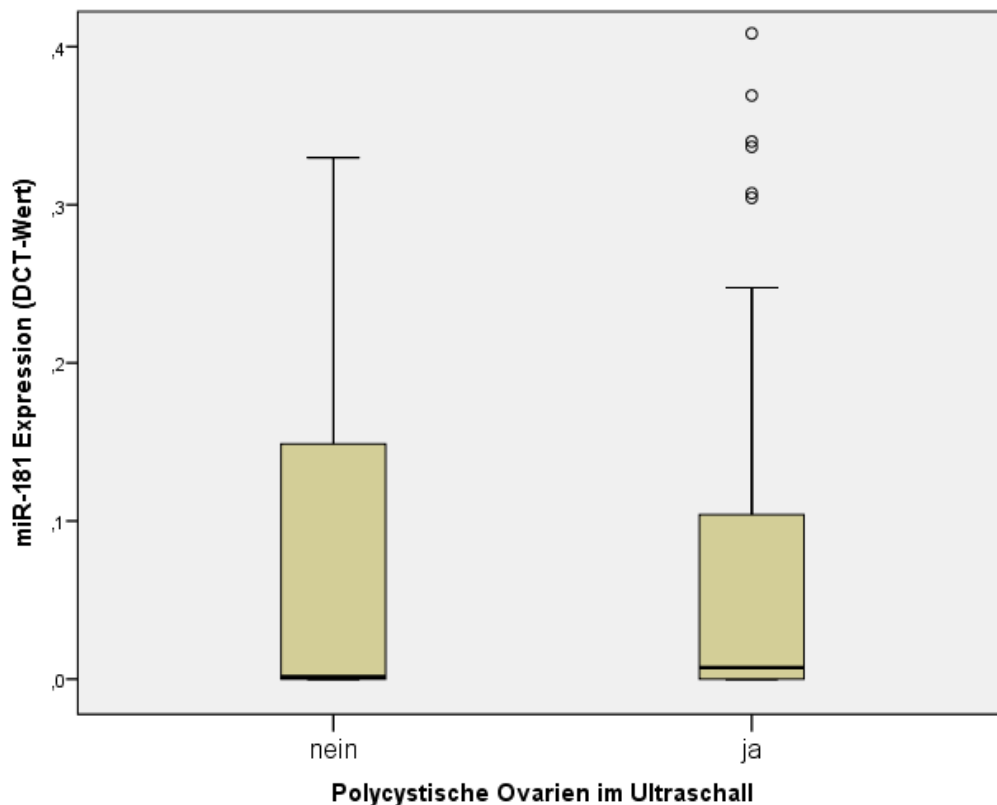


Abb. 6: Box-Plot der Serum-Konzentration der miR-181 im Zusammenhang mit dem Vorliegen von Polycystischen Ovarien im Ultraschall (p=0,136; Mann-Whitney-U Test)

Weiterhin zeigte sich eine Assoziation im Trend für den Vergleich des Vorliegens eines androgenen Phänotyps und die Serum-Konzentration der microRNA miR-203 (MWU: p=0,135). Bei Patientinnen, die einen androgenen Phänotyp aufwiesen, war die Serum-Konzentration der miR-203 im Mittel leicht niedriger als Patientinnen ohne androgenen Phänotyp (s. Abb. 7).

Tabelle 4: Nichtparametrische Tests zur Assoziation zwischen der Serum-Konzentration der untersuchten microRNAs und dem Vorliegen eines androgenen Phänotyps. Angegeben sind die p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests (MWU). Farblich markiert ist eine Assoziation an der Signifikanzschwelle.

Androgener Phänotyp	miR-375	miR-181	miR-200	miR-203	miR-411
MWU	0,908	0,221	0,695	0,135	0,703

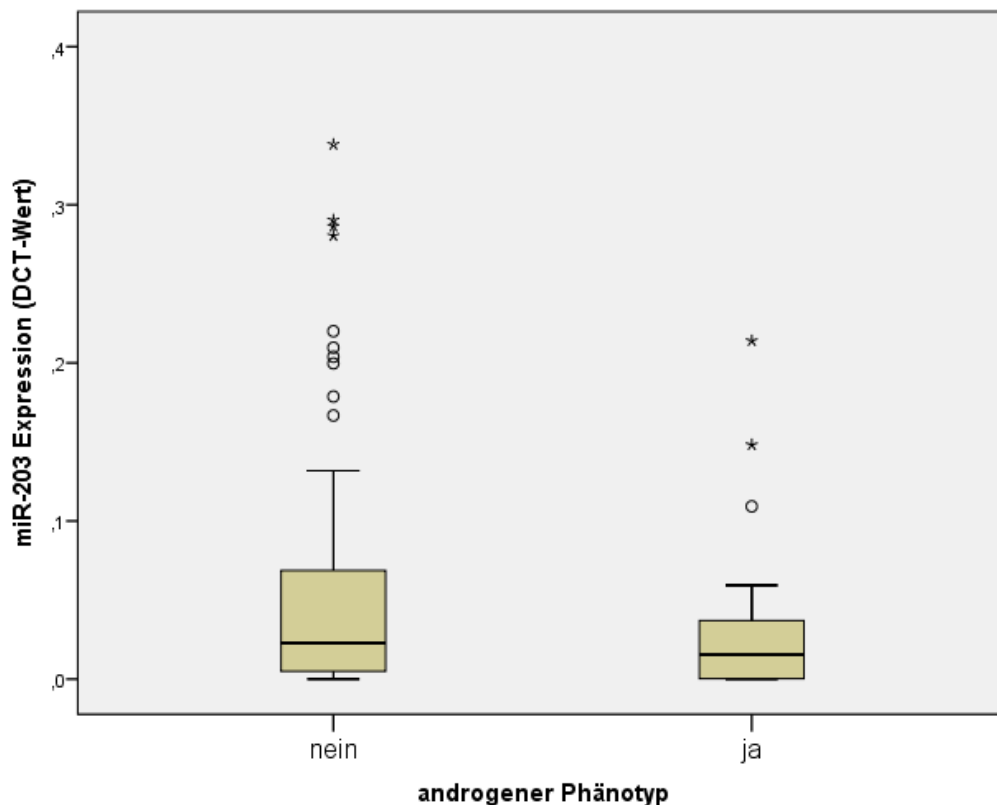


Abb. 7: Box-Plot der Serum-Konzentration der miR-203 im Zusammenhang mit dem Vorliegen eines androgenen Phänotyps ($p=0,135$; Mann-Whitney-U Test)

Bei der nicht-parametrischen Korrelationsanalyse nach Mann-Whitney-U zwischen dem Vorliegen eines Hyperandrogenismus und der Serum-Konzentration der analysierten microRNAs zeigen Patientinnen mit Hyperandrogenismus im Mittel eine signifikant höhere Serum-Konzentration der microRNA miR-200a als die Patientinnen ohne Hyperandrogenismus (MWU: $p=0,001$; s. Abb. 8).

Tabelle 5: Nichtparametrische Tests zur Assoziation zwischen der Serum-Konzentration der untersuchten microRNAs und dem Vorliegen eines Hyperandrogenismus. Angegeben sind die p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests (MWU). Farblich markiert ist eine Assoziation an der Signifikanzschwelle.

Hyperandrogenismus	miR-375	miR-181	miR-200a	miR-203	miR-411
MWU	0,829	0,602	0,001	0,814	0,785

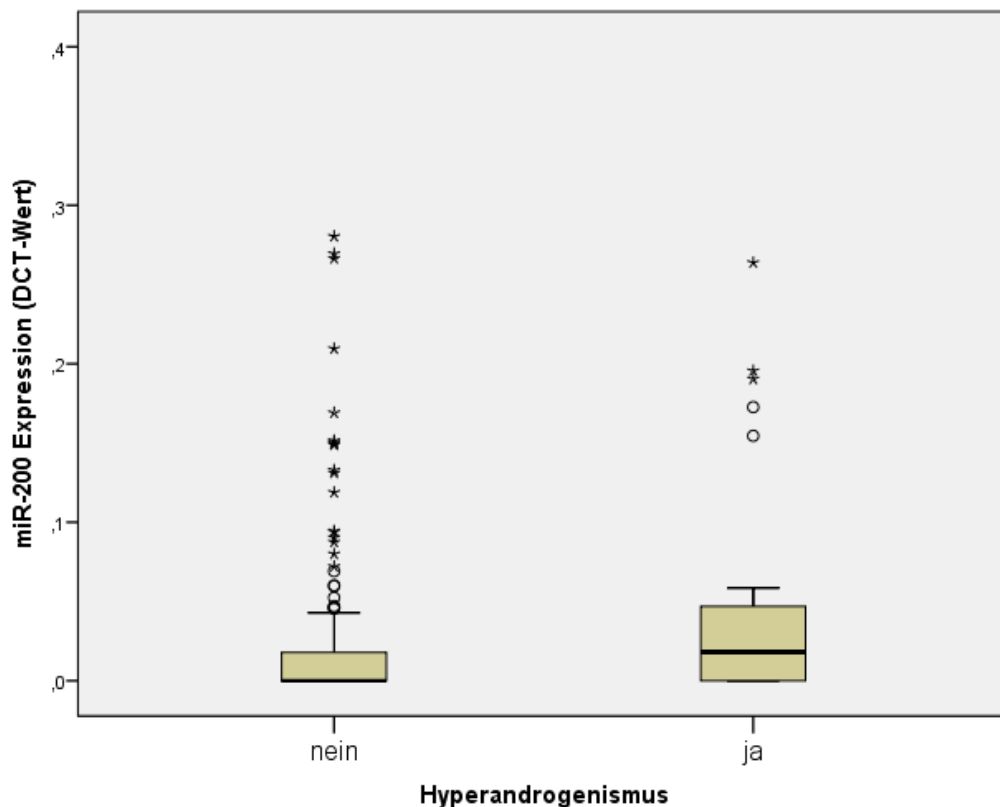


Abb. 8: Box-Plot der Serum-Konzentration der miR-200a im Zusammenhang mit dem Vorliegen eines Hyperandrogenismus (p=0,001; Mann-Whitney-U Test)

Eine weitere Korrelation, die einen Trend zur Signifikanz zeigt, kann zwischen dem Vorliegen von Zyklusunregelmäßigkeiten und der Serum-Konzentration der microRNA miR-200a (MWU: p=0,086) detektiert werden. Dabei haben Patientinnen mit Zyklusunregelmäßigkeiten eine mit Mittel niedrigere Serum-Konzentration der miR-200a (s. Abb. 9).

Tabelle 6: Nichtparametrische Tests zur Assoziation zwischen der Serum-Konzentration der untersuchten microRNAs und dem Vorliegen eines Hyperandrogenismus. Angegeben sind die p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests (MWU). Farbig markiert ist eine Assoziation an der Signifikanzschwelle.

Zyklusunregelmäßigkeiten	miR-375	miR-181	miR-200a	miR-203	miR-411
MWU	0,398	0,795	0,086	0,925	0,963

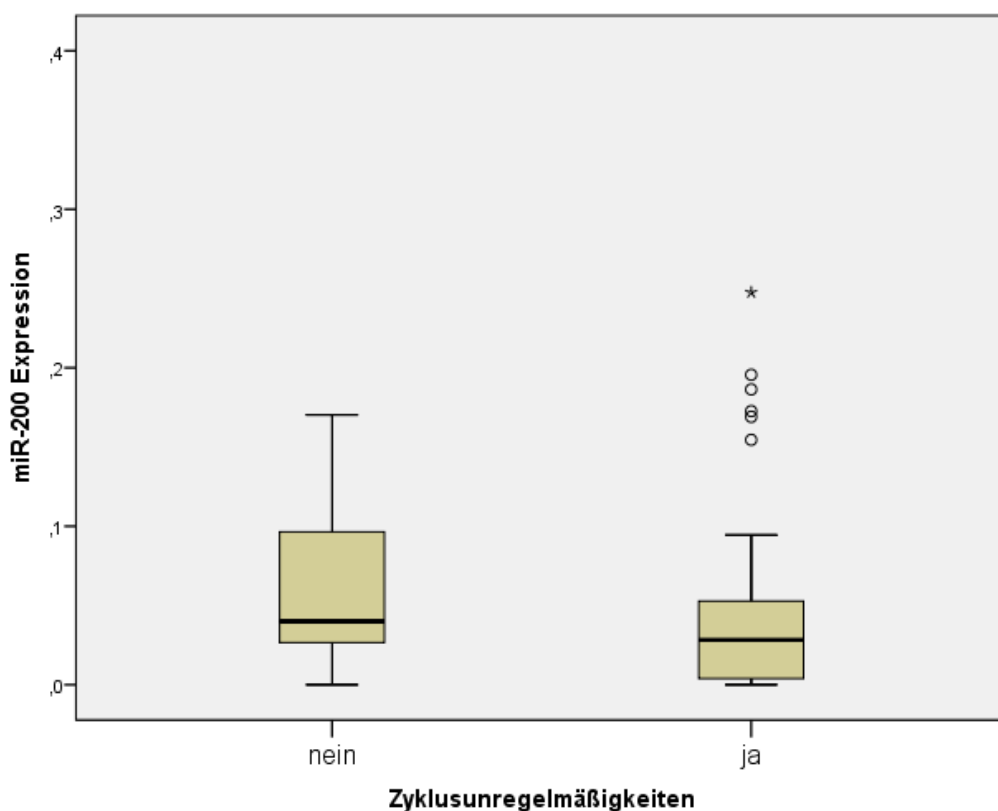


Abb. 9: Box-Plots der Serum-Konzentration der miR-200 im Zusammenhang mit dem Vorliegen von Zyklusunregelmäßigkeiten (p=0,086; Mann-Whitney-U Test)

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Serum-Konzentration der miR-200a signifikant mit einem Hyperandrogenismus in der untersuchten Studienkohorte assoziiert ist, wobei die mittlere Serum-Konzentration der miR-200a bei Patientinnen mit Hyperandrogenismus im Mittel erhöht ist. Zwischen der Serum-Konzentration der untersuchten microRNAs miR-375, miR-181, miR-200a, miR-203 und miR-411 in und den weiteren für das PCOS charakteristischen klinischen Diagnosekriterien konnten keine signifikanten Korrelationen festgestellt werden. Darüber hinaus ist die Serum-

Konzentration der untersuchten microRNAs zwischen den Patientinnen mit und denen ohne PCOS in der Studienkohorte nicht signifikant verändert.

