

Expression von Mikro-Ribonukleinsäuren in Follikelflüssigkeit bei Infertilität

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

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

von Mareike Mertens, geb. Bauer

geboren am 20. September 1990 in Oelsnitz /Vgtl.

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

Verteidigung: 09.11.2023

Gutachter:

Prof. Dr. Hermann M. Behre Halle (Saale)

apl. Prof. Dr. Martin Sebastian Staeger Halle (Saale)

Prof. Dr. Peter Würfl Dessau-Roßlau

In Liebe gewidmet meinem Matthias

„Epigenetik waren schon immer all die seltsamen und wundervollen Dinge, die sich durch die Genetik nicht erklären lassen.“

Denise Barlow

Referat

Um Erkenntnisse über epigenetische Mechanismen verschiedener Infertilitätsfaktoren, wie Adipositas, Tubenpathologien, Endometriose und das Polyzystische Ovarialsyndrom (PCOS) zu gewinnen, untersucht die vorliegende Arbeit die Expression von Mikro-Ribonukleinsäuren (miRNA) in Follikelflüssigkeit. Hierzu konnte Follikelflüssigkeit von 72 Patientinnen mit und ohne die oben genannten Infertilitätsfaktoren am Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) untersucht werden. Das Vorkommen von miRNA in Follikelflüssigkeit wurde mittels Mikro *Array* nachgewiesen. Im Anschluss wurde mittels quantitativer *real time PCR* eine quantitative Analyse der in Follikelflüssigkeit exprimierten miRNA 191, miRNA 200c, miRNA 221 und miRNA 27a durchgeführt. Die Expressionsmengen der einzelnen miRNA im Vergleich zur Referenz miRNA 16 wurden statistisch anhand von Spearman Korrelationskoeffizienten, Kruskal-Wallis-Tests und Regressionsanalysen (Kleinste-Quadrate-Schätzer-Verfahren) ausgewertet. Die vorliegende Arbeit wies die Expression 31 verschiedener miRNA in Follikelflüssigkeit nach. In der durchgeführten quantitativen Expressionsbestimmung zeigten sich bei Patientinnen ohne die o.g. Infertilitätsfaktoren durchgehend höhere Medianwerte der miRNA 27a, miRNA 191 und miRNA 200c. Bei Patientinnen mit Tubenpathologien konnten stets geringere Medianwerte aller miRNA nachgewiesen werden, insbesondere war bei diesen Probandinnen auch im Durchschnitt statistisch signifikant weniger miRNA 191 in Follikelflüssigkeit vorhanden als bei Patientinnen ohne Tubenpathologie. Weiterhin zeigt die vorliegende Arbeit eine positive Korrelation von Gewicht bzw. Body-Mass-Index (BMI) zur Expression von miRNA 27a in deren Follikelflüssigkeit. Hervorzuheben ist eine statistisch signifikant negative Assoziation zwischen der Expression von miRNA 191 und einer erfolgreichen Implantation nach Befruchtung und Embryonentransfer. Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation verdeutlichen die Notwendigkeit weiterführender Untersuchungen im Bereich von epigenetischer Fertilitätseinflüsse und Fertilitätsmodifikatoren, nicht nur im Hinblick auf therapeutische Möglichkeiten, sondern auch im Sinne einer prädiktiven Testung des Implantationserfolges.

Mertens, Mareike; geb. Bauer: Expression von Mikro-Ribonukleinsäuren in Follikelflüssigkeit bei Infertilität, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 70 Seiten, 2022

INHALTSVERZEICHNIS

Referat	III
Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	VI
(1.) Einleitung	1
(1.1) Unerfüllter Kinderwunsch und weibliche Infertilität.....	1
(1.1.1) Unerfüllter Kinderwunsch	1
(1.1.2) Weibliche Infertilität.....	3
(1.2) Follikelflüssigkeit als Spiegel der Oogenese	6
(1.3) Mikro-Ribonukleinsäuren und Faktoren weiblicher Infertilität	8
(1.3.1) Mikro-Ribonukleinsäure 191.....	10
(1.3.2) Mikro-Ribonukleinsäure 200c.....	11
(1.3.3) Mikro-Ribonukleinsäure 221.....	11
(1.3.4) Mikro-Ribonukleinsäure 27a.....	12
(2.) Zielstellung	13
(3.) Material und Methodik	15
(3.1) Material	15
(3.1.1) Patientinnen – Follikelflüssigkeit als biologisches Material	15
(3.1.2) Nicht – biologisches Material.....	16
(3.2) Methodik.....	18
(3.2.1) Gewinnung der Follikelflüssigkeit.....	18
(3.2.2) RNA-Isolation mittels Phenol/Chloroform-Extraktion	18
(3.2.3) Konzentrationsmessung der RNA	18
(3.2.4) Array	18

(3.2.5) Quantitative Messung der miRNA 191, miRNA 200c, miRNA 27a, miRNA 221 und miRNA 27a.....	20
(3.2.6) Statistische Auswertung.....	23
(4.) Ergebnisse	24
(4.1) Mikro Arrays	24
(4.2) Quantifizierung exprimierter miRNA mittels <i>real-time-qPCR</i>	25
(4.2.1) Charakteristika der untersuchten Kohorte	25
(4.3) Statistische Untersuchung der Ergebnisse der <i>real-time-qPCR</i>	29
(5.) Diskussion.....	38
(5.1) Überblick über die durchgeführten Analysen.....	38
(5.2) Diskussion der Kohorte	39
(5.3) Diskussion der Mikro Array.....	40
(5.4) Diskussion der quantitativen Expression von miRNA in Follikelflüssigkeit.....	41
(6.) Zusammenfassung.....	45
(7.) Literaturverzeichnis.....	48
(8.) Thesen.....	58
Anlagen / Anhang	VII
Selbstständigkeitserklärung.....	IX
Erklärung über frühere Promotionsversuche.....	X
Danksagung.....	XI

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

cDNA.....	komplementäre DNA
EM.....	Endometriose
FSH.....	Follikelstimulierendes Hormon
GRCh38.....	<i>Genome Reference Consortium Human Build 38</i>
LH.....	Luteinisierendes Hormon
miRNA.....	Mikro-Ribonukleinsäure
mRNA.....	Messenger-Ribonukleinsäure
N.....	Anzahl der Beobachtungen
PCOS.....	Polyzystisches Ovarialsyndrom
RNA.....	Ribonukleinsäuren
rt-q-PCR.....	<i>real time quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SNP.....	<i>Single Nucleotide Polymorphismen</i>
U/min.....	Umdrehungen pro Minute
UTR.....	untranslatierte Region

1. Einleitung

Im Folgenden sollen die grundlegenden Begrifflichkeiten der vorliegenden Arbeiten in einem einleitenden Sinne definiert werden. Begonnen wird mit dem Begriff des unerfüllten Kinderwunsches und die in der Arbeit untersuchten Faktoren weiblicher Infertilität (Tubenpathologie, Endometriose, Adipositas, PCOS) erläutert. Anschließend findet sich ein kurzer Literaturüberblick über die vier miRNA (miRNA 191, miRNA 200c, miRNA 221 und miRNA 27a) deren Expression in Follikelflüssigkeit in der vorliegenden Arbeit quantifiziert wurde.

1.1 Unerfüllter Kinderwunsch und weibliche Infertilität

1.1.1 Unerfüllter Kinderwunsch

Bei einem fertilen Paar, welches regelmäßig ungeschützten Geschlechtsverkehr vollzieht, setzt eine Schwangerschaft nach spätestens 1-1,5 Jahren ein.¹ Im Jahr 2017 sind etwa 3% der geborenen Kinder mittels extrakorporaler Befruchtung gezeugt wurden. Im Durchschnitt findet sich also in fast jeder Schulklasse ein Kind, welches nach assistierter Reproduktion gezeugt wurde.² Fertilität meint in der vorliegenden Dissertation die geschlechtliche Vermehrungsfähigkeit.³ Ein unerfüllter Kinderwunsch ist definiert als das Ausbleiben einer Schwangerschaft nach zwölf Monaten, unter der Bedingung, dass regelmäßiger, ungeschützter Geschlechtsverkehrs an einem zur Kontrazeption geeigneten Zeitpunkten stattgefunden hatte.⁴ Ursachen des unerfüllten Kinderwunsches sind in der Mehrheit der Fälle bei beiden Partnern zu finden, seltener sind Fälle in denen nur einer der beiden Partner eine als ursächlich vermutete Pathologie aufweist. In etwa 20 % der Fälle kann keine grundlegende Ursache gefunden werden.⁴

Die Begriffe Sterilität und Infertilität sind voneinander abzugrenzen. Die Benutzung dieser Begrifflichkeiten unterscheidet sich vom englischen Sprachraum zum deutschen Sprachraum und wird in der Literatur seit einem Beitrag von Habemma *et al.*, 2004 diskutiert.⁵ Die

vorliegende Dissertation nutzt den Begriff Infertilität nach der Definition der Weltgesundheitsorganisation. Diese Definition wird ebenfalls in der aktuell publizierten Literatur genutzt. Infertilität ist hierbei eine Erkrankung der zur Reproduktion benötigten Organe, im Sinne des Ausbleibens einer klinischen Schwangerschaft nach mindestens zwölf Monaten regelmäßigem und ungeschütztem Geschlechtsverkehr.⁶ Sterilität meint demzufolge die Unfähigkeit zur Reproduktion und wird im Folgenden kongruent zur aktuellen Literatur nicht verwendet.⁵

Über 900.000 In-vitro-Fertilisationszyklen (IVF) werden in Europa jährlich durchgeführt. 200.000 Kinder werden pro Jahr nach extrakorporaler Befruchtung in Europa geboren. Das sind ca. 5 % der Geburten in Europa.^{7,2} Zu den häufigsten Indikationen einer extrakorporalen Befruchtung gehört bei Frauen mit 17,1 % bei IVF bzw. 6,8 % bei Intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) die Tubenpathologie, mit 14,2 % bzw. 8,7 % die Endometriose und mit 4,6 % bzw. 3,7 % das Polyzystische Ovarialsyndrom (PCOS). Nach außerkörperlicher assistierter Reproduktion trat im Jahr 2019 bei 31,9 % der Paare eine Schwangerschaft ein.^{8,7} Folglich tritt nach 68,1 % der Embryonentransfers keine Schwangerschaft ein und das ratsuchende Paar bleibt weiterhin ungewollt kinderlos. Neue Interventionsmöglichkeiten und prädiktive Testungen in der assistierten Reproduktion könnten zu einer Erhöhung der Wahrscheinlichkeit auf eine Implantation führen. Hierzu können Erkenntnisse der molekularen Mechanismen verschiedener Infertilitätsfaktoren, wie beispielsweise Adipositas, Tubenpathologien, Endometriose und das Polyzystische Ovarialsyndrom beitragen. Eine epigenetische Regulierung von Fertilität durch fertilitätsbeeinflussende Faktoren, wie beispielsweise Übergewicht, wurde in der Literatur bereits mehrmals nachgewiesen.^{9, 10} Um grundlegende Erkenntnisse von Genexpression und Genregulation zu gewinnen, ist es notwendig epigenetische Wirkmechanismen zu untersuchen. Mikro-Ribonukleinsäuren (miRNA) als Modifikatoren der Genfunktion spielen hierbei eine wichtige Rolle. Seit der Entdeckung der miRNA im Jahr 1993 werden immer mehr funktionale, modifikatorische und lokusspezifische Eigenschaften von miRNA aufgedeckt.¹¹⁻¹³ Nach der Entdeckung des extrazellulären

Vorkommens von miRNA durch Valadi *et al.*, 2007 stellte sich die Frage, ob diesen nicht-kodierenden Ribonukleinsäuren auch eine Rolle bei Infertilität zukommt.¹⁴

Vor diesem Hintergrund untersucht die vorliegende Arbeit die Expression von Mikro-Ribonukleinsäuren in Follikelflüssigkeit bei Frauen mit und ohne physische Infertilitätsfaktoren, die aufgrund eines unerfüllten Kinderwunsches eine extrakorporale assistierte Reproduktion im Sinne einer ICSI oder IVF in Anspruch genommen haben.

1.1.2 Weibliche Infertilität

Die Spontankonzeptionschance kann von spezifisch weiblichen, spezifisch männlichen oder geschlechtsunabhängigen Faktoren beeinflusst werden.¹⁴ Die vorliegende Arbeit konzentriert sich insbesondere auf weibliche Einflussfaktoren der Paarfertilität, da die Expression von miRNA in Follikelflüssigkeit untersucht wird und das Vorliegen dieser spezifisch für das weibliche Geschlecht ist.

Die Ursachen weiblicher Infertilität sind vielfältig. Da eine Thematisierung sämtlicher Ursachen weiblicher Infertilität den Rahmen dieser Arbeit übersteigen würde, werden im folgenden Kapitel insbesondere die Infertilitätsfaktoren Tubenpathologien, Adipositas, Endometriose und das PCOS erläutert, welche bei ca. 61 % der in der vorliegenden Dissertation untersuchten Probandinnen diagnostiziert wurden.

Endometriose (EM) ist charakterisiert durch das Auftreten von ektopen Gewebe des uterinen Endometrium. Dieses ist meist im peritonealen Bereich des Abdomens, insbesondere des kleinen Beckens lokalisiert. Endometrioseläsionen können aber auch extraabdominal im Bereich des Herzens, des zentralen Nervensystems, der Pleura und anderen Organen auftreten.¹⁵ Die meisten Frauen werden im Alter von 25-35 Jahren mit Endometriose diagnostiziert und zeigen ein weites Spektrum an Symptomen. So kann es neben asymptomatischen Verläufen auch zu neurologischen Symptomen (wie z.B. einer Schmerzsymptomatik), endokriner Dysfunktion (Hypothyreose, Follikelreifungsstörung) und lokalen Funktionsbehinderungen (z.B. im Bereich der Tuben, der Oozytenfreisetzung und Spermienmotilität) durch mechanische Einwirkungen

kommen. 10-15 % aller Frauen im reproduktionsfähigen Alter sind von Endometriose betroffen. Bei Fertilitätsstörungen liegt eine Endometriose mit einer Prävalenz von ungefähr 25 %-50 % vor.¹⁶ Es wurden bereits Expressionsunterschiede von miRNA in Follikelflüssigkeit von Patientinnen mit und ohne Endometriose nachgewiesen. So konnte eine geringere Expression der miRNA 451 bei Patientinnen mit Endometrioseläsionen nachgewiesen werden.¹⁷ Als potenziell ätiologischer Faktoren der Endometriose assoziierten Infertilität wird die aberrante Expression des *HOXA10* Gens diskutiert.¹⁶ Diesem kommt eine Rolle in der embryonalen Entwicklung des Uterus zu. Die Expression von *HOXA10* erreicht ihren Höhepunkt während der Implantation der befruchteten Eizelle. Frauen mit Endometrioseläsionen zeigen diesen Expressionsanstieg nicht.¹⁸ Hierbei konnten Petracco *et al.*, 2011 einen regulatorischen Einfluss von miRNA 135 auf die Expression von *HOXA10* belegen.¹⁹ Die Literatur konnte außerdem in Endometrioseläsionen somatisch entstandene, pathogene Einzelnukleotidvarianten bzw. Kopienzahlveränderungen, welche sonst als Treibervarianten bei der Tumorentstehung von somatischen Tumoren bekannt sind, finden. Insbesondere sind hierbei pathogene Varianten in *KRAS* zu nennen.²⁰

In den Tuben erfolgt der Transport der Eizelle zum Uterus. Ursachen für pathologische Tubenveränderungen können mechanischer und paralytischer Ätiologie sein, bislang sind allerdings nicht alle Ursachen aufgeklärt.²¹ Mechanische Verschlüsse der Tuben sind meist durch Adhäsionen bedingt. Diese können postinflammatorisch (z.B. postinfektiös nach Adnexitis bei Chlamydieninfektionen), postoperativ und postpartal entstehen. Ein mechanischer Verschluss der Tuben kann auch durch Endometrioseläsionen bedingt sein.²² Bisher wurden in der Literatur keine Expressionsunterschiede von miRNA in Follikelflüssigkeit bei Frauen mit fertilitätsbeeinflussenden Faktoren im Vergleich zu Frauen ohne diese Faktoren beschrieben.

Adipositas ist eine Erkrankung, die durch ein stark erhöhtes Körpergewicht mit einem Body-Mass-Index (BMI) von mehr als 30 kg/m² charakterisiert ist. Etwa die Hälfte (53 %) der Frauen in Deutschland sind mit einem BMI von ≥ 25 kg/m² übergewichtig. Bei ungefähr jeder sechsten

erwachsenen Frau (18,1 %) in Deutschland ist eine Adipositas bekannt. Hierbei führen freie Fettsäuren zu einer toxischen Wirkung im reproduktiven Gewebe und darauffolgend zu einer chronischen Entzündung. Bei Frauen mit Adipositas sind höhere Fehlgeburtsraten, Totgeburtsraten und einer höhere Wahrscheinlichkeit einer Präeklampsie in der Schwangerschaft bekannt. Die Fertilitätsrate bei adipösen Frauen ist selbst bei Eumenorrhoe geringer als bei Frauen mit Normalgewicht. Außerdem besteht die höhere Wahrscheinlichkeit einer ovariellen Dysfunktion. Ebenso sinkt bei Ihnen die Chance einer erfolgreichen Implantation nach extrakorporaler Fertilisation.²³ In Follikelflüssigkeit konnten bislang in der Literatur keine Expressionsunterschiede von miRNA bei Frauen mit und ohne Adipositas gefunden werden.

