

Aus dem Institut für Experimentelle Endokrinologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Das Polyzystische Ovarialsyndrom als Autoimmunerkrankung -  
sind natürliche Gonadotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor-  
Autoantikörper von diagnostischer Relevanz?

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lisa-Marie Sattler

Datum der Promotion: 26. Juni 2022



## INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
0. Abstract.....	6
1. Einleitung.....	8
1.1. Grundlagen des Menstruationszyklus.....	8
1.1.1. Die regulierenden Hormone.....	8
1.1.2. Die Rezeptoren.....	9
1.2. Das Polyzystische Ovarialsyndrom.....	10
1.2.1. Ein Überblick über das Krankheitsbild.....	10
1.2.2. Aktueller Forschungsstand der Ätiopathogenese.....	12
1.3. Fragestellung/ Hypothese.....	15
2. Materialien und Methodik.....	15
2.1. Serumproben.....	15
2.2. Herstellung des GnRH-R-Luciferase Fusionsproteins.....	16
2.2.1. Klonierung.....	16
2.2.2. Rekombinante Expression in Säugerzellen.....	17
2.3. Herstellung des Fusionsprotein-enthaltenden Zellextraktes.....	18
2.4. Durchführung des Immunopräzipitationsassays.....	18
2.5. Bestätigungsmessungen.....	19
2.5.1. GnRH-R-Ak-Verdünnungsreihe.....	19
2.5.2. Analysen durch Mix-Seren.....	19
2.6. Statistische Analysen.....	19
3. Ergebnisse.....	20
3.1. Testung der Expression des GnRH-R-Luciferase Fusionsproteins.....	20
3.2. Prävalenz von natürlichen GnRH-R-Autoantikörpern.....	21
3.3. Stabilität von GnRH-R-Autoantikörpern.....	23
3.4. Androgenspiegel bei GnRH-R-aAk-positiven Seren.....	24
4. Diskussion.....	24
5. Literaturverzeichnis.....	29
6. Eidesstattliche Versicherung .....	33
7. Anteilserklärung.....	34
8. Auszug aus der „Journal Summary List“ (ISI Web of Knowledge).....	35
9. Druckexemplar der Publikation.....	37
10. Lebenslauf.....	51
11. komplette Publikationsliste.....	53
12. Danksagung.....	54

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(a)Ak	(Auto)Antikörper
AC	Adenylatzyklase
BSA	bovine serum albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB-binding protein
CREB	cAMP response element-binding protein
DAG	Diacylglycerol
DENND1A	DENN domain-containing 1A
DHEAS	Dehydroepiandrosteron-Sulfat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMEM <sup>++</sup>	DMEM mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/ Streptomycin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL 2	second extracellular loop, zweite extrazelluläre Schleife
Egr 1	early growth response protein 1
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK 1/2	extracellular-signal regulated kinase 1/2
FBS	fetal bovine serum
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
FSH-R	Follikel-stimulierendes Hormon-Rezeptor
FTO	fat mass and obesity associated
G418	Geneticin = Analogon des Neomycins
GDP	Guanosindiphosphat
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GnRH-R	Gonadotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor
GnRH-R-aAk	Gonadotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor-Autoantikörper
GnRH-R-Luc	Gonadotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor-Luciferase
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
HCG	humanes Choriongonadotropin
HCG-R	humaner Choriongonadotropin-Rezeptor
HDL	high density lipoprotein
HEK-Zellen	“human embryonic kidney“-Zellen
IFN	Interferon
IGF1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IUGR	intrauterine growth restriction
IVF	in-vitro-Fertilisation
kanGnRH-R-Ak	Kaninchen-GnRH-R-Antikörper
Katalognr.	Katalognummer
LB	lysogeny broth
LDL	low density lipoprotein
LGA	large for gestational age
LH	luteinisierendes Hormon
LHCGR	luteinisierendes Hormon/ Choriongonadotropin Rezeptor

LH-R	lutinisierendes Hormon-Rezeptor
Luc	(Firefly) Luciferase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
NIS	Natrium-Iodid-Symporter
PCOS	Polyzystisches Ovarialsyndrom
PCO	polyzystische Ovarien
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDS	Pendrin-Transporter
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC $\beta$	Phospholipase C $\beta$
RLU	relative light unit
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SD	standard deviation, Standardabweichung
SGA	small for gestational age
SHBG	Sexualhormon-bindendes Globulin
SNP	single nucleotide polymorphism, Einzelnukleotid-Polymorphismus
StAR	steroidogenic acute regulatory protein
Tg	Thyreoglobulin
Tg-Ak	Thyreoglobulin-Antikörper
THADA	Thyroid adenoma associated
TNF	Tumornekrosefaktor
TPO	Thyreoperoxidase
TPO-Ak	Thyreoperoxidase-Antikörper
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
TSH-R	Thyroidea-stimulierendes Hormon-Rezeptor

## ABSTRACT

**Einleitung:** Das Polyzystische Ovarialsyndrom (PCOS) betrifft 5 – 15 % der gebärfähigen Frauen und ist damit eine der häufigsten Ursachen weiblicher Infertilität. Charakteristisch sind Zyklusunregelmäßigkeiten, insbesondere Oligo- oder Amenorrhö, sowie ein Hyperandrogenismus, oft einhergehend mit Virilisierungserscheinungen der betroffenen Patientinnen. Die klinische Heterogenität des Krankheitsbildes und das Fehlen pathognomonischer serologischer Marker führen zu einer oftmals verspäteten Diagnosestellung und damit zu einem erhöhten Leidensdruck der betroffenen Patientinnen.

**Hypothese:** Aufgrund des häufigen Einhergehens des PCOS mit anderen Autoimmunerkrankungen, der erhöhten Prävalenz verschiedenster Autoantikörper (aAk) bei PCOS-Patientinnen und der dysregulierten gonadotropen Hormonachse, vermuteten wir natürliche aAk gegen den Gonadotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor (GnRH-R) mit pathogenetischer Relevanz, die einen diagnostisch verwendbaren Marker darstellen könnten.

**Methoden:** Mittels eines Immunopräzipitationsassays wurden 651 PCOS-Seren und 400 Kontrollseren auf das Vorhandensein von natürlichen GnRH-R-aAk untersucht (n = 1051). Als Antigen diente ein rekombinantes GnRH-R-Luciferase Fusionsprotein, welches den kompletten humanen GnRH-R enthielt, an dessen intrazelluläres Ende eine Luciferase als Reporterprotein gekoppelt wurde. Zur Standardisierung wurde ein kommerzieller, gegen den humanen GnRH-R gerichteter, polyklonaler Kaninchen-Antikörper (kanGnRH-R-Ak) verwendet.

**Ergebnisse:** Der Assay erwies sich als sensitiv. In der Durchführung des Assays mit dem kommerziellen kanGnRH-R-Ak zeigte sich ein lineares, Ak-konzentrationsabhängiges Signal. Unter den 651 PCOS-Seren konnten zwei hoch GnRH-R-aAk-positive (0,31 %) und unter den 400 Kontrollseren eine (0,25 %) hoch GnRH-R-aAk-positive Serumprobe detektiert werden. Weitere 12 Serumproben wiesen ein schwach GnRH-R-aAk-positives Signal auf. Kontrollmessungen bestätigten die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse. Durch zusätzliche Analysen konnten Matrixeffekte ausgeschlossen werden.

**Zusammenfassung:** Die Prävalenz von GnRH-R-aAk-positiven Proben unter den PCOS-Seren war verschwindend klein und glich nahezu der Prävalenz in den gesunden Kontrollseren. Somit sind GnRH-R-aAk unseren Ergebnissen zufolge weder von pathogenetischer noch von diagnostischer Relevanz, wodurch unsere eingangs aufgestellte Hypothese negiert wird.

## ABSTRACT

**Introduction:** Polycystic ovarian syndrome (PCOS) affects 5 – 15 % of women of child-bearing age and is one of the most common reasons for female infertility. The patients are suffering from menstrual irregularities, especially oligo- or amenorrhea, and virilisation symptoms due to the hyperandrogenism, which is characteristic for PCOS. Despite the rising prevalence of PCOS and the high psychological strain on the affected women, to date pathogenesis is not finally resolved and pathognomonic serological markers are still missing, leading to delayed diagnosis of PCOS.

**Hypothesis:** Due to the association of PCOS with autoimmune diseases, several different autoantibodies (aAb) detectable in PCOS patient's sera and the dysregulated gonadotropic axis, we assumed natural aAb to the gonadotropin-releasing-hormone-receptor (GnRH-R) being of pathogenetic and consequently diagnostic relevance.

**Methods:** We investigated 651 PCOS serum samples as well as 400 control serum samples by an immunoprecipitation assay looking for natural GnRH-R-aAb (n = 1051). A recombinant full-length GnRH-R-Luciferase fusion protein served as antigen. For standardization the immunoprecipitation assay additionally was conducted with a commercial rabbit antiserum to human GnRH-R.

**Results:** Two highly GnRH-R-aAb-positive serum samples among the 651 PCOS patients (0.31 %) and one highly GnRH-R-aAb-positive serum sample among the 400 control sera (0.25 %) were detected. Further 12 serum samples were slightly GnRH-R-aAb-positive. In control measurements positivity was reproduced. The assay revealed linear signals on dilution with the commercial polyclonal rabbit anti-GnRH-R-Ab. Matrix effects could be excluded by additional analyses.

**Conclusion:** The prevalence of GnRH-R-aAb-positive serum samples among PCOS patients was infinitesimally small and almost equal to the prevalence in healthy controls. Thus, according to our results, GnRH-R-aAb are neither of pathogenetic nor of diagnostic relevance.

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Grundlagen des Menstruationszyklus

### 1.1.1. Die regulierenden Hormone

Eine zentrale Rolle in der Regulation des weiblichen Zyklus spielen die beiden Hormone luteinisierendes Hormon (LH) und Follikel-stimulierendes Hormon (FSH). Bei diesen beiden, als Gonadotropine bezeichneten Hormonen, handelt es sich um heterodimere Glykoproteine bestehend aus einer alpha- und einer beta-Untereinheit (a, b). Die alpha-Untereinheiten mit ihren 92 Aminosäuren sind jeweils identisch, die beta-Untereinheiten sind Hormon-spezifisch und für die jeweilige Rezeptorbindung verantwortlich. Ausgeschüttet werden FSH und LH von der Adenohypophyse. Deren Ausschüttung wiederum wird über das Gonadotropin-Releasing-Hormon (= Gonadoliberin), ein Dekapeptid, reguliert, welches vom Hypothalamus gebildet und pulsatil alle ca. 60 – 120 Minuten in den hypophysären Portalkreislauf ausgeschüttet wird (c). Auf diese Weise entsteht die Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse.

Die Zielzellen der Gonadotropine befinden sich bei Frauen in den Ovarien. LH bindet hier an die Rezeptoren der Zellen der Theca interna und FSH an die Rezeptoren der Granulosazellen – beides Zelltypen, die die Oozyte umgeben und zur Follikelbildung und Reifung beitragen. Durch die Bindung von LH an den LH-Rezeptor (LH-R) der Theca-interna-Zellen, wird in diesen die Androgensynthese stimuliert. Das aus Cholesterin gebildete Androstendion und Testosteron wird in den Granulosazellen mittels des Enzyms Aromatase in Östron und Östradiol umgewandelt. Die Expression und Aktivität der Aromatase wird durch die Bindung von FSH an den FSH-Rezeptor (FSH-R) der Granulosazellen stimuliert.

In der Rinde der Ovarien existiert ein ruhender Vorrat an Primordialfollikeln, der sich über die Jahre der Geschlechtsreife verbraucht. Aus diesem ruhenden Vorrat entstehen nach und nach, zunächst Zyklus-unabhängig, Tertiärfollikel. Monatlich wird eine Follikelkohorte aus Tertiärfollikeln rekrutiert, aus der in der Mitte des durchschnittlich 28-tägigen Zyklus ein sprungreifer, dominanter Graaf-Follikel hervorgeht (d, e).

Mit dem ersten Tag der Menstruation beginnt die erste Zyklusphase, die Follikelphase, deren Ende durch den dominanten Graaf-Follikel und die Ovulation gekennzeichnet ist. FSH und Östradiol dominieren diese erste Zyklusphase. FSH bewirkt genau jene bereits erwähnte Rekrutierung einer Follikelkohorte und fördert die weitere Reifung dieser Follikel. Unter FSH-Einfluss produzieren die Granulosazellen der heranreifenden Follikel viel Östrogen und Inhibin, wodurch es wiederum über einen negativen Feedbackmechanismus zu einer Hemmung der FSH-Ausschüttung aus der Adenohypophyse kommt. Nur der Follikel, der über eine besonders hohe FSH-Sensitivität und –Rezeptordichte verfügt, kann trotz niedriger FSH-Spiegel weiterreifen und verstärkt Östrogen produzieren. Er entwickelt sich zum dominanten Graaf-Follikel. Die übrigen Follikel atresieren. Der stark erhöhte Östrogenspiegel führt um den 14. Zyklustag über einen positiven Feedbackmechanismus zu einem LH-Peak, der ca. 24 Stunden später die Ovulation auslöst. Die Oozyte samt Corona radiata verlässt den Follikel und damit das Ovar. Es beginnt die zweite Zyklusphase, die Lutealphase. In dieser sind LH und Progesteron die dominierenden Hormone. Es kommt zur Luteinisierung der Granulosazellen, d.h., dass nun auch die Granulosazellen LH-R exprimieren. Unter dem Einfluss von LH werden die verbliebenden Reste des Follikels zum Corpus luteum (Gelbkörper), der für die Progesteronproduktion in dieser Phase verantwortlich ist. Über die negative Rückkopplung hemmen hohe Progesteronspiegel die LH-Ausschüttung. Die Progesteron-Synthese kommt zum Erliegen, wenn die Oozyte nicht befruchtet wird, und die Progesteron-Produktion nicht

durch das humane Choriongonadotropin ( $\beta$ -hCG), das ebenfalls an den LH-R der Granulosazellen binden kann, aufrechterhalten wird. Der Progesteronabfall führt zur Hormonentzugsblutung, der Menstruationsblutung. Durch die niedrigen Sexualhormonspiegel entfällt die Sexualhormon-abhängige Hemmung auf die Hypophyse und den Hypothalamus. Somit kommt es zu einem erneuten Anstieg von FSH und der Rekrutierung einer neuen Follikelkohorte - ein neuer Menstruationszyklus beginnt.

### 1.1.2. Die Rezeptoren

Der FSH-R, LH-R und GnRH-R gehören, wie auch der TSH-R und HCG-R, zur großen Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Diese zeichnen sich durch sieben, die Plasmamembran durchspannende Transmembranhelices aus. Das N-terminale Ende befindet sich extrazellulär und das C-terminale Ende intrazellulär. GPCR sind intrazellulär mit heterotrimeren G-Proteinen gekoppelt. Diese G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten: einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Untereinheit. Sobald ein Ligand an seinen entsprechenden Rezeptor gebunden hat, kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors (f). Nun kann die intrazelluläre Domäne des Rezeptors mit dem G-Protein interagieren und seine Funktion als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor ausüben (1). Daraufhin wird in der  $\alpha$ -Untereinheit Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) ausgetauscht. In der aktivierten, GTP-gebundenen Form dissoziiert die  $\alpha$ -Untereinheit von der  $\beta,\gamma$ -Untereinheit ab und kann nun ihrerseits Signaltransduktionskaskaden über Effektorproteine bzw. Second Messenger auslösen. Die  $\alpha$ -Untereinheit verfügt über eine intrinsische GTPase-Aktivität, die aktiv wird, sobald kein Ligand mehr an den Rezeptor bindet. Das GTP der  $\alpha$ -Untereinheit wird zu GDP,  $\alpha$ - und  $\beta,\gamma$ -Untereinheit reassoziieren, und damit fällt das heterotrimere G-Protein in seine inaktive Form zurück (f).

Es gibt mehrere verschiedene  $\alpha$ -Untereinheiten der G-Proteine, die die nachfolgende Signaltransduktionskaskade und damit die Funktion des jeweiligen GPCR maßgeblich beeinflussen: am häufigsten vertreten sind die  $G\alpha_s$ -,  $G\alpha_{i/o}$ - und  $G\alpha_{q/11}$ -Untereinheiten. Die Untereinheit  $\alpha_s$  aktiviert die Adenylatzyklase (AC), was zur Bildung des Second Messengers zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) führt, der die Proteinkinase A (PKA) stimuliert. Eine  $\alpha_{i/o}$ -Untereinheit hingegen hemmt die Adenylatzyklase und führt zur Aktivierung von Kaliumkanälen. Die Phospholipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ) wird über die  $\alpha_{q/11}$ -Untereinheit aktiviert und spaltet das in der Plasmamembran vorkommende Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP $_2$ ) in Inositoltriphosphat (IP $_3$ ) und Diacylglycerol (DAG). IP $_3$  führt dann über Bindung an seinen Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Retikulums zur Steigerung des intrazellulären Calciumspiegels und DAG überführt die Proteinkinase C (PKC) in ihre aktive Form.

