

**Regulation der Dipeptidyl-Peptidase 4 Expression durch Androgene
bei Patientinnen mit Polycystischem Ovarsyndrom**

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

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

von Anna Tamara John geb. Hille

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

Gutachter: PD Astrid Kehlen, Halle (Saale)
Prof. Undraga Schagdarsurengin, Gießen
Prof. Peter Würfl, Dessau

Datum der Verteidigung: 23.08.2024

Referat und bibliographische Angaben

Das Polycystische Ovarsyndrom (PCOS) ist eine der häufigsten endokrinen Erkrankung der Frau im reproduktiven Alter, welches auch mit einer reduzierten Fertilität einhergeht. Ein zentraler Stellenwert in der Pathophysiologie dieses Syndroms kommt dabei dem Hyperandrogenismus zu.

Die genauen Zusammenhänge zwischen den Ursachen und dem Pathomechanismus des PCOS sind bis heute nicht abschließend geklärt. Diese Arbeit untersucht die Androgenregulation der Dipeptidyl-Peptidase 4 (DPP4), einem Enzym, welches einen Angriffspunkt zur Behandlung des PCOS bietet.

In dieser Arbeit konnte an Zellen der KGN und COV 434 eine Expressionssteigerung der DPP4-mRNA durch Testosteron und Dihydrotestosteron gezeigt werden. Tendenzen dieses Zusammenhangs konnten durch die gesteigerte Expression des DPP4-Proteins im Zellkulturüberstand bestätigt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass typische metabolische Veränderungen des PCOS wie Hyperinsulinämie und Hyperglykämie keinen Einfluss auf die mRNA-Expression der DPP4 *in vitro* haben. Weiterführend wurde der Einfluss verschiedener Behandlungsstrategien des PCOS auf die *in vitro* Expression von DPP4 untersucht. Es zeigte sich, dass die Behandlung von Granulosakarzinomzellen mit Sitagliptin, einem DPP4-Hemmer, tendenziell eine verringerte mRNA-Expression bedingt. Durch die Behandlung mit Metformin konnte eine Steigerung der mRNA-Expression in beiden Zelllinien gezeigt werden.

Zur Untersuchung des Einflusses einer Promotermethylierung der DPP4 wurde die Expression der DPP4 auf mRNA- und Proteinebene in KGN und COV 434 nach der Behandlung mit 5'Aza-2-Desoxycytidin untersucht. Es konnte auf mRNA- und Proteinebene eine Expressionssteigerung nachgewiesen werden. Eine epigenetische Regulation der DPP4 ist dadurch anzunehmen und weiter zu untersuchen.

Ob der zentralen Stellung der DPP4 im Stoffwechsel und einer in dieser Arbeit gezeigten Regulation durch Androgene sollte im klinischen Setting die Bedeutung der DPP4 aufgezeigt werden. Dazu wurden DPP4-Aktivität und -Konzentration bei Kinderwunschpatientinnen (n = 103) und Kinderwunschpatienten (n = 63) im Serum untersucht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der DPP4-Aktivität oder -Konzentrationen bei Kinderwunschpatientinnen mit verschiedenen fertilitätseinschränkenden Erkrankungen gezeigt werden. Außerdem konnte kein Zusammenhang zwischen der DPP4-Aktivität und -Konzentration und dem Zustandekommen einer Schwangerschaft oder einem Abortrisiko gezeigt werden.

John, Anna Tamara: Regulation der Dipeptidyl-Peptidase 4 Expression durch Androgene bei Patientinnen mit Polycystischem Ovarsyndrom, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 64 Seiten, 2023

Inhaltsverzeichnis

Deckblatt

Referat

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

1	Einleitung	1
1.1	Unerfüllter Kinderwunsch	1
1.2	Weibliche Unfruchtbarkeit	1
1.3	Das Polycystische Ovarsyndrom	2
1.3.1	Diagnose des PCOS.....	2
1.3.2	Pathomechanismus und Hyperandrogenismus des PCOS.....	3
1.3.3	Metabolische Veränderungen beim PCOS.....	5
1.3.4	Behandlung des PCOS.....	6
1.4	Dipeptidyl-Peptidase 4	7
1.4.1	Struktur und Funktion.....	8
1.4.2	Regulation der DPP4	9
1.4.3	DPP4 im Insulinstoffwechsel	9
1.4.4	DPP4-Hemmer	10
2	Zielstellung	11
3	Material und Methoden	12
3.1	Materialien	12
3.1.1	Laborgeräte.....	12
3.1.2	Verbrauchsmittel	12
3.1.3	Chemikalien und Reagenzien	13
3.1.4	Puffer und Lösungen	14
3.1.5	Reaktionskits	15
3.1.6	Enzyme.....	16
3.1.7	Oligonukleotide.....	16
3.1.8	Antikörper	16

3.1.9	Zellen.....	17
3.1.10	Patientenproben.....	17
3.1.11	Verwendete Software.....	18
3.2	Zellbiologische Methoden.....	18
3.2.1	Zellkultivierung.....	18
3.2.2	Behandlung der Zellen.....	19
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	21
3.3.1	RNA spezifische Untersuchungen.....	21
3.3.2	Protein spezifische Untersuchungen.....	23
3.4	Analytik in Patientenserum.....	25
3.4.1	DPP4-Konzentrationsbestimmung.....	25
3.4.2	DPP4-Aktivitätsbestimmung.....	26
3.5	Statistische Methoden.....	26
4	Ergebnisse.....	27
4.1	Regulation der DPP4 unter Androgen- und Östrogeneinfluss.....	27
4.1.1	Androgeneffekte auf die Expression der DPP4-mRNA.....	27
4.1.2	Androgeneffekte auf die DPP4-Proteinexpression.....	29
4.2	Regulation der DPP4 durch metabolische Veränderungen.....	31
4.2.1	Effekte auf die DPP4-mRNA-Expression.....	32
4.2.2	Effekte auf die DPP4-Proteinexpression.....	35
4.3	Analyse der Promotoraktivität der DPP4 durch 5'-Aza-2-Desoxycytidin.....	36
4.3.1	Analyse der mRNA-Expression von DPP4 nach 5'-Aza-2-Desoxycytidin- Behandlung.....	37
4.3.2	Analyse der DPP4-Proteinexpression nach 5'-Aza-2-Desoxycytidin- Behandlung.....	37
4.4	Auswertung der Patientenproben.....	40
4.4.1	Beschreibung der Kohorte.....	40
4.4.2	Zusammenhang Aktivität und Konzentration.....	40
4.4.3	Korrelation zwischen Aktivität, Konzentration und Alter.....	40
4.4.4	Aktivität und Konzentration bei Frauen und Männern.....	41

4.4.5	Aktivität und Konzentration in Abhängigkeit von der fertilitätseinschränkenden Diagnose.....	42
4.4.6	Aktivität und Konzentration im Zusammenhang mit dem Outcome Schwangerschaft.....	44
4.4.7	Aktivität und Konzentration im Zusammenhang mit dem Outcome Abort.....	47
5	Diskussion.....	49
5.1	Regulation der DPP4 unter Androgen- und Östrogeneinfluss	49
5.2	Regulation der DPP4 durch metabolische Veränderungen	50
5.3	Regulation der DPP4 durch 5´-Aza-2-Desoxycytidin.....	51
5.4	Analyse der Konzentration und Aktivität von DPP4 im Serum von Kinderwunschpatientinnen	52
5.4.1	Zusammenhang zwischen Aktivität und Konzentration und Alter.....	52
5.4.2	Vergleich zwischen den Aktivitätsleveln und Konzentrationen von Männern und Frauen.....	53
5.4.3	Aktivität und Konzentration in Abhängigkeit von der fertilitätseinschränkenden Diagnose.....	53
5.4.4	Aktivität und Konzentration im Zusammenhang zum Outcome Schwangerschaft und Abort	54
6	Zusammenfassung.....	56
7	Literaturverzeichnis.....	57
	Thesen.....	64
	Erklärungen	
	Danksagungen	

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Δ	Delta
μL	Mikroliter
μM	Mikromol
AMH	Anti-Müller-Hormon
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP-1 Faktor	Aktivator Protein 1
AST	Aspartat-Aminotransferase
bp	Basenpaare
BMI	<i>Body mass index</i>
c	Konzentration
cDNA	complementary DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleosic acid
DNase	Desoxyribonuklease
DNMT1	DNA-(Cytosin-5)-Methyltransferase 1
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DPP4	Dipepidylpeptidase 4
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESHRA	European Society of Human Reproduction and Embryology
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GIP	Glukoseabhängiges insulinotropes Peptid
Gli	Sitagliptin
GLP-1	Glucagon-like Peptid 1
Glu	Glukose
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon

h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HbA1c	glykiertes Hämoglobin
HCl	Chlorwasserstoff
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
Ins	Insulin
L	Liter
LH	Luteinisierendes Hormon
M	Mol
M _{Rang}	statistischer Rang
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger RNA
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NaCl	Natriumchlorid
NFκB	Nuclear factor of activated B cells
p	Signifikanz
PBS	Phosphate buffered saline
PCOS	Polycystisches Ovarsyndrom
PCR	Polymerase Chain Reaction
R	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonucleid acid
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
sDPP4	lösliche Dipeptidylpeptidase 4
pH	Potentia Hydrogenii
SHBG	Sexualhormonbindendes Globulin
T	Testosteron
TBS-(T)	Tris-buffered Saline (and Tween 20)
U	Unit
V	Volt
V	Volumen
xg	G-Zahl

1 Einleitung

1.1 Unerfüllter Kinderwunsch

Die WHO definiert Infertilität als eine Erkrankung des reproduktiven Systems. Die Diagnose wird gestellt, wenn keine Schwangerschaft nach 12 oder mehr Monaten ungeschützten Geschlechtsverkehrs erreicht wird (Zegers-Hochschild et al., 2009).

Dabei wird von primärer Infertilität gesprochen, wenn noch keine Schwangerschaft zustande gekommen ist. Eine sekundäre Infertilität liegt vor, wenn es bereits einmal zur spontanen Konzeption gekommen ist und anschließend eine Phase ungewollter Kinderlosigkeit eintritt (Strauss, Beyer, 2004).

Weltweit sind geschätzt mindestens 9 % aller Paare im reproduktiven Alter von ungewollter Kinderlosigkeit betroffen (Boivin et al., 2007).

Davon bleiben 3 % aller Paare auch mit medizinischer Unterstützung dauerhaft kinderlos (Strauss, Beyer, 2004).

Unerfüllter Kinderwunsch kann biologische, psychologische und soziale Ursachen haben, die sowohl auf Seiten des männlichen Partners als auch der weiblichen Partnerin oder bei beiden Partnern zu finden sein können. In 40 % der Fälle liegt sowohl beim Mann als auch bei der Frau eine biologische Ursache vor (Strauss, Beyer, 2004). In 10-15 % kann keine organische oder psychische Ursache festgestellt werden (Wischmann, 2006).

Die Behandlung der Infertilität eines Paares erfolgt zumeist interdisziplinär durch unter anderem Andrologen, Gynäkologen, Urologen, Reproduktionsbiologen und Humangenetiker.

Die Erfüllung des Kinderwunsches kann u.a. durch Spontanschwangerschaft, Adoption oder mit Hilfe reproduktionsmedizinischer Maßnahmen ermöglicht werden (Strauss, Beyer, 2004).

1.2 Weibliche Unfruchtbarkeit

Die Ursachen für die weibliche Unfruchtbarkeit sind mannigfaltig.

Ein wichtiger Aspekt der weiblichen Fertilität ist das Alter, denn die Wahrscheinlichkeit für eine Schwangerschaft nimmt mit steigendem Alter ab. So beträgt die Wahrscheinlichkeit innerhalb eines Jahres schwanger zu werden und ein Kind zu gebären mit 30 Jahren 75 % und mit 35 Jahren 66 % (Dunson et al., 2004).

Durch den Anstieg des Alters beim ersten Kind trifft 30 % der Frauen eine zeitweise ungewollte Kinderlosigkeit (Strauss, Beyer, 2004).

Des Weiteren können Life-style-assoziierte Gründe eine ausbleibende Schwangerschaft bedingen. Essstörungen, Leistungssport sowie Alkohol- und Medikamentenabusus sind als fertilitätsschädigendes Verhalten beschrieben (Schilling et al., 2012).

Als organische Ursache für eine Infertilität bei der Frau ist zum Ersten eine Infektion mit *Chlamydia trachomatis* zu nennen. Diese kann zu einer Verklebung der Eierstöcke führen, und dadurch mit einer herabgesetzten Fertilität einhergehen (Guven et al., 2007).

Eine weitere häufige Ursache ist die, bei 30-40 % der Frauen mit unerfülltem Kinderwunsch beschriebene, Endometriose (Alborzi et al., 2019). Bei dieser chronischen Erkrankung findet sich gebärmutter schleimhaut-ähnliches Gewebe außerhalb der Gebärmutter. Daraus resultieren u.a. Verklebungen und Adhäsionen der Eileiter (Catenacci, Falcone, 2008). Für die Entwicklung von Endometriose sind verschiedene immunologische, genetische und umweltbedingte Einflüsse relevant (Abrao et al., 2013).

Weitere, aber seltenere, organische Ursachen für weibliche Unfruchtbarkeit können primäre Ovarialinsuffizienz, Tuben- und Uteruspathologien sein (Abrao et al., 2013; Vander Borcht, Wyns, 2018).

Eine der wichtigsten Ursachen für weibliche Infertilität ist das polycystische Ovarsyndrom (PCOS), die unter Frauen im gebärfähigen Alter häufigste Endokrinopathie.

1.3 Das Polycystische Ovarsyndrom

Das Polycystische Ovarsyndrom (PCOS) ist eine der häufigsten endokrinen Erkrankungen von Frauen. 5-10 % aller Frauen im reproduktiven Alter sind von dieser Erkrankung betroffen (Sawant, Bhide, 2019).

1.3.1 Diagnose des PCOS

Zur Diagnosestellung dieser heterogenen Krankheit werden seit 2003 die von der *European Society for Human Reproduction* (ESHRE) beschriebenen Kriterien herangezogen. Von den folgenden drei Kriterien müssen zwei erfüllt sein. Die Kriterien umfassen: einen klinischen oder biochemischen Hyperandrogenismus, Oligo- oder Amenorrhoe sowie die Darstellung von polycystischen Ovarien in der Sonographie (Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS), 2004).

Hyperandrogenismus kann durch die biochemische Messung des freien Testosterons oder durch die klinische Beschreibung typischer Veränderungen wie Hirsutismus, Haarausfall oder Akne diagnostiziert werden.

Bei einem Zyklus von über 35 Tagen wird von Oligomenorrhoe gesprochen. Der Begriff Amenorrhoe beschreibt das Ausbleiben der Menstruation für über drei Monate. Durch die beschriebenen Zyklusstörungen kommt es seltener zu einer Eizprung und damit sinkt die Wahrscheinlichkeit der Konzeption.

Die sonographischen Kriterien sind mehr als 12 Follikel mit einem Durchmesser von 2-9 mm oder ein Gesamtvolumen von über 10 ml (Kyritsi et al., 2017).



Abbildung 1: vaginaler Ultraschall mit polycystischen Ovar (freundlicherweise überlassen von Frau Dr. Kaltwaßer und Frau Dr. Köller, ZRA), 1: Darstellung des Ovars, 2: Darstellung der perlschnurartigen Anordnung der Zysten

Um die Diagnose PCOS stellen zu können, müssen Erkrankungen, die einen ähnlichen Phänotyp bedingen, ausgeschlossen werden. Dazu gehören Erkrankungen der Hirnanhangsdrüse, der Nebennieren, der Schilddrüse und der Ovarien. Häufige Pathologien sind Schilddrüsenerkrankungen und Hyperprolaktinämien. Seltene Erkrankungen umfassen das Cushing-Syndrom sowie androgenproduzierende Tumore (Kyritsi et al., 2017).

40 % der Patientinnen mit PCOS sind von Infertilität betroffen. PCOS ist damit die häufigste Ursache der anovulatorischen Infertilität (Sirmans, Pate, 2013).

Eine Einschränkung der Fertilität von PCOS-Patientinnen ist auf einen Stillstand des Antralfollikelwachstums in den letzten Stadien der Reifung auf Grund einer niedrigen FSH-Konzentration zurückzuführen. Durch die begrenzte Follikelreifung bleibt eine Ovulation aus (Badawy, Elnashar, 2011).

Bei Frauen mit PCOS ist eine Folge der vermehrten Anhäufung kleiner Antralfollikel die Erhöhung des Anti-Müller-Hormon (AMH)-Spiegels. Bei Patientinnen mit PCOS sind die Serumspiegel von AMH und LH positiv miteinander korreliert. Diese Korrelation ist vom Androgenspiegel unabhängig (Dewailly et al., 2020).

Diese hormonellen Veränderungen werden in einem erhöhten LH/FSH-Quotienten deutlich (Sanchez-Garrido, Tena-Sempere, 2020).

1.3.2 Pathomechanismus und Hyperandrogenismus des PCOS

Aufgrund einer Vielzahl von Studien wird vermutet, dass entwicklungstechnische, umweltbedingte, genetische und epigenetische Mechanismen zur Entwicklung des PCOS beitragen können (Sanchez-Garrido, Tena-Sempere, 2020).

Bereits während der Schwangerschaft wirken verschiedene Faktoren prädisponierend für die Entwicklung eines PCOS-ähnlichen Phänotyps. Dazu zählen erhöhte AMH-Spiegel, Wachstumseinschränkungen und Androgenüberschuss (Sanchez-Garrido, Tena-Sempere, 2020). Verschiedene Studien beschreiben pränatale epigenetische Veränderungen nach einer frühen Überexpression von Androgenen im Zusammenhang mit der Entstehung des PCOS. Beispielsweise konnte eine Hypomethylierung spezifischer CpGs in der Promotorregion verschiedener Steroidgene im Tiermodell nachgewiesen werden (Salehi et al., 2018).

Patientinnen mit der Diagnose PCOS zeigen oftmals eine erhöhte pulsative Freisetzung von GnRH, was sich in einer erhöhten LH-Konzentration und einem erhöhten LH/FSH-Quotienten äußert (Tanbo et al., 2018; Rashid et al., 2022).

Die erhöhte GnRH-Expression lässt sich u.a. durch Insulin, besonders eine Hyperinsulinämie, erklären. Des Weiteren fördert AMH die Freisetzung von GnRH (Kim et al., 2005; Sanchez-Garrido, Tena-Sempere, 2020).

Eine weitere Ursache der LH-Erhöhung sehen verschiedene Autoren in der neuroendokrinen Dysregulation infolge eines Defektes der Regulationsmechanismen durch Sexualhormone.

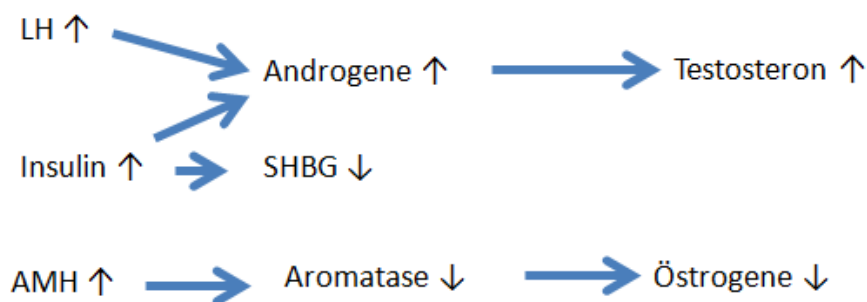


Abbildung 2: Darstellung des endokrinen Pathomechanismus des PCOS

Eine Störung der Produktion und des Metabolismus verschiedener Sexualhormone ist für die Entstehung eines PCOS essentiell. Eine zentrale Rolle kommt dabei dem Hyperandrogenismus zu (Deswal et al., 2018).

Die Bildung von Androgenen erfolgt bei Patientinnen mit PCOS überwiegend in den Eierstöcken und zusätzlich in der Nebenniere, dabei ist Cytochrom P450c17 das geschwindigkeitsbegrenzende Enzym. Die Regulation von Cytochrom P450c17 erfolgt mittels parakriner Hemmung durch Androgene und Östradiol sowie stimulierend durch Insulin und IGF-1 (Sanchez-Garrido, Tena-Sempere, 2020).

Für die Entstehung des Hyperandrogenismus sind verschiedene Aspekte verantwortlich. LH stimuliert die Androgensynthese in den Thekazellen und FSH stimuliert die Aromatase und damit die Umwandlung von Androgenen zu Östrogenen in den Granulosazellen. Durch einen erhöhten LH-Spiegel wird so die Androgenproduktion erhöht, während die niedrigeren FSH-Spiegel die Östrogenproduktion nicht erhöhen können (Tanbo et al., 2018). Erhöhte AMH-Spiegel hemmen die Umwandlung von Androgenen in Östrogen und bedingen somit teilweise einen ovariellen Hyperandrogenismus (Tanbo et al., 2018). Übergewicht bzw. Fettleibigkeit sensibilisieren die Thekazellen bzgl. ihrer Empfindlichkeit gegenüber LH, was zu einem ovariellen Hyperandrogenismus führt (Louwers, Laven, 2020). Außerdem wird die Androgenbildung in den Ovarien durch eine Hyperinsulinämie gesteigert (Sanchez-Garrido, Tena-Sempere, 2020). Des Weiteren bewirkt eine Hyperinsulinämie eine verringerte Produktion und Freisetzung von SHBG in der Leber. Diese verminderte SHBG-Konzentration im Serum bedingt eine Erhöhung des freien Testosterons (Diedrich, 2013; Deswal et al., 2018). Außerdem können Umweltfaktoren indirekt auf die Entstehung eines Hyperandrogenismus bei PCOS-Patientinnen Einfluss nehmen. So bewirken unangemessene Ernährungsgewohnheiten und sitzende Lebensweise Adipositas und Insulinresistenz mit folgender Hyperinsulinämie (Sanchez-Garrido, Tena-Sempere, 2020). Ein ovarieller Hyperandrogenismus bedingt typische Beschwerden von PCOS-Patientinnen wie Hirsutismus, Akne, Anovulation und Infertilität (Sawant, Bhide, 2019; Sanchez-Garrido, Tena-Sempere, 2020). Es ist erforderlich weitere Informationen zu den umfassenden Mechanismen der Androgenwirkungen zu gewinnen. Außerdem ist bisher ungeklärt, ob Androgene durch die Regulation der DPP4 möglicherweise auch auf metabolische Veränderungen Einfluss nehmen.

1.3.3 Metabolische Veränderungen beim PCOS

40-60 % aller vom PCOS betroffenen Frauen sind übergewichtig oder adipös (Swant, Bhide, 2019).

70 % aller Frauen mit PCOS weisen eine Insulinresistenz oder verwandte Stoffwechselstörungen auf (He et al., 2020). Dabei sind nicht nur adipöse oder übergewichtige Frauen, sondern auch untergewichtige Frauen mit PCOS betroffen (Sanchez-Garrido, Tena-Sempere, 2020).

Die gestörte Insulinwirkung bedingt eine kompensatorische Hyperinsulinämie (Sanchez-Garrido, Tena-Sempere, 2020).

Allerdings bleibt die Insulinsensitivität der Ovarien entgegen der peripheren Insulinresistenz bestehen (Baillargeon, Nestler, 2006).

Ein hoher Androgenspiegel korreliert bei Frauen mit einer Ansammlung von viszeralem Fettgewebe, was, ebenso wie Diabetes mellitus, ein Risikofaktor für die Ausprägung eines metabolischen Syndroms ist (Borrue et al., 2013).

Das metabolische Syndrom ist eine Gruppe metabolischer Erkrankungen, die Adipositas, Hyperglykämie, Insulinresistenz, Dyslipidämie und erhöhten Blutdruck umfasst. Es wird vermutet, dass die Assoziation des metabolischen Syndroms mit PCOS möglicherweise androgenvermittelt ist (Louwers, Laven, 2020).

Diabetes mellitus, als mögliche Folge einer Insulinresistenz, geht des Weiteren mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse einher.

Die Prävalenz eines metabolischen Syndroms bei Frauen mit PCOS beträgt 25-33 % (Saklayan, 2018; Sawant, Bhide, 2019). Des Weiteren gibt es verschiedene Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen PCOS und der Entwicklung einer nicht-alkoholischen Fettleberkrankheit (Rocha et al., 2017).

Mit steigendem Alter nehmen die metabolischen Komplikationen des PCOS wie Diabetes mellitus Typ 2, Dyslipidämie und erhöhtes kardiovaskuläres Risiko zu. Mit dem Zeitpunkt der Diagnose ist es deswegen entscheidend Hochrisikopatientinnen zu erkennen und eine Strategie zur Vermeidung von Langzeitkomplikationen zu entwickeln (Louwers, Laven 2020).

1.3.4 Behandlung des PCOS

Es gibt derzeit keine einheitliche Therapie zur Behandlung des PCOS und der damit einhergehenden metabolischen Veränderungen.

Bei der Behandlung von adipösen Patientinnen besteht die erste therapeutische Option in Ratschlägen zu verschiedenen Lebensstil-Interventionen, denn ein erhöhtes Körpergewicht ist mit einer fehlenden oder verzögerten Ansprechrage verschiedener Interventionen vergesellschaftet. (Badawy, Elnashar, 2011).