Als die häufigste endokrine Erkrankung von Frauen ist das Polyzystische Ovarialsyndrom (PCOS) ein Krankheitskomplex, der die Reproduktion, den Metabolismus aber auch die psychische Gesundheit der Betroffenen beeinflussen kann. Klinisch können variabel eine Hyperandrogenämie, Übergewicht, Adipositas, periphere Insulinresistenz, Zyklusunregelmäßigkeiten im Sinne einer Oligomenorrhoe, respektive Amenorrhoe und die typische polyzystische Ovarmorphologie auftreten.²⁴ 8-10 % der Frauen im reproduktionsfähigen Alter sind betroffen. Diagnosestellung und Therapie werden in der Fachliteratur insbesondere aufgrund der klinischen Heterogenität diskutiert, sodass innerhalb der internationalen Leitlinie geschätzt wird, dass bei bis zu 70 % der betroffenen Frauen weltweit das Polyzystische Ovarialsyndrom bisher nicht diagnostiziert wurde.²⁵ In Deutschland wird zum aktuellen Zeitpunkt eine Leitlinie für Ärzte betroffener Frauen erstellt. Die Expression von miRNA bei Patientinnen mit PCOS variiert und wurde bereits in mehreren Studien untersucht. Eine unterschiedliche Expression von miRNA in Follikelflüssigkeit von Patientinnen mit PCOS im Gegensatz zu Patientinnen ohne PCOS konnte bereits für miRNA 132 und miRNA 320 gezeigt werden.²⁶ Eine positive Korrelation zwischen der ebenfalls in der vorliegenden Arbeit eingeschlossenen miRNA 27a im Serum und einem PCOS konnten Pourteymour *et al.*, 2020 zeigen.²⁷

1.2 Follikelflüssigkeit als Spiegel der Oogenese

Im Folgenden wird die Keimbahn (die Zelllinie, welche von befruchteter Eizelle zum reifen Follikel führt) beschrieben. Hierbei wird insbesondere auf die Entstehung und den Aufbau von Follikelflüssigkeit eingegangen.

Die Zelllinie, welche von der ersten Teilung einer befruchteten Eizelle bis zur reifen Gamete führt, wird Keimbahn genannt. Die Oogenese beschreibt die Keimbahn zur Entwicklung einer befruchtungsfähigen Eizelle. Sie beginnt nach der Konzeption, und wird erst nach Ovulation abgeschlossen.^{21,28}

Die Gametenbildung unterliegt der Mitose und der Meiose. Sie dient der Reduktion des diploiden Chromosomensatzes hin zum haploiden Chromosomensatz, um später eine Konstanthaltung der Chromosomenanzahl bei Befruchtung zu ermöglichen.²⁹ Während der gesamten Keimbahn sollten Gene im potenziell aktivierbaren Zustand vorliegen, allerdings nicht zu somatischen Zellen ausdifferenzieren. Dies kann durch epigenetische Modifikation, wie beispielsweise durch Transkriptionsfaktoren und regulatorische RNA-Moleküle gewährleistet werden.²⁸

Zu Beginn der weiblichen Keimbahn entwickeln sich in der fünften Embryonalwoche die Oogonien.²¹ In der Zeit zwischen dem dritten und siebten Fetalmonat differenzieren sich diese (durch Beginn der ersten Reifeteilung und das Einleiten der Trennung beider homologer Chromosomenpaare) zu primären Oozyten.²⁹ Im Anschluss werden das Pachytän- und Diplotänstadium der Prophase (der ersten Reifeteilung/Meiose) durchlaufen. In diesem Stadium ruhen die 400.000-500.000 Oozyten im Ovar eines Mädchens.²⁹ Umgeben sind diese von Prägranulosazellen.³⁰ Nachgeburtlich findet keine weitere Proliferation der Oozyten statt. Bei Einsetzen der Pubertät begeben sich rund 90 % der angelegten Oozyten in den programmierten Zelltod.²⁸ Die übrigen Oozyten (nun als Primordialfollikel bezeichnet) arretieren 12-45 Jahre in der Meiose.

Die Eizellen beenden diese Ruhephase nach der Pubertät unter dem Einfluss des Follikelstimulierenden Hormons (FSH) und des Luteinisierendem Hormons (LH)³⁰. Es kommt im weiteren Verlauf zur zyklischen Rekrutierung eines dominanten Follikels aus dieser Ovarreserve und darauf folgend in der Regel zur Monovulation.

Das Heranreifen der Oozyte unterteilt man in verschiedene Stadien, dies sind das Primärstadium, das Sekundärstadium und das Tertiärstadium.

Die Epithelzellen (Prägranulosazellen), welche die Oozyte umgeben, vermehren ihr Volumen und nehmen eine kubische bis hochprismatische Form an. Die Basalmembran wird deutlicher. Im Verlauf dieser Entwicklung bildet sich zwischen Eizelle und Epithelzellen ein Spalt, die Zona pellucida.³⁰ So entsteht eine biologische Nische, bestehend aus Eizelle und umgebendem Epithel. Dies nennt man den Follikel.³¹

Das Epithel des Follikels wird durch Teilung mehrschichtig. Die Granulierung unter dem Mikroskop nimmt zu. Aufgrund dessen wird diese Schicht Granulosazellschicht genannt. Während des Stadiums des sekundären Follikels bildet sich um das Follikelepithel herum eine weitere Zellschicht aus. Diese nennt man Theca folliculi. Ein Teil dieser Schicht ist vaskularisiert. Hierbei ist eine Kommunikation mit anderen Organsystemen möglich. So können Hormone einen stärkeren Einfluss auf den Follikel nehmen. Ebenso werden Substrate, bspw. für die Steroidsynthese über diese vaskularisierte Schicht transportiert. In der späten Sekundärphase teilt sich die Granulosazellschicht. Es entsteht ein mit Flüssigkeit gefülltes Antrum.³⁰ Die in diesem enthaltene Flüssigkeit definiert die vorliegende Arbeit als Follikelflüssigkeit.³²

In dieser Phase wächst die Oozyte, hierbei wird sie durch die Thekazellschicht versorgt. Der nun Antralfollikel genannt wird und erreicht zwischen dem 5. und 12. Zyklustag eine Größe von 8,5-14mm. Jeder dieser Follikel enthält eine Oozyte, welche von Follikelflüssigkeit umgeben wird, gefolgt von einer Schicht aus Granulosa- und Thekazellen.³⁰ Physiologisch findet im Anschluss an dieses Stadium die Ovulation statt.

Bei invasiver assistierter Reproduktion wird die Follikelreifung medikamentös forciert, sodass mehrere Follikel pro Zyklus reifen. Diese medikamentöse Stimulation basiert meist auf einer Erhöhung des FSH-Spiegels.³³ Bei invasiver assistierter Reproduktion werden nach erfolgreicher medikamentöser Stimulation mittels transvaginaler Punktion mehrere Follikel zur Eizellgewinnung punktiert.³⁴

Der bereits oben beschriebene Antralfollikel besteht aus somatischen Zellen (Granulosazellen und Thekazellen), sowie einem Antrum, welches mit einer extrazellulären Matrix gefüllt ist. Die vorliegende Arbeit nennt diese, den Follikel umgebende Matrix, Follikelflüssigkeit. Diese dient als wichtige Mikroumgebung für die Oogenese, Reifung und Qualität der Oozyte. Follikelflüssigkeit ist aus mehreren Bestandteilen zusammengesetzt. Dies sind Blutplasmabestandteile, welche die Blut-Follikel-Schranke überschreiten und Sekrete aus Granulosa- und Thekazellen. Weiterhin enthält die Follikelflüssigkeit Hormone, wie FSH, LH, *Growth Hormone* (GH), Östrogene und Androgene, Wachstumsfaktoren, einschließlich TGF-, Inhibin, Activin, Anti-Müller'sches Hormon, sowie antiapoptotische Faktoren, wie Fas-Liganden, und Proteine, Peptide, Aminosäuren und Nukleotide.³⁵ Auch miRNA konnten bereits in Follikelflüssigkeit des Menschen nachgewiesen werden.³⁶⁻³⁸ Ein konstantes Gleichgewicht zwischen regulierenden extra- und intraovariellen Faktoren ist für den Ablauf der Oogenese bis hin zur Ovulation erforderlich.³⁹ Follikelflüssigkeit ist somit ein wichtiger Bestandteil innerhalb des intrafollikulären Mikromilieus, welche die lokalen sekretorischen Aktivitäten der Eizelle sowie der Granulosa- und Thekazellen und deren Metaboliten widerspiegelt.³⁶

1.3 Mikro-Ribonukleinsäuren und Faktoren weiblicher Infertilität

Mikro-Ribonukleinsäuren (miRNA) sind rund 19-24 Nukleotide umfassende, nicht kodierende (im Sinne von nicht an der Proteinbiosynthese beteiligt), Ribonukleinsäuren. Die Genloci vieler miRNA sind über mehrere Spezies hinweg hoch konserviert.⁴⁰ Seit der Entdeckung der miRNA im Jahr 1993 werden immer differenziertere und vielfältigere Funktionen von miRNA, insbesondere auf die Formung des Proteoms aufgeklärt.^{41, 13} Als *Enhancer* oder *Silencer* der posttranskriptionalen Proteinbiosynthese, insbesondere durch Bindung an eine mRNA, konnte

Ihre Beteiligung an vielen physiologischen und pathologischen Prozessen und dem *non-sense-mediated decay* von Proteinen nachgewiesen werden.⁴⁰ Ihr Vorkommen wurde bereits in mehreren intrazellulären Kompartiments (Zytosol, Nukleus) beschrieben.⁴² Grundlegend für die vorliegende Arbeit war der extrazelluläre Nachweis von miRNA.⁴³ In Form von Exosomen, im Extrazellulärraum sekretiert, kommt miRNA somit auch eine Funktion bei der intrazellulären Kommunikation zu.⁴³ Zur Bindung an die Zielsequenz einer Ziel-RNA reichen meist 7-8 komplementäre Basen aus. Dies lässt ein breites Bindungsspektrum an unterschiedliche RNA Sequenzen zu.⁴⁴ Die 3'UTR der mRNA dient dabei als *binding site*, so können miRNA die Expression von ungefähr 60 % der humanen Gene regulieren.⁴⁵ Es konnte gezeigt werden, dass eine Regulation der mRNA durch miRNA Organ-, und sogar Zellspezifisch ist und miRNA unterschiedlich in Abhängigkeit von externen Einflussfaktoren (u.a. metabolischen Einflüssen, Zellstress, fertilitätsbeeinflussende Faktoren) exprimiert werden.⁴⁰ Aufgrund der unterschiedlichen miRNA Expressionsprofile zwischen einzelnen Geweben, Zellen und extrazellulärer Matrix sowie bei pathologischen Zuständen oder auch bei unterschiedlicher Hormonexpression, können sie als diagnostische Marker für bspw. Tumorerkrankungen verwendet werden.¹² Nicht erst seit dem Einsatz des mRNA-Impfstoffes während der SARS-CoV2 Pandemie werden die kleineren miRNA auch als Therapiemöglichkeiten betrachtet. Hierzu gibt es in den Vereinigten Staaten von Amerika bereits klinische Studien, unter anderem im Bereich der Onkologie und Nephrologie.⁴⁶

Mehrere Studien konnten das Vorhandensein von miRNA im weiblichen Geschlecht nachweisen. So konnte eine erhöhte Expression der miRNA 200c und der miRNA 191 im Serum von Frauen mit Ovarialkarzinom gezeigt werden.³⁷ Rosenbluth *et al.*, 2014 untersuchten das Kulturmedium von Embryonen nach In-vitro-Fertilisation auf unterschiedliche miRNA Konzentrationen.⁴⁷ Auch in Follikelflüssigkeit gelang bereits mehrfach der Nachweis verschiedener regulatorischer miRNA, deren Expression hinweisend auf die Qualität der Eizelle sind. Ebenso wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression von miRNA in Follikelflüssigkeit und einem Überstimulationssyndrom, einer potenziellen Nebenwirkung der Kinderwunschbehandlung, beschrieben.⁴⁸ In Bezug auf Infertilitätsfaktoren wurden miRNA

sowie eine unterschiedliche Expression einzelner miRNA bei Menschen mit und ohne Vorhandensein verschiedener Infertilitätsfaktoren bereits nachgewiesen. So konnte eine Assoziation von mehreren miRNA und dem Polzystischen Ovarialsyndrom, primärer Ovarialinsuffizienz, Endometriose und anderen fertilitätsbeeinflussenden Faktoren belegt werden.^{49, 50} Auch eine Assoziation zu erfolgreicher Implantation nach Embryonentransfer konnte für einzelne miRNA bereits gezeigt werden.⁵⁰ Grundsätzlich ist allerdings zu betonen, dass aufgrund der niedrigen Patientenfallzahl innerhalb der meisten Studien, die Literatur hierzu noch keine abschließenden reliablen Ergebnisse zu einer Korrelation von miRNA und einzelnen Infertilitätsfaktoren festhalten kann. Auch in der vorliegenden Arbeit umfasst die Patientinnen-Kohorte eine relativ kleine Gruppe, was in Kapitel 5.2 kritisch diskutiert wird.

Der nachfolgende Abschnitt stellt eine kurze Übersicht über die Literatur zu den in der Arbeit quantitativ untersuchten miRNA 191, miRNA 200c, miRNA 221 und miRNA 27a in Bezug auf Faktoren der weiblichen Infertilität und deren Vorkommen in Follikelflüssigkeit dar. Hierbei wird das für die jeweilige miRNA kodierende Gen genannt und dessen chromosomale Position nach GRCh38 angegeben.

1.3.1 Mikro-Ribonukleinsäure 191

Das für die miRNA 191 kodierende Gen *MICRO RNA 191* liegt auf dem kurzen Arm des Chromosom 3 (3p21.31). Die genomische Position lautet: chr3:49,020,617-49,020,708.⁵¹ Mehrere Arbeiten konnten eine Assoziation der Expression von miRNA 191 und malignen Tumoren der Frau finden.⁵² Shen *et al.*, 2010 vermuten, dass pathogene Varianten im Gen, welches für die miRNA 191 codiert, ursächlich für familiären Brust- und Eierstockkrebs sein könnten.⁵³ An östrogenrezeptor-positiven Brustkrebszellen konnte eine Induktion von miRNA 191 durch Östrogen gezeigt werden.⁵⁴ In Bezug auf Endometriose als Faktor weiblicher Infertilität konnten Dong *et al.*, 2015 eine signifikant höhere Konzentration von miRNA 191 in Gewebeproben von Patientinnen mit maligner Endometriose nachweisen.⁵⁵ Funktionell wiesen sie den Regulatorischen Einfluss von miRNA 191 auf TIMP3 und somit auf die maligne Entartung von Endometriosezellen nach. In Bezug auf weibliche Fertilität anderer Spezies konnte eine

Korrelation zwischen der Konzentration von miRNA 191 im Speichel von Büffeln und des Vorhandensein eines dominanten Follikels nachgewiesen werden.⁵⁶ Rosenbluth *et al.*, 2014 wiesen miRNA 191 im Kulturmedium menschlicher Embryonen nach Befruchtung der Eizelle in vitro nach. Dabei konnten Sie eine erhöhte Konzentration der miRNA 191 im Medium von Embryonen finden, welche mittels ICSI befruchtet wurden.⁴⁷ Bei nicht-erfolgreichen IVF Zyklen waren die Expression von miRNA 191 im Kulturmedium höher als im Vergleich zu der Expression im Kulturmedium von Embryonen, die nach erfolgreicher Schwangerschaft geborenen wurde. Weiterhin konnten Acuña-González *et al.*, 2021 eine statistisch signifikante positive Assoziation von miRNA 191 im Kulturmedium von Embryonen am fünften Tag nach extrakorporaler assistierter Reproduktion zu erfolgreicher Schwangerschaft nach Transfer finden.⁵⁰

1.3.2 Mikro-Ribonukleinsäure 200c

Das für die miRNA 200c kodierende Gen *MICRO RNA 200C* liegt auf dem kurzen Arm des Chromosom 12 (12p13.31). Die genomische Position lautet: chr12:6,963,698-6,963,765.⁵⁷ Die Expression von miRNA 200c ist östrogenabhängig.⁵⁸ Eine erhöhte Konzentration im Serum ist mit Infertilität und Fehlgeburten assoziiert und ein sensitives Diagnosekriterium für Infertilität. Außerdem hemmt die miRNA-200c die Ausbildung der Uterusrezeptivität, welche für die Einnistung der Blastozyste in das Endometrium notwendig ist.⁵⁹ Kim *et al.*, 2019 zeigten allerdings eine signifikant erhöhte Konzentration von miRNA 200c im Kulturmedium bei assistierter Reproduktion von einnistungsfähigen Blastozysten im Vergleich zum Kulturmedium mit Eizellarrest.⁶⁰

1.3.3 Mikro-Ribonukleinsäure 221

Das für die miRNA 221 kodierende Gen *MICRO RNA 221* liegt auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms (Xp11.3). Die genomische Position lautet: chrX:45,746,156-45,746,265 Micro Ribonukleinsäure.⁶¹ Ein regulatorischer Einfluss der miRNA 221 wurde bereits bei mehreren biologischen Prozessen, unter anderem der Adipogenese, nachgewiesen.⁶² Robinson *et al.*, 2018 konnten zeigen, dass die Expression der Mikro-Ribonukleinsäure 221 während der

Follikelreifung in Granulosazellen abnimmt, in den Theka interna Zellen hingegen zunimmt. Sie vermuten eine inhibitorische Wirkung des Anstiegs der miRNA 221 auf die Steroidsynthese in Granulosazellen.⁶³

1.3.4 Mikro-Ribonukleinsäure 27a

Das für die miRNA 27a kodierende Gen *MICRO RNA 27A* liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 19 (19p13.12). Die genomische Position lautet: chr19:13,836,439-13,836,516.⁶⁴ Es konnte ein Zusammenhang zwischen miRNA 27a und Adipogenese nachgewiesen werden.⁶⁶ Karolina *et al.*, 2012 vermuten einen Zusammenhang zwischen miRNA 27a und Menschen mit metabolischem Syndrom und Typ 2 Diabetes.⁶⁷ Die miRNA 27a wurde ebenfalls im Zusammenhang mit maligner Entartung von Tumoren beobachtet. So konnte in triple-negativen Brustkrebszelllinien eine erhöhte Expression festgestellt werden.⁶⁸ MiRNA 27a ist assoziiert mit prämaturer Ovarialinsuffizienz.⁶⁹ Nie *et al.*, 2015 zeigten, dass miRNA 27a über den FasL-Fas pathway und das Zielgen *SMAD5* proapoptotisch auf Granulosazellen wirkt.⁷⁰ Kim *et al.*, 2019 konnten auch für die miRNA 27a eine signifikant erhöhte Konzentration im Kulturmedium von einnistungsfähigen Blastozysten im Vergleich zum Kulturmedium mit Eizellarrest bei assistierter Reproduktion nachweisen.⁶⁰