GnRH-R interagiert vor allem mit der  $G\alpha_{q/11}$ -Untereinheit, kann aber auch  $G\alpha_s$ - und seltener  $G\alpha_{i/o}$  gekoppelt sein (1-3). Die Frequenz der GnRH-Ausschüttung hat Einfluss auf die Genexpression der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten der Gonadotropine und deren Sekretion. Eine langsame GnRH-Ausschüttungsfrequenz (ca. alle 120 Minuten) fördert vor allem die FSH-Bildung und -Sekretion. Hingegen stimuliert eine höhere GnRH-Ausschüttungsfrequenz (ca. alle 10 bis 30 Minuten) vermehrt die LH-Expression und -Ausschüttung (1). Bei hoher GnRH-Ausschüttungsfrequenz kommt es vornehmlich zur Aktivierung von  $G\alpha_{q/11}$  und damit zur Aktivierung der PKC. Diese aktiviert eine Kaskade von MAP-Kinasen (MAPK), in der am Ende die phosphorylierte ERK 1/2 steht, welche Transkriptionsfaktoren, insbesondere Egr 1, aktiviert und damit vor allem die Expression der  $\beta$ -Untereinheit von LH fördert (3). Eine langsame GnRH-Ausschüttungsfrequenz führt neben dem  $G\alpha_{q/11}$ -PKC-MAPK-Signalweg vorzugsweise zur

Aktivierung von  $G\alpha_s$ , wodurch die PKA und schließlich der Transkriptionsfaktor cAMP response element-binding protein (CREB) aktiviert wird. Phosphoryliertes CREB bindet an die entsprechende Promotorregion für die FSH- $\beta$ -Untereinheit und rekrutiert das CREB-binding protein (CBP), wodurch die Transkription der FSH- $\beta$ -Untereinheit stimuliert wird (3).

Die Rezeptoren für FSH und LH sind vor allem  $G\alpha_s$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren (4, 5). Bindet LH an seinen LH-R, aktiviert die  $G\alpha_s$ -Untereinheit die AC. Der intrazelluläre cAMP-Spiegel steigt an und die PKA wird aktiviert. Durch die Phosphorylierung und damit Aktivierung von CREB wird die Transkription von Genen gefördert, die für die Androgensynthese von Bedeutung sind. Dazu gehören unter anderem das Transportprotein StAR und das Enzym 20,22-Desmolase. Über StAR gelangt Cholesterin von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran. Hier wird Cholesterin durch das Enzym 20,22-Desmolase (= Cholesterindesmolase = Cholesterin-Monooxygenase) in Pregnenolon umwandelt, was den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Steroidhormonsynthese darstellt. Die Androgensynthese der Theca-interna-Zellen kommt in Schwung. Neben diesem vorrangigen cAMP/PKA/CREB-Signalweg, kann LH auch an GPCR binden, die mit  $G\alpha_{q/11}$  oder  $G\alpha_{i/o}$  interagieren (4). Darüberhinaus können Theca-Zellen auch Insulin- und Lipoprotein-Rezeptoren exprimieren, die synergistisch zu LH über gebundenes Insulin bzw. Lipoproteine (vor allem LDL und HDL) die Androgenproduktion fördern (4).

Durch die Bindung von FSH an FSH-R wird auf gleichem Wege über die  $G\alpha_s$ -Untereinheit der cAMP/PKA/CREB-Signalweg aktiviert, wodurch die Expression der Aromatase deutlich gesteigert wird. Die Aromatase ist das entscheidende Enzym, das Androstendion bzw. Testosteron in Östron bzw. Östradiol umwandelt (4, 6).

## **1.2. Das Polyzystische Ovarialsyndrom**

### **1.2.1. Ein Überblick über das Krankheitsbild**

1935 wurde von Stein und Leventhal ein Syndrom bei Frauen beschrieben, welches vorrangig von unregelmäßigen Menstruationen, Virilisierungserscheinungen und Infertilität gekennzeichnet war. Sie nannten es Stein-Leventhal-Syndrom. Heute trägt dieses Syndrom die Bezeichnung Polyzystisches Ovarialsyndrom (PCOS) und ist eines der häufigsten Gründe für unerfüllten Kinderwunsch bei Frauen im gebärfähigen Alter. Ca. 5 – 15 % der Frauen weltweit sind betroffen und die Prävalenz ist weiterhin steigend (7, 8). Die Symptome sind von Frau zu Frau sehr heterogen. Häufig manifestiert sich die Erkrankung im zweiten oder dritten Lebensjahrzehnt mit primärer oder sekundärer Amenorrhö, Oligomenorrhö oder Infertilität bzw. unerfülltem Kinderwunsch aufgrund von Oligo- bis hin zu Anovulation. Aufgrund der erhöhten Androgene kommt es zu Virilisierungserscheinungen wie Hirsutismus, einer tieferen Stimme, androgenetischer Alopezie oder auch Akne vulgaris. Bis zu 75 % der Frauen mit PCOS sind übergewichtig oder adipös, über 70 % weisen serologisch eine Dyslipidämie auf, ca. 50 % erfüllen die Kriterien eines metabolischen Syndroms (8, 9) und über 50 % leiden unter einer Insulinresistenz mit konsekutiver Hyperinsulinämie (7, 10), was sich in einer gestörten Glucosetoleranz zeigt und somit das Risiko für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ II stark erhöht. Diese Risikofaktoren führen zu weiteren Komorbiditäten, wie zum Beispiel arterieller Hypertonie, koronarer Herzkrankheit, Myokardinfarkten und Schlaganfällen, aber auch obstruktiver Schlafapnoe und Gallensteinen (8, 9, 11, 12). Hervorzuheben ist das nicht seltene Einhergehen des PCOS mit Autoimmunerkrankungen wie Hashimoto-Thyreoiditis, Morbus Basedow und Diabetes mellitus Typ I, aber auch systemischem Lupus erythematodes und rheumatoider Arthritis (9, 12). Betroffene Frauen haben ein ca. 1,5- bis 2,5-fach erhöhtes Risiko für Asthma bronchiale (9) und ein erhöhtes Risiko für Schwangerschaftskomplikationen wie Abort, Frühgeburtlichkeit und Gestationsdiabetes (13). Aufgrund der erhöhten Östrogen-

und erniedrigten Progesteronspiegel liegt ein erhöhtes Risiko für Endometriumkarzinome vor (9, 12). Bezüglich eines erhöhten Risikos für Mamma- und Ovarialkarzinome herrscht noch Unklarheit (9, 12).

Zur diagnostischen Sicherung eines PCOS gehören eine Blutentnahme und eine Sonografie der Ovarien. Die Androgene im Blut sind charakteristischerweise erhöht, insbesondere Testosteron und Androstendion, die das serologische Korrelat der Virilisierung darstellen. Die erhöhten Androgene führen durch vermehrte Umwandlung mittels Aromatase zu ebenfalls erhöhten Östrogenwerten, wohingegen die Progesteronwerte aufgrund der Oligo-/ Anovulation normal bis erniedrigt sind (12, 14). Serologisch typisch ist auch eine LH-Dominanz bei normalen bis verminderten FSH-Werten mit konsekutiv erhöhtem LH-/ FSH-Quotienten. Diese Konstellation liegt darin begründet, dass die erhöhten Testosteron- und Östrogenspiegel die GnRH-, FSH- und LH-Ausschüttung hemmen. Die Suppression der LH-Ausschüttung ist allerdings durch die verminderten Progesteronspiegel weniger ausgeprägt als die FSH-Suppression (7, 12). Hinzu kommt eine oftmals vorliegende Hyperinsulinämie, welche die Frequenz und Amplitude der LH-Sekretion der Adenohypophyse stimuliert. Die LH-Dominanz wiederum fördert den Hyperandrogenismus über eine stimulierte Testosteron-Synthese in den Theca-interna-Zellen. Zusätzlich verstärkt die Hyperinsulinämie den Hyperandrogenismus durch die LH-synergistische Wirkung des Insulins an den Theca-interna-Zellen (15). Darüber hinaus bewirkt eine Hyperinsulinämie eine verminderte hepatische Synthese des Sexualhormonbindenden Globulins (SHBG), wodurch die effektiv wirksame, freie Menge an Sexualhormonen weiter gesteigert wird (10) (Abb. 1). In der Sonografie der Ovarien sind oftmals perlenschnurartig aneinandergereihte Zysten zu detektieren, die dem Krankheitsbild seinen Namen geben. Bei den Zysten handelt es sich um herangereifte, persistierende Follikel. Von polyzystischen Ovarien spricht man ab mind. 12 subkapsulären Zysten mit einem Durchmesser von 2 bis 9 mm und/ oder einer Volumenzunahme des Ovars von über 10 ml (7, 14).

Seit 2003 wird die Diagnose des PCOS anhand der Rotterdam-Kriterien gestellt. Mindestens zwei der folgenden drei Kriterien müssen erfüllt sein (h):

1. Oligo- und/ oder Anovulation (bzw. Oligo- und/ oder Amenorrhö)
2. Hyperandrogenismus (klinisch oder laborchemisch gesichert)
3. polyzystische Ovarien (PCO)

Zudem müssen vor Diagnosestellung andere Ursachen für irreguläre Menstruationen und/ oder Androgenerhöhungen, wie z.B. das Adrenogenitale Syndrom, Morbus Cushing, Hypophysenadenome, eine kongenitale adrenale Hyperplasie, androgenproduzierende Tumore, eine exogene Androgenezufuhr, etc. ausgeschlossen werden (7, 10).

Zunehmend wird das PCOS in vier Typen eingeteilt, wie sie in Tabelle 1 aufgeführt sind (7, 16, g).

**Tabelle 1.** Die vier PCOS-Typen

PCOS-Typ	chronische Anovulation	Hyperandrogenismus	PCO
1 „full-blown (teils auch „classic“) PCOS“	✓	✓	✓
2 „classic PCOS“	✓	✓	X
3 „ovulatory PCOS“	X	✓	✓
4 „normoandrogenic PCOS“	✓	X	✓

Legende: ✓... liegt vor; X... liegt nicht vor

Diese Einteilung ist von prognostischer Bedeutung. Die Typen eins bis drei gehen mit einem Hyperandrogenismus einher und sind somit stark mit Hyperinsulinämie, metabolischem Syndrom und dessen Folgen assoziiert. Dem gegenüber steht der vierte, normoandrogene Typ, der prognostisch günstiger ist und bei dem sich beispielsweise ein gutes Therapieansprechen auf eine Metformin-Therapie bei Kinderwunsch zeigte (g).

Bezüglich der Therapie bestehen verschiedene Möglichkeiten, die sich nach dem Interesse der jeweiligen Patientin richten. Den oftmals ersten und einfachsten Schritt stellt eine Gewichtsreduktion dar. Eine Gewichtsreduktion von allein 5 % des Körpergewichtes hat einen positiven Einfluss auf die Zyklusregelmäßigkeit, die Fertilität, die Hyperinsulinämie und den Hyperandrogenismus (10). Bei starker Adipositas kommen zunehmend auch bariatrische Operationen zum Einsatz. Auch die Gabe von Metformin stellt eine Therapieoption dar. Ab einer Metformin-Einnahme von über sechs Monaten bessern sich die Insulin- und Androgenspiegel, was sich günstig auf die Zyklusregelmäßigkeit und damit Fertilität auswirkt, weiter hat Metformin einen positiven Einfluss auf die Dyslipidämie und senkt den Blutdruck (7). Wünscht die betroffene Frau derzeit keine Schwangerschaft und möchte vor allem den Virilisierungserscheinungen entgegenwirken, sind orale Kontrazeptiva Mittel der Wahl, die zumeist das antiandrogenetisch wirkende Progesteronderivat Cyproteronacetat enthalten. Die Kontrazeptiva stellen die Regelmäßigkeit des Zyklus wieder her, reduzieren den Hyperandrogenismus und das Risiko einer Endometriumshyperplasie (7).

Um die psychisch belastenden Virilisierungserscheinungen weiter zu minimieren, können gegen eine stark ausgeprägte Akne Isotretinoin und gegen die androgenetische Alopezie Cyproteronacetat oder der 5 $\alpha$ -Reduktase-Hemmer Finasterid verschrieben werden. Besteht hingegen ein Kinderwunsch, der allein durch Lifestyle-Modifikation wie Gewichtsabnahme, Bewegung und gesunde Ernährung oder in Kombination mit einer Metformin-Therapie nicht erfüllt werden kann, stellt Clomifen die Erstlinientherapie dar (7). Hierbei handelt es sich um einen Östrogen-Rezeptor-Modulator, der durch Bindung an die Östrogen-Rezeptoren der Hypophyse die negative Feedbackschleife unterbricht, wodurch mehr FSH und LH freigesetzt werden, die zur Follikelreifung und letztlich zum Eisprung führen (7). Immer mehr wird auch Letrozol, ein Aromatasehemmer, eingesetzt. Die Hemmung der Aromatase führt zu einer Erniedrigung der Östrogenspiegel, dadurch wird die FSH- und LH-Freisetzung aus der Adenohypophyse enthemmt (g). Stellt sich noch immer keine Schwangerschaft ein, kann ein Versuch mit der Gabe von Gonadotropinen oder GnRH selbst unternommen werden. Darüber hinaus gibt es einige invasive Techniken, die eine Ovulation begünstigen können, wie z.B. das transvaginale oder laparoskopische „ovarian drilling“, bei dem die das Ovar umgebenden Membranen mittels eines Lasers oder einer Nadel punktiert werden (7). Auch die Gabe von Vitamin-D-Präparaten zeigte bereits positive Effekte, insbesondere bezüglich der Senkung der Insulinresistenz, der Gewichtsreduktion und der Senkung des kardiovaskulären Risikos (7, 17). Die verschiedenen Therapieoptionen und das „Austesten“ der jeweils besten Therapievariante für die entsprechende Patientin unterstreichen sowohl die Heterogenität des Krankheitsbildes PCOS als auch die Ungewissheit über die definitive Ätiopathogenese. Pathognomonische serologische Marker, die bis dato fehlen, würden die Zeit bis zur Diagnosestellung verkürzen, den Leidensdruck der betroffenen Patientinnen senken und die Lebensqualität deutlich steigern.

### **1.2.2. Aktueller Forschungsstand der Ätiopathogenese**

Die genaue Ätiologie und Pathogenese des PCOS sind bis dato nicht abschließend geklärt, und es besteht weiterhin großer Forschungsbedarf. Derzeit wird von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen. Ein Konstrukt, an dessen Ende das Krankheitsbild PCOS steht, das sich aus

mehreren Puzzleteilen wie genetischer Prädisposition, fetaler Programmierung, Sport- und Ernährungsgewohnheiten, Inflammation und Autoimmunität zusammensetzt.

