

**Serumkonzentration und Funktion der zirkulierenden
microRNAs miR-27b, miR-126, miR-224 und miR-372 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 Viktoria Hoffmann, geb. Heinrich
geboren am 30.12.1993 in Lutherstadt Wittenberg

Betreuer: Prof. H. M. Behre

Gutachter: Prof. H. M. Behre
Prof. M. Staeger
Prof. U. Markert, Jena

03.11.2020
11.11.2021

Referat

Das polyzystische Ovarsyndrom (PCOS) als häufigste Ursache endokriner Störungen bei Frauen mit unerfülltem Kinderwunsch ist bis heute eine Erkrankung ohne eindeutige diagnostische Marker. In dieser Arbeit sollte der Zusammenhang zwischen den Serumkonzentrationen der microRNAs miR-27b, miR-126, miR-224 und miR-372 und dem Krankheitsbild des PCOS untersucht werden. Die zirkulierenden microRNAs wurden im Serum von 201 Kinderwunschpatientinnen mit unterschiedlichen Diagnosen (106 PCOS- und 95 Non-PCOS-Patientinnen) mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) bestimmt. Durch anschließende Korrelationsanalysen konnten signifikante Korrelationen zwischen allen vermessenen microRNA-Konzentrationen sowie dem Vorliegen von Polyzystischen Ovarien im Ultraschall, einem der PCOS definierenden Merkmale, belegt werden. Zudem korrelierten die Serumkonzentrationen der miR-126, miR-224 und miR-372 signifikant mit der Diagnose „Polyzystisches Ovarsyndrom“.

Weitere Charakteristika des PCOS sind der Hyperandrogenismus sowie der enge Zusammenhang zu metabolischen Begleiterkrankungen wie primär dem Diabetes mellitus. Vor diesem Hintergrund wurde mittels *in vitro* Experimenten mit den Granulosakarzinomzelllinien COV434 und KGN ein möglicher Zusammenhang zwischen der Expression der ausgewählten microRNAs sowie zusätzlich der microRNA miR-23a und einer Stimulation der Zellen mit Testosteron oder Glukose untersucht. Unter erhöhten Testosteron- und Glukosekonzentrationen konnte keine signifikante Veränderung der microRNA-Expression gegenüber unbehandelten Kontrollen detektiert werden.

Um die microRNA miR-23a in die Pathogenese des PCOS einordnen zu können, wurden mittels bioinformatischer Tools die zwei Gene Östrogenrezeptor α (ER α) und Progesteronrezeptor (PR) selektiert und im dualen Luziferasereporterassay sowie dem Western Blot untersucht. In beiden Versuchsreihen konnten die beiden Gene für die microRNA miR-23a nicht als Zielgene nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit konnte eine signifikante Korrelation zwischen den Serumkonzentrationen der microRNAs miR-27b, miR-126, miR-224 und miR-372 und dem Vorliegen von Polyzystischen Ovarien im Ultraschall sowie zwischen den microRNA miR-126-, miR-224- und miR-372-Konzentrationen und der Diagnose „Polyzystisches Ovarsyndrom“ festgestellt werden. Dies stellt einen Ausgangspunkt für weitere Forschungsarbeiten dar.

Hoffmann, Viktoria: Serumkonzentration und Funktion der zirkulierenden microRNAs miR-27b, miR-126, miR-224 und miR-372 bei Patientinnen mit Polyzystischem Ovarsyndrom, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 65 Seiten, 2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Weibliche Infertilität	1
1.2	Polyzystisches Ovarsyndrom	2
1.2.1	Klinik und Diagnose des PCOS.....	3
1.2.2	Therapie und Prognose des PCOS	5
1.3	MicroRNAs.....	7
1.3.1	Eigenschaften, Biogenese und Funktionsweise	7
1.3.2	MicroRNAs und PCOS.....	8
2	Zielstellung	10
3	Material und Methoden	11
3.1	Material	11
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	11
3.1.2	Laborgeräte.....	12
3.1.3	Verbrauchsmaterial	13
3.1.4	Enzyme.....	13
3.1.5	Reaktionskits.....	14
3.1.6	Oligonukleotide	14
3.1.7	Vektoren	15
3.1.8	Antikörper	15
3.1.9	Zellen.....	15
3.1.10	Puffer und Lösungen.....	15
3.1.11	Software.....	17
3.2	Studienkohorte	17
3.2.1	Ethikantrag.....	17
3.3	Analytik im Patientinnenserum	18
3.3.1	RNA-Isolation aus Patientinnenserum mittels Trizol-Chloroform- Extraktion.....	18
3.3.2	Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung.....	18
3.3.3	MicroRNA cDNA-Synthese	18
3.3.4	Quantitative Realtime PCR (TaqMan™).....	19
3.4	Zellbiologische Methoden.....	20
3.4.1	Zellkultivierung	20
3.4.2	Einstreuen der Zellen für die Behandlungen.....	21
3.4.3	Behandlung der Zellen mit Testosteron und Glukose	21

3.4.4	RNA-Isolation mittels Trizol-Chloroform-Extraktion.....	22
3.4.5	MicroRNA cDNA-Synthese	22
3.4.6	Quantitative Realtime PCR (TaqMan™).....	23
3.4.7	Transfektion von Vektoren	23
3.4.8	Transfektion von microRNA	24
3.5	Molekularbiologische Methoden	24
3.5.1	Dualer Luziferasereporterassay	24
3.5.2	Western Blot	29
3.6	Statistische Auswertung.....	31
4	Ergebnisse.....	32
4.1	Vermessung von microRNAs im Patientinnenserum	32
4.1.1	Patientinnenkohorte	32
4.1.2	MicroRNA-Messungen	36
4.1.3	Bivariate Korrelationsanalysen der zirkulierenden microRNAs	37
4.1.4	Assoziation der Serumkonzentration der zirkulierenden microRNAs zu PCOS und dessen Diagnosekriterien.....	38
4.2	Effekte der Stimulation mit Testosteron oder Glukose auf die microRNA-Expression	44
4.3	Dualer Luziferasereporterassay	46
4.4	Western Blot	48
5	Diskussion.....	50
5.1	Korrelation zwischen microRNA-Konzentrationen und dem Vorliegen eines PCOS.....	50
5.2	Effekte der Stimulation von Granulosakarzinomzelllinien mit Glukose oder Testosteron auf die microRNA-Expression.....	52
5.3	Zielgene der microRNA miR-23a.....	53
6	Zusammenfassung.....	56
7	Literaturverzeichnis	58
8	Thesen	65

Abkürzungen und Symbole

%	Prozent
°C	Grad Celsius
$2^{-\Delta CT}$	relative Expressionsrate
3'UTR	3' untranslatierter Bereich
5'-cap	5'-terminales Ende
Abb.	Abbildung
ASRM	American Society for Reproductive Medicine
bidest.	doppelt destilliert
BMI	Bodymaßindex
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre DNA
cm ²	Quadratzentimeter
Co	Kontrolle
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region 8
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPP4	Dipeptidyl-Peptidase 4
E.coli	Escherichia coli
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ER α	Östrogenrezeptor α
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embryology

FKS	Fetales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
fw/rev	forward/reverse
Glc	Glukose
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
H ₂ O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff
hsa	Homo sapiens
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LB	Luria Broth mikrobielles Wachstumsmedium
LH	Luteinisierendes Hormon
luc-siRNA	Luziferase-siRNA
M	Molar
m ²	Quadratmeter
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
miR	microRNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD	optische Dichte

p	Signifikanz
PBS	Phosphate buffered saline
PCOS	Polyzystisches Ovarsyndrom
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
PR	Progesteronrezeptor
pre-miRNA	Precursor-microRNA (Vorläufer-microRNA)
pri-miRNA	Primary microRNA (Primär-microRNA)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
r _s	Spearman-Korrelationskoeffizient
s	Sekunde
siRNA	small interfering RNA
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
T	Testosteron
TBS	Tris-buffered Saline
TBST	Tris-Buffered Saline and Tween 20
TRB-Protein	Transactivation-responsive RNA-binding protein
U/min	Umdrehung pro Minute
V	Volt
v/v	Volumenprozent
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
y	Jahre
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
µl	Mikroliter

1 Einleitung

1.1 Weibliche Infertilität

Nach weltweiten Schätzungen leiden über 72,4 Millionen Paare an Unfruchtbarkeit (Gurunath et al., 2011). Diese ist laut der World Health Organisation (WHO) definiert über das fehlende Eintreten einer Schwangerschaft innerhalb eines Zeitraumes von einem Jahr bei regelmäßigem, ungeschütztem Geschlechtsverkehr (Zegers-Hochschild et al., 2017). Die primäre Infertilität, aufgrund welcher betroffene Frauen noch nie schwanger waren, ist von der sekundären Infertilität abzugrenzen. Letztere ist definiert durch die Empfängnis von zumindest einer Schwangerschaft zuvor (Izzo et al., 2015). In 30-40 % der Fälle liegt die Ursache für den unerfüllten Kinderwunsch allein bei der Frau, in 40 % der Fälle bei dem Mann und in 20-30 % der Fälle tragen beide Partner Ursachen zur Kinderlosigkeit bei (Izzo et al., 2015). Auch wenn im individuellen Fall die Ursache für die Infertilität sehr spezifisch sein kann, können doch mehrere Indikationsgruppen unterschieden werden. (s. in Abb. 1 eine Übersicht der Indikationen zur In-Vitro-Fertilisation (IVF), einer Methode der künstlichen Befruchtung).

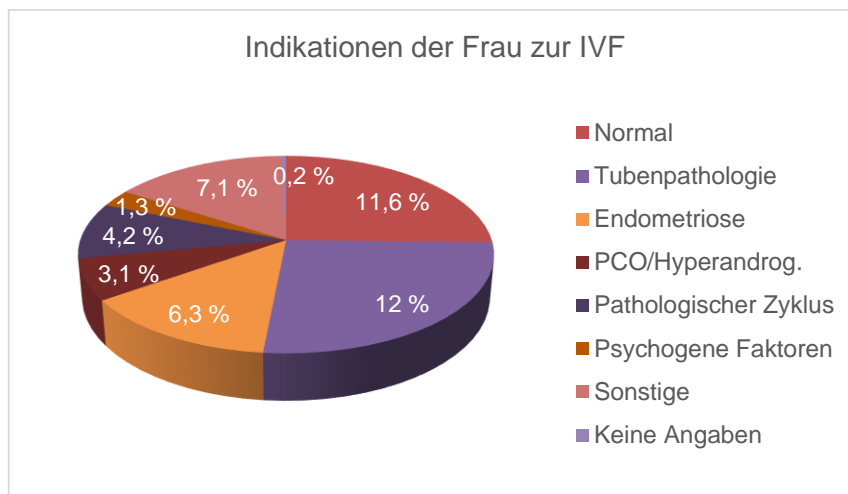


Abbildung 1 Grafische Darstellung der Indikationen der Frau zur in-vitro-Fertilisation (IVF); modifiziert nach Blumenauer et al., 2018 (Blumenauer et al., 2018)

Unter den häufigsten Ursachen der weiblichen Infertilität sind angeborene oder erworbene anatomische Deformitäten, Ovulationsstörungen und das Krankheitsbild der Endometriose zu finden (Blumenauer et al., 2018). Letztere ist charakterisiert durch Endometrium-Gewebe außerhalb der Gebärmutter, welches zu Dysmenorrhoe, Dyspareunie, nicht zyklusabhängigen Schmerzen und Subfertilität führen kann (Farquhar, 2000). Weiterhin können sich auch sexuell übertragbare Erkrankungen auf die Fertilität auswirken. So können Chlamydien-Infektionen, die Gonorrhoe oder auch

die genitale Form der Tuberkulose zu einer Verklebung der Eileiter führen und die Empfängnis verhindern (Alasiri et al., 2012). Zahlreiche hormonelle Störungen wie die Hypo- als auch die Hyperthyreose oder auch die verminderte Sekretion des hypothalamischen Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH) bewirken ebenfalls häufig eine verminderte Fruchtbarkeit (Bliss et al., 2010). Die häufigste endokrinologische Störung unter Frauen in Verbindung mit einer Infertilität ist jedoch das Polyzystische Ovarsyndrom.

1.2 Polyzystisches Ovarsyndrom

Bereits in den Schriften Hippocrates von vor über zwei Jahrtausenden wird ein Krankheitsbild von Frauen beschrieben, die ein männliches, robustes und gesundes Erscheinungsbild prägen, eine schwache Menstruation von zumeist weniger als drei Tagen haben und nicht in der Lage sind schwanger zu werden oder ein Kind zu gebären (Azziz et al., 2011). Im Jahr 2003 veröffentlichten die „European Society of Human Reproduction and Embryology/American Society for Reproductive Medicine“ (ESHRE/ASRM) die sogenannten Rotterdam-Kriterien, die das diagnostische Vorgehen für die Indikation PCOS definieren. Bei Vorliegen von zwei der drei Kriterien (1) A- oder Oligomenorrhoe, (2) Hyperandrogenismus und (3) Polyzystische Ovarien im Ultraschall ist eine positive Diagnose zu stellen. Darüber hinaus existieren auch weitere Definitionen des PCOS, so auch die des „National Institute of Health“ (NIH), mit anderen diagnostischen Gewichtungen (s. Tabelle 1).

Tabelle 1 Diagnostische Kriterien zur Definition des PCOS; modifiziert nach Ajmal et al., 2019

NIH 1990	Rotterdam 2003	AE-PCOS society 2006
(1) jahrelange Anovulation (2) Hyperandrogenismus	(1) Oligomenorrhoe oder Anovulation (2) Hyperandrogenismus (3) polyzystische Ovarien im Ultraschall	(1) biochemisch oder klinisch bewiesener Hyperandrogenismus (2) ovarielle Dysfunktion (3) polyzystische Ovarmorphologie

Demnach ist trotz der tiefgreifenden Historie des Krankheitsbildes eine exakte Definition und prozentuale Einschätzung betroffener Frauen nicht leicht zu stellen. Schätzungen zu Folge sind 8-13 % der weiblichen Bevölkerung im gebärfähigen Alter betroffen, wobei eine steigende Inzidenz zu verzeichnen ist (Agapova et al., 2014; Escobar-Morreale, 2018; Neven et al., 2018).

Bisher weitgehend ungeklärt ist auch die Ätiologie des Polyzystischen Ovarsyndroms. Vermutlich handelt es sich um ein komplexes Zusammenspiel aus sowohl genetischen als auch Umweltfaktoren (Charifson und Trumble, 2019). Dysregulationen von Ovar- und Leberfunktionen, die zu gestörten Androgen- sowie Insulinspiegeln führen, könnten dabei eine Hauptursache darstellen (Li et al., 2019). Hinsichtlich der beteiligten genetischen Komponente ist von einer polygenen Beteiligung auszugehen, die vermutlich durch fertile männliche stumme Träger und subfertile Frauen weitergegeben wird (Barthelmess und Naz, 2015). Zusätzlich zeigen Beobachtungen einen Zusammenhang zwischen externen Faktoren und dem Auftreten des PCOS. Ein niedriger sozioökonomischer Status, einhergehend mit ungesunden Lebensgewohnheiten wie Rauchen, Bewegungsmangel und ungesunde Ernährung, scheint sich fördernd auf die Krankheitsentwicklung auszuwirken (Barthelmess und Naz, 2015).

1.2.1 Klinik und Diagnose des PCOS

Eine Vielzahl assoziierter Gesundheitsstörungen beim PCOS sind bereits bekannt. Im Vordergrund stehen dabei die drei zur Diagnose führenden Kriterien der Anovulation (mit einem Anteil von 95 %), des Hyperandrogenismus (60 %) und der Polyzystischen Ovarien (17-33 %) (Dumesic et al., 2015).

Nicht nur reproduktive, sondern auch diverse metabolische Störungen werden beschrieben, deren Zahl mit dem reproduktiven Schweregrad Betroffener korreliert (Moran und Teede, 2009). Im Vordergrund steht dabei die Insulinresistenz. 60-80 % der PCOS-Patientinnen und 95 % der übergewichtigen PCOS-Patientinnen sind betroffen (Wang et al., 2016). Die Insulinresistenz zählt dabei als entscheidender Risikofaktor für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2. Bei 31-35 % der betroffenen Frauen konnte eine gestörte Glukosetoleranz und bei 7,5-10 % bereits ein Diabetes mellitus Typ 2 nachgewiesen werden (Salley et al., 2007). Ein hoher BMI scheint ebenfalls ein Prädiktor für die Verschlechterung der Glukosekontrolle zu sein (Salley et al., 2007). 30 % der PCOS-Patientinnen sind adipös, in den USA und in Australien können sogar Werte von 61-76 % verzeichnet werden (Barthelmess und Naz, 2015), (Norman et al., 2007). Weiterhin lässt sich ein vermehrtes Auftreten des Gestationsdiabetes unter PCOS-Betroffenen verzeichnen (Palomba et al., 2015; Bihendi Yarandi et al., 2019).

Die Insulinresistenz wirkt sich überdies auch auf den Hormonhaushalt der Frauen aus. Die Thekazellschicht heranreifender Follikel des Ovars produziert Androgene für die benachbarten Granulosazellen, welche die synthetisierten Androgene zu Östrogen

umwandeln. Dies geschieht in Antwort auf LH-Stimulation und die vorliegende Insulinhöhe (Witchel et al., 2019). Die Hyperinsulinämie, resultierend aus einer bestehenden Insulinresistenz, bewirkt dementsprechend eine verstärkte Antwort der Granulosazellen auf den LH-Reiz, wodurch vermehrt Androgene produziert werden (Barthelmess und Naz, 2015). Einhergehend mit der Anovulation ergibt sich weiterhin ein relativer Östrogenüberschuss und eine Progesteroninsuffizienz. Östrogen hat stark proliferative Eigenschaften, wodurch vermehrtes Wachstum im Endometrium angeregt wird. Dies hat ein höheres Risiko von Endometrium- als auch Brustkrebs zur Folge (Zhao et al., 2016).

Aus genannten metabolischen Risikofaktoren resultiert ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko für die Betroffenen. Darüber hinaus sind auch psychische und neurologische Auffälligkeiten untersucht worden, wie mentale Störungen und Reduktion der Lebensqualität (Krug et al., 2019).

Das PCOS per definitionem ist somit eine Konstellation von Faktoren ohne spezifische Diagnose-Tests, wodurch es zur Variabilität in der Diagnostik von biochemischem oder klinischem Hyperandrogenismus, Zyklusstörungen und Polyzystischen Ovarien kommt (Moran und Teede, 2009).

Um die Vielzahl der hier angerissenen Begleiterkrankungen einzudämmen, ist eine frühzeitige Krankheitsdiagnose notwendig. Hinsichtlich der Erstdiagnose nach der Menarche werden aktuell 5 Kriterien vorgeschlagen, die zur Erkrankungsbestätigung bei positivem Befund von 4 Merkmalen führen sollen (Agapova et al., 2014). Diese Kriterien sind der Nachweis einer Amenorrhoe über 2 Jahre nach der Menarche, eines klinischen Hyperandrogenismus oder eines biologischen Hyperandrogenismus, einer Insulinresistenz und/oder polyzystischer Ovarien (Witchel et al., 2019). Sehr schwierig erscheint die Diagnostik des klinischen Hyperandrogenismus über die Merkmale Hirsutismus, Alopezie und Akne während der Adoleszenz, nicht nur da sie subjektiv zu bewerten sind, sondern auch vermehrt im Rahmen der Pubertät physiologisch bedingt sind. Die Oligo- oder Amenorrhoe ist ebenfalls schwer zu beurteilen, da Zyklusunregelmäßigkeiten nach der ersten Regelblutung häufig sind. So konnte in einer Studie von 200 gesunden Mädchen bei 55 % eine Anovulation in den ersten 2 Jahren nach der Menarche festgestellt werden (Agapova et al., 2014). Darüber hinaus ergeben sich Schwierigkeiten in der eindeutigen Diagnostik polyzystischer Ovarien. Solche sind definiert durch das Vorhandensein von zumindest 12 Follikeln im Ovar mit einer Größe von 2-9 mm oder durch ein Ovarvolumen über 10 ml (Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group, 2004); s. Abb. 2).



Abbildung 2 Darstellung eines polyzystischen Ovars im Vaginalultraschall; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Petra Kaltwaßer und Herrn PD Dr. Gregor Seliger; Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Halle (Saale)

Die sensitivste Diagnostik stellt zum derzeitigen Zeitpunkt die Vaginalsonografie dar, deren Anwendbarkeit bei jungfräulichen Pubertierenden jedoch ethisch fragwürdig erscheint, weshalb auf die Abdomensonografie zurückgegriffen wird. Da die beim Polyzystischen Ovarsyndrom zu verzeichnende Adipositas vor allem abdominell geprägt ist (Moran und Teede, 2009), ergibt sich oftmals eine eingeschränkte Beurteilbarkeit. Eindeutige Biomarker zur Krankheitsdiagnose oder zum Screening von Frauen sind bisher nicht bekannt.