2. Zielstellung

Um mehr Verständnis über epigenetische Modifikatoren von Fertilität zu erlangen, untersucht die vorliegende Arbeit das Vorkommen von Mikro-Ribonukleinsäuren in Follikelflüssigkeit bei Frauen, die eine assistierte Reproduktion im Sinne einer ICSI oder IVF in Anspruch genommen haben. Anschließend wird die Expression von vier miRNA (miRNA 191, miRNA 200c, miRNA 221 und miRNA 27a) mittels *real-time*-qPCR quantifiziert. So ist es Ziel der vorliegenden Arbeit eine mögliche Korrelation zwischen quantitativer Expression von miRNA und fertilitätsbeeinflussenden Faktoren der Frau zu untersuchen. Hierfür wird im Sinne einer Einleitung zunächst Infertilität selbst, die untersuchten Infertilitätsfaktoren Tubenpathologie, Endometriose, Adipositas und PCOS, aber auch die Oogenese (im speziellen die Bildung von Follikelflüssigkeit) definiert. Ebenso wird im Rahmen der Einleitung ein kurzer Literaturüberblick über die untersuchten miRNA 191, miRNA 200c, miRNA 221 und miRNA 27a gegeben. Im anschließenden Kapitel werden Material und Methodik der Arbeit aufgezeigt. Hierbei sind sowohl die durchgeführten Mikro *Arrays*, als auch die *real-time-qPCR* und die statistische Auswertung mit Stata beschrieben. Im Ergebnisteil folgt eine Auflistung der in der Follikelflüssigkeit nachweisbaren miRNA und die Ergebnisse der statistischen Auswertung. In diesem Punkt wird zunächst die Probandinnen-Kohorte charakterisiert. Anschließend untersucht die Arbeit wie eine Assoziation zwischen quantitativer Expression der ausgewählten miRNA zum Auftreten von ausgewählten physischen Infertilitätsfaktoren. Dazu werden Spearman-Rangkorrelationen berechnet, Kruskal-Wallis-Tests, welche die Verteilung von den einzelnen miRNA zwischen Patientinnen untersuchen, durchgeführt und Regressionsanalysen in Form von Kleinste-Quadrate-Regressions-Gleichungen, welche Korrelationen zwischen dem quantitativen Vorkommen der einzelnen miRNA und dem Auftreten der untersuchten physischen Infertilitätsfaktoren schätzen, ausgeführt. Zusammenfassend ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Expression von Mikro-Ribonukleinsäuren in Follikelflüssigkeit von Frauen, die aufgrund eines unerfüllten Kinderwunsches eine invasive assistierte Reproduktion in Anspruch genommen haben,

nachzuweisen und zu quantifizieren. Darüber hinaus sollen Assoziationen von Expressionsänderungen zu verschiedenen Fertilitätsbeeinflussenden Faktoren (wie Endometriose, Adipositas, PCOS und Tubenpathologien) und dem Eintritt einer Schwangerschaft untersucht werden.

3. Material und Methodik

Im Folgenden werden der Ablauf, die verwendeten Materialien sowie die angewandte Methodik der vorliegenden Dissertation dargestellt.

Nach Aufklärung und Einverständniserklärung erfolgte bei 75 Patientinnen des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. med. H. M. Behre die transvaginale Follikelpunktion zur Eizellgewinnung zur weiteren extrakorporalen Fertilisation, respektive Kryokonservierung. Bei dieser Follikelpunktion wurde, die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Follikelflüssigkeit anonymisiert asserviert. Das erste Experiment konnte das Vorhandensein von miRNA in Follikelflüssigkeit mittels Mikro-*Array*-Technik nachweisen. Hierbei erfolgte eine Untersuchung an Follikelflüssigkeit von Frauen mit und ohne Infertilitätsfaktoren (männlicher Infertilitätsfaktor, Endometriose, PCOS). Im zweiten Abschnitt untersucht die vorliegende Arbeit die quantitative Expression der im Mikro *Array* nachweisbaren Mikro-Ribonukleinsäuren miRNA 191, miRNA 200c, miRNA 27a und miRNA 221. Hierzu wurden diese aus Follikelflüssigkeit isoliert, in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und mittels *real time Polymerase Chain Reaction (real-time-qPCR)* deren quantitative Expression bestimmt. Im Anschluss erfolgte die statistische Auswertung aller erhobenen Daten unter Einbezug von physischen Infertilitätsfaktoren mittels der Statistiksoftware Stata Version 14. Es besteht die Möglichkeit einer digitalen Einsicht des zugehörigen Programmcode bei der Autorin.

3.1 Material

3.1.1 Patientinnen – Follikelflüssigkeit als biologisches Material

Dem Forschungsvorhaben wurde durch die Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zugestimmt (Studien-Nr.: 2013-01/ZRA). Alle Patientinnen willigten nach Aufklärung gemäß § 630e | BGB und § 8 | MBO schriftlich ein. Für den Nachweis von miRNA in Follikelflüssigkeit und der anschließend quantitativen

Untersuchung konnten 75 Probandinnen im Zeitraum vom 26.02.2014 bis 19.10.2014 am Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) unter der Leitung von Univ. – Prof. Dr. med. H.M. Behre rekrutiert werden. Es konnte Follikelflüssigkeit von 75 Probandinnen, die sich einer künstlichen Befruchtung mittels IVF oder ICSI unterzogen haben, für die vorliegende Arbeit verwendet werden. Eine genaue Charakterisierung der untersuchten Kohorte wird in Kapitel 3.1.1 vorgestellt.

3.1.2 Nicht – biologisches Material

Die nachfolgenden Tabellen geben einen Überblick über die verwendeten Materialien, Reagenzien, Puffer, Lösungen, Kits und Geräte sowie deren Hersteller.

TABELLE 1 – GERÄTE UND EINMALMATERIALIEN	
Anmerkungen und Abkürzungen: iCycler Thermal Cycler – <i>real time cycler</i> ; ml – Milliliter; <i>Tubes</i> - Reaktionsgefäße	
GERÄTE	
Gerät	Hersteller (Ort)
Universal-30 RF Zentrifuge	Hettich (Tuttlingen)
Pipetboy	Bioscience (Fernwald)
Spectrometer	Eppendorf (Hamburg)
Sprout Tischzentrifuge	Kisker (Steinfurt)
iCycler Thermal Cycler	Bio-Rad (München)
Tischzentrifuge	Kisker (Steinfurt)
Magnetständer	Ambion Inc. (Austin USA)
Thermocycler T3000	Biometra (Göttingen)
Vortex Mixer	StarLab (Ahrensburg)
Röntgenfilmkammer	Roth, Karlsruhe
Zentrifuge	Biofuge pico Heraeus Instruments (Hanau)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Gefrierschrank	Gram bioline (Vojens, Dänemark)
EINMALMATERIALIEN	
Material	Hersteller (Ort)
Reaktionsgefäße >2,0ml	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäße 0,5-2,0ml	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf)
Falconröhrchen	Greiner (Frickenhausen)
qPCR <i>Tubes</i> mit Deckel	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Küvetten	Uvette routine pack, Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen	
- mit Filter	Greiner bio-one (Frickenhausen)
- ohne Filter	Biozym Scientific (Oldendorf)
peqGOLD Phase Trap- Tube	Peqlab (Erlangen)
Parafilm	

TABELLE 2 REAGENZIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN, KITS	
Anmerkungen und Abkürzungen: MgCl ₂ -Magnesiumchlorid; RDD Puffer – Rnase und DNase freier Puffer	
Reagenzien	
Reagenz	Hersteller (Ort)
Trizol	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Chloroform	Solis Biodyne (Tartu, Estland)
DNAase	Qiagen (Hilden)
Isopropanol	AppliChem (Darmstadt)
Ethanol	SigmaAldrich (Steinheim)
Fixierer	Kodak, Sigma Aldrich (Hamburg)
MgCl ₂	Solis Biodyne (Tartu, Estland)
Reverse Transkriptase	ThermoScientific, Rockford, USA
Riboblock	ThermoScientific, Rockford, USA
RDD Puffer	Qiagen (Hilden)
RNAase freies Wasser	Qiagen (Hilden)
TaqMan Primer	Applied Biosystems (Darmstadt)
DNA Polymerase	Solis Biodyne (Tartu, Estland)
Distilliertes Wasser	AmpuwaFresenius Kabi, (Bad Homburg)
BD-Puffer	Solis Biodyne (Tartu, Estland)
Entwickler	Kodak, Sigma Aldrich, Hamburg
Puffer und deren Lösungen	
Puffer / Lösung	Zusammensetzung, Volumen, pH
Hybridisierungspuffer	30ml 5x hybridization washing buffer (Signosis) 120ml bidestilliertes Wasser
Detektionspuffer	40ml 5x Detection washing buffer 160 ml Aqua bidest.
Entwickler	80g Entwickler 500ml Aqua bidest
Fixierer	100ml fixierkonzentrat 300ml Aqua bidest
Kits	
<i>Human miRNA Array I-III</i> Katalog Number: AP-0008	Signosis (Santa Clara, USA)

3.2 Methodik

3.2.1 Gewinnung der Follikelflüssigkeit

Im Rahmen der Kinderwunschtherapie erfolgte bei den Probandinnen eine transvaginale Follikelpunktion zur Eizellgewinnung für die weitere extrakorporale Fertilisation. Im Anschluss an die Punktion wurde die entnommene Follikelflüssigkeit pseudonymisiert asserviert. Im nachfolgenden Schritt wurde nach Abzentrifugieren (1000 U/min, 10 min) die Follikelflüssigkeit als Überstand über dem Sediment aus zellulären Bestandteilen abgenommen.

3.2.2 RNA-Isolation mittels Phenol/Chloroform-Extraktion

5µl der jeweiligen Follikelflüssigkeit wurden fünf Minuten bei 2000 Umdrehungen pro Minute (U/min) abzentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde mit 750µl Trizol Reagenz versetzt und gemischt. Anschließend wurden 200µl Chloroform zugesetzt und die entstandene Suspension 10 Minuten bei 1200 U/min und 4°C Umgebungstemperatur zentrifugiert. In der Oberphase befand sich nun die Nukleinsäuren der Suspension. Diese wurde abgenommen und die DNA mittels Dnase-Puffer verdaut. Zur RNA Fällung erfolgte die Zugabe von Isopropanol, und die Lagerung bei -20°C über 12 Stunden. Um ein RNA-Pellet zu erhalten wurde danach die Suspension mehrmals zentrifugiert und mit 96%-igem und anschließend 70%-igem Ethanol gewaschen. Das verbliebene Pellet wurde luftgetrocknet und mit 20 µl Rnase-freiem Wasser versetzt.

3.2.3 Konzentrationsmessung der RNA

Zur Konzentrationsmessung am Photometer wurden 2µl der jeweiligen RNA/ cDNA-Lösung in 98 % Rnase freiem Wasser verwendet. Der Reinheitsgrad der Probe wurde bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge bestimmt. Proben mit einem Reinheitsgrad zwischen 1,7 und 2,1 wurden weiterverwendet.

3.2.4 Array

Um das Vorhandensein von miRNA in Follikelflüssigkeit bei Frauen nachzuweisen wurde ein *Array* zur Bestimmung von menschlicher miRNA der Firma Signosis verwendet. Dieser wurde an Follikelflüssigkeit von drei Frauen durchgeführt. Hierbei war bei Patientin 1 eine

Endometriose bekannt, bei Patientin 2 ein PCOS und bei Patientin 3 lagen männliche Infertilitätsfaktoren vor. Bei einem *Mikro Array* wird eine miRNA mit zwei Oligo-DNA hybridisiert, um einen miRNA-DNA-Komplex zu bilden. Dieser Komplex kann folgend ligiert werden, um diesen auf einer *Array*-Membran zu hybridisieren und im Anschluss den entstandenen Komplex und somit das Vorhandensein von miRNA in der untersuchten Probe mittels lichtempfindlicher Filme zu identifizieren. Hierzu wurden im ersten Schritt die Reagenzien des Kits vorbereitet. Um das Annealing (die Bildung eines doppelsträngigen Polynukleotids aus den spezifischen miRNA und Oligo-DNA) durchzuführen wurden 5µg der isolierten RNA, 5µl des Oligo Mix, 1µl des *Array Detection Oligo* und 20µl des annealing buffer mit bidestilliertem Wasser auf 40µl aufgefüllt und in einem Thermocycler bei 72°C für 5 Minuten und 53°C für 90 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die miRNA/Oligo- Hybride an *beads* gebunden, um sie isolieren zu können. Dies erfolgte nach Vorbereiten der beads (jeweils 5µl *magnetic streptavidin beads*) durch Waschen in 100µl *annealing buffer*. Es wurden 40µl der zuvor hergestellten *bead suspension* 40µl des miRNA/oligo hybrids zugesetzt. In 40µl dieses bead binding Puffers wurden dann 40µl des miRNA/Oligo Hybrid Mixes hinzugegeben und diese 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die *beads* mit *beads washing buffer* auf einer Magnetplatte zweimal gewaschen. Hierzu wurden 100µl *beads washing buffer* verwendet.

Daraufhin wurden die miRNA/Oligo Komplexe ligiert. Hierzu wurde mit 50µl Ligations Puffer die *beads* resuspensiert um später den Überstand auf der Magnetplatte abzunehmen. Anschließend wurde dieser Schritt mit 20µl Ligationspuffer wiederholt. Dies wurde für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde ein RNA-Transkript hergestellt, indem die beads mit 100µl *bead washing buffer* gewaschen wurden und dem Reaktionsmix 20µl des mittlerweile ligierten miRNA-Oligo Komplexes hinzugefügt wurden. Weiterhin wurde dieser mit 20µl *expansion mix* resuspensiert und in einem Thermocycler 2 Minuten bei 94°C, 1 Minute bei 54°C, 1,5 Minuten bei 72°C und 30 Sekunden bei 94°C inkubiert. Daraufhin wurde der Überschuss über den Beads mit Hilfe eines Magnetständers entnommen und mit 20µl *labeling mix* versetzt. Dies wurde anschließend eine Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss kann nun die isolierte miRNA auf die *Array* Membran hybridisiert werden. Hierzu wird die Membran

vorbereitet, indem man sie mit destilliertem Wasser und anschließend Hybridisierungspuffer bei 42°C wäscht und anschließend 40µl der transkribierten RNA hinzugibt. Dies wird über Nacht bei 42° inkubiert. Anschließend wird die Membran noch mehrmals mit *washing buffer* gewaschen. Zur Auswertung wird die Membran anschließend mit 10µl *1xDetection wash buffer* inkubiert. Dieser wird mit 15ml *blocking buffer* geblockt. Anschließend wird 1ml des Streptavidin-HRP Konjugates in 1ml gelöst und auf die Membran gegeben. Unter Schütteln wird dieses 4 Minuten einwirken gelassen. Daraufhin folgen drei Waschschrte mit 15ml *1x detection washing buffer*. Anschließend wird Substrat A und B zu gleichen Teilen vermischt. Die Membran wird nun auf einen Fotofilm gelegt. 1ml der gemischten Substrat A und B Lösung hinzugegeben und anschließend entwickelt.

3.2.5 *Quantitative Messung der miRNA 191, miRNA 200c, miRNA 27a, miRNA 221 und miRNA 27a*

(3.2.5.1) *cDNA-Synthese*

Um eine quantitative Bestimmung vom Vorkommen einzelner miRNA in Follikelflüssigkeit mittels *real-time-PCR* vorzunehmen, musste die isolierte RNA in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Hierzu werden miRNA-spezifische Primer der miRNA 191, miRNA 200c, miRNA 221, miRNA 27a und der Referenz miRNA 16 verwendet. Zur cDNA Synthese werden 2ng/µl der zuvor isolierten RNA verwendet. Anschließend kann der Reaktionsansatz (15µl) mit folgender Zusammensetzung pipettiert werden: 2,0µl dNTPs, 10µl Reverse Transkriptase, 3,0µl 5xPuffer, 1,0µl RNase-Inhibitor, 2,5µl nuclease-freies Wasser, 0,5µl stem loop primer, 5,0µl RNA-Verdünnung. Anschließend wurde dieser Reaktionsansatz in einem Thermocycler bei 16°C für 30 Minuten, 42°C für 30 Minuten und 85°C für 5 Minuten inkubiert. Im Anschluss sind die in den Tubes enthaltenen miRNA in eine cDNA umgeschrieben.

(3.2.5.2) *quantitative real-time-Polymerase Chain Reaction (real-time-qPCR)*

Mittels qPCR wurden die zuvor umgeschriebene cDNA amplifiziert, um so die quantitative Expression bestimmen zu können. Dies erfolgte mit folgendem 20µl umfassenden

Reaktionsansatz: 5µl der aus zuvor aus RNA isolierten cDN, 6,2µl H₂O und 1,5µl 10xPuffer, 0,8µl MgCl₂, 0,5µl dNTPs, 0,8µl TaqMan-Primer und 0,2µl HotStart-Taq-Polymerase. Die Amplifikation wurde in einem *real-time Cycler* mit folgenden Zyklen durchgeführt: 1. Zyklus 5 Minuten bei 95°C, 2. Zyklus 30 Sekunden bei 95°C, 15 Sekunden bei 60°C, 3. Zyklus 10 Sekunden bei 95°C, 40 Sekunden bei 60°C. Der zweite Zyklus wurde hierbei 15-mal wiederholt, der dritte Zyklus 45 mal wiederholt.

(3.2.5.3) *rt-q-PCR Auswertung und Delta cT-Methode*

Um die Expression der miRNA zu quantifizieren, wurde eine *real-time-qPCR* anhand der verschiedenen Follikelflüssigkeitsproben durchgeführt. Bei dieser PCR-Methode kann nach Denaturierung, *Annealing* und Anlagerung der cDNA-Stränge während der Polymerase Reaktion das durch Fluoreszenzsonden markierte PCR-Produkt direkt detektiert werden. Die Stärke des Fluoreszenzsignals korreliert dabei mit der Menge an enthaltener cDNA. In der vorliegenden Arbeit wurden hierfür an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelte und für die Ziel-cDNA-Sequenz spezifische Oligonukleotide verwendet (TaqMan Primer). Nach Bindung an die Zielsequenz erfolgt die Fluoreszenzaktivierung während der Polymerase Reaktion durch Hydrolyse. Die Intensität der entstehenden Fluoreszenzsignale ist durch den *real-time-Cycler* messbar. Hierbei gilt je mehr Amplifikate entstehen, desto höher ist die Intensität des Fluoreszenzsignals.