5. Diskussion

5.1. Klinische und endokrinologische Parameter der untersuchten Studienkohorte

Die Kohorte unserer Studie, welche insgesamt aus 288 Probandinnen besteht, die sich in 134 Patientinnen mit PCOS und 154 Kontrollprobandinnen aufteilt, nimmt sich vergleichsweise groß aus. Andere Arbeitsgruppen, die auch zirkulierende microRNA im Zusammenhang mit dem PCOS untersuchten, forschten an Kohorten mit 12 Patientinnen und 12 Kontrollen (Murri et al., 2013) oder jeweils 18 Teilnehmern in jeder Gruppe (Ding et al., 2015). Selbst die Studie von Long und Kollegen (Long et al., 2014) kommt mit einer Gesamtkohorte von 136 Probandinnen nur auf knapp 50% unserer rekrutierten Patientinnen. Dies wiederum zeichnet unsere Arbeit aus, macht unsere Ergebnisse valide und unsere statistische Auswertung zuverlässiger als die der anderen Studien. Lediglich die Studie von Zhao und Kollegen untersuchte eine ähnlich große Kohorte von 384 PCOS Patientinnen, bei denen allerdings nur 100 in Fällen die Serum-Konzentration der Kandidaten-microRNAs (miR-16, miR-30c, miR-92a, miR-146a, miR-191, miR-212, miR-223, miR-451) bestimmt wurde (Zhao et al., 2015). In dieser Studie wurden jedoch zirkulierenden microRNA zur Prädiktion eines ovariellen Hyperstimulationssyndroms analysiert und keine Kontrollgruppe von Nicht PCOS Patientinnen involviert.

Der Mittelwert des Alters lag in der PCOS Gruppe bei 28,9 Jahren, in der Kontrollgruppe hingegen bei 31,8 Jahren. Der mittlere BMI betrug 27,6 für die PCOS Gruppe und 23,5 für die Kontrollgruppe. Der Mittelwert des HOMA-Index lag bei den PCOS Patientinnen bei 3,28 und bei Probandinnen der Kontrollgruppe bei 2,7.

Für das Alter der PCOS Patientinnen sind die Mittelwerte der vergleichbaren Studien ähnlich der unsrigen. Long und Kollegen (Long et al., 2014) gaben dabei 26,6 Jahre, Murri und Kollegen (Murri et al., 2013) dagegen 29 Jahren an. Unsere Kontrollpatientinnen sind mit einem mittleren Alter von 31,8 Jahren geringfügig älter als die der anderen Studien (Long et al.: 27,9 Jahre, Murri et al.: 27 Jahre). Dies kann darin begründet sein, dass unsere Kontrollpatientinnen auch aus der Kinderwunschsprechstunde des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie rekrutiert wurden und in einigen Fällen die reproduktive Beeinträchtigung durch ein höheres Alter begründet sein könnte. Ob dies allerdings einen Effekt auf unsere Erhebungen hat, bleibt spekulativ.

Bezüglich des Gewichtes waren die Patientinnen unserer Kontrollgruppe im Mittel schlanker als die PCOS Patientinnen. Dies ist identisch bei der Studie von Long und Kollegen (BMI PCOS: 25,9, BMI Kontrollen: 22,4; Long et al., 2014) und bei der Studie von Ding und Kollegen (BMI PCOS: 29.1/ 31.5, BMI Kontrollen: 23.5/ 22.7; Ding et al., 2015) und deckt sich mit den Charakteristiken des PCOS.

Weiterhin kongruent mit den Eigenschaften des PCOS ist der bei den Patientinnen erhöhte HOMA-Diabetesindex. Dieser fand sich auch bei der Studie von Ding und Kollegen (2015, PCOS: 2.9/ 3.1, Kontrollen: 1.5/ 1.3; Ding et al., 2015). Auffällig ist dabei, dass in unserer Studienkohorte der HOMA-Index bei den PCOS Patientinnen zwar höher lag, aber auch unsere Kontrollpatientinnen im Mittel einen Wert aufwiesen, der bei einigen Patientinnen eine Insulinresistenz sehr wahrscheinlich macht. Dies bleibt bei unseren weiteren Erhebungen bezüglich des Diabetes und der Insulinresistenz zu berücksichtigen.

Der Mittelwert des Progesteronspiegels lag in der Gruppe der PCOS Patientinnen bei 12,5 nmol/l. Im Gegensatz dazu lag der Mittelwert in der Kontrollgruppe bei 25,12 nmol/l. Die Mittelwerte der beiden Gruppen unterscheiden sich hier signifikant mit einem p-Wert von $p < 0,0001$. In den thematisch mit unserer Studie vergleichbaren Untersuchungen wurde der Progesteronspiegel nicht bestimmt, aber in einer Studie, die sich mit den hormonellen Faktoren des PCOS befasst, wurde ein signifikant höherer Progesteronwert bei den Kontrollen ermittelt (Fakhoury et al., 2012, Progesteron in nmol/L, Fälle: 3.1, Kontrollen: 3.8, p-Wert 0,002).

Für die PCOS Patientinnen lag der Mittelwert des LH-Spiegels bei 37,9 U/l, in der Kontrollgruppe dagegen lag er bei 10,8 U/l. Damit unterscheiden sich die Mittelwerte der beiden Gruppen mit einem p-Wert von $p < 0,0001$ signifikant voneinander. Auch der FSH- Spiegel variierte signifikant zwischen den Gruppen ($p = 0,026$), wobei der Mittelwert der Fallgruppe bei 6,1 U/l und der Kontrollgruppe bei 11,16 U/l lag. Damit unterscheidet sich auch der LH/FSH-Quotient mit einem p-Wert von $p < 0,0001$ signifikant zwischen den Gruppen. Auch Long und Kollegen bestimmten in ihrer Studie für ihre Probandinnen LH und FSH. In der Fallgruppe wurde das LH mit 9,78 U/l und das FSH mit 6,1 U/l bestimmt. In der Kontrollgruppe lag der LH-Wert bei 6,85 U/l und der FSH-Wert bei 6,5 U/l (Long et al., 2014). Mit einem p-Wert von 0,046 für die LH-Bestimmung und 0,019 für die FSH-Bestimmung sind die Bestimmungen auch hier signifikant und unterstützen unsere Ergebnisse. Da die Diskrepanzen zwischen unserer Fall- und Kontrollgruppe größer sind als die der zitierten Studie, unterstreicht dies noch die Relevanz unserer weiteren diesbezüglichen Untersuchungen.

Weiterhin lag der Prolaktinspiegel in der PCOS Gruppe im Mittel bei 258,9 mU/l, wohingegen in der Kontrollgruppe 271,3 mU/l bestimmt wurden. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen

anderer Arbeitsgruppen, da sowohl Long et al. (Prolaktin: Fälle 37,39 ng/ml oder 1,03 mU/l; Kontrollen 11,96ng/ml oder 0,33 mU/l; $p=0,031$; Long et al., 2014), als auch Fakhoury et al. (Prolaktin (mU/l), Fälle: 21.3, Kontrollen: 19.2, $p=0.46$; Fakhoury et al., 2012) in der Fallgruppe höhere Messwerte als in der Kontrollgruppe bestimmt haben. Dies könnte daran liegen, dass bei uns nur 57,5% der Teilnehmerinnen mit PCOS und in Gruppe 2 nur bei 37,7% der Patientinnen der Prolaktinspiegel bestimmt wurde, wodurch unsere Ergebnisse bezüglich des Prolaktins möglicherweise an Validität einbüßen.

Eine Östradiolspiegelbestimmung wurde in der PCOS Gruppe bei 56,7% der Patientinnen durchgeführt, dabei befand sich der Mittelwert bei 453,42 pmol/l. In der Kontrollgruppe wurde die Bestimmung bei 64,9% der Patientinnen durchgeführt und ergab einen Mittelwert von 504,94 pmol/l. Mit einem p-Wert von 0,604 sind die Unterschiede der beiden Gruppen nicht signifikant. Auch bei Fakhoury et al. unterschieden sich die beiden Gruppen nicht signifikant voneinander (Östradiol (pmol/l), Fälle: 100.1, Kontrollen: 96.2, $p= 0.67$; Fakhoury et al. 2012). Bei Long und Kollegen hingegen findet sich ein signifikanter Unterschied mit einem höheren Östrogenwert bei den PCOS Patientinnen (Östradiol (pg/ml), Fälle: 77,1, Kontrollen: 32,9, $p= 0,029$; Long et al., 2014). Die Ergebnisse in unserer Studienkohorte könnte eventuell mit einer Bestimmung bei weiteren Patientinnen klarer dargestellt werden.

Letztlich fand auch eine Bestimmung des Anti-Müller-Hormons (AMH) statt. Die Mittelwerte lagen bei den PCOS Patientinnen bei 5,37 pmol/l und bei den Patientinnen der Kontrollgruppe bei 1,95 pmol/l. Dies ergibt einen signifikanten Unterschied mit einem p-Wert von $<0,0001$ und entspricht auch den Erhebungen von Roth et al. (Anti-Müller Hormon (ng/dl), Fälle: 6.5, Kontrollen: 2.9; Roth et al., 2014). Damit finden sich unsere Ergebnisse bestätigt.

5.2. Korrelation der endokrinologischen und klinischen Daten

In der Korrelation unserer klinischen Daten sahen wir einen negativen Zusammenhang zwischen dem BMI und dem Progesteronspiegel ($r_s=-0,179$, $p=0,030$). Dies bestätigen auch Yeung et al., die bei übergewichtigen Frauen einen 15% geringeren Progesteronspiegel fanden. Sie sehen die Ursache im generell bei adipösen Frauen verringerten LH-Spiegels während des Zyklus und in der Lutealphase (Yeung et al., 2013).

Außerdem konnten wir eine Assoziation zwischen dem Ergebnis des HOMA-Index und der Anzahl der Fehlgeburten ($r_s = 0,432$, $p = 0,035$) detektieren. Zu diesem Ergebnis kamen auch Ispasoiu et al. Sie untersuchten das Nüchtersulin und den HOMA-Index als Parameter für die Insulinresistenz bei Patientinnen mit habituellen Aborten und fanden deutlich höhere Werte für beide Parameter in ihrer Fallgruppe (Ispasoiu et al., 2013). Die Mechanismen hinter dieser Beobachtung sind vielschichtig. Zum einen ist die Insulinresistenz häufig assoziiert mit Hyperkoagulabilität, verminderter Fibrinolyse und der erhöhten Expression inflammatorischer Zytokine (Jakubowicz et al., 2004). Diese Faktoren schaffen zusammen, auch plazentar, ein thrombogenes Milieu und erhöhen so das Risiko für Fehlgeburten (Glueck et al., 1999). Zum anderen spielt die Insulinresistenz eine Rolle im ovariellen Androgenexzess und erhöht so das Risiko für Fehlgeburten durch einen erhöhten Testosteronspiegel (Ispasoiu et al., 2013). Dieser Mechanismus spielt natürlich für unsere Fragestellung in Bezug auf das Polyzystische Ovarsyndrom eine besonders große Rolle.

Weiterhin entdeckten wir einen Zusammenhang zwischen dem Östradiolspiegel und der Anzahl der Geburten ($r_s = 0,181$, $p = 0,031$). Diese Problematik wurde in der Literatur bereits viel diskutiert, vor allem im Hinblick auf die Kriterien für eine in vitro Fertilisation. So fanden Barton et al. (2010) mehr reife Oozyten und eine höhere Embryonenanzahl bei Patientinnen mit höherem Östrogenspiegel. Auch Ziomkiewicz et al. brachten einen niedrigeren Östrogenspiegel mit geringeren Schwangerschaftsraten in Verbindung (Ziomkiewicz et al., 2008). Für die tatsächliche Geburtenanzahl allerdings sahen Zavy et al. bei der IVF nach Kontrolle für die Embryonenqualität keinen Effekt des Östrogenspiegels (Zavy et al., 2014). So bleibt diese Beobachtung weiterhin kontrovers. Vor allem der Unterschied zwischen einer natürlichen Schwangerschaft und der IVF könnte diesbezüglich noch beleuchtet werden.

5.3. MicroRNA- Microarrays im Serum von PCOS Patientinnen

Unsere Microarrays wurden mit dem Serum von drei Patientinnen durchgeführt. Diese unterschieden sich voneinander hinsichtlich ihrer Konstellation bezüglich der Faktoren Gewicht und Diagnose eines PCOS. Es wurden für jede Patientin 231 verschiedene microRNA untersucht.

In Bezug auf den Faktor Normalgewicht wurden 14 microRNA differentiell exprimiert. Dies sind microRNA let-7e, miR-17-5p, miR-21, miR-28, miR-124a, miR-126, miR-131, miR-143, miR-145, miR-181d, miR-185, miR-186, miR-192 und miR-199a*. Davon waren die miR-185 und miR-186 vermindert exprimiert, der Rest hingegen zeigte eine verstärkte Serum-Konzentration. Die miR-145

war als einzige microRNA in der Doppelbestimmung differentiell exprimiert, die anderen microRNAs jeweils nur in einer Einfachbestimmung.

Bei den übergewichtigen Probandinnen wurden 8 microRNA ermittelt, die alle bei diesen Patientinnen vermehrt exprimiert wurden. Diese waren die miR-92b, miR-95, miR-142-3p, miR-183, miR-221, miR-222, miR-296 und miR-372, die alle ebenfalls in einer Einfachbestimmung differentiell exprimiert waren.

Auch andere Arbeitsgruppen haben bereits versucht mittels Microarrays microRNA zu ermitteln, die mit dem Gewicht der Probanden korrelieren. Meerson und Kollegen haben ebenfalls Individuen der höchsten und niedrigsten Gewichtsgruppe ihrer Studienpopulation verglichen. Nach der Anpassung der Ergebnisse nach Alter und Geschlecht zeigten sich bei ihnen die miR-221, miR-193a-3p und miR-193b-5p bei Adipositas vermehrt exprimiert (Meerson et al., 2013). Mit unseren Ergebnissen stimmt hierbei nur die miR-221 überein. Dies könnte entweder begründet sein in der hohen Relevanz dieser microRNA, aber im Gegenteil dazu auch im unterschiedlichen Setting der Untersuchungen. Meerson und Kollegen untersuchten in ihrer Studie 9 adipöse Patienten und 10 Kontrollen, außerdem gehören alle ihre Probanden zum Volksstamm der Pima-Indianer und sie untersuchten keine Serumproben, sondern Biopsien aus subkutanem Bauchfett (Meerson et al., 2013).

