

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Direktor: Prof. Dr. med. Ludwig Kiesel

Insulin- und IGF- Liganden- und Rezeptorspezifität humaner Granulosazellen *in vitro*:
Bedeutung für Proliferation und Apoptose bei der Follikelreifung

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Brinkert, Miriam
aus Warendorf
2010

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Barbara Sonntag

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Ludwig Kiesel

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ludwig Kiesel

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Barbara Sonntag

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Ludwig Kiesel

ZUSAMMENFASSUNG

Insulin- und IGF- Liganden- und Rezeptorspezifität humaner Granulosazellen *in vitro*:

Bedeutung für Proliferation und Apoptose bei der Follikelreifung

Brinkert, Miriam

Im Ovar kommt es in zyklischer Regelmäßigkeit zum Wachstum mehrerer Follikel, von denen nur einer selektiert wird und ovuliert. Als die wichtigsten Regulatoren von Zellvermehrung, Zelldifferenzierung und Zelltod dienen die Gonadotropine. Dieser Dissertation liegt die Hypothese zugrunde, dass das Insulin-/ IGF-System ein wesentlicher Ko-Faktor für das regulierte wie dysregulierte Follikelwachstum ist. Ziel der Dissertation ist es, die Beteiligung der verschiedenen Rezeptoren an den durch Liganden des Insulin-/IGF-Systems induzierten proliferativen und antiapoptotischen Effekten an primären humanen Granulosaluteinzellen zu untersuchen (Genehmigung der Ethikkommission Reg. Nr: 1IXGreb, 19.09.2001).

Sowohl durch Insulin, als auch durch IGF-I und -II können proliferative und antiapoptotische Stimuli an Granulosazellen ausgelöst werden. IGF-II kommt hierbei ein besonderes Interesse zu, da es als einziger Ligand endogen in humanen Granulosazellen gebildet wird. Durch Einsatz eines spezifisch am IGF-Rezeptor Typ 2 wirkenden Analogons kann gezeigt werden, dass über diesen Rezeptor die antiapoptotische, aber nicht die proliferative Wirkung vermittelt wird. Die spezifische Blockade des IGF-Rezeptor Typ 1 führt zu keiner verminderten Stimulation der proliferativen Aktivität, so dass hier auch alternative Signalvermittler wie der Insulin- Rezeptor in Betracht kommen.

Inwieweit aus diesen Ergebnissen eine pathogenetische Relevanz für Zustände einer gestörten Follikelreifung, wie beispielsweise im Rahmen des Syndroms polyzystischer Ovarien, abzuleiten ist, bleibt der Klärung in nachfolgenden Studien überlassen.

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2010

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1	Insulin und das IGF-System	6
1.1.1	Insulin und der Insulinrezeptor.....	6
1.1.2	Das IGF-System	7
1.1.3	Bedeutung von Insulin und IGF im Ovar	10
1.2	Zellproliferation und Apoptose im Rahmen des Follikelwachstums	14
1.2.1	Zellproliferation.....	14
1.2.2	Apoptose.....	16
1.2.3	Physiologisches Follikelwachstum.....	18
1.2.4	Gestörtes Follikelwachstum beim PCO-Syndrom.....	22
1.3	Ziel.....	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Versuchsplan	25
2.2	Granulosazellpräparation und -kultur.....	26
2.3	Caspase-3-Assay.....	28
2.4	Proliferationsassay.....	29
2.5	Statistische Auswertung	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Charakterisierung des Zellmodells und Festlegung der Kulturbedingungen .	30
3.2	Apoptose humaner Granulosaluteinzellen.....	31
3.2.1	Einfluss der Kulturdauer der Liganden Insulin, IGF-I und IGF-II im Caspase-3-Assay.....	31
3.2.2	Einfluss der Wirkungs-dosis der Liganden Insulin, IGF-I und IGF-II im Caspase-3-Assay.....	32
3.2.3	Wirkung von [Leu27]-IGF-II-Analogen im Vergleich zu IGF-II.....	33
3.3	Proliferation von humanen Granulosaluteinzellen	35
3.3.1	Wachstum und Zellviabilität unter Einfluss von Insulin, IGF-I, IGF-II sowie vergleichend IGF-II Analogon	35
3.3.2	Wirkung eines spezifischen IGF-Rezeptor Typ 1 blockierenden Antikörpers unter Stimulation mit IGF-I und IGF-II	37
4	Diskussion.....	40
5	Literatur	49
6	Lebenslauf	56

7	Danksagung.....	58
8	Anhang	I
8.1	Tabellenanhang.....	I
8.2	Patienteneinverständniserklärung.....	IX
8.3	Genehmigung der Ethikkommission	XII

Abkürzungsverzeichnis

AC-DEVD-AMC	Fluorogenes Substrat für Caspase-3
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
AKT	Proteinkinase B
AMH	Anti Müller Hormon
BMP-15	Bone Morphogenetic Protein-15
BSA 0,1%	Bovines Serum Albumin
CDK	Cyclin- abhängige Kinasen
Eppi	Eppendorfgefäß
FCS	Fetales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
G1 Phase	Gap1 Phase
G2 Phase	Gap2 Phase
GDF-9	Growth Differentiation Factor-9
GH	Wachstumshormon
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
HCG	Humanes Choriongonadotropin
HEPES 1%	N-2-Hydroxyethylpeperazine-N-2-ethanesulfonic acid
HGL-5	Humane Granulosazelllinie
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IGF-I	Insulin-like Growth Factor Typ1
IGF-II	Insulin-like Growth Factor Typ2
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Bindungs Proteine

IGFBP-Proteasen	Insulin-like Growth Factor Bindungs Proteine-Proteasen
IRS	Insulin- Rezeptor Substrat
IVF	In- Vitro- Fertilisation
LH	Luteinisierendes Hormon
MAPK	Mitogen- activated Protein Kinase
MAPK/ ERK	Mitogen-activated Protein Kinase/ extracellular signal-regulated Kinase
M Phase	Mitose Phase
NH ₄ CL-Lsg	Ammoniumchlorid Lösung
PBS	Phosphate Bufferd Saline
PCOS	Syndrom der Polyzystischen Ovarien
PI-3 Kinase	Phosphoinositol-3 Kinase
PIP 2	Phosphatidylinositol Bisphosphonate
PIP 3	Phosphatidylinositol Trisphosphonate
Rpm	Umdrehung pro Minute
S Phase	Synthese Phase
SHBG	Sexualhormonbindenes Globulin
Tyr	Tyrosin
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α

1. Einleitung

Im Ovar kommt es in zyklischer Regelmäßigkeit zum Wachstum mehrerer Follikel, von denen nur einer selektiert wird und ovuliert, während die anderen zugrunde gehen. Dieser Vorgang erfordert eine gezielte Kontrolle von Zellvermehrung, Zelldifferenzierung und Zelltod. Als essentielle Regulatoren dienen hierzu die Gonadotropine, Follikelstimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH). Um den physiologischen Prozess der Follikeldominanz, aber auch Pathomechanismen bei gestörter Follikelreifung, wie zum Beispiel dem Syndrom der Polyzystischen Ovarien (PCOS), zu verstehen, sind Mechanismen zur Modulation der Gonadotropinwirkung im Follikel selbst zu identifizieren. Insulin und dem Insulin-like Growth Faktor (IGF)-System scheinen hierbei eine wesentliche Bedeutung zuzukommen (82). Insbesondere ist die Bedeutung von IGF für das Wachstum von Zellen und den Schutz vor Apoptose im Rahmen der Follikulogenese im Ovar und anderen Geweben gezeigt worden (60). Das PCO-Syndrom ist eine relativ häufige und bisher ungeklärte Störung der Follikelreifung. Diese ist übermäßig häufig mit Hyperinsulinämie und peripherer Insulinresistenz, die mit Defekten der intrazellulären Signaltransduktionswege in Muskel- und Fettgewebe in Verbindung zu stehen scheinen, assoziiert. Die Vermittlung der Wirkung von Insulin erfolgt dabei, ebenso wie für IGF-I, über Proteintyrosinkinase-Rezeptoren, durch die eine Vielzahl untergeordneter Signaltransduktionswege in der Zelle aktiviert werden. Die Wirkung von IGF-II erfolgt über einen dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor identischen Rezeptor. Welche Bedeutung die verschiedenen intrazellulären Signaltransduktionswege hierbei für die unterschiedlichen Effekte von Insulin und IGF haben ist bisher noch nicht bekannt.

Ebenso ist nicht bekannt, welche Rolle eine Rezeptorspezifität von Insulin, IGF-I und -II zur Kontrolle von Zellviabilität und Apoptose spielt.

1.1 Insulin und das IGF-System

1.1.1 Insulin und der Insulinrezeptor

Insulin ist ein Proteohormon des exokrinen Pankreas. Seine Hauptaufgabe besteht in der Regulation des Blutzuckerspiegels. Das Insulingen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 gelegen und enthält zwei Introns. Diese werden posttranskriptional entfernt. Nach Transkription und Translation entsteht Präproinsulin, welches zunächst ein Signalpeptid aus 24 Aminosäuren enthält, eine B-Kette aus 30 Aminosäuren, ein C-Peptid und anschließend eine A-Kette aus 21 Aminosäuren. Durch Abtrennung des Signalpeptids entsteht Proinsulin. Zwei Endopeptidasen spalten anschließend das C-Peptid von der A- und B-Kette ab. Die A- und B-Kette sind durch zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft, eine dritte Disulfidbrücke befindet sich in der A-Kette (57).

Der Insulinrezeptor gehört zur Familie der Tyrosinkinaserzeptoren und ist ein tetrameres Molekül mit zwei α - (135kDa) und zwei β - (95kDa) Untereinheiten. Das Insulinrezeptorgen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 19 gelegen und kodiert für ein einkettiges Polypeptid mit 22 Exons. Es ist 150kb lang und hat ein Molekulargewicht von 190kDa. Erst nach Dimerisierung und posttranslationaler Modifikation entsteht das tetramere Molekül, welches je ein Insulinmolekül bindet. Die α -Untereinheiten bestehen aus extrazellulären Domänen, die an ihre Cystein-reichen Domänen das Insulinmolekül binden können. Die β -Untereinheiten bestehen aus extrazellulären, transmembranen und cytosolischen Anteilen. Die Bindung des

Insulinmoleküls an die α -Untereinheiten führt zu einer Konformationsänderung der β -Untereinheit, löst eine oder mehrere Autophosphorylierungen an Tyrosylresten der intrazellulären Domäne aus und steigert die Kinaseaktivität des Rezeptors. Es gibt dreizehn Tyrosylreste, die in drei verschiedene Domänen unterteilt sind. Die Wichtigsten für Autophosphorylierung und Kinaseaktivität sind Tyr 1158, 1162, 1163 der katalytischen Region (57).

Anschließend kann der Insulinrezeptor spezifische Proteine, die als Insulin-Rezeptor Substrate (IRS) 1-4 bezeichnet werden, phosphorylieren. IRS, sogenannte Dockingproteine, sind eine Art Brückenmodul zwischen Rezeptor und weiteren intrazellulären Signalmolekülen. Somit kann eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen sowohl über die IRS als auch direkt über den Rezeptor mittels phosphorylierter Tyrosinmoleküle stimuliert werden (57).

1.1.2 Das IGF-System

Das IGF-System besteht aus Liganden (IGF-I und -II), IGF- Rezeptoren (Typ 1 und Typ 2), IGF-Bindungsproteinen (IGFBP) und IGFBP-Proteasen.

Das humane IGF-I Gen ist auf Chromosom 12 lokalisiert und kodiert für ein 70 Aminosäuren enthaltendes Polypeptid, welches homologe Strukturen zu IGF-II, Proinsulin und Relaxin aufweist. Entdeckt wurde es ursprünglich als Mediator Somatomedin C des Wachstumshormons (GH), welches die Transkription von IGF-I induziert (57). Eine Induktion der IGF-I Gen Transkription wird unter anderen auch durch Östradiol, experimentellen Diabetes oder Angiotensin II ausgelöst. Die Synthese von IGF-I erfolgt vorwiegend im Hepatozyten. Allerdings wird es in fast allen Geweben exprimiert, um als parakriner und autokriner Mediator zu wirken (82). Eine besondere

Bedeutung kommt dem IGF-I in der postnatalen Entwicklung zu, da Null-Mutanten eine starke Wachstumsretardierung aufweisen. *In vivo* sind diese Nullmutanten infertil (3).

Das humane IGF-II Gen ist auf Chromosom 11 lokalisiert und kodiert für ein 67 Aminosäuren enthaltendes Polypeptid, welches zu ca. 70% mit IGF-I und zu 50% mit Proinsulin homolog ist (8, 53, 74).

Der IGF-Rezeptor Typ 1 gehört zur Familie der Tyrosinkinaserzeptoren und ist ein tetrameres Molekül mit zwei α - und zwei β - Untereinheiten. Das IGF-I Rezeptorgen ist auf Chromosom 15 gelegen. Das Tetramer weist große Ähnlichkeit mit dem Insulinrezeptor auf (54). Die cysteinreichen Regionen der α -Untereinheiten des IGF-Rezeptors Typ 1 und des Insulinrezeptors sind bis zu 67% homolog. Die Tyrosinkinase Domänen der β -Untereinheiten ähneln sich in 84% (82). Als Substrate für den Rezeptor können neben IGF-I auch Insulin und IGF-II mit geringerer Affinität binden. IGF-Rezeptor Typ 1 Knock-out Mäuse kommen mit nur 45% des normalen Geburtsgewichtes zur Welt und versterben postnatal (18). Intrazellulär kommt es ähnlich wie beim Insulinrezeptor zu Konformationsänderungen, Autophosphorylierungen und Bindung von Dockingproteinen.

Der IGF-Rezeptor Typ 2 ist mit dem Mannose-6-Phosphat Rezeptor identisch (50, 91). Das IGF-II Rezeptorgen ist auf dem langen Arm von Chromosom 6 lokalisiert. Im Wesentlichen dient der Rezeptor als Erkennungssequenz für zelluläre Transportprozesse zwischen dem extrazellulärem Raum und dem endosomalen/ lysosomalen Kompartiment, sowie zur Internalisierung und damit Inaktivierung von zirkulierendem IGF-II. Verschiedene Studien verbinden den IGF-II Rezeptor jedoch auch mit einer Kopplung an inhibierende G-Proteine (75) und des MAP Kinase Weg (65). IGF-II Rezeptor Knock-out Mäuse weisen erhöhte IGF-II Plasmaspiegel auf und sterben *in*

utero (59). Abbildung 1 gibt einen Überblick über die durch Insulin, IGF und ihre Rezeptoren vermittelten intrazellulären Signaltransduktionswege.

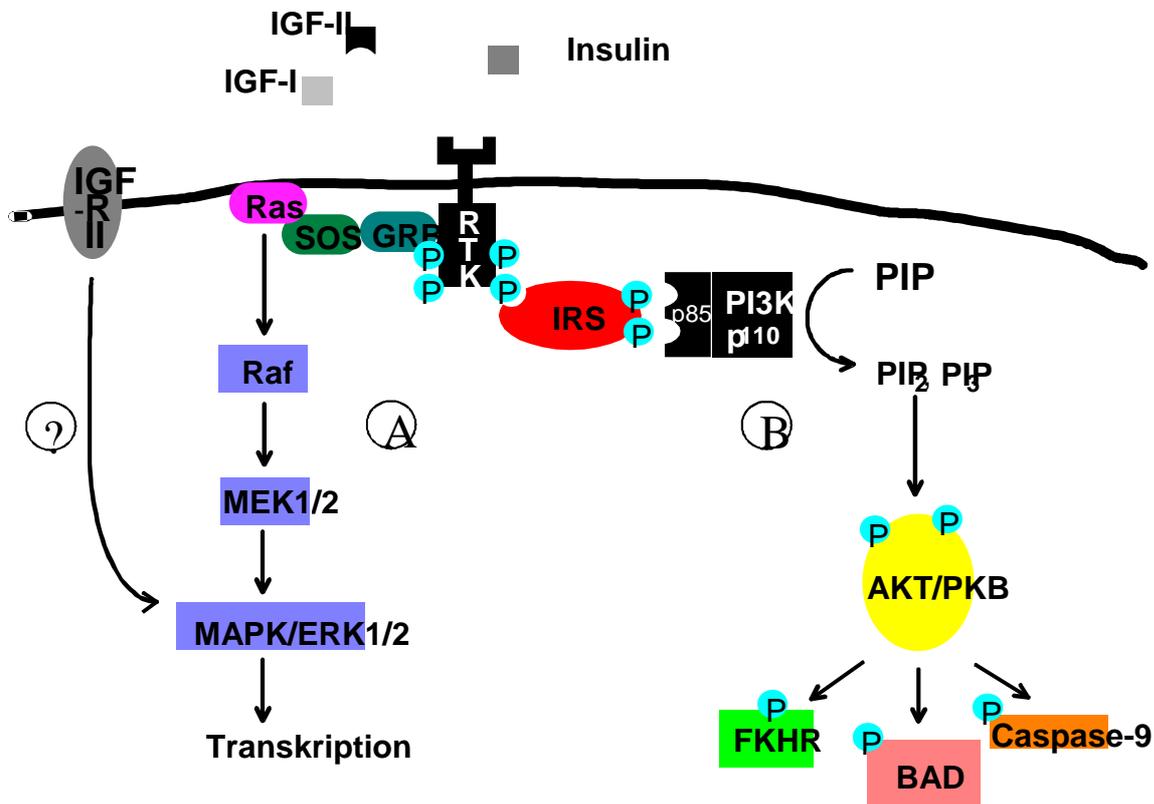


Abbildung 1: Intrazelluläre Signaltransduktion in Folge des aktivierten IGF-R Typ 1/ Insulin-Rezeptor (modifiziert nach (95)). Erläuterungen im Text.

Aus der Vielzahl der stimulierten Signaltransduktionswege erscheinen zwei von besonderer Bedeutung in der Wirkung auf Zellproliferation und Survival (78). Erstens die Aktivierung von PI-3 Kinase, die unter anderen zur Aktivierung von Proteinkinase B/AKT führt (siehe Abbildung 1 A), und zweitens die Stimulation des MAPK/ERK-Signaltransduktionsweges (siehe Abbildung 1 B). Die Bindung der regulatorischen Untereinheit p85 an den tyrosinphosphorylierten Rezeptor selbst oder an

Dockingproteine führt zur Aktivierung von PI-3 Kinase. In der aktivierten Form erfolgt durch die katalytische Untereinheit p110 die Multiphosphorylierung von Phosphatidylinositol zu den „second messengers“ PIP2 und PIP3, welche ihrerseits weitere Kinasen, unter anderem Proteinkinase B/AKT, aktivieren. AKT konnte eine Schlüsselrolle als antiapoptotischer Faktor zugeordnet werden, da es den proapoptotischen Faktor BAD phosphoryliert und damit inaktiviert. Ein weiterer durch AKT phosphorylierter Faktor mit antiapoptotischer Wirkung ist der Transkriptionsfaktor FKHR1. Die Aktivierung des MAP Kinase Weg wird initiiert durch Bindung der SH2-Domäne von GRB an den ligandenaktivierten Rezeptor, welches wiederum durch Bindung von GRB an den GTP/GDP Austauschfaktor SOS zur Aktivierung von Ras führt. Ras aktiviert durch Raf den MAP Kinase Signaltransduktionsweg, der zu einer Vielzahl von Effekten im Bereich von Proteinsynthese und Genexpression führt.