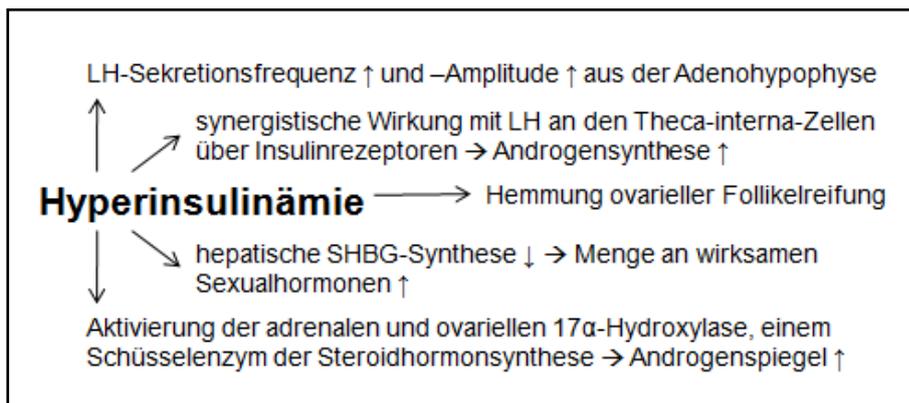
Laut Zwillingsstudien wird die Heritabilität des PCOS auf über 70 % geschätzt (18). In genomweiten Assoziationsstudien chinesischer Frauen wurden Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) gefunden, die gehäuft bei PCOS-Patientinnen auftraten. Darunter fielen unter anderem folgende Gene: Luteinisierendes Hormon/ Choriongonadotropin Rezeptor- (LHCGR-) Gen, Thyroid adenoma associated- (THADA-) Gen und DENN domain-containing 1A- (DENND1A-) Gen (11, 18). SNP im LHCGR-Gen, das für den LH- bzw. HCG-Rezeptor kodiert, sind assoziiert mit erhöhten LH-Spiegeln, vergrößerten Ovarien, Oligomenorrhö, Hormonresistenz gegenüber LH bzw. HCG und Infertilität (11). SNP im DENND1A-Gen führen zu Hypothalamus-, Hypophysen-, Ovarien- sowie Nebennierendysfunktionen und sind assoziiert mit Übergewicht und Diabetes mellitus Typ II. Bei vorliegenden SNP im THADA-Gen wurden ein gestörter Glucosemetabolismus, Dyslipidämien, polyzystische Ovarien, LH-Übersekretion und ein Hyperandrogenismus beschrieben (11). Ebenfalls wurde ein FTO-Gen-Polymorphismus (Variante rs9939609) detektiert, der ein erhöhtes Risiko für die Entstehung des PCOS mit sich bringt (18, 20, 21). Polymorphismen des FTO-Gens sind bereits bekannt und mit Adipositas und Diabetes mellitus Typ II assoziiert. Des Weiteren wurde in einer konsanguinen Familie mit drei, von PCOS betroffenen Töchtern eine Missense-Mutation (Variante rs104893836) im ersten kodierenden Exon des GnRH-R mittels Exom-Sequenzierung entdeckt, die bei allen drei betroffenen Töchtern homozygot vorlag (19).

Auch die fetale Programmierung soll eine Rolle in der Entwicklung des PCOS spielen (11). Hohe Glukokortikoid- und/ oder Androgenspiegel während der Schwangerschaft sollen epigenetische Einflüsse auf die DNA und damit auf die Expression bestimmter Gene haben und den späteren Phänotyp des PCOS-Krankheitsbildes beeinflussen. Erhöhte fetale Glukokortikoid-Spiegel, die stressbedingt z.B. aufgrund einer Plazentainsuffizienz entstehen, sind assoziiert mit intrauteriner Wachstumsretardierung (IUGR) und Small for Gestational Age- (SGA-) Neugeborenen. Für diese Neugeborenen mit kompensatorischem Wachstum in den ersten beiden Lebensjahren wurde ein erhöhtes Risiko für PCOS, aber auch für kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ II, Übergewicht und Dyslipidämien beschrieben. Ein andauernder maternaler Androgenüberschuss, der beispielsweise durch Übergewicht, Diabetes mellitus Typ II, Insulinresistenz, starke Gewichtszunahme während der Schwangerschaft oder durch PCOS selbst ausgelöst wurde, führt hingegen zu Large for Gestational Age- (LGA-) Neugeborenen und mündet ebenfalls in einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines PCOS, Glukoseintoleranz, Insulinresistenz und viszeraler Adipositas. Auch der Zeitpunkt des Hormoneinflusses spielt eine entscheidende Rolle. In Tierstudien wurde gezeigt, dass ein Androgenexzess, der über die gesamte Schwangerschaft stattfand, zu PCOS-typischen Einschränkungen der Reproduktivität führte, wohingegen ein Androgenüberschuss, begrenzt auf die erste Hälfte der Schwangerschaft, vor allem zu einem gestörten Glucosemetabolismus und viszeraler Adipositas führte (11).

Aber nicht nur die intrauterine Entwicklung, sondern auch postnatale Umweltfaktoren scheinen eine pathogenetische Rolle zu spielen. Ungesunde Ernährung, Überernährung und wenig Sport münden in steigenden Prävalenzen für Übergewicht, Adipositas und Diabetes mellitus Typ II. Weil PCOS auffallend häufig mit Übergewicht einhergeht, stellt sich die Frage: „Ist das Übergewicht die Ursache für die Entwicklung eines PCOS oder entsteht das Übergewicht aufgrund eines PCOS?“ Übergewicht fördert über erhöhte Leptinspiegel, die wiederum die GnRH- und LH-Sekretion stimulieren, die Entwicklung eines Hyperandrogenismus und damit Unregelmäßigkeiten im Menstruationszyklus (11). Dass Übergewicht einen Einfluss auf die

Fertilität hat, wird unterstützt durch die Tatsache, dass eine Gewichtsreduktion zur Senkung der Androgen- und Insulinspiegel führt und auf diesem Wege die Zyklusregelmäßigkeit verbessert, weshalb, wie bereits erwähnt, die Gewichtsreduktion einen wichtigen Pfeiler der Therapie darstellt (8, 11). Gegen „Übergewicht als ursächlichen Faktor für das PCOS“ sprechen die Tatsachen, dass die meisten übergewichtigen Frauen eine normale Fertilität aufweisen und dass auch schlanke Frauen von einem PCOS betroffen sein können (8). Zudem ist die Prävalenz übergewichtiger Frauen in den letzten Jahren verhältnismäßig mehr angestiegen als die Prävalenz von an PCOS erkrankten Frauen.

Die bereits mehrfach erwähnte Insulinresistenz bei über 50 % der PCOS-Frauen rückt immer mehr in den Fokus (10). Auch bei vielen schlanken PCOS-Patientinnen lässt sich diese nachweisen (8, 22). Folge der Insulinresistenz ist eine kompensatorische Hyperinsulinämie, welche zu den Effekten führt, die in Abbildung 1 schematisch dargestellt sind. Auf diese Weise trägt die Hyperinsulinämie zum Hyperandrogenismus bei und provoziert das phänotypische Erscheinungsbild des PCOS und dessen Zyklusunregelmäßigkeiten (10). Unterstrichen wird die pathogenetische Relevanz der Insulinresistenz durch die Tatsache, dass sowohl durch eine bariatrische Operation als auch durch Gewichtsabnahme und Metformin-Therapie die Insulinsensitivität gesteigert, Insulin- und Androgenspiegel gesenkt und somit die Fertilität verbessert werden.



**Abbildung 1. Auswirkungen der Hyperinsulinämie** (eigene Darstellung). Insulin stimuliert die LH-Sekretion aus der Adenohypophyse und fördert sowohl die Androgenproduktion in den Ovarien über Insulinrezeptoren der Theca-interna-Zellen als auch die Androgenproduktion in den Nebennierenrinden über Aktivierung der 17 $\alpha$ -Hydroxylase. Darüber hinaus hemmt Insulin sowohl die ovarielle Follikelreifung als auch die hepatische SHBG-Synthese, wodurch die effektive Menge wirksamer Androgene zunimmt. Legende: LH...Luteinisierendes Hormon, SHBG...Sexualhormon-bindendes Globulin,  $\uparrow$ ...nimmt zu,  $\downarrow$ ...nimmt ab

Darüberhinaus wird auch die Relevanz inflammatorischer Prozesse für die Pathogenese des PCOS diskutiert. Die hohen Östrogenspiegel wirken proinflammatorisch über eine gesteigerte Bildung und Sekretion von Zytokinen wie IL-4, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  (12, 14, 23). Diese proinflammatorischen Effekte des Östrogens werden normalerweise durch Progesteron gehemmt, und zwar durch Hemmung der Lymphozytenproliferation, Reduktion des oxidativen Bursts von Monozyten, verminderter Sekretion von IL-6 und Förderung der Sekretion des inhibitorischen Zytokins IL-10 (14, 23). Aufgrund der fehlenden bzw. unregelmäßigen Ovulationen bei PCOS-Patientinnen sind die Progesteron-Spiegel jedoch eher niedrig, wodurch die hemmende Wirkung des Progesterons in der zweiten Zyklushälfte die proinflammatorische Wirkung des Östrogens der ersten Zyklushälfte nicht ausgleichen kann und es zur Überstimulation des Immunsystems kommt, was wiederum die Bildung von Autoantikörpern

(aAk) begünstigt. Dies stellt die Brücke zur Autoimmunität und deren pathogenetischer Relevanz beim PCOS dar. Die Prävalenz verschiedener aAk in Serum von PCOS-Patientinnen ist deutlich erhöht und wurde bereits mehrfach beschrieben. Um nur einige Beispiele zu nennen: Doppelstrang-DNA-Antikörper, Thyreoglobulin-Antikörper (Tg-Ak), Thyreoperoxidase-Antikörper (TPO-Ak), ovarielle Antikörper, Glatte-Muskulatur-Antikörper, Histonantikörper, Inselzellantikörper, etc. (12, 14, 24). Dennoch haben die genannten aAk keinen diagnostischen Nutzen für das Krankheitsbild PCOS.

An dieser Stelle soll das gehäufte Vorkommen insbesondere einer Hashimoto-Thyreoiditis unter PCOS-Patientinnen nochmals hervorgehoben werden. Diese leiden schätzungsweise drei Mal häufiger unter einer Hashimoto-Thyreoiditis und ihre Titer für TPO-Ak und Tg-Ak sind höher als bei Hashimoto-Patientinnen ohne PCOS (12, 24). Auch zeigte sich, dass TPO-Ak-positiv PCOS-Patientinnen höhere Östrogenspiegel aufwiesen, als TPO-Ak-negative PCOS-Patientinnen (14). Darüberhinaus sind erhöhte TPO-Ak-Spiegel mit einem schlechteren Therapieerfolg infertiler PCOS-Patientinnen assoziiert (24).

Zuletzt soll noch der oftmals bei betroffenen Patientinnen vorliegende erniedrigte Vitamin-D-Spiegel erwähnt werden, der das Krankheitsbild zu beeinflussen scheint. Wird mittels Vitamin-D-Supplementation der Mangel ausgeglichen, hat das einen positiven Einfluss auf die Zyklusregelmäßigkeit, die Fertilität, den Hyperandrogenismus, das Übergewicht sowie die Insulinresistenz (25). Der Vitamin-D-Mangel unterstützt den autoimmunen Pfeiler der Pathogenese des PCOS: so sind Menschen, die nahe dem Äquator leben, signifikant seltener von Autoimmunerkrankungen, Übergewicht, Insulinresistenz und kardiovaskulären Erkrankungen betroffen im Vergleich zu Äquator-fernen Populationen (24, 26). Besonders niedrige Vitamin-D-Level zeigten sich bei Frauen, die neben einem PCOS eine zusätzliche Autoimmunerkrankung aufwiesen.

### **1.3. Fragestellung/ Hypothese**

Die Ätiopathogenese des PCOS scheint vielseitig zu sein; die Hoffnung nach pathognomonischen Markern aber ist noch nicht aufgegeben. Der Verdacht auf eine autoimmune Genese liegt nahe, nicht zuletzt aufgrund der assoziierten Autoimmunerkrankungen und den erhöhten aAk-Titern gegen die verschiedensten Autoantigene bei PCOS-Patientinnen. Die serologische PCOS-charakteristische Konstellation deutet auf eine Dysregulation der gonadotropen Achse hin. Kürzlich wurden aAk gegen die zweite extrazelluläre Schleife des GnRH-R von Kem et al. beschrieben (27). Stellen diese aAk den lang gesuchten krankheitsspezifischen Marker dar? Mit diesem Hintergrundwissen und der plausiblen Möglichkeit einer autoimmunen Genese, wurde von unserer Arbeitsgruppe die Hypothese aufgestellt, dass es natürliche aAk gegen den GnRH-R gibt, die zu einer Dysregulation der gonadotropen Achse führen und von diagnostischer Relevanz für das PCOS sind (29). Durch einen solchen pathognomonischen Marker könnte die Diagnostik in Zukunft deutlich vereinfacht und die Latenz bis zur endgültigen Diagnosestellung entsprechend verkürzt werden. Auch wäre es dann möglich, eine spezifische, zielgerichtete Therapie zu entwickeln. Damit würde die Lebensqualität betroffener Frauen deutlich gebessert werden.

## **2. MATERIALIEN UND METHODIK**

### **2.1. Serumproben**

Für diese Arbeit lagen insgesamt 1051 geeignete Serumproben vor. Darunter befanden sich 400 Serumproben von gesunden Kontrollprobanden (50 % weiblich, 50 % männlich, in.vent

Diagnostica GmbH, Hennigsdorf, Deutschland) und 651 PCOS-Patientinnen-Seren. Diese 651 Seren setzten sich aus drei verschiedenen Kohorten wie folgt zusammen: Die größte Kohorte bestand aus weiblichen Patientinnen aus Graz, Österreich (PCOS-A, n = 576, 78,5 % mit PCOS), die zweite Kohorte setzte sich aus jugendlichen Patientinnen aus Datteln/ Witten/ Herdecke, Deutschland (PCOS-DE, n = 40, 50,0 % mit PCOS) zusammen und die Seren der dritten, kleinsten Kohorte stammten aus Budapest, Ungarn (PCOS-HU, n = 35, 68,6 % mit PCOS). Die PCOS-Diagnosen wurden anhand der Rotterdam Kriterien gestellt. Nach entsprechender Aufklärung gaben alle Patientinnen ihre schriftliche Einwilligung, und bei den Patientinnen unter 18 Jahren stimmten ein oder beide Elternteile der Serenanalyse zu. Es fand keine weitere Selektion hinsichtlich genetischer oder Umweltfaktoren statt. Die Untersuchungen wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Deklaration von Helsinki durchgeführt, die Einwilligungserklärungen der Patientinnen oder deren Eltern wurden nach ausführlicher Aufklärung eingeholt und die Proben wurden verblindet in einem Labor abseits der Kliniken analysiert. Die Analysen wurden von den jeweiligen Ethikkommissionen der Universitäten in Graz (Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz, LKH-Universitätsklinikum, Österreich; EC18-066 ex 06-07), Datteln/Witten/Herdecke (Ethikkommission der Universität Witten/ Herdecke e.V., Witten, Deutschland; EV No. 15/2006) und Budapest (universitäre Ethikkommission, Semmelweis Universität, Budapest, Ungarn; ETT-TUKEB 42506-1/2016/EKU) genehmigt. Die Tabelle 2 fasst die Charakteristika der Kohorten zusammen.

**Tabelle 2.** Charakterisierung der drei analysierten PCOS-Kohorten

Kohorte	PCOS-A*	PCOS-DE	PCOS-HU
Stadt, Land	Graz, Österreich	Datteln, Deutschland	Budapest, Ungarn
Proben, total [n]	576	40	35
PCOS-Diagnosen [n]	452	20	24
Alter (median, IQR) [y]	26,8 (23, 30)	15,1 (14,6, 16,0)	23,0 (21,0, 29,8)
BMI (median, IQR) [kg/m <sup>2</sup> ]	26,3 (21,4, 30,5)	36,0 (31,0, 41,2)	27,8 (22,8, 38,6)

Legende: PCOS-A...PCOS-Austria, PCOS-DE...PCOS-Deutschland, PCOS-HU...PCOS-Hungary, IQR...Interquartilsabstand, \* > 99 % mit kaukasischer Ethnizität. Tabelle aus Sattler et al., 2021 (29), vorgenommene Veränderung: Übersetzung aus dem Englischen ins Deutsche

Zusätzlich wurden routinemäßig die Androgenspiegel der Patientinnen der PCOS-A-Kohorte von den Kollegen in Graz bestimmt. Es wurden das totale Testosteron mittels ELISA (ADVIA Centaur® Immunoassay, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY, USA) und per Flüssigkeitschromatographie/ Massenspektrometrie das freie Testosteron, Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEAS) und Androstendion gemessen (28).

## 2.2. Herstellung des GnRH-R-Luciferase Fusionsproteins

### 2.2.1. Klonierung

Um den quantitativen Test für GnRH-R-aAk zu entwickeln, musste in einem ersten Schritt die rekombinante Expression des humanen GnRH-R erfolgen.

Der offene Leserahmen der GnRH-R-DNA wurde von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und als cDNA-Matrize für die Klonierung verwendet. Die für die Polymerasekettenreaktion (PCR) benötigten DNA-Primer wurden von BioTeZ (Berlin, Deutschland) hergestellt. Der Vektor pIRESneo stammte von Addgene (Addgene, Teddington, UK, Katalognr. #6988-1) und der Vektor pSP-Luc+NF von Promega (Promega, Mannheim, Deutschland, Katalognr. #E4471).