Auch im subkutanen Fettgewebe untersuchten Martinelli und Kollegen verschiedene microRNA. In deren Studie waren die miR-10b_MM2, miR-30d, miR-132, miR-150, miR-181a, miR-200a*, miR-299-5p, miR-326, miR-342-3p, miR-376a, miR-432*, miR-498, miR-519d, miR-586, miR-606, miR-611, miR-629*, miR-636, miR-642, miR-646 und miR-663 differentiell exprimiert bei 17 von 20 Übergewichtigen im Vergleich zu den Kontrollen (Martinelli et al., 2010). Bei 20 von 20 adipösen Probanden waren lediglich die microRNAs miR-150, miR-498 und miR-519d hochreguliert, während die miR-371-3p_MM2 und miR-659 herunterreguliert waren (Martinelli et al., 2010). Diese Ergebnisse zeigen keinerlei Überschneidung zu den unsrigen.

In einer weiteren Studie wurde das omentale Fettgewebe adipöser und schlanker Probanden untersucht. Laut Microarray waren hier die miR-122, miR-17-5p, miR-132, miR-143, miR-145 verschieden exprimiert, wobei die miR-17-5p und die miR-132 bei adipösen Patienten geringer exprimiert vorlagen. Es wurden insgesamt 10 Gewebeproben analysiert (Heneghan et al., 2011). Wir sind zu den gleichen Ergebnissen bezüglich der miR-17-5p gekommen. Auch die miR-143, miR-145 sind in unseren Erhebungen auffällig gewesen, sie korrelierten bei uns aber im Gegenteil verstärkt mit niedrigerem Gewicht und nicht mit der Adipositas. Diese Erkenntnisse unterstützen die Ergebnisse von Klötting et al. (2009), dass die miR-17-5p entgegengesetzt mit dem BMI korreliert.

Zusammen sprechen diese Studienergebnisse für eine weiter reichende Bedeutung der miR-17-5p in Bezug auf die Adipositas und liefern hier eventuell sogar einen neuen Ansatz für Therapieforschung.

Im Sinne der fehlenden Diagnose eines PCOS waren 22 microRNA auffällig. Es zeigten sich let-7e-5p, miR-9, miR-17-5p, miR-22, miR-23a, miR-126-3p, miR-148a, miR-155, miR-181a, miR-181b, miR-182, miR-199a, miR-200a, miR-200c, miR-204, miR-216, miR-221, miR-222, miR-223, miR-296 und miR-368 vermehrt exprimiert und die miR-30a-3p vermindert exprimiert. Von diesen wurden die miR-220a, miR-200c und miR-204 doppelt differentiell nachgewiesen. Weiterhin überschneiden sich die Bestimmung von let-7e, miR-17-5p und miR-126 mit der des Normalgewichtes und die von miR-221, miR-222 sowie miR-296 mit der des Übergewichtes. Dies hebt zusätzlich die mögliche Bedeutung der miR-17-5p hervor.

Für den Faktor PCOS konnte keine differentiell exprimierte microRNA nachgewiesen werden.

Ding et al. untersuchten auch Serumproben, jedoch von 9 Patientinnen und 9 Kontrollen, hinsichtlich potenziell für das PCOS relevanter zirkulierender microRNA. In ihren Microarrays zeigten sich die folgenden microRNA verstärkt exprimiert: let-7i-3p, miR-25, miR-27b, miR-125, miR-371, miR-449, miR-638, miR-3665, miR-4463, miR-4490 und miR-5706; und diese microRNA verringert exprimiert: let-7c, miR-29a-3p, miR-124-3p und miR-128 (Ding et al., 2015). Dabei zeigen sich keine gemeinsamen Ergebnisse zwischen den Analysen dieser Arbeitsgruppe und unserer Untersuchung. Dies könnte an deren größerer Probandinnenzahl für die Arrays liegen, da sich weitere Faktoren wie das Alter oder der BMI sowie die Rekrutierung der Patientinnen nicht nennenswert voneinander unterscheiden. Weiterführende Forschungen sind nötig, um die Diskrepanz zwischen den unterschiedlichen Ergebnissen aufzuklären. Sørensen und Kollegen weisen auf den interessanten Aspekt hin, dass viele PCOS Patientinnen vor oder während der microRNA-Analyse bereits IVF-Behandlungen oder Metformin erhalten haben und dies zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen könnte (Sørensen et al., 2014).

Auch Long und Kollegen untersuchten Serumproben. Sie verwendeten die Sera von PCOS Patientinnen und 5 Kontrollen. Dabei konnten sie 8 hochregulierte microRNAs, miR-16, miR-19a, miR-24, miR-30c, miR-106b, miR-146a, miR-186 und miR-222 und eine herunterregulierte microRNA, miR-320, finden (Long et al., 2014). Zu unseren Ergebnissen gibt es nur eine Überschneidung bezüglich der miR-222, allerdings ist bei Long et al. diese microRNA bei Patientinnen mit PCOS stärker exprimiert, in unseren Untersuchungen jedoch vermindert. Dieser Kontrast könnte darin begründet sein, dass bei Long et al. die analysierten Serumproben gepoolt wurden und bei uns jedes Serum einzeln untersucht wurde, zudem könnten aber auch ethnische Faktoren eine Rolle spielen.

Insgesamt ist festzustellen, dass sich unsere Microarray-Ergebnisse zur Analyse von zirkulierenden microRNAs im Serum von PCOS Patientinnen von den Ergebnissen der anderen Studien- sowie die Ergebnisse der anderen Studien untereinander - stark unterscheiden. Dies liegt mit hoher Sicherheit an den stark unterschiedlichen Studiensettings und an Unterschieden in der verwendeten Methodik, verdeutlicht aber in jedem Fall den Bedarf nach einer Standardisierung der Messmethoden sowie nach weiterführender Forschung auf dem Gebiet.

Auch andere Körperflüssigkeiten wurden im Kontext des PCOS auf differentiell exprimierte microRNA untersucht. Roth et al. analysierten die Follikelflüssigkeit von jeweils 4 PCOS Patientinnen und 4 Kontrollen. Sie fanden 29 bei Patientinnen mit PCOS verstärkt exprimierte microRNA, die miR-9, miR-18b, miR-32, miR-34a, miR-34c-5p, miR-122, miR-125a-3p, miR-133a, miR-134, miR-135a, miR-138, miR-142-5p, miR-143, miR-146a, miR-186, miR-214, miR-223, miR-224, miR-383, miR-409-5p, miR-486-3p, miR-489, miR-509-5p, miR-510, miR-532-5p, miR-539, miR-627, miR-642, miR-888 (Roth et al., 2014). Von diesen microRNA zeigen die miR-9 und die miR-223 entgegengesetzte Ergebnisse. In unseren Microarray- Untersuchungen sind sie im Serum der Kontrollpatientin verstärkt exprimiert, bei Roth et al. in der Follikelflüssigkeit der PCOS Patientinnen. Allerdings waren die PCOS Patientinnen in der Studie von Roth et al. mit einem Mittelwert von 33,1 Jahren wesentlich älter als unsere Patientinnen mit einem Mittelwert von 28,9 Jahren (Roth et al., 2014). Weiterhin verweisen Roth et al. auf eine Studie von da Silveira et al., in der Follikularflüssigkeit von Stuten unterschiedlichen Alters unterschiedliche microRNA-Expressionsmuster detektiert wurden (da Silveira et al., 2012). Der Effekt des Alters sollte auch hier berücksichtigt werden. Außerdem wurde durch uns eine andere Methodik als durch Roth et al. verwendet. Diese beiden Aspekte vermindern die Vergleichbarkeit der Studienergebnisse.

Tabelle 7: Übersicht über bisherige Studien zur Expression zirkulierender microRNAs bei PCOS Patientinnen (modifiziert nach Sørensen et al., 2014).

microRNA	Detektiert in...	Expression in PCOS	Referenz
miR-27b	Blut	↑	Murri et al., 2013
miR-30c	Serum	↑	Long et al., 2014
miR-93	Serum	↑	Sathyapalan et al., 2015
miR-103	Blut	↑	Sirotkin et al., 2009; Murri et al., 2013
miR-21	Blut, Follikelflüssigkeit	↑	Murri et al., 2013; Diez-Fraile et al., 2014

miR-135a	Folikelflüssigkeit, Serum, Plasma	↑	Sirotkin et al., 2009; Roth et al., 2014
miR-146a	Folikelflüssigkeit, Serum	↑	Sirotkin et al., 2009; Sang et al., 2013; Long et al., 2014
miR-155	Serum, Folikelflüssigkeit	↑	Sirotkin et al., 2009; Murri et al., 2013
miR-223	Serum, Folikelflüssigkeit	↑	Sathyapalan et al., 2015; Roth et al., 2014
miR-320	Serum, Folikelflüssigkeit	↓	Sang et al., 2013; Long et al., 2014;
miR-9	Folikelflüssigkeit	↑	Roth et al., 2014
miR-18b	Folikelflüssigkeit	↑	Roth et al., 2014
miR-132	Folikelflüssigkeit	↓	Sang et al., 2013; Sirotkin et al., 2009
miR-222	Folikelflüssigkeit	↑	Sang et al., 2013; Long et al., 2014
miR-383	Folikelflüssigkeit	↑	Roth et al., 2014

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die Microarray-Analysen in unserer und in anderen Studien eine Vielzahl verschiedener differentiell exprimierter microRNA im Serum von PCOS Patientinnen zeigten (s. Tabelle 7), wodurch sich die Notwendigkeit ergibt, diese detaillierter zu charakterisieren und im Zusammenhang mit der Pathogenese und dem klinischen Bild des PCOS zu analysieren.

5.4. Spezifische Untersuchung einzelner differentiell regulierter microRNAs im Serum von PCOS Patientinnen

Die Korrelation der von uns untersuchten microRNA-Expressionen untereinander brachte signifikante Ergebnisse. Unter anderem zeigte sich diese zwischen der Serum-Konzentration der microRNA miR-375 und miR-181 ($r_s=0,284$, $p=0,006$), sowie zwischen der Serum-Konzentration der microRNA miR-375 und miR-203 ($r_s=0,390$, $p<0,001$) ein signifikanter Zusammenhang.

Für eine Co-Regulation von miR-375 und miR-181 finden sich in der Literatur bisher keine Hinweise. Über die Ursachen und eventuelle Bedeutung dieser Beobachtung könnten weitere Studien Klarheit bringen.

In Bezug auf die Korrelation von miR-375 und miR-203 konnte in einer anderen Studie die verminderte Expression dieser beiden microRNA in Endometriomen im Vergleich zu gesundem Endometrium nachgewiesen werden (Hawkins et al., 2011). Außerdem zeigten Madhavan et al., dass diese beiden, zusammen mit 6 weiteren microRNA, bei Mammakarzinompatientinnen mit zirkulierenden Tumorzellen verstärkt exprimiert sind (Madhavan et al., 2012). Madhavan und Kollegen analysierten, wie in unserer Studie, zirkulierende microRNA-Expressionsmuster. Dieser Umstand macht ihre Beobachtungen in der Interpretation unserer Resultate besonders interessant. Allerdings wurden weder in dieser, noch in unserer Studie, Mechanismen zur Co-Regulation spezifischer zirkulierender microRNA untersucht. Auch dies könnte Gegenstand weiterer Studien sein.

Des Weiteren fanden wir eine Korrelation zwischen der Expression der microRNA miR-181 und miR-200a ($r_s=0,268$, $p<0,001$). Estella et al. zeigten, dass die miR-181, miR-200a und miR-183 während der Dezidualisierung der Plazenta herunterreguliert sind (Estella et al., 2012). Ihre Studien ergaben auch, dass sich diese microRNAs in einem genomischen cluster lokalisiert sind. Sie sehen dies als mögliche Begründung für die gemeinsame Expression und deren stark ähnliche Sequenzen.

Auch für die microRNA miR-181 und miR-203 fanden wir eine signifikante Assoziation ($r_s=0,306$, $p=0,003$), die bisher nur in Bezug auf den GABA-A-Rezeptor beschrieben wurde. Beide microRNAs sollen - zusammen mit der miR-216 - die Expression des GABA-A-Rezeptor posttranskriptionell regulieren (Zhao et al., 2012).

Außerdem konnten wir eine gemeinsame Expression der microRNA miR-200a und miR-203 ($r_s=0,217$, $p=0,037$) feststellen. Diese wurde auch von Wagner et al. beschrieben, die eine Inhibition dieser und anderer microRNA mit dem verbesserten Ansprechen auf die photodynamische Therapie beim Gallengangkarzinom in Verbindung brachten (Wagner et al., 2014). Ferner wurde auch der Verlust dieser beiden microRNA in Melanometastasen im Vergleich zum Primärtumor beobachtet (van Kempen et al., 2012).

Des Weiteren fanden wir auch zwischen der Expression der microRNA miR-200a und miR-411 eine Korrelation ($r_s=0,365$, $p<0,0001$), die allerdings in der Literatur bisher auch noch nicht beschrieben wurde.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass bisher wenig Forschung zur Co-Regulation verschiedener zirkulierender microRNA und deren Mechanismen stattgefunden hat. Dies könnte Gegenstand weiterer Studien sein und neue Erkenntnisse zu krankheitsassoziierten microRNA, auch in Bezug auf

das polyzystische Ovarsyndrom, erbringen. Auch Sørensen und Kollegen empfehlen, die Forschung vermehrt an microRNA-Familien durchzuführen, da dies eher dem physiologischen Vorkommen der microRNA entspricht (Sørensen et al., 2016).

5.5. MicroRNA miR-181

Dunaif et al. (1997) beschrieben den folliculären Wachstumsarrest und die gehemmte Granulosazellproliferation als charakteristisch für das polyzystische Ovarsyndrom. In anderen Untersuchungen wurde ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression von miR-181 in den Granulosazellen und der verminderten Proliferation derselben gezeigt (Sirotkin et al., 2010). Dies bestätigten auch Zhang et al. (2013) mit der Erkenntnis, dass die miR-181a bei Patientinnen mit PCOS verringert in präantralen und antralen Follikeln im Vergleich zu primären Follikeln exprimiert wird und die Proliferation der Granulosazellen sowie die ovarielle Follikelentwicklung über Suppression des Aktivinrezeptors IIa Expression in Mäusen (Zhang et al., 2013) hemmt.

Im Gegensatz dazu untersuchten wir die Expression der microRNA miR-181 nicht lokal, sondern in der zirkulierenden Form. Wir konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Serumniveau und potentiell mit der ovariellen Funktion in Zusammenhang stehenden Parametern wie Gewicht, BMI, Alter zu Beginn der Menstruation, Anzahl der wirklichen Geburten, Anzahl der Fehlgeburten, Hormonbestimmungen von Progesteron, LH, FSH, Estradiol und Prolaktin, Oligomenorrhoe, androgenem Phänotyp, Hyperandrogenismus und bestehenden Zyklusunregelmäßigkeiten finden. Es stellte sich lediglich eine schwache Korrelation zwischen der microRNA miR-181 und dem Menarche-Alter ($r_s = -0,109$, $p = 0,088$) heraus.