Die entstehenden Messkurven sind exponentiell eine dieser Messkurven wird schematisch in *Abbildung 1: Real Time qPCR Messkurve nach Ginzinger, 2002* wiedergegeben.⁶⁹

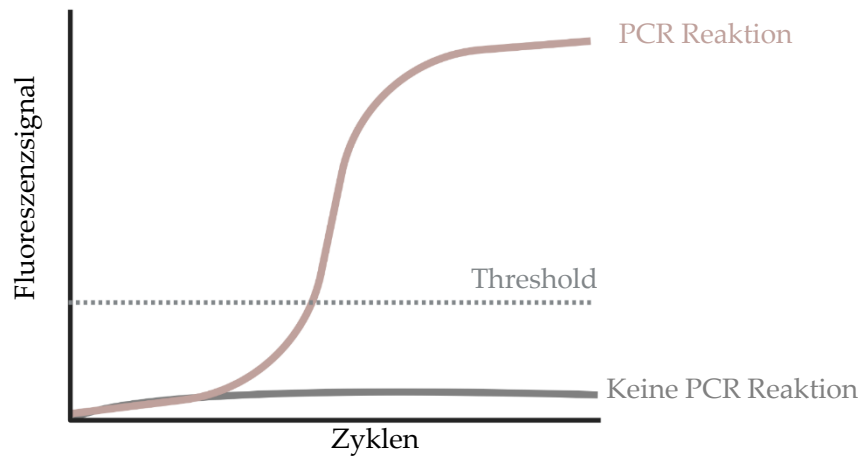


Abbildung 1: Real Time qPCR Messkurve nach Ginzinger, 2002, Abbildung erstellt mit BioRender.com

Hierbei ist auf der Y-Achse die Stärke des Fluoreszenzsignals und auf der X-Achse die Anzahl der Verdopplungszyklen dargestellt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nun ein quantitativer Schwellenwert festgelegt, der Threshold Cycle-Wert (cT-Wert). Die Lage des cT-Wertes wurde an der Stelle gewählt, an dem die Reaktion in die exponentielle Phase eintritt und über dem Hintergrund hervortritt. Nun kann die Anzahl der Verdopplungszyklen bis zum Erreichen des cT-Wertes abgelesen und mit anderen Zyklen verglichen werden. Mit dieser Methode kann also anhand eines Fluoreszenzsignals auf die Menge der in einzelnen Proben vorliegenden miRNA Rückschluss gezogen werden. Wird dieser Wert mit weniger Zyklen erreicht, bedeutet dies, dass im Ausgangsmaterial eine höhere Ausgangsmenge der entsprechenden miRNA vorhanden gewesen sein muss (da es weniger Verdopplungen benötigt, um den gegebenen cT-Wert zu erreichen). Um eine Korrektur, bspw. eines Pipettierfehlers oder eine Ungleichverteilung von freier miRNA bei Probenentnahme, vornehmen zu können, wird eine Referenz-miRNA zur Normalisierung der Expression der untersuchten miRNA relativ zur Expression der Referenz miRNA genutzt. Das bedeutet, dass eine relative Expressionsmenge im Vergleich zur Referenz ermittelt wird. Über den Vergleich der benötigten Verdopplungszyklen zwischen der untersuchten miRNA und Referenz-miRNA kann mittels der sogenannten Delta-

Methode, die relative Expressionsmenge der untersuchten miRNA, relativ zur Referenz-miRNA, berechnet werden.⁷¹ Hierzu wird folgende Formel verwendet:

$$(1) \quad \textit{Relative Expressionsmenge } X = 2^{-(CT_X - CT_{\textit{Referenz}})},$$

Wobei X für die untersuchten miRNA 191, miRNA 221, miRNA 200c und miRNA 27a steht und miRNA 16 als Referenz verwendet wurde. Gemäß der Formel (1) sind Expressionsmengen als prozentuale Werte, relativ zur Referenz-miRNA zu interpretieren.

3.2.6 *Statistische Auswertung*

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software STATA (Version 14, Firma: StataCorp LLC, USA). Die statistischen Analysen umfassten die Berechnungen von Spearman Korrelationskoeffizienten, Kruskal-Wallis-Tests und Regressionen mittels des Kleinsten-Quadrate-Schätzers. Diese statistischen Verfahren wurden in Bezug auf die quantitative Analyse der Assoziationen von in dieser Dissertation betrachteten Faktoren weiblicher Infertilität und relativen Mengen von miRNA in Follikelflüssigkeit angewandt. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz innerhalb der Regressionen wurden t-Tests durchgeführt. Das Signifikanzniveau ist an der jeweiligen Stelle aufgeführt. Zusätzlich zu den quantitativen Berechnungen wurden mittels STATA Box-Plot-Diagramme erstellt, welche die Verteilung der einzelnen miRNA über die hier betrachteten Faktoren weiblicher Infertilität darstellen.

4. Ergebnisse

4.1 Mikro Arrays

Um die Expression von miRNA in Follikelflüssigkeit nachzuweisen, wurde ein Mikro-Array durchgeführt.

TABELLE 3: NACHWEIS EXPRESSION VON miRNA IN FOLLIKELFLÜSSIGKEIT
Anmerkungen: Alle hier nicht aufgeführten miRNA der Micro-Array II-IV wurden bei keiner der Patientinnen in Follikelflüssigkeit nachgewiesen.
Abkürzung: miRNA – Mikro-Ribonukleinsäure

<i>miRNA</i>	<i>Patientin 1</i>	<i>Patientin 2</i>	<i>Patientin 3</i>
29a	x	x	
95			x
154			x
219			x
31		x	x
10a	x	x	x
let7b	x		
200c	x	x	
10b	x	x	x
101-1	x	x	x
136		x	
213	x	x	x
221			x
Let7c	x		
25		x	x
204		x	x
183	x	x	x
Let7d	x	x	
28		x	x
185	x	x	x
106b	x		
141			x
372			x
190			x
191			
27a	x	x	x
127	x	x	
134	x	x	x
Let7i	x		
100	x	x	
368	x	x	x

Tabelle 3 im Abschnitt Material und Methoden zeigt eine vollständige Liste der miRNA, welche die verwendeten *Micro-Arrays (Human miRNA Array Signosis II, III und IV etc.)* detektieren. Die Expression wurde in Follikelflüssigkeit von drei Frauen, die im Frühjahr 2014 am Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie punktiert wurden, untersucht. Patientin 1 hatte eine Endometriose, Patientin 2 ein PCOS, und bei Patientin 3 war eine männliche Infertilitätsdiagnose die Ursache für die Behandlung.

Der folgende Abschnitt beschreibt die Ergebnisse der durchgeführten statistischen Analyse. Kapitel 4.1 präsentiert daraufhin die Ergebnisse des *Arrays*, welcher das Vorkommen der hier analysierten Mikro-Ribonukleinsäuren in Follikelflüssigkeit von drei verschiedenen Probandinnen nachgewiesen hat. Kapitel 4.2.1. beschreibt die Charakteristika der untersuchten Kohorte, sowie Merkmale des verwendeten Datensatzes. Abschließend wird in Kapitel 4.3 das quantitative Vorkommen der einzelnen Mikro-Ribonukleinsäuren in Patientinnen mit und ohne physische Infertilitätsfaktoren untersucht.

4.2 Quantifizierung exprimierter miRNA mittels *real-time-qPCR*

Zur Quantifizierung der in Follikelflüssigkeit vorhandener miRNA erfolgte im Anschluss an den durchgeführten *Array* eine Analyse mittels *real-time-qPCR*. Hierzu wurden miRNA ausgewählt, die in Follikelflüssigkeit aller Probandinnen exprimiert sind. Um eine Streuung der Ergebnisse auf Grund von Fehlern, die zu einer Fehlverteilung (bspw. durch Pipettierfehler oder durch unterschiedliche Mengen in gewonnener Follikelflüssigkeit) der miRNA in Follikelflüssigkeit führen, zu korrigieren wurde eine Referenz RNA zur relativen Quantifizierung mitgeführt. Hierzu wurde die miRNA 16 gewählt. Sie wurde bereits in vorhergehenden Arbeiten als Referenz miRNA genutzt.³⁸ Auch in Follikelflüssigkeit der aktuell untersuchten Kohorte wurde sie konstant exprimiert.

4.2.1 Charakteristika der untersuchten Kohorte

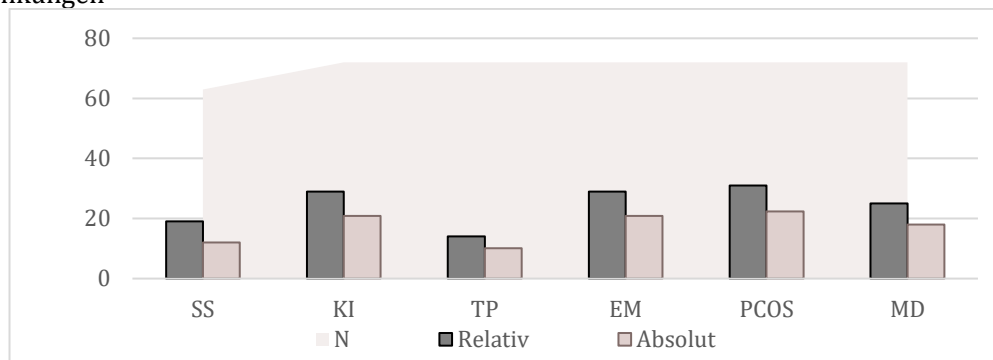
Die Probandinnen dieser Dissertation wurden im Zeitraum vom 26.02.2014 bis 19.10.2014 am Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) unter der Leitung von Univ. – Prof. Dr. med. H.M. Behre rekrutiert. Insgesamt konnten Daten

zu 72 Patientinnen mit durchschnittlichem Alter von ca. 34 Jahren mit und ohne die Infertilitätsfaktoren Adipositas, Endometriose, Tubenpathologie und PCOS erhoben werden. Weiterhin wurden der BMI und das Alter als fertilitätsbeeinflussende Faktoren und der Eintritt einer Implantation nach Transfer des Embryos nach extrakorporaler Befruchtung für die Analyse erhoben. Die Verteilung der beobachteten Merkmale ist in Tabelle 4 dargestellt.

TABELLE 4: CHARAKTERISTIK DES VERWENDETEN DATENSATZES I

Anmerkung: N – Anzahl der Gesamtbeobachtungen für die jeweilige Beobachtung; relativ – prozentualer Anteil der Patientinnen mit einer positiven Ausprägung des angegebenen Merkmals; absolut – absolute Anzahl an Probandinnen mit positiver Ausprägung des angegebenen Merkmals. Abkürzungen: N-Anzahl der Beobachtungen; SS -Schwangerschaft; KI-keine Infertilitätsfaktoren, TP-Tubenpathologie, EM-Endometriose, PCOS - Polyzystisches Ovarialsyndrom, MD – Mischdiagnosen und andere Erkrankungen.

	Relativ	Absolut	N
Schwangerschaft	0,19	12	63
Keine physischen Infertilitätsfaktoren	0,29	21	72
Tubenpathologie	0,14	10	72
Endometriose	0,29	21	72
PCOS	0,3	22	72
Mischdiagnosen&andere Erkrankungen	0,25	18	72



Von 72 Frauen wurde bei 14 % eine Tubenpathologie, bei 29 % eine Endometriose und bei 31 % ein PCOS diagnostiziert. Bei 29 % war ein Infertilitätsfaktor des Partners, aber nicht der Probandin selbst die Indikation zur extrakorporalen Befruchtung. Bei 25 % der Patientinnen wurde mehr als eine der oben genannten Diagnosen gestellt. Von 63 Probandinnen wurde bei

12 (19 %) nach ICSI ein Schwangerschaftseintritt nachgewiesen. Tabelle 4 beschreibt den Datensatz, welcher für die vorliegende Dissertation verwendet wurde. Dabei werden Mittelwert, Standardabweichung, die Perzentilen 25, 50 und 75 sowie die Anzahl der Beobachtungen, für die in der Dissertation untersuchten Faktoren weiblicher Infertilität und für die quantitative Expression der untersuchten miRNA 221, miRNA 191, miRNA 200c und miRNA 27a dargestellt. Zu beachten ist dabei, dass die quantitativen Werte für diese miRNA als relative Werte (relativ zur Referenz-miRNA 16) angegeben sind. Ein Mittelwert von 0,4251 für die Expression von miRNA 191 bedeutet beispielweise, dass das quantitative Niveau der miRNA 191 im Durchschnitt 42,5 % des quantitativen Niveaus der Referenz-miRNA 16 betrug. Zusätzlich enthält die Tabelle Informationen zu Gewicht, Alter, Größe und BMI der Patientinnen zum Zeitpunkt der Punktion.

TABELLE 5: CHARAKTERISTIKA DES VERWENDETEN DATENSATZES II

Anmerkung: (1) Mittelwert; (2) Standardabweichung (SD); (3) 25er Perzentil (P25); (4) Median; (5) 75er Perzentil (P75); (6) Anzahl der Beobachtungen (N).

Variable	Mittelwert (1)	SD (2)	P25 (3)	Median (4)	P75 (5)	N (6)
Größe in Zentimeter	167,72	6,37	163,5	168,00	172,00	72
Gewicht in Kilogramm	66,25	11,08	58,5	65,00	72,00	72
Body-Mass-Index	23,54	3,72	20,8	23,0	25,85	72
Alter bei Punktion	33,88	3,99	31	34,0	25,85	72
Expression miRNA 191	0,4251	0,9041	0,0353	0,1251	0,3135	72
Expression miRNA 200c	0,2401	1,2521	0,0021	0,0138	0,0599	71
Expression miRNA 221	0,0450	0,0705	0,0052	0,0178	0,0576	70
Expression miRNA 27a	0,0198	0,0344	0,0001	0,0024	0,0270	72

Des Weiteren ist auffallend, dass die relativen Mengen aller analysierter miRNA im Durchschnitt deutlich unter einem Wert von 1 liegen. Dies bedeutet, dass im Vergleich zur Referenz-miRNA 16 wesentlich geringere Mengen der untersuchten miRNA 191, miRNA 200c,

miRNA 221 und miRNA 27a nachgewiesen wurden. Am deutlichsten ist dies im Fall der miRNA 27a zu erkennen, deren Expression im Durchschnitt 2 % der Menge der Referenz-miRNA 16 beträgt. Auffallend ist, dass die Standardabweichung der miRNA stets größer als der Mittelwert ist, was die hohen Unterschiede der relativen Expressionsmengen über die einzelnen Patientinnen hinweg verdeutlicht. In Tabelle 6 sind Spearman-Korrelationskoeffizienten für ausgewählte stetige Merkmale des Datensatzes dargestellt. Bei der Spearman Korrelation können die tatsächlichen Werte und deren Verhältnis zueinander nicht verglichen werden. Stattdessen werden Beobachtungen den Messwerten nach geordnet und mit Rängen versehen (Die Beobachtung mit dem höchsten Messwert bekommt den Rang 1, der zweithöchste Messwert erhält den Rang 2, usw.) und anschließend die Ränge miteinander korreliert. Folglich werden die Ränge einzelner Merkmale miteinander verglichen. Ein Vorteil der Spearman Korrelation ist, dass diese nicht anfällig für Ausreißer ist und zudem nicht zwangsläufig einen linearen Zusammenhang zwischen den Merkmalen unterstellt. Stattdessen werden Merkmale auf ihren monotonen Zusammenhang untersucht. Der Spearman Korrelationskoeffizient ist stets zwischen -1 und 1 normiert, wobei negative Werte einen negativen Zusammenhang und positive Werte einen positiven Zusammenhang beschreiben. Dabei gibt ein Wert von 1 (-1) eine perfekte positive (negative) Korrelation zweier Merkmale an.⁷²

TABELLE 6: SPEARMAN KORRELATION DER RÄNGE

Anmerkung: BMI=Body-Mass-Index Gew.=Gewicht; Signifikanzniveau: p<0.1 * p<0.05** p<0.01***

	Alter	Größe	Gewicht	BMI	miR_i^{191}	miR_i^{200c}	miR_i^{221}	miR_i^{27a}
Alter	1							
Größe	0,1778	1						
Gew.	0,0653	0,3389***	1					
BMI	-0,0236	-0,1160	0,8653***	1				
miR_i^{191}	-0,0202	0,0112	0,0262	-0,0234	1			
miR_i^{200c}	-0,0071	-0,0209	0,0964	0,0793	0,4332***	1		
miR_i^{221}	0,0159	0,0178	0,1301	0,1553	0,2840**	0,5430***	1	
miR_i^{27a}	0,0185	0,0682	0,2917**	0,2407**	0,1772	0,4277***	0,2151*	1

Auffallend ist, dass die Expression verschiedener miRNA untereinander in den meisten Fällen positiv korreliert ist. So sind statistisch signifikante positive Korrelationskoeffizienten zwischen

den relativen Mengen von miRNA 191 und miRNA 200c, miRNA 191 und miRNA 221, miRNA 200c und miRNA 221 sowie zwischen miRNA 200c und miRNA 27a nachweisbar. Die größte Assoziation liegt zwischen den miRNA 200c und miRNA 221 vor ($r_s = 0,5430$). Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Variablen Gewicht und BMI eine positive und statistisch signifikante Rangkorrelation mit der miRNA 27a aufweisen. Dies ist interessant, da die Literatur bereits einen Zusammenhang zwischen einem hohen BMI und einer verstärkten Auftreten von weiblicher Infertilität nachgewiesen hat.²³