Durch die Verringerung des Körpergewichtes kann sich das metabolische und hormonelle Gleichgewicht verbessern (Lim et al., 2019).

Um eine Gewichtsreduktion herbeizuführen kann neben Lebensstil-Interventionen, die auf vermehrte Bewegung und einer ausgewogenen Ernährung abzielen, auch die bariatrische Chirurgie berücksichtigt werden.

Bereits ab einer Reduktion des Körpergewichtes um 5-10 % verbessert sich die Funktion der Ovarien (Badawy, Elnashar, 2011).

Bei Patientinnen mit Kinderwunsch kann medikamentös eine Ovulation ausgelöst werden. Die Erstlinienbehandlung umfasst eine Ovulationsinduktion durch Clomiphencitrat. Clomiphencitrat

hemmt als Östrogenrezeptorantagonist die negative Rückkopplung und erhöht somit die Konzentration von FSH (Badawy, Elnashar, 2011).

Die Ovulationsrate liegt bei 70-85 % pro Zyklus, während die kumulative Lebensgeburtenrate bei einer Behandlung mit bis zu sechs Zyklen zwischen 50-60 % liegt (Sirmans, Pate, 2013).

Bei Resistenz oder Versagen einer Clomiphencitratbehandlung kann alternativ Tamoxifen gegeben werden. Weitere vielversprechende ovulationsauslösende Wirkstoffe sind selektive Aromatasehemmer wie Anastrozol und Letrozol.

Die Applikation von exogenen Gonadotropinen ist eine mögliche Zweitlinientherapie. Mögliche Nebenwirkungen dieser Therapie sind multiple Follikelentwicklungen und damit verbunden das Risiko eines ovariellen Überstimulationssyndroms (Badawy, Elnashar, 2011).

Als letztes Mittel bietet sich Patientinnen mit PCOS die Möglichkeit einer in-vitro-Fertilisation (Badawy, Elnashar, 2011).

Bei Patientinnen ohne Kinderwunsch wird eine Verabreichung von oralen Kontrazeptiva empfohlen, um die Proliferation der Gebärmutterschleimhaut zu hemmen. Außerdem kann die ovarielle Androgenproduktion und dadurch die Ausprägung von Akne und Hirsutismus durch orale Kontrazeptiva verringert werden (Badawy, Elnashar, 2011).

Verschiedene Studien zeigen, dass Metformin die Serumspiegel von Insulin und Androgen senkt und den SHBG-Serumspiegel erhöht (Sanchez-Garrido, Tena-Sempere, 2020).

Eine off-label Anwendung des Insulinsensitizers Metformin über mehrere Monate kann somit zur Normalisierung des Zyklus beitragen (Diedrich, 2013).

Glucagon-like-peptid-1-Analoga können einen positiven Effekt auf die Insulinresistenz und Gewichtsentwicklung haben (Sanchez-Garrido, Tena-Sempere, 2020).

Im Tierversuch zeigten DPP4-Hemmer sich als effektive therapeutische Option zur Behandlung von metabolischen Veränderungen bei PCOS typischen Phänotypen (Abdalla et al., 2020).

1.4 Dipeptidyl-Peptidase 4

Die Dipeptidyl-Peptidase (DPP4) ist auch als CD 26 bekannt. Es ist ein ubiquitär exprimiertes Glykoprotein. Die Bedeutung der DPP4 für den klinischen Alltag als auch für die medizinische Forschung zeigt sich in der Zulassung der DPP4-Inhibitoren als orale Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 (Röhrborn et al., 2015).

Des Weiteren sind die Regulationsmechanismen und Zusammenhänge der Transkription und enzymatischen Aktivität noch nicht vollständig erforscht.

1.4.1 Struktur und Funktion

Die DPP4 liegt zum einen als Transmembranprotein vom Typ II und zum anderen in löslicher Form vor (Röhrborn et al., 2015).

Klassischerweise existiert DPP4 als Membranprotein mit einer intrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne, einer flexiblen Region und einer extrazellulären Domäne.

Die lösliche DPP4 (sDPP4) resultiert aus der Entfernung der Transmembran- und intrazellulären Domäne (Nistala, Savin, 2017).

Die DPP4 wird unter anderem auf Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Leukozytenuntergruppen exprimiert (Röhrborn et al., 2015; Nistala, Savin, 2017).

Auf den Zelloberflächen kann DPP4 als Monomer, Homodimer oder als Homotetramer gefunden werden.

Als Serinprotease spaltet die DPP4 verschiedene Substrate u.a. das Glukagon-like-Peptid 1 (GLP-1), das glukoseabhängige insulinotropes Peptid (GIP) und Substanz P. Die DPP4 ist eine Exopeptidase, die Dipeptide von der vorletzten N-terminalen Position ihrer Substrate abspaltet (Röhrborn et al., 2015).

Die lösliche Form der DPP4 kann parakrin und endokrin wirken (Röhrborn et al., 2015).

Des Weiteren kann die Serumaktivität der löslichen DPP4 ein Indikator für physiologische oder immunologische Stadien sein. Es konnte gezeigt werden, dass Patientinnen und Patienten mit rheumatoider Arthritis geringere Aktivitäten löslicher DPP4 als gesunde Probanden haben (Lin et al. 2019).

Außerdem konnte die lösliche Form der DPP4 als Adipokin identifiziert werden, das mit verschiedenen Markern des metabolischen Syndroms, wie BMI, Taillenumfang und Plasma-Triglyceriden, korreliert.

Die Serumspiegel der löslichen DPP4 sind bei vielen pathophysiologischen Zuständen, einschließlich verschiedener Krebsarten, allergischem Asthmas oder Hepatitis C, verändert (Röhrborn et al., 2015).

Genau wie die lösliche Form ist die membrangebundene Form der DPP4 ein Marker für die Aktivität verschiedener Krankheiten wie beispielsweise der Hashimotothyreoiditis (Lin et al., 2019).

Darüber hinaus kann DPP4 als ko-stimulatorisches Molekül für die T-Zell-Aktivierung dienen und eine Entzündung fördern (Nargis, Chakrabarti, 2018).

Zusätzlich kann eine Beteiligung der DPP4 an der Reifung und Migration von Immunzellen und der Zytokinsekretion angenommen werden (Röhrborn et al., 2015).

1.4.2 Regulation der DPP4

Die Regulationsmechanismen sind noch nicht vollständig erforscht.

Das Gen für die DPP4 liegt beim Menschen auf Chromosom 2 und besteht aus 26 Exonen. Die Promotorregion enthält Bindungsstellen für verschiedenste Transkriptionsfaktoren wie NF κ B, SP-1, EGFR und AP-1-Faktor NF-1 (Röhrborn et al., 2015).

Es konnte gezeigt werden, dass die Interferone α , β und γ die DPP4-Expression und –Aktivität erhöhen (Röhrborn et al., 2015).

Ferner konnte belegt werden, dass ein niedriger Sauerstoffgehalt die DPP4-Sekretion von glatten Muskelzellen erhöht (Nargis, Chakrabarti, 2018).

Ob der vielfältigen Funktionen der DPP4 ist es essentiell die Regulationsmechanismen besser zu verstehen.

1.4.3 DPP4 im Insulinstoffwechsel

Einen besonderen Stellenwert hat die DPP4 im Insulinstoffwechsel. Die DPP4 baut unter anderem das GLP-1 und das GIP ab, wodurch deren Wirkung abgeschwächt wird (Röhrborn et al., 2015).

GLP-1 und GIP sind für 60 % der postprandialen Insulinsekretion verantwortlich. Dieses Phänomen wird auch Inkretin-Effekt genannt (Nargis, Chakrabarti, 2018).

GLP-1 ist verantwortlich für die Hemmung der Magenentleerung und eine verzögerte Nahrungsaufnahme und reguliert so das Gefühl von Sättigung und Appetit (Röhrborn et al., 2015).

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass GLP-1 auch Einfluss auf den Zyklus nehmen kann. Die Autoren beschreiben, GLP-1 bewirke eine kurzfristige LH-Erhöhung (Outeirino-Iglesias et al., 2015). Diese Erhöhung beeinflusst die Östradiol- und Progesteron-Spiegel während des weiblichen Zyklus, produziert mehr Graaf-Follikel und Corpora lutea und erhöht so die Anzahl erfolgreicher Nidationen und Geburten (Jensterle et al., 2019).

Des Weiteren nimmt DPP4 Einfluss auf das Neuropeptid Y und Peptid YY, zwei Mitglieder der Polypeptidfamilie, die für die Regulation des Energiehaushaltes, Appetit und Magenmotilität verantwortlich sind (Röhrborn et al., 2015).

Da die DPP4 durch den Abbau von GLP-1 und GIP den Inkretineffekt beendet, setzen an diesem Punkt DPP4-Hemmer als therapeutische Option bei der Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 an.

1.4.4 DPP4-Hemmer

DPP4-Hemmer, bekannt als Gliptine, sind antidiabetische Medikamente, welche die Kontrolle des Blutzuckers durch die Erhöhung von physiologischen GLP-1- und GIP-Spiegeln bewirken (Abdalla et al., 2020). Sie senken die DPP4-Aktivität um 70-90 %. Dabei passieren sie die Blut-Hirnschranke nicht und haben keinen direkten Einfluss auf die Sättigung und die Magenentleerung (Röhrborn et al., 2015).

Durch einzelne Gliptine u.a. Sitagliptin konnten durch Senken des HbA1c-Spiegels bei Patientinnen mit Diabetes mellitus Typ 2 positive Effekte gezeigt werden.

Außerdem konnte belegt werden, dass DPP4-Inhibitoren die Serumspiegel von AST und ALT verbessern (Röhrborn et al., 2015).

Vor dem Hintergrund des Diabetes mellitus Typ 2 sind Gliptine bereits gut untersucht, verschiedene Autoren propagieren den Einsatz von DPP4-Hemmern beim PCOS.

Tierversuche und erste klinische Studien haben gezeigt, dass DPP4-Hemmer effektive therapeutische Möglichkeiten zur Behandlung des PCOS und der Vorbeugung metabolischer Begleiterscheinungen sein können (Abdalla et al., 2020).

Die Effekte von DPP4-Hemmern auf die Regelmäßigkeit des Zyklus zeigten sich in verschiedenen Studien stärker als die Effekte durch Metformin (Elkind-Hirsch et al., 2017).

Durch die Anwendung von Liragliptin zeigte sich ein Rückgang der Zysten der Ovarien und eine vermehrte Entwicklung von gesunden Follikeln und Corpora lutea. Es zeigte sich ein signifikanter Rückgang der zellulären Entzündung (Kabel et al., 2017).

Derzeit sind fünf Gliptine für die klinische Anwendung zugelassen: Sitagliptin, Vildagliptin, Saxagliptin, Linagliptin und Alogliptin.

Für diese Arbeit wurde Sitagliptin verwendet, welches zu den DPP4-Hemmern mit der stärksten hemmenden Funktion gehört. Zusätzlich senkt Sitagliptin den Gehalt an freien Fettsäuren und besitzt insulinsensibilisierende Eigenschaften. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Sitagliptin starke entzündungshemmende Eigenschaften hat (Röhrborn et al., 2017).

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Sitagliptin den Nüchternblutzuckerspiegel und den Testosteronspiegel im Serum verringert sowie den Fibrosierungsprozess der Ovarien verlangsamen kann (Wang et al., 2019).

Des Weiteren zeigte eine Studie, dass Sitagliptin die Zellfunktion der β -Zellen des Pankreas bei PCOS-Patientinnen verbessert, welche eine Intoleranz gegenüber Metformin aufwiesen (Aboghasemi et al., 2022).

2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Regulation und Bedeutung der DPP4 im Rahmen des PCOS genauer zu beleuchten. Dabei soll auf die verschiedenen endokrinen und metabolischen Veränderungen eingegangen werden.

Das PCOS betrifft 5-10 % aller Frauen im reproduktiven Alter und ist damit eine der häufigsten endokrinen Erkrankungen von Frauen. Die Erkrankung wird durch Hyperandrogenismus, Oligo- oder Amenorrhoe und sonographisch darstellbare polyzystische Ovarien definiert. Zudem ist diese Erkrankung mit weiteren endokrinen und metabolischen Veränderungen assoziiert. Die DPP4 ist ein ubiquitär exprimiertes Glykoprotein, welches als Transmembranprotein vom Typ II oder in löslicher Form vorliegen kann. Die DPP4 wirkt auf unterschiedliche Art und Weise bei vielen Prozessen im Körper mit. Bei verschiedenen Erkrankungen konnten bereits pathologisch veränderte Spiegel der DPP4 nachgewiesen werden.

Die Ursachen des PCOS und die Pathophysiologie sind noch unzureichend untersucht.

Ein zentrales Element des PCOS ist der Hyperandrogenismus. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob durch diese Erhöhung des Androgenspiegels eine Erhöhung der DPP4-Expression bei Granulosakarzinomzellen zu beobachten ist.

Des Weiteren soll untersucht werden, ob andere PCOS-typische metabolische Veränderungen einen Einfluss auf die DPP4-Expression haben. Deswegen ist es ein Ziel dieser Arbeit den Einfluss von Hyperglykämie und Hyperinsulinämie *in vitro* zu untersuchen.

Diese Arbeit soll untersuchen, ob Metformin und Sitagliptin, als Vertreter der DPP4-Hemmer, *in vitro* einen Einfluss auf die Expression der DPP4 auf mRNA- und Proteinebene haben.

Eine weitere Regulationsmöglichkeit der Genexpression stellen epigenetische Zustandsänderungen dar.

Diese Arbeit setzt sich zum Ziel den Einfluss einer Hypomethylierung auf die Expression der DPP4 *in vitro* zu untersuchen.

Weiterführend soll die Frage geklärt werden, welche klinische Bedeutung die Aktivität und Konzentration von DPP4 bei Kinderwunschpatientinnen hat.

Um dahingehend Aussagen treffen zu können, sollen die DPP4-Aktivität und -Konzentration von Kinderwunschpatientinnen mit unterschiedlichen fertilitätseinschränkenden Erkrankungen miteinander verglichen werden. Außerdem werden die Proben von Kinderwunschpatientinnen und -patienten verglichen, um mögliche Unterschiede zwischen Männern und Frauen nachzuweisen. Bei fertilitätseingeschränkten Patientinnen ist das Zustandekommen einer Schwangerschaft erschwert und/oder mit einer erhöhten Abortrate zu rechnen. Diese Arbeit stellt sich der Frage, ob die DPP4-Aktivität oder -Konzentration mit diesen beiden Outcomes assoziiert ist.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Laborgeräte

Analysewaage „ABJ“	Kern&Sohn (Balingen)
Brutschrank „Hera Cell 240i“	Thermo Scientific (Bonn)
Elektrophorese-Kammer „40-0911“	PeqLab (Erlangen)
Inkubator „Unimax1011	Heidolph (Schwalbach)
Magnetrührer	IKA-Labortechnik (Staufen)
PCR Thermo-Cycler „T3000“	Biometra (Göttingen)
Photometer „BioPhotometer“	Eppendorf (Hamburg)
Plattenreader „Tecan“	Tecan (Grödig)
Sterilbank „Herasafe“	Heraeus (Hanau)
Realtime-Cycler „iCycler“	Bio-Rad (München)
Thermoblock „Thermomixer Comfort“	Eppendorf (Hamburg)
Vortexer „Vortex IR“	Starlab (Hamburg)
Western Blot Electrophoresis Cell „XCell SureLockTM“	Invitrogen (Karlsruhe)
Western Blot Transfer-Kammer „Mini Trans-Blot Cell“	Bio-Rad (München)
Zellzählgerät „Countess“	Invitrogen (Karlsruhe)
Zentrifuge „Centrifuge 5415D“	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge „Sprout“	Kisker (Steinfurt)
Zentrifuge „4-5L“	Sigma (Osterode am Harz)

3.1.2 Verbrauchsmittel

Countess Cell Counting Chamber Slides	Thermo Scientific (Bonn)
Einmalhandschuh	Semperit, Wien
Gewebekulturflaschen	Sigma-Aldrich, München
Kryoröhrchen Nalgene	Thermo Scientific (Bonn)
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplatten, 96-Loch	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Pasteurpipetten	Hirschmann Labor (Eberstadt)
Pipetten	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
PVDF-Membran	Biorad (München)
Reaktionsgefäße (0,2-2 ml)	Eppendorf, Hamburg

serologische Einmalpipetten

Wachstube Phasetrap

Zentrifugationsröhrchen

Greiner Bio-one

(Frickenhausen)

peqLab, Erlangen

Greiner, Frickenhausen

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

0,05% Trypsin-EDTA mit Phenolrot

2-Propanol (95%)

5'-Aza-2-Desoxycytidin (5AzadC)

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal)

100 bp DNA Ladder

Aceton

Agarose

Ampicillin-Natriumsalz

Chloroform

Dimethylsulfoxid (DMSO)

dNTP Mix 10 mM total

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)

ECL Western Blotting Detection Reagent

Ethanol (96%)

Ethidiumbromid

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

Fötale Kälberserum

GelPilot DNA Loading Dye

Magermilchpulver

Maxima SYBR Green qPCR Mastermix

Methanol (100%)

Natriumacetat für Molekularbiologie

Natriumchlorid

Nu Page LDS Sample Buffer (4x)

Nu Page MES SDS Running Buffer (20x)

Nu Page Sample Reducing Agent

Nu Page Transfer Buffer (20x)

NuPage 4-12 % Bis-Tris-Gele

PageRuler Prestained Protein Ladder

Penicillin/Streptomycin

Invitrogen (Karlsruhe)

Roth (Karlsruhe) 22

Sigma-Aldrich (München)

Sigma-Aldrich (München)

Invitrogen (Karlsruhe)

AppliChem, Darmstadt

Serva (Heidelberg)

AppliChem (Darmstadt)

AppliChem (Darmstadt)

AppliChem (Darmstadt)

Bioline (Luckenwalde)

Gibco (Karlsruhe)

GE Healthcare (München)

Sigma-Aldrich (München)

AppliChem (Darmstadt)

Roth (Karlsruhe)

Gibco (Karlsruhe)

Qiagen (Hilden)

Roth (Karlsruhe)

Fermentas (St Leon Rot)

Invitrogen (Karlsruhe)

AppliChem (Darmstadt)

AppliChem (Darmstadt)

Invitrogen (Karlsruhe)

Invitrogen (Karlsruhe)

Invitrogen (Karlsruhe)

Invitrogen (Karlsruhe)

Invitrogen (Karlsruhe)

Thermo Scientific (Bonn)

Gibco (Karlsruhe)

phosphate buffered saline (PBS)
Ponceau-S
Proteaseinhibitor
Trypanblau
Tween-20

Biochrom (Berlin)
Sigma Aldrich (München)
Invitrogen (Karlsruhe)
Invitrogen (Karlsruhe)
AppliChem (Darmstadt)

3.1.4 Puffer und Lösungen

Einfriermedium

1 mL Kulturmedium komplett
 10 % DMSO (frisch hinzugeben)
Kulturmedium DMEM komplett (NT2/D1)
500 mL DMEM + GlutaMAX
 50 mL FKS
 5 mL Antibiotika (Pen/Strep)

LB-Medium

20 g LB Broth Base
 ad. 1 L Aqua bidest.
→ autoklavieren
Zugabe von Ampicillin (100 mg/L) oder Kanamycin (100 mg/L)

Nähragar für Bakterienkulturen

2g LB Agar
 ad. 1 L Aqua bidest.
→ autoklavieren
Zugabe von Ampicillin (100 mg/L) oder Kanamycin (100 mg/L)

10xTBE-Puffer (pH 8)

54,0 g Tris
27,5 g Borsäure
20 mL 0,5 M EDTA (pH 8)

 ad. 1 L Aqua bidest.

1xTBE-Laufpuffer (pH 8)

100 mL 10x TBE-Puffer
 900 mL Aqua bidest.

RIPA-Lysepuffer (pH 7,4)

50 mM Tris-HCl (pH 7,4)
 200 mM NaCl
 1 mM EDTA

1 mM EGTA
1 % Triton X-100
0,25 % Desoxycholat
1xMES-Laufpuffer (pH 7,3)
50 mL MES-Puffer (20x)
950 mL Aqua bidest.
1xTransferpuffer (pH 7,2)
50 mL Transferpuffer (20x)
100 mL Methanol
850 mL Aqua bidest.
10xTBS (pH 8)
100 mL 5M NaCl
300 mL 1M Tris
(pH 8,0 mit HCl einstellen)
600 mL Aqua bidest.
1xTBS-T (pH 8)
100 mL 10x TBS
900 mL Aqua bidest.
500 µL Tween-20 (0,2 %)
Ponceau-S
1 mg Ponceau-S
5 mL 100 % Essigsäure
ad 100 mL Aqua bidest.

3.1.5 Reaktionskits

DPP4 Activity Assay Kit	Sigma-Aldrich (München)
<i>HotStarTaq DNA Polymerase</i>	Qiagen (Hilden)
<i>Human sCD26 ELISA Kit</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>MasterPure DNA Purification Kit</i>	Biozym (Hessisch Oldendorf)
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen (Hilden)
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas (St- Leon-Rot)
<i>TOPO TA Cloning Kit</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>ZR Plasmid Miniprep Kit</i>	Zymo Research (Freiburg)

3.1.6 Enzyme

DNase, RNA-frei	Qiagen (Hilden)
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen (Hilden)
Proteinase K	Serva (Heidelberg)
RevertAid H Minus Reverse Transkriptase	Thermofisher (Dreieich)
RNase A	Serva (Heidelberg)

3.1.7 Oligonukleotide

	Sequenz (5'-3')
DPP4 qPCR fw	AATACCAAATTGAAGCAGCCAGACA
DPP4 qPCR rv	CAGGGCTTTGGAGATCTGAG
GAPDH fw	CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG
GAPDH rv	GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG
DPP4 Me fw 1	TATTTTGTGGGAAAATTTTG
DPP4 Me rv1	TCTATCTCAACCTCCCAAATAAC
DPP4 Me fw2	TTTAGTTATTTGGGAGGTTGAG
DPP4 Me rv2	CTAACTAACACAATAAAACCCCA

Hersteller aller oben genannten Oligonukleotide: Sigma Aldrich, Taufkirchen

3.1.8 Antikörper

Primäre Antikörper

primärer DPP4-Antikörper (Überstand)

Anti-CD26 (ab86806)

aus dem Kaninchen 1:10.000 Abcam

primärer DPP4/CD26

Anti-CD26 (D6D8K)

aus dem Kaninchen 1: 8.000 Cell Signaling

primärer GAPDH-Antikörper

Anti-GAPDH

aus der Maus 1: 5.000

Sekundäre Antikörper

Anti-rabbit IgG

aus der Ziege

1:10.000

CellSignaling

Anti-mouse IgG

aus dem Kaninchen

1:10.000

Dako (Glostrup,
Dänemark)

3.1.9 Zellen

Eukaryoten: humane Granulosakarzinomzelllinien

COV 434

ECACC Nr. 07071909

ATCC, Wesel

KGN

Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Jana Ernst aus dem Institut für
Anatomie und Zellbiologie zur Verfügung gestellt.

3.1.10 Patientenproben

Im Zeitraum von 2010 bis 2013 wurden im Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie Vollblutproben von Patientinnen mit Kinderwunsch gesammelt. Die Patientinnen kamen auf Grund verschiedener Anliegen in die Klinik (u.a. unerfüllter Kinderwunsch, Endometriose, Zyklusstörungen).

Durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 1000 xg wurde das Vollblut in Serum und zelluläre Bestandteile getrennt.

Die Blutproben der männlichen Probanden wurden 2010 am Zentrum für Andrologie und Reproduktionsmedizin in der Kinderwunschsprechstunde gesammelt. Es wurde dabei nicht zwischen fertilen und infertilen Probanden unterschieden.

Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C. Relevante diagnostische Aspekte wurden aus den Patientenakten entnommen und in eine anonymisierte Datenbank eingefügt.

3.1.10.1 Ethikantrag

Die Ethikkommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg hat das Forschungsvorhaben „miRNA als Marker für plazentäre Fehlfunktion bei Glukosestoffwechselstörungen“ (Bearbeitungs-Nr.: 2014-08; Datum der Zustimmung am 24.1.2014; Ergänzungsantrag zustimmend bewertet am 28.3.2019) befürwortet. Alle Patientinnen wurden durch Frau OÄ Dr. Kaltwaßer und Fr. Dr. Köller aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einwilligung zur wissenschaftlichen Verwendung ihres Vollblutes.

Für die Verwendung der männlichen Proben liegt ebenfalls ein zustimmendes Votum („Molekulare Faktoren männlicher Infertilität“; Bearbeitungsnummer 218/14.04.10/2.; Datum der Zustimmung: 19 April 2010; Ergänzungsantrag zustimmend bewertet am 28.3.2019) vor.

