

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR KLINISCHE CHEMIE UND
LABORATORIUMSMEDIZIN

PROF. DR. MED. GERD SCHMITZ

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

POLYZYSTISCHES OVAR-SYNDROM – UNTERSUCHUNG VON
KANDIDATENGENEN UND DEREN KORRELATION MIT DEM KLINISCHEN
ERSCHEINUNGSBILD

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Nadja Geneidy

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR KLINISCHE CHEMIE UND
LABORATORIUMSMEDIZIN

PROF. DR. MED. GERD SCHMITZ

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

POLYZYSTISCHES OVAR-SYNDROM – UNTERSUCHUNG VON
KANDIDATENGENEN UND DEREN KORRELATION MIT DEM KLINISCHEN
ERSCHEINUNGSBILD

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Nadja Geneidy

2008

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Gerd Schmitz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Olaf Ortman

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Januar 2009

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nadja Geneidy, geb. Abou-Mandour
geboren: am 7. April 1973 in Würzburg
Staatsangehörigkeit: deutsch

Professionelle Tätigkeiten

Seit Mai 2007:

Assistenzärztin in der Fachabteilung Gynäkologie und Geburtshilfe des Krankenhauses Wertheim

Verantwortungsbereiche:

- Diagnostik und Differenzialdiagnostik gynäkologischer Erkrankungen, einschließlich sonografischer, endoskopischer und laborchemischer Verfahren
- konservative Therapie von gynäkologischen Erkrankungen, einschließlich psychosomatischer Aspekte
- Assistenz bei und selbständige Durchführung von operativen Eingriffen zur Behandlung von Krankheiten der weiblichen Geschlechtsorgane und Brustdrüsen
- Behandlung von Schwangeren bei Pathologien und unglücklichem Schwangerschaftsausgang
- Leitung und Nachbehandlung von Geburten
- Untersuchung, Erstversorgung und Überwachung Neugeborener
- Betreuung von Wöchnerinnen

Sept. 2005 – März 2007:

Ausbildungsassistentin im Fachgebiet Gynäkologie und Geburtshilfe am Zentrum für Gynäkologische Endokrinologie, Reproduktionsmedizin und Humangenetik Regensburg

Verantwortungsbereiche:

- ambulante Versorgung gynäkologischer und geburtshilflicher Patientinnen im Rahmen der Sprechstunde einschließlich Diagnostik und Therapie sowie Schwangerschaftsvorsorge und Krebsfrüherkennungsuntersuchung

- Untersuchung und Behandlung von Patientinnen bei spezifischen endokrinologischen Fragestellungen
- Umfassende Behandlung von Paaren mit unerfülltem Kinderwunsch einschließlich
 - o gezielter Anamneseerhebung
 - o endokrinologischer, serologischer, molekulargenetischer und biochemischer Diagnostik
 - o bildgebender Verfahren wie Vaginalsonographie, sonografische Hysterosalpingografie
 - o operativer Diagnostik, z.B. Hysteroskopie
 - o Beurteilung andrologischer Faktoren
 - o Hormontherapie
 - o Insemination
 - o IVF einschließlich Zyklusmonitoring, Follikelpunktion, Embryotransfer
- Hygienebeauftragter Arzt
 - o Vollständige Überarbeitung des praxisinternen Hygieneplans
 - o Anpassung von Praxisausstattung und Arbeitsabläufen an neue gesetzliche Vorgaben und Richtlinien
- Praxisübergreifende Beschäftigung
 - o Mitwirkung am ReForM C-Projekt der Universität Regensburg zur Erforschung von metabolischen Einflüssen auf die Entwicklung chronischer Erkrankungen in sexualhormon-sensitiven Organen
 - o Erstellung einer Promotionsarbeit zu den molekulargenetischen Grundlagen beim PCO-Syndrom und deren Korrelation mit den klinischen Parametern der Störung

Sept. 2003 – Aug. 2005: Familienpause

Dez. 2001 – Sept. 2003:

Sonderfallsachbearbeiterin in der Allianz Private Krankenversicherung, Niederlassung Berlin

- Beratungsärztliche Tätigkeit
- Sachbearbeitung in medizinischen Sonderfällen

Okt. 1999 – Juni 2001:

Ärztin im Praktikum bzw. Ausbildungsassistentin am Zentrum für Gynäkologische Endokrinologie, Reproduktionsmedizin und Humangenetik Regensburg

Verantwortungsbereiche: wie Sept. 2005 – März 2007 (s. oben)

Ausbildung

Nov. 1992 – Juni 1999 Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg

April 1998 – März 1999 Praktisches Jahr mit Wahlfach Gynäkologie und Geburtshilfe an der Universitätsfrauenklinik Würzburg

Sept. 1983 – Juli 1992 Gymnasium, Abitur
Röntgen-Gymnasium Würzburg

Sept. 1979 – Juli 1983 Grundschule

Danksagung

Vielen herzlichen Dank Frau PD Dr. M. Bals-Pratsch und Herrn Prof. Dr. B. Seifert für die äußerst lehrreiche Zusammenarbeit und die Ermöglichung der Erstellung der vorliegenden Arbeit.

Ich danke den Arzhelferinnen des Zentrums für Gynäkologische Endokrinologie, Reproduktionsmedizin und Humangenetik Regensburg für die freundliche Hilfe bei unzähligen Schritten der Datenverarbeitung sowie der Patientinnenrekrutierung, -befragung und -untersuchung.

Vielen Dank Herrn Prof. Dr. C. Aslanidis und Herrn PD Dr. R. Gruber für die Unterstützung bei den für die vorliegende Arbeit erforderlichen Untersuchungen und für zahlreiche konstruktive Hinweise sowie für die Korrektur der Arbeit.

Ein Dankeschön an Frau Dr. U. Hehr für hilfreiche Tipps zur Literatursuche und die Überprüfung der in der Arbeit geschilderten humangenetischen Zusammenhänge.

Ich bedanke mich vielmals bei Frau Justine Rochon und Frau Nicole Wolmerstedt für Ihre Unterstützung bei den Fragen zu statistischen Berechnungen.

Herzlichen Dank an Frau Dr. D. Seifert für freundlichen Rückhalt in schwieriger Zeit.

Ganz lieben Dank meinen Eltern, ohne deren bedingungslose Unterstützung nicht nur die Erstellung dieser Arbeit so unendlich viel schwieriger gewesen wäre.

Danke, meine kleine Hebba, für so viel Brav- und Vernünftigsein!

Polyzystisches Ovar-Syndrom – Untersuchung von Kandidatengenen und deren Korrelation mit dem klinischen Erscheinungsbild

Inhalt

1. Einleitung

- 1.1 Definition
- 1.2 Komplikationen und Langzeitfolgen
- 1.3 Ätiologie und Pathomechanismus
- 1.4 Bisher untersuchte Kandidatengene
 - 1.4.1 Kandidatengene aus dem Synthese- und Wirkungsweg von Androgenen
 - 1.4.1.1 CYP17
 - 1.4.1.2 CYP11A
 - 1.4.1.3 CYP21
 - 1.4.1.4 Androgenrezeptor
 - 1.4.1.5 Sexualhormon-bindendes Globulin (SHBG)
 - 1.4.1.6 CYP19
 - 1.4.1.7 Retinol-Dehydrogenase-Gen (HSD17B6)
 - 1.4.2 Kandidatengene im Zusammenhang mit der Insulinwirkung
 - 1.4.2.1 Insulin-Gen
 - 1.4.2.2 Insulinrezeptor-Gen
 - 1.4.2.3 Resistin-Gen
 - 1.4.2.4 Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor Gamma-Gen
 - 1.4.2.5 Insulinrezeptorsubstrat-1 und -2
 - 1.4.2.6 Insulin-like growth factors
 - 1.4.2.7 Calpain-10-Gen
 - 1.4.2.8 Calpain-5-Gen
 - 1.4.3 Kandidatengene aus dem Bereich der Gonadotropinwirkung
 - 1.4.3.1 LH und LH-Rezeptor
 - 1.4.3.2 Follistatin-Gen
 - 1.4.4 Kandidatengene aus dem Bereich chronischer Entzündungsvorgänge
 - 1.4.4.1 Interleukin-1-Gene
 - 1.4.4.2 Tumornekrosefaktor-Rezeptor-2-Gen, Interleukin-6-Gen, Interleukin-6-Rezeptorglykoprotein-Gen
 - 1.4.4.3 Tumornekrosefaktor α -Gen
 - 1.4.4.4 Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-Gen

2. Patienten und Methoden

- 2.1 Untersuchte Kandidatengene
- 2.2 Rekrutierung des Patientinnenkollektivs
- 2.3 Kontrollpersonen
- 2.4 Molekulargenetische Untersuchungen
- 2.5 Diagnosestellung bei den untersuchten Patientinnen
- 2.6 Statistische Analysen

3. Ergebnisse

- 3.1 Genotyp- und Allelverteilungen
 - 3.1.1 MTHFD-1-Gen
 - 3.1.2 IGF-2-Gen
 - 3.1.3 PAI-1-Gen
- 3.2 Einfluss des Genotyps auf das klinische Erscheinungsbild

- 3.2.1 Körpergewicht
 - 3.2.1.1 MTHFD-1-Gen
 - 3.2.1.2 IGF-2-Gen
 - 3.2.1.3 PAI-1-Gen
- 3.2.2 Gruppierung der Patientinnen nach dem BMI
 - 3.2.2.1 MTHFD-1-Gen
 - 3.2.2.2 IGF-2-Gen
 - 3.2.2.3 PAI-1-Gen
- 3.2.3 Insulinsensitivität
 - 3.2.3.1 MTHFD-1-Gen
 - 3.2.3.2 IGF-2-Gen
 - 3.2.3.3 PAI-1-Gen
- 3.2.4 Gestationsdiabetes
 - 3.2.4.1 MTHFD-1-Gen
 - 3.2.4.2 IGF-2-Gen
 - 3.2.4.3 PAI-1-Gen
- 3.2.5 Fettstoffwechsel
 - 3.2.5.1 MTHFD-1-Gen
 - 3.2.5.2 IGF-2-Gen
 - 3.2.5.3 PAI-1-Gen
- 3.2.6 Hyperandrogenämie
 - 3.2.6.1 IGF-2-Gen
 - 3.2.6.2 MTHFD-1-Gen
 - 3.2.6.3 PAI-1-Gen
- 3.2.7 Abortneigung
 - 3.2.7.1 MTHFD-1-Gen
 - 3.2.7.2 IGF-2-Gen
 - 3.2.7.3 PAI-1-Gen
- 3.3 Ergebnisse in tabellarischer Form

4. Diskussion

- 4.1 Problematik der Diagnosestellung bei PCOS
- 4.2 Stellenwert genetischer Analysen für die Therapie des PCOS
- 4.3 Genotyp- und Allelverteilungen bezüglich des MTHFD-1-, IGF-2- und PAI-1-Gens
- 4.4 Bedeutung von Single-Nucleotid-Polymorphismen im MTHFD-1-, IGF-2- und PAI-1-Gen für das klinische Bild des PCOS
 - 4.4.1 Körpergewicht
 - 4.4.2 Insulinsensitivität und Gestationsdiabetes
 - 4.4.3 Fettstoffwechsel
 - 4.4.4 Hyperandrogenämie
 - 4.4.5 Abortneigung

5. Zusammenfassung

6. Literatur

1. Einleitung

1.1 Definition

Bei dem polyzystischen Ovarsyndrom (PCOS) handelt es sich um die am häufigsten vorkommende endokrine Störung bei Frauen im reproduktionsfähigen Alter. Seine Prävalenz wird in der Literatur mit 5-10 % angegeben [1]. Die betroffenen Frauen zeigen ein heterogenes Bild, die klinische Symptomatik reicht von Regeltempoanomalien und Adipositas über Zeichen einer Androgenisierung bis hin zu Stoffwechselstörungen im Sinne eines metabolischen Syndroms und dessen typischen Folgen. Bezüglich biochemischer Parameter fallen die Patientinnen durch erhöhte Androgene, anovulatorische Zyklen [2, 3] und erhöhte Werte des Luteinisierenden Hormons (LH) auf [4], häufig findet sich eine Insulinresistenz [5] mit konsekutiver Hyperinsulinämie [6].

Nachdem erstmals Stein und Leventhal im Jahr 1935 ein Syndrom aus Adipositas, Hirsutismus, Amenorrhoe und dem histologischen Nachweis polyzystischer Ovarien (PCO) beschrieben [7] wurde das PCOS als heterogene Störung erkannt, dessen diagnostische Kriterien stets viel diskutiert und mehrfach modifiziert wurden [8].

Aufgrund der bis heute in weiten Teilen ungeklärten Ätiologie des Syndroms [3, 9] herrscht weiterhin in vielen Fragen Uneinigkeit hinsichtlich Pathophysiologie und der angezeigten diagnostischen und therapeutischen Intervention.

Ein erster wesentlicher Schritt bei dem Versuch, eine internationale Einigung über die bis dahin sehr unterschiedliche Charakterisierung des Syndroms zu erzielen, erfolgte 1990 auf der Konferenz an den National Institutes Of Health (NIH) in Maryland, USA. Auch wenn dort die Meinungen der Teilnehmer in vielen Punkten noch auseinander gingen, so einigte man sich doch auf die folgenden Diagnosekriterien:

- laborchemische oder klinische Zeichen einer Hyperandrogenämie
- chronische Anovulation
- Ausschluss einer anderen Störung, die sich klinisch ähnlich äußert [4]

Seit der NIH-Konferenz kamen die klinisch tätigen und forschenden Mediziner zunehmend zu der Erkenntnis, dass die Erscheinungen des PCOS über die NIH-Definitionen hinausgehen. Insbesondere europäische Forscher betrachteten die Morphologie der polyzystischen Ovarien als zentralen Aspekt des PCOS und stellten die Diagnose, wenn sich zusätzlich zum Befund PCO klinische oder biochemische Zeichen einer Androgenisierung, eine Adipositas oder eine Ovulationsstörung fanden [8].

Im Jahr 2003 fand in Rotterdam, Niederlande erneut ein internationales Treffen statt mit dem Ziel einer einheitlichen Überarbeitung der bisherigen Diagnosekriterien. Im Ergebnis wurde bei dieser von der European Society Of Human Reproduction And Embryology (ESHRE) und der American Society Of Reproductive Medicine (ASRM) abgehaltenen Konferenz folgender Konsens erzielt:

- Das PCOS bleibt eine Ausschlussdiagnose, das heißt es muss zunächst das Vorliegen einer Störung, die PCOS-assoziierte Symptome bewirkt, abgeklärt werden. Dabei handelt es sich um die kongenitale adrenale Hyperplasie, das Cushing-Syndrom, das Bestehen eines androgensezernierenden Tumors und die nicht-klassische adrenale Hyperplasie aufgrund einer 21-Hydroxylase-Defizienz. Letztere liegt vor, wenn molekulargenetisch eine Mutation oder Deletion im CYP 21-Gen nachgewiesen

werden kann. Zustände wie der hypo- oder der hypergonadotrope Hypogonadismus und die Hyperprolaktinämie lassen sich durch die Messung des Estradiol (E2)-, Follikelstimulierendes Hormon (FSH)-, LH- und Prolaktin (PRL)-Spiegels ausschließen. Das hyperandrogen-insulinresistente Acanthosis nigricans (HAIRAN)-Syndrom muss bei klinischem Verdacht ebenfalls ausgeschlossen werden [4].

- Die Diagnose PCOS soll künftig dann gestellt werden, wenn zwei der folgenden Kriterien erfüllt sind:
 - o Oligo- oder Anovulation
 - o klinische und/ oder biochemische Zeichen einer Hyperandrogenämie
 - o polyzystische Ovarien [4]

Als klinische Zeichen einer Hyperandrogenämie gelten Hirsutismus, Akne und androgenbedingte Alopezie [4].

Zur Evaluierung einer biochemischen Hyperandrogenämie empfehlen die Autoren des Konsenspapiers die Messung des freien Testosterons oder die Bestimmung des freien Androgen-Index in der Follikelphase als sensitivste Marker für die Hyperandrogenämie [4, 10, 11].

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der NIH-Konferenz von 1990 wurde beim ESHRE-/ASRM-Treffen beschlossen, die Morphologie der Ovarien bei der Diagnosestellung des PCOS mit zu berücksichtigen. Die Abgrenzung wurde wie folgt festgelegt:

Als typisches polyzystisches Ovar (PCO) gilt ein Eierstock mit 12 oder mehr Follikeln von 2-9 mm Durchmesser bzw. ein Ovar mit einem Volumen von über 10 ml. Bereits bei einem unilateralen Vorliegen eines solchen Befundes gilt das Kriterium als erfüllt. Für die Bestimmung des Ovarialvolumens wurde die vereinfachte Messung eines Ellipsoidrauminhalts festgelegt, also die Hälfte des Produkts aus Länge, Breite und Dicke des Organs. Untersucht werden sollen Frauen nur dann, wenn sie keine oralen Kontrazeptiva einsetzen, weil die Einnahme der Pille die Ovarmorphologie beeinflussen kann. [Lit. 48 in 4]. Die Teilnehmer der Konferenz einigten sich weiterhin darauf, dass im Falle des Vorliegens eines Leitfollikels mit einem Durchmesser von über 10mm oder eines Corpus luteums die Ultraschalluntersuchung im nächsten Zyklus wiederholt werden sollte [4].

Durch die neuen Diagnosekriterien wurde das Kollektiv der PCOS-Patientinnen um etwa 20% erweitert [12].

Noch einmal im März diesen Jahres (2007) trafen sich Experten auf internationaler Ebene, um erneut die Diagnosestellung des PCOS und dieses Mal auch seine Therapie zu diskutieren und sich auf grundlegende Punkte zu einigen. Das Treffen fand in Thessaloniki, Griechenland statt und war abermals von der ESHRE und der ASRM organisiert.

Die Teilnehmer einigten sich bezüglich der Diagnosestellung des PCOS erneut auf das Zutreffen von zwei von drei Symptomen. Es handelt sich dabei, in geringfügiger Abweichung der Kriterien von Rotterdam um das Bestehen von:

- o Hyperandrogenämie
- o polyzystischen Ovarien
- o Regeltempostörung [12]

Das Konsensuspapier, das im Jahr 2008 erwartet wird, wird Therapieformen und Alternativen bei resistenten Patientinnen enthalten. Maßnahmen in Bezug auf Ernährungs- und Lebensgewohnheiten, also Kalorienreduktion und körperliche Betätigung werden dabei erneut

im Vordergrund stehen, nachdem auf der Konferenz über deren maßgebliche Bedeutung berichtet wurde [12]. Man bevorzugt wieder die medikamentöse Ovulationsinduktion mit Clomiphencitrat (CC) anstelle der in letzter Zeit favorisierten Metformingabe, nachdem über die Ergebnisse der bisher größten Studie zur Untersuchung der Wirkung von Metformin im Vergleich zu CC oder einer Kombination aus beiden berichtet wurde [12, 2 in 12]. In der von der NIH unterstützten Studie, in der 626 Patientinnen mit PCOS mit CC allein, Metformin allein oder mit einer Kombination aus beidem behandelt worden waren, waren die Lebendgeburtsraten in der CC-Gruppe signifikant höher als in der Metformingruppe. Eine Kombination der Therapeutika ergab keinen signifikanten Vorteil [2 in 12].

Für Therapieversager stehen die medikamentöse Ovulationsinduktion mit niedrig dosiertem FSH, die laparoskopische Diathermiebehandlung und die weiteren Möglichkeiten der assistierten Reproduktion zur Verfügung. Es fehlen aber noch fallstarke Studien, um eine definitive Festlegung auf den Stellenwert des jeweiligen Behandlungsweges machen zu können [12].

1.2 Komplikationen und Langzeitfolgen

Die besondere Bedeutung des PCOS liegt zum einen in der häufig damit verbundenen Infertilität [12, 13, 14], zum anderen in den Langzeitfolgen für die Gesundheit der betroffenen Frauen.

Je nach Untersucher wird der Anteil anovulatorischer Frauen am Gesamtkollektiv infertiler Patientinnen mit 25% [15] bis 40% [15, 16] angegeben. In etwa 75% bis 80% dieser Fälle liegt der Anovulation ein PCOS zugrunde [17, 18, 19], manche Autoren geben sogar einen Anteil von 85 bis 90% an [12].

Die alleinige Ovulationsinduktion ist zur Therapie oft unzureichend, weil die Patientinnen häufig eine Störung der Implantationsbereitschaft des Endometriums aufweisen [14]. Dazu kommt eine bei PCOS-Patientinnen erhöhte Abortrate [13].

Auch auf die Schwangerschaften der betroffenen Frauen sowie auf ihre neugeborenen Kinder wirkt sich das PCOS aus.

Wird eine Schwangerschaft erzielt, so trägt die Patientin ein signifikant erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Gestationsdiabetes und für das Auftreten einer schwangerschaftsinduzierten Hypertonie, und zwar unabhängig vom Body mass index (BMI) der Patientin [20, 21].

Auch wenn verschiedene Studien differierende Ergebnisse zur Assoziation von PCOS und schwangerschaftsinduzierter Hypertonie gefunden haben, gibt es doch überzeugende Hinweise dafür, dass die Prävalenz bei Patientinnen mit PCOS erhöht ist [21].

Eine Präeklampsie tritt bei Schwangeren mit PCOS signifikant häufiger auf, diese Frauen entbinden außerdem signifikant öfter vor der abgeschlossenen 37. Schwangerschaftswoche [20, 21].

Systolischer, diastolischer und mittlerer arterieller Druck sowohl am Tag als auch in der Nacht sind bei Schwangeren mit PCOS im Vergleich zu gesunden Gravidae erhöht. Der nächtliche systolische Blutdruck nimmt bei den PCOS-Patientinnen zwischen dem zweiten und dem dritten Trimester um 8% zu, während er bei gesunden Schwangeren konstant bleibt. Während der gesamten Gravidität ist die Karotiselastizität im Vergleich zu Kontrollen bei PCOS-Betroffenen ungünstiger, bei Letzteren steigt der Steifeindex der Karotisarterien mit zunehmendem Gestationsalter, während bei Gesunden die Karotiscompliance zunimmt [21].

Somit kann man davon ausgehen, dass bei dem PCOS unter anderem eine Störung der physiologischen arteriellen Adaptation an die Schwangerschaft vorliegt, die zu mütterlicher Hypertension und mangelndem fetalem Wachstum führt. Auch wenn der genaue Mechanismus ungeklärt ist, gehen Untersucher davon aus, dass diese Abläufe PCOS-bedingt sind, möglich ist auch, dass die Grundlage in der meist bei dem PCOS vorliegenden Hyperandrogenämie, Hyperinsulinämie oder Insulinresistenz besteht [21].

Schwangerschaftsinduzierte Hypertonie und Präeklampsie setzen über die mögliche Entstehung einer Plazentainsuffizienz den Feten der Gefahr einer chronischen Hypoxie aus. Zusammen mit der häufig erhöhten Glucosebelastung kann so ein gefährlicher, oft lebensbedrohender Zustand für den Feten entstehen [20].

Die Wahrscheinlichkeit dass das Neugeborene auf eine pädiatrische Intensivstation verlegt wird, ist signifikant erhöht, die Perinatalmortalität ist signifikant gesteigert. Möglicherweise hängt die Zunahme dieser Gefahren bei einem PCOS der Mutter mit deren häufig erhöhtem BMI zusammen, der auch noch das Risiko für eine Plazentalösung oder eine Zervixinsuffizienz verstärkt [20].

Frauen mit PCOS, besonders wenn sie übergewichtig sind, wenn bei Ihnen eine Anovulation vorliegt oder sie eine belastete Familienanamnese bezüglich des Diabetes mellitus Typ II aufweisen, tragen selbst ein erhöhtes Risiko, einen nicht-insulinpflichtigen Diabetes mellitus zu entwickeln [4, 22, 23].

Bei bis zu 50-70% der Frauen besteht eine gestörte Glucosetoleranz verbunden mit einer Insulinresistenz insbesondere der Skelettmuskulatur und des Fettgewebes [3, 5, 6]. Das kompensatorisch erhöhte Seruminsulin wirkt stimulierend auf die Thekazellen des Ovars und regt diese in Synergie mit der Wirkung eines hohen LH zu verstärkter Androgenproduktion an [3, 24, 25, 26].

Weiterhin wird die Synthese von Sexualhormon-bindendem Globulin (SHBG) in der Leber gehemmt, wodurch der Spiegel an freien Androgenen weiter erhöht wird [3, 27].

Die Insulinresistenz ist als Vorstufe des Diabetes mellitus Typ II anzusehen und bedeutet für die Patientinnen ein entsprechendes Risiko [3, 28, 29].

Nicht abschließend geklärt ist, in welchem höherem Maße PCOS-Patientinnen von der Gefahr einer kardiovaskulären Erkrankung bedroht sind. Hierzu bleibt auch noch zu klären, welche Frauen des heterogenen Kollektivs besonders gefährdet sind [4].

Trotzdem ist den Patientinnen allgemein zu einer optimierten Ernährungs- und Lebensweise, sprich zu ausreichender körperlicher Betätigung zu raten. [4, 20, 30]. Dies zielt sowohl auf eine Verringerung der Gefahr eines Diabetes mellitus Typ II als auch auf die Vermeidung der Entstehung einer kardiovaskulären Erkrankung ab [4].