4.3 Statistische Untersuchung der Ergebnisse der *real-time-qPCR*

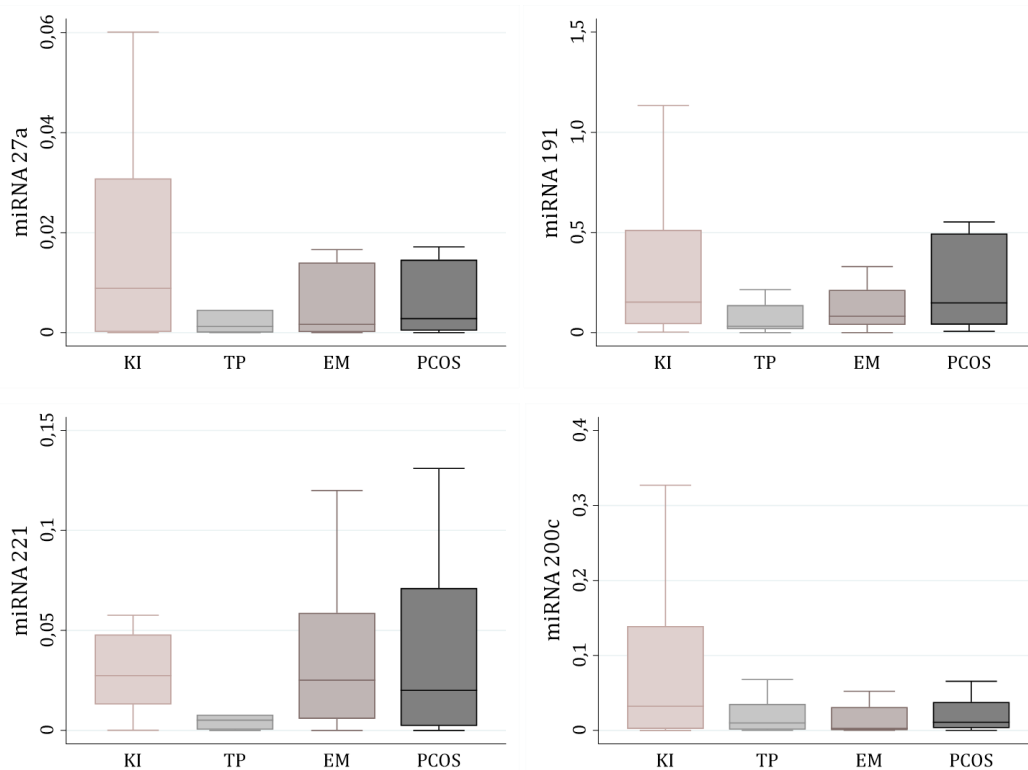


ABBILDUNG 2: VERTEILUNG VON MIKRO-RIBONUKLEINSÄUREN IN PROBANDINNEN MIT UND OHNE PHYSISCHE INFERTILITÄTSFAKTOREN

Abkürzungen: KI = keine Infertilitätsfaktoren; TP=Tubenpathologie; EM=Endometriose; PCOS= Polyzystisches Ovarialsyndrom

Abbildung 2 stellt die Verteilung der relativen Mengen der einzelnen untersuchten miRNA in Bezug auf die betrachteten physischen Infertilitätsfaktoren in Form von Box-Plots dar. Die

Randwerte der Boxplots werden auch als oberer und unterer „Whisker“ bezeichnet.⁷³ Der obere Whisker ist durch $\frac{3}{2}(p(75) - p(25))$ und der untere Whisker durch $\frac{3}{2}(p(25) - p(75))$ gegeben, wobei $p(25)$ und $p(75)$ das 25. und 75. Perzentil einer Verteilung symbolisieren.⁷⁴ Patientinnen ohne dokumentierte Infertilitätsfaktoren (KI) zeigen einen höheren Medianwert sowie eine stärkere Streuung der relativen Expression von miRNA 27a, miRNA 191 und miRNA 200c. Im Vergleich zu Patientinnen mit Tubenpathologien (TP) ist dies ebenfalls der Fall für die miRNA 221. Allerdings zeigen Probandinnen mit Endometriose (EM) und PCOS ähnlich hohe Medianwerte sowie eine stärkere Streuung in der relativen Expression von miRNA 221 wie Probandinnen ohne dokumentierte Infertilitätsfaktoren. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass Patientinnen mit Tubenpathologien außer im Fall der miRNA 200c stets die geringsten Medianwerte aufweisen.

Um zu untersuchen, ob die Verteilungen der Mikro-Ribonukleinsäuren für Probandinnen mit und ohne verschiedene physische Infertilitätsfaktoren voneinander statistisch zu unterscheiden sind, wurde ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Im Fall der vorliegenden Arbeit untersucht dieser, ob die Verteilungen der nachgewiesenen relativen Mengen von miRNA statistisch voneinander zu unterscheiden sind, gegeben, dass eine Patienten i) keine physischen Infertilitätsfaktoren aufweist, ii) eine Tubenpathologie bekannt ist, iii) eine Endometriose aufgetreten ist oder iv) ein PCOS diagnostiziert wurde.⁷⁵ Der Kruskal-Wallis-Test eignet sich für einen Vergleich beliebig vieler Verteilungen.⁷⁵ Letzterer ist im Rahmen dieser Arbeit das geeignete statistische Analyseverfahren, da insgesamt vier verschiedene Verteilungen miteinander verglichen werden (jeweils eine für die drei untersuchten Diagnosen, sowie eine weitere für die gesunde Kontrollgruppe). Tabelle 7 stellt die Ergebnisse eines Kruskal-Wallis-Test für die in dieser Arbeit untersuchten miRNA dar. Hierbei werden in der ersten Zeile das Kruskal-Wallis H abgebildet, in der zweiten Zeile die Freiheitsgrade und in der dritten Zeile die statistische Signifikanz. Die Spalten zeigen die untersuchten miRNA auf, für welche jeweils ein Kruskal-Wallis-Test über die vier Patientengruppen (Endometriosegruppe, PCOS-Gruppe, Tubenpathologiegruppe und keine Infertilitätsfaktorengruppe) durchgeführt wurde. Die Verteilungen der miRNA 200c und miRNA 27a sind dabei bei gesunden Patientinnen nicht

statistisch signifikant unterschiedlich zu den Verteilungen dieser miRNA bei Patientinnen mit einem der drei untersuchten Infertilitätsfaktoren. Ähnliches gilt für die Verteilungen der miRNA 221. Hier zeigt der Kruskal-Wallis Test lediglich zu einem statistischen Signifikanzniveau von 16 % an, dass mindestens eine der Patientinnengruppen eine andere Verteilung der miRNA 221 aufweist als die übrigen Patientinnengruppen. Hinsichtlich der miRNA 191 kann allerdings festgestellt werden, dass sich die Verteilungen der nachgewiesenen relativen Mengen in den einzelnen Patientinnen-Gruppen zu einem Signifikanzniveau von nahezu 7 % statistisch unterscheiden.

TABELLE 7: VORKOMMEN VON MIKRO-RIBONUKLEINSÄUREN UND PHYSISCHEN INFERTILITÄTSFAKTOREN, KRUSKAL-WALLIS-TEST

Anmerkung: Verglichen wurden die Verteilungen der einzelnen miRNA innerhalb der Patientinnengruppen mit den Infertilitätsfaktoren Endometriose, Tubenpathologie, PCOS und ohne Infertilitätsfaktoren.

	<i>miRNA 191</i> (1)	<i>miRNA 200c</i> (2)	<i>miRNA 221</i> (3)	<i>miRNA 27a</i> (4)
Kruskal-Wallis H	7,036	4,280	5,226	1,159
Freiheitsgrade	3	3	3	3
Signifikanz	0,0708	0,2328	0,1560	0,7627

Um eine quantifizierbare Analyse der Zusammenhänge zwischen den untersuchten physischen Infertilitätsfaktoren und den relativen Expressionsmengen der untersuchten miRNA zu ermöglichen, wurde folgendes statistisches Regressionsmodell geschätzt:

$$(2) \quad y_i = \beta_x x_i + C_i' \beta + \varepsilon_i.$$

Dabei symbolisiert y_i die abhängige Variable von Interesse. Hierbei handelt es sich stets um die relative Expressionsmenge einer einzelnen miRNA. Es gilt also: $y_i = \{miR_i^{191}, miR_i^{200c}, miR_i^{221}, miR_i^{27a}\}$, wobei miR für miRNA steht und der obere Index die spezifische Mikro-Ribonukleinsäure kennzeichnet. i indexiert eine einzelne Patientin. Folglich verdeutlicht der Index i , dass die Ausprägung einer jeweiligen Variable spezifisch für eine Patientin ist. $x_i = \{TP_i, EM_i, PCOS_i\}$ kennzeichnet stets eine von drei Dummy-Variablen (0-1-

Variablen), welche jeweils den Wert 1 besitzt, wenn bei einer Probandin die Diagnose Tubenpathologie ($TP_i = 1$), Endometriose ($EM_i = 1$) oder PCOS ($PCOS_i = 1$) gestellt wurde. Der Koeffizient β_x beschreibt den Wert von Interesse und kennzeichnet den Unterschied der relativen Expression von y_i in einer Patientin mit $x_i = 1$ (also einer Patientin mit einem hier untersuchten Infertilitätsfaktor), im Vergleich zu einer Patientin mit $x_i = 0$ (also einer Patientin ohne den entsprechenden Infertilitätsfaktor). Für jede einzelne Diagnose wird jeweils ein eigenes Modell geschätzt (x_i ist also kein Vektor). Der Vektor C'_i beinhaltet die Kontrollvariablen Alter (Age_i), Body-Mass-Index (BMI_i) sowie erfolgreiche Schwangerschaft nach assistierter Reproduktion (SS_i) und wird in einigen Spezifikationen ausgelassen. Die dazugehörigen Elastizitäten, bzw. geschätzten Koeffizienten sind im Vektor β enthalten. ε_i steht für den obligatorischen Fehlerterm.⁷² Das Regressionsmodell vergleicht Patientinnen mit Infertilitätsfaktoren mit Patientinnen ohne die entsprechenden Infertilitätsfaktoren. Dabei ermöglicht es die Berücksichtigung von Confoundern, liefert also eine quantitative Analyse konditional auf die ausgewählten Kontrollvariablen (s. Regressionstabelle bspw. BMI, Alter etc.).

Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse einer Schätzung des Modells (2) mit einem Kleinste-Quadrate-Schätzer (bzw. mit einem *Ordinary-Least-Square-Estimator*).⁷⁶ Die erste Zeile gibt hierbei die abhängige Variable an, während in der ganz linken Spalte die unabhängigen Variablen aufgeführt sind. Darunter ist mit N die Beobachtungsanzahl für das jeweilige Modell angegeben sowie mit R^2 der absolute Erklärungsgehalt des Modells (das sogenannte R-Quadrat). Letzterer Wert ist zwar für die vorliegende Arbeit nicht von zentraler Bedeutung, zeigt aber an, dass über alle geschätzten Modelle hinweg, ein Großteil der Varianz in der jeweiligen abhängigen Variable nicht erklärt werden kann.⁷⁶ Unterschiede in der Beobachtungszahl folgen daraus, dass nicht sämtliche Variablen für alle Patientinnen erhoben wurden (siehe Tabelle 4). Die Ergebnistabelle ist zudem in drei Abschnitte eingeteilt, von welcher jeder die Regressionsergebnisse für die Analyse jeweils eines physischen Infertilitätsfaktors (Tubenpathologie, Endometriosen und PCOS) $x_i = \{TP_i, EM_i, PCOS_i\}$ abbildet. Die erste Zeile unter den Abschnittsüberschriften zeigt dabei die Variable von Interesse. Der Koeffizient ohne Berücksichtigung der Kontrollvariablen

findet sich in der ersten Spalte unter der jeweiligen miRNA (Spalten 1, 3, 5 und 7). Der Koeffizient nach Berücksichtigung aller Kontrollvariablen (Alter, BMI und erfolgreiche Implantation nach Transfer) findet sich in der zweiten Spalte unter der jeweiligen miRNA (Spalten 2,4,6 und 8). Die Koeffizienten unter Berücksichtigung einzelner *Confounder* finden sich in der Tabelle stets in den Zeilen unter dem Koeffizienten für die Variable von Interesse (Infertilitätsfaktoren).

TABELLE 8: EXPRESSION VON MIKRO-RIBONUKLEINSÄUREN BEI PHYSISCHEN INFERTILITÄTSFAKTOREN								
Anmerkung: TP=Tubenpathologie; EM=Endometriose; PCOS= Polyzystisches Ovarialsyndrom;								
Age=Alter; BMI = Body-Mass-Index; SS=Schwangerschaft; N=Anzahl der Beobachtungen								
Signifikanzniveau: p<0.1 * p<0.05** p<0.01***								
Abschnitt 1: Tubenpathologie								
	miR_i^{191}	miR_i^{191}	miR_i^{200c}	miR_i^{200c}	miR_i^{221}	miR_i^{221}	miR_i^{27a}	miR_i^{27a}
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
TP_i	-0,413*** (0,125)	-0,500*** (0,180)	-0,256 (0,174)	-0,392 (0,321)	-0,0368*** (0,0125)	-0,0321** (0,0146)	-0,00804 (0,00923)	-0,00803 (0,0101)
Age_i		-0,0369 (0,0331)		-0,00274 (0,0193)		-0,00108 (0,00183)		0,000926 (0,00108)
BMI_i		-0,0226 (0,0296)		-0,0414 (0,0650)		0,00224 (0,00233)		0,0000 (0,00153)
SS_i		-0,512** (0,217)		-0,369 (0,325)		0,0110 (0,0260)		0,000858 (0,00969)
N	72	63	71	62	70	61	72	63
R ²	0,025	0,090	0,005	0,026	0,034	0,053	0,007	0,018
Abschnitt 2: Endometriose								
	miR_i^{191}	miR_i^{191}	miR_i^{200c}	miR_i^{200c}	miR_i^{221}	miR_i^{221}	miR_i^{27a}	miR_i^{27a}
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
EM_i	-0,263 (0,164)	-0,296* (0,175)	-0,290 (0,208)	-0,295 (0,180)	0,0234 (0,0220)	0,0196 (0,0235)	0,00467 (0,00999)	0,00053 (0,00992)
Age_i		-0,0416 (0,0334)		-0,00625 (0,0213)		-0,00136 (0,00176)		0,00084 (0,00108)
BMI_i		-0,00619 (0,0270)		-0,0276 (0,0562)		0,00248 (0,00200)		0,00017 (0,00157)
SS_i		-0,441*** (0,204)		-0,303 (0,281)		0,0129 (0,0242)		0,00157 (0,00938)
N	72	63	71	62	70	61	72	63
R ²	0,018	0,074	0,011	0,024	0,024	0,043	0,004	0,011
Abschnitt 3: PCOS								
	miR_i^{191}	miR_i^{191}	miR_i^{200c}	miR_i^{200c}	miR_i^{221}	miR_i^{221}	miR_i^{27a}	miR_i^{27a}
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
$PCOS_i$	0,107 (0,224)	0,120 (0,290)	-0,143 (0,228)	-0,113 (0,201)	0,0130 (0,0195)	0,0115 (0,0272)	-0,00743 (0,00774)	-0,00405 (0,00696)
Age_i		-0,0410 (0,0357)		-0,00809 (0,0234)		-0,00121 (0,00207)		0,000798 (0,00111)
BMI_i		-0,0170 (0,0270)		-0,0291 (0,0534)		0,00245 (0,00290)		0,000335 (0,00136)
SS_i		-0,470** (0,210)		-0,328 (0,290)		0,0141 (0,0261)		0,00176 (0,00951)
N	72	63	71	62	70	61	72	63
R ²	0,003	0,058	0,003	0,016	0,007	0,033	0,010	0,014

Über alle drei Abschnitte hinweg zeigt sich, dass keine statistisch signifikant höheren relativen Expressionsmengen von miRNA 200c und 27a bei Patientinnen mit einem der drei untersuchten physischen Infertilitätsfaktoren im Vergleich zu gesunden Probandinnen nachzuweisen sind. Bereits im obigen Kruskal-Wallis-Test konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Verteilung der Expressionsmengen von miRNA 200c und miRNA 27a über die einzelnen Probandinnen-Gruppen festgestellt werden. Patientinnen mit Tubenpathologien (Abschnitt 1) weisen allerdings statistische signifikant niedrigere relative Expressionsmengen von miRNA 191 und miRNA 221 auf. Dies hält für Modelle, welche Kontrollvariablen in die Schätzung aufnehmen (Spalte 2 und 6) sowie für Modelle, welche Kontrollvariablen herauslassen (Spalte 1 und 5). Insbesondere in Hinblick auf die relativen Expressionen von miRNA 191 lassen sich dabei deutliche Unterschiede zwischen Patientinnen mit und ohne Tubenpathologien finden. Dies ist erneut konsistent mit den Ergebnissen des Kruskal-Wallis-Tests aus dem vorherigen Abschnitt. Quantitativ implizieren die Ergebnisse in Spalte 2, dass Probandinnen mit Tubenpathologien einen um 0,5 niedrigen relativen Expressionswert für die miRNA 191 aufweisen. Das bedeutet, dass bei diesen Probandinnen die Expression der miRNA 191 relativ zur Referenz miRNA 16 um 50 Prozentpunkte niedriger ist als bei Patientinnen ohne Tubenpathologien. Hinsichtlich der miRNA 221 beträgt dieser Unterschied drei Prozentpunkte. Während sich für Patientinnen mit PCOS keine signifikanten Expressionsunterschiede in den einzelnen Mikro-Ribonukleinsäuren im Vergleich zu Patientinnen ohne PCOS nachweisen lassen, kann für Patientinnen mit Endometriose zu einem 10 % Signifikanzniveau ebenfalls eine geringere relative Expression von miRNA 191 nachgewiesen werden. Zudem zeigen die Ergebnisse in Spalte 2 über alle drei Abschnitte der Tabelle 8 hinweg, dass bei Frauen, bei denen nach ICSI eine Schwangerschaft eintrat, ebenfalls eine niedrigere relative Expressionsmenge von miRNA 191 in Follikelflüssigkeit nachzuweisen war. Hierbei war die Expression von miRNA 191 jeweils um 65 Prozentpunkte (bei Tubenpathologie), um 55 Prozentpunkte (bei Endometriose) und um 59 Prozentpunkte bei PCOS niedriger bei Frauen, bei denen eine Schwangerschaft eintrat, als bei Frauen bei denen keine Schwangerschaft eintrat (jeweils zum 5 % Niveau statistisch signifikant).

