

**Verläufe der Serumkonzentrationen
von Pregnancy-Associated Plasma Protein A
im Spontan- und Stimulationszyklus**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Alena Katharina Brewka
aus Bonn

2013

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. H. van der Ven
2. Gutachter: Prof. Dr. med. D. Klingmüller

Tag der Mündlichen Prüfung: 02.09.2013

Aus dem Zentrum für Geburtshilfe und Gynäkologie der Universität Bonn
(Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. H. van der Ven)
Direktor: Prof. Dr. med. W. Kuhn

Für Oma Hilde

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	10
1.1 Allgemeine Informationen zu PAPP-A.....	10
1.2 Genlokalisierung, Proteinstruktur und Enzymaufbau von PAPP-A.....	11
1.2.1 Genlokalisierung von PAPP-A.....	11
1.2.2 Proteinstruktur von PAPP-A.....	12
1.2.3 PAPP-A als Monomer, Homodimer und Heterotetramer.....	13
1.3 Funktion von PAPP-A.....	14
1.3.1 Allgemeine Funktion von PAPP-A im IGF-System.....	14
1.3.2 Spezielle Funktion von PAPP-A im ovariellen IGF-System.....	17
1.4 Die intra- und extraovarielle Follikelstimulation.....	19
1.4.1 Kopplung der intra- und extraovariellen Regulationssysteme.....	19
1.4.2 Ablauf der Follikelreifung.....	20
1.5 Expressionsprofile der IGF-Systemkomponenten je nach Größe und... Funktionszustand der Follikel.....	21
1.6 Fragestellung.....	22
2. Material und Methoden	25
2.1 Erhebung der Daten.....	25
2.2 Beschreibung des Patientenkollektivs.....	25
2.3 Ein- und Ausschlusskriterien.....	26
2.3.1 Einschlusskriterien.....	26
2.3.2 Ausschlusskriterien.....	27
2.4 Messung von PAPP-A.....	28
2.4.1 Prinzip eines enzymgekoppelten Immunadsorbtionstests (ELISA).....	28
2.4.2 Durchführung des PAPP-A-ELISA.....	29
2.5 Statistische Methoden.....	30
3. Ergebnisse	32
3.1 Klassifizierung des Patientenkollektivs.....	32

3.2	Veränderungen von PAPP-A unter follikulärer Stimulation.....	33
3.3	Veränderungen von PAPP-A im Zyklusverlauf.....	36
3.4	Zusammenhang zwischen PAPP-A und zyklusabhängigen Faktoren.....	38
3.4.1	PAPP-A und Estradiol.....	38
3.4.2	PAPP-A und das Follikelwachstum.....	39
3.4.2.1	PAPP-A und die Follikelanzahl.....	39
3.4.2.2	PAPP-A und die Follikelgröße des dominanten Follikels.....	41
3.4.3	PAPP-A und die Endometriumsdicke.....	42
3.5	Zusammenhang zwischen PAPP-A und zykluskonstanten Faktoren.....	43
3.5.1	PAPP-A und Patientenalter, Patientengröße, Patientengewicht und..... Body-Mass-Index (BMI).....	43
3.5.2	PAPP-A und Sterilität, Anzahl von Schwangerschaften, Geburten und.. Aborten.....	45
3.5.3	PAPP-A und Diagnosen der Patientinnen.....	45
4.	Diskussion	48
4.1	Ziele der Arbeit.....	48
4.2	Bewertung der Methode.....	48
4.3	Auswertung der Ergebnisse.....	49
4.3.1	Das Patientenkollektiv.....	49
4.3.2	Veränderungen von PAPP-A unter follikulärer Stimulation.....	50
4.3.3	Veränderungen von PAPP-A im Zyklusverlauf.....	52
4.3.4	Einfluss zyklusabhängiger Faktoren auf PAPP-A.....	53
4.3.4.1	Hormonelle Veränderungen unter Hyperstimulation.....	53
4.3.4.2	Veränderungen des Follikelwachstums unter Hyperstimulation.....	55
4.3.4.3	Veränderungen des Endometriums unter Hyperstimulation.....	56
4.3.5	Einfluss zyklusunabhängiger Faktoren auf PAPP-A.....	57
4.3.5.1	Einfluss von Gewicht, Größe und BMI auf PAPP-A.....	57
4.3.5.2	Einfluss des Patientenalters auf PAPP-A.....	58
4.3.5.3	Einfluss von Sterilität, Gravidität, Parität und Aborten auf PAPP-A.....	59
4.3.5.4	Einfluss von Erkrankungen und Medikamente auf PAPP-A.....	59
5.	Zusammenfassung	62

6.	Abbildungsverzeichnis.....	64
7.	Tabellenverzeichnis.....	65
8.	Literaturverzeichnis.....	66
9.	Danksagung.....	77
10.	Lebenslauf.....	78

Abkürzungsverzeichnis

ACS	Akutes Coronarsyndrom
AS	Aminosäure
BMI	Body-Mass-Index
BMP-15	Oocyte derived bone morphogenetic Protein-15
CCP	Complement-Control-Protein
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DS	Downsyndrom
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay (dt: Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin releasing Hormon, Gonadoliberin
HCG	Humanes Choriogonadotropin
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP	Insulin-like growth factor binding protein
mIU/L	micro international unit(s) per liter
IUI	Intrauterine Insemination
IVF	In-vitro-Fertilisation
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
k.o.	knock-out
LG	Laminin-G
LH	Luteinisierendes Hormon
LNR	Lin-12-Notch-Repeats
M	Messphase
M1	Messphase 1: frühe Follikelphase
M2	Messphase 2: später Follikelphase
M3	Messphase 3: Ovulationsinduktion
M4	Messphase 4: Lutealphase
MPB	Metallobasicprotein
OHS	Ovarielle Hyperstimulation

p	Signifikanz
PAPP-A	Pregnancy-associated plasma protein-A
SCR	Short Consensus Repeats
SST	Schwangerschaftstest
TMB	Tetramethylbenzidin
VZO	Verkehr zum Zyklusoptimum
w.t.	Wildtype
ZT	Zyklustag

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Informationen zu PAPP-A

Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) ist ein Bestandteil des Insulin-like growth factor (IGF)-Systems. Es ist die Protease des Insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4), die durch dessen Spaltung zu einer Freisetzung von IGF führt (Boldt und Conover, 2007). PAPP-A wurde erstmals 1974 isoliert und als ein Plasmaprotein der Plazenta identifiziert (Lin et al., 1974), das während der Schwangerschaft in hohen Konzentrationen im maternalen Serum zirkuliert (Guidence et al., 2002) und für die adäquate Plazentareifung sowie die Fetalentwicklung essentiell ist (Conover et al., 2004b). Nachdem in den 90er Jahren verschiedene Arbeitsgruppen auch in diversen anderen Zellen eine proteolytische Aktivität gegen IGFBP-4 beschrieben (Conover et al., 1993; Durham et al., 1994; Parker et al., 1995), gelang es Lawrence et al. 1999 nachzuweisen, dass diese identisch mit dem plazentaren PAPP-A sind. Gleichzeitig konnte damit gezeigt werden, dass PAPP-A nicht nur schwangerschaftsassoziiert vorliegt, wie sein Name suggeriert, sondern bei Männern und Frauen sowohl von Geweben des Reproduktionstraktes (Ovar, Tube, Endometrium, Myometrium) als auch außerhalb davon (Leber, Niere, Dickdarm, Knochen, Brust, Gehirn) gebildet wird (Conover et al., 1999; Overgaard et al., 1999). Es wurden daher vielfältigere Funktionen von PAPP-A als wichtiger Regulator der lokalen IGF-Bioverfügbarkeit durch den gezielten Abbau von IGFBP-4 bei angenommen (Abb.1; Boldt und Conover, 2007). Aus diesem Grund wird PAPP-A heute in Zusammenhang mit diversen Wachstums-, Reparatur- und Umbaumechanismen wie dem Knochenumbau (Ortiz et al., 2003; Qin et al., 1999) und der Wundheilung (Lawrence et al., 1999) gesehen. Zudem kann im Rahmen von entzündlichen Prozessen eine Steigerung der PAPP-A-Aktivität gefunden werden (Che et al., 2002; Conover et al., 2004; Resch et al., 2004), weshalb PAPP-A als Serummarker für das Akute Coronarsyndrom (ACS) ins Gespräch gekommen ist (Bayes-Genis et al., 2000; Bayes-Genis et al., 2001; Chyu und Shah, 2001; Cosin-Sales et al., 2004 / 2005; Qin et al., 2002). Klinische Anwendung als Serummarker hat PAPP-A bereits seit langem in der Schwangerschaftsvorsorge erlangt, da es im Rahmen des Ersttrimester-Screening zur Diagnose des Downsyndroms (DS) eingesetzt wird (Berry et al., 1997; Bersinger et al., 1995; Brizot und Noble, 1999; Krantz et al., 1996; Palomaki et al., 2006; Wald et al., 1992; Wald et al., 1999).

Im Fokus dieser Arbeit stehen die ovariellen Funktionen von PAPP-A, da es als Bestandteil des intraovariellen IGF-Systems und zusammen mit extraovariellen Hormonen der Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse an der Regulation der Follikelreifung und Dominanzausbildung eines Follikels sowie der Bildung des Corpus luteums (Brogan et al., 2010) beteiligt ist. PAPP-A wird im Ovar von den Granulosazellen synthetisiert (Conover et al., 2001) und fördert dort durch den Abbau des inhibitorischen IGFBP-4 und die Freisetzung von IGF lokal die mitotische und steroidogene Aktivität der Follikel.

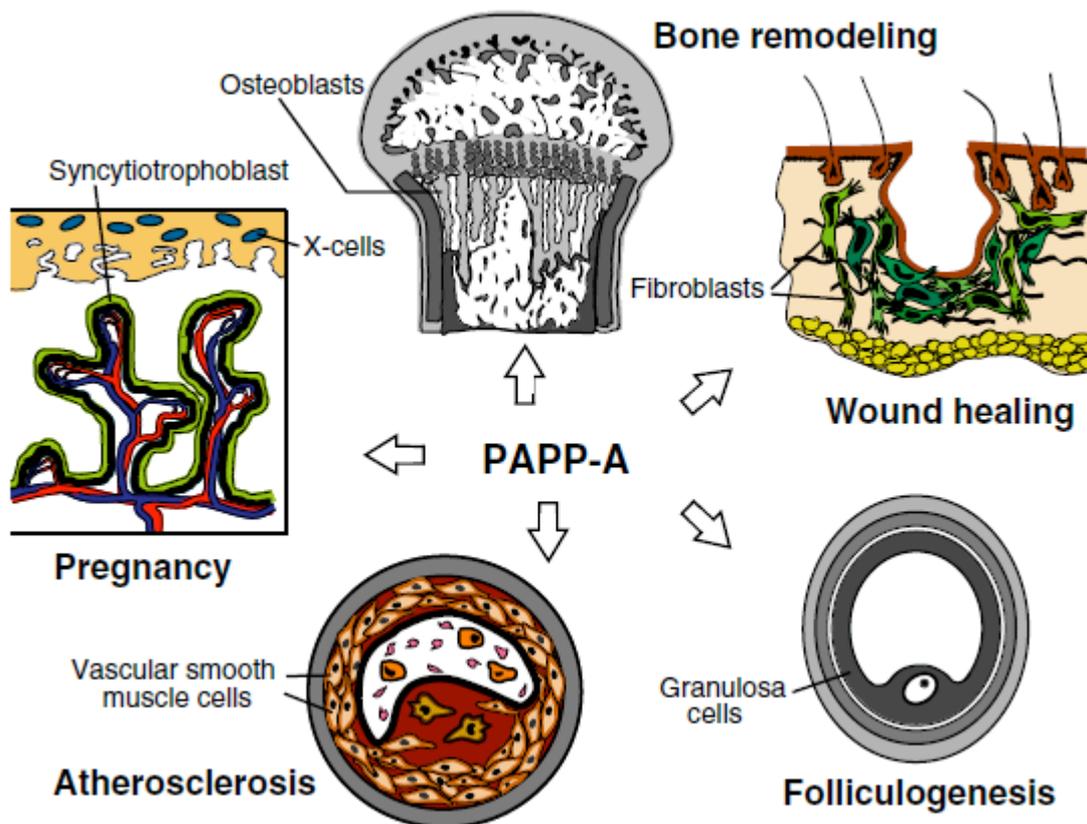


Abb. 1: Orte der Synthese und lokale Funktionen von PAPP-A. PAPP-A wird von verschiedenen Zellen des menschlichen Körpers synthetisiert und ist an zahlreichen Wachstums-, Reparatur- und Umbaumechanismen beteiligt (nach Boldt und Conover, 2007).

1.2 Genlokalisierung, Proteinstruktur und Enzymaufbau von PAPP-A

1.2.1 Genlokalisierung von PAPP-A

Das PAPP-A-Gen des Menschen liegt auf Chromosom 9q33.1 (Silahataroglu et al., 1993). Es umfasst etwa 200 kb Desoxyribonukleinsäure (DNA) und enthält 22 Exons

sowie 21 Introns (Overgaard et al., 2003). Die DNA-Sequenz des PAPP-A-Gens kodiert als primäres Translationsprodukt ein Präproprotein, das sich aus einem putativen Basensignal, einem Propeptinsignal und dem endgültigen Protein zusammensetzt (Boldt et al., 2006; Haaning et al., 1996; Kirstensen et al., 1994). Die Präpro-Anteile von PAPP-A sind wichtig für seine Faltung und Sekretion (Overgaard et al., 2000).

1.2.2 Proteinstruktur von PAPP-A

PAPP-A ist ein großes Glykoprotein, das aus 5 Domänen zusammensetzt wird. Die Domänen können hinsichtlich ihrer Größe, Struktur und Funktion unterschieden werden (Abb. 2; Boldt und Conover, 2007).

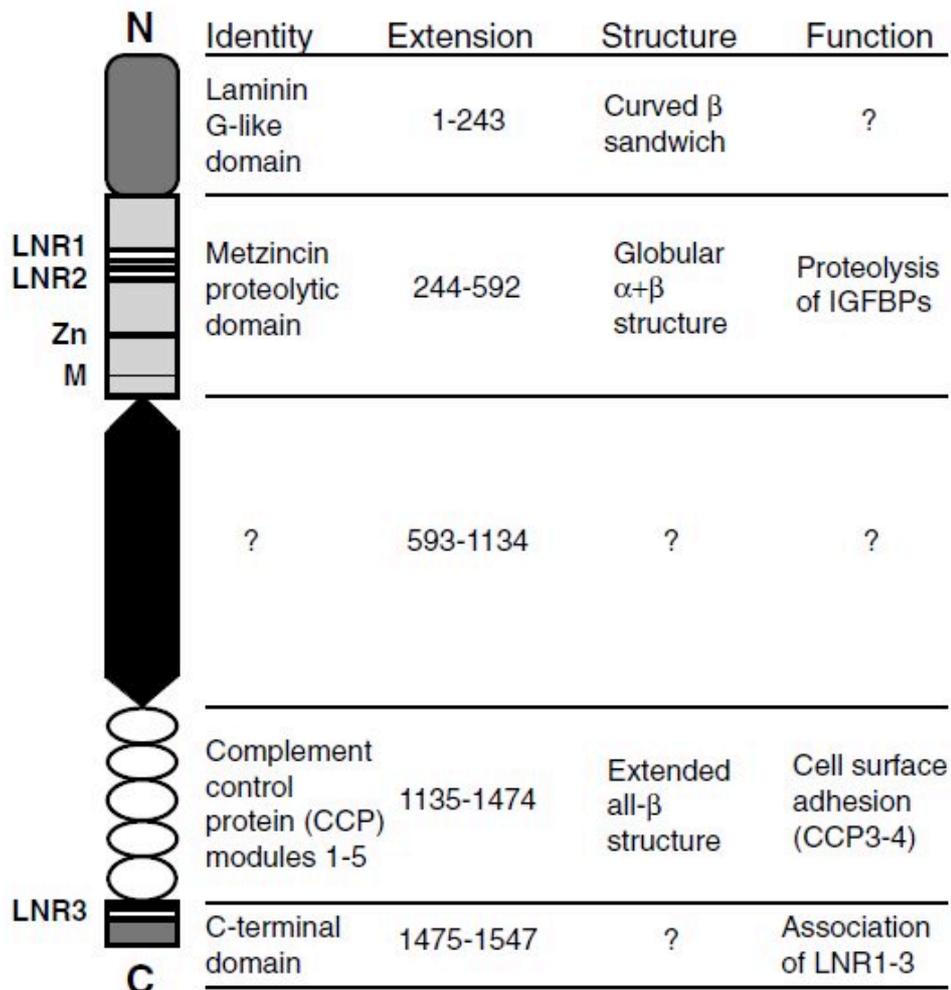


Abb. 2: Das PAPP-A-Polypeptid. Schematische Darstellung des PAPP-A-Polypeptides mit Unterteilung in die 5 Domänen. Anzeige der Ausdehnung, Struktur und Funktion der Domänen (nach Boldt und Conover, 2007).

Die N-terminale Domäne von PAPP-A umfasst die ersten 243 Aminosäuren (AS) und wird als Laminin-G(LG)-like Domäne bezeichnet. LG-like Domänen können in verschiedenen Proteinen gefunden werden (Rudenko et al., 2001) und zeichnen sich durch die LG-Struktur aus 14 β -Strängen aus, die ein Sandwich aus zwei β -Faltblättern bildet. Diese stellen meist die Bindestelle für die Substrate der Proteine dar (Rudenko et al., 2001). In PAPP-A fungiert die LG-Domäne wahrscheinlich als Stabilisator der benachbarten proteolytischen Domäne und ist während der Expression erforderlich (Boldt et al., 2006).

Die proteolytische Domäne von PAPP-A besteht aus ungefähr 350 AS und hat die Funktion, IGFBP-4 zu spalten. Außerdem können in dieser Domäne von PAPP-A zwei weitere Merkmale gefunden werden: eine verlängerte zinkbindende Sequenz und ein Met-Turn (Kirstensen et al., 1994). Diese Merkmale sind charakteristisch für die Superfamilie der Metzinitin-Metalloproteinasen, zu der die Matrixine, Serralysine, Astacine und Adamalysine zählen.

PAPP-A ist Gründer und Namensgeber der neuesten 5. Unterfamilie der Metzinitin-Metalloproteinasen, den Pappalysinen (Boldt et al., 2001), zu der außerdem PAPP-A-2 und Uilysin gehören. Innerhalb der proteolytischen Domäne von PAPP-A hat man außerdem zwei der insgesamt drei Lin-12-Notch-repeats (LNR) von PAPP-A gefunden, die aus 30 AS bestehen und Calcium binden, welches für den Abbau von IGFBP essentiell ist (Boldt et al., 2004).

Die dritte, zentrale Domäne von PAPP-A umfasst 500 AS. Ihre Struktur und Funktion sind bislang unbekannt. Die vierte Domäne enthält 5 Complement-Control-Protein(CCP)-Module, auch bekannt als Short Consensus Repeats (SCR), die aus jeweils 60 AS gebildet werden und eine ellipsoide Struktur aus β -Strängen formen. Die CCP-Module geben PAPP-A die Fähigkeit, Zelloberflächen zu binden (Boldt und Conover, 2007). Das C-terminale Ende von PAPP-A besteht aus 70 AS und bildet die fünfte Domäne. Es enthält wie die proteolytische Domäne ein weiteres, drittes LNR (Boldt und Conover, 2007).

1.2.3 PAPP-A als Monomer, Homodimer und Heterotetramer

PAPP-A kann in drei Formen vorliegen. Zunächst wird es als 200 kDa schweres Monomer synthetisiert. Zwei dieser PAPP-A Monomere können über eine Disulfidbrücke mit-

einander verbunden werden, so dass ein Homodimer entsteht. Dabei liegen die PAPP-A-Monomere in antiparalleler Ausrichtung zueinander vor, so dass sich LNR-1 und -2 des einen Monomers mit LNR-3 des Anderen assoziieren können (Boldt und Conover, 2007). Dies ist für die proteolytische Aktivität gegen IGFBP-4, nicht aber IGFBP-5, erforderlich und so entsteht ein aktives, 400 kDa schweres PAPP-A-Homodimer (Abb. 3a).

Außerdem kann PAPP-A mit dem proMetallobasicprotein (MBP) einen 2:2 heterotetrameren PAPP-A-proMBP-Komplex von 500 kDa bilden (Abb. 3b; Oxvig et al., 1994). ProMBP ist ein direkter Inhibitor von PAPP-A, da es durch Bildung des 2:2 heterotetrameren Komplexes mit proMBP zu einem kompletten Funktionsverlust von PAPP-A kommt (Overgaard et al., 2000). Während der Schwangerschaft hat dieser Mechanismus eine besondere Bedeutung, da im Serum von Schwangeren nur 1 % freies PAPP-A nachzuweisen ist, während die restlichen 99 % in der inaktiven PAPP-A-proMBP-Komplexform vorliegen (Han, 1996). Die Inaktivierung von PAPP-A dient hier vermutlich dem Ausgleich der hohen PAPP-A-Serumspiegel in der peripheren Zirkulation der Schwangeren, denn die hohe PAPP-A-Aktivität, die für die fetale Entwicklung erforderlich ist, soll nur lokal in der Plazenta entstehen (Overgaard et al., 2000), unerwünschte Nebeneffekte von PAPP-A wie Hypoglykämien und unkontrollierte Proliferation aber vermieden werden (Bunn und Fowlkes, 2003).

Die Ausschaltung der proliferations- und wachstumsfördernden PAPP-A Wirkung durch proMBP findet in kleinerem Umfang aber auch außerhalb der Schwangerschaft statt. Es wird angenommen, dass der PAPP-A-proMBP-Komplex unter bestimmten Umständen auch wieder gespalten wird, so dass dann gezielt PAPP-A zur Verfügung gestellt werden kann (Overgaard et al., 2000).

1.3 Funktionen von PAPP-A

1.3.1 Allgemeine Funktionen von PAPP-A im IGF-System

Die wichtigste Aufgabe von PAPP-A liegt in der Regulation der lokalen Bioverfügbarkeit von IGF. IGF sind mitogenetische und differenzierende Wachstumsfaktoren, die ubiquitär exprimiert werden (Hwa et al., 1999) und über ihre Rezeptoren verschiedenste Signale wie zelluläre Proliferation, Differenzierung und Überleben vermitteln (Steward und Rotwein, 1996). Wie ihr Name suggeriert, werden sie außerdem für adäquates prä- und postnatales Wachstum benötigt. Es gibt zwei verschiedene IGF: IGF-1 und IGF-2.