1.2.2 Therapie und Prognose des PCOS

Hinsichtlich der Komplexität des Krankheitsbildes ist eine allgemeine Änderung der Lebensgewohnheiten ratsam. Gewichtsverlust, gesunde Ernährung sowie Sport und Bewegung stellen den Goldstandard zur Verbesserung der Insulinsensitivität unter Patientinnen mit PCOS dar (Madhani et al., 2013). Da eine Anpassung der Lebensgewohnheiten langfristig jedoch oft nicht ausreichend ist, stehen verschiedene medikamentöse als auch operative Therapieverfahren zur Verfügung. Zur Behandlung der gestörten Insulinsensitivität und der damit verbundenen Anovulation und des Androgenexzesses wird häufig mit Metformin, ein Biguanid, therapiert. Metformin senkt nachweislich die hepatische Glukoneogenese sowie die freie Fettsäureoxidation bei gleichzeitiger Verbesserung der peripheren Glukoseaufnahme (Duleba, 2012; Ortiz-Flores et al., 2018). Der Effekt von Metformin auf metabolische Begleiterkrankungen

beim PCOS ist jedoch umstritten und konnte bisher in den nur wenigen Placebo-kontrollierten Studien nicht konkret nachgewiesen werden (Duleba, 2012; Morley et al., 2017). Metformin senkt weiterhin den Serumandrogenspiegel und erhöht die Ovulations- und Menstruationshäufigkeit (McCartney und Marshall, 2016). Darüber hinaus zeigt es Assoziation zur Gewichtsreduktion und ist Mittel der Wahl bei Frauen mit Glukoseintoleranz und erhöhtem Diabetesrisiko (Madnani et al., 2013; Yang et al., 2018). Die Therapieerfolge durch Metformin können durch Kombination mit der Änderung der Lebensgewohnheiten deutlich verbessert werden (Spritzer, 2014). So konnte nachgewiesen werden, dass die Metformingabe zusammen mit einer angepassten Lebensweise zur BMI-Reduktion führt (Naderpoor et al., 2015). Auf die Therapie mit Thiazolidindionen, die zur Verstärkung der Insulinaktivität in der Leber, dem Skelettmuskel und dem Fettgewebe führen, wird weitestgehend verzichtet, da sie aufgrund ihrer Hepatotoxizität, des erhöhten kardiovaskulären Risikos und vermehrter Gewichtszunahme viele unerwünschte Wirkungen mit sich bringen (Madnani et al., 2013). Die Behandlung der Infertilität aufgrund einer Anovulation erfolgt durch das Antiöstrogen Clomifencitrat als Mittel der ersten Wahl (Balen et al., 2016). Clomifencitrat wirkt auf Hypothalamusebene und bewirkt eine Induktion der Gonadotropinsekretion (Madnani et al., 2013). Bei Versagen der Therapie mit Clomifencitrat kommen als Mittel der zweiten Wahl entweder extern zugeführte Gonadotropine oder operative Verfahren in Betracht (Madnani et al., 2013; Balen et al., 2016). Bereits 1935 wurde durch Stein und Leventhal die erste Möglichkeit der operativen Keilresektion des Ovars etabliert (Costello und Ledger, 2012). Durch zahlreiche Spät komplikationen wie Adhäsionen oder Nachblutungen wurde sie heute jedoch vom laparoskopischen Ovar drilling bzw. der Diathermie abgelöst - einem Verfahren bei der durch Elektrokauterisation oder Laser Vaporisation 4 bis 10 Löcher in der Ovarrinde bis ins Stroma gesetzt werden, um androgenproduzierende Thekazellen zu zerstören und somit zur lokalen und systemischen Androgenspiegelsenkung beizutragen (Costello und Ledger, 2012).

Die Krankheitsprognose ist stark abhängig von der Erstdiagnose des PCOS. Da es bisher jedoch noch keinen geeigneten Biomarker gibt, der eine solche frühzeitige Diagnose ermöglicht, ist die Suche nach einem solchen umso relevanter. Potenzielle Kandidaten für diese Biomarker könnten im Serum zirkulierende microRNAs sein, da sie stabil, leicht und kostengünstig nachweisbar und - im Idealfall - spezifisch sind.

1.3 MicroRNAs

1.3.1 Eigenschaften, Biogenese und Funktionsweise

MicroRNAs sind kleine, nichtkodierende, einzelsträngige RNAs einer Länge von ca. 21-23 Nukleotiden. Aktuell sind beim Menschen 2654 reife microRNA-Spezies beschrieben (www.mirbase.org). Sie können fast überall auf dem Genom vorkommen. So liegen sie sowohl zwischen Genen (mit eigenem Promoter), als auch in Introns oder Exons proteinkodierender Gene und kommen dabei einzeln oder in Clustern liegend vor (Cortez et al., 2011).

Die Biogenese der microRNA beginnt im Zellkern. Hier wird die meiste microRNA zunächst durch die RNA-Polymerase II transkribiert und es entstehen mehrere Kilobasen lange, mit einem 5'-cap versehene Vorläufer-microRNAs - die pri-miRNA (primary microRNA) (Rajman und Schratt, 2017). Anschließend werden diese Strukturen durch das RNase III zugehörige Enzym Drosha als Komplex mit dem DGCR8-Protein prozessiert. Aus der Prozessierung resultiert eine ca. 70 Nukleotide lange Vorläufer pre-miRNA (Herrera-Carrillo und Berkhout, 2017). Durch den nukleären Exportrezeptor Exportin 5 gelangt jene in das Zytoplasma (Cortez et al., 2011). Hier ist das ebenfalls der RNase III Familie zugehörige Enzym Dicer mit dem TRB-Protein für das weitere Processing verantwortlich und generiert kleine RNA-Doppelstrangstrukturen der Länge von ca. 22 Nukleotiden (Herrera-Carrillo und Berkhout, 2017). Schließlich wird aus dieser Doppelstrang-microRNA ein Einzelstrang in den RISC (RNA-induced silencing complex) inkorporiert, welcher die Bindung dieses Einzelstranges an ihre komplementäre Ziel-mRNA und die folgende translationale Inhibierung katalysiert (Cortez et al., 2011).

MicroRNAs sind in zahlreichen physiologischen Prozessen wie dem Zelltod, verschiedenen Stressantworten und Stoffwechselfvorgängen sowie der Zelldifferenzierung und Zellproliferation beteiligt (Wang et al., 2017). Dabei übernehmen sie wichtige regulatorische Funktionen auf posttranskriptioneller Ebene und vermitteln somit die Regulation von ca. 30-50% der Gene des menschlichen Genoms (Stark et al., 2005). Zwei unterschiedliche Mechanismen konnten dabei beobachtet werden - zum einen die Zerstörung der Ziel-mRNA bei perfekter Komplementarität der microRNA-Sequenz mit einer komplementären Sequenz im 5'UTR durch mRNA-Zerschneidung, welche primär bei Einzellern beobachtet wurde, zum anderen die Hemmung oder ineffektive Translation durch posttranslationale Inhibierung der Bildung eines funktionellen ribosomalen Komplexes (Bartel, 2004). Diese Translationsrepression konnte vor allem im menschlichen Organismus beobachtet werden. Sie erfolgt bei Komplementarität einer 6-8 nt langen Sequenz am 5'-Ende der microRNAs („seed“-

Sequenz) mit Sequenzen in den 3'UTR-Regionen entsprechender Ziel-mRNAs (Pescador et al., 2013). Aufgrund der kurzen *seed*-Sequenzen kann eine microRNA mehrere hunderte Ziel-mRNAs regulieren (Cortez et al., 2011).

MicroRNAs sind nicht nur intrazellulär nachweisbar, sondern auch in Körperflüssigkeiten wie Serum, Speichel, Aszites oder Urin. Sie können dabei gewebespezifisch sein und unterschiedliche Effekte, krankheitsfördernde oder -protektive, vermitteln (Rajman und Schratt, 2017). In diesem Zusammenhang können sie hormonähnliche Wirkungen zeigen und sind beteiligt an der Zell-Zell-Kommunikation (Cortez et al., 2011). Besonders ist dabei ihre extrazelluläre Stabilität. MicroRNAs zeigen sich resistent gegen endogene RNase Aktivität, viele Einfrierzyklen, Erhitzen, niedrige und hohe pH-Werte und lange Aufbewahrungszeiten in Raumtemperatur (Gul et al., 2017). All diese genannten Eigenschaften begünstigen Untersuchung und Forschung von microRNAs im Bereich der Diagnostik und des Therapiemonitorings als minimal-invasive Biomarker, allem voran in häufigen und klinisch äußerst relevanten Krankheitsbildern. Insgesamt kann festgestellt werden, dass eine im Vergleich zu gesunden Probanden differenzielle microRNA-Expression in vielen verschiedenen Krankheitsbildern vorliegt (Cortez et al., 2011).

1.3.2 MicroRNAs und PCOS

So richteten auch beim Krankheitsbild des PCOS immer mehr Forschungsgruppen weltweit ihre Aufmerksamkeit auf die microRNA-Forschung. Ebenso komplex wie das Krankheitsbild zeigten sich dabei auch die unterschiedlichen Forschungsergebnisse (Homburg, 2002). Insgesamt sind bereits eine Vielzahl an verschiedenen microRNAs identifiziert, deren Expression sich bei Frauen mit dem Polyzystischen Ovarsyndrom im Vergleich zu gesunden Frauen aus Kontrollgruppen entweder erhöht oder verringert zeigte. Im Hinblick auf phänotypische Veränderungen konnte ein positiver Zusammenhang zwischen solchen microRNAs und dem Hirsutismus gefunden werden (Murri et al., 2018). Auch in Bezug zu Stoffwechselstörungen und Adipositas bei PCOS wurden zahlreiche Korrelationen mit bestimmten microRNAs veränderter Expression belegt, wie mit dem Diabetes mellitus Typ 2, der Adipogenese, dem Seruminsulinspiegel und der Insulinresistenz sowie dem BMI und dem Taille-Hüft-Verhältnis, der Glukosetoleranz, dem HDL-, Cholesterin- und Triglyceridspiegel (Sørensen et al., 2014; Murri et al., 2018). Weiterhin konnten auch im Zusammenhang mit den Sexualhormonen microRNA-Expressionsveränderungen detektiert werden. Sowohl Östrogen-, als auch Progesteron- und Testosteronspiegel korrelierten mit mehreren untersuchten microRNAs (Murri et al., 2018). Darüber hinaus wurde auch eine Korrelation mit

Sexualhormon-bindenden Proteinen, der LH-, FSH- und GH- Spiegel sowie Anti-Müller-Hormonkonzentrationen festgestellt (Sørensen et al., 2014). Ebenso konnten Zielgene der PCOS-spezifischen microRNAs erkannt werden - so das Insulin-Rezeptor-Substrat 2 (IRS2) (Roth et al., 2014). Unter diesen Zielgenen befanden sich weiterhin Gene der Steroidsynthese, der Östrogen- und Androgenrezeptoren, der Oozyten-Meiose, verschiedene Gene der insulinvermittelten Stoffwechselwege und der Regulation des Fettstoffwechsels (Murri et al., 2018).

2 Zielstellung

Weltweit sind immer mehr Paare von ungewollter Kinderlosigkeit betroffen. Zu etwa 30 % ist dabei das Vorliegen eines Polyzystischen Ovarsyndroms (PCOS) bei der Frau ursächlich. Resultierend aus der multifaktoriellen Genese sowie den vor allem in jungen Jahren unspezifischen Krankheitssymptomen ist eine frühzeitige Diagnose selten. Häufig erfolgt erst bei ausbleibendem Kinderwunsch eine spezifische Ursachensuche mit resultierender Diagnose eines PCOS.

Standardisierte Biomarker zur Krankheitsdiagnostik, zur Prognoseeinschätzung sowie zur Verlaufs- und Therapieerfolgskontrolle sind bei vielen Krankheitsbildern von hohem Interesse. Mögliche Biomarker im Zusammenhang mit dem PCOS sind zirkulierende microRNAs.

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit ist daher, ob ein Zusammenhang zwischen differenziell exprimierten im Serum zirkulierenden microRNAs und dem PCOS besteht.

Dazu wurde diese Arbeit in drei Teilprojekte untergliedert. Zunächst erfolgte (1) die Vermessung der Konzentrationen der vier microRNAs miR-27b, miR-126, miR-224 und miR-372 im Serum von Frauen mit unerfülltem Kinderwunsch mittels qPCR. Die Auswahl dieser microRNAs basierte auf einer früheren microArray-Analyse. Anschließend wurde die Korrelation der Ergebnisse zum Vorliegen eines PCOS sowie weiterer klinischer und demografischer Parameter statistisch geprüft.

Im zweiten Teil (2) wurde in den Granulosakarzinomzelllinien COV434 und KGN die Expression der PCOS-relevanten microRNAs miR-23a, miR-27b, miR-126, miR-224 und miR-372 unter Testosteron und High-Glukose-Stimulation mittels qPCR vermessen.

Zusätzlich sollten (3) potenzielle Zielgene der deregulierten microRNA miR-23a mittels bioinformatischer Tools selektiert und *in vitro* mittels dualem Luziferasereporterassay und Western Blot untersucht werden. In diesem Zusammenhang wurden die möglichen Zielgene Östrogenrezeptor α (ER α) und Progesteronrezeptor (PR) ausgewählt.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

0,05 % Trypsin-EDTA mit Phenolrot	Invitrogen, Karlsruhe
100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
2-Propanol (70 %)	Roth, Karlsruhe
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal)	Sigma-Aldrich, München
Agarose	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Buffer R (für <i>Xho</i> I)	Fermentas, St Leon Rot
Chloroform	AppliChem, Darmstadt
Countess® Trypan Blue stain	Invitrogen, Karlsruhe
DEPC-H ₂ O	Roth, Karlsruhe
D-Glukose	AppliChem, Darmstadt
Desoxycholat	Sigma, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
dNTP Mix 10 mM total	BIOLINE, Luckenwalde
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, München
Ethanol (96 %)	Sigma-Aldrich, München
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Roth, Karlsruhe
Fast Digest Buffer (für NotI)	Fermentas, St Leon Rot
Fötales Kälberserum	Sigma-Aldrich, München
FUGENE	Promega, Mannheim
Halt™ Phosphatase Inhibitor „Cocktail“	Pierce, Rockford (USA)
InterFERin	Invitrogen, Karlsruhe
Kodak D-19 Developer	Sigma-Aldrich, München
LB Agar, powder (Lennox L Agar)	Invitrogen, Karlsruhe
LB Broth Base, powder (Lennox L Broth Base) ®	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt

Maxima SYBR Green qPCR Mastermix	Fermentas, St. Leon Rot
MES Puffer 20x	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol (100 % p.a.)	Sigma-Aldrich, München
Natriumacetat für Molekularbiologie	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Nu Page LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen, Karlsruhe
Nu Page MES SDS Running Buffer für Bis-Tris Gele (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
Nu Page Sample Reducing Agent	Invitrogen, Karlsruhe
Nu Page Transfer Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage 4-12 % Bis-Tris-Gele	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies, Darmstadt
Phosphate Buffered Saline	Biochrom, Berlin
Protein Assay Dye reagent concentrate	Biorad, München
Testosteron	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris (20 M)	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl (50 mM)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trizol	Life Technologies, Darmstadt
Tween® 20	Serva, Heidelberg

3.1.2 Laborgeräte

Analysewaage ABJ	Kern&Sohn, Balingen
Brutschrank Hera Cell 240i	Thermo Scientific, Bonn
Elektrophorese-Kammer 40-0911	peqLab, Erlangen
FreezingContainer (Kryokonservierung)	Nalgene, Hereford
Handzentrifuge	Biozym, Hessisch Oldendorf
Inkubator Unimax1011	Heidolph, Schwabach
Kühlschrank	Ewald, Bad Nenndorf
Lichtmikroskop ECLIPSE TS 100	Nikon, Düsseldorf
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
Photometer BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
PIPETBOY comfort Integra	Biosciences (IBS), Zizers
Plattenreader Genios	Tecan, Gröding
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau

Realtime-Cycler iCycler	Bio-Rad, München
Thermoblock Thermomixer	ComfortEppendorf, Hamburg
Vortexer Vortex IR XCell SureLock™	Starlab, Hamburg
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Western Blot XCell SureLock™	
Elektrophorese-Kammer Electrophoresis Cell	Invitrogen, Karlsruhe
Western Blot Transfer-Kammer	
Mini Trans-Blot® Cell	Biorad, München
Zellschaber	TPP®, Trasadingen
Zellzählgerät Countess	Invitrogen, Karlsruhe
Zentrifuge 5414 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 4-5 L	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.1.3 Verbrauchsmaterial

96-Well-Platten (Transparent)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
6-Well-Platten (Transparent)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
BioPhotometer®, Küvetten	Eppendorf, Hamburg
Countess® Cell Counting Chamber Slides	Life Technologies, Darmstadt
Gewebekulturflaschen (25-175 cm ²)	Sigma-Aldrich, München
Einmalhandschuh	Semperit, Wien
Kryoröhrchen	Nalgene, Hereford
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
Parafilm	Merck, Darmstadt
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Glaspipetten	Greiner, Frickenhausen
PCR Tube Stripes, Flat Cap Stripes	PeqLab, Erlangen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße Safe-Lock Tubes (0,2-2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten	TPP®, Trasadingen
Wachstube Phasetrap	peqLab, Erlangen
Zentrifugationsröhrchen	Greiner, Frickenhausen

3.1.4 Enzyme

DNase, RNA-frei	Qiagen, Hilden
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
<i>Not I</i>	Fermentas, St Leon Rot

RevertAid H Minus Reverse Transkriptase	Thermofisher, Dreieich
T4 DNA Ligase	Fermentas, St Leon Rot
<i>Xho I</i>	Fermentas, St Leon Rot

3.1.5 Reaktionskits

Bio-Rad Protein-Assay (Bradford Reagenz)	Biorad, Richmond (USA)
Countess® Automated Cell Counting Kit	Life Technologies, Darmstadt
Dual Glo™ Luciferase Assay Systems	Promega, Mannheim
Miniprep Kits	Zymo Research, Freiburg
QIAquick Gel Extraction Kit (250)	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning® Kit (mit pCR®2.1 vector)	Invitrogen, Karlsruhe
ZR Plasmid Miniprep	Zymo Research, Freiburg

3.1.6 Oligonukleotide

<u>ER1 3' UTR</u>	Sequenz (5'-3')
Primer fw	TAG CCC ATG CCT TTT GAG GG
Primer rv	GCA AAG GGG TCT GTG TCT CA
Produktlänge	761

<u>PR 3'UTR</u>	Sequenz (5'-3')
Primer fw	GCA GCT GTT CAT GGC AGA AA
Primer rv	GGA CAC TAA TGC CAC ACT GC
Produktlänge	476

Hersteller der Primer: Sigma Aldrich, Taufkirchen

TaqMan Sonden

U18
hsa-miR-16
hsa-miR-23a
hsa-miR-27b
hsa-miR-126
hsa-miR-224
hsa-miR-372

Hersteller der TaqMan™ micro-RNA-Sonden: ThermoFisher, Dreieich

3.1.7 Vektoren

psiCHECK™-2	Promega, Mannheim
pCR®2.1	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.8 Antikörper

primärer ER α -Antikörper

Östrogenrezeptor α (ER α) aus der Maus	1:5000	Biomol, Hamburg
---	--------	-----------------

sekundärer Antikörper

anti-Maus IgM aus dem Kaninchen	1:10000	DAKO, Hamburg
---------------------------------	---------	---------------

primärer PR-Antikörper

Progesteronrezeptor (PR) aus dem Kaninchen	1:1000	Novus Biologicals, Cambridge
--	--------	------------------------------

sekundärer Antikörper

anti-Kaninchen IgG aus der Ziege	1:10000	DAKO, Hamburg
----------------------------------	---------	---------------

Referenz

β -Actin aus der Maus	1:15000	Sigma, Steinheim
-----------------------------	---------	------------------

3.1.9 Zellen

Prokaryoten: chemisch kompetent

One Shot® TOP10 <i>E. coli</i>	Invitrogen, Karlsruhe
--------------------------------	-----------------------

Eukaryoten: humane Granulosakarzinomzelllinien

COV434	ECACC Nr. 07071909	ATCC, Wesel
--------	--------------------	-------------

KGN	Zellen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Jana Ernst zur Verfügung gestellt	
-----	--	--

SaOS-2		ATCC, Wesel
--------	--	-------------

3.1.10 Puffer und Lösungen

Zellkultivierung

Zellkulturmedium:	DMEM 500 ml
-------------------	-------------

10 % FKS
1 % PenStrep

Bakterienkultivierung

LB-Medium: 20 g in 1 l Aqua bidest. lösen →
autoklavieren

Nähragar für Bakterienkulturen: 32 g in 1 l Aqua bidest. lösen →
autoklavieren
Zugabe von Ampicillin (50 µg/ml)

Proteinisolation

RIPA-Lysepuffer: 50 mM (pH 7,4) Tris-HCl
200 mM NaCl
1 mM EDTA
1 mM EGTA
1 % Triton X-100
0,25 % Desoxycholat
1:100 Phosphatase-Inhibitor (frisch hinzugeben)
1:100 Proteinase-Inhibitor (frisch hinzugeben)

Western Blot

MES-Laufpuffer (1000 ml): 50 ml MES (20x)
950 ml Aqua bidest.

Transferpuffer (1000 ml): 50 ml Transferpuffer (20x)
100 ml Methanol
850 ml Aqua bidest.

10 % Milchpulver (100 ml): 10 g Milchpulver
100 ml TBS

10x TBS (1000 ml): 100 ml 5 M NaCl
300 ml 1 M Tris (pH 8,0 mit HCl einstellen)
600 ml Aqua bidest.

TBS (500 ml):	50 ml 10x TBS 450 ml Aqua bidest.
TBST (500 ml):	50 ml 10x TBS 450 ml Aqua bidest. 500 µl Tween 20
Entwickler:	80 g Entwickler 500 ml Aqua bidest.
Fixierer:	100 ml Konzentrat 300 ml Aqua bidest.

3.1.11 Software

Statistische Auswertung	SPSS Statistics 20.0 (IBM, Ehningen)
Quantitative Realtime-PCR	Bio-Rad iQ5 2.1 (Bio-Rad, München)
<u>Online-Datenbanken</u>	
TargetScan	www.targetscan.org
PicTar	pictar.mdc-berlin.de
miRBase	www.mirbase.org

3.2 Studienkohorte

3.2.1 Ethikantrag

Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg befürwortete das Forschungsprojekt „Untersuchung molekularer Faktoren der weiblichen Unfruchtbarkeit“ (19.04.2010). Die Ärztinnen Frau Dr. Kaltwaßer und Frau Dr. Köller des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie rekrutierten die Patientinnen, die zwischen 2010-2014 aufgrund unterschiedlicher Infertilitätsursachen in der Kinderwunschsprechstunde behandelt wurden, führten die Aufklärung durch und holten deren Einverständnis schriftlich ein. Die Blutproben wurden zwischen 7:00-11:00 Uhr abgenommen und unverzüglich per Zentrifugation (4000 xg, 10 Minuten) separiert. Das Serum wurde aliquotiert, bei -80 °C eingefroren und erst zur weiteren Aufarbeitung wieder aufgetaut. Frau Dr. Sindy Blauschmidt verwaltete die Bioproben

sowie die dazugehörigen Patientinnendaten und stellte die Untersuchungskohorte zur Verfügung.