Ersteres Ziel war es, ein GnRH-R-Luciferase (GnRH-R-Luc) Fusionsgen zu generieren. Dazu wurde zunächst die DNA-Sequenz der Firely Luciferase (Luc) mittels PCR amplifiziert, wofür der pSP-Luc+NF-Vektor als Matrize verwendet wurde. Durch die verwendeten Primer wurden Restriktionsstellen an den 3'- und 5'-Enden der Luc-Amplifikate eingebracht. Auf diese Weise konnten die Enden in einem anschließenden Restriktionsverdau (4h bei 37°C) mittels Restriktionsenzymen derart modifiziert werden, dass eine gerichtete Insertion des Luc-Amplifikats in den Vektor pIRESneo erfolgen konnte, der zuvor ebenfalls einem Restriktionsverdau unterzogen worden war. Auf diese Weise entstand das Plasmid pIRESneo-Luc. Ebenso wurde die cDNA-Sequenz des GnRH-R mittels entsprechender Primer via PCR amplifiziert. Anschließend wurden auch hier die 3'- und 5'-Enden mittels eines Restriktionsverdau modifiziert und die cDNA gerichtet in pIRESneo-Luc per DNA-Ligase bei Raumtemperatur (RT) einligiert. Auf diese Weise wurde die GnRH-R-cDNA-Sequenz N-terminal an die Luciferase gekoppelt, und es entstand das Expressionsplasmid pIRESneo-GnRH-R-Luc, das für das GnRH-R-Luc Fusionsprotein kodierte. Somit konnte das Luciferase-Enzym später als Reporterprotein verwendet werden.

Es folgte nun die Transformation von gekühlten kompetenten, d.h. mit Calciumchlorid vorbehandelten, DH5 $\alpha$  E. coli Bakterien mit pIRESneo-GnRH-R-Luc. Nach einer einstündigen Inkubation von pIRESneo-GnRH-R-Luc mit den E. coli Bakterien auf Eis erfolgte ein einminütiger „Hitzeschock“ bei 42°C, der zur Porenbildung in der Bakterienmembran beitrug und somit die Aufnahme der freien pIRESneo-GnRH-R-Luc-Plasmide in die Bakterien unterstützte. Die transformierten Bakterien wurden auf mit LB-Medium bedeckten Petrischalen ausplattiert. Das LB-Medium der Petrischalen war im Vorhinein mit Ampicillin versetzt worden. Aufgrund des im pIRESneo-Vektor enthaltenen Ampicillin-Resistenzgens konnte eine Selektion der erfolgreich und stabil transformierten Bakterien stattfinden, sodass lediglich diese überlebten und sich vermehrten (Inkubation bei 37°C über Nacht). Am darauffolgenden Tag wurden mehrere Klonkolonien in mit LB-Ampicillin-Medium befüllte Eppendorf-Tubes überführt und erneut bei 37°C unter leichter Schüttelung über Nacht gelagert. Eine Klonkolonie wurde ausgewählt, um damit eine DNA-Isolierung durchzuführen. Die übrigen Tubes wurden bei -4°C aufbewahrt. Im Anschluss an die Isolierung wurde der DNA-Gehalt am NanoDrop-Messgerät ermittelt (Angabe in ng/ $\mu$ l).

Die Überprüfung des korrekten Leserahmens des GnRH-R-Luc Fusionsgens erfolgte über DNA-Sequenzierung (LGC Genomics GmbH, Berlin, Deutschland). Nach der Bestätigung, dass die eingeschickte DNA den korrekten Leserahmen enthielt und somit für das GnRH-R-Luc Fusionsprotein kodierte, konnte der nächste Schritt, die Expression in Säugerzellen, eingeleitet werden.

### **2.2.2. Rekombinante Expression in Säugerzellen**

Für die rekombinante Expression des GnRH-R-Luc Fusionsproteins wurden HEK-293-Zellen gewählt. Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte in DMEM, welches mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/ Streptomycin (DMEM<sup>++</sup>) versetzt war. Die Transfektion dieser HEK-293-Zellen mit pIRESneo-GnRH-R-Luc erfolgte mit FuGENE6 (Promega, Katalognr. #E2691). 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in einer 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Die Selektion stabil transfizierter Zellen erfolgte über G418 (0,8 mg/ml, Sigma-Aldrich, Katalognr. #A1720), denn der pIRESneo-Vektor kodiert neben der Ampicillin- auch für eine Neomycin-Resistenz. Es bildeten sich Kolonien stabiler Zellklone. Diese wurden gepickt, in separate Wells überführt und dadurch als Einzelklone weitergeführt. Sobald ein konfluentes Wachstum erreicht wurde, wurden Cryostocks in Gefriermedium (50 % FBS, 40 % DMEM<sup>++</sup>, 10 % DMSO) angelegt und

bei -80°C bis zum Gebrauch aufbewahrt. Um die Luciferase-Aktivität der verschiedenen Zellklone zu vergleichen, wurden Aliquots der Zellen lysiert und deren Luciferase-Aktivität gemessen. Der Zellklon, der die höchste Luciferase-Aktivität zeigte, die abhängig von der Stelle der Integration des Vektors in das Genom der HEK-293-Zelle war, wurde in DMEM<sup>++</sup>-G418-Medium angezüchtet, bis sich ein konfluierendes Wachstum in 100 mm-Zellkulturschalen zeigte.

Die beschriebenen Schritte der Klonierung und Transfektion wurden von Dr. Waldemar Minich vorgenommen. Das Anzüchten der transfizierten HEK-293-Zellen und die folgenden Schritte, genannt unter Punkt 2.3. – 2.5.2., wurden von mir, Lisa-Marie Sattler, in enger Zusammenarbeit mit Hanna A. Schniewind und Dr. Minich durchgeführt.

### **2.3. Herstellung des Fusionsprotein-enthaltenden Zellextraktes**

Dieser Schritt führte zur Gewinnung des GnRH-R-Luc Fusionsproteins, das von den HEK-293-Zellen exprimiert wurde. Zuerst wurde das Nährmedium aus den 100 mm-Zellkulturschalen fast vollständig abgesogen. Mit Hilfe eines Spatels wurden die Zellen vorsichtig vom Boden gelöst, abpipettiert, in ein Glasröhrchen überführt, für 10 Minuten bei 4°C und 3500 rpm (2000 g) zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau, Deutschland) und auf Eis gestellt. Der Überstand wurde abgesogen und das Zellpellet in einem Puffer (50 mM Tris HCl (pH 7,4), 100 mM NaCl, 10 % Glycerol) resuspendiert. Anschließend wurde 20%iges Triton X-100 hinzugegeben, was zur Lyse der Zellen führte, und es folgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Danach wurde nochmals zentrifugiert (10 Minuten, 4°C, 3500 rpm, 2000g), der Überstand auf Eppendorf-Tubes aufgeteilt und die Tubes bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Zusätzlich erfolgte ein Luciferase-Aktivitätstest, indem 100 µl Luciferase-Substratpuffer (D-Luciferin, ATP, GTP) mit 5 µl des gewonnenen Überstandes versetzt wurden und eine Kontrollmessung im Ketten-Luminometer erfolgte. Werte von > 100.000 relative light units (RLU) erfüllten das Kriterium für eine ausreichend gute Luciferase-Aktivität.

### **2.4. Durchführung des Immunopräzipitationsassays**

Der Immunopräzipitationsassay selbst erstreckte sich über zwei aufeinanderfolgende Tage. Das gewonnene GnRH-R-Luc Fusionsprotein-haltige Zellextrakt wurde zunächst mit einem Puffer (50 mM Tris (pH 7,5), 100mM NaCl, 10 % Glycerol, 5 % Milchpulver, 5 % Glukose, 1 % Triton X-100, 0,01 % Natriumazid) 10-fach verdünnt. In jedes Well einer vorgekühlten 96-Well-Platte wurden 40 µl dieses GnRH-R-Luc-Fusionsprotein-Zellextrakt-Puffer-Gemisches pipettiert. Im Anschluss wurden 10 µl vorverdünntes Serum (Verdünnung 1:1, d.h. 100 µl Serum mit 100 µl Vorverdünnungspuffer bestehend aus 50 % Glycerol, 100 mM NaCl und 50 mM Tris HCl (pH 7,4)) hinzugefügt, die Platten abgedeckt und über Nacht im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden je Well 40 µl Protein A-Sepharose Suspension (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Katalognr. #GE17096303) hinzugegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert. Protein A konnte an die Fc-Region von Immunglobulinen binden und führte damit zur Aggregation der potentiell gebildeten GnRH-R-Luc-aAk-Komplexe. Anschließend folgten abwechselnd das Waschen und Zentrifugieren, was unter gekühlten Bedingungen erfolgte: 200 µl des Waschpuffers (50 mM Tris HCl (pH 7,4), 100 mM NaCl, 10 % Glycerol, 0,5 % Triton X-100) wurden in jedes Well der 96-Well-Platte pipettiert, kurz geschüttelt, zentrifugiert (2 Minuten, 2000 rpm, 4°C) und der Überstand abgesogen. Dieser Vorgang wurde insgesamt sechs Mal durchgeführt. Nach dem sechsten Mal Absaugen wurden 100 µl eines gekühlten Überführungspuffers (Substratpuffer -/-, 0,5 % Triton X-100) in jedes Well gegeben, das Pellet darin resuspendiert und der Inhalt eines jeden Wells in jeweils ein

gekühltes 5 ml-Glasröhrchen überführt. Die Glasröhrchen wurden in das Kettenluminometer (Berthold, Bad Wildbad, Deutschland) gestellt. Mit Hilfe dessen erfolgte die Messung: automatisiert wurden in jedes Röhrchen 200 µl des Luciferase-Substratpuffers (77 mg ATP, 116 mg GTP, 100 ml Luciferase-Substratpuffer -/-, 1,5 ml D-Luciferin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland, Produktnr. #L9504)) injiziert und das entstandene Lichtsignal für fünf Sekunden gemessen. Die Messergebnisse wurden in relative light units (RLU) angezeigt.

## 2.5. Bestätigungsmessungen

### 2.5.1. GnRH-R-Ak-Verdünnungsreihe

Zur Standardisierung und Kontrolle des Immunopräzipitationsassays wurde dieser zusätzlich mit einem kommerziellen aus Kaninchen gewonnenen Antiserum durchgeführt, welches polyklonale gegen den humanen GnRH-R gerichtete Ak (kanGnRH-R-Ak, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland, Katalognr. #PA5-33597, IgG, c = 1 mg/ml) enthielt. Die ersten 16 Wells einer vorgekühlten 96-Well-Platte wurden mit BSA-Puffer befüllt: in das erste Well der Verdünnungsreihe wurden 15 µl BSA pipettiert und in die folgenden 15 Wells jeweils nur 10 µl BSA. Nun wurden in das erste Well 5 µl des kanGnRH-R-Ak gegeben und gut vermischt. 10 µl aus diesem ersten Well wurden abgenommen, in das zweite übertragen und wieder gut vermischt. Auf diese Weise wurde fortgefahren bis zum 14. Well. Die übrigen 10 µl aus dem 14. Well wurden verworfen. Zur Leermessung befanden sich in Well 15 und 16 lediglich 10 µl BSA. In alle Wells wurden dann je 40 µl des 10-fach verdünnten GnRH-R-Luc-Fusionsprotein-haltigen Zellextraktes hinzugefügt. Der weitere Ablauf des Immunopräzipitationsassays glich dem oben beschriebenen Ablauf. Auf diese Weise entstand eine Ak-Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen (in µg/ml): 50,0 – 25,0 – 12,5 – 6,25 – 3,125 – 1,563 – 0,781 – 0,391 – 0,195 – 0,098 – 0,049 – 0,024 – 0,012 – 0,006 – 0,000 – 0,000.

### 2.5.2. Analysen durch Mix-Seren

Um Matrix-Effekte auszuschließen, wurde der Immunopräzipitationsassay zusätzlich mit vermischten Seren („Mix-Seren“) durchgeführt. Für die Mix-Seren wurden jeweils eine GnRH-R-aAk-positive Serum-Probe und eine GnRH-R-aAk-negative Serum-Probe im Verhältnis 1:1 vermischt. Pipettiert wurde, wie in Tabelle 3 dargestellt:

**Tabelle 3.** Pipettierschema der Mix-Seren-Analysen

1. Well: Negativprobe	2. Well: Positivprobe	3. Well: Seren-Mix
40 µl GnRH-R-Luc Zellextrakt (10fach verdünnt)	40 µl GnRH-R-Luc Zellextrakt (10fach verdünnt)	40 µl GnRH-R-Luc Zellextrakt (10fach verdünnt)
+	+	+
10 µl vorverdünntes Serum einer GnRH-R-aAk-negativen Probe	10 µl vorverdünntes Serum einer GnRH-R-aAk-positiven Probe	5 µl der Positivprobe + 5 µl der Negativprobe

(eigene Darstellung)

Der weitere Ablauf des Assays erfolgte wie unter Punkt 2.4. beschrieben.

## 2.6. Statistische Analysen

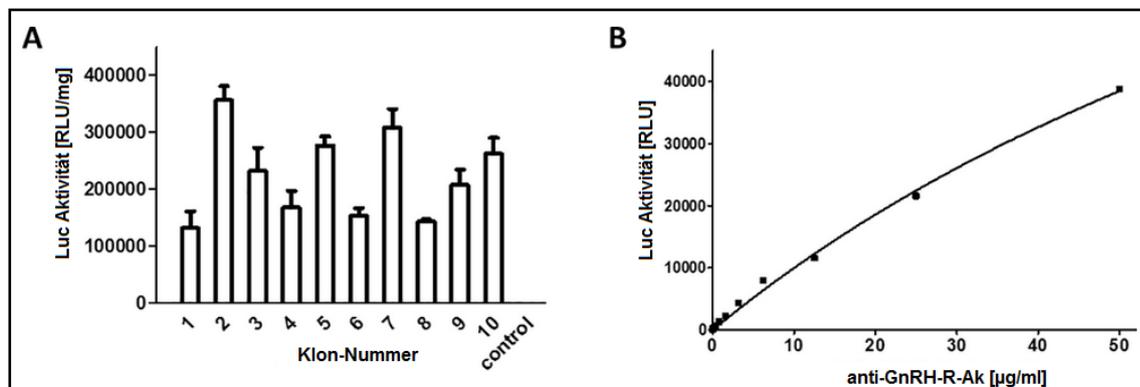
Unter Zuhilfenahme von GraphPad Prism v.7.0 (Version 7.0, GraphPad Software Inc., San Diego, USA) oder SPSS (Version 25, SAS Institute, Cary, NC, USA) wurden die statistischen Analysen durchgeführt. Der Shapiro-Wilk-Test wurde verwendet zur Ermittlung der

Normalverteilung. Zum Vergleich quantitativer Variablen wurde der ungepaarte t-Test (Normalverteilung) herangezogen. Alternativ wurden die Daten mittels des zweiseitigen nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Tests verglichen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) oder als Median mit Interquartilsabstand (IQR) angegeben. Statistische Signifikanz wurde festgesetzt bei \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  oder \*\*\* $P < 0,001$ . Die Diagramme der Abbildungen 2B, 4 und 5 wurden mittels GraphPad Prism von Hanna Schniewind und mir erstellt und von Prof. Dr. Lutz Schomburg auf ihre Richtigkeit überprüft. Die Durchführung der statistischen Analysen wurde von Prof. Dr. Schomburg übernommen.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Testung der Expression des GnRH-R-Luciferase Fusionsproteins

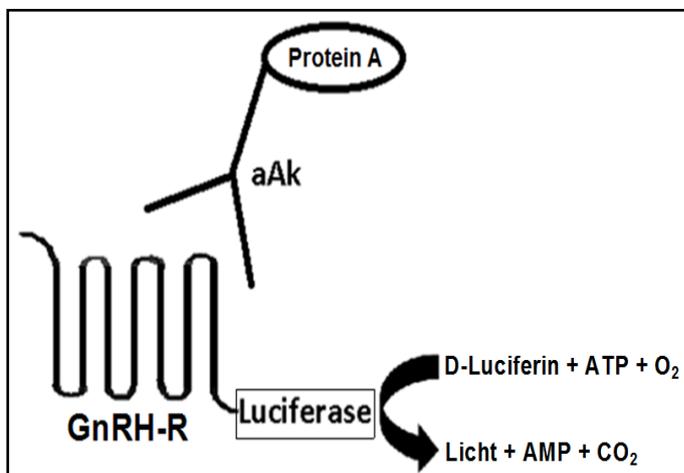
Humane HEK-293-Zellen wurden mit den pIRESneo-GnRH-R-Luc-Plasmiden transfiziert und stabile Zellkone wurden über die Selektion mit G418 (0,8 mg/ml) etabliert. Für den Testaufbau wurden dann Klone mit hoher GnRH-R-Luc-Expression ausgewählt (Abb. 2A). Zur Standardisierung und Überprüfung der Funktionalität wurde der Assay zuerst mit dem kommerziellen polyklonalen kanGnRH-R-Ak durchgeführt (Abb. 2B). Abbildung 2B zeigt ein kanGnRH-R-Ak-konzentrationsabhängiges Messergebnis: Je höher die Konzentration des kommerziellen polyklonalen kanGnRH-R-Ak, umso mehr Immunkomplexbildung mit dem GnRH-R-Luc Fusionsprotein, umso höhere Luciferase-Aktivität (Luciferase-Signal in relative light units, RLU) (29). Es zeigte sich keine, das Hintergrund-Signal übersteigende, Luciferase-Aktivität bei der Testung des kanGnRH-R-Ak mit Zellextrakt nicht-transfizierter HEK-293-Zellen. Die Sensitivität und Spezifität des kanGnRH-R-Ak konnten somit bestätigt werden.