Die Diskrepanz zwischen diesen widersprüchlichen Ergebnissen könnte in der Tatsache begründet sein, dass der Serumspiegel der microRNA nicht notwendigerweise im Zusammenhang zur Expression in den Ovarialzellen steht. Dies bestätigten auch Long et al. (2014) mit der Feststellung, dass bei ihrer Analyse von zirkulierenden microRNA im Serum von PCOS Patientinnen die meisten im Ovarialgewebe differentiell exprimierten microRNA im Serum nicht verändert waren. Sie führen diese Erkenntnis auf das fehlende Wissen zu den Zusammenhängen wie, warum und welche microRNA ins Serum gelangen, zurück.

Des Weiteren wird die miR-181a durch oxidiertes LDL hoch reguliert. Dieses spielt eine wichtige Rolle bei der Atherosklerose und aktiviert dendritische Zellen in diesem Zusammenhang (Choi et al., 2009).

Die miR-181a verhindert diesen Prozess, indem sie die Oberflächenantigenexpression proinflammatorischer Marker hemmt und das Verhältnis der Zytokine verschiebt (Wu et al., 2012). Auch bei der Genexpression in der akuten myeloischen Leukämie korreliert das Level von miR-181a mit der inflammatorischen Antwort (Havelange et al., 2011). Gleichermaßen ist die miR-181a in abdominalen und zirkulierenden Makrophagen gleichzeitig mit inflammatorischen Stimuli erhöht, was mit der frühen Phase der Inflammation kohärent ist und für die homöostatische Regulation der Immunantwort spricht (Xie et al., 2012). Diese These stützt auch die Tatsache, dass die miR-181a/b direkt auf einen Koaktivator von TNF α abzielt, der die negative Feedbackreaktion inflammatorischer Stimuli in Leberepithelzellen steuert (Zhao et al., 2012). Weiterhin geht auch der Diabetes mellitus mit einer schwachen chronischen inflammatorischen Reaktion einher (Jousseaume et al., 2004) und unter antidiabetischer Therapie mit Rosiglitazon senkt sich auch der miR-181a-Spiegel (Xie et al., 2012). Dieser Aspekt ist besonders relevant für den Zusammenhang mit dem polyzystischen Ovarsyndrom, da bei den Patientinnen die Diabetesprävalenz erhöht ist und unter Therapie mit Rosiglitazon die Ovulationsraten stiegen. Alles in allem ist die miR-181 als neuer Biomarker für inflammatorische Krankheiten vorstellbar (Xie et al., 2012).

Unsere Untersuchung zeigt lediglich eine positive Tendenz für den Zusammenhang zwischen der microRNA miR-181 und dem HOMA Diabetesindex ($r_s=0,375$, $p=0,074$), aber kein signifikantes Ergebnis. Dies könnte auch an den unterschiedlichen Ausgangsmaterialien zur Bestimmung liegen und die Schlussfolgerung zulassen, dass in der zirkulierenden Form die Korrelation nicht stark genug ist, damit die microRNA miR-181 als neuer Biomarker fungieren kann. Es könnte aber auch spekuliert werden, dass bei der chronischen Inflammation, die der Diabetes mellitus und das Übergewicht darstellen, die Effekte auf den Serumspiegel nicht für einen signifikanten Zusammenhang ausreichen, wie es vielleicht bei einer fulminanten akuten Infektion der Fall wäre.

Des Weiteren konnten wir für die Ultraschallkriterien des PCOS hinsichtlich der microRNA miR-181 ein Ergebnis nahe der Signifikanzgrenze ermitteln (MWU: $p=0,136$). Zu diesem Kriterium gibt bisher noch keine anderen Untersuchungen, sodass nur Mutmaßungen angestellt werden können in wie weit diese Beobachtung trotzdem relevant sein könnte. Eventuell könnte auch hier die Kontroverse über die Ultraschallkriterien eine Rolle spielen, nämlich, dass es seit Einführung der Kriterien starke Verbesserungen in der Ultraschalltechnik gab und deshalb jetzt mehr Follikel detektiert werden können, was zu einer künstlichen Erhöhung der Prävalenz von polyzystischen Ovarien, vor allem bei Frauen unter 30, führt (Duijkers et al., 2009; Johnstone et al., 2010). Würden die Kriterien wie von Dewailly et al. (2011) vorgeschlagen, angepasst, dann würde es zu diesen vielleicht einen signifikanten Zusammenhang zur microRNA miR-181 geben.

5.6. MicroRNA miR-200a, -c

Die Resultate unserer Erhebungen im Zusammenhang mit der microRNA miR-200a stehen alle im Zusammenhang mit dem Hormonstatus der Patientinnen. Es zeigen sich Ergebnisse nahe der Signifikanzgrenze zwischen der microRNA miR-200a und dem Zyklustag der Blutabnahme ($r_s = -0,135$, $p = 0,095$), dem FSH-Spiegel ($r_s = 0,184$, $p = 0,062$), dem LH/FSH-Quotienten ($r_s = -0,172$, $p = 0,082$) und dem Prolaktinspiegel ($r_s = 0,154$, $p = 0,094$). Des Weiteren unterscheiden sich in unserer Studienkohorte die Patientinnen mit Hyperandrogenismus in Bezug auf die Expression der microRNA miR-200a signifikant von denen, die dieses Kriterium nicht erfüllen (MWU: $p = 0,001$), wobei eine erhöhte Serum-Konzentration der miR-200a mit dem Vorliegen eines Hyperandrogenismus assoziiert ist. Eine weitere Korrelation, die der Signifikanz nahe kommt, ist die zwischen dem Bestehen von Zyklusunregelmäßigkeiten und der Serum-Konzentration der microRNA miR-200a (MWU: $p = 0,086$).

Lin et al. (2015) zeigten, dass die miR-200a in den Ovarien von Frauen mit PCOS, Insulinresistenz und Hyperandrogenismus differentiell exprimiert wird, wobei eine um das 1,88fach signifikant verstärkte Expression der miR-200a in der Patientinnengruppe nur im Microarray detektiert, in den folgenden qRT-PCR jedoch nicht bestätigt werden konnte (Lin et al., 2015). Lin et al. diskutieren als Ursache dafür zum einen ihre geringe Kohortengröße von 18 Probandinnen, zum anderen die unterschiedlichen Androgenspiegel derselben. Die in dieser Studie erzielten Ergebnisse stimmen mit den unsrigen im Kern überein. Die von uns nachgewiesene höhere Serum-Konzentration der miR-200a im Zusammenhang mit dem Vorliegen eines Hyperandrogenismus zeigte sich als signifikant in der untersuchten Studienkohorte von 288 Patientinnen.

In der Literatur findet sich zu anderen hormonellen Veränderungen lediglich eine Beschreibung der microRNA miR-200a bezogen auf den Progesteronspiegel im Myometrium unter der Geburt. Hierbei wurde eine verstärkte Expression der miR-200-Familie bei Mäusen und Menschen entdeckt, dieser Effekt wird verursacht über einen Abfall der Progesteronkonzentration und führt zur einer vermehrten Transkription kontraktionsassoziiierter Gene (Renthal et al., 2010). Weiterhin führt die Erhöhung der miR-200a im Myometrium von Gebärenden zum vermehrten Progesteronabbau, eine Progesteronbehandlung wiederum senkt den miR-200a Spiegel bei Mäusen (Williams et al., 2012).

In Bezug auf relevante Aspekte des Polyzystischen Ovarsyndroms finden sich zwei weitere interessante Forschungsschwerpunkte zur microRNA miR-200a.

Zum einen konnten Belgardt et al. durch Inhibition der miR-200-Familie ein gesteigertes β -Zellüberleben beobachten, sowie eine Steigerung der miR-200a in den Inselzellen von Diabetikern und belegten einen Schutz vor oxidativem Stress und DNA- Schäden in den β -Zellen durch eine miR-200a Inhibition (Belgardt et al., 2015).

Zum anderen wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen die Bedeutung der miR-200a bei der Appetit- und Nahrungsaufnahmeregulation erforscht. Die Gabe eines Leptinantagonisten bei neugeborenen Ratten führte zur vermehrten Insulinresistenz und zum erhöhten miR-200a Spiegel im Hypothalamus (Benoit et al., 2013). Gezielt erzeugtes Übergewicht führte zur erhöhten hypothalamischen miR-200a Expression, die sich unter Leptintherapie wieder normalisierte. Außerdem konnte durch eine Inhibition der miR-200a im Hypothalamus von Mäusen eine Gewichtsreduktion und eine gesteigerte Insulinsensitivität erreicht werden (Crepin et al., 2014). Auch in anderen Geweben, wie der Leber (Dou et al., 2013) und im weißen Fettgewebe von übergewichtigen Mäusen (Chartoumpakis et al., 2012) konnte eine differentielle Expression der miR-200a gezeigt werden.

Zu den Faktoren Gewicht, BMI und HOMA Diabetesindex wurde von uns allerdings kein Zusammenhang nachgewiesen. Die aktuelle Studienlage deckt sich folglich nicht mit unseren Erkenntnissen. Dies könnte daran liegen, dass in diesen Studien die miR-200a lokal vermessen wurde und in unserer Studie in der zirkulierenden Form oder daran, dass die untersuchte Spezies nicht die Gleiche ist. In jedem Fall deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass die miR-200a eine Bedeutung bezüglich des Hormonprofils beim Polyzystischen Ovarsyndrom haben könnte. Weitere Untersuchungen wären vor allem für die LH-, FSH- und die Androgenexpression der Patientinnen und den zu Grunde liegenden Mechanismen interessant, da diese Veränderungen besonders relevant für das PCOS sind.

5.7. MicroRNA-203

Die microRNA miR-203 spielt als Tumorsuppressor eine große Rolle bei der Erforschung pathophysiologischer Zusammenhänge vieler Tumorentitäten. In vielen Studien wurde die microRNA miR-203 als herunterreguliert beschrieben, zum Beispiel in squamösen Karzinomen des Kopf-Halsbereiches (Yuan et al., 2011), in Larynxkarzinomen (Bian et al., 2012), in gastrischen B-Zelllymphomen (Craig et al., 2011), in malignen hämatopoetischen Erkrankungen (Bueno et al., 2008), im Kolonkarzinom (Li et al., 2011), im Prostatakarzinom (Viticchiè et al., 2011) und im Melanom (Noguchi et al., 2012). Außerdem gingen geringere Spiegel im Cervixkarzinom mit mehr

Lymphknotenmetastasen einher und eine Transfektion von Cervixkarzinomzellen mit miR-203 Imitatoren ergab eine Wachstumsinhibition (Zhao et al., 2013). Im gleichen Sinn konnte eine verminderte Expression in Gliomzellen im Vergleich zum normalen Hirngewebe festgestellt werden. Hier korrelierte der miR-203 Spiegel invers zum Tumorgrad nach WHO und positiv mit der Überlebenszeit (He et al., 2013).

Außerdem handelt es sich bei der miR-203 unter anderem um eine hautspezifische miR, die eine Rolle in der epidermalen Differenzierung spielt (Lena et al., 2008; Yi et al., 2008). Genauer gesagt findet man die miR-203 verstärkt exprimiert in den nichtteilenden Zellen und nur gering exprimiert in den sich teilenden Zellen der Suprabasalschicht. Außerdem stoppt eine Induktion von miR-203 die Proliferation der Epidermis. Des Weiteren besteht ein Einfluss auf den Zellzyklus und zwar auf das Verlassen desselben. Eine ausgedehnte Induktion von miR-203 über 72 Stunden bei Keratinozyten in der Zellkultur führt zu einem permanenten Verlust der proliferativen Kapazität (Jackson et al., 2013). Zusätzlich ist die miR-203 erhöht in Haut mit psoriatischen Läsionen und kann direkt die Expression proinflammatorischer Zytokine in Keratinozyten regulieren (Primo et al., 2012).

Neuere Forschungen haben auch einen Zusammenhang zwischen der microRNA miR-203 und Faktoren der Adipositas und dem Typ II Diabetes mellitus offen gelegt.

Die Entdeckung von aktivem braunen Fettgewebe in Erwachsenen (Nedergaard et al., 2007) förderte eine neue Möglichkeit der Therapie der Adipositas durch Erhöhung des Energieverbrauchs (Nedergaard and Cannon, 2010) zu Tage. Interessanterweise entstehen braune Adipozyten in weißem Fettgewebe nach Kälteexposition oder β -adrenerger Stimulation (Himms-Hagen et al., 1994). Die microRNA miR-203 wurde dabei als eine der 10 microRNA beschrieben, die auf die meisten Gene zur Entwicklung und Wachstum des braunen Fettgewebes in Mäusen abzielt (Kim et al., 2014), und konnte auch in menschlichem braunen Fettgewebe nachgewiesen werden (Güller et al., 2015).

Des Weiteren beschreiben Chartoumpakis et al. (2012) die miR-203 herunterreguliert im weißen Fettgewebe adipöser Mäusen nach hochkalorischer Diät. Dies ist die erste Beschreibung der murinen miR-203 im Zusammenhang mit Übergewicht. Diese Studie sieht die Bedeutung der miR-203 in der Zelldifferenzierung, da microRNA, die während der Adipogenese erhöht exprimiert sind, in der Übergewichtsentwicklung meist herunterreguliert vorliegen (Xie et al., 2009).

Außerdem konnten Nesca et al. (2013) eine vermehrte Apoptose von humanen und den β -Zellen von Ratten nach Herunterregulierung von miR-203 beobachten.

Unsere Ergebnisse zur microRNA miR-203 zeigen keinen Bezug zu den Resultaten bisheriger Studien. Zu den für das PCOS relevanten Faktoren die bereits beschrieben wurden, nämlich das Übergewicht und der Diabetes mellitus, konnten wir keine Korrelation feststellen.

Die von uns beobachteten Zusammenhänge zwischen der Serum-Konzentration der microRNA miR-203 und der Körpergröße der Patientinnen ($r_s=0,176$, $p=0,093$), sowie des Menarche-Alters ($r_s=0,183$, $p=0,094$) und dem androgenen Phänotyp (MWU: $p=0,135$) wurden in der Literatur noch nicht beschrieben und bedürfen deswegen weiterer Forschung zur Klärung ihrer Bedeutung und eventueller Zusammenhänge zu bisherigen Forschungsergebnissen.