3.3 Analytik im Patientinnenserum

3.3.1 RNA-Isolation aus Patientinnenserum mittels Trizol-Chloroform-Extraktion

Die im Patientinnenserum enthaltene microRNA wurde mit Trizol extrahiert. 400 µl Serum wurden mit 500 µl Trizol-Reagenz versetzt und in Phasetrap Tubes überführt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde Chloroform in einer Menge von 200 µl hinzugegeben. Die Proben wurden kräftig geschüttelt und anschließend bei 4 °C für 10 Minuten bei 12000 U/m zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde ein Mastermix aus 45 µl RDD-Puffer und 5 µl DNase pipettiert, der den Verdau von DNA-Kontaminationen bewirken soll. Die Oberphasen der zentrifugierten Proben wurden abpipettiert und in ein 1,5 ml Tube überführt sowie mit 50 µl der DNase-Puffer-Lösung vermengt. Es erfolgte ein Mischen durch Invertieren und ein Inkubieren für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Zur RNA-Fällung wurden 500 µl Isopropanol zugefügt und die Proben bei -20 °C über Nacht inkubiert. Darauf folgte eine Zentrifugation bei 12000 U/min und 4 °C für 10 Minuten. Der Überstand wurde dekantiert und 1 ml 96%iger eisgekühlter Ethanol hinzugefügt. Nach erneuter Zentrifugation bei 10000 U/min und 4 °C für 10 Minuten und Dekantieren des Überstandes wurden 700 µl 70%iger eisgekühlter Ethanol zugegeben. Eine weitere Zentrifugation erfolgte bei 6000 U/min und 4 °C für 10 Minuten. Der Überstand wurde abgenommen und das RNA-Pellet im umgedrehten Tube luftgetrocknet. Ein Lösen des Pellets wurde durch Zugabe von 15 µl RNase-freiem H₂O erreicht.

3.3.2 Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt. Die Proben wurden dazu 1:50 mit RNase freiem Wasser verdünnt. Die Extinktion wurde bei 260 nm und 280 nm gemessen. Dabei gilt, dass $1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ µg RNA/ml}$. Aus dem Quotient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ergibt sich die Reinheit der Präparation. Diese sollte zwischen 1,7-2,0 liegen.

3.3.3 MicroRNA cDNA-Synthese

Aufgrund geringer Expression der microRNAs im Patientinnenserum und daraus resultierend geringen RNA-Konzentrationen in der photometrischen Messung wurde die RNA für die microRNA cDNA-Synthese unverdünnt eingesetzt. Es wurde mit „RevertAid

H Minus Reverse Transkriptase“ (Thermofisher) und den microRNA-spezifischen stem-loop-Primern TaqMan™ gearbeitet.

Der Einfachansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 7,5 µl H₂O
- 3,0 µl 5x Puffer
- 2,0 µl dNTPs
- 1,0 µl stem-loop-Primer 20x, TaqMan™
- 0,5 µl Reverse Transkriptase

Es wurden 14 µl Reaktionsansatz mit 1 µl RNA pipettiert. Die Synthese erfolgte unter folgenden Standardbedingungen:

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

Die Lagerung der synthetisierten cDNA erfolgte für Stunden bei 4 °C, über längere Zeit bei -20 °C.

3.3.4 Quantitative Realtime PCR (TaqMan™)

Für die qPCR wurden die Komponenten der Hotfire-Pol (Solis Biodyne) verwendet.

Der Einfachansatz wurde wie folgt pipettiert:

- 4,3 µl H₂O
- 1,5 µl 10x Puffer
- 1,2 µl MgCl₂
- 1,0 µl dNTPs
- 0,8 µl TaqMan™ Primer
- 0,2 µl HotStart-Taq-Polymerase

Es wurden 9 µl Reaktionsansatz mit 6 µl cDNA versetzt. Anschließend erfolgte die Synthese unter folgenden Standardbedingungen:

- 1. Schritt 95 °C 15 min
- 2. Schritt 95 °C 20 s
- 3. Schritt 58 °C 30 s

4. Schritt	72 °C 2 min
5. Schritt	Schritt 2-4 65x wiederholen
6. Schritt	72 °C 10 min

Als Referenz wurde die microRNA miR-16 verwendet, da diese sowohl bei Non-PCOS-Patientinnen als auch bei PCOS-Patientinnen nahezu konstant exprimiert wird. Die Auswertung der C_T -Werte erfolgt über die $2^{-\Delta CT}$ -Methode.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Zellkultivierung

Die verwendeten Granulosakarzinomzelllinien COV434 und KGN sowie die Osteosarkomzelllinie SaOS-2 wurden in DMEM-Medium, versetzt mit 1 % PenStrep und 10 % FKS, kultiviert. Die Lagerung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, maximaler Luftfeuchte und 5 % (v/v) CO₂. Das Passagieren in neue 75 cm² Zellkulturflaschen erfolgte bei einer Zelldichte von etwa 70-80 %. Dazu wurde das alte Medium entfernt und die Zellen wurden mit 7 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 5 ml Trypsin zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden erfolgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37 °C für 5-10 Minuten. Mit der doppelten Menge Medium wurde die Reaktion gestoppt, um einen Zellverdau zu vermeiden. In Greiner-Tubes erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1000 U/min. Das Zellpellet wurde vom überschüssigen Medium befreit und in frischem Medium resuspendiert, bevor eine Bestimmung der Zellzahl oder die Überführung in neue Zellkulturflaschen erfolgte. Zur Zellzahlbestimmung wurden 10 µl der in DMEM suspendierten Zellen mit 10 µl Trypanblau gemischt. 10 µl dieses Gemisches wurden in eine Zellzählkammer überführt und mittels des Zellzählgerätes ausgezählt. Dabei wurde neben der Gesamtzellzahl der prozentuale Anteil lebender und toter Zellen ermittelt.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen pro 1 ml Medium mit 100 µl DMSO versetzt und in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert. Das Einfrieren erfolgte dabei langsam mit einem Temperaturabfall von 1 °C pro Minute.

Die Reaktivierung kryokonservierter Zellen erfolgte durch rasches Auftauen der Zellen bei 37 °C im Wärmebad. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml Medium versetzt und bei 1000 U/min für 2 Minuten zentrifugiert. Das DMSO-haltige Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet wurde in frischem DMSO-Medium suspendiert und in neue Zellkulturflaschen überführt sowie im Brutschrank gelagert.

3.4.2 Einstreuen der Zellen für die Behandlungen

Für die Hormonbehandlung mit Testosteron und die Behandlung mit Glukose wurden die Zelllinien COV434 und KGN verwendet und dazu in 25 cm² Flaschen kultiviert. Der Versuch erfolgte in Dreifachbestimmung.

Behandlung mit Testosteron und Glukose:

Zelllinie	eingestreute Zellzahl	Gefäß	Volumen
COV434	1,0 x 10 ⁶	25 cm ² Zellkulturflasche	5 ml
KGN	6,0 x 10 ⁵	25 cm ² Zellkulturflasche	5 ml

Für den dualen Luziferasereporterassay wurde die Zelllinie SaOS-2 in 96-Lochplatten wie folgt eingestreut.

Zelllinie	eingestreute Zellzahl	Gefäß	Volumen
SaOS-2	2,0 x 10 ⁴	96-Lochplatten	200 µl

Für Versuche zur Proteinisolation für den Western Blot wurden die Zelllinien COV434 und KGN in 6-Lochplatten wie folgt eingestreut.

Zelllinie	eingestreute Zellzahl	Gefäß	Volumen
COV434	7,0 x 10 ⁵	6-Lochplatte	3 ml
KGN	5,0 x 10 ⁵	6-Lochplatte	3 ml

3.4.3 Behandlung der Zellen mit Testosteron und Glukose

Um den Einfluss von Glukose sowie Testosteron auf die microRNAs miR-23a, miR-27b, miR-126, miR-224 sowie miR-372 zu untersuchen, wurden die Zellen für jeweils 24 und 48 Stunden nach folgendem Schema behandelt.

Zelllinie	Behandlung	Konzentration
COV434	Glukose	25 mM
	Testosteron	50 nM
KGN	Glukose	25 mM
	Testosteron	50 nM

Die Zellen wurden entsprechend dem Zeitwert geerntet. Dazu wurde zunächst das Medium mit jeweiliger Behandlung entfernt. Anschließend wurde mit 2 ml PBS gewaschen, um tote und lose Zellen zu entfernen. In 1 ml PBS wurden nun mit dem Zellschaber die Zellen vom Gefäßboden abgekratzt und in ein Greiner Tube überführt. Nach Zentrifugation und Entfernen des überschüssigen PBS wurde das Zellpellet bei -20 °C im Greiner Tube weggefroren.

3.4.4 RNA-Isolation mittels Trizol-Chloroform-Extraktion

Das Zellpellet wurde mit 500 µl Trizol-Reagenz versetzt und in Phasetrap Tubes überführt. Die anschließende RNA-Isolation erfolgte in gleicher Weise wie unter 3.3.1 beschrieben.

3.4.5 MicroRNA cDNA-Synthese

Die RNA wurde 1:10 verdünnt und insgesamt wurde 250 ng RNA in die Reverse Transkriptase-Reaktion eingesetzt. Es wurde mit „RevertAid H Minus Reverse Transkriptase“ (Thermofisher) und den microRNA-spezifischen stem-loop-Primern TaqMan™ gearbeitet.

Der Einfachansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 2,5 µl H₂O
- 3,0 µl 5x Puffer
- 2,0 µl dNTPs
- 1,0 µl stem-loop-Primer 20x, TaqMan™
- 1,0 µl RNase-Inhibitor
- 0,5 µl Reverse Transkriptase

Es wurden 10 µl Reaktionsansatz mit 5 µl RNA-Verdünnung pipettiert. Die Synthese erfolgte unter folgenden Standardbedingungen:

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

Die Lagerung der synthetisierten cDNA erfolgte für Stunden bei 4 °C, über längere Zeit bei -20 °C.

3.4.6 Quantitative Realtime PCR (TaqMan™)

Die qPCR erfolgte in gleicher Weise wie bei der Analytik im Patientinnenserum (s. 3.3.4). Es wurde lediglich die cDNA Menge auf 2 µl verringert.

Der Einfachansatz wurde wie folgt pipettiert:

8,3 µl H₂O
1,5 µl 10x Puffer
1,2 µl MgCl₂
1,0 µl dNTPs
0,8 µl TaqMan™ Primer
0,2 µl HotStart-Taq-Polymerase

Es wurden 13 µl Reaktionsansatz und 2 µl cDNA pipettiert.

3.4.7 Transfektion von Vektoren

Die eigens generierten psiCHECK™-2 Vektoren mit Abschnitten aus dem 3'UTR des Östrogenrezeptors α oder des Progesteronrezeptors wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenzes FuGENE (Promega) transfiziert. Die Zellen wurden für den dualen Luziferasereporterassay wie zuvor beschrieben eingestreut und für 24 h wachsen gelassen. Das Medium wurde anschließend abgenommen und es wurde entsprechend der folgenden Behandlung serumfreies Medium vorgelegt - bei den Kontrolllöchern 175 µl, bei den Löchern mit Vektortransfektion 166,25 µl und bei den Löchern mit Vektortransfektion und microRNA-Kotransfektion 116,25 µl.

Der Einfachansatz für die Vektortransfektion setzte sich wie folgt zusammen:

Gen	ER α	PR
Plasmid	13,2 µl	12,2 µl
serumfreies		
Medium	262,2 µl	263,2 µl
FuGENE	21,6 µl	21,6 µl

Der Ansatz wurde für 10 Minuten zur Komplexbildung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde er mit 8,75 µl pro Loch in das vorgelegte serumfreie Medium pipettiert.

3.4.8 Transfektion von microRNA

Die Transfektion von microRNA erfolgte mit INTERFERin (Polyplus). Es wurde die microRNA miR-23a und zur Negativkontrolle eine entsprechende Negativmimik verwendet. Für den dualen Luziferasereporterassay wurden 96-Lochplatten mit definierter Zellmenge verwendet. Die Zellen wurden wieder für 24 h wachsen gelassen. Das Medium wurde anschließend entfernt und serumfreies Medium wurde vorgelegt. Die microRNA Transfektion für den Western Blot erfolgte in 6-Lochplatten in gleicher Weise.

Der Einfachansatz setzte sich wie folgt zusammen:

	miR-23a	Negativmimik
RNA-Lösung	3,15 µl	3,15 µl
serumfreies		
Medium	864,85 µl	864,85 µl
INTERFERin	32 µl	32 µl

Der Ansatz wurde für 10 Minuten zur Komplexbildung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde er mit 50 µl pro well in das vorgelegte serumfreie Medium pipettiert.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Dualer Luziferasereporterassay

Für die Untersuchung des Einflusses der microRNA miR-23a auf die potenziellen Zielgene Östrogenrezeptor α (ER α) und Progesteronrezeptor (PR) wurden zunächst mögliche Zielgene mittels Bioinformatischer Tools eruiert. Genspezifisch wurden Primer erstellt. Mittels dieser Vorwärts- und Rückwärtsprimer-Paare konnte nun ein spezifischer Bereich des 3'UTR des ER α - und des PR-Gens amplifiziert werden.

UTR-Amplifikation

Die Amplifikation erfolgte mittels PCR nach folgendem Einfachansatz:

- 9,1 µl H₂O
- 1,5 µl 10x Puffer
- 1,2 µl MgCl₂
- 1 µl dNTPs
- 0,5 µl je Primer (forward und reverse)

0,2 µl TaqPolymerase

Dem Reaktionsansatz wurden 2 µl cDNA zugefügt. Die Proben wurden im PCR Thermocycler nach folgendem Ablauf amplifiziert:

1. Schritt 95 °C 5 min
2. Schritt 95 °C 20 s
3. Schritt 60 °C 30 s
4. Schritt 72 °C 1 min
5. Schritt Schritt 2-4 35x wiederholen
6. Schritt 72 °C 5 min

Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Amplifikate erfolgte durch Auftragen im Agarose-Gel. Dazu wurden 1-2 %-ige Gele, angereichert mit etwa 5 µl Ethidiumbromid, hergestellt. 15 µl PCR-Produkt wurden mit 1 µl Bromphenolblau-haltigem Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung von 120 V wurden die Proben aufgetrennt und konnten anhand einer 100 bp DNA-Leiter entsprechend ihrer zu erwartenden Länge von etwa 500-960 bp zugeordnet werden. Die Detektion der Banden erfolgte dabei unter UV-Licht.

Aufreinigung der PCR-Produkte aus Agarosegel

Die Banden der entsprechenden Größe wurden mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten. Um DNA-Schädigung zu vermeiden, wurde zügig gearbeitet. Mit Hilfe des QiaQuick Gelextraktionskits (Quiagen) wurden die Proben aufgereinigt. Zum Gelstück wurden 700 µl QG-Puffer zugefügt. Durch 10-minütiges Erhitzen auf 50 °C wurde es verflüssigt. 200 µl Isopropanol wurden hinzugegeben und nach kurzem Vortexen konnte das Gemisch auf eine Säule gegeben werden. Die Säule wurde bei 10000 U/min für 1 Minute zentrifugiert, wodurch das Gemisch die Säule durchlief und es zur Bindung der negativ geladenen PCR-Produkte in der Säule kam. Anschließend wurde die Säule zweimal mit 350 µl PE-Puffer bei 10000 U/min für eine Minute gespült. Um die Säule zu trocknen wurde sie im Anschluss erneut bei 10000 U/min für 1 min zentrifugiert. Es konnten nun die gereinigten PCR-Produkte durch direkte Zugabe von 15 µl nukleasefreiem Wasser auf die Säule gelöst werden.

Ligation in den pcR2.1-Vektor

Für die Ligation wurde das TOPO-TA-Cloning-Kit (Invitrogen) verwendet. Eine direkte Ligation konnte durch überhängende T-Enden des pcR2.1-Vektors erreicht werden. Diese gehen Bindungen ein mit den durch die HotStart Taq Polymerase in der PCR erzeugten überhängenden A-Enden der PCR-Produkte. Durch eine zusätzliche am Vektor gebundene Topoisomerase wird zudem ein Offenhalten des Vektors gewährleistet. Es wurden 4 µl aufgereinigtes PCR-Produkt mit 1 µl Salzlösung sowie 1 µl pCR®2.1-TOPO TA Vektor versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der pcR2.1-Vektor stellt dabei einen Zwischenvektor dar, der notwendig ist, um einen optimalen Restriktionsverdau und somit korrekte Ligation der PCR-Produkte in den Zielvektor zu gewährleisten.

Transformation in E.coli

100 µl chemisch kompetente E.coli Zellen (Invitrogen) wurden für die Transformation auf Eis aufgetaut. Es erfolgte eine Inkubation auf Eis für 15 Minuten unter Zugabe von 2 µl Ligationsansatz. Ein 30-sekündiger Hitzeschock bei 42 °C und anschließende abrupte Eiskühlung diente der DNA-Aufnahme. Es wurden 250 µl S.O.C. Medium zugefügt und die Probe wurde für 1 h bei 37 °C unter horizontalem Schütteln von 200 U/min inkubiert. Der Ansatz wurde auf Selektionsagarplatten ausgestrichen. Dazu wurden 50 µl verwendet. Die Platten waren vorgewärmt und über Nacht bei 37 °C gelagert.

Um die positiven Transformanden zu selektieren wurden 50 µg/ml Ampicillin in den Selektionsagar gegeben. Unter Verwendung des pcR2.1-Vektors konnte zusätzlich eine Farbselektion erfolgen. Hierzu wurden 40 µg/ml X-Gal verwendet, wodurch eine blau/weiß-Färbung erfolgte. Weiße Inseln zeigten dabei eine positive Vektortransformation an und wurden für die Übernachtskultur ausgewählt.

Übernachtskultur

Mit sterilen Zahnstochern wurden weiße Einzelkolonien gepickt, indem sie mit der Spitze des Zahnstochers kurz angestochen wurden. Die Zahnstocherspitze wurde in 5 ml LB-Medium, versetzt mit Ampicillin (100 mg/ml) eingefügt. Über Nacht wurden die Bakterien bei 37 °C unter Schütteln von 200 U/min inkubiert und somit vermehrt.

Plasmidisolierung

Der über Nacht gezüchtete Bakterienansatz wurde bei 4000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Mit dem Miniprep Kit (ZymoResearch) wurden nun aus dem Zellpellet die Plasmide isoliert. Das Zellpellet wurde unter Zugabe von 200 µl P1-Puffer in Tubes überführt. Anschließend wurden 200 µl P2-Puffer zugefügt und mehrmals invertiert, um die Wände der Zellen zu zerstören. Erneutes Invertieren erfolgte unter Zugabe von 400 µl gekühltem P3-Puffer bis zum Farbumschlag. Die Proben wurden nun bei 13000 U/min für 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Säule überführt, die zurückbleibenden Zellreste wurden verworfen. Die Säule wurde bei 13000 U/min für 1 min zentrifugiert, wodurch die negativ geladene Plasmid-DNA in der Säule gebunden wurde. Durch zweimaliges Zufügen von 200 µl Waschpuffer und 1-minütiges Zentrifugieren bei 13000 U/min wurde die Säule gespült. Abschließend wurde die Säule trocken zentrifugiert und die Elution der Plasmid-DNA erfolgte in 20 µl nukleasefreiem Wasser.

Restriktionsverdau mit *Xho I* und *Not I*

Die eigens generierten Primer der potenziellen Zielgene ER α und PR enthielten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme. Die Vorwärtsprimer enthielten Schnittstellen für *Xho I* und die Rückwärtsprimer für *Not I*. Um die 3'UTR-Bereiche der beiden zu untersuchenden Gene in den Zielvektor ligieren zu können, erfolgte nun der Verdau mit den beiden Restriktionsenzymen. Somit war eine Ligation der Bereiche mit der gewünschten Zielorientierung von 5'-3' gewährleistet.

Der Einfachansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 5 µl psiCHECK™-2 / Insert-enthaltender pCR®2.1-Vektor
- 4,5 µl Aqua bidest.
- 1,5 µl Puffer R
- 2 µl *Xho I*
- 2 µl *Not I*

Der Verdau erfolgte bei 37 °C für 1,5 h. In der Zwischenzeit wurde ein Gel gegossen. Nach dem Verdau erfolgte das Auftragen der Proben sowie das Schneiden der Plasmide aus dem Gel sowie deren Aufreinigung.

Ligation in psiCheck-Vektor

Die Ligation in den Luziferase-Vektor erfolgte für 30 min bei 22 °C.

Der Einfachansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 2 µl Aqua bidest.
- 1 µl doppelt verdauter Zielvektor psiCHECK™-2
- 4 µl doppelt verdautes Insert (3'UTR)
- 2 µl 10x T4-Ligationspuffer
- 1 µl T4-Ligase

Es erfolgte ein erneutes Klonieren in E.coli Top10 Zellen. Positive Transformation konnte in diesem Fall nicht durch Farbselektion überprüft werden. Es wurden mögliche Transformanden gepickt und durch Übernachtskultur vervielfältigt. Anschließend erfolgte zur Überprüfung der erfolgreichen Generierung von Vektoren mit gewünschtem Insert eine Sequenzierung.

Sequenzierung

Um die generierten Genabschnitte zu überprüfen, erfolgte eine Sequenzierung.

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

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

Die Reaktion lief anschließend im Thermocycler wie folgt ab:

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

Im Anschluss erfolgte die Fällung des Sequenzierproduktes unter Vermeidung direkter Lichteinstrahlung. Es wurden 2 µl EDTA (125 mM), 2 µL Natriumacetat (3 M) und 50 µl 96%iger Ethanol zu den Proben hinzugefügt. Nach kurzem Vortexen wurde der Ansatz für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Eine anschließende Zentrifugation bei 6000 U/min für 20 min bei 4 °C erzeugte ein Pellet der gefällten DNA. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet bei 80 °C für 10 min im Thermocycler getrocknet. Die Sequenzierung wurde am Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der MLU Halle-Wittenberg durch Frau Dr. Darmer und Herrn Dr. Christov unter Nutzung eines ABI Prism DNA-Sequencers durchgeführt.

Dualer Luziferasereporterassay

Durch den dualen Luziferasereporterassay wurde der Zusammenhang zwischen microRNA miR-23a und Expression der Gene ER α und PR überprüft.

Zunächst wurden SaOS-2 Zellen in definierter Menge eingestreut und für 24 h wachsen gelassen. Es erfolgte die Behandlung der Zellen wie zuvor beschrieben. Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und durch 50 µl serumfreies Medium pro Loch ersetzt. Nun erfolgte die Zugabe von 50 µl Firefly-Luziferase-Substanz (Dual Glo™ Luciferase Reagent). Nach 15 min wurde eine Aktivitätsmessung am Plattenreader infinite M200 (Tecan) durchgeführt. Nach Zugabe von 50 µl einer zweiten Substratlösung (Dual Glo™ Stop&Glo® Reagent) zum Abstoppen der Aktivität der Firefly-Luziferase sowie zur Zugabe der Renillafly-Luziferase und erneuter 15-minütiger Inkubation erfolgte eine zweite Messung. Abschließend konnte die Aktivität beider Enzyme in Beziehung gesetzt werden. Der zu untersuchende 3'UTR der potenziellen Zielgene wurde vor das Stop-Codon des Vektors psiCHECK™-2 transfiziert. Zeigt die untersuchte microRNA miR-23a RNA-Interferenz gegen den 3'UTR, so kommt es zur Spaltung und nachfolgend zur Degradation der fusionierten mRNA. In diesem Fall ist eine Abnahme der Renillafly-Aktivität zu verzeichnen.