3.1.11 Verwendete Software

Quantitative Realtime-PCR	Bio-Rad iQ5 2.1 (Bio-Rad, München)
Westernblot Auswertung	ImageJ
statistische Auswertung	IBM SPSS Statistics 20.0.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellkultivierung

Die verwendeten Granulosakarzinomzelllinien COV 434 und KGN wurden mit DMEM Medium kultiviert, welches mit 10 % FKS und 1 % Penstrep versetzt wurde. Bei 37 °C, 5 % CO₂ und maximaler Luftfeuchte wurden die Zellen in sterilen Kulturflaschen inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte aller zwei bis fünf Tage. Die adhärent wachsende Monolayerkultur wurde bei einer Konfluenz von 80 % passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch eine fünfminütige Inkubation mit 0,05 % Trypsin/EDTA Lösung bei 37 °C. Durch die Zugabe von DMEM Medium wurde die Reaktion abgestoppt, die Zellen wurden in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in Medium resuspendiert und zur Weiterkultivierung in geeigneter Konzentration in eine neue Zellkulturflasche überführt. Zur Kryokonservierung wurde das Zellpellet in Gefriermedium aufgenommen (Medium mit 10 % DMSO) und in ein 2 ml Kryoröhrchen überführt. Die Kurzzeitlagerung erfolgte bei -80 °C und die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff. Zur Reaktivierung aus einer Kryokultur wurde das Kryoröhrchen auf 37 °C erwärmt und der Inhalt in 5 ml Medium überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 1000 xg für 5 min sedimentiert. Das Zellpellet wurde in Medium aufgenommen und in sterile Kulturflaschen überführt. Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in einer Einzelzellsuspension wurde das Zellpellet in Kultivierungsmedium resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypanblau gemischt und 10 µl dieses Gemisches in eine Zählkammer pipettiert. Das Auszählen der Gesamt-, Lebend- und Totzellanzahl wurde am Zellzählgerät ermittelt. Die Lebensanzahl wurde zur Ermittlung von definierten Zellzahlen verwendet.

3.2.2 Behandlung der Zellen

3.2.2.1 Androgen- und Estrogenbehandlung

Zur Untersuchung des Einflusses der Steroidhormone Testosteron, Dihydrotestosteron und Östrogen auf die DPP4-Expression der COV 434 und KGN wurden die Zellen über einen Zeitraum von 72 h mit verschiedenen Hormonkonzentrationen behandelt. Dafür wurden für RNA-Versuche 6 bis $7,5 \times 10^4$ Zellen je nach Zelllinie in 1ml Medium pro Well in eine 24 Well-Platte kultiviert. Für Proteinversuche wurden 3 bis 5×10^5 Zellen in 2 ml Medium pro Well in eine 6 Well-Platte eingestreut. Bei einer Konfluenz von 80 % wurde der Versuch gestartet. Von jedem Hormon wurde eine 100 μM Stammlösung angefertigt, indem das jeweilige Hormon in DMSO gelöst wurde. Für die Behandlung wurde die Stammlösung auf folgende Konzentrationen mit Medium verdünnt (Tabelle 1 und 2).

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Konzentrationen bei RNA-Versuchen

Substanz	Testosteron ($c_A = 100 \mu\text{M}$)			Dihydrotestosteron ($c_A = 100 \mu\text{M}$)			Estrogen ($c_A = 100 \mu\text{M}$)		
	c_E [nM]	10	50	100	1	25	50	10	50
V_{Hormon} [μl]	1	5	10	0,1	2,5	5	1	5	10
V_{Medium}	Add 10 ml								

c_A : Ausgangskonzentration, c_E : Endkonzentration

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Konzentrationen bei Protein-Versuchen

Substanz	Testosteron ($c_A = 100 \mu\text{M}$)	Dihydrotestosteron ($c_A = 100 \mu\text{M}$)	Estrogen ($c_A = 100 \mu\text{M}$)
c_E [nM]	100	50	100
V_{Hormon} [μl]	10	5	10
V_{Medium}	Add 10 ml		

c_A : Ausgangskonzentration, c_E : Endkonzentration

Neben den verschiedenen Hormonkonzentrationen wurden zwei DMSO Lösungsmittelkontrollen und zwei Mediumkontrollen mitgeführt. Die Zellen wurden nach 24, 48 und 72 h geerntet. Um die Zellen zu ernten, wurden diese einmal in PBS gewaschen. Anschließend wurde pro Well 1 ml kaltes PBS hinzugegeben und die Zellen mittels Schaber von der Oberfläche gelöst. Diese wurden dann in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und für

5 min bei 1000 xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde für weiterführende Versuche eingefroren. Zur Proteinanalyse wurden zusätzlich die 2 ml Überstand eingefroren.

3.2.2.2 Hyperglykämie und metabolische Veränderungen

Diabetes mellitus Typ 2 ist eine Erkrankung, die mit dem PCOS assoziiert ist. Deswegen wurden Versuche mit hyperglykämischen bzw. hyperinsulinämischen Zuständen durchgeführt. Zur Untersuchung des Einflusses von Glukose, Insulin, Metformin und Sitagliptin, als Vertreter der Gliptine, auf die DPP4-Expression wurden die Zellen über einen Zeitraum von 72 h mit verschiedenen Konzentrationen behandelt und jeweils nach 24, 48 und 72 h geerntet. Die Vorgehensweise zum Einstreuen und Ernten entspricht dabei dem Vorgehen bei der Androgen- und Östrogenbehandlung. Zur Behandlung der Zellen wurden die oben genannten Stoffe in Wasser gelöst und mit Medium auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt (Tabelle 3 und 4).

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Konzentrationen bei RNA-Versuchen

Substanz	Glukose ($c_A = 1 \text{ M}$)			Insulin ($c_A = 17,22 \text{ } \mu\text{M}$)			Metformin ($c_A = 1 \text{ M}$)			Sitagliptin ($c_A = 100 \text{ } \mu\text{M}$)		
c_E	[mM]			[nM]			[mM]			[nM]		
	5	50	100	5	10	25	5	10	20	10	50	100
V_{Substanz} [μl]	50	500	1000	2,9	5,8	14,5	50	100	200	1	5	10
V_{Medium}	Add 10 ml											

c_A : Ausgangskonzentration, c_E : Endkonzentration

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Konzentrationen bei Protein-Versuchen

Substanz	Glukose ($c_A = 1 \text{ M}$)		Insulin ($c_A = 172,2 \text{ } \mu\text{M}$)		Metformin ($c_A = 1 \text{ M}$)		Sitagliptin ($c_A = 100 \text{ mM}$)	
c_E	[mM]		[nM]		[mM]		[nM]	
	100		25		20		100	
V_{Substanz} [μl]	1000		14,5		200		10	
V_{Medium}	Add 10 ml							

c_A : Ausgangskonzentration, c_E : Endkonzentration

Zusätzlich wurden zwei Mediumkontrollen mitgeführt.

3.2.2.3 5'-Aza-2-Desoxycytidin Behandlung

Durch 5'-Aza-2-Desoxycytidin (5'-Aza) können inaktivierte Gene reexprimiert werden. 5'-Aza ist ein Cytosinanalogon, welches in neu synthetisierte DNA-Stränge inkorporiert und die DNA-(Cytosin-5)-Methyltransferase 1 (DNMT1) irreversibel hemmt. DNMT1 ist verantwortlich für die *de novo* Methylierung. Durch die Hemmung der DNMT1 kommt es zu einem passiven Methylierungsverlust in den nachfolgenden Zellteilungen und somit zur Reaktivierung der betroffenen Gene. Für die Versuche wurden jeweils 3 bis 5×10^5 Zellen in 2 ml Medium pro Well in 6-Well-Platten eingestreut. Bei einer Konfluenz von 80 % wurde der Versuch gestartet. Um den Einfluss von 5'-Aza zu untersuchen wurden die Zellen für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen (10 μ l, 50 μ M, 100 μ M) von 5'-Aza behandelt. Auf Grund der geringen Halbwertszeit von 3,5-21 h wurde alle 24 h das Medium gewechselt und die Zellen mit frischem 5'-Aza behandelt. Zusätzlich wurden eine DMSO und eine Mediumkontrolle mitgeführt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Zellpellets bei -20 °C gelagert. Für die Untersuchung auf Proteinebene wurden zusätzlich die 2 ml Überstand eingefroren.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA spezifische Untersuchungen

3.3.1.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus den Zellpellets erfolgte mittels Trizol. Dafür wurde das Pellet in 500 μ l Trizol resuspendiert und in ein Wachstumsglas überführt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurden 200 μ l Chloroform hinzugegeben und das Reaktionsgefäß für 15 s kräftig geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Phasentrennung durch Zentrifugation. Diese erfolgte für 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C. Die Oberphase wurde anschließend abgenommen und mit 35 μ l RDD-Puffer sowie 5 μ l DNase für 15 min inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 500 μ l Isopropanol. Nach einer Inkubationszeit von 20 min erfolgte eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C. Anschließend wurde das Pellet mit jeweils 96 %igem und 70 %igem eiskalten Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 20 μ l RNase-freiem H₂O aufgelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

3.3.1.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung von RNA erfolgte mittels Photometer. Dafür wurden die Proben 1:100 verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gemessen. Als Richtwert galt dabei: 1 OD_{260nm} entspricht 40 μ g RNA/ml. Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} beschreibt die Reinheit und sollte zwischen 1,8 und 2 liegen.

3.3.1.3 cDNA-Synthese

Mittels reverser Transkriptase wurden 300-1000 ng isolierter mRNA (je nach Zelllinie) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese RNA-abhängige DNA-Polymerase generiert mit Hilfe von Primern und dNTPs ein RNA-DNA-Hybrid, welches nach Denaturierung durch Erhitzen in einen Doppelstrang überführt wird. Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des *RevertAid First Strang cDNA Synthesis Kit*. Der Hybridisierungsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

300-1000 ng RNA

1 µl random Primer

ad 11 µl nukleasefreies H₂O.

Das Gemisch wurde 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend zügig auf 4 °C gekühlt, um eine möglichst effektive Anlagerung der Primer zu generieren.

Anschließend wurde der folgende Master-Mix hinzugegeben:

4 µl 5x Reaktionspuffer

1,5 µl nukleasefreies H₂O

2 µl dNTP Mix (10 mM)

1 µl *Ribolock* RNase-Inhibitor (20 U/µl)

0,5 µl ReverseTranskriptase (200 U/µl)

Für die Synthese wurde folgendes Programm verwendet (Tabelle 5):

Tabelle 5: Darstellung der Reaktionsschritte der cDNA-Synthese

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
Primer-annealing	25 °C	5 min
cDNA-Synthese	42 °C	60 min
Denaturierung	70 °C	5 min

Anschließend wurde die cDNA 1:2 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -20 °C.

3.3.1.4 Quantitative Realtime PCR (SyberGreen)

Mittels der quantitativen Realtime PCR kann eine quantitative Expressionsanalyse durchgeführt werden. Der Fluoreszenzfarbstoff *SYBRGreen* interkaliert in die sich bildende dsDNA. Nach jedem Elongationsschritt erfolgt eine Anregung und Messung des entstehenden Fluoreszenzsignals. Die Intensität des Signals entspricht in der exponentiellen Phase proportional der gebildeten Produktmenge. Zur Auswertung wird der cT-Wert (*cycle threshold*) herangezogen. Der cT-Wert ist ein definierter Schwellenwert, bei dem das Fluoreszenzsignal

erstmalig höher liegt als die Fluoreszenz der Hintergrundaktivität. Zur Quantifizierung der Genexpression wurde die $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) relativ zum Referenzgen GAPDH verwendet. Um ein reines Produkt zu verifizieren, wurde anschließend eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dafür wird der Doppelstrang wieder in zwei Einzelstränge aufgetrennt, dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und die Fluoreszenz nimmt ab. Bei einem reinen Produkt kann ein einheitlicher thermischer Übergang beobachtet werden.

Der MasterMix für die SYBR Green qPCR setzt sich wie folgt zusammen:

5,5 µl nukleasefreies H₂O

7,7 µl SYBR Green

0,5 µl fw Primer (20 µM)

0,5 µl rv Primer (20 µM)

2 µl cDNA

Anschließend wurde folgendes Programm genutzt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Schritte der Quantitativen Realtime PCR

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zykluszahl
Polymeraseaktivierung	95	5	1
Denaturierung	95	0,5	40
Primer-annealing	58-62	0,5	40
Elongation	72	0,5	40
Schmelzkurve	55-90		1

Zur Auswertung der qPCRs wurde jeweils eine qPCR mit GAPDH durchgeführt und die Ergebnisse mittels der $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Methode berechnet.

3.3.2 Protein spezifische Untersuchungen

3.3.2.1 Proteinisolierung

Die Proteinisolierung aus Zellpellets erfolgte mittels RIPA-Lysepuffer. Dafür wurden dem RIPA Puffer Protease-Inhibitor 1:100 zugesetzt. Anschließend wurde das Pellet in 20-30 µl der Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 13.000 xg und 4 °C für 10 min. Das Lysat wurde bei -20 °C gelagert.

Für die Bestimmung der sezernierten Proteine im Überstand wurde dieser zentrifugiert und das Zellpellet entfernt. Ziel war es in beiden Zelllinien die zelluläre und sezernierte Form der DPP4 zu untersuchen. Die zelluläre DPP4 war jedoch in der Zelllinie der COV 434 nicht darstellbar.

3.3.2.2 Quantifizierung des Proteingehalts

Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wurde die Bradford-Methode verwendet. Das Bradford-Reagenz wurde 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt. Zur Messung wurden 199 µl der Färbelösung und 1 µl Proteinlysate bzw. Überstand für 5 min inkubiert. Die Messung erfolgte anschließend fotometrisch bei 595 nm. Die Konzentration wurde mittels Eichgerade aus der gemessenen Absorption errechnet.

3.3.2.3 Western-Blot

Mittels der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgte die Auftrennung der Proteine nach der molekularen Masse. Durch Zugabe von Detergenz SDS wurden die Proben denaturiert und negativ geladen. Im Gel erfolgte die Auftrennung durch elektrischen Strom, wobei kleinere Proteine eine höhere Laufgeschwindigkeit aufweisen als größere. Vor dem Auftragen der Proben wurden 30 µg Protein auf ein Volumen von 15 µl verdünnt und mit 2 µl Denaturierungspuffer und 5 µl Laufpuffer versehen und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Es wurden anschließend jeweils 22 µl Protein pro Geltasche eines 4-12 %-igen *Bis-Tris* Gradientengels aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsstandard mitgeführt (*PageRuler Prestained Protein Ladder*). Die Elektrophorese erfolgte in 1xMES-Laufpuffer bei 150 V, 85 mA und 4 °C.

Mit Hilfe des „Tank-Blot-Verfahrens“ wurden die aufgetrennten Proteine auf eine aktivierte PVDF-Membran (0,45 µm Porengröße) übertragen. Dafür wurde eine Mini-Trans-Blot Cell-Apparatur (Biorad) verwendet. Die Aktivierung der Membran erfolgte zuvor durch MeOH für 1 min. Anschließend wurde die Membran in Aqua bidest. und Transferpuffer gewaschen. Die Tank-Blot-Kassette wurde beginnend auf der schwarzen Seite wie folgt im Transferpuffer liegend aufgebaut: Schwamm, Filterpapier, Bis-Tris-Gel, PVDF-Membran, 2x Filterpapier, Schwamm. Der Transfer erfolgte in 1x Transferpuffer bei 150 V, 300 mA und 4 °C für 1 h 45 min.

Nach dem Transfer wurden die Proteine durch die Färbung mit Ponceau-S dargestellt. Dafür wurde die PVDF-Membran für 5 min in 1 %-iger Ponceau-S Lösung inkubiert und anschließend mit Aqua bidest. gewaschen. Die aufgetragene Proteinmenge und die Qualität des Blots konnten durch die angefärbten Proteinbanden geprüft werden. Die Entfärbung erfolgte durch das Waschen mit 1xTBST.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper an der PVDF-Membran zu verhindern, wurde diese für 20 min in 5 % Magermilchpulver/TBST-Puffer inkubiert. Die verwendeten primären Anti-CD26 (ab86806) und primären GAPDH-Antikörper wurden mit 5 % Magermilchpulver/TBST-Puffer verdünnt. Der primäre Antikörper Anti-CD26 (D6D8K) wurde in 5 %-BSA verdünnt. Über Nacht wurde die PVDF-Membran in geeigneter Verdünnung mit

dem jeweiligen primären Antikörper unter Schütteln bei 4 °C inkubiert. Zur Entfernung nichtgebundener Antikörper wurde die Membran am folgenden Tag 3 x für 15 min mit 1x TBST gewaschen. Zum indirekten Nachweis der Proteine wurde ein sekundärer Antikörper in geeigneter Verdünnung hinzugegeben und die Membran für 1 h bei RT inkubiert. Die verwendeten sekundären Antikörper Anti-rabbit IgG und Anti-mouse IgG wurden mit 5 % Magermilchpulver/TBST-Puffer verdünnt. Ungebundene sekundäre Antikörper wurden durch Waschen (dreimal für 12 min) entfernt. Die Detektion der Banden erfolgte mittels *ECL Western-Blotting Detection System* (GE Health care). Dafür wurden jeweils 300 µl von Lösung A und B vermischt und die Membran damit für 1 min benetzt. Der Nachweis der Chemolumineszenz wurde in der Dunkelkammer mit Hilfe von Röntgenfilm erbracht. Die belichteten Filme wurden dafür zunächst in Entwicklerlösung getaucht, danach in Aqua bidest. gewaschen und schließlich in Fixierlösung gegeben. Zum Abschluss wurden die Filme erneut in Aqua bidest. gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Für die nachfolgende Auswertung wurde der mitgeführte Marker auf den Röntgenfilm übertragen.

Die Auswertung und Quantifizierung der erhaltenen Western Blots erfolgte mit Hilfe von ImageJ. Dafür wurden die Blots eingescannt und die Farbintensität mittels Kurve dargestellt. Die Fläche unter der Kurve wurde berechnet und relativiert. Bei der Darstellung der Proteine im Überstand wurde die Ponceau-S-Färbung zum Vergleich herangezogen und bei zellulären Proteinen GAPDH-Blots.

3.4 Analytik in Patientenserum

3.4.1 DPP4-Konzentrationsbestimmung

Unter Verwendung des *HumansCD26 Platinum ELISA* wurde die DPP4-Konzentration der Serumproben in einer 96-Wellplatte ermittelt. Zuerst wurde die Platte mit jeweils 250 µl *Wash-Puffer* gewaschen. Mit Hilfe des mitgelieferten Standards sCD26 wurden zwei Verdünnungsreihen auf der Platte erstellt. Zusätzlich wurden zwei Felder mit dem gelieferten Blank gefüllt. Die Proben wurden 1:5 verdünnt und jeweils als Duplikat aufgetragen. Zu jedem Well wurden 50 µl frisch hergestelltes Biotin-Konjugat gegeben. Die Platte wurde für 3 h unter Schütteln (150 rpm) bei RT inkubiert. Danach wurde die Platte ausgeschüttet und 4x mit jeweils 250 µl *Wash-Puffer* gewaschen. Anschließend wurde zu jedem Well 100 µl frisch hergestelltes Streptavidin/HRP-Lösung hinzugefügt. Die folgende Inkubation erfolgte bei RT unter Schütteln (150 rpm) für 1 h. Im Anschluss wurde die Platte ausgeschüttet und 4x mit 250 µl *Wash-Puffer* gewaschen. Für die Messung wurden in jedes Well 100 µl Substratlösung hinzugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation im Dunkeln wurden jeweils 100 µl Stopplösung zugeführt. Die Messung erfolgte unmittelbar nach dem Abstoppen der Reaktion bei 450 nm sowie 620 nm als

Referenz. Mit Hilfe der Standard-Verdünnungsreihen konnte eine Eichgerade erstellt und die einzelnen Konzentrationen berechnet werden.

3.4.2 DPP4-Aktivitätsbestimmung

Mit Hilfe des *DPP4-Activity Assay Kits* wurde die Aktivität von DPP4 in den Patientenproben gemessen. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe des *AMC Standard* aufgetragen. Anschließend wurden die Proben mit 10 µl *Assay Puffer* inkubiert. Für die Blanks wurde zu den Proben 10 µl *DPP4-Inhibitor* hinzugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37 °C unter Schütteln wurde das mitgelieferte Substrat *H-Gly-Pro-AMC* 1:20 mit Assay-Puffer verdünnt und den Wells hinzugegeben. Für die Messung wurde eine Anregungsstrahlung mit 360 nm verwendet und die Emission bei einer Wellenlänge von 460 nm gemessen. Die Messung erfolgte für 25 min alle 5 min. Mit Hilfe der Standards wurde eine Eichkurve erstellt. Von den Patientenwerten wurden die Blankwerte abgezogen. Anschließend wurden von den Finalwerten die Initialwerte abgezogen. Anschließend wurden diese mit der Standardkurve verglichen. Für die Berechnung der Aktivität wurden außerdem die Verdünnung, die Reaktionszeit und das Gesamtvolumen mit einbezogen. Die Aktivität wurde in microunits/ml angegeben.

3.5 Statistische Methoden

Zur Auswertung der molekularbiologischen Methoden wurde der T-Test verwendet. Dabei wurden die Werte jeweils mit der Lösungsmittelkontrolle verglichen, um einen möglichen Einfluss des Lösungsmittels auszuschließen. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt.

Mit Hilfe der Software *IBM SPSS Statistics 20.0.* erfolgte die statistische Auswertung der Patientenproben.

Zur Einschätzung des Zusammenhangs zwischen DPP4-Konzentration und DPP4-Aktivität sowie bekannten Diagnosen wurde der *Mann-Whitney-U* Test angewendet.

Außerdem wurde ein einfacher *ANOVA* durchgeführt, um die Gleichheit zweier oder mehrerer Werteproben zu gewährleisten.

Die gewonnenen Verteilungen der DPP4-Konzentrationen und -Aktivitäten wurden in Kastengrafiken, *PlotBoxes*, dargestellt.

Der dargestellte Kasten entspricht dabei 50 % der Werte und der durchgehende Strich entspricht dem Median. Extremwerte werden in der *PlotBox* als Kreise dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Regulation der DPP4 unter Androgen- und Östrogeneinfluss

Neben polyzystischen Ovarien und Oligo- bzw. Amenorrhö ist Hyperandrogenismus ein Teil der Definition des PCOS. Deswegen wurde eine mögliche Regulation der DPP4 durch Testosteron bzw. Dihydrotestosteron untersucht. Außerdem wurde untersucht, ob Östrogen eine Veränderung der DPP4-Expression bewirkt. Die Analyse wurde auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt.

4.1.1 Androgeneffekte auf die Expression der DPP4-mRNA

Zur Darstellung der DPP4-mRNA-Expression wurde die RNA nach 24, 48 und 72 h isoliert, in cDNA umgeschrieben und durch die *quantitative Realtime-PCR* ausgewertet. In der Abbildung 3 wird jeweils die relative Veränderung der mRNA-Expression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO dargestellt.

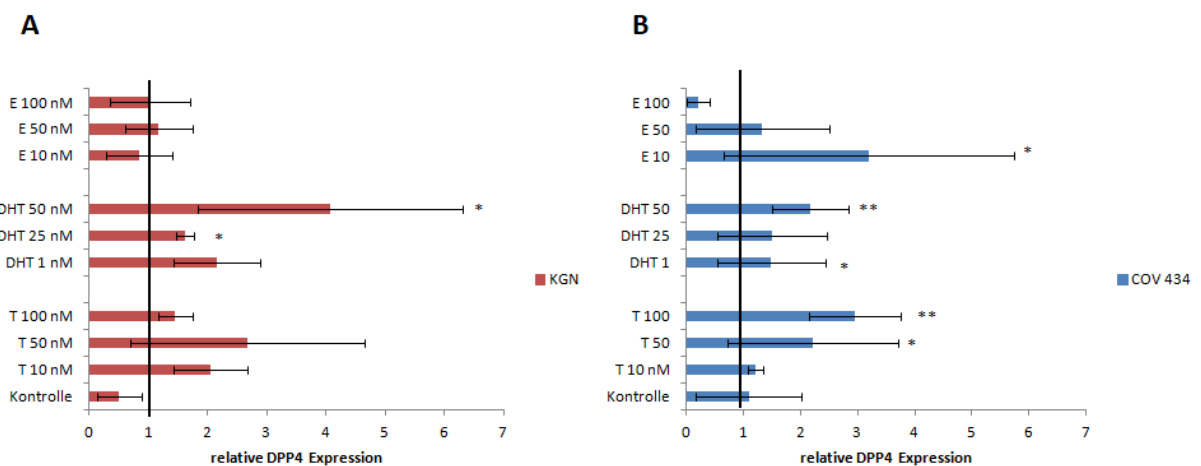


Abbildung 3: DPP4-mRNA-Expression in den Zelllinien KGN (A, $n_{\text{KGN}} = 4$) und der COV 434 (B, $n_{\text{COV 434}} = 4$), $t = 24$ h unter Stimulation mit Testosteron, DHT oder Estradiol, t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Abkürzungen: T-Testosteron; DHT-Dihydrotestosteron; E-Estradiol

Es konnte beobachtet werden, dass in der Zelllinie KGN die DPP4-mRNA-Expression unter Testosteronbehandlung auf das 1,5 bis 2,6fache steigt. Ein ähnlicher Effekt ist bei der Behandlung mit Dihydrotestosteron zu beobachten. Bei der Behandlung mit 25 nM ($p = 0,029$) und 50 nM ($p = 0,036$) Dihydrotestosteron ist dieser Effekt signifikant. In der Zelllinie der COV 434 kommt es unter hoher Testosteronwirkung innerhalb der ersten 24 h zu einer signifikanten Steigerung der DPP4-Expression. Bei einer Testosteron-Konzentration von 50 nM steigt die DPP4-mRNA-Expression signifikant auf das 1,5fache ($p = 0,035$). Unter Stimulation mit Dihydrotestosteron steigt die DPP4-mRNA-Expression in der COV 434 signifikant

(DHT 1 nM $p = 0,048$; DHT 50 nM $p = 0,004$) auf das 1,4 bis 2fache im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Estradiol wirkt sich in geringer Konzentration (10 nM, $p = 0,042$) steigernd auf die DPP4-Expression aus, in höherer Konzentration (100 nM) dagegen hemmend (0,2fache Expression).