Im extrazellulären Raum wird die Aktivität von IGF zusätzlich durch die IGFBP reguliert: spezifische Bindungsproteine, die mit hoher Affinität IGF binden. Sie sind eine Familie von mindestens 6 Plasma- und Gewebeproteinen mit gemeinsamen strukturellen und funktionellen Charaktereigenschaften (17, 35), welche Schutz vor enzymatischem Abbau bieten und tragen somit maßgeblich zur Verlängerung der Wirkungsdauer von IGF bei. IGFBP-Proteasen wiederum sind spezifische Proteasen, die mit hoher Affinität IGFBP spalten.

1.1.3 Bedeutung von Insulin und IGF im Ovar

In den letzten beiden Jahrzehnten wurden Daten erarbeitet und publiziert, die darauf hindeuten, dass Insulin und das IGF-System als Kofaktoren für die Regulation und Dysregulation der Follikulogenese verantwortlich sein könnten. Bereits 1925 wurde bei

jungen Frauen mit Diabetes mellitus Typ 1 eine Dysregulation der ovariellen Funktion beobachtet, so dass Joslin eine „gonadotrope“ Wirkung von Insulin propagierte (47). Besonderes Interesse erweckte die Feststellung, dass Hyperandrogenismus vermehrt mit Hyperinsulinämie und einer peripheren Insulinresistenz einhergeht (29, 48). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass hohe Insulinspiegel im Blut für eine hohe Androgenproduktion verantwortlich sind (80, 103). In ovarieller Follikelflüssigkeit werden Insulinkonzentrationen von $2\mu\text{U/ml}$ bis zu $65\mu\text{U/ml}$, mit einem Mittelwert von $16\mu\text{U/ml}$ gemessen (19). Wahrscheinlich wird diese Konzentration durch Transsudation aus der systemischen Zirkulation erreicht (82). Der Insulinspiegel korreliert direkt mit dem Progesteronspiegel, allerdings nicht mit dem Plasmainsulinspiegel, dem Östradiolspiegel im Follikel oder der Androstendionkonzentration.

Im humanen Ovar und in verschiedenen Tiermodellen ist der Insulinrezeptor in allen Zellen des Ovars, wie z.B. Theka- und Granulosazellen, exprimiert (21, 39, 84, 92). Die Expression des Insulin-Rezeptors im Ovar wird weitestgehend durch Insulin selbst reguliert. *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass es nach Insulingabe zu einer Rezeptor-Down-Regulation, die nach vier Stunden reversibel ist, kommt (81). Ebenso konnte *in vivo* am Rattenmodell gezeigt werden, dass es bei induzierter Hyperinsulinämie zur Down-Regulation von Insulinrezeptoren kommt (83). Allerdings ist bei prämenopausalen Frauen mit PCOS und anderen Frauen mit peripherer Hyperinsulinämie die ovarielle Insulin-Rezeptor-Expression erhalten (21, 22, 93). Trotz peripherer Insulinresistenz bleibt die Wirkung von Insulin bestehen (72, 80, 109, 110). Hier könnten Gonadotropine, Sexualhormone oder andere autokrine Faktoren, wie zum Beispiel IGF, in die Regulation mit eingreifen. Die zahlreichen direkten und indirekten Wirkungen von Insulin auf das Ovar werden in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Effekte	Organ
Direkte Stimulation der Steroidbiosynthese	Ovar
Synergistische Wirkung mit FSH und LH auf die Steroidbiosynthese	Ovar
Stimulation der 17 α -Hydroxylase	Ovar
Stimulation oder Inhibition der Aromatase	Ovar, Fettgewebe
Hochregulation der LH-Rezeptoren	Ovar
Steuerung des ovariellen Wachstums und der Zystenbildung synergistisch mit LH/ hCG	Ovar
Down-Regulation des Insulin-Rezeptors	Ovar
Up-Regulation des IGF-Rezeptor Typ 1 oder des Hybrid Insulin- / IGF-Rezeptor Typ 1	Ovar
Inhibition IGFBP-1 Produktion	Ovar, Leber
Verstärkung der Effekte von GnRH auf FSH und LH	Hypothalamus, Hypophyse
Inhibition der SHBG Produktion	Leber

Tabelle 1: Insulinwirkung im Ovar (modifiziert nach (82)).

Wie in Tabelle 1 dargestellt wirkt Insulin auf die Expression des IGF-Rezeptors Typ 1. An einem *in vivo* Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass bei experimentell induzierter Hyperinsulinämie eine Down-Regulation der Insulin-Rezeptoren, sowie eine Up-Regulation der IGF-Rezeptoren erfolgt (83). Im humanen Ovar gibt es Hinweise auf ähnliche Mechanismen. Samoto (93) und Nagamani (70) zeigten, dass es bei Frauen mit Hyperthecosis oder PCOS ebenfalls zu einer Down-Regulation der Insulinrezeptoren, sowie zu einer Up-Regulation der IGF-Rezeptoren Typ 1 kommt. IGF und seine Rezeptoren werden sowohl im murinen (115), als auch im humanen Ovar exprimiert (22). Ebenso werden die IGF-Bindungsproteine und ihre Proteasen als interne Regulatoren des IGF-Systems im Ovar exprimiert. In *in vitro* Studien konnte

gezeigt werden, dass IGF synergistisch mit Gonadotropinen die Steroidproduktion im murinen (1) und humanen Ovar (6, 14, 24, 25, 62) reguliert.

Die Genexpression der IGF-Peptide ist sowohl vom Follikelstadium, als auch vom Ovarkompartiment abhängig. Dies bedeutet, dass es für IGF-I und IGF-II eine charakteristische Verteilung je nach Zelltyp gibt: IGF-I mRNA ist lediglich im adulten Ovar nachzuweisen. In den Granulosazellen lässt sich in den unterschiedlichen Entwicklungsstufen der Follikel keine IGF-I mRNA Expression nachweisen (21, 22, 114). Im Gegensatz dazu wird IGF-II mRNA in Thekazellen, in allen perifollikulären Gefäßen und in Granulosazellen von Follikeln exprimiert. Besonders stark wird IGF-II mRNA in Granulosazellen von spät-antralen Follikeln beziehungsweise in Granulosaluteinzellen exprimiert (21, 32, 39, 88, 106, 107). Vor der Pubertät wird in Granulosazellen keine IGF-II mRNA exprimiert. Aufgrund dieser Verteilung ist davon auszugehen, dass die IGF-II Gen Expression durch Gonadotropine geregelt wird, was *in vitro* mehrfach gezeigt werden konnte (82, 88).

Bei gesunden, ovulierenden Frauen ist die IGF-I Konzentration in humaner Follikelflüssigkeit unabhängig von der Follikelgröße sowohl in wachsenden östrogen-dominanten als auch in atretischen androgen-dominanten Follikeln gleich (104). Dahingegen sind höhere IGF-II Konzentrationen in östrogen-dominanten Follikeln zu messen. Ebenso ist der IGF-II Spiegel positiv mit der Follikelgröße, Zyklustag, und Östradiol korreliert (45). Beim Vergleich peripherer, venöser Blutkonzentrationen mit intraovariellen Konzentrationen von IGF-I und IGF-II konnte lediglich eine höhere Konzentration für IGF-II intraovariell bestimmt werden (45). Außerdem sind Serumkonzentrationen von IGF-I und IGF-II bei gesunden Frauen konstant (104).

Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass IGF-II lokal, das heißt im Ovar, von Granulosazellen und eventuell von Thekazellen produziert wird, wohingegen IGF-I aus der systemischen Zirkulation stammt.

1.2 Zellproliferation und Apoptose im Rahmen des Follikelwachstums

1.2.1 Zellproliferation

Die Vermehrung von Zellen durch Zellteilungen ist eine Grundvoraussetzung für die Aufrechterhaltung allen Lebens vom Einzeller bis hin zum komplexen vielzelligen Organismus. Zellwachstum entsteht durch Progression der Zelle durch den Zellzyklus, der sich aus vier definierten, voneinander abgrenzbaren Phasen zusammensetzt: G1 (Gap)-, S (Synthese)-, G2 (Gap)- und M (Mitose)-Phase (5). Die G1-Phase ist die Wachstumsphase, in der die Zellen sich unter ATP-Verbrauch vergrößern und sich Zellorganellen vervielfachen. Die G1-Phase entscheidet außerdem über den Beginn der Zellteilung. Diese Entscheidung hängt von der Anwesenheit mitogener Signale ab und kann durch antiproliferative Signale gehemmt werden. Beim Überwiegen antiproliferativer Stimuli können die Zellen den Zellzyklus verlassen und in den Ruhezustand, die G0-Phase, eintreten. Bei mitogener Stimulation können die Zellen wieder in den Zellzyklus eintreten, und nach einmal erfolgtem Überschreiten des Restriktionspunktes in der nächsten G1-Phase wieder in den G0-Zustand eintreten. Anschließend beginnt die Herstellung einer identischen Kopie ihrer Erbinformation, der so genannten DNA-Verdopplung in der Synthese-Phase. Diese sorgt für einen erhöhten Energieverbrauch, weshalb mit der G2-Phase eine weitere Wachstumsphase folgt. Darauf folgt die Mitose-Phase, bei der die Chromosomen und das Zytoplasma mit

Zellorganellen geteilt werden. Es entstehen aus einer diploiden Zelle zwei identische Kopien. Diese komplizierten Vorgänge werden in vier Abschnitte, - Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase -, unterteilt. Die aus der Mitose hervorgegangenen Tochterzellen befinden sich dann wieder in der G1-Phase.

Wesentliche Erkenntnisse zur Regulation der Proliferation wurden an der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* und an der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* gewonnen (51, 69, 101). An Defektmutanten hat man die Cycline als Motor des Zellzyklus entdeckt. Die Expression dieser Proteine oszilliert, und zu bestimmten Phasen des Zellzyklus werden bestimmte Cycline hoch- oder herunterreguliert (43). Die Cycline regulieren die Enzymaktivität Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs) (55, 97), die über die Phosphorylierung von Substratproteinen das Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus koordinieren und regulieren. Verschiedene mitogene und antiproliferative Signale laufen auf Ebene der Regulation von CDK-inhibitorischen Proteinen zusammen. Diese Proteine binden und regulieren CDKs. Es gibt eine Anzahl unterschiedlicher Mechanismen, die die biologische Aktivität, die Translation oder die Stabilität dieser Proteine regulieren und damit über den Eintritt in den Zellzyklus oder den Ruhezustand entscheiden können. Einer dieser Inhibitoren ist das p27, welches an Cyclin und CDK bindet und den Einstieg in die S-Phase verhindert. Zur gleichen Familie (Cip/Kip-Familie) zählen p21 und p57, denen eine CDK-inhibitorische Domäne gemeinsam ist. Allerdings werden die Proteine durch unterschiedliche Signale reguliert. Ein weiteres Protein ist das p53, welches nach einem DNA-Defekt den Zellzyklus blockiert oder bei schweren Defekten zur Apoptose führt. P53-Mutationen sind häufige Ursachen für onkologische Erkrankungen. Durch die strenge Kontrolle von Zellzyklusarrest, sowie

von Apoptose und Zellüberleben wird in normalen Zellen dereguliertes Wachstum verhindert.

1.2.2 Apoptose

Der programmierte Zelltod (Apoptose) ist erstmals 1972 durch den australischen Pathologen John F. R. Kerr und seinen schottischen Kollegen Andrew H. Wyllie und Alastair R. Currie in Abgrenzung gegenüber der Nekrose definiert worden (49). Sie postulierten, dass der genetisch programmierte Zelltod physiologisch und streng reguliert ist und sowohl in der Embryonalentwicklung, als auch im adulten Organismus wichtige Funktionen hat. Außerdem spielt Apoptose bei vielen pathologischen Prozessen, wie zum Beispiel bei Tumorentstehung, Autoimmunerkrankungen und degenerativen Erkrankungen eine zentrale Rolle.

Apoptose und Nekrose sind sowohl morphologisch als auch biochemisch zu unterscheiden. Nekrose ist immer ein pathologischer, akzidenteller und passiver Prozess. Es kommt durch Verlust der Membranintegrität zu einem unkontrollierten Einfluss von Wasser und extrazellulären Ionen in das Zytoplasma und die intrazellulären Zellorganellen, besonders den Mitochondrien. Die komplette Zellyse bewirkt, dass zelluläre Bestandteile, zum Beispiel lysosomale Enzyme, in die extrazelluläre Matrix gelangen, eine Entzündungsreaktion hervorrufen und den angrenzenden Zellverband zerstören können. In der Apoptose hingegen kommt es zum Auslösen der Zelle aus dem Zellverband. Die Integrität des Gewebes bleibt bestehen. Charakteristisch ist zu Beginn der Apoptose eine Schrumpfung des Zellkerns (Pyknosis) und der Mitochondrien. Außerdem kommt es zur Kondensation des Zytoplasma mit so genanntem cell-blebbing, der Veränderung mit Ausbildung kleiner Blasen an der Zellmembran, und der Exposition von Phosphatidylserinen auf der extrazellulären Seite

der Plasmamembran. Durch die Abnahme des Zellvolumens verliert die Zelle den Kontakt zu den umliegenden Zellen. Es folgt die Phase der Zeiose, in der es zur Chromatinverdichtung mit Fragmentation der DNA kommt. Nach Fragmentation werden so genannte apoptotic bodies mit intakten Membranen und Zellorganellen abgeschnürt. Diese apoptotic bodies werden von Nachbarzellen und Zellen des Immunsystems erkannt und phagozytiert. Es kommt zu keiner Entzündungsreaktion. Biochemisch ist Apoptose ein ATP-abhängiger Prozess (5). Im Gegensatz zur Nekrose (postlytisch) kommt es zu einer prälytischen DNA-Fragmentation mit spezifischem Muster, welches man mit einer Agarose-Gel-Elektrophorese nachweisen kann, die so genannte DNA-Leiter. Es werden außerdem zahlreiche mitochondriale Enzyme, wie zum Beispiel Cytochrom C oder der Apoptose induzierende Faktor AIF freigesetzt und die Caspase-Kaskade aktiviert. Die Caspase-Kaskade steht im Zentrum der Apoptoseinduktion (siehe Abbildung 2). Diese sind spezifische Proteasen, welche lebenswichtige intrazelluläre Proteine abbauen (85). Die Familie umfasst derzeit 14 Mitglieder (16), wobei 12 Caspasen beim Menschen nachgewiesen worden sind. Es handelt sich um hochkonservierte Cystein-Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Proteine nach der Aminosäure Aspartat spalten. Die proteolytische Prozessierung und Aktivierung der Caspasen stellen entscheidene Schritte im Apoptoseprozess dar (2). Aufgrund ihrer Substratspezifität lassen sich die Caspasen in verschiedene Gruppen einteilen. Die Apoptose-Caspasen unterteilen sich in Effektor- und Initiatorcaspasen. Die Aktivität von Caspasen wird durch verschiedene Proteine reguliert, zum Beispiel durch IAP-Proteine (Inhibitor of Apoptosis).

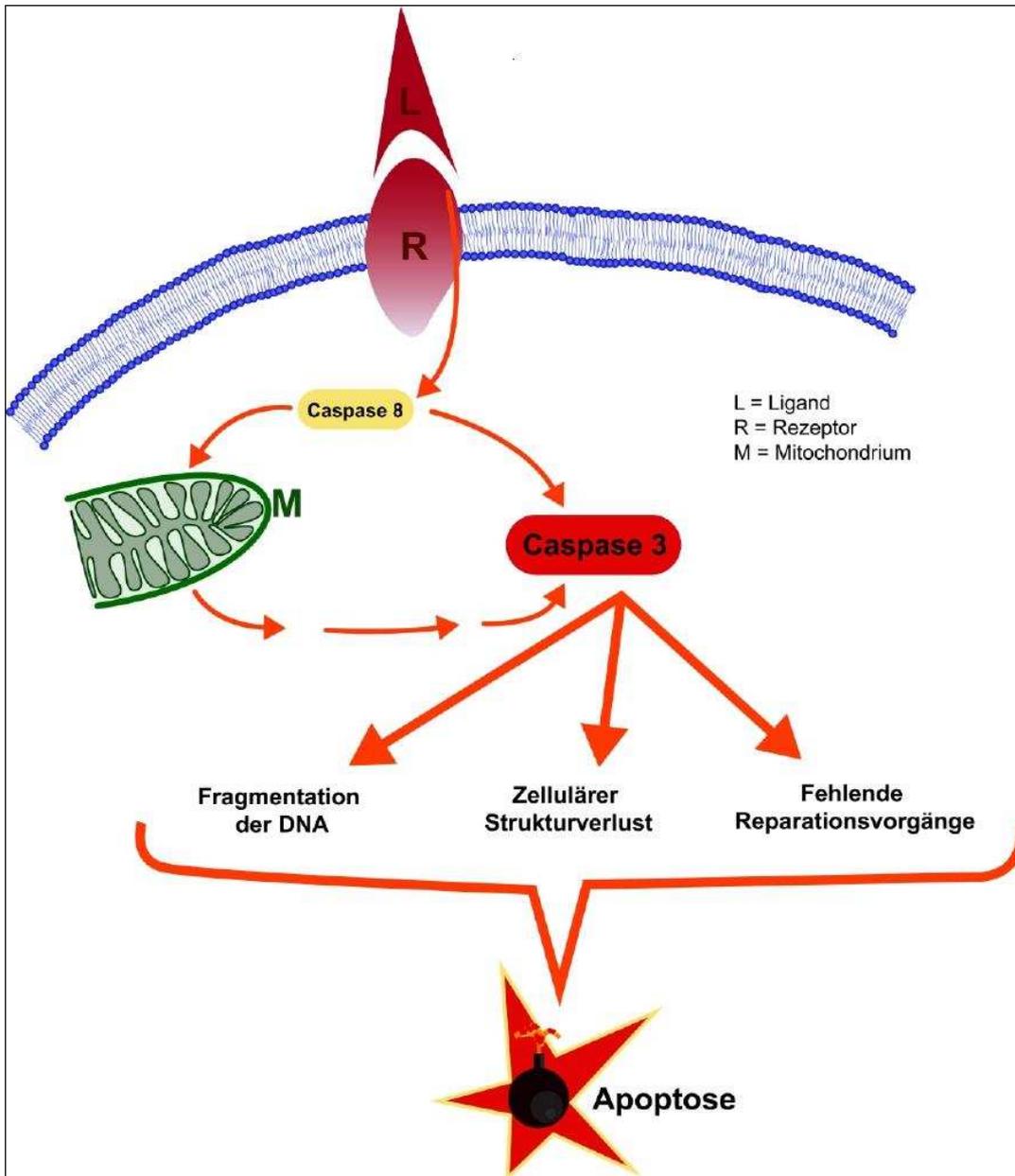


Abbildung 2 : Schematische Darstellung der Apoptose modifiziert nach (57).