3.5.2 Western Blot

Um die beiden Gene ER α und PR als Zielgene der microRNA miR-23a zu überprüfen, wurde ein Western Blot durchgeführt. Es wurden die Zelllinien COV434 und KGN für 24, 48 und 72 h mit der microRNA miR-23a behandelt. Aus den behandelten Zellen wurden die Proteine isoliert und nach Blotten auf eine Membran mit spezifischen Antikörpern der zu untersuchenden Zielproteine ER α und PR behandelt. Das entsprechende

Bindungsverhalten gibt dabei Rückschlüsse auf das Vorhandensein der genannten Zielgene.

Zunächst erfolgte nach der Zellernte der mit microRNA miR-23a behandelten Zellreihen die Proteinkonzentrationsbestimmung. Das Zellpellet wurde dazu mit einem Farbreagenz aus 1 ml Protein Assay und 4 ml Wasser versetzt. Die Konzentrationsmessung erfolgte nach 30-minütiger Inkubationszeit im Photometer, indem 199 µl Farbreagenz mit 1 µl Probe vermessen wurden. Nach anschließender Probenaufbereitung durch Zusatz von 2 µl Reduktionsmittel und 6 µl Laufpuffer und Denaturierung für 7 min bei 95 °C erfolgte die Elektrophorese in einer Gelkammer. Im Gel kommt es durch Anlegen von elektrischem Strom zur Größenauftrennung der Proteine, wobei große Proteine weiter hinten im Gel zurückgehalten werden und kleine Proteine das Gel weiter nach vorn durchwandern. 7,5 µg Gesamtprotein wurden auf das Gel aufgetragen und für 1 h bei 150 V und 4 °C in einer Gelkammer (XCell Sure lock™) aufgetrennt. Es wurden 4-12%ige Bis-Tris-Acetat-Gele und 1x MES-Laufpuffer verwendet. Zur Größenbestimmung diente ein mitgeführter Protein-Molekulargewichtsstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder). Nachfolgend konnte der Transfer auf eine PVDF-Membran durch Tank-Blot-Verfahren mittels einer Mini Trans-Blot® Cell erfolgen. Die Membran wurde zunächst für 1 min in Methanol aktiviert, in Aqua bidest. gewaschen und in Transferpuffer eingelegt. Das Blotting erfolgte in 1x Transferpuffer für 2,5 h bei 150 V im Kühlschrank. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen wurde die Membran für 1 h mit 10%igem Magermilchpulver in TBST blockiert. Der Primärantikörper wurde dann dem Gemisch hinzugefügt und bei 4 °C über Nacht auf der Membran inkubiert. Die Membran wurde nach Inkubation dreimal mit TBST gewaschen und schließlich mit dem sekundären Antikörper erneut für 1 h bei Raumtemperatur in 10%igem Magermilchpulver in TBST behandelt. Anschließend wurde die Membran erneut dreifach mit TBST gewaschen. Im Anschluss konnte die Detektion mittels ECL Western Blotting Detection System erfolgen. Die Membran wurde mit den Lösungen A und B im Verhältnis 1:1 für 1 min inkubiert. Dann erfolgte die Entwicklung auf dem Röntgenfilm in der Dunkelkammer. Zunächst wurden die belichteten Filme bis zum Sichtbarwerden von Banden in Entwicklerlösung getaucht, anschließend mit Wasser gewaschen und schließlich in Fixierlösung gebracht. Nach Trocknen der Filme konnte die Auswertung erfolgen.

3.6 Statistische Auswertung

Die Software *IBM SPSS Statistics 20.0* wurde für die statistische Auswertung genutzt. Es erfolgten bivariate Korrelationsanalysen (Spearman-Rho) und nicht-parametrische Tests (Mann-Whitney U-Test). Als statistisch signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ eingestuft.

4 Ergebnisse

4.1 Vermessung von microRNAs im Patientinnenserum

Zielstellung dieser Arbeit war, einen Zusammenhang zwischen differenziell exprimierten microRNAs im Serum von Kinderwunschpatientinnen und dem Polyzystischen Ovarsyndrom zu prüfen. Ein Zusammenhang zwischen dem Krankheitsbild und zirkulierenden microRNAs wurde bereits in einigen Studien beschrieben (Butler et al., 2019; Sørensen et al., 2019). Auch in der eigenen Arbeitsgruppe konnte im Rahmen der Dissertationsarbeit von Frau Dr. Wiebke Würfl (Würfl, 2016) unter anderem eine signifikante Korrelation zwischen der erhöhten Serumkonzentration der microRNA miR-200a und Hyperandrogenismus, einem der PCOS definierenden Merkmale, gezeigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Analyse der zirkulierenden microRNAs miR-27b, miR-126, miR-224 und miR-372 - basierend auf den microArray-Analysen aus der Dissertationsarbeit von Frau Dr. Wiebke Würfl - aus dem Serum von insgesamt 201 Kinderwunschpatientinnen des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie.

Mittels quantitativer Realtime PCR erfolgte die Konzentrationsbestimmung der microRNAs im Serum der Patientinnen. Es folgte die statistische Auswertung durch Korrelationsanalysen und nicht-parametrische Tests. Alle in die Auswertung einbezogenen klinischen Messdaten wurden durch Frau Dr. Kaltwaßer und Frau Dr. Köller, Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Halle (Saale), erhoben.

4.1.1 Patientinnenkohorte

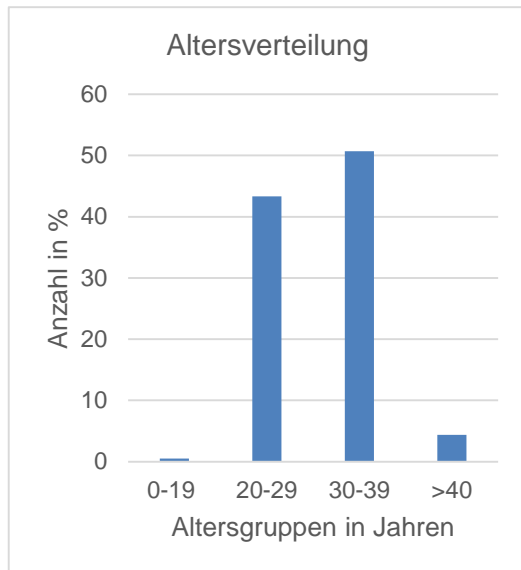
In das untersuchte Patientinnenkollektiv wurden 201 Kinderwunschpatientinnen eingeschlossen, die zwischen 2010-2014 im Rahmen einer Kinderwunschtherapie im Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) behandelt wurden.

Tabelle 2 Zusammenfassung klinischer Parameter des Patientinnenkollektivs

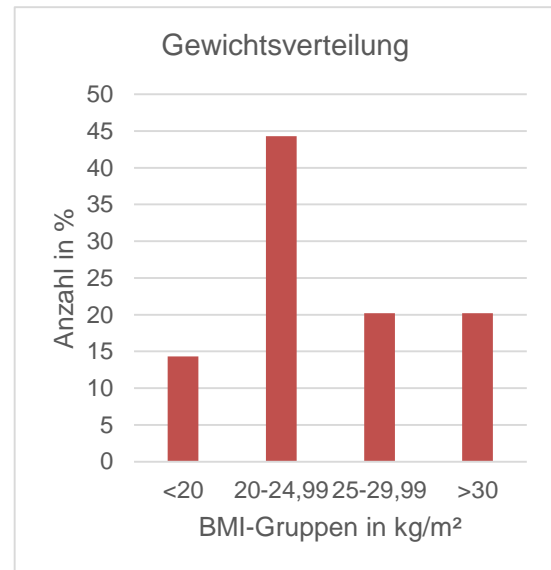
	Alter [y]	Gewicht [kg]	Größe [m]	BMI [kg/m²]	Menarche [y]
Median	30	66	1,68	23,74	13
Minimum- Maximum	19 - 44	45 - 126	1,5 - 1,83	17,36 - 44,64	10 - 17
Anzahl n	201	201	201	201	186

4 Ergebnisse

Der Mittelwert des Alters lag bei 30,6 Jahren (s. Tabelle 2). Der Median belief sich auf 30 Jahre (s. Abb. 3). Der BMI betrug im Mittel 25,3 und im Median 23,7. Das Gewicht war im Mittel bei 70,6 kg und der Median bei 66 kg (s. Abb. 4). Mittelwert und Median des Alters bei Eintritt der Menarche lagen bei 13 Jahren.



3



4

Abbildung 3, 4 Alters- und Gewichtsverteilung der Patientinnenkohorte

Es können überdies Angaben zu Schwangerschaften, Geburten sowie Fehlgeburten gemacht werden (s. Abb. 5-7). Mit einem Anteil von 53,2 % empfangen die Mehrheit der Frauen keine Schwangerschaft. 41,9 % hatten eine bis drei und 4 % vier oder mehr Schwangerschaften. Es kam bei 79,8 % der Frauen zu keiner und bei 0,5 % zu vier Geburten. 18,7 % lagen mit einer bis drei Geburten im Mittelfeld. Der Großteil der Frauen erlitt zu 77,3 % noch nie eine Fehlgeburt. 19,7 % erlebten einen, zwei oder drei Aborte, vier und mehr Fehlgeburten lagen bei 2 % vor.

4 Ergebnisse

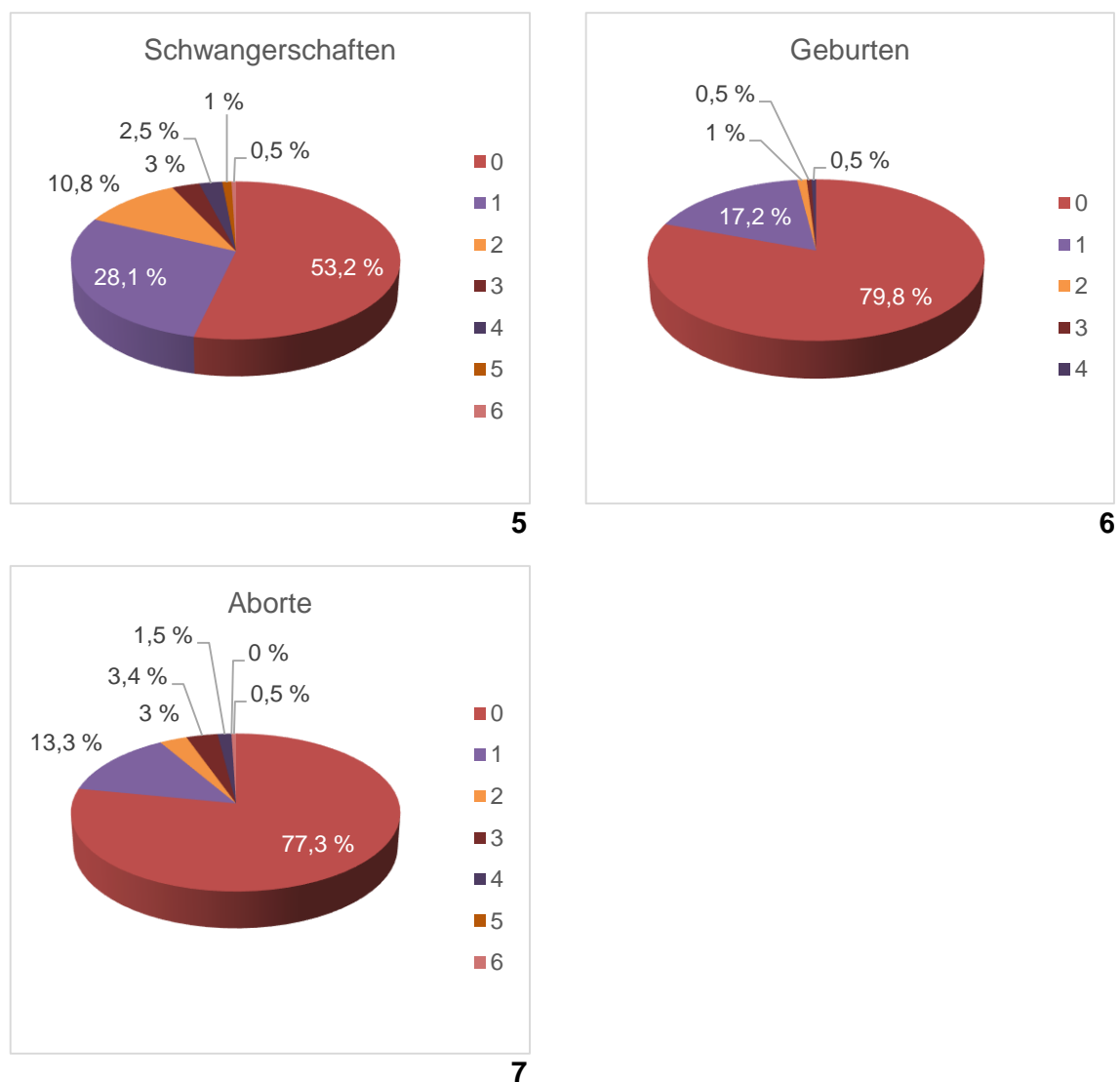
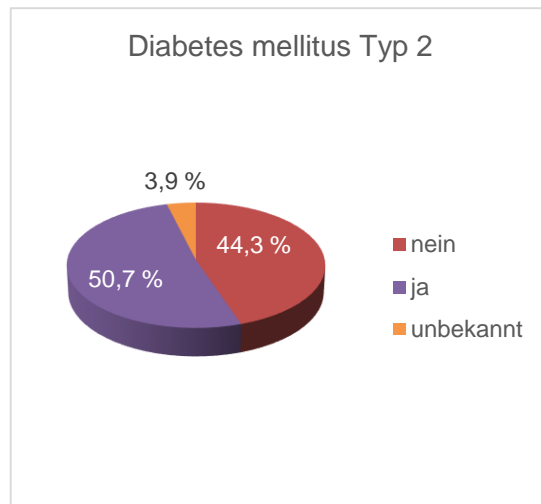


Abbildung 5, 6, 7 Schwangerschaften, Geburten und Fehlgeburten des Patientinnenkollektivs

Aussagen zum Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 2 in der Familienanamnese der Betroffenen können ebenfalls getroffen werden (s. Abb. 8). 50,7 % der Patientinnen hatten in der Familie Fälle von Typ 2 Diabetes mellitus, 44,3 % waren nicht betroffen und bei 3,9 % war es unklar, ob eine Diagnose besteht.

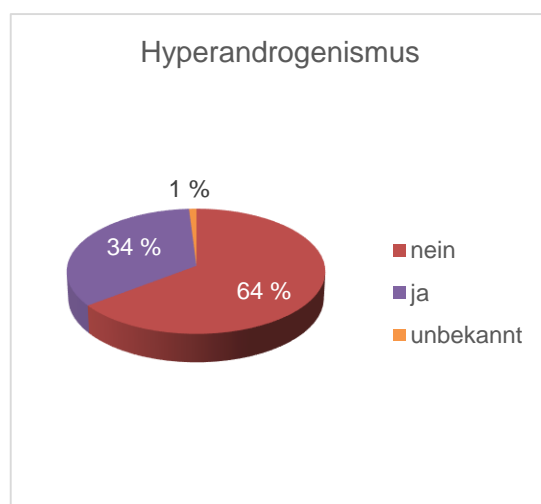
4 Ergebnisse



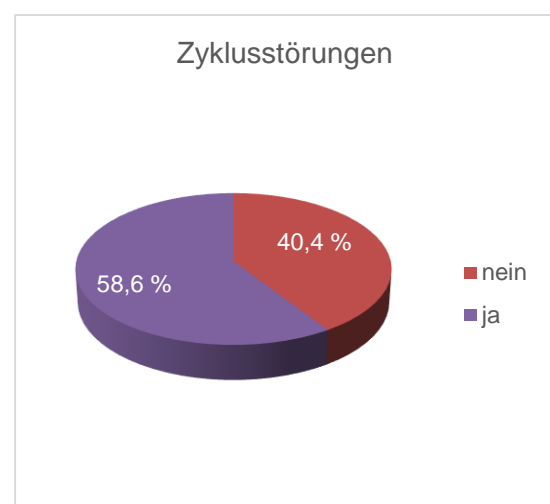
8

Abbildung 8 Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 2 in der Familienanamnese der Patientinnenkohorte

Es folgen die für das Polyzystische Ovarsyndrom typischen klinischen Parameter sowie die Diagnose selbst (s. Abb. 9-12). Es konnte bei 34 % ein Hyperandrogenismus festgestellt werden und bei 1 % der Frauen ist es unklar, ob ein androgener Phänotyp vorliegt. Polyzystische Ovarien konnten mittels Ultraschall bei 49,8 % diagnostiziert werden. 58,6 % der Kinderwunschpatientinnen hatten Zyklusstörungen und bei 52,2 % konnte die Diagnose „Polyzystisches Ovarsyndrom“ gestellt werden.



9



10

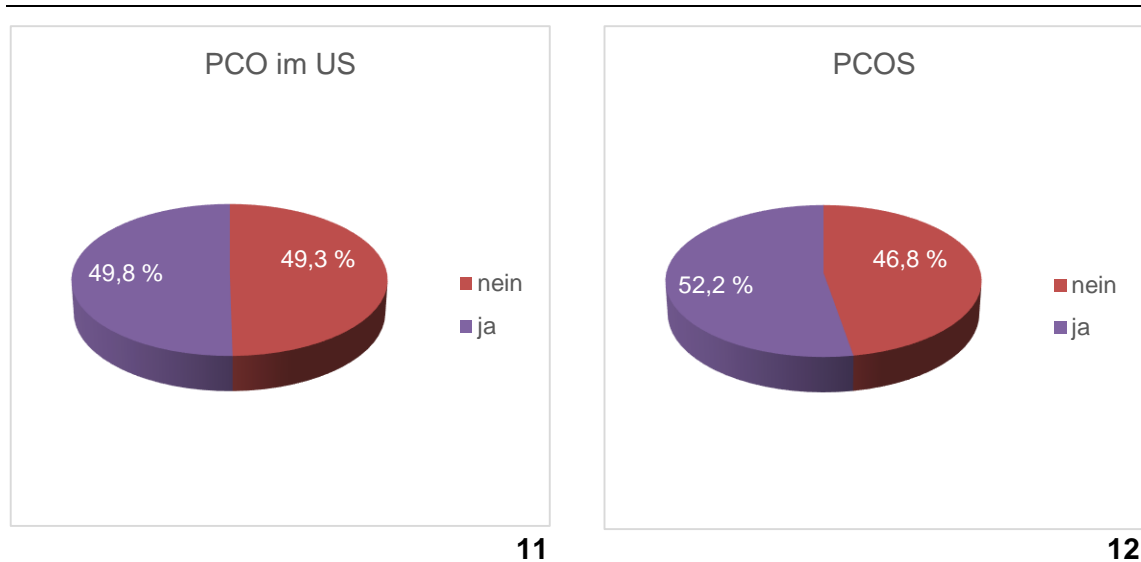


Abbildung 9, 10, 11, 12 Übersicht der klinischen Merkmale Hyperandrogenismus, Zyklusstörungen, Polyzystische Ovarien (PCO) im Ultraschall (US) sowie die Diagnose „Polyzystisches Ovarsyndrom“ innerhalb des Patientinnenkollektivs

Es resultiert - bedingt durch die hohe Anzahl der Patientinnen sowie die nahezu homogen verteilten klinischen Messdaten Alter, BMI sowie vorausgegangene Schwangerschaften, Geburten, Fehlgeburten - eine repräsentative Kohorte. Die für das Polyzystische Ovarsyndrom definierenden Merkmale sowie die Diagnose selbst sind innerhalb der Kohorte ebenfalls nahezu gleich verteilt.

4.1.2 MicroRNA-Messungen

Im Rahmen der Dissertationsarbeit von Frau Dr. Wiebke Würfl konnten in microArray-Analysen microRNAs ermittelt werden, welche beim Krankheitsbild „Polyzystisches Ovarsyndrom“ beziehungsweise deren klinischen Merkmalen im Serum der Patientinnen differenziell exprimiert sind. Zwei dieser ermittelten microRNAs wurden ausgewählt und ihre Konzentrationen im Rahmen dieser Arbeit im Serum von 201 Patientinnen mit unerfülltem Kinderwunsch vermessen. Es handelt sich dabei um die microRNAs miR-126 und miR-372. Zusätzlich wurden zwei weitere microRNAs für die Vermessung im Patientinnenkollektiv bestimmt - die microRNA miR-27b, welche nach Murri et al., 2013 im Serum von PCOS Frauen als differenziell exprimiert beschrieben wurde sowie die microRNA miR-224, welche nach Sang et al., 2013 in die Aromatasefreisetzung während der Follikelentwicklung involviert sei (Murri et al., 2013; Sang et al., 2013).

Für die microRNA miR-27b-Konzentration im Serum befanden sich dabei 64 Proben außerhalb des Detektionsbereiches. Für die microRNA miR-126 befanden sich 17 Proben außerhalb des Detektionsbereiches, für die microRNA miR-224 waren es 49

Proben und für die microRNA miR-372 25 Proben. Der Median der miR-27b-Werte ($2^{-\Delta CT}$) betrug 0,006. Die microRNA miR-126 hatte einen Median der Konzentrationswerte von 0,778, die miR-224 von 0,0218. Die $2^{-\Delta CT}$ -Werte der microRNA miR-372 lagen im Median bei 0,0676 (s. Abb. 13).