Frauen mit einem PCOS weisen häufig eine Dyslipidämie auf [31] und tragen oft Zeichen einer gestörten Gefäßfunktion [32]. Die Inzidenz für cerebrovaskuläre Ereignisse ist bei ihnen leicht erhöht [Lit. 89 in 4].

Die Wahrscheinlichkeit an einem Endometrium-Karzinom zu erkranken, ist bei Frauen unter 50 Jahren mit polyzystischen Ovarien erhöht [33].

1.3 Ätiologie und Pathomechanismus

Die Schwierigkeit, innerhalb des heterogenen Kollektivs von Frauen mit PCOS eine sichere Diagnosestellung mit ausreichender Sensitivität und hinreichender Spezifität zu erreichen, sowie die Betroffenen erfolgreich zu behandeln und langfristig vor negativen Folgen für ihre Gesundheit zu schützen, liegt sicherlich mit in der bisher ungeklärten Ätiologie begründet. Heute gehören die gesteigerte ovarielle Androgenproduktion, die Hyperinsulinämie und eine Fehlfunktion der neuroendokrinen Zusammenwirkung von Ovar und Hypothalamus zu den wichtigsten vermuteten ätiologischen Primärfaktoren [3, 9].

Schon mehrfach wurde bei dem PCOS eine familiäre Häufung gefunden [34, 35, 36]. Deshalb wird allgemein bei der Entstehung des PCOS das Zusammenwirken einer genetischen Grundlage mit dem Auftreten äußerer Auslösefaktoren vermutet [3, 36]. Es ist bisher jedoch nicht gelungen, eine sichere Aussage über die genetischen Veränderungen zu treffen, die vorliegen müssen, um ein PCOS zu generieren. Ebenso ist unklar, nach welchem Modus das Syndrom vererbt wird [37]. Viele Kandidatengene sind untersucht worden, jedoch sind nur wenige Versuche, die Ergebnisse zu reproduzieren, gelungen [36, 37].

1.4 Bisher untersuchte Kandidatengene

Bei der Suche nach möglicherweise den klinischen Symptomen des PCOS zugrunde liegenden genetischen Veränderungen kann man sich an den Stoffwechselwegen und den für die Fertilität ausschlaggebenden Vorgängen, die bei dem PCOS gestört sind, orientieren. Hier stehen vor allem Auffälligkeiten in der Steroidogenese, in der Follikelreifung und im Glucosestoffwechsel im Vordergrund [38].

Eine Reihe von Genen weist bei Patientinnen mit PCOS eine veränderte Expression auf. Dies ist ein Hinweis darauf, dass hier durch eine genetische Veränderung Signaltransduktionswege betroffen sind, die die Expression von mehreren Genen, nicht eines einzelnen Gens steuern [38].

1.4.1 Kandidatengene aus dem Synthese- und Wirkungsweg von Androgenen

Da der Hyperandrogenismus ein Kardinalsymptom des PCOS darstellt, hat man zunächst vor allem nach genetischen Veränderungen im Umfeld der Androgensynthese gesucht [38, 39].

1.4.1.1 CYP17

In Ovar und Nebennierenrinde wirkt die P450c-17 α -Hydroxylase-17-20-Lyase als Katalysator in der Androgenbiosynthese. Bei Patientinnen mit PCOS weist dieses Enzym eine gesteigerte Aktivität auf [40].

Das kodierende Gen ist CYP17. Eine Forschergruppe fand bei molekulargenetischen Untersuchungen eine Assoziation zwischen dem T/C-Polymorphismus des CYP17-Promotors im Abstand von -34 bp vom Transkriptionsbereich und dem PCOS [41].

In anderen Studien konnte dagegen keine Verbindung zwischen dem Polymorphismus und dem PCOS nachgewiesen werden [42, 43]. Daher geht man heute davon aus, dass es sich hier nicht um einen funktionell bedeutsamen Polymorphismus handelt [39].

1.4.1.2 CYP11A

Im Rahmen der gesteigerten Androgenbioproduktion werden in Thekazellen der Ovarien von Frauen mit PCOS alle Enzyme der Androgenbiosynthese verstärkt exprimiert. Die erste Reaktion im Syntheseweg von Androgenen wird durch das Enzym Cholesterol Side Chain Cleavage katalysiert [39]. Das kodierende Gen ist CYP11A. Hier gilt vor allem ein Polymorphismus bezüglich der variierenden Anzahl von Tandemwiederholungen („variable number of tandem repeats“ – VNTR) des (TTTTA)_n-Pentanukleotids im CYP11A-Genpromotor als Kandidatengen für das PCOS [44].

Bei dem Vergleich eines Kollektivs von chinesischen PCOS-Patientinnen mit gesunden Kontrollen wurde eine signifikante Assoziation der 6/6-Allelvariante mit dem PCOS gefunden. Unter den Frauen mit PCOS wiesen darüber hinaus diejenigen mit der 6-Repeat-Allelvariante statistisch einen höheren BMI auf [45].

Allerdings haben verschiedene andere Studien keine Assoziation des VNTR-Polymorphismus mit dem PCOS nachweisen können [43, 46].

1.4.1.3 CYP21

In bestimmten Fällen liegt einer bestehenden Hyperandrogenämie ein genetisch bedingter Defekt eines Enzyms, nämlich der 21-Hydroxylase zugrunde. Das als CYP 21 bezeichnete Gen, das die 21-Hydroxylase kodiert, liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 [47]. Liegt hier bei beiden Allelen eine Mutation oder eine Deletion vor, so kommt es zum partiellen oder vollständigen Ausfall der Enzymaktivität der 21-Hydroxylase und es entsteht die häufigste Form des adrenogenitalen Syndroms (AGS) mit Glukokortikoidmangel und erhöhter Konzentrationen von 17 α -Hydroxy-Progesteron (17-OHP). Bei externer Gabe von Adrenokortikotropem Hormon (ACTH) reagieren die Patienten mit überschießendem Anstieg des 17-OHP. Am häufigsten ist die „late onset“-Form des AGS, die im Erwachsenenalter manifest wird [48].

Das Vorliegen entsprechender krankheitsverursachender Mutationen oder Deletionen im CYP 21 gilt als Ausschlusskriterium bezüglich der Diagnosestellung eines PCOS [4], auch wenn es einen signifikanten Anteil von Patientinnen gibt, die phänotypisch einem PCOS entsprechen und eine Mutation im CYP 21 tragen, im ACTH-Test aber keine überschießende 17-OHP-Antwort zeigen [49].

1.4.1.4 Androgenrezeptor

Die Wirkung von Androgenen entsteht immer durch deren Bindung an den Androgenrezeptor (AR). Sein Gen befindet sich auf dem X-Chromosom [39]. Im Fall einer Veränderung dieses Gens ist eine gestörte Androgenwirkung zu erwarten. Dies träfe selbst dann zu, wenn bei der Patientin normale Androgenspiegel vorlägen. Somit könnte sich auch das Erscheinungsbild von PCOS-Patientinnen mit normalen Androgenkonzentrationen erklären [39]. Bezüglich des AR liegt ein Polymorphismus in Exon 1 vor, der in der Variabilität der Anzahl von CAG-Repeats besteht [39, 50]. Dabei beeinflusst die Länge der Allele den Einfluss von Testosteron auf die Insulinresistenz. In einer Studie lag bei kurzer Allelsequenz bei einem erhöhten Testosteronspiegel eine deutlichere Insulinresistenz vor. Dieser Effekt wird mit zunehmenden

Wiederholungen stärker, bis er sich bei einer Anzahl von über 23 Repeats umkehrt [50].

Mit dem Polymorphismus des AR-Gens und der damit verbundenen verstärkten Androgenwirkung ließe sich erklären, warum die Frauen mit PCOS Symptome der Hyperandrogenämie gemeinsam haben, auch wenn bei einem Teil der Betroffenen eine biochemische Hyperandrogenämie nicht nachgewiesen werden kann.

Allerdings konnten manche Untersucher keine Assoziation des CAG-Repeat-Polymorphismus mit dem PCOS nachweisen [51].

1.4.1.5 Sexualhormon-bindendes Globulin (SHBG)

Testosteron, das an SHBG gebunden ist, entfaltet keine androgene Wirkung. Bei einer Verringerung des SHBG im Blut kommt es umgekehrt durch einen Anstieg des freien Testosterons zu einer verstärkten Androgenisierung.

Ein funktioneller Polymorphismus in dem Gen, das das SHBG kodiert, stellt eine mögliche Ursache für den bei Frauen mit PCOS häufig verminderten SHBG-Spiegel dar. Im Promotor des SHBG-Gens existiert ein VNTR-Polymorphismus einer (TAAAA)_n-Wiederholung. In einer Untersuchung wurde gefunden, dass Patientinnen mit PCOS häufiger längere VNTR aufweisen mit mehr als acht Wiederholungen des Pentanukleotids, während bei den gesunden Kontrollen häufiger kürzere VNTR mit unter acht Wiederholungen vorliegen. Unter den Patientinnen mit PCOS fand sich eine umgekehrte Abhängigkeit von Länge der VNTR und SHBG-Spiegel [52].

In einer anderen kontrollierten Studie fand man, dass die Anzahl der (TAAAA)_n-Wiederholungen zwar stark die Höhe des SHBG-Spiegels beeinflusst, ein signifikanter Zusammenhang des Polymorphismus mit dem PCOS wurde hier jedoch nicht gefunden [53].

Zu der Bedeutung der Mutation D327N in Exon 8 des SHBG-Gens liegen widersprüchliche Aussagen vor. Während zunächst eine Verbindung des Polymorphismus mit verminderten SHBG-Spiegeln vermutet wurde, wurde kürzlich in einer kontrollierten Studie nachgewiesen, dass der Polymorphismus keinen Einfluss auf die Bereitschaft für die Entwicklung eines PCOS oder auf Veränderungen der Konzentration von SHBG, auf Androgenspiegel, Lipid- oder Glucosestoffwechselfparameter hat [54].

1.4.1.6 CYP19

Eine Veränderung der P450-Aromatase, die Androstendion in Estron und Testosteron in Estradiol umwandelt, wurde als möglicher genetischer Faktor für die Ausbildung der Hyperandrogenämie bei dem PCOS vermutet, da man von einer verringerten Aromataseaktivität in Granulosazellen bei dem PCOS ausgeht [39]. In größeren Studien konnte die Assoziation zwischen CYP19-Mutationen und dem PCOS jedoch nicht nachgewiesen werden [43, 44].

1.4.1.7 Retinol-Dehydrogenase-Gen (HSD17B6)

Einen Beitrag zur Ätiologie des PCOS könnten Polymorphismen von Genen von Androgenmetabolismusregulatoren leisten. Nachdem in Ovargewebekulturen eine erhöhte Aktivität von HSD17B6-Enzymen und eine erhöhte Expression von HSD17B6-mRNA

nachgewiesen wurden, erfolgte eine Untersuchung, ob das Vorliegen eines HSD17B6-Polymorphismus mit dem Auftreten des PCOS assoziiert ist und ob Polymorphismen des HSD17B6-Gens Veränderungen im Androgenstoffwechsel von Frauen mit PCOS bewirken. Man fand eine signifikante Assoziation zwischen dem Vorliegen von GG-Allelen des rs898611-Polymorphismus und dem PCOS. Die anderen untersuchten Polymorphismen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Allelverteilung zwischen PCOS-Patientinnen und Kontrollen.

Allerdings konnte eine signifikante Assoziation sowohl des oben genannten Polymorphismus als auch des Polymorphismus rs7967600 mit niedrigerer Nüchternblutglucose-Insulin-Ratio nachgewiesen werden.

Beide Polymorphismen sowie die Varianten rs1870673 und rs12227117 waren signifikant mit einem erhöhten BMI assoziiert.

Die Untersucher ziehen daraus den Schluss, dass dem PCOS möglicherweise als primäre Störung doch die gesteigerte ovarielle Androgenproduktion zugrunde liegt, die die Grundlage von Gewichtszunahme und Insulinresistenz darstellt [55].

Diese Einschätzung wird in gewissem Maß auch von einer anderen Untersuchergruppe geteilt. Sie fand, dass bei Frauen mit PCOS der Adiponektinspiegel gesenkt ist und zwar unabhängig vom Grad der Adipositas und vom Vorliegen von untersuchten Polymorphismen im Adiponektin-Gen. Adiponektin ist ein vom Fettgewebe ausgeschüttetes Adipokin mit insulinsensitivierender Wirkung. Bei Patientinnen mit PCOS wurde eine Senkung des Adiponektinspiegels festgestellt in Abhängigkeit von biochemischer Hyperandrogenämie und der vorwiegend abdominalen Körperfettverteilung.

Die Forscher sprechen hier von einem Teufelskreis aus Insulinresistenz mit folgender Hyperinsulinämie und Hyperandrogenämie, wobei die Insulinresistenz durch eine Hyperandrogenämie und deren Auswirkung auf die abdominal betonte Adipositas und eine folgende Hypoadiponektinämie verstärkt wird. Die Autoren sehen allerdings eine Einschränkung ihrer Wertung darin, dass dieser Mechanismus möglicherweise auf eine Gruppierung unter den PCOS-Patientinnen begrenzt ist, bei der eine eher androide Fettverteilung und höhere Androgenspiegel vorliegen [56].

1.4.2 Kandidatengene im Zusammenhang mit der Insulinwirkung

Viele Studien haben inzwischen die Bedeutung der Insulinwirkung für die Ausbildung des Phänotyps des PCOS betont [6, 38]. Die Insulinresistenz sowie die daraus folgende Hyperinsulinämie werden als entscheidende pathogenetische Faktoren des PCOS angesehen, weil durch sie bestimmte Organe verstärkt auf Insulin reagieren und dabei eine pathologische Wirkung entsteht [39], die zur Entstehung des PCOS beitragen kann. In den Thekazellen des Ovars bewirkt die Hyperinsulinämie über die Aktivierung des Insulinrezeptors eine gesteigerte Androgensekretion [39]. Gleichzeitig wird die Sekretion von Sexualhormon bindendem Globulin (SHBG) in der Leber gesenkt [27].

Patientinnen mit einem PCOS haben in 15,7 bis 31 % eine gestörte Glucosetoleranz [57, 58, 59].

Einige Untersucher fanden eine Abhängigkeit der Prävalenz der gestörten Glucosetoleranz vom BMI der Frauen [22, 58, 59], andere fanden keine signifikante Assoziation von Glucosetoleranz und BMI [57].

Wenngleich die verschiedenen Studien leicht differierende Definitionen des PCOS anwandten, wird angenommen, dass ethnische Unterschiede und vor allem Lebens- und

Ernährungsgewohnheiten eine Rolle bei der Unterschiedlichkeit dieser Ergebnisse spielen.

Aufgrund der Insulinresistenz tragen Patientinnen mit PCOS ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung eines metabolischen Syndroms [39] und eines Diabetes mellitus Typ II [58].

Somit ergibt sich der Hinweis darauf, dass Gene, die im Zusammenhang mit der Insulinausschüttung und -wirkung stehen, möglicherweise für die Pathogenese des PCOS von Bedeutung sind.

1.4.2.1 Insulin-Gen

Der Promotor des Insulin-Gens bestimmt dessen Expression. Hier existiert ein VNTR-Polymorphismus, der über die Zahl der Repeats die Expression des Insulin-Gens beeinflusst. Die meisten Frauen tragen Klasse I-Allele mit durchschnittlich 40 Wiederholungen oder Klasse III-Allele mit einem Mittel von 157 Repeats. Während in einer Studie eine signifikante Assoziation zwischen dem Vorliegen von Klasse III-Allelen des Insulin-Gens und dem PCOS nachgewiesen wurde [60], fanden andere Untersucher keine solche Verbindung zwischen Insulingenvarianten und dem PCOS [43, 61]. Unterschiedliche Einschlusskriterien für die Studien sowie ungleiche ethnische Hintergründe der untersuchten Patientinnen könnten mit zu den voneinander abweichenden Ergebnissen beigetragen haben [38].

1.4.2.2 Insulinrezeptor-Gen

Eine genetische Veränderung mit Auswirkung auf die Funktion des Rezeptors ist eine mögliche Ursache für die bei dem PCOS veränderte Insulinwirkung.

In zwei aufeinander folgenden Studien konnten dieselben Untersucher eine Assoziation des Dinukleotid-Repeat-Markers D19S884 mit dem PCOS nachweisen und bestätigen. Der Marker ist eng gekoppelt mit dem Insulinrezeptor-Gen auf Chromosom 19. Untersucht wurden 367 Familien mit mindestens einer PCOS-Patientin [37, 43]. Die Ergebnisse wurden auch durch andere Forscher bestätigt, die in einer kontrollierten Studie zehn Short-tandem-Repeats untersuchten, und nur für D19S884 eine Assoziation zum PCOS nachweisen konnten [62].

Ein Transmission-Disequilibrium-Test (TDT), mit dem geprüft werden kann, ob bestimmte Gene sowohl in Kombination zueinander vorkommen als auch mit einem Phänotyp assoziiert sind, wurde in zwei Studien durchgeführt. Dabei wurde die Verbindung von Genveränderungen auf dem Chromosom 19p13.2 und deren Assoziation mit dem PCOS bei 217 bzw. 98 Familien getestet und bestätigt [37, 63]. Es gelang eine Einengung des Genlokus auf Chromosom 19p13.2, und zwar auf oder in der Nähe des Dinukleotid-Repeat-Markers D19S884. Durch eine Untersuchung von DNA-Proben von Kontrollen wurde auch die Spezifität des Markers D19S884 für das PCOS bestätigt [37].

Eine endgültige Klärung der Bedeutung der gefundenen Zusammenhänge steht allerdings noch aus. So besteht für die Untersucher der oben genannten Studie noch die Frage, ob es sich bei dem Marker D19S884 selbst um die ausschlaggebende Sequenzveränderung für die Grundlage des PCOS handelt, etwa indem er selbst die Transkription eines anderen nahe gelegenen Gens – möglicherweise des Insulinrezeptor-Gens – reguliert oder ob seine Assoziation mit dem PCOS durch seine Nähe zu bei dem PCOS veränderten anderen Genen bedingt ist. Innerhalb einem Abstand von 100 kb vom Marker D19S884 liegen die Gene für drei Proteine. Es handelt sich dabei um ein mRNA-Bindungsprotein, ein thymusexprimiertes Chemokin und ein extrazelluläres Matrixprotein. Sollte eines der kodierenden Gene eine

kausale Rolle in der Ätiologie des PCOS spielen, könnte die Assoziation von D19S884 mit dem PCOS nach Ansicht der Untersucher durch dessen Nähe zu dem betreffenden Gen bedingt sein [37]. Zuletzt besteht noch die Möglichkeit, dass D19S884 mit einem nahe gelegenen Regulationsfaktor assoziiert ist und auf weiter entfernt liegende Gene wie z.B. das Insulinrezeptor-Gen wirkt [37]

1.4.2.3 Resistin-Gen

Ein weiteres Kandidatengen des PCOS wurde in der oben zitierten Studie ebenfalls untersucht [37]. Es kodiert für Resistin, ein Proteinhormon, das von Adipozyten sezerniert wird und eine Rolle in der Insulinwirkung und -resistenz spielt. Es liegt ebenfalls auf dem Chromosom 19p13.2 und zwar im Abstand von 420 kb von D19S884 entfernt. Die Autoren prüften einen Zusammenhang von Resistin-Gen-Veränderungen mit dem PCOS, fanden aber keine signifikante Assoziation [37]. Zu diesem Ergebnis kamen auch andere Untersucher, deren Studie ergab, dass das Serumresistin bei Übergewichtigen erhöht ist unabhängig davon, ob bei ihnen ein PCOS vorliegt oder nicht [56].

1.4.2.4 Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor Gamma-Gen

Eine Aktivierung des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors Gamma (PPARG) bewirkt in Adipozyten eine Differenzierung und erhöht damit die Insulinsensitivität [38]. Das kodierende Gen weist einen Single-Nukleotid-Polymorphismus auf. Die Pro12Ala-Variante war in einer Studie signifikant seltener bei PCOS-Patientinnen vorhanden als bei gesunden Kontrollen. Patientinnen mit PCOS, bei denen ein Ala-Allel vorlag, wiesen niedrigere Spiegel von freiem Testosteron, Androstendion und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) auf, sie hatten geringere Insulinwerte und Homeostasis model assessment Indizes der Insulinresistenz (HOMA-IR), weiterhin eine niedrigere LH-FSH-Ratio, Hirsutismus und Akne waren weniger ausgeprägt. Die Patientinnen hatten einen geringeren BMI und eine niedrigere Waist-to-hip-Ratio. Somit wurde ein Einfluss des SNP auf die Insulinresistenz bei Patientinnen mit PCOS angenommen [64].

Andere Untersucher fanden keinen signifikanten Zusammenhang des Pro12Ala-Polymorphismus mit dem Auftreten des PCOS oder den damit zusammenhängenden Androgen- und Stoffwechselverschiebungen [65, 66]. Eine Forschergruppe wies dagegen einen Einfluss eines anderen Polymorphismus im PPARG-Gen, nämlich des His447His-Polymorphismus auf den Testosteronspiegel und den HOMA-IR-Index bei Gesunden nach und vermutete hier einen Zusammenhang mit Androgenproduktion und Insulinresistenz [65].

1.4.2.5 Insulinrezeptorsubstrat-1 und -2

Neben dem Rezeptor selbst können auch Veränderungen in der nachgeschalteten Signalwirkung des Insulins zum Pathomechanismus beitragen.

Physiologisch bewirkt die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor eine Phosphorylierung der Insulinrezeptorsubstrate (IRS) -1 und -2. Eine genetische Veränderung in einem der Substrate könnte eine Störung der Signaltransduktion hervorrufen und somit zur Entstehung der Pathologie des PCOS beitragen.

Ein Polymorphismus des IRS-1, die Arg972-Variante und ein Polymorphismus des IRS-2, die Asp1057-Variante wurden bereits mehrfach auf ihre Verbindung zu

Insulinresistenzmerkmalen hin untersucht, brachten aber widersprüchliche Ergebnisse [67, 68].

Eine Studie bei Patientinnen aus Taiwan zeigte, dass keine signifikante Assoziation zwischen dem Gly972Arg- bzw. Ala513Pro-Polymorphismus des IRS-1-Gens und dem PCOS besteht [5].

1.4.2.6 Insulin-like growth factors

Eine statistisch signifikante Assoziation der homozygoten Mutation des Insulin-like growth factors (IGF)-2 mit zwei G-Allelen der Apa1-Variante und dem PCOS wurde in einer Untersuchung von 72 kaukasischen Patientinnen und 42 Kontrollen gefunden [66]. Das Vorliegen der G-Allele bedingt möglicherweise eine erhöhte IGF-2-Expression und Sekretion in der Leber. IGF-2 fördert die Androgenproduktion in Ovarien und Nebenniere und trägt so möglicherweise zum Pathomechanismus des PCOS bei [66].

Die Ergebnisse der Untersuchung stehen im Widerspruch zu vorher gemachten Aussagen anderer Wissenschaftler, die keine Verbindung zwischen dem PCOS und IGF-Gen-Veränderungen nachweisen konnten [43]. Zur Klärung der Bedeutung der Apa1-Variante des IGF-2 für das PCOS sind deshalb laut Forschern weitere Studien erforderlich [38].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde unter anderem die Assoziation zwischen dem IGF-2-Polymorphismus und dem PCOS bei 242 Patientinnen und 161 Kontrollen untersucht.

1.4.2.7 Calpain-10-Gen

Unterschiedliche Ergebnisse brachten Untersuchungen zu der Assoziation von Varianten im Calpain-10-Gen (CAPN10) und dem PCOS.

Bei Calpain-10 handelt es sich um eine Protease, die sowohl die Sekretion von Insulin als auch dessen Wirkung beeinflusst.

In einer Studie wurde bei Trägerinnen des 112/121-Haplotyps ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines PCOS festgestellt [69].

Eine Assoziation mit dem PCOS wurde weiterhin für den AA-Genotyp der CAPN10-Variante UCSNP-56 im Vergleich zu dem GG-Genotyp gefunden. Ebenso ergab sich für den 22-Genotyp der ins/del-19-Variante eine signifikante Assoziation mit dem PCOS [70].

Gonzalez et al verglichen die Allelverteilungen bezüglich des UCSNP-44-Genlokus bei Patientinnen mit PCOS und gesunden Kontrollen. Sie fanden bei Frauen mit PCOS signifikant häufiger die C-Variante im Vergleich zu der T-Wildtypvariante als bei Gesunden. Weiterhin wiesen sie signifikant häufiger UCSNP-19-Deletionen bei PCOS-Patientinnen nach als bei Gesunden.

Sie statuierten eine mögliche Rolle des Calpain-10-Gens bei der Bereitschaft für die Entwicklung eines PCOS [71].

1.4.2.8 Calpain-5-Gen

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des Calpain-5-Gens mit dem Calpain-10-Gen und seiner Rolle in der Geschlechtsdifferenzierung im Tiermodell vermuteten Gonzalez und Kollegen, dass das Calpain-5-Gen mit dem PCOS assoziiert sein könnte. In einer Untersuchung, die die Allelverteilungen in Bezug auf vier Polymorphismen des Calpain-5-Gens bei 148 Patientinnen mit PCOS und 606 gesunden Frauen verglich, fanden die Forscher signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die Haplotypen GGCA und GGTG

waren bei den Betroffenen mit PCOS signifikant häufiger als bei den Kontrollen. Eine Assoziation mehrerer klinischer Charakteristika des PCOS mit bestimmten Calpain-5-Haplotypen wurde ebenfalls nachgewiesen. So war das Vorliegen einer Amenorrhoe signifikant mit dem GGCA-Allel, eine Akne mit der GGCG- und der AGCG-Variante und eine Adipositas mit dem GGCG-, dem AACG- und dem AACA-Haplotyp assoziiert. Somit statuierten die Untersucher eine Verbindung des Calpain-5-Gens zu dem PCOS und einigen der damit verbundenen klinischen Charakteristika [72].