1.2.3 Physiologisches Follikelwachstum

Das Heranwachsen eines dominanten Follikels, die zyklische Reifung einer Eizelle und ihre sich anschließende Ovulation sind die Grundlagen weiblicher Fertilität. Das kontinuierliche Wachstum und die Entwicklung von Eizellen und Follikeln wird im Wesentlichen durch die ebenfalls in zyklischer Regelmäßigkeit ausgeschütteten

Gonadotropine, die im Ovar selbst die Produktion der Steroidhormone Östradiol und Progesteron sowie weiterer regulatorischer Proteine wie Inhibin hervorrufen, bestimmt (64). Für den geregelten Ablauf dieser Vorgänge müssen die Eizelle sowie Granulosa- und Thekazellen ein Programm von höchster zeitlicher, qualitativer und quantitativer Präzision, welches die Expression von für Wachstum und Follikelselektion benötigter Gene steuert, durchlaufen.

Eine essentielle Rolle im Prozess der Follikulogenese spielt das follikelstimulierende Hormon (FSH). Interferiert eine Substanz mit der FSH-Rezeptor-Signaltransduktion wird das Programm der Follikulogenese entweder unterdrückt und so verändert, dass der Follikel atretisch wird, oder es führt zu einer Verstärkung des Programms mit Ausreifung des Follikels bis hin zur Ovulation. Keinem anderen Liganden kann eine gleichwertige eigenständige regulatorische Kapazität eingeräumt werden. Neben der FSH-Signaltransduktion gibt es allerdings eine Vielzahl intraovarieller Faktoren, die durch auto- und parakrine Mechanismen die FSH-Wirkung modulieren und zusätzlich in der Lage sind Abschnitte der nicht gonadotropinabhängigen Follikulogenese zu steuern (100). Bei der Follikulogenese werden grundsätzlich verschiedene Stadien von Follikeln unterschieden. Im Rahmen der Embryonalentwicklung wandern die primordialen Keimzellen in die zukünftige Gonade ein. Dort kommt es durch Ummantelung mit Granulosazellen der entstehenden Oozyten, die im Diktyotänstadium der Meiose arretiert sind, zur Bildung der Primordialfollikel. Der Follikel als funktionelle Einheit liegt bereits zum Zeitpunkt der Geburt vor. Gonadotropinunabhängig gehen aus dem Follikelpool kontinuierlich Follikel in die Wachstumsphase über. Genauere Mechanismen der Rekrutierung sind noch

unverstanden, wobei *in vitro* Experimente darauf hindeuten, dass das Signal zur Rekrutierung vom Ovar selbst ausgeht (30).

Im Anschluss an die Rekrutierung erfolgt eine Reihe morphologischer und physiologischer Veränderungen, die das Wachstum und die Differenzierung der Oozyte, sowie die der Granulosazellproliferation und –differenzierung als auch die Akquirierung einer frühen Thekazellschicht beinhalten. Ovarielle Wachstumsfaktoren wie kit-Ligand, IGF-I und –II, GDF-9 (Growth Differentiation Factor), BMP-15 (Bone Morphogenetic Protein) und AMH (Anti Müller Hormon) wirken in dieser präantralen Phase auf die Follikulogenese des Primär- und Sekundärfollikels ein. Ebenso sind diese Faktoren über eine Modulation der FSH-Wirkung auch an der gonadotropinabhängigen Follikelselektion beteiligt.

Der Übergang zum Tertiärfollikelstadium ist durch die Ausbildung eines flüssigkeitsgefüllten Antrums gekennzeichnet. Es ist in den Granulosazellen von einer zunehmenden Produktion von Hyaluronsäure und anderen Glykosaminoglykanen auszugehen, die dann zu einer Wasseransammlung und Schwellung im extrazellulären Raum führt (20). Der zugrunde liegende Mechanismus ist allerdings bis heute unklar. Zusätzlich wird ein weiteres Follikelwachstum über eine obligate FSH-Stimulation erreicht. Die Bedeutung von FSH für den Prozess der Selektion ist unbestritten. Der Mechanismus der Selektion eines einzelnen Follikels aus einer Kohorte putativ equipotenter Follikel ist allerdings nach wie vor ungeklärt. Nach dem Stand der Forschung handelt es sich auch hierbei um einen komplexen Prozess, bei dem es unter Ablauf eines strikt terminierten Programms zur zeitlich und örtlich gesteuerten differentiellen Aktivierung der Genexpression im sich entwickelnden dominanten Follikel kommt. Gekennzeichnet sind diese Vorgänge durch eine von diesem Zeitpunkt

an erheblich gesteigerte Mitoserate der Granulosazellen als Zielzellen der FSH-Wirkung sowie durch einen Anstieg der Östradiol- und Inhibinsynthese und einem zunehmenden Follikelvolumen.

Eine besondere Bedeutung scheint auch hier dem IGF-System zuzukommen. Hohe Konzentrationen von FSH in der Follikelflüssigkeit induzieren die Produktion von IGF und spezifischen IGFBP-Proteasen. Über seinen spezifischen Rezeptor führt freies IGF zu die FSH-Wirkung verstärkenden Antworten in der Granulosazelle (23). Im Gegensatz dazu führen putativ Atresie induzierende Faktoren zu einer vermehrten Produktion von Bindungsproteinen (IGFBP-4, IGFBP-5). Unter anderen konnte IGFBP-4 als ausschließlich die IGF-Wirkung inhibierendes Bindungsprotein und FSH antagonisierender Faktor im atretischen Follikel nachgewiesen werden (10, 56).

Ausgehend von einer maximalen Follikelzahl von ca. 2 Millionen in der Fetalperiode kommt es im gesamten Leben zu nur ca. 400 Ovulationen, während die anderen Follikel der Atresie verfallen. Durch Apoptose unterliegt auch die Follikelatresie einer sehr strikten Regulation (42). Aaron, Tsafirri et al. zeigen drei theoretische Modelle auf, die die Bestimmung für das jeweilige Schicksals eines Follikels erklären sollen. Modell 1 geht davon aus, dass der Prozess der Atresie entweder in der Oocyte oder im Follikel genetisch terminiert ist. Modell 2 beinhaltet Atresie induzierende Faktoren wohingegen in Modell 3 Survival-Faktoren postuliert werden. Der genaue Mechanismus ist ungeklärt, wobei eine Kombination dieser drei Modelle wahrscheinlich ist. Eine bedeutende Rolle scheint die Familie der Zytokine zu spielen. In der Zyklusmitte kommt es durch einen steilen Anstieg von LH und FSH zur Freisetzung der reifen Eizelle und der sie umgebenden Kumuluszellen. Hierfür muss allerdings die erste meiotische Teilung abgeschlossen sein. Die Umwandlung des Follikels in den

Gelbkörper als Progesteron produzierende Drüse scheint durch den Wegfall der Eizelle bedingt zu sein (28). So betrachtet gewinnt die Eizelle zunehmend an Bedeutung für die Mitbestimmung des Schicksals eines einmal rekrutierten Follikels vom Stadium des frühen Primordialfollikels bis zum Gelbkörper.

1.2.4 Gestörtes Follikelwachstum beim PCO-Syndrom

Das Polyzystische Ovarsyndrom (PCOS) ist ein komplexes endokrines Krankheitsbild ungeklärter Ätiologie. Gekennzeichnet ist es durch Hyperandrogenämie, anovulatorische Zyklusstörungen und charakteristische morphologische ovarielle Veränderungen. Zusätzlich sind eine Hypersekretion des Luteinisierenden Hormons (LH), Adipositas, Insulinresistenz und Hyperinsulinismus mit diesem Krankheitsbild assoziiert (11, 13). Zuletzt wurde auf einem Expertentreffen der europäischen (ESHRE) und amerikanischen Gesellschaft für Reproduktionsmedizin (ASRM) im Jahr 2003 ein Konsensus bemüht, der die definierenden Krankheitsmerkmale dieses heterogenen Syndroms definiert (36) .

Da das PCOS mit einer Prävalenz von 5-10% (31) die häufigste Ursache für anovulatorische Infertilität ist, steht dieses Krankheitsbild im besonderen Interesse der gegenwärtigen Forschung. Zurzeit wird eine multifaktorielle Genese, bei der Androgene und Insulin als Hauptkomponenten der Pathogenese gelten, diskutiert (12, 102). Unter anderem ist die normale Follikelreifung im Ovar gestört (27). Ein möglicher Ansatzpunkt ist die Störung des Insulin-/ IGF-Systems, dass durch auto- und parakrine Mechanismen Einfluss auf das ovarielle Follikelwachstum, Follikelatresie sowie die Steroidbiosynthese hat (34). Bei Patientinnen mit PCOS sind sowohl die Wirkspiegel von IGF-I und IGF-II in der Follikelflüssigkeit vermindert, als auch die RNA

Expression von IGF-II reduziert (4). Iwashita M et al. stellten fest, dass in Follikelflüssigkeit nichtstimulierter Ovarien, sowie im Serum von Frauen mit PCOS erhöhte IGF-I Spiegel nachzuweisen sind (44). Eine andere Gruppe konnte an humanen Ovarpräparaten keine Unterschiede in der Expression der Komponenten des IGF-Systems bei Patientinnen mit PCOS oder ovulatorischen Patientinnen feststellen (106). Weitere Untersuchungen lassen vermuten, dass die Aktivität von IGF-II im Ovar durch vermehrte Synthese von entsprechenden Bindungsproteinen im Vergleich zu ovulatorischen Frauen reduziert ist (77, 94). Da das PCOS nicht bei allen Patientinnen mit einer Insulinresistenz und vermutlich Störungen in der Insulin-/IGF-Signalübertragung einhergeht, wird alternativ auch die ätiopathogenetische Rolle der Androgene in den Vordergrund gestellt (41). In diesem Zusammenhang wird auch ein bereits in utero vorliegender, „programmierender“ Androgenexzess postuliert, der eine initiale Störung des Primordialfollikelpools hervorruft und in der Adoleszenz dann zur vollen Manifestation im Sinne eines PCO-Syndroms führt. Bei dieser Theorie würde in Abhängigkeit vom Ausprägungsgrad der Androgenexzessstörung eine zusätzlich auftretende Störung des Insulinstoffwechsels möglicherweise erst zur vollen Manifestation des PCOS führen (96). Zurzeit werden bisherige Ergebnisse sehr kontrovers diskutiert, so dass es noch keine abschließend zufriedenstellende pathogenetische Erklärung gibt.

1.3 Ziel

Dieser Dissertation liegt die Hypothese zu Grunde, dass das Insulin-/ IGF-System ein wesentlicher Ko-Faktor für das regulierte wie dysregulierte Follikelwachstum ist. Die Zugrunde liegenden Funktionen, wie Proliferation, Survival und Differenzierung lassen

sich auf zellulärer Ebene insbesondere der die Follikelwand auskleidenden Granulosazelle zuordnen. Bisher ist allerdings unklar, welche spezifische Bedeutung den einzelnen Liganden namentlich IGF-I, IGF-II und auch Insulin zukommt. Auch ist unklar, ob diese ihre Wirkung nur über den jeweils spezifischen Rezeptor, oder im Sinne einer Kreuzreaktivität auch über einen anderen Rezeptor vermitteln. Für die oben genannten, im Rahmen des Follikelwachstums, zellrelevanten Prozesse könnten sich hier auch unterschiedliche Ergebnisse zeigen. Ziel der Dissertation soll es daher sein, die Beteiligung der verschiedenen Rezeptoren an den durch IGF-I, IGF-II und Insulin induzierten proliferativen und antiapoptotischen Effekten in primären humanen Granulosazellen zu untersuchen. Konkret ergeben sich auf der Grundlage der vorhandenen Literatur die folgenden zwei Fragestellungen:

- 1) Da IGF-II, jedoch nicht IGF-I im humanen Ovar produziert wird, scheint diesem Liganden eine hervorgehobene Rolle in der intraovariellen Regulation des Follikelwachstums zuzukommen. In diesem Zusammenhang soll untersucht werden, ob die Wirkung von IGF-II auf die verschiedenen Prozesse über den spezifischen Rezeptor, oder alternativ über den IGF-Rezeptor Typ 1 oder den Insulin Rezeptor vermittelt wird.
- 2) Im Hinblick auf die beschriebene Wirkung von Insulin als „Ko-Gonadotropin“ und die Relevanz der Hyperinsulinämie für die Pathogenese des PCOS soll im zweiten Teil insbesondere die Wirkungsvermittlung von den verschiedenen Liganden über den Insulin Rezeptor oder den IGF-Rezeptor Typ 2 untersucht werden.

Ausblickend soll mit den hierbei durchzuführenden Untersuchungen die postulierte Beteiligung des Insulin- und IGF-Systems an der Pathogenese des PCOS überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsplan

Die Versuche werden an primären humanen Granulosaluteinzellen durchgeführt, welche bei der Follikelpunktion im Rahmen assistierter Reproduktionstechniken gewonnen werden. Für die Patientinnen besteht eine Indikation zur *In vitro*-Fertilisation (IVF) mit oder ohne intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI). Die Patientinnen werden durch Standardprotokolle der ovariellen Stimulation (rekombinante oder hochgereinigte FSH-Präparate sowie GnRH-Analoga) behandelt. Es werden nur Zellen von Patientinnen ohne ovarielle Pathologien (z. B. PCOS) verwendet. Die Follikelpunktion erfolgt unter standardisierten Bedingungen 36 Stunden nach Induktion der Oozytenreifung durch hCG-Injektion. Zum Zeitpunkt der Follikelpunktion wird die Follikelflüssigkeit durch den Reproduktionsbiologen untersucht, und nach Identifizierung und Isolierung der Eizelle werden Follikelflüssigkeit und die darin enthaltenen Granulosazellen für die weitere Aufbereitung zur Verfügung gestellt. Vor Verwendung der Follikelflüssigkeiten und Granulosazellen wurde ein Ethikvotum (Reg.-Nr 1 IX Greb; s. Anhang) der Ethikkommission der Medizinische Fakultät und hiesigen Ärztekammer eingeholt. Die Patientinnen mussten nicht zusätzlich im Krankenhaus vorstellig werden. Es lag eine schriftliche Einverständniserklärung (s. Anhang) für die Verwendung der in der Routine anfallenden Daten für die wissenschaftliche Auswertung vor. Aufbereitung und Kultur erfolgten wie in 2.2 näher beschrieben. Nach 24 Stunden Präinkubation ist die Zugabe von IGF-I, -II und Insulin allein sowie in Kombination mit receptorspezifischen Molekülen geplant. Als Endparameter der Stimulationsexperimente werden Zellviabilität (WST-1 Assay) und Apoptose (Caspase-3-Aktivität) untersucht. Jeder Versuch wird unabhängig

voneinander mindestens dreimal wiederholt. Zur Auswertung werden die Ergebnisse relativ zur Kontrolle gesetzt.

2.2 Granulosazellpräparation und -kultur

Unmittelbar nach Ende der Punktion wird die Follikelflüssigkeit für 5min bei 1500rpm und 4°C zentrifugiert. Nun muss der Percollgradient zur Zellaufreinigung vorbereitet werden: Je 15ml Falcon-Röhrchen werden 1,5ml Percoll (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) und 1,5 ml Waschmedium (Mc Coys 5a, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) pipettiert und mit einer 5ml Pipette vermischt. Anschließend wird der Überstand der Punktionen abgesaugt. Das Pellet mit den darin enthaltenen Granulosazellen wird in 1ml Waschmedium aufgenommen. Pro Percollröhrchen wird 1ml Zellen langsam auf das Percoll pipettiert und der Gradient bei 1800 rpm und 4°C für 25min zentrifugiert. Die jeweilige Interphase (Granulosaluteinzellen) wird in ein 15ml Falcon-Röhrchen abgenommen, mit Waschmedium aufgefüllt und 5min für 1500rpm zentrifugiert. Die weitere Aufreinigung der Granulosazellen erfolgt in zwei zusätzlichen Präparationsschritten: Zur Hämolyse der Erythrozyten wird der Überstand verworfen und das Zellpellet der Granulosazellen in 5ml Hämolysepuffer mit Ammoniumchlorid (NH₄CL; Sigma, Taufkirchen, Deutschland) suspendiert. Die Suspension wird für 3min bei Raumtemperatur stehen gelassen. 10ml Waschmedium werden zur Suspension gegeben und erneut für 5min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Zellen in Medium aufgenommen und mit Hilfe einer Neubauerkammer gezählt. Anschließend werden für die Leukozytendepletion CD15/CD45 Dynabeads der Firma DYNAL Biotech, Hamburg benutzt. Diese sind Antikörper, die sowohl Bindungsstellen für die Epitope CD15 und CD45 der

Leukozyten als auch einen Magneten enthalten. Mit Hilfe eines externen Magneten, der die Dynabeads anzieht, können somit Leukozyten, nachdem sie an die Dynabeads gebunden haben, von den Granulosazellen isoliert werden. Die Granulosazellen werden auf 1'000'000/100µl PBS mit 0,1%BSA eingestellt. Weitere Schritte werden auf Eis und mit 4°C kalten Lösungen durchgeführt. CD15/CD45 Dynabeads werden gut gevortext und je 2,5µl/100'000Zellen in ein leeres Eppendorf Gefäß (Eppi) pipettiert. Das Eppi wird für 2min im Magneten platziert, anschließend der Überstand verworfen und 0,5ml Waschpuffer zugegeben. Es folgt erneutes Platzieren im Magneten und nach Verwerfung des Überstandes eine Resuspension in 50µl Waschpuffer. Nun werden 50µl Beadsuspension in ein leeres Eppi pipettiert und erneut für 1min im Magneten platziert. Nachdem der Überstand verworfen ist, geschieht die sofortige Zugabe der Zellsuspension (100µl/50µl Beadsuspension) auf die trockenen Dynabeads. Unter ständiger Rotation erfolgt eine zwanzigminütige Inkubation bei 4°C. Anschließend erfolgt die Zugabe von 1ml Waschpuffer pro Eppi und das Platzieren des Eppis für 3min im Magneten. Von dem Magneten werden die Dynabeads mit gebundenen Leukozyten angezogen. Der Überstand enthält die Granulosazellen und kann abgenommen werden. Es erfolgt eine erneute Zählung der Granulosazellen und die Weiterverwertung für die Versuche. Im Anschluss an die Granulosazellpräparation werden die Granulosazellen auf 96-well-Platten mit Flachboden in Mc Coys 5a Medium (Mc Coys 5a Gibco BRL, Invitrogen GmbH, Karlsruhe + 0,1% BSA +1% HEPES) ausgesät. Nach 24 Stunden Präinkubation erfolgt ein Mediumwechsel und anschließend die Stimulation mit den jeweiligen Liganden, die als Stocklösungen vorliegen.