**Abbildung 2. Aufbau und Überprüfung des GnRH-R-aAk-Assays.** A) Vergleich verschiedener HEK-293-Zellklon-Kulturen bezüglich ihrer Luciferase-Aktivität: Zehn erfolgreich transfizierte, mittels G418 selektionierte Zellklon-Kulturen, die das GnRH-R-Luc Fusionsprotein exprimierten, wurden lysiert und auf ihre Luciferase-Aktivität hin untersucht. Die Höhe der Luciferase-Aktivität steigt proportional mit der Menge der Expression des gewünschten Fusionsproteins. B) Durchführung des Immuno-präzipitationsassays mit einem kommerziellen kanGnRH-R-Ak: Ein aus Kaninchen gewonnenes Antiserum gegen den humanen GnRH-R (anti-GnRH-R-Ak) wurde käuflich erworben und in einer Verdünnungsreihe mit dem Immuno-präzipitationsassay getestet. Es zeigte sich ein proportional zu der kanGnRH-R-Ak-Konzentration abhängiger Anstieg der Luciferase-Aktivität. Die Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Kontroll-Messungen mit BSA-Pufferlösung und ohne anti-GnRH-R-Ak zeigten typische Lumineszenz-Signale  $< 100$  RLU. Abbildung aus Sattler et al., 2021 (29), vorgenommene Veränderung: Übersetzung der Achsen-Beschriftung aus dem Englischen ins Deutsche.

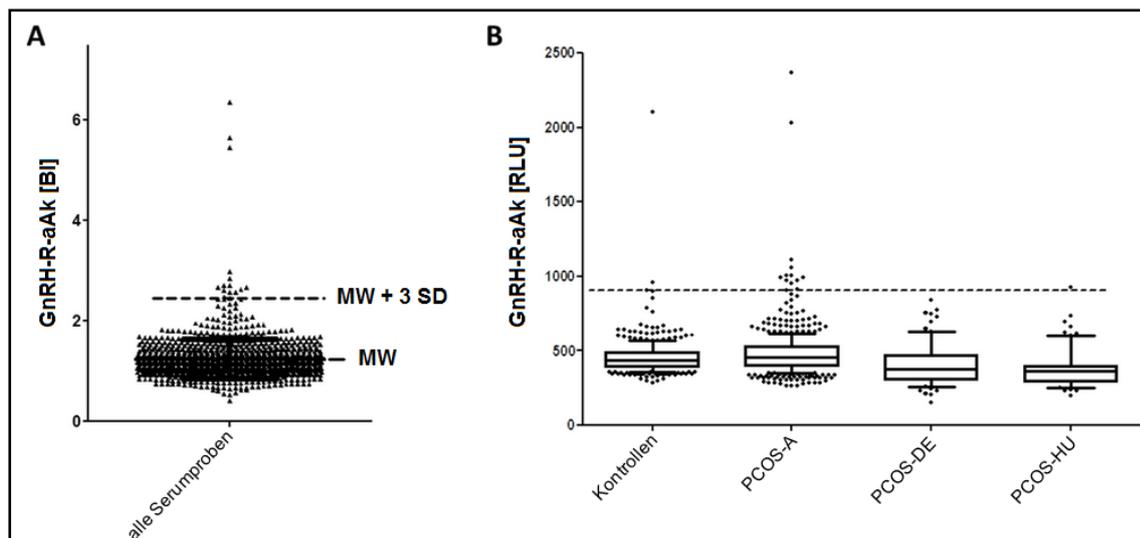
### 3.2. Prävalenz von natürlichen GnRH-R-Autoantikörpern

Der Immunopräzipitationsassay wurde mit jeder der 1051 Serumproben, wie unter Punkt 2.4. beschrieben, durchgeführt (Abb. 4). Durch die Inkubation des GnRH-R-Luc Fusionsprotein-haltigen Zellextraktes mit den Seren bei 4°C über Nacht konnten eventuell vorhandene aAk der Seren an die GnRH-R-Luc Fusionsproteine binden und Immunkomplexe bilden (Abb. 3). Durch die Zugabe von Protein A-Sepharose Suspension am darauffolgenden Tag, welche an die Fc-Region von Ak bindet, wurden die entstandenen Antigen-aAk-Komplexe fixiert und durch das anschließende Waschen und Zentrifugieren vom restlichen Serum isoliert. Weil Protein A-Sepharose unspezifisch an die Fc-Region sämtlicher vorhandener Ak bindet, war die Luciferase als Reporter nötig. Durch die Zugabe des Luciferase-Substrates im Kettenluminometer kam es zur Biolumineszenz, d.h. es wurde Licht erzeugt, welches von dem Kettenluminometer detektiert und in RLU angegeben wurde. Somit war die Menge des gemessenen Lichtsignals bzw. der gemessenen Luciferase-Aktivität proportional zur Menge der vorhandenen GnRH-R-aAk im jeweiligen Serum.



**Abbildung 3. Schematische Darstellung des Immunkomplexes und der Luciferase-Reaktion.** Gezeigt wird der GnRH-R, der gentechnisch an das Luciferase-Enzym gekoppelt wurde, die als Reporter fungierte. Vermutete aAk der Serumproben konnten an den Rezeptor binden. Hinzugefügtes Protein A-Sepharose Suspension sorgte für die Bindung des Protein A an die Fc-Region der aAk und führte zur Präzipitation der Immunkomplexe. Die Luciferase führte zur Biolumineszenz nach Zugabe des Luciferase-Substrates. Das Lichtsignal wurde im Kettenluminometer gemessen. (eigene Darstellung)

Wie in Abbildung 4 sichtbar, konzentrierte sich die Mehrheit der Messwerte auf einen Bereich zwischen 250 und 750 RLU (29). Der Shapiro-Wilk-Test zeigte, dass die Messwerte nicht normalverteilt waren ( $W = 0,7133$ ,  $P < 0,0001$ ). Als Kriterium für GnRH-R-aAk-Positivität eines Serums wurde das Überschreiten eines wie folgt kalkulierten Schwellenwertes festgelegt: Alle erhaltenen Messwerte wurden der Größe nach geordnet und aus den unteren 50 % der Mittelwert errechnet. Dieser Mittelwert plus drei Standardabweichungen ( $MW + 3 SD$ ) wurde als Schwellenwert zur Positivität definiert (29). Durch Bildung des jeweiligen Quotienten aus Messwert und dem zuvor errechneten Mittelwert, erhielt man den sogenannten Binding Index (BI). Dieser spiegelte somit den Faktor wider, um den der Messwert größer als der Mittelwert war.



**Abbildung 4. Prävalenz von natürlichen GnRH-R-aAk.** A) 1051 Seren wurden mit Hilfe des Immunopräzipitationsassays durch Messung der Luciferase-Aktivität auf das Vorhandensein von natürlichen GnRH-R-aAk untersucht. Der Schwellenwert zur GnRH-R-aAk-Positivität wurde definiert als der Mittelwert (MW), der aus den unteren 50 % aller Messwerte gebildet wurde, plus drei Standardabweichungen (MW + 3 SD). Der Binding Index (BI) entsprach dem Faktor, um den der jeweilige Messwert größer als der errechnete Mittelwert war. Insgesamt wurden 15 GnRH-R-aAk-positive Proben unter den 1051 Serumproben detektiert, von denen 12 ein schwaches und drei ein starkes GnRH-R-aAk-positives Signal aufwiesen. B) Die analysierten Seren zeigten innerhalb der Kohorten keine Normalverteilung hinsichtlich des Vorhandenseins von GnRH-R-aAk (Shapiro-Wilk-Test,  $W = 0,7133$ ,  $P < 0,0001$ ). Unter den gesunden Kontrollseren befand sich eine deutlich GnRH-R-aAk-positive Serumprobe (1/400; 0,25 %) und unter den PCOS-Patientinnenproben waren zwei hoch GnRH-R-aAk-positive Seren (2/651; 0,31 %), die innerhalb der PCOS-A-Kohorte detektiert wurden. Damit ist die Prävalenz natürlicher GnRH-R-aAk unter den Kontrollen und PCOS-Patientinnen nahezu identisch. Abbildung aus Sattler et al., 2021 (29), vorgenommene Veränderung: Übersetzung der Achsen-Beschriftung aus dem Englischen ins Deutsche.

Durch die Festlegung dieses Schwellenwertes ergaben sich insgesamt 15 GnRH-R-aAk-positive Serumproben (15/1051), einer Prävalenz von 1,4 % entsprechend (Abb. 4A). Anhand der Abbildung 4A ist gut erkennbar, dass 12 der 15 aAk-positiven Proben unmittelbar über dem Schwellenwert lagen (BI = 2,4) und lediglich drei der 15 Serumproben ein stark aAk-positives Signal mit BI von 5,46, 5,65 und 6,36 zeigten (29). Alle Messwerte waren reproduzierbar. Die GnRH-R-Spezifität der drei hoch GnRH-R-aAk-positiven Serumproben wurde bestätigt, indem der Assay auf genau demselben Wege durchgeführt wurde, allerdings wurde Zellextrakte von HEK-293-Zellen verwendet, die nicht mit pIRESneo-GnRH-R-Luc-Vektoren transfiziert worden waren, sondern nur mit pIRESneo-Luc-Vektoren, weshalb das Zellextrakt lediglich das Luciferase-Enzym enthielt. Die daraufhin ermittelten Messwerte entsprachen lediglich den üblichen Hintergrund-Signalen. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die GnRH-R-aAk gegen das Luciferase-Enzym als Antigen gerichtet waren.

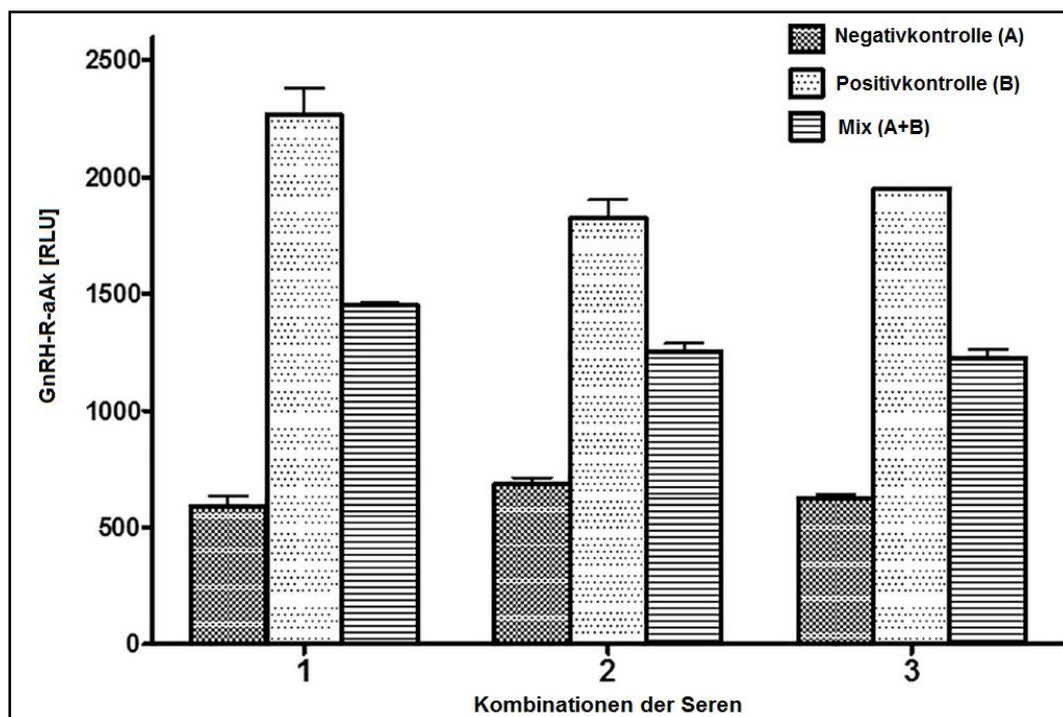
Die Abbildung 4B spiegelt die Prävalenz von GnRH-R-aAk innerhalb der einzelnen Kohorten wider. Unter den gesunden Kontrollseren befanden sich zwei GnRH-R-aAk-positive Proben ( $n = 2$ , eine leicht und eine stark GnRH-R-aAk-positive Probe). Innerhalb der großen Graz-Kohorte (PCOS-A) konnten 12 GnRH-R-aAk-positive Seren detektiert werden, darunter zwei Serumproben mit einem deutlich positiven Messsignal, und unter den Patientinnenserum aus Ungarn befand sich eine schwach aAk-positive Probe. Keine GnRH-R-aAk-positiven Proben befanden sich unter den Proben der jugendlichen PCOS-Patientinnen aus Deutschland. Durch ausschließliche Betrachtung der stark positiven Signale, ergaben sich folgende Prävalenzen: Unter den gesunden Kontrollseren gab es eine stark GnRH-R-aAk-positive Probe, wodurch sich

eine Prävalenz von 0,25 % (1/400) ergab. Unter den PCOS-Patientinnenserumproben konnten zwei deutlich GnRH-R-aAk-positive Serumproben ermittelt werden (2/651), was einer Prävalenz von  $\approx 0,31$  % entsprach. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl unter den gesunden Kontrollproben als auch innerhalb der PCOS-Proben GnRH-R-aAk detektierbar sind, die Prävalenzen jedoch sehr ähnlich und insgesamt verschwindend gering sind, weshalb von keiner diagnostischen Relevanz für das PCOS auszugehen ist (29).

### 3.3. Stabilität von GnRH-R-Autoantikörpern

Die Präsenz von GnRH-R-aAk in den als aAk-positiv ermittelten Seren schien nicht durch Lagerung der Seren bei 4°C beeinträchtigt zu werden. Kontrollmessungen bestätigten die schwache aAk-Positivität der 12 Serumproben und die hohe aAk-Positivität der drei Serumproben (eine unter den Kontrollseren und zwei in der PCOS-A-Kohorte; Seriennummer #175 und #225).

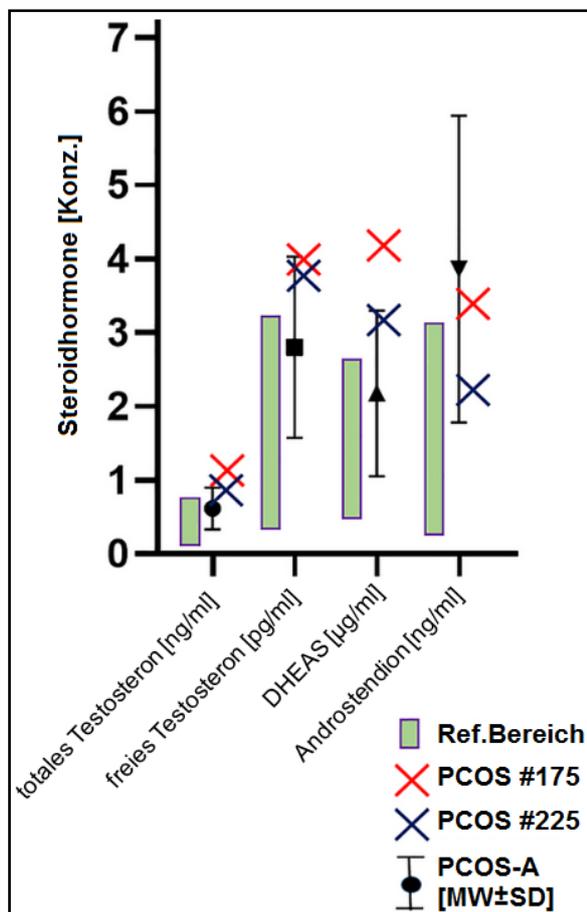
Um Einflüsse durch Matrixeffekte auszuschließen und weiter die Stabilität der GnRH-R-aAk zu überprüfen, wurden Analysen mit Mix-Seren, wie unter Punkt 2.6.2. beschrieben, durchgeführt. Für diese Mix-Seren-Analysen wurden die drei hoch GnRH-R-aAk-positiven Serumproben verwendet. Als Negativkontrolle dienten drei aAk-negative Kontrollseren. Die Messwerte aller drei Mix-Seren stimmten mit den theoretischen, errechneten arithmetischen Mitteln überein (Abb. 5). Auf diese Weise wurden die Reproduzierbarkeit des Immunpräzipitationsassays abermals bestätigt und Matrixeffekte ausgeschlossen (29).