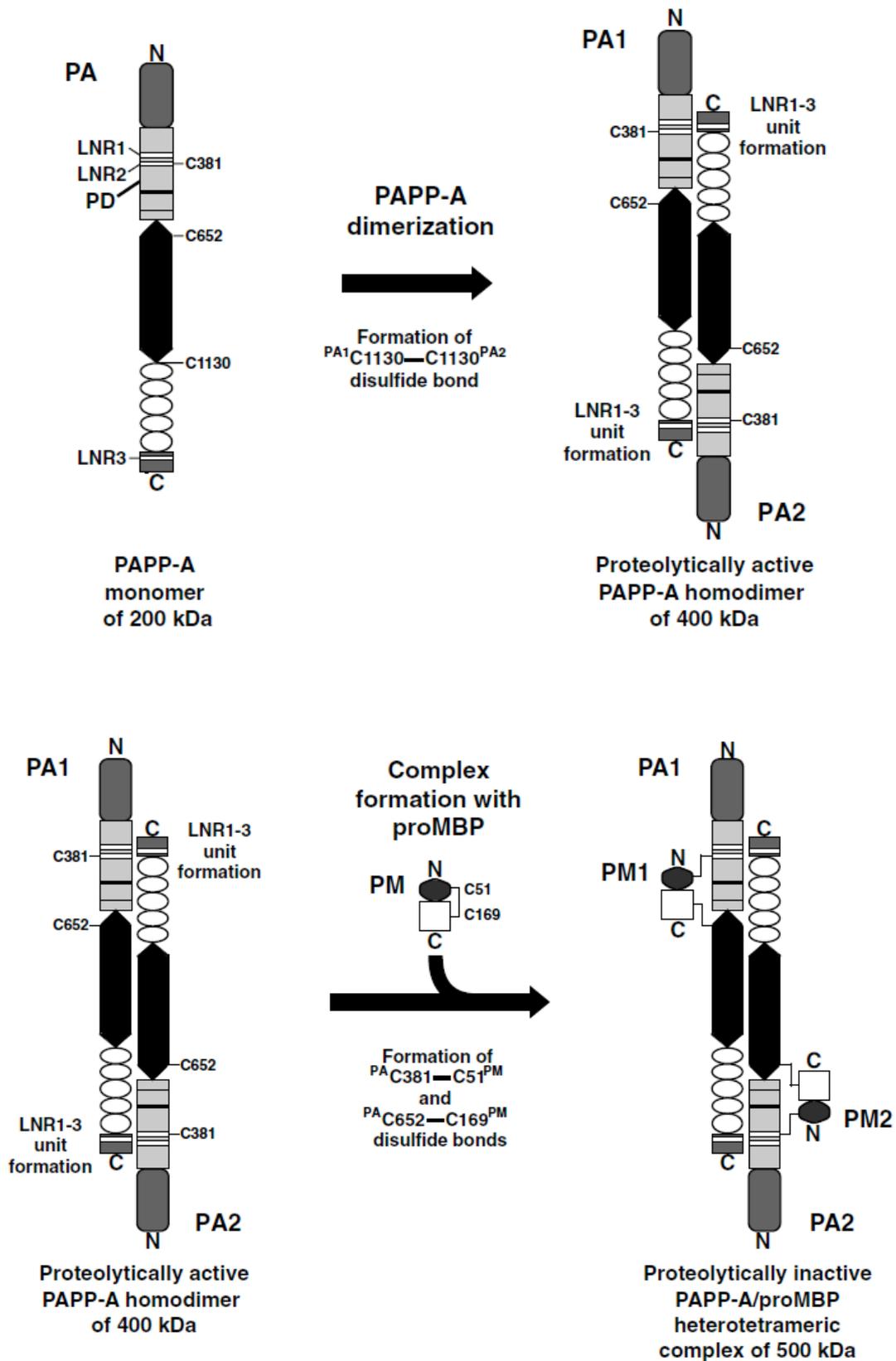


Abb. 3: PAPP-A als Monomer, Homodimer und im heterotetrameren Komplex mit proMBP. Assoziation zum Homodimer (obere Abbildung) und zum heterotetrameren Komplex mit proMBP (untere Abbildung; nach Boldt und Conover, 2007).

Beides sind Peptidhormone, die in ihrer Struktur dem Insulin ähnlich sind und daher ihren Namen erhalten haben (Hwa et al., 1999). IGF liegen in biologischen Flüssigkeiten normalerweise an spezifische IGFBP gebunden vor, da die Affinität zu ihren Bindeproteinen größer ist als die zu ihren Rezeptoren. IGFBP umfassen eine heterogene Gruppe aus insgesamt sechs verschiedenen, hochaffinen Proteinen (IGFBP-1 bis -6). Außerdem gibt es mehrere IGFBP-verwandte Proteine, deren Affinität zu den IGF aber wesentlich niedriger ist (Hwa et al., 1999). Die Bindung an IGFBP führt zu einer Hemmung der IGF, da sie in gebundener Form nicht mehr ihre Rezeptoren binden und ihre Signale vermitteln können (Boldt und Conover, 2007; Clemmons, 1998; Jones und Clemmons, 1995).

Diese inhibitorischen IGFBP wiederum werden durch IGFBP-Proteasen wie PAPP-A abgebaut. Für jedes IGFBP-1 bis -6 gibt es eine Protease (Zhou et al., 2003; Bunn und Fowlkes, 2003). Diese führen durch proteolytische Spaltung zu einem Funktionsverlust der inhibitorischen IGFBP, da die Affinität der IGFBP-Spaltprodukte zu den IGF reduziert bis aufgehoben ist. Dadurch werden die IGF aus ihrer Bindung befreit und können rezeptorvermittelt ihre metabolischen und mitogenetischen Funktionen ausüben. Über diese antagonistischen Mechanismen, das heißt die Bindung und Inaktivierung der IGF durch IGFBP-Bindung auf der einen Seite und die Freisetzung der IGF aus dem IGF-IGFBP-Komplex durch IGFBP-Proteolyse auf der anderen Seite, wird die lokale Bioverfügbarkeit und Aktivität der IGF genau reguliert (Firth und Baxter, 2002).

PAPP-A gehört als einzige Protease von IGFBP-4 (Nyegaard et al., 2010) zu der Familie der IGFBP-Proteasen. Nach der Spaltung durch PAPP-A ist die Affinität des N-terminalen IGFBP-4-Fragmentes zu IGF stark reduziert, die Affinität des C-terminalen Fragmentes sogar komplett aufgehoben (Stäntker et al., 2000). Dadurch kann IGF aus dem Komplex mit IGFBP-4 gelöst werden (Byun et al., 2001) und aus der inaktiven, gebundenen Form in den aktiven, ungebundenen Zustand übergehen (Abb. 4).

Charakteristisch ist die IGF-Abhängigkeit des IGFBP-4-Abbaus durch PAPP-A (Lawrence et al., 1999), denn IGF wird benötigt, um die proteolytische Aktivität von PAPP-A gegen IGFBP-4 hervorzurufen. IGF-2 ist dabei effektiver als IGF-1 (Byun et al., 2000; Conover et al. 1993). IGF-2 ist aber kein Kofaktor für die Protease, lediglich seine Bindung an IGFBP-4 macht dieses im IGF-2-IGFBP-4-Komplex anfälliger für seinen schnellen Abbau durch PAPP-A (Byun et al., 2000). Neben IGF wird für die Aktivität von

PAPP-A außerdem Calcium benötigt (Sun et al., 2002). Einige Studien sprechen dafür, dass PAPP-A auch IGFBP-2 und -5 abbauen kann (Maile und Holly, 1999), wobei der Abbau von IGFBP-2, wie bei IGFBP-4, IGF-abhängig ist, wohingegen der Abbau von IGFBP-5 IGF-unabhängig zu sein scheint (Laursen et al., 2001; Monget et al., 2003; Riviera und Fortune, 2003 a/b). Sowohl der Abbau von IGFBP-2 als auch der Abbau von IGFBP-5 scheint aber ein Phänomen zu sein, das dem dominanten Follikel eigen ist (Gerard et al., 2004; Riviera und Fortune, 2003a/b). Aufgrund seiner Struktur zählt PAPP-A zu der Superfamilie der Metzincin-Metalloproteinasen (Boldt et al., 2001; Rajah et al., 1995; Zhou et al., 2003).

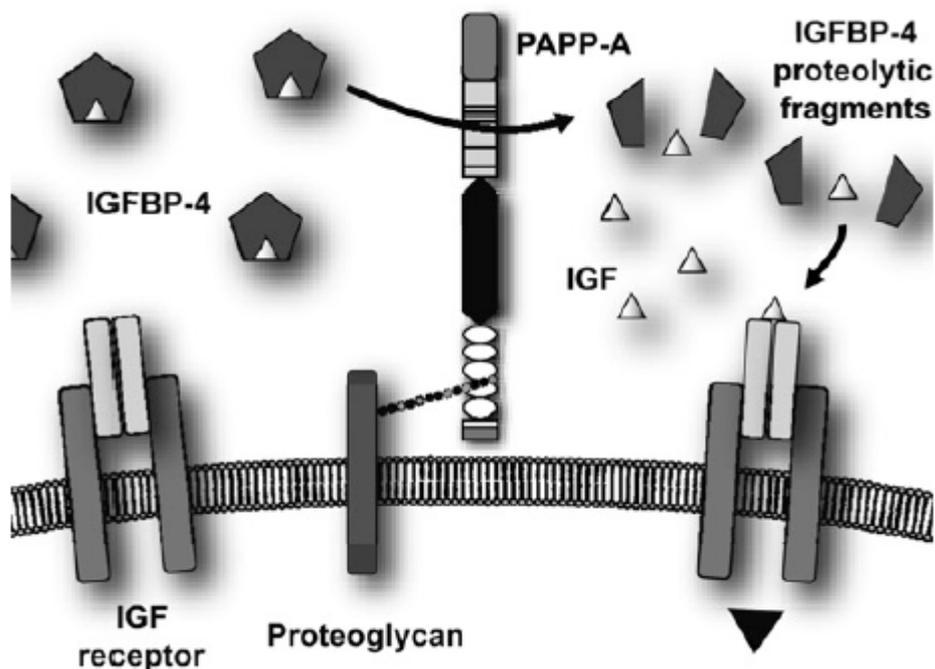


Abb. 4: Funktion von PAPP-A im IGF-System. Im Serum liegt IGF an IGFBP-4 gebunden vor. Erst durch proteolytische Spaltung von IGFBP-4 durch PAPP-A kommt es zu einer Freisetzung von IGF, sodass sie ihre Rezeptoren binden, und zelluläre Funktionen ausüben können (nach Boldt und Conover, 2007).

1.3.2 Spezielle Funktion von PAPP-A im ovariellen IGF-System

Im Ovar wird PAPP-A von den Granulosazellen gebildet um die lokale Bioverfügbarkeit von ovariellern IGF zu regulieren. Da die Granulosazellen nur IGF-2 bilden ist dieses das entscheidende IGF der Follikel (Geisthövel et al., 1989). IGF-2 wird eine zentrale Rolle in der Koordinierung der Follikelreifung zugesprochen, weil es zusammen mit den

hypophysären Gonadotropinen die Funktionen der Follikelzellen beeinflusst, indem es deren mitotische und steroidogene Aktivität moduliert. Auf der einen Seite führt IGF-2 zu einer erhöhten Zellteilungsrate der Granulosazellen, die für das Wachstum der Follikel und deren Reifung essentiell ist. Auf der anderen Seite fördert IGF-2 die Bildung von Steroidhormonen, indem es die gonadotropin-induzierte Estrogen- und Progesteronsynthese steigert (Erickson et al., 1989). IGF-2 verstärken demnach die gonadotropinen Effekte auf den Follikel (Adashi, 1998).

In IGF-1-knock-out(k.o.)-Mäusen konnte der Einfluss von IGF auf die gonadotropine Wirkung ganz gezielt dargestellt werden, da diese die Fähigkeit verloren haben, über das Follikelstimulierende Hormon (FSH) den dominanten Follikel ausreichend zu stimulieren, und dementsprechend unfruchtbar waren (Baker et al., 1996). Das gonadotropinagonistische IGF ist dementsprechend zumindest im Ovar der Maus essentiell für die FSH-Wirkung, und damit entscheidend für die Bildung des dominanten Follikels, die Ovulation und letztendlich die Fruchtbarkeit der Mäuse.

Die Hemmung von IGF-2 erfolgt durch vier der sechs hochaffinen IGFBP (IGFBP-2, -3, -4, -5), die lokal von den Granulosazellen des Ovars gebildet und anschließend als lösliche Proteine sezerniert werden (Chamberlain und Spicer, 2001). IGFBP-4 ist das wichtigste ovarielle IGFBP, und für diese Studie besonders interessant, weil es durch PAPP-A abgebaut wird. Im Ovar führt IGFBP-4 durch IGF-2-Bindung zu einer reduzierten Zellteilung und Hormonsynthese der Follikelzellen, da es gleichzeitig das follikelstimulierende IGF-2 inaktiviert (Mason et al., 1992) und dessen gonadotropine Wirkung am Follikel unterdrückt (Putowski et al., 1997).

PAPP-A selbst führt demnach durch den Abbau des inhibitorischen IGFBP-4 und der Freisetzung von mitotischen und steroidogenen IGF zu einer Stimulation der gonadotropinen Follikelreifung. So zeichnen sich PAPP-A-k.o.-Mäuse verglichen mit Wildtype(w.t.)-Mäusen unter anderem durch eine verminderte Anzahl ovulierender Oozyten sowie einer reduzierten Expression von ovariellen, steroidogenen Enzymgenen aus (Nyegaard et al., 2010).

Diese Funktionsverluste sprechen für eine wichtige Rolle von PAPP-A in der Modulation der Follikelreifung und der weiblichen Fruchtbarkeit durch die Kontrolle der Aktivität von lokal verfügbaren IGF. Sie suggerieren eine reduzierte Fruchtbarkeit der PAPP-A-k.o.-Mäuse, die aber im Gegensatz zu IGF-1-ko-Mäuse nicht steril sind (Baker et al., 1996)

und bei denen man nach wie vor alle Follikelstadien auffinden kann (Nyegaard et al., 2010).

1.4 Die intra- und extraovarielle Follikelstimulation

1.4.1 Kopplung der intra- und extraovariellen Follikelstimulation

An der Regulation der mitotischen und steroidogenen Aktivität der Follikelzellen im Rahmen des präantralen und antralen Follikelwachstums sind neben dem dargestellten intraovariellen IGF-System maßgeblich extraovarielle Hormone der Hypothalamus-Hypophysen-Achse beteiligt. Eine enge Vernetzung zwischen den intra- und extraovariellen Regulationssystemen ermöglicht dabei den koordinierten Ablauf der Reifungsprozesse im Follikel. Gemeinsam wird so die Zukunft des Follikels bestimmt: soll er wachsen und dominant werden, oder in Atresie gehen?

Die Initiation des präantralen Follikelwachstums von primordialen Follikeln über primäre Follikel zu antralen Follikeln geschieht einem Modell von Webb et al., 2004 nach zunächst wachstumsfaktorenabhängig und dauert ungefähr 3 Monate. Diese erste Phase des präantralen Follikelwachstums kann gonadotropinunabhängig erfolgen (Campbell et al., 2000; Fortune et al., 2000; McNatty et al., 1999; Wandji et al., 1992). Gonadotropine, vor allem FSH, sind aber in der Lage, die Rate heranwachsenden Follikeln zu steigern (Campbell et al., 2000), da sie die Freisetzung von IGF durch zeit- und dosisabhängige Steigerung der PAPP-A-Expression induzieren (Iwashita et al., 1998; Motozumi et al., 2004) und die Bindungskapazität und Signaltransduktion der ovariellen IGF-Rezeptoren verbessern (Adashi 1998).

Erst ab einer Größe der antralen Follikeln von ungefähr 5 mm ist für das weitere antrale Follikelwachstum und die Rekrutierung des Follikels in die Kohorte die extraovarielle Follikelstimulation durch Gonadotropine essentiell (Webb et al., 2003), ohne die der Follikel in Atresie geht. Die gonadotropinabhängige Entwicklung der Follikelkohorte eines Zyklus steht jetzt aber selbst unter dem Einfluss ovarieller Wachstumsfaktoren. So wird die gonadotropine Wirkung durch intraovarielle IGF stimuliert, indem diese die mitotische und steroidogene Aktivität der Gonadotropine potenzieren (Adashi, 1998). Außerdem kann der Abbau antigonadotropiner IGFBP durch PAPP-A nur unter Anwesenheit von IGF stattfinden.

Zwischen der intra- und extraovariellen Regulation des Follikelwachstums liegt demzufolge eine enge Vernetzung vor, wobei die follikelstimulierenden Komponenten beider Systeme positiv miteinander verkoppelt sind. Dadurch wird in wachsenden Follikel eine maximale Stimulation der Zellteilung und Hormonproduktion ermöglicht.

1.4.2 Ablauf der Follikelreifung

Zu Beginn eines neuen Zyklus ist FSH das entscheidende Gonadotropin, das die Rekrutierung der Follikelkohorte initiiert und in der frühen Follikelphase die Reifung eines dominanten Follikels aus der Kohorte schnell wachsender Follikel auslöst. Dabei stimuliert FSH das Wachstum der Follikel und deren Estrogenproduktion, indem es das Angebot lokaler Wachstumsfaktoren und deren Wirksamkeit am Follikel erhöht. So führt FSH über Induktion der lokalen PAPP-A-Synthese und IGFBP-4-Proteolyse zu einer Freisetzung von IGF. Zudem erhöht FSH die Empfindlichkeit der IGF-Rezeptoren. Dadurch werden die follikelstimulierenden Effekte von FSH und den Wachstumsfaktoren in wachsenden Follikeln maximiert, während die antigonadotropinen IGFBP an Wirkung verlieren.

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass der durch FSH und PAPP-A ausgelöste IGF-Anstieg 12 h vor der Follikeldurchmesserzunahme des dominanten Follikels gegenüber dem größten untergeordneten Follikel kommt (Donadeu und Ginther, 2002). Außerdem konnte durch IGF-Injektion in den größten, untergeordneten Follikel dieser zur Dominanzausbildung und Ovulation gebracht werden (Ginther et al., 2004 a/b), während man durch IGFBP-Injektion in den größten Follikel dessen weiteres Wachstum hemmen konnte (Ginther et al., 2004c). Bei der Dominanzausbildung eines Follikels kann demnach der Anstieg der PAPP-A-Konzentration mit nachfolgendem IGF-Anstieg als erste markante Veränderung zwischen dominantem und untergeordnetem Follikeln nachgewiesen werden. Erst später zeigen sich Unterschiede im Durchmesser, oder andere hormonelle Veränderungen wie die Östrogensynthese.

Die Stimulation der Follikel über FSH und intraovarielle Wachstumsfaktoren führt zu einer Zunahme der follikulären Estrogenproduktion und einem starken Anstieg der endogenen Estrogenspiegel, sodass über negative Rückkopplungsmechanismen ein drastischer Abfall der FSH-Produktion in der Hypophyse ausgelöst wird. Diesen kann nur der

hochempfindliche, dominante Follikel überleben kann, während die untergeordneten Kohortenfollikel in Atresie gehen. Neben dem Abfall von FSH löst der starke Estrogenanstieg außerdem eine massive Freisetzung des Luteinisierenden Hormons (LH) aus der Hypophyse aus, so dass LH in der späten Follikelphase und während der Lutealphase das vorherrschende Gonadotropin wird und dann zur terminalen Reifung der primären Oozyte, der Ovulationsauslösung, der Luteinisierung und der gesteigerten Gestagenproduktion führt. Bei der Luteinisierung bewirkt LH die Umwandlung des gesprungenen Follikels in das Corpus luteum, das aus Thekalutein- und Granolosaluteinzellen besteht, die jetzt überwiegend Gestagene, besonders Progesteron produzieren. Die Gestagenproduktion wird ebenfalls von den Wachstumsfaktoren unterstützt. Durch die Konzentrationserhöhung der Gestagene wird über negative Rückkopplungsmechanismen ein erneuter Abfall von LH bewirkt, wodurch im Gegenzug auch die Progesteron- und Gestagenproduktion des Corpus luteum abnehmen. Das wiederum führt durch Ausbleiben des negativen Feedbacks auf die Hypophyse zu einem erneuten FSH-Anstieg, wodurch ein neuer Zyklus eingeleitet wird (Lüllmann-Rauch, 2003).

1.5 Expressionsprofile der IGF-Systemkomponenten je nach Größe und Funktionszustand der Follikel

Die mitotische und steroide Funktion eines Follikels wird wie beschrieben von den Bestandteilen des intraovariellen IGF-Systems mitbestimmt. Dieser funktionelle Einfluss spiegelt sich lokal im Follikel wider, da je nach Größe und Funktionszustand der Follikel unterschiedliche Profile der einzelnen Komponenten gefunden werden können. So werden PAPP-A und IGF-2 überwiegend in großen, reifen Follikeln produziert. In kleinen, untergeordneten, anovulatorischen oder atretischen Follikeln hingegen können nur minimale Konzentrationen von PAPP-A und IGF-2 nachgewiesen werden (Westgaard et al., 1985). Die Syntheseleitung von PAPP-A und IGF-2 hängt demzufolge positiv mit der Größe und dem Funktionszustand der Follikel zusammen, weshalb im Verlauf des Follikelwachstums die Konzentrationen in der Flüssigkeit von gesunden Follikeln stetig steigen (Conover et al., 2001). Umgekehrt ist die Konzentration von IGFBP-4 in kleinen Follikeln hoch, nimmt aber bei heranwachsenden Follikeln stetig ab, bis sie in der Follikelflüssigkeit des dominanten Follikels kaum mehr nachgewiesen werden kann (Conover et al., 2001; Funston et al., 1996; Sota de la et al., 1996; Steward et al.

1996a;). Erst wenn der dominante Follikel gesprungen ist, steigen seine IGFBP-4 Konzentrationen wieder an (Ericksen et al., 1992). Diese Veränderungen von IGFBP-4 im Verlauf der Follikelreifung lassen sich durch die Wirkung von PAPP-A erklären, dass vor allem in großen, gesunden Follikeln synthetisiert wird und dort schnell IGFBP-4 abbaut (Zhou et al., 2003b). Die Konzentration von IGFBP-4 ist demnach umgekehrt proportional zu PAPP-A und der Größe und dem Funktionszustand der Follikel.

Zusammengefasst besitzen große, heranwachsende Follikel hohe PAPP-A-Konzentrationen, niedrige IGFBP-4-Level und hohe IGF-2-Werte. Sie haben damit die Fähigkeit zur gonadotropinagonistischen Stimulation der Hormonsynthese und Zellteilung der Granulosazellen, so dass diese Follikel wachsen können (Spicer, 2004). In kleinen, atretischen Follikeln mit niedrigem PAPP-A und hohen antigonadotropinen IGFBP hingegen ist die Bioverfügbarkeit von IGF-2 gering, die follikelstimulierenden Effekte bleiben aus und der Follikel kann nicht überleben.

Die unterschiedlichen Expressionsprofile der IGF-Systemkomponenten je nach Funktionszustand und Größe der Follikel im Ovar unterstreichen deren Funktion im organisierten Follikelwachstum. Zudem sind PAPP-A und die anderen Komponenten des IGF-Systems als Marker für die Follikelreifung- und Selektion ins Gespräch gekommen, da die Profile der IGF-Systemkomponenten den Funktionszustand der Follikel widerspiegeln (Conover et al., 2001; Hourvitz et al., 2000; Hourvitz et al., 2002).

1.6 Fragestellung

Als wichtiger Regulator der lokalen IGF-Bioverfügbarkeit ist PAPP-A an der Koordinierung der Follikelreifung beteiligt und beeinflusst die mitotische und steroidogene Aktivität der Follikel positiv. Die lokale Aktivität von PAPP-A im Follikel spiegelt sich in den vergleichsweise hohen Konzentrationen gesunder Follikel wider. Dabei korrelieren die Konzentrationen von PAPP-A sowohl positiv mit dem Funktionszustand und der Größe der Follikel (Conover et al., 1999; Mazerbourg et al., 2003). Dies spricht dafür, dass das Wachstum und die Reifung der Follikel mit dynamischen Veränderungen von PAPP-A einhergehen, weshalb PAPP-A als Marker für die Follikel und das Corpus luteum ins Gespräch gekommen ist. In dieser Arbeit gilt es zu klären, ob sich auch im Serum analoge Veränderungen von PAPP-A im Verlauf eines Menstruationszyklus während der

Follikel- und Lutealphase und parallel zu bestimmten Follikelstadien darstellen lassen, denn das wäre eine entscheidende Voraussetzung dafür, dass PAPP-A tatsächlich auch als Serummarker für die Follikelreifung in Betracht gezogen werden könnte.

Frühere Studien konnten bislang keine endgültigen und eindeutigen Ergebnisse dazu vorweisen (Fialova und Malbohan, 2002), wobei jedoch bislang die Arbeiten überwiegen, die keine signifikanten Unterschiede der PAPP-A-Serumkonzentrationen im Verlauf des Zyklus finden könnten (Bersinger und Klopper, 1984; Bischof et al., 1982). Es wird angenommen, dass Veränderungen von PAPP-A im Serum nicht wie in der Konzentration der Follikelflüssigkeit dargestellt werden können, da nicht nur selektiv follikuläres PAPP-A im Serum gemessen wird, sondern auch solches, das von anderen Syntheseorten produziert und sezerniert wurde.

Zudem sind die Konzentrationen von PAPP-A im Serum außerhalb der Schwangerschaft sehr gering, was die Detektion kleiner Schwankungen erschwert. Da allerdings neue, sensitivere Tests auf den Markt gekommen sind, die besonders dem Nachweis von freiem PAPP-A im Serum dienen, das von alten Testsystemen vermutlich nicht erfasst wurde, lohnt sich eine erneute Beurteilung der Serum-PAPP-A auf zyklische Veränderungen hin.

Außerdem soll untersucht werden, welchen Einfluss die ovarielle Hyperstimulation (OHS) der Follikel im Rahmen verschiedener reproduktionsmedizinischer Verfahren auf die PAPP-A-Serumspiegel der Patientinnen hat, da wie beschrieben eine enge Vernetzung zwischen den an der Follikelreifung beteiligten intra- und extraovariellen Regulationssystemen besteht. Es ist davon auszugehen, dass rekombinante FSH-Präparate analog zu endogenem FSH die ovarielle Expression von PAPP-A im Ovar steigern (Choi et al., 2003). Wir wollen prüfen, ob sich das auch in veränderten PAPP-A-Serumspiegeln der Patientinnen widerspiegelt.