Dies sind Insulin, IGF-I und IGF-II in jeweils 0- 100ng/ ml Endkonzentration. Die optimale Inkubationsdauer ist abhängig von den gewählten Endparametern der

Stimulationsexperimente und wurde in vorangehenden Versuchen definiert. Je nach geplante Versuchansatz wird ein zusätzlicher Ligand, ein IGF-II-Analogon ([Leu²⁷]IGF-II Firma Gropep, Adelaide, Australia) eingesetzt, welches mit 1000fach geringerer Wirkung am IGF-Rezeptor Typ 1 im Vergleich zu IGF-II selbst wirkt, wodurch die relative Relevanz der Signalvermittlung über den IGF-Rezeptor Typ 2 geprüft werden soll. Alternativ wird 30 Minuten vor Zugabe der Liganden der Einsatz eines spezifisch den IGF-Rezeptor Typ 1 blockierender Antikörper (Calbiochem) und im Vergleich als Kontrolle ein unspezifischer IgG-Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen geprüft. Durch diesen IGF-Rezeptor Typ 1 blockierender Antikörper soll die relative Relevanz der Wirkung von Insulin, IGF-I und IGF-II über den Insulin-Rezeptor und den IGF Rezeptor Typ 2 untersucht werden.

2.3 Caspase-3-Assay

Zur Bestimmung der Apoptose wird die Caspase-3-Aktivierung gemessen. Nach Präinkubation und Stimulation der Granulosazellen auf 96-well-Platten mit Flachboden werden die Zellen mit 20µl des Zell-Lysis-Puffers versetzt und 15-20min auf Eis lysiert. Anschließend werden 180µl Protease-Assay-Puffer mit 2µl fluorogenem Substrat (AC-DEVD-AMC) für Caspase-3 hinzugefügt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C, mit 5% CO₂ korreliert das vom Substrat freigesetzte AMC direkt mit der Menge der apoptotischen Zellen. Dieses lässt sich mit einem Spectrofluorometer bei einer Extinktion von 380nm und einer Wellenlänge von 430-460nm messen.

2.4 Proliferationsassay

Zur Messung der Zellviabilität wird der WST-1 Assay (Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland) verwendet. Nach 20-stündiger Inkubation wird das Medium abgenommen und 20µl pro well eines auf 37°C erwärmten WST-1 Reagenzes hinzugegeben, um eine Quantifizierung der Zellviabilität mit Hilfe eines Spectrophotometers (VERSAmax, Tunable Microplate Reader, California) zu ermöglichen. WST-1 Reagenz ist ein in Phosphatpuffer gelöstes Tetrazolium Salz, das durch mitochondriale Dehydrogenasen zu Formazan umgewandelt wird. Ein Anstieg der zellulären Enzymaktivität führt zu einem erhöhten Umsatz von WST-1 zu Formazan. Dieser Anstieg korreliert direkt mit der metabolischen Stoffwechselaktivität der Granulosazellen und kann als Parameter für die Zahl vitaler Zellen verwendet werden. Nach 6 Stunden Inkubation des Assays kann dieser bei 420-480nm Wellenlänge gemessen werden.

2.5 Statistische Auswertung

Die Verwaltung der Daten und die deskriptive Statistik erfolgt mit Excel (Microsoft Windows XP, Home Edition, Version 2002).

Für die Inferenzstatistik wird das Computerprogramm SPSS, Software für Windows, Version 11 genutzt. Es wird eine einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc-Test nach Scheffé-Prozedur mit unabhängigen Variablen durchgeführt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wird bei $\alpha < 0.05$ festgelegt.

Durch die einfaktorielle Varianzanalyse kann ermittelt werden, ob sich eine Gruppe von der anderen signifikant unterscheidet. Die Signifikanz einer ermittelten Gruppeneinteilung lässt sich anhand der F-Verteilung testen. Die Werte in dieser Verteilung sind die Prüfgröße der Varianzanalyse.

Mit dem folgenden Post-Hoc-Test nach Scheffé-Prozedur wird eine Gruppenanalyse durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Zellmodells und Festlegung der Kulturbedingungen

Alle Experimente werden an primären humanen Granulosaluteinzellen durchgeführt, welche bei der Follikelpunktion im Rahmen assistierter Reproduktionstechniken gewonnen wurden. Es werden in jedem Versuch Granulosaluteinzellen verschiedener Follikel und Frauen gepoolt. Absolute Messwerte der einzelnen Versuchstage ergeben aufgrund der individuellen Unterschiede der Granulosazellen eine hohe Streubreite durchschnittlicher Zellviabilität. Die Ergebnisse werden aus diesem Grund jeweils relativ zur Kontrollgruppe beurteilt. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die humanen Granulosazellen unmittelbar nach Entnahme und Präparation noch unter dem Einfluss der *in vivo* einwirkenden Hormonen stehen und daher nur bedingt auf exogene Stimuli reagieren. Nach 24-stündiger Präinkubation konnte hingegen eine adäquate Antwort auf etablierte Stimuli wie Follikelstimulierendes Hormon gezeigt werden. Zu diesem Zeitpunkt zeigen die humanen Granulosazellen unter serumfreien Kulturbedingungen mit proteinreichem Mc Coys 5a Medium auch noch keine eingeschränkten Überlebensraten gegenüber Zellen, die unter Zusatz von 0,1%, 1% oder 5% fetalem Kälberserum (FCS) kultiviert werden. In Vorversuchen konnte eine adäquate Antwort auf exogene Stimuli noch bis nach 5 Tagen unter serumfreien Kulturbedingungen gezeigt werden.

3.2 Apoptose humaner Granulosaluteinzellen

3.2.1 Einfluss der Kulturdauer der Liganden Insulin, IGF-I und IGF-II im

Caspase-3-Assay

Im Lysat kultivierter Granulosazellen wird mittels eines fluorospektrometrischen Assays (Caspase-3 Fluorogenic Substrate Ac-DEVD-AMC, BDPharmingen, San Diego) die Aktivität von Caspase-3 mit und ohne Zugabe von Insulin, IGF-I und IGF-II in 30ng/ml Endkonzentration nach 3, 8 und 20 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Für die nachfolgenden Experimente wird eine Inkubationsdauer von 5 Stunden ausgewählt, da ein Anstieg zwischen 3 und 8 Stunden, nach 8 Stunden jedoch ein Abfall nachzuweisen ist (Abbildung 3, Anhang Tabelle 1-2).

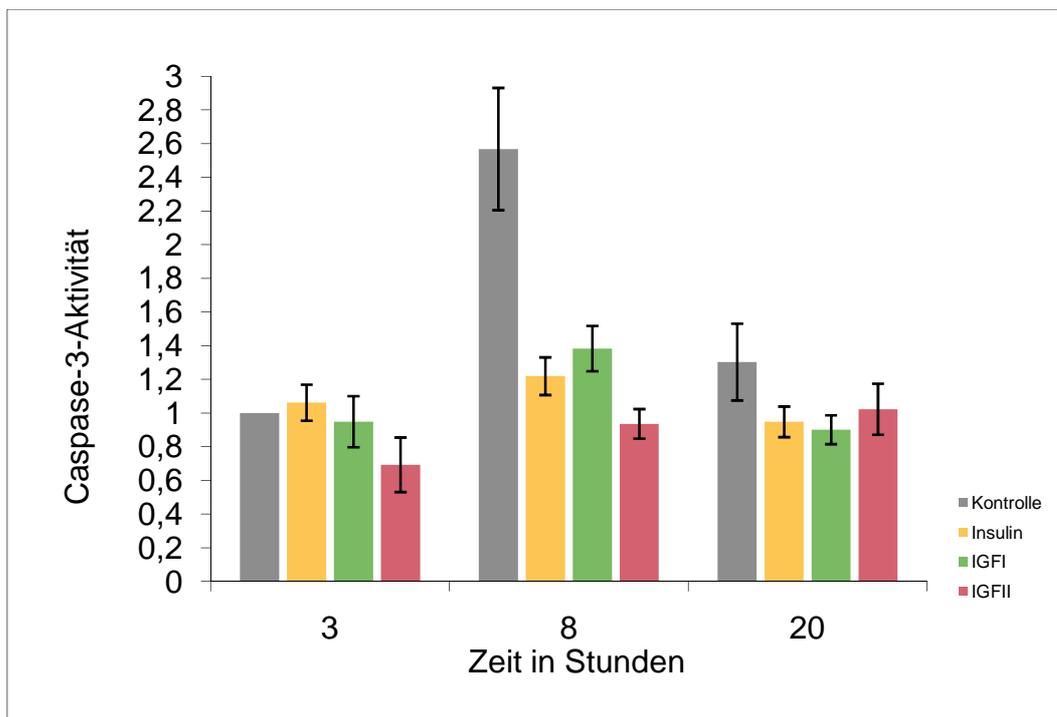


Abbildung 3: Apoptose (Caspase-3 Aktivität) humaner Granulosaluteinzellen mit den Liganden mit verschiedener Inkubationsdauer

3.2.2 Einfluss der Wirkungs-dosis der Liganden Insulin, IGF-I und IGF-II im Caspase-3-Assay

Es wird im Lysat kultivierter Granulosazellen die Aktivität von Caspase-3 mit und ohne Zugabe von Insulin, IGF-I und IGF-II in verschiedenen Dosierungen nach fünf Stunden Stimulation, um eine Dosis-Wirkungsbeziehung zu erstellen, gemessen. Es werden pro Ligand die Endkonzentrationen von 0/10/30/100 ng/ml eingesetzt. (Abbildung 4, Anhang Tabelle 3-9). In der deskriptiven Statistik lässt sich die Tendenz erkennen, dass die Caspase- Aktivität unter Zugabe von IGF-I schon bei einer Konzentration von 10ng/ml erniedrigt ist. Diese Tendenz bleibt auch bei höheren Konzentrationen von 30 und 100 ng/ml in etwa gleich. In der einfaktoriellen Varianzanalyse gibt es signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Bei der Analyse der einzelnen Gruppen im Post-Hoc-Test ist im Vergleich zur Kontrolle für keine der drei angegebenen Konzentrationen ein signifikanter Unterschied festzustellen. Bei einer Endkonzentration von 30ng/ml wäre bei der Annahme von einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha < 0,053$ ein signifikanter Unterschied nachzuweisen. Für IGF-II wird deskriptiv deutlich, dass eine Konzentration von 30ng/ml und 100ng/ml zu einer Inhibition der Apoptose führt. Dies zeigt die Reduktion der Caspase-3-Aktivität auf 0,71 bei 30ng/ml und auf 0,76 bei 100ng/ml durch IGF-II. Allerdings lassen sich weder in der einfaktoriellen Varianzanalyse noch in dem Post-Hoc-Test signifikante Unterschiede zeigen. Insulin reduziert ab einer Konzentration von 30 ng/ml die Caspase-3 Aktivität. Diese beträgt bei 30ng/ml im Mittel 0,68 und bei 100ng/ml Endkonzentration 0,76. In der einfaktoriellen Varianzanalyse ist ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festzustellen, ausgehend von einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha < 0,005$. Der Post-

Hoc-Test zeigt beim Vergleich der einzelnen Gruppen zur Kontrolle keine signifikanten Unterschiede.

Zusammenfassend deutet die deskriptive Statistik daraufhin, dass IGF-I, IGF-II und Insulin in einer Konzentration von 30 und 100 ng/ml Endkonzentration über eine rasche Inhibition proapoptotischer Moleküle zu einer verminderten Aktivierung der Caspase -3 führen.

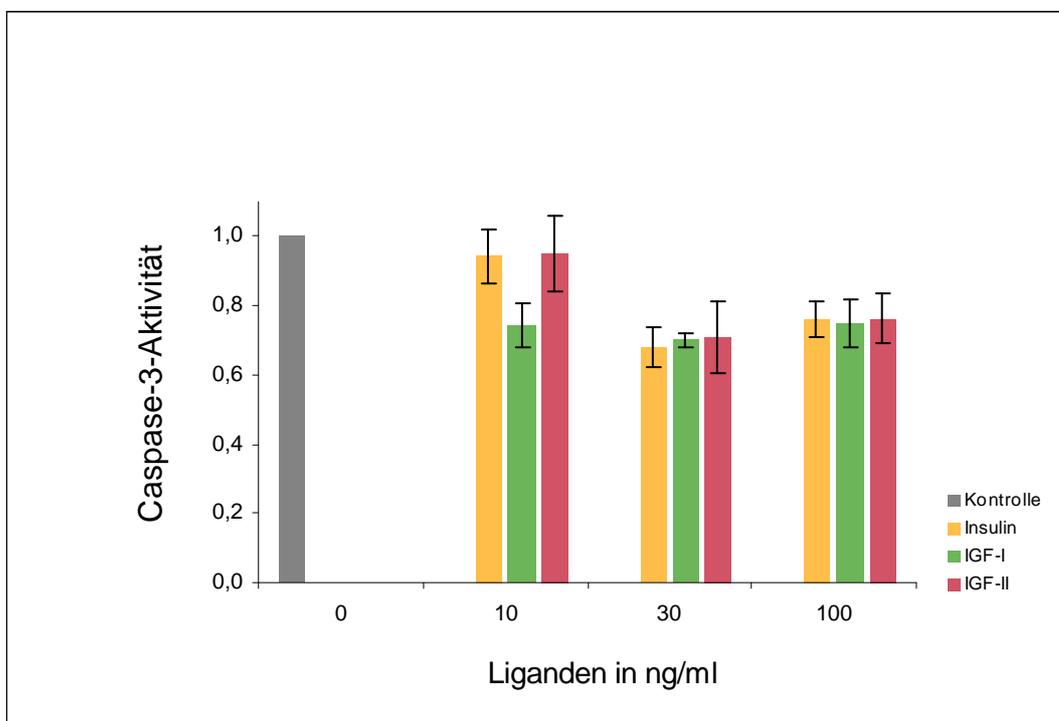


Abbildung 4: Apoptose (Caspase-3 Aktivität) humaner Granulosaluteinzellen unter Einfluss der Liganden in verschiedenen Konzentrationen nach 5-stündiger Inkubation

3.2.3 Wirkung von [Leu27]-IGF-II-Analogon im Vergleich zu IGF-II

Durch den Einsatz des IGF-II Analogons soll die spezifische Bedeutung von IGF-II als Schutzfaktor vor Apoptose im Rahmen der rezeptorspezifischen Vermittlung untersucht

werden. Das IGF-II Analogon bindet mit einer 1000fach geringeren Wirkung als IGF-II am IGF-Rezeptor Typ 1, so dass eine nahezu exklusive Signalvermittlung über den IGF-Rezeptor Typ 2 erfolgt. Vergleichend wird auch hier IGF-II in der zuvor maximal eingesetzten Dosis von 100ng/ml eingesetzt. In der durchgeführten einfaktoriellen Varianzanalyse ist zwischen den Gruppen auf dem Signifikanzniveau $\alpha < 0,05$ ein Unterschied festzustellen. Deskriptiv ist für IGF-II im Vergleich zur Kontrolle ein niedrigerer Anstieg der Caspase-Aktivität zu messen. Die relative Caspase Aktivität beträgt für IGF-II 0,57. Im Post-Hoc-Test werden die signifikanten Unterschiede jeweils für die einzelne Gruppe bestätigt. Unter Zugabe des IGF-II-Analogons kommt es im Vergleich zur Kontrolle zu einem ebenfalls niedrigeren Anstieg der Caspase-3 Aktivität. Die Reduktion der Aktivität bedingt durch das IGF-II-Analogon beträgt relativ zur Kontrolle 0,72. Im Post-Hoc-Test kann ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Diese Versuche lassen also vermuten, dass der antiapoptotische Effekt von IGF-II auf primäre Granulosazellen zumindest anteilig über den IGF-Rezeptor Typ 2 vermittelt wird (Abbildung 5, Anhang Tabelle 10-13).

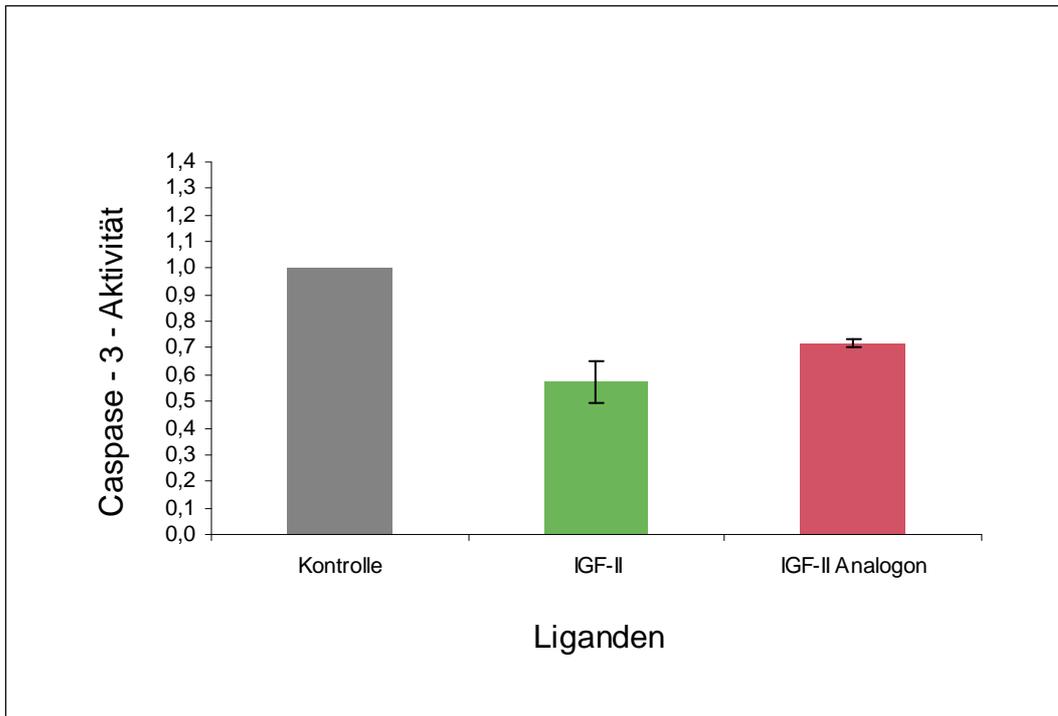


Abbildung 5: Apoptose (Caspase-3 Aktivität) humaner Granulosaluteinzellen nach Stimulation mit IGF-II und IGF-II Analogon in 100ng/ml Endkonzentration im Vergleich zur Kontrolle.