**Abbildung 5. Mix-Seren-Analysen.** Dargestellt sind drei Durchführungen des Immunpräzipitationsassays in Form von Mix-Seren. Die jeweils erste Säule (A) spiegelt den Messwert der Negativkontrolle wider, die jeweils zweite Säule (B) den Messwert der Positivkontrolle. Als Positivkontrollen wurden die drei hoch GnRH-R-aAk-positiven Serumproben gewählt. Die dritte Säule (A+B) zeigt den Messwert, nachdem A und B in einem Verhältnis von 1:1 vermischt wurden. Dieser stimmte mit dem theoretischen arithmetischen Mittel überein. Somit konnten Matrixeffekte ausgeschlossen und die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse bestätigt werden. Die Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Abbildung aus Sattler et al., 2021 (29), vorgenommene Veränderung: Übersetzung der Achsen-Beschriftung aus dem Englischen ins Deutsche.

### 3.4. Androgenspiegel bei GnRH-R-aAk-positiven Seren

Zwar zeigte sich, dass die Prävalenz von GnRH-R-aAk unter den PCOS-Patientinnen zu gering ist, um von diagnostischer Relevanz zu sein, aber dennoch konnten 15 GnRH-R-aAk-positive PCOS-Serumproben identifiziert werden. Somit stellte sich die Frage, inwieweit diese aAk mit den Androgenspiegeln korrelieren. Folgende Steroidhormone wurden von den Grazer Kooperationspartnern bestimmt: das totale Testosteron, das freie Testosteron, DHEAS und Androstendion (Abb. 6). Dargestellt sind die Referenzwerte gesunder Frauen, die erhobenen Werte der PCOS-A-Kohorte und hervorgehoben wurden die jeweiligen Hormonspiegel der beiden aus der PCOS-A-Kohorte stammenden aAk-positiven PCOS-Patientinnen (#175 und #225), die die höchsten GnRH-R-aAk-Spiegel aufwiesen. Bei diesen beiden GnRH-R-aAk-positiven PCOS-Seren zeigte sich im direkten Vergleich mit den Referenzwerten gesunder Frauen eine deutliche Hyperandrogenämie. Die aAk-positive PCOS-Probe Nummer 175, die die höchsten GnRH-R-aAk-Werte aufwies, zeigte die höchsten Spiegel an totalem Testosteron und DHEAS (29).



**Abbildung 6. Vergleich der Androgenspiegel der zwei GnRH-R-aAk-positiven PCOS-Proben mit gesunden Kontrollen und anderen PCOS-Patientinnen.** Unter den Graz-PCOS-Patientinnen (PCOS-A) wurden zwei hoch GnRH-R-aAk-positive Serumproben detektiert (PCOS #175, rotes Kreuz; PCOS #225, blaues Kreuz). Diese beiden aAk-positiven Proben zeigten deutlich erhöhte Androgenspiegel im Vergleich zu den Referenzwerten gesunder Frauen (Ref.Bereich, grüne Säule). Darüber hinaus ist der Bereich der Androgenspiegel der PCOS-A-Seren markiert (schwarze Fehlerbalken mit Markierung des Mittelwertes  $\pm$  SD). Unter diesen zeigten sich vor allem die Androstendionspiegel erhöht. Abbildung aus Sattler et al., 2021 (29), vorgenommene Veränderung: Übersetzung der Achsen-Beschriftung aus dem Englischen ins Deutsche.

## 4. DISKUSSION

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist die Ätiopathogenese des Krankheitsbildes PCOS nicht abschließend geklärt. Diverse Faktoren wie genetische Prädisposition, sozioökonomische Faktoren, Ethnizität, Lifestyle, Inflammation und Autoimmunität scheinen Einfluss zu nehmen. Aber worin liegt der entscheidende Auslöser? Eine autoimmune Genese des PCOS ist naheliegend aufgrund der erhöhten Prävalenzen verschiedenster aAk in Seren von PCOS-

Patientinnen und des häufigen Einhergehens mit anderen Autoimmunerkrankungen (12, 24, 30). Daraufhin wurde in dieser Arbeit der Fragestellung nachgegangen, ob natürliche aAk gegen den GnRH-R in Seren von PCOS-Patientinnen in signifikant höherer Prävalenz als in der Normalbevölkerung vorkommen, und damit von prädiktiver und vor allem diagnostischer Relevanz sind. Dazu wurde ein Immunopräzipitationsassay generiert, welcher als Antigen ein GnRH-R-Luc Fusionsprotein nutzte. Zur Gewinnung dieses Fusionsproteins wurden HEK-293-Zellen mit pIRESneo-GnRH-R-Luc transfiziert, die daraufhin den gesamten humanen GnRH-R in seiner vollen Länge exprimierten, wodurch alle extrazellulären Domänen für potentielle aAk zugänglich waren. Die Auswertung unserer Ergebnisse konnte unsere Hypothese allerdings nicht untermauern (29). Unter den gesamten 1051 Serumproben konnten lediglich 15 GnRH-R-aAk-positive PCOS-Seren identifiziert werden, einer Prävalenz von 1,4 % (15/1051) entsprechend. Und nur drei dieser 15 GnRH-R-aAk-positiven Seren lagen in einem entsprechend hohen Titerbereich, der potentiell als pathogenetisch relevant angesehen werden könnte (3/1051; 0,3 %). Die Prävalenz von hoch GnRH-R-aAk-positiven Seren unter den PCOS-Patientinnen war mit 0,31 % (2/651) nahezu identisch mit der Prävalenz von hoch GnRH-R-aAk-positiven Seren unter den gesunden Kontrollen (1/400, 0,25 %). Bei der Betrachtung der Androgenspiegel zeigten die zwei stärksten GnRH-R-aAk-positiven PCOS-Seren deutlich erhöhte Androgenspiegel im Vergleich mit den Werten anderer PCOS-Patientinnen und im Vergleich mit den Referenzwerten gesunder Kontrollen.

Aufgrund der detektierten niedrigen Prävalenz von GnRH-R-aAk-positiven Seren innerhalb der PCOS-Kohorten negieren wir unsere eingangs aufgestellte Hypothese: aAk gegen den GnRH-R sind von keiner generellen diagnostischen Relevanz bei europäischen PCOS-Patientinnen (29). Nichtsdestotrotz konnten wir einen spezifischen Immunopräzipitationsassay generieren, welcher zuverlässig und reproduzierbar GnRH-R-aAk nachweist. Ebenfalls bekräftigen die Ergebnisse die Existenz von natürlich vorkommenden GnRH-R-aAk und schließen somit eine Autoimmunität durch GnRH-R-aAk nicht endgültig aus. Allerdings sind diese aAk selten und im Rahmen der PCOS-Diagnostik, unseren Ergebnissen zufolge, zu vernachlässigen (29). Ferner konnte ein „Standard-Antiserum“ identifiziert werden, welches den humanen GnRH-R sensitiv detektiert und für weitere Analysen und Vergleichsmessungen durch andere Forschungsgruppen verwendet werden könnte. Des Weiteren konnte dargestellt werden, dass sich Protein A zur Immunopräzipitation verschiedener IgG-Ak-Spezies eignet, denn es erkannte die Fc-Region unseres verwendeten polyklonalen kanGnRH-R-Ak ebenso wie die humanen aAk (29). Die Funktionalität dieses Assayaufbaus wurde bereits unter Beweis gestellt, indem mittels derselben Techniken ein IGF1-Rezeptor-Luciferase Fusionsprotein hergestellt wurde. In einem Immunopräzipitationsassay, unter Nutzung dieses Fusionsproteins als Antigen, wurden Seren von Patienten untersucht, die unter einer endokrinen Orbitopathie bei Morbus Basedow litten. 10 % (60/584) der untersuchten Patientenserum waren IGF1-Rezeptor-aAk-positiv (31).

Die mittels unseres GnRH-R-aAk-Immunopräzipitationsassays ermittelte niedrige Prävalenz von GnRH-R-aAk hat die Frage aufgeworfen, inwieweit Autoimmunität gegen den humanen GnRH-R überhaupt eine Rolle für verschiedene Krankheitsbilder spielt. Die aktuelle Datenlage zu natürlich vorkommenden GnRH-R-aAk ist dünn. 2014 untersuchten Mandl et al. 25 Patientinnen mit primärem Sjögren Syndrom und 169 Kontrollen mittels eines ELISAs auf GnRH-R-aAk (32). Als Antigen diente das N-terminale, an Ovalbumin gebundene Peptid des GnRH-R. 5 Patienten (20 %) waren positiv für IgM-GnRH-R-aAk und ein Patient (4 %) zeigte IgG-GnRH-R-aAk. Unter den Kontrollen fanden sich in beiden Immunglobulin-Klassen jeweils nur bei 2,4 % GnRH-R-aAk. Die gleiche Arbeitsgruppe unter Hammar et al. untersuchte, ob die Verwendung von Buserelin, einem GnRH-Analogen, zur in-vitro-Fertilisation (IVF) die

Entstehung von GnRH-R-aAk fördern würde (33). Der ELISA-Aufbau war derselbe, d.h. es wurde abermals lediglich das N-terminale Peptid des GnRH-R verwendet zur Detektion von GnRH-R-aAk. 96 Patientinnen, bei denen die Ursache der Infertilität unklar war, wurden sowohl vor als auch nach der Anwendung von Buserelin auf IgM-GnRH-R-aAk untersucht. Unter den 169 Kontrollen zeigten 4 (2,4 %) Frauen IgM-GnRH-R-aAk, wohingegen bei den Patientinnen 13 (13,5 %) vor und 10 (10,4 %) nach der IVF IgM-GnRH-R-aAk aufwiesen. Durch die IVF wurde also kein Anstieg an GnRH-R-aAk provoziert. Diese Arbeit zeigte somit, dass GnRH-R-aAk bei infertilen Frauen gefunden werden können, deren Rolle in Bezug auf die Entstehung von Infertilität blieb allerdings auch hier unklar.

Eine mögliche Ursache für die niedrige Prävalenz von GnRH-R-aAk, insbesondere, wenn der ganze Rezeptor als Autoantigen verwendet wird, könnte in der Struktur des GnRH-R begründet sein. Der GnRH-R gehört zur Familie der GPCR, deren extrazellulärer Anteil charakteristischerweise aus einem N-Terminus und drei extrazellulären Schleifen besteht. Allerdings ist der extrazellulär liegende Anteil des GnRH-R besonders klein, denn die N-terminale Region besitzt gerade einmal 35 Aminosäuren (34). Dem gegenüber steht beispielsweise der TSH-R, ebenfalls aus der Gruppe der GPCR, der eine verhältnismäßig große extrazelluläre Domäne besitzt und gegen den viele aAk bekannt sind, die beispielsweise die Signalwirkung des TSH imitieren und zu Morbus Basedow und schließlich Hyperthyreose führen (35). Es zeigte sich bereits, dass der komplette und korrekt exprimierte Rezeptor von großer Relevanz ist, um zuverlässig TSH-R-aAk detektieren zu können (36, 37). Das veranlasste uns, einen Assay zu generieren, in dem der komplette GnRH-R in seiner vollen Länge als Antigen zur Verfügung gestellt wird, damit sowohl aAk, die gegen lineare als auch aAk, die gegen dreidimensionale Epitope gerichtet sind, als auch aAk, die Seitenketten des GnRH-R erkennen, detektiert werden können (29, 37). Die unterschiedliche Detektierbarkeit von aAk je nach Länge bzw. Region des verwendeten Peptides, das als Antigen verwendet wird, wird durch den Vergleich mit folgender Arbeit sichtbar: Kürzlich publizierte die Arbeitsgruppe Kem et al. das Vorhandensein von GnRH-R-aAk, die gegen die zweite extrazelluläre Schleife des GnRH-R gerichtet sind und laut deren Ergebnissen von diagnostischer Relevanz für das PCOS seien (27). Es wurden die Seren von 40 PCOS-Patientinnen, 40 infertilen Frauen und 14 gesunden Kontrollen mittels eines darauf aufgebauten ELISAs untersucht. Als Antigen wurde ein 28 Aminosäuren langes Peptid verwendet, das der Aminosäuresequenz der zweiten extrazellulären Schleife (ECL2) des GnRH-R entsprach. Als markierender Ak wurde ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter IgG-Ak (goat antihuman IgG) verwendet. Zur Detektion der Ak wurde das Substrat Paranitrophenyl-Phosphat verwendet. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 405 nm nach 10 Minuten. Der mittlere ELISA-Wert der PCOS-Patientinnen war signifikant höher als der der jeweiligen Kontrollgruppen, wodurch auf das Vorhandensein von GnRH-R-aAk geschlossen und deren diagnostische Relevanz postuliert wurde. Weiter untersuchte diese Arbeitsgruppe mit GnRH-R-ECL2-Peptiden immunisierte Ratten, die nach Immunisierung aktivierende aAk gegen die ECL2 des GnRH-R ausbildeten, die mittels ELISA detektiert wurden (38). Darüberhinaus wurde eine Epitopkartierung der ECL2 durchgeführt, wodurch ein dominantes Epitop in der Mitte des GnRH-R-ECL2-Peptides identifiziert wurde. Die immunisierten Ratten wiesen im Vergleich zu den Kontrollratten eine höhere LH-Sekretionsfrequenz, eine insgesamt höhere LH-Konzentration, höhere Testosteronspiegel und höhere Spiegel proinflammatorischer Zytokine auf; erhöhte Blutglukosewerte deuteten auf eine gestörte Glukosetoleranz (22, 27, 38). Die Zykluslänge der immunisierten Ratten verlängerte sich, in den Ovarien zeigte sich eine vergleichsweise höhere Anzahl atretischer Follikel und eine geringere Anzahl an Corpora lutea als auch eine dickere Theca-Zellschicht. Die Arbeitsgruppe schlussfolgerte, dass aktivierende

aAk gegen die ECL2 des GnRH-R zu PCOS-typischen Veränderungen in den getesteten Ratten führten und von pathogenetischer Relevanz seien.

Diese Aussage deckt sich nicht mit den Ergebnissen unserer Analysen und macht den Unterschied zwischen der Verwendung einzelner Peptidsequenzen eines Rezeptors oder des kompletten Rezeptors als Antigen deutlich und unterstreicht, wie wichtig zusätzliche Kontrollversuche sind. Der Peptid-basierte Assay von Kem et al. wurde nicht über einen kommerziellen Antikörper überprüft, Stabilitäts- und Matrixeffekte wurden nicht analysiert und die untersuchte Kohorte war vergleichsweise klein. Messungen zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse fanden nicht statt.

Welchen Einfluss die angewandte Methodik und die Wahl des jeweiligen Antigen(teil)s auf die Detektierbarkeit von aAk haben, wird auch anhand folgender Vergleiche deutlich: In jedem der folgenden vier Assays wurden Seren von Patienten mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen auf das Vorhandensein von aAk gegen den Natrium-Iodid-Symporter (NIS) und/oder Pendrin-Transporter (PDS) untersucht. Hohe Prävalenzen von aAk gegen den NIS oder PDS ergaben sich, wenn Peptid-basierte aAk-Assays verwendet wurden. Endo et al. untersuchten 26 Seren von Morbus Basedow Patienten auf das Vorhandensein von aAk gegen einen rekombinant hergestellten NIS mittels Western Blot. Dieser Peptid-basierte Assay erbrachte eine Prävalenz von 84 % (22/26) von NIS-aAk-positiven Seren (39). Ebenfalls mittels Immunoblot detektierten Yoshida et al. in 97,5 % der Seren von Hashimoto-Patienten aAk gegen PDS (40). Wurden hingegen die jeweiligen Transporter-Moleküle in ihrer vollen Länge als Antigen verwendet, konnten die eben genannten hohen Prävalenzzahlen nicht reproduziert werden, weder in einem Aufbau als Radioimmunoassay (41), noch als Immuno-präzipitationsassay, der ein Transporter-Luciferase Fusionsprotein als Antigen verwendete (42). All diese Beispiele machen deutlich, wie unterschiedlich die Ergebnisse ausfallen, je nach verwendetem Antigen, und unterstreichen die Wichtigkeit der Verwendung von (Auto-) Antigenen in ihrer vollen Länge und nicht nur einzelner Peptide, um zuverlässig und reproduzierbar aAk nachweisen zu können. Überdies unterstreichen diese diskrepanten Ergebnisse die hohe Bedeutung von Kontroll- und Validierungsexperimenten.