Da die Serumspiegel von PAPP-A verschiedenen externen Einflüssen unterliegen, wurden außerdem andere Eigenschaften der Patientinnen auf Zusammenhänge mit Veränderungen der PAPP-A-Serumspiegel hin untersucht. Dazu zählen geburtshilfliche und gynäkologische Parameter, die im Rahmen der klinischen Untersuchung und Anamnese erhoben worden waren. Dabei war von besonderem Interesse herauszufinden, ob sich im Rahmen bestimmter Erkrankungen, besonders solchen, die mit Follikelreifungsstörungen und einer eingeschränkten Fertilität einhergehen, Alterationen der lokalen PAPP-

A-Konzentrationen im Serum darstellen lassen. Wäre das der Fall, so könnte PAPP-A als Serummarker für diese Erkrankungen in Frage kommen.

2. Material und Methoden

2.1 Erhebung der Daten

In dieser retrospektiven Studie wurden die PAPP-A-Serumverläufe von Patientinnen analysiert, die sich im Zeitraum von 2007 bis 2009 in der Sterilitätsambulanz der Universitätsfrauenklinik Bonn in Behandlung befanden. Es wurden gezielt solche Patientinnen gesucht, bei denen, zur Fragestellung passend, mehrere Blutabnahmen zu bestimmten Zeitpunkten im Verlauf eines Zyklus erfolgt waren und die nach zusätzlichen Ein- und Ausschlusskriterien gefiltert werden konnten.

Von diesen Patientinnen wurden anschließend die entsprechenden Serumproben anhand der ID-Nummern identifiziert und für die Nachbestimmung von PAPP-A im Hormonlabor der Universitätsfrauenklinik Bonn verwendet. Zur Untersuchung möglicher Zusammenhänge zwischen PAPP-A und anderen Eigenschaften der Frauen wurden außerdem die Akten der Patientinnen nach bestimmten reproduktionsmedizinischen Daten durchsucht, die im Rahmen der Untersuchung und Anamnese erhoben worden waren. Die konkreten Angaben zu den Hormonkonzentrationen sowie Informationen zu der Follikelanzahl, Follikelgröße und Endometriumsdicke konnten den Stimulationsprotokollen entnommen werden.

2.2 Beschreibung des Patientenkollektivs

Es wurden insgesamt 120 Patientinnen in die Studie eingeschlossen. Da bei 9 Frauen 2 Zyklen und bei 3 Frauen 3 Zyklen untersucht wurden, konnten insgesamt 135 Zyklusverläufe von PAPP-A analysiert werden. Um den Einfluss der Follikelstimulation auf die PAPP-A-Serumspiegel darzustellen, wurden die Patientinnen je nach reproduktionsmedizinischem Verfahren und Stimulationsstärke der untersuchten Zyklen in verschiedene Stimulationsgruppen eingeteilt. Im Zuge aller Stimulationsverfahren erfolgte eine engmaschige Zyklusbeobachtung anhand von regelmäßigen Hormonkontrollen von Estradiol und LH sowie der transvaginalsonographischen Beurteilung der Follikel beginnend ab Zyklustag (ZT) 5-8 und darauf folgend mindestens alle 3 Tage.

Diejenigen Patientinnen, deren Spontanzklus man zur Ermittlung des Ovulationszeitpunkt im Rahmen von Verkehr zum Zyklusoptimum (VZO; n= 16) und intrauteriner Insemination (IUI; n= 15) beobachtete, wurden in der ersten Stimulationsgruppe zusam-

mengefasst (n= 31). Erreichte der dominante Follikel dieser Patientinnen einen Durchmesser von >18 mm, so wurde eine Ovulationsinduktion mit 5000 internationalen Einheiten (IU) humanen Choriongonadotropin (HCG, Ovitrelle, Predalon, Organon) durchgeführt. 24 h nach Ovulationsinduktion sollten die Patientinnen im VZO-Verfahren Geschlechtsverkehr haben. Im Rahmen des IUI-Verfahren hingegen wurde 36 h nach der Ovulationsinduktion die IUI durchgeführt.

In der zweiten Stimulationsgruppe wurden die Patientinnen (n= 45) zusammengefasst, bei denen im Zuge von VZO (n= 35) und IUI (n= 10) zusätzlich eine leichte Stimulation der Follikel durch tägliche subkutanen Injektionen von 25 bis 75 IU rekombinantem FSH (Gonal F, Puregon, Bravelle, Menogon) ab dem 3. Zyklustag bis zur Ovulationsinduktion erfolgt war. Analog zu der Funktion von körpereigenem FSH sollten dadurch das Follikelwachstum und die Steroidhormonproduktion der Eierstöcke stimuliert werden.

In der 3. Stimulationsgruppe wurden alle Patientinnen (n= 59) zusammengefasst, bei denen eine multifollikuläre Hyperstimulation im Rahmen einer In-vitro-Fertilisation (IVF; n= 9) oder intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI; n= 50) durchgeführt wurde. Die Follikelstimulation der Patientinnen erfolgte mit hochdosiertem, rekombinantem FSH (Gonal F, Puregon, Bravelle, Menogon), welches ab dem 1. Zyklustag durch tägliche subkutane Injektionen verabreicht wurde. Um die natürlichen Rückkopplungsmechanismen der Hypophyse zu unterdrücken und eine vorzeitige Ovulation zu verhindern wurde zusätzlich etwa 14 Tage vor Beginn des Stimulationszyklus die Applikation von Gonadotropin-Releasing-Hormon(GnRH)-Analoga (Decapeptyl, Synarela, Enantone) eingesetzt. Eine Ovulationsinduktion mit 5000 IU HCG wurde ungefähr 36 h vor der geplanten Follikelpunktion zum Abschluss der Eizellreifung durchgeführt. 72h nach in-vitro Befruchtung der Eizellen folgten der abschließende Embryonentransfer in die Gebärmutter. Im Unterschied zu dem IVF-Verfahren wurden bei dem ICSI-Verfahren einzelne Spermien des Mannes durch Mikroinjektion direkt in die Eizellen der Frau injiziert.

2.3 Ein- und Ausschlusskriterien

2.3.1 Einschlusskriterien

Um durch Nachbestimmung von PAPP-A in den entsprechenden Serumproben die PAPP-A-Serumverläufe darstellen zu können, wurden lediglich solche Patientinnen für

die drei oben dargestellten Stimulationsgruppen gesucht, bei denen über den Zeitraum eines Zyklus mindestens 4 Blutentnahmen zum Hormonmonitoring erfolgt waren. Die Zeiträume an denen die Proben gewonnen wurden, sollten bestimmte Zyklusphasen repräsentieren (Tab. 1). Es sollte jeweils eine Messung aus der frühen und späten Follikelphase (M1 und M2), sowie weitere Messung am Tag der Ovulationsinduktion (M3) und gegen Ende der Lutealphase (M4) durchgeführt werden. Bei den Gruppen 1 und 2 wurden für die erste Messung der Zyklustag (ZT) 8 +/- 1, für die zweite Messung der ZT 12 +/- 1 und für die dritte Messung der Tag der HCG-Gabe-Tag gewählt, der meist auf ZT 15 +/- 1 fiel. Nur bei 16 Patienten war die HCG-Gabe erst später, aber spätestens an ZT 18 durchgeführt worden. Die Zeiträume für die ersten zwei Messungen wurden für die Gruppe 3 angepasst, da die Hormonkontrolle dieser Patientinnen in der Regel früher stattfand, weil es hier nicht zu einer Ovulation kommen sollte, sondern die Eizellen zur Durchführung der geplanten in-vitro-Befruchtung ungefähr an ZT 12 per Punktion gewonnen werden sollten. Die Messzeiträume wurden dem entsprechend vorgezogen auf den ZT 6 +/- 1 für die erste Messung und ZT 9 +/- 1 für die zweite Messung. Der HCG-Gabe-Tag, der nur in einem Fall nicht auf ZT 12 +/- 1 gefallen ist, sondern erst an ZT 14 erfolgte, wurde wie bei Gruppe 1 und 2 für die dritte Messung gewählt. Die vierte Messung von PAPP-A erfolgte in allen drei Gruppen gleichzeitig, ungefähr 2 Wochen nach der dritten Messung. Zu diesem Zeitpunkt wird bei den Patienten ein Schwangerschaftstest (SST) durchgeführt.

	M 1: Follikelphase (früh)	M2: Follikelphase (spät)	M 3: Ovulationsinduktion	M4: Lutealphase
Gruppe 1	ZT 8 +/- 1	ZT 12 +/- 1	HCG: ZT 15 +/- 1	SST
Gruppe 2	ZT 8 +/- 1	ZT 12 +/- 1	HCG: ZT 15 +/- 1	SST
Gruppe 3	ZT 6 +/- 1	ZT 9 +/- 1	HCG: ZT 12 +/- 1	SST

Tab. 1: Zeitpunkte der Messungen von PAPP-A im Zyklusverlauf. In den Patientengruppen erfolgten jeweils vier Messungen von PAPP-A zu verschiedenen Phasen im Zyklus.

2.3.2 Ausschlusskriterien

Alle Frauen, die nicht einer der oben genannten Stimulationsgruppen zugeordnet werden konnten, und die nicht vier Serumproben in den Zeiträumen entsprechend der je-

weiligen Gruppe abgegeben hatten (Tab. 1), in denen man PAPP-A nachmessen konnte, wurden ausgeschlossen. Das umschließt alle Patienten, die sich in der Art der hormonellen Stimulation oder den reproduktionsmedizinischen Methoden unterschieden, also beispielsweise solche Patientinnen, die eine Stimulation nach Antagonisten-Protokoll erhalten hatten.

Außerdem wurden die Patienten ausgeschlossen, die bis zum Zeitraum der HCG-Gabe einen Zeitraum von 18 Tagen überschritten hatten. Grund dafür ist, dass wir die Serumverläufe von PAPP-A während der Follikelreifung untersuchen wollten. Bei Patientinnen, die zum Teil trotz hormoneller Stimulation, über 18 Tage für diesen Reifungsprozess brauchen, kann man von einer gestörten Follikelreifung und damit von veränderten hormonellen Konzentrationen ausgehen.

Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass nur Zyklen eingeschlossen wurden, die nicht zu einer Schwangerschaft führten, um am Tag 14 nach der Ovulation einen Referenzwert zum Zyklusbeginn des darauf folgenden Zyklus zu haben. Eine Schwangerschaft hätte veränderte PAPP-A-Serumkonzentrationen zur Folge, die unsere Ergebnisse verfälschen würden.

2.4 Messung von PAPP-A

2.4.1 Prinzip eines enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA)

Die quantitative Messung der PAPP-A-Konzentrationen in den Patientenseren erfolgte mit dem ACTIVE cPAPP-A ELISA (Diagnostic Systems Laboratories, Webster, USA). Dieser Assay wurde neu entwickelt, um spezifisch die Serumkonzentrationen von freiem und gebundenem PAPP-A außerhalb der Schwangerschaft und in geringen Konzentrationen zu messen. ELISA sind enzymgekoppelte Immunadsorptionstest, die dem immunometrischen Mess-Prinzip folgen. Hierbei wird das nachzuweisende PAPP-A mit Hilfe von spezifischen Anti-PAPP-A-Fängerantikörpern (Abb. 5a), die auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert sind, aus der Probe gefangen und fixiert (Abb. 5b). Die Quantifizierung des gebundenen PAPP-A erfolgt über Nachweisantikörper (Abb. 5c), die gegen eine zweite Determinante auf dem PAPP-A-Molekül gerichtet sind. Der Nachweisantikörper ist an ein Enzym gekoppelt (Abb. 5d), welches in der Lage ist, eine Indikatorreaktion zu katalysieren (Abb. 5e), bei der ein geeignetes Substrat von dem gekoppelten

Enzym zu einem Farbstoff umgesetzt wird. Da die Konzentration von PAPP-A direkt proportional zur Konzentration des neu gebildeten Farbstoffs ist, kann durch quantitative Bestimmung des Farbstoffs, auch die Konzentration von PAPP-A ermittelt werden (Janeway et al., 2007).

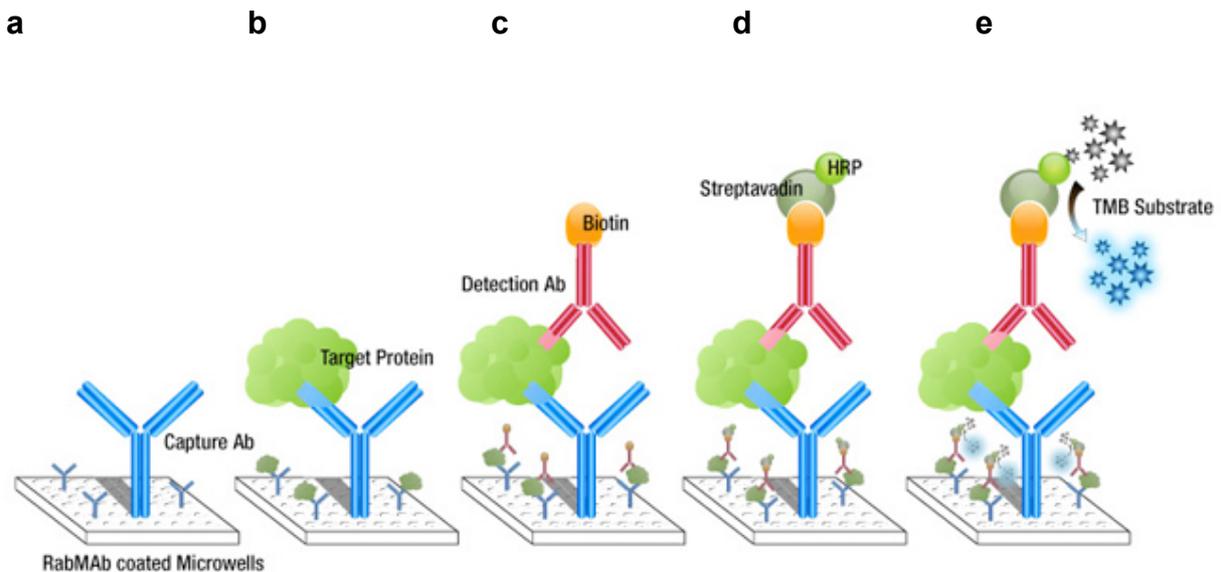


Abb. 5: Schematische Darstellung eines ELISA. Immobilisierte Fängerantikörper auf der Mikrotiterplatte (a) fixieren das Zielprotein (b). Dieses wird anschließend mit Hilfe von Nachweisantikörpern (c) quantifiziert, die durch ein gekoppeltes Enzym (d) eine Indikatorreaktion katalysieren (e) (nach Epitopics, 2011).

2.4.2 Durchführung des PAPP-A-ELISA

Zu Beginn des Tests wurden jeweils 50 µl der Standards, Kontrollen oder Proben zusammen mit 50 µl PAPP-A Assay-Puffer A in die mit Anti-PAPP-A-Antikörper beschichteten Wells einer 96 Well-Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wurde die Platte zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bindung des PAPP-A der Proben an die Fängerantikörper zu ermöglichen. In einem darauffolgenden Waschschrift wurden alle ungebundenen Bestandteile des Inkubationsgemisches entfernt. Anschließend wurden 100 µl Antikörper-Konjugatlösung in jedes Well gegeben und eine weitere, einstündige Inkubation bei Raumtemperatur durchgeführt. In dieser Phase konnte die Bindung zwischen PAPP-A und dem peroxidasegekoppelten PAPP-A-Nachweisanti-

körpern stattfinden. In einem erneuten Waschschrift wurden die nicht gebundenen Nachweisantikörper entfernt.

Es folgte die Farb- oder Indikatorreaktion, in der das gekoppelte Enzym sein Substrat umsetzt. Dazu wurden 100 μl Tetramethylbenzidin(TMB)-Chromogen-Lösung in die Wells gegeben und bei Raumtemperatur 12 Minuten lang inkubiert. TMB ist ein lösliches Substrat der Peroxidase, das in Anwesenheit mit Wasserstoffperoxid zu einem blauen Farbstoff oxidiert wird.

Die enzymatische Umsetzung wurde nach 12 Minuten mit 100 μl Stopp-Lösung gestoppt. Die Stopp-Lösung enthält Schwefelsäure, die die Peroxidase denaturiert, so dass diese ihre katalytisch Aktivität verliert. Die Schwefelsäure der Stopplösung führt außerdem zu einer Protonierung des blauen TMB-Radikalkations, so dass es einen Farbumschlag von blau nach gelb gibt. Dieses Endprodukt wurde anschließend bei einer Wellenlänge von 450 nm mit 620 nm Referenzfilter fotometrisch quantifiziert.

In jedem Testansatz wurden parallel zu den Proben 7 Standardproben mit bekannter PAPP-A-Konzentration gemessen. Aus den in den Standardproben gemessenen Exktionswerten wurde eine Kalibratorkurve berechnet (Abb. 6), aus der die PAPP-A-Konzentrationen der Patientenproben über Interpolation ermittelt wurden.

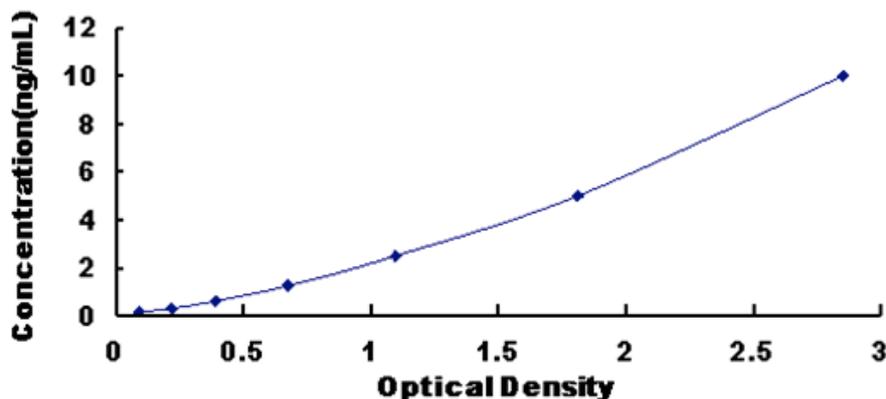


Abb. 6: Beispiel für eine Standarddeichkurve von PAPP-A. Aus der optischen Dichte des TMB-Radikalkations kann mit Hilfe der Standarddeichkurve die Konzentration von PAPP-A im Serum ermittelt werden (nach Uschn Life Science Inc. Wuhan, 2010).

Laut Angaben des Herstellers beträgt die Detektionsspannweite des cPAPP-A-ELISAs 0,1-15 mIU/L mit einer Sensitivität von 0,02 mIU/L (Diagnostik Systems Laboratories inc, 2010).

2.5 Statistische Methoden

Alle untersuchten Parameter wurden tabellarisch erfasst und mit dem Programm SPSS 18.0 für Windows (Version 18.0.1; SPSS Inc., Chicago, USA) statistisch ausgewertet. Die Untersuchung auf Unterschiede zwischen unverbundenen Stichproben, erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test für 2 Stichproben oder dem Kruskal-Wallis-Test für mehrere Stichproben. Verbundene Stichproben wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Testes analysiert. Die bivariate Korrelation zweier nichtparametrischer, stringenter Werte erfolgte nach Spearman. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Die Auswertung des Zusammenhangs zwischen PAPP-A und zykluskonstanten Eigenschaften der Patientinnen erfolgte mit Hilfe der Berechnung von patientenspezifischen PAPP-A-Werten. Dabei wurde aus den 4 Einzelwerten der Patientinnen durch Mittelung ein Durchschnittswert berechnet. In den Fällen, wo eine Patientin mehrfach untersucht wurde, erfolgte die Mittelung aller 8 bzw. 12 Werte.

3. Ergebnisse

3.1 Klassifizierung des Patientenkollektivs

In dieser Studie wurden die PAPP-A-Serumspiegel von 120 Patientinnen im Zyklusverlauf untersucht, die im Rahmen einer Kinderwunschbehandlung durch die Sterilitätsambulanz der Universitätsfrauenklinik Bonn betreut wurden. Die untersuchten Frauen waren zwischen 25 und 45 Jahre alt. Sie waren meist primär steril (54,2 %) und kinderlos (82,5 %). Lediglich 17,5 % der Patientinnen hatten zum Zeitpunkt der Behandlung bereits ein oder mehrere Kinder. Der Anteil der Patientinnen, die in der Vergangenheit einen Abort erlitten hatten, war mit knapp einem Drittel (32,4 %) hoch, zumal weniger als die Hälfte der Patientinnen (45,8 %) je schwanger gewesen war.

Zur Untersuchung des Einflusses der hormonellen Follikelstimulation auf die PAPP-A-Serumspiegel wurden die Patientinnen je nach reproduktionsmedizinischem Verfahren und Stimulationsstärke verschiedenen Stimulationsgruppen zugeordnet. Da bei 9 Frauen 2 Zyklen und von 3 Frauen insgesamt 3 Zyklen in die Auswertung einbezogen wurden, konnten insgesamt 135 Zyklusverläufe von PAPP-A analysiert werden.

In der ersten Stimulationsgruppe wurden 31 (23 %) Spontanzyklen von Patientinnen zusammengefasst, die im Rahmen von VZO (n= 16) oder IUI (n= 15) überwacht wurden. In der zweiten Stimulationsgruppe wurden 45 (33,3 %) Zyklen von Patientinnen analysiert, bei denen im Rahmen von VZO (n= 35) und IUI (n= 10) zusätzlich eine niedrig dosierte Stimulation der Follikel mit rekombinantem FSH erfolgt war. In der dritten Stimulationsgruppe wurden Zyklen von IVF- (n= 9) und ICSI- (n= 50) Patientinnen untersucht, bei denen eine multifollikuläre Hyperstimulation nach dem Agonistenprotokoll durchgeführt wurde (n= 59; 43,7 %).

Zur Darstellung von gruppenspezifischen Unterschieden wurde die Verteilung und Ausprägung von bestimmten Eigenschaften innerhalb der Patientenkollektive verglichen. Signifikante Unterschiede zwischen den Stimulationsgruppen waren in den Variablen Alter, Gravidität und Aborthäufigkeit zu finden (Tab. 2). Die Patientinnen der Gruppe 3, die eine IVF oder ICSI im Hyperstimulationszyklus erhielten, waren etwa 3 Jahre älter als die Patientinnen der anderen Stimulationsgruppen (p= 0,007). Die unstimulierten Patientinnen der Gruppe 1 hingegen waren im Mittel seltener schwanger gewesen als die Vergleichsgruppen (p= 0,017), und hatten eine geringere mittlere Anzahl an Aborten

erlitten ($p= 0,033$). Keine gruppenspezifischen Unterschiede konnten bei der Form der Sterilität, der Parität, dem Körpergewicht, der Körpergröße und dem Body-Mass-Index (BMI) der Patientinnen dargestellt werden (Tab. 2).

Mittlere Werte	Kollektiv	Gruppe 1: keine Stimulation	Gruppe 2: leichte Stimulation	Gruppe 3: Hyperstimu- lation	Signifikanz (p)
Patienten (n)	120	26	39	55	-
Alter (Jahre)	34,5	33,2	33,4	36,0	0,007*
Gravidität (n)	0,86	0,27	1,1	0,96	0,017*
Parität (n)	0,18	0,12	0,18	0,22	0,50
Abort (n)	0,62	0,15	0,90	0,64	0,033*
BMI (kg/m ²)	25,1	24,3	25,7	24,9	0,30
Größe (m)	1,67	1,67	1,67	1,68	0,51
Gewicht (kg)	70	68	72	71	0,45

Tab. 2: Charakterisierung des Patientenkollektivs und der Stimulationsgruppen. Signifikante Unterschiede zwischen den Stimulationsgruppen fanden sich in den Variablen Alter, Gravidität- und Aborthäufigkeit (* $p<0,05$ nach Kruskal-Wallis-Testung).

3.2 Veränderungen von PAPP-A unter follikulärer Stimulation

Der Einfluss der follikulären Stimulation auf die PAPP-A-Serumspiegel ließ sich anhand des Vergleiches von PAPP-A in den verschiedenen Stimulationsgruppen verdeutlichen. Dabei stellten sich höchst signifikante Unterschiede in der Höhe von PAPP-A je nach Stimulationsstärke der Patientinnen dar ($p< 0,001$; Tab. 3; Abb. 7).