Tabelle 9 repliziert die Ergebnisse aus Tabelle 8 und schließt dabei sämtliche Patientinnen bei denen mehr als ein Infertilitätsfaktor bekannt ist (Mischdiagnose) aus. Dies soll mögliche Fehlmessungen aufgrund solcher Mischdiagnosen ausschließen. Wie zu erkennen ist, sind Ergebnisse auch mit dieser Teilmenge von Frauen qualitativ unverändert, was die Robustheit der durchgeführten statistischen Analyse unterstreicht.

Tabelle 9: EXPRESSION VON MIKRO-RIBONUKLEINSÄUREN BEI PHYSISCHEN INFERTILITÄTSFAKTOREN,
OHNE MISCHDIAGNOSEN

Anmerkung: TP=Tubenpathologie; EM=Endometriose; PCOS= Polyzystisches Ovarialsyndrom;
Age=Alter; BMI=Body-Mass-Index; SS=Schwangerschaft; N=Anzahl der Beobachtungen;
Signifikanzniveau: $p < 0.1$ * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ ***

Abschnitt 1: Tubenpathologie								
	miR_i^{191}	miR_i^{191}	miR_i^{200c}	miR_i^{200c}	miR_i^{221}	miR_i^{221}	miR_i^{27a}	miR_i^{27a}
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
TP_i	-0,514*** (0,170)	-0,615*** (0,224)	-0,349 (0,241)	-0,487 (0,378)	0,0417** * (0,0153)	- 0,0398** (0,0174)	-0,00991 (0,0101)	-0,0119 (0,0112)
Age_i		-0,0397 (0,0384)		-0,00103 (0,0270)		-0,00044 (0,00210)		0,00135 (0,00131)
BMI_i		-0,0288 (0,0356)		-0,0335 (0,0845)		0,00451 (0,00328)		0,00094 (0,00212)
SS_i		-0,647** (0,269)		-0,453 (0,396)		0,00908 (0,0332)		-0,0013 (0,0116)
N	54	47	54	47	52	45	54	47
R ²	0,039	0,118	0,009	0,029	0,045	0,084	0,011	0,042
Abschnitt 2: Endometriose								
	miR_i^{191}	miR_i^{191}	miR_i^{200c}	miR_i^{200c}	miR_i^{221}	miR_i^{221}	miR_i^{27a}	miR_i^{27a}
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
EM_i	-0,389** (0,179)	-0,404** (0,198)	-0,319 (0,248)	-0,365 (0,284)	0,0442 (0,0366)	0,0539 (0,0462)	0,0168 (0,0164)	0,0101 (0,0169)
Age_i		-0,0443 (0,0394)		-0,00429 (0,0291)		-0,00136 (0,00212)		0,00109 (0,00129)
BMI_i		-0,0227 (0,0338)		-0,0290 (0,0818)		0,00535* (0,00303)		0,00116 (0,00213)
SS_i		-0,549** (0,258)		-0,372 (0,339)		0,0100 (0,0281)		-0,00082 (0,0106)
N	54	47	54	47	52	45	54	47
R ²	0,024	0,085	0,008	0,020	0,054	0,108	0,033	0,036
Abschnitt 3: PCOS								
	miR_i^{191}	miR_i^{191}	miR_i^{200c}	miR_i^{200c}	miR_i^{221}	miR_i^{221}	miR_i^{27a}	miR_i^{27a}
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
$PCOS_i$	0,0277 (0,302)	0,0619 (0,378)	-0,143 (0,291)	-0,123 (0,305)	0,0189 (0,0258)	0,0201 (0,0342)	-0,00930 (0,00999)	-0,00681 (0,00955)
Age_i		-0,0476 (0,0410)		-0,00870 (0,0330)		-0,00065 (0,00236)		0,00113 (0,00136)
BMI_i		-0,0213 (0,0358)		-0,0247 (0,0769)		0,00468 (0,00366)		0,00122 (0,00205)
SS_i		-0,585** (0,259)		-0,392 (0,340)		0,0131 (0,0342)		0,00041 (0,0111)
N	54	47	54	47	52	45	54	47
R ²	0,000	0,066	0,002	0,014	0,012	0,057	0,012	0,032

5. Diskussion

Dieses Kapitel gibt einen Überblick über die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen. Anschließend wird ein Zusammenhang zur Literatur hergestellt und eine kritische Betrachtung der methodischen Durchführung und statistischen Analyse aufgezeigt.

5.1 Überblick über die durchgeführten Analysen

Um weitere Erkenntnisse über die zugrundeliegenden Mechanismen des unerfüllten Kinderwunsches zu gewinnen, untersuchte die vorliegende Arbeit Follikelflüssigkeit von 75 Frauen mit und ohne diagnostizierte Infertilitätsfaktoren auf das Vorliegen ($n=3$) und die quantitative Expression von miRNA ($n=72$). Im ersten Schritt wurden zur Detektion der Expression verschiedener miRNA mehrere Mikro-Arrays durchgeführt. Dabei konnte das Vorliegen von 31 verschiedenen miRNA in Follikelflüssigkeit von drei Patientinnen nachgewiesen werden. Von diesen 31 in Follikelflüssigkeit nachgewiesenen miRNA wurde die Expression von miRNA 27a, miRNA 191, miRNA 200c und miRNA 221 in einer größeren Patientinnenkohorte quantifiziert und die relativen Expressionsmengen zwischen Patientinnen mit und ohne Infertilitätsfaktoren durch die Anwendung verschiedener statistischer Verfahren miteinander verglichen. Dabei wurden i) Rangkorrelationskoeffizienten zwischen den relativen Expressionsmengen der untersuchten miRNA bei Patientinnen mit und ohne physische Infertilitätsfaktoren ermittelt (Spearman Korrelationskoeffizienten), ii) Kruskals-Wallis-Tests zur Unterscheidung der Verteilungen der Expressionsmengen der untersuchten miRNA zwischen Patientinnen mit und ohne Infertilitätsfaktoren durchgeführt und iii) Regressionsanalysen mittels des Kleinst-Quadrateschätzer-Verfahrens zur Bestimmung von quantitativen Korrelationskoeffizienten zwischen dem Auftreten der betrachteten Infertilitätsfaktoren und der relativen Expressionsmengen der untersuchten miRNA durchgeführt.

5.2 Diskussion der Kohorte

Die untersuchte Kohorte umfasste insgesamt 75 Frauen, die im Zeitraum vom 26.02.2014 bis 19.10.2014 am Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikum Halle (Saale) unter der Leitung von Prof. Dr. Behre bei denen ein Verfahren zur assistierten Reproduktion (ICSI oder IVF) durchgeführt wurde. Von diesen Patientinnen konnte Follikelflüssigkeit untersucht werden, welche nach hormoneller Follikelstimulation im Rahmen der Gewinnung von Oozyten zur weiteren Befruchtung entnommen wurde. Hiervon wurde i) Follikelflüssigkeit von 3 Probandinnen zur Durchführung von *Arrays* zum Nachweis der Expression von miRNA in Follikelflüssigkeit und ii) Follikelflüssigkeit von 72 Patientinnen zur Bestimmung der quantitativen Expression von vier verschiedenen miRNA untersucht. Um statistisch valide Ergebnisse zu erzielen, diskutiere ich im Folgenden die Größe des Stichprobenumfangs.

61 % der untersuchten Probandinnen wiesen Infertilitätsfaktoren (Tubenpathologie, Endometriose, PCOS) auf. Die Diagnose Endometriose und PCOS waren bei 29 % und 31 % der Probandinnen bekannt, während eine Tubenpathologie halb so viele (14 %) Patientinnen betraf. Vergleicht man diese Verteilung mit der Indikationsverteilung des IVF Register Jahrbuch 2014, so ergibt sich eine Indikationsverteilung von 23,36 % für Tubenpathologien bei IVF und 6,88 % bei ICSI. Eine Endometriose wurde vor IVF bei 11,46 % und vor ICSI bei 6,48 % der Frauen diagnostiziert. Bei 5,44 % (IVF) bzw. 4,51 % (ICSI) der Frauen war ein PCOS bzw. Hyperandrogenismus bekannt.⁷⁷ Um eine generelle Aussage, über Ratsuchende im Bereich der Reproduktionsmedizin treffen zu können, sollte die Verteilung der Infertilitätsfaktoren bei den untersuchten Probandinnen der vorliegenden Arbeit nun der Verteilung der Ratsuchenden der Reproduktionsmedizin entsprechen. Aus diesem Grund ist zu Schlussfolgern, dass die Probandinnen der vorliegenden Arbeit nicht repräsentativ die Ratsuchenden Frauen dieses Bereiches widerspiegeln. Kritisch anzumerken ist ebenso, dass alle Patientinnen aus dem Einzugsgebiet des Universitätsklinikum Halle (Saale) stammten, sodass die verwendete Stichprobe repräsentativ für diese Region ist und eine Verzerrung des Ergebnisses durch bspw. das regional gehäufte Vorkommen von Single Nucleotide Polymorphismen (SNP) im Bereich

der Primerbindestellen oder durch regionale Umweltfaktoren oder andere Einflüsse nicht vollständig auszuschließen ist. Anzumerken ist allerdings, dass aktuelle Literatur in diesem Bereich auf diese Verteilungsproblematik und die daraus resultierenden potentiellen Fehler nicht eingeht. Siehe beispielsweise Acuña-González *et al.*, 2021.^{49, 78}

5.3 Diskussion der Mikro Array

Der durchgeführte Mikro *Array* wies die Expression der folgenden 31 miRNA in Follikelflüssigkeit nach: **miRNA 95**, miRNA 154, miRNA 219, miRNA 31, **miRNA 10a**, miRNA let7b, **miRNA 200c**, **miRNA 10b**, miRNA 101-1, miRNA 136, miRNA 213, **miRNA 221**, **miRNA Let7c**, miRNA 25, **miRNA 204**, miRNA 183, miRNA Let7d, miRNA 28, miRNA 185, miRNA 106b, miRNA 141, **miRNA 372**, miRNA 190, **miRNA 191**, miRNA Let7i, miRNA 100, miRNA 29a, miRNA 368, miRNA 27a, miRNA 127 und miRNA 134. In anderen Arbeiten wurde bereits eine Vielzahl an Mikro-Ribonukleinsäuren in menschlicher, aber auch in Follikelflüssigkeit anderer Arten nachgewiesen.⁷⁹ Die hierzu verwendeten Methoden sind vielfältig, neben dem Einsatz von Mikro-*Arrays*, sind miRNA auch mittels *RNA-seq* und *genome-wide deep sequencing* in Follikelflüssigkeit nachgewiesen wurden.^{80, 79} Cimadomo *et al.*, 2020 wiesen in menschlicher Follikelflüssigkeit ebenfalls miRNA 10b, miRNA Let7c, miRNA Let7i und miRNA 100 nach.⁸¹ Weiterhin ist auch ein regulatorischer Einfluss auf das Follikelwachstum von extrazellulärer miRNA 204 in Follikelflüssigkeit nachgewiesen wurden.⁸² Die Expression von miRNA 372 in Follikelflüssigkeit als Teil des TP53 Pathways wurde in Zusammenhang mit der Oozytenreifung beschrieben.⁸³ Eine regulatorische Rolle der Expression von miRNA 10a in Follikelflüssigkeit auf die Expression von BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) wurde ebenfalls diskutiert. BDNF wird eine Rolle bei der Oozytenreifung und dem *outcome* nach *in vitro* Fertilisation zugeschrieben.⁸⁴ Ebenso wurde ein Einfluss von miRNA 10a auf die ovarielle Reserve nach Chemotherapie diskutiert.⁸⁵ Eine ausführliche Diskussion und Einordnung in die aktuelle Literatur der ebenfalls im Mikro-*Array* nachgewiesenen und anschließend quantifizierten miRNA 191, miRNA 200c, miRNA 221 und miRNA 27a findet sich im folgenden Abschnitt der vorliegenden Arbeit. Zu den weiteren in Follikelflüssigkeit der untersuchten Patientinnen nachgewiesenen o.g. miRNA lagen keine Studien vor.

5.4 Diskussion der quantitativen Expression von miRNA in Follikelflüssigkeit

Für die quantitative Expressionsbestimmung der miRNA 191, miRNA 200c, miRNA 221 und miRNA 27a in Follikelflüssigkeit wurden *real-time*-qPCRs durchgeführt und anschließend statistisch ausgewertet.

Das hierzu verwendete Regressionsmodell erlaubt den Einbezug von *Confoundern*. Für folgende *Confounder* hat die vorliegende Arbeit kontrolliert: BMI, Alter und Schwangerschaft nach Transfer. Die in der Regression berechneten Unterschiede in der Expression der untersuchten Mikro-Ribonukleinsäuren berücksichtigen die o.g. *Confounder*.

Ein gemeinsames Expressionsmuster von miRNA 200c und miRNA 221 in Follikelflüssigkeit konnte zum 1 % Signifikanzniveau nachgewiesen werden. In der Literatur konnte bereits eine gesteigerte Expression beider miRNA in einem 3D Modell an Tumorzellen mit somatischer *KRAS* Mutation gezeigt werden.⁸⁶ Das *KRAS*-Gen kodiert für das menschliche Homolog eines Gens, welches ursprünglich aus dem Kirsten-Ratten-Sarkom Virus isoliert wurde. Das Produkt dieses Gens, das RAS Protein, fungiert als intrazellulärer Signalüberträger. Wildtyp-Proteine haben eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Differenzierung und Seneszenz von Zellen. Somatische Varianten in *KRAS* können eine potente onkogene Wirkung verursachen, der eine wichtige Rolle bei der menschlichen Tumorentstehung zukommt.^{87,88} Driver Varianten in *KRAS* sind neben Tumorgewebe auch mittels Exom Sequenzierung in Endometriosegewebe nachgewiesen wurden.²⁰ Eine gemeinsame gesteigerte Expression beider miRNA in Follikelflüssigkeit könnte also bei Patientinnen mit Endometriose, oder somatischen Tumoren vorliegen. Daten zu Tumorerkrankung bei den Probandinnen der aktuell vorliegenden Arbeit liegen nicht vor, ebenso ist der *KRAS* Status der Probandinnen, sollten bei ihnen eine Endometriose oder eine sporadische Tumorerkrankung diagnostiziert worden sein, nicht bekannt. Die Regressionstabellen Tabelle 8 und Tabelle 9 zeigen bei den Probandinnen der vorliegenden Arbeit zwar eine positive Assoziation von miRNA 221, allerdings eine negative Assoziation zwischen miRNA 200c und dem Vorhandensein einer Endometriose. Beide Werte sind nicht statistisch signifikant, also nicht zur Auswertung dieser Fragestellung geeignet. Um

eine statistisch valide Aussage über einen eventuellen Zusammenhang zu treffen sind weitere Untersuchungen notwendig. Für eine gemeinsame Expression der untersuchten miRNA gibt es in der Literatur noch keine Angaben, hierzu konnte die vorliegende Arbeit statistisch das signifikante, gemeinsamen Expressionsmuster der untersuchten miRNA zeigen (miRNA 191 wird mit miRNA200c exprimiert, miRNA 191 wird gemeinsam mit miRNA 221 exprimiert und miRNA 200c wird mit miRNA 27a exprimiert, miRNA 221 wird gemeinsam mit miRNA 27a exprimiert).

Im durchgeführten *Array* wurde miRNA 27a in Follikelflüssigkeit nachgewiesen. Hierbei wies das Gewicht und der BMI der Patientinnen eine positive und statistisch signifikante Rangkorrelation mit der relativen Expressionsmenge von miRNA 27a auf. Auch Yao *et al.* 2017 konnten zeigen, dass in Fettgewebe, eine verstärkte Expression von miRNA27a vorliegt, sie konnten ebenso eine Assoziation zu fettreicher Ernährung herstellen.⁷⁸ Im Kontext der vorliegenden Arbeit ist dies insbesondere interessant, da bereits zahlreich der positive Zusammenhang zwischen Adipositas und Infertilität nachgewiesen wurde.⁸⁹

Patientinnen mit Tubenpathologien weisen über alle miRNA hinweg geringere Mittelwerte in der miRNA-Expression auf. Weiterhin ist miRNA 191 bei Patientinnen mit einer Tubenpathologie zu einem Signifikanzniveau von 1 % um 50 Prozentpunkte geringer exprimiert als bei Patientinnen ohne Tubenpathologie. Bei miRNA 221 ist diese Expression um 3 Prozentpunkte verringert. Aktuelle Studien zu Tubenpathologien und miRNA Expression sind nicht vorhanden. Eine Diskussion über Ursprung bzw. Regulationsmechanismen der Expression von miRNA in Follikelflüssigkeit könnte nach Validierung des vorliegenden Ergebnisses durch eine Ausweitung der Patientinnen Kohorte erfolgen.

Zum 10 % Signifikanzniveau konnte die vorliegende Dissertation eine verringerte Expression von miRNA 191 bei Patientinnen mit diagnostizierter Endometriose nachweisen. Kontrolliert man zusätzlich für Mischdiagnosen, so wird dieses Ergebnis sogar zum 5 % Niveau signifikant. Dong *et al.* 2015 zeigten bei Patientinnen mit maligne entarteter Endometriose eine Überexpression von miRNA 191, wiesen dennoch eine im Vergleich zu Patientinnen ohne

Endometriose erhöhte Expression in Endometrioseläsionen nach. Dieses unterschiedliche Expressionsmuster kann darauf hinweisen, dass es einen Mechanismus zur negativen Rückkopplung bei extrazellulär erhöhter miRNA 191 Expression gibt. Allerdings wurde auch eine erhöhte Expression der in der aktuellen Arbeit verwendeten Referenz-miRNA 16 in Endometrioseläsionen nachgewiesen.⁹⁰ Auch dies kann das unterschiedliche Expressionsmuster von miRNA 191 in Follikelflüssigkeit in dieser Arbeit zum Expressionsmuster das Dong *et al.* 2015 in Endometrioseläsionen beschreiben erklären.