3.3 Proliferation von humanen Granulosaluteinzellen

3.3.1 Wachstum und Zellviabilität unter Einfluss von Insulin, IGF-I, IGF-II sowie vergleichend IGF-II Analogon

Mit Hilfe eines kolorimetrischen Zellproliferations- und Viabilitätsassay (WST-1-Assay) wird das Wachstumsverhalten kultivierter humaner Granulosaluteinzellen mit und ohne Zugabe von Insulin, IGF-I, IGF-II und IGF-II Analogon in einer Endkonzentration von 100ng/ml beurteilt (Abbildung 6, Anhang Tabelle 14-17). Bei zur Kontrolle unveränderter Gesamtzellzahl zeigt sich nach bereits 24 Stunden Stimulation mit IGF-I und IGF-II ein signifikanter, relativer Anstieg der Anzahl an metabolisch aktiven und vitalen Zellen. Auch für Insulin ist in der deskriptiven Statistik eine

ansteigende Tendenz relativ zur Kontrolle auf 1,35 zu erkennen. Vergleichend hierzu lässt sich mit dem IGF-II-Analogen kein vermehrtes Wachstum und Zellviabilität gegenüber der Kontrolle induzieren. Relativ zur Kontrolle beträgt die gemessene Zellviabilität 1,1. Es wird gezeigt, dass das IGF-II-Analogen keine proliferative Wirkung an primären Granulosaluteinzellen vermittelt.

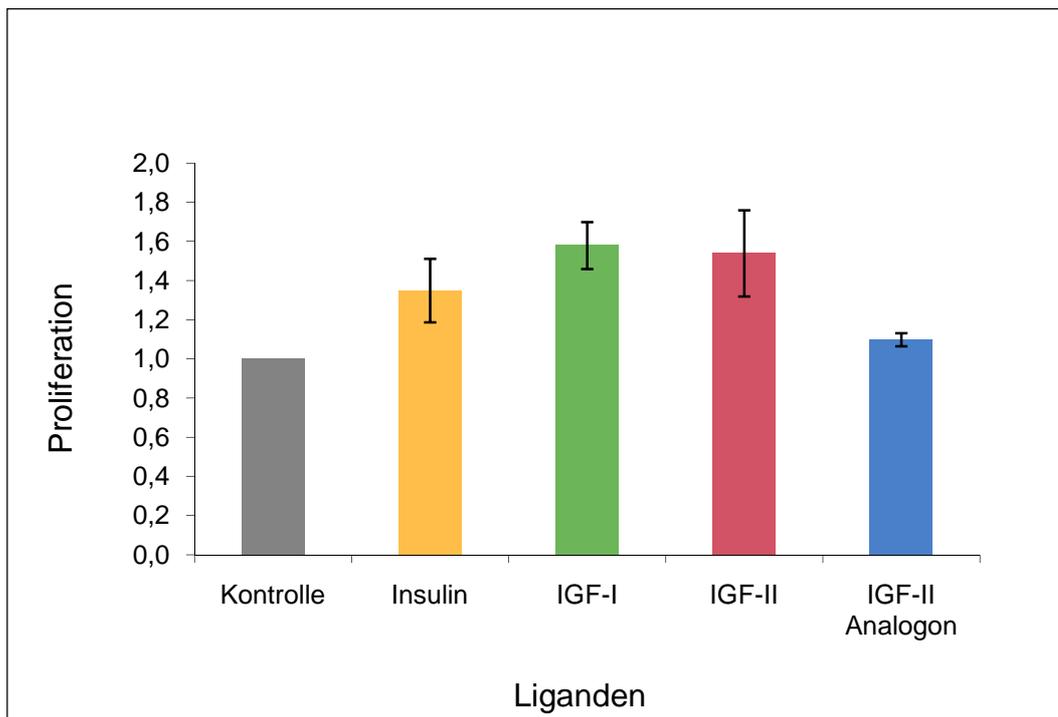


Abbildung 6: Proliferation primärer humaner Granulosaluteinzellen nach Zugabe von Insulin, IGF-I, IGF-II und IGF-II Analogon mit einer Endkonzentration von 100 ng/ml.

Demnach scheint der spezifische IGF -Rezeptor Typ 2 von Relevanz für die Vermittlung antiapoptotischer, jedoch nicht proliferativer Stimuli zu sein. Hieraus ergibt sich, dass für die Vermittlung proliferativer Stimuli der Fokus des Interesses auf dem IGF-Rezeptor Typ 1 in Abgrenzung zum Insulinrezeptor liegen sollte. Dieses wird im

Folgenden durch Einsatz eines IGF- Rezeptor Typ 1 blockierenden Antikörpers untersucht.

3.3.2 Wirkung eines spezifischen IGF-Rezeptor Typ 1 blockierenden Antikörpers unter Stimulation mit IGF-I und IGF-II

Zur Untersuchung der Liganden- und Rezeptorspezifität von IGF-I und IGF-II und der möglichen Bedeutung des Insulinrezeptors und des IGF-Rezeptors Typ 1 für die Proliferation wird ein den IGF-Rezeptor Typ 1 blockierender Antikörper eingesetzt. Dargestellt ist eine Dosis-Wirkungsbeziehung bei Experimenten mit primären humanen Granulosaluteinzellen, die mit IGF-I und im zweiten Abschnitt mit IGF-II in verschiedenen Konzentrationen stimuliert worden sind. Hierdurch sollten auch Effekte in niedrigen Titrationen erkennbar werden (Abbildung 7a und Abbildung 7b, Anhang Tabellen 18-23). Ein Anstieg der Zellviabilität für IGF-I kann wie auch schon in Versuch 3.2.1. bei verschiedenen Konzentrationen gezeigt werden. Bei einer Endkonzentration von 100 ng/ml lässt sich in der deskriptiven Auswertung eine Steigerung um das 1,72 fache bei Stimulation mit IGF-I relativ zur Kontrolle feststellen. Der zusätzliche Einsatz des IGF-Rezeptor Typ 1 Antikörpers zeigt einen Anstieg der Zellviabilität auf 1,8. In der deskriptiven Auswertung zeigt sich somit weder ein Abnahme noch ein Zunahme der Zellviabilität gegenüber der alleinigen Stimulation mit IGF-I. Der als Kontrolle eingesetzte unspezifische IgG-Antikörper zeigt ebenso keine differente Stimulation der Zellviabilität, weder zur alleinigen Stimulation mit IGF-I noch zum IGF-Rezeptor Typ 1 Antikörper. Da in den verschiedenen Gruppen in der deskriptiven Statistik bei Betrachtung der Mittelwerte keine Unterschiede festgestellt worden sind, ist auf eine Inferenzstatistik verzichtet worden.

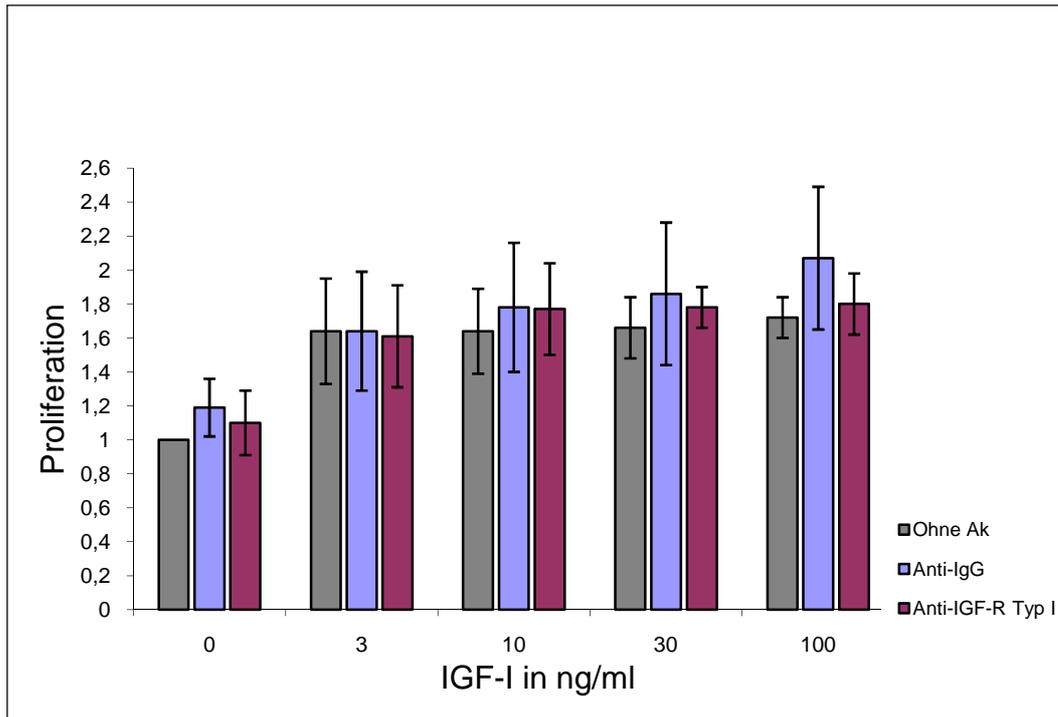


Abbildung 7a : Dosisabhängiges Proliferationsverhalten humaner Granulosaluteinzellen unter Einsatz von IGF-I sowie eines den IGF-Rezeptor Typ 1-blockierenden Antikörpers. Die Kontrolle erfolgte ganz ohne Zusätze bzw. durch einen unspezifischen IgG- Antikörper in gleicher Konzentration. Stimulation mit IGF-I in verschiedenen Endkonzentrationen.

Ein Anstieg der Zellviabilität für IGF-II kann ebenso wie mit IGF-I wie auch schon in Versuch 3.2.1. bei verschiedenen Konzentrationen gezeigt werden. Bei einer Endkonzentration von 100 ng/ml lässt sich in der deskriptiven Auswertung eine Steigerung um das 1,67 fache bei Stimulation mit IGF-II 100ng/ml relativ zur Kontrolle feststellen. Der Einsatz des IGF-Rezeptor Typ 1 Antikörpers zeigt einen Anstieg der Zellviabilität auf 1,73. In der deskriptiven Auswertung zeigt sich auch hier weder ein Abnahme noch ein Zunahme der Zellviabilität gegenüber der alleinigen Stimulation mit IGF-II. Der als Kontrolle eingesetzte unspezifische IgG-Antikörper zeigt ebenso keine differente Stimulation, weder zur alleinigen Stimulation mit IGF-II noch zum IGF-

Rezeptor Typ 1 Antikörper. Hier beträgt der Mittelwert der Aktivität 1,98. Da in den verschiedenen Gruppen in der deskriptiven Statistik bei Betrachtung der Mittelwerte keine Unterschiede festgestellt worden sind, ist auch hier auf eine Inferenzstatistik verzichtet worden. Da nach selektiver Blockierung des IGF-Rezeptor Typ 1 keine Unterschiede der Proliferation von humanen Granulosaluteinzellen festgestellt werden können, ist es möglich, dass proliferative Stimuli mit IGF-I und IGF-II an diesen Zellen nicht über den IGF-Rezeptor Typ 1 vermittelt werden. Alternativ würde sich dann aufgrund der vorangegangenen Versuche mit dem IGF-II Analogon insbesondere der Insulinrezeptor als Signalvermittler anbieten.

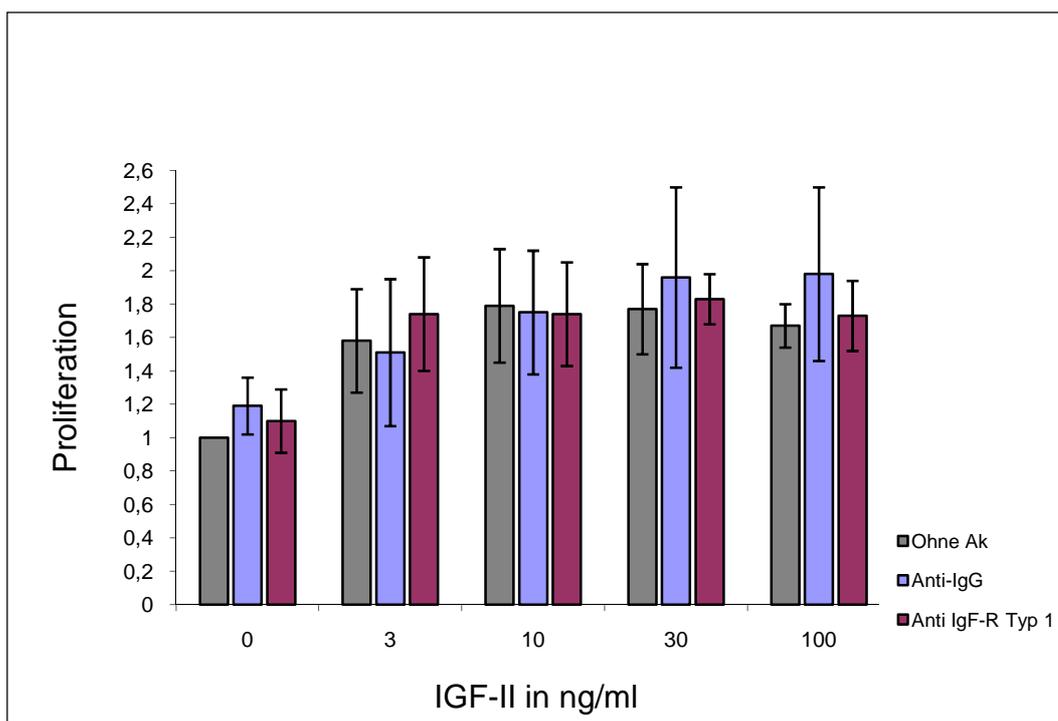


Abbildung 7b: Dosis abhängiges Proliferationsverhalten humaner Granulosazellen unter Einsatz von IGF-II sowie eines den IGF-Rezeptor Typ 1 blockierenden Antikörpers. Die Kontrolle erfolgte ganz ohne Zusätze bzw. durch einen unspezifischen IgG- Antikörper in gleicher Konzentration. Stimulation mit IGF-II in verschiedenen Endkonzentrationen.

4 Diskussion

Das Insulin-/IGF-System ist ein wesentlicher Ko-Faktor für das regulierte und dysregulierte Follikelwachstum. Die intraovarielle Regulation von Proliferation und Survival erfolgt auf zellulärer Ebene maßgeblich in den Granulosaluteinzellen. Weiterhin besteht eine bidirektionale Kommunikation zwischen den Granulosazellen und der Eizelle, so dass einerseits das Follikelwachstum durch eizellspezifische Faktoren beeinflusst wird, und andererseits die Eizellreifung und somit Entwicklungskompetenz der Eizelle weitgehend durch die Granulosazellen beeinflusst wird (33). Hierüber ließe sich auch eine bekanntermaßen eingeschränkte Eizellqualität bei PCOS-Patientinnen mit entsprechenden Auswirkungen auf die Schwangerschaftsraten und -verläufe mit erklären (76).

Das IGF-System besteht aus verschiedenen Elementen. Den Liganden IGF-I und IGF-II und ihren Rezeptoren, sowie sechs IGF-Bindungs-Proteinen (IGFBP) und Proteasen. In zahlreichen Studien ist deutlich geworden, dass die Bioverfügbarkeit von IGF mit Follikelwachstum und Dominanz korreliert. Bei gesunden, ovulierenden Frauen ist die IGF-I Konzentration in humaner Follikelflüssigkeit unabhängig von der Follikelgröße sowohl in wachsenden östrogen-dominanten als auch in atretischen androgen-dominanten Follikeln gleich (104). Dahingegen sind höhere IGF-II Konzentrationen in östrogen-dominanten Follikeln zu messen. Ebenso ist der IGF-II Spiegel positiv mit der Follikelgröße, Zyklustag, und Östradiol korreliert (45). Auch an Rhesusaffen konnte gezeigt werden, dass IGF-II und Aromatase in dominanten Follikeln als Marker nachzuweisen sind (7). Die Rolle von IGF als Survival Faktor ist mehrfach untersucht (71). Die antiapoptotische Wirkung ist im Tiermodell (15) und im humanen Ovar (113) an Granulosazell- und Follikelkulturstudien gezeigt worden. An Schweinen ist gezeigt

worden, dass IGF-I und EGF (Epidermal growth factor) eine Granulosazellproliferation bewirken, sowie einen schützenden Effekt vor Apoptose bieten (67). In den unter 3.2.1 und 3.2.2. dargestellten Versuchen wird die antiapoptotische Wirkung von IGF-I, IGF-II und Insulin mit unterschiedlicher Kulturdauer und in unterschiedlichen Konzentrationen an humanen Granulosaluteinzellen gezeigt. Für die nachfolgenden Experimente wurde eine Inkubationszeit von fünf Stunden gewählt, da im Experiment 3.2.1. ein maximaler Anstieg der Apoptose zwischen drei und acht Stunden nachzuweisen ist. Nach acht Stunden ist bereits ein Abfall zu dokumentieren. IGF-II und Insulin führen ab einer Konzentration von 30ng/ml und IGF-II ab einer Konzentration von 10ng/ml zu einer maximalen Inhibition der Apoptose, die an der Reduktion der Caspase-3 Aktivität gemessen wird. Die folgenden Experimente werden in jeweils 100ng/ml Endkonzentration des jeweiligen Liganden durchgeführt. Da bisherige Erkenntnisse darauf hin deuten, dass IGF-II im Gegensatz zu IGF-I lokal im Ovar von Granulosazellen und eventuell von Thekazellen produziert wird (39) ist IGF-II als Schutz vor Apoptose mit seiner rezeptorspezifischen Vermittlung von besonderem Interesse und hat möglicherweise eine hervorgehobene Rolle bei der intraovariellen Regulation des Follikelwachstums. Sowohl der IGF-Rezeptor Typ 1 als auch der IGF-Rezeptor Typ 2 werden im humanen Ovar in Granulosa- und Thekazellen exprimiert (106). In manchen Studien wird eine dominante Rolle des IGF-Rezeptor Typ 1 gegenüber dem Rezeptor- Typ 2 diskutiert (114). Der IGF Rezeptor- Typ 2 wird in Granulosazellen, Thekazellen und vermehrt in dominanten gegenüber antralen Follikeln exprimiert (21, 114). Eine Dominanz des einen gegenüber dem anderen Rezeptor kann noch nicht abschließend beurteilt werden. In Versuch 3.2.3 wird neben IGF-II ein IGF-II-Analogon eingesetzt. Das IGF-II Analogon bindet mit einer 1000fach geringeren

Wirkung als IGF-II am IGF-Rezeptor Typ 1, so dass eine nahezu exklusive Signalvermittlung über den IGF-Rezeptor Typ 2 erfolgt. Bei Endkonzentrationen der Liganden von 100ng/ml wird ein schützender Effekt vor Apoptose wie in den Vorversuchen durch IGF-II erreicht. Ebenso reduziert das IGF-II-Analogon die Aktivität der Caspase-3 signifikant. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass IGF-II seinen schützenden Effekt vor Apoptose hauptsächlich über den IGF-Rezeptor Typ 2 vermittelt.