1.4.3 Kandidatengene aus dem Bereich der Gonadotropinwirkung

1.4.3.1 LH und LH-Rezeptor

Der Androgenhypersekretion bei dem PCOS liegt unter anderem eine LH-Stimulation der Ovarien zugrunde mit einer erhöhten LH-Pulsatilität und einer Verschiebung der LH-FSH-Ratio zugunsten des LH [9]. Inwieweit ein Polymorphismus des LH b-Gens bei der Entstehung des PCOS-Phänotyps eine Rolle spielt, wurde in einer multizentrischen Studie untersucht. Hierbei konnte kein kausaler Zusammenhang nachgewiesen werden [73].

1.4.3.2 Follistatin-Gen

Follistatin bindet und deaktiviert damit Aktivin. Es stellt einen Antagonisten zur Aromatase dar [74]. Somit hat eine Veränderung des Follistatin potentiell einen Einfluss auf die Follikelreifung und die ovarielle Androgenproduktion [38]. Während sich in anfänglichen Untersuchungen Hinweise darauf fanden, dass die Erscheinung des PCOS am deutlichsten mit einer Veränderung des Follistatin-Gens verbunden sei [43], fanden Forscher in neueren Studien keine erhöhte Bereitschaft für die Entwicklung eines PCOS bei Vorliegen von sieben verschiedenen Polymorphismen des Follistatin-Gens. Lediglich eine signifikante Verbindung mit SHBG-Spiegeln und freiem Androgen-Index wurde für einen SNP (rs3797297) gefunden [74].

1.4.4 Kandidatengene aus dem Bereich chronischer Entzündungsvorgänge

Frauen mit PCOS tragen ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen [75] und weisen Störungen der Endothelfunktion auf [76], womit sich die Gene von Entzündungsmarkern als mögliche Kandidatengene des PCOS darstellen.

1.4.4.1 Interleukin-1-Gene

In einer Untersuchung der Bedeutung eines Polymorphismus im IL-1 α - bzw. β -Gen für das PCOS wurde eine signifikante Assoziation zwischen dem C(-889)T-Polymorphismus des IL-1 α -Gens und dem Auftreten des PCOS nachgewiesen. Man fand weiterhin eine Korrelation zwischen diesem Polymorphismus und den FSH-Spiegeln sowie der LH-FSH-Ratio bei den Frauen mit PCOS. Für die beiden untersuchten IL-1 β -Genpolymorphismen konnte keine Assoziation zum PCOS nachgewiesen werden [77].

1.4.4.2 Tumornekrosefaktor-Rezeptor-2-Gen, Interleukin-6-Gen, Interleukin-6-Rezeptorglykoprotein-Gen

In verschiedenen Studien waren Polymorphismen der genannten Gene mit einer Hyperandrogenämie bzw. – im Fall des Interleukin-6-Rezeptorglykoprotein-Gens – mit dem Schutz vor einer Hyperandrogenämie assoziiert. Es wurde jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen einem Polymorphismus eines der Gene und dem Auftreten des PCOS gezeigt [38].

1.4.4.3 Tumornekrosefaktor α -Gen

Während der Tumornekrosefaktor (TNF)- α im Blut bei dem Vorliegen eines PCOS erhöht ist, konnte keine Assoziation eines Polymorphismus im kodierenden Gen mit dem PCOS nachgewiesen werden [78, 79].

1.4.4.4 Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-Gen

Das erhöhte Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung und eine thrombophile Diathese sind die bekannten Gefahren eines erhöhten Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1)-Spiegels [80].

Bei Frauen mit PCOS wurden erhöhte PAI-1-Konzentrationen im Blut nachgewiesen [80, 81, 82, 83, 84]. In einer Studie konnte eine Korrelation von erhöhter PAI-1-Aktivität und dem Bestehen einer Insulinresistenz nachgewiesen werden [82].

Eine andere Untersuchung fand eine Assoziation von hohen PAI-Werten bei PCOS-Patientinnen mit dem Auftreten habitueller Aborte [85].

Das PAI-1-Gen weist einen Polymorphismus auf, der die Promotorregion des Gens betrifft. Es handelt sich dabei um den 4G/5G-SNP, zu dem in einigen Untersuchungen ein signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung bei Patientinnen mit PCOS gefunden wurde. In mehreren Studien waren der 4G4G- sowie der 4G5G-Genotyp bei ihnen häufiger als bei Kontrollen [80, 86].

Andere Untersucher fanden allerdings keine signifikant unterschiedliche Genotypverteilung bezüglich des PAI-1-Gen-SNP bei Frauen mit PCOS [66].

Eine weitere Forschergruppe fand bei PCOS-Patientinnen bezüglich des PAI-1-Gen-Polymorphismus signifikant häufiger das 4G-Allel, wies eine Assoziation mit erhöhten PAI-Spiegeln nach und stellte hier einen Zusammenhang zu der Erhöhung des kardiovaskulären Risikos bei Frauen mit PCOS her [80].

Auffällig ist, dass trotz großen wissenschaftlichen Aufwands bisher kaum eindeutige Ergebnisse zur genetischen Grundlage des PCOS erzielt werden konnten. Eine mangelnde Reproduzierbarkeit und widersprüchliche Ergebnisse in verschiedenen Studien – mit verursacht durch die Heterogenität des Phänotyps und die uneinheitliche Diagnosestellung – hemmen den Fortschritt in der Klärung der Ätiologie des PCOS.

Eine sicherere Diagnosestellung und ein besseres Verständnis der Ätiologie und des Pathomechanismus des PCOS bleiben jedoch hinsichtlich der Behandlung und des langfristigen Gesundheitszustandes der betroffenen Frauen sehr erstrebenswert.

Deshalb müssen weiter Anstrengungen unternommen werden, die genetischen Grundlagen des PCOS eingehend zu untersuchen und die Ätiologie sowie die pathophysiologischen Vorgänge genau zu ergründen. Neue Therapieansätze müssen hinsichtlich Effizienz, Verträglichkeit und Sicherheit überprüft werden.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde zum einen versucht, die Reproduzierbarkeit bisheriger Ergebnisse zur Untersuchung von Kandidatengenen des PCOS zu prüfen. Bei einer mangelnden Kenntnis der genauen Ätiologie des PCOS und der fehlenden molekulargenetischen Erklärung dafür ist die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse genetischer Analysen momentan einer der wichtigsten Hinweise auf eine zutreffende Assoziation einer Genveränderung mit dem Phänotyp [37].

Daneben erfolgte eine Untersuchung von 131 PCOS-Patientinnen hinsichtlich ihrer klinischen Symptomatik und eine Sammlung von Daten zu den Patientinnen einschließlich Glucose- und Lipidstoffwechselfparametern.

Bei 242 Patientinnen wurde die Assoziation von drei bisher in der Literatur beschriebenen Polymorphismen mit dem Bestehen des PCOS sowie mit dem Vorliegen bestimmter phänotypischer Merkmale des PCOS untersucht.

161 gesunde Kontrollen wurden ebenfalls auf die Genotypverteilungen der SNP hin geprüft.

2. Patienten und Methoden

2.1 Untersuchte Kandidatengene

Die erhöhte Androgenproduktion als ein zentraler phänotypischer Faktor des PCOS wird unter anderem durch den IGF-2 verstärkt, der eine erhöhte Androgensekretion im Ovar und in der Nebenniere bewirkt [87, 88, 89]. Somit könnte eine Veränderung am kodierenden Gen für die Pathophysiologie des PCOS von Bedeutung sein.

Es erfolgte daher eine Untersuchung der PCOS-Patientinnen und der Kontrollen bezüglich der Assoziation mit dem Polymorphismus der Apa1-Variante des IGF-2-Gens.

Patientinnen mit PCOS tragen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer kardiovaskulären Erkrankung [75]. Diese Gefahr ist auch dann erhöht, wenn erhöhte PAI-1-Spiegel vorliegen [90]. Bei PCOS-Patientinnen wurden im Vergleich zu Gesunden erhöhte PAI-Spiegel nachgewiesen [80]. Mittels der vorliegenden Untersuchung sollte geklärt werden, inwieweit der 4G/5G-Polymorphismus in der Promotor-Region des PAI-1-Gens mit dem PCOS assoziiert ist.

Darüber hinaus wurde die Assoziation von PCOS und Allel- und Genotypverteilungen eines weiteren Polymorphismus geprüft, nämlich des R653Q-SNP des Methylentetrahydrofolatdehydrogenase (MTHFD)-1-Gens.

Es handelt sich dabei um einen Polymorphismus, dessen AA-Variante mit einer erhöhten Gefahr für anderweitig nicht erklärbare Aborte verbunden ist [91]. Das Gen der MTHFD-1 wurde auf Chromosom 14q24 lokalisiert [92].

2.2 Rekrutierung des Patientinnenkollektivs

Zu Beginn der Arbeit erfolgte eine maschinelle Durchsuchung der Patientendatenbank des Zentrums für Gynäkologische Endokrinologie, Reproduktionsmedizin und Humangenetik

Regensburg. Unter allen Patientinnen, die seit dem 01.07.2000 im Zentrum behandelt worden waren, wurden diejenigen herausgesucht, die zum Zeitpunkt der Behandlung die Diagnose PCOS erhalten hatten.

Um die Ergebnisse der Arbeit auf aktuellstem Wissensstand aufzubauen und eine Vergleichbarkeit mit den Resultaten anderer Untersucher zu erzielen, wurden die Befunde aller gefundener Patientinnen in deren elektronischen Karteikarten hinsichtlich der Erfüllung der Diagnosekriterien der Konsensuskonferenz von 2003 in Rotterdam [4] überprüft. Frauen, die nicht mindestens die geforderten zwei Kriterien aufwiesen, wurden von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen.

Ebenfalls nicht in die Untersuchungen aufgenommen wurden Patientinnen, die nach den Übereinkünften der Rotterdam-Konferenz ein Ausschlusskriterium aufwiesen.

Es verblieben 337 Patientinnen. Von diesen war bei 149 die Behandlung bereits abgeschlossen worden. 188 Patientinnen befanden sich aktuell in Therapie.

Von den insgesamt 337 Frauen wurden 266 aufgrund eines unerfüllten Kinderwunsches behandelt, die restlichen 69 Patientinnen wegen verschiedener allgemeiner gynäkologischer Erkrankungen.

Zum Zwecke der Datensammlung wurde nun ein Fragebogen entwickelt. Anhand der Befunde in den elektronischen Karteikarten wurde dieser Fragenkatalog für jede Patientin ausgefüllt. Im Teil A des Bogens wurde dokumentiert, dass die jeweilige Patientin die Diagnosekriterien der Rotterdamer Konsensuskonferenz [4] erfüllte und welche Kriterien dies im Einzelnen waren. Um das Vorliegen einer Oligo- oder Anovulation zu prüfen, wurde die Zyklusanamnese abgefragt, wobei notiert wurde, ob der Zyklus regelmäßig oder unregelmäßig war und ob eine Oligomenorrhoe vorlag, also ein Zyklus mit einer Länge von über 35 Tagen. Es wurde festgehalten, ob bei der Patientin monophasische Zyklen nachgewiesen worden waren und ob eine sekundäre Amenorrhoe mit einer Dauer von mindestens drei Monaten vorgelegen habe.

Es wurde weiterhin dokumentiert, ob bei der Patientin eine chemische Hyperandrogenämie bestanden hat. Dies wurde bejaht, wenn in der Follikelphase ein Gesamttestosteron von über 60 ng/dl bestimmt worden war oder wenn die Menge an freiem Testosteron 3,17 pg/ml in der Follikelphase, 2,48 pg/ml in der Lutealphase oder 2,01 pg/ml unter oraler Kontrazeption überschritten hatte. Als auffällig im Sinne einer Hyperandrogenämie wurde weiterhin ein Androstendionspiegel von über 2,81 ng/ml bei 20- bis 29-jährigen sowie von über 2,9 ng/ml bei 30- bis 50-jährigen Frauen eingestuft. Ein DHEAS-Wert von mehr als 3,40 µg/ml bedeutete ebenfalls die Diagnose chemische Hyperandrogenämie, genauso ein Dihydrotestosteronspiegel von über 95 pg/ml.

Weiterhin wurde das Vorliegen von klinischen Androgenisierungszeichen abgefragt. Hierzu wurden die Fragen nach dem Bestehen eines Hirsutismus, einer Akne oder einer Alopezie beantwortet. Da eine objektivierbare Befunderhebung bezüglich des Hirsutismus in den Karteikarten der Patientinnen nicht erfolgt war, wurde es als auffällig gewertet, wenn mindestens vier Angaben über typisch männliche Behaarungsmuster bei der Patientin dokumentiert waren, so zum Beispiel das Vorliegen einer deltoiden Pubesbegrenzung, einer Behaarung an der Oberschenkelinnenseite, eines Wangenbarts und deutlicher Oberlippenbehaarung. Bei diesen Befunden kann man von einem FG-Score nach Ferriman und Gallwey von über acht Punkten ausgehen.

Anschließend wurde der ultrasonografische Befund abgefragt. Es wurde dokumentiert, ob bei der jeweiligen Patientin mindestens zwölf antrale Follikel in einem Ovar gefunden worden waren und ob ein Ovarvolumen von über 10 ml gemessen worden war.

Um zu kontrollieren, inwieweit bei den Patientinnen das Bestehen eines late onset-Adrenogenitalen Syndroms (AGS) ausgeschlossen worden war, wurde das Ergebnis des ACTH-Tests bzw. der Untersuchung des CYP 21-Gens festgehalten.

Frauen, bei denen der Verdacht bestand, dass eine andere Diagnose vorlag, die zum klinischen Erscheinungsbild des PCOS geführt hatte, wurden gemäß den Vorgaben der Rotterdamer Konsensuskonferenz von der Studie ausgeschlossen [4].

Für alle anderen Patientinnen wurde dann im Fragebogen noch zusammenfassend festgehalten, ob nach dem vorliegenden Befund mindestens zwei der geforderten drei Diagnosekriterien erfüllt waren und die Frau somit als PCOS- Patientin klassifiziert werden konnte [4].

Im letzten Abschnitt des Teils A des Fragebogens wurden anamnestische Daten der Patientin festgehalten, wie die Anzahl bisheriger Schwangerschaften und die Anzahl eventueller Aborte unter Berücksichtigung der jeweiligen Schwangerschaftswoche (SSW). Es wurde weiterhin jeweils vermerkt, ob im Falle eines Aborts der Verdacht auf ein Abortivei, also ein Fehlen des sonografischen Nachweises von Herzaktionen bzw. des histologischen Nachweises eines Embryoblasten bestanden hatte.

Der BMI der Patientin wurde dokumentiert, ebenso die Dauer eines eventuell bestehenden unerfüllten Kinderwunsches in Jahren.

Für eine eingehende Charakterisierung und zur Ermöglichung weiterführender Untersuchungen des Patientinnenkollektivs wurde im Teil B des Fragebogens festgehalten, ob bei der Patientin eine Autoimmunerkrankung vorlag, wobei zunächst kumulativ nach einem Lupus erythematoses, einem Sjögren-Syndrom, einer Chronischen Polyarthritis, einer Sklerodermie und einer Multiplen Sklerose gefragt wurde.

Dann wurde vermerkt, ob bei der Patientin ein Antiphospholipidsyndrom (APS) bestand und ob sie eine Autoimmunthyreopathie hatte. Ein APS wurde diagnostiziert, wenn zwei Mal im Abstand von mindestens zwölf Wochen Werte der Antiphospholipid-Antikörper von über 15,0 MPL- bzw. GPL-U/ml oder ein positiver Wert für Lupusanticoagulans oder β 2-Glykoproteinantikörper nachgewiesen wurde und ein thromboembolisches Geschehen oder eine habituelle Abortneigung nachweisbar waren. Eine Autoimmunthyreopathie galt als gesichert, wenn Anti-hTPO-Serumspiegel von über 50,0 U/ml oder Thyreoglobulin-Antikörper mit einem Wert von über 50,0 U/ml gemessen worden waren.

Dann wurde das Bestehen einer allgemeinen Schilddrüsenfunktionsstörung dokumentiert. Sie wurde diagnostiziert, wenn der Spiegel des Thyreoidea-stimulierenden Hormons (TSH) im Serum unter 0,30 oder über 4,00 μ IU/ml lag bzw. wenn das freie Trijodthyronin (fT3) einen Wert unter 3,90 oder über 6,70 pmol/l aufwies, sowie wenn die Konzentration des freien Tetrajodthyronins (fT4) niedriger als 12,0 oder höher als 22,0 pmol/l war.

Als nächstes wurde im Fragebogen das Vorliegen einer Endometriose vermerkt, falls diese mittels histologischer Untersuchung nach Probebiopsie im Rahmen einer Laparoskopie gesichert worden war. Wo eine solche Abklärung nicht erfolgt war, die Patientin aber unter schwerer Dysmenorrhoe litt, wurde dies gesondert festgehalten. Als schwer wurde eine Dysmenorrhoe hier bezeichnet, wenn die Patientin angab, aufgrund der Regelschmerzen Analgetika einnehmen zu müssen.

Anschließend wurden bestimmte Parameter zur Insulinsensitivität und zum Lipidstoffwechsel dokumentiert. Bei den meisten Patientinnen war ein oraler Glucosetoleranztest durchgeführt worden mit Bestimmung des Nüchternblutzucker- und -insulinspiegels sowie Messungen der Zucker- und Insulinwerte 30, 60, 90 und 120 Minuten nach definierter oraler Zufuhr von 75 g Glucose. Die Nüchternwerte von Gesamtcholesterin, LDL- und HDL-Cholesterin und Triglyzeriden wurden ebenfalls gemessen. Durch das beauftragte Labor erfolgte eine Berechnung des Insulinsensitivitätsindex (ISI) nach Matsuda et al nach folgender Formel: $ISI = 10.000 / \sqrt{(Glucose\ basal \times Insulin\ basal) \times (mittlere\ Glucose \times mittleres\ Insulin)}$ [93].

Dabei gilt ein ISI von 6-12 als normal, ein Wert unter 6 entspricht dem Verdacht einer zu mindest partiellen Insulinresistenz, was im Fragebogen entsprechend dokumentiert wurde. Zur Beurteilung des Fettstoffwechsels wurde der Quotient aus LDL- und HDL-Cholesterinspiegel berechnet. Als normal gilt hier ein Wert unter 4, darüber liegende LDL-HDL-Quotienten werden als erhöht angesehen, was im Fragenkatalog ebenfalls entsprechend markiert wurde.

Bei den Frauen wurde ebenfalls der Prolaktinspiegel (PRL) im Blut bestimmt. Im Fall eines einmalig erhöhten Wertes erfolgte eine Kontrolle, um eine Fehlbewertung aufgrund der pulsatilen Sekretion des PRL durch die Hypophyse auszuschließen. Wurde erneut ein Wert von über 15 ng/ml gemessen, wurde die Diagnose Hyperprolaktinämie gestellt und dies im Fragebogen dokumentiert. Die Patientin wurde von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Um das Abortrisiko, das die Patientinnen unabhängig vom Bestehen eines PCOS tragen könnten, mit einzuschätzen erfolgte eine Beurteilung der individuellen Thrombophilieparameter. Im Fragebogen wurde vermerkt, ob eine Frau einen Protein S- oder C- oder einen Antithrombin III-Mangel hatte, ob bei der Patientin eine Faktor V Leiden-Mutation und damit eine angeborene Aktiviertes Protein C-Resistenz (APC-Resistenz) vorlag, ob sie Trägerin einer Prothrombin-Mutation oder einer Methyltetrahydrofolatreduktase (MTHFR)-Mutation war und ob eine Faktor VIII-, XII-, XIII- oder Plasminogenaktivatorinhibitor (PAI)-bezogene Gerinnungsstörung bestand.

Zur Einschätzung der Risiken für Chromosomenaberrationen und Erbkrankheiten im Fall einer Kinderwunschbehandlung erfolgte bei den meisten Patientinnen und deren Partnern eine Karyotypisierung. Im Fragebogen wurde markiert, ob eine solche Untersuchung stattgefunden hatte und ob das Ergebnis, jeweils bezogen auf die Patientin und ihren Partner, auffällig oder unauffällig war.

Für die Bewertung des uterinen Faktors im Hinblick auf das Abortrisiko wurde im Fragebogen festgehalten, ob bei der Patientin sonografisch oder hysteroskopisch eine uterine Fehlbildung, ein Myom oder eine vergleichbare Pathologie nachgewiesen worden war.

Bei den Patientinnen, die wegen Infertilität behandelt worden waren, wurde dann der letzte Teil des Fragebogens ausgefüllt. Hier wurden zunächst die Sterilitätsfaktoren festgehalten, die die Behandlung erforderlich gemacht hatten. Vermerkt wurden das etwaige Bestehen einer Tubenpathologie, einer Endometriose, einer männlichen Fertilitätsstörung und das Vorliegen des PCOS als Behandlungsindikation.

Dann folgte die Datensammlung zu den im Zentrum erfolgten Behandlungszyklen. Diese erfolgten in Form einer hormonellen Ovulationsinduktion mit zeitlich geplantem Spontanverkehr, als Insemination, In vitro-Fertilisation (IVF) mit oder ohne zusätzliche

Intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) sowie als Kryo-Auftau-Behandlung, also als Transfer von Embryonen, deren Vorstufen im Pronukleusstadium kryokonserviert worden waren.

Im Fragebogen wurde abgefragt, welches Präparat zur Stimulation verwendet worden war, hier kamen Clomiphencitrat, als rekombinantes FSH Puregon® oder Gonal F® und als kombiniertes LH-FSH-Präparat Menogon®HP in Frage.

Im Fall einer Stimulation mit Gonadotropinen wurde die Gesamtdosis im jeweiligen Behandlungszyklus berechnet und dokumentiert.

Die Anzahl der Follikel mit einem Durchmesser von mindestens 15mm und der Estradiolspiegel zum Zeitpunkt der Ovulationsinduktion wurden vermerkt, ebenso die Anzahl der bei der Punktion gewonnenen Oozyten.

Das Auftreten eines ovariellen Hyperstimulationssyndroms (OHSS) wurde dokumentiert unter Berücksichtigung der entsprechenden Gradeinteilung. Im Fragebogen wurde weiterhin vermerkt, ob der begonnene Stimulationszyklus abgebrochen werden musste.

Im Fall einer IVF oder einer kombinierten IVF/ ICSI-Behandlung wurde die Befruchtungsrate dokumentiert. Danach wurde festgestellt, ob ein Embryotransfer erfolgte.

Die Begleitmedikation der Patientinnen wurde im Fragebogen ebenso abgefragt. Hier erfolgte eine Konzentration auf solche Therapeutika, für die sich ein Einfluss auf die Erfolgchancen der Behandlung vermuten ließ und die in unterschiedlicher Dosierung eingesetzt worden waren. Es wurde somit die Anwendung von niedermolekularem Heparin sowie die Einnahme und die individuelle Dosierung von Metformin und Prednisolon dokumentiert.

Anschließend wurde das Ergebnis des Behandlungszyklus festgehalten. Zunächst wurde die Frage beantwortet, ob biochemisch eine Schwangerschaft festgestellt wurde. Dies erfolgte durch eine Bestimmung des humanen β -Choriogonadotropin (β -HCG) am Tag 17 bis 19 nach Stimulationsbehandlung mit Spontanverkehr oder Insemination bzw. am Tag 15 bis 17 nach Follikelpunktion. Als biochemische Schwangerschaft wurde ein Ergebnis ab 10 mIU/ml angesehen. Dann wurde vermerkt, ob die festgestellte Gravidität bis zur Geburt weiter verlief oder ob sie frühzeitig mit einem Abort endete. Unterschieden wurde hier zwischen einer lediglich biochemischen Schwangerschaft ohne klinischen Nachweis und einer Gravidität, die in der Ultraschalluntersuchung sichtbar wurde. In letzterem Falle wurde, wenn es danach zum Abort kam, dokumentiert, ob der Verdacht auf ein Abortivei bestand, also sonografisch keine Herzaktionen gesehen werden konnten bzw. die histologische Untersuchung keinen Embryoblast nachweisen konnte. Traf dies nicht zu, so wurde der Abort je nach seinem zeitlichen Auftreten als Früh- oder Spätabort definiert. Als Frühabort galt ein Ende der Gravidität bis zur abgeschlossenen 16. SSW, als Spätabort ein Verlauf bis zur abgeschlossenen 28. SSW. In jedem Fall wurde festgehalten, ob bei der humangenetischen Aufarbeitung des Abortmaterials ein auffälliger fetaler Karyotyp gefunden wurde.

Es wurde jeweils dokumentiert, ob Schwangerschafts- bzw. Geburtsverlauf insgesamt als komplikationslos beschrieben werden konnten oder nicht.

Das Auftreten eines Gestationsdiabetes, einer Präeklampsie oder einer fetalen Retardierung wurden explizit abgefragt.

Bezüglich der Geburt wurde zwischen Spontangeburt und Entbindung durch Sectio caesarea unterschieden.