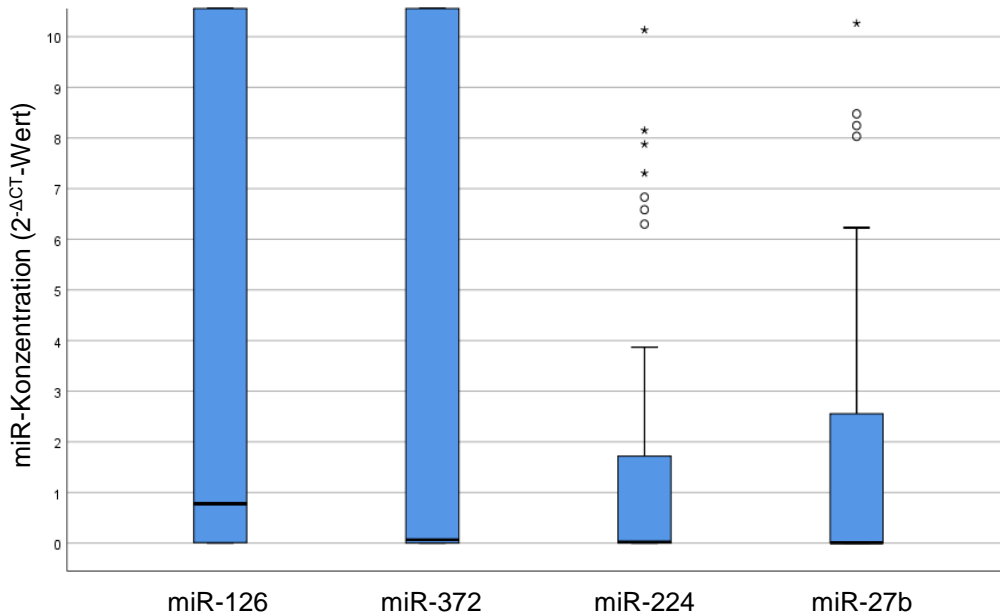


Abbildung 13 Konzentrationen der microRNAs miR-27b, miR-126, miR-224 und miR-372 im Serum der Patientinnenkohorte

Es zeigt sich im Mittel eine deutlich höhere Konzentration der microRNAs miR-126 sowie miR-372 im Serum der Probandinnen. Die microRNAs miR-224 sowie miR-27b weisen deutlich geringere Serumkonzentrationen auf.

4.1.3 Bivariate Korrelationsanalysen der zirkulierenden microRNAs

Um zu überprüfen, ob zwischen den Serumkonzentrationen der vermessenen microRNAs und den im Rahmen der Blutprobensammlung der Kinderwunschpatientinnen erstellten klinischen Messdaten ein Zusammenhang besteht, wurde eine bivariate Korrelationsanalyse nach Spearman-Rho durchgeführt. Außerdem wurden Assoziationen zwischen den Konzentrationen der einzelnen microRNAs sowie zwischen den klinischen Messdaten geprüft. Den Tabellen 3-6 sind die erhobenen Korrelationen zu entnehmen.

Tabelle 3, 4, 5, 6 Bivariate Korrelationen der microRNAs miR-27b, miR-126, miR-224 und miR-372; r_s = Korrelationskoeffizient (von -1 bis +1), p = Signifikanzniveau, n = Zahl der Fälle

3

		r_s	p	n
hsa-miR-27b	DPP4-Aktivität	-0,232	0,001	200
	DPP4-Konzentration	-0,315	$8,8 \cdot 10^{-6}$	191
	miR-224-Konzentration	0,287	$3,7 \cdot 10^{-4}$	201
	miR-372-Konzentration	0,618	$1,48 \cdot 10^{-22}$	201

4

		r_s	p	n
hsa-miR-126	miR-200-Konzentration	-0,334	$4,5 \cdot 10^{-6}$	201
	miR-224-Konzentration	0,418	$6,33 \cdot 10^{-10}$	201
	miR-372-Konzentration	0,564	$2,92 \cdot 10^{-18}$	201

5

		r_s	p	n
hsa-miR-224	miR-200-Konzentration	-0,298	$4,85 \cdot 10^{-4}$	180
	miR-372-Konzentration	0,487	$2,42 \cdot 10^{-13}$	201

6

		r_s	p	n
hsa-miR-372	Estradiol	0,238	0,023	92
	DPP4-Konzentration	-0,32	$6,22 \cdot 10^{-6}$	191
	miR-200-Konzentration	-0,373	$2,43 \cdot 10^{-7}$	180

Es zeigt sich, dass die microRNA-Konzentrationen teilweise untereinander, als auch mit anderen Faktoren signifikant korrelieren. So korreliert die microRNA miR-27b-Konzentration mit den Konzentrationen der microRNAs miR-224 und miR-372, als auch der DPP4-Konzentration und -Aktivität. Die Konzentration der microRNA miR-126 korreliert mit den microRNA miR-200-, miR-224- und miR-372-Konzentrationen. Signifikant korrelierend mit der microRNA miR-224-Konzentration sind ebenfalls die microRNA miR-200- und miR-372-Konzentrationen. Für die microRNA miR-372-Konzentration konnte auch eine signifikante Korrelation mit der microRNA miR-200-Konzentration sowie mit der DPP4- und der Östrogenkonzentration gefunden werden.

4.1.4 Assoziation der Serumkonzentration der zirkulierenden microRNAs zu PCOS und dessen Diagnosekriterien

Es folgte der Test der Hypothese. Um zu überprüfen, ob die Serumkonzentrationen der zirkulierenden microRNAs mit der Diagnose „Polyzystisches Ovarsyndrom“ oder

einzelnen diagnostischen Kriterien signifikant korrelieren, wurden nicht-parametrische Tests nach Mann-Whitney-U durchgeführt.

Dazu wurden die 4 diagnostischen Kriterien „Androgener Phänotyp“, „Zyklusstörungen“, „Polyzystische Ovarien im Ultraschall“ und „Polyzystisches Ovarsyndrom“ ausgewählt.

Die Serumkonzentration der microRNAs korreliert nicht mit dem Auftreten eines androgenen Phänotyps (s. Tabelle 7).

Tabelle 7 Nicht-parametrische Tests zur Assoziation zwischen dem Vorliegen eines androgenen Phänotyps und den Konzentrationen der vermessenen microRNAs; p MWU = p-Wert des Mann-Whitney-U-Tests

Androgener Phänotyp	miR-27b	miR-126	miR-224	miR-372
p MWU	0,479	0,147	0,36	0,675

Zur Diagnose „Zyklusstörungen“ konnte eine signifikante Korrelation der Serumkonzentration der microRNA miR-372 festgestellt werden ($p = 0,038$), zudem zeigte die Serumkonzentration der miR-126 einen Trend zur Signifikanz ($p = 0,088$). Die Serumkonzentrationen der miR-27b und miR-224 wiesen keine Assoziation zum Vorliegen einer Zyklusstörung auf (s. Tabelle 8).

Tabelle 8 Nicht-parametrische Tests zur Assoziation zwischen dem Vorliegen einer Zyklusstörung und den Konzentrationen der vermessenen microRNAs; p MWU = p-Wert des Mann-Whitney-U-Tests

Zyklusstörung	miR-27b	miR-126	miR-224	miR-372
p MWU	0,365	0,088	0,173	0,038

Das Auftreten von polyzystischen Ovarien im Ultraschall korreliert signifikant mit allen der vermessenen microRNA-Konzentrationen (s. Tabelle 9).

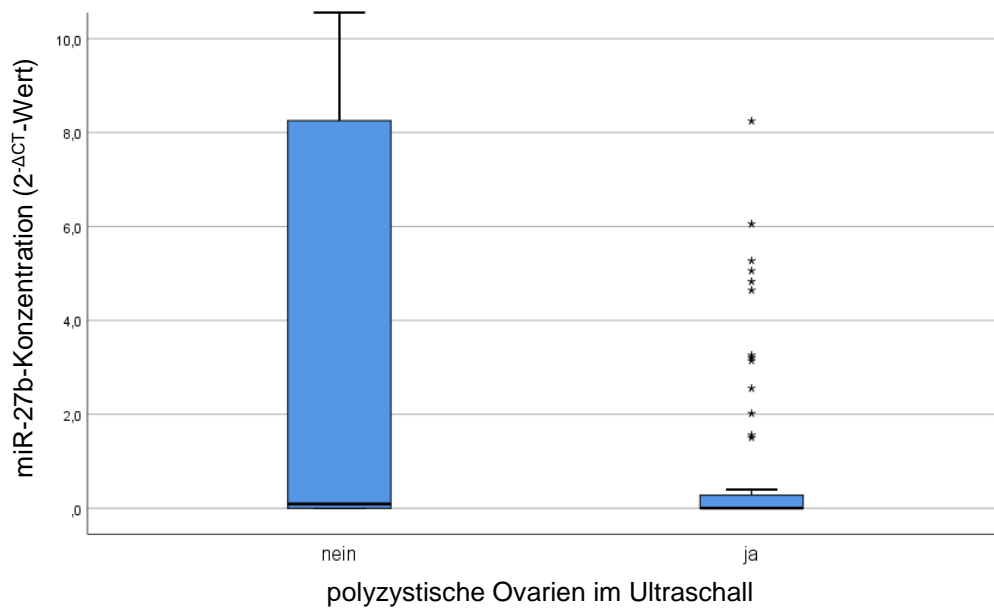
Tabelle 9 Nicht-parametrische Tests zur Assoziation zwischen dem Vorliegen von polyzystischen Ovarien im Ultraschall und den Konzentrationen der vermessenen microRNAs; p MWU = p-Wert des Mann-Whitney-U-Tests

PCO im US	miR-27b	miR-126	miR-224	miR-372
p MWU	0,014	0,006	0,003	0,001

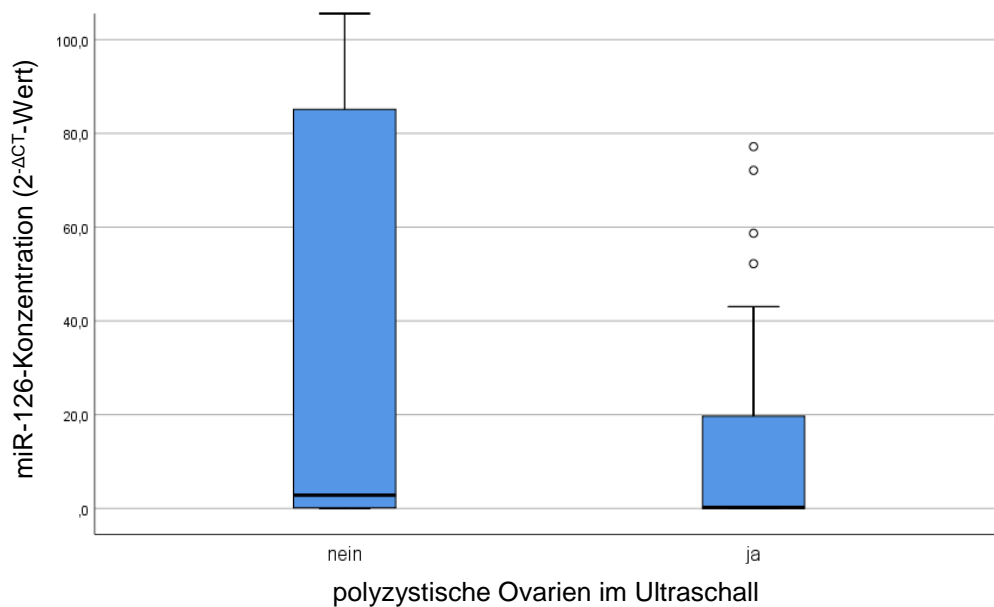
Die Diagnose „Polyzystisches Ovarsyndrom“ korreliert signifikant mit den Konzentrationen der microRNAs miR-126, miR-224 und miR-372 (s. Tabelle 10).

Tabelle 10 Nicht-parametrische Tests zur Assoziation zwischen dem Vorliegen der Diagnose „Polyzystisches Ovarsyndrom“ und den Konzentrationen der vermessenen microRNAs; p MWU = p-Wert des Mann-Whitney-U-Tests

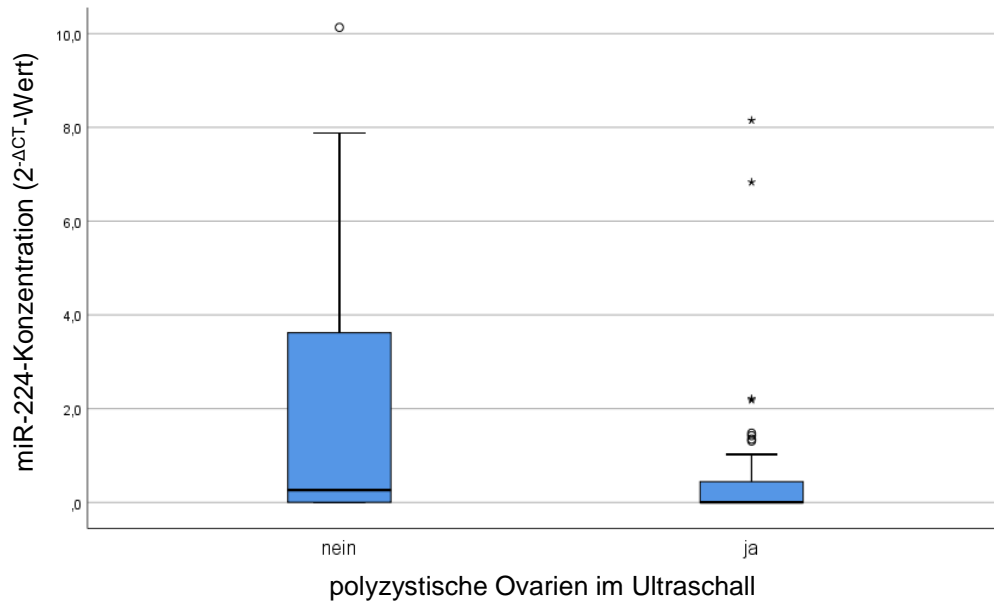
PCOS	miR-27b	miR-126	miR-224	miR-372
p MWU	0,06	0,037	0,007	0,007



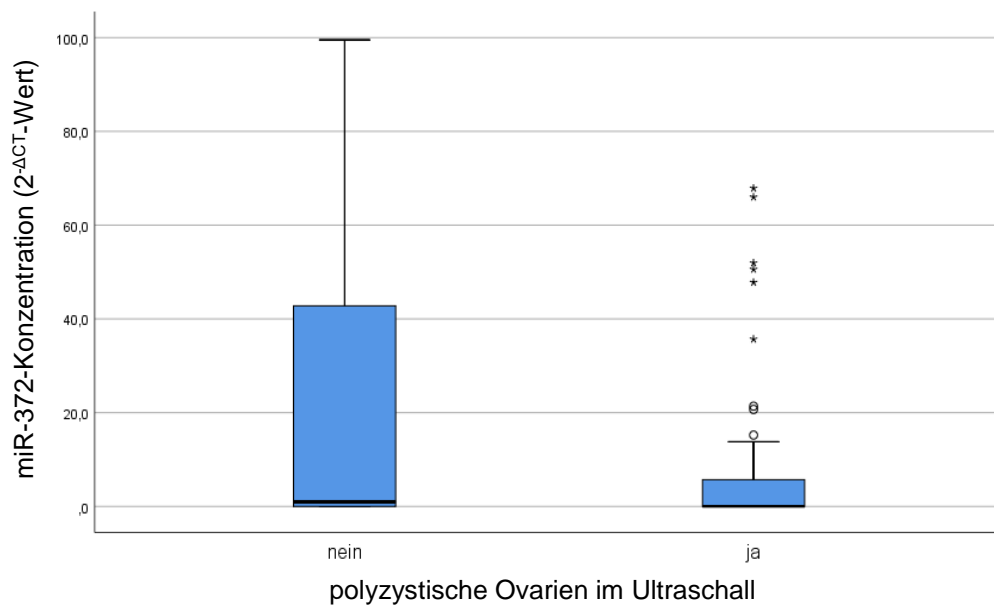
14



15



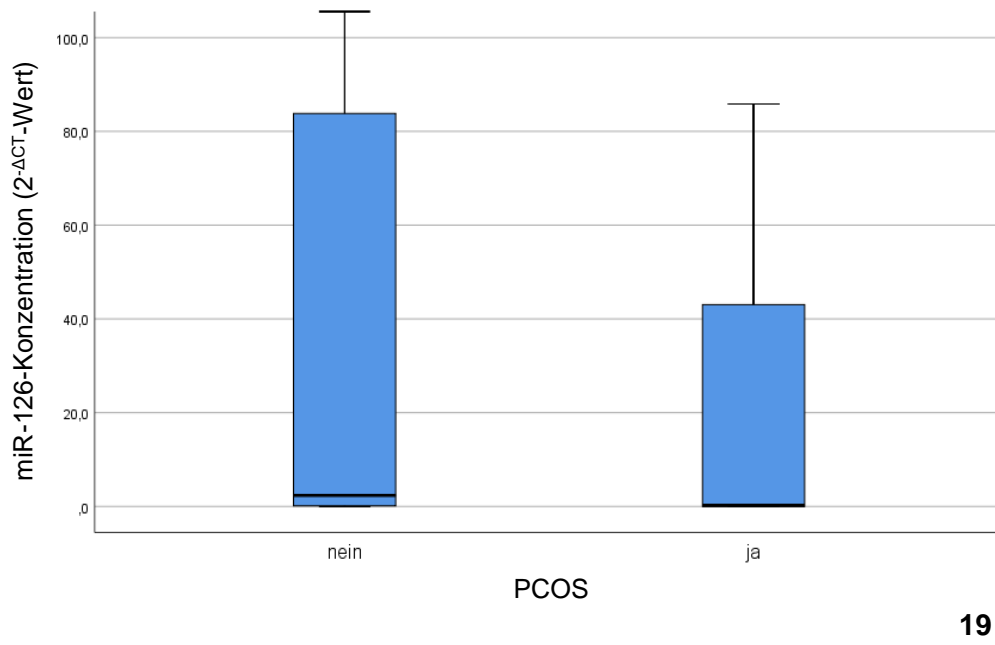
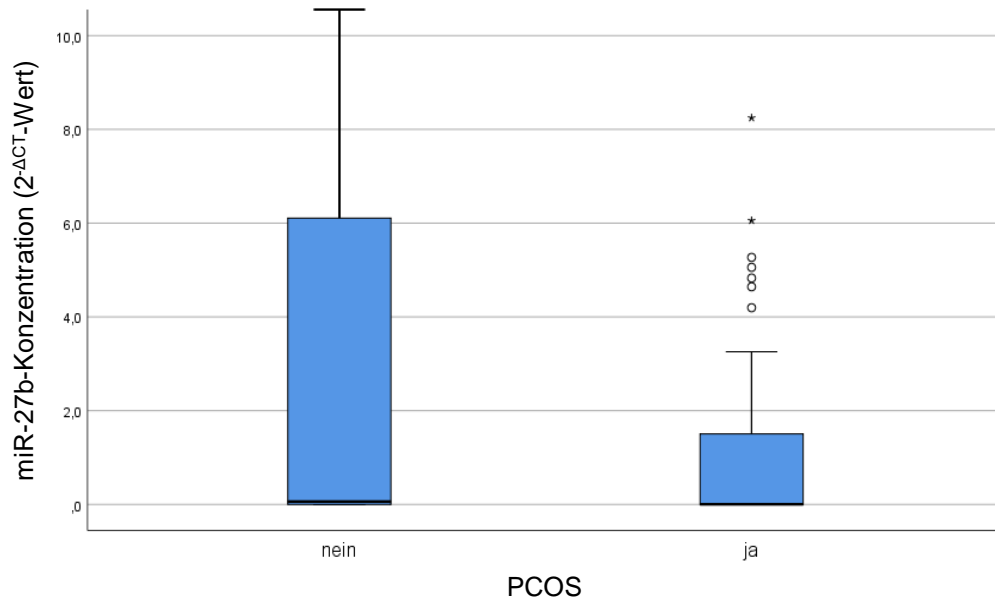
16

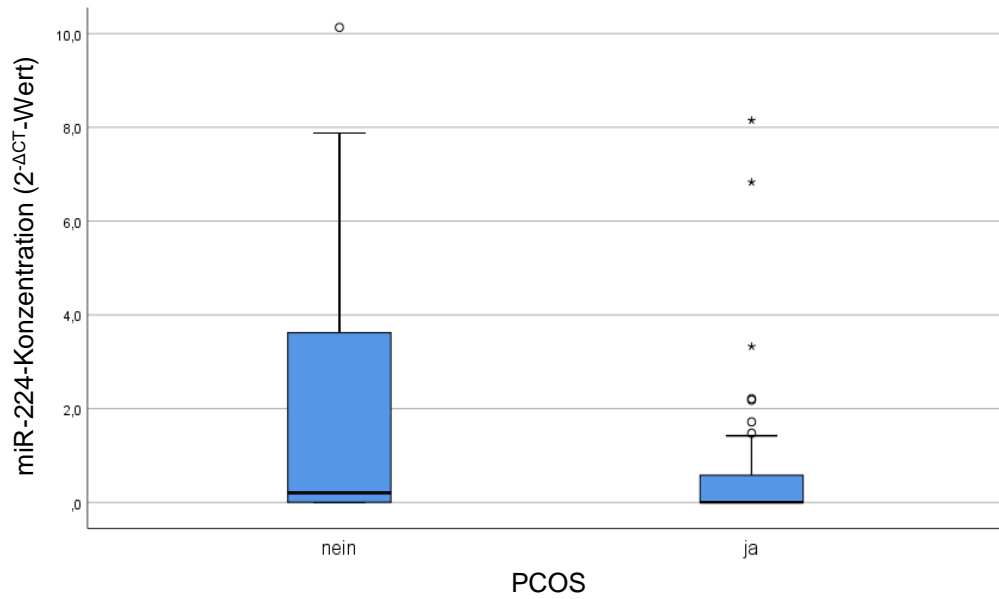


17

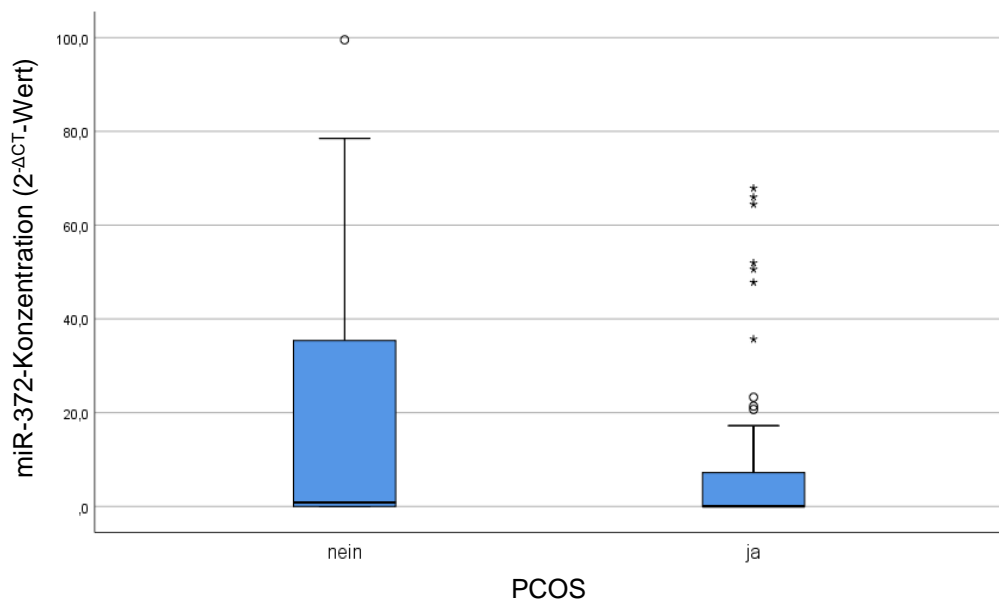
Abbildung 14, 15, 16, 17 Box-Plots der Serumkonzentrationen der vermessenen microRNAs und dem Vorliegen von polyzystischen Ovarien im Ultraschall

4 Ergebnisse





20



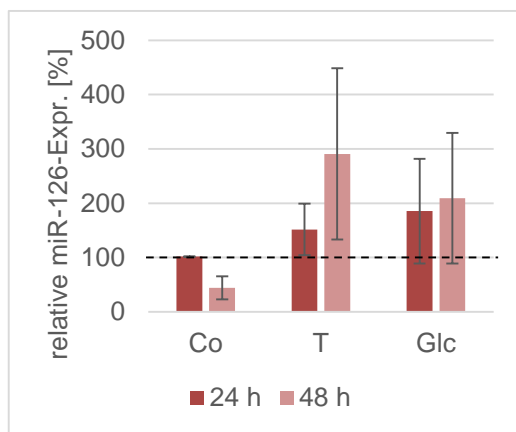
21

Abbildung 18, 19, 20, 21 Box-Plots der Serumkonzentrationen der vermessenen microRNAs und dem Vorliegen der Diagnose „Polyzystisches Ovarsyndrom“

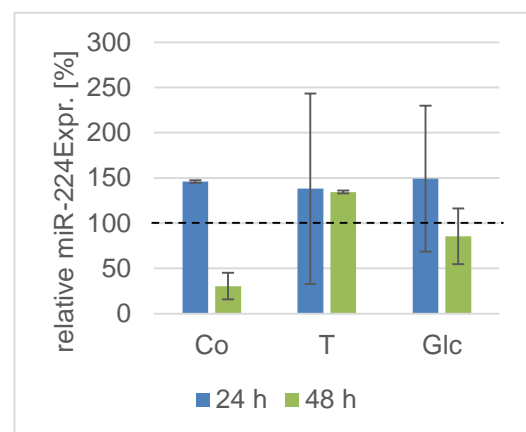
Zusammenfassend zeigt sich, dass die Serumkonzentrationen der 4 microRNAs miR-27b, miR-126, miR-224 und miR-372 mit dem Auftreten von Polyzystischen Ovarien im Ultraschall signifikant korrelieren (s. Abb. 14-17). Zudem korrelieren - mit Ausnahme der miR-27b - die Serumkonzentrationen der analysierten microRNAs mit der Diagnose „Polyzystisches Ovarsyndrom“ (s. Abb. 18-21).