Die aktuelle Arbeit konnte eine negative Korrelation zwischen relativer Expression von miRNA 191 zum Eintritt einer Schwangerschaft zeigen. Dieses Ergebnis ist zum 1 % Niveau statistisch signifikant. In der Literatur wurde bereits eine inverse Expression von miRNA 191 zum erfolgreichen Eintritt einer Schwangerschaft gezeigt. Rosenbluth *et al.*, 2014 konnten im Kulturmedium von Embryonen nach IVF eine geringere Expression von miRNA 191 nachweisen, wenn im Anschluss an den Transfer eine Schwangerschaft eintrat, als im Kulturmedium von Embryonen bei denen nach Transfer keine Schwangerschaft eintrat.⁴⁷ Weiterhin zeigten Rosenbluth *et al.* 2014 eine höhere Expression von miRNA 191 im Kulturmedium von extrakorporal befruchteten Embryos, die eine Aneuploide aufwiesen. Ebenso konnten sie eine höhere relative Expression von miRNA 191 nach ICSI, als nach IVF zeigen. Im Gegensatz dazu wiesen Acuña-González *et al.*, 2021 am fünften Tag nach IVF eine 5,2-fach erhöhte Expression von miRNA 191 im Kulturmedium von Embryonen nach, wenn nach Transfer eine Schwangerschaft eintrat. Die Studie untersuchte das Kulturmedium nach in vitro Fertilisation. Sie schlossen dabei 50 Frauen in die Studie ein. Die Daten sind zum 1 % Niveau signifikant.⁵⁰ Eine erhöhte Expression von miRNA 191 wurde ebenfalls im Speichel von Kühen, bei Ovulation nachgewiesen.⁵⁶ Diese widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse können unterschiedlich diskutiert werden. Es könnte eine (oben bereits diskutierte) unterschiedlich exprimierte Referenz-miRNA für die Abweichung ursächlich sein. Die angegebenen Expressionsunterschiede sind immer in abhängig vom Vorkommen der Referenz-miRNA. In der vorliegenden Arbeit wurde als Referenz die miRNA 16 gewählt, bei Rosenbluth *et al.*, 2014 wurde die snRNA U6 als Referenz ausgewählt. Zum anderen haben sowohl

Rosenbluth *et al.*, 2014, als auch Acuña-González *et al.*, 2021 nicht für *Confounder* kontrolliert. Eine molekularbiologische Erklärung könnte der Zeitpunkt der hier angesprochenen Messungen sein. Dong *et al.* 2015 konnten eine signifikant gesteigerte Zellproliferation und Invasion von Endometriumgewebe bei Überexpression von miRNA 191 zeigen. Ein Erklärungsversuch für die gefundenen Werte könnte also sein, dass die Sekretion von miRNA 191 zur erfolgreichen Implantation in das Endometrium benötigt wird, diese sogar stimulieren kann. So ist die Expression von miRNA 191 in Follikelflüssigkeit vor Implantation nicht notwendig, oder hätte sogar einen negativen Einfluss auf die Fertilisation. Allerdings sind weder die Datensätze der vorliegenden Arbeit noch die von Rosenbluth *et al.*, 2014 Acuña-González *et al.*, 2021 oder Dong *et al.*, 2015 ausreichend, um eine abschließende Aussage dieser Fragestellung formulieren zu können.

6. Zusammenfassung

Um in Zukunft Expression und Regulation von Genen und den pathogenetischen Einfluss u.a. auf Fertilität besser zu verstehen, ist es notwendig epigenetische Wirkmechanismen zu untersuchen. Mikro-Ribonukleinsäuren (miRNA) als Modifikatoren der Genfunktion spielen hierbei eine wichtige Rolle. Seit der Entdeckung der miRNA im Jahr 1993 werden immer mehr funktionale, modifikatorische und lokusspezifische Eigenschaften von miRNA aufgedeckt.²⁶ Um mehr Verständnis über diese potenziellen epigenetischen Modifikatoren von Fertilität zu erlangen, wurde in der vorliegenden Arbeit Follikelflüssigkeit von drei Probandinnen auf das Vorliegen von miRNA untersucht. Anschließend an den Nachweis von verschiedenen miRNA wurden eine quantitative Expressionsbestimmung dieser *real-time-qPCR* durchgeführt und auf eine Assoziation zu verschiedenen Infertilitätsfaktoren, aber auch erfolgreicher Implantation, untersucht. Diese Untersuchung konnte anhand von Follikelflüssigkeit von 72 Frauen des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) unter Leitung von Prof. Dr. med. H. M. Behre nach hormoneller Stimulation punktiert wurden, durchgeführt werden. Von diesen wiesen 61 % mindestens einen der untersuchten Infertilitätsfaktoren Endometriose, Polyzystisches Ovarialsyndrom oder Tubenpathologie auf. Bei 31 % der Probandinnen wurde ein PCOS, bei 29 % eine Endometriose und bei 14 % der Probandinnen eine Tubenpathologie diagnostiziert. Im Anschluss an die durchgeführten qPCR erfolgte eine statistische Analyse der erhobenen Daten.

Es konnte gezeigt werden, dass mehrere miRNA gemeinsam exprimiert wurden. So zeigten sich statistisch signifikante Korrelationen zwischen miRNA 200c und miRNA 221, miRNA 191 und miRNA 200c, miRNA 191 und miRNA 221, miRNA 200c und miRNA 27a, miRNA 221 und miRNA 27a.

Darüber hinaus konnte die vorliegende Arbeit nachweisen, dass statistisch signifikante Unterschiede in den relativen Expressionsmengen von verschiedenen miRNA zwischen Patientinnen mit und ohne verschiedene physische Infertilitätsfaktoren auftreten.

Ein höherer BMI ist mit einer statistisch signifikant höheren Expression von miRNA 27a assoziiert. Weiterhin zeigte die vorliegende Arbeit geringere Mittelwerte der Expression aller miRNA bei Patientinnen mit Tubenpathologien. Am stärksten war dieser Zusammenhang bei der miRNA 191, welche um 50 Prozentpunkte niedriger bei Probandinnen mit Tubenpathologien als bei Probandinnen ohne Tubenpathologien exprimiert war. Auch bei der miRNA 221 wies die vorliegende Arbeit ebenfalls eine geringere Expression bei Patientinnen mit einer Tubenpathologie nach. Aktuelle Studien zu Tubenpathologien und miRNA Expression sind in der Literatur nicht vorhanden. Patientinnen bei denen eine Endometriose und keine weiteren Infertilitätsfaktoren diagnostiziert wurden, konnte eine statistisch signifikant verminderte Expression von miRNA 191 in Follikelflüssigkeit nachgewiesen werden. Ob diese adverse Expression als Reaktion oder unabhängig von einer gesteigerten Expression der miRNA 191 in Follikelflüssigkeit ist, oder eine Diskrepanz bei erhöhter Expression der Referenz-miRNA 16 bei Patientinnen mit Endometriose ursächlich ist, kann Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Weiterhin zeigte die vorliegende Arbeit statistisch signifikante positive Assoziation von Expression der miRNA 191 zu einer erfolgreichen Implantation nach Befruchtung und Embryonentransfer. In Zusammenschau mit einer in der Literatur beschriebenen erhöhten Expression von miRNA 191 im Endometrium stellt sich die Frage, ob die von der Eizelle oder der Zona pellucida exprimierte, miRNA 191 in Zusammenhang mit der Implantation in das Endometrium steht und ob eine vorzeitige Überexpression von miRNA 191 mit Sekretion in die Follikelflüssigkeit eine erfolgreiche Schwangerschaft erschwert. Da es bei ca. 68 % der nach extrakorporaler Befruchtung transferierten Embryonen nicht zur Implantation in die Gebärmutter schleimhaut kommt, also keine Schwangerschaft eintritt, könnte die Expression von miRNA 191 zum einen in Follikelflüssigkeit, zum anderen im Kulturmedium nach IVF, ein paraklinischer prädiktiver Test zur individuellen Vorhersage des Eintritts der Implantation der befruchteten Eizelle nach assistierter Reproduktion sein. Um hierfür robuste Aussagen treffen zu können, sind allerdings weitere Untersuchungen an Follikelflüssigkeit sowie am Kulturmedium nötig. Zusammenfassend sind die Ergebnisse dieser Dissertation ein weiterer

Hinweis auf das Vorliegen von miRNA in Follikelflüssigkeit und deuten auf relevante Assoziationen zwischen der Expression der untersuchten miRNA 27a, miRNA 221, miRNA 200c und miRNA 191 in Follikelflüssigkeit und verschiedenen Fertilitätsfaktoren, aber auch dem erfolgreichen Eintritt einer Schwangerschaft hin.

7. Literaturverzeichnis

1. Keck, C. (2009). Diagnostik und Therapie des unerfüllten Kinderwunsches (Bremen: UNI-MED Verl.).
2. Blumenauer V, Czeromin U, Fehr D, Fiedler K, Gnoth C, Krüssel JS, Kupka MS, Ott A, Tandler-Schneider A, ed. (2019). D.I.R.-Jahrbuch. Deutsches IVF-Register e.V. (D·I·R)®. Jahrbuch 2018 (Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, A-3003 Gablitz).
3. Dörner, T., Feldkamp, J., Kunze, J., Pfitzmann, R., Radke, M., Schönberger, B., Straube, E. and Straube, W., eds. (2004). Pschyrembel Klinisches Wörterbuch (Berlin: De Gruyter).
4. Lasch, L., and Fillenberg, S. (2017). Basiswissen Gynäkologie und Geburtshilfe (Springer).
5. Habbema, J.D.F., Collins, J., Leridon, H., Evers, J.L.H., Lunenfeld, B., and te Velde, E.R. (2004). Towards less confusing terminology in reproductive medicine: a proposal. *Human reproduction* (Oxford, England) 19, 1497–1501.
6. Zegers-Hochschild, F., Adamson, G.D., Mouzon, J. de, Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., and van der Poel, S. (2009). The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Human reproduction* (Oxford, England) 24, 2683–2687.
7. Statista (07.09.2021). EU & Euro-Zone - Geburten 2020 | Statista, <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/248979/umfrage/geburten-in-der-europaeischen-union-eu/>.
8. Barnitzky S, Blumenauer V, Czeromin U, Fehr D, Gnoth C, Grewe C, Krüssel JS, Kupka MS, Tandler-Schneider A, Tauchert S, ed. (2020). D.I.R.-Jahrbuch. Deutsches IVF-Register e.V. (D·I·R)®. Jahrbuch 2020 (Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, A-3003 Gablitz).

9. Ding, G.-L., Liu, Y., Liu, M.-E., Pan, J.-X., Guo, M.-X., Sheng, J.-Z., and Huang, H.-F. (2015). The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. *Asian journal of andrology* 17, 948–953.
10. Abeysinghe, P., Turner, N., Morean Garcia, I., Mosaad, E., Peiris, H.N., and Mitchell, M.D. (2020). The Role of Exosomal Epigenetic Modifiers in Cell Communication and Fertility of Dairy Cows. *International journal of molecular sciences* 21.
11. Lu, T.X., and Rothenberg, M.E. (2018). MicroRNA. *The Journal of allergy and clinical immunology* 141, 1202–1207.
12. Mohr, A.M., and Mott, J.L. (2015). Overview of microRNA biology. *Seminars in liver disease* 35, 3–11.
13. Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.
14. Diedrich, K., Ludwig, M. and Griesinger, G., eds. (2013). *Reproduktionsmedizin* (Berlin: Springer).
15. Giudice, L.C., and Kao, L.C. (2004). Endometriosis. *The Lancet* 364, 1789–1799.
16. Macer, M.L., and Taylor, H.S. (2012). Endometriosis and Infertility: A Review of the Pathogenesis and Treatment of Endometriosis-associated Infertility. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* 39, 535–549.
17. Li, X., Zhang, W., Fu, J., Xu, Y., Gu, R., Qu, R., Li, L., Sun, Y., and Sun, X. (2019). MicroRNA-451 is downregulated in the follicular fluid of women with endometriosis and influences mouse and human embryonic potential. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 17, 96.
18. Zanatta, A., Rocha, A.M., Carvalho, F.M., Pereira, R.M.A., Taylor, H.S., Motta, E.L.A., Baracat, E.C., and Serafini, P.C. (2010). The role of the *Hoxa10/HOXA10* gene in the etiology of endometriosis and its related infertility: a review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 27, 701–710.

19. Petracco, R., Grechukhina, O., Popkhadze, S., Massasa, E., Zhou, Y., and Taylor, H.S. (2011). MicroRNA 135 regulates HOXA10 expression in endometriosis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96, E1925-33.
20. Anglesio, M.S., Papadopoulos, N., Ayhan, A., Nazeran, T.M., Noë, M., Horlings, H.M., Lum, A., Jones, S., Senz, J., and Seckin, T., et al. (2017). Cancer-Associated Mutations in Endometriosis without Cancer. *N Engl J Med* 376, 1835–1848.
21. Stauber, M., and Weyerstahl, T. (2007). *Gynäkologie und Geburtshilfe* (Stuttgart: Thieme).
22. Hoellen, F., and Bohlmann, M.K. (2013). Endoskopische Techniken in der Reproduktionsmedizin. In *Reproduktionsmedizin*, K. Diedrich, M. Ludwig and G. Griesinger, eds. (Berlin: Springer), pp. 174–186.
23. Broughton, D.E., and Moley, K.H. (2017). Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact. *Fertility and sterility* 107, 840–847.
24. Meier, R.K. (2018). Polycystic Ovary Syndrome. *The Nursing clinics of North America* 53, 407–420.
25. Teede, H.J., Misso, M.L., Costello, M.F., Dokras, A., Laven, J., Moran, L., Piltonen, T., and Norman, R.J. (2018). Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility* 110, 364–379.
26. Chen, B., Xu, P., Wang, J., and Zhang, C. (2019). The role of MiRNA in polycystic ovary syndrome (PCOS). *Gene* 706, 91–96.
27. Pourteymour Fard Tabrizi, Z., Miraj, S., Tahmasebian, S., and Ghasemi, S. (2020). Plasma Levels of miR-27a, miR-130b, and miR-301a in Polycystic Ovary Syndrome. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine* 9, 198–206.
28. Müller, W., and Hassel, M. (2018). *Entwicklungs und Reproduktionsbiologie* (Berlin: Springer).
29. Buselmaier, W., and Haussig, J. (2018). *Biologie für Mediziner* (Berlin: Springer).

30. Cordes, T., and Götttsching, H. (2013). Endokrine Kontrolle der Ovarfunktion. In *Reproduktionsmedizin*, K. Diedrich, M. Ludwig and G. Griesinger, eds. (Berlin: Springer), pp. 22–34.
31. Zamah, A.M., Hassis, M.E., Albertolle, M.E., and Williams, K.E. (2015). Proteomic analysis of human follicular fluid from fertile women. *Clinical proteomics* 12, 5.
32. Gosden, R.G., Hunter, R.H.F., Telfer, E., Torrance, C., and Brown, N. (1988). Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *Reproduction* 82, 813–825.
33. Griesinger, G. (2020). Ovulationsinduktion und ovarielle Stimulation. In *Reproduktionsmedizin*, K. Diedrich, M. Ludwig and G. Griesinger, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 115–141.
34. Behre, H.M., Howles, C.M., and Longobardi, S. (2015). Randomized trial comparing luteinizing hormone supplementation timing strategies in older women undergoing ovarian stimulation. *Reproductive biomedicine online* 31, 339–346.
35. Sørensen, A.E., Wissing, M.L., Salö, S., Englund, A.L.M., and Dalgaard, L.T. (2014). MicroRNAs Related to Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Genes* 5, 684–708.
36. Sørensen, A.E., Wissing, M.L., Englund, A.L.M., and Dalgaard, L.T. (2016). MicroRNA Species in Follicular Fluid Associating With Polycystic Ovary Syndrome and Related Intermediary Phenotypes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 101, 1579–1589.
37. Montazerian, M., Yasari, F., and Aghaalikhani, N. (2018). Ovarian extracellular MicroRNAs as the potential non-invasive biomarkers: An update. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 106, 1633–1640.
38. Scalici, E., Traver, S., Mullet, T., Molinari, N., Ferrières, A., Brunet, C., Belloc, S., and Hamamah, S. (2016). Circulating microRNAs in follicular fluid, powerful tools to explore in vitro fertilization process. *Scientific reports* 6, 24976.
39. Basuino, L., and Silveira, C.F. (2016). Human follicular fluid and effects on reproduction. *JBRA assisted reproduction* 20, 38–40.

40. Correia de Sousa, M., Gjorgjieva, M., Dolicka, D., Sobolewski, C., and Foti, M. (2019). Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. *International journal of molecular sciences* 20.
41. Bhaskaran, M., and Mohan, M. (2013). MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease. *Veterinary pathology* 51, 759–774.
42. Xiao, M., Li, J., Li, W., Wang, Y., Wu, F., Xi, Y., Zhang, L., Ding, C., Luo, H., and Li, Y., et al. (2017). MicroRNAs activate gene transcription epigenetically as an enhancer trigger. *RNA biology* 14, 1326–1334.
43. Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., and Lötval, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology* 9, 654-659.
44. Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20.
45. Zhang, F., and Wang, D. (2017). The Pattern of microRNA Binding Site Distribution. *Genes* 8, 296.
46. Chakraborty, C., Sharma, A.R., Sharma, G., and Lee, S.-S. (2021). Therapeutic advances of miRNAs: A preclinical and clinical update. *Journal of Advanced Research* 28, 127–138.
47. Rosenbluth, E.M., Shelton, D.N., Wells, L.M., Sparks, A.E., and van Voorhis, B.J. (2014). Human embryos secrete microRNAs into culture media—a potential biomarker for implantation. *Fertility and sterility* 101, 1493–1500.
48. Feng, R., Sang, Q., Zhu, Y., Fu, W., Liu, M., Xu, Y., Shi, H., Xu, Y., Qu, R., and Chai, R., et al. (2015). MiRNA-320 in the human follicular fluid is associated with embryo quality in vivo and affects mouse embryonic development in vitro. *Scientific reports* 5, 8689.
49. Lange, T., Stracke, S., Rettig, R., Lendeckel, U., Kuhn, J., Schlüter, R., Rippe, V., Endlich, K., and Endlich, N. (2017). Identification of miR-16 as an endogenous reference gene for the normalization of urinary exosomal miRNA expression data from CKD patients. *PloS one* 12, e0183435.