Im Fall einer Frühgeburt, also eines Endes der Schwangerschaft vor der abgeschlossenen 38. SSW, wurde dies vermerkt. In jedem Fall wurden das Geburtsgewicht des Kindes und seine Vitalität dokumentiert.

Es wurde festgehalten, ob die Patientin während der Schwangerschaft prophylaktisch eine tägliche Gabe von niedermolekularem Heparin erhielt und ob und in welcher Dosierung in der Frühschwangerschaft Prednisolon eingenommen wurde.

Schließlich wurde dokumentiert, ob das Kind der Patientin gesund war, im Falle einer Erkrankung wurde die Diagnose notiert.

Im Falle mehrerer Behandlungszyklen wurde der entsprechende Teil des Fragebogens für jede einzelne Behandlung und jede eingetretene Schwangerschaft ausgefüllt.

Die Schwangerschaftsrate bei Kinderwunschbehandlungen bei den rekrutierten Patientinnen unterschied sich statistisch nicht von der des Gesamtkollektivs an behandelten Frauen mit PCOS. Sie betrug 38,59% im Falle der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientinnen und 44,30% bei allen 184 zwischen Januar 1998 und März 2007 am Zentrum behandelten Frauen, bei denen ein PCOS vorlag (Exakter Test nach Fisher: $p=0,16$) [104].

Die Abortrate nach assistierter Reproduktion betrug bei den untersuchten Frauen 16,85%, im Gesamtkollektiv der zwischen Januar 1998 und März 2007 Behandelten 11,64%. Auch hier fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied (Exakter Test nach Fisher: $p=0,17$) [104].

2.3 Kontrollpersonen

Als Kontrollpersonen diente ein Kollektiv gesunder Studentinnen und Studenten der Universität Regensburg.

Da sich sowohl Patientinnen als auch Kontrollpersonen zur Zeit der Untersuchungen in der Umgebung Regensburgs aufhielten, kann davon ausgegangen werden, dass keine relevanten Unterschiede in der ethnischen Zusammensetzung der Gruppen vorlagen.

2.4 Molekulargenetische Untersuchungen

Eine Schwäche bei Assoziationsstudien ist die oft unzureichende Anzahl von untersuchten Personen und dass Assoziationen, die in einer Studie nachgewiesen wurden, in anderen Studien nicht reproduzierbar waren. Daher gibt es bereits seit 1998 Empfehlungen von renommierten Zeitschriften, dass nur dann Assoziationsergebnisse als valide angesehen werden, wenn diese in unabhängigen Patientengruppen bestätigt werden. Zudem ist es wichtig, dass Untersuchungen an möglichst großen Kollektiven erfolgen, was für die bisher beschriebenen Studien nicht der Fall ist.

Um die Reproduzierbarkeit einiger bisheriger Ergebnisse von Untersuchungen zu Kandidatengenomen des PCOS zu prüfen, wurde zunächst die Literatur zu bisher untersuchten Assoziationen zwischen Genomvarianten und dem PCOS studiert.

Anschließend erfolgte eine molekulargenetische Untersuchung der anonymisierten DNA-Proben von 242 PCOS-Patientinnen und 161 Kontrollen.

Alle Personen waren über die genetischen Untersuchungen aufgeklärt worden und hatten dies sowie ihr Einverständnis damit schriftlich bestätigt.

Die Studie erfolgte im Rahmen des „ReForM-Projekts“ der Universität Regensburg, für dieses liegt ein positives Votum der Ethikkommission des Zentrums für Klinische Studien des Klinikums der Universität Regensburg vor.

Hinsichtlich der Assoziation von ausgewählten Genveränderungen mit dem PCOS wurden statistische Berechnungen nach dem Chi(χ^2)-Test sowie nach dem Fisher-Test durchgeführt.

Bei den untersuchten Polymorphismen handelt es sich um die Apa1-Variante des Insulin-like growth factor 2 (IGF-2)-Gens, um den 4G5G-Polymorphismus in der Promotorregion des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1(PAI-1)-Gens und um den R653Q-Polymorphismus des Methylentetrahydrofolatdehydrogenase-1 (MTHFD-1)-Gens.

Weiterhin wurden der -108T/C-Polymorphismus des PON1-Gens und der G1057D-SNP des IRS-2-Gens untersucht, hier konnten aber keine validen verwertbaren Ergebnisse erzielt werden.

Den Patientinnen und Kontrollpersonen wurden EDTA-Vollblutproben abgenommen, aus denen mithilfe eines *QIAamp Blut DNA Midi Kits* die DNA präpariert wurde. Die DNA-Proben wurden dann mithilfe eines Pipettierroboters (Biomek FX, Beckman Coulter) auf Mikrotiterplatten verbracht.

Zur Bestimmung der jeweils vorliegenden SNP wurden Real-Time Polymerasekettenreaktionen (PCR) mit dem TaqMan-System durchgeführt. Dabei dient die 5'-3'-Nukleaseaktivität der AmpliTaq Gold DNA-Polymerase über das Freisetzen eines fluoreszierenden Markers dem Nachweis einer bestimmten DNA-Sequenz, im gegebenen Fall eines bestimmten SNP. Die verwendete Sonde besteht dabei aus einem Oligonukleotid mit einem Fluoreszenzmarker am 5'- und einem sog. Quencher (dt.: Löscher) am 3'-Ende. Solange die Sonde ungebunden und somit intakt ist, wird die Fluoreszenz durch die Nähe von Marker und Quencher unterdrückt. Nur wenn die gesuchte DNA-Sequenz vorhanden ist und die Sonde bei der PCR daran gebunden wird, wird durch die folgende Hydrolyse der Sonde die Fluoreszenz des Markers ausgelöst. In jedem Zyklus der PCR wird dieser Vorgang wiederholt. Die steigende Fluoreszenz wird mittels *ABI PRISM™ 7900HT Sequence Detection System* von PE Applied Biosystems (TaqMan) gemessen und erlaubt somit den Nachweis des Vorliegens der gesuchten DNA-Sequenz. Quantitativ wird die Fluoreszenz als Vergleichswert zu der Emission einer passiven Referenzsonde angegeben.

Sollen verschiedene Allele nachgewiesen werden, so können gleichzeitig zwei allelspezifische Sonden mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern zum Einsatz kommen. Die Fluoreszenzbestimmung kann so zeigen, ob ein bestimmter SNP vorliegt und ob es sich um einen homo- oder einen heterozygoten Genotyp handelt.

Zu einer Subgruppe der untersuchten Patientinnen, die einen Umfang von 137 Personen hatte, wurde dann eine statistische Auswertung des Zusammenhangs von Genotyp und klinischen Parametern durchgeführt.

Die untersuchten Patientinnen waren in 80,17% Nulliparae, von ihnen waren 90,32% noch nie schwanger gewesen. 17,24% des gesamten Kollektivs hatten bereits ein Kind geboren, 60% von ihnen ohne Abort in der Anamnese, 40% hatten dagegen bereits mindestens eine Schwangerschaft verloren. Die restlichen 2,59% der untersuchten Frauen hatten bereits mindestens zwei Kinder.

Die Kinderwunschpatientinnen waren durchschnittlich 31 Jahre alt.

2.5 Diagnosestellung bei den untersuchten Patientinnen

Die Kriterien, nach denen bei den untersuchten Patientinnen die Diagnose PCOS gestellt worden war, waren folgendermaßen verteilt:

Bei 106 (77,37%) fand sich die Kombination von polyzystischen Ovarien in der Sonografie und dem Vorliegen einer Oligo- bzw. Anovulation. 39 dieser Patientinnen (28,47%) wiesen zusätzlich dazu auch noch eine biochemisch nachweisbare Hyperandrogenämie auf. Unter diesen Frauen zeigten fünf das klinische Symptom Hirsutismus und sieben eine Akne. Sechs Frauen hatten alle beiden Symptome.

Bei elf Patientinnen (8,03%) lag die Kombination von PCO, Oligo- bzw. Anovulation sowie Hirsutismus vor. Sechs von diesen Betroffenen litten zusätzlich unter Akne, eine weitere Frau hatte Akne und eine Alopezie.

14 Patientinnen (10,22%) wiesen neben PCO und Oligo- bzw. Anovulation das Symptom Akne auf, bei zweien davon lag weiterhin eine Alopezie vor.

Bei einer Frau (0,73%) fand sich die Kombination von Ultraschallbefund, Oligo- bzw. Anovulation und Alopezie.

Bei acht Patientinnen (5,84%) wurde die Diagnose PCOS aufgrund des Vorliegens von polyzystischen Ovarien sowie einer biochemischen Hyperandrogenämie gestellt. Eine dieser Frauen wies auch klinisch eine Akne auf.

Weitere acht Frauen (5,84%) erfüllten neben dem sonografischen Diagnosekriterium das des Vorliegens eines Hirsutismus als klinischem Zeichen einer Hyperandrogenämie. Drei dieser Patientinnen litten zusätzlich unter Akne.

10 Betroffene (7,30%) erhielten die Diagnose PCOS aufgrund des Bestehens einer Akne neben dem Vorliegen polyzystischer Ovarien.

Eine Frau (0,73%) wies neben dem Ultraschallbefund eine Alopezie auf.

Eine weitere (0,73%) Patientin hatte eine Oligo- oder Anovulation neben dem Nachweis einer biochemischen Hyperandrogenämie.

Drei Betroffene (2,19%) zeigten einen oligo- oder anovulatorischen Zustand neben dem Symptom der Akne. Bei einer dieser Frauen (0,73%) bestand zusätzlich ein Hirsutismus.

2.6 Statistische Analysen

Für die statistische Bewertung der Ergebnisse zu den untersuchten PCOS-Patientinnen und den Kontrollpersonen erfolgten, je nach Fragestellung verschiedene Tests, und zwar der Exakte Test nach Fisher, der Chi-Quadrat (χ^2)-, der Mann-Whitney- und der Kruskal-Wallis-Test.

Ein Resultat galt als statistisch signifikant, wenn die Wahrscheinlichkeit, dass das Ergebnis als wahr angesehen wird, aber tatsächlich unwahr ist, unter 5% ($p=0,05$) lag.

Die Berechnungen erfolgten mithilfe der Statistik-Software SPSS, Version 16.0 und dem Programm Windows Excel. Die Auswertung der berechneten Ergebnisse erfolgte nach Rücksprache mit der Statistikerin des Zentrums für Klinische Studien der Universitätsklinik Regensburg.

3. Ergebnisse

Die molekulargenetischen Untersuchungen der genannten SNP des MTHFD-1-, IGF-2- und PAI-1-Gens, die mittels Real-Time-PCR und anschließender Fluoreszenzmessung durchgeführt wurden, brachten valide Ergebnisse. Bezüglich der Genotyp- und Allelverteilungen ergaben sich die folgenden Resultate.

3.1 Genotyp- und Allelverteilungen

3.1.1 MTHFD-1-Gen

Unter 242 untersuchten Frauen, bei denen ein PCOS diagnostiziert wurde, hatten 55 (22,7%) einen reinen A/A-Genotyp bezüglich des R653Q –Polymorphismus des MTHFD-1-Gens. Bei 118 (48,8%) lag ein heterozygoter Genotyp vor, 69 (28,5%) waren homozygot für die G/G-Variante.

Von den 161 untersuchten weiblichen gesunden Kontrollpersonen wiesen 31 (19,3%) einen reinen A/A-Genotyp auf, 76 (47,2%) waren heterozygot, bei 54 (33,5%) fand sich eine Homozygotie für das G-Allel.

Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Genotypverteilung zwischen Gesunden und Patientinnen mit PCOS (Exakter Test nach Fisher: $p=0,49$).

Dasselbe gilt für die Betrachtung der Allelverteilung ($p=0,26$). Unter den 484 Allelen der untersuchten PCOS-Patientinnen befanden sich 228 (47,1%) A- und 256 (52,9%) G-Allele. Die Gesunden wiesen von 322 Allelen 138 (42,9%) A- und 184 (57,1%) G-Allele auf.

3.1.2 IGF-2-Gen

Von 219 Frauen mit PCOS, die hinsichtlich der Apa1-Variante des IGF-2-Gens erfolgreich untersucht wurden, hatten 116 (53%) einen homozygoten G/G-Genotyp. 81 (37%) waren heterozygot, bei 22 (10%) lag ein homozygoter Genotyp des A-Allels vor.

Unter den 152 Kontrollpersonen wiesen 71 (46,7%) eine G/G-Variante auf, 66 (43,4%) hatten einen heterozygoten Genotyp. 15 (9,9%) waren homozygot bezüglich des A-Typs.

Die Betrachtung der Allelverteilung ergab bei den Patientinnen mit PCOS 313 von 438 (71,5%) G- und 125 (28,5%) A-Allele. Die Kontrollen wiesen von 304 Allelen 208 (68,4%) G- und 96 (31,6%) A-Varianten auf. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Betroffenen und Gesunden (Exakter Test nach Fisher: $p=0,44$ für die Genotyp- bzw. $p=0,41$ für die Allelverteilung).

3.1.3 PAI-1-Gen

Von 240 untersuchten Patientinnen mit PCOS wiesen 65 (27,1%) bezüglich des PAI-1-SNP einen homozygoten Genotyp der 4G-Variante auf. 56 (23,3%) waren homozygot bezogen auf den 5G-Genotyp. 119 (49,6%) hatten einen 4G/5G-Typ.

Unter den gesunden Kontrollen befanden sich 56 von 152 (36,8%) mit Homozygotie für die 4G-Variante. 26 (17,1%) hatten einen 5G/5G-Genotyp, 70 (46,1%) waren heterozygot.

Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Genotypverteilung von PCOS-Patientinnen und Kontrollpersonen (Exakter Test nach Fisher: $p=0,08$).

Anders stellt sich dies bei der Betrachtung der Allelverteilungen dar. Von den 480 Allelen der 240 untersuchten PCOS-Patientinnen waren 249 (51,9%) 4G-Allele. Es fanden sich 231 (48,1%) 5G-Allele. Bei den Kontrollen fanden sich bei insgesamt 304 Allelen 182 (59,9%) 4G-Typen und 122 (40,1%) 5G-Varianten. Somit lag eine signifikant unterschiedliche Allelverteilung zwischen Patientinnen mit PCOS und Kontrollen vor (Exakter Test nach Fisher: $p=0,03$). Während unter den Patientinnen mit PCOS die 4G- und 5G-Allele nicht in

signifikant unterschiedlichem Maß vertreten waren, ergab die Verteilung der Alleltypen unter den gesunden Kontrollpersonen signifikant mehr 4G-Allele.

3.2 Einfluss des Genotyps auf das klinische Erscheinungsbild

Um zu untersuchen, inwieweit die verschiedenen Genotypen sich auf das klinische Erscheinungsbild der betroffenen Frauen mit PCOS auswirken, wurden bestimmte klinische Parameter bezogen auf die vorliegenden Genotypen untersucht. Es zeigten sich die folgenden Ergebnisse.

3.2.1 Körpergewicht

Bei dem Vergleich der verschiedenen Genotypen im Hinblick auf die durchschnittlichen BMI der Trägerinnen ergaben sich die folgenden Ergebnisse.

3.2.1.1 MTHFD-1-Gen

Die jeweils vorliegende Variante des MTHFD-1- Gens wirkte sich nicht signifikant auf den mittleren BMI der Trägerinnen mit PCOS aus (Kruskal-Wallis-Test: $p=0,53$).

Die PCOS-Patientinnen mit der A/A-Variante hatten einen durchschnittlichen BMI von 28,09 kg/m². Frauen mit PCOS und A/G-Genotyp wiesen einen mittleren BMI von 26,43 kg/m² auf. Bei Betroffenen mit Homozygotie für das G-Allel betrug der durchschnittliche BMI 27,6 kg/m². Die Mediane lagen bei 25,90 kg/m², 24,50 kg/m² bzw. 25,00 kg/m².

3.2.1.2 IGF-2-Gen

Der IGF-2-Polymorphismus hatte keinen signifikanten Einfluss auf den mittleren BMI von Patientinnen mit PCOS (Kruskal-Wallis-Test: $p=0,19$). Frauen mit der A/A-Variante des IGF-2-Gens hatten einen durchschnittlichen BMI von 29,1 kg/m². Bei Patientinnen mit heterozygotem Genotyp betrug der mittlere BMI 26,76 kg/m², Betroffene mit G/G-Variante wiesen einen BMI von durchschnittlich 26,14 kg/m² auf. Die Mediane betragen 28,45 kg/m², 23,50 kg/m² bzw. 24,60 kg/m².

3.2.1.3 PAI-1-Gen

Die verschiedenen Allelvarianten des PAI-1-Gens beeinflussten nicht signifikant den mittleren BMI der Frauen mit PCOS (Kruskal-Wallis-Test: $p=0,14$). Der durchschnittliche BMI betrug bei Patientinnen mit 4G/4G-Genotyp 27,46 kg/m², bei Heterozygoten 27,59 kg/m² und bei der 5G/5G-Variante 24,72 kg/m² (s. Abb.1). Die Mediane lagen bei 24,40 kg/m², 26,20 kg/m² und 22,95 kg/m².

Insgesamt hatten die Varianten der untersuchten SNP keinen signifikanten Einfluss auf die durchschnittlichen bzw. medianen BMI der Patientinnen.

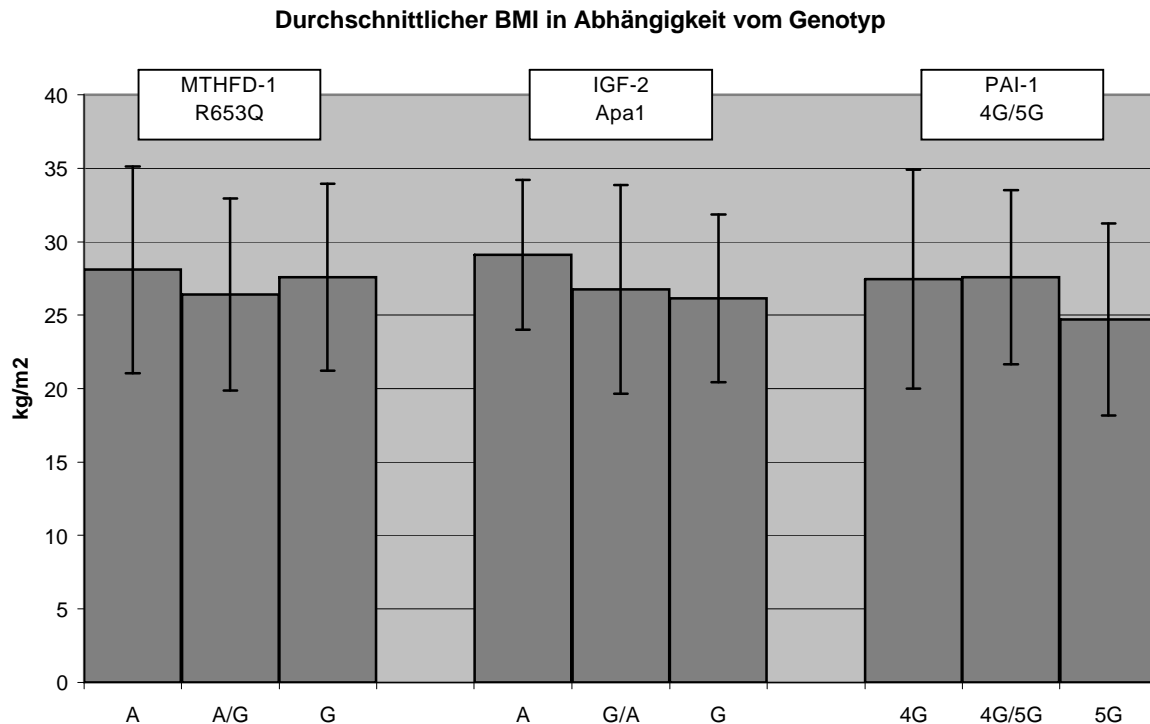


Abb. 1: Durchschnittlicher BMI in Abhängigkeit vom Genotyp

Gruppirt man die Patientinnen in schlanke (BMI < 25 kg/m²), leicht übergewichtige (BMI 25 – 29,9 kg/m²) und adipöse (BMI mind. 30 kg/m²) Frauen, und vergleicht die Trägerinnen der verschiedenen Polymorphismusvarianten, so erhält man ein teilweise abweichendes Ergebnis.

3.2.2 Gruppierung der Patientinnen nach dem BMI

3.2.2.1 MTHFD-1-Gen

Patientinnen mit A/A-Genotyp bezüglich des MTHFD-1-Gen-SNP waren in 41,67% der Fälle schlank, zu 13,89% leicht übergewichtig und zu 44,44% adipös. Unter den heterozygoten Frauen fanden sich zu 52,94% Schlanke, zu 16,18% leicht Übergewichtige und zu 30,88% Adipöse. Trägerinnen des G/G-Genotyps waren in 48,78% der Fälle schlank, in 21,95% leicht und in 29,27% deutlich übergewichtig. Somit zeigen die verschiedenen Polymorphismus-Typen des MTHFD-1-Gens keinen signifikanten Einfluss auf den Grad der Adipositas der Trägerinnen ($\chi^2=0,11$).

3.2.2.2 IGF-2-Gen

Patientinnen mit homozygoter A/A-Variante des IGF-2-SNP sind nur in 25% der Fälle schlank, in 33,33% bzw. 41,67% der Fälle leicht übergewichtig bzw. adipös, während Heterozygote zu 53,85% schlank, 15,38% leicht übergewichtig und 30,77% adipös sind. Trägerinnen des G/G-Genotyps sind in 51,47% der Fälle schlank, 16,18% von ihnen sind leicht übergewichtig und 32,35% adipös. Somit sind Frauen mit A/A-Variante des IGF-2-Polymorphismus signifikant häufiger leicht übergewichtig oder adipös als Trägerinnen des G/A- oder G/G-Genotyps ($\chi^2=1,2 \times 10^{-7}$).

3.2.2.3 PAI-1-Gen

Unter den Frauen mit PCOS, die bezüglich des PAI-1-SNP homozygot für das 5G-Allel sind, sind 65,63% schlank, während 9,38% bzw. 25% leicht übergewichtig bzw. adipös sind. Heterozygote Patientinnen haben in 39,71% der Fälle einen BMI unter 25 kg/m², in 22,06% beträgt der BMI zwischen 25 und 29,9 kg/m², in 38,24% mindestens 30 kg/m². Homozygote Trägerinnen der 4G-Variante sind zu 51,22% schlank, zu 14,63% leicht übergewichtig und zu 34,15% deutlich adipös. Somit befinden sich unter den Trägerinnen der reinen 5G-Variante signifikant mehr Schlanke als unter den Trägerinnen des 4G/5G- oder des reinen 4G-Genotyps ($\chi^2=0,024$).

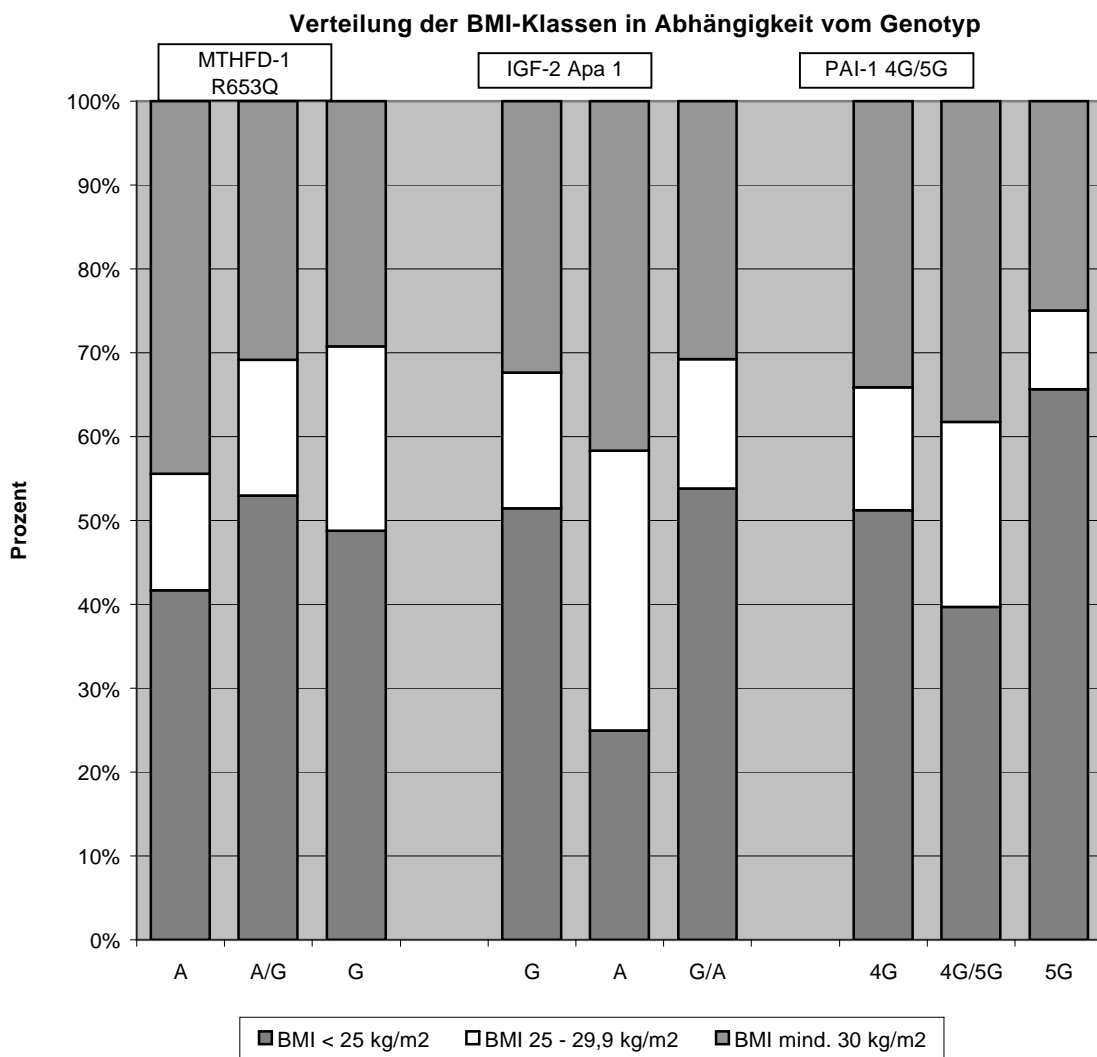


Abb. 2: BMI-Klassen in Abhängigkeit vom Genotyp

3.2.3 Insulinsensitivität

Um einen möglichen Einfluss der Genpolymorphismen auf die Insulinsensitivität der Patientinnen mit PCOS zu prüfen, wurden alle Frauen nach dem jeweils vorliegenden Genotyp in Subgruppen eingeteilt. Diese wurden bezüglich des ermittelten durchschnittlichen Insulinsensitivitätsindex (ISI) miteinander verglichen.