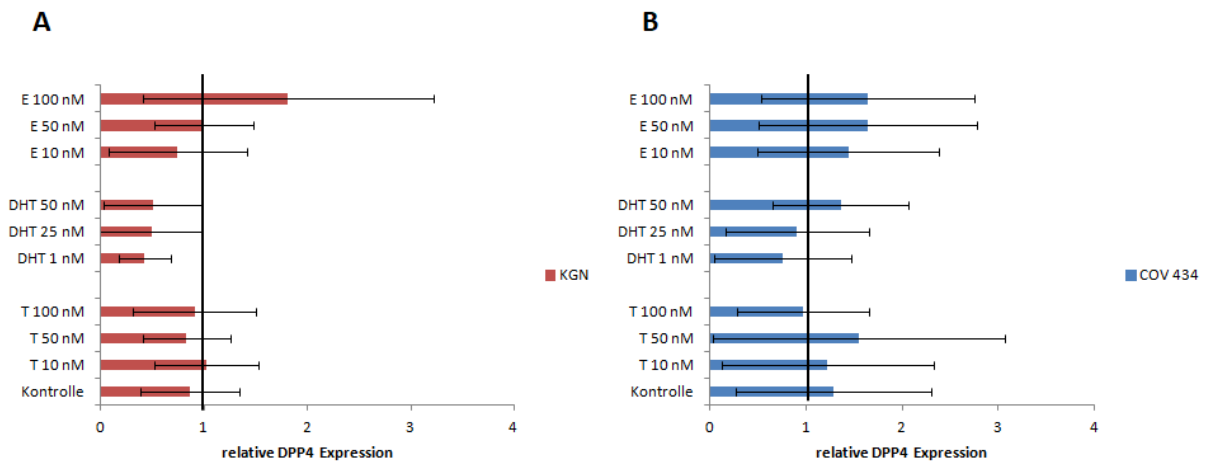


Abbildung 4: DPP4-mRNA-Expression in der Zelllinie der KGN (A, $n_{\text{KGN}} = 4$) und der COV 434 (B, $n_{\text{COV 434}} = 4$), $t = 48$ h unter Stimulation mit Testosteron, DHT oder Estradiol, t- Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Abkürzungen: T-Testosteron; DHT-Dihydrotestosteron; E-Estradiol

Nach 48-stündiger Behandlung der Zellen mit Testosteron, Dihydrotestosteron oder Estradiol lassen sich in keiner der beiden Zelllinien signifikante Veränderungen in der DPP4-mRNA-Expression ausmachen.

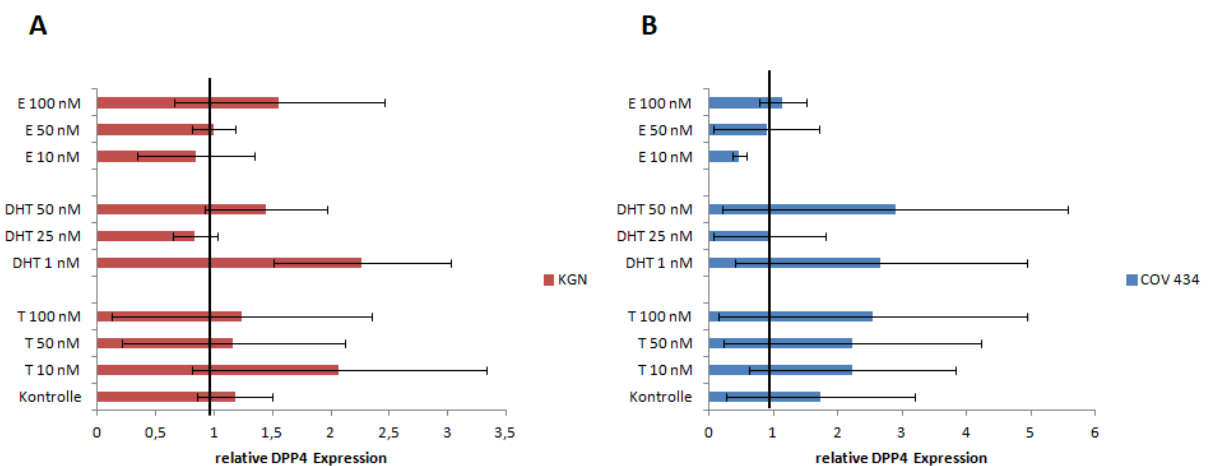


Abbildung 5: DPP4-mRNA-Expression in der Zelllinie der KGN (A, $n_{\text{KGN}} = 4$) und der COV 434 (B, $n_{\text{COV 434}} = 4$), $t = 72$ h unter Stimulation mit Testosteron, DHT oder Estradiol, t- Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Abkürzungen: T-Testosteron; DHT-Dihydrotestosteron; E-Estradiol

Nach 72 h sieht man eine 2,4fache Steigerung der DPP4-Expression unter Testosteroneinfluss und eine Steigerung auf das 2,2fache durch Dihydrotestosteron in der Zelllinie der KGN. Ein Einfluss durch Estrogen ist nicht zu beobachten.

In der Zelllinie der COV 434 ist unter Testosteroneinfluss eine 2,2 bis 2,5fache Expression zu beobachten. Durch Dihydrotestosteron wird die Expression bis auf das 2,9fache gesteigert. Ein Einfluss der Lösungsmittelkontrolle ist im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu allen drei untersuchten Zeitpunkten nicht auszumachen.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die DPP4-mRNA-Expression unter Testosteronstimulation in den beiden Zelllinien leicht steigt, besonders in hoher Konzentration ist dies bei den COV 434 zu sehen. Unter DHT-Stimulation ist in beiden Zelllinien eine signifikant verstärkte DPP4-mRNA-Expression in den ersten 24 h zu erkennen. Unter Estradioleinfluss sinkt die Expression tendenziell ab, dies ist besonders nach 72 h zu erkennen. Auffällig ist, dass nach 24 und 72 h die gleichen Tendenzen zu erkennen sind, während nach 48 h keine Tendenzen zu beobachten sind. Wobei die Tendenzen nach 72 h nicht mehr signifikant sind.

4.1.2 Androgeneffekte auf die DPP4-Proteinexpression

Zur Untersuchung der Regulation der DPP4-Expression auf Proteinebene wurden die Zellen nach 48 h geerntet, die Proteine isoliert und anschließend Western-Blots durchgeführt.

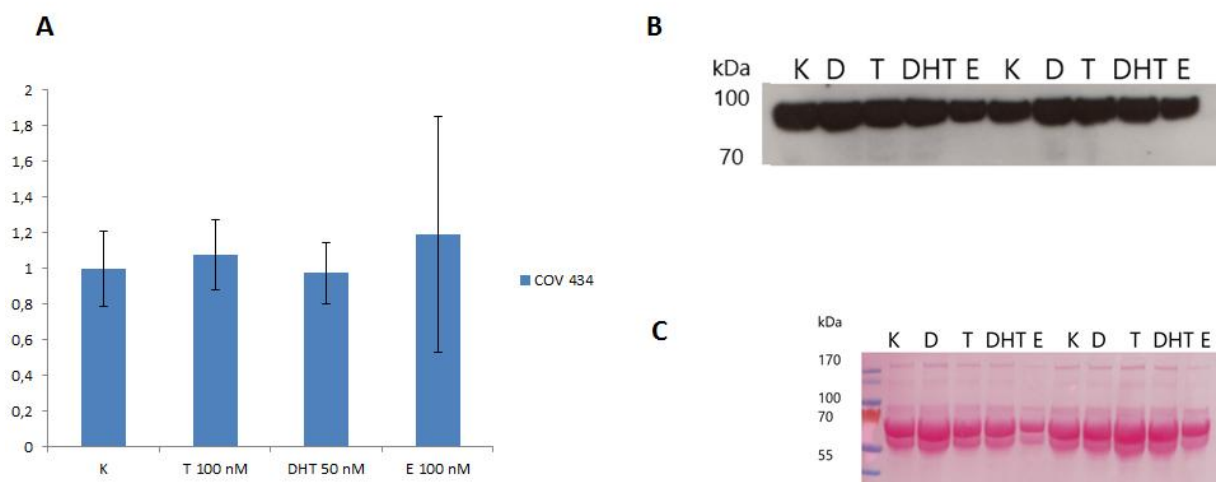


Abbildung 6: A (Darstellung der DPP4-Expression im Verhältnis zu DMSO der COV 434 im Überstand, Referenz Ponceau Färbung, $n_{COV\ 434} = 2$, $t = 48$ h), B (Western Blot der DPP4-Expression im Überstand der COV 434), C (Ponceau Färbung des Überstandes der COV 434), t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Abkürzungen: K - Kontrolle, D - DMSO, T - Testosteron, DHT - Dihydrotestosteron, E - Estrogen)

Nach Stimulation der Zellen mit Testosteron und Dihydrotestosteron lässt sich keine eindeutig veränderte Expression des DPP4-Proteins im Überstand nachweisen. Auch unter Estradiol konnte keine signifikante Änderung der DPP4-Protein-Expression gezeigt werden.

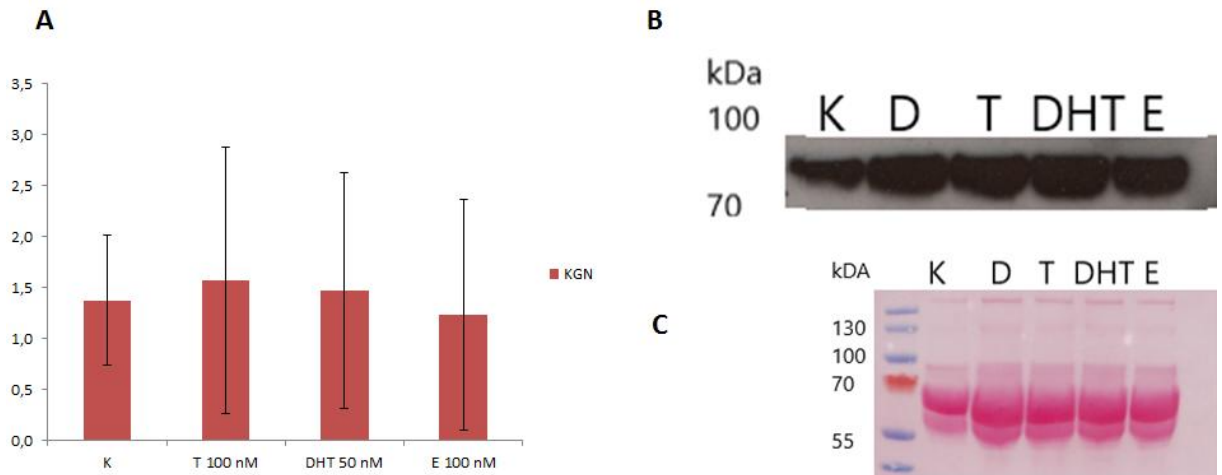


Abbildung 7: A (Darstellung der DPP4-Expression im Verhältnis zu DMSO der KGN im Überstand, Referenz Ponceau Färbung, $n_{KGN} = 2$, $t = 48$ h), B (Western Blot der DPP4-Expression im Überstand der KGN), C (Ponceau Färbung des Überstandes der KGN), t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Abkürzungen: K - Kontrolle, D - DMSO, T - Testosteron, DHT - Dihydrotestosteron, E - Estrogen)

Im Überstand der KGN lässt sich eine 1,6fach gesteigerte DPP4-Expression unter Testosteron und eine 1,5fach gesteigerte Expression unter Dihydrotestosteron nachweisen.

Die DPP4-Expression unter der Behandlung mit Estrogen ist gegenüber der Behandlung mit Testosteron und Dihydrotestosteron verringert.

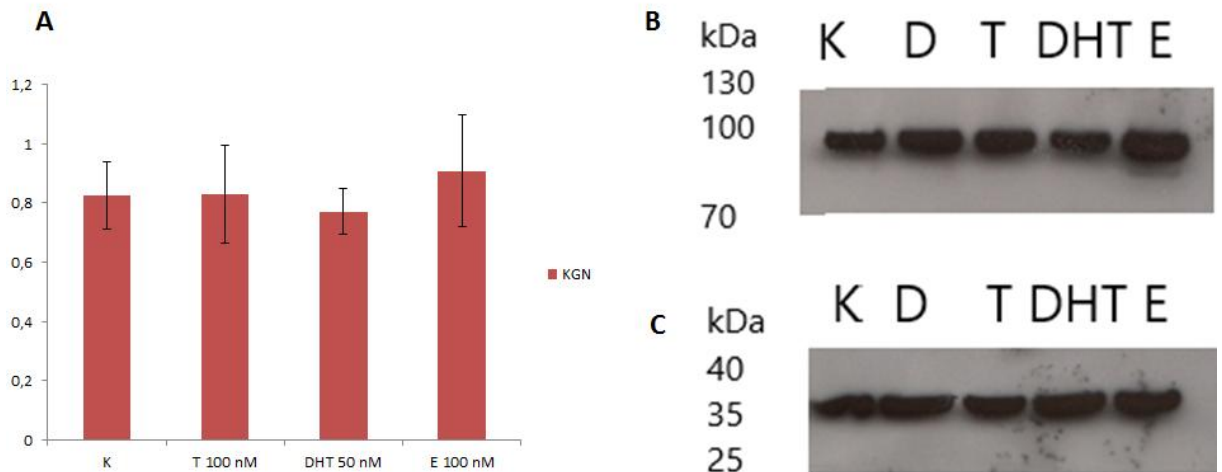


Abbildung 8: A (Darstellung der zellulären DPP4-Expression im Verhältnis zu DMSO der KGN, Referenz GAPDH, $n_{\text{KGN}} = 2$, $t = 48$ h), B (Western Blot der zellulären DPP4-Expression der KGN), C (Western Blot der zellulären GAPDH-Expression der KGN), t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Abkürzungen: K - Kontrolle, D - DMSO, T - Testosteron, DHT - Dihydrotestosteron, E - Estrogen

Bei der Untersuchung der zellulären Proteine in der KGN konnte keine signifikante Veränderung der Expression der DPP4 beobachtet werden.

Im Überstand ist bei der COV 434 unter Testosteron und Dihydrotestosteron kein Anstieg der DPP4 zu erkennen. Im Gegensatz dazu konnte im Überstand der KGN eine gesteigerte DPP4-Expression unter Testosteron und Dihydrotestosteron gezeigt werden. In der Untersuchung des zellulären DPP4 kann keine sichere Tendenz ausgemacht werden.

4.2 Regulation der DPP4 durch metabolische Veränderungen

In diesem Arbeitspunkt sollten die durch das PCOS auftretenden endokrinen und metabolischen Veränderungen untersucht werden, um eine mögliche Regulation auszuschließen und so den Zusammenhang zwischen Androgenregulation und DPP4-Expression zu stärken. Im Weiteren sollte geschaut werden, ob Medikamente, die zur Behandlung des assoziierten Diabetes mellitus Typ II eingesetzt werden, *in vitro* einen Einfluss auf die DPP4-Expression haben. Dafür wurden Metformin und Sitagliptin ausgewählt. Die verwendeten Metforminkonzentrationen orientieren sich an *in vitro* Versuchen mit Lungenkarzinomzellen (Ashinuma et al., 2012; Yousef, Tsiani, 2017).

Die verwendeten Sitagliptinkonzentrationen orientieren sich ebenfalls an bereits *in vitro* verwendeten Konzentrationen (Lin, Lin, 2016).

4.2.1 Effekte auf die DPP4-mRNA-Expression

Für die Analyse der RNA wurden die Zellen nach 24, 48 und 72 h geerntet, die RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und durch die *quantitative Realtime-PCR* ausgewertet. In den nachfolgenden Abbildung 9 wird die nfache mRNA-Expression der DPP4 der einzelnen Behandlungen zur DMSO-Lösungsmittelkontrolle dargestellt.

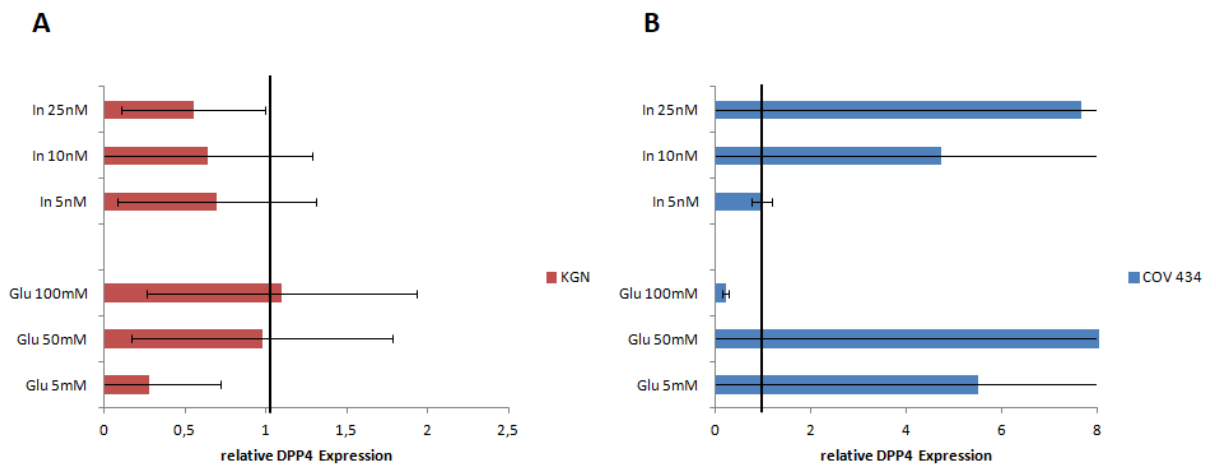


Abbildung 9: DPP4-mRNA-Expression in der Zelllinie der KGN (A, $n_{\text{KGN}} = 4$) und der COV 434 (B, $n_{\text{COV 434}} = 4$), $t = 24$ h unter Stimulation mit Insulin oder Glukose, t- Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Abkürzungen: In - Insulin, Glu - Glukose

Nach 24 h ist weder in der COV 434 noch in der KGN eine veränderte DPP4-Expression durch metabolische Veränderungen zu erkennen.

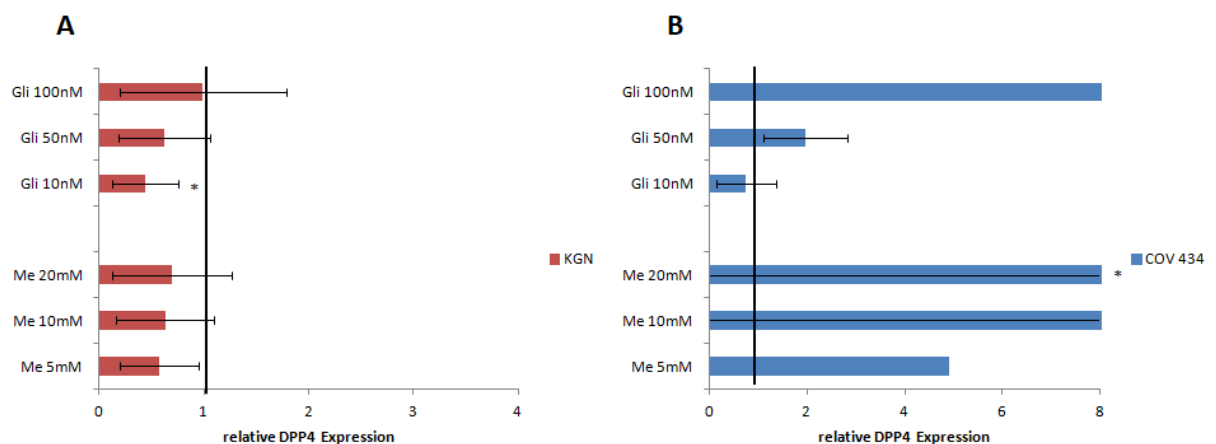


Abbildung 10: DPP4-mRNA-Expression in der Zelllinie der KGN (A, $n_{\text{KGN}} = 4$) und der COV 434 (B, $n_{\text{COV 434}} = 4$), $t = 24$ h unter Stimulation mit Sitagliptin oder Metformin, t- Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Abkürzungen: Gli - Sitagliptin, Me - Metformin

Durch die Gabe von Sitagliptin konnte in der KGN eine signifikante Hemmung auf das 0,4fache beobachtet werden (Gli 10 nM, $p = 0,036$).

Die Expression von DPP4 in der COV 434 wurde durch Metformin stark gesteigert ($p = 0,012$).

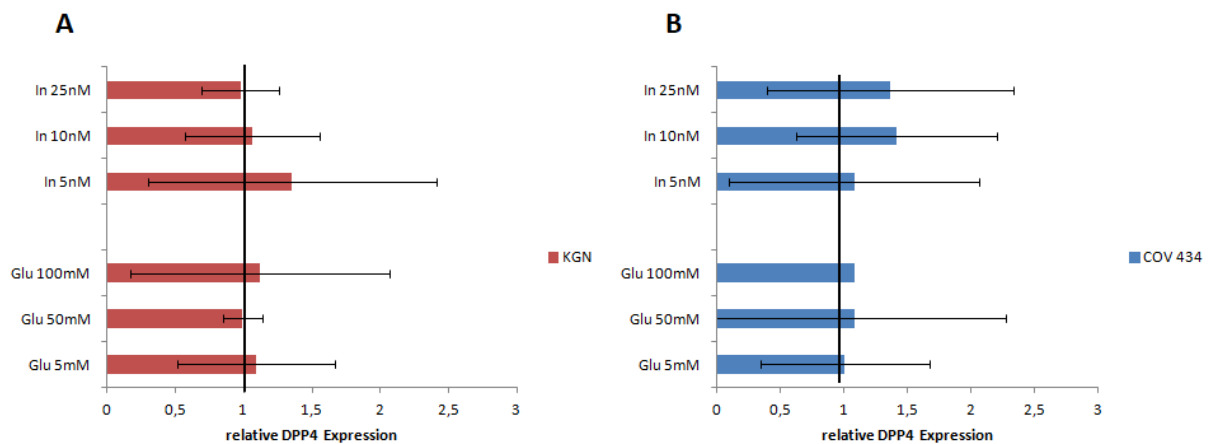


Abbildung 11: DPP4-mRNA-Expression in der Zelllinie der KGN (A, $n_{KGN} = 4$) und der COV 434 (B, $n_{COV\ 434} = 4$), $t = 48$ h unter Stimulation mit Insulin oder Glukose, t- Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Abkürzungen: In - Insulin, Glu - Glukose

Nach 48 h ist in beiden Zelllinien durch induzierte Hyperglykämie bzw. Hyperinsulinämie keine Veränderung der DPP4-Expression zu beschreiben.

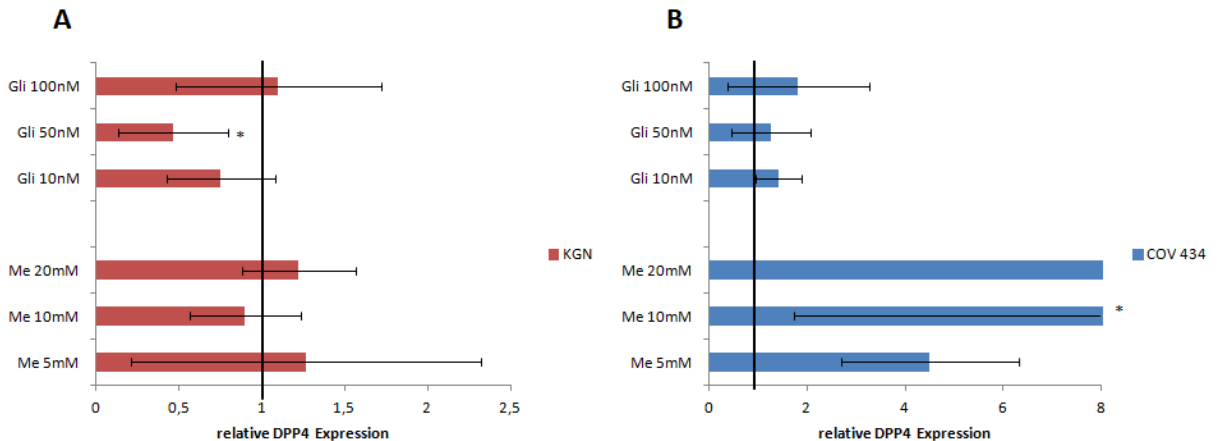


Abbildung 12: DPP4-mRNA-Expression in der Zelllinie der KGN (A, $n_{KGN} = 4$) und der COV 434 (B, $n_{COV\ 434} = 4$), $t = 48$ h unter Stimulation mit Sitagliptin oder Metformin, t- Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Abkürzungen: Gli - Sitagliptin, Me - Metformin

In der Zelllinie der KGN ist wiederum eine signifikante Hemmung der DPP4 durch Sitagliptin auf das 0,5fache zu beschreiben (Gli 50 nM $p = 0,013$). Durch die Gabe von Metformin steigt die DPP4-Expression in den COV 434 wie auch nach 24 h stark an (Me 20 nM $p = 0,014$).