50. Acuña-González, R.J., Olvera-Valencia, M., López-Canales, J.S., Lozano-Cuenca, J., Osorio-Caballero, M., and Flores-Herrera, H. (2021). MiR-191-5p is upregulated in culture media of implanted human embryo on day fifth of development. *Reproductive biology and endocrinology (RB&E)* 19, 109.
51. (09.09.2021). Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <https://www.omim.org/entry/615150?search=miRNA%20191&highlight=191%20mirna>.
52. Mar-Aguilar, F., Luna-Aguirre, C.M., Moreno-Rocha, J.C., Araiza-Chávez, J., Trevino, V., Rodríguez-Padilla, C., and Reséndez-Pérez, D. (2013). Differential expression of miR-21, miR-125b and miR-191 in breast cancer tissue. *Asia-Pacific journal of clinical oncology* 9, 53–59.
53. Shen, J., DiCioccio, R., Odunsi, K., Lele, S.B., and Zhao, H. (2010). Novel genetic variants in miR-191 gene and familial ovarian cancer. *BMC cancer* 10, 1-8.
54. Nagpal, N., Ahmad, H.M., Molparia, B., and Kulshreshtha, R. (2013). MicroRNA-191, an estrogen-responsive microRNA, functions as an oncogenic regulator in human breast cancer. *Carcinogenesis* 34, 1889–1899.
55. Dong, M., Yang, P., and Hua, F. (2015). MiR-191 modulates malignant transformation of endometriosis through regulating TIMP3. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 21, 915–920.
56. Singh, P., Golla, N., Singh, P., Baddela, V.S., Chand, S., Baithalu, R.K., Singh, D., and Onteru, S.K. (2017). Salivary miR-16, miR-191 and miR-223: intuitive indicators of dominant ovarian follicles in buffaloes. *Molecular genetics and genomics : MGG* 292, 935–953.
57. (09.09.2021). Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <https://www.omim.org/entry/612092?search=miR%20200c&highlight=200c%20mir>.
58. Singh, P., Golla, N., Singh, P., Baddela, V.S., Chand, S., Baithalu, R.K., Singh, D., and Onteru, S.K. (2017). Salivary miR-16, miR-191 and miR-223: intuitive indicators of dominant ovarian follicles in buffaloes. *Molecular genetics and genomics : MGG* 292, 935–953.

59. Zheng, Q., Zhang, D., Yang, Y.u., Cui, X., Sun, J., Liang, C., Qin, H., Yang, X., Liu, S., and Yan, Q. (2017). MicroRNA-200c impairs uterine receptivity formation by targeting FUT4 and α 1,3-fucosylation. *Cell Death and Differentiation* 24, 2161–2172.
60. Kim, S., Choi, M.C., Jeong, J.-Y., Hwang, S., Jung, S.G., Joo, W.D., Park, H., Song, S.H., Lee, C., and Kim, T.H., et al. (2019). Serum exosomal miRNA-145 and miRNA-200c as promising biomarkers for preoperative diagnosis of ovarian carcinomas. *Journal of Cancer* 10, 1958–1967.
61. (09.09.2021). Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <https://www.omim.org/entry/300568?search=mirna%20221&highlight=221%20mirna>.
62. Meerson, A., Traurig, M., Ossowski, V., Fleming, J.M., Mullins, M., and Baier, L.J. (2013). Human adipose microRNA-221 is upregulated in obesity and affects fat metabolism downstream of leptin and TNF- α . *Diabetologia* 56, 1971–1979.
63. Robinson, C.L., Zhang, L., Schütz, L.F., Totty, M.L., and Spicer, L.J. (2018). MicroRNA 221 expression in theca and granulosa cells: hormonal regulation and function. *Journal of animal science* 96, 641–652.
64. (09.09.2021). Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <https://www.omim.org/entry/612153?search=miRNA%2027a&highlight=27a%20mirna>.
65. Adashi, E.Y., Resnick, C.E., Hernandez, E.R., May, J.V., Purchio, A.F., and Twardzik, D.R. (1989). Ovarian transforming growth factor- β (TGF β): cellular site(s), and mechanism(s) of action. *Molecular and Cellular Endocrinology* 61, 247–256.
66. Shi, C., Huang, F., Gu, X., Zhang, M., Wen, J., Wang, X., You, L., Cui, X., Ji, C., and Guo, X. (2016). Adipogenic miRNA and meta-signature miRNAs involved in human adipocyte differentiation and obesity. *Oncotarget* 7, 40830–40845.
67. Karolina, D.S., Tavintharan, S., Armugam, A., Sepramaniam, S., Pek, S.L.T., Wong, M.T.K., Lim, S.C., Sum, C.F., and Jeyaseelan, K. (2012). Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97, E2271-6.

68. Ren, Y., Fu, F., and Han, J. (2015). MiR-27a modulates radiosensitivity of triple-negative breast cancer (TNBC) cells by targeting CDC27. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 21, 1297–1303.
69. Guo, Y., Sun, J., and Lai, D. (2017). Role of microRNAs in premature ovarian insufficiency. *Reproductive biology and endocrinology (RB&E)* 15, 38.
70. Nie, M., Yu, S., Peng, S., Fang, Y., Wang, H., and Yang, X. (2015). miR-23a and miR-27a Promote Human Granulosa Cell Apoptosis by Targeting SMAD51. *Biology of Reproduction* 93, 98, 1-10-98, 1-10.
71. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408.
72. Spearman, C. (1904). The Proof and Measurement of Association between Two Things. *The American Journal of Psychology* 15, 72.
73. Einbock, S. (2018). Statistik für Ingenieure (mit Excel). Datenauswertung schnell verstehen & anwenden (Norderstedt: BoD - Books on Demand).
74. (10.09.2021). Stata Bookstore | Base Reference Manual, Release 17, <https://www.stata.com/bookstore/base-reference-manual/>.
75. Wollschläger, D. (2020). Grundlagen der Datenanalyse mit R (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).
76. Wooldridge, Jeffrey M., 1960- (2012). Introductory econometrics : a modern approach (Fifth edition. Mason, Ohio : South-Western Cengage Learning, 2012).
77. Blumenauer V, Czeromin U, Fiedler K, Gnoth C, Happel L, Krüssel JS, Kupka MS, Tandler-Schneider A, ed. D.I.R.-Jahrbuch. Deutsches IVF-Register e.V. (D·I·R)®. Jahrbuch 2014 (Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, A-3003 Gablitz).
78. Yao, F., Yu, Y., Feng, L., Li, J., Zhang, M., Lan, X., Yan, X., Liu, Y., Guan, F., and Zhang, M., et al. (2017). Adipogenic miR-27a in adipose tissue upregulates macrophage activation via inhibiting PPAR γ of insulin resistance induced by high-fat diet-associated obesity. *Experimental cell research* 355, 105–112.

79. Sang, Q., Yao, Z., Wang, H., Feng, R., Wang, H., Zhao, X., Xing, Q., Jin, L., He, L., and Wu, L., 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. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 98, 3068–3079.
80. Inoue, Y., Munakata, Y., Shinozawa, A., Kawahara-Miki, R., Shirasuna, K., and Iwata, H. (2020). Prediction of major microRNAs in follicular fluid regulating porcine oocyte development. *J Assist Reprod Genet* 37, 2569–2579.
81. Cimadomo, D., Carmelo, R., Parrotta, E.I., Scalise, S., Santamaria, G., Alviggi, E., Angelis, M.T. de, Sarro, G., Vaiarelli, A., and Venturella, R., et al. (2020). Similar miRNomic signatures characterize the follicular fluids collected after follicular and luteal phase stimulations in the same ovarian cycle. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 37, 149–158.
82. Pasquariello, R., Manzoni, E.F.M., Fiandanese, N., Viglino, A., Pocar, P., Brevini, T.A.L., Williams, J.L., and Gandolfi, F. (2020). Implications of miRNA expression pattern in bovine oocytes and follicular fluids for developmental competence. *Theriogenology* 145, 77–85.
83. Battaglia, R., Musumeci, P., Ragusa, M., Barbagallo, D., Scalia, M., Zimbone, M., Lo Faro, J.M., Borzì, P., Scollo, P., and Purrello, M., et al. (2020). Ovarian aging increases small extracellular vesicle CD81+ release in human follicular fluid and influences miRNA profiles. *Aging* 12, 12324–12341.
84. Zhang, Q., Su, J., Kong, W., Fang, Z., Li, Y., Huang, Z., Wen, J., and Wang, Y. (2021). Roles of miR-10a-5p and miR-103a-3p, Regulators of BDNF Expression in Follicular Fluid, in the Outcomes of IVF-ET. *Frontiers in Endocrinology* 12, 637384.
85. Xiao, G.-Y., Cheng, C.-C., Chiang, Y.-S., Cheng, W.T.-K., Liu, I.-H., and Wu, S.-C. (2016). Exosomal miR-10a derived from amniotic fluid stem cells preserves ovarian follicles after chemotherapy. *Scientific reports* 6, 23120.
86. Tsunoda, T., Takashima, Y., Yoshida, Y., Doi, K., Tanaka, Y., Fujimoto, T., Machida, T., Ota, T., Koyanagi, M., and Kuroki, M., et al. (2011). Oncogenic KRAS regulates miR-200c and

- miR-221/222 in a 3D-specific manner in colorectal cancer cells. *Anticancer research* 31, 2453–2459.
87. Weinberg, R. (1982). Fewer and fewer oncogenes. *Cell* 30, 3–4.
 88. Haigis, K.M. (2017). KRAS Alleles: The Devil Is in the Detail. *Trends in cancer* 3, 686–697.
 89. Silvestris, E., Pergola, G. de, Rosania, R., and Loverro, G. (2018). Obesity as disruptor of the female fertility. *Reproductive biology and endocrinology (RB&E)* 16, 22.
 90. Raja, M.H.R., Farooqui, N., Zuberi, N., Ashraf, M., Azhar, A., Baig, R., Badar, B., and Rehman, R. (2021). Endometriosis, infertility and MicroRNA's: A review. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction* 50, 102157.,

8. Thesen

- 1) Ein besseres Verständnis epigenetischer Mechanismen, wie der Expression spezifischer Mikro-Ribonukleinsäuren, kann zur besseren Diagnose und Therapie von Infertilitätsfaktoren beitragen und ein prädiktiver Parameter für den Eintritt einer Schwangerschaft sein.
- 2) Mikro-Ribonukleinsäuren können mittels *Mikro Array* in Follikelflüssigkeit nachgewiesen und mittels rt-q-PCR quantifiziert werden.
- 3) 31 verschiedene Mikro-Ribonukleinsäuren sind in Follikelflüssigkeit sowohl bei Probandinnen mit Endometriose, Adipositas, PCOS oder Tubenpathologie, als auch bei Probandinnen ohne vorliegende Infertilitätsfaktoren nachweisbar und sind dort verschieden exprimiert.
- 4) Die quantitative Expression von miRNA 191, miRNA 200c, miRNA 221 und miRNA 27a in Follikelflüssigkeit der untersuchten Probandinnen, bei denen mindestens einer der oben genannten Infertilitätsfaktoren vorliegt, unterscheidet sich von der Expression dieser miRNA bei Probandinnen ohne Vorliegen dieser Infertilitätsfaktoren.
- 5) Das Gewicht sowie der Body-Mass-Index korrelieren in der untersuchten Kohorte positiv mit der Expression von miRNA 27a in Follikelflüssigkeit.
- 6) Das Vorhandensein von Endometrioseläsionen korreliert negativ mit der Expression von miRNA 191.
- 7) Eine verringerte Expression von miRNA 191 ist mit einem Schwangerschaftseintritt nach extrakorporaler Befruchtung und Embryonentransfer assoziiert.

Anlagen / Anhang

Folgende Tabellen führen alle Mikro RNA auf, die die durchgeführten *Micro Arrays* von Signosis nachweisen können.

Tabelle 10 Untersuchte miRNA in Follikelflüssigkeit									
Micro Array Signosis II									
miR-9-1	miR-10b	miR-17-3	miR-22	miR-23a	miR-24	miR-26a	miR-26b	miR-27a	miR-27b
miR-29a	miR-29b	miR-29c	miR-30a	miR-30a	miR-30b	miR-30c	miR-92	miR-92b	miR-93
miR-95	miR-101	miR-103	miR-106a	miR-106b	miR-107	miR-128a	miR-128b	miR-132	miR-134
miR-135b	miR-136	miR-137	miR-140	miR-141	miR-142	miR-149	miR-150	miR-151	miR-153
miR-154	miR-181	miR-183	miR-185	miR-186	miR-188	miR-190	miR-191	miR-196a	miR-196b
miR-197	miR-198	miR-200b	miR-202	miR-203	miR-205	miR-210	miR-214	miR-215	miR-218
miR-219	miR-221	miR-222	miR-296	miR-372	miR-373	miR-488	miR-100	miR-127	miR-142
miR-31	miR-213	RNU48							
Micro Array Signosis III									
Let-7a	Let-7b	Let-7c	Let-7d	Let-7e	Let-7f	Let-7g	Let-7i	miR-1	miR7
miR-9	miR-10a	miR-15a	miR-15b	miR-16	miR-17-5p	miR-18a	miR-18b	miR-19a	miR-19b
miR-20a	miR-21	miR-25	miR-28	miR-34a	miR-99a	miR-122a	miR-124a	miR-125a	miR-125b
miR-126	miR-131	miR-131	miR-133a	miR-133b	miR-143	miR-145	miR-146a	miR-148a	miR-155
miR-181a	miR-181b	miR-181c	miR-182	miR-192	miR-194	miR-195	miR-199a	miR-199b	miR-199a
miR-200a	miR-200c	miR-204	miR-206	miR-216	miR-223	miR-224	miR-324	miR-368	miR-375
miR-29a	miR-29b	miR-29c	miR-30a	miR-30a	miR-30b	miR-30c	miR-92	miR-92b	miR-93
miR-95	miR-101-1	miR-103	miR-106a	miR-106b	miR-107	miR-128a	miR-128b	miR-132	miR-134
miR-135b	miR-136	miR-137	miR-140	miR-141	miR-142-3p	miR-149	miR-150	miR-151	miR-153
miR-154	miR-181d	miR-183	miR-185	miR-186	miR-188	miR-190	miR-191	miR-196a	miR-196b
miR-197	miR-198	miR-200b	miR-202	miR-203	miR-205	miR-210	miR-2014	miR-215	miR-218
miR-219	miR-221	miR-222	miR-296	miR-372	miR-373	miR-488	miR-100	miR-127	miR-142-5p
miR-31	miR-213	RNU48							

Anlagen / Anhang

<i>Micro Array Signosis IV</i>									
miR-138	miR-139	miR-105	miR-130a	miR-135a	miR-147	miR-152	miR-154	miR-184	miR-187
miR-189	miR-211	miR-212	miR-217	miR-22	miR-220	miR-299-3p	miR-299-5p	miR-301	miR-302a
miR-302a	miR-302b	miR-302b	miR-302c	miR-302c	miR-302d	miR-30d	miR-30e-3p	miR-30e-5p	miR-32
miR-320	miR-323	miR-324-3p	miR-324-5p	miR-325	miR-326	miR-328	miR-329	miR-33	miR-330
miR-331	miR-335	miR-337	miR-338	miR-339	miR-33b	miR-340	miR-345	miR-346	miR-34b
miR-34c	miR-361	miR-362	miR-363	miR-363	miR-365	miR-367	miR-369-3p	miR-369-5p	miR-370
miR-371	miR-373	miR-374	miR-376a	miR-376a	miR-376b	miR-377	miR-378	miR-379	miR-380-3p
miR-380-5p	miR-381	miR-382	miR-383	miR-384	miR-409-5p	miR-410	miR-411	miR-412	miR-422a
miR-422b	miR-423	miR-424	miR-425	miR-425-5p	miR-429	miR-234	miR-432	miR-433	miR-448
miR-449	miR-449b	miR-450	miR-451	miR-452	miR-452	miR-453	miR-455	miR-483	U6

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet (Amtsblatt der MLU Nr. 5, 02.07.09). Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Datum:

Unterschrift:

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich keinen vorausgegangenen Promotionsversuch unternommen habe, und dass kein Promotionsversuch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung im In- oder Ausland läuft.

Datum:

Unterschrift:

Danksagung

„Wenn ich weiter sehen konnte, so deshalb, weil ich auf den Schultern von Riesen stand“

Isaac Newton

Ohne Follikelflüssigkeit wäre der Nachweis von miRNA in dieser nicht möglich gewesen. Deshalb gilt mein größter Dank den Probandinnen der vorliegenden Arbeit für Ihre Einwilligung und Teilnahme, ebenso wie Prof. Dr. med. Hermann M. Behre für die Ermöglichung der Durchführung der Untersuchungen zum einen an Follikelflüssigkeit, zum anderen mittels moderner molekulargenetischer Methoden und Materialien. Während meiner Zeit am Forschungslabor des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikum Halle (Saale), in der ich die praktischen Arbeiten der vorliegenden Arbeit durchführen konnte, sowie während des Schreibens an der vorliegenden Dissertation, wurde ich von Dr. rer. nat. Thomas Greither betreut. Ihm danke ich für das mir vermittelte Wissen und das mir gegebene Vertrauen. Für die Einarbeitung und den freundlichen Empfang im Labor möchte ich mich insbesondere bei Ariane Klemm bedanken. Auch weiteren Mitarbeiterinnen des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie gilt mein Dank für die bestmögliche Unterstützung: Dr. rer. nat. Maria Giebler, Sabine Moosdorf, Gabriele Wiener und Ina Nelles.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie es mir ermöglicht haben mich in meinem Freisemester vollständig auf die Expression von miRNA in Follikelflüssigkeit konzentrieren zu können. Durch eure liebende Unterstützung und eure Stärke war mir schon immer der Weg geebnet. In diesem Sinne gilt mein Dank auch meiner ganzen Familie: meinen Großeltern, die immer an mich geglaubt haben, Maria, Hans, Raja und Max, die mich immer unterstützen.

Insbesondere bedanke ich mich bei meinem Ehemann, Matthias, der mit mir „*On- and Off-topic*“ diskutiert, mich und meine Ziele wertschätzt und der es schafft mich jeden Tag glücklich zu machen.

In tiefer Dankbarkeit