3.2.3.1 MTHFD-1-Gen

Bei einer Betrachtung der verschiedenen Varianten des MTHFD-1-Gens und deren Zusammenhang mit der Insulinsensitivität zeigte sich, dass Frauen mit Homozygotie für das A-Allel in 56,25% eine partielle Insulinresistenz aufwiesen, Heterozygote in 60,53% und homozygote Trägerinnen des G-Allels in 66,52%. Somit unterschied sich der Anteil von Patientinnen mit Insulinresistenz unter den Trägerinnen der verschiedenen SNP-Varianten nicht signifikant (Exakter Test nach Fisher: $p=0,84$).

3.2.3.2 IGF-2-Gen

Die acht Trägerinnen der A/A-Variante des IGF-2-Gen-Polymorphismus, bei denen ein OGTT durchgeführt wurde, wiesen alle eine zumindest partielle Insulinresistenz auf. Hier ergibt sich möglicherweise ein Hinweis auf einen Beitrag des IGF-2-Gens zur Pathogenese des PCOS. Da die Korrelation jedoch aufgrund der geringen Fallzahl und der damit niedrigen Testpower nicht auf ausreichendem Signifikanzniveau nachgewiesen werden konnte, ist eine definitive Aussage nicht möglich.

Bei den Frauen, die bezüglich der Apa1-Allelvarianten heterozygot waren, lag der Anteil der Patientinnen mit Insulinresistenz bei 57,58%, unter den Homozygoten mit G/G-Genotyp bei 60,0%. Hier bestand kein signifikanter Unterschied (Exakter Test nach Fisher: $p=0,07$).

3.2.3.3 PAI-1-Gen

Bei Betrachtung der verschiedenen Polymorphismus-Typen des PAI-1-Gens ergibt sich ein nahezu gleichmäßiger Anteil an Patientinnen mit Insulinresistenz. Er beträgt unter den Frauen mit Homozygotie für das 4G-Allel 56,52%, bei Heterozygoten mit 4G/5G-Variante 63,41% und bei Trägerinnen der reinen 5G-Variante 61,11%. Es ergibt sich kein Hinweis auf einen signifikanten Einfluss des PAI-1-Gens auf die Insulinwirkung der Betroffenen (Exakter Test nach Fisher: $p=0,92$).

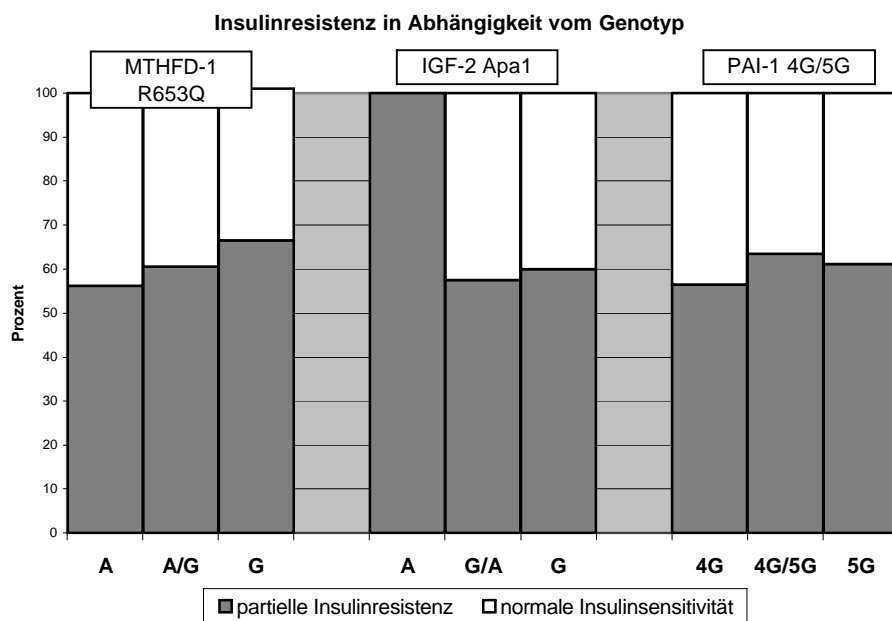


Abb. 3: Insulinresistenz in Abhängigkeit vom Genotyp

3.2.4 Gestationsdiabetes

Eine typische Komplikation des PCOS bei betroffenen Frauen, die eine Schwangerschaft erzielen, ist der Gestationsdiabetes.

Es erfolgte daher eine Untersuchung der Abhängigkeit des Auftretens dieser Komplikation von der jeweils vorliegenden Variante der untersuchten Genpolymorphismen.

3.2.4.1 MTHFD-1-Gen

Im Ergebnis fand sich ein Gestationsdiabetes in 10,71% der Fälle mit reinem A/A-Genotyp. Von den Patientinnen, die bezüglich des MTHFD-1-Gens heterozygot waren, entwickelte keine einen Gestationsdiabetes. Diese Komplikation trat bei 3,45% der Patientinnen mit G/G-Konstellation auf.

Damit war der Gestationsdiabetes bei Patientinnen mit der AA-Variante des MTHFD-1-Gen-Polymorphismus signifikant häufiger (Exakter Test nach Fisher: $p=0,036$).

3.2.4.2 IGF-2-Gen

Ein Gestationsdiabetes fand sich bei keiner der Patientinnen mit homozygoter A-Variante des IGF-2-Polymorphismus. Bei Heterozygoten lag der Anteil bei 2,63%. Homozygote bezüglich des G-Allels entwickelten in 6,38% einen Diabetes während der Schwangerschaft. Die Unterschiede in der Häufigkeit waren nicht statistisch signifikant, die Testpower war hier aufgrund der geringen Anzahl von Patientinnen mit AA-Genotyp zu gering (Exakter Test nach Fisher: $p=0,72$).

3.2.4.3 PAI-1-Gen

3,33% der Frauen mit PCOS, die einen homozygoten 4G-Genotyp bezüglich des PAI-1-Gen-Polymorphismus aufwiesen, entwickelten einen Gestationsdiabetes. Unter den heterozygoten Patientinnen betrug die Häufigkeit des Gestationsdiabetes 5,66%. Frauen mit 5G/5G-Variante entwickelten in 4,55% einen Diabetes in der Schwangerschaft.

Die Unterschiede in der Häufigkeit waren hier ebenfalls nicht signifikant (Exakter Test nach Fisher: $p=1,00$).

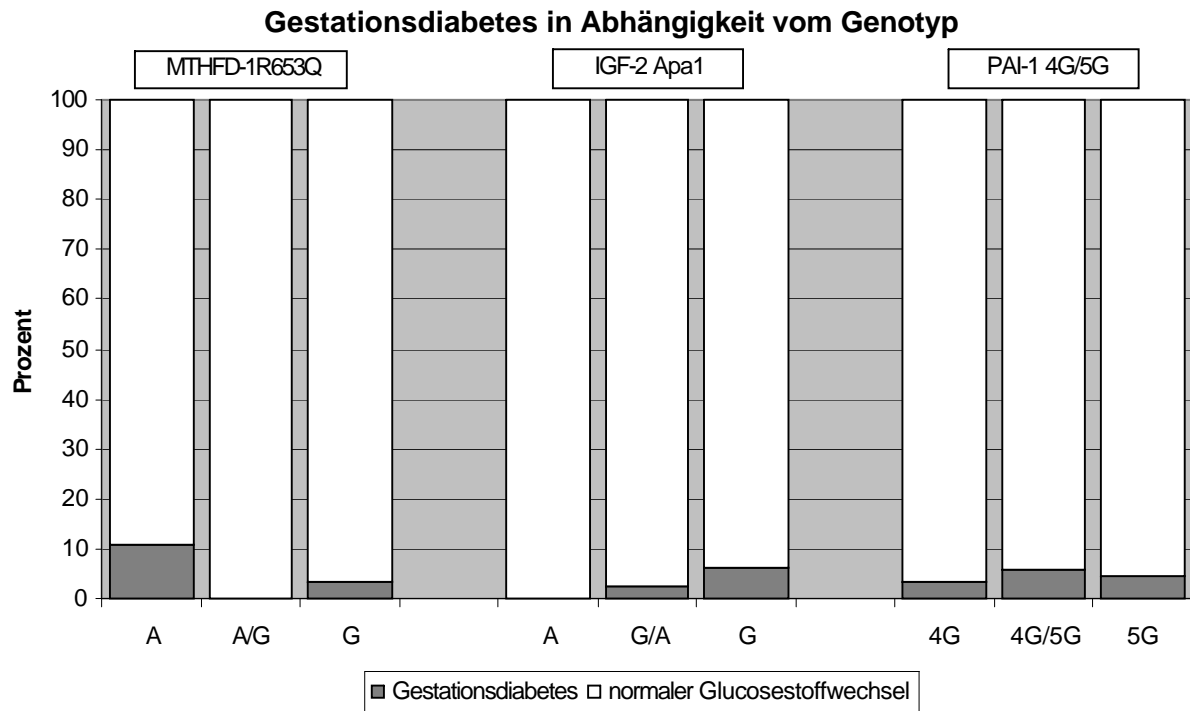


Abb. 4: Gestationsdiabetes in Abhängigkeit vom Genotyp

3.2.5 Fettstoffwechsel

Um den Einfluss des Genotyps auf den Lipidmetabolismus zu untersuchen, wurde bei den Patientinnen das Verhältnis von LDL- zu HDL-Cholesterin bestimmt.

3.2.5.1 MTHFD-1-Gen

Im Ergebnis hatten 10,53% der Patientinnen mit PCOS, die homozygot für das A-Allel des MTHFD-1-Gen-Polymorphismus waren, einen erhöhten (>4) LDL-HDL-Quotient. Alle Frauen mit A/G-Genotyp und alle Homozygoten für das G-Allel hatten einen normalen LDL-HDL-Quotient von <4 . Ein erhöhter LDL-HDL-Quotient fand sich somit signifikant häufiger bei Patientinnen mit der AA-Variante des MTHFD-1-Gen-Polymorphismus (Exakter Test nach Fisher: $p=0,044$).

3.2.5.2 IGF-2-Gen

Bei Vorliegen der A/A-Variante des IGF-2-Polymorphismus bei Frauen mit PCOS war das Verhältnis von LDL- und HDL-Cholesterin immer kleiner als 4 und damit normal. Unter den Frauen mit G/A-Genotyp befanden sich 3,23% mit erhöhtem (>4) LDL-HDL-Quotient, G-Allel-Homozygote wiesen in 2,50% der Fälle ein erhöhtes (>4) Verhältnis von LDL- und HDL-Cholesterin auf. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypvarianten waren hier aufgrund niedriger Testpower nicht signifikant (Exakter Test nach Fisher: $p=1,00$).

3.2.5.3 PAI-1-Gen

Die verschiedenen Varianten des PAI-1-Gens ergaben unter den Patientinnen mit PCOS einen erhöhten LDL-HDL-Quotient in 3,57% der Fälle mit 4G/4G-Typ und von 2,22% bei Vorliegen der 4G/5G-Variante. Bei Patientinnen mit homozygotem 5G-Genotyp fand sich in allen (15) Fällen ein normaler (<4) LDL-HDL-Quotient. Somit unterschied sich der Anteil an Frauen mit erhöhtem LDL-HDL-Quotient unter den Trägerinnen der verschiedenen Polymorphismus-Varianten nicht signifikant (Exakter Test nach Fisher: $p=1,00$).

Nach diesen Ergebnissen erscheint lediglich der MTHFD-1-Gen-Polymorphismus als möglicherweise bedeutender Faktor für die Beeinflussung des Fettstoffwechsels bei Patientinnen mit PCOS.

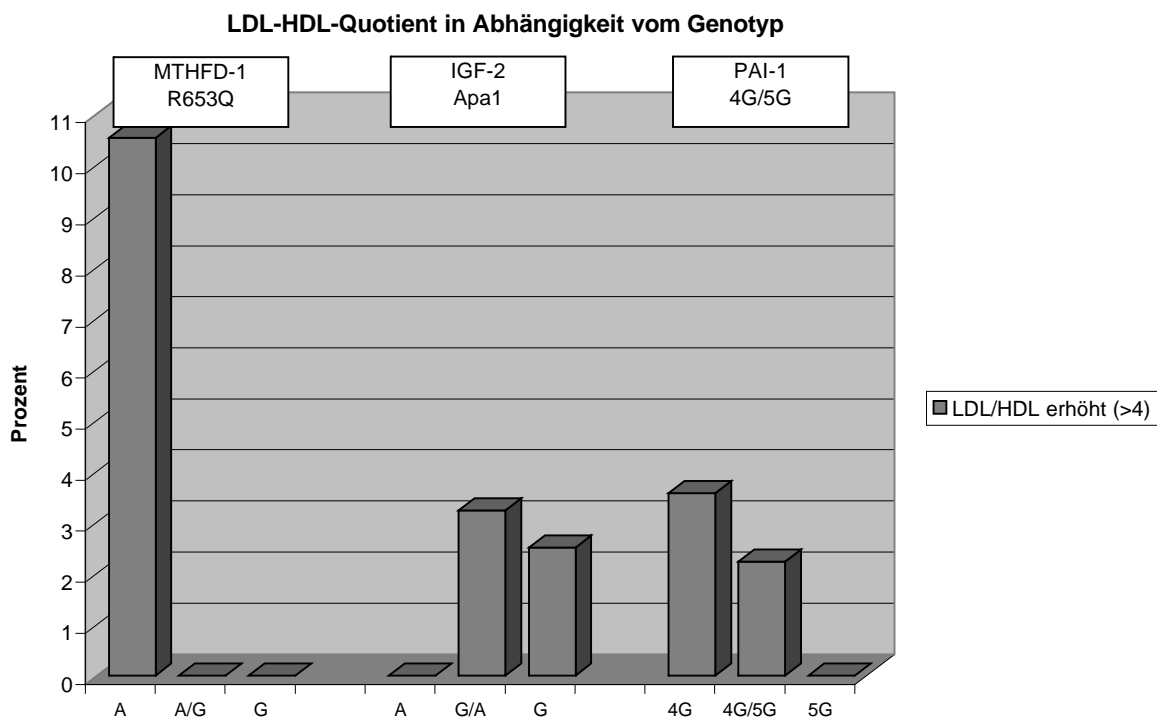


Abb. 5: LDL-HDL-Quotient in Abhängigkeit vom Genotyp

3.2.6 Hyperandrogenämie

Um die Bedeutung der untersuchten Genpolymorphismen für die Androgenspiegel der untersuchten Patientinnen zu prüfen, wurden die Genotypen der Frauen mit dem Bestehen einer biochemisch nachgewiesenen Hyperandrogenämie sowie mit dem Vorliegen von klinischen Androgenisierungszeichen, also Hirsutismus, Akne und androgenbedingter Alopezie korreliert.

Als biochemische Hyperandrogenämie wurden Spiegel des Gesamttestosterons in der Follikelphase von über 60 ng/dl, freies Testosteron über 3,17 pg/ml in der Follikelphase, über 2,48 pg/ml in der Lutealphase oder über 2,01 pg/ml unter oraler Kontrazeption und Androstendionspiegel von über 2,81 ng/ml bei 20- bis 29-jährigen sowie von über 2,9 ng/ml bei 30- bis 50-jährigen Frauen gewertet. Ein DHEAS-Wert von mehr als 3,40 μ g/ml galt ebenfalls als biochemische Hyperandrogenämie, ebenso ein Dihydrotestosteronspiegel von über 95 pg/ml.

3.2.6.1 IGF-2-Gen

Im Ergebnis wiesen 62,50% der Frauen mit PCOS und einer A/A-Genotypvariante des IGF-2-Gens erhöhte Androgenspiegel auf. Bei 43,33% der Patientinnen, die heterozygot bezüglich des IGF-2-Genpolymorphismus waren, fand sich eine biochemisch nachweisbare Hyperandrogenämie. Dasselbe war bei 56,10% der Betroffenen mit homozygotem G/G-Genotyp der Fall. Die Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens einer Hyperandrogenämie bei den Trägerinnen der verschiedenen SNP-Varianten waren aufgrund niedriger Testpower nicht signifikant (Exakter Test nach Fisher: $p=0,51$).

Eine Akne trat unter den Frauen mit homozygotem A-Typ des IGF-2-Gens in 33,33% auf. Patientinnen mit heterozygotem Genotyp wiesen in 62,50% der Fälle eine Akne auf, Homozygote für die G-Variante in 69,70%. Der Anteil an Patientinnen mit Akne war somit unter den Trägerinnen der verschiedenen Genotyp-Varianten nicht signifikant unterschiedlich (Exakter Test nach Fisher: $p=0,23$).

Bezüglich der Zahlen von Patientinnen mit vermehrter Körperbehaarung nach männlichem Behaarungsmuster unter den Trägerinnen der verschiedenen Varianten des IGF-2-Gens fanden sich bei niedriger Testpower keine signifikanten Unterschiede (Exakter Test nach Fisher: $p=0,43$). Hier war nur bei zwei der Betroffenen mit A/A-Variante bekannt, ob sich bei Ihnen Hirsutismus fand, dies war bei beiden der Fall. 16 Patientinnen mit G/G-Genotyp wiesen eine vermehrte Körperbehaarung auf (69,57%), das gleiche war bei elf heterozygoten Frauen der Fall (55%).

Eine androgenbedingte Alopezie lag unter bezüglich des IGF-2-Gen-Polymorphismus Heterozygoten in 16,67% und unter Patientinnen mit Homozygotie für das G-Allel des IGF-2-Genpolymorphismus in 12,50% vor. Zu den Frauen mit A/A-Genotyp kann aufgrund der geringen Anzahl von Betroffenen keine statistisch sinnvolle Aussage gemacht werden. Insgesamt fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Trägerinnen der verschiedenen Varianten des SNP bezüglich der androgenbedingten Alopezie (Exakter Test nach Fisher: $p=0,29$).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass der IGF-2-Polymorphismus das Auftreten von Androgenisierungszeichen bei Patientinnen mit PCOS eher nicht beeinflusst. Auch die gemessenen Androgenspiegel waren nicht vom jeweils vorliegenden Polymorphismus des IGF-2-Gens abhängig.

3.2.6.2 MTHFD-1-Gen

Eine biochemisch messbare Hyperandrogenämie lag bei 63,64% der Patientinnen mit A/A-Genotyp bezüglich des MTHFD-1-SNP vor, bei 51,52% der Heterozygoten und bei 42,86% der Frauen mit G/G-Typ. Somit fanden sich keine signifikanten Unterschiede bei dem Auftreten erhöhter Androgenspiegel zwischen den Trägerinnen der verschiedenen Genotypen (Exakter Test nach Fisher: $p=0,325$).

Bezüglich der Häufigkeit von klinischen Zeichen einer Androgenisierung ergab sich ein Auftreten von Akne bei 75,00% der Patientinnen mit Homozygotie für das A-Allel, bei 46,87% der Heterozygoten und bei 66,67% der G-Homozygoten. Der Unterschied der Häufigkeit war nicht statistisch signifikant (Exakter Test nach Fisher: $p=0,118$).

Hirsutismus bestand bei 71,43% der Frauen mit A/A-Variante, bei 50,00% der Heterozygoten und bei 71,43% der Patientinnen mit G/G-Genotyp. Auch hier bestand keine signifikante Differenz zwischen den Trägerinnen der verschiedenen Polymorphismusvarianten (Exakter Test nach Fisher: $p=0,324$).

Zum Auftreten der Alopezie können keine statistisch verwertbaren Aussagen gemacht werden, weil hier zu wenige Informationen vorhanden sind. Insgesamt ergab sich kein signifikanter Einfluss des MTHFD-1-SNP auf die klinischen Zeichen der Androgenisierung bei den untersuchten Frauen mit PCOS.

3.2.6.3 PAI-1-Gen

Ein erhöhter Androgenspiegel wurde bei 52,38% der Patientinnen mit 4G/4G-Genotyp des PAI-1-Gen-SNP festgestellt. Eine biochemische Hyperandrogenämie bestand auch bei 55,00% der Frauen, die bezüglich dieses Polymorphismus heterozygot waren und bei 45,00% der 5G-Homozygoten. Das Auftreten erhöhter Androgenspiegel bei den PCOS-Patientinnen war somit nicht signifikant vom PAI-1-SNP abhängig (Exakter Test nach Fisher: $p=0,81$).

Eine Akne bestand bei 63,64% der Frauen mit 4G/4G-Genotyp, bei 61,54% der Heterozygoten und bei 55,56% der Patientinnen mit 5G/5G-Variante. Damit war auch die Häufigkeit des Bestehens einer Akne bei den Trägerinnen der verschiedenen Polymorphismusvarianten nicht signifikant unterschiedlich (Exakter Test nach Fisher: $p=0,91$).

Zur androgenbedingten Alopezie konnten aufgrund zu geringer Fallzahlen keine statistisch aussagekräftigen Berechnungen angestellt werden.

Auch der Hirsutismus wurde bei den untersuchten Frauen vom PAI-1-Gen-Polymorphismus nicht beeinflusst. Trägerinnen mit reinem 4G-Genotyp wiesen in 53,33% der Fälle eine verstärkte Körperbehaarung nach männlichem Behaarungsmuster auf, dies war bei 62,96% der Heterozygoten und bei 75,00% der Frauen mit 5G/5G-Genotyp der Fall. Somit war die Häufigkeit nicht signifikant von der jeweils bestehenden Polymorphismus-Variante abhängig (Exakter Test nach Fisher: $p=0,62$).