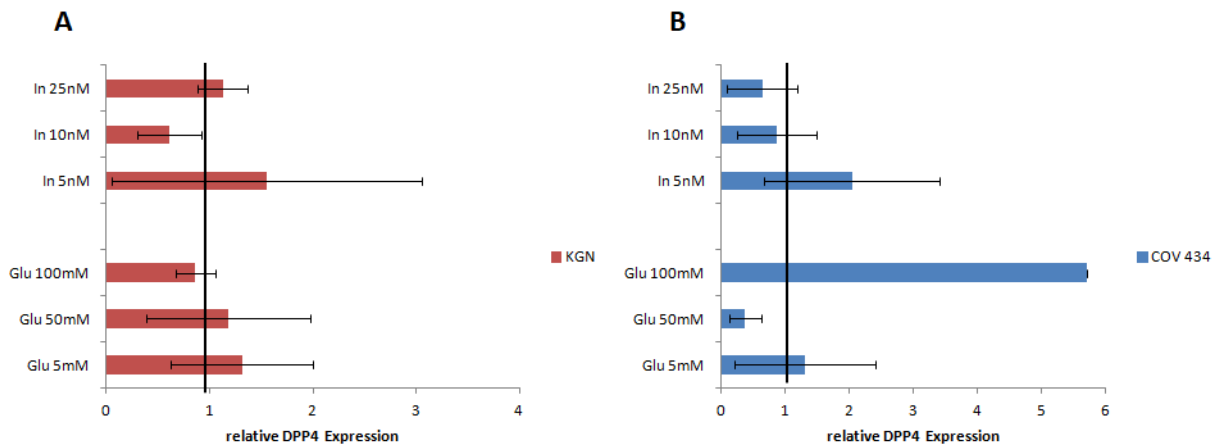


Abbildung 13: DPP4-mRNA-Expression in der Zelllinie der KGN (A, $n_{KGN} = 4$) und der COV 434 (B, $n_{COV\ 434} = 4$), $t = 72$ h unter Stimulation mit Insulin oder Glukose, t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Abkürzungen: In - Insulin, Glu - Glukose

Auch nach 72 h zeigt sich in beiden Zelllinien keine veränderte DPP4-Expression durch Glukose oder Insulinveränderungen.

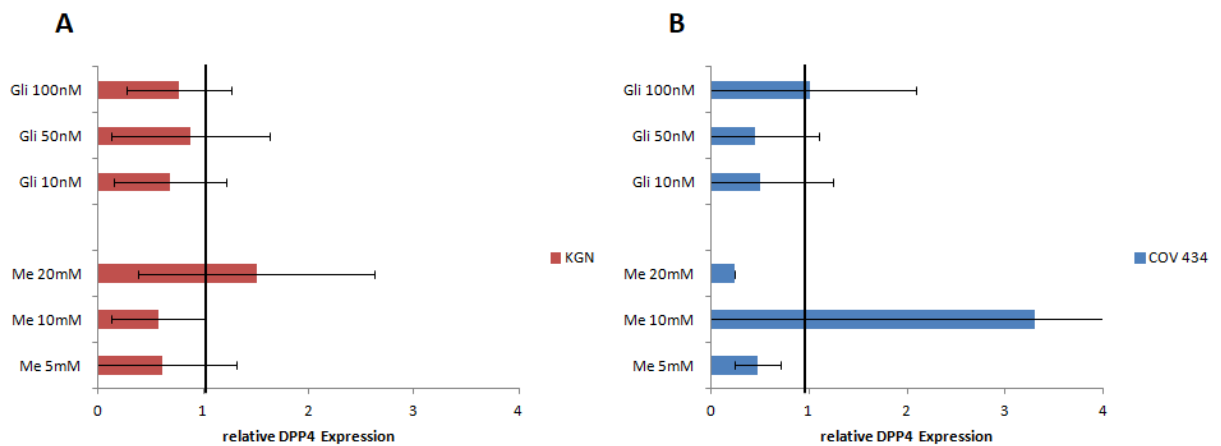


Abbildung 14: DPP4-mRNA-Expression in der Zelllinie der KGN (A, $n_{KGN} = 4$) und der COV 434 (B, $n_{COV\ 434} = 4$), $t = 72$ h unter Stimulation mit Sitagliptin oder Metformin, t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Abkürzungen: Gli - Sitagliptin, Me - Metformin

Nach 72 h zeigt weder Sitagliptin noch Metformin einen Einfluss auf die DPP4-Expression der KGN. In der Zelllinie der COV 434 ist eine Steigerung der DPP4-Expression unter Metformin 10mM zu erkennen.

Aus den Diagrammen wird ersichtlich, dass Glukose und Insulin keinen Einfluss auf die DPP4-Expression auf mRNA-Ebene besitzt. Metformin hat nur bei Behandlung der COV 434 einen steigernden Einfluss auf die mRNA der DPP4 gezeigt. Sitagliptin zeigt in den KGN einen hemmenden Einfluss auf die DPP4-mRNA-Expression.

4.2.2 Effekte auf die DPP4-Proteinexpression

Für die Analyse wurden die Proteine nach 48-stündiger Behandlung gewonnen und im Western-Blot untersucht.

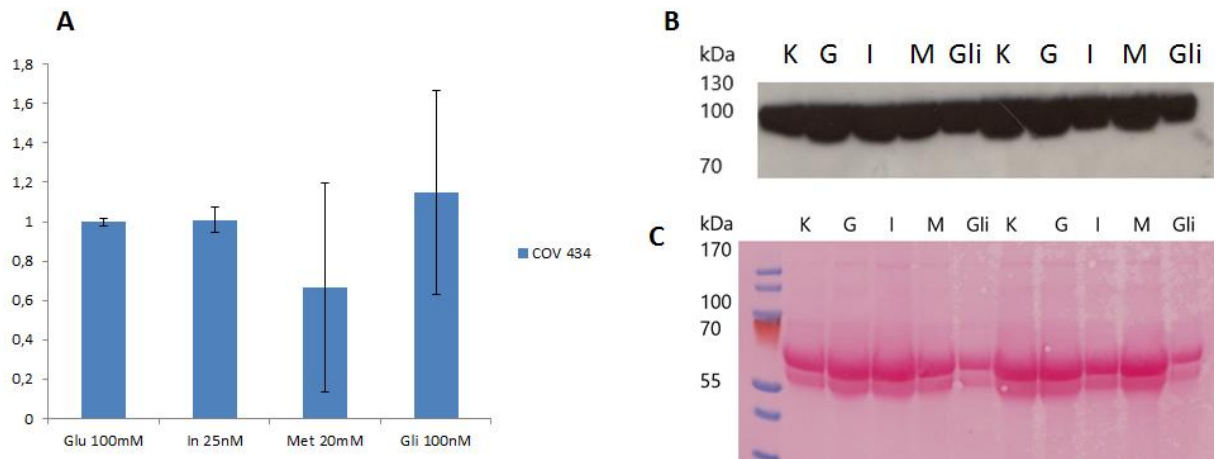


Abbildung 15: A (Darstellung der DPP4-Expression im Verhältnis zu DMSO der COV 434 im Überstand, Referenz Ponceau Färbung, $n_{COV\ 434} = 2$, $t = 48$ h), B (Western Blot der DPP4-Expression im Überstand der COV 434), C (Ponceau Färbung des Überstandes der COV 434), t- Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Abkürzungen: K - Kontrolle, G - Glukose, I - Insulin, M - Metformin, Gli - Sitagliptin

Im Überstand der COV 434 konnte keine veränderte Expression der DPP4 durch die verschiedenen Behandlungen detektiert werden.

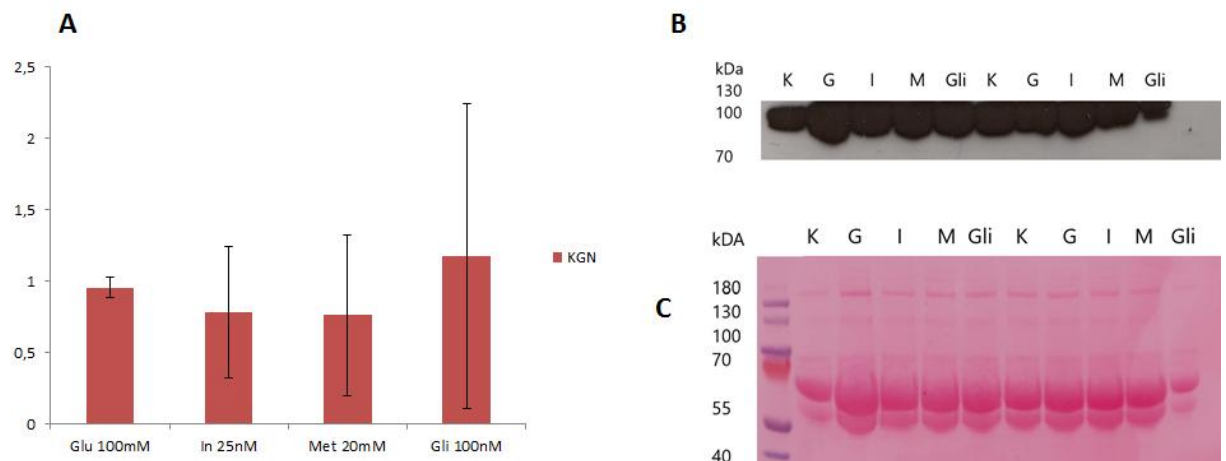


Abbildung 16: A (Darstellung der DPP4-Expression im Verhältnis zu DMSO der KGN im Überstand, Referenz Ponceau Färbung, $n_{KGN} = 2$, $t = 48$ h), B (Western Blot der DPP4-Expression im Überstand der KGN), C (Ponceau Färbung des Überstandes der KGN), t- Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Abkürzungen: K - Kontrolle, G - Glukose, I - Insulin, M - Metformin, Gli - Sitagliptin

Nach 48 h können im Überstand der KGN keine signifikanten Unterschiede der DPP4-Expression durch die Behandlung von Glukose, Insulin, Metformin oder Sitagliptin dargestellt werden.

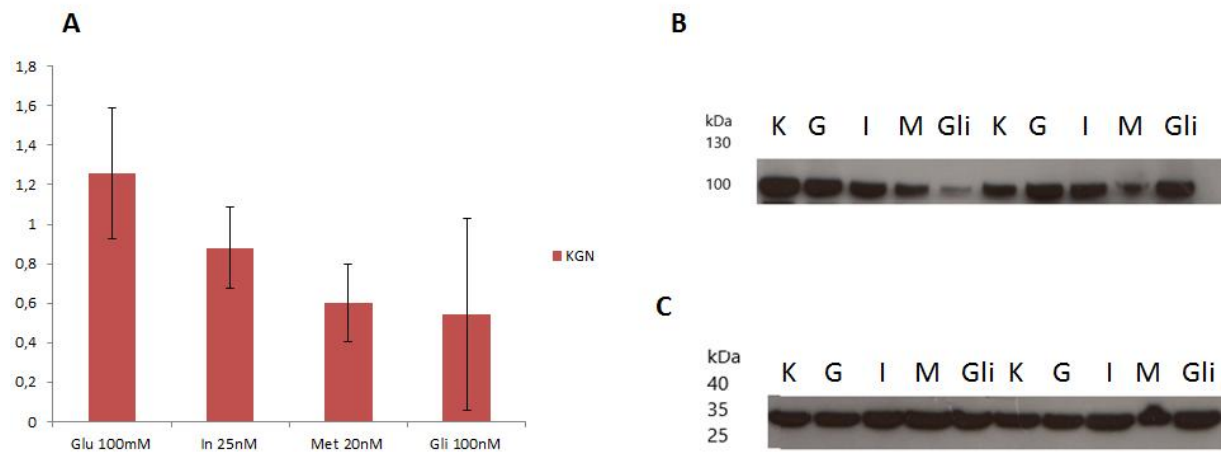


Abbildung 17: A (Darstellung der zellulären DPP4-Expression im Verhältnis zu DMSO der KGN, Referenz GAPDH, $n_{KGN} = 2$, $t = 48$ h), B (Western Blot der zellulären DPP4-Expression der KGN), C (Western Blot der zellulären GAPDH der KGN), t- Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Abkürzungen: K - Kontrolle, G - Glukose, I - Insulin, M - Metformin, Gli - Sitagliptin

Bei der Analyse der zellulären DPP4 der KGN fällt auf, dass durch die unterschiedlichen Behandlungen mit Glukose, Insulin, Metformin und Sitagliptin keine Veränderung der DPP4-Expression nachweisbar ist.

Auf Proteinebene ist keine Veränderung der DPP4-Expression durch Hyperglykämie, Hyperinsulinämie, Metformin oder Sitagliptin zu beobachten.

4.3 Analyse der Promotoraktivität der DPP4 durch 5'-Aza-2-Desoxycytidin

Durch die Behandlung mit 5'-Aza-2-Desoxycytidin (5'-Aza) besteht die Möglichkeit inaktivierte Gene zu reexprimieren. Durch die Hemmung der DNMT1 kommt es zu einem passiven Methylierungsverlust durch Zellteilung. Um eine genügende Anzahl von Zellteilungen zu gewährleisten, wurden die Zellen jeweils nach 72 h analysiert. Zur Ermittlung der verwendeten Konzentrationen wurde ein Vorversuch durchgeführt, um keine zytotoxische Konzentration zu verwenden.

4.3.1 Analyse der mRNA-Expression von DPP4 nach 5'-Aza-2-Desoxycytidin-Behandlung

Aus den nach 72 h geernteten Zellen wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer Realtime-PCR analysiert. Das folgende Diagramm zeigt die relative Expression der DPP4 im Vergleich zur DMSO-Lösungsmittelkonzentration.

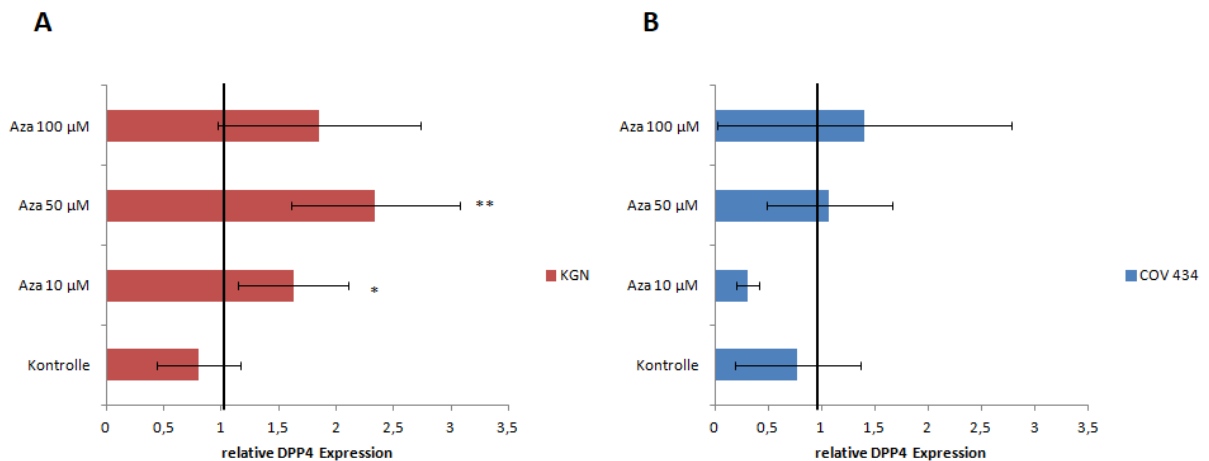


Abbildung 18: DPP4-mRNA-Expression in der Zelllinie der KGN (A, $n_{\text{KGN}} = 3$) und der COV 434 (B, $n_{\text{COV 434}} = 3$), $t = 72$ h unter Stimulation mit 5'-Aza, t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Bei einer Behandlung von 10 μM ($p = 0,032$) und 50 μM ($p = 0,009$) 5'-Aza ist bei der KGN nach 72 h eine signifikante Steigerung der DPP4-Expression auf das 1,6 bis 2,3fache zu beobachten, bei der Behandlung mit 100 μM 5'-Aza ist eine Steigerung auf das 1,8fache zu erkennen.

Bei der Analyse der COV 434 fällt auf, dass ab einer Konzentration von 50 μM 5'-Aza eine Steigerung der Expression auf mRNA-Ebene erkennbar ist. Die Behandlung mit 50 μM 5'-Aza hat eine Steigerung auf das 1,1fache und die Behandlung mit 100 μM 5'-Aza eine Steigerung auf das 1,4fache zur Folge.

4.3.2 Analyse der DPP4-Proteinexpression nach 5'-Aza-2-Desoxycytidin-Behandlung

Für die Untersuchung wurden die Zellen nach 72 h geerntet und die Proteine aus dem Zellpellet bzw. dem Überstand isoliert. Anschließend wurde der Western Blot durchgeführt.

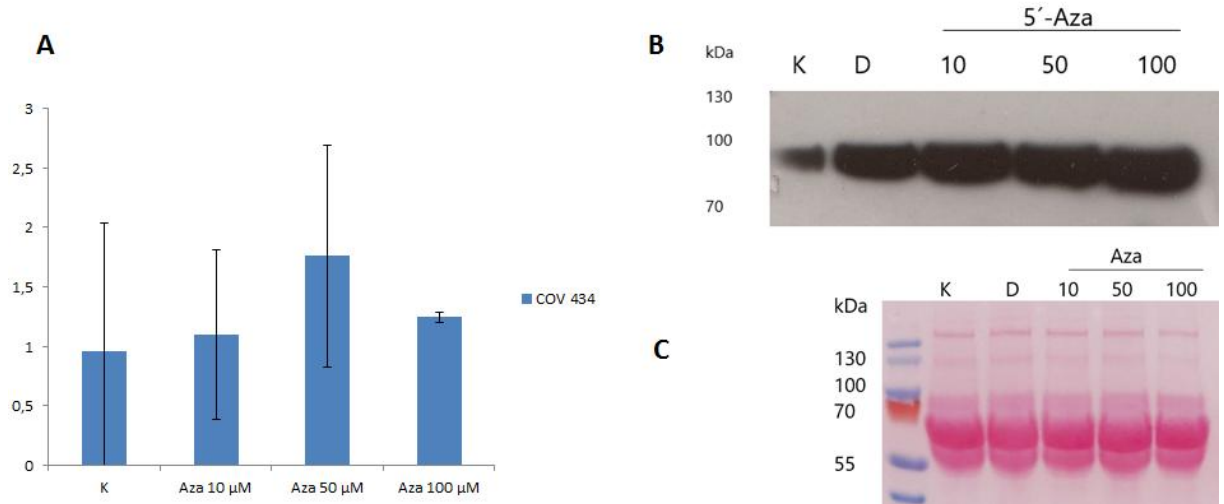


Abbildung 19: A (Darstellung der DPP4-Expression im Verhältnis zu DMSO der COV 434 im Überstand, Referenz Ponceau Färbung, $n_{\text{COV 434}} = 3$, $t = 72$ h), B (Western Blot der DPP4-Expression im Überstand der COV 434), C (Ponceau Färbung des Überstandes der COV 434), t- Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Abkürzungen: K - Kontrolle, D - DMSO, Aza – 5'-Aza-2-Desoxycytidin, 10; 50; 100 = 10; 50; 100 µM 5'-Aza-2-Desoxycytidin

Die Expression der im Überstand der COV 434 befindlichen DPP4-Proteine nimmt unter 5'-Aza Behandlung zu. Unter der Behandlung mit 50 µM 5'-Aza ist die stärkste Steigerung auf das 1,7fache zu beobachten.

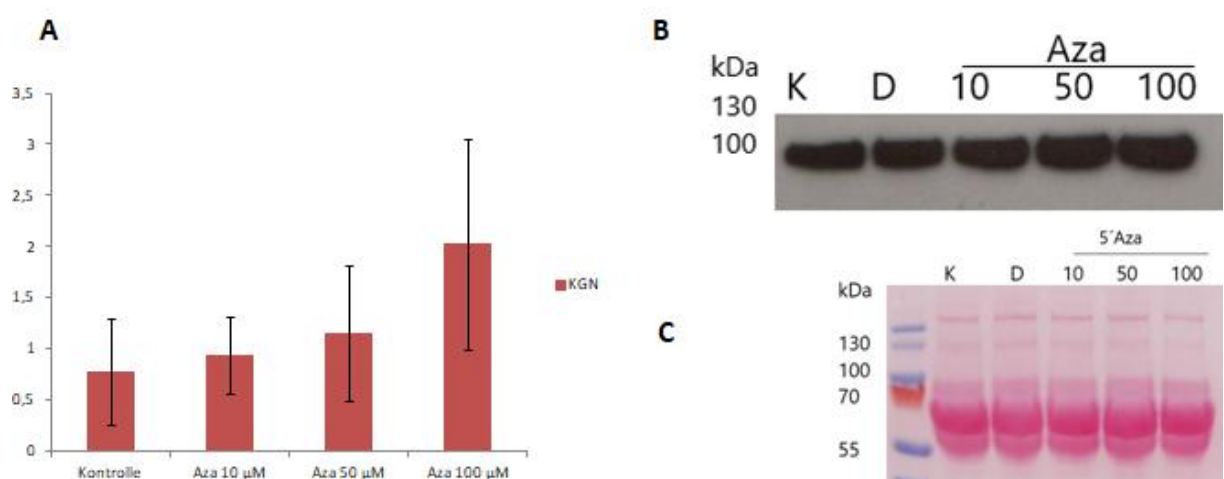


Abbildung 20: A (Darstellung der DPP4-Expression im Verhältnis zu DMSO der KGN im Überstand, Referenz Ponceau Färbung, $n_{\text{KGN}} = 3$, $t = 72$ h), B (Western Blot der DPP4-Expression im Überstand der KGN), C (Ponceau Färbung des Überstandes der KGN), t- Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Abkürzungen: K - Kontrolle, D - DMSO, Aza – 5'-Aza-2-Desoxycytidin, 10; 50; 100 = 10; 50; 100 µM 5'-Aza-2-Desoxycytidin

Bei Analyse des Überstandes der KGN fällt auf, dass die DPP4-Expression durch die Behandlung mit 5'-Aza steigt. Durch die Behandlung mit 50 µM 5'-Aza steigt diese auf das

1,2fache. Unter der Behandlung mit 100 μM 5'-Aza steigt die DPP4-Expression auf das 2,0fache.

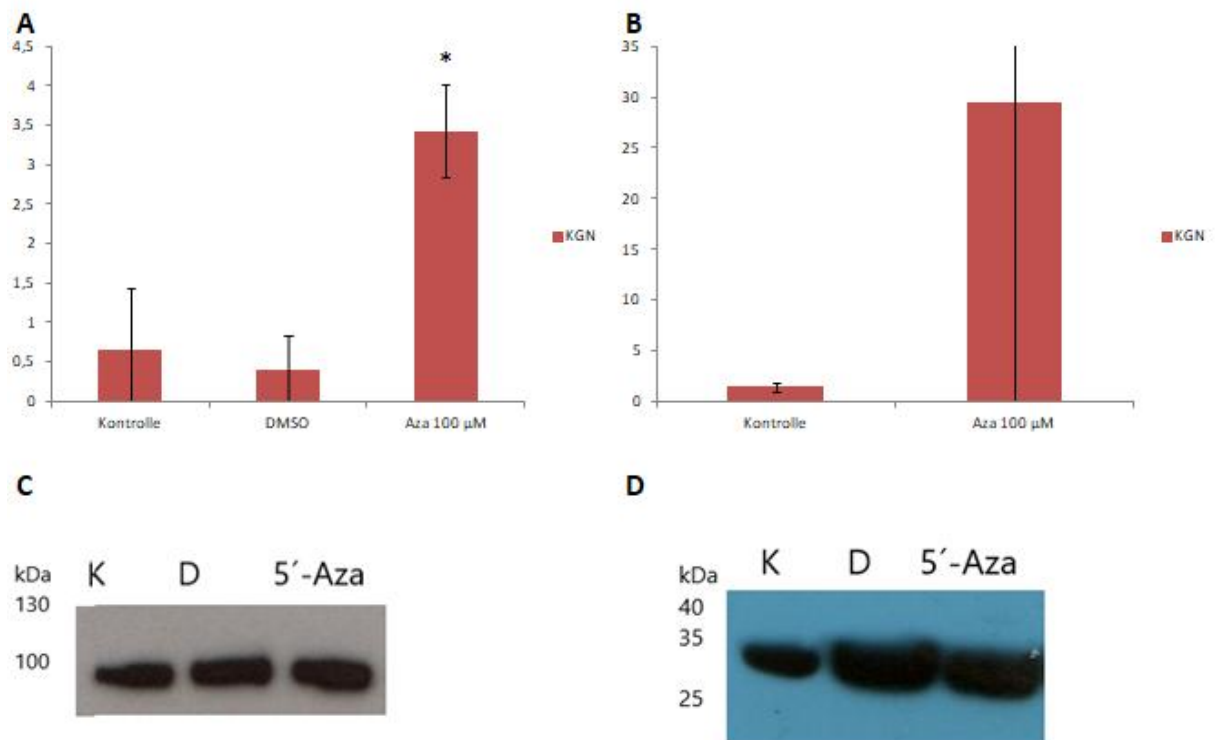


Abbildung 21: A (Darstellung der zellulären DPP4-Expression der KGN, Referenz GAPDH, $n_{\text{KGN}} = 2$, $t = 72\text{h}$), B (Darstellung der zellulären DPP4-Expression im Verhältnis zu DMSO der KGN, Referenz GAPDH, $n_{\text{KGN}} = 2$, $t = 72\text{h}$), C (Western Blot der zellulären DPP4-Expression der KGN), D (Western Blot der zellulären GAPDH-Expression der KGN), t- Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Abkürzungen: K - Kontrolle, D - DMSO, Aza 100 μM = 100 μM 5'-Aza-2-Desoxycytidin, 5'-Aza – 5'-Aza-2-Desoxycytidin

Bei der Auswertung der zellulären DPP4 wird deutlich, dass durch die Behandlung mit 5'-Aza die Expression der DPP4 signifikant steigt. Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO steigt die DPP4-Expression auf das 29fache.