Die Rolle von IGF als mitogene Substanz ist mehrfach untersucht worden (71). Im Ovar ist die proliferative Wirkung von IGF am Tiermodell (15) und im humanen Ovar (113) in Granulosazell- und Follikelstudien beschrieben. Die Ergebnisse sind in den vorliegenden Versuchen für jeden der drei Liganden an humanen Granulosaluteinzellen bestätigt. Insulin, IGF-I und IGF-II steigern Wachstum und Zellviabilität in humanen Granulosaluteinzellen. Versuch 3.3.1 zeigt für jeden dieser drei Liganden einen signifikanten Anstieg der Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle. Von besonderem Interesse ist auch hier der Ligand IGF-II. Allerdings ist bisher wenig über die receptorspezifische Vermittlung bekannt. Willis et al. haben herausgefunden, dass IGF-II seine Wirkung nicht nur über den IGF-Rezeptor Typ 2 ausübt, sondern auch über den in allen Zelltypen des humanen Ovars exprimierten IGF-Rezeptor Typ 1 wirken kann (111). Ebenso ist dies über den Insulin-Rezeptor möglich (68). Speziell Zellviabilität, das heißt der mitogene Stimulus durch IGF-II induziert, ist in den hier beschriebenen Experimenten nicht über den IGF-Rezeptor Typ 2 vermittelt. In den unter 3.2.1 dargestellten Versuchen ist mit dem schon bekannten IGF-II Analogon, welches eine 1000fach geringere Wirkung als IGF-II am IGF-Rezeptor Typ 1 ausübt, kein signifikanter Anstieg der Zellviabilität zu messen. Das von uns eingesetzte IGF-II

Analogon hat keine proliferative Wirkung auf humane Granulosaluteinzellen. Dieses können Hinweise dafür sein, dass der Ligand IGF-II seine proliferative Wirkung hauptsächlich über den Insulin Rezeptor oder den IGF-Rezeptor Typ 1 induziert. IGF-II Rezeptor Knock-out Mäuse weisen erhöhte IGF-II Plasmaspiegel auf und sterben in utero (59). Das zeigt, dass der IGF Rezeptor Typ 2 trotz fehlender Nachweisbarkeit auf Zellviabilität in unseren Versuchen an humanen Granulosaluteinzellen im Tiermodell essentiell ist. Im Hinblick auf die beschriebene Wirkung von Insulin als Ko-Gonadotropin und die Relevanz der Hyperinsulinämie für die Pathogenese des PCOS ist der Insulin Rezeptor wahrscheinlich eine essentielle Komponente für die intraovarielle Regulation der physiologischen und gestörten Follikelreifung. Zur Definition der möglichen Bedeutung des Insulinrezeptors für Proliferation wird ein den IGF-Rezeptor Typ 1 blockierender Antikörper eingesetzt. Durch diesen soll die Wirkung von IGF-I und IGF-II über den Insulin-Rezeptor untersucht werden. In dem vorliegenden Versuchssystem wird im Vergleich zu einem als Kontrolle eingesetzten unspezifischen IgG-Antikörper keine Veränderung der Zellviabilität durch spezifische Blockierung des IGF Rezeptor Typ 1 erzielt. Um einen möglichen Fehler in den Versuchsbedingungen auszuschließen, wurden diese mehrfach verändert. Des Weiteren ist der gleiche Antikörper im Western Blot eingesetzt worden. Es zeigt sich auch hier keine spezifische Veränderung der Expression nachfolgender Signaltransduktionsmoleküle (z.B. AKT, persönliche Mitteilung, unveröffentlicht) nach Stimulation mit IGF-I und IGF-II bei Blockade des IGF-Rezeptor Typ 1. Bei etablierter Methode, zahlreichen Versuchen, Primärzellen verschiedener Individuen, sowie bei der alternativen Nutzung einer Granulosa-Zelllinie (HGL-5; persönliche Mitteilung, unveröffentlicht) konnte keine selektive Veränderung der Zellviabilität mittels IGF Rezeptor Typ 1 blockierendem

Antikörper gezeigt werden. Die Wirksamkeit des blockierenden Antikörpers vorausgesetzt, würde dies eine nahezu exklusive Vermittlung mitogener Stimuli über den Insulin-Rezeptor oder alternative Signalvermittler außerhalb des Insulin-/ IGF-Systems im Sinne einer Kreuzreaktivität bedeuten.

Eine multifaktorielle Genese des PCOS wird, wie in der Einleitung dargestellt, diskutiert. Hier soll nun die Bedeutung der möglichen intrinsischen, ovariellen Beteiligung erörtert werden. Wie schon oben beschrieben sind die Liganden des Insulin- und IGF-Systems an der Vermittlung von mitogenen und antiapoptotischen Signalen beteiligt. Dies gilt sowohl für die physiologische Follikulogenese bei gesunden Frauen als auch im Sinne einer möglichen pathogenetischen Rolle in der Entstehung einer gestörten Follikelentwicklung im Rahmen des Syndroms der polyzystischen Ovarien (52). Bei Frauen mit PCOS kommt es übermäßig häufig zur Hyperinsulinämie und peripheren Insulinresistenz, die mit Defekten der intrazellulären Signalvermittlung in Muskel und Fettgewebe in Verbindung steht. Immunhistochemisch ist die Expression der IGF-I und IGF-II mRNA in antralen Follikeln bei Frauen mit PCOS und gesunden Frauen identisch (22). Ebenso ist die IGF-I und IGF-II Produktion in Thekazellen bei gesunden und Frauen mit PCOS gleich (61). Bei Frauen mit PCOS nach IVF Behandlung konnten allerdings niedrigere intrafollikuläre Konzentrationen von IGF-II, sowie eine niedrigere IGF-II Expression in Granulosazellen gemessen werden (4). Außerdem scheint beim PCOS die Proliferation der Granulosazellen gestört zu sein, da im Vergleich zu gesunden Frauen die Anzahl an Granulosazellen in Follikeln erniedrigt ist (27). Eine interessante Fragestellung wäre hier, ob es beim PCOS zu Veränderungen der rezeptorspezifischen IGF- vermittelten Signaltransduktion bezüglich Proliferation und Apoptose kommt. Aktuelle Studien zeigen, dass Frauen mit PCOS trotz der

veränderten Anzahl von Granulosazellen mit einem Anstieg von Östradiol auf einen FSH Stimulus reagieren können (63). Mehta et al. haben festgestellt, dass Frauen mit PCOS auf eine FSH Stimulation sogar mit einem erhöhten Anstieg der Östradiol Produktion reagieren, welche mit einem erhöhten Risiko für ein Überstimulationssyndrom einhergeht (66). Die kontroverse Datenlage bezüglich der Pathophysiologie des PCOS kann auch anhand der Forschungsdaten zur Aromatase-Aktivität veranschaulicht werden. Während Untersuchungen an Granulosazellen von Frauen mit PCOS gezeigt haben, dass *in vivo* eine verminderte Aromatase-Aktivität zu messen ist, welche der möglichen Reduktion des FSH Spiegels bei Frauen, die an PCOS erkrankt sind entsprechen könnte (82), konnte in Granulosazellkulturen keine verminderte Aromatase-Aktivität nachgewiesen werden (26). Pierro et al. (79) haben sogar einen Anstieg der Aromatase-Aktivität in kultivierten Granulosazellen von PCOS Patientinnen gemessen. Im Jahr 2005 konnte von der Arbeitsgruppe Soderlund et al. gezeigt werden, dass bei Patientinnen mit PCOS keine Genmutation des P450 Aromatase Gens vorliegt und die Pathophysiologie des PCOS somit auch nicht auf genetischer Ebene der Aromatase erklärbar ist (98). In den Follikelflüssigkeiten sind sehr hohe Konzentrationen von den als FSH Antagonisten wirkenden IGFBP2 und 4 zu messen (86, 105). Allerdings sowohl bei erkrankten, als auch bei gesunden Frauen (9, 22, 94). Daher ist es eher unwahrscheinlich, dass diese Proteine in der Pathogenese eine Rolle spielen. Interessanterweise konnte in Erweiterung der hier vorgestellten Ergebnisse gezeigt werden, dass der beim PCOS zum therapeutischen Einsatz kommende Wirkstoff Metformin zu direkten Veränderungen der Signaltransduktionswege des Insulinrezeptors und zu einer Erhöhung der Zellviabilität an humanen Granulosazellen führt (99). Initial wurde Metformin, welches zur

Substanzklasse der Biguanide zählt als so genannter Insulinsensitizer bei der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt. Seit mehreren Jahren bereits werden im Rahmen eines individuellen Heilversuchs zusätzlich Frauen mit PCOS und nachgewiesener Insulinresistenz mit Metformin therapiert (38). Es konnten bisher verschiedenen Effekte wie zum Beispiel eine Abnahme der peripheren Androgenspiegel, eine Wiederherstellung des regelmäßigen Menstruationszyklus, sowie eine erhöhte Spontan- und auch durch Clomifen- induzierte Ovulationsrate gezeigt werden (58, 73). Bisher waren jedoch wenig direkte Effekte des Metformin am Ovar bekannt. In der Erweiterung der oben vorgestellten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass eine Präinkubation der Granulosazellen mit Metformin zu einem Anstieg der Zellviabilität führt, jedoch bei gemeinsamer Stimulation mit Insulin und IGF sich kein potenzierender Effekt zeigt (99) . An verschiedenen Zelltypen konnte bisher gezeigt werden, dass Metformin einen direkten Einfluss auf die Tyrosinkinase-Aktivität des Insulinrezeptors hat (37, 40, 112). Über die phosphorylierte Form der Rezeptor-Tyrosin- Kinase werden über verschiedene Docking Proteine unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert (78, 95). Aufgrund des fehlenden potenzierenden Effektes bei der Präinkubation mit Metformin und zusätzlich Insulin oder IGF wurde die Hypothese aufgestellt, dass Metformin einen möglicherweise modulierenden Effekt auf die Signaltransduktionswege der AKT und der MAPK habe. In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Präinkubation mit Metformin zu einer vermehrten Expression von phosphorylierter AKT und einer verminderten Expression von phosphorylierter MAPK bei humanen Granulosazellen der Zelllinie HGL-5 führt. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass AKT eine wichtige Rolle bezüglich des Überlebens bei Granulosazellen spielt (46, 87, 108). Der MAPK Weg ist deutlich weniger erforscht. In der Summe deuten die Ergebnisse

daraufhin, dass Metformin neben den bekannten systemischen Effekten direkt auf ovarieller Ebene über die Insulinsignaltransduktionswege via AKT und MAPK Einfluss auf die Induktion der Ovulation und Follikulogenese hat. Rice et al. stellten ebenso fest, dass bei Frauen mit PCOS wahrscheinlich eine Veränderung und Schädigung der Post-Rezeptor- Signaltransduktionswege für Insulin vorliegt. Sie konnten nachweisen, dass bei Frauen mit PCOS und Anovulation humane Granulosazellen resistent auf die Wirkung von Insulin stimulierter Glukoseaufnahme und -nutzung sind, wohingegen die Steroidbiosynthese durch Stimulation mit Insulin erhalten ist (89). Zwischenzeitlich konnte von derselben Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Metformin die Aromatase-Aktivität in humanen Granulosaluteinzellen über eine Aktivierung des MEK/ERK-Signalwegs direkt inhibiert (90).

Zusammenfassend sind zum Verständnis der Follikulogenese bereits zahlreiche intrinsische Faktoren auf Ebene des Ovars untersucht worden. Im Besonderen interessiert das Syndrom der Polyzystischen Ovarien, da diese häufige, komplexe Krankheit, welche mit einer gestörten Follikulogenese einhergeht, ein wichtiger Grund für Infertilität ist. In den hier durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass die intraovarielle Regulation der Viabilität humaner Granulosaluteinzellen *in vitro* durch Liganden des Insulin-/IGF-Systems mitbestimmt wird. IGF-II spielt hierbei aufgrund seiner Produktion im Ovar selbst eine hervorgehobene Rolle. Die antiapoptotische Wirkung von IGF-II wird nach den hier vorliegenden Ergebnissen über den spezifischen IGF-Rezeptor Typ 2 vermittelt. Die proliferative Wirkung von IGF-II wird nach den hier vorgestellten Ergebnissen weder über den IGF-Rezeptor Typ 2, noch über den IGF -Rezeptor Typ 1 vermittelt. Aus diesem Grund übernimmt möglicherweise der Insulinrezeptor oder alternative Signalvermittler außerhalb des

Insulin- / IGF- Systems eine essentielle Rolle bei der Vermittlung mitogener Signale. Im Hinblick auf die beschriebene Wirkung von Insulin als „Ko-Gonadotropin“ und die Relevanz der Hyperinsulinämie für die Pathogenese des PCOS ist eine Beteiligung des Insulin und IGF-Systems in der Pathogenese des PCOS weiterhin zu postulieren. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen jedoch, dass weitergehende Experimente zur genauen Definierung der Signaltransduktionswege zum physiologischen Verständnis und zur Klärung des Krankheitsbildes des Syndroms der Polyzystischen Ovarien benötigt werden.

5 Literatur

1. **Adashi EY, Resnick CE, Hernandez ER, May JV, Knecht M, Svoboda ME, and Van Wyk JJ.** Insulin-like growth factor-I as an amplifier of follicle-stimulating hormone action: studies on mechanism(s) and site(s) of action in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 122: 1583-1591, 1988.
2. **Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, and Yuan J.** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171, 1996.
3. **Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellve AR, and Efstratiadis A.** Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol* 10: 903-918, 1996.
4. **Barreca A, Del Monte P, Ponzani P, Artini PG, Genazzani AR, and Minuto F.** Intrafollicular insulin-like growth factor-II levels in normally ovulating women and in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 65: 739-745, 1996.
5. **Berg J, Tymoczko, L. Stryer.** *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2003.
6. **Bergh C, Olsson JH, and Hillensjo T.** Effect of insulin-like growth factor I on steroidogenesis in cultured human granulosa cells. *Acta Endocrinol (Copenh)* 125: 177-185, 1991.
7. **Bondy CA ZJ.** Functional correlates of IGF system gene expression in the murine and primate ovary. In: LeRoith D (ed) *The Role of Insulin-like Growth Factors in Ovarian Physiology*. . In: *Ares-Serono Symposia, Rome*, 1996, p. pp 59–69.
8. **Buyalos RP.** Insulin-like growth factors: clinical experience in ovarian function. *Am J Med* 98: 55S-66S, 1995.
9. **Cataldo NA, and Giudice LC.** Follicular fluid insulin-like growth factor binding protein profiles in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 695-697, 1992.
10. **Cataldo NA, and Giudice LC.** Insulin-like growth factor binding protein profiles in human ovarian follicular fluid correlate with follicular functional status. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 821-829, 1992.
11. **Chang RJ.** A practical approach to the diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 191: 713-717, 2004.
12. **Chang RJ.** The reproductive phenotype in polycystic ovary syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3: 688-695, 2007.
13. **Chang RJ, and Katz SE.** Diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 28: 397-408, vii, 1999.
14. **Christman GM, Randolph JF, Jr., Peegel H, and Menon KM.** Differential responsiveness of luteinized human granulosa cells to gonadotropins and insulin-like growth factor I for induction of aromatase activity. *Fertil Steril* 55: 1099-1105, 1991.
15. **Chun SY, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafiri A, and Hsueh AJ.** Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 135: 1845-1853, 1994.
16. **Cohen GM.** Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1): 1-16, 1997.
17. **Cohen P, Fielder PJ, Hasegawa Y, Frisch H, Giudice LC, and Rosenfeld RG.** Clinical aspects of insulin-like growth factor binding proteins. *Acta Endocrinol (Copenh)* 124 Suppl 2: 74-85, 1991.

18. **D'Ercole AJ, Ye P, and Gutierrez-Ospina G.** Use of transgenic mice for understanding the physiology of insulin-like growth factors. *Horm Res* 45 Suppl 1: 5-7, 1996.
19. **Diamond MP, Webster BW, Carr RK, Wentz AC, and Osteen KG.** Human follicular fluid insulin concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 61: 990-992, 1985.
20. **Edwards RG.** Follicular fluid. *J Reprod Fertil* 37: 189-219, 1974.
21. **el-Roeiy A, Chen X, Roberts VJ, LeRoith D, Roberts CT, Jr., and Yen SS.** Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II and the IGF-I, IGF-II, and insulin receptor genes and localization of the gene products in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 1411-1418, 1993.
22. **el-Roeiy A, Chen X, Roberts VJ, Shimasakai S, Ling N, LeRoith D, Roberts CT, Jr., and Yen SS.** Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors (IGF-I and II), the IGF and insulin receptors, and IGF-binding proteins-1-6 and the localization of their gene products in normal and polycystic ovary syndrome ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 1488-1496, 1994.
23. **Erickson GF, and Danforth DR.** Ovarian control of follicle development. *Am J Obstet Gynecol* 172: 736-747, 1995.
24. **Erickson GF, Garzo VG, and Magoffin DA.** Insulin-like growth factor-I regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 69: 716-724, 1989.
25. **Erickson GF, Garzo VG, and Magoffin DA.** Progesterone production by human granulosa cells cultured in serum free medium: effects of gonadotrophins and insulin-like growth factor I (IGF-I). *Hum Reprod* 6: 1074-1081, 1991.
26. **Erickson GF, Magoffin DA, Garzo VG, Cheung AP, and Chang RJ.** Granulosa cells of polycystic ovaries: are they normal or abnormal? *Hum Reprod* 7: 293-299, 1992.
27. **Erickson GF, and Yen SSC.** New Data on Follicle Cells in Polycystic Ovaries - a Proposed Mechanism for the Genesis of Cystic Follicles. *Seminars in Reproductive Endocrinology* 2: 231-243, 1984.
28. **Falck B.** Site of production of oestrogen in the ovary of the rat. *Nature* 184(Suppl 14): 1082, 1959.
29. **Flier JS, Kahn CR, Roth J, and Bar RS.** Antibodies that impair insulin receptor binding in an unusual diabetic syndrome with severe insulin resistance. *Science* 190: 63-65, 1975.
30. **Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, and Kito S.** The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 163: 53-60, 2000.
31. **Franks S.** Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 333: 853-861, 1995.
32. **Geisthovel F, Moretti-Rojas I, Asch RH, and Rojas FJ.** Expression of insulin-like growth factor-II (IGF-II) messenger ribonucleic acid (mRNA), but not IGF-I mRNA, in human preovulatory granulosa cells. *Hum Reprod* 4: 899-902, 1989.
33. **Gilchrist RB, Lane M, and Thompson JG.** Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* 14: 159-177, 2008.
34. **Giudice LC.** Growth factor action on ovarian function in polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 28: 325-339, vi, 1999.
35. **Giudice LC, Farrell EM, Pham H, and Rosenfeld RG.** Identification of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) and IGFBP-2 in human follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 71: 1330-1338, 1990.