Hyperandrogenämie und Akne in Abhängigkeit vom Genotyp

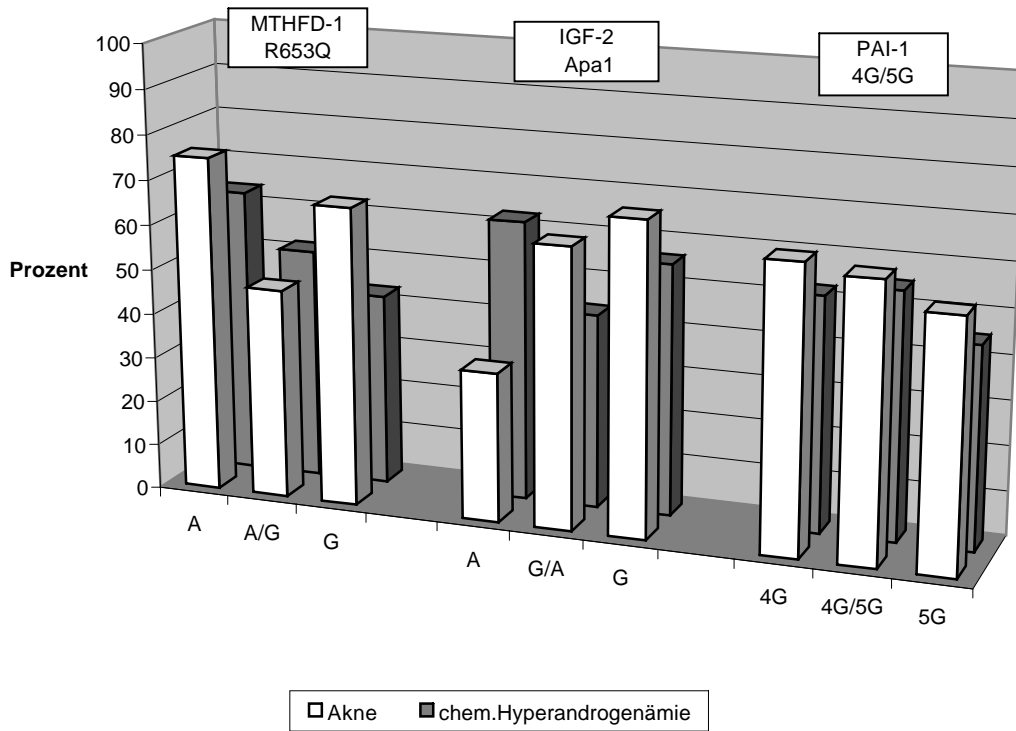


Abb. 6: Hyperandrogenämie und Akne in Abhängigkeit vom Genotyp

Hyperandrogenämie und Hirsutismus in Abhängigkeit vom Genotyp

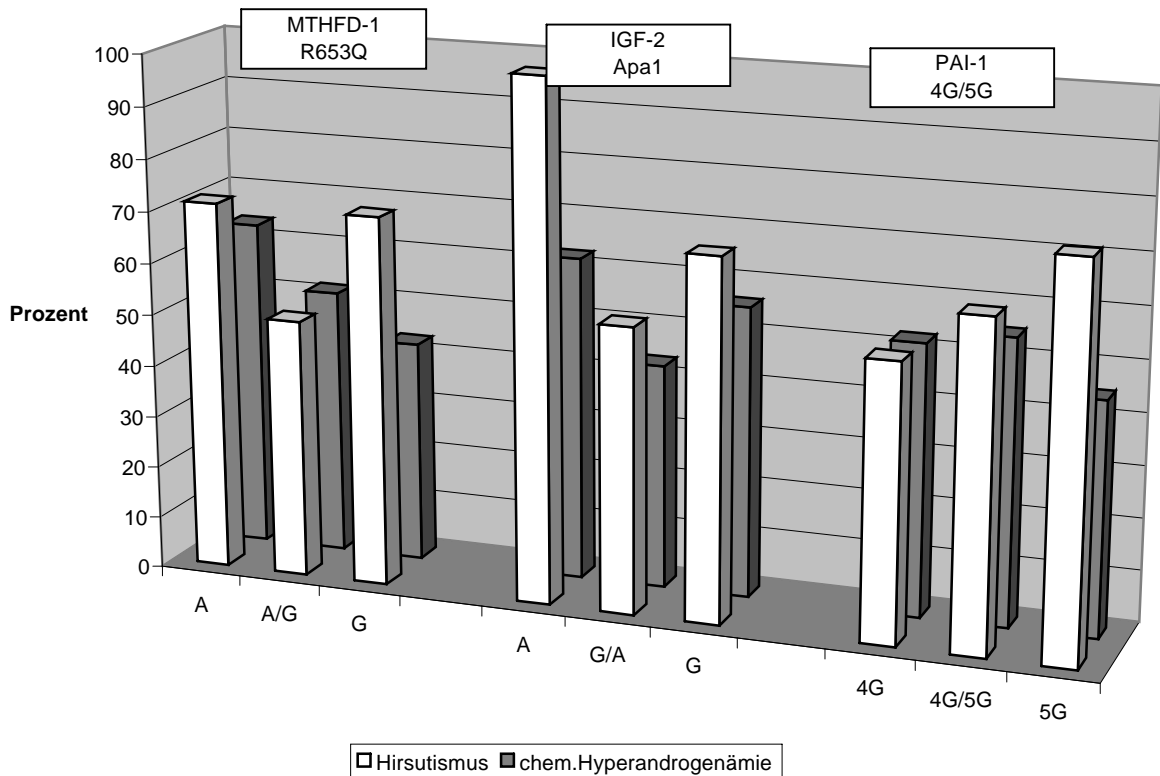


Abb. 7: Hyperandrogenämie und Hirsutismus in Abhängigkeit vom Genotyp

3.2.7 Abortneigung

Eine wesentliche Auswirkung des PCOS für die betroffenen Frauen besteht in der erhöhten Gefahr, einen Abort zu erleiden.

Um den Zusammenhang der SNP mit der Abortneigung zu untersuchen, wurden die Patientinnen nach den jeweils vorliegenden Genotypen gruppiert und auf das Vorliegen von Fehlgeburten in der Anamnese sowie auf den Verlauf von mittels assistierter Reproduktionstherapie erzielter Schwangerschaften hin untersucht.

3.2.7.1 MTHFD-1-Gen

Im Ergebnis hatten eine der Patientinnen mit A-Genotyp (3,85%) und jeweils drei mit A/G- bzw. G-Genotyp (7,14% bzw. 10,71%) vor dem Beginn der Kinderwunschbehandlung anamnestisch über eine Fehlgeburt berichtet, von ihnen hatten zwei Patientinnen (4,76%) mit Heterozygotie und eine mit G-Variante (3,57%) sogar bereits zwei Aborte erlitten. Der Unterschied zwischen den SNP war damit nicht signifikant (Exakter Test nach Fisher: $p=0,70$).

Da Frauen, die eine Sterilitätsbehandlung erhalten, die selben Untersuchungen und gegebenenfalls schwangerschaftsunterstützenden Therapien erhalten, und somit in gewissem Maß von standardisierten Zuständen ausgegangen werden kann, erfolgte ein Vergleich der Abortraten von Patientinnen mit Kinderwunschbehandlung. 25,00% der durch assistierte Reproduktionstherapie erzielten Schwangerschaften von Frauen mit AA-Variante waren nur biochemisch nachzuweisen, 8,33% endeten in einem Früh-, 8,33% in einem Spätabort.

Heterozygote Patientinnen erzielten in 24,14% nur eine biochemische Gravidität, in 13,79% der Schwangerschaften erlitten Sie eine frühe, in 6,90% eine späte Fehlgeburt. Unter den Frauen mit GG-Genotyp endeten 33,33% der Schwangerschaften, bevor sie klinisch nachweisbar waren. In 13,33% der Graviditäten trat ein Frühabort, in 6,67% der Fälle ein Spätabort auf.

Somit ließ sich hier kein statistisch signifikanter Einfluss der Genvariante auf das Auftreten nur biochemisch nachweisbarer Schwangerschaften und Aborte nachweisen (Exakter Test nach Fisher: $p=0,83$).

Die genannten Beobachtungen ändern sich auch dann nicht, wenn man die Patientinnen ausschließt, bei denen eine Thrombophilie aufgrund einer Faktor V Leiden-Mutation, eines Protein C-, S- oder Antithrombin III-Mangels, einer Prothrombin- oder MTHFR-Mutation, oder einer anderen Gerinnungsstörung bekannt ist.

Das Gleiche gilt auch dann, wenn Patientinnen mit bestehender Uteruspathologie, z.B. einem Uterus myomatosus ausgeschlossen wurden.

Die drei PCOS-Patientinnen, bei denen mittels Karyotypisierung eine Chromosomenstörung gefunden wurde, hatten alle keine Fehlgeburten und beeinflussten das Ergebnis der Abortneigung somit nicht. Unter den Partnern der untersuchten PCOS-Patientinnen wurden keine mit Chromosomenaberrationen gefunden.

3.2.7.2 IGF-2-Gen

Von den sieben Frauen, die bezüglich des IGF-2-Gen-Polymorphismus homozygot für das A-Allel waren, hatte eine (14,29%) bereits zwei Fehlgeburten durchgemacht. Unter den

Patientinnen mit G/G-Genotyp fanden sich drei (7,14%) mit einem Abort in der Anamnese. Drei der Frauen (7,89%) mit G/A-Genotyp hatten bereits eine, zwei (5,26%) von ihnen hatten bereits zwei Fehlgeburten erlitten. Für eine statistisch signifikante Aussage reichte die Fallzahl in der Frage des Einflusses des Genotyps auf die Wahrscheinlichkeit für anamnestisch eingetretene Fehlgeburten leider nicht aus.

Im Rahmen der Kinderwunschbehandlung erzielten Frauen mit Homozygotie für das A-Allel in jedem Fall einer biochemisch nachweisbaren auch eine klinisch nachweisbare Schwangerschaft. Jeweils 25,00% davon endeten in einem Früh- bzw. einem Spätabort. Heterozygote erreichten in 27,27% nur eine biochemisch nachweisbare Gravidität. In 9,09% kam es zu einer frühen Fehlgeburt, Spätaborte traten in dieser Gruppe nicht auf. Bei 26,67% der Patientinnen mit G/G-Variante des SNP war eine Schwangerschaft nur biochemisch nachweisbar, 10,00% dieser Frauen erlitten einen Frühabort, in 3,33% kam es zu einem späten Verlust der Gravidität. Somit war die Häufigkeit von nur biochemisch nachweisbaren oder in einen Abort mündenden Schwangerschaften bei den Patientinnen mit den verschiedenen Genotypen nicht signifikant unterschiedlich (Exakter Test nach Fisher: $p=0,92$).

Das gleiche gilt auch nach Ausschluss von Patientinnen, bei denen eine erhöhte Blutgerinnungsbereitschaft oder eine Uteruspathologie und damit eine erhöhte Abortneigung nachgewiesen wurde.

3.2.7.3 PAI-1-Gen

Unter den PCOS-Patientinnen mit bezüglich des PAI-1-Polymorphismus homozygotem 4G-Genotyp hatten bei Aufnahme der Kinderwunschbehandlung zwei (7,41%) bereits zwei Fehlgeburten durchgemacht. Fünf von 47 Frauen (10,64%) mit heterozygotem Genotyp hatten bereits mindestens einen Abort in der Anamnese, bei einer der Betroffenen (2,13%) war es bereits zu zwei Fehlgeburten gekommen. Von den Frauen mit homozygotem 5G-Genotyp hatte keine einen Abort erlitten. Es besteht hier kein signifikanter Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Fehlgeburten durch den PAI-1-Gen-SNP, lediglich ein Trend für weniger Aborte bei Trägerinnen der 5G/5G-Variante (Exakter Test nach Fisher: $p=0,40$)

Dies trifft auch dann zu, wenn nur Frauen ohne nachweisbare Gerinnungsstörungen bzw. ohne Uteruspathologie in die Untersuchung eingeschlossen werden.

Mit assistierter Reproduktionstherapie erzielten Patientinnen mit PCOS, bei denen ein homozygoter 4G-Genotyp nachgewiesen wurde, in 26,32% der Fälle nur eine biochemische Schwangerschaft, bei 10,53% kam es zum Frühabort. Einen Spätabort erlitt keine dieser Frauen. Bei 26,32% der Patientinnen, die bezüglich dieses SNP heterozygot waren, fand sich lediglich ein laborchemischer Nachweis einer Gravidität, bei 13,16% trat eine frühe, bei 10,53% eine späte Fehlgeburt auf. Bei den für das 5G-Allel Homozygoten endeten alle Schwangerschaften mit einer Lebendgeburt.

Somit erzielten die PCOS-Patientinnen mit reinem 5G-Genotyp bei Kinderwunschbehandlung signifikant seltener nur eine biochemische Gravidität und erlitten signifikant seltener einen Abort als Patientinnen mit heterozygotem oder 4G/4G-Typ (Exakter Test nach Fisher: $p=0,01$).

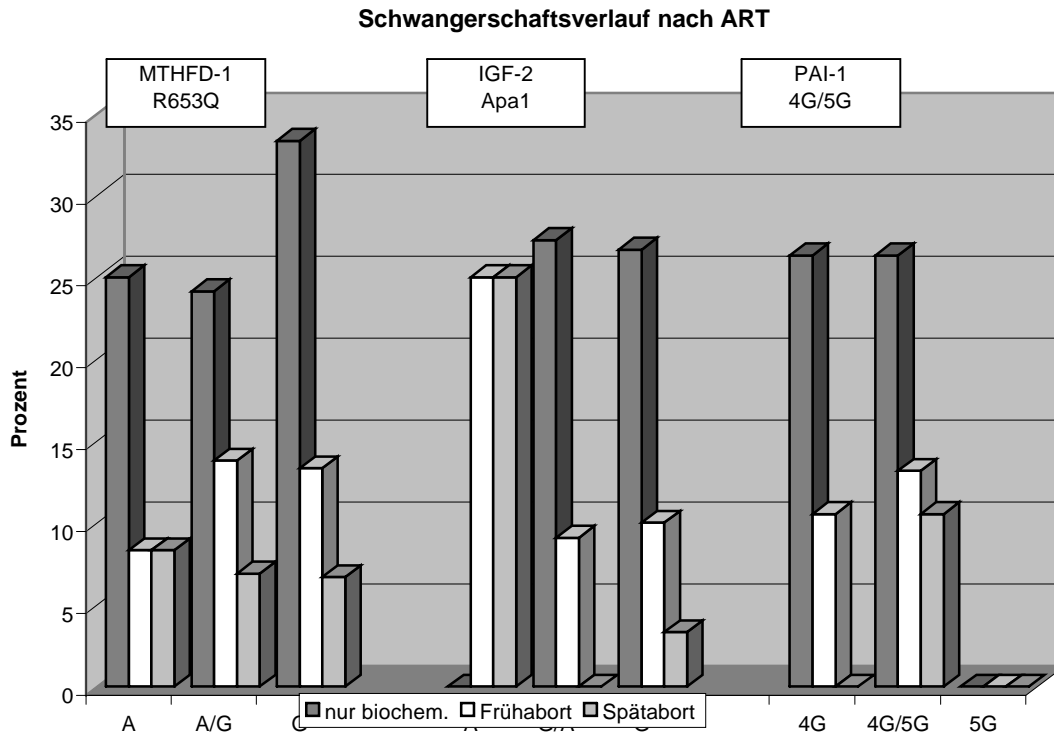


Abb. 8: Schwangerschaftsverlauf nach ART

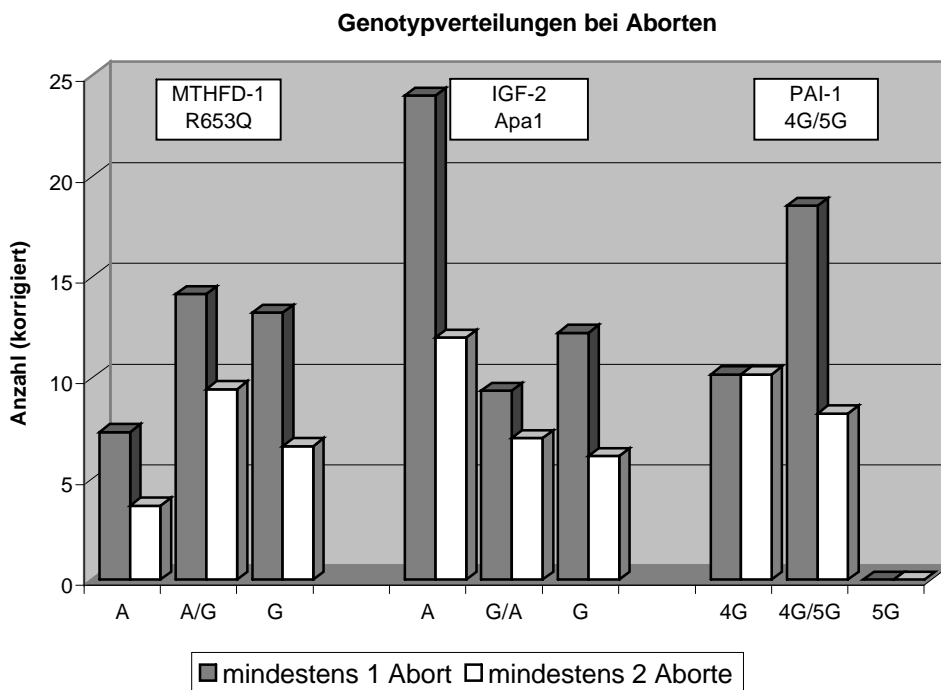


Abb. 9: Genotypverteilungen bei Aborten

3.3 Ergebnisse in tabellarischer Form

SNP	MTHFD-1	IGF-2	PAI-1
Genotypverteilung PCOS / Kontrollen	Keine sign. Unterschiede	Keine sign. Unterschiede	Keine sign. Unterschiede
Allelverteilung PCOS / Kontrollen	Keine sign. Unterschiede	Keine sign. Unterschiede	PCOS-Pat.: Allele nicht sign. unterschiedlich verteilt; Kontrollen: sign. häufiger 4G-Allel; 4G sign. häufiger bei Kontrollen als bei PCOS-Pat.
BMI-Durchschnitt	Kein sign. Einfluss	Kein sign. Einfluss	Kein sign. Einfluss
Gruppierung in schlanke, übergewichtige und adipöse Patientinnen	Kein sign. Einfluss	A/A-Trägerinnen sign. häufiger leicht übergewichtig oder adipös	5G/5G-Trägerinnen sign. häufiger schlank
Insulinsensitivität	Kein sign. Einfluss	Trend: A/A häufiger Insulinresistenz	Kein sign. Einfluss
Gestationsdiabetes	A/A sign. häufiger Gestationsdiabetes	Kein sign. Einfluss	Kein sign. Einfluss
Fettstoffwechsel	A/A sign. häufiger erhöhter LDL-HDL- Quotient	Kein sign. Einfluss	Kein sign. Einfluss
Biochemische Hyperandrogenämie	Kein sign. Einfluss	Kein sign. Einfluss	Kein sign. Einfluss
Akne	Kein sign. Einfluss	Kein sign. Einfluss	Kein sign. Einfluss
Hirsutismus	Kein sign. Einfluss	Kein sign. Einfluss	Kein sign. Einfluss
Alopezie	Keine Aussage mögl.	Kein sign. Einfluss	Keine Aussage mögl.
Androgenisierung insgesamt	Kein sign. Einfluss	Kein sign. Einfluss	Kein sign. Einfluss
Aborte in Anamnese	Kein sign. Einfluss	Kein sign. Einfluss	Trend: 5G/5G weniger Aborte
Aborte nach ART	Kein sign. Einfluss	Kein sign. Einfluss	5G/5G sign. weniger biochem. SS / Aborte

Tab. 1: Ergebnisse

4. Diskussion

4.1 Problematik der Diagnosestellung bei PCOS

Das PCOS wurde im Lauf der Zeit seit seiner Erstbeschreibung 1935 vielfachen Modifikationen hinsichtlich der ausschlaggebenden und zur Diagnose führenden Charakteristika unterworfen [8].

Eine korrekte Diagnosestellung ist – wie überall in der Medizin – auch beim PCOS die Grundlage einer erfolgreichen Therapie. Da jedoch die Ätiologie des PCOS weiterhin nicht vollständig bekannt ist, ist auch die Diagnosestellung nach wie vor nicht abschließend geklärt. Zuletzt einigte man sich auf den von der ESHRE und der ASRM abgehaltenen Konferenzen über die derzeit gültigen Diagnosekriterien [4, 12]. Damit werden künftige Studien besser vergleichbar sein, was dazu beitragen wird, die Ätiologie des PCOS weiterhin besser zu verstehen.

Inzwischen haben sich bereits kritische Autoren geäußert, denen die Kriterien der Rotterdamer Konsensuskonferenz zu ungenau sind. Diese lassen bei einem Subkollektiv der Patientinnen, die ovulatorische Zyklen aber auch polyzystische Ovarien haben und keine Hyperandrogenämie aufweisen, die Diagnosestellung nicht zu. Die betreffenden Patientinnen tragen nach Meinung der Kritiker aber dennoch die für das PCOS typischen Risiken, z.B. für die Entstehung einer Hyperinsulinämie, das Auftreten eines OHSS bei einer Stimulationsbehandlung im Rahmen der assistierten Reproduktion, ausbleibende Implantation oder das Erleiden einer Fehlgeburt [30].

Daneben vermuten die Kritiker, dass viele Patientinnen mit PCO durch eine Reduktion des Körpergewichts eine Normalisierung des konventionellen Ultraschallbefundes erzielen, trotzdem aber eine Neigung zu übermäßiger Reaktion auf eine Ovarstimulation, niedrige Befruchtungsraten, mangelnde Embryonenqualität und niedrigere Lebendgeburtsraten behalten [30].

Um all diese Patientinnen zu identifizieren, ist nach Meinung der Kritiker eine detailliertere Befunderhebung erforderlich. Sie gehen davon aus, dass das PCOS ultrasonografisch ein komplexer Befund ist, dem die Bedingungen der ESHRE-/ASRM-Konferenz nicht gerecht werden.

Ihrer Meinung nach sind zusätzliche quantitative Informationen zum Volumen, zur Echogenität und zum Grad der Vaskularisation des Stromas und des gesamten Ovars erforderlich, die allerdings nur mit dem Einsatz der dreidimensionalen Sonografie erzielt werden könnten. Auch wenn diese nicht allen Klinikern zur Verfügung steht, so fordern manche Forscher, 3D-Ultraschall-bezogene Diagnosekriterien aufzustellen und prospektiv gegenüber der Wertigkeit von zweidimensionalen Ultraschallkriterien zu vergleichen [30].

Neben dem Ultraschallbefund gelten die klinischen Zeichen einer Androgenisierung als Diagnosekriterien nach dem Konsens der Rotterdamer Konferenz [4].

Die meisten Teilnehmer des Treffens waren sich darüber einig, dass der Hirsutismus der bedeutendste klinische Marker für eine Androgenisierung ist [4]. Sie stellten aber selbst fest, dass kaum objektivierte Vergleichsdaten zur Verfügung stehen, die Beurteilung des Grads an übermäßiger Behaarung nach männlichem Behaarungsmuster doch in gewissem Maße subjektiv ist und nur wenige Kliniker standardisierte Methoden anwenden, um den Behaarungszustand der Patientinnen zu beschreiben. Trotzdem ordnete man dem Hirsutismus die entsprechende Wertigkeit als Diagnosekriterium zu [4].

Auch bezüglich der Akne wiesen die Autoren des Konsenspapiers darauf hin, dass Studien widersprüchliche Aussagen zur Prävalenz der Hyperandrogenämie unter den betroffenen Frauen gebracht haben. Trotzdem wurde die Akne als Diagnosekriterium eingestuft [4].

Weniger gut untersucht ist die Aussagekraft der androgenbedingten Alopezie als Zeichen für eine Hyperandrogenämie, sie scheint aber eher ein relativ schwacher Faktor zu sein, wenn es sich nicht um Patienten mit Oligoovulation handelt [94]. Trotzdem wurde auch die androgenbedingte Alopezie in den Katalog der Diagnosekriterien mit aufgenommen [4].

Der biochemische Nachweis einer Hyperandrogenämie wurde von den Teilnehmern der Rotterdamer Konferenz als Hauptmerkmal für das PCOS bezeichnet [4]. Aber auch diesem schrieben die Autoren des Konsenspapiers eine begrenzte Aussagekraft zu. Als Grund dafür wurde genannt, dass viele Untersucher nicht alle Androgene bestimmen und dass auch in der Normalbevölkerung eine große Variationsbreite bezüglich der Serumandrogene besteht. Weiterhin wurde ausgeführt, dass bei der Festlegung der Normwerte das Alter und der BMI der Patientin nicht mitberücksichtigt wurde. Darüber hinaus gebe es einen Mangel an Referenzdaten für Adoleszenten und ältere Frauen. Letztendlich wurde darauf hingewiesen, dass Androgene durch eine hormonelle Therapie relativ schnell beeinflusst werden und dass eine senkende Wirkung auf die Androgene auch nach Absetzen der Hormongabe anhalten kann [4].

Der Spiegel des Luteinisierenden Hormons (LH) ebenso wie das Verhältnis des LH zur Höhe des Follikelstimulierenden Hormons (FSH) ist bei PCOS-Patientinnen im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht. Eine erhöhte LH-FSH-Ratio findet sich bei 95% der Frauen mit PCOS außerhalb der frühen Lutealphase [95]. Bei schlanken PCOS-Patientinnen ist das LH noch höher als bei übergewichtigen [4].

Als eine Grundlage des gesteigerten LH-Spiegels wird eine anhaltend erhöhte Gonadotropin-Releasing-Hormon- (GnRH) Pulsatilität des Hypothalamus angesehen. Als Folge wird die LH-Sekretion der Hypophyse in stärkerem Maß erhöht als die des FSH [9]. Durch das verhältnismäßig niedrige FSH kommt es dann zur Störung der Follikelentwicklung. Das gesteigerte LH wiederum sorgt für eine verstärkte Androgenproduktion im Ovar [9]. Durch die erhöhten Androgenspiegel wird die Progesteronsensitivität des Hypothalamus wiederum erniedrigt. Progesteron verringert normalerweise die GnRH-Pulsfrequenz des Hypothalamus. Durch eine Abschwächung dieser Wirkung kommt es zu einer anhaltend hohen GnRH-Pulsatilität [96].

Forscher vermuten in diesem Teufelskreis einen Weg, der von peripubertärer Hyperandrogenämie, z.B. aufgrund von Adipositas oder Hyperinsulinämie zu der Ausbildung des kompletten Bildes eines PCOS und zu dessen Aufrechterhaltung führen könnte [9].

Im Jahr 2003 einigten sich die Teilnehmer der Konferenz in Rotterdam darauf, dass ein erhöhter LH-Wert für die klinische Diagnosestellung des PCOS nicht obligatorisch sei. Sie sahen die Bestimmung des LH-Spiegels als nützlich an und zwar besonders bei der Untersuchung schlanker Frauen mit Amenorrhoe und in der Forschung. Bezüglich der klinischen Relevanz des LH beim PCOS sah man aber noch Klärungsbedarf [4].

Eine weitere Erscheinung beim PCOS, der eine zentrale Rolle in seiner Pathophysiologie zugeschrieben wird, ist die Insulinresistenz [6, 97]. Inzwischen herrscht Einigkeit darüber, dass ihre Inzidenz bei Patientinnen mit PCOS erhöht ist. Sie wird in der Literatur mit 50 % [6] bis 64,4 % [98] angegeben. Dabei besteht zwischen normal- und übergewichtigen Patientinnen kein Unterschied. [6].