Durch die Behandlung mit 5'-Aza nimmt die Proteinexpression von DPP4 bei der COV 434 im Überstand zu, besonders bei einer Behandlung mit 50 μM 5'-Aza. Im Überstand der KGN ist die Steigerung der DPP4-Expression sowohl bei 50 μM als auch bei 100 μM deutlich. Die zelluläre DPP4-Expression der KGN steigt durch 5'-Aza Behandlung signifikant.

4.4 Auswertung der Patientenproben

Durch die Untersuchung der Serumproben von Patientinnen und Patienten der Kinderwunschprechstunde sollten DPP4-Aktivität und -Konzentration zwischen Patientinnen mit PCOS und Patientinnen ohne PCOS sowie zwischen Frauen und Männern verglichen werden.

Außerdem sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der DPP4-Aktivität und -Konzentration und der Implantationswahrscheinlichkeit und der Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Schwangerschaft untersucht werden.

4.4.1 Beschreibung der Kohorte

Die Serumproben der Patientinnen wurden zwischen 2010 und 2013 im Zentrum für Reproduktion und Andrologie im Universitätsklinikum Halle (Saale) gesammelt. Anschließend wurde eine Gruppierung anhand der diagnostizierten Erkrankungen vorgenommen und eine anonymisierte Datenbank erstellt.

Insgesamt wurden Proben von 103 Patientinnen untersucht. Davon haben 29 Frauen keine bekannte Diagnose, die mit einer reduzierten Fertilität in Zusammenhang steht.

11 Patientinnen der Kohorte haben die Diagnose PCOS, und 11 PCOS und eine weitere Erkrankung. Diese 22 Patientinnen wurden als eine Gruppe in die Auswertung aufgenommen.

Die Anzahl der Patientinnen mit Endometriose beträgt in dieser Kohorte 20, zusätzlich haben 7 Patientinnen die Diagnose Endometriose und eine weitere Erkrankung.

21 Patientinnen dieser Kohorte wiesen eine Tubenpathologie auf.

Unter dem Aspekt „Sonstiges“ wurden Erkrankungen gruppiert, die nicht direkt auf die Fertilitätsorgane zurückführen sind. Unter anderem sind Gerinnungsstörungen sowie psychische Erkrankungen zu nennen.

4.4.2 Zusammenhang Aktivität und Konzentration

Für die klinische Bedeutung der DPP4 für Kinderwunschpatientinnen stellen die Konzentration und die Aktivität entscheidende Parameter dar. In einer Pearson Korrelation kann eine negative Korrelation dieser Parameter gezeigt werden ($r = -0,25$). Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 zweiseitig signifikant.

4.4.3 Korrelation zwischen Aktivität, Konzentration und Alter

Das Alter ist ein entscheidender Faktor für die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Konzeption. In einer Pearson Korrelation kann eine positive Korrelation zwischen Alter und der DPP4-Aktivität im Serum gezeigt werden ($r = 0,20$). Die Korrelation ist auf dem Niveau von

0,05 zweiseitig signifikant. Des Weiteren kann eine leicht negative Korrelation zwischen dem Alter und der DPP4-Konzentration gezeigt werden ($r = -0,07$). Diese Korrelation ist nicht signifikant.

4.4.4 Aktivität und Konzentration bei Frauen und Männern

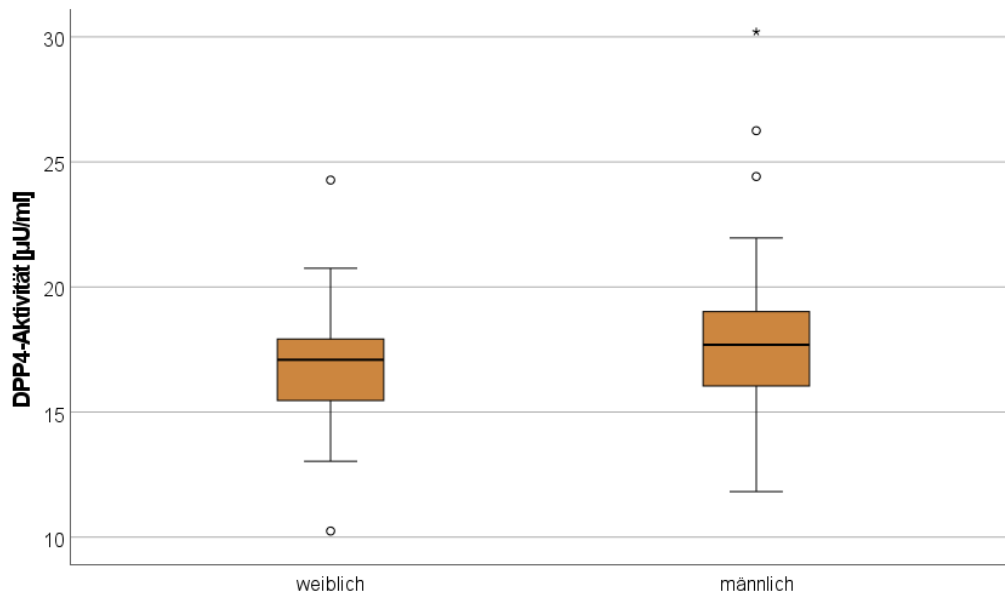


Abbildung 22: Darstellung der DPP4-Aktivität [$\mu\text{U/ml}$] in Abhängigkeit vom Geschlecht, weiblich ($n = 103$), männlich ($n = 63$)

Der Median der DPP4-Aktivität ist bei Frauen mit $16,3 \mu\text{U/ml}$ niedriger als bei Männern mit $17,7 \mu\text{U/ml}$.

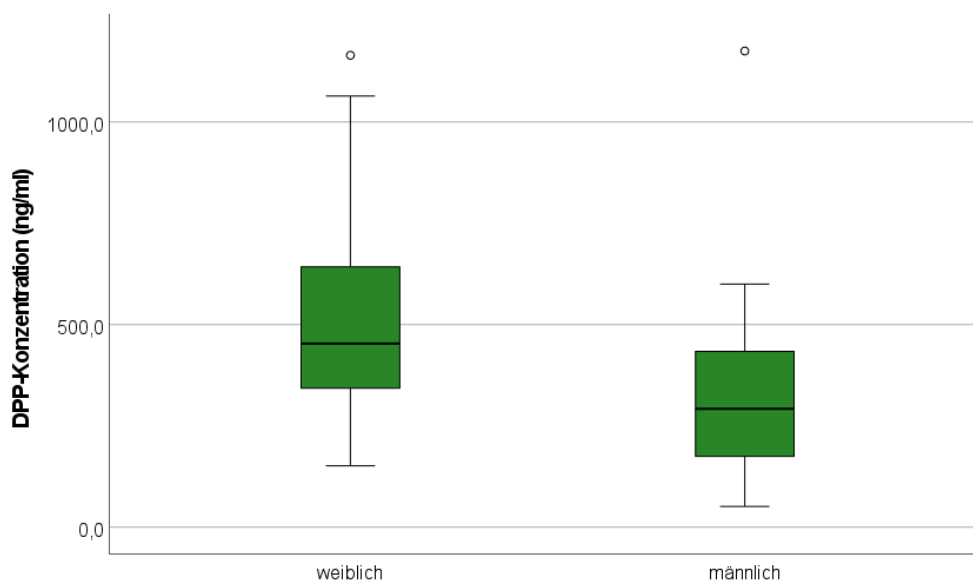


Abbildung 23: Darstellung der DPP4-Konzentration [ng/ml] in Abhängigkeit vom Geschlecht, weiblich ($n = 103$), männlich ($n = 63$)

Der Median der DPP4-Konzentration liegt bei Frauen bei 607 ng/ml und bei Männern bei 458 ng/ml. Damit liegt der Zentralwert bei Frauen höher als bei Männern.

Es lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der DPP4-Serumaktivität und Serumkonzentration nachweisen. Tendenziell liegen jedoch die DPP4-Konzentrationen bei Frauen und die Aktivitätslevel bei Männern höher.

4.4.5 Aktivität und Konzentration in Abhängigkeit von der fertilitätseinschränkenden Diagnose

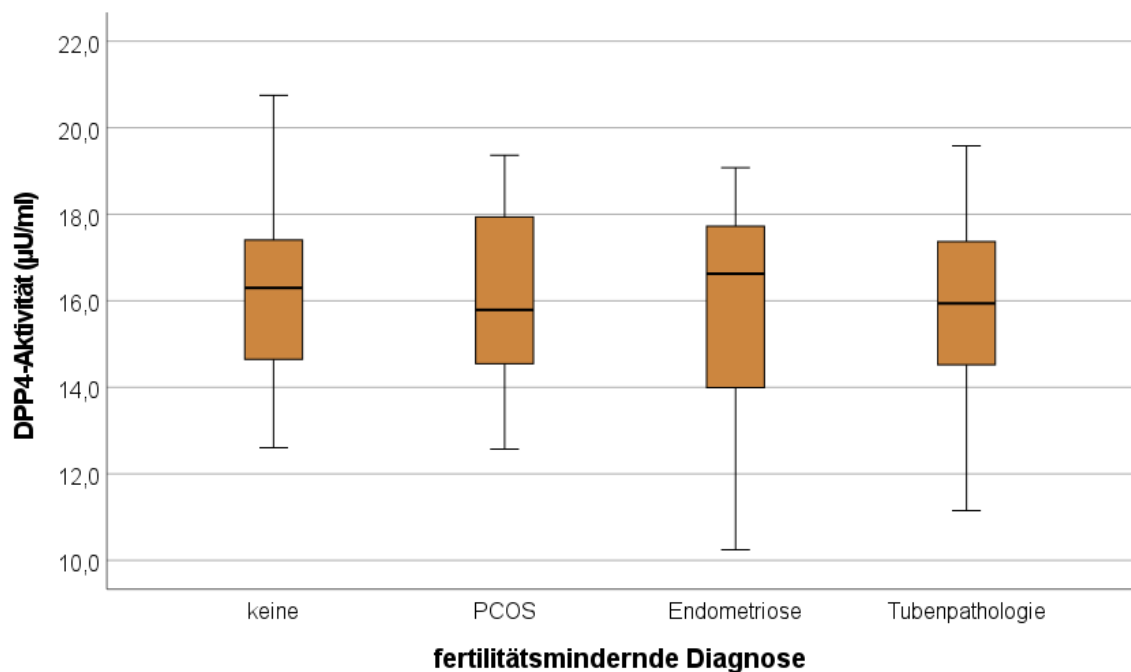


Abbildung 24: Darstellung der DPP4-Aktivität [$\mu\text{U}/\text{ml}$] in Abhängigkeit von der Diagnose

In Abbildung 24 wird deutlich, dass es keine signifikanten Unterschiede der DPP4-Aktivität in Abhängigkeit von der Diagnose gibt. Der höchste Durchschnitt wurde bei Patientinnen mit PCOS gemessen, dieser beträgt $15,7 \mu\text{U}/\text{ml}$. Die Aktivität der Vergleichsgruppen lag bei $15,5 \mu\text{U}/\text{ml}$ für Patientinnen ohne bekannte fertilitätseinschränkende Erkrankung, $14,9 \mu\text{U}/\text{ml}$ bei Patientinnen mit Endometriose und $15,1 \mu\text{U}/\text{ml}$ in der Gruppe der Patientinnen mit Tubenpathologien.

In einzelnen Mann-Whitney-U-Tests zeigten sich keine signifikanten Unterschied zwischen der Aktivität von PCOS-Patientinnen ($M_{\text{Rang}} = 49,20$) und Patientinnen ohne bekannte Diagnose ($M_{\text{Rang}} = 50,42$), Tubenpathologien ($M_{\text{Rang}} = 52,56$) und Endometriose ($M_{\text{Rang}} = 47,14$), $p = 0,93$.

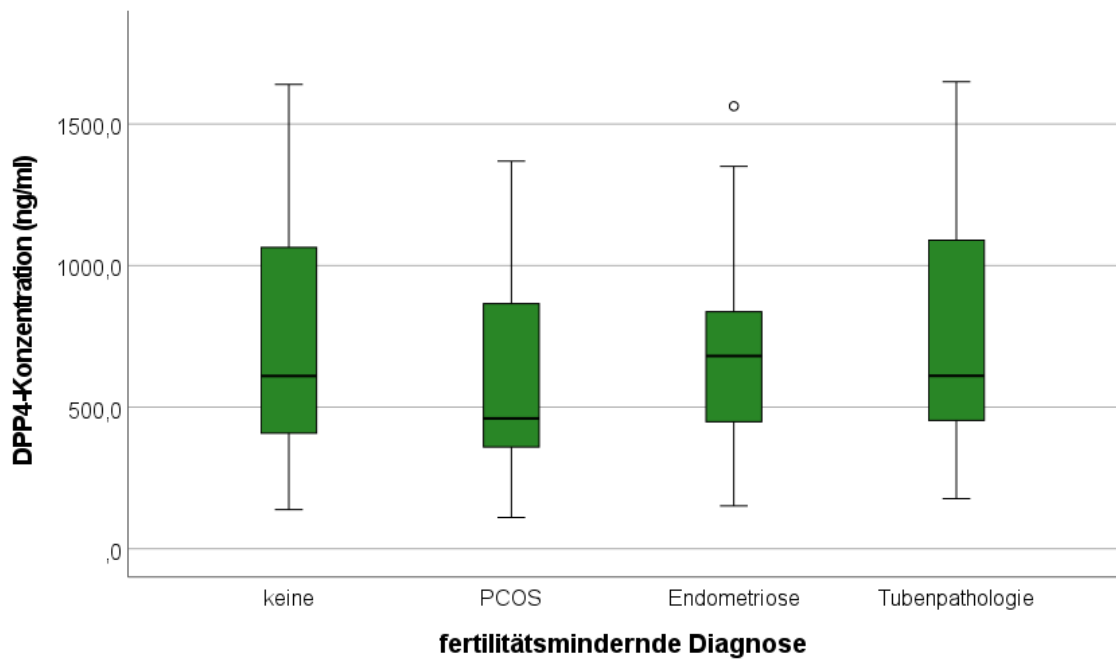


Abbildung 25: Darstellung der DPP4-Konzentration [ng/ml] in Abhängigkeit von der Diagnose

Durch die Abbildung 25 wird verdeutlicht, dass es zwischen den verschiedenen Diagnosen keinen signifikanten Unterschied der DPP4-Konzentrationen gibt. Bei Patientinnen mit PCOS wurde im Durchschnitt eine Konzentration von 595,9 ng/ml gemessen. Dieser Wert liegt unter denen der Vergleichsgruppen: Patientinnen ohne bekannte fertilitätseinschränkende Diagnose (734,0 ng/ml), Patientinnen mit bekannten Tubenpathologien (715,3 ng/ml) sowie Endometriose-Patientinnen (8,51,2 ng/ml). Die Berechnung eines Mann-Whitney-U-Tests ergab folgende Ränge : Patientinnen ohne bekannte Diagnose ($M_{\text{Rang}} = 49$), PCOS-Patientinnen ($M_{\text{Rang}} = 40,92$), Patientinnen mit einer bekannten Tubenpathologie ($M_{\text{Rang}} = 52,56$), von Endometriose betroffene Patientinnen ($M_{\text{Rang}} = 54,05$), $p = 0,41$. In dem untersuchten Patientinnenkollektiv konnte kein signifikanter Unterschied der DPP4-Serumaktivität und -konzentration in Abhängigkeit verschiedener fertilitätseinschränkender Erkrankungen aufgezeigt werden.

4.4.6 Aktivität und Konzentration im Zusammenhang mit dem Outcome Schwangerschaft

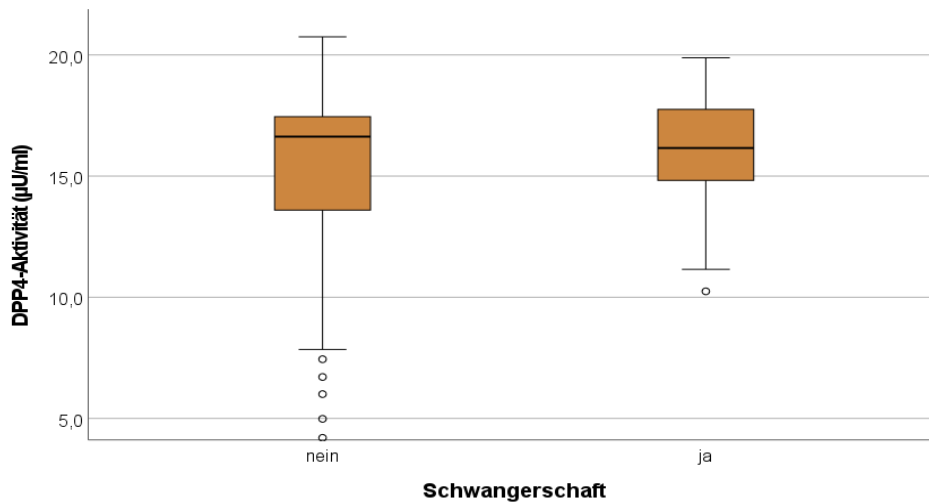


Abbildung 26: Darstellung der DPP4-Aktivität [$\mu\text{U/ml}$] in Abhängigkeit vom Outcome Schwangerschaft

In der untersuchten Kohorte wurden in der Zeit zwischen 2010 bis 2013 29 Patientinnen schwanger, das entspricht einem Anteil von 28,1 %. In der Abbildung 26 wird die Aktivität der Patientinnen in Abhängigkeit vom Outcome Schwangerschaft dargestellt. Die durchschnittliche Aktivität bei Patientinnen, die schwanger wurden, liegt bei 16,1 $\mu\text{U/ml}$. Im Vergleich dazu liegt der Durchschnitt bei nicht schwanger gewordenen Patientinnen mit 14,9 $\mu\text{U/ml}$ leicht niedriger. Bei der Durchführung des Mann-Whitney-U-Tests ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patientinnen, die schwanger wurden ($M_{\text{Rang}} = 45,74$) und Patientinnen, welche nicht schwanger wurden ($M_{\text{Rang}} = 42,24$), $p = 0,53$.

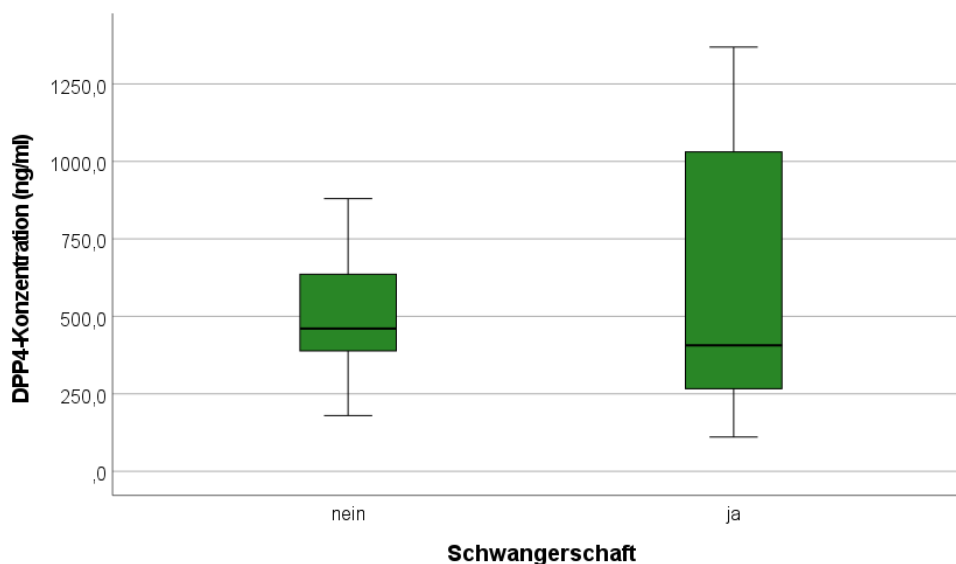


Abbildung 27: Darstellung der DPP4-Konzentration [ng/ml] in Abhängigkeit vom Outcome Schwangerschaft.

Die durchschnittliche Konzentration liegt bei Patientinnen, welche schwanger wurden, mit 746,4 ng/ml höher als bei Patientinnen, welche nicht schwanger wurden (598,8 ng/ml).

Die Berechnung des Mann-Whitney-U-Tests ergab keinen signifikanten Unterschied der Konzentration von DPP4 bei Patientinnen, welche schwanger wurden ($M_{\text{Rang}} = 41,55$) und Patientinnen, welche nicht schwanger wurden ($M_{\text{Rang}} = 43,83$), $p = 0,681$.

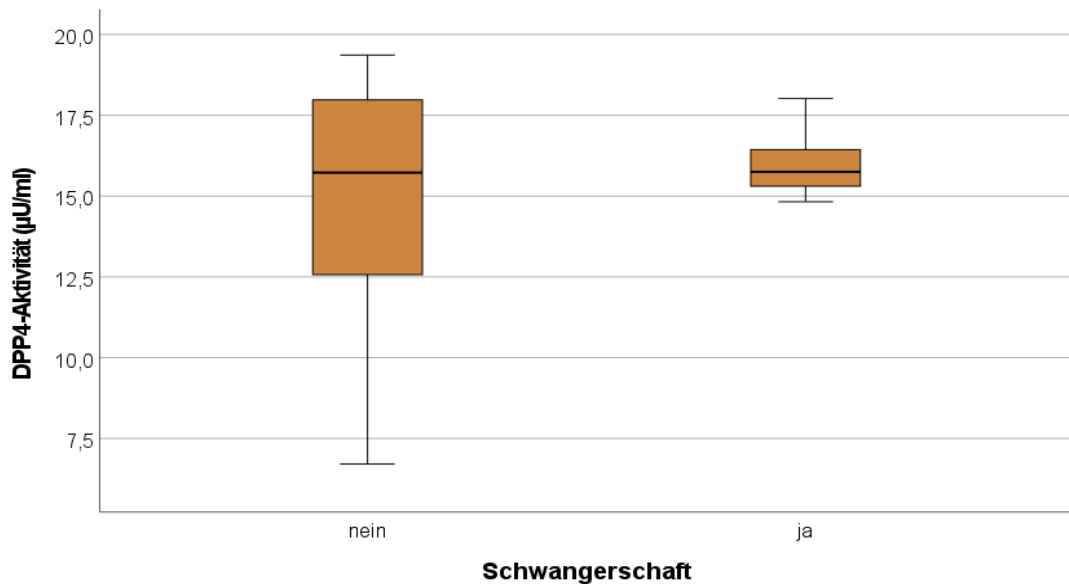


Abbildung 28: Darstellung der DPP4-Aktivität [$\mu\text{U/ml}$] in Abhängigkeit vom Outcome Schwangerschaft bei PCOS-Patientinnen

Von den Patientinnen mit PCOS, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, stellte sich bei 10 eine Schwangerschaft ein. Die durchschnittliche Aktivität liegt bei Patientinnen, welche schwanger wurden, mit 16,1 $\mu\text{U/ml}$ höher als bei Patientinnen, welche nicht schwanger wurden (15,4 $\mu\text{U/ml}$). Im Mann-Whitney-U-Test stellt sich kein signifikanter Unterschied im Bezug auf die DPP4-Aktivität zwischen Patientinnen, welche schwanger wurden ($M_{\text{Rang}} = 11,40$) und Patientinnen, welche nicht schwanger wurden ($M_{\text{Rang}} = 10,64$), $p=0,78$, dar.