5.8. MicroRNA miR-375

Die miR-375 spielt eine Rolle als pankreasspezifische microRNA, die die glukoseabhängige Insulinausschüttung der β -Zellen durch direkte Hemmung der Insulinexozytose verringert (Poy et al., 2004). Sie erhält außerdem die normale β -Zellmasse und die Glukosehomöostase. In diesem Sinne führte eine Inhibition von miR-375 bei adipösen Mäusen zu einer Proliferation der β -Zellen und mehr Insulin mRNA. Während miR-375 Knockout Mäuse Hyperglykämie und verringerte Anzahl von β -Zellen zeigten und später dann schweren Diabetes mellitus entwickelten (Poy et al., 2009). Weiterhin korreliert die miR-375 Expression positiv mit dem Ausmaß von Amyloidablagerungen in den Pankreasinseln und negativ mit der Anzahl der β -Zellen und der Mitochondriendichte in denselben. Bei allen der drei Kriterien handelt es sich um Marker für das Ausmaß der Inselzellschädigung (Zhao et al., 2010). Ferner können durch eine Deletion von Dicer während der Pankreasentwicklung zu schweren Schäden an allen Zellarten des Pankreas provoziert werden (Lynn et al., 2007), während ein Knockout von miR-375 zu Defekten in der Entwicklung der Pankreasinseln führt (Kloosterman et al., 2007).

Des Weiteren ist das Expressionsniveau der miR-375 während der Differenzierung von Adipozyten erhöht, sie induziert die Differenzierung von Adipozyten und stimuliert die Genexpression von adipogenen Markern (Ling et al., 2011).

Beiden Wirkungsbereiche dieser microRNA berühren Aspekte, die auch in der Charakteristik von Patientinnen mit polzystischem Ovarsyndrom eine Rolle spielen. Denn sowohl die Prävalenz von Diabetes mellitus als auch von Adipositas ist in diesem Kollektiv im Vergleich zu Normalbevölkerung erhöht.

Higuchi et al. (2015) schlagen weiterhin die microRNA miR-375 als einen neuen Biomarker für den Typ II Diabetes vor. In ihrer Studie fanden sie die microRNA im Serum signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Trotz dieser scheinbar eindeutigen Studienlage, die Zusammenhänge zu wichtigen Aspekten des Polyzystischen Ovarsyndroms zeigt, konnte in unserer Studie kein relevantes Ergebnis erhoben werden. Korrelationen zwischen dem Serum-Konzentration der miR-375 und dem Gewicht, dem BMI sowie dem HOMA Diabetesindex, zeigten keine Verknüpfung.

Obwohl diese Ergebnisse widersprüchlich erscheinen, fanden Latreille et al. (2015) heraus, dass in Mäusen nur 1% der zirkulierenden microRNA miR-375 aus β -Zellen stammt. Der übrige Teil entstammt wahrscheinlich den neuroendokrinen Zellen der Lunge, des Gastrointestinaltrakts, der Schilddrüse und den Nebennieren. Der Plasmalevel der microRNA miR-375 in der von Latreille und Kollegen untersuchten Patientenkohorte mit Diabetes mellitus Typ 2 war nicht signifikant erhöht. Latreille et al. spekuliert, dass dies an den Unterschieden des BMI der Probandinnen der unterschiedlichen Studien liegt. Bei erhöhtem BMI steigt die glomeruläre Filtrationsrate an und die zirkulierenden microRNA werden vermehrt renal ausgeschieden (Bosma et al., 2004; Chagnac et al., 2003; Neal et al., 2011). Da der Mittelwert des BMI unserer Patientinnen mit PCOS bei 27,6 liegt und sich damit zwischen dem der beiden anderen Studien bewegt (Latreille et al.: 31,6, Higuchi et al.: 25,9), und wir keine Daten zur renalen Funktion der Probandinnen erhoben haben, lässt sich über die Wirkung dieses Effekts nur spekulieren. Da der BMI unserer Patientinnen aber überdurchschnittlich hoch ist, könnte die Vermutung des Zusammenhangs mit der glomerulären Filtrationsrate auch hier zutreffen und die Bedeutung der microRNA miR-375 als Serummarker des Diabetes mellitus damit verringern.

Diese Schlussfolgerung wird auch gestützt durch die Ergebnisse von Nesca et al. (2013), die in ihrem Diabetesmodell in Mäusen keinen Unterschied in der Expression der microRNA miR-375 in den Inselzellen ihrer Versuchstiere finden konnten und damit dieser microRNA keine Bedeutung bei der Entstehung des Diabetes zuschreiben.

5.9. MicroRNA miR-411

In unserer Untersuchung konnte ein Zusammenhang zwischen der microRNA miR-411 und der Anzahl der Fehlgeburten festgestellt werden, auch wenn dieser nicht signifikant ausfiel ($r_s=-0,188$, $p=0,074$).

Bisher wurden zu diesem Zusammenhang keine Studien durchgeführt. Allerdings wurde eine Korrelation zwischen der verringerten Expression der microRNA miR-411 im plazentaren Gewebe und dem Auftreten einer Präeklampsie von Zhu et al. (2009) nachgewiesen. Diese Beobachtung wurde von Xu et al. (2014) dahingehend spezifiziert, dass eine Suppression der microRNA miR-411-Spiegel sowohl in Zellen der Chorion-als auch der Basalplatte bei Patientinnen mit schwerer Präeklampsie zu verzeichnen ist.

Unsere Ergebnisse unterstützen die Erkenntnisse der anderen Arbeitsgruppen, obwohl die Spiegel der microRNA im Serum der von uns untersuchten Frauen nicht für einen signifikanten Effekt ausreichten. Mutmaßlich könnte das am unterschiedlichen Forschungsmaterial oder daran liegen, dass unserem Kollektiv keine schwangeren Patientinnen angehören, womöglich wäre der Effekt bei diesen Frauen viel stärker ausgeprägt.

Die Relevanz für das Polyzystische Ovarsyndrom ergibt sich dadurch, dass die Präeklampsie eine wichtige Ursache für Fehlgeburten (Cartwright et al., 2010) darstellt und bei schwangeren Patientinnen mit PCOS vermehrt vorkommt (Boomsma et al., 2006). Diese Beziehung macht die microRNA zu einer potentiell relevanten microRNA, vor allem für schwangere Patientinnen mit PCOS.

Ferner konnten wir eine Verbindung zwischen der microRNA miR-411 und dem Serumprogesteronspiegel ($r_s=0,189$, $p=0,097$) unserer Patientinnen feststellen, dieser Zusammenhang wurde in der Literatur bis jetzt noch nicht beschrieben. Das Ergebnis ist insofern interessant, wenn auch nicht signifikant, als das der Progesteronspiegel bei PCOS Patientinnen, sogar nach Gewichtsanpassung, niedriger ist als in der gesunden Kontrollgruppe (Fakhoury et al., 2012). Bisher ist noch nicht geklärt ob hierfür ein pathologischer GnRH- Sekretionsmechanismus zugrunde liegt oder der niedrige Progesteronspiegel aufgrund der seltenen Ovulation (Ehrmann, 2005) vorliegt. Vielleicht könnte es hier einen Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen zwischen der microRNA miR-411 und der Ovulation und ihren Mechanismen geben.

Die miR-411 stammt aus dem Locus 14p32.31, der viele tumorsuppressive microRNA trägt (Lavon et al., 2010). Sie wurde damit übereinstimmend als vermindert im Serum von Brustkrebspatientinnen erkannt. Hier zeigten Frauen mit unbehandeltem metastasiertem Tumor die geringsten Expression, wobei sich der Spiegel unter einer Therapie normalisierte (van Schooneveld et al., 2012). Auch in Ovarkarzinomzellen wird die microRNA miR-411 geringer exprimiert als in gesunden Ovarzellen (Kim et al., 2014). Diese in der Literatur beschriebenen Zusammenhänge zeigen das Potential dieser microRNA, bei unklaren ovariellen Raumforderungen als Klärung der Differentialdiagnose zwischen Zysten und malignen Befunden in Zukunft als Serummarker zu dienen.

6. Zusammenfassung

Das Polyzystische Ovarsyndrom ist eine der häufigsten Ursachen für weibliche Unfruchtbarkeit in den entwickelten Ländern. Durch die Infertilitätsdiagnostik und -therapie bekommt es eine große psychologische als auch finanzielle Bedeutung für die Betroffenen.

Ziel dieser Arbeit war es die Expressionsmuster zirkulierender microRNAs bei Patientinnen mit PCOS im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne PCOS zu beschreiben und mögliche differentiell exprimierte Kandidaten auszuwählen. Die Relevanz dieser Untersuchungen ergibt sich auch daraus, dass die aktuelle Definition des PCOS bis jetzt sehr subjektive und umstrittene Kriterien beinhaltet.

Zur Umsetzung unserer Zielstellung isolierten wir RNA aus den Serumproben von 288 Probandinnen, von denen 134 zur Fallgruppe und 154 zur Kontrollgruppe gehörten. Zur Ermittlung potentiell relevanter microRNA führten wir bei 3 Patientinnen Microarray Untersuchungen durch und selektierten dann aus den 44 in den Microarrays differentiell exprimierten microRNA anhand der vorhandenen Literaturbefunde 5 microRNA (miR-181, miR-200a, miR-203, miR-375 und miR-411) zur weiteren Untersuchung. Zur Validierung der bisher gefunden Expressionsunterschiede führten wir quantitative real-time-PCR Messungen durch und korrelierten diese Ergebnisse dann mit für das polyzystische Ovarsyndrom relevanten klinischen Messdaten und Parametern.

Wir ermittelten in unserer Studienkohorte signifikante Korrelationen zwischen dem BMI und dem Progesteronspiegel ($r_s = -0,179$, $p = 0,030$), sowie zwischen dem HOMA Diabetesindex und der Anzahl der Fehlgeburten ($r_s = 0,432$, $p = 0,035$). Des Weiteren fanden wir mehrere signifikante Korrelationen der Serum-Konzentration verschiedener microRNAs untereinander. Bezüglich des Zusammenhangs der microRNA mit den klinischen Charakteristika und Messwerten unserer Patientinnen zeigten wir eine signifikante Korrelation zwischen der erhöhten Serum-Konzentration der miR-200a dem Vorliegen eines Hyperandrogenismus (MWU: $p = 0,001$).

Um die von uns gefundenen Ergebnisse genauer verstehen zu können und mehr Erkenntnisse zu den kausalen Zusammenhängen zu erlangen sind weitere Untersuchungen in diesem vielfältigen Forschungsgebiet nötig.

7. Literaturverzeichnis

Achard MC, Thyers MJ (1921) Le virilisme pileire et son association à l'insuffisance glycolytique. (Diabète des femmes a barbe). *Bull Acad Natl Med.* 86, 51–64.

Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanian EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M (2011) Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 5003–5008.

Asuncion M, Calvo RM, San Millan JL, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale HF (2000) A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab.* 85, 2434–2438.

Azziz R (2006) Controversy in clinical endocrinology: diagnosis of polycystic ovarian syndrome: the Rotterdam criteria are premature. *J Clin Endocrinol Metab.* 91, 781–785.

Azziz R, Ehrmann D, Legro RS, Whitcomb RW, Hanley R, Fereshetian AG, O'Keefe M, Ghazzi MN (2001) Troglitazone improves ovulation and hirsutism in the polycystic ovary syndrome: a multicenter, double blind, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 86, 1626–32.

Azziz R, Hincapie LA, Knochenhauer ES, Dewailly D, Fox L, Boots LR (1999) Screening for 21-hydroxylase deficient non-classic adrenal hyperplasia among hyperandrogenic women: a prospective study. *Fertil Steril.* 72, 915–925.

Azziz R, Kashar-Miller MD (2000) Family history as a risk factor for the polycystic ovary syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 13(Suppl 5), 1303–1306.

Bartel, DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 116, 281–297.

Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 136, 215–233.

Barton SE, Missmer SA, Ashby RK, Ginsburg ES (2010) Multivariate analysis of the association between oocyte donor characteristics, including basal follicle stimulating hormone (FSH) and age, and IVF cycle outcomes. *Fertil Steril.* 94, 1292–5.

Baskerville S, Bartel DP (2005) Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring microRNAs and host genes. *RNA.* 11, 241–247.

Belgardt B-F, Ahmed K, Spranger M, Latreille M, Denzler R, Kondratiuk N, von Meyenn F, Nunez Villena F, Herrmanns K, Bosco D, Kerr-Conte J, Pattou F, Rülcke T, Stoffel M (2015) The microRNA-200 family regulates pancreatic beta cell survival in type 2 diabetes. *Nature Medicine.* 21, 619–627.

Belli SH, Graffigna MN, Oneto A, Otero P, Schurman L, Levalle OA (2004) Effect of rosiglitazone on insulin resistance, growth factors, and reproductive disturbances in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 81, 624–9.

- Benoit C, Ould-Hamouda H, Crepin D, Gertler A, Amar L, Taouis M (2013) Early leptin blockade predisposes fat-fed rats to overweight and modifies hypothalamic microRNAs. *J Endocrinol.* 218, 35–47.
- Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W (2006) Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell.* 125, 1111–1124.
- Bhushan R, Grünhagen J, Becker J, Robinson PN, Ott CE, Knaus P (2013) miR-181a promotes osteoblastic differentiation through repression of TGF- β signaling molecules. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 45, 696–705.
- Bian K, Fan J, Zhang X, Yang X-W, Zhu H-Y, Wang L, Sun J-Y, Meng Y-L, Cui P-C, Cheng S-Y, Zhang J, Zhao J, Yang A-G, Zhang R (2012) MicroRNA-203 leads to G1 phase cell cycle arrest in laryngeal carcinoma cells by directly targeting survivin. *FEBS Lett.* 586, 804–809.
- Blumenauer V, Fiedler K, Gnoth C, Kupka M, Tandler-Schneider A, Bühler K, Czeromin U, Krüssel J-S (2013) D.I.R.-Jahrbuch 2012. (2013) *J Reproduktionsmed Endokrinol.* 10 (Sonderheft 2), 1–48.
- Boomsma CM, Eijkemans MJ, Hughes EG, Visser GH, Fauser BC, Macklon NS (2006) A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update.* 12, 673–683.
- Bosma RJ, van der Heide JJ, Oosterop EJ, de Jong PE, Navis G (2004) Body mass index is associated with altered renal hemodynamics in non-obese healthy subjects. *Kidney Int.* 65, 259–265.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2005) Principles of MicroRNA-Target Recognition. *PLoS Biol.* 3., e85.
- Bueno MJ, Pérez deCastro I, Gómez de Cedrón M, Santos J, Calin GA, Cigudosa JC, Croce CM, Fernández-Piqueras J, Marcos Malumbres M (2008) Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell.* 13, 496–506.
- Cartwright JE, Fraser R, Leslie K, Wallace AE, James JL (2010) Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. *Reproduction.* 140, 803–813.
- Chagnac A, Weinstein T, Herman M, Hirsh J, Gafter U, Ori Y (2003) The effects of weight loss on renal function in patients with severe obesity. *J Am Soc Nephrol.* 14, 1480–1486.
- Chartoumpakis DV, Zaravinos A, Ziros PG, Iskrenova RP, Psyrogiannis AI, Kyriazopoulou VE, Habeos IG (2012) Differential expression of microRNAs in adipose tissue after long-term high-fat diet-induced obesity in mice. *PLoS One.* 7, e34872.
- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 18, 997–1006.