Zur Diagnostik einer Insulinresistenz steht kein einfacher Test zur Verfügung. Ihre Evaluierung erfolgt z.B. durch einen oralen Glucosetoleranztest (OGTT) mit mehrfachen Glucose- und Insulinwertmessungen oder die Berechnung von Indices unter anderem aus Nüchtern-glucose- und -insulinwerten. Zu beachten ist hierbei, dass ein entstehender Diabetes mellitus Typ II mit seiner Veränderung der β -Zellfunktion der Langerhansschen Inseln möglicherweise der Entdeckung durch einen solchen Test entgeht [4]. Eine solche β -Zell-Dysfunktion ist bei 2,6 % der PCOS-Patientinnen zu erwarten [98]. Zur langfristigen Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ II bei Frauen mit PCOS findet man stark schwankende Literaturangaben. Während man für chinesische Patientinnen mit PCOS eine Prävalenz des Diabetes mellitus von 1,9 % gefunden hat [57], betragen Angaben über amerikanische Betroffene bis zu 7,5 % [58]. Neben ethnischen Faktoren dürften hier vor allem unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten und Lebensweisen eine Rolle spielen [57].

Die meisten Frauen mit Insulinresistenz und PCOS kompensieren die Insulinresistenz durch eine erhöhte Insulinsekretion [6]. Die daraus folgende Hyperinsulinämie wird als ein zentraler pathophysiologischer Faktor beim PCOS angesehen [6, 9].

Es ist bekannt, dass Fertilität und Insulinresistenz von Patientinnen mit PCOS durch eine Umstellung der Lebens- und Ernährungsgewohnheiten und durch medikamentöse Behandlung, die auf eine Verbesserung der Insulinsensitivität abzielt, günstig beeinflusst werden können [4].

Da eine gestörte Glucosetoleranz für sich genommen für die Betroffenen eine erhöhte Mortalität bedeutet [99] und außerdem die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ II bei Frauen mit PCOS und gestörter Glucosetoleranz durch die oben genannten Maßnahmen verzögert werden kann [100, 101], wird es als obligatorisch betrachtet, bei Frauen mit PCOS und Übergewicht ab einem BMI von über 27 kg/m² einen OGTT durchzuführen [4].

Trotz der hohen Prävalenz der Insulinresistenz und ihrer Bedeutung für die Pathophysiologie des PCOS statuierten die Teilnehmer der Konsensuskonferenz in Rotterdam 2003, dass das Vorliegen einer Insulinresistenz für die Diagnosestellung des PCOS und die Therapieentscheidung kein obligatorisches Kriterium sei [4].

4.2 Stellenwert genetischer Analysen für die Therapie des PCOS

Eine korrekte Diagnosestellung ist Bedingung für eine erfolgreiche Behandlung. Die Langzeitrisiken, die die Gesundheit der betroffenen Frauen bedrohen, und der Leidensdruck der Patientinnen aufgrund der häufig bestehenden Infertilität bewirken die Notwendigkeit einer wirksamen Therapie des PCOS.

Durch die Schwächen der klinischen Diagnosestellung, die in den Kriterien selbst, in der Vielfältigkeit des Syndroms und im mangelnden Verständnis seiner Ätiologie begründet sind, und durch die Uneinigkeit innerhalb der forschenden Gemeinschaft fällt dem Versuch, genetische Analysen zur Diagnostik des PCOS einzusetzen, besondere Bedeutung zu.

In der vorliegenden Arbeit wurden 242 Patientinnen und 161 Kontrollpersonen untersucht. Diese Fallzahl bringt eine begrenzte Aussagekraft der gefundenen Ergebnisse mit sich. Im Vergleich mit den meisten publizierten wissenschaftlichen Studien der letzten Jahre erweist sich die Größenordnung aber durchaus als beachtlich.

4.3 Genotyp- und Allelverteilungen bezüglich des MTHFD-1-, IGF-2- und PAI-1-Gens

Die Untersuchung der Genotypverteilungen bezüglich der genannten Polymorphismen bei Patientinnen mit PCOS und gesunden Kontrollpersonen ergab für alle drei Gene keine signifikanten Unterschiede.

Auch der Vergleich der Allelverteilungen bei den Polymorphismen des MTHFD-1- und des IGF-2-Gens zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Frauen mit PCOS und nicht Betroffenen.

Lediglich bei der Allelverteilung bezüglich des PAI-1-Gens besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Frauen mit PCOS und den Gesunden.

Bezüglich des MTHFD-1-SNP fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Genotypen und Allele zwischen Frauen mit PCOS und gesunden Kontrollen. Hierzu fanden sich auch bei der Literaturrecherche keine widersprüchlichen Angaben.

Somit erscheint dieser SNP als eher unbedeutsam für die Pathogenese des PCOS. Auf die Auswirkung der einzelnen Genotyp-Varianten auf das klinische Erscheinungsbild des PCOS wird später eingegangen.

Auch bezüglich des IGF-2-Gen-Polymorphismus fanden sich in der vorliegenden Untersuchung sowohl bei der Verteilung der Genotypen als auch der Allele keine signifikanten Unterschiede ($p=0,44$ bzw. $0,41$) zwischen Patientinnen mit PCOS und Gesunden.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Resultaten der Forschergruppe um San Millan von 2004. Sie untersuchte 72 kaukasische Frauen mit PCOS und verglich diese mit 42 gesunden Kontrollen. Die untersuchten Patientinnen waren signifikant häufiger homozygot für das G-Allel der Apa1-Variante des IGF-2-Gens als die Kontrollpersonen [66].

Weitere Studien mit möglichst großen Fallzahlen und streng nach geltenden Diagnosekriterien selektierten Probandinnen würden hier zu einer weiteren Klärung der Bedeutung des IGF-2-SNP beitragen.

Bei der Betrachtung unserer Untersuchungsergebnisse fällt auf, dass bei der Allelverteilung bezüglich des 4G5G-Polymorphismus des PAI-1-Gens ein signifikanter Unterschied zwischen den Frauen mit PCOS und den Gesunden besteht. Bei den PCOS-Patientinnen kommt signifikant seltener (51,9%) das 4G-Allel vor als bei den Kontrollen (59,9%), während das 5G-Allel signifikant häufiger bei Frauen mit PCOS (48,1%) gefunden wird als bei Gesunden (40,1%) ($p=0,03$).

Im Detail betrachtet lag der Anteil homozygoter Trägerinnen der 4G-Variante unter den PCOS-Patientinnen bei 27,1%, unter den nicht betroffenen Frauen betrug der Anteil signifikant mehr, nämlich 36,8% (Exakter Test nach Fisher: $p=0,04$). Umgekehrt lag der Anteil an Patientinnen mit PCOS, die homozygot für das 5G-Allel waren, bei 23,3%, unter den Gesunden deutlich darunter, nämlich bei 17,1%. Es waren mehr als doppelt so viele Gesunde homozygot für das 4G-Allel als für das 5G-Allel, mit 36,8% gegenüber 17,1% war der Unterschied hier deutlich.

Einem protektiven Effekt des 4G-Allels, auf den man durch das häufigere Vorkommen bei den Gesunden hätte schließen können, steht die gleichmäßige Verteilung der beiden Allele bei den Patientinnen mit PCOS entgegen. Allerdings muss man berücksichtigen, dass bei der Ätiologie des PCOS von einem Zusammenspiel mehrerer genetischer Faktoren auszugehen

ist. Die uneindeutigen Ergebnisse bezüglich der Allelverteilung könnten also Ausdruck der Multigenität des PCOS sein.

Um zu prüfen, ob die gefundenen Genotypverteilungen von Patientinnen und Gesunden dem Hardy-Weinberg-Equilibrium entsprechen, wurden die nach dem Hardy-Weinberg-Prinzip zu erwartenden Genotypfrequenzen berechnet. Anschließend wurden die in der Untersuchung gefundenen Genotyphäufigkeiten mittels Chi-Quadrat(χ^2)-Test mit den nach dem Hardy-Weinberg-Prinzip zu erwartenden verglichen.

Dabei ergab sich ein χ^2 -Wert von 0,012 für die PCOS-Patientinnen und von 0,264 für die Kontrollen.

Aufgrund der Anzahlen von untersuchten betroffenen Frauen (n=240) und Kontrollen (n=152) konnten somit bei einem Freiheitsgrad von 1 (Differenz der Anzahl möglicher Genotypen {3} und der Anzahl der zugrunde liegenden Allele {2}) Unterschiede zwischen gefundenen und erwarteten Häufigkeiten von 0,012 nach χ^2 -Test für die PCOS-Patientinnen und von 0,264 für die Kontrollen erkannt werden.

Wirkgrößen für die Unterschiede zwischen Häufigkeiten werden als „sehr gering“ bezeichnet, wenn sie kleiner sind als 0,10, als „klein“ bei Werten zwischen 0,10 und 0,30 und als „mittelgradig“ zwischen 0,30 und 0,50. Wenn Häufigkeiten um mehr als 0,50 differieren spricht man von „großen“ Wirkgrößen.

Somit hätten bei den Größen der untersuchten Gruppen sehr kleine (PCOS-Patientinnen) bzw. kleine (Kontrollen) Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Equilibrium gefunden werden können.

Da die Berechnungen also mit sehr großer (PCOS-Patientinnen) bzw. großer (Kontrollen) Wahrscheinlichkeit Genotyp-Verteilungen gemäß dem Hardy-Weinberg-Equilibrium ergaben, spricht dies für die Abwesenheit von die Ergebnisse verfälschenden Fehlerquellen im Bereich der Genanalysen.

Nach den vorliegenden Ergebnissen könnte man, zumindest wenn auch in anderen Studien übereinstimmend gefunden würde, dass die Genotypverteilungen der untersuchten SNP keine Rolle für das Auftreten eines PCOS spielen, schließen, dass es keinen Zusammenhang zwischen den betrachteten Genomvarianten und der Pathogenese eines PCOS gibt.

Es bestehen jedoch deutliche Differenzen zwischen den verschiedenen bisher dazu durchgeführten Studien.

So stehen beispielsweise die Resultate der vorliegenden Untersuchung den Ergebnissen der Forschergruppe um Diamanti-Kandarakis von 2004 entgegen, die in einer kontrollierten Studie 98 Patientinnen mit PCOS und 64 Kontrollen bezüglich der bestehenden PAI-1-Genvarianten verglichen.

Dort wurde im Ergebnis eine signifikant unterschiedliche Genotypverteilung zwischen Patientinnen und Gesunden gefunden mit signifikant häufigeren 4G/4G- und 4G/5G-Varianten sowie signifikant selteneren 5G/5G-Genotypen in der PCOS-Gruppe [80].

Damit konforme Ergebnisse fanden Glueck et al 2006. Sie wiesen ein signifikant häufigeres Auftreten der 4G-Variante bei Frauen mit PCOS nach [86].

Auch Zhao und Kollegen wiesen 2005 ein häufigeres Auftreten des homozygoten 4G-Genotypen bei 101 PCOS-Patientinnen im Vergleich zu 42 Kontrollpersonen nach [102].

Ein Vergleich von 106 Kaukasierinnen mit PCOS und 102 Kontrollen durch die Forschergruppe um Walch 2005 ergab wiederum keine signifikanten Unterschiede sowohl bei

der Genotyp- als auch bei der Allelverteilung des 4G/5G-Polymorphismus des PAI-1-Gens [103].

Die mangelnde Einheitlichkeit der Ergebnisse mag auf unterschiedlichen angewandten Diagnose- bzw. Ausschlusskriterien oder zu geringen Fallzahlen beruhen, die allgemeine Heterogenität der PCOS-Kollektive und ethnische Unterschiede mögen hier auch eine Rolle spielen. Die mangelnde Reproduzierbarkeit der gefundenen Ergebnisse zeigt jedoch in jedem Fall, dass weitere Anstrengungen unternommen werden müssen, um die Frage nach der Bedeutung der einzelnen Kandidatengene des PCOS endgültig zu beantworten.

Möglicherweise liegt der Grund dafür, dass verschiedene Untersuchungen so oft unterschiedliche Ergebnisse bringen, darin begründet, dass es sich bei dem PCOS weniger um eine Entität einer Erkrankung handelt, sondern vielmehr um eine Gruppe verschiedener Störungen von endokrinen und reproduktiven Funktionen sowie von Stoffwechselfvorgängen, die sich teilweise überschneidende Symptomenkomplexe aufweisen.

Um dieser Theorie nachzugehen, müssten Frauen, die nach den Kriterien von Rotterdam ein PCOS haben, in eng zu definierende Subgruppen eingeteilt werden. Die Patientinnen müssten ganz konkret abgegrenzte Symptome sowie endokrine Merkmale aufweisen. Dann müsste geprüft werden, ob sich Zusammenhänge zwischen den genetischen Befunden der Betroffenen und der jeweiligen Zugehörigkeit zu einer Subgruppe finden und inwieweit innerhalb der Gruppen Korrelationen zwischen genetischen Prädispositionen und klinischen Parametern bestehen.

Es ist möglich, dass sich damit enger definierte Syndrome finden lassen, sowie eine Klärung der Bedeutung genetischer Grundlagen für die Pathogenese der Störung.

Hier sind weitere umfangreiche Untersuchungen für das Verständnis der Pathophysiologie des PCOS bzw. der sich dahinter verbergenden Störungen erforderlich.

4.4 Bedeutung von Single-Nucleotid-Polymorphismen im MTHFD-1-, IGF-2- und PAI-1-Gen für das klinische Bild des PCOS

4.4.1 Körpergewicht

Bei den untersuchten Frauen mit PCOS fanden sich bei der Betrachtung des durchschnittlichen BMI keine signifikanten Unterschiede bezogen auf den vorliegenden IGF-2-Genotyp.

Lediglich bei einer Gruppierung der Patientinnen in Schlanke (BMI < 25 kg/m²), leicht Übergewichtige (BMI zwischen 25 und 29,9 kg/m²) und Adipöse (BMI mindesten 30,0 kg/m²) ergab sich, dass Betroffene mit A/A-Variante signifikant häufiger leicht übergewichtig oder adipös sind als Frauen mit G/A- oder G/G-Genotyp.

San Millan und Kollegen untersuchten 2004 den Einfluss des SNP des IGF-2-Gens auf das klinische Erscheinungsbild von Frauen mit PCOS und fanden keine Auswirkungen auf den BMI der Patientinnen, die in dem untersuchten Kollektiv signifikant häufiger homozygot für das G-Allel des Apa1-SNP waren als die gesunden Kontrollen [66].

Somit ist es fraglich, inwieweit das IGF-2-Gen insgesamt Auswirkung auf das Körpergewicht der Betroffenen hat.

Vom PCOS Betroffene hatten in der vorliegenden Untersuchung bezüglich des PAI-1-Gen-Polymorphismus bei Vorliegen eines 4G/4G-Genotyps einen durchschnittlichen BMI von 27,46 kg/m², bei Heterozygotie von 27,59 kg/m² und bei homozygoter 5G-Variante von 24,72 kg/m². Es besteht hier somit kein signifikanter Unterschied bezüglich des durchschnittlichen Körpermasseindex bei Betrachtung der verschiedenen SNP-Varianten.

Geht man dagegen von Patientinnen aus, die ihrem BMI entsprechend in die Gruppen schlanker, leicht übergewichtiger und adipöser Patientinnen eingeteilt wurden, so findet man in der vorliegenden Untersuchung, dass Frauen mit 5G/5G-Genotyp signifikant häufiger schlank sind als vom PCOS Betroffene mit 4G- oder 4G/5G-Variante.

Zhao und Kollegen hatten dagegen 2005 ein vermehrtes Vorkommen des 4G/4G-Typs bei schlanken Patientinnen im Vergleich zu adipösen gefunden [102].

Sie hatten 101 PCOS-Patientinnen untersucht, die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit beruhen auf der Auswertung des Einflusses des PAI-1-Gen-Polymorphismus bei 143 Patientinnen.

Keine signifikante Auswirkung des PAI-1-SNP auf den BMI der Betroffenen fanden San Millan et al bei der Untersuchung von 72 Frauen mit PCOS [66].

Insgesamt kann somit nicht abschließend geklärt werden, inwieweit der PAI-1-Gen-Polymorphismus eine Auswirkung auf die Körpermasse der Patientinnen hat.

4.4.2 Insulinsensitivität und Gestationsdiabetes

Die Untersuchung der Auswirkung der verschiedenen Varianten des MTHFD-1-Gen-Polymorphismus auf die Insulinsensitivität und die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Gestationsdiabetes ergab zwar keinen signifikanten Einfluss des SNP auf den Insulinsensitivitätsindex, aber dass signifikant mehr Patientinnen mit A/A-Variante einen Gestationsdiabetes entwickelten.

Zusammen mit der Tatsache, dass bei diesen Patientinnen auch signifikant häufiger ein erhöhter LDL/HDL-Quotient gefunden wurde, kann dies einen Hinweis auf einen Einfluss des MTHFD-1-SNP auf die Stoffwechsellage der Patientinnen mit PCOS und deren Risiko für die Komplikationen des Gestationsdiabetes im Falle einer Schwangerschaft bedeuten.

Alle acht untersuchten Patientinnen mit bezüglich des IGF-2-SNP homozygotem A-Genotyp hatten eine mindestens partielle Insulinresistenz. Unter den Heterozygoten betrug der Anteil der Frauen mit Insulinresistenz 57,58 %, unter den Patientinnen mit G/G-Variante 60,0 %.

Aufgrund der geringen Zahl an Patientinnen mit Homozygotie für den A/A-SNP war hier die Testpower niedrig. Somit konnte in der vorliegenden Untersuchung statistisch lediglich ein Trend für eine häufigere Insulinresistenz bei A/A-Homozygoten nachgewiesen werden.

San Millan und Kollegen untersuchten 2004 den Einfluss des SNP des IGF-2-Gens auf das klinische Erscheinungsbild von 72 Frauen mit PCOS und fanden keine Auswirkungen auf die Insulinresistenz bei den Patientinnen, die in dem untersuchten Kollektiv signifikant häufiger homozygot für das G-Allel des Apa1-SNP waren als die gesunden Kontrollen [66].

In der vorliegenden Untersuchung wurde bei 88 Frauen mit PCOS die Insulinsensitivität untersucht.

Im Widerspruch zu dem Auftreten einer Insulinresistenz bei allen Patientinnen mit A/A-Variante steht die Tatsache, dass keine dieser Frauen einen Gestationsdiabetes entwickelte.

Insgesamt waren die Unterschiede zwischen den Patientinnen bezüglich der verschiedenen Varianten des SNP nicht signifikant. Auch hier wäre die Untersuchung einer noch größeren Anzahl von Betroffenen erforderlich, um zu stärker aussagekräftigen, reproduzierbaren und statistisch aussagekräftigen Ergebnissen zu gelangen.

Die verschiedenen Varianten des PAI-1-Gen-Polymorphismus hatten in der vorliegenden Arbeit keine Auswirkung auf das Auftreten einer Insulinresistenz bei den PCOS-Patientinnen. Mit einem Prozentsatz von 56,52 %, 63,41 % bzw. 61,11 % waren die Anteile von Betroffenen mit eingeschränkter Insulinsensitivität bei allen Genomvarianten nahezu gleich groß ($\chi^2 > 0,05$).

Auch eine andere Studie fand bei 72 Frauen mit PCOS keinen Einfluss des PAI-1-SNP auf die Insulinsensitivität der Patientinnen [66].

Auch bei dem Auftreten eines Gestationsdiabetes hatten die verschiedenen Varianten des PAI-1-Gen-Polymorphismus in der vorliegenden Untersuchung keine signifikanten Auswirkungen.

Somit ist davon auszugehen, dass der 4G/5G-Polymorphismus des PAI-1-Gens keine Bedeutung für die Entstehung der häufig auftretenden Insulinresistenz und des Gestationsdiabetes bei Frauen mit PCOS hat.

4.4.3 Fettstoffwechsel

Der IGF-2-Gen-Polymorphismus hatte bei den hier untersuchten Patientinnen mit PCOS keinen signifikanten Einfluss auf den LDL/HDL-Quotient.

Das Gleiche gilt für die Trägerinnen der verschiedenen Varianten des MTHFD-1-Gen-Polymorphismus. Auch diese wirkten sich nicht signifikant auf das LDL/HDL-Verhältnis aus.

In der Literatur ist ein solcher Zusammenhang bisher ebenso nicht beschrieben worden. Eine mögliche pathogenetische Beziehung zwischen den genannten Polymorphismen und dem Fettstoffwechsel ist somit eher unwahrscheinlich.

4.4.4 Hyperandrogenämie

Der untersuchte MTHFD-1-Gen-Polymorphismus zeigte sich in der vorliegenden Untersuchung als nicht ausschlaggebend für das Auftreten von Androgenisierungszeichen bei den Patientinnen mit PCOS.

Zu der Auswirkung des IGF-2-SNP auf die Androgenspiegel der Betroffenen sowie das Auftreten von Hirsutismus und Alopezie sind nur begrenzt gültige Aussagen möglich, da die Testpower der vorliegenden Untersuchung für eine signifikante Beurteilung dieser Fragen zu gering ist. Betroffene mit A/A-Homozygotie litten deutlich seltener unter Akne, aber da sich keine signifikanten Unterschiede bei den Androgenwerten nachweisen ließen, kann nicht abschließend geklärt werden, ob dies direkt auf eine Auswirkung des IGF-2-Polymorphismus zurückgeht.

San Millan und Kollegen untersuchten 2004 ebenfalls den Einfluss des SNP des IGF-2-Gens auf das klinische Erscheinungsbild von Frauen mit PCOS und fanden keine Auswirkungen auf die Hyperandrogenämie bei den Patientinnen, die in dem untersuchten Kollektiv signifikant häufiger homozygot für das G-Allel des Apa1-SNP waren als die gesunden Kontrollen [66].

Der PAI-1-SNP zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Androgenisierungszeichen sowie die Höhe der Androgenspiegel.

San Millan und Kollegen fanden übereinstimmend damit keinen signifikanten Einfluss der PAI-1-Genomvarianten auf die Hyperandrogenämie ihrer untersuchten Patientinnen [66], so dass insgesamt davon ausgegangen werden kann, dass der PAI-1-Gen-Polymorphismus keine Auswirkung auf die Androgenisierung der betroffenen Frauen hat.

4.4.5 Abortneigung

Bei der Untersuchung der Patientinnen fand sich kein signifikanter Einfluss der jeweils vorliegenden Variante des MTHFD-1-Gen-Polymorphismus auf die Wahrscheinlichkeit für das Bestehen anamnestischer Fehlgeburten.

Dies widerspricht Ergebnissen der Forschergruppe um Parle-McDermott von 2005, die ein 1,64-fach erhöhtes Risiko für Aborte bei Frauen mit homozygotem A/A-Genotyp bezüglich des MTHFD-1-SNP fanden. Hier waren insgesamt 125 Patientinnen, die bereits mindestens eine nicht anders erklärbare Fehlgeburt zwischen der 13. und 26. Schwangerschaftswoche erlitten hatten, in die Untersuchung eingeschlossen worden [91].

Der MTHFD-1-Gen-Polymorphismus wirkte sich in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht signifikant auf die Gefahr der 106 Betroffenen aus, im Rahmen der assistierten Reproduktionstherapie eine nur biochemische Schwangerschaft zu erzielen bzw. einen Früh- oder Spätabort durchzumachen.

Insgesamt ergibt sich hier kein Hinweis auf eine die Schwangerschaft von PCOS-Patientinnen gefährdende Auswirkung einer der Varianten des MTHFD-1-Gen-Polymorphismus.

Der IGF-2-Gen-SNP zeigte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls keinen Einfluss auf die Abortgefahr. Hier kann insgesamt davon ausgegangen werden, dass sich der IGF-2-SNP nicht signifikant auf die Abortneigung der PCOS-Patientinnen auswirkt.

Bezogen auf den PAI-1-Gen-Polymorphismus fand sich in der vorliegenden Untersuchung bei spontan eingetretenen Graviditäten ein Trend für eine geringere Wahrscheinlichkeit eines Aborts bei Trägerinnen der 5G-SNP-Variante. Auch bei im Rahmen assistierter Reproduktionstherapie erzielten Schwangerschaften traten bei Patientinnen mit 5G/5G-Genotyp signifikant seltener Fehlgeburten auf.

Ebenso war bei einem Vergleich von Patientinnen, die mindestens einen bzw. mindestens zwei Aborte im Leben erlitten hatten, der homozygote 5G-Genotyp signifikant seltener vertreten.

Diese Ergebnisse entsprechen denen der Forschergruppe um Zhao. Sie wies 2005 ein häufigeres Auftreten des homozygoten 4G-Genotyps bei PCOS nach und fand dabei ein

vermehrtes Vorkommen des 4G/4G-Typs bei PCOS-Patientinnen mit Abort in der Anamnese im Vergleich zu solchen ohne durchgemachte Fehlgeburt [102].

Glueck et al fanden 2006 bei einer signifikant häufigeren 4G-Variante des PAI-1-Polymorphismus bei Patientinnen mit PCOS eine Assoziation des 4G-Allels mit höherer PAI-1-Aktivität und ebenfalls mit erhöhter Fehlgeburtsrate [86].

Somit erscheint hier das 4G- im Vergleich zum 5G-Allel als eher prädisponierend für das Erleiden eines Aborts bei Frauen mit PCOS.

5. Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob und inwieweit der R653Q-SNP im MTHFD-1-Gen, die ApaI-Variante des IGF-2-Gens und der 4G/5G-Polymorphismus des PAI-1-Gens für die Pathogenese des PCOS und seine klinischen Charakteristika verantwortlich sind.

Dafür erfolgte eine Sammlung klinischer Daten sowie eine molekulargenetische Untersuchung von 242 Patientinnen und 161 gesunden Kontrollpersonen. Es wurde gezeigt, dass die genannten SNP nicht die genetische Grundlage des Pathomechanismus des PCOS darstellen.