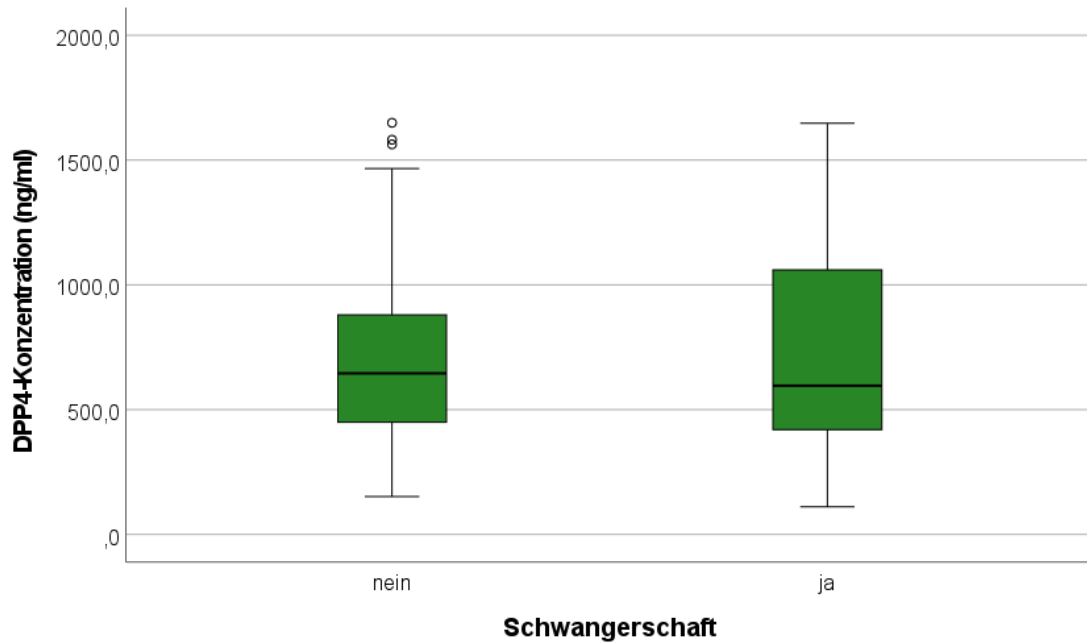


Abbildung 29: Darstellung der DPP4-Konzentration [ng/ml] in Abhängigkeit vom Outcome Schwangerschaft bei PCOS-Patientinnen.

In Abbildung 29 wird deutlich, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Konzentrationen bei PCOS-Patientinnen gibt, die schwanger geworden sind und denen, die nicht schwanger geworden sind. Im Durchschnitt liegt die Konzentration bei Patientinnen, welche schwanger wurden bei 591,6 ng/ml und bei Patientinnen, welche nicht schwanger wurden bei 598,8 ng/ml. Im Mann-Whitney-U-Test ergaben sich folgende Werte: Patientinnen, welche schwanger wurden ($M_{\text{Rang}} = 10,60$), Patientinnen, welche nicht schwanger wurden ($M_{\text{Rang}} = 10,60$), $p = 0,78$. Es zeigt sich, dass in unserem Patientinnenkollektiv kein Zusammenhang zwischen DPP4-Serumkonzentration und –aktivität und der Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaft nachweisbar ist.

4.4.7 Aktivität und Konzentration im Zusammenhang mit dem Outcome Abort

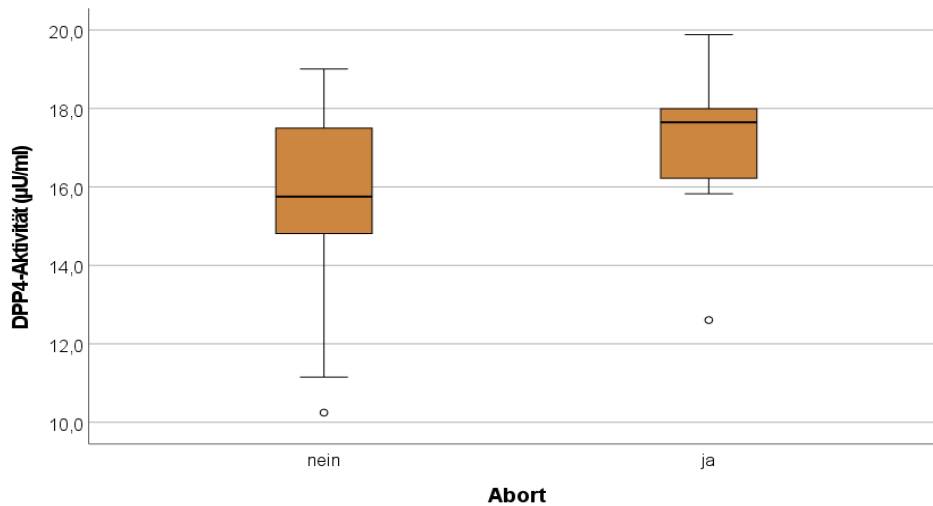


Abbildung 30: Darstellung der DPP4-Aktivität [$\mu\text{U/ml}$] in Abhängigkeit vom Outcome Abort

In der beschriebenen Kohorte kam bei 29 Patientinnen eine Schwangerschaft zu Stande, davon erlitten 6 Patientinnen einen Abort. Das entspricht einem Anteil von 21 %.

In der Abbildung 30 wird deutlich, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen stattgehabten Abort und erfolgreicher Schwangerschaft im Bezug auf die DPP4-Aktivität gibt. Durchschnittlich liegt die DPP4-Aktivität bei Patientinnen mit stattgehabtem Abort mit $17,0 \mu\text{U/ml}$ höher als bei Patientinnen mit einer erfolgreichen Schwangerschaft und der Geburt von mindestens einem Kind ($15,7 \mu\text{U/ml}$). Der Mann-Whitney-U-Test ergab folgende Werte: stattgehabter Abort ($M_{\text{Rang}} = 20,38$), erfolgreiche Schwangerschaft ($M_{\text{Rang}} = 14,48$), $p = 0,11$.

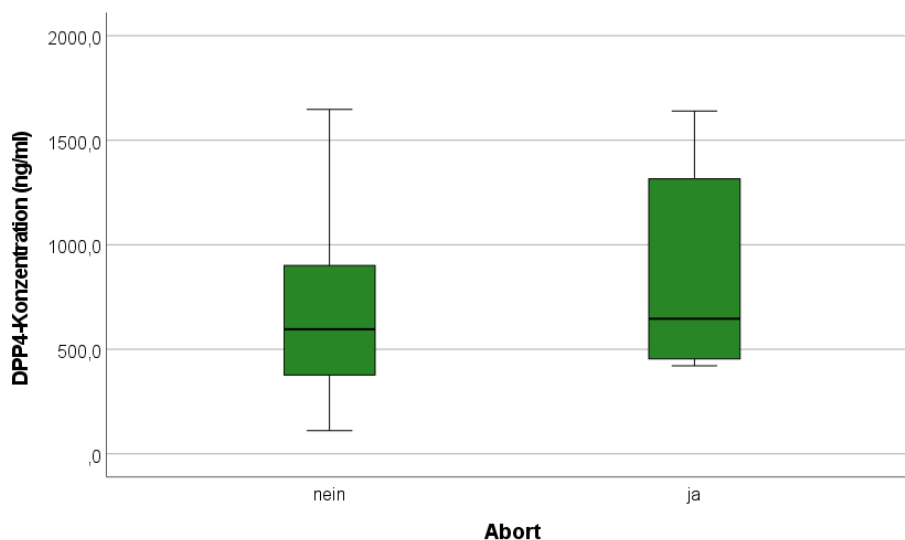


Abbildung 31: Darstellung der DPP4-Konzentration [ng/ml] in Abhängigkeit vom Outcome Abort.

Bei der Analyse der DPP4-Konzentrationen von Patientinnen mit stattgehabten Abort und erfolgreicher Schwangerschaft kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Durchschnittlich haben Patientinnen mit stattgehabtem Abort eine Konzentration von 861,8 ng/ml und Patientinnen mit einer erfolgreichen Schwangerschaft im Durchschnitt eine Konzentration von 729,4 ng/ml. Im Mann-Whitney-U-Test ergibt sich für Patientinnen mit stattgehabten Abort ein mittlerer Rang von 18,25 und bei Patientinnen mit erfolgreicher Schwangerschaft ein mittlerer Rang von 15,22, $p = 0,42$. Es zeigt sich, dass in unserem Patientinnenkollektiv kein Zusammenhang zwischen DPP4-Serumkonzentration und –aktivität und dem Risiko für einen Abort im Verlauf der Schwangerschaft existiert.

5 Diskussion

5.1 Regulation der DPP4 unter Androgen- und Östrogeneinfluss

Nach der Definition der ESHRE ist ein Kriterium für die Diagnose PCOS der Hyperandrogenismus. Ziel dieser Untersuchung ist es den Einfluss von Androgenen und Estrogen auf die Expression der DPP4 zu beleuchten, um ein weiteres Verständnis des Pathomechanismus und verschiedener Wechselwirkungen zu erlangen. Durch die Behandlung mit Testosteron und Dihydrotestosteron konnte eine Steigerung der DPP4-Expression in beiden Zelllinien gezeigt werden. Eine andere Arbeitsgruppe konnte im Tiermodell zeigen, dass eine Testosteronexposition während der Schwangerschaft eine Dysregulation des Glukosestoffwechsels und eine erhöhte DPP4-Aktivität bedingt (Usman, Olatunji, 2021). Trotz geringerer Konzentration von Dihydrotestosteron war der Einfluss auf die Expression teilweise genau so groß, teilweise sogar ausgeprägter, als bei Testosteron, was darauf schließen lässt, dass auch in diesem Zusammenhang Dihydrotestosteron der aktivere Metabolit ist. Durch die beobachteten Veränderungen lässt sich ein Feedback-Mechanismus vermuten. Beim PCOS bewirkt unter anderem eine erhöhte Insulinkonzentration eine erhöhte Androgenkonzentration. Die erhöhte Androgenkonzentration steigert die Expression der DPP4 und vermindert so die Wirkung von GLP-1 und GIP. Durch den reduzierten Inkretineffekt wird die Insulinausschüttung vermindert und wirkt so einer Hyperinsulinämie entgegen. Um diese These zu stärken, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Wie bereits beschrieben, wirkt sich Estradiol nach 24 h in geringer Konzentration steigernd auf die DPP4-Expression aus und in höheren Konzentrationen hemmend. Diese Tendenz zeigt sich in beiden Zelllinien jedoch ohne Signifikanz. Dieser Einfluss zeigt sich auf mRNA-Ebene nur in den ersten 24 h, was auf eine kurzfristige Regulation bei Konzentrationsänderung schließen lässt. Die Werte nach 48 bzw. 72 h weisen eine breite Streuung auf. Eine Modulation der DPP4-Expression bei PCOS durch Estradiol scheint daher weniger relevant als der Einfluss der Androgene.

Auf Proteinebene konnten die auf mRNA vermuteten Zusammenhänge leider nicht abschließend bestätigt werden. Wie bereits beschrieben, kann DPP4 als Transmembranprotein oder in löslicher Form vorliegen. Aus diesem Grund wurde die Expression im Überstand, vermuteter Weise der löslichen Form der DPP4, und in der zellgebundenen Form der DPP4, als Transmembranprotein, gesondert untersucht. Es konnte die erhöhte Expression der DPP4 durch Dihydrotestosteron und Testosteron im Überstand gezeigt werden. Um dieses noch einmal deutlicher zu zeigen, braucht es weitere Versuche über ggf. längere Zeiträume als 48 h.

5.2 Regulation der DPP4 durch metabolische Veränderungen

Im vorhergehenden Kapitel konnte eine Regulation der DPP4-Expression durch Androgene aufgezeigt werden. Um diesen Zusammenhang zu stärken, wurden weitere mögliche Einflussfaktoren auf die DPP4-Expression untersucht. Es besteht die Möglichkeit, dass auch die metabolischen Veränderungen des PCOS, wie Hyperglykämie und Hyperinsulinismus, einen Einfluss auf die Regulation der DPP4-Expression haben.

Durch die durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass weder eine erhöhte Glukosekonzentration, noch eine erhöhte Insulinkonzentration einen Einfluss auf die Expression der DPP4 haben. Dieses Ergebnis zeigt sich sowohl auf der mRNA-Ebene als auch bei der Untersuchung der Proteine. Diese Ergebnisse decken sich mit denen einer anderen Arbeitsgruppe, welche ebenfalls zeigten, dass Insulin die Expression von DPP4 nicht verändert (Larmers et al., 2011). Dadurch wird eine Regulation durch diese metabolischen Einflüsse unwahrscheinlich.

Verschiedene Autoren propagieren den Einsatz von DPP4-Hemmern als Behandlungsoptionen bei PCOS-Patientinnen (Kabel et al., 2017; Öztürk et al., 2019; Daneshjou et al., 2021). Die durchgeführten Experimente untersuchen, ob dieser neuen therapeutischen Option, eine mögliche Regulation der DPP4-Expression durch Sitagliptin.

Es zeigte sich, dass die Verwendung von Sitagliptin bereits eine Hemmung der DPP4-Expression auf mRNA-Ebene bewirkt. In der Literatur wurde der Wirkmechanismus von Sitagliptin durch die Interaktion mit dem aktiven Zentrum der DPP4 beschrieben (Röhrborn et al., 2015). Eine andere Studie konnte zeigen, dass Sitagliptin die Expression von Aromatase reguliert (Lin, Wang, 2021). Die von Lin und Wang beschriebenen Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass Sitagliptin möglicherweise verschiedene Wirkmechanismen aufweist. Die Daten dieser Arbeit legen nahe, dass auch die Hemmung der DPP4 nicht nur durch die Interaktion mit dem aktiven Zentrum, sondern möglicherweise durch verschiedene Wirkmechanismen erreicht wird.

Eine weitere Therapieoption mit *good-clinical-practise* bei der Behandlung von PCOS-Patientinnen ist Metformin.

In den Versuchen zeigte sich in der Zelllinie der COV 434 eine Expressionssteigerung der DPP4 durch Metformin. Dieser Zusammenhang war besonders auf Ebene der mRNA aufzuzeigen. Die Beobachtung der DPP4-Expression auf Proteinebene konnte die Ergebnisse leider nicht reproduzieren. Für das genauere Verständnis sind weitere Beobachtungszeitpunkte neben den bereits untersuchten 48 h notwendig. Bisher zeigte keine Studie einen Zusammenhang zwischen der DPP4-Expression und Metformin. Dagegen wurde beschrieben, dass Metformin die DPP4-Aktivität im Serum verändern kann. In verschiedenen Experimenten

verringerte Metformin konzentrationsabhängig die endogene Plasmaaktivität der DPP4 bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (Nargis, Chakrabarti, 2018).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine mögliche Einflussnahme von Metformin auf die DPP4 und damit den Inkretineffekt.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass für unsere Versuche suprapharmakologische Konzentrationen (>1 mM) verwendet wurden, welche im klinischen Setting nicht anzutreffen sind. Es gilt die klinisch relevanten Konzentrationen (50-100 µM) weiter zu untersuchen und so ggf. die dargestellten Ergebnisse zu bestätigen (LaMoia, Shulman, 2021).

Trotz unserer Untersuchungen und verschiedener Beobachtungen durch andere Arbeitsgruppen scheint der komplexe Wirkungsmechanismus noch nicht abschließend verstanden worden zu sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Regulation der DPP4-Expression bei PCOS-Patientinnen durch die bestehenden metabolischen Veränderungen unwahrscheinlich ist. Sitagliptin, als Vertreter der DPP4-Hemmer, und Metformin zeigen jeweils einen leichten Einfluss auf die DPP4-Expression, was noch unbekannte Wirkmechanismen vermuten lässt.

5.3 Regulation der DPP4 durch 5'-Aza-2-Desoxycytidin

In verschiedenen Studien konnte durch die Verwendung von Zellkulturen und Tiermodellen eine erhöhte DPP4-Expression bei PCOS gezeigt werden. Es sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um diese Ergebnisse zu verifizieren. Wenige Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Methylierungszustand der entsprechenden Genabschnitte.

Durch die Behandlung mit 5'-Aza-2-Desoxycytidin wird ein passiver Methylierungsverlust während der Zellteilung bewirkt. Durch die Hypomethylierung konnte eine signifikante Steigerung der DPP4-Expression beobachtet werden. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Regulation der DPP4-Expression unter anderem epigenetisch erfolgt und ein Verlust der Methylierung eine Expressionssteigerung bedingt. Eine negative Assoziation des Methylierungsgrades und der DPP4-Expression auf mRNA-Ebene wurde auch in einer anderen Studie, welche sich mit der Analyse viszeralen Fettgewebes schwer adipöser Patientinnen beschäftigt, beschrieben (Röhrborn et al., 2015). Durch die beschriebenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die DPP4-Expression auf Ebene der mRNA und auf der Ebene der Proteine nachweisbar ist. Die verstärkte Proteinexpression der DPP4 ist sowohl im Überstand als auch zellulär erkennbar. Daraus kann geschlossen werden, dass die Regulation sowohl die membrangebundene als auch die lösliche Form der DPP4 betrifft. Interessant werden genauere Beobachtungen sein, welche externen Substanzen und Umstände das Methylierungsmuster beeinflussen.

5.4 Analyse der Konzentration und Aktivität von DPP4 im Serum von Kinderwunschpatientinnen

Im Weiteren beschäftigt sich diese Arbeit mit dem Zusammenhang der DPP4-Konzentration und -Aktivität im Serum von Kinderwunschpatientinnen unter der Fragestellung einer möglichen Relevanz der DPP4 als Biomarker und einer möglichen Behandlungsindikation.

Ein weiteres Ziel ist der Vergleich der DPP4-Aktivität und -Konzentration zwischen Kinderwunschpatientinnen mit verschiedenen fertilitätseinschränkenden Erkrankungen sowie einen Vergleich zwischen Kinderwunschpatientinnen und Kinderwunschpatienten darzustellen.

5.4.1 Zusammenhang zwischen Aktivität und Konzentration und Alter

Der Zusammenhang zwischen der Aktivität und Konzentration der DPP4 ist noch nicht abschließend geklärt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es bei Kinderwunschpatientinnen eine leichte negative Korrelation zwischen Konzentration und Aktivität gibt. Die Korrelation von DPP4-Aktivität und -Konzentration wurde bereits im Zusammenhang mit metabolischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Hypertonie und Adipositas untersucht. In einer Studie die DPP4 im Zusammenhang mit Diabetes mellitus, Hypertonie und chronischer Nierenerkrankung untersuchte, konnte keine Korrelation zwischen Aktivität und Konzentration gezeigt werden (Nistala, Savin, 2017). Eine andere Studie beschreibt eine positive Relation zwischen der Aktivität und der Konzentration der DPP4. Dabei beschreibt die Studie, dass bei der Behandlung naiver Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 die Plasma DPP4-Konzentrationen sowie die enzymatische Aktivität höher als bei gesunden Kontrollprobanden waren (Nargis, Chakrabarti, 2018).

Diese vielfältigen Ergebnisse verschiedener Studiengruppen legen den Rückschluss nahe, dass weitere, noch unbekannte Einflüsse, auf die Aktivität und Konzentration der DPP4 einwirken.

In dieser Arbeit wird beschrieben, dass zwischen dem Alter und der DPP4-Aktivität eine positive Korrelation bestehen könnte. In einer anderen Arbeit wurde durch eine multiple Regressionsanalyse gezeigt, dass die DPP4-Aktivität im Alter abnimmt (Durinx et al., 2001). Bei all diesen Betrachtungen sind die Kohorten genauer zu unterscheiden. Für diese Berechnungen wurden nur die Proben der Patientinnen verwendet. In den beschriebenen Studien von Nistala et Savin und Nargis et Chakrabart sowie Durinx et al. dagegen waren sowohl Frauen als auch Männer eingeschlossen. Vermuten lässt sich eine geschlechterabhängige Korrelation.

5.4.2 Vergleich zwischen den Aktivitätsleveln und Konzentrationen von Männern und Frauen

Bei Verdacht auf eine geschlechterabhängige Korrelation ist es interessant die Verteilung der DPP4-Konzentration und -Aktivität bei Männern und Frauen zu unterscheiden. Dabei wird deutlich, dass die Aktivität der DPP4 im Median bei Männern höher liegt als bei Frauen und die Konzentration dagegen bei Frauen leicht höher als bei Männern liegt. In der Kohorte dieser Arbeit zeigten sich diese Zusammenhänge nicht als signifikant. Eine Limitation dieser Arbeit ist die geringe Probandenanzahl. Durinx et al. konnten durch ihre Untersuchungen zeigen, dass die Aktivität der DPP4 bei Frauen niedriger als bei Männern ist, dabei wurden insgesamt 481 Probanden untersucht (Durinx et al., 2001). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte bestätigen, dass die DPP4-Aktivität bei Männern höher als bei Frauen ist (Chiara et al., 2020) Es liegt nahe, dass geschlechterspezifisch verschiedene Faktoren, wie zum Beispiel Sexualhormone, die Aktivität und damit die Korrelation von Aktivität und Konzentration beeinflussen.

5.4.3 Aktivität und Konzentration in Abhängigkeit von der fertilitätseinschränkenden Diagnose

Wie bereits beschrieben, ist das Alter ein fertilitätsbeschränkender Faktor. Die DPP4-Aktivität ist signifikant positiv mit dem Alter korreliert. Die DPP4-Konzentration dagegen negativ. Neben dem Alter können verschiedene fertilitätseinschränkende Erkrankungen einen unerfüllten Kinderwunsch bedingen. Die Darstellung der Konzentrationen und Aktivitäten der DPP4 im Bezug zu den einzelnen Diagnosen zeigt keine signifikanten Ergebnisse. Die DPP4-Expression scheint bei allen Patientinnen mit eingeschränkter Fertilität ähnlich ausgeprägt zu sein. Allerdings zeigen sich ein erhöhter Durchschnitt der Aktivität und ein verringerter Durchschnitt der Konzentration bei PCOS-Patientinnen.

Eine Studie, die sich mit dem Einfluss der DPP4 auf den Zellzyklus bei Granulosazellen beschäftigt, konnte eine Erhöhung des DPP4-Spiegels bei PCOS-Patientinnen nachweisen und propagiert eine Hemmung dieser als eine neue Behandlungsmöglichkeit für das PCOS und damit verbundene Ko-Morbiditäten (Lin, Wang, 2021).

In einer anderen Studie konnte eine erhöhte DPP4-Expression bei PCOS-Patientinnen im Vergleich zu anderen Patientinnen mit fertilitätseinschränkenden Erkrankungen gezeigt werden (Blauschmidt et al., 2017). Eine Arbeitsgruppe behandelte die Frage, ob die DPP4-Aktivität bei Frauen mit PCOS im Vergleich zu gesunden Probandinnen erhöht ist. Sie konnten zwischen beiden Studiengruppen keinen signifikanten Unterschied ausmachen. Die Studie ist jedoch durch die geringe Teilnehmeranzahl mit 30 PCOS Patientinnen und 28 gesunden Probandinnen limitiert (Braga et al., 2018).

Eine Studie, die sich mit den Aktivitätsleveln der DPP4 bei verschiedenen Fertilitätseinschränkenden Erkrankungen beschäftigte zeigt, dass die DPP4-Aktivität bei Patientinnen mit PCOS signifikant höher als bei Patientinnen ohne PCOS liegt. Bei einer genaueren Untersuchung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der DPP4-Aktivität bei PCOS Patientinnen mit und ohne Insulinresistenz gezeigt werden. Tendenziell zeigten PCOS Patientinnen mit Insulinresistenz höhere DPP4-Aktivitätslevel (Abolghasemi et al., 2022).

Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Studienergebnisse ist das heterogene Erscheinungsbild dieser Erkrankung. Eine weitere mögliche Erklärung liegt in der Heterogenität der einzelnen Studien, die sich im Umfang, den klinischen Ein- und Ausschlusskriterien sowie technischen und analytischen Methoden unterscheiden. Außerdem wurde in den Arbeiten nicht auf die mögliche Einflussnahme des Zyklus geachtet. In dieser Arbeit wurden explizit Proben von Patientinnen am achten Zyklustag analysiert.

Die Limitation der in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchungen besteht darin, dass die Gesamtaktivität bzw. -konzentration der DPP4 bestimmt wurde. In anderen Studien wurde explizit die lösliche bzw. membrangebundene Form untersucht (Lin et al., 2019).

5.4.4 Aktivität und Konzentration im Zusammenhang zum Outcome Schwangerschaft und Abort

In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen Aktivität und Konzentration der DPP4 und dem Outcome einer erfolgreich zustande gekommenen Schwangerschaft untersucht. Zum einen wurden alle Patientinnen analysiert, um eine generelle Tendenz auszumachen. Es zeigte sich, dass die negative Korrelation von Konzentration und Aktivität aufgehoben scheint. Allerdings sind diese Ergebnisse nicht signifikant und die Kohortengröße ist eingeschränkt. Im Weiteren wurde ein genaueres Augenmerk auf die PCOS-Patientinnen gelegt. Der Anteil an Patientinnen mit PCOS, die schwanger wurden, liegt bei 40 %. Das beschreibt einmal mehr den zentralen Stellenwert des PCOS in der Reproduktionsmedizin. Eine eindeutige Tendenz der DPP4-Konzentration oder -Aktivität konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Eine Arbeitsgruppe berichtete in einer interessanten Studie von dem Einfluss der Hemmung der membrangebundenen DPP4 in der frühen Schwangerschaft als wichtigen Behandlungsansatz bei wiederholten Implantationsschwierigkeiten (Dolanbay et al., 2016).