Die multifollikulär hyperstimulierten Patientinnen der Stimulationsgruppe 3 wiesen signifikant niedrigere mediane PAPP-A-Serumkonzentrationen (0,83 mIU/L) auf als die anderen Patientinnen (Stimulationsgruppe 1: 1,08 mIU/L, $p< 0,001$; Stimulationsgruppe 2: 1,20 mIU/L, $p< 0,001$). Zwischen den nicht oder gering stimulierten Patientengruppen konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Höhe von PAPP-A gefunden werden ($p= 0,776$).

PAPP-A (mIU/L)	Gruppe 1: keine Stimulation	Gruppe 2: leichte Stimulation	Gruppe 3: Hyperstimulation
Anzahl (n)	124	180	236
Median	1,08	1,20	0,83
25% Quantil	0,78	0,83	0,34
75% Quantil	1,66	1,61	1,45
Interquartilbereich	0,88	0,78	1,11

Tab. 3: PAPP-A in Abhängigkeit zum Stimulationsverfahren. Signifikant niedrigere PAPP-A-Werte fanden sich bei den hyperstimulierten Patientinnen der Stimulationsgruppe 3 im Vergleich zu den nicht oder gering stimulierten Patientinnen der Stimulationsgruppe 1 und 2 ($p < 0,001$ nach Mann-Whitney-U-Testung).

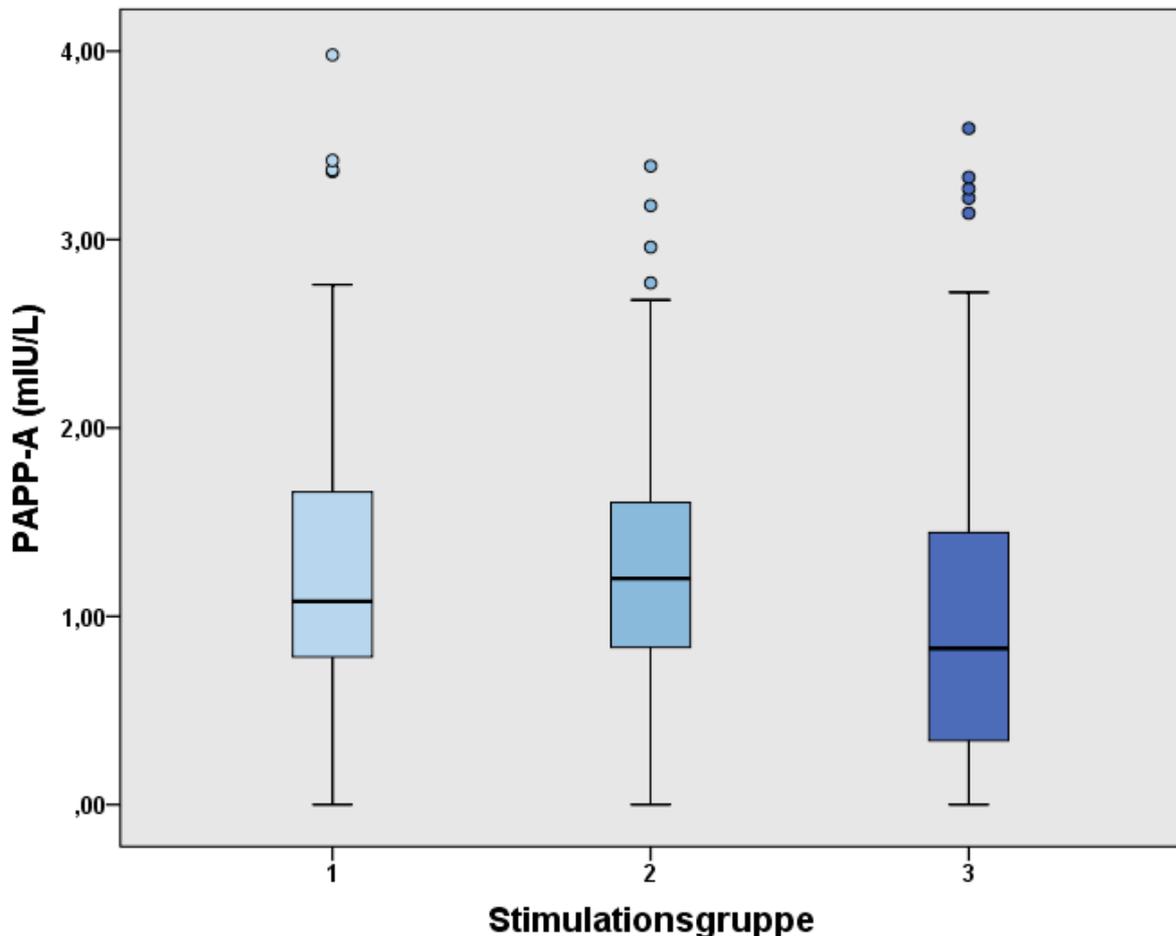


Abb. 7: Unterschiede von PAPP-A je nach Stimulationsverfahren.. Signifikant niedrigere PAPP-A-Werte fanden sich bei den hyperstimulierten Patientinnen der Stimulationsgruppe 3 im Vergleich zu den nicht oder gering stimulierten Patientinnen der Stimulationsgruppe 1 und 2 ($p < 0,001$ nach Mann-Whitney-U-Testung).

Die unterschiedliche Verteilung von PAPP-A je nach Stimulationsmodus ließ sich über den gesamten Zyklusverlauf verfolgen. Dementsprechend zeigte sich auch an den einzelnen Messphasen (M1-4) jeweils das niedrigste, mediane PAPP-A bei den hyperstimulierten Patientinnen der Stimulationsgruppe 3 und höhere, mediane PAPP-A-Werte in den nicht bzw. niedrig stimulierten Stimulationsgruppen 1 und 2 (Abb. 8).

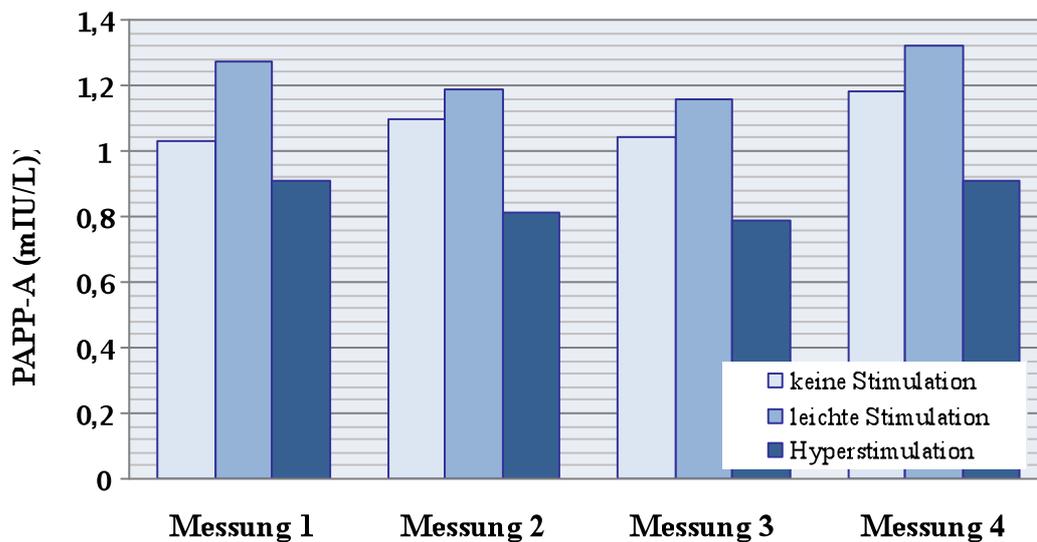


Abb. 8: Zyklusphasenabhängige Unterschiede von PAPP-A je nach Stimulationsverfahren. Sig-nifikante Unterschiede fanden sich zwischen Gruppe 2 und 3 an M1-4 sowie zwischen Gruppe 1 und 3 an M2-3 ($p < 0,05$ nach Mann-Whitney-U-Testung).

Die größten Differenzen im Bezug auf die PAPP-A-Serumspiegel fanden sich zwischen Patientinnen der Stimulationsgruppe 2 und 3. Diese waren über den gesamten Zyklusverlauf signifikant (M1: $p = 0,032^*$; M2: $p = 0,018^*$; M3: $p = 0,021^*$; M4: $p = 0,049^*$). Zwischen den Patientinnen der Stimulationsgruppen 1 und 3 hingegen ließen sich signifikante Unterschiede nur um die Zyklusmitte darstellen (M1: $p = 0,127$; M2: $p = 0,02^*$; M3: $p = 0,008^*$; M4: $p = 0,124$). Die Unterschiede von PAPP-A zwischen den Patientinnen der Stimulationsgruppe 1 und 2 waren auch bei der Betrachtung der einzelnen Zyklusphasen nicht signifikant (M1: $p = 0,502$; M2: $p = 0,979$; M3: $p = 0,907$; M4: $p = 0,887$), obschon die medianen PAPP-A-Serumspiegel in Gruppe 2 zu jeden Zeitpunkt der Untersuchung höher waren. Anhand der p -Werte ließ sich zusätzlich veranschaulichen, dass sich die Unterschiede von PAPP-A zwischen den Stimulationsgruppen zur Zyklusmitte hin vergrößerten bzw. signifikanter wurden, weil es im Vergleich zu den anderen Patientinnen bei den Hyperstimulierten zu einem stärkeren PAPP-A-Abfall kam.

3.3 Veränderungen von PAPP-A im Zyklusverlauf

Um die Veränderungen von PAPP-A im Zyklusverlauf darzustellen, wurden die PAPP-A-Serumspiegel der einzelnen Zyklusphasen verglichen. Es zeigte sich ein signifikanter Abfall von PAPP-A (um 8 %; $p=0,017$) vom frühen Zyklus (M1) bis zur Zyklusmitte (M3), wo PAPP-A seinen Tiefpunkt erreichte. Darauf folgte ein erneuter signifikanter Anstieg der PAPP-A-Werte (um 10 %; $p=0,040$) in der späten Lutealphase des Zyklus (M4), womit erneut vergleichbare Werte wie zu Beginn des Zyklus (M1) erreicht wurden (Tab. 4; Abb. 9).

PAPP-A (mIU/L)	M1: Follikelphase 1	M2: Follikelphase 2	M3: Ovulationszeitpunkt	M4: Lutealphase
Anzahl (n)	135	135	135	135
Median	1,06	1,10	0,98	1,08
25% Quartil	0,64	0,56	0,54	0,56
75% Quartil	1,58	1,60	1,52	1,66
Interquartilbereich	0,94	1,04	0,98	1,10

Tab. 4: PAPP-A in Abhängigkeit zur Zyklusphase. Es zeigt sich ein signifikanter PAPP-A-Abfall von M1 zu M3 ($p=0,017$ nach Wilcoxon-Testung) und ein signifikanter Anstieg von M3 zu M4 ($p=0,040$ nach Wilcoxon-Testung).

Die Untersuchung der Zyklusverläufe von PAPP-A unter Berücksichtigung des Stimulationsmodus stellte bei den hyperstimulierten Patientinnen der Stimulationsgruppe 3 in gleicher Weise einen signifikanten medianen PAPP-A-Abfall (um 15 %; $p=0,019$) vom Zyklusbeginn (M1) bis zur Zyklusmitte (M3) sowie ein erneuter signifikanter medianer PAPP-A-Anstieg (um 15 %; $p=0,028$) bis zur späten Lutealphase des Zyklus (M4) darstellen (Abb. 10).

In den Stimulationsgruppe 1 und 2 hingegen waren diese Verläufe zwar anhand der PAPP-A-Werte weitgehend nachvollziehbar (Abb. 14), jedoch erreichten die Unterschiede zwischen den einzelnen Zyklusphasen nicht das Signifikanzniveau (Abfall zur Zyklusmitte (M1-M3): Stimulationsgruppe 1: $p=0,52$; Stimulationsgruppe 2: $p=0,07$; Anstieg zu Beginn des nächsten Zyklus (M3-M4): Stimulationsgruppe 1: $p=0,63$; Stimulationsgruppe 2: $p=0,163$).

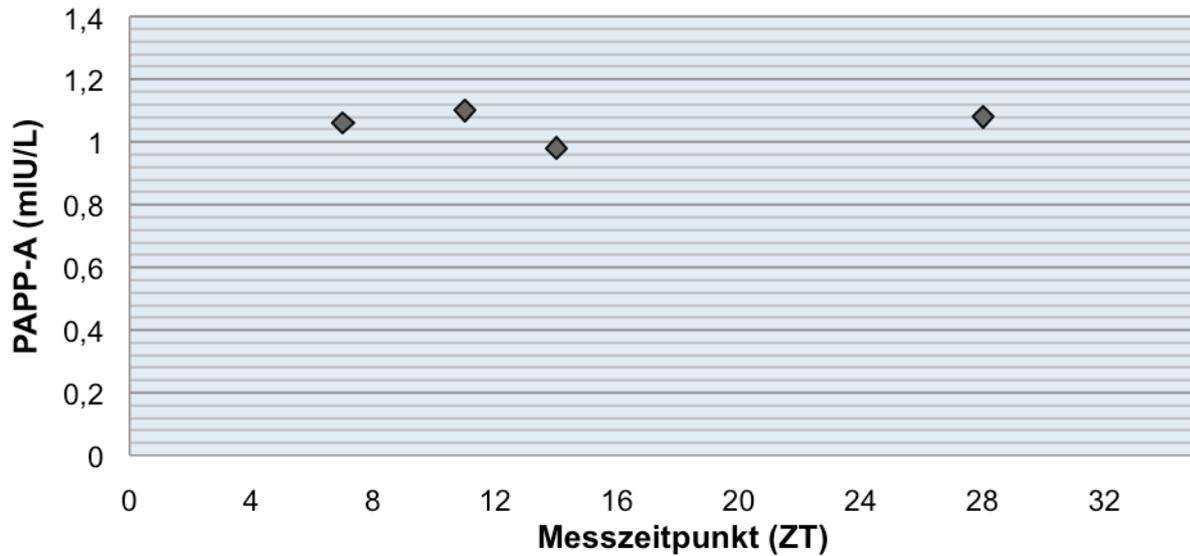


Abb. 9: Zyklischer Verlauf von PAPP-A. Es zeigt sich ein signifikanter PAPP-A-Abfall von M1 zu M3 ($p=0,017$ nach Wilcoxon-Testung) und ein signifikanter Anstieg von M3 zu M4 ($p=0,040$ nach Wilcoxon-Testung).

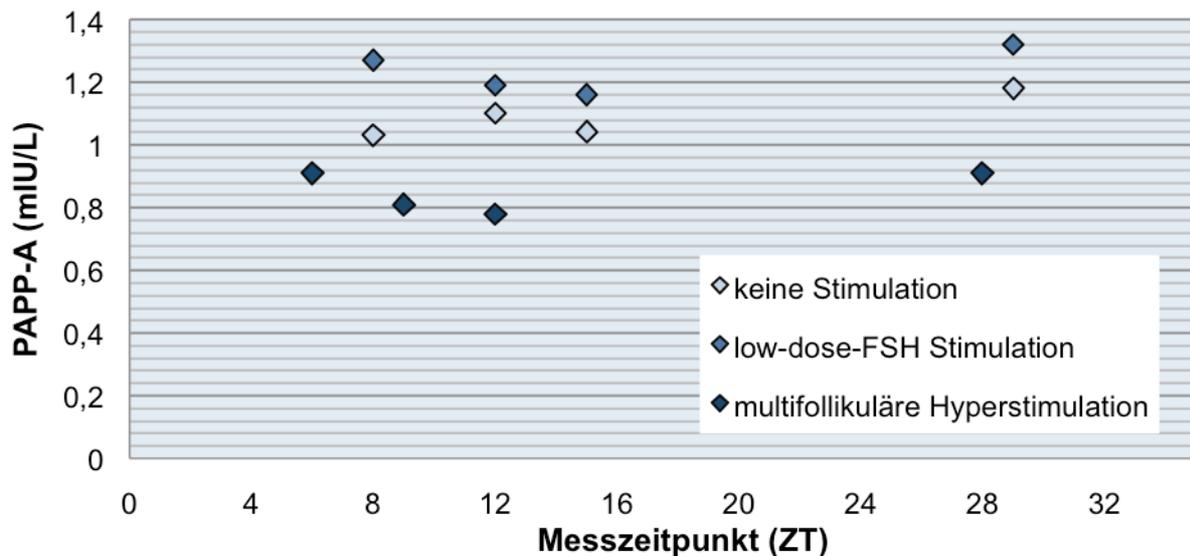


Abb. 10: Zyklische Verläufe von PAPP-A je nach Stimulationsverfahren. Nur unter multifollikulärer Hyperstimulation zeigt sich ein signifikanter periovulatorischer PAPP-A-Abfall ($p=0,019$ nach Wilcoxon-Testung).

Ergänzend zu den vorherigen Ergebnissen konnte man außerdem sehen, dass die maximalen Schwankungen der PAPP-A-Mediane bei den Patientinnen im Spontanzklus (13,5 %) und unter low-dose Stimulation (13,7 %) kleiner ausfielen als unter multifollikulärer Hyperstimulation (15,2 %), wo sich PAPP-A im Verlauf des Zyklus stärker veränderte.

3.4 Zusammenhang zwischen PAPP-A und zyklusabhängigen Faktoren

3.4.1 PAPP-A und Estradiol

Analog zu PAPP-A wurden die Serumspiegel von Estradiol im Verlauf des Zyklus und unter dem Einfluss follikulärer Stimulation untersucht. Dabei konnten signifikante Unterschiede zwischen den Estradiol-Serumspiegeln der einzelnen Stimulationsgruppen festgestellt werden ($p < 0,001$). Die medianen Estradiolwerte der multifollikulär hyperstimulierten Patientinnen (523,0 pg/ml) waren signifikant höher ($p < 0,001$; Abb. 11) als bei den Vergleichsgruppen (Gruppe 1: 95,0 pg/mL; Gruppe 2: 110,5 pg/ml). Zudem zeigte sich in allen Stimulationsgruppen ein signifikanter Anstieg der Estradiol-Serumspiegel vom Zyklusbeginn (M1) bis zur Zyklusmitte (M3) ($p < 0,001$ für Stimulationsgruppe 1-3, Abb.11).

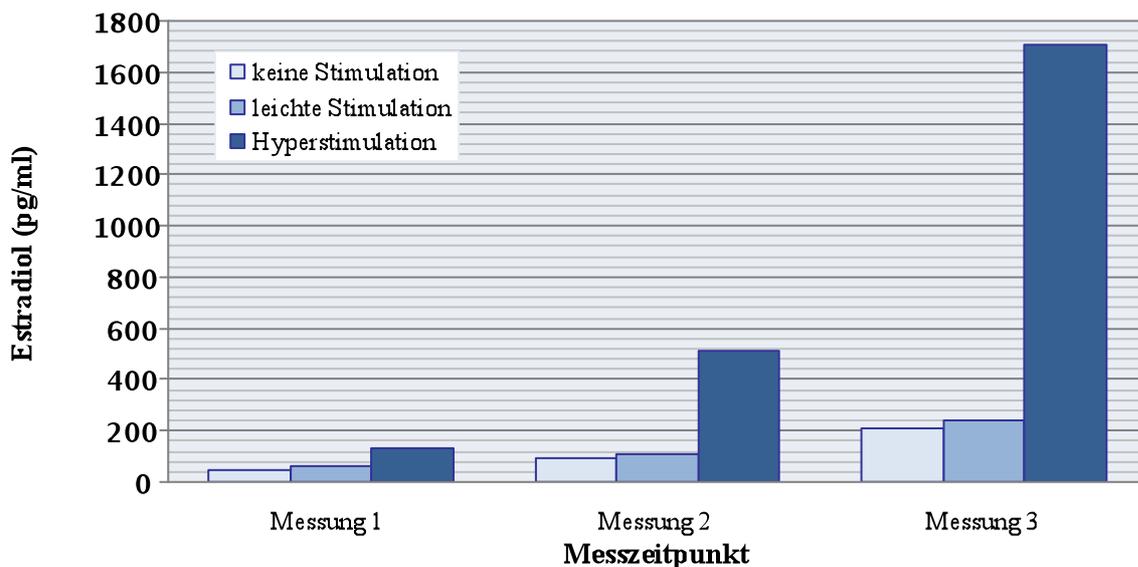


Abb. 11: Estradiol in Abhängigkeit zur Stimulationsstärke und Zyklusphase. Bei den hyperstimulierten Patientinnen zeigen sich signifikant höhere Estradiolwerte ($p < 0,001$ nach Mann-Whitney-U) und ein signifikanter Anstieg von Estradiol zwischen M1 und M3 ($p < 0,001$ in Gruppe 1-3 nach Wilcoxon).

Ein Zusammenhang zwischen den Serumkonzentrationen von PAPP-A und Estradiol konnte bei den nicht oder gering stimulierten Frauen nicht gefunden werden (Gruppe 1: $p = 0,076$; $r = 0,185$; Gruppe 2: $p = 0,622$; $r = -0,043$). Bei den hyperstimulierten Frauen hingegen stellte sich passend zu der unterschiedlichen Verteilung von Estradiol und PAPP-A in den Stimulationsgruppen und den divergenten Zyklusverläufen eine signifi-

kante, negative Korrelation zwischen den Serumkonzentrationen von PAPP-A und Estradiol dar ($p= 0,007$; $r= -0,202$; Abb. 12).

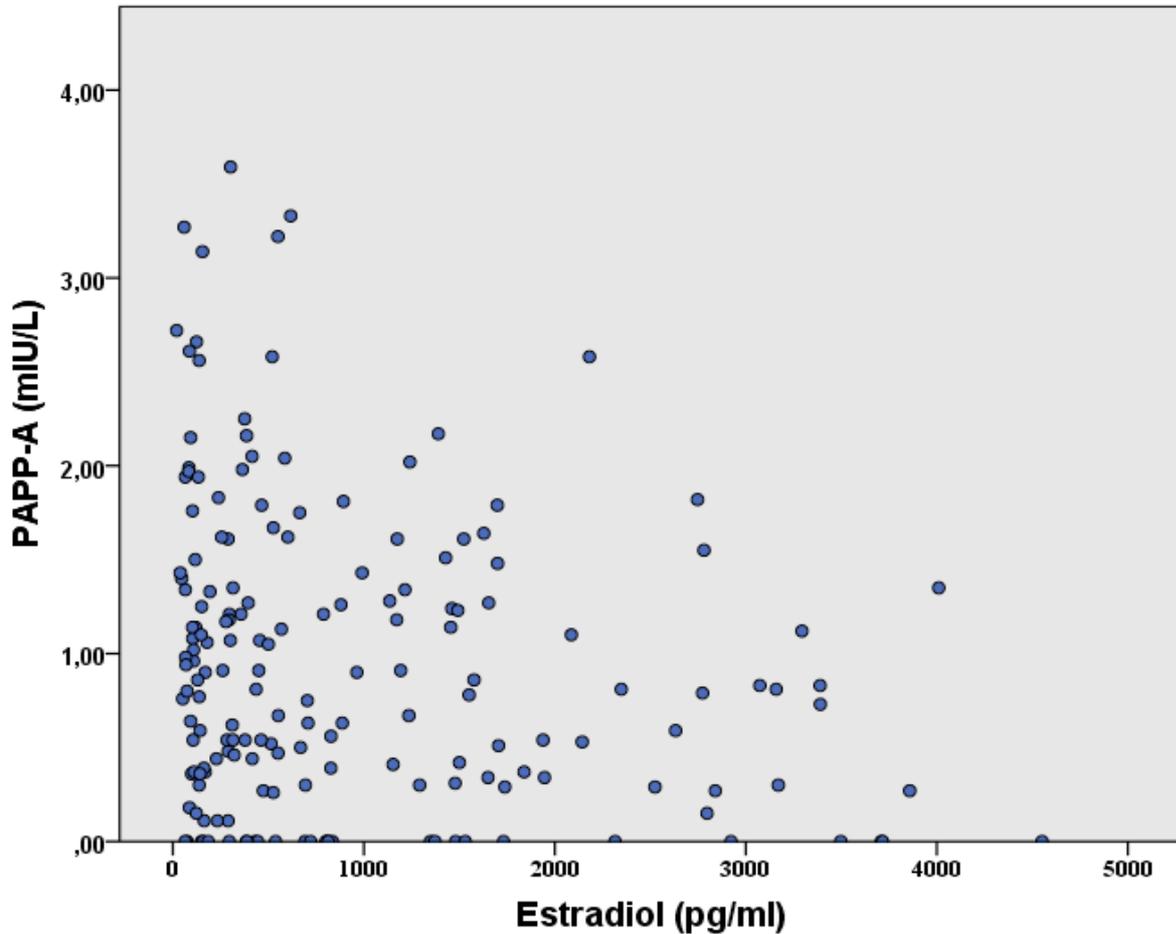


Abb. 12: Korrelation zwischen PAPP-A und Estradiol bei den hyperstimulierten Patientinnen ($p= 0,007$; $r= -0,202$ nach Spearman-Rank). Im Serum zeigt sich ein signifikanter Abfall von PAPP-A unter Zunahme von Estradiol.