Demzufolge zählt zu den Stärken unseres Assays die Verwendung eines rekombinant hergestellten GnRH-R in seiner vollen Länge als Antigen (29). Die transfizierten HEK-293-Zellen exprimierten den kompletten Rezeptor samt N-Terminus und den drei extrazellulären Schleifen. Somit konnte sichergestellt werden, dass alle möglichen Epitope für potentielle aAk erreichbar waren. Eine weitere Stärke stellt die große Patienten- und Kontrollzahl dar, die untersucht wurde, wodurch ein repräsentatives Bild bezüglich der Prävalenzen sowohl unter PCOS-Patientinnen als auch unter gesunden Kontrollprobanden entstand. Weiter zu nennen sind die hohe Qualität des Assays, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, die Standardisierung mittels eines kommerziellen kanGnRH-R-Ak und die Möglichkeit mittels dieses Assays eine hohe Durchsatzrate zu erzielen. Zu den Schwächen unserer Studie zählt das Fehlen vertiefender, klinischer Informationen zu den verwendeten Kontrollseren und, dass sich unsere Kohorten zu über 99 % aus Kaukasiern zusammensetzen. Auch wurde auf die Durchführung eines anschließenden Bioassays verzichtet, aufgrund der detektierten niedrigen Prävalenz von GnRH-R-aAk. Als Limitation anzumerken ist ebenso, dass die extrazelluläre(n) Domäne(n), an die die GnRH-R-aAk gebunden haben, nicht weiter durch eine Epitopkartierung und entsprechende Konkurrenzexperimente identifiziert wurde(n).

Die aufgezeigten Publikationen und auch unsere, in dem Paper „Natural autoantibodies to the gonadotropin-releasing hormone receptor in polycystic ovarian syndrome“ von Sattler et al.

veröffentlichten Ergebnisse (29) bestätigen die Existenz von natürlich vorkommenden GnRH-R-aAk – sowohl in Seren von PCOS-Patientinnen als auch in Seren von Frauen, die unter Infertilität unklarer Genese leiden, und durchaus auch in Seren von gesunden Kontrollprobanden. Dass diese aAk eine Relevanz für die Pathogenese des PCOS haben, konnten unsere Ergebnisse aufgrund der niedrigen Prävalenzen nicht untermauern, aber ein Zusammenhang mit Infertilität ist nicht auszuschließen – das unterstreichen die Ergebnisse von Hammar et al. Das Geheimnis um die Ätiopathogenese des PCOS ist somit noch nicht gelüftet und es bleibt bei der Formulierung des PCOS als multifaktoriell bedingte Erkrankung. Und vielleicht stimmt das letztendlich auch genau so. Vielleicht führt genau dieses Zusammenspiel aus Einzelnukleotid-Polymorphismen, intrauteriner Programmierung, Lifestyle, Insulinresistenz, Inflammation und Immunreaktionen zu dem Krankheitsbild PCOS. Die Heterogenität des Krankheitsbildes könnte dann als Ausdruck des unterschiedlichen Einflusses der jeweiligen Faktoren gewertet werden.

Dennoch lohnt es sich, nach weiteren aAk zu suchen, denn eine autoimmune Genese von PCOS ist weiterhin durchaus denkbar. Durch die eindeutig vorliegende hormonelle Dysregulation kämen beispielsweise aAk gegen die Hormone GnRH, LH und FSH selbst in Betracht, sowie aAk gegen den FSH- oder LH-R. Aufgrund der starken Assoziation des PCOS mit einer Insulinresistenz sind auch Assays denkbar, die PCOS-Seren auf Insulin-Rezeptor-aAk untersuchen. Im Zusammenhang mit der Infertilität kommt auch die Frage auf, ob bei infertilen Männern GnRH-R-aAk detektierbar sind. Die deutliche Assoziation zu insbesondere den autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen ist auch noch nicht abschließend geklärt. Dass TPO- und Tg-Ak bei PCOS-Patientinnen höher sind als bei Schilddrüsen-Patientinnen ohne PCOS ist mehrfach bewiesen, aber warum? Bedingt PCOS die Autoimmunthyreoiditis oder ist es genau andersherum? Ebenso verdient die genetische Komponente noch intensivere Beachtung und Forschung. Vielleicht gibt es doch einen ausschlaggebenden Polymorphismus? All das sind ungeklärte Fragen, die es gilt, in Zukunft zu beantworten.

Folgende Schlussfolgerung ist aus dieser Arbeit zu ziehen: natürliche GnRH-R-aAk sind sowohl bei europäischen PCOS-Patientinnen als auch bei gesunden Kontrollprobanden detektierbar in einer jeweils sehr geringen Prävalenz. Mit Hilfe unseres Immunoprecipitationsassays gelingt es, diese GnRH-R-spezifischen aAk reproduzierbar und mittels eines qualitativ hochwertigen Assays nachzuweisen. Aufgrund der niedrigen Prävalenz der GnRH-R-aAk innerhalb der PCOS-Kohorte ist, unseren Ergebnissen zufolge, zu schlussfolgern, dass GnRH-R-aAk von keiner prädiktiven oder diagnostischen Relevanz sind (29). Die Ätiologie und Pathogenese bleiben nicht vollends geklärt und es besteht weiterhin Forschungsbedarf, um die genaue Ätiopathogenese klären, die Latenz bis zur Diagnose verkürzen, eine gezielte Therapie entwickeln und damit die Lebensqualität betroffener Patientinnen verbessern zu können.

## LITERATURVERZEICHNIS

- a. DocCheck Flexikon. Follikelstimulierendes Hormon (zuletzt abgerufen am 19.06.2021). <https://flexikon.doccheck.com/de/FSH>
  - b. DocCheck Flexikon. Luteinisierendes Hormon (zuletzt abgerufen am 19.06.2021). [https://flexikon.doccheck.com/de/Luteinisierendes\\_Hormon](https://flexikon.doccheck.com/de/Luteinisierendes_Hormon)
  - c. DocCheck Flexikon. Gonadotropin-Releasing-Hormon (zuletzt abgerufen am 20.06.2021). <https://flexikon.doccheck.com/de/Gonadotropin-Releasing-Hormon>
  - d. Taschenlehrbuch Histologie. Renate Lüllmann-Rauch. Unter Mitarbeit von Friedrich Paulsen. Georg Thieme Verlag KG (4. Auflage). Seiten 515 – 523
  - e. Amboss. Menstruationszyklus und Zyklusanomalien (zuletzt abgerufen am 19.06.2021). <https://next.amboss.com/de/article/Ek08pT?q=menstruationszyklus%20und%20zyklusanomalien#Za9dde6254dc902b890e9b4bf33be57b8>
  - f. Taschenlehrbuch Biochemie. Gerhard Püschel, Hartmut Kühn, Thomas Kietzmann, Wolfgang Höhne, Bruno Christ, Detlef Doenecke, Jan Koolman. Georg Thieme Verlag KG (2011) .Seiten 542 – 545
  - g. DocCheck News. Polyzwistisches Ovarialsyndrom (zuletzt abgerufen am 26.11.2018). <https://news.doccheck.com/de/218017/polyzwistisches-ovariansyndrom>
  - h. Amboss. Polyzystisches Ovarialsyndrom (zuletzt abgerufen am 21.06.2021). <https://next.amboss.com/de/article/AO0RET?q=pcos#Zdbf102cb31f3d708359d685f6bc6d98e>
1. Naor Z. Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): studies on the GnRH receptor. *Front Neuroendocrinol.* 2009;30(1):10-29.
  2. Balík A, Jindřichová M, Bhattacharyya S, Zemková H. GnRH-I and GnRH-II-induced calcium signaling and hormone secretion in neonatal rat gonadotrophs. *Physiol Res.* 2009;58(5):709-16.
  3. Stamatiades GA, Kaiser UB. Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression. *Mol Cell Endocrinol.* 2018;463:131-41.
  4. Williams CJ, Erickson GF. Morphology and Physiology of the Ovary. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Hofland J, Kalra S, Kaltsas G, Koch C, Kopp P, Korbonits M, Kovacs CS, Kuohung W, Laferrère B, McGee EA, McLachlan R, Morley JE, New M, Purnell J, Sahay R, Singer F, Stratakis CA, Trencé DL, Wilson DP, editors. *Endotext.* South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc. Copyright © 2000-2021, MDTText.com, Inc.; 2000.
  5. Latronico AC, Segaloff DL. Naturally occurring mutations of the luteinizing-hormone receptor: lessons learned about reproductive physiology and G protein-coupled receptors. *Am J Hum Genet.* 1999;65(4):949-58.
  6. Santi D, Potì F, Simoni M, Casarini L. Pharmacogenetics of G-protein-coupled receptors variants: FSH receptor and infertility treatment. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2018;32(2):189-200.
  7. Bednarska S, Siejka A. The pathogenesis and treatment of polycystic ovary syndrome: What's new? *Adv Clin Exp Med.* 2017;26(2):359-67.
  8. Torchen LC. Cardiometabolic Risk in PCOS: More than a Reproductive Disorder. *Curr Diab Rep.* 2017;17(12):137.
  9. Glinborg D, Andersen M. Medical comorbidity in polycystic ovary syndrome with special focus on cardiometabolic, autoimmune, hepatic and cancer diseases: an updated review. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2017;29(6):390-6.

10. Barber TM, Dimitriadis GK, Andreou A, Franks S. Polycystic ovary syndrome: insight into pathogenesis and a common association with insulin resistance. *Clin Med (Lond)*. 2016;16(3):262-6.
11. de Melo AS, Dias SV, Cavalli Rde C, Cardoso VC, Bettiol H, Barbieri MA, Ferriani RA, Vieira CS. Pathogenesis of polycystic ovary syndrome: multifactorial assessment from the foetal stage to menopause. *Reproduction*. 2015;150(1):R11-24.
12. Mobeen H, Afzal N, Kashif M. Polycystic Ovary Syndrome May Be an Autoimmune Disorder. *Scientifica (Cairo)*. 2016;2016:4071735.
13. Pérez-Bravo F, Carrasco E, Echiburú B, Maliqueo M, Diaz J, Sir-Petermann T. Serological markers of autoimmunity in pregnant women with polycystic ovary syndrome: a pilot study. *Gynecol Endocrinol*. 2010;26(12):889-93.
14. Arduc A, Aycicek Dogan B, Bilmez S, Imga Nasiroglu N, Tuna MM, Isik S, Berker D, Guler S. High prevalence of Hashimoto's thyroiditis in patients with polycystic ovary syndrome: does the imbalance between estradiol and progesterone play a role? *Endocr Res*. 2015;40(4):204-10.
15. Andrade VH, Mata AM, Borges RS, Costa-Silva DR, Martins LM, Ferreira PM, Cunha-Nunes LC, DA Silva BB. Current aspects of polycystic ovary syndrome: A literature review. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2016;62(9):867-71.
16. Rosenfield RL, Ehrmann DA. The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Hypothesis of PCOS as Functional Ovarian Hyperandrogenism Revisited. *Endocr Rev*. 2016;37(5):467-520.
17. Thomson RL, Spedding S, Brinkworth GD, Noakes M, Buckley JD. Seasonal effects on vitamin D status influence outcomes of lifestyle intervention in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2013;99(6):1779-85.
18. Welt CK, Duran JM. Genetics of polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med*. 2014;32(3):177-82.
19. Caburet S, Fruchter RB, Legois B, Fellous M, Shalev S, Veitia RA. A homozygous mutation of GNRHR in a familial case diagnosed with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2017;176(5):K9-k14.
20. Beyazit F, Hiz MM, Turkon H, Unsal MA. Serum spexin, adiponectin and leptin levels in polycystic ovarian syndrome in association with FTO gene polymorphism. *Ginekol Pol*. 2021.
21. Branavan U, Wijesundera S, Chandrasekaran V, Arambepola C, Wijeyaratne C. In depth analysis of the association of FTO SNP (rs9939609) with the expression of classical phenotype of PCOS: a Sri Lankan study. *BMC Med Genet*. 2020;21(1):30.
22. Li H, Zhang G, Guo Y, Deng J, Fischer H, Craig LB, Kem DC, Yu X. Autoimmune activation of the GnRH receptor induces insulin resistance independent of obesity in a female rat model. *Physiol Rep*. 2021;8(24):e14672.
23. Petrikova J, Lazurova I, Dravecka I, Vrbikova J, Kozakova D, Figurova J, Vaczy Z, Rosocha J. The prevalence of non organ specific and thyroid autoimmunity in patients with polycystic ovary syndrome. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2015;159(2):302-6.
24. Petříková J, Lazúrová I. Ovarian failure and polycystic ovary syndrome. *Autoimmun Rev*. 2012;11(6-7):A471-8.
25. Thomson RL, Spedding S, Buckley JD. Vitamin D in the aetiology and management of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;77(3):343-50.

26. Muscogiuri G, Palomba S, Caggiano M, Tafuri D, Colao A, Orio F. Low 25 (OH) vitamin D levels are associated with autoimmune thyroid disease in polycystic ovary syndrome. *Endocrine*. 2016;53(2):538-42.
27. Kem DC, Li H, Yu X, Weedin E, Reynolds AC, Forsythe E, Beel M, Fischer H, Hines B, Guo Y, Deng J, Liles JT, Nuss Z, Elkosseifi M, Aston CE, Burks HR, Craig LB. The Role of GnRH Receptor Autoantibodies in Polycystic Ovary Syndrome. *J Endocr Soc*. 2020;4(8):bvaa078.
28. Münzker J, Hofer D, Trummer C, Ulbing M, Harger A, Pieber T, Owen L, Keevil B, Brabant G, Lerchbaum E, Obermayer-Pietsch B. Testosterone to dihydrotestosterone ratio as a new biomarker for an adverse metabolic phenotype in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(2):653-60.
29. Sattler LM, Schniewind HA, Minich WB, Haudum CW, Niklowitz P, Münzker J, Kovács GL, Reinehr T, Obermayer-Pietsch B, Schomburg L. Natural autoantibodies to the gonadotropin-releasing hormone receptor in polycystic ovarian syndrome. *PLoS One*. 2021;16(4):e0249639.
30. Hefler-Frischmuth K, Walch K, Huebl W, Baumuehlner K, Tempfer C, Hefler L. Serologic markers of autoimmunity in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2010;93(7):2291-4.
31. Minich WB, Dehina N, Welsink T, Schwiebert C, Morgenthaler NG, Köhrle J, Eckstein A, Schomburg L. Autoantibodies to the IGF1 receptor in Graves' orbitopathy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(2):752-60.
32. Mandl T, Roth B, Ohlsson B. Antibodies against GnRH and its receptor in patients with primary Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol*. 2014;43(4):338-48.
33. Hammar O, Roth B, Bengtsson M, Mandl T, Ohlsson B. Autoantibodies and gastrointestinal symptoms in infertile women in relation to in vitro fertilization. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2013;13:201.
34. Rispoli LA, Nett TM. Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: structure, distribution and regulation of expression. *Anim Reprod Sci*. 2005;88(1-2):57-74.
35. Rapoport B, McLachlan SM. Reflections on Thyroid Autoimmunity: A Personal Overview from the Past into the Future. *Horm Metab Res*. 2018;50(12):840-52.
36. Zöphel K, Roggenbuck D, Schott M. Clinical review about TRAb assay's history. *Autoimmun Rev*. 2010;9(10):695-700.
37. Minich WB, Lenzner C, Morgenthaler NG. Antibodies to TSH-receptor in thyroid autoimmune disease interact with monoclonal antibodies whose epitopes are broadly distributed on the receptor. *Clin Exp Immunol*. 2004;136(1):129-36.
38. Li H, Guo Y, Zhang G, Deng J, Fischer H, Craig LB, Yu X, Kem DC. Gonadotrophin-releasing hormone receptor autoantibodies induce polycystic ovary syndrome-like features in a rat model. *Exp Physiol*. 2021;106(4):902-12.
39. Endo T, Kogai T, Nakazato M, Saito T, Kaneshige M, Onaya T. Autoantibody against Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>symporter in the sera of patients with autoimmune thyroid disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;224(1):92-5.
40. Yoshida A, Hisatome I, Taniguchi S, Shirayoshi Y, Yamamoto Y, Miake J, Ohkura T, Akama T, Igawa O, Shigemasa C, Kamijo K, Ikuyama S, Caturegli P, Suzuki K. Pendrin is a novel autoantigen recognized by patients with autoimmune thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(2):442-8.
41. Brix TH, Hegedüs L, Weetman AP, Kemp HE. Pendrin and NIS antibodies are absent in healthy individuals and are rare in autoimmune thyroid disease: evidence from a Danish twin study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014;81(3):440-4.