4.2 Effekte der Stimulation mit Testosteron oder Glukose auf die microRNA-Expression

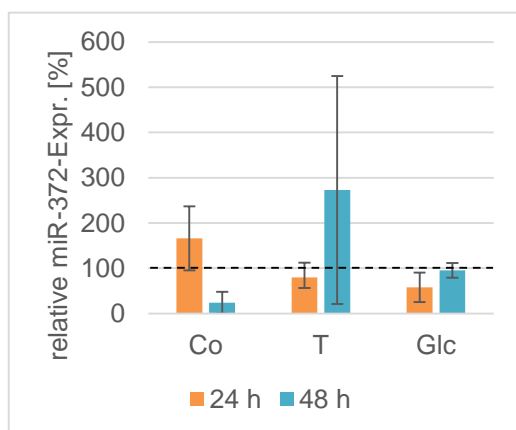
Um zu überprüfen, ob der bei PCOS betroffenen Frauen veränderte Hormonhaushalt - allem voran der Hyperandrogenismus und die Hyperglykämie - Auswirkungen auf die Expression der analysierten microRNAs in Granulosazellen haben könnte, wurden Zellversuche durchgeführt. Es wurden die Expression der microRNAs miR-23a, miR-27b, miR-126, miR-224 und miR-372 nach Stimulation der Zelllinien COV434 und KGN mit definierten Konzentrationen Testosteron und Glukose für 24 und 48 h in der qPCR vermessen.



22



23

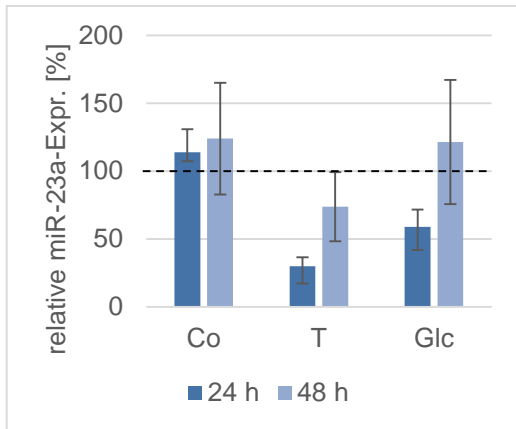


24

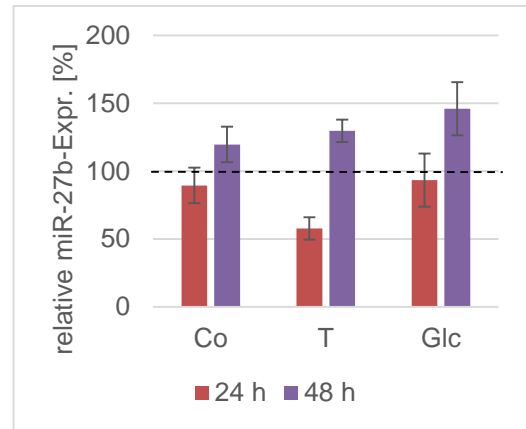
Abbildung 22, 23, 24 Darstellung der relativen Expression der microRNAs miR-126, miR-224 und miR-372 in der Zelllinie KGN in Abhängigkeit von einer Testosteron- oder Glukose-Stimulation (Co = DMSO-behandelte Kontrolle, T = Behandlung mit 50 nM Testosteron, Glc = Behandlung mit 25 mM Glukose); $p < 0,05$, t-Test, $n = 3$

4 Ergebnisse

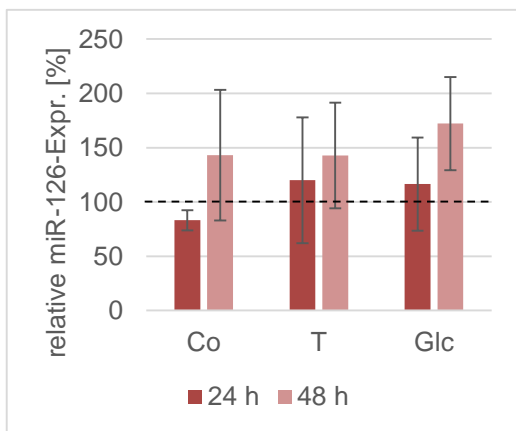
Unter Inkubation mit 50 nM Testosteron oder 25 mM Glukose zeigte sich in der Zelllinie KGN eine leichte Tendenz der Zunahme der Expression der microRNAs miR-126 und miR-372 mit der Länge der Testosteronbehandlung. Die Durchführung des t-Tests ergab keine Signifikanz gegenüber der DMSO-behandelten Kontrolle. Die Behandlung mit Glukose in der Zelllinie KGN ergab keinen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrolle (s. Abb. 22-24).



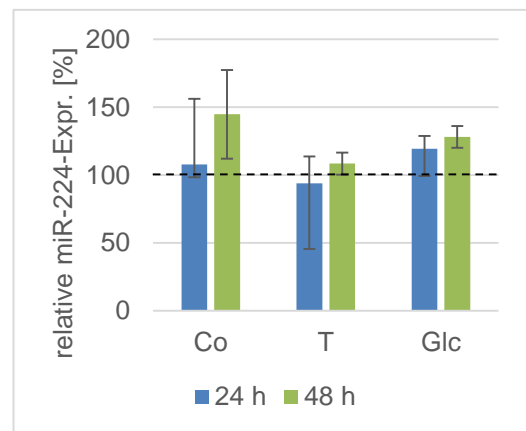
25



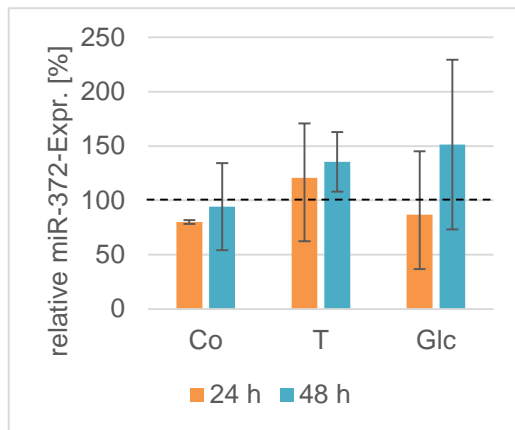
26



27



28



29

Abbildung 25, 26, 27, 28, 29 Darstellung der relativen Expression der microRNAs miR-23a, miR-27b, miR-126, miR-224 und miR-372 in der Zelllinie COV434 (Co = DMSO-behandelte Kontrolle, T = Behandlung mit 50 nM Testosteron, Glc = Behandlung mit 25 mM Glukose); $p < 0,05$, t-Test, $n = 3$

In der Zelllinie COV434 konnte sowohl durch die Behandlung mit Testosteron, als auch Glukose kein signifikanter Unterschied in der Expression der analysierten microRNAs gegenüber der Kontrolle festgestellt werden (s. Abb. 25-29).

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die Behandlung der Zelllinien COV434 und KGN mit Testosteron oder Glukose gegenüber den DMSO-behandelten Kontrollen keine Unterschiede in der Expression der microRNAs miR-23a, miR-27b, miR-126, miR-224 und miR-372 aufweisen.

4.3 Dualer Luziferasereporterassay

Da für die microRNA miR-23a bereits mögliche regulatorische Eigenschaften für die Funktion von Granulosazellen beschrieben wurden, sollte diese microRNA in einem dualen Luziferasereporterassay auf potenzielle Zielgene untersucht werden (Luo et al., 2019). Aus einer Vielzahl von zu untersuchenden Zielgenen fiel die Auswahl auf die beiden Gene Östrogenrezeptor α (ER α) und Progesteronrezeptor (PR).

Tabelle 11 Zusammenstellung einiger in-silico Zielgene der miR-23a

Gen	Name	Context score ++	Total sites in 3'UTR	in früheren TargetScan-Versionen
CLDN14	claudin14	-0,44	1	ja
ESR1	estrogen receptor alpha	-0,36	2	ja
PGRMC2	progesterone receptor membrane component 2	-0,33	1	ja
PRDM10	PR domain containing 10	-0,2	1	ja
PGR	progesterone receptor	-0,02	1	ja

Es wurden Plasmide erzeugt, welche die entsprechenden 3'UTR Regionen der Gene ER α und PR sowie das Luziferase-Reporter gen enthielten. Kommt es zur Bindung der microRNA miR-23a an den 3'UTR Bereich, so folgt die Spaltung der fusionierten mRNA mit daraus resultierender Abnahme des Lumineszenzsignals durch das Luziferase-Reporter gen.

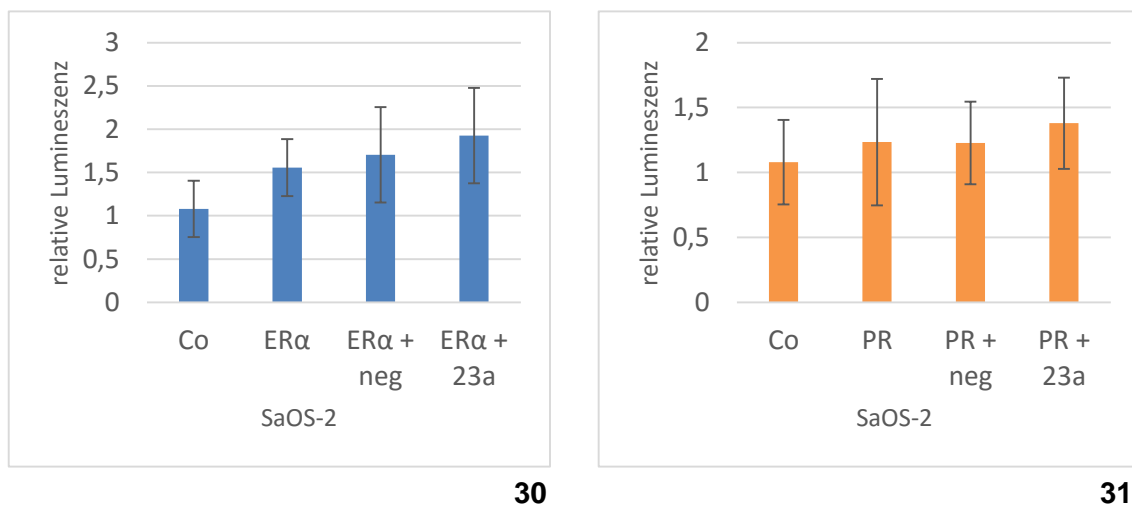


Abbildung 30, 31 Dualer Luziferasereporterassay (Co = DMSO-Kontrolle, ER α + neg = negativ mimic)

Die relative Lumineszenz durch die microRNA miR-23a zeigt gegenüber den Kontrollen beider zu überprüfender Gene keine signifikante Abnahme (s. Abb. 30, 31).

Die beiden Gene Östrogenrezeptor α und Progesteronrezeptor konnten mittels dualem Luziferasereporterassay folglich nicht als Zielgene der microRNA miR-23a verifiziert werden.

4.4 Western Blot

In Zusammenhang mit dem dualen Luziferasereporterassay erfolgte ein Proteinnachweis von ER α und PR nach Transfektion von Granulosakarzinomzelllinien mit miR-23a-mimics im Western Blot, um ER α und PR als mögliche Zielgene der microRNA miR-23a nachzuweisen. Nach 24-, 48- und 72-stündiger Behandlung der Zelllinien COV434 und KGN erfolgte die Proteinisolierung. Der Nachweis des Gens ER α erfolgte mit dem Primärantikörper Östrogenrezeptor α (ER α) aus der Maus (1:5000) und dem Sekundärantikörper Anti-Maus IgM aus dem Kaninchen (1:10000). Die zu erwartende Bandengröße zum Nachweis des ER α wurde vom Hersteller mit etwa 67 kDa angegeben. Der Primärantikörper Progesteronrezeptor (PR) aus dem Kaninchen (1:1000) diente für den Nachweis des Gens PR. Als sekundärer Antikörper wurde Anti-Kaninchen IgG aus der Ziege (1:10000) verwendet. Hier sind zwei angegebene Bandengrößen zum Nachweis von PR bei etwa 94 kDa und bei etwa 114 kDa beschrieben.

Eine Färbung mit Ponceau S zur reversiblen Anfärbung der auf der Membran gebundenen Proteine wurde durchgeführt. Mit β -Actin aus der Maus (1:15000) erfolgte die Ladekontrolle.

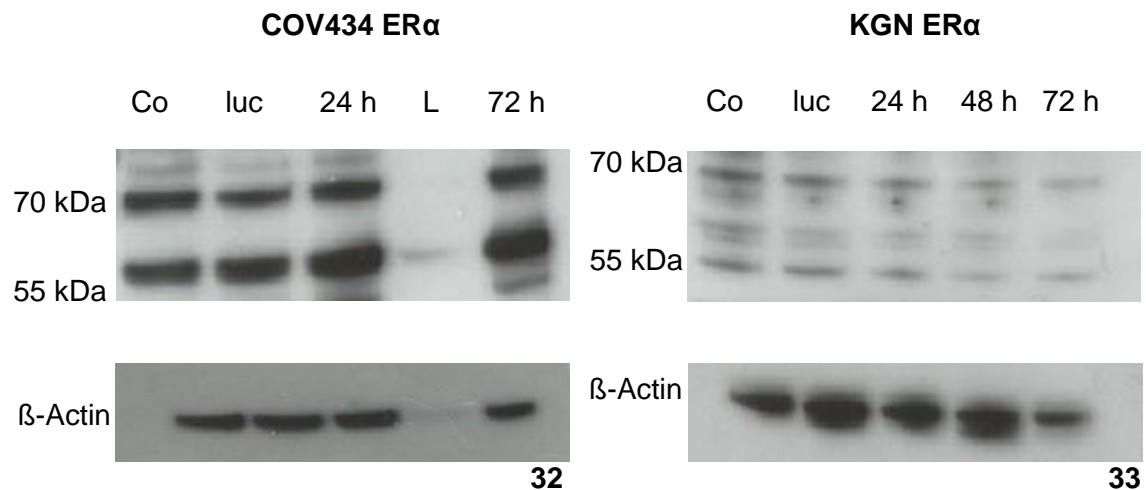


Abbildung 32, 33 Western Blot zum Nachweis des ER α -Protein; Co = DMSO-Kontrolle; luc = Negativinhibitor Luc siRNA; 24, 48 und 72 h = Zeitwerte der miR-23a Behandlung; L = leer

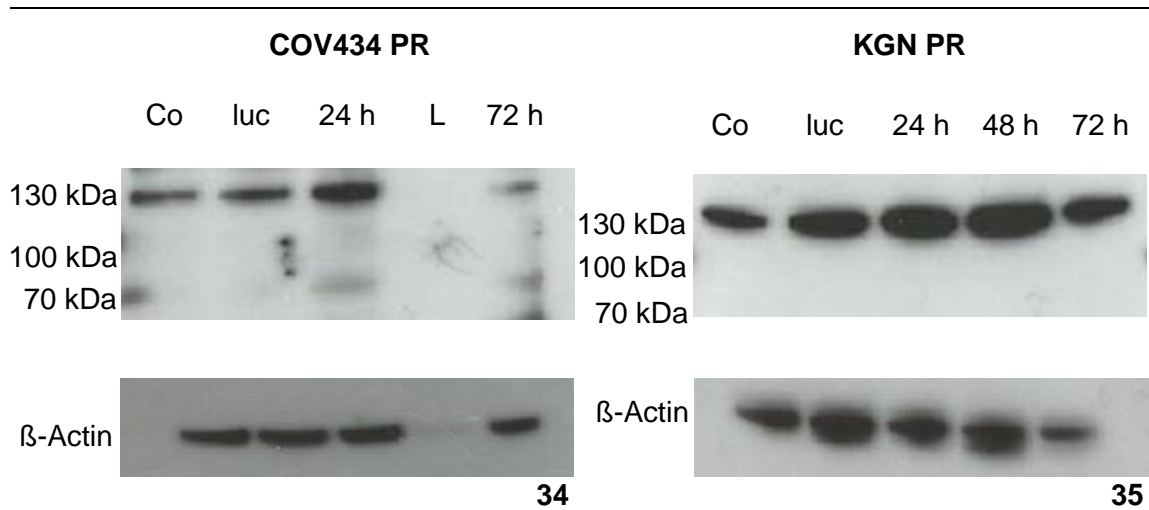


Abbildung 34, 35 Western Blot zum Nachweis des PR-Protein in den Zelllinien COV434 und KGN; Co = DMSO-Kontrolle; luc = Negativinhibitor Luc siRNA; 24, 48 und 72 h = Zeitwerte der miR-23a Behandlung; L = leer

Es konnte gegenüber den Kontrollen in beiden Zelllinien keine signifikante Verringerung des ER α - und PR-Proteins nach Transfektion der Zellen mit miR-23a-mimics festgestellt werden (s. Abb. 32-35).

Zusammenfassend konnten auch im Western Blot die beiden Gene ER α und PR nicht als Zielgene der microRNA miR-23a bestätigt werden. Dies ist kongruent zum Ergebnis aus dem dualen Luziferasereporterassay.

5 Diskussion

5.1 Korrelation zwischen microRNA-Konzentrationen und dem Vorliegen eines PCOS

Das Polyzystische Ovarsyndrom ist die häufigste endokrine Störung unter Frauen, charakterisiert durch reproduktive, hormonelle und metabolische Fehlfunktionen (Misso et al., 2012). Die Definition nach den 2003 beschlossenen Rotterdam-Kriterien, bestehend aus (1) A- oder Oligomenorrhoe, (2) Hyperandrogenismus und (3) Polyzystische Ovarien im Ultraschall ist die gebräuchlichste weltweit (Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group, 2004). Es bestehen zahlreiche Begleiterkrankungen, unter welcher vom PCOS betroffene Frauen leiden - allem voran Diabetes mellitus Typ 2, Insulinresistenz, kardiovaskuläre Erkrankungen, chronische Entzündungen sowie viele weitere Nebendiagnosen (McCartney und Marshall, 2016). Somit wird das Polyzystische Ovarsyndrom heutzutage als Systemkrankheit bezeichnet, deren reproduktive und dermatologische Störungen nur den sichtbaren Teil der Erkrankung darstellen (Rocha et al., 2019). Trotz zunehmendem Verständnis in der Pathophysiologie des PCOS gibt es noch keinen Test durch einen geeigneten Marker, der zur einfachen Diagnose der Erkrankung führt. MicroRNAs, welche ubiquitär im menschlichen Körper zu finden sind, nicht nur innerhalb von Zellen, sondern auch in Körperflüssigkeiten, wie beispielsweise dem Serum oder Follikelflüssigkeit, scheinen mögliche Biomarker für einen solchen Test zu sein.