Fertilitätseinschränkende Erkrankungen setzen zum einen die Konzeption herab, verringern zusätzlich in anderen Fällen den Anteil einer erfolgreichen Schwangerschaft bis zur Geburt und erhöhen die Anzahl von Aborten. Der Anteil von Aborten betrug bei allen Patientinnen 21 %. Auf eine Unterscheidung der Aborte nach bekannter Diagnose wurde auf Grund der geringen Kohorte verzichtet. Die negative Korrelation von Konzentration und Aktivität ist hier nicht

nachweisbar. Auch zeigt sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Aktivität oder Konzentration der DPP4. Es konnte gezeigt werden, dass zwischen der DPP4-Aktivität bzw. der DPP4-Konzentration und einem Abortrisiko kein Zusammenhang besteht. Eine Einschränkung dieser Aussage ist durch den Umstand gegeben, dass bei wenigen Aborten der Kohorte eine genaue Ursache bekannt ist. Mögliche Ursachen für Spontanaborte sind erhöhtes mütterliches Alter, elterliche chromosomale Aberration, endokrine und immunologische Dysregulationen. Einige Studien beschreiben ein erhöhtes Risiko für Spontan- bzw. Frühaborte bei Patientinnen mit PCOS (Louwers, Laven, 2020). Es gibt jedoch auch Fälle in denen keine Ursache gefunden wird (Laisk et al., 2020). Der Einfluss des PCOS auf Spontanaborte ist schwer auszumachen, da es manifoldige Ursachen haben kann. Die DPP4 scheint in der hier beschriebenen Kohorte keinen Einfluss auf das Zustandekommen einer Schwangerschaft oder das Statthaben eines Abortes zu haben.

6 Zusammenfassung

Eine häufige endokrine Pathologie der Frau stellt das PCOS dar. Laut ESHRA definieren die folgenden Kriterien das PCOS: (1) klinischer oder biochemischer Hyperandrogenismus, (2) Oligo- oder Amenorrhoe und (3) polycystische Ovarien in der Sonographie. Zur Diagnosestellung müssen zwei der Kriterien bestätigt werden und Erkrankungen, welche ein ähnliches Bild hervorrufen, ausgeschlossen werden. Deswegen und auf Grund verschiedener assoziierter Erkrankungen und Stoffwechselstörungen ist das PCOS ein sehr heterogenes Krankheitsbild.

In dieser Arbeit wurde die Relevanz und Regulation der DPP4 bei Patientinnen mit PCOS untersucht.

Durch die Behandlung von Granulosakarzinomzellen der KGN und COV 434 Zelllinien mit Testosteron und Dihydrotestosteron konnte eine Steigerung der mRNA- und Proteinexpression der DPP4 nachgewiesen werden.

Die PCOS typischen metabolischen Veränderungen, Hyperglykämie und Hyperinsulinämie zeigten *in vitro* keinen Einfluss auf die Expression der DPP4. In dieser Arbeit konnte eine verringerte mRNA-Expression der DPP4 durch Sitagliptin gezeigt werden. Durch die Behandlung der Granulosakarzinomzellen mit Metformin konnte eine Erhöhung der mRNA-Expression der DPP4 *in vitro* aufgezeigt werden.

Ein passiver Methylierungsverlust in den Zellen der KGN und COV 434 geht mit einer gesteigerten DPP4-Expression auf mRNA- und Proteinebene einher und lässt eine epigenetische Regulation der DPP4 vermuten.

Klinische Analysen dieser Arbeit zeigten keine Unterschiede in den Aktivitäten und Konzentrationen der DPP4 im Serum von Kinderwunschpatientinnen mit unterschiedlichen fertilitätseinschränkenden Erkrankungen. Die DPP4-Konzentration und -Aktivität ist nach den hier beschriebenen Analysen weder mit dem Outcome Schwangerschaft noch einem erhöhtem Abortrisiko assoziiert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die DPP4-Expression durch Geschlechtshormone, besonders Androgene, reguliert wird. Ein Einfluss metabolischer Veränderungen auf die Expression der DPP4 ist nach den Untersuchungen dieser Arbeit zu vernachlässigen. Durch die hier beschriebenen Untersuchungen zeigt sich, dass die DPP4 ein Schlüsselenzym sowohl im Insulinstoffwechsel als auch im endokrinen System des PCOS ist.

Zwischen den verschiedenen fertilitätseinschränkenden Erkrankungen der Kinderwunschpatientinnen der hier beschriebenen Kohorte konnte kein signifikanter Unterschied der Aktivitäten und Konzentrationen der DPP4 gezeigt werden, sodass auch ein Einfluss der DPP4 auf andere fertilitätseinschränkende Erkrankungen angenommen werden kann.

7 Literaturverzeichnis

Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS) (2004). In: *Human reproduction (Oxford, England)* 19 (1), S. 41–47.

Abdalla, Mohammed Altigani; Deshmukh, Harshal; Atkin, Stephen; Sathyapalan, Thozhukat (2021): The potential role of incretin-based therapies for polycystic ovary syndrome: a narrative review of the current evidence. In: *Therapeutic advances in endocrinology and metabolism* 12, 2042018821989238. DOI: 10.1177/2042018821989238.

Abolghasemi, Maryam; Mahjoub, Soleiman; Esmaeilzadeh, Sedighe (2022): Serum dipeptidyl peptidase-4 activity and progranulin level in polycystic ovary syndrome patients. In: *Caspian journal of internal medicine* 13 (1), S. 70–75. DOI: 10.22088/cjim.13.1.70.

Abrao, Mauricio S.; Muzii, Ludovico; Marana, Riccardo (2013): Anatomical causes of female infertility and their management. In: *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 123 Suppl 2, S18–24. DOI: 10.1016/j.ijgo.2013.09.008.

Alborzi, Saeed; Zahiri Sorouri, Ziba; Askari, Elham; Poordast, Tahereh; Chamanara, Kefayat (2019): The success of various endometrioma treatments in infertility: A systematic review and meta-analysis of prospective studies. In: *Reproductive medicine and biology* 18 (4), S. 312–322. DOI: 10.1002/rmb2.12286.

Ashinuma, Hironori; Takiguchi, Yuichi; Kitazono, Satoru; Kitazono-Saitoh, Miyako; Kitamura, Atsushi; Chiba, Tetsuhiro et al. (2012): Antiproliferative action of metformin in human lung cancer cell lines. In: *Oncology reports* 28 (1), S. 8–14. DOI: 10.3892/or.2012.1763.

Badawy, Ahmed; Elnashar, Abubaker (2011): Treatment options for polycystic ovary syndrome. In: *International journal of women's health* 3, S. 25–35. DOI: 10.2147/IJWH.S11304.

Baillargeon, Jean-Patrice; Nestler, John E. (2006): Commentary: polycystic ovary syndrome: a syndrome of ovarian hypersensitivity to insulin? In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91 (1), S. 22–24. DOI: 10.1210/jc.2005-1804.

Barbieri, Federica; Thellung, Stefano; Ratto, Alessandra; Carra, Elisa; Marini, Valeria; Fucile, Carmen et al. (2015): In vitro and in vivo antiproliferative activity of metformin on stem-like cells isolated from spontaneous canine mammary carcinomas: translational implications for human tumors. In: *BMC cancer* 15, S. 228. DOI: 10.1186/s12885-015-1235-8.

Blauschmidt, Sindy; Greither, Thomas; Lampe, Katharina; Köller, Solveig; Kaltwaßer, Petra; Behre, Hermann M. (2017): Dipeptidyl peptidase 4 serum activity and concentration are

increased in women with polycystic ovary syndrome. In: *Clinical endocrinology* 87 (6), S. 741–747. DOI: 10.1111/cen.13444.

Boivin, Jacky; Bunting, Laura; Collins, John A.; Nygren, Karl G. (2007): International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 22 (6), S. 1506–1512. DOI: 10.1093/humrep/dem046.

Borrueal, Susana; Fernández-Durán, Elena; Alpañés, Macarena; Martí, David; Alvarez-Blasco, Francisco; Luque-Ramírez, Manuel; Escobar-Morreale, Héctor F. (2013): Global adiposity and thickness of intraperitoneal and mesenteric adipose tissue depots are increased in women with polycystic ovary syndrome (PCOS). In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 98 (3), S. 1254–1263. DOI: 10.1210/jc.2012-3698.

Braga, Letícia Dinis da C.; Godoy-Matos, Amelio F.; Siciliano, Priscila de Oliveira; Corrêa, José Otávio do Amaral; Carvalho, Denise Pires (2018): Is DPP4 activity increased in PCOS? In: *Diabetes & metabolic syndrome* 12 (5), S. 673–675. DOI: 10.1016/j.dsx.2018.04.032.

Catenacci, M.; Falcone, T. (2008): The effect of endometriosis on in vitro fertilization outcome. In: *Minerva ginecologica* 60 (3), S. 209–221.

Chiara, Loretta de; La Páez de Cadena, María; Rodríguez-Berrocal, Javier; Alvarez-Pardiñas, M^a Carmen; Pardiñas-Añón, M^a Carmen; Varela-Calviño, Rubén; Cordero, Oscar J. (2020): CD26-Related Serum Biomarkers: sCD26 Protein, DPP4 Activity, and Anti-CD26 Isotype Levels in a Colorectal Cancer-Screening Context. In: *Disease markers* 2020, S. 4347936. DOI: 10.1155/2020/4347936.

Chua, Sarah; Sheu, Jiunn-Jye; Chen, Yung-Lung; Chang, Li-Teh; Sun, Cheuk-Kwan; Leu, Steve et al. (2013): Sitagliptin therapy enhances the number of circulating angiogenic cells and angiogenesis-evaluations in vitro and in the rat critical limb ischemia model. In: *Cytotherapy* 15 (9), S. 1148–1163. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.05.005.

Daneshjou, Delbar; Zadeh Modarres, Shahrzad; Soleimani Mehranjani, Malek; Shariat Zadeh, Seyed Mohammad Ali (2021): Comparing the effect of sitagliptin and metformin on the oocyte and embryo quality in classic PCOS patients undergoing ICSI. In: *Irish journal of medical science* 190 (2), S. 685–692. DOI: 10.1007/s11845-020-02320-5.

Deswal, Ritu; Yadav, Arun; Dang, Amita Suneja (2018): Sex hormone binding globulin - an important biomarker for predicting PCOS risk: A systematic review and meta-analysis. In: *Systems biology in reproductive medicine* 64 (1), S. 12–24. DOI: 10.1080/19396368.2017.1410591.

- Dewailly, Didier; Barbotin, Anne-Laure; Dumont, Agathe; Catteau-Jonard, Sophie; Robin, Geoffroy (2020): Role of Anti-Müllerian Hormone in the Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome. In: *Frontiers in endocrinology* 11, S. 641. DOI: 10.3389/fendo.2020.00641.
- Diedrich, Klaus (2013): Reproduktionsmedizin. Berlin: Springer. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-30181-0>.
- Dolanbay, Elif Gelenli; Yardimoglu, Melda; Yalcinkaya, Ender; Yazir, Yusufhan; Aksoy, Ayca; Karaoz, Erdal; Caliskan, Eray (2016): Expression of trophinin and dipeptidyl peptidase IV in endometrial co-culture in the presence of an embryo: A comparative immunocytochemical study. In: *Molecular medicine reports* 13 (5), S. 3961–3968. DOI: 10.3892/mmr.2016.5020.
- Dunson, David B.; Baird, Donna D.; Colombo, Bernardo (2004): Increased infertility with age in men and women. In: *Obstetrics and gynecology* 103 (1), S. 51–56. DOI: 10.1097/01.AOG.0000100153.24061.45.
- Durinx, C.; Neels, H.; van der Auwera, J. C.; Naelaerts, K.; Scharpe, S.; Meester, I. de (2001): Reference values for plasma dipeptidyl-peptidase IV activity and their association with other laboratory parameters. In: *Clinical chemistry and laboratory medicine* 39 (2), S. 155–159. DOI: 10.1515/CCLM.2001.026.
- Elkind-Hirsch, Karen E.; Paterson, Martha S.; Seidemann, Ericka L.; Gutowski, Hanh C. (2017): Short-term therapy with combination dipeptidyl peptidase-4 inhibitor saxagliptin/metformin extended release (XR) is superior to saxagliptin or metformin XR monotherapy in prediabetic women with polycystic ovary syndrome: a single-blind, randomized, pilot study. In: *Fertility and sterility* 107 (1), 253-260.e1. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.09.023.
- Güven, Melih A.; Dilek, Umut; Pata, Özlem; Dilek, Saffet; Ciragil, Pinar (2007): Prevalance of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis infections in the unexplained infertile women. In: *Archives of gynecology and obstetrics* 276 (3), S. 219–223. DOI: 10.1007/s00404-006-0279-z.
- He, Yirui; Hu, Wenjin; Yang, Gangyi; Guo, Huilin; Liu, Hua; Li, Ling (2020): Adipose Insulin Resistance and Circulating Betatrophin Levels in Women with PCOS. In: *BioMed research international* 2020, S. 1253164. DOI: 10.1155/2020/1253164.
- Jensterle, Mojca; Janez, Andrej; Fliers, Eric; DeVries, J. Hans; Vrtacnik-Bokal, Eda; Siegelhaar, Sarah E. (2019): The role of glucagon-like peptide-1 in reproduction: from physiology to therapeutic perspective. In: *Human reproduction update* 25 (4), S. 504–517. DOI: 10.1093/humupd/dmz019.

- Kabel, Ahmed M.; Al-Shehri, Aisha H.; Al-Talhi, Rehab A.; Abd Elmaaboud, Maaly A. (2017): The promising effect of linagliptin and/or indole-3-carbinol on experimentally-induced polycystic ovarian syndrome. In: *Chemico-biological interactions* 273, S. 190–199. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.06.009.
- Kim, Helen H.; DiVall, Sara A.; Deneau, Robyn M.; Wolfe, Andrew (2005): Insulin regulation of GnRH gene expression through MAP kinase signaling pathways. In: *Molecular and cellular endocrinology* 242 (1-2), S. 42–49. DOI: 10.1016/j.mce.2005.07.002.
- Kyritsi, Eleni Magdalini; Dimitriadis, George K.; Kyrou, Ioannis; Kaltsas, Gregory; Randevo, Harpal S. (2017): PCOS remains a diagnosis of exclusion: a concise review of key endocrinopathies to exclude. In: *Clinical endocrinology* 86 (1), S. 1–6. DOI: 10.1111/cen.13245.
- Laisk, Triin; Soares, Ana Luiza G.; Ferreira, Teresa; Painter, Jodie N.; Censin, Jenny C.; Laber, Samantha et al. (2020): The genetic architecture of sporadic and multiple consecutive miscarriage. In: *Nature communications* 11 (1), S. 5980. DOI: 10.1038/s41467-020-19742-5.
- Lamers, Daniela; Famulla, Susanne; Wronkowitz, Nina; Hartwig, Sonja; Lehr, Stefan; Ouwens, D. Margriet et al. (2011): Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. In: *Diabetes* 60 (7), S. 1917–1925. DOI: 10.2337/db10-1707.
- LaMoia, Traci E.; Shulman, Gerald I. (2021): Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action. In: *Endocrine reviews* 42 (1), S. 77–96. DOI: 10.1210/endrev/bnaa023.
- Lim, Siew S.; Hutchison, Samantha K.; van Ryswyk, Emer; Norman, Robert J.; Teede, Helena J.; Moran, Lisa J. (2019): Lifestyle changes in women with polycystic ovary syndrome. In: *The Cochrane database of systematic reviews* 3, CD007506. DOI: 10.1002/14651858.CD007506.pub4.
- Lin, Chien-Hung; Lin, Chung-Ching (2016): Sitagliptin attenuates inflammatory responses in lipopolysaccharide-stimulated cardiomyocytes via nuclear factor- κ B pathway inhibition. In: *Experimental and therapeutic medicine* 11 (6), S. 2609–2615. DOI: 10.3892/etm.2016.3255.
- Lin, Lina; Wang, Liman (2022): Knockdown of DPP4 promotes the proliferation and the activation of the CREB/aromatase pathway in ovarian granulosa cells. In: *Molecular medicine reports* 25 (2). DOI: 10.3892/mmr.2022.12589.
- Lin, Shian-Ren; Chang, Chia-Hsiang; Tsai, May-Jwan; Cheng, Henrich; Chen, Jian-Chyi; Leong, Max K.; Weng, Ching-Feng (2019): The perceptions of natural compounds against dipeptidyl peptidase 4 in diabetes: from in silico to in vivo. In: *Therapeutic advances in chronic disease* 10, 2040622319875305. DOI: 10.1177/2040622319875305.

- Louwers, Yvonne V.; Laven, Joop S. E. (2020): Characteristics of polycystic ovary syndrome throughout life. In: *Therapeutic advances in reproductive health* 14, 2633494120911038. DOI: 10.1177/2633494120911038.
- Nargis, Titli; Chakrabarti, Partha (2018): Significance of circulatory DPP4 activity in metabolic diseases. In: *IUBMB life* 70 (2), S. 112–119. DOI: 10.1002/iub.1709.
- Nistala, Ravi; Savin, Virginia (2017): Diabetes, hypertension, and chronic kidney disease progression: role of DPP4. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 312 (4), F661-F670. DOI: 10.1152/ajprenal.00316.2016.
- Outeirinho-Iglesias, Verónica; Romani-Pérez, Marina; González-Matías, Lucas C.; Vigo, Eva; Mallo, Federico (2015): GLP-1 Increases Preovulatory LH Source and the Number of Mature Follicles, As Well As Synchronizing the Onset of Puberty in Female Rats. In: *Endocrinology* 156 (11), S. 4226–4237. DOI: 10.1210/en.2014-1978.
- Öztürk, Bahadır; Gürbüz, Ali Sami; Durak, Zahide Esra; Öztürk, Hasan Serdar (2019): Dipeptidyl peptidase-4 and adenosine deaminase enzyme levels in polycystic ovary syndrome. In: *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 35 (2), S. 138–141. DOI: 10.1080/09513590.2018.1505847.
- Rashid, Rumaisa; Mir, Suhail Ahmad; Kareem, Ozaifa; Ali, Tabassum; Ara, Rifat; Malik, Anjum et al. (2022): Polycystic ovarian syndrome-current pharmacotherapy and clinical implications. In: *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology* 61 (1), S. 40–50. DOI: 10.1016/j.tjog.2021.11.009.
- Rocha, A. L. L.; Faria, L. C.; Guimarães, T. C. M.; Moreira, G. V.; Cândido, A. L.; Couto, C. A.; Reis, F. M. (2017): Non-alcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. In: *Journal of endocrinological investigation* 40 (12), S. 1279–1288. DOI: 10.1007/s40618-017-0708-9.
- Röhrborn, Diana; Wronkowitz, Nina; Eckel, Juergen (2015): DPP4 in Diabetes. In: *Frontiers in immunology* 6, S. 386. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00386.
- Saklayen, Mohammad G. (2018): The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. In: *Current hypertension reports* 20 (2), S. 12. DOI: 10.1007/s11906-018-0812-z.
- Salehi Jahromi, Marziyeh; Hill, Jennifer W.; Ramezani Tehrani, Fahimeh; Zadeh-Vakili, Azita (2018): Hypomethylation of specific CpG sites in the promoter region of steroidogenic genes (GATA6 and StAR) in prenatally androgenized rats. In: *Life sciences* 207, S. 105–109. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.05.052.

- Sanchez-Garrido, Miguel A.; Tena-Sempere, Manuel (2020): Metabolic dysfunction in polycystic ovary syndrome: Pathogenic role of androgen excess and potential therapeutic strategies. In: *Molecular metabolism* 35, S. 100937. DOI: 10.1016/j.molmet.2020.01.001.
- Sawant, Shital; Bhide, Priya (2019): Fertility Treatment Options for Women With Polycystic Ovary Syndrome. In: *Clinical medicine insights. Reproductive health* 13, 1179558119890867. DOI: 10.1177/1179558119890867.
- Schilling, Kathrin; Toth, Bettina; Rösner, Sabine; Strowitzki, Thomas; Wischmann, Tewes (2012): Prevalence of behaviour-related fertility disorders in a clinical sample: results of a pilot study. In: *Archives of gynecology and obstetrics* 286 (5), S. 1307–1314. DOI: 10.1007/s00404-012-2436-x.
- Schmidt, Lone (2006): Infertility and assisted reproduction in Denmark. Epidemiology and psychosocial consequences. In: *Danish medical bulletin* 53 (4), S. 390–417.
- Sirmans, Susan M.; Pate, Kristen A. (2013): Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. In: *Clinical epidemiology* 6, S. 1–13. DOI: 10.2147/CLEP.S37559.
- Strauss, Bernhard; Beyer, Karla (2004): Ungewollte Kinderlosigkeit. Berlin: Robert-Koch-Inst (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, H. 20).
- Tanbo, Tom; Mellembakken, Jan; Bjercke, Sverre; Ring, Eva; Åbyholm, Thomas; Fedorcsak, Peter (2018): Ovulation induction in polycystic ovary syndrome. In: *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* 97 (10), S. 1162–1167. DOI: 10.1111/aogs.13395.
- Usman, Taofeek O.; Olatunji, Lawrence A. (2021): Late gestational testosterone exposure causes glucose deregulation and elevated cardiac VCAM-1 and DPP-4 activity in rats. In: *Archives of physiology and biochemistry* 127 (5), S. 445–452. DOI: 10.1080/13813455.2019.1650068.
- Vander Borght, Mélodie; Wyns, Christine (2018): Fertility and infertility: Definition and epidemiology. In: *Clinical biochemistry* 62, S. 2–10. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012.
- Wang, Fang; Zhang, Zhi-Fen; He, Yi-Ran; Wu, Hong-Yan; Wei, Shuang-Shuang (2019): Effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on transforming growth factor- β 1 signal transduction pathways in the ovarian fibrosis of polycystic ovary syndrome rats. In: *The journal of obstetrics and gynaecology research* 45 (3), S. 600–608. DOI: 10.1111/jog.13847.
- Wischmann, T. (2006): Psychogenese von Fertilitätsstörungen: eine Übersicht. In: *Geburtsh Frauenheilk* 66 (1), S. 34–43. DOI: 10.1055/s-2005-873030.
- Yousef, Michael; Tsiani, Evangelia (2017): Metformin in Lung Cancer: Review of in Vitro and in Vivo Animal Studies. In: *Cancers* 9 (5). DOI: 10.3390/cancers9050045.

Zegers-Hochschild, F.; Adamson, G. D.; Mouzon, J. de; Ishihara, O.; Mansour, R.; Nygren, K. et al. (2009): The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 24 (11), S. 2683–2687. DOI: 10.1093/humrep/dep343.

Thesen

- (1) Dipeptidyl-Peptidase 4 (DPP4) ist ein Enzym mit regulatorischer Funktion unter anderem bei der Glukose-Homöostase. Eine veränderte DPP4-Serumaktivität und -konzentration beim Polycystischen Ovarsyndrom (PCOS) ist in einigen Studien gezeigt worden.
- (2) Testosteron und Dihydrotestosteron stimulieren *in vitro* die Expression der DPP4 auf mRNA- und Proteinebene in den Granulosakarzinomzelllinien COV434 und KGN.
- (3) Die Simulation der beim PCOS häufigen metabolischen Veränderungen Hyperglykämie und Hyperinsulinämie zeigen *in vitro* keine Effekte auf die DPP4-mRNA- und Proteinexpression.
- (4) Eine Hypomethylierung des DPP4-Promoterbereichs bei der Zelllinie KGN erhöht die Expression der DPP4-mRNA *in vitro* und ist ein möglicher Regulationsmechanismus der DPP4 beim PCOS.
- (5) Die DPP4-Konzentration und -Aktivität im Serum der untersuchten Kinderwunschpatientinnen ist nicht mit dem Eintreten einer Schwangerschaft assoziiert.
- (6) Die DPP4-Konzentration und -Aktivität im Serum der untersuchten Kinderwunschpatientinnen ist nicht mit einem erhöhten Abortrisiko assoziiert.

Erklärungen

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

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

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

Halle (Saale), den _____

Anna Tamara John

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde am Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) angefertigt. Der Dank gilt allen, die mich während der Durchführung der Experimente und der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Hermann M. Behre möchte ich mich ganz herzlich für die Möglichkeit bedanken, dieses Thema in seiner Arbeitsgruppe zu untersuchen. Außerdem bin ich für die vielfältigen Diskussionen dankbar sowie die Gelegenheit die Ergebnisse im Rahmen verschiedener Tagungen zu präsentieren.

Für die stets wertschätzende und aufbauende Betreuung möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Thomas Greither bedanken. Des Weiteren für seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei der Bearbeitung dieser wissenschaftlichen Fragestellungen.

Für die geduldigen Anleitungen und vielen lehrreichen und fröhlichen Stunden möchte ich mich bei Frau Dr. Maria Giebler bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Kaltwasser und Frau Dr. Köller für die Bereitstellung der Serumproben der Kinderwunschpatientinnen und -patienten. Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Jana Ernst bedanken, die freundlicherweise die KGN Zellen zur Verfügung gestellt hat.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Kollegen des FG05 E01 für die herzliche Aufnahme und liebevolle Mitbegleitung durch alle Höhen und Tiefen bedanken. Besonderer Dank gilt dabei der Arbeitsgruppe der Reproduktionsmedizin.

Vielen Dank meiner Familie und Freunden für ihr Interesse und ihre Motivation. Danke für die Unterstützung bei kleinen und großen Sorgen und für das Erklären der formativen Elemente des Word Programmes. Ein besonderer Dank gilt meinem Mann, Leonard, für seine Geduld und seine motivierende sowie inspirierende Art.