- Choi JH , Do Y, Cheong C, Koh H, Boscardin SB, Oh YS, Bozzacco L, Trumpfheller C, Park CG, Steinman RM (2009) Identification of antigen-presenting dendritic cells in mouse aorta and cardiac valves. *J. Exp. Med.* 206, 497–505.
- Cibula D, Hill M, Starka L (2000) The best correlation of the new index of hyperandrogenism with the grade of increased hair. *Eur J Endocrinol.* 143, 405–408.
- Colilla S, Cox NJ, Ehrmann DA (2001) Heritability of insulin secretion and insulin action in women with polycystic ovary syndrome and their first-degree relatives. *J Clin Endocrinol Metab.* 86, 2027–2031.
- Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA (2011) MicroRNAs in body fluids– the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol.* 8, 467–477.
- Craig VJ, Cogliatti SB, Rehrauer H, Wundisch T, Muller A (2011) Epigenetic silencing of microRNA-203 dysregulates ABL1 expression and drives Helicobacter-associated gastric lymphomagenesis. *Cancer Res.* 71, 3616–3624.
- Crepin D, Benomar Y, Riffault L, Amine H, Gertler A, Taouis M (2014) The overexpression of miR-200a in the hypothalamus of ob/ob mice is linked to leptin and insulin signaling impairment. *Mol Cell Endocrinol.* 384, 1–11.
- Dewailly D, Gronier H, Poncelet E, Robin G, Leroy M, Pigny P, Duhamel A, Catteau-Jonard S (2011) Diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS): revisiting the threshold values of follicle count on ultrasound and of the serum AMH level for the definition of polycystic ovaries. *Human Reproduction.* 26(11), 3123–3129.
- 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, 4399–4405.
- Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. (2012) *Endocr Rev.* 33, 981–1030.
- Diez-Fraile A, Lammens T, Tillemann K, Witkowski W, Verhasselt B, De Sutter P, Benoit Y, Espeel M, D’Herde K (2014) Age-associated differential microRNA levels in human follicular fluid reveal pathways potentially determining fertility and success of in vitro fertilization. *Hum Fertil (Camb).* 17(2), 90-8.
- Ding C-F, Chen W-Q, Zhu Y-T, Bo Y-L, Hu H-M, Zheng R-H (2015) Circulating microRNAs in patients with polycystic ovary syndrome. *Human Fertility.* 18(1), 22–29.
- Doench JG, Sharp PA (2004) Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 18, 504–511.
- Dou L, Zhao T, Wang L, Huang X, Jiao J, Gao D, Zhang H, Shen T, Man Y, Wang S, Li J (2013) miR-200s contribute to interleukin-6 (IL-6)-induced insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem.* 288, 22596–22606.

- Duijkers IJ, Klipping C (2009) Polycystic ovaries, as defined by the 2003 Rotterdam consensus criteria, are found to be very common in young healthy women. *Gynecol Endocrinol*. 26, 152–160.
- Dunaif A (1997) Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev*. 18, 774–800.
- Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A (1989) Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes*. 38, 1165–74.
- Dunaif A, Wu X, Lee A, Diamanti-Kandarakis E (2001) Defects in insulin receptor signaling in vivo in the polycystic ovary syndrome (PCOS). *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 281, E392–E399.
- Eagleson CA, Gingrich MB, Pastor CL, Arora TK, Burt CM, Evans WS, Marshall JC (2000) Polycystic ovarian syndrome: evidence that flutamide restores sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. *J Clin Endocrinol Metab*. 85, 4047–52.
- Ehrmann DA (2005) Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med*. 352, 1223–1236.
- Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL, Cavaghan MK, Imperial J (1999) Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care*. 22, 141–6.
- Escobar-Morreale H, Luque-Ramírez M, San Millán JL (2005) The Molecular-Genetic Basis of Functional Hyperandrogenism and the Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrine Reviews*. 26(2), 251–282.
- ESHRE Capri Workshop Group. (1995) Anovulatory infertility. *Hum Reprod*. 10, 1549–1553.
- Estella C, Herrero I, Moreno-Moya JM, Quiñonero A, Martínez S, Pellicer A, Simón C (2012) microRNA Signature and Dicer Requirement during Human Endometrial Stromal Decidualization In Vitro. *PLoS ONE*. 7(7), e41080.
- Fakhoury H, Tamim H, Ferwana M, Siddiqui IA, Adham M, Tamimi W (2012) Age and BMI Adjusted Comparison of Reproductive Hormones in PCOS. *J Fam Med Primary Care*. 1, 132–6.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet*. 9, 102–114.
- Flynt AS, Lai EC (2008) Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity. *Nat. Rev. Genet*. 9, 831–842.
- Fogel RB, Malhotra A, Pillar G, Pittman SD, Dunaif A, White DP (2001) Increased prevalence of obstructive sleep apnea syndrome in obese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 86, 1175–80.
- Franks S (2002) Adult polycystic ovary syndrome begins in childhood. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 16, 263–72.

Franks S (2006) Controversy in clinical endocrinology: diagnosis of polycystic ovarian syndrome: in defense of the Rotterdam criteria. *J Clin Endocrinol Metab.* 91, 786–789.

Futterweit W, Dunaif A, Yeh C, Kingsley P (1988) The prevalence of hyperandrogenism in 109 consecutive female patients with diffuse alopecia. *J Am Acad Dermatol.* 19, 831–836.

Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholakh H, Melamed N, Bentwich Z, Hod M, Goren Y, Chajut A (2008) Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS ONE.* 3, e3148.

Glueck CJ, Phillips H, Cameron D, Sieve-Smith L, Wang P (2001) Continuing metformin throughout pregnancy in women with polycystic ovary syndrome appears to safely reduce first-trimester spontaneous abortion: a pilot study. *Fertil Steril.* 75, 46–52.

Glueck CJ, Wang P, Fontaine RN, Sieve-Smith L, Tracy T, Moore SK (1999) Plasminogen activator inhibitor activity: an independent risk factor for the high miscarriage rate during pregnancy in women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism.* 48(12), 1589–1595.

Glueck CJ, Wang P, Kobayashi S, Phillips H, Sieve-Smith L (2002) Metformin therapy throughout pregnancy reduces the development of gestational diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 77, 520–5.

Güller I, McNaughton S, Crowley T, Gilsanz V, Kajimura S, Watt M, Russell AP (2015) Comparative analysis of microRNA expression in mouse and human brown adipose tissue. *BMC Genomics.* 16, 820.

Haisenleder DJ, Dalkin AC, Ortolano GA, Marshall JC, Shupnik MA (1991) A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo. *Endocrinology.* 128, 509–17.

Hardiman P, Pillay OC, Atiomo W (2003) Polycystic ovary syndrome and endometrial carcinoma. *Lancet.* 361, 1810–2. [Erratum, *Lancet* (2003) 362, 1082.].

Havelange V, Stauffer N, Heaphy CC, Volinia S, Andreeff M, Marcucci G, Croce CM, Garzon R (2011) Functional implications of microRNAs in acute myeloid leukemia by integrating microRNA and messenger RNA expression profiling. *Cancer.* 117, 4696–4706.

Hawkins SM, Creighton CJ, Han DY, Zariff A, Anderson ML, Gunaratne PH, Matzuk MM (2011) Functional MicroRNA Involved in Endometriosis. *Mol Endocrinol.* 25(5), 821–832.

He J, Deng Y, Yang G, Xie W (2013) MicroRNA-203 Down-Regulation Is Associated With Unfavorable Prognosis in Human Glioma. *Journal of Surgical Oncology.* 108, 121–125.

Healthy People 2020.

<http://healthypeople.gov/2020/topicsobjectives2020/objectiveslist.aspx?topicId=26>

Healy DL, Trounson AO, Andersen AN (1994) Female infertility: causes and treatment. *Lancet.* 343, 1539–1544.

- Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, Kerin MJ (2010) Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg.* 251, 499–505.
- Heneghan HM, Miller N, McAnena OJ, O'Brien T, Kerin MJ (2011) Differential microRNA Expression in Omental Adipose Tissue and in the Circulation of Obese Patients Identifies Novel Metabolic Biomarkers. *J Clin Endocrinol Metab.* 96(5), E846–E850.
- Higuchi C, Nakatsuka A, Eguchi J, Teshigawara S, Kanzaki M, Katayama A, Yamaguchi S, Takahashi N, Murakami K, Ogawa D, Sasaki S, Makino H, Wada J (2015) Identification of circulating miR-101, miR-375 and miR-802 as biomarkers for type 2 diabetes. *Metabolism.* 64, 489–497.
- Himms-Hagen J, Cui J, Danforth Jr E, Taatjes DJ, Lang SS, Waters BL, Claus TH (1994) Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. *Am J Physiol.* 266, R1371–82.
- Hoeger KM, Kochman L, Wixom N, Craig K, Miller RK, Guzick DS (2004) A randomized, 48-week, placebo-controlled trial of intensive lifestyle modification and/or metformin therapy in overweight women with polycystic ovary syndrome: a pilot study. *Fertil Steril.* 82, 421–9.
- Hogeveen KN, Cousin P, Pugeat M, Dewailly D, Soudan B, Hammond GL. (2002) Human sex hormone-binding globulin variants associated with hyperandrogenism and ovarian dysfunction. *J Clin Invest.* 109, 973–981.
- Hull L, Nisenblat V (2013) Tissue and circulating microRNA influence reproductive function in endometrial disease. *Reproductive BioMedicine Online.* 27, 515–529.
- Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB (2008) Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One.* 3, e3694.
- Imani B, Eijkemans MJ, de Jong FH, Payne NN, Bouchard P, Giudice LC, Fauser BC (2000) Free androgen index and leptin are the most prominent endocrine predictors of ovarian response during clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrhoeic infertility. *J Clin Endocrinol Metab.* 85, 676–682.
- Ispasoiu C-A, Chicea R, Stamatian FV, Ispasoiu F (2013) High Fasting Insulin Levels and Insulin Resistance May Be Linked to Idiopathic Recurrent Pregnancy Loss: A Case-Control Study. *Int J Endocrinol.* 2013, 576926.
- Jackson SJ, Zhang Z, Feng D, Flagg M, O'Loughlin E, Wang D, Stokes N, Fuchs E, Yi R (2013) Rapid and widespread suppression of self-renewal by microRNA-203 during epidermal differentiation. *Development.* 140, 1882–1891.
- Jakubowicz DJ, Essah PA, Seppälä M, Jakubowicz S, Baillargeon JP, Koistinen R, Nestler JE (2004) Reduced serum glycodelin and insulin-like growth factor-binding protein-1 in women with polycystic ovary syndrome during first trimester of pregnancy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 89(2), 833–9.

- Johnstone EB, Rosen MP, Neril R, Trevithick D, Sternfeld B, Murphy R, Addauan-Andersen C, McConnell D, Pera RR, Cedars MI (2010) The polycystic ovary post-Rotterdam: a common, age-dependent finding in ovulatory women without metabolic significance. *J Clin Endocrinol Metab.* 95, 4965–4972.
- Jonard S, Robert Y, Cortet C, Decanter C, Dewailly D (2003) Ultrasound examination of polycystic ovaries: is it worth counting the follicles? *Hum Reprod.* 18, 598–603.
- Joussen AM, Poulaki V, Le ML, Koizumi K, Esser C, Janicki H, Schraermeyer U, Kociok N, Fauser S, Kirchhof B, Kern TS, Adamis AP (2004) A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *FASEB J.* 18, 1450–1452.
- Kelly CJG, Speirs A, Gould GW, Petrie JR, Lyall H, Connell JMC (2002) Altered vascular function in young women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 87, 742–6.
- Van Kempen LC, van den Hurk K, Lazar V, Michiels S, Winnepenninckx V, Stas M, Spatz A, van den Oord JJ (2012) Loss of microRNA-200a and c, and microRNA-203 expression at the invasive front of primary cutaneous melanoma is associated with increased thickness and disease progression. *Virchows Arch.* 461, 441–448.
- Kennell JA, Gerin I, MacDougald OA, Cadigan KM (2008) The microRNA miR-8 is a conserved negative regulator of Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105, 15417–15422.
- Kim HJ, Cho H, Alexander R, Patterson HC, Gu M, Lo KA, Xu D, Goh VJ, Nguyen LN, Chai X, Huang CX, Kovalik J-P, Ghosh S, Trajkovski M, Silver DL, Lodish H, Sun L (2014) MicroRNAs are required for the feature maintenance and differentiation of brown adipocytes. *Diabetes.* 63(12), 4045–56.
- Kim VN, Han J, Siomi MC (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10, 126–139.
- Kim YK, Kim VN (2007) Processing of intronic microRNAs. *Embo J.* 26, 775–783.
- Kim Y-W, Kim EY, Jeon D, Liu J-L, Kim HS, Choi JW, Ahn WS (2014) Differential microRNA expression signatures and cell type-specific association with Taxol resistance in ovarian cancer cells. *Drug Design, Development and Therapy.* 8, 293–314.
- Klötting N, Berthold S, Kovacs P, Schön MR, Fasshauer M, Ruschke K, Stumvoll M, Blüher M (2009) MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. *PLoS One.* 4, e4699.
- Kloosterman WP, Lagendijk AK, Ketting RF, Moulton JD, Plasterk RHA (2007) Targeted inhibition of microRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol.* 5, e203.
- Kobaly K, Vellanki P, Sisk RK, Armstrong L, Lee JY, Hayes MG, Urbanek M, Legro RS, Dunaif A. (2014) Parent-of-origin effects on glucose homeostasis in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 99(8), 2961–2966.

- Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T (2010) Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J. Biol. Chem.* 285, 17442–17452.
- Lai EC (2002) microRNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative posttranscriptional regulation. *Nat Genet.* 30, 363–364.
- Latreille M, Herrmanns K, Renwick N, Tuschl T, Malecki MT, McCarthy MI, Owen KR, Rüllicke T, Stoffel M (2015) miR-375 gene dosage in pancreatic β -cells: implications for regulation of β -cell mass and biomarker development. *J Mol Med.* 93, 1159–1169.
- Laven JS, Imani B, Eijkemans MJ, Fauser BC (2002) New approaches to PCOS and other forms of anovulation. *Obstet Gynecol Surv.* 57, 755–767.
- Lavon I, Zrihan D, Granit A, Einstein O, Fainstein N, Cohen MA, Cohen MA, Zelikovitch B, Shoshan Y, Spektor S, Reubinoff BE, Felig Y, Gerlitz O, Ben-Hur T, Smith Y, Siegal T (2010) Gliomas display a microRNA expression profile reminiscent of neural precursor cells. *Neuro Oncol.* 12, 422–433.
- Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boulwood J, Wainscoat JS, Hatton CS, Harris AL (2008) Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 141, 672–675.
- Lee RC, Ambros V (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Sci. Signal.* 294, 862.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 75, 843–854.
- Legro RS, Driscoll D, Strauss JF, 3rd, Fox J, Dunaif A. (1998) Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 14956–14960
- Legro RS, Kunesman AR, Dodson WC, Dunaif A (1999) Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab.* 84, 165–9.
- Lena AM, Shalom-Feuerstein R, Rivetti di Val Cervo P, Aberdam D, Knight RA, Melino G, Candi E (2008) miR-203 represses “stemness” by repressing *DeltaNp63*. *Cell Death Differ.* 15, 1187–1195.
- Li J, Chen Y, Zhao J, Kong F, Zhang Y (2011) miR-203 reverses chemoresistance in p53-mutated colon cancer cells through downregulation of *Akt2* expression. *Cancer Let.* 304, 52–59.
- Lin L, Du T, Huang J, Huang L-L, Yang D-Z (2015) Identification of Differentially Expressed MicroRNAs in the Ovary of Polycystic Ovary Syndrome with Hyperandrogenism and Insulin Resistance. *Chin Med J (Engl).* 128(2), 169–174.
- Ling HY, Wen GB, Feng SD, Tuo QH, Ou HS, Yao CH, Zhu BY, Gao ZP, Zhang L, Liao DF (2011) MicroRNA-375 promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation via modulation of ERK signaling. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 38, 239–246.

- Long W, Zhao C, Ji C, Ding H, Cui Y, Guo X, Shen R, Liu J (2014) Characterization of serum microRNAs profile of PCOS and identification of novel non-invasive biomarkers. *Cell. Physiol. Biochem.* 33, 1304–1315.
- Lynn FC, Skewes-Cox P, Kosaka Y, McManus MT, Harfe BD, German MS (2007) MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse. *Diabetes.* 56, 2938Y2945.
- Lytle JR, Yario TA, Steitz JA (2007) Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 9667–9672.
- Martin R, Smibert P, Yalcin A, Tyler DM, Schaefer U, Tuschl T, Lai EC (2009) A *Drosophila* pasha mutant distinguishes the canonical microRNA and mirtron pathways. *Mol Cell Biol.* 29, 861–870.
- Martinelli R, Nardelli C, Pilone V, Buonomo T, Liguori R, Castanò I, Buono P, Masone S, Persico G, Forestieri P, Pastore L, Sacchetti L (2010) miR-519d Overexpression Is Associated With Human Obesity. *Obesity.* 18, 2170–2176.
- Meerson A, Traurig M, Ossowski V, Fleming JM, Mullins M, Baier LJ (2013) Human adipose microRNA-221 is upregulated in obesity and affects fat metabolism downstream of leptin and TNF- α . *Diabetologia.* 56, 1971–1979.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105, 10513–10518.
- Moran C, Knochenhauer E, Boots LR, Azziz R (1999) Adrenal androgen excess in hyperandrogenism: relation to age and body mass. *Fertil Steril.* 71, 671–674.
- Moran L, Teede H (2009) Metabolic features of the reproductive phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction Update.* 15(4), 477–488.
- Murri M, Insenser M, Fernández-Durán E, San-Millán JL, Escobar-Morreale HF (2013) Effects of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), Sex Hormones, and Obesity on Circulating microRNA-21, microRNA-27b, microRNA-103, and microRNA-155 Expression. *J Clin Endocrinol Metab.* 98(11), E1835–E1844.
- Nam Menke M, Strauss JF 3rd. (2007) Genetics of polycystic ovarian syndrome. *Clin Obstet Gynecol.* 50(1), 188–204.
- National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) (2002) Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III): final report. *Circulation.* 106, 3143–421.
- Neal CS, Michael MZ, Pimlott LK, Tyong TY, Li JYZ, Gleagle JM (2011) Circulating microRNA expression is reduced in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 26, 3794–3802.

- Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B (2007) Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 293, E444–52.
- Nedergaard J, Cannon B (2010) The changed metabolic world with human brown adipose tissue: therapeutic visions. *Cell Metab.* 11, 268–72.
- Nelson VL, Qin KN, Rosenfield RL, Wood JR, Penning TM, Legro RS, Strauss III JF, Mc Allister JM (2001) The biochemical basis for increased testosterone production in theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 86, 5925–33.
- Nesca V, Guay C, Jacovetti C, Menoud V, Peyot M-L, Ross Laybutt D, Prentki M, Regazzi R (2013) Identification of particular groups of microRNAs that positively or negatively impact on beta cell function in obese models of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 56, 2203–2212.
- Noguchi S, Mori T, Otsuka Y, Yamada N, Yasui Y, Iwasaki J, Kumazaki M, Maruo K, Akao Y (2012) Anti-oncogenic micro-RNA-203 induces senescence by targeting E2F3 protein in human melanoma cells. *J Biol Chem.* 287, 11769–11777.
- Okada C, Yamashita E, Lee SJ, Shibata S, Katahira J, Nakagawa A, Yoneda Y, Tsukihara T (2009) A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science.* 326, 1275–1279.
- Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC (2007) The mirtron pathway generates microRNA class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell.* 130, 89–100.
- Paradisi G, Steinberg HO, Shepard MK, Hook G, Baron AD (2003) Troglitazone therapy improves endothelial function to near normal levels in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 88, 576–80.
- Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL, de Gruijl TD, Wurdinger T, Middeldorp JM (2010) Functional delivery of viral microRNAs via exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 6328–6333.
- Pigny P, Jonard S, Robert Y, Dewailly D (2006) Serum anti-Müllerian hormone as a surrogate for antral follicle count for definition of the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 91, 941–945.
- Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, MacDonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M (2004) A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature.* 432, 226–230.
- Poy MN, Hausser J, Trajkovski M, Braun M, Collins S, Rorsman P, Zavolan M, Stoffel M (2009) miR-375 maintains normal pancreatic α - and β -cell mass. *PNAS.* 106, 5813–5818.
- Primo MN, Bak RO, Schibler B, Mikkelsen JG (2012) Regulation of proinflammatory cytokines TNF α and IL24 by microRNA-203 in primary keratinocytes. *Cytokine.* 60, 741–748.
- Pula G, Perera S, Prokopi M, Sidibe A, Boulanger CM, Mayr M (2008) Proteomic analysis of secretory proteins and vesicles in vascular research. *Proteomics Clin. Appl.* 2, 882–891.

Renthal NE, Chen C-C, Williams KC, Gerard RD, Prange-Kiel J, Mendelson CR (2010) miR-200 family and targets, ZEB1 and ZEB2, modulate uterine quiescence and contractility during pregnancy and labor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107, 20828–20833.

Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE (2009) The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol*. 112, 55–59.

Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A (2004) Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*. 14, 1902–1910.

Romualdi D, Guido M, Ciampelli M, Giuliani M, Leoni F, Perri C, Lanzone A (2003) Selective effects of pioglitazone on insulin and androgen abnormalities in normo- and hyperinsulinaemic obese patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 18, 1210–8.

Rosner W (1997) Errors in the measurement of plasma free testosterone. *J Clin Endocrinol Metab*. 82, 2014–2015.

Roth LW, McCallie B, Alvero R, Schoolcraft WB, Minjarez D, Katz-Jaffe MG (2014) Altered microRNA and gene expression in the follicular fluid of women with polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet*. 31, 355–362.

The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group. (2003) Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and longterm health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Human Reproduction*. 19(1), 41–47.

Ruby JG, Jan CH, Bartel DP (2007) Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*. 448, 83–86.

Ruby JG, Stark A, Johnston WK, Kellis M, Bartel DP, Lai EC (2007) Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of Drosophila microRNAs. *Genome Res*. 17, 1850–1864.

Sang Q, Yao Z, Wang H, Feng R, Wang H, Zhao H, 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.

van Santbrink EJ, Hop WC, Fauser BC (1997) Classification of normogonadotropin infertility: polycystic ovaries diagnosed by ultrasound versus endocrine characteristics of PCOS. *Fertil Steril*. 67, 452–458

Sathyapalan T, David R, Gooderham NJ, Atkin SL (2015) Increased expression of circulating miRNA-93 in women with polycystic ovary syndrome may represent a novel, non-invasive biomarker for diagnosis. *Sci. Rep*. 5, 16890.

Sauber M, Weyerstahl T: Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2007, S. 429, 432–435.

Schickel R, Park SM, Murmann AE, Peter ME (2010) MiR-200c regulates induction of apoptosis through CD95 by targeting FAP-1. *Mol. Cell.* 38, 908–915.

Schrauder MG, Strick R, Schulz-Wendtland R, Strissel PL, Kahmann L, Loehberg CR, Lux MP, Jud SM, Hartmann A, Hein A, Bayer CM, Bani MR, Richter S, Adamietz BR, Wenkel E, Rauh C, Beckmann MW, Fasching PA (2012) Circulating Micro-RNAs as Potential Blood-Based Markers for Early Stage Breast Cancer Detection. *PLoS ONE.* 7(1), e29770.

Shi Y, Zhao H, Shi Y, Cao Y, Yang D, Li Z, Zhang B, Liang X, Li T, Chen J, Shen J, Zhao J, You L, Gao X, Zhu D, Zhao X, Yan Y, Qin Y, Li W, Yan J, Wang Q, Zhao J, Geng L, Ma J, Zhao Y, He G, Zhang A, Zou S, Yang A, Liu J, Li W, Li B, Wan C, Qin Y, Shi J, Yang J, Jiang H, Xu JE, Qi X, Sun Y, Zhang Y, Hao C, Ju X, Zhao D, Ren CE, Li X, Zhang W, Zhang Y, Zhang J, Wu D, Zhang C, He L, Chen ZJ. (2012) Genome-wide association study identifies eight new risk loci for polycystic ovary syndrome. *Nat Genet.* 44, 1020–1025

da Silveira JC, Veeramachaneni DN, Winger QA, Carnevale EM, Bouma GJ (2012) Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain microRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle. *Biol Reprod.* 86(3), 71.

Silverman BL, Rizzo TA, Cho NH, Metzger BE. (1998) Long-term effects of the intrauterine environment. The Northwestern University Diabetes in Pregnancy Center. *Diabetes Care.* 21(Suppl 2), B142–B149.

Sirotkin AV, Lauková M, Ovcharenko D, Brenaut P, Mlynčková M (2010) Identification of microRNAs controlling human ovarian cell proliferation and apoptosis. *Journal of Cellular Physiology.* 223, 49–5.

Sirotkin AV, Ovcharenko D, Grossmann R, Lauková M, Mlynčková M (2009) Identification of MicroRNAs Controlling Human Ovarian Cell Steroidogenesis Via a Genome-Scale Screen. *J. Cell. Physiol.* 219, 415–420.

Slayden SM, Moran C, Sams WM Jr, Boots LR, Azziz R (2001) Hyperandrogenemia in patients presenting with acne. *Fertil Steril.* 75, 889–892.

Sørensen AE, Udesen PB, Wissing ML, Englund ALM, Dalgaard LT (2016) MicroRNAs related to androgen metabolism and polycystic ovary syndrome. *Chemico-Biological Interactions.* S0009-2797(16), 30224-1.

Sørensen AE, Wissing ML, Salö S, Englund ALM, Dalgaard LT (2014) MicroRNAs Related to Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Genes.* 5, 684-708.

Stein IF, Leventhal LM (1935) Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol.* 29, 181–191.

Taylor AE, McCourt B, Martin K, Anderson EJ, Adams J, Schoebfeld D, Hall J (1997) Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinically defined women with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab.* 82, 2248–2256.

- Taylor DD, Gercel-Taylor C (2008) MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 110, 13–21.
- Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B (2011) Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* 39, 7223–7233.
- Urbanek M, Sam S, Legro RS, Dunaif A. (2007) Identification of a polycystic ovary syndrome susceptibility variant in fibrillin-3 and association with a metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 92, 4191–4198.
- Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659.
- van Schooneveld E, Wouters MCA, Van der Auwera I, Peeters DJ, Wildiers H, Van Dam PA, Vergote I, Vermeulen PB, Dirix LY, Van Laere SJ (2012) Expression profiling of cancerous and normal breast tissues identifies microRNAs that are differentially expressed in serum from patients with (metastatic) breast cancer and healthy volunteers. *Breast Cancer Research.* 14, R34.
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science.* 318, 1931–1934.
- Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT (2011) MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* 13, 423–433.
- Viticchiè G, Lena AM, Latina A, Formosa A, Gregersen LH, Lund AH, Bernardini S, Mauriello A, Miano R, Spagnoli LG, Knight RA, Candi E, Melino G (2011) MiR-203 controls proliferation, migration and invasive potential of prostate cancer cell lines. *Cell Cycle.* 10, 1121–1131.
- Wagner A, Mayr C, Bach D, Illig R, Plaetzer K, Berr F, Pichler M, Neureiter D, Kiesslich T (2014) MicroRNAs Associated with the Efficacy of Photodynamic Therapy in Biliary Tract Cancer Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 20134–20157.
- Waldstreicher J, Santoro NF, Hall JE, Filicori M, Crowley WF Jr. (1988) Hyperfunction of the hypothalamic-pituitary axis in women with polycystic ovarian disease: indirect evidence for partial gonadotroph desensitization. *J Clin Endocrinol Metab.* 66, 165–72.
- Wang J, Chen J, Chang P, LeBlanc A, Li D, Abbruzzese JL, Frazier ML, Killary AM, Sen S (2009) MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prev Res (Phila Pa).* 2, 807–813.
- Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ (2010) Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 38, 7248–7259.
- Westholm JO, Lai EC (2011) Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie.* 93, 1897.