Vor diesem Hintergrund wurde diese Arbeit unter der grundlegenden Frage, ob microRNAs bei Frauen mit PCOS verändert exprimiert werden, verfasst. Es wurden die Konzentrationen der vier microRNAs miR-27b, miR-126, miR-224 und miR-372 im Serum von 201 Frauen mit unerfülltem Kinderwunsch vermessen. Durch bivariate Korrelationsanalysen konnte eine signifikante Korrelation aller untersuchter microRNA-Konzentrationen mit dem Auftreten von polyzystischen Ovarien im Ultraschall festgestellt werden. Außerdem korrelieren die microRNA miR-126-, miR-224- und miR-372-Konzentrationen mit der Diagnose „Polyzystisches Ovarsyndrom“. Die differenzielle Konzentration von zirkulierenden microRNAs bei PCOS gegenüber gesunden Frauen wurde auch von anderen Arbeitsgruppen analysiert. So wurden auch in den Studien von Murri et al., 2013 und Arancio et al., 2018 zirkulierende microRNAs im Blut von 12 bzw. 16 PCOS-Patientinnen vermessen. Beide Gruppen ermittelten eine erhöhte Konzentration der microRNA miR-27b bei Betroffenen (Murri et al., 2013; Arancio et al., 2018). Nach Murri et al., 2013 wurde eine positive Korrelation zwischen der Expression der microRNA miR-27b und Adipositas bei Frauen mit Polyzystischem Ovarsyndrom

beschrieben (Murri et al., 2013). Da die Konzentration der microRNA miR-27b für die Regulation der Cholesterolumöostase und des Fettsäuremetabolismus mitverantwortlich zu sein scheint und in inflammatorische Prozesse, in den Hormonmetabolismus, Adipogenese, Insulinrezeptor-Signalwege sowie viele andere Mechanismen involviert sei, spielt sie möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese des PCOS (Fernández-Hernando et al., 2011; Murri et al., 2013). Die microRNAs miR-126 und miR-224 wurden ebenfalls in Studien untersucht und so konnte in der Arbeitsgruppe von Mao et al., 2018 eine verminderte Konzentration der microRNA miR-126 in den Granulosazellen von 43 vom PCOS betroffenen Frauen ermittelt werden (Mao et al., 2018). Dies belegte auch zuvor die Studie nach Sang et al., 2013, in der ebenfalls eine verminderte Expression der microRNA miR-126 in Microvesikeln und im Überstand aus der Follikelflüssigkeit von 22 PCOS-Patientinnen beschrieben wurde (Sang et al., 2013). Yao et al., 2010 und Yin et al., 2012 untersuchten die Expression der microRNA miR-224 und wiesen ihr eine mögliche Rolle in der Granulosazellproliferation und -funktion während der Follikelreifung zu (Yao et al., 2010; Yin et al., 2012).

Es konnte in dieser Arbeit keine Korrelation zwischen den vier microRNA miR-27b-, miR-126-, miR-224- und miR-372-Konzentrationen und dem Vorliegen eines androgenen Phänotyps bzw. Hyperandrogenismus festgestellt werden. Dem gegenüber steht die Studie von Ali et al., 2016, die eine Androgenabhängigkeit der microRNA miR-27b-Expression beschreiben (Ali et al., 2016). Es konnte bei Frauen mit Brustkrebs eine erhöhte microRNA miR-27b-Konzentration unter Östrogeneinfluss, vermittelt durch den Östrogenrezeptor α , gezeigt werden (Ali et al., 2016). Eine vergleichbare Studie mit vom Polyzystischen Ovarsyndrom betroffenen Frauen existiert bisher nicht. Es kann daher nur darüber spekuliert werden, ob die Androgenabhängigkeit der microRNA miR-27b-Expression möglicherweise spezifisch für das Mammakarzinom ist und somit beim PCOS nicht zu finden ist. Für alle anderen untersuchten microRNAs liegen aktuell keine Studien zum Thema Hyperandrogenismus und Androgenabhängigkeit vor.

Sowohl Serum, als auch Follikelflüssigkeit von Frauen mit Polyzystischem Ovarsyndrom unterscheiden sich hinsichtlich der microRNA-Konzentration von gesunden Frauen (Jiao et al., 2018). Ähnlich groß wie die Vielfalt der veröffentlichten Studien zum Thema microRNA-Expression und PCOS ist auch die Varianz der Ergebnisse. So werden nicht nur unterschiedliche microRNAs in ihren Konzentrationen als differenziell exprimiert bei Patientinnen mit PCOS beschrieben, sondern auch verschiedene Voraussetzungen zur Durchführung der Studien festgelegt. Es stehen Arbeiten zur Untersuchung von microRNA-Konzentrationen aus Serumproben denen zur Untersuchung von microRNA-Konzentrationen aus Follikelflüssigkeit gegenüber. Weiterhin differiert die

Studienpopulation. Mit einer Anzahl von 201 Frauen konnte im Zuge dieser Arbeit ein großes Kollektiv untersucht werden. Überdies wurden in einigen Arbeitsgruppen die PCOS betroffenen Frauen allein nach den Rotterdam-Kriterien ausgewählt, andere Arbeitsgruppen hingegen definierten noch zusätzliche Ausschlusskriterien, wie Adipositas, Nebendiagnosen, wie Diabetes mellitus Typ 2 oder Insulinresistenz sowie bestimmte Altersgruppen. Da zirkulierende microRNAs eine geringe interindividuelle Variabilität zu haben scheinen, wären sie ein geeigneter Marker, um zwischen PCOS-Patientinnen und gesunden Frauen zu unterscheiden (Sørensen et al., 2019). Es sind allerdings zukünftig neben den vorhandenen *in vitro* Studien noch mehr *in vivo* Studien nötig, um die Expression von microRNAs unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen (O'Brien et al., 2018).

5.2 Effekte der Stimulation von Granulosakarzinomzelllinien mit Glukose oder Testosteron auf die microRNA-Expression

Nach Vermessung der ausgewählten microRNAs im Serum von Kinderwunschpatientinnen folgten Zellversuche. Eine Vielzahl von Begleiterkrankungen prägen das Polyzystische Ovarsyndrom maßgeblich. Diabetes mellitus Typ 2 und Hyperandrogenismus sind die dabei am häufigsten beschriebenen und untersuchten Störungen. Es stellt sich folglich die Frage, ob microRNAs unter dem Einfluss des bei PCOS-Patientinnen veränderten Metabolismus und Hormonhaushaltes differenziell exprimiert werden. Zur Prüfung dieser These wurden sowohl die vier bereits im Serum vermessenen microRNAs miR-27b, miR-126, miR-224 und miR-372, als auch zusätzlich die PCOS-assoziierte microRNA miR-23a ausgewählt. Mittels Zellversuchen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Behandlung der Zellen mit Testosteron und Glukose mit nachfolgender Bestimmung der microRNA-Expression.

Durch die Behandlung mit Testosteron konnte im Zellversuch keine Korrelation zwischen Testosteron und den ausgewählten microRNA-Konzentrationen festgestellt werden. Die microRNA miR-23a wird unter anderem als regulatorische microRNA mit apoptotischer Wirkung auf Granulosazellen beschrieben (Luo et al., 2019). Darüber hinaus ist die inhibitorische Wirkung der microRNA miR-23a beim Endometriumkarzinom in der Arbeit von Li et al., 2019 dargelegt (Li et al., 2019). Die Arbeitsgruppe von Xiong et al. konnte eine verminderte microRNA miR-23a-Konzentration im Serum sowie eine positive Korrelation zum BMI von PCOS-Patientinnen feststellen (Xiong et al., 2017). Sie beschrieben ebenso eine im Vergleich zu gesunden Frauen 4-fach erhöhte Serum-Testosteronkonzentration (Xiong et al., 2017). Es konnte unter Xiong et al. ebenfalls keine Korrelation zwischen Testosteron und der microRNA miR-23a-Expression

bestätigt werden. Die microRNA miR-27b-Konzentration ist, wie bereits im vorhergehenden Kapitel beschrieben, in ihrer Androgenabhängigkeit nur bei Brustkrebspatientinnen beschrieben (Ali et al., 2016). Für die microRNAs miR-126, miR-224 und miR-372 liegen keine Studien zur Konzentrationsabhängigkeit unter Testosteroneinfluss vor.

Unter Behandlung mit Glukose konnte ebenfalls keine signifikante Veränderung der Expression der microRNAs miR-23a, miR-27b, miR-126, miR-224 und miR-372 festgestellt werden. Auf der anderen Seite steht die Arbeit von Yang et al., 2014, welche im Serum von 44 Diabetes Typ 2- und Prädiabetes-Patienten eine verminderte Konzentration der microRNA miR-23a nachweisen konnten (Yang et al., 2014). Eine ähnliche Vermessung von microRNAs in Blutproben führte die Arbeitsgruppe von Zampetaki et al., 2010 durch. Sie ermittelten eine niedrigere Konzentration der microRNA miR-126 im Blut von 80 Diabetes-Patienten (Zampetaki et al., 2010). Weiterhin ermittelten sie in humanen Endothelzellen unter Einfluss von 25 mM Glukose eine Reduktion der microRNA miR-126-Expression (Zampetaki et al., 2010). Dies entspricht der selben wie auch in dieser Arbeit festgelegten Glukosemenge. Allerdings differiert die Behandlungsdauer, welche unter Zampetaki et al. mit insgesamt 6 Tagen doppelt so hoch liegt, wie die für diese Arbeit festgelegte Behandlungsdauer. Außerdem erfolgte die Auswahl unterschiedlicher Zellkulturen, was neben der längeren Behandlungsdauer möglicherweise zu unterschiedlichen Ergebnissen in der microRNA-Expression führte. Wie auch für die Expression der analysierten microRNAs unter Testosteroneinfluss ist auch die Studienlage unter Glukoseeinfluss unzureichend.

Diese unterschiedlichen Ergebnisse in der Untersuchung der Expression der microRNAs unter Testosteron- und Glukoseeinfluss lassen darauf schließen, dass weitere Experimente unter längerer Behandlungsdauer nötig sind. Eine Durchführung der Behandlung in weiteren PCOS-relevanten Zelllinien sollte zur objektiven Betrachtung der microRNA-Konzentrationen ebenfalls erfolgen.

5.3 Zielgene der microRNA miR-23a

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit bezog sich auf mögliche Zielgene der PCOS-assoziierten microRNA miR-23a. Es ist bekannt, dass microRNAs Einfluss auf verschiedene für die Pathogenese des PCOS relevante Gene haben. Da bisher noch keine Studie zu möglichen Zielgenen der microRNA miR-23a bei Frauen mit Polyzystischem Ovarsyndrom veröffentlicht wurde, sollten in dieser Arbeit zwei Gene untersucht werden. Mit Hilfe bioinformatischer Tools erfolgten Recherchen und eine

Zusammenstellung von Genen, welche durch die microRNA miR-23a-Expression beeinflusst werden könnten. Unter diesen fiel die Auswahl auf die beiden Gene Östrogenrezeptor α und Progesteronrezeptor. In zweierlei Versuchsreihen, dualer Luziferasereporterassay und Western Blot, erfolgte die Untersuchung beider möglicher Zielgene.

Es ist inzwischen bekannt, dass bei Frauen mit Polyzystischem Ovarsyndrom gegenüber gesunden Frauen eine vermehrte mRNA- sowie daraus resultierend erhöhte Proteinexpression von Progesteronrezeptoren vorliegt (Hu et al., 2018). Endometriale Progesteronresistenz einhergehend mit einer Proliferation des Endometriums und einem gestörten Zyklus, der vor allem durch Anovulation gekennzeichnet ist, sind neben anderen die Leitsymptome des PCOS (Li et al., 2014). Der Progesteronrezeptor scheint in der Pathogenese des Syndroms eine zentrale Rolle einzunehmen und sollte daher durch diese Arbeit hinsichtlich einer Korrelation zur microRNA miR-23a-Expression überprüft werden.

Ebenso vielfach beschrieben ist die erhöhte Expression und veränderte Funktion von Östrogenrezeptoren im Endometrium von PCOS-Patientinnen. Tang et al., 2019 beschreiben in ihrem Review auch den Zusammenhang beider Rezeptoren - durch den aktivierten Östrogenrezeptor α kommt es zur vermehrten Expression des Progesteronrezeptors und im Gegenzug wird durch Progesteron die Synthese von Östrogenrezeptoren gehemmt (Tang et al., 2019). Die gesteigerte Aktivität des Östrogenrezeptors α resultiert in einer übermäßigen Proliferation des Endometriums, welche sich negativ auf die Fertilität auswirkt (Gregory et al., 2006). Eine ähnliche Schlüsselrolle vermittelt scheinbar auch der Östrogenrezeptor α im Hinblick auf die Erkrankung PCOS und sollte als zweites mögliches Zielgen der microRNA miR-23a im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Sowohl im dualen Luziferasereporterassay, als auch im Western Blot konnte zwischen dem Gen Östrogenrezeptor α und der Konzentration der microRNA miR-23a keine signifikante Korrelation festgestellt werden. Durch Assou et al., 2013 wurden Cumuluszellen, welche die Eizelle umgeben, wichtige nutritive Funktionen erfüllen sowie an der Eizellreifung beteiligt sind, untersucht. Es konnte in humanen Cumuluszellkulturen eine erhöhte Expression der microRNA miR-23a mit daraus resultierender verminderter mRNA-Konzentration des Enzyms Aromatase (*CYP19A1*) festgestellt werden (Assou et al., 2013). Laut Shen et al. konnte nicht nur eine verminderte Expression der microRNA miR-23a im Endometrium von 23 Frauen mit Endometriose ermittelt werden, sondern auch deren repressiver Einfluss auf den

Steroid-Faktor-1 (SF-1), welcher eine wichtige Funktion im Östrogen-Signalweg einnimmt (Shen et al., 2013). Die microRNA miR-23a scheint folglich eine mögliche Rolle in der Östrogensynthese sowie im Östrogen-Signalweg zu vermitteln. Zusätzlich zum Einfluss auf Östrogensynthese und -Signalwege scheint nach Maillot et al., 2009 auch die microRNA miR-23a-Expression an sich östrogenvermittelt zu sein (Maillot et al., 2009). Studien zu Korrelationen zwischen der microRNA miR-23a-Expression und Östrogen-Signalwegen beim PCOS sind bisher nicht bekannt. Eine Korrelation der microRNA miR-23a-Konzentration und dem Gen Östrogenrezeptor α ist ebenfalls nicht belegt und konnte auch in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Für das Gen Progesteronrezeptor konnte ebenfalls weder im dualen Luziferasereporterassay, noch im Western Blot eine Korrelation mit der microRNA miR-23a-Konzentration bewiesen werden. Die Arbeitsgruppe unter Gilam et al., 2017 beschreibt in einer Kohorte von 29 Brustkrebspatientinnen eine inverse Korrelation zwischen der microRNA miR-23a-Expression und dem Gen Progesteronrezeptor (Gilam et al., 2017). Die microRNA miR-23a scheint somit ein möglicher negativer Regulator im Progesteronrezeptor-Signalweg bei Brustkrebs zu sein (Gilam et al., 2017). Für das Polyzystische Ovarsyndrom wurde bisher kein Zusammenhang mit dem Gen Progesteronrezeptor beschrieben. In dieser Arbeit konnte ebenfalls keine Korrelation zwischen der Expression der microRNA miR-23a und dem Gen Progesteronrezeptor festgestellt werden.

Obwohl in dieser Arbeit zwei mögliche Zielgene der microRNA miR-23a - zum einen Östrogenrezeptor α und zum anderen Progesteronrezeptor - nicht bestätigt werden konnten, scheint die microRNA miR-23a eine Rolle in der Pathogenese des PCOS einzunehmen. Die Auswahl weiterer möglicher Zielgene und Überprüfung in geeigneten Nachweisverfahren wie dem Western Blot oder dualen Luziferasereporterassay ist nötig, um die microRNA miR-23a-Expression in konkreten Zusammenhang zum Erkrankungsbild des PCOS zu bringen.

6 Zusammenfassung

Mit einem Anteil von etwa 30 % stellt das Polyzystische Ovarsyndrom die häufigste Ursache endokrinologischer Erkrankungen, die zu weiblicher Unfruchtbarkeit führen, dar. Durch die drei Rotterdam-Kriterien (1) A- oder Oligomenorrhoe, (2) Hyperandrogenismus und (3) Polyzystische Ovarien im Ultraschall wird das PCOS bei Vorliegen von zwei dieser Merkmale diagnostiziert. Biochemische Marker zur Diagnosestellung sind bisher nicht bekannt. In sämtlichen Körperflüssigkeiten vorkommende microRNAs könnten solche möglichen diagnostischen Marker sein.

Zielstellung der Arbeit war die Vermessung der Serumkonzentrationen der zirkulierenden microRNAs miR-126, miR-27b, miR-224 und miR-372 bei Frauen mit unerfülltem Kinderwunsch. Zusätzlich wurden *in vitro* Behandlungsversuche von Zellen mit Testosteron und Glukose sowie folgender microRNA-Konzentrationsmessungen durchgeführt. Mittels dualem Luziferasereporterassay und Western Blot sollten potenzielle Zielgene der microRNA miR-23a überprüft werden.

Die Expression der vorab festgelegten microRNAs miR-27b, miR-126, miR-224 und miR-372 wurden durch quantitative Realtime PCR in 201 Serumproben von Kinderwunschpatientinnen vermessen. Um neben den klinischen PCOS-Charakteristika auch die sehr häufige Begleiterkrankung Diabetes mellitus mit in die Forschungsarbeit einzubeziehen, erfolgten Behandlungsversuche der Granulosakarzinomzellen COV434 und KGN mit 50 nM Testosteron und 25 mM Glukose und anschließender Konzentrationsvermessung ebenfalls durch qPCR der microRNAs miR-23a, miR-27b, miR-126, miR-224 und miR-372 nach 24 h, 48 h und 72 h Behandlungszeit. Zur Überprüfung potenzieller Zielgene der microRNA miR-23a sollten die zuvor bestimmten Gene Östrogenrezeptor α (ER α) und Progesteronrezeptor (PR) im dualen Luziferasereporterassay und Western Blot untersucht werden.

Durch Korrelationsanalysen konnte für die Konzentrationen aller vermessenen microRNAs ein signifikanter Zusammenhang mit dem Vorhandensein von polyzystischen Ovarien im Ultraschall sowie für die Konzentrationen der microRNAs miR-126, miR-224 und miR-372 eine signifikante Korrelation mit der Diagnose „Polyzystisches Ovarsyndrom“ belegt werden. Die Behandlungsversuche der Granulosakarzinomzellreihen mit Testosteron und Glukose ergaben keine signifikanten Veränderungen der microRNA-Expression gegenüber unbehandelten Kontrollen. Die beiden Gene ER α und PR konnten weder im dualen Luziferasereporterassay, noch im Western Blot als Zielgene der microRNA miR-23a bestätigt werden.

Um die mit dem PCOS in Zusammenhang gebrachten microRNAs als mögliche biochemische Marker zur Krankheitsdiagnostik bestimmen zu können, sind weitere Forschungsarbeiten nötig.

7 Literaturverzeichnis

Agapova, Sophia; Cameo, Tamara; Sopher, Aviva; Oberfield, Sharon (2014): Diagnosis and Challenges of Polycystic Ovary Syndrome in Adolescence. In: *Semin Reprod Med* 32 (03), S. 194–201. DOI: 10.1055/s-0034-1371091.

Alasiri, S. A.; Ghahremani, M.; McComb, P. F. (2012): Cornual polyps of the fallopian tube are associated with endometriosis and anovulation. In: *Obstetrics and gynecology international* 2012, S. 561306. DOI: 10.1155/2012/561306.

Ali, H. O.; Arroyo, A. B.; González-Conejero, R.; Stavik, B.; Iversen, N.; Sandset, P. M. et al. (2016): The role of microRNA-27a/b and microRNA-494 in estrogen-mediated downregulation of tissue factor pathway inhibitor α . In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 14 (6), S. 1226–1237. DOI: 10.1111/jth.13321.

Arancio, Walter; Calogero Amato, Marco; Magliozzo, Miriam; Pizzolanti, Giuseppe; Vesco, Rosalia; Giordano, Carla (2018): Serum miRNAs in women affected by hyperandrogenic polycystic ovary syndrome: the potential role of miR-155 as a biomarker for monitoring the estroprogestinic treatment. In: *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 34 (8), S. 704–708. DOI: 10.1080/09513590.2018.1428299.

Assou, S.; Al-edani, T.; Haouzi, D.; Philippe, N.; Lecellier, C-H; Piquemal, D. et al. (2013): MicroRNAs: new candidates for the regulation of the human cumulus-oocyte complex. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 28 (11), S. 3038–3049. DOI: 10.1093/humrep/det321.

Azziz, Ricardo; Dumesic, Daniel A.; Goodarzi, Mark O. (2011): Polycystic ovary syndrome. An ancient disorder? In: *Fertility and Sterility* 95 (5), S. 1544–1548. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2010.09.032.

Balen, Adam H.; Morley, Lara C.; Misso, Marie; Franks, Stephen; Legro, Richard S.; Wijeyaratne, Chandrika N. et al. (2016): The management of anovulatory infertility in women with polycystic ovary syndrome: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance. In: *Human Reproduction Update* 22 (6), S. 687–708. DOI: 10.1093/humupd/dmw025.

Bartel, D. P. (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. In: *Cell*. 116(2), S: 281-297. doi:10.1016/s0092-8674(04)00045-5.

Barthelmess, Erin K.; Naz Rajesh K. (2015): Polycystic ovary syndrome: current status and future perspective. In: *Front Biosci (Elite Ed)* 6, S. 104–119. DOI: 10.2741/e695.

Bidhendi Yarandi, Razieh; Behboudi-Gandevani, Samira; Amiri, Mina; Ramezani Tehrani, Fahimeh (2019): Metformin therapy before conception versus throughout the pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus in women with polycystic ovary syndrome: a systemic review, meta-analysis and meta-regression. In: *Diabetology & metabolic syndrome* 11, S. 58. DOI: 10.1186/s13098-019-0453-7.

Bliss, Stuart P.; Navratil, Amy M.; Xie, Jianjun; Roberson, Mark S. (2010): GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. In: *Frontiers in neuroendocrinology* 31 (3), S. 322–340. DOI: 10.1016/j.yfrne.2010.04.002.