Lediglich für die Allelverteilung bezüglich des 4G/5G-Polymorphismus des PAI-1-Gens konnte ein Unterschied zwischen Patientinnen mit PCOS und gesunden Kontrollen festgestellt werden. Unter den vom PCOS Betroffenen fanden sich für sich genommen jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Allelverteilung, lediglich bei den gesunden Frauen konnte ein signifikant häufigeres Vorkommen des 4G-Allels nachgewiesen werden.

Auf bestimmte klinische Charakteristika des PCOS, wie die Androgenisierung haben die untersuchten SNP nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit keine Auswirkung.

Andere klinische Parameter werden dagegen signifikant durch die jeweils bestehenden Varianten der Polymorphismen beeinflusst.

So geht bei den Patientinnen die IGF-2-SNP-Variante A/A mit Übergewicht und Adipositas einher, Frauen mit der reinen 5G-Variante des PAI-1-Gen-Polymorphismus sind signifikant häufiger schlank.

Patientinnen mit A/A-Variante des MTHFD-1-Gen-Polymorphismus weisen signifikant häufiger eine Dyslipidämie auf und entwickeln signifikant öfter einen Gestationsdiabetes.

Nach einer Kinderwunschbehandlung treten signifikant weniger Fehlgeburten bei den Frauen mit PCOS auf, die einen reinen 5G-Genotyp des PAI-1-Gen-SNP haben.

Während manche der gefundenen Ergebnisse mit denen anderer Untersucher übereinstimmen, gibt es auch Fragestellungen, bei denen abweichende Resultate von anderen Forschern vorliegen.

Dies macht klar, dass mehr Studien mit sehr hohen Fallzahlen benötigt werden, um zu endgültigen Aussagen zu gelangen. Darüber hinaus ist immer wieder die differierende Diagnosestellung des PCOS ein Grund für uneinheitliche Resultate verschiedener Untersuchungen.

Hier ist es unumgänglich, dass für eine echte Vergleichbarkeit von Forschungsergebnissen einheitliche Diagnosekriterien herangezogen und kompromisslos angewandt werden.

Die mangelnde Reproduzierbarkeit gefundener Ergebnisse zeigt aber in jedem Fall, dass weiterer Klärungsbedarf bezüglich der Bedeutung der untersuchten Kandidatengene besteht.

Die Zahl der Genomvarianten, die mit dem PCOS assoziiert werden, nimmt immer mehr zu. Dies legt nahe, dass es sich bei dem PCOS um eine Störung handelt, deren Pathomechanismus auf dem Zusammenwirken multipler Genveränderungen mit Umweltfaktoren und Lebensgewohnheiten beruht [66].

Weitere Anstrengungen müssen hier unternommen werden, um viele andere in Frage kommende Kandidatengene auf ihre Assoziation mit dem PCOS hin zu untersuchen. Dabei wird stets auf die genaue Auswahl der Probandinnen mit strenger Anwendung der gültigen Diagnosekriterien geachtet werden müssen, bei gleichzeitigem Anstreben des Einschlusses großer Fallzahlen. Darüber hinaus darf das wahrscheinliche Basieren der Pathogenese des PCOS auf multiplen Genveränderungen nicht außer Acht gelassen werden.

Weiterhin bleibt zu klären, ob es sich bei dem PCOS überhaupt um eine einzige Störung handelt oder ob sich dahinter vielmehr mehrere verschiedene Krankheitsentitäten verbergen.

6. Literatur

- [1] Asuncion M, Calvo RM, San Millan JL, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale HF (2000) A prospective study of the prevalence of polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 2434-2438
- [2] Laven JS, Imani B, Eijkemans MJ, Fauser BC (2002) New approaches to PCOS and other forms of anovulation. *Obstet Gynecol Surv* 57, 755-767
- [3] Hughes C, Elgasim M, Layfeld R, Atiomo W (2006) Genomic and post-geomic approaches to polycystic ovary syndrome – progress so far: mini review. *Hum Reprod* 21 (11), 2766-2775
- [4] The Rotterdam ESHRE/ ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group (2004) Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 81 (1), 19-25
- [5] Lin TC, Yen JM, Gong KB, Kuo TC, Ku DC, Liang SF, Wu MJ (2006) Abnormal glucose tolerance and insulin resistance in polycystic ovary syndrome amongst the Taiwanese population – not correlated with insulin receptor substrate-1 Gly972Arg/Ala513Pro polymorphism. *BMC Med Genet* 7, 36
- [6] Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A (1989) Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome, *Diabetes* 38, 1165-1174
- [7] Stein I, Leventhal M (1935) Amenorrhoea associated with bilateral polycystic ovaries, *Am J Obstet Gynecol* 29, 181-191

- [8] Bloom MS, Schisterman EF, Hediger ML (2006) Selecting controls is not selecting “normals”: Design and analysis issues for studying the etiology of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 86 (1), 1-12
- [9] Blank SK, McCartney CR, Marshall JC (2006) The origins and sequelae of abnormal neuroendocrine function in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 12 (4), 351-361
- [10] Cibula D, Hill M, Starka L (2000) The best correlation of the new index of hyperandrogenism with the grade of increased hair. *Eur J Endocrinol* 143, 405-408
- [11] Imani B, Eijkemans MJ, de Jong FH, Payne NN, Bouchard P, Gludice LC (2000) Free androgen index and leptin are the most prominent endocrine predictors of ovarian response during clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrhic infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 676-682
- [12] Brown S (2007) Towards consensus in the treatment of PCOS. *Focus on Reproduction* 5/2007, 18-21
- [13] Checa MA, Requena A, Salvador C, Tur R, Callejo J, Espinos JJ, Fabregues F, Herrero J (2005) Insulin-sensitizing agents: use in pregnancy and as therapy in polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction Update* 11(4), 375-390
- [14] Quezada S, Avellaira C, Johnson MC, Gabler F, Fuentes A, Vega M (2006) Evaluation of steroid receptors, coregulators, and molecules associated with uterine receptivity in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 85 (4), 1017-1026
- [15] Beers MH, Berkow R (1999) *The Merck manual of diagnosis and therapy. Infertility.* Whitehouse Station 1991-1995
- [16] Speroff L, Glass RH, Kase NG (1994) Anovulation and the polycystic ovary. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility* 457-482
- [17] Hull MG (1987) Epidemiology of infertility and polycystic ovarian disease: endocrinological and demographic studies. *Gynecol Endocrinol* 1, 235-245
- [18] Goldzieher JW, Green J (1962) The polycystic ovary. Clinical and histologic features. *J Clin Endocrinol Metab* 22, 325-338
- [19] Tang T, Glanville J, Orsi N, Barth JH, Balen AH (2006) The use of metformin for women with PCOS undergoing IVF treatment. *Hum Reprod* 21 (6), 1416-1425
- [20] Boomsma CM, Eijkemans MJC, Hughes EG, Visser GHA, Fauser BCJM, Macklon NS (2006) A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 12 (6), 673-683
- [21] Hu S, Leonard A, Seifalian A, Hardiman P (2007) Vascular dysfunction during pregnancy in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 22 (6), 1532-1539

- [22] Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL, Cavaghan MK, Imperial J (1999) Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome, *Diabetes Care* 22, 141-146
- [23] Dunaif A (1995) Hyperandrogenic anovulation (PCOS): a unique disorder of insulin action associated with an increased risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med* 98, 33-39
- [24] Burghen G, Givens JR, Kitabachi AE (1980) Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 50, 113-116
- [25] Barbieri R, Makris A, Randall RW, Daniels G, Kistner RW, Ryan KJ (1986) Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of ovarian stroma obtained from women with hyperandrogenism, *J Clin Endocrinol Metab* 62, 904-910
- [26] Nestler J, Jakubowicz DJ, Falcon de Vargas A, Brik C, Quintero N, Medina F (1998) 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
- [27] Nestler JE, Powers LP, Matt DW, Steingold KA, Plymate SR, Rittmaster RS, Clore JN, Blackard WG (1991) A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 72, 83-89
- [28] Ovalle F, Azziz R (2002) Insulin resistance, polycystic ovary syndrome, and type 2 diabetes mellitus. *Fertil Steril* 77, 1095-1105
- [29] Wild RA (2002) Long-term health consequences of PCOS. *Hum Reprod Update* 8, 231-241
- [30] Lam PM, Raine-Fenning N (2006) The role of three-dimensional ultrasonography in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 21 (9), 2209-2215
- [31] Legro RS, Kunesman AR, Dunaif A (2001) Prevalence and predictors of dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome. *Am J Med* 117, 607-613
- [32] Paradisi G, Steinberg HO, Hempfling A, Cronin J, Hook G, Shepard MK, Baron AD (2001) Polycystic ovary syndrome is associated with endothelial dysfunction. *Circulation* 103, 1410-1415
- [33] Pillay OC, Wong Te Fong LF, Crow JC, Benjamin E, Mould T, Atiomo W, Menon PA, Leonard AJ, Hardiman P (2006) The association between polycystic ovaries and endometrial cancer. *Hum Reprod* 21 (4), 924-929
- [34] Amato P, Simpson JL (2005) The genetics of polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 18 (5), 707-718
- [35] Legro RS, Driscoll D, Strauss JF, Fox J, Dunaif A (1998) Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 14956-14960

- [36] Escobar-Morreale HF, Luque-Ramirez M, San Millan JL (2005) The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev* 26, 251-282
- [37] Urbanek M, Woodroffe A, Ewens KG, Diamanti-Kandarakis E, Legro RS, Strauss JF III, Dunaif A, Spielman RS (2005) Candidate gene region for polycystic ovary syndrome on chromosome 19p13.2. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 6623-6629
- [38] Diamanti-Kandarakis E, Piperi C (2005) Genetics of polycystic ovary syndrome: searching for the way out of the labyrinth. *Hum Reprod Update* 11(6), 631-643
- [39] Schüring A, Sonntag B, Kiesel L (2006) Androgene und Insulin in Pathophysiologie und Genetik des PCO-Syndroms. *Gynäkologische Endokrinologie* 3, 143-148
- [40] Rosenfield RL, Barnes RB, Cara JF, Lucky AW (1990) Dysregulation of cytochrome P450c 17 alpha as the cause of polycystic ovarian syndrome. *Fertil Steril* 53, 785-791
- [41] Carey AH, Waterworth D, Patel K, White D, Little J, Novelli P, Franks S, Williamson R (1994) Polycystic ovaries and premature male baldness are associated with one allele of the steroid metabolism gene CYP 17. *Hum Mol Genet* 3, 1873-1876
- [42] Diamanti-Kandarakis E, Bartzis MI, Zapanti ED, Spina GG, Filandra FA, Tsianateli TC, Bergiele AT, Kouli CR (1999) Polymorphism T/C (-34bp) of gene CYP17 promotor in Greek patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 71, 431-435
- [43] Urbanek M, Legro RS, Driscoll DA, Azziz R, Ehrmann DA, Norman RJ, Strauss JF III, Spielman RS, Dunaif A (1999) Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: strongest evidence for linkage is with follistatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 8573-8578
- [44] Gharani N, Waterworth DM, Batty S, White D, Gilling-Smith C, Conway GS, McCarthy M, Franks S, Williamson R (1997) Association of the steroid synthesis gene CYP 11a with polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism. *Hum Mol Genet* 6(3), 397-402
- [45] Wang Y, Wu X, Cao Y, Yi L, Chen J (2006) A microsatellite polymorphism (tttta)_n in the promoter of the CYP11a gene in Chinese women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 86(1), 223-226
- [46] Gaasenbeek M, Powell BL, Sovio U, Haddad L, Gharani N, Bennett A, Groves CJ, Rush K, Goh MJ, Conway GS, Ruokonen A, Martikainen H, Pouta A, Taponen S, Hartikainen AL, Halford S, Jarvelin MR, Franks S, McCarthy MI (2004) Large-scale analysis of the relationship between CYP 11A promoter variation, polycystic ovarian syndrome, and serum testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2408-2413
- [47] Fauser BC, Hsueh AJ (1995) Genetic basis of human reproductive endocrine disorders. *Hum Reprod* 10, 826-846
- [48] Dolzan V, Solyom J, Fekete G, Kovacs J, Rakosnikova V, Votava F, Lebel J, Priblincova Z, Baumgartner-Parzer SM, Riedl S, Waldhauser F, Frisch H, Stopar-Obreza M, Krzisnik C, Battelino T (2005) Mutational spectrum of steroid 21-

- hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 153, 99-106
- [49] Escobar-Morreale HF, San Millan JL, Smith RR, Sancho J, Witchel SF (1999) The presence of the 21-hydroxylase-deficiency carrier status in hirsute women: phenotype-genotype correlations. *Fertil Steril* 72, 629-638
- [50] Möhlig M, Jürgens A, Spranger J, Hoffmann K, Weickert MO, Schlösser HW, Schill T, Brabant G, Schüring A, Pfeiffer AF, Gromoll J, Schöfl C (2006) The androgen receptor CAG repeat modifies the impact of testosterone on insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 155(1), 127-130
- [51] Jääskeläinen J, Korhonen S, Voutilainen R, Hippeläinen M, Heinonen S (2005) Androgen receptor gene CAG length polymorphism in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 83(6), 1724-1728
- [52] Xita N, Tsatsoulis A, Chatzikiyriakidou A, Georgiou I (2003) Association of the (TAAAA)_n repeat polymorphism in the sex hormone-binding globulin (SHBG) gene with polycystic ovary syndrome and relation to SHBG serum levels. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 5976-5980
- [53] Ferk P, Teran N, Cersak K (2007) The (TAAAA)_n microsatellite polymorphism in the SHBG gene influences serum SHBG levels in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 22(4), 1031-1036
- [54] Bendlova B, Zavadilova J, Vankova M, Vejrazkova D, Lukasova P, Vcelak J, Hill M, Cibula D, Vondra K, Starka L, Vrbikova J (2007) Role of D327N sex hormone-binding globuline gene polymorphism in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol* 104 (1-2), 68-74
- [55] Jones MR, Italiano L, Wilson SG, Mullin BH, Mead R, Dudbridge F, Watts GF, Stuckey BGA (2006) Polymorphism in HSD17B6 is associated with key features of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 86(5), 1438-1446
- [56] Escobar-Morreale HF, Villuendas G, Botella-Carretero JJ, Alvarez-Blasco F, Sanchon R, Luque-Ramirez M, San Millan JL (2006) Adiponectin and resistin in PCOS: a clinical, biochemical and molecular genetic study. *Hum Reprod* 21(9), 2257-2265
- [57] Chen X, Yang D, Li L, Feng S, Wang L (2006) Abnormal glucose tolerance in Chinese women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 21 (8), 2027-2032
- [58] Legro RS, Kusanman AR, Dodson WC, Dunaif A (1999) Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 165-169
- [59] Gambineri A, Pelusi C, Manicardi E, Vicennati V, Cacciari M, Morselli-Labate AM, Pagotto U, Pasquali R (2004) Glucose intolerance in a large cohort of Mediterranean women with polycystic ovary syndrome phenotype and associated factors. *Diabetes* 53, 2353-2358

- [60] Waterworth DM, Bennett ST, Gharani N, McCarthy MI, Hague S, Batty S, Conway GS, White D, Todd JA, Franks S, Williamson R (1997) Linkage and association of insulin gene VNTR regulatory polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Lancet* 349, 986-990
- [61] Vankova M, Vrbikova J, Hill M, Cinek O, Bendlova B (2002) Association of insulin gene VNTR polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 967, 558-565
- [62] Tucci S, Futterweit W, Concepcion ES, Greenberg DA, Villanueva R, Davies TF, Tomer Y (2001) Evidence for association of polycystic ovary syndrome in caucasian women with a marker at the insulin receptor gene locus. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 446-449
- [63] Stewart DR, Dombroski BA, Urbanek M, Ankener W, Ewens KG, Wood JR, Legro RS, Strauss JF III, Dunaif A, Spielman RS (2006) Fine mapping of genetic susceptibility to polycystic ovary syndrome on chromosome 19p13.2 and tests for regulatory activity. *J Clin Endocrinol Metab* 91(10), 4112-4117
- [64] Yilmaz M, Ergun MA, Karakoc A, Yurtcu E, Cakir N, Arslan M (2006) Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 22(6), 336-342
- [65] Antoine HJ, Pall M, Trader BC, Chen YD, Azziz R, Goodarzi MO (2007) Genetic variants in peroxisome proliferator-activated receptor gamma influence insulin resistance and testosterone levels in normal women, but not those with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 87 (4), 862-869
- [66] San Millan JL, Corton M, Villuendas G, Sancho J, Peral B, Escobar-Morreale HF (2004) Association of the polycystic ovary syndrome with genomic variants related to insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2640-2646
- [67] Ehrmann DA, Tang X, Yoshiuchi I, Cox NJ, Bell GI (2002) Relationship of insulin receptor substrate-1 and -2 genotypes to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 4297-4300
- [68] Dilek S, Ertunc D, Tok EC, Erdal EM, Aktas A (2005) Association of Gly972Arg variant of insulin receptor substrate-1 with metabolic features in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 84 (2), 407-412
- [69] Ehrmann DA, Schwarz PE, Hara M, Tang X, Horikawa Y, Imperial J, Bell GI, Cox NJ (2002) Relationship of calpain-10 genotype to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 1669-1673
- [70] Vollmert C, Hahn S, Lamina C, Huth C, Kolz M, Schoepfer-Wendels A, Mann K, Bongardt F, Müller JC, Kronenberg F, Wichmann HE, Herder C, Holle R, Loewel H, Illig T, Janssen OE, Kora Gruppe (2006) Calpain-10 variants and haplotypes are associated with polycystic ovary syndrome in caucasians. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292 (3), 836-844

- [71] Gonzalez A, Abril E, Roca A, Aragon MJ, Figueroa MJ, Velarde P, Royo JL, Real LM, Ruiz A (2002) CAPN10 alleles are associated with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3971-3976
- [72] Gonzalez A, Saez ME, Aragon MJ, Galan JJ, Vettori P, Molina L, Rubio C, Real LM, Ruiz A, Ramirez-Lorca R (2006) Specific haplotypes of the Calpain-5 gene are associated with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 21(4), 943-951
- [73] Tapanainen JS, Koivunen R, Fauser BC, Taylor AE, Clayton RN, Rajkova M, White D, Franks S, Anttila L, Pettersson KS, Huhtaniemi IT (1999) A new contributing factor to PCOS: the genetic variant of luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 1711-1715
- [74] Jones MR, Wilson SG, Mullin BH, Mead R, Watts GF, Stuckey BG (2007) Polymorphism of the follistatin gene in polycystic ovary syndrome. *Mol Hum Reprod* 13 (4), 237-241
- [75] Carmina E, Chu MC, Longo RA, Rini GB, Lobo RA (2005) Phenotypic variation in hyperandrogenic women influences the findings of abnormal metabolic and cardiovascular risk parameters. *J Clin Endocrinol Metab* 90(5), 2545-2549
- [76] Lowenstein L, Damti A, Pillar G, Shott S, Blumenfeld Z (2007) Evaluation of endothelial function in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 134 (2), 208-212
- [77] Kolbus A, Walch K, Nagele F, Wenzl R, Unfried G, Huber JC (2007) Interleukin-1 alpha but not interleukin-1 beta gene polymorphism is associated with polycystic ovary syndrome. *J Reprod Immunol* 73 (2), 188-193
- [78] Sayin NC, Gücer F, Balkanli-Kaplan P, Yüce MA, Ciftci S, Küçük M, Yardim T (2003) Elevated serum TNF-alpha levels in normal-weight women with polycystic ovaries or the polycystic ovary syndrome. *J Reprod Med* 48(3), 165-170
- [79] Milner CR, Craig JE, Hussey ND, Norman RJ (1999) No association between the -308 polymorphism in the tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) promoter region and polycystic ovaries. *Mol Hum Reprod* 5, 5-9
- [80] Diamanti-Kandarakis E, Palioniko G, Alexandraki K, Bergiele A, Koutsouba T, Bartzis M (2004) The prevalence of 4G5G polymorphism of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene in polycystic ovarian syndrome and its association with plasma PAI-1 levels. *Eur J Endocrinol* 150, 793-798
- [81] Orio F Jr, Palomba S, Cascella T, Tauchmanova L, Nardo LG, Di Biase S, Labella D, Russo T, Savastano S, Tolino A, Zullo F, Colao A, Lombardi G (2004) Is plasminogen activator inhibitor-1 a cardiovascular risk factor in young women with polycystic ovary syndrome? *Reprod Biomed Online* 9(5), 505-510
- [82] Tarkun I, Canturk Z, Arslan BC, Turemen E, Tarkun P (2004) The plasminogen activator system in young and lean women with polycystic ovary syndrome. *Endocr J* 51(5), 467-472

- [83] Glueck CJ, Wang P, Goldenberg N, Sieve L (2004) Pregnancy loss, polycystic ovary syndrome, thrombophilia, hypofibrinolysis, enoxaparin, metformin. *Clin Appl Thromb Hemost* 10(4), 323-334
- [84] Sills ES, Drews CD, Perloe M, Tucker MJ, Kaplan CR, Palermo GD (2003) Absence of profound hyperinsulinism in polycystic ovary syndrome is associated with subtle elevations in the plasminogen activator inhibitor system. *Gynecol Endocrinol* 17(3), 231-237
- [85] Glueck CJ, Wang P, Bornovali S, Goldenberg N, Sieve L (2003) Polycystic ovary syndrome, the G1691A factor V Leiden mutation, and plasminogen activator inhibitor activity: associations with recurrent pregnancy loss. *Metabolism* 52(12), 1627-1632
- [86] Glueck CJ, Sieve L, Zhu B, Wang P (2006) Plasminogen activator inhibitor activity, 4G5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor 1 gene, and first-trimester miscarriage in women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 55(3), 345-352
- [87] Cara JF (1994) Insulin-like growth factors, insulin-like growth factor binding proteins and ovarian androgen production. *Horm Res* 42, 49-54
- [88] Mesiano S, Katz SL, Lee JY, Jaffe RB (1997) Insulin-like growth factors augment steroid production and expression of steroidogenic enzymes in human fetal adrenal cortical cells: implications for adrenal androgen regulation. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 1390-1396
- [89] L'Allemand D, Penhoat A, Lebrethon MC, Ardevol R, Bähr V, Ölkens W, Saez JM (1996) Insulin-like growth factors enhance steroidogenic enzyme and corticotropin receptor messenger ribonucleic acid levels and corticotropin steroidogenic responsiveness in cultured human adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 3892-3897
- [90] Smith A, Patterson C, Yarnell J, Rumley A, Ben-Shlomo Y, Lowe G (2005) Which hemostatic markers add to the predictive value of conventional risk factors for coronary heart disease and ischemic stroke? The Caerphilly Study. *Circulation* 112(20), 3080-3087
- [91] Parle-McDermott A, Pangilinan F, Mills JL, Signore CC, Molloy AM, Cotter A, Conley M, Cox C, Kirke PN, Scott JM, Brody LC (2005) A polymorphism in the MTHFD1 gene increases a mother's risk of having an unexplained second trimester pregnancy loss. *Mol Hum Reprod* 11(7), 477-480
- [92] Rozen R, Barton D, Du J, Hum DW, MacKenzie RE, Francke U (1989) Chromosomal localization of the gene for the human trifunctional enzyme, methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase. *Am J Hum Genet* 44, 781-786
- [93] Matsuda M, DeFronzo RA (1999) Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 22(9), 1462-1470

- [94] Futterweit W, Dunaif A, Yeh C, Kingsley P (1988) The prevalence of hyperandrogenism in 109 consecutive female patients with diffuse alopecia. *J Med Acad Dermatol* 19, 831-836
- [95] Taylor AE, McCourt B, Martin K, Anderson EJ, Adams J, Schoenfeld D, Hall JE (1997) Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinically defined women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 2248-2256
- [96] Soules MR, Steiner RA, Clifton DK, Cohen NL, Aksel S, Bremner WJ (1984) Progesterone modulation of pulsatile luteinizing hormone secretion in normal women. *J Clin Endocrinol metab* 58, 378-383
- [97] Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS (2004) The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 60(1), 1-17
- [98] De Ugarte CM, Bartolucci AA, Azziz R (2005) Prevalence of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment. *Fertil Steril* 83, 1454-1460
- [99] Tominaga M, Eguchi H, Manaka H, Igarashi K, Kato T, Sekikawa A (1999) Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. The funagata diabetes study. *Diabetes Care* 22, 920-924
- [100] Buchanan TA, Xiang AH, Peters RK, Kjos SL, Marroquin A, Goico J, et al (2002) Preservation of pancreatic beta-cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk hispanic women. *Diabetes* 51, 2798-2803
- [101] Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, et al (2002) Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346, 393-403
- [102] Zhao JL, Chen ZJ, Zhao YR, Zhao LX, Wang LC, Tang R, Ma ZX (2005) Correlation between 4G and 5G genotypes distribution of plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphism in its promoter region with polycystic ovarian syndrome. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 40(8), 528-531
- [103] Walch K, Grimm C, Huber JC, Nagele F, Kolbus A, Hefler LA (2005) A polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene promoter and the polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 123(1), 77-81
- [104] Fink S (2008) Outcome von Patientinnen mit Polyzystischem Ovar-Syndrom (PCOS) und Einfluss von Metformin im Rahmen der assistierten Reproduktion. (Dissertation)