3.4.2 PAPP-A und das Follikelwachstum

3.4.2.1 PAPP-A und die Follikelanzahl

Neben den hormonellen Effekten wurden die Veränderungen der Follikeleigenschaften unter dem Einfluss hormoneller Stimulation sowie im Zyklusverlauf untersucht. Erwartungsgemäß ließen sich als Stimulationseffekt bei Patientinnen unter multifollikulärer Hyperstimulationstherapie signifikant mehr Kohortenfollikel mit einem Durchmesser ab einer Größe von < 10 mm finden ($n= 11$), als bei den Vergleichsgruppen ($n= 5$; $p= 0,001$). Allerdings ist dieses Ergebnis auf Grund der geringen Fallzahl in letztgenannten

Gruppen 1 (n= 1) und 2 (n=2) nur sehr begrenzt aussagekräftig, da für diese Untersuchung verbundene Stichproben getestet werden sollten, und die Angaben zur Follikelgröße und Anzahl in diesen Patientengruppen lückenhaft waren.

Die Untersuchung der Follikelanzahl im Zyklusverlauf gab bei den nicht oder gering stimulierten Patientinnen keine signifikanten zyklusabhängigen Veränderungen der Follikelanzahl wieder (Vergleich der Follikelanzahl an M1 und M3 in Stimulationsgruppe 1: konstant ($p= 1$), Stimulationsgruppe 2: $p= 0,317$). Unter multifollikulärer Hyperstimulation hingegen konnte eine signifikante Zunahme der Follikelanzahl vom frühen Zyklus (M1: n= 10) bis zur Zyklusmitte (M3: n= 12) beobachtet werden ($p= 0,001$; Abb. 13)

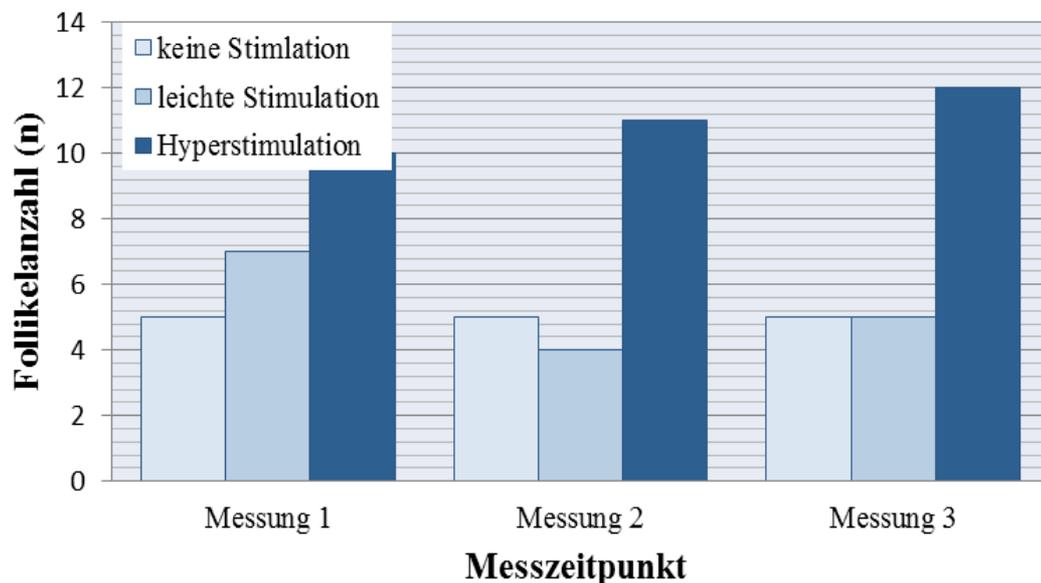


Abb. 13: Follikelanzahl in Abhängigkeit zur Stimulationsstärke und Zyklusphase. Bei hyperstimulierten Patientinnen zeigen sich signifikant mehr Follikel ($p < 0,001$ nach Mann-Whitney-U) und eine signifikante Zunahme der Follikelanzahl im Zyklusverlauf ($p < 0,001$ nach Wilcoxon-Test).

Ein Zusammenhang zwischen den PAPP-A-Serumspiegeln der Patientinnen und ihrer Follikelanzahl konnte sich im Fall der nicht oder gering stimulierten Patientinnen nicht bestätigen (Gruppe 1: Test nicht möglich weil Follikelanzahl: konstant; Gruppe 2: $p= 0,667$; $r= -0,5$). Unter multifollikulärer Hyperstimulation hingegen konnten passend zur abweichenden Verteilung der Follikelanzahl und PAPP-A in den Stimulationsgruppen und den divergenten Zyklusverläufen eine hochsignifikante, negative Korrelation zwischen der Follikelanzahl und den PAPP-A-Serumspiegeln gefunden werden ($p= 0,001$; $r= -0,277$; Abb. 14).

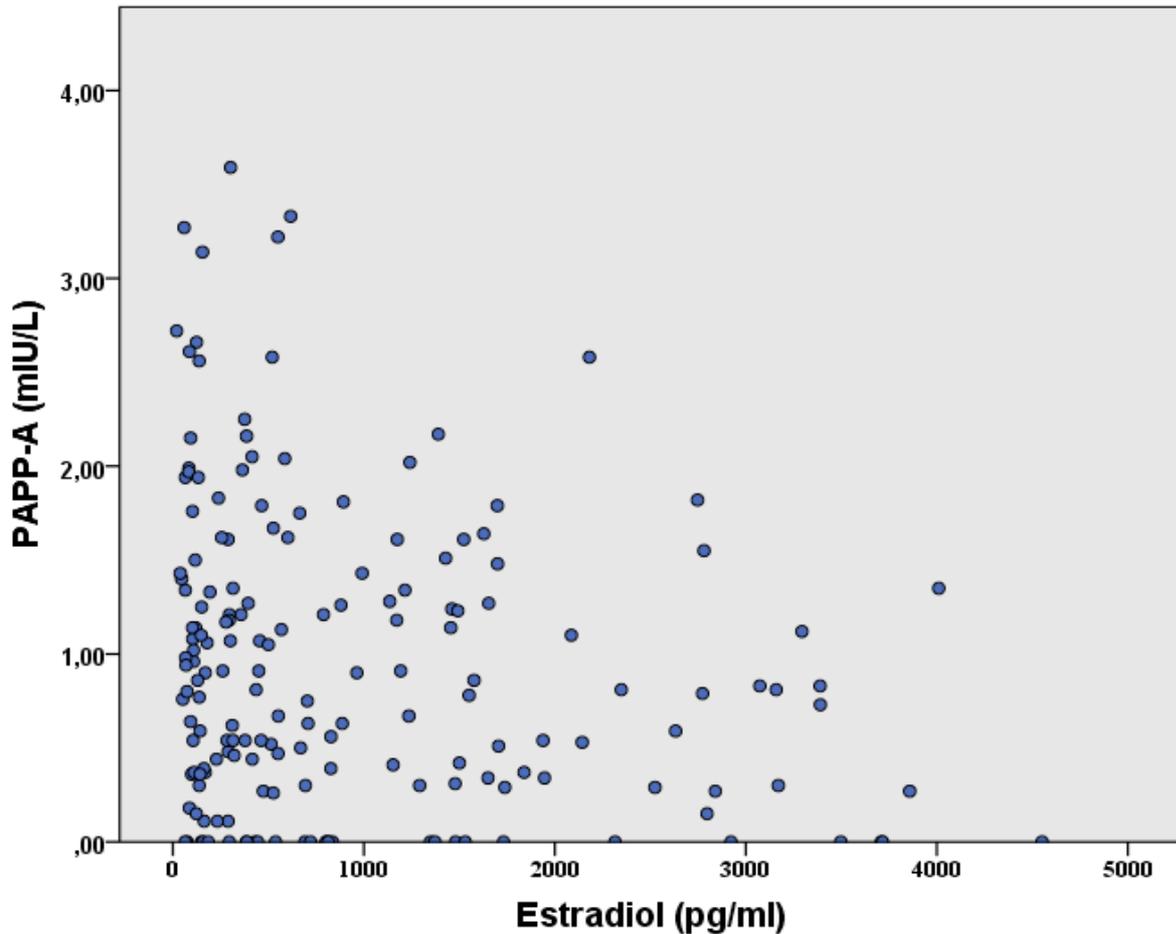


Abb. 14: Korrelation zwischen PAPP-A und der Follikelzahl bei den hyperstimulierten Patientinnen. Es zeigt sich ein signifikanter Abfall der PAPP-A-Serumspiegel bei Zunahme der Follikelanzahl ($p < 0,001$; $r = -0,337$ nach Spearman-Rank).

3.4.2.2 PAPP-A und die Follikelgröße des dominanten Follikels

Neben der Follikelanzahl wurde außerdem die Größe der Follikel untersucht. Hierbei zeigte sich eine signifikante Größenzunahme des dominanten Follikels unter Stimulation sowie im Verlauf des Zyklus (Abb. 15). Zu Beginn des Zyklus war die mediane Follikelgröße in allen Stimulationsgruppen ähnlich ($p = 0,918$). Mit zunehmender Stimulationsdauer zeigte sich allerdings bei den stimulierten Patientinnen ein stärkeres Wachstum des dominanten Follikels, sodass in der späten Follikelphase (M2: $p < 0,001$) und um die Zyklusmitte (M3: $p = 0,001$) signifikant größere Follikel bei den hyperstimulierten Patientinnen gefunden werden konnten. Außerdem konnte erwartungsgemäß in allen Stimulationsgruppen ein signifikanter Anstieg der Follikelgröße im Verlauf des Zyklus verzeichnet werden ($p < 0,001$ für Stimulationsgruppe 1-3).

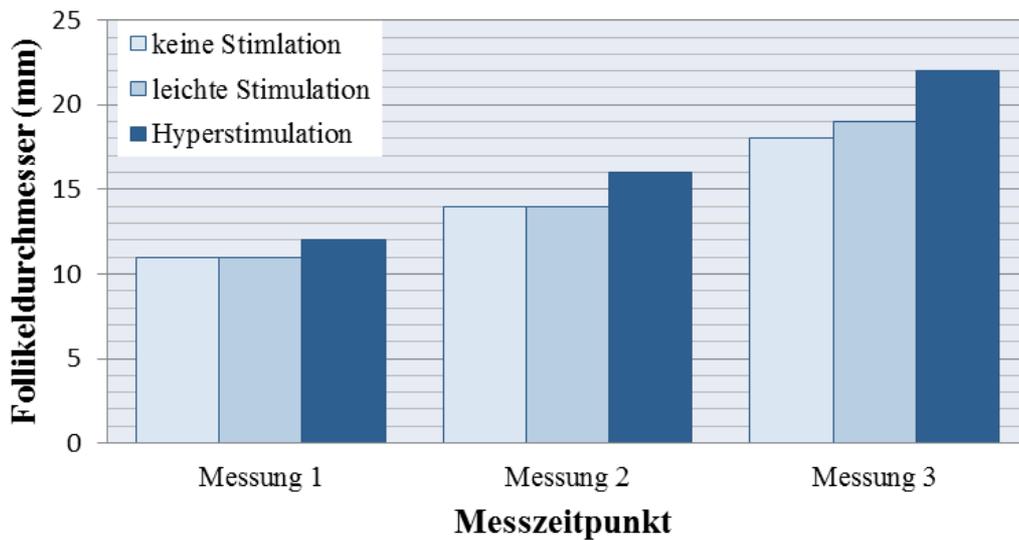


Abb. 15: Follikelgröße des dominanten Follikels in Abhängigkeit zur Stimulationsstärke und Zyklusphase. Es zeigt sich ein signifikanter Zuwachs der Follikelgröße im Zyklusverlauf ($p < 0,001$ für Stimulationsgruppe 1-3 nach Wilcoxon-Testung) und mit Zunahme der Stimulationsstärke.

Ein Zusammenhang zwischen der Größe des dominanten Follikels und den PAPP-A-Serumspiegeln konnte für keine der Stimulationsgruppen dargestellt werden (Korrelation Follikelgröße und PAPP-A: Gruppe 1: $p = 0,278$; $r = -0,144$; Gruppe 2: $p = 0,278$; $r = -0,99$; Gruppe 3: $p = 0,178$; $r = -0,103$).

3.4.3 PAPP-A und die Endometriumsdicke

Die Endometriumsdicke der untersuchten Patientinnen variierte ebenfalls in Abhängigkeit des Stimulationsverfahrens und der Zyklusphase (Abb. 16). Zunächst wiesen die Patientinnen der verschiedenen Stimulationsgruppen vergleichbare Endometriumsdicken ($p = 0,525$) auf. Unter dem Einfluss der Stimulation kam es jedoch bei den stimulierten Patientinnen zu einer stärkeren Proliferation des Endometriums, sodass gegen Ende der Follikelphase (M2: $p < 0,001$) und um die Zyklusmitte (M3: $p < 0,001$) signifikante Unterschiede hinsichtlich der Endometriumsdicke gefunden werden konnten.

Außerdem zeigte sich bei den Patientinnen aller Stimulationsgruppen eine signifikante Zunahme der Endometriumshöhe vom frühen Zyklus bis zur Zyklusmitte ($p < 0,001$ in Gruppe 1-3). Ein Zusammenhang zwischen der Endometriumshöhe und den PAPP-A-Serumspiegeln der Patientinnen konnte für keine der Stimulationsgruppen dargestellt

werden (Gruppe 1: $p= 0,757$; $r= 0,033$; Gruppe 2: $p= 0,399$, $r= -0,085$; Gruppe 3: $p= 0,521$; $r= -0,49$).

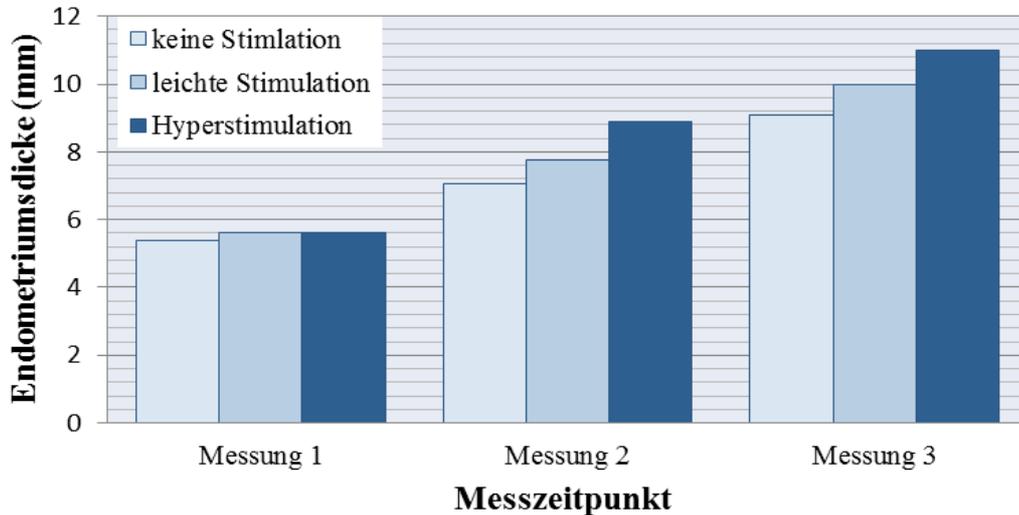


Abb. 16: Endometriumsdicke in Abhängigkeit zur Stimulationsstärke und Zyklusphase. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme der Endometriumshöhe unter Stimulation ($p < 0,001$ nach Wilcoxon-Testung) und im Verlauf des Zyklus ($p < 0,001$ nach Kruskal-Wallis-Testung).

3.5 PAPP-A und zykluskonstante Faktoren

Wie sich herausstellte, waren die Fluktuationen von PAPP-A zumindest in den nicht oder leicht stimulierten Zyklus sehr klein. Im Gegensatz dazu zeigten sich große Unterschiede zwischen den PAPP-A-Werten der einzelnen Patientinnen. Daher wurden auch die Einflüsse zykluskonstanter Faktoren und ihre Effekte auf die PAPP-A-Serumspiegel untersucht.

3.5.1 PAPP-A und Patientenalter, Patientengröße, Patientengewicht und Body-Mass-Index (BMI)

Es folgte die Untersuchung des Einflusses von Patientenalter, Patientengröße, Patientengewicht und BMI auf die PAPP-A-Serumspiegel der Patientinnen (siehe Tab. 2). Dazu wurde eine Korrelationsanalyse zwischen dem jeweiligen Parameter und den patientenspezifischen PAPP-A-Werte der Frauen ($n= 120$) durchgeführt, die wie im Methodenteil beschrieben aus den PAPP-A-Einzelwerten der Patientinnen ermittelt wurden.

Es konnte eine signifikante, negative Korrelation zwischen der Patientengröße und PAPP-A festgestellt werden ($p= 0,037$; $r= -0,91$; $n= 120$; Abb. 17).

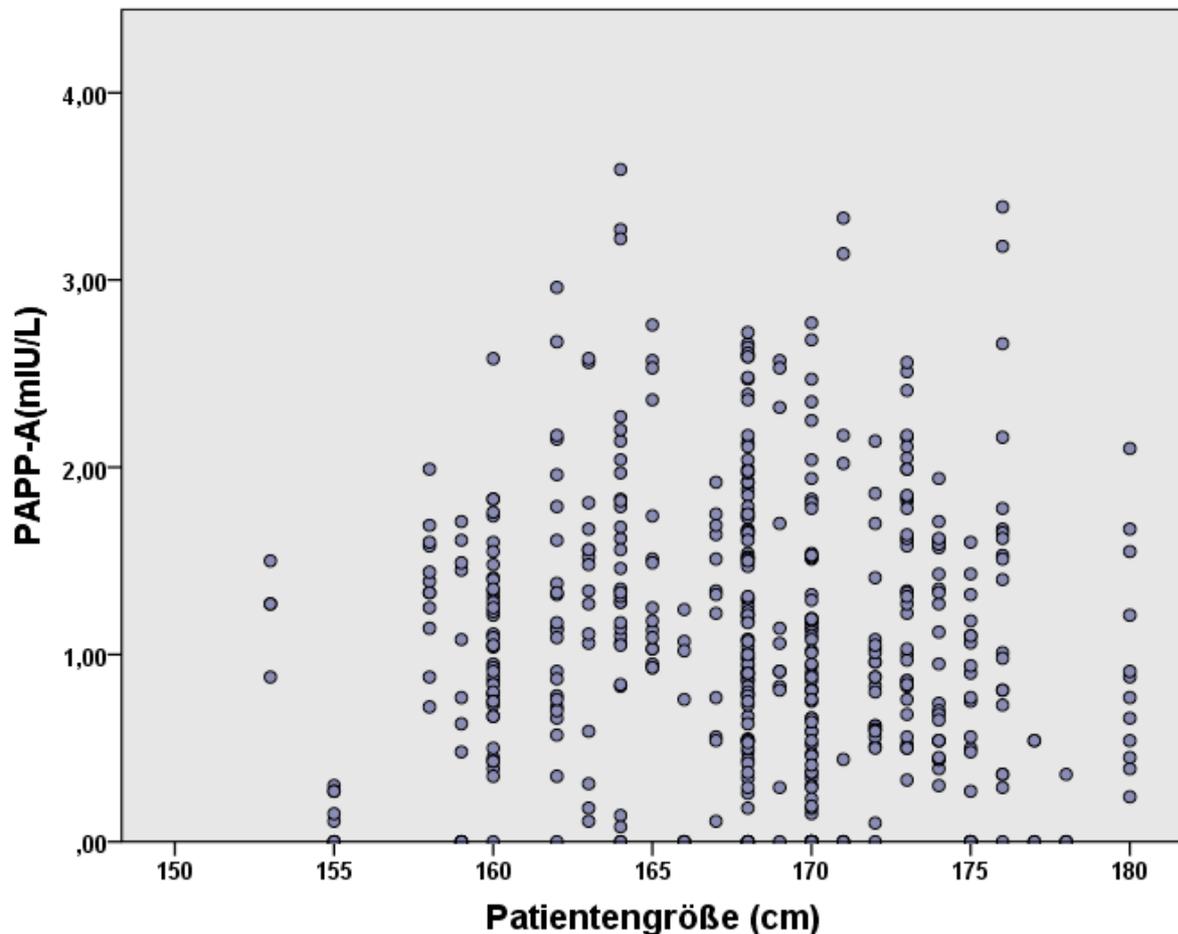


Abb. 17: Korrelation zwischen PAPP-A und der Patientengröße. Es zeigt sich ein signifikanter Abfall von PAPP-A unter Zunahme der Größe einer Patientin. ($p= 0,037$; $r= -0,91$).

Mit Zunahme der Körpergröße einer Patientin kam es demnach gleichzeitig zu einem Abfall ihres patientenspezifischen PAPP-A. Da die Verteilung der Patientengröße in den Stimulationsgruppen vergleichbar war ($p= 0,51$; Tab. 2), kann ausgeschlossen werden, dass dieses Ergebnis fälschlicherweise dadurch zustande gekommen ist, dass die multifollikulär stimulierten Patientinnen mit den signifikant niedrigeren PAPP-A-Werten zufällig auch signifikant größer waren.

Sowohl die Korrelation zwischen PAPP-A und Patientengewicht ($p= 0,883$; Korrelationskoeffizient= $0,006$), PAPP-A und BMI ($p= 0,583$; Korrelationskoeffizient= $0,024$) sowie

PAPP-A und Patientenalter ($p= 0,86$; $r= 0,017$) ließen hingegen keine signifikanten Zusammenhänge mit der patientenspezifischen Höhe der PAPP-A-Serumspiegeln erkennen.

3.5.2 PAPP-A und Sterilität sowie Anzahl von Schwangerschaften, Geburten & Aborten

Ebenso sollte der Einfluss vorangegangener Schwangerschaften, Geburten und Aborte sowie die Form der Sterilität im Bezug auf die patientenspezifischen PAPP-A-Werte der Frauen untersucht werden (Tab. 5). Dazu erfolgte eine Einteilung der Patientinnen in Sterilitäts-, Graviditäts-, Paritäts-, und Abortgruppen. Bei der Form der Sterilität wurde zwischen primärer und sekundärer Sterilität unterschieden. In den anderen Fällen wurden die Patientinnen nach der Anzahl der Schwangerschaften, Geburten und Aborte in Gruppen von $n= 0$, $n= 1$, $n= 2$ und $n\geq 3$ eingeteilt.

Der Vergleich der jeweiligen Untergruppen konnten keine Unterschiede in der Höhe der patientenspezifischen PAPP-A-Werte erkennen lassen. Die Form der Sterilität ($p= 0,626$) sowie die Anzahl vorangegangener Schwangerschaften ($p= 0,167$), Geburten ($p= 0,741$) und Aborte ($p= 0,986$) zeigten demnach keinen signifikanten Einfluss auf die patientenspezifischen PAPP-A-Werte.

3.5.3 Zusammenhang zwischen PAPP-A und Diagnosen der Patientinnen

Ein weiteres Ziel dieser Studie war es, die Auswirkungen verschiedener Erkrankungen auf die PAPP-A-Serumspiegel der Patientinnen zu analysieren. Dazu wurden die patientenspezifischen PAPP-A-Werte der Frauen, die von einer Erkrankung betroffen waren, mit denen der Kontrollgruppe verglichen (alle Patientinnen, die nicht von der Erkrankung betroffen waren). Dabei wurden allerdings auch die Patientinnen in die Auswertung mit einbezogen, die gleichzeitig an mehrere Krankheiten litten, da sonst nur sehr wenig Fälle hätten ausgewertet werden können. Ebenso ist zu beachten, dass bei den Erkrankungen, die gleichzeitig eine Therapieindikation stellen, zum Zeitpunkt der PAPP-A-Messungen bereits eine entsprechende medikamentöse Therapie eingeleitet wurde. Aus Gründen der statistischen Aussagekraft wurden Krankheiten erst ab einer Fallzahl über $n= 10$ aufgeführt.