36. **Group consensus workshop Rotterdam** ESHRE/ASRM-sponsored PCOS. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 81: 19-25, 2004.
37. **Gunton JE, Delhanty PJ, Takahashi S, and Baxter RC.** Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 1323-1332, 2003.
38. **Harborne L, Fleming R, Lyall H, Norman J, and Sattar N.** Descriptive review of the evidence for the use of metformin in polycystic ovary syndrome. *Lancet* 361: 1894-1901, 2003.
39. **Hernandez ER, Hurwitz A, Vera A, Pellicer A, Adashi EY, LeRoith D, and Roberts CT, Jr.** Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors and their receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 419-425, 1992.
40. **Holland W, Morrison T, Chang Y, Wiernsperger N, and Stith BJ.** Metformin (Glucophage) inhibits tyrosine phosphatase activity to stimulate the insulin receptor tyrosine kinase. *Biochem Pharmacol* 67: 2081-2091, 2004.
41. **Homburg R.** Androgen circle of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 24: 1548-1555, 2009.
42. **Hsueh AJ, Billig H, and Tsafiriri A.** Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev* 15: 707-724, 1994.
43. **Hunt T.** Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. *Semin Cell Biol* 2: 213-222, 1991.
44. **Iwashita M, Mimuro T, Watanabe M, Setoyama T, Matsuo A, Adachi T, Takeda Y, and Sakamoto S.** Plasma levels of insulin-like growth factor-I and its binding protein in polycystic ovary syndrome. *Horm Res* 33 Suppl 2: 21-26, 1990.
45. **Jesionowska H, Hemmings R, Guyda HJ, and Posner BI.** Determination of insulin and insulin-like growth factors in the ovarian circulation. *Fertil Steril* 53: 88-91, 1990.
46. **Johnson AL, Bridgham JT, and Swenson JA.** Activation of the Akt/protein kinase B signaling pathway is associated with granulosa cell survival. *Biol Reprod* 64: 1566-1574, 2001.
47. **Joslin EP RH, White P.** The growth, development and prognosis of diabetic children. *JAMA* 85: 420-422 1925.
48. **Kahn CR, Flier JS, Bar RS, Archer JA, Gorden P, Martin MM, and Roth J.** The syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans. Insulin-receptor disorders in man. *N Engl J Med* 294: 739-745, 1976.
49. **Kerr JF, Wyllie AH, and Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972.
50. **Kiess W, Blickenstaff GD, Sklar MM, Thomas CL, Nissley SP, and Sahagian GG.** Biochemical evidence that the type II insulin-like growth factor receptor is identical to the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 263: 9339-9344, 1988.
51. **Kuntzel H, Schulz A, and Ehbrecht IM.** Cell cycle control and initiation of DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem* 377: 481-487, 1996.
52. **Kwintkiewicz J, and Giudice LC.** The interplay of insulin-like growth factors, gonadotropins, and endocrine disruptors in ovarian follicular development and function. *Semin Reprod Med* 27: 43-51, 2009.

53. **LeRoith D, Clemmons D, Nissley P, and Rechler MM.** NIH conference. Insulin-like growth factors in health and disease. *Ann Intern Med* 116: 854-862, 1992.
54. **LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, and Roberts CT, Jr.** Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16: 143-163, 1995.
55. **Li A, and Blow JJ.** The origin of CDK regulation. *Nat Cell Biol* 3: E182-184, 2001.
56. **Ling NC, Liu XJ, Malkowski M, Guo YL, Erickson GF, and Shimasaki S.** Structural and functional studies of insulin-like growth factor binding proteins in the ovary. *Growth Regul* 3: 70-74, 1993.
57. **Löffler G, Petrides, P. E.** *Biochemie und Pathobiochemie.* Springer Verlag, 2006.
58. **Lord JM, Flight IH, and Norman RJ.** Insulin-sensitising drugs (metformin, troglitazone, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* CD003053, 2003.
59. **Ludwig T, Eggenschwiler J, Fisher P, D'Ercole AJ, Davenport ML, and Efstratiadis A.** Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in Igf2 and Igf1r null backgrounds. *Dev Biol* 177: 517-535, 1996.
60. **Markstrom E, Svensson E, Shao R, Svanberg B, and Billig H.** Survival factors regulating ovarian apoptosis -- dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 123: 23-30, 2002.
61. **Mason HD, Cwyfan-Hughes SC, Heinrich G, Franks S, and Holly JM.** Insulin-like growth factor (IGF) I and II, IGF-binding proteins, and IGF-binding protein proteases are produced by theca and stroma of normal and polycystic human ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 276-284, 1996.
62. **Mason HD, Willis D, Holly JM, Cwyfan-Hughes SC, Seppala M, and Franks S.** Inhibitory effects of insulin-like growth factor-binding proteins on steroidogenesis by human granulosa cells in culture. *Mol Cell Endocrinol* 89: R1-4, 1992.
63. **Matalliotakis I, Kourtis A, Koukoura O, and Panidis D.** Polycystic ovary syndrome: etiology and pathogenesis. *Arch Gynecol Obstet* 274: 187-197, 2006.
64. **McGee EA, and Hsueh AJ.** Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 21: 200-214, 2000.
65. **McKinnon T, Chakraborty C, Gleeson LM, Chidiac P, and Lala PK.** Stimulation of human extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF type 2 receptor involving inhibitory G protein(s) and phosphorylation of MAPK. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 3665-3674, 2001.
66. **Mehta RV, Malcom PJ, and Chang RJ.** The Effect of Androgen Blockade on Granulosa Cell Estradiol Production Following FSH Stimulation in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006.
67. **Monget P, Fabre S, Mulsant P, Lecerf F, Elsen JM, Mazerbourg S, Pisselet C, and Monniaux D.** Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 23: 139-154, 2002.
68. **Morrione A, Valentinis B, Xu SQ, Yumet G, Louvi A, Efstratiadis A, and Baserga R.** Insulin-like growth factor II stimulates cell proliferation through the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3777-3782, 1997.

69. **Moser BA, and Russell P.** Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Opin Microbiol* 3: 631-636, 2000.
70. **Nagamani M, and Stuart CA.** Specific binding sites for insulin-like growth factor I in the ovarian stroma of women with polycystic ovarian disease and stromal hyperthecosis. *Am J Obstet Gynecol* 163: 1992-1997, 1990.
71. **Navarro M, and Baserga R.** Limited redundancy of survival signals from the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Endocrinology* 142: 1073-1081, 2001.
72. **Nestler JE, Jakubowicz DJ, de Vargas AF, Brik C, Quintero N, and Medina F.** Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2001-2005, 1998.
73. **Nestler JE, Jakubowicz DJ, Evans WS, and Pasquali R.** Effects of metformin on spontaneous and clomiphene-induced ovulation in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 338: 1876-1880, 1998.
74. **Nielsen FC.** The molecular and cellular biology of insulin-like growth factor II. *Prog Growth Factor Res* 4: 257-290, 1992.
75. **Nishimoto I, Murayama Y, Katada T, Ui M, and Ogata E.** Possible direct linkage of insulin-like growth factor-II receptor with guanine nucleotide-binding proteins. *J Biol Chem* 264: 14029-14038, 1989.
76. **Patel SS, and Carr BR.** Oocyte quality in adult polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med* 26: 196-203, 2008.
77. **Peng X, Maruo T, Samoto T, and Mochizuki M.** Comparison of immunocytologic localization of insulin-like growth factor binding protein-4 in normal and polycystic ovary syndrome human ovaries. *Endocr J* 43: 269-278, 1996.
78. **Peruzzi F, Prisco M, Dews M, Salomoni P, Grassilli E, Romano G, Calabretta B, and Baserga R.** Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis. *Mol Cell Biol* 19: 7203-7215, 1999.
79. **Pierro E, Andreani CL, Lazzarin N, Cento R, Lanzone A, Caruso A, and Mancuso S.** Further evidence of increased aromatase activity in granulosa luteal cells from polycystic ovary. *Hum Reprod* 12: 1890-1896, 1997.
80. **Poretsky L.** On the paradox of insulin-induced hyperandrogenism in insulin-resistant states. *Endocr Rev* 12: 3-13, 1991.
81. **Poretsky L, Bhargava G, Kalin MF, and Wolf SA.** Regulation of insulin receptors in the human ovary: in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab* 67: 774-778, 1988.
82. **Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, and Giudice LC.** The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev* 20: 535-582, 1999.
83. **Poretsky L, Glover B, Laumas V, Kalin M, and Dunaif A.** The effects of experimental hyperinsulinemia on steroid secretion, ovarian [125I]insulin binding, and ovarian [125I]insulin-like growth-factor I binding in the rat. *Endocrinology* 122: 581-585, 1988.
84. **Poretsky L, and Kalin MF.** The gonadotropic function of insulin. *Endocr Rev* 8: 132-141, 1987.
85. **Porter AG, Ng P, and Janicke RU.** Death substrates come alive. *Bioessays* 19: 501-507, 1997.
86. **Putowski L, Rohan RM, Choi DS, Scherzer WJ, Ricciarelli E, Mordacq J, Mayo KE, and Adashi EY.** Rat ovarian insulin-like growth factor binding protein-4: a

- hormone-dependent granulosa cell-derived antigonadotropin. *J Soc Gynecol Investig* 4: 144-151, 1997.
87. **Quirk SM, Cowan RG, Harman RM, Hu CL, and Porter DA.** Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J Anim Sci* 82 E-Suppl: E40-52, 2004.
 88. **Ramasharma K, and Li CH.** Human pituitary and placental hormones control human insulin-like growth factor II secretion in human granulosa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 2643-2647, 1987.
 89. **Rice S, Christoforidis N, Gadd C, Nikolaou D, Seyani L, Donaldson A, Margara R, Hardy K, and Franks S.** Impaired insulin-dependent glucose metabolism in granulosa-lutein cells from anovulatory women with polycystic ovaries. *Hum Reprod* 20: 373-381, 2005.
 90. **Rice S, Pellatt L, Ramanathan K, Whitehead SA, and Mason HD.** Metformin inhibits aromatase via an extracellular signal-regulated kinase-mediated pathway. *Endocrinology* 150: 4794-4801, 2009.
 91. **Roth RA.** Structure of the receptor for insulin-like growth factor II: the puzzle amplified. *Science* 239: 1269-1271, 1988.
 92. **Samoto T, Maruo T, Ladines-Llave CA, Matsuo H, Deguchi J, Barnea ER, and Mochizuki M.** Insulin receptor expression in follicular and stromal compartments of the human ovary over the course of follicular growth, regression and atresia. *Endocr J* 40: 715-726, 1993.
 93. **Samoto T, Maruo T, Matsuo H, Katayama K, Barnea ER, and Mochizuki M.** Altered expression of insulin and insulin-like growth factor-I receptors in follicular and stromal compartments of polycystic ovaries. *Endocr J* 40: 413-424, 1993.
 94. **San Roman GA, and Magoffin DA.** Insulin-like growth factor binding proteins in ovarian follicles from women with polycystic ovarian disease: cellular source and levels in follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 1010-1016, 1992.
 95. **Schlessinger J.** Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103: 211-225, 2000.
 96. **Schuring AN, Schulte N, Sonntag B, and Kiesel L.** Androgens and insulin--two key players in polycystic ovary syndrome. Recent concepts in the pathophysiology and genetics of polycystic ovary syndrome. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* 48: 9-15, 2008.
 97. **Sherr CJ, and Roberts JM.** CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13: 1501-1512, 1999.
 98. **Soderlund D, Canto P, Carranza-Lira S, and Mendez JP.** No evidence of mutations in the P450 aromatase gene in patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 20: 965-969, 2005.
 99. **Sonntag B, Gotte M, Wulfig P, Schuring AN, Kiesel L, and Greb RR.** Metformin alters insulin signaling and viability of human granulosa cells. *Fertil Steril* 84 Suppl 2: 1173-1179, 2005.
 100. **Sonntag E, Kiesel.** Bedeutung ovarieller Faktoren für die Steuerung der Follikulogenese In: *Reproduktionsmedizin* 2002, p. Seiten 307-312
 101. **Stern B, and Nurse P.** A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet* 12: 345-350, 1996.
 102. **Strauss JF, 3rd, and Dunaif A.** Molecular mysteries of polycystic ovary syndrome. *Mol Endocrinol* 13: 800-805, 1999.

103. **Taylor SI, Dons RF, Hernandez E, Roth J, and Gorden P.** Insulin resistance associated with androgen excess in women with autoantibodies to the insulin receptor. *Ann Intern Med* 97: 851-855, 1982.
104. **Thierry van Dessel HJ, Chandrasekher Y, Yap OW, Lee PD, Hintz RL, Faessen GH, Braat DD, Fauser BC, and Giudice LC.** Serum and follicular fluid levels of insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, and IGF-binding protein-1 and -3 during the normal menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 1224-1231, 1996.
105. **Ui M, Shimonaka M, Shimasaki S, and Ling N.** An insulin-like growth factor-binding protein in ovarian follicular fluid blocks follicle-stimulating hormone-stimulated steroid production by ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 125: 912-916, 1989.
106. **Voutilainen R, Franks S, Mason HD, and Martikainen H.** Expression of insulin-like growth factor (IGF), IGF-binding protein, and IGF receptor messenger ribonucleic acids in normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 1003-1008, 1996.
107. **Voutilainen R, and Miller WL.** Coordinate tropic hormone regulation of mRNAs for insulin-like growth factor II and the cholesterol side-chain-cleavage enzyme, P450scc [corrected], in human steroidogenic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 1590-1594, 1987.
108. **Westfall SD, Hendry IR, Obholz KL, Rueda BR, and Davis JS.** Putative role of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling pathway in the survival of granulosa cells. *Endocrine* 12: 315-321, 2000.
109. **Willis D, and Franks S.** Insulin action in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries is mediated by the insulin receptor and not the type-I insulin-like growth factor receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 3788-3790, 1995.
110. **Willis D, Mason H, Gilling-Smith C, and Franks S.** Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 302-309, 1996.
111. **Willis DS, Mason HD, Watson H, and Franks S.** Developmentally regulated responses of human granulosa cells to insulin-like growth factors (IGFs): IGF-I and IGF-II action mediated via the type-I IGF receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1256-1259, 1998.
112. **Yuan L, Ziegler R, and Hamann A.** Metformin modulates insulin post-receptor signaling transduction in chronically insulin-treated Hep G2 cells. *Acta Pharmacol Sin* 24: 55-60, 2003.
113. **Yuan W, and Giudice LC.** Insulin-like growth factor-II mediates the steroidogenic and growth promoting actions of follicle stimulating hormone on human ovarian pre-antral follicles cultured in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1479-1482, 1999.
114. **Zhou J, and Bondy C.** Anatomy of the human ovarian insulin-like growth factor system. *Biol Reprod* 48: 467-482, 1993.
115. **Zhou J, Chin E, and Bondy C.** Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor gene expression in the developing and mature ovarian follicle. *Endocrinology* 129: 3281-3288, 1991.

6. Lebenslauf

7. Danksagung

Mein Dank für die hilfreiche Unterstützung beim Erstellen meiner Dissertation geht in erster Linie an meine Doktormutter Barbara Sonntag, die mit ihrem Fachwissen, ihrer konstruktiven Kritik und ihren Ideen immer wieder den nötigen Aufschwung gegeben hat.

Bedanken möchte ich mich bei der gesamten Laborgruppe der Reproduktionsmedizin, insbesondere bei Monika Offers und Birgit Pers. Sie haben mir mit ihrer Erfahrung, ihren Ideen, ihrer Geduld und ihrem Humor immer tatkräftig beiseite gestanden.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern, Florian und Felix, die mich stets bestärkt haben und mir gerade in schwierigen Zeiten die nötige Unterstützung gegeben haben.