- Blumenauer V, Czeromin U, Fehr D, Fiedler K, Gnoth C Krüssel JS, Kupka MS, Ott A, Tandler-Schneider A (2018): D.I.R-Annual 2017. In: *J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2018*; 15 (5-6), S. 216-249
- Butler, Alexandra E.; Ramachandran, Vimal; Hayat, Shahina; Dargham, Soha R.; Cunningham, Thomas Keith; Benurwar, Manasi et al. (2019): Expression of microRNA in follicular fluid in women with and without PCOS. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 16306. DOI: 10.1038/s41598-019-52856-5.
- Charifson, Mia A.; Trumble, Benjamin C. (2019): Evolutionary origins of polycystic ovary syndrome: An environmental mismatch disorder. In: *Evolution, medicine, and public health* 2019 (1), S. 50–63. DOI: 10.1093/emph/eoz011.
- Cortez, Maria Angelica; Bueso-Ramos, Carlos; Ferdin, Jana; Lopez-Berestein, Gabriel; Sood, Anil K.; Calin, George A. (2011): MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. In: *Nat Rev Clin Oncol* 8 (8), S. 467–477. DOI: 10.1038/nrclinonc.2011.76.
- Costello, Michael F.; Ledger, William L. (2012): Evidence-based management of infertility in women with polycystic ovary syndrome using surgery or assisted reproductive technology. In: *Women's health (London, England)* 8 (3), S. 291–300. DOI: 10.2217/whe.12.7.
- Duleba, Antoni J. (2012): Medical management of metabolic dysfunction in PCOS. In: *Steroids* 77 (4), S. 306–311. DOI: 10.1016/j.steroids.2011.11.014.
- Dumesic, Daniel A.; Oberfield, Sharon E.; Stener-Victorin, Elisabet; Marshall, John C.; Laven, Joop S.; Legro, Richard S. (2015): Scientific Statement on the Diagnostic Criteria, Epidemiology, Pathophysiology, and Molecular Genetics of Polycystic Ovary Syndrome. In: *Endocrine reviews* 36 (5), S. 487–525. DOI: 10.1210/er.2015-1018.
- Escobar-Morreale, Héctor F. (2018): Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment. In: *Nature reviews. Endocrinology* 14 (5), S. 270–284. DOI: 10.1038/nrendo.2018.24.
- Farquhar, Cynthia M (2000): Endometriosis. In: *British Medical Journal* 320, S. 1449–1452. DOI: 10.1136/bmj.320.7247.1449.
- Fernández-Hernando, Carlos; Suárez, Yajaira; Rayner, Katey J.; Moore, Kathryn J. (2011): MicroRNAs in lipid metabolism. In: *Current opinion in lipidology* 22 (2), S. 86–92. DOI: 10.1097/MOL.0b013e3283428d9d.
- Gilam, A.; Shai, A.; Ashkenazi, I.; Sarid, L. A.; Drobot, A.; Bickel, A.; Shomron, N. (2017): MicroRNA regulation of progesterone receptor in breast cancer. In: *Oncotarget*, 8(16), S. 25963–25976. DOI: 10.18632/oncotarget.15657.
- Gregory, C. W.; Wilson, E. M.; Apparao, K. B.; Lininger, R. A.; Meyer, W. A.; Kowalik, A.; Fritz, M. A.; Lessey, B. A. (2002): Steroid receptor coactivator expression throughout the menstrual cycle in normal and abnormal endometrium. In: *J Clin Endocrinol Metab.* 87(6), S. 2960-2966. DOI: 10.1210/jcem.87.6.8572.
- Gul, Sarah S.; Huesgen, Karl; Wang, Kevin K.; Tyndall, Joseph A. (2017): MicroRNAs as potential prognosticators of neurological outcome in out-of-hospital cardiac arrest patients. In: *Biomarkers in medicine* 11 (12), S. 1113–1123. DOI: 10.2217/bmm-2017-0215.

- Gurunath, S.; Pandian, Z.; Anderson, Richard A.; Bhattacharya, Siladitya (2011): Defining infertility--a systematic review of prevalence studies. In: *Human Reproduction Update* 17 (5), S. 575–588. DOI: 10.1093/humupd/dmr015.
- Herrera-Carrillo, Elena; Berkhout, Ben (2017): Dicer-independent processing of small RNA duplexes: mechanistic insights and applications. In: *Nucleic acids research* 45 (18), S. 10369–10379. DOI: 10.1093/nar/gkx779.
- Homburg, Roy (2002): What is polycystic ovarian syndrome? A proposal for a consensus on the definition and diagnosis of polycystic ovarian syndrome. In: *Hum Reprod.* 17(10), S. 2495-2499. doi:10.1093/humrep/17.10.2495.
- Hu, Min; Li, Juan; Zhang, Yuehui; Li, Xin; Brännström, Mats; Shao, Linus R.; Billig, Håkan (2018): Endometrial progesterone receptor isoforms in women with polycystic ovary syndrome. In: *Am J Transl Res* 10(8), S. 2696-2705.
- Izzo, Carlos Roberto; Monteleone, Pedro Augusto Araujo; Serafini, Paulo C. (2015): Human reproduction: current status. In: *Revista da Associacao Medica Brasileira (1992)* 61 (6), S. 557–559. DOI: 10.1590/1806-9282.61.06.557.
- Jiao, Jiao; Shi, Bei; Wang, Tianren; Fang, Yuanyuan; Cao, Tiefeng; Zhou, Yiming et al. (2018): Characterization of long non-coding RNA and messenger RNA profiles in follicular fluid from mature and immature ovarian follicles of healthy women and women with polycystic ovary syndrome. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 33 (9), S. 1735–1748. DOI: 10.1093/humrep/dey255.
- Krug, Isabel; Giles, Sarah; Paganini, Chiara (2019): Binge eating in patients with polycystic ovary syndrome: prevalence, causes, and management strategies. In: *Neuropsychiatric disease and treatment* 15, S. 1273–1285. DOI: 10.2147/NDT.S168944.
- Li, Hong-Lin; Sun, Jun-Jie; Ma, Hui; Liu, Shen-Jia; Li, Na; Guo, Su-Jie et al. (2019a): MicroRNA-23a inhibits endometrial cancer cell development by targeting SIX1. In: *Oncology letters* 18 (4), S. 3792–3802. DOI: 10.3892/ol.2019.10694.
- Li, X.; Feng, Y.; Lin, J. F.; Billig, H.; Shao, R. (2014): Endometrial progesterone resistance and PCOS. In: *J Biomed Sci.* 2014 Jan 9 21(1), 2. DOI: 10.1186/1423-0127-21-2.
- Li, Yan; Chen, Changye; Ma, Yan; Xiao, Jiao; Luo, Guifang; Li, Yukun; Wu, Daichao (2019b): Multi-system reproductive metabolic disorder: significance for the pathogenesis and therapy of polycystic ovary syndrome (PCOS). In: *Life sciences* 228, S. 167–175. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.04.046.
- Luo, Haining; Han, Ying; Liu, Jiao; Zhang, Yunshan (2019): Identification of microRNAs in granulosa cells from patients with different levels of ovarian reserve function and the potential regulatory function of miR-23a in granulosa cell apoptosis. In: *Gene* 686, S. 250–260. DOI: 10.1016/j.gene.2018.11.025.
- Madnani, Nina; Khan, Kaleem; Chauhan, Phulrenu; Parmar, Girish (2013): Polycystic ovarian syndrome. In: *Indian journal of dermatology, venereology and leprology* 79 (3), S. 310–321. DOI: 10.4103/0378-6323.110759.
- Maillot, Gérard; Lacroix-Triki, Magali; Pierredon, Sandra; Gratadou, Lise; Schmidt, Sabine; Bénès, Vladimir et al. (2009): Widespread estrogen-dependent repression of

micrnas involved in breast tumor cell growth. In: *Cancer research* 69 (21), S. 8332–8340. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2206.

Mao, Zenghui; Fan, Liqing; Yu, Qiao; Luo, Shuwei; Wu, Xianling; Tang, Jun et al. (2018): Abnormality of Klotho Signaling Is Involved in Polycystic Ovary Syndrome. In: *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 25 (3), S. 372–383. DOI: 10.1177/1933719117715129.

McCartney, Christopher R.; Marshall, John C. (2016): CLINICAL PRACTICE. Polycystic Ovary Syndrome. In: *The New England journal of medicine* 375 (1), S. 54–64. DOI: 10.1056/NEJMcp1514916.

Misso, Marie L.; Wong, Jennifer L. A.; Teede, Helena J.; Hart, Roger; Rombauts, Luk; Melder, Angela M. et al. (2012): Aromatase inhibitors for PCOS: a systematic review and meta-analysis. In: *Human Reproduction Update* 18 (3), S. 301–312. DOI: 10.1093/humupd/dms003.

Moran, L.; Teede, H. (2009): Metabolic features of the reproductive phenotypes of polycystic ovary syndrome. In: *Human Reproduction Update* 15 (4), S. 477–488. DOI: 10.1093/humupd/dmp008.

Morley, Lara C.; Tang, Thomas; Yasmin, Ephia; Norman, Robert J.; Balen, Adam H. (2017): Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility. In: *The Cochrane database of systematic reviews* 11, S. CD003053. DOI: 10.1002/14651858.CD003053.pub6.

Murri, Mora; Insenser, María; Fernández-Durán, Elena; San-Millán, José L.; Escobar-Morreale, Héctor F. (2013): Effects of polycystic ovary syndrome (PCOS), sex hormones, and obesity on circulating miRNA-21, miRNA-27b, miRNA-103, and miRNA-155 expression. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 98 (11), S. E1835–44. DOI: 10.1210/jc.2013-2218.

Murri, Mora; Insenser, María; Fernández-Durán, Elena; San-Millán, José L.; Luque-Ramírez, Manuel; Escobar-Morreale, Héctor F. (2018): Non-targeted profiling of circulating microRNAs in women with polycystic ovary syndrome (PCOS): effects of obesity and sex hormones. In: *Metabolism: clinical and experimental*. DOI: 10.1016/j.metabol.2018.01.011.

Naderpoor, Negar; Shorakae, Soulmaz; Courten, Barbora de; Misso, Marie L.; Moran, Lisa J.; Teede, Helena J. (2015): Metformin and lifestyle modification in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. In: *Human Reproduction Update* 21 (5), S. 560–574. DOI: 10.1093/humupd/dmv025.

Neven, Adriana Catharina Helena; Laven, Joop; Teede, Helena J.; Boyle, Jacqueline A. (2018): A Summary on Polycystic Ovary Syndrome: Diagnostic Criteria, Prevalence, Clinical Manifestations, and Management According to the Latest International Guidelines. In: *Seminars in reproductive medicine* 36 (1), S. 5–12. DOI: 10.1055/s-0038-1668085.

Norman, Robert J.; Dewailly, Didier; Legro, Richard S.; Hickey, Theresa E. (2007): Polycystic ovary syndrome. In: *The Lancet* 370 (9588), S. 685–697. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)61345-2.

- O'Brien, Jacob; Hayder, Heyam; Zayed, Yara; Peng, Chun (2018): Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. In: *Frontiers in endocrinology* 9, S. 402. DOI: 10.3389/fendo.2018.00402.
- Ortiz-Flores, Andrés E.; Luque-Ramírez, Manuel; Escobar-Morreale, Héctor F. (2018): Pharmacotherapeutic management of comorbid polycystic ovary syndrome and diabetes. In: *Expert opinion on pharmacotherapy* 19 (17), S. 1915–1926. DOI: 10.1080/14656566.2018.1528231.
- Palomba, Stefano; Wilde, Marlieke A. de; Falbo, Angela; Koster, Maria P. H.; La Sala, Giovanni Battista; Fauser, Bart C J M (2015): Pregnancy complications in women with polycystic ovary syndrome. In: *Human Reproduction Update* 21 (5), S. 575–592. DOI: 10.1093/humupd/dmv029.
- Pescador, Nuria; Pérez-Barba, Milagros; Ibarra, José María; Corbatón, Arturo; Martínez-Larrad, María Teresa; Serrano-Ríos, Manuel (2013): Serum circulating microRNA profiling for identification of potential type 2 diabetes and obesity biomarkers. In: *PLoS one* 8 (10), S. e77251. DOI: 10.1371/journal.pone.0077251.
- Rajman, Marek; Schratt, Gerhard (2017): MicroRNAs in neural development: from master regulators to fine-tuners. In: *Development (Cambridge, England)* 144 (13), S. 2310–2322. DOI: 10.1242/dev.144337.
- Rocha, A. L.; Oliveira, F. R.; Azevedo, R. C.; Silva, V. A.; Peres, T. M.; Candido, A. L.; Gomes, K. B.; Reis, F. M. (2019): Recent advances in the understanding and management of polycystic ovary syndrome. In: *F1000Res. 2019 Apr 26;8:F1000 Faculty Rev-565*. DOI : 10.12688/f1000research.15318.1.
- Roth, Lauren W.; McCallie, Blair; Alvero, Ruben; Schoolcraft, William B.; Minjarez, Debra; Katz-Jaffe, Mandy G. (2014): Altered microRNA and gene expression in the follicular fluid of women with polycystic ovary syndrome. In: *Journal of assisted reproduction and genetics* 31 (3), S. 355–362. DOI: 10.1007/s10815-013-0161-4.
- Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). In: *Human Reproduction* 2004; 19: 41–47. DOI: 10.1093/humrep/deh098.
- Salley, Kelsey E. S.; Wickham, Edmond P.; Cheang, Kai I.; Essah, Paulina A.; Karjane, Nicole W.; Nestler, John E. (2007): POSITION STATEMENT. Glucose Intolerance in Polycystic Ovary Syndrome—A Position Statement of the Androgen Excess Society. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92 (12), S. 4546–4556. DOI: 10.1210/jc.2007-1549.
- Sang, Qing; Yao, Zhongyuan; Wang, Huan; Feng, Ruizhi; Wang, Haojue; Zhao, Xinzhi et al. (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. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 98 (7), S. 3068–3079. DOI: 10.1210/jc.2013-1715.
- Shen, Licong; Yang, Shiyuan; Huang, Wei; Xu, Wenming; Wang, Qiushi; Song, Yong; Liu, Ying (2013): MicroRNA23a and microRNA23b deregulation derepresses SF-1 and upregulates estrogen signaling in ovarian endometriosis. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 98 (4), S. 1575–1582. DOI: 10.1210/jc.2012-3010.

- Sørensen, Anja Elaine; Wissing, Marie Louise; Salö, Sofia; Englund, Anne Lis Mikkelsen; Dalgaard, Louise Torp (2014): MicroRNAs Related to Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). In: *Genes* 5 (3), S. 684–708. DOI: 10.3390/genes5030684.
- Sørensen, Anja E.; Udesen, Pernille B.; Maciag, Grzegorz; Geiger, Julian; Saliari, Negar; Januszewski, Andrzej S. et al. (2019): Hyperandrogenism and Metabolic Syndrome Are Associated With Changes in Serum-Derived microRNAs in Women With Polycystic Ovary Syndrome. In: *Frontiers in medicine* 6, S. 242. DOI: 10.3389/fmed.2019.00242.
- Spritzer, Poli Mara (2014): Polycystic ovary syndrome. Reviewing diagnosis and management of metabolic disturbances. In: *Arq Bras Endocrinol Metab* 58 (2), S. 182–187. DOI: 10.1590/0004-2730000003051.
- Stark, Alexander; Brennecke, Julius; Bushati, Natascha; Russell, Robert B.; Cohen, Stephen M. (2005): Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. In: *Cell* 123 (6), S. 1133–1146. DOI: 10.1016/j.cell.2005.11.023.
- Tang, Zi-Run; Zhang, Rui; Lian, Zheng-Xing; Deng, Shou-Long; Yu, Kun (2019): Estrogen-Receptor Expression and Function in Female Reproductive Disease. In: *Cells* 8 (10). DOI: 10.3390/cells8101123.
- Wang, Qian; Ma, Junfen; Jiang, Zhiyun; Wu, Fan; Ping, Jiedan; Ming, Liang (2017): Identification of microRNAs as diagnostic biomarkers for acute myocardial infarction in Asian populations: A systematic review and meta-analysis. In: *Medicine* 96 (24), S. e7173. DOI: 10.1097/MD.00000000000007173.
- Wang, Yongqing; Gu, Xunke; Tao, Liyuan; Zhao, Yangyu (2016): Co-morbidity of cervical incompetence with polycystic ovarian syndrome (PCOS) negatively impacts prognosis: A retrospective analysis of 178 patients. In: *BMC pregnancy and childbirth* 16 (1), S. 308. DOI: 10.1186/s12884-016-1094-6.
- Witchel, Selma Feldman; Oberfield, Sharon E.; Peña, Alexia S. (2019): Polycystic Ovary Syndrome: Pathophysiology, Presentation, and Treatment With Emphasis on Adolescent Girls. In: *Journal of the Endocrine Society* 3 (8), S. 1545–1573. DOI: 10.1210/js.2019-00078.
- Würl W. 2016. Expressionsprofil zirkulierender microRNA bei Patientinnen mit PCOS [Dissertation]. Halle: Universität
- Xiong, Weixi; Lin, Ying; Xu, Lili; Tamadon, Amin; Zou, Shien; Tian, Fubo et al. (2017): Circulatory microRNA 23a and microRNA 23b and polycystic ovary syndrome (PCOS): the effects of body mass index and sex hormones in an Eastern Han Chinese population. In: *Journal of ovarian research* 10 (1), S. 10. DOI: 10.1186/s13048-016-0298-8.
- Yang, Po-Kai; Hsu, Chih-Yuan; Chen, Mei-Jou; Lai, Mei-Yu; Li, Zheng-Rong; Chen, Chen-Hsin et al. (2018): The Efficacy of 24-Month Metformin for Improving Menses, Hormones, and Metabolic Profiles in Polycystic Ovary Syndrome. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 103 (3), S. 890–899. DOI: 10.1210/jc.2017-01739.
- Yang, Zhangping; Chen, Haimin; Si, Hongqiang; Li, Xuan; Ding, Xianfeng; Sheng, Qing et al. (2014): Serum miR-23a, a potential biomarker for diagnosis of pre-diabetes and

type 2 diabetes. In: *Acta diabetologica* 51 (5), S. 823–831. DOI: 10.1007/s00592-014-0617-8.

Yao, Guidong; Yin, Mianmian; Lian, Jie; Tian, Hui; Liu, Lin; Li, Xin; Sun, Fei (2010): MicroRNA-224 is involved in transforming growth factor-beta-mediated mouse granulosa cell proliferation and granulosa cell function by targeting Smad4. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 24 (3), S. 540–551. DOI: 10.1210/me.2009-0432.

Yin, Mianmian; Lü, Mingrong; Yao, Guidong; Tian, Hui; Lian, Jie; Liu, Lin et al. (2012): Transactivation of microRNA-383 by steroidogenic factor-1 promotes estradiol release from mouse ovarian granulosa cells by targeting RBMS1. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 26 (7), S. 1129–1143. DOI: 10.1210/me.2011-1341.

Zampetaki, Anna; Kiechl, Stefan; Drozdov, Ignat; Willeit, Peter; Mayr, Ursula; Prokopi, Marianna et al. (2010): Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. In: *Circulation research* 107 (6), S. 810–817. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.226357.

Zegers-Hochschild, Fernando; Adamson, G. David; Dyer, Silke; Racowsky, Catherine; Mouzon, Jacques de; Sokol, Rebecca et al. (2017): The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 32 (9), S. 1786–1801. DOI: 10.1093/humrep/dex234.

Zhao, Hong; Zhou, Ling; Shangguan, Anna Junjie; Bulun, Serdar E. (2016): Aromatase expression and regulation in breast and endometrial cancer. In: *Journal of molecular endocrinology* 57 (1), S. R19-33. DOI: 10.1530/JME-15-0310.

8 Thesen

1. Für das Polyzystische Ovarsyndrom existieren bisher keine diagnostischen biochemischen Marker. Mögliche Marker stellen microRNAs dar.
2. Die microRNAs miR-27b, miR-126, miR-224 und miR-372 wurden anhand von microArray-Analysen aus der eigenen Arbeitsgruppe ausgewählt und deren Konzentrationen im Serum von 201 Kinderwunschpatientinnen vermessen.
3. Die Serumkonzentrationen der microRNAs miR-27b, miR-126, miR-224 und miR-372 korrelieren signifikant mit dem Vorhandensein von polyzystischen Ovarien im Ultraschall.
4. Die Serumkonzentrationen der microRNAs miR-126, miR-224 und miR-372 korrelieren signifikant mit der Diagnose „Polyzystisches Ovarsyndrom“.
5. *In vitro* Versuche zeigten keine Expressionsveränderung der microRNAs miR-23a, miR-126, miR-224 und miR-372 durch Stimulation der Granulosakarzinomzelllinien COV434 oder KGN mit Testosteron oder Glukose.
6. Die beiden Gene Östrogenrezeptor α (ER α) und Progesteronrezeptor (PR) konnten im dualen Luziferasereporterassay und Western Blot nicht als Zielgene der PCOS-assoziierten microRNA miR-23a verifiziert werden

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Serumkonzentration und Funktion der zirkulierenden microRNAs miR-27b, miR-126, miR-224 und miR-372 bei Patientinnen mit Polyzystischem Ovarsyndrom“ selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Jede Stelle, an der wörtlich oder inhaltlich auf das Gedankengut anderer zurückgegriffen wurde, habe ich kenntlich gemacht.

Weder die gesamte Arbeit noch Teile der Arbeit lagen jemals einer Prüfungsbehörde vor.

Ort, Datum

Unterschrift

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich keinen vorausgegangenen Promotionsversuch unternommen habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Viktoria Hoffmann, geb. Heinrich
Geburtsdatum/-ort	30.12.1993 Lutherstadt Wittenberg
Familienstand	verheiratet, eine Tochter (*2019), ein Sohn (*2022)
Staatsangehörigkeit	deutsch

Beruflicher Werdegang

seit 09/2020	Assistenzärztin für Dermatologie und Venerologie, Hautmedizin Delitzsch
--------------	--

Ausbildung

10/2012 - 11/2018	Studium der Humanmedizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
11/2018	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11/2017 - 10/2018	Praktisches Jahr
10/2017	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
09/2014	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08/2004 - 07/2012	Staatliches Gymnasium, Paul-Gerhardt-Gymnasium Gräfenhainichen
08/2000 - 07/2004	Staatliche Grundschule Bad Schmiedeberg

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Allem voran gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Hermann Behre, der diese Dissertationsarbeit am Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) ermöglichte und mit regem Interesse die Thematik diskutierte sowie durch konstruktive Kritik hinterfragte.

Herrn Dr. Thomas Greither danke ich ebenfalls ganz besonders für seine Präsenz und Unterstützung während der gesamten Arbeit. Seine überaus akribische Betreuung sowohl während meiner Arbeit im Labor, als auch während der Verschriftlichung der Arbeit weiß ich sehr zu schätzen. Ich bedanke mich darüber hinaus auch für die vielen anregenden Diskussionen und Gespräche, welche mich stets in meinem Vorhaben begeisterten und ermutigten.

Für die freundschaftliche und produktive Arbeitsatmosphäre bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) - allem voran bei Maria Giebler für ihre unermüdlichen Erklärungen und Motivationen zu jedem Experiment sowie ihre inspirierende gute Laune.

Meinem Mann Steve, meiner Familie und meiner Schwiegerfamilie gilt mein herzlichster Dank für ihre aufbauenden und stets positiven Worte, für das Zuhören und ihre tatkräftige Unterstützung im Babysitting und Rücken freihalten.

Meinen Freunden danke ich für ihr offenes Ohr, ihr Interesse an meiner Dissertationsarbeit und die vielen gemeinsamen Momente, in denen ich ausgiebig lachen und mich von Stress befreien durfte.