Sterilitätsgruppe	primär	sekundär	-	-	Signifikanz (p)
Anzahl (n)	65	55	-	-	0,626
PAPP-A (mIU/L)	1,19	1,09	-	-	
Graviditätsgruppe	Gravida 0	Gravida 1	Gravida 2	Gravida ≥ 3	
Anzahl (n)	65	31	14	10	0,167
PAPP-A (mIU/L)	1,18	1,01	1,42	0,92	
Paritätsgruppe	Para 0	Para 1	Para 2	Para ≥ 3	
Anzahl (n)	99	20	1	0	0,741
PAPP-A (mIU/L)	1,08	1,16	1,42	-	
Abortgruppe	Abort 0	Abort 1	Aborte 2	Abort ≥ 3	
Anzahl (n)/ Prozent	97	27	8	6	0,986
PAPP-A (mIU/L)	1,14	1,20	1,14	1,07	

Tab. 5: Zusammenhang zwischen PAPP-A und Art der Sterilität sowie der Anzahl von Schwangerschaften, Geburten, und Aborten. PAPP-A-Mediane der Sterilitäts-, Graviditäts-, Paritäts- und Abortgruppen mit Angabe der Wahrscheinlichkeit von signifikanten Unterschieden in PAPP-A zwischen den Untergruppen nach Kruskal-Wallis-Testung..

Tabelle 6 stellt eine Übersicht über die untersuchten Erkrankungen mit Prävalenz, patientenspezifischem, medianem PAPP-A von Patientengruppe und Kontrollgruppe sowie der Signifikanz der Unterschiede dar.

Im Rahmen dieser Studie wurde ein besonderer Fokus auf Störungen des endokrinen Systems gelegt. Zu den Erkrankungen mit besonders hoher Prävalenz gehörten in unserem Kollektiv die Hypothyreose (43 Fälle), das PCO-Syndrom (37 Fälle) und die Endometriose (22 Fälle). Außerdem wurden Störungen des Insulinstoffwechsels untersucht (n=19), bei denen zusätzlich zwischen Patientinnen mit manifestem Diabetes mellitus Typ 2 (n=6) und Patientinnen mit pathologischer Glukosetoleranz (n=15) unterschieden wurde.

Bei keiner der untersuchten Erkrankungen ließ sich jedoch eine signifikante Abweichung der patientenspezifischen PAPP-A-Werten im Vergleich zu der Kontrollgruppe darstellen. Damit ist anzunehmen, dass es keinen direkten Zusammenhang zwischen diesen Erkrankungen und den patientenspezifischen Serumspiegeln von PAPP-A gibt.

Erkrankung	Prävalenz (n/120)	Medianes PAPP-A (mIU/L)		Signifikanz (p)
		Erkrankte	Kontrolle	
Hypothyreose	43	1,02	1,03	0,66
PCO	37	1,23	1,02	0,28
Endometriose	22	1,07	1,02	0,71
Insulinresistenz:	21	1,03	1,18	0,42
Diab. melli. Typ 2	6	0,67	1,04	0,29
path.Glukosetoleranz	15	1,21	1,02	0,42
Hyperandrogenämie	18	1,21	0,98	0,54
Hyperprolaktinämie	14	0,92	1,05	0,99

Tab. 6: Erkrankungen ohne signifikante Korrelation zu veränderten PAPP-A-Serumspiegeln. Vergleiche der medianen PAPP-A-Werte zwischen Erkrankten und der Kontrollgruppe mit Signifikanzangabe der Unterschiede nach Mann-Whitney-U-Testung.

4. Diskussion

4.1 Ziele der Arbeit

In dieser Studie sollten die Einflüsse verschiedener Faktoren auf die Serumspiegel von PAPP-A untersucht werden. Erstens sollte geprüft werden, welche Effekte die folliculäre Stimulation mit rekombinantem FSH auf die Serumspiegel von PAPP-A hat. Zweitens sollte geklärt werden, ob im Verlauf eines natürlichen oder stimulierten Zyklus Veränderungen der PAPP-A-Serumspiegel nachzuweisen sind. Würde sich bestätigen, dass parallel zu der Follikelreifung nicht nur die lokalen Konzentrationen im Ovar, sondern auch die Serumspiegel von PAPP-A ansteigen, dann könnte PAPP-A möglicherweise tatsächlich als Serummarker für die Follikelreifung in Betracht gezogen werden (Conover et al., 2001; Hourvitz et al., 2000; Hourvitz et al., 2002). Da unabhängig von zyklischen Veränderungen große Unterschiede zwischen den PAPP-A-Spiegeln der Patientinnen gefunden werden konnten, wurden drittens die Einflüsse zykluskonstanter Eigenschaften der Patientinnen auf die PAPP-A-Serumspiegel analysiert. Von besonderem Interesse war dabei, wie sich PAPP-A im Rahmen bestimmter Erkrankungen verändert, die im Zusammenhang mit einer gestörten Follikelreifung und Sterilität stehen. Würden sich Veränderungen von PAPP-A in den Serumspiegeln der betroffenen Patientinnen widerspiegeln lassen, dann könnte PAPP-A möglicherweise als diagnostischer Serummarker hilfreich sein oder im Rahmen der reproduktionsmedizinischen Therapie Verwendung finden.

4.2 Bewertung der Methode

PAPP-A wurde bereits von zahlreichen Arbeitsgruppen untersucht. Durch die Verwendung eines neuen hochspezifischen und hochsensitiven Immunoassays (ACTIVE cPAPP-A ELISA), der im Gegensatz zu früheren Testsystemen nicht nur komplexiertes PAPP-A (Qin et al., 2006), sondern auch freies PAPP-A erfasst, sollten im Rahmen unserer Analysen bereits geringe Veränderungen von PAPP-A detektiert werden. So gelang trotz der niedrigen Serumspiegel von PAPP-A außerhalb der Schwangerschaft in über 90 % (490/540) der Seren die Bestimmung von PAPP-A. In lediglich 50 Serumproben lagen die Konzentrationen von PAPP-A unter der Nachweisgrenze. Die gemessenen PAPP-A-Konzentrationen dieser Studie (Median:

1,06 mIU/L) stimmen zudem mit den erwarteten Werten des Assays überein (1,18 mIU/L nach Kumar et al., 2008).

4.3 Auswertung der Ergebnisse

4.3.1 Das Patientenkollektiv

In diese Studie wurden 120 Patientinnen einbezogen, die sich in reproduktionsmedizinischer Behandlung an der Sterilitätsambulanz der Universitätsfrauenklinik Bonn befanden. Mit dem Ziel, mögliche Effekte der externen FSH-Stimulation auf die PAPP-A-Serumspiegel zu untersuchen, wurden die Patientinnen in Abhängigkeit ihres Stimulationsverfahrens in verschiedene Gruppen eingeteilt (nicht stimuliert, leicht stimuliert, hyperstimuliert). Um mögliche Unterschiede der PAPP-A-Serumspiegel in den verschiedenen Stimulationsgruppen tatsächlich auf die unterschiedlichen Stimulationsverfahren zurück führen zu können, musste zunächst die Vergleichbarkeit der Patientinnen hinsichtlich anderer Charakteristika überprüft werden. Wie sich herausstellte, waren die einzelnen Patientengruppen in den Faktoren Parität, Körpergröße, Körpergewicht und BMI vergleichbar. Demnach können diese Eigenschaften der Patientinnen als Ursache für mögliche Unterschiede zwischen den PAPP-A-Serumspiegel in den Stimulationsgruppen ausgeschlossen werden.

Signifikante Unterschiede zwischen den Stimulationsgruppen konnten hingegen beim Patientenalter sowie der Gravidität- und Aborthäufigkeit gefunden werden. Wie sich herausstellte, waren die IVF- und ICSI-Patientinnen etwa 3 Jahre älter, als die Patientinnen der Vergleichsgruppen. Dies ist vermutlich dadurch zu begründen, dass im Rahmen einer Kinderwunschbehandlung zunächst möglichst natürliche Methoden ausprobiert werden (VZO und IUI im Spontanzklus oder unter leichter Stimulation), bevor zu invasiveren, risikoreicheren und kostenintensiveren Reproduktionsmethoden übergegangen wird (IVF und ICSI unter Hyperstimulation). Durch Korrelationsanalyse konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter der Patientinnen und ihren PAPP-A-Serumspiegeln jedoch ausgeschlossen werden. Es ist daher anzunehmen, dass die unterschiedliche Verteilung des Alters keine Wirkung auf die PAPP-A-Werte in den Stimulationsgruppen hatte. Des Weiteren konnte dargestellt werden, dass die unstimulierten Patientinnen anamnestisch eine geringere Anzahl an Graviditäten und

Aborten aufwiesen als die anderen Stimulationsgruppen. Ein Effekt auf die PAPP-A-Serumspiegel konnte jedoch auch bei diesen Faktoren ausgeschlossen werden, da keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung von PAPP-A in Abhängigkeit zur Gravidität- oder Aborthäufigkeit der Patientinnen gefunden werden konnte.

Mit der Einteilung der Patientinnen in die Stimulationsgruppen ist man demnach in der Lage die Effekte der Follikelstimulation auf PAPP-A zu untersuchen, da von den anderen Eigenschaften der Patientinnen, bei denen eine unterschiedliche Verteilung in den Stimulationsgruppen gefunden werden konnte, keine positive oder negative Wirkung auf die PAPP-A-Serumkonzentrationen zu erwarten sind.

4.3.2 Veränderungen von PAPP-A unter follikulärer Stimulation

PAPP-A ist als wichtige Komponente des intraovariellen IGF-Systems und zusammen mit den Hormonen der Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse für das kontrollierte Wachstum der Follikel verantwortlich. Um einen koordinierten Ablauf der Follikelreifung zu ermöglichen, wird die intraovarielle Aktivität von PAPP-A durch die hypophysären Hormone gesteuert. Besonders FSH, das für die Stimulation der Follikelreifung verantwortlich ist, scheint die Aktivität von PAPP-A zu modulieren.

So beschreiben früheren Studien an in-vitro gezüchteten Granulosazellen eine Produktionszunahme von PAPP-A und eine Freisetzung von intraovariellen Wachstumsfaktoren unter der Wirkung FSH (Iwashita et al., 1998; Motozumi et al., 2004). Neuere Untersuchungen gehen davon aus, dass es ebenso im Rahmen verschiedener reproduktionsmedizinischer Verfahren, die mit der Gabe von rekombinantem FSH einhergehen, zu einer Zunahme der lokalen Produktion von PAPP-A im Ovar kommt (Choi et al., 2003).

Im Zuge dieser Arbeit sollte nun geklärt werden inwieweit sich die positive Wirkung von FSH darüber hinaus auch in einem Anstieg der Serumkonzentration von PAPP-A widerspiegeln lässt. Unseren Ergebnissen zur Folge konnte jedoch kein positiver Zusammenhang zwischen der Stärke der Follikelstimulation mit FSH und der Höhe der PAPP-A-Serumspiegeln dargestellt werden, wie man ihn in Analogie zu früherer Studien erwartet hätte. So ließen sich im Vergleich zu den Spontanzyklen keine signifikanten Veränderungen der PAPP-A-Serumspiegel unter leichter Stimulation der Follikel

darstellen. Darüber hinaus zeigte sich bei den IVF- und ICSI-Patientinnen im Hyperstimulationszyklus, im Gegensatz zu dem erwarteten Anstieg vom PAPP-A, sogar ein Abfall seiner Serumspiegel.

Es scheint so, dass die in anderen Studien beschriebene Produktionssteigerung von PAPP-A unter Stimulation mit rekombinantem FSH nur lokal im Follikel (z.B. in der Follikelflüssigkeit) nachgewiesen werden kann, sich jedoch nicht in einem Anstieg seiner Serumkonzentrationen widerspiegelt. Dies impliziert, dass vermutlich kein direkter Zusammenhang zwischen den lokalen Konzentrationen von PAPP-A im Follikel und im Serum vorliegt (Moos et al., 2009).

Ursächlich für einen lokal begrenzten Konzentrationsanstieg von PAPP-A im Follikel könnte die größenabhängige Permeabilität der Follikel-Blut-Schranke sein, die nur für Proteine bis zu einer Molekülgröße von etwa 300 kDa durchlässig ist (Hess et al., 1998). Demnach wäre PAPP-A in seiner Komplexform als 400 kDa großes Homodimer oder 500 kDa großes Heterotetramer (Boldt und Conover, 2007) zu groß, um entlang der Follikel-Blut-Schranke auszutreten. Das könnte gleichzeitig erklären, weshalb die Konzentrationen von PAPP-A im Serum wesentlich geringer sind (Bersinger und Klopper, 1984; Bersinger et al., 1995; Bischof et al., 1982) als in der Follikelflüssigkeit (Conover et al., 1999; Mazerbourg et al., 2001). Außerdem passt die lokal begrenzte Konzentrationssteigerung im Follikel zu dem eher auto- oder parakrin angenommenen Wirkmechanismus von PAPP-A (Boldt und Conover, 2007).

Nehmen wir also an, dass die Konzentrationen von PAPP-A im Follikel und im Serum unabhängig voneinander zu betrachten sind, dann würde man trotz Stimulation mit FSH konstante Serumspiegel von PAPP-A erwarten. Dies bestätigt sich beim Vergleich zwischen den Spontan- und low-dose-Stimulationszyklen, bei denen keine signifikanten Unterschiede gefunden werden konnten. Was aber verursacht den signifikanten Abfall der PAPP-A-Serumspiegel unter folliculärer Hyperstimulation? Dazu wäre es zunächst wichtig zu klären, woher das im Serum gemessene PAPP-A stammt. Als Ursprung kommen ja diverse Zellen des menschlichen Körpers in Frage, da PAPP-A ubiquitär, sowohl von Geweben des Reproduktionstraktes als auch außerhalb davon, gebildet wird (Boldt und Conover, 2007). Bislang ist aber unbekannt, welche Gewebe darüber hinaus in der Lage sind PAPP-A ins Serum zu sezernieren und damit die Höhe der Serumspiegel zu beeinflussen. Die Follikel als einer von vielen Produktionsorten von

PAPP-A scheinen zumindest keinen direkten Einfluss auf die Höhe seiner Serumspiegel zu haben. So muss es anderer Orts durch die Wirkung von FSH im Rahmen der Hyperstimulationstherapie zu einer verminderten Produktion, Sekretion oder einem beschleunigten Metabolismus von PAPP-A kommen, der die niedrigeren Serumkonzentrationen bei diesen Patientinnen erklärt.

4.3.3 Veränderungen von PAPP-A im Zyklusverlauf

Ein weiteres Ziel der Studie war es, die Verläufe der PAPP-A-Serumspiegel im natürlichen und stimulierten Zyklus darzustellen. Unsere Ergebnisse stellen im Einklang mit früheren Studien vergleichsweise geringe Fluktuationen der individuellen Zyklusspiegel von PAPP-A im Gegensatz zu relativ großen Unterschieden zwischen den Serumkonzentrationen der Patientinnen dar (Bersinger und Klopper, 1984; Bischof et al., 1982). So war PAPP-A bei einigen Patientinnen im gesamten Zyklusverlauf nicht messbar, wohingegen andere Patientinnen relativ konstante Serumspiegel von knapp 4 mIU/L aufwiesen. Sowohl in den natürlichen als auch in den leicht stimulierten Zyklen konnten jedoch keine signifikanten Veränderungen der PAPP-A-Serumkonzentrationen im Zyklusverlauf festgestellt werden, obschon die Serumproben der Patientinnen paarweise verglichen wurden, um zyklische Unterschiede im Patientenvergleich deutlicher zu machen. Dies lässt insgesamt darauf schließen, dass bei gesunden Frauen die PAPP-A-Serumspiegel stärker durch andere Faktoren gesteuert werden als durch zyklusabhängigen Effekte im Rahmen des Menstruationszyklus. Unter leichter FSH-Stimulation konnte lediglich eine Tendenz zu niedrigeren, periovulatorischen PAPP-A-Serumspiegeln gefunden werden. Eine mögliche Erklärung dafür liefert die Theorie, dass der dominante Follikel trotz lokal gesteigerter PAPP-A-Produktion nicht in der Lage ist, den Abfall der PAPP-A-Produktion von den Kohortenfollikeln vollständig zu kompensieren, die in der späten Follikelphase in Atresie gehen. Insgesamt könnte dies zu einer Abnahme von PAPP-A führen. Man müsste dann allerdings voraussetzen, dass PAPP-A aus dem Follikel im Serum messbar wäre, was unseren Ergebnisse zufolge unwahrscheinlich ist.

Im Gegensatz dazu konnte bei Untersuchung der Hyperstimulationszyklen ein signifikanter periovulatorischer Abfall der PAPP-A-Serumspiegel dargestellt werden. Dies ist erstaunlich, denn gerade ein Abfall von PAPP-A bei den hyperstimulierten

Patientinnen und im Laufe der Follikelphase ist aus mehreren Gründen unerwartet. Zum einen ist bekannt, dass FSH die lokale PAPP-A-Produktion im Ovar zeit- und dosisabhängig induziert (Iwashita et al., 1998; Motozumi et al., 2004). Zum anderen haben Studien belegt, dass die Syntheseleistung von PAPP-A und seine Konzentrationen in der Flüssigkeit von gesunden Follikeln parallel zur Reifung der Follikel stetig zunehmen (Conover et al., 2001; Westgaard et al., 1985). Da unter dem Einfluss exogenen FSHs im Rahmen der Hyperstimulationstherapie signifikant mehr und signifikant größere Follikel heranwachsen, die besonders hohe Mengen von PAPP-A produzieren sollen und gleichzeitig die Atresie der Kohortenfollikel ausbleibt, würde man erwarten, dass sich im Zyklusverlauf ein Anstieg der PAPP-A-Produktion parallel zur Reifung dieser Follikel darstellt. Die beobachteten Zyklusverläufe von PAPP-A stimmen demnach nicht mit den erwarteten lokalen Veränderungen im Follikel überein (z.B. der Follikelflüssigkeit: Conover et al., 2001).

Das bestätigt die Theorie, dass PAPP-A nicht von den Follikeln sezerniert wird und daher das im Serum nachgewiesene PAPP-A aus anderen Synthesorten stammen muss. Dann würde man im Zyklusverlauf jedoch konstante Konzentrationen von PAPP-A erwarten wie sie bei den nicht oder gering stimulierten Zyklen beschrieben wurden. Dies erklärt nicht, wieso es im Zuge der Hyperstimulationstherapie zu einem signifikanten, periovulatorischen PAPP-A-Abfall kommt. Die Mechanismen, die diesen auslösen, sind bislang unbekannt. Am wahrscheinlichsten kommt es durch die direkte Wirkung von FSH außerhalb des Ovars zu einem veränderten Metabolismus von PAPP-A. Andererseits könnten indirekte zyklusphasenabhängige Effekte der Hormonbehandlung auf den Hormonstatus und das veränderte Follikelwachstum der Patientinnen ursächlich für den periovulatorischen Abfall von PAPP-A sein.

4.3.4 Einfluss zyklusabhängiger Faktoren auf PAPP-A

Als mögliche Ursachen für den Abfall von PAPP-A unter follikulärer Hyperstimulation im Rahmen von IVF und ICSI kommen, neben der direkten Wirkung von FSH, indirekte Veränderungen des Hormonstatus und des Follikelwachstums in Frage, die bei diesen Patientinnen in Folge der Hyperstimulationstherapie eintraten. Im Folgenden gilt es zu klären, welche dieser Veränderungen den Abfall von PAPP-A unter Hyperstimulation verursacht haben könnten.

4.3.4.1 Hormonelle Veränderungen unter Hyperstimulation

Ein Zyklushormon, das durch den Einfluss der Hyperstimulationstherapie maßgeblich verändert wird, ist Estradiol. Auf der einen Seite kommt es durch die Wirkung von FSH zu einem Anstieg der Estradiolkonzentrationen, da viele Follikel heranreifen, die hohe Mengen an Estradiol produzieren. Auf der anderen Seite werden im Rahmen des Agonistenprotokolls die negativen Feedbackmechanismen der Hypophyse unterdrückt, die natürlicherweise die Estradiolproduktion limitieren. Im Vergleich zu den natürlichen und leicht stimulierten Zyklen konnten in den Hyperstimulationszyklen daher deutlich höhere mediane Estradiolkonzentrationen gefunden werden. Zudem zeigte sich erwartungsgemäß in allen untersuchten Zyklen ein signifikanter Anstieg der Estradiolkonzentrationen bis zur Zyklusmitte. Estradiol verhält sich damit sowohl unter hormoneller Stimulation als auch im Verlauf der Follikelphase gegenläufig zu PAPP-A. Dementsprechend konnte unter follikulärer Hyperstimulation eine signifikante, negative Korrelation zwischen den Serumspiegeln von PAPP-A und Estradiol gefunden werden.

Frühere Studien gingen zumindest lokal im Follikel von einem positiven Zusammenhang zwischen den gonadotropinagonistischen Bestandteilen des IGF-Systems und den Steroidhormonen aus. So beschrieben Erickson et al. (1989) den positiven Einfluss der Wachstumsfaktoren und Adashi (1998) die stimulierende Effekte von PAPP-A auf die Steroidhormonsynthese der Follikel. Zudem wiesen Conover et al. (2002) gerade in östrogendominanten Follikeln hohe Konzentrationen von PAPP-A nach. Bei einem Anstieg von Estradiol unter Hyperstimulation hätte man deshalb ebenfalls mit einem Anstieg von PAPP-A gerechnet. Unseren Ergebnissen zufolge konnte aber zumindest im Serum der untersuchten Frauen mit Zunahme der Estradiolkonzentrationen ein Abfall von PAPP-A gefunden werden. Dies schließt nicht aus, dass PAPP-A, wie in früheren Studien beschrieben, lokal in den wachsenden Follikeln parallel zu Estrogen ansteigt, so dass dort eine maximale Stimulation des Follikelwachstums erzeugt wird. Anders als erwartet scheinen aber zumindest im Serum Estradiol und PAPP-A unter follikulärer Hyperstimulation negativ zu korrelieren. Dabei ist unklar, ob die hohen Serumspiegel von Estradiol bei den hyperstimulierten Patientinnen direkt zu einer Hemmung der Produktion, Sekretion oder einem beschleunigten Metabolismus von PAPP-A außerhalb des Ovars führen können. Es ist jedoch ebenso denkbar, dass kein direkter kausaler Zusammenhang zwischen Estradiol und PAPP-A besteht, sondern dieser lediglich durch

die divergenten Veränderungen im Rahmen der FSH-Stimulation vorgetäuscht wird, zumal in den nicht oder gering stimulierten Stimulationsgruppen keine signifikante Korrelation zwischen PAPP-A und Estradiol im Serum gefunden werden konnte.

Unabhängig davon, ob Estradiol und PAPP-A unter Hyperstimulationstherapie nun direkt oder indirekt zusammenhängen, so zeichnet sich hier möglicherweise ein Regulationsmechanismus ab, durch den die follikelstimulierenden Effekte beider Hormone zumindest im Serum ausgeglichen werden sollen, um einer Überstimulation der Follikel entgegen zu wirken, wie sie künstlich im Rahmen der multifollikulären Hyperstimulation erzeugt wird. Eine direkte, endokrine Wirkung des Serum-PAPP-A auf die Follikel ist jedoch nicht zu erwarten, da es ja vermutlich zu keinem Transport von PAPP-A entlang der Follikel-Blut-Schranke kommt, und man demnach nicht erwarten kann, dass Serum-PAPP-A sich auf den Follikel auswirkt.