8. Anhang

8.1. Tabellenanhang

Tabelle 1

1. Zellpräparation	Absolute Werte 1	Absolute Werte 2	Mittelwert	Ohne Leerwert	Relativ zur Kontrolle
Nach 3 Stunden					
Kontrolle	79,10	75,54	77,32	39,31	1,00
IGFI	65,70	72,95	69,32	31,32	0,80
IGFII	73,09	70,16	71,62	33,62	0,86
Insulin	93,96	73,93	83,94	45,94	1,17
Leerwert	39,29	36,73	38,01		
Nach 8 Stunden					
Kontrolle	148,50	100,87	124,69	86,68	2,21
IGFI	102,63	92,70	97,66	59,66	1,52
IGFII	79,62	76,86	78,24	40,23	1,02
Insulin	79,73	83,34	81,54	43,53	1,11
Leerwert	39,29	36,73	38,01		
Nach 20 Stunden					
Kontrolle	83,43	77,11	80,27	42,26	1,08
IGFI	69,25	70,88	70,06	32,05	0,82
IGFII	62,25	82,26	72,25	34,25	0,87
Insulin	71,05	72,37	71,71	33,70	0,86
Leerwert	39,29	36,73	38,01		
2. Zellpräparation					
Nach 3 Stunden					
Kontrolle	96,65	91,27	93,96	55,95	1,00
IGFI	87,01	112,18	99,60	61,59	1,10
IGFII	67,74	67,62	67,68	29,68	0,53
Insulin	106,28	76,58	91,43	53,42	0,95
Leerwert	39,29	36,73	38,01		
Nach 8 Stunden					
Kontrolle	228,52	175,61	202,06	164,05	2,93
IGFI	107,47	108,33	107,90	69,89	1,25
IGFII	81,91	88,96	85,43	47,43	0,85
Insulin	110,43	114,54	112,49	74,48	1,33
Leerwert	39,29	36,73	38,01		
Nach 20 Stunden					
Kontrolle	122,39	124,90	123,64	85,63	1,53
IGFI	93,70	92,72	93,21	55,21	0,99
IGFII	118,89	88,65	103,77	65,76	1,18
Insulin	107,25	85,07	96,16	58,15	1,04
Leerwert	39,29	36,73	38,01		

Tabelle 2

Zeit in Stunden	Kontrolle	Insulin	IGFI	IGFII
3	1,00	1,06	0,95	0,69
8	2,57	1,22	1,38	0,94
20	1,30	0,95	0,90	1,02
Standardabweichung				
3	-	0,11	0,15	0,16
8	0,36	0,11	0,13	0,09
20	0,23	0,09	0,09	0,15

Tabelle 3

Liganden in ng/ml	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrolle	1,00	-
IGF-I 10	0,74	0,06
IGF-I 30	0,70	0,02
IGF-I 100	0,75	0,07
IGF-II 10	0,95	0,11
IGF-II 30	0,71	0,10
IGF-II 100	0,76	0,07
Insulin 10	0,94	0,08
Insulin 30	0,68	0,06
Insulin 100	0,76	0,05

Tabelle 4

	Quadratsumme	Freiheitsgrade	Mittel der Quadrate	F-Wert	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	0,62	3	0,21	3,19	0,05
Innerhalb der Gruppen	1,28	20	0,06		
Gesamt	1,9	23			

Tabelle 5

(I) V7	(J) V7	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
Kontrolle	Insulin 10	0,19	0,15	0,65	-0,26	0,63
	Insulin 30	0,41	0,15	0,08	-0,03	0,86
	Insulin 100	0,35	0,15	0,16	-0,10	0,80

Tabelle 6

	Quadratsumme	Freiheitsgrade	Mittel der Quadrate	F-Wert	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	0,64	3	0,21	3,86	0,03
Innerhalb der Gruppen	1,10	20	0,06		
Gesamt	1,74	23			

Tabelle 7

(I) V1	(J) V1	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
Kontrolle	IGF-1 10	0,36	0,16	0,10	-0,05	0,77
	IGF-1 30	0,41	0,13	0,05	-0,00	0,82
	IGF-1 100	0,35	0,14	0,11	-0,06	0,77

Tabelle 8

	Quadrat- summe	Freiheits- grade	Mittel der Quadrate	F-Wert	Signifi- kanz
Zwischen den Gruppen	0,54	3	0,18	2,74	0,07
Innerhalb der Gruppen	1,31	20	0,07		
Gesamt	1,85	23			

Tabelle 9

(I) V4	(J) V4	Mittlere Differenz (I-J)	Standard- fehler	Signifi- kanz	95%- Konfidenzintervall	
Kontrolle	IGF-II 10	0,17	0,15	0,72	-0,28	0,62
	IGF-II 30	0,38	0,15	0,13	-0,07	0,83
	IGF-II 100	0,34	0,15	0,19	-0,11	0,79

Tabelle 10

	Kontrolle	IGF-II	IGF-II- Analogon
Versuch 1	1	0,49	0,71
Versuch 2	1	0,58	0,72
Versuch 3	1	0,65	0,74
Mittelwert	1	0,57	0,72
Standardabweichung	0	0,08	0,02

Tabelle 11

Levene- statistik	Freiheits- grade 1	Freiheits- grade 2	Signifi- kanz
4,71	2	6	0,06

Tabelle 12

	Quadrat- summe	Freiheits- grade	Mittel der Quadrate	F-Wert	Signifi- kanz
Zwischen den Gruppen	0,28	2	0,14	66,62	0,00
Innerhalb der Gruppen	0,01	6	0,002		
Gesamt	0,10	8			

Tabelle 13

		Mittlere Differenz (I-J)	Standard- fehler	Signifi- kanz	95%- Konfidenzintervall	
IGF-II	IGF-II Analogon	-0,15	0,04	0,02	-0,27	-0,03
	Kontrolle	-0,43	0,04	0,00	-0,55	-0,31
IGF-II Analogon	IGF-II	0,15	0,04	0,02	-0,03	0,27
	Kontrolle	-0,28	0,04	0,001	-0,40	-0,16
Kontrolle	IGF-II	0,43	0,04	0,00	0,31	0,55
	IGF-II Analogon	0,28	0,04	0,001	0,16	0,40

Tabelle 14

	Kontrolle	Insulin	IGF-I	IGF-II	IGF-II- Analogon
Versuch 1	1	1,32	1,68	1,43	1,08
Versuch 2	1	1,52	1,61	1,39	1,14
Versuch 3	1	1,20	1,45	1,79	1,08
Mittelwert	1	1,35	1,58	1,54	1,10
Standardabweichung	0	0,16	0,12	0,22	0,03

Tabelle 15

Levene- statistik	Freiheits- grade 1	Freiheits- grade 2	Signifi- kanz
6,063	4	40	0,001

Tabelle 16

		Quadrat- summe	Freiheits- grade	Mittel der Quadrate	F- Wert	Signifi- kanz
Zwischen den Gruppen	(Kombiniert)	2,42	4	0,60	11,0 9	0,00
	Linearer Term	0,14	1	0,14	2,50	0,12
	Abwei- chung	2,28	3	0,76	13,9 5	0,00
Innerhalb der Gruppen		2,18	40	0,05		
Gesamt		4,6	44			

Tabelle 17

		Mittlere Differenz (I-J)	Standard- fehler	Signifi- kanz	95%- Konfidenzintervall	
Kontrolle	Ins-relativ	-0,35	0,11	0,05	-0,71	0,004
	IGF-I- relativ	-0,58	0,11	0,00	-0,94	-0,23
	IGF-II- relativ	-0,54	0,11	0,001	-0,9	-0,19
	Analogon- relativ	-0,1	0,11	0,93	-0,46	0,26

Tabelle 18

IGF-I in ng/ml ohne Antikörper	0	3	10	30	100
Versuch 1	1	1,83	1,84	1,79	1,84
Versuch 2	1	1,97	1,86	1,83	1,77
Versuch 3	1	1,46	1,36	1,44	1,57
Versuch 4	1	1,31	1,50	1,59	1,67
Mittelwert	1	1,64	1,64	1,66	1,72
Standardabweichung	0	0,31	0,25	0,18	0,12

Tabelle 19

IGF-I in ng/ml mit Anti-IgG	0	3	10	30	100
Versuch 1	1,24	1,90	1,95	1,67	2,13
Versuch 2	1,40	1,98	2,22	2,47	2,64
Versuch 3	0,99	1,29	1,33	1,53	1,70
Versuch 4	1,14	1,40	1,63	1,76	1,82
Mittelwert	1,19	1,64	1,78	1,86	2,07
Standardabweichung	0,17	0,35	0,38	0,42	0,42

Tabelle 20

IGF-I in ng/ml mit IGF-I-Rezeptor-Antikörper	0	3	10	30	100
Versuch 1	1,14	1,96	2,13	1,86	1,79
Versuch 2	1,27	1,74	1,61	1,89	2,03
Versuch 3	0,83	1,27	1,51	1,63	1,59
Versuch 4	1,17	1,48	1,81	1,73	1,77
Mittelwert	1,10	1,61	1,77	1,78	1,80
Standardabweichung	0,19	0,30	0,27	0,12	0,18

Tabelle 21

IGF-II in ng/ml ohne Antikörper	0	3	10	30	100
Versuch 1	1	2,04	2,05	2,05	1,81
Versuch 2	1	1,52	2,1	1,95	1,68
Versuch 3	1	1,36	1,60	1,51	1,70
Versuch 4	1	1,41	1,39	1,57	1,50
Mittelwert	1	1,58	1,79	1,77	1,67
Standardabweichung	0	0,31	0,34	0,27	0,13

Tabelle 22

IGF-II in ng/ml mit Anti-IgG	0	3	10	30	100
Versuch 1	1,24	1,91	1,93	2,17	1,83
Versuch 2	1,40	1,83	2,18	2,63	2,74
Versuch 3	0,99	1,34	1,51	1,51	1,74
Versuch 4	1,14	0,97	1,39	1,53	1,59
Mittelwert	1,19	1,51	1,75	1,96	1,98
Standardabweichung	0,17	0,44	0,37	0,54	0,52

Tabelle 23

IGF-II in ng/ml mit IGF-I-Rezeptor-Antikörper	0	3	10	30	100
Versuch 1	1,14	2,11	2,12	2,01	1,94
Versuch 2	1,27	1,86	1,85	1,89	1,84
Versuch 3	0,83	1,29	1,54	1,72	1,68
Versuch 4	1,17	1,69	1,43	1,68	1,45
Mittelwert	1,10	1,74	1,74	1,83	1,73
Standardabweichung	0,19	0,34	0,31	0,15	0,21

8.2. Patienteneinverständniserklärung

Entnahme und Aufbewahrung von Blut und Gewebe

im Rahmen ergänzender wissenschaftlicher Untersuchungen

Sehr geehrte Patientin,

zur weiteren Diagnose und Behandlung Ihrer Krankheit kann bei Ihnen die Entfernung oder Entnahme von Gewebe notwendig werden. Üblicherweise wird dieses Gewebe nach dem Eingriff verworfen. Einen Teil dieses Gewebes möchten Mitarbeiter unserer Klinik zu wissenschaftlichen Zwecken verwenden.

Die Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe (Direktor: Prof. Dr. med. L. Kiesel) möchte Ihnen eine medizinische Versorgung auf hohem Niveau bieten und diese konsequent verbessern. Daher ist die Bearbeitung wissenschaftlicher Fragen zur Entstehung von gynäkologischen Erkrankungen zusätzlich zur Patientenversorgung eine wichtige Aufgabe dieser Klinik.

Hierzu erbitten wir nachfolgend Ihre Unterstützung:

Auch in Kooperation mit anderen Institutionen führt die Universitäts-Frauenklinik Münster wissenschaftliche Projekte zur Frage der Entstehungsweise Ihrer Erkrankung durch. Durch die Identifizierung typischer Veränderungen des Gewebes – sei es an der DNA oder Proteinen - können neue Therapiestrategien entwickelt werden. Im Rahmen dieser wissenschaftlichen Projekte werden mit verschiedenen Methoden nach bislang unbekanntem Veränderungen des erkrankten und umgebenden gesunden Gewebes bei gynäkologischen Erkrankungen gesucht, um diese dann systematisch zu analysieren.

Hierzu werden Gewebeproben von Patientinnen gesammelt, aufgearbeitet, analysiert und unter Einbeziehung krankheitsrelevanter Daten auf spezifisch auftretende Veränderungen hin verglichen.

Zur Behandlung Ihrer Erkrankung sind ärztliche Maßnahmen nötig, in deren Verlauf Blut- und Gewebeproben entnommen werden müssen. Wir bitten Sie um Ihre Zustimmung, eine geringe Menge dieser Proben für die wissenschaftlichen Untersuchungen zur Verfügung zu stellen. Diese Proben werden bis zu Ihrer Analyse in einer Gewebebank tiefgekühlt gelagert und können so für die verschiedenen wissenschaftlichen Methoden genutzt werden.

Durch Ihre Bereitschaft, uns Gewebe zu wissenschaftlichen Zwecken zur Verfügung zu stellen, können Sie einen wichtigen Beitrag dazu leisten, dass neue Therapien zur Behandlung gynäkologischer Erkrankungen entwickelt werden können. Auch wenn in der Regel kein direkter Einfluss auf Ihren individuellen Krankheitsverlauf erwartet werden kann, können die Ergebnisse für andere Patientinnen in Zukunft von großer

Bedeutung sein. Möchten Sie für den Fall, dass im Rahmen dieses Projekts doch neue Erkenntnisse mit Relevanz für Ihren Krankheitsverlauf gewonnen werden, informiert werden, so können Sie dies auf dem Einwilligungsbogen vermerken.

Vorgehen bei der Entnahme von Blut- und Gewebematerial

Die Entnahme von **Blut** erfolgt im Rahmen einer Routineentnahme, wie sie nach dem Eingriff üblich ist, z.B. Blutbilduntersuchung. Hierbei werden Ihnen zusätzlich 1-2 Blutröhrchen mit 10-20 ml Blut entnommen, d.h. es ist kein zusätzlicher Einstich mit einer Kanüle in die Haut notwendig.

Sowohl diese Menge, als auch die für die Routineuntersuchung entnommene Blutmenge, sind gesundheitlich unbedenklich. Das Verfahren läuft dabei wie folgt ab: ein erfahrener Arzt desinfiziert die Einstichstelle, in der Regel an der Armbeuge oder im Unterarm, und legt die Entnahmekanüle in die Armvene. Anschließend wird das Blut in speziellen Röhrchen abgenommen. Nach Beendigung der Blutentnahme wird die Kanüle entfernt und ein Pflaster auf die Haut gebracht.

Das **Gewebematerial** wird aus dem Gewebe entnommen, das Ihnen im Rahmen des medizinisch notwendigen Eingriffs entnommen werden muss. Es bedarf weder eines zusätzlichen Eingriffs, noch wird eine größere Gewebemenge entnommen als für den Eingriff üblich ist. Für die wissenschaftlichen Untersuchungen wird nur das Gewebe verwendet, das nicht zu diagnostischen Zwecken benötigt wird.

Die Entnahme des Gewebes für wissenschaftliche Untersuchungen erfolgt außerhalb des Körpers, nachdem das zu operierende Gewebe aus dem Körper entfernt worden ist. Es besteht somit keine Gefahr, dass z.B. bösartige Zellen im Körper gestreut werden. Das Gewebe wird anschließend im Labor aufgearbeitet und sofort weiterverwendet oder für spätere Untersuchungen dauerhaft tiefgekühlt gelagert.

Sowohl zur Blutentnahme als auch zur Gewebeentnahme wird kein gesonderter oder erweiterter Eingriff vorgenommen, vielmehr wird dies während oder nach der medizinisch erforderlichen Maßnahme (während der Routineblutentnahme, nach dem Eingriff) durchgeführt. Es wird kein Blut oder Gewebe für wissenschaftliche Untersuchungen entnommen, das für die Diagnose Ihrer Erkrankung gebraucht worden wäre.

Zusätzliche Hinweise

Datenschutz

Untersuchungsergebnisse und weitere krankheitsrelevante Daten sowie Behandlungsverläufe werden dokumentiert und diese Daten mit Hilfe der EDV sowie unter Berücksichtigung des §4 Abs.3 des Landesdatenschutzgesetzes gespeichert und ausgewertet. Die Patienten- und Krankheitsdaten werden entsprechend den Bestimmungen des Bundesdatenschutzgesetzes streng vertraulich behandelt. Sollte es im Rahmen dieser Projekte notwendig werden, Teile von Untersuchungen an anderen Einrichtungen durchführen zu lassen oder krankheitsrelevante Daten zu vergleichen, so erfolgt die Weitergabe in anonymisierter Form.

Entscheidungsfreiheit

Die Einwilligung zur Entnahme von zusätzlichem Blut bzw. Gewebe im Rahmen der Behandlung zu den beschriebenen wissenschaftlichen Zwecken erfolgt freiwillig. Sie können jederzeit (auch nach Ihrer Behandlung) eine gegebene Einwilligung ohne Angabe von Gründen widerrufen, ohne dass dies nachteilige Folgen für Ihre weitere medizinische Behandlung hat.

Besonderer Hinweis

Für das im Rahmen dieses Projekts entnommene Gewebe gilt:

- Es werden **keine** genetischen Manipulationen (z.B. Klonen) vorgenommen
- Es wird **nicht** zu therapeutischen Zwecken bei anderen Menschen verwendet.
- Sollten sich neue wissenschaftliche Fragestellungen ergeben, die mit den oben genannten Aussagen nicht mehr übereinstimmen, für die das abservierte Gewebe aber von großem Nutzen wäre, werden Sie vorher um eine erneute Einwilligung gebeten.

Datum

Unterschrift der Patientin

Unterschrift des Arztes

8.3. Genehmigung der Ethikkommission



WESTFÄLISCHE
WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER

Medizinische Fakultät

- Ethikkommission -

Ethikkommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe -

Universität Münster - Medizinische Fakultät - Ethikkommission -

D - 48129 Münster

Herrn OA Dr.med. K. Greb
Frau Dr.med. Pia Wülfing, AiP
Klinik u. Poliklinik f. Frauenheilkunde
Albert-Schweitzer-Str. 33

D - 48129 Münster,

19.09.01

Hausadresse:
Waldeyerstraße 27
D - 48149 Münster

Prof.Hu/Rö

Telefon: Vermittlung (02 51) 83 - 0
Telefax: (02 51) 83 - 5 53 39
Telefon: Durchwahl (02 51) 83 - 5 52 90
e-mail: ethikkom@uni-muenster.de

Reg.Nr.: IIXGreb (Beim Schriftwechsel bitte stets angeben.)

Betr.: Beurteilung eines biomedizinischen Forschungsvorhabens am Menschen durch die Ethikkommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
Hier: Ihr Antrag vom 01.08.2001: "Entnahme und Aufbewahrung von Blut und (Tumor-)Gewebe im Rahmen ergänzender wissenschaftlicher Untersuchungen."
Folgende Unterlagen haben uns vorgelegen: Der Antrag vom 01.08.2001, die Patientenaufklärung und das Einwilligungsformular.

Sehr geehrter Herr Kollege Greb,
Sehr geehrte Frau Kollegin Wülfing,

vielen Dank für die Einreichung Ihres oben genannten Antrags zur Vorlage bei der Ethikkommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. Die Kommission hat Ihren Antrag vorgeprüft und auf ihrer Sitzung am 14.09.2001 ausführlich beraten.

Danach bestehen in der Kommission weder ethische noch juristische Bedenken gegen die Durchführung des Forschungsvorhabens.

Künftige Änderungen in Organisation und Ablauf der Studie sollten der Kommission umgehend mitgeteilt und die entsprechend geänderten Passagen deutlich kenntlich gemacht werden.

Unabhängig vom Beratungsergebnis macht die Kommission darauf aufmerksam, dass die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung einer klinischen Prüfung beim Leiter der klinischen Prüfung und auch bei allen an der Prüfung teilnehmenden Ärzten liegt. Wir bitten Sie, die Kommission zeitnah über alle schwerwiegenden oder unerwarteten unerwünschten Ereignisse zu unterrichten, die während der Studie auftreten und die Sicherheit der Studienteilnehmer oder die Durchführung der Studie beeinträchtigen könnten.

Die Kommission wünscht Ihrem Forschungsvorhaben gutes Gelingen und würde es begrüßen, wenn sie über die Ergebnisse der Studie nach deren Abschluss von Ihnen unterrichtet würde.

Mit freundlichen Grüßen

Prof.Dr.med.Dr.phil. Peter Hucklenbroich

Stellvertretender Vorsitzender der Ethikkommission

Mitglieder: F. van de Loo (Vorsitzender), P. Hucklenbroich (Geschäftsführer und stellv. Vorsitzender),
D. Drinkmann, H. Kolthammer, H. Kresse, E. Lessing, J. Ritter, M. Seelingma, L. Siep, I. Wolf