- Williams KC, Renthall NE, Condon JC, Gerard RD, Mendelson CR (2012) MicroRNA-200a serves a key role in the decline of progesterone receptor function leading to term and preterm labor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109(19), 7529–34.
- Wu C, Gong Y, Yuan J, Zhang W, Zhao G, Li H, Sun A, KaiHu, Zou Y, Ge J (2012) microRNA-181a represses ox-LDL-stimulated inflammatory response in dendritic cell by targeting c-Fos. *Journal of Lipid Research*. 53, 2355–2363.
- Xie H, Lim B, Lodish HF (2009) MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity. *Diabetes*. 58, 1050–1057.
- Xie W, Li Z, Li M, Xu N, Zhang Y (2012) miR-181a and inflammation: microRNA homeostasis response to inflammatory stimuli in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 430, 647–652.
- Xu P, Zhao Y, Liu M, Wang Y, Wang H, Li Y, Zhu X, Yao Y, Wang H, Qiao J, Ji L, Wang Y (2014) Variations of MicroRNAs in Human Placentas and Plasma from Preeclamptic Pregnancy. *Hypertension*. 63, 1276–1284.
- Yeung EH, Zhang C, Albert PS, Mumford SL, Ye A, Perkins NJ, Wactawski-Wende J, Schisterman EF (2013) Adiposity and sex hormones across the menstrual cycle: the BioCycle Study. *Int J Obes (Lond.)* 37(2), 237–243.
- Yi R, Poy MN, Stoffel M, Fuchs E (2008) A skin microRNA promotes differentiation by repressing “stemness”. *Nature*. 452, 225–229.
- Yuan Y, Zeng ZY, Liu XH, Gong D-J, Tao J, Cheng H-Z, Huang S-D (2011) MicroRNA-203 inhibits cell proliferation by repressing DNp63 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 11, 57.
- Zavy MT, Craig LB, Wild RA, Kahn SN, O’Leary D, Hansen KR (2014) In high responding patients undergoing an initial IVF cycle, elevated estradiol on the day of hCG has no effect on live birth rate. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 12, 119.
- Zhang Q, Sun H, Jiang Y, Ding L, Wu S, Fang T (2013) MicroRNA-181a suppresses mouse granulosa cell proliferation by targeting activin receptor IIA. *PLoS ONE*. 8, e59667.
- Zhao C, Huang C, Weng T, Xiao X, Ma H, Liu L (2012) Computational prediction of MicroRNAs targeting GABA receptors and experimental verification of miR-181, miR-216 and miR-203 targets in GABA-A receptor. *BMC Research Notes*. 5, 91.
- Zhao H, Guan J, Lee HM, Sui Y, He L, Siu J, Tse PP, Tong CY, Lai MM, Chan CN (2010) Up-Regulated Pancreatic Tissue MicroRNA-375 Associates With Human Type 2 Diabetes Through A-Cell Deficit and Islet Amyloid Deposition. *Pancreas*. 39, 843–846.
- Zhao J, Gong AY, Zhou R, Liu J, Eischeid AN, Chen XM (2012) Downregulation of PCAF by miR-181a/b provides feedback regulation to TNF- α -induced transcription of proinflammatory genes in liver epithelial cells. *J. Immunol*. 188, 1266–1274.

Zhao C, Liu X, Shi Z, Zhang J, Zhang J, Jia X, Ling X (2015) Role of Serum miRNAs in the Prediction of Ovarian Hyperstimulation Syndrome in Polycystic Ovarian Syndrome Patients. *Cell Physiol Biochem.* 35, 1086-1094.

Zhao S, Yao DS, Chen JY, Ding N (2013) Aberrant Expression of miR-20a and miR-203 in Cervical Cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 14, 2289–2293.

Zhu X-M, Han T, Sargent IL, Yin G-W, Yao Y-Q (2009) Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 661, e1–e7.

Ziomkiewicz A, Ellison PT, Lipson SF, Thune I, Jasienska G (2008) Body fat, energy balance and estradiol levels: a study based on hormonal profiles from complete menstrual cycles. *Hum Reprod.* 23(11), 2555–2563.

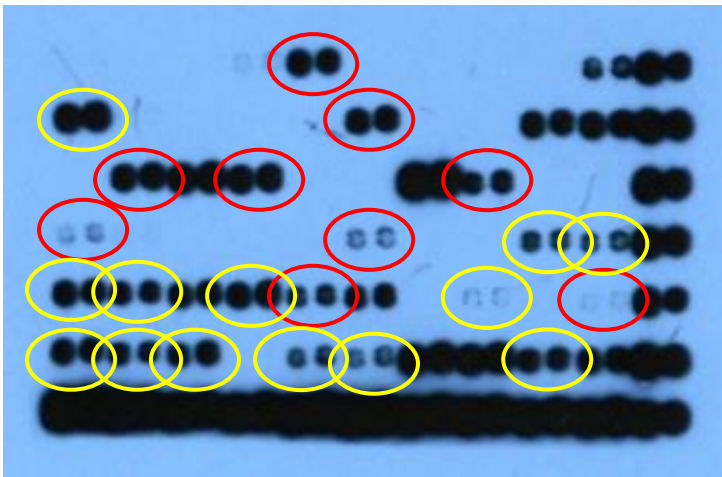
8. Thesen

1. Bei der Untersuchung des Expressionsprofils von 231 microRNAs in drei Patientinnen wurden 44 differentiell exprimierte microRNA in Microarrays ermittelt.
2. Es wurden die microRNA miR-181, miR-200a, miR-203, miR-375 und miR-411 zur weiteren Untersuchung mittels quantitativer RT-PCR ausgewählt. Zur Verifikation der Expressionsunterschiede zwischen Patientinnen mit und ohne polyzystisches Ovarsyndrom wurden die Serumproben von 288 Patientinnen untersucht.
3. Es zeigten sich Korrelationen nahe der Signifikanzgrenze zwischen der Serum-Konzentration der microRNA miR-181 und dem HOMA Diabetesindex, der microRNA miR-200a und dem LH/FSH-Quotienten sowie dem Prolaktinspiegel, der microRNA miR-203 und dem Menarche-Alter sowie zwischen der microRNA miR-411 und der Anzahl der Fehlgeburten.
4. Es zeigten sich Korrelationen nahe der Signifikanzgrenze zwischen der Serum-Konzentration der microRNA miR-181 und den Ultraschallkriterien des PCOS, dem Vorliegen eines androgenen Phänotyp und der Serum-Konzentration der microRNA miR-203 sowie dem Bestehen von Zyklusunregelmäßigkeiten und der Serum-Konzentration der microRNA miR-200a.
5. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen der erhöhten Serum-Konzentration der miR-200a und dem Vorliegen eines Hyperandrogenismus in den Patientinnen der Studienkohorte gezeigt werden ($p=0,001$, Mann-Whitney-U-Test).
6. Weitere Studien sind nötig um die kausalen Zusammenhänge und die klinische Relevanz unserer Ergebnisse zu klären.

Anlagen

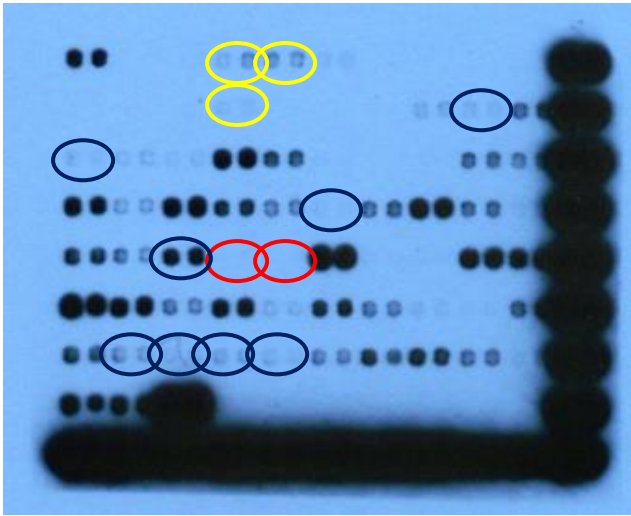
- **Abbildung der Mikroarrays und Übersicht der dargestellten microRNA**

- **Array I**



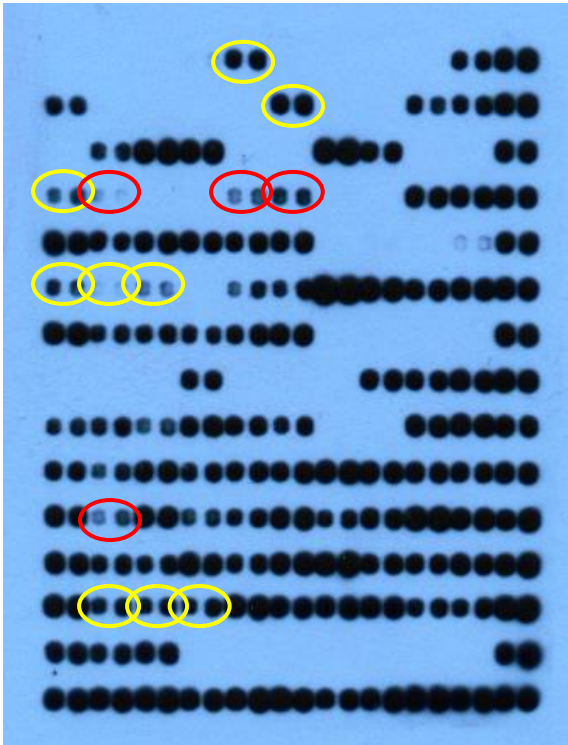
Let-7a	Let-7b	Let-7c	Let-7d	Let-7e	Let-7f	Let-7g	Let-7i	miR-1	miR-7
9	10a	15a	15b	16	17-5p	18a	18b	19a	19b
20a	21	25	28	34a	99a	122a	124a	125a	125b
126	131	133a	133b	143	145	146a	146b	148a	155
181a	181b	181c	182	192	194	195	199a	199b	199a*
200a	200c	204	206	216	223	224	342	368	375

○ Array II



9-1	10b	17-3p	22	23a	24	26a	26b	27a	27b
29a	29b	29c	30a-3p	30a-5p	30b	30c	92	92b	93
95	101-1	103	106a	106b	107	128a	128b	132	134
135b	136	137	140	141	142-3p	149	150	151	153
154	181d	183	185	186	188	190	191	196a	196b
197	198	200b	202	203	205	210	214	215	218
219	221	222	296	372	373	488	100	127	142-5p
31	213	RNU48							

○ Array III



Let-7a	Let-7b	Let-7c	Let-7d	Let-7e	Let-7f	Let-7g	Let-7i	1	7
9	10a	15a	15b	16	17-5p	18a	18b	19a	19b
20a	21	25	28	34a	99a	122a	124a	125a	125b
126	131	133a	133b	143	145	146a	146b	148a	155
181a	181b	181c	182	192	194	195	199a	199b	199a*
200a	200c	204	206	216	223	224	342	368	375
9-1	10b	17-3p	22	23a	24	26a	26b	27a	27b
29a	29b	29c	30a-3p	30a-5p	30b	30c	92	92b	93
95	101-1	103	106a	106b	107	128a	128b	132	134
135b	136	137	140	141	142-3p	149	150	151	153
154	181d	183	185	186	188	190	191	196a	196b
197	198	200b	202	203	205	210	214	215	218
219	221	222	296	372	373	488	100	127	142-5p
31	213	RNU48							

○ Array IV



138	139	105	130a	135a	147	152	154	184	187
189	211	212	217	22	220	299-3p	299-5	301	302a
302a#	302b	302b#	302c	302c#	302d	30d	30e-3	30e-5	32
320	323	324-5p	324-5p	325	326	328	329	33	330
331	335	337	338	339	33b	340	345	346	34b
34c	361	362	363	363#	365	367	369-3	369-5	370
371	373#	374	376a	376a#	376b	377	378	379	380-3p
380-5p	381	382	383	384	409-5p	410	411	412	422a
422b	423	424	425	425-5p	429	432	432#	433	448
449	449b	450	451	452	452#	453	455	483	U6

Tabellarischer Lebenslauf

Personalien

Name	Wiebke Würf
Anschrift	Breiter Weg 250, 39104 Magdeburg
Geburtsdatum, -ort	03.09.1988, Dresden
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Beruflicher Werdegang

Ab 15.1.2016	Assistenzärztin in der Klinik für Nieren-und Hochdruckerkrankungen, Diabetologie und Endokrinologie des Universitätsklinikums Magdeburg
--------------	---

Akademischer Werdegang

Oktober 2008 - Mai 2015	Studium der Humanmedizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
August 2000 - Juni 2008	Bertolt-Brecht-Gymnasium, Dresden
Juli 2005 - Juni 2006	Besuch der Adelaide High School, Adelaide, Australien

Auslandspraktika

Mai 2014 - August 2014	1. PJ-Tertial in der Abteilung für Innere Medizin, Spital Flawil, Schweiz
September 2012	Plastische und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinik Coimbra, Portugal

Zusatzqualifikationen

Fremdsprachen	Englisch - verhandlungssicher Französisch - fließend in Wort und Schrift Spanisch - Grundkenntnisse
---------------	---

Persönliche Interessen

Lesen
Reiten

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Die eingereichte schriftliche Fassung der Arbeit entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit noch nicht als Abschlussarbeit an anderer Stelle eingereicht wurde.

Halle (Saale), den 05.10.2016

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'W' followed by a horizontal line and a flourish.

Wiebke Würfl

Danksagung

Ich möchte hier die Gelegenheit nutzen denjenigen zu danken, die mich beim Verwirklichen dieses Projektes sowohl in fachlicher als auch persönlicher Hinsicht unterstützt haben.

Zu allererst gilt mein Dank Prof. Behre für die Möglichkeit zur Promotion im Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie am Universitätsklinikum Halle (Saale). Weiterhin für sein stetes Interesse und die hilfreichen Diskussionen zur Arbeit, sowie seine Begeisterung für die Thematik.

Weiterhin danke ich Dr. Thomas Greither für seine außergewöhnlich engagierte und geduldige Betreuung, auch in schwierigen Phasen und langwierigen Perioden.

Frau Dr. Sindy Pelka möchte ich sehr herzlich für ihre kontinuierliche Hilfe und Beratung in allen Belangen dieser Promotion danken. Sie hat mir durch ihr offenes Ohr, ihre kritischen Ratschläge und ihren unermüdlichen freundschaftlichen Beistand geholfen viele der Hürden zu meistern. In diesem Zusammenhang danke ich auch Maria Giebler und Matthias Kraus für die stets kollegiale und produktive Laboratmosphäre.

Meiner Familie gilt ein besonders herzlicher Dank. Ich danke meiner Mutter ihren unerschütterlichen Glauben an den Erfolg dieser Promotion, meiner Großmutter für ihre Inspiration und meinem Vater für seine Quelle der Motivation und des Durchhaltevermögens.

Der abschließende Dank gilt Julia Beyer, Claudia Geißler, Marieke Raffenberg, Susanne Streuber und Kyra Klocke für die jahrelange Unterstützung mit der richtigen Kombination aus Herz und Humor.