4.3.4.2 Veränderungen des Follikelwachstums unter hormoneller Hyperstimulation

Neben den beschriebenen Auswirkungen der Hyperstimulationstherapie auf die hormonelle Situation konnten außerdem Veränderungen des Follikelwachstums beschrieben werden. So fand man bei den hyperstimulierten Patientinnen zum einen eine höhere mediane Anzahl an Follikeln und zum anderen größere, mediane Durchmesser des dominanten Follikels. Diese Veränderungen der Follikeleigenschaften erklären sich durch die starke Stimulation des Follikelwachstums mittels hochdosierten FSH, welches die Zellteilung und Hormonproduktion der Follikel anregt. Außerdem kommt es im Rahmen der Hyperstimulationstherapie nicht zu dem natürlicherweise auftretenden Abfall von FSH durch den starken Estrogenanstieg und die daraus folgende negative Rückkopplung der Hypophyse. Die Kohortenfollikel gehen daher nicht in Atresie, sodass bis zur Zyklusmitte eine Zunahme der Follikelanzahl beobachtet werden kann. Die Follikelanzahl verändert sich unter Stimulation damit entgegengesetzt zu PAPP-A, das zur Zyklusmitte abfällt. Dementsprechend konnte bei den hyperstimulierten Patientinnen im Gegensatz zu den nicht oder leicht stimulierten Patientinnen eine signifikante, negative Korrelation zwischen der Follikelanzahl und PAPP-A gefunden werden. Dies ist erstaunlich, weil man davon ausgeht, dass PAPP-A von den Granulosazellen der Follikel produziert wird (Conover et al., 2001) und man

dem zu Folge annehmen würde, dass es parallel zur Follikelanzahl ansteigt. Bei den hyperstimulierten Patientinnen mit vielen Follikeln hätten wir daher höhere PAPP-A-Level erwartet. Zudem haben frühere Studien beschrieben, dass Follikel mit Zunahme ihrer Größe und Funktionalität mehr PAPP-A produzieren können (Conover et al, 2001; Westgaard et al., 1985). Ein Zusammenhang zwischen der Follikelgröße des dominanten Follikels und den PAPP-A-Serumspiegeln konnte in dieser Studie jedoch nicht dargestellt werden. Das liegt vermutlich daran, dass ein Anstieg der PAPP-A-Produktion parallel zur Follikelanzahl und Größe nur lokal nachweisbar ist und sich nicht in einem Anstieg der Serumkonzentrationen widerspiegelt.

Die unerwartet negative Korrelation zwischen PAPP-A und der Follikelanzahl unter Hyperstimulationstherapie suggeriert aber gleichzeitig, dass es durch die erhöhte Anzahl der Follikel über unbekannte Mechanismen zu einem Abfall der endokrinen PAPP-A-Level kommen könnte. Ein Protein, das von den Oozyten sezerniert wird und bekanntlich die lokale PAPP-A-Produktion der restlichen Follikel unterdrückt, ist das Oocyte derived bone morphogenetic Protein-15 (BMP-15; Motozumi et al., 2004). Vielleicht gibt es noch weitere Mediatoren dieser Art, die die Produktion, Sekretion oder Metabolisation von PAPP-A aus anderen Syntheseorten außerhalb der Follikel hemmen, weshalb man einen Abfall im Serum nachweisen kann. Gegen einen direkten kausalen Zusammenhang zwischen PAPP-A und der Follikelanzahl spricht allerdings die Tatsache, dass sich bei den Vergleichsgruppen keine analoge Korrelation zwischen den beiden Parametern darstellen ließ. Möglicherweise besteht der Zusammenhang nur scheinbar auf Grund der gegenläufigen Veränderungen unter Hyperstimulation.

4.3.4.3 Veränderungen des Endometriums unter Hyperstimulation

Das Endometrium ist ein Syntheseort von PAPP-A (Guidice et al., 2002), das zyklischen und hormonellen Veränderungen besonders stark unterliegt und daher als fraglicher Ursprung der zyklusabhängig veränderten PAPP-A-Produktion, -Sekretion oder -Metabolisation außerhalb des Follikels in Betracht gezogen werden sollte. Da PAPP-A von den endometrialen Stromazellen produziert wird, hätte man auf Grund der Endometriumsproliferation unter Hyperstimulation und im Zyklusverlauf auch mit einer parallelen Zunahme der PAPP-A-Serumspiegel gerechnet. In dieser Studie ließ sich jedoch wider Erwarten mit Zunahme der Stimulationsstärke und im Verlauf des Zyklus

ein Abfall der PAPP-A-Serumspiegel verzeichnen. Ein positiver Zusammenhang zwischen der Endometriumsdicke und den PAPP-A-Serumspiegeln konnte sich dementsprechend nicht bestätigen. Frühere Studien an Endometriosepatientinnen, bei denen es zyklusabhängig ebenfalls zu einer verstärkten Endometriumsproliferation kommt, weil sich dieses auch ektop, außerhalb der Uterushöhle aufbaut, suggerierten zumindest lokal (peritoneal) erhöhte Konzentrationen von PAPP-A sowie eine Korrelation zwischen der Höhe der Serumspiegel und dem Grad der Endometriose (Arici et al., 2003). Andere Studien hingegen erwarteten auf Grund der schlechten Eizellqualität bei Endometriosepatientinnen verminderte PAPP-A-Konzentrationen, was sich jedoch lokal in der Follikelflüssigkeit von Endometriosepatientinnen nicht bestätigen ließ (Wunder et al., 2005).

Eine klare Aussage darüber wie sich die lokalen PAPP-A-Spiegel im Zuge der Proliferation des Endometriums (z.B. unter Hyperstimulation oder im Rahmen einer Endometriose) verändern, kann im Rahmen unserer Untersuchungen nicht getroffen werden. Zumindest eine direkte Korrelation zwischen PAPP-A im Serum und der Dicke des Endometriums konnte jedoch widerlegt werden.

4.3.5 Einfluss zyklusunabhängiger Eigenschaften auf PAPP-A

Da sich neben relativ geringen Fluktuationen von PAPP-A im Zyklusverlauf große Unterschiede zwischen den Serumspiegeln der einzelnen Patientinnen zeigten, wurden neben den oben beschriebenen Einflüssen zyklusabhängiger Faktoren auch andere Eigenschaften der Frauen hinsichtlich ihre Wirkung auf PAPP-A untersucht. Dazu wurden die Einzelwerte der Patientinnen gemittelt und anschließend mit bestimmten Eigenschaften korreliert.

4.3.5.1 Einfluss von Gewicht, Größe und Body-Mass-Index (BMI) auf PAPP-A

Ein Faktor, der sich während der Schwangerschaft signifikant auf die Serumspiegel von PAPP-A auswirkt, ist das Körpergewicht. Ein Großteil des gemessenen PAPP-A stammt dann aus der Plazenta und wird unabhängig von mütterlichen Faktoren sezerniert. Da mit zunehmendem Körpergewicht das Verteilungsvolumen zunimmt, aber die Sekretionsrate des plazentaren PAPP-A konstant bleibt (Bischof et al., 1982), werden

bei adipösen Frauen niedrigere PAPP-A-Serumspiegel gemessen (Westergaard et al., 1983). Bei den Frauen unseres Kollektivs, die nicht schwanger waren, ließ sich ein Zusammenhang zwischen Körpergewicht und PAPP-A-Serumspiegeln jedoch nicht nachweisen. Es ist davon auszugehen, dass über unbekannte Regulationsmechanismen eine Anpassung der Serumspiegel von PAPP-A erfolgt.

Unerwarteter Weise zeigte sich jedoch eine signifikante, negative Korrelation zwischen der Körpergröße und den patientenspezifischen PAPP-A-Serumspiegeln. Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass dieses Ergebnis dadurch zustande gekommen ist, dass die hyperstimulierten Patientinnen gleichzeitig niedrigere PAPP-A-Serumspiegel hatten und zufällig größer waren, da keine signifikanten Unterschiede zwischen der Körpergröße der Patientinnen in den Stimulationsgruppen zu finden waren. Die Korrelation ist jedoch relativ schwach, sodass eine Korrektur des Faktors Körpergröße in dieser Studie unnötig erschien.

4.3.5.2 Einfluss des Patientenalters auf PAPP-A

Zudem wurde der Einfluss des Patientenalters auf die PAPP-A-Serumspiegel untersucht. Da PAPP-A als Bestandteil des IGF-Systems an der Regulation von Wachstum- und Proliferationsprozessen beteiligt ist, wäre eine altersabhängige Veränderung durchaus vorstellbar (Hammermann, 1987). Frühere Studien bestätigen, dass beim Menschen die Konzentrationen von zirkulierendem IGF, das ja durch PAPP-A mitreguliert wird, bis zur Geburt und im Laufe der Kindheit stetig ansteigen, um am Ende der Pubertät ihren Höhepunkt erreichen. Eine Reduktion von IGF hingegen steht im Zusammenhang mit einer verminderten Sekretion des Wachstumshormons, wie sie mit dem Alter vergesellschaftet ist (Hammermann, 1987). Demnach könnte es auch bei PAPP-A, und gerade in Anbetracht seiner Rolle als Modulator der ovariellen Follikelreifung und weiblichen Fruchtbarkeit (Nyegaard et al., 2010) auch im Alter zu einer Veränderung der Serumspiegel, beispielsweise im Rahmen der Menopause, kommen. Unseren Ergebnissen zufolge ließ sich jedoch keine signifikante Korrelation zwischen den Serumspiegeln von PAPP-A und dem Patientenalter darstellen, obschon die hyperstimulierten Frauen gleichzeitig signifikant älter waren und signifikant niedrigere PAPP-A-Konzentrationen vorwiesen als die Vergleichsgruppen. Es könnte sich jedoch durchaus lohnen, die lokalen Konzentrationen von PAPP-A im Follikel auf

einen Zusammenhang zum Patientenalter hin zu untersuchen, zumal wir davon ausgehen, dass kein direkter Zusammenhang zwischen den lokalen Konzentrationen von PAPP-A im Follikel und denen im Serum besteht. Außerdem wäre ein Vergleich zwischen Patientinnen mit größeren Altersdifferenzen sinnvoll, da wir nur Frauen im reproduktionsfähigen Alter zwischen 25 und 45 Jahren untersucht haben.

4.3.5.3 Einfluss von Sterilität, Gravidität, Parität und Aborten auf PAPP-A

Unter dem Aspekt, dass PAPP-A Auswirkungen auf die Fruchtbarkeit der Patientinnen haben könnte (Nyegaard et al., 2010), wurden Zusammenhänge zwischen den patientenspezifischen PAPP-A-Werten und der Sterilitätsform, sowie der Anzahl vorangegangener Schwangerschaften, Geburten und Aborte untersucht.

Signifikante Unterschiede der patientenspezifischen PAPP-A-Werte je nach Form der Sterilität ließen sich jedoch nicht darstellen. Ebenso schien die Anzahl vorangegangener Schwangerschaften und Geburten keinen Einfluss auf die PAPP-A-Serumspiegel zu haben. Dies steht im Widerspruch zu einer Studie von Westergaard et al. (1983 a) die höhere plazentare PAPP-A-Level bei Erstgebärenden beschrieb.

Von besonderem Interesse ist außerdem der Einfluss veränderter PAPP-A-Spiegel auf die Abortrate der Patientinnen, zumal niedrige PAPP-A-Serumspiegel im Rahmen des Ersttrimester-Screenings neben einer unangemessenen Fetalentwicklung und verschiedenen Schwangerschaftspathologien auch als Anzeichen für einen drohenden Abort gesehen werden können (Westergaard et al., 1983 b/ 1985; Smith et al., 2002; Fialova und Malbohan, 2002). So konnten in Schwangerschaften, die nach reproduktionsmedizinischer Behandlung eingetreten waren, bereits in den ersten Schwangerschaftswochen reduzierte PAPP-A-Spiegel bei den Patientinnen gefunden werden, die anschließend einen Abort erlitten (Sinosich et al., 1984).

In dieser Studie konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen den patientenspezifischen PAPP-A-Spiegeln und früheren Aborten gefunden werden. Die Serumspiegel von PAPP-A außerhalb der Schwangerschaft eignen sich demnach nicht dazu, eine Abortanfälligkeit zu prognostizieren. Erst in Rahmen der Schwangerschaft kann durch Bestimmung von throphoblastärem PAPP-A im Serum ein Abortgeschehen prognostiziert und diagnostiziert werden.

4.3.5.4 Einfluss verschiedener Erkrankungen auf PAPP-A

Die Rolle des insulinähnlichen Wachstumsfaktorensystems bei der Regulation normaler ovarieller Funktionen wurde bereits durch zahlreiche Studien belegt. Veränderungen dieses Systems bei Störung des ovariellen Milieus im Rahmen bestimmter Erkrankungen stehen nun im Fokus aktueller Studien (Greisen et al., 2002; Poretsky et al., 1999; San Roman und Magoffin, 1992). Besonders Erkrankungen, die mit einer gestörten Follikelreifung und reduzierter Fruchtbarkeit verbunden sind, wurden in dieser Studie auf Veränderungen der PAPP-A-Serumspiegel hin untersucht. Würde es sich bestätigen, dass Veränderungen im IGF-System an dem Pathomechanismus bestimmter Erkrankung beteiligt sind, dann könnte ein therapeutisches Ziel in der Normalisierung der Konzentrationen dieses Systems liegen (Poretsky et al. 1999).

In dieser Studie gelang es jedoch bei keiner der von uns untersuchten Erkrankungen, signifikante Veränderungen der patientenspezifischen PAPP-A-Serumspiegel darzustellen. Das gilt sowohl für Erkrankungen des endokrinen Systems als auch für Störungen, die mit einer gestörten Follikelreifung und reduzierter Fruchtbarkeit einhergehen (S.46, Tab.6). Daraus darf man jedoch nicht schließen, dass die lokalen Konzentrationen von PAPP-A im Rahmen der untersuchten Erkrankungen nicht verändert sind. Bei dem von uns untersuchten PCO-Syndrom liegen beispielsweise mehrere Studien vor, die lokale Alterationen im IGF-System von polyzystischen Follikeln nachweisen (z.B. Veränderungen der IGFBP-Profile: Greisen et al., 2002; San Roman et al., 1992; Voutilainen et al., 1996). Ebenso beschrieben mehrere Studien lokale Veränderungen einzelner Bestandteile des IGF-System im Follikel unter dem Einfluss von Insulin (Greisen et al., 2002: Anstieg von IGFBP-2 und 4; Poretsky et al., 1991: Zunahme von IGF-Rezeptoren). Dazu passend fanden Spencer et al. (2005) bei Schwangeren mit Diabetes mellitus verminderte PAPP-A-Spiegel.

Trotzdem konnte in unserem Kollektiv keine Veränderungen der PAPP-A-Serumspiegeln bei Erkrankten im Vergleich zu der Kontrollgruppe dargestellt werden. Man kann daher nur schlussfolgern, dass die Veränderungen von PAPP-A durch die jeweilige Krankheit nur lokal und nicht in den Serumkonzentrationen der Patientinnen widerspiegeln lassen. Diese Ergebnisse bestätigen demnach die Annahme, dass es keinen direkten Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von PAPP-A im Serum und Ovar gibt (Moos et al., 2009). Durch Bestimmung der Serumkonzentrationen ist

man daher auch nicht in der Lage, Aussagen über lokale Veränderungen von PAPP-A im Follikel im Rahmen bestimmter Erkrankungen zu treffen, geschweige denn diese Erkrankungen durch Veränderungen der PAPP-A-Serumkonzentrationen zu diagnostizieren. Weitere Studien sollten klären, ob lokal im Follikel Veränderungen von PAPP-A und den anderen Bestandteilen des IGF-System im Rahmen dieser Erkrankungen nachgewiesen werden können. Darüber hinaus sollte dann getestet werden, ob diese Veränderungen durch leitliniengerechte Therapie wieder behoben werden können. So ist in dieser Arbeit kritisch zu bemerken, dass bei den von uns untersuchten Patientinnen mit Diagnosestellung oft gleichzeitig die Indikation zu einer entsprechenden medikamentösen Therapie gestellt wurde, die mögliche Effekte der Erkrankungen auf die PAPP-A-Spiegel verschleiert haben könnte. Jedoch war ein Ausschluss der medikamentös therapierten Patientinnen auf Grund schwindender Fallzahlen nicht möglich. Aus dem selben Grund wurden die Patientinnen, die neben der untersuchten Erkrankung weitere Erkrankungen hatten, nicht aus der Wertung ausgeschlossen.

5. Zusammenfassung

Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) ist ein Bestandteil des Insulin-like growth factor (IGF)-Systems. In verschiedenen biologischen Systemen ist es an der Regulation der lokalen IGF-Verfügbarkeit beteiligt, da es als Protease des inhibitorischen Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-4 zu einer Freisetzung von IGF führt. Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass dieser Mechanismus an der hormonellen Regulation der Follikelreifung, Follikelselektion und der Dominanzentwicklung eines Follikels eine entscheidende Rolle einnimmt.

In dieser Studie wurden retrospektiv die Serumspiegel von PAPP-A bei 120 Patientinnen im Zyklusverlauf untersucht, die durch die Sterilitätsambulanz der Universitätsfrauenklinik Bonn betreut wurden. Die Bestimmung von PAPP-A erfolgte sowohl im Spontanzklus (n= 31), als auch unter leichter (n= 45) und starker (n= 59) Stimulation mit FSH im Rahmen verschiedener reproduktionsmedizinischer Verfahren (VZO, IUI, IVF, ICSI). Die Messung von PAPP-A aus den Serum-Reihen der Patientinnen erfolgte mit Hilfe eines neuen, hochsensitiven Immunoassays, das im Gegensatz zu früheren Testsystemen auch freies PAPP-A bestimmt.

PAPP-A konnte in über 90 % (490/540) der Serumproben mit einer großen Bandbreite zwischen den Patientinnen von 0,08 mIU/L bis 3,98 mIU/L nachgewiesen werden (Median: 1,06 mIU/L). Im Gegensatz zu den großen Schwankungen zwischen den Patientinnen, waren die individuellen Veränderungen von PAPP-A im Zyklusverlauf klein. In den untersuchten Zyklen von Patientinnen, die nicht oder nur leicht stimuliert wurden, konnten dem entsprechend keine signifikanten Unterschiede im Zyklusverlauf gefunden werden. Es stellte sich lediglich eine Tendenz zu niedrigeren PAPP-A-Serumspiegeln unter leichter Stimulation mit FSH um die Zyklusmitte dar (p= 0,07). In den Hyperstimulationszyklen hingegen zeigte sich im Vergleich dazu ein deutlicher periovulatorischer Abfall von PAPP-A (p= 0,019). Ein Zusammenhang zwischen PAPP-A und anderen zykluskonstanten Parametern ließ sich jedoch nicht darstellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass es im natürlichen Zyklus zu keinen signifikanten Schwankungen der PAPP-A-Serumspiegel kommt. Im Gegensatz dazu stellte sich unter Hyperstimulation mit FSH ein deutlicher Abfall von PAPP-A im Zyklusverlauf und im Vergleich zu den nicht oder gering stimulierten Patientinnen dar.

Neben der direkten Wirkung von FSH kommen als Ursachen dafür Veränderungen der Estradiolkonzentration und der Follikelanzahl in Frage. Da die beobachteten Veränderungen von PAPP-A im Zyklusverlauf nicht mit dem zu erwarteten Produktionsanstieg in wachsenden Follikeln übereinstimmen, muss davon ausgegangen werden, dass PAPP-A nicht vom Follikel sezerniert wird und das gemessene PAPP-A im Serum von Nicht-Schwangeren Frauen aus anderen Produktions- und Sekretionsorten von PAPP-A stammen muss, die bislang noch unbekannt sind. PAPP-A scheidet demnach als Serummarker für die Follikelreifung aus. Eine Korrelation zwischen PAPP-A und anderen von uns untersuchten, zyklusunabhängigen Eigenschaften der Patientinnen, die die große Bandbreite der Serumspiegel erklären könnten, ließ sich nicht finden.

6. **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1:	Orte der Synthese und lokale Funktionen von PAPP-A.....	11
	(nach Boldt und Conover, 2007)	
Abb. 2:	Das PAPP-A-Polypeptid.....	12
	(nach Boldt und Conover, 2007)	
Abb. 3:	PAPP-A als Monomer, Homodimer und im heteroteorameren Komplex ...	15
	mit proMBP (nach Boldt und Conover, 2007)	
Abb. 4:	Funktion von PAPP-A im IGF-System	17
	(nach Boldt und Conover, 2007)	
Abb. 5:	Schematische Darstellung eines ELISA.....	29
	(nach Epitopics, 2011)	
Abb. 6:	Beispiel für eine Standarddeichkurve von PAPP-A.....	30
	(nach USCN Life Science Inc. Wuhan, 2010)	
Abb. 7:	Unterschiede von PAPP-A je nach Stimulationsverfahren.....	34
Abb. 8:	Zyklusphasenabhängige Unterschiede von PAPP-A je nach Stimula-.....	35
	tionsverfahren.....	
Abb. 9:	Zyklischer Verlauf von PAPP-A	37
Abb. 10:	Zyklische Verläufe von PAPP-A je nach Stimulationsverfahren.....	37
Abb. 11:	Estradiol in Abhängigkeit zur Stimulationsstärke und Zyklusphase.....	38
Abb. 12:	Korrelation zwischen PAPP-A und Estradiol bei den hyperstimulierten.....	39
	Patientinnen.....	
Abb. 13:	Follikelanzahl in Abhängigkeit zur Stimulationsstärke und Zyklusphase....	40
Abb. 14:	Korrelation zwischen PAPP-A und der Follikelanzahl bei den hyperstimu- lierten Patientinnen.....	41
Abb. 15:	Follikelgröße des dominanten Follikels in Abhängigkeit zur Stimulations- stärke und Zyklusphase	42
Abb. 16:	Endometriumdicke in Abhängigkeit zur Stimulationsstärke und Zyklus-.. phase.....	43
Abb. 17:	Korrelation zwischen PAPP-A und der Patientengröße.....	44

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Zeitpunkte der Messungen von PAPP-A im Zyklusverlauf.....	27
Tab. 2:	Charakterisierung des Patientenkollektivs und der Stimulationsgruppen...	33
Tab. 3:	PAPP-A in Abhängigkeit zum Stimulationsverfahren.....	34
Tab. 4:	PAPP-A in Abhängigkeit zur Zyklusphase.....	36
Tab. 5:	Zusammenhang zwischen PAPP-A und Art der Sterilität sowie der Anzahl von Schwangerschaften, Geburten, und Aborten	46
Tab. 6:	Erkrankungen ohne signifikante Korrelation zu veränderten PAPP-A-Serumspiegeln.....	47

8. Literaturverzeichnis

Adashi AY. The IGF family and Folliculogenesis. *Am J Reprod Immunol* 1998; 39: 13-19

Arici A, Matalliotakis I, Goumenou A, Koumantakis G, Fragouli Y, Mahutte NG. Increased pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) concentrations in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2003; 49: 70-74

Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellve AR, Efstratiadis A. Effects of an igf-1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 903-918

Bayes-Genis A, Conover CA, Overgaard MT, Bailey KR, Christiansen M, Holmes DR Jr, Virmani R, Oxvig C, Schwartz RS. Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2001; 345: 1022-1029

Bayes-Genis A, Conover CA, Schwartz RS. The insulin-like growth factor axis: a review of atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 2000; 86: 125-123

Berry E, Aitken DA, Crossley JA, Macri JN, Connor JM. Screening for Down's syndrome: changes in marker levels and detection rates between first and second trimester. *Brit J Obstet Gynaecol* 1997; 104: 811-817

Bersinger A, Zakher A, Huber U, Pescia G, Schneider H. A sensitive enzyme immunoassay for pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A): a possible first trimester method of screening for Down syndrome and other trisomies. *Arch Gynecol Obstet* 1995; 256: 186-192

Bersinger N, Klopper A. The pattern of serum levels of pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) during the ovulatory menstrual cycle. *Brit J of Obstet and Gynaecol* 1984; 91: 1245-1248

Bischof P, Schindler AM, Obradovic D, Weil A, Faigaux, R, Herrmann W, Sizonenko PC. Endometrial and plasma concentrations of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A). *Brit J Obstet Gynaecol* 1982; 89: 701-703

Boldt HB, Conover CA. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): A local regulator of IGF bioavailability through cleavage of IGFBPs. *Growth Hor IGF Res* 2007; 17: 10-18

Boldt HB, Glerup S, Overgaard MT, Sottrup-Jensen L, Oxvig C. Definition, expression, and characterization of a protein domain in the N-terminus of pregnancy associated plasma protein A distantly related to the family of laminin G-like models. *Protein Expr Purif* 2006; 48: 261-273

Boldt HB, Kjaer-Sorensen K, Overgaard MT, Weyer K, Poulsen CB, Sottrup-Jensen L, Conover CA, Giudice LC. The Lin-12-notch repeats of pregnancy-associated plasma protein-A bind calcium and determine its proteolytic specificity. *J Biol Chem* 2004; 279: 38525-38531

Boldt HB, Overgaard MT, Laursen LS, Weyer K, Sottrup-Jensen L, Oxvig C. Mutational analysis of the proteolytic domain of pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A): classification as a metzincin. *Biochem J* 2001; 358: 359-367

Brizot M, Noble P. Chapter 1: Nuchal translucency and maternal serum biochemistry. In: Nicolaides KH, Sebire NJ, Snijder JM. *The 11-14 weeks scan. The diagnosis of fetal abnormalities*. Parthenon Publishing 1999 (38-41)

Brogan RS, Mix S, Puttabyatappa M, VandeVoort CA, Chaffin CL. Expression of the insulin-like growth factor and insulin systems in the luteinizing macaque ovarian follicle. *Fertil Steril* 2010; 93: 1421-1429

Bunn CR, Fowlkes JL. Insulin-like growth factor binding proteolysis. *Endocrinol Metab* 2003; 14: 176-183

Byun D, Mohan S, Kim C, Suh K, Yoo M, Lee H, Baylink DJ, Qin X. Studies on human pregnancy-induced insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 proteases in serum: determination of IGF-2-dependency and localisation of cleavage site. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 373-381

Byun D, Mohan S, Yoo M, Sexton C, Baylink DJ, Qin X. Pregnancy-associated plasma protein A accounts for the insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 proteolytic activity in human pregnancy serum and enhances the mitogenic activity of IGF by degrading IGFBP-4 in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 847-854

Campbell BK, Telfer EE, Webb R, Baird DT. Ovarian autografts in sheep as a model for studying folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163:137-139

Chamberlain CS, Spicer LJ. Hormonal control of ovarian cell production of insulin-like growth factor binding proteins. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 182: 69-81

Chandrashekar V, Zaczek D, Bartke A. Consequences of Altered Somatotrophic System on Reproduction. *Biol Reprod* 2004; 71: 17-27

Che W, Lerner-Marmarosh N, Huang Q, Osawa M, Ohta S, Yoshizumi M, Glassman M, Lee JD, Yan C, Berk BC, Abe J. Insulin-like growth factor-1 enhances inflammatory responses in endothelial cells: role of Gab1 and MEKK3 in TNF α induced c-Jun and NK- κ B activation and adhesion molecule expression. *Circ Res* 2002; 90: 1222-1230

Choi D, Hwang SS, Lee EY, Park CE, Yoon BK, Lee JH, Bae DS. Recombinant FSH and pregnancy-associated plasma protein. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 109: 171-176

Chyu KY, Shah PK. The role of inflammation in plaque disruption and thrombosis. *Rev Cardiovasc Med* 2001; 2: 82-91

Clemmons DR. Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 140: 19-24

Conover CA, Bale LK, Overgaard MT, Johnstone EW, Laursen UH, Fuchtbauer EM, Oxvig C, van Deursen J. Metalloproteinase pregnancy-associated plasma protein A is a critical growth regulatory factor during fetal development. *Development* 2004; 131: 1187-1194

Conover CA, Faessen GF, Ilg KE, Christiansen M, Overgaard MT, Oxvig C, Guidice LC. Pregnancy-associated plasma protein-A is the insulin-like growth factor binding protein-4 protease secreted by human ovarian granulosa cells and is a marker of dominant follicle selection and the corpus luteum. *Endocrinology* 2001; 142: 2155-2158

Conover CA, Chen BK, Resch ZT. Regulation of Pregnancy associated plasma protein A expression in cultured human osteoblasts *Bone* 2004; 34: 297-302

Conover CA, Kiefer MC, Zapf J. Posttranslational regulation of insulin-like growth factor binding protein-4 in normal and transformed human fibroblasts: insulin-like growth factor dependence and biological studies. *J Clin Invest* 1993; 91: 1129-1137

Conover CA, Oxvig C, Overgaard MT, Christiansen M, Guidice LC. Evidence that insulin-like growth factor binding protein-4 protease in human ovarian follicular fluid is pregnancy associated plasma protein-A. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 4742-4745

Cosin-Sales J, Christiansen M, Kaminski P, Oxvig C, Overgaard MT, Cole D, Holt DW, Kaski JC. Pregnancy-associated plasma protein A and its endogenous inhibitor, the proform of eosinophil major basic protein (proMBP), are related to complex stenosis morphology in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 2004; 109: 1724-1728

Cosin-Sales J, Kaski J, Christiansen M, Kaminski P, Oxvig C, Overgaard M, Cole D, Holt D. Relationship among pregnancy associated plasma protein-A levels, clinical characteristics, and coronary artery disease extent in patients with chronic stable angina pectoris. *Eur Heart J* 2005; 26: 2093-2098

Diagnostik Systems Laboratories inc, 2010: PAPP-A ELISA Kit from Diagnostic Systems Laboratories, Inc. <http://www.biocompare.com/ProductDetails/215825/PAPP-A-ELISA-Kit.html> (Zugriffsdatum: 20.12.2010)

Donadeu FX, Ginther OJ. Changes in concentrations of follicular-fluid factors during follicle selection in mares. *Biol of Reprod* 2002; 66: 1111-1118

Durham SK, Kiefer MC, Riggs BL, Conover CA. Regulation of insulin-like growth factor binding protein 4 by a specific insulin-like growth factor binding protein-4 proteinase in normal human osteoblast-like cells: implications in bone cell physiology. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 111-117

Epitomics, 2011: Steps involved in Sandwich ELISA Kit. http://www.epitomics.com/images/products/sandwich_dual.jpg (Zugriffsdatum: 13.2.11).

Erickson GF, Garzo VG, Magoffin DA. Insulin-like growth factor I regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69: 716-724

Erickson GF, Nakatani A, Ling N, Shimasaki S. Cyclic changes in insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) mRNA in the rat ovary. *Endocrinology* 1992; 130: 625-636

Fialova L, Malbohan IM. Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A): theoretical and clinical aspects. *Bratisl Lek Listy* 2002; 103: 194-205

Firth SM, Baxter RC. Cellular actions of insulin-like growth factor binding proteins. *Endocrinol Rev* 2002; 23: 824-854

Fortune, JE, Cushman RA, Wahl MC, Kito WS. The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163: 53–60

Funston RN, Seidel GE, Klindt J, Roberts AJ. Insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding proteins in bovine serum and follicular fluid before and after the preovulatory surge of luteinizing hormone. *Biol Reprod* 1996; 55: 1390-1396

Geisthovel F, Moretti-Rojas I, Asch RH, Rojas FJ. Expression of insulin-like growth factor 2 (IGF 2) messenger ribonucleic acid (mRNA), but not IGF 1 mRNA, in human preovulatory granulosa cell. *Hum Reprod* 1989; 4: 899-902

Gerard N, Delpuech T, Oxvig C, Overgaard MT, Monget P. Proteolytic degradation of IGF-binding protein (IGFBP)-2 in equine ovarian follicles: involvement of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) and association with dominant but not subordinate follicles. *J Endocrinol* 2004; 182: 457-466

Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Meira C, Kot K. In vivo effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor 1 on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. *Biol Reprod* 2004a; 70: 99–105

Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA. Critical role of insulin-like growth factor system in follicle selection and dominance in mares. *Biol Reprod* 2004c; 70: 1374–1379

Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Checurea CM, Beg MA. Dose–response study of intrafollicular injection of insulin-like growth factor-1 on follicular-fluid factors and follicle dominance in mares. *Biol Reprod* 2004b; 70: 1063–1069

Greisen S, Flyvbjerg A, Ledet T, Ovesen P. Regulation of insulin-like growth factor binding protein secretion by human granulosa luteal cells in a polycystic ovary-like environment. *Fertil Steril* 2002; 78: 162-168

Guidice LC, Conover CA, Bale L, Faessen GH, Ilg K, Sun I, Imani B, Suen LF, Irwin JC, Christiansen M, Overgaard MT, Oxvig C. Identification and regulation of the IGFBP-4 protease and its physiological inhibitor in human trophoblasts and endometrial stroma: evidence for paracrine regulation of IGF 2 bioavailability in the placental bed during human implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2359-2366

Haaning J, Oxvig C, Overgaard MT, Ebbesen P, Kristensen T, Sottrup-Jensen L. Complete c DNA sequence of the preproform of human pregnancy associated plasma protein A: evidence for expression in the brain and induction by cAMP. *Eur J Biochem* 1996; 237: 159-163

Hammermann MR. Insulin-like growth factors and aging. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1987; 16: 995-1011

Han VKM. Insulin-like growth factor (IGF) and IGF binding protein genes in the human placenta and membranes: evidence for IGF: IGFBP interactions at the feto-maternal interface. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2680–2693

Hess KA, Chen L, Larsen WJ. The ovarian blood follicle barrier is both charge- and size-selective in mice. *Biol Reprod* 1998; 58: 705-711

Hourvitz A, Kuwahara A, Hennebold JD, Travares AB, Negishi H, LEE TH, Erickson GF, Adashi EY. The Regulated Expression of the Pregnancy-Associated Plasma Protein-A in the Rodent Ovary: A Proposed Role in the Development of Dominant Follicles and of Corpora Lutea. *Endocrinology* 2002; 143:1833-1844

Hourvitz A, Widger AE, Filoh FL, Chang RJ, Adashi EY, Erickson GF. Pregnancy-associated plasma protein-A gene expression is restricted to healthy follicles and corpora lutea. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4916-4920

Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 1999; 20: 761-787

Iwashita M, Kudo, Y, Takeda Y. Effects of follicle stimulating hormone and insulin-like growth factors on proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-4 in human granulosa cells. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 401-405

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchick M. Nachweis, Messung und Charakterisierung von Antikörpern und ihre Verwendung in der Forschung und bei der Diagnose. In: Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchick M, Hrsg. *Immunologie*. Heidelberg-Berlin: Spectrum Verlag, 2002: 664-666

Jones JL, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995; 16: 3-34

Kirstensen T, Oxvig C, Sand O, Moller HNP, Sottrup-Jensen L. Amino acid sequence of human pregnancy associated plasma protein-A derives from cloned cDNA. *Biochemistry* 1994; 33: 159-163

Krantz DA, Larsen JW, Buchanan PD, Macri JN. First trimester Down syndrome screening: free beta human chorionic gonadotrophin and pregnancy associated plasma protein A. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 612–616

Laursen LS, Overgaard MT, Soe R, Boldt HB, Sottrup-Jensen L, Guidice LC, Conover CA, Oxvig C. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) cleaves insulin-like growth factor binding protein(IGFBP)-5 independent of IGF: implications for the mechanism of IGFBP-4 proteolysis by PAPP-A. *FEBS Lett* 2001; 504: 36-40

Lawrence JB, Oxvig C, Overgaard MT, Sottrup-Jensen L, Gleich GD, Hays LG, Yates JR, Conover CA. The insulin-like growth factor(IGF)-dependant IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 3149-3153

Lin TM, Galbert SP, Kiefer D, Spellacy WN, Gall S. Characterisation of four human pregnancy-associated plasma proteins, *Am J Obstet Gynecol* 1974; 118: 223-236

Lüllmann-Rauch R. Ovar. In: Lüllmann-Rauch, Hrsg. *Histologie*. Stuttgart-New York: Thieme Verlag, 2003: 481-494

Maile LA, Holly JM. Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteolysis: occurrence, identification, role and regulation. *Growth Horm IGF Res* 1999; 9: 85-95

Mason HD, Willis D, Holly JMP, Cwyfan-Hughes SC, Seppala M, Franks S. Inhibitory effects of insulin-like growth factor binding proteins on steroidogenesis by human granulosa cells in culture. *Mol Cell Endocrinol* 1992; 89: R1-R4

Mazerbourg S, Bondy CA, Zhou J, Monget P. The insulin-like growth factor system: a key determinant role in the growth and selection of ovarian follicles. *Reprod Domest Anim* 2003; 38: 247-258

McNatty KP, Heath DA, Lindy F, Fidler AE, Quirke L, O'Connell A, Smith P, Groome N, Tisdall DJ. Control of early ovarian follicular development. *J Reprod Fertil Suppl* 1999; 54: 3-16

Monget P, Mazerbourg S, Delpuech T, Maurel MC, Maniere S, Zapf J, Lalmanach G, Oxvig C, Overgaard MT. Pregnancy-associated plasma protein-A is involved in insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) proteolytic degradation in bovine and porcine preovulatory follicles: identification of cleavage site and characterisation of IGFBP-2 degradation. *Biol Reprod* 2003; 68: 77-86

Moos J, Filova V, Pavelkova J, Moosova M, Peknicova J, Rezabek K. Follicular fluid and serum level of Inhibin A and pregnancy-associated plasma protein A in patients undergoing IVF. *Fertil Steril* 2009; 91: 1739-1744

Motozumi M, Sonntag B, Hwang SS, Byerly T, Hourvitz A, Adashi EY, Shimasaki S, Erickson GF. Pregnancy-Associated Plasma Protein-A Production in Rat Granulosa Cells: Stimulation by Follicle-Stimulating Hormone and Inhibition by the Oocyte-Derived Bone Morphogenetic Protein-15. *Endocrinology* 2004; 145: 3686-3695

Nyegaard M, Overgaard MT, Su YQ, Hamilton AE, Kwintkiewicz J, Hsieh M, Nayak NR, Conti M, Conover CA, Guidice LC. Lack of functional pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) compromises mouse ovarian steroidogenesis and female fertility. *Biol Reprod* 2010; 82: 1129-1138

Ortiz CO, Chen BK, Bale LK, Overgaard MT, Oxvig C, Conover CA. Transforming growth factor- β regulation of the insulin-like growth factor binding protein-4 protease system in cultured human osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 1066-1072

Overgaard MT, Haaning J, Boldt HB, Olsen IM, Laursen LS, Christiansen M, Gleich GJ, Sottrup-Jensen L, Conover CA, Oxvig C. Expression of recombinant human pregnancy associated plasma protein A and identification of the proform of eosinophil major basic protein as its physiological inhibitor. *J Biol Chem* 2000; 275: 31128- 31133

Overgaard MT, Sorensen ES, Stachowiak D, Boldt HB, Kristensen L, Sottrup-Jensen L, Oxvig C. Complex of pregnancy associated plasma protein A and the proform of eosinophil major basic protein. Disulfide structure and carbohydrate attachment. *J Biol Chem* 2003; 278: 2106-2117

Overgaard MZ, Oxvig C, Christiansen M, Lawrence JB, Conover ChA, Gleich GJ, Sottrup-Jensen L, Haaning J. Messenger ribonucleic acid levels of pregnancy-associated plasma protein-A and the proform of eosinophil major basic protein: Expression in human reproductive and nonreproductive tissues. *Biol Reprod* 1999; 61: 1083-1089

Oxvig C., Sand O, Kristensen L, Sottrup-Jensen L. Isolation and characterisation of circulating complex between human pregnancy-associated plasma protein-A and proform of eosinophil major basic protein. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1201: 415-423

Palomaki GE, Wright DE, Summers AM, Neveux LM, Meier C, O'Donnell A, Huang T, Knight GJ, Haddow JE. Repeated measurement of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in Down syndrome screening: A validation study. *Prenat Diagn* 2006; 26: 730-739

Parker A, Gockerman A, Busby WH, Clemmons DR. Properties of insulin-like growth factor-binding protein-4 protease that is secreted by smooth muscle cells. *Endocrinology* 1995; 136: 2470-2476

Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, Guidice LC. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev* 1999; 20: 535-582

Putowski L, Rohan RM, Choi DS, Scherzer WJ, Ricciarelli E, Mordacq J, Mayo KE, Adashi EY. Rat ovarian insulin-like growth factor binding protein-4: a hormone dependent granulosa cell-derived antigonadotropin. *J Soc Gynecol Investig* 1997; 4: 144-151

Poretsky L. On the paradox of insulin-induced hyperandrogenism in insulin-resistant states. *Endocr Rev* 1991; 12: 3-13

Qin QP, Laitinen P, Majamaa-Voltti K, Eriksson S, Kumpula EK, Pettersson K. Release patterns of pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) in patients with acute coronary syndromes. *Scand Cardiovasc J* 2002; 36: 358-361

Qin QP, Kokkala S, Lund J, Tamm N, Qin X, Lepäntalo M, Pettersson K. Immunoassays developed for pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) may not recognize PAPP-A in acute coronary syndromes. *Clin Chem* 2006; 52: 398-404

Qin X, Byun D, Strong DD, Baylink DJ, Mohan S. Studies on the role of human insulin-like growth factor 2 (IGF 2)-dependant IGF binding protein (hIGFBP)-4 protease in humanb osteoblasts using protease-resistant IGFBP-4 analogs. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 2079-2088

Rajah R, Katz L, Nunn S, Solberg P, Beers T, Cohen P. Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteases: functional regulators of cell growth. *Prog Growth Factor Res* 1995; 6: 273-284

Resch ZT, Chen BK, Bale LK, Oxvig C, Overgaard MT, Conover CA. Pregnancy-associated plasma protein A gene expression as a target of inflammatory cytokines. *Endocrinology* 2004; 145: 1124-1129

Rivera GM, Fortune JE. Proteolysis of the Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins -4 and -5 in Bovine Follicular Fluid: Implications for Ovarian Follicular Selection and Dominance. *Endocrinology* 2003b; 144: 2977-2987

Rivera GM, Fortune JE. Selection of the dominant follicle and insulin-like growth factor (IGF) binding proteins: evidence that pregnancy-associated plasma protein-A contributes to proteolysis of IGF-binding protein 5 in Bovine Follicular Fluid. *Endocrinology* 2003a; 144: 437-446

Rudenko G, Hohenester E, Muller YA. LG/LNS domains: multiple functions- one business end? *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 363-368

San Roman GA, Magoffin DA. Insulin-like growth factor binding proteins in ovarian follicles from women with polycystic ovarian disease: cellulare source and levels in follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 1010-1016

Silahataroglu AN, Tumer Z, Kirstensen T, Sottrup-Jensen L, Tommerup N. Assignment of the human gene for pregnancy associated plasma protein A (PAPPA) to 9q33.1 by fluorescence in situ hybridisation to mitotic and meiotic chromosomes. *Cytogenet Cell Gente* 1993; 62: 214-216

Sinosich MJ. Biological role of pregnancy-associated plasma protein-A in human reproduction. 158-183. In: Bischof P, Klooper A (Eds): *Proteins of the Placenta*. 5th International Congress on Placental Proteins, Annecy 1984. Karger, Basel, 1985

Smith GCS, Stenhouse EJ, Crossley JA, Aiken DA, Cameronn AD, Connor MJ. Early Pregnancy Levels of Pregnancy-Associated Plasma Protein A and the Risk of Intrauterine Growth Restriction, Premature Birth, Preeclampsia, and Stillbirth. *J Clin Endocrinol. Metab* 2002; 87: 1762-1767

Sota de la RL, Simmen FA, Diaz T, Thatcher WW. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. *Biol Reprod* 1996; 55: 803-812

Spencer K, Cicero Simona, Atzei A, Otigbah C, Nicolaidis KH. The influence of maternal insulin-dependant diabetes on fetal nuchal translucency thickness and first-trimester maternal serum biological markers of aneuploidy. *Prenat Diagn* 2005; 10: 927-929

Spicer LJ. Proteolytic Degradation of Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins by Ovarian Follicles: A Control Mechanism for Selection of Dominant Follicles. *Biol Reprod* 04; 70: 1223-1230

Ständker L, Bräulke T, Mark S, Mostafavi H, Meyer M, Honing S, Gimenez-Gallego G, Forssmann WG. Partial IGF affinity of circulating N- and C-terminal fragments of human insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) and the disulfide bonding pattern of the C-terminal IGFBP-4 domain. *Biochemistry* 2000; 39: 5082-5088

Steward CE, Rotwein P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* 1996; 76: 1005-1026

Steward RE, Spencer LJ, Hamilton TD, Keefer BE, Dawson LJ, Morgan GL, Echternkamp SE. Levels of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins, luteinizing hormone and IGF-1-receptors, and steroids in dominant follicles during the first follicular wave in cattle exhibiting regular estrous cycles. *Endocrinology* 1996a; 137: 2842-2850

Sun IYC, Overgaard MT, Oxvig C, Guidica LC. Pregnancy-associated plasma protein A proteolytic activity is associated with the human placental trophoblast cell membrane. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 5235-5240

Taylor SI, Dons RF, Hernandez E, Roth J, Gordon P. Insulinresistance associated with androgen excess in women with autoantibodies to the insulin receptor. *Ann Intern Med* 1982; 97: 851-855

Usckn Life Science Inc. Wuhan, 2010: Elisa Kit for Human Pregnancy Associated Plasma Protein A. <http://www.usckn.com/newsfile/2010-1-11/201011192956.pdf> (Zugriffsdatum: 20.12.2010)

Voutilainen R, Franks S, Mason HD, Martikainen H. Expression of insulin-like growth factor (IGF), IGF-binding protein, and IGF receptor messenger ribonucleic acids in normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1003-1008

Wald N, Stone R, Chuckle HS, Grudzinskas JG, Barkai G, Brambati B. First trimester concentrations of pregnancy associated plasma protein A and placental protein 14 in Down's syndrome. *BMJ* 1992, 305: 28

Wald NJ, Watts HC, Hackshaw AK. Integrated screening for Down's syndrome based on tests performed during the first and second trimesters. *N Engl J Med* 1999; 341: 461-467

Wandji SA, Pelletier G, Sirard MA. Ontogeny and cellular localization of 125I-labelled insulin-like growth factor-1, 125I-labelled follicle-stimulating hormone, and 125I-labelled human chorionic gonadotropin binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. *Biol Reprod* 1992; 47: 814-822

Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci* 2004; 82: E63-74

Webb R., Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverick HA, Armstrong DJ. Mechanism regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction in Domestic Ruminants. V Reprod Suppl* 2003; 61: 71-90

Westergaard JG, Chemnitz J, Teisner B, Poulsen HK, Ipsen L, Beck B, Grudzinskas JG. Pregnancy-associated plasma protein A: a possible marker in the classification and prenatal diagnosis of Cornelia de Lange syndrome. *Prenat Diagn* 1983 b; 3: 225-232

Westergaard JG, Teisner B, Grudzinskas JG. Serum PAPP-A in normal pregnancy: Relationship to fetal and maternal characteristics. *Arch Gynecol* 1983 a; 233: 211-215

Westgaard L, Sinosich MJ, Grudzinskas JG, Bolton T, McNatty KP, Sauders DM, Teisner B, Westgaard J. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in preovulatory, nonovulatory healthy, and atretic human ovarian follicles during the natural cycle. *Ann N Y Acad Sci* 1985; 442: 205-211

Wunder DM, Mueller MD, Birkhäuser MH, Bersinger NA. Steroids and protein markers in the follicular fluid as indicators of oocyte quality in patients with and without endometriosis. *J Assist Reprod Genet* 2005; 22: 257-264

Zhou J, Wang J, Penny D, Monget P, Arraztoa JA, Fogelson LJ, Bondy CA. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 4 Expression Parallels Luteinising Hormone Receptor Expression and Follicular Luteinization in the Primate Ovary. *Biol Reprod* 2003; 69: 22-29

Zhou R, Diehl D, Hoeflich A, Lahm H, Wolf E. IGF-binding protein-4: biochemical characteristics and functional consequences. *J Endocrinol* 2003; 178: 177-193

9. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei mich herzlich bei Prof. Dr. van der Ven, dem Leiter der Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin der Universitätsfrauenklinik Bonn bedanken, der es mir ermöglicht hat, meine Dissertation in seiner Abteilung zu schreiben. Danke für die Korrektur meiner Arbeit und die guten Anmerkungen zu inhaltlichen und formalen Sachverhalten.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Reinsberg bedanken. Ihm habe ich zu verdanken, dass meine Arbeit zustande gekommen ist und die Messungen im Labor wider Erwarten doch durchgeführt werden konnten, als ich nicht mehr daran geglaubt habe. Er hat mich tatkräftig unterstützt und mir mit guten Ideen weitergeholfen, wenn ich nicht weiter wusste.

Des weiteren möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Bender bedanken, der mich mit seiner Begeisterung für das Themengebiet angesteckt hat und mir vor allem bei der Planung und Strukturierung der Arbeit sowie inhaltlichen Fragestellungen geholfen hat. Danke, dass du ein Ansprechpartner für mich geblieben ist, auch nachdem du die Uniklinik Bonn verlassen hat.

Ich möchte mich auch bei allen anderen Mitarbeitern des Hormonlabors der Universitätsfrauenklinik bedanken, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Außerdem möchte ich mich bei meiner lieben Familie und meinen Freunden bedanken, die mich immer auf meinem Weg unterstützt haben und mir zur Seite gestanden sind. In diesem Fall konkret durch Einführung in die Welt von SPSS und Excel, Hilfe bei der Formatierung und Korrektur meiner Arbeit.

Danke euch Allen!