42. Eleftheriadou AM, Mehl S, Renko K, Kasim RH, Schaefer JA, Minich WB, Schomburg L. Re-visiting autoimmunity to sodium-iodide symporter and pendrin in thyroid disease. *Eur J Endocrinol.* 2020;183(6):571-80.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lisa-Marie Sattler, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Das Polyzystische Ovarialsyndrom als Autoimmunerkrankung - sind natürliche Gonadotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor-Autoantikörper von diagnostischer Relevanz?“ („Polycystic ovarian syndrome as an autoimmune disease – does gonadotropin-releasing hormone receptor autoantibodies are of diagnostic relevance?“) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum: 24.06.2021

Unterschrift

## Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

### Publikation:

Lisa-Marie Sattler, Hanna A. Schniewind, Waldemar B. Minich, Christoph W. Haudum, Petra Niklowitz, Julia Münzker, Gábor L. Kovács, Thomas Reinehr, Barbara Obermayer-Pietsch, Lutz Schomburg, *Natural autoantibodies to the gonadotropin-releasing hormone receptor in polycystic ovarian syndrome*, PLOS ONE, 2021, Apr 2;**16**(4):e0249639

An der Publikation hatte ich, Lisa-Marie Sattler, folgenden Anteil:

- Transfektion von HEK-293-Zellen und Etablierung eines stabilen Zellklons (Fig. 1A)
- Gewinnung des GnRH-R-Luciferase Fusionsprotein-haltigen Zellextraktes (Fig. 1B)
- Durchführung des Immunopräzipitationsassays und Luciferase-Aktivitätsmessungen der 400 Kontrollseren, der 35 PCOS-HU-Seren und der 40 PCOS-DE-Seren (Fig. 2B)
- Überprüfung der Reproduzierbarkeit und potentieller Matrixeffekte (Fig. 3)
- biostatistische Auswertung und Optimierung der graphischen Darstellungen
- Mitgestaltung und Literaturrecherche für den initialen Publikationsentwurf
- Vollendung des Manuskriptes in Zusammenarbeit mit den Co-Autoren
- Beitrag zur Beantwortung der Nachfragen während des Revisionsprozesses
- Viele der Laborarbeiten wurden in enger Zusammenarbeit mit dem Postdoc. Dr. Waldemar B. Minich und meiner Kommilitonin Hanna A. Schniewind durchgeführt. Details bei der Fertigstellung der Publikation wurden in Kooperation mit meinem Mentor Prof. Dr. Lutz Schomburg geklärt und umgesetzt.

---

Unterschrift der Doktorandin

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2019** Selected Editions: SCIE, SSCI Selected Categories: **“MULTIDISCIPLINARY SCIENCES”**  
 Selected Category Scheme: WoS  
 Gesamtanzahl: 71 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE	767,209	42.778	1.216730
2	SCIENCE	699,842	41.845	1.022660
3	National Science Review	2,775	16.693	0.009760
4	Science Advances	36,380	13.116	0.172060
5	Nature Human Behaviour	2,457	12.282	0.014190
6	Nature Communications	312,599	12.121	1.259510
7	Science Bulletin	5,172	9.511	0.014150
8	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA	676,425	9.412	0.931890
9	Journal of Advanced Research	3,564	6.992	0.005470
10	GigaScience	4,068	5.993	0.016410
11	Scientific Data	5,761	5.541	0.028720
12	Research Synthesis Methods	2,572	5.299	0.006440
13	ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES	45,596	4.728	0.026370
14	FRACTALS-COMPLEX GEOMETRY PATTERNS AND SCALING IN NATURE AND SOCIETY	2,156	4.536	0.002210
15	iScience	1,410	4.447	0.004140
16	GLOBAL CHALLENGES	481	4.306	0.001440
17	Scientific Reports	386,848	3.998	1.231180
18	JOURNAL OF KING SAUD UNIVERSITY SCIENCE	1,640	3.819	0.002020
19	Journal of the Royal Society Interface	13,762	3.748	0.027670

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
20	Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	2,770	3.644	0.007650
21	NPJ Microgravity	346	3.380	0.001210
22	PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY A-MATHEMATICAL PHYSICAL AND ENGINEERING SCIENCES	20,609	3.275	0.027840
23	PROCEEDINGS OF THE JAPAN ACADEMY SERIES B-PHYSICAL AND BIOLOGICAL SCIENCES	1,669	3.000	0.001980
24	Advanced Theory and Simulations	432	2.951	0.000700
25	SCIENCE AND ENGINEERING ETHICS	2,129	2.787	0.003760
26	PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY A-MATHEMATICAL PHYSICAL AND ENGINEERING SCIENCES	19,218	2.741	0.018450
27	PLoS One	688,763	2.740	1.388860
28	Royal Society Open Science	7,222	2.647	0.027340
29	Symmetry-Basel	4,888	2.645	0.005390
30	INTERNATIONAL JOURNAL OF BIFURCATION AND CHAOS	7,115	2.469	0.007090
31	COMPLEXITY	4,413	2.462	0.007160
32	PeerJ	17,984	2.379	0.062850
33	MIT Technology Review	871	2.357	0.001810
34	Science of Nature	673	2.090	0.002400
35	SCIENCE PROGRESS	499	1.906	0.000340
36	SOUTH AFRICAN JOURNAL OF SCIENCE	2,631	1.866	0.001800
37	Journal of Taibah University for Science	1,126	1.863	0.001470
38	Journal of Radiation Research and Applied Sciences	1,127	1.804	0.002280

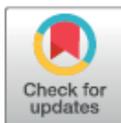
## RESEARCH ARTICLE

## Natural autoantibodies to the gonadotropin-releasing hormone receptor in polycystic ovarian syndrome

Lisa-Marie Sattler<sup>1,2</sup>, Hanna A. Schniewind<sup>1,2</sup>, Waldemar B. Minich<sup>1,2</sup>, Christoph W. Haudum<sup>3,4</sup>, Petra Niklowitz<sup>5</sup>, Julia Münzker<sup>6</sup>, Gábor L. Kovács<sup>7</sup>, Thomas Reinehr<sup>5</sup>, Barbara Obermayer-Pietsch<sup>3</sup>, Lutz Schomburg<sup>1,2\*</sup>

**1** Institute for Experimental Endocrinology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, **2** Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany, **3** Department of Internal Medicine and Department of Gynecology and Obstetrics, Endocrinology Lab Platform, Medical University Graz, Graz, Austria, **4** Center for Biomarker Research in Medicine (CBmed), Graz, Austria, **5** Department of Pediatric Endocrinology, Vestische Kinder- und Jugendklinik, University of Witten-Herdecke, Datteln, Germany, **6** Integrated Research and Treatment Centre for Adiposity Diseases, Department of Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany, **7** 1st Department of Internal Medicine, Flor Ferenc Hospital, Kistarcsa, Hungary

\* [lutz.schomburg@charite.de](mailto:lutz.schomburg@charite.de)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Sattler L-M, Schniewind HA, Minich WB, Haudum CW, Niklowitz P, Münzker J, et al. (2021) Natural autoantibodies to the gonadotropin-releasing hormone receptor in polycystic ovarian syndrome. PLOS ONE 16(4): e0249639. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249639>

**Editor:** Sheng Wu, Lewis Katz School of Medicine at Temple University, UNITED STATES

**Received:** November 11, 2020

**Accepted:** March 22, 2021

**Published:** April 2, 2021

**Copyright:** ©2021 Sattler et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its [Supporting Information](#) files.

**Funding:** The research has been funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Research Unit FOR-2558 "TraceAge" (Scho 849/6-1), by the Austrian Research Promotion Agency FFG (FFG844609), the Center for Biomarker Research in Medicine (CBmed) in Graz, and we acknowledge financial support by the Open Access

## Abstract

## Context

Polycystic ovarian syndrome (PCOS) is a complex disease with different subtypes and unclear etiology. Among the frequent comorbidities are autoimmune diseases, suggesting that autoantibodies (aAb) may be involved in PCOS pathogenesis.

## Objective

As the gonadal axis often is dysregulated, we tested the hypothesis that aAb to the gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRH-R) are of diagnostic value in PCOS.

## Design

An in vitro assay for quantifying aAb to the GnRH-R (GnRH-R-aAb) was established by using a recombinant fusion protein of full-length human GnRH-R and firefly luciferase. A commercial rabbit antiserum to human GnRH-R was used for standardization. Serum samples of control subjects and different cohorts of European PCOS patients (n = 1051) were analyzed.

## Results

The novel GnRH-R-aAb assay was sensitive, and signals were linear on dilution when tested with the commercial GnRH-R antiserum. Natural GnRH-R-aAb were detected in one control (0.25%) and two PCOS samples (0.31%), and 12 samples were slightly above the threshold of positivity. The identification of samples with positive GnRH-R-aAb was reproducible and the signals showed no matrix interferences.

Publication Fund of Charité – Universitätsmedizin Berlin.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Conclusion

Natural GnRH-R-aAb are present in a very small fraction of adult control and PCOS subjects of European decent. Our results do not support the hypothesis that the GnRH-R constitutes a relevant autoantigen in PCOS.

## Introduction

Fertility constitutes an essential issue for both adult males and females. It is estimated that 3.5% to 16.7% of women in developed nations are suffering from infertility, with more than half of them seeking medical care [1]. One of the frequent underlying reasons for female infertility is polycystic ovarian syndrome (PCOS), affecting about 5% to 15% of women of reproductive age [2–5]. PCOS is a chronic and complex disease with a rising incidence in most populations, making PCOS one of the most common endocrine-metabolic disorder in adult women [6]. The clinical presentation is heterogeneous and established pathognomonic serological markers are missing, hindering a fast and reliable diagnosis [7,8]. Menstrual disturbances such as cycle irregularities are among the first symptoms, and signs of virilisation like hirsutism, a deep voice, acne or alopecia may develop [9,10]. The current diagnosis is based on the Rotterdam criteria from 2003 [3,11], i.e., when any two of the following three criteria are met; i) clinical or biochemical diagnosis of hyperandrogenism, ii) oligo- or amenorrhea (or rather oligo- or anovulation), and/or iii) morphological presence of polycystic ovaries by ultrasound inspection (presence of  $\geq 12$  follicles of 2–9 mm in diameter and/or ovarian volume  $\geq 10$  ml).

However, around one half of the affected women are on a year-long journey with three or more specific health professionals needed for establishing the diagnosis, causing dissatisfaction and disappointment with the current medical care and information on PCOS [7]. During diagnosis, other reasons potentially leading to irregular menstruation or high androgen levels have to be excluded, e.g. M. Cushing, non-classical congenital adrenal hyperplasia, androgen-producing tumors or hyperprolactinemia [12]. Still, the diagnosis is challenging and the criteria are on debate as more than 50% of patients display signs of insulin resistance, which may occur independently of obesity [4,5], and may promote additional comorbidities like diabetes mellitus, dyslipidemia or hypertension [12,13]. Collectively, hyperandrogenism and insulin resistance seem to constitute the chief culprit of PCOS, calling for an update and respective modification of the diagnostic criteria used in the clinical routine workup of symptomatic women [14].

In general, about 75% of PCOS women are overweight and about 70% show dyslipidemia, contributing to a relatively high mortality rate due to cardiovascular events [15]. Furthermore, affected women have an increased risk for autoimmune diseases, including Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease and diabetes mellitus type I [4,15,16]. There are reports on the presence of certain autoantibodies (aAb) known from other autoimmune diseases in PCOS, e.g. aAb to dsDNA, histones, TPO, islet-cells or SMTRNP [16,17].

No causal therapy is currently available. In many cases, weight loss serves as a first promising and meaningful measure, as it improves insulin sensitivity, hyperandrogenemia and irregular menstrual cycles [13,18]. The administration of oral contraceptives similarly contributes to restoring the monthly rhythm and mitigating hyperandrogenemia [4], but is limited as therapeutic tool for women without the intention to become pregnant. Metformin may improve glucose handling, which also lowers androgen levels and positively affects fertility [4]. In case a patient nevertheless stays anovulatory, gonadotropins in combination with GnRH may be applied [19]. Other supportive medication include antiandrogens, glucocorticoids, isotretinoin

or statins in addition to metformin, bariatric surgery or certain micronutrients such as vitamin D, which has been reported to improve ovulatory function and hyperlipidemia [4,15]. Another promising approach for positively affecting weight and fat mass would also include alteration of the gut microbiome by dietary means using prebiotics, probiotics or synbiotics [20].

Collectively, these diverse treatment options highlight the variable clinical picture of PCOS, the missing understanding of disease etiology and the urgent need for better prognostic and diagnostic biomarkers. A recent report suggested the existence of aAb to the second extracellular loop of the gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRH-R) in the majority of PCOS serum samples tested [21]. The GnRH-R belongs to the family of G protein-coupled receptors (GPCR) and is inserted into the plasma membrane of GnRH target cells, with high expression in gonadotropin cells of the anterior pituitary. It controls biosynthesis of the anterior pituitary glycoprotein-hormones luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH), exists in different variants, and associates with G-proteins that activate the IP3-calcium and cAMP-PKA second messenger signaling cascades [22]. GnRH and the GnRH-R are central components of the endocrine axis controlling the ovary, and dysregulation of either the hypothalamic ligand or the pituitary receptor are associated with impaired fertility [23]. Autoimmunity to the GnRH-R would constitute a plausible underlying mechanism of dysregulation, given that GnRH controls the gonadotropins FSH and LH that are dysregulated in PCOS [24]. It is well established that autoantibodies to G-protein coupled receptors (GPCR) are capable of disturbing endocrine signaling, e.g. in Graves' [25] or Chagas disease [26]. An autoimmune origin of the disturbed gonadal axis is also supported by the notion that autoimmune diseases like Hashimoto's thyroiditis or systemic lupus erythematosus are more prevalent in females with PCOS than in the general population [16]. To verify this hypothesis experimentally, we have established a novel and highly sensitive assay for detecting and quantifying aAb to human GnRH-R (GnRH-R-aAb) by using the full-length human G protein-coupled receptor (GPCR). The assay's properties were thoroughly characterized and GnRH-R-aAb prevalence was compared in healthy subjects and different cohorts of women with PCOS from three European countries. Our results indicate that GnRH-R-aAb are a rare finding and likely not of relevance for general PCOS risk assessment or diagnosis.

## Materials and methods

### Human samples

A set of high quality serum samples from adult subjects ( $n = 400$ , 50% female, self-reported status as healthy) was purchased from a commercial supplier (in.vent Diagnostica GmbH, Hennigsdorf, Germany), assuming that a group size of  $n = 200$  female and  $n = 200$  male samples will be of sufficient size to determine the prevalence of GnRH-R-aAb in the normal population background and define the technical background noise of the novel aAb assay. Three different cohorts of PCOS were analyzed, comprising a set of 651 serum samples. Samples were collected from female patients in Graz, Austria (PCOS-A,  $n = 576$ , 78.5% PCOS), from adolescent patients in Datteln/Witten/Herdecke, Germany (PCOS-DE,  $n = 40$ , 50.0% PCOS), and from patients in Budapest, Hungary (PCOS-HU,  $n = 35$ , 68.6% PCOS). Written informed consent for participation was obtained from all patients included, or from one or both of their parents in case the participants were below 18 years of age (all subjects in PCOS-DE). No particular selection with regard to any genetic or environmental factors was made. An overview on anthropometric characteristics is provided, highlighting that PCOS-A was contributing the largest cohort without preselection of anthropometric or clinical characteristics, PCOS-DE was exclusively enrolling adolescent PCOS patients, whereas PCOS-HU constituted a small set of predominantly young and obese patients (Table 1). Diagnosis of PCOS was based on

Table 1. Characterization of the cohorts of patients studied in this analysis.

Cohort	PCOS-A*	PCOS-DE	PCOS-HU
City, Country	Graz, Austria	Datteln, Germany	Budapest, Hungary
Samples, total [n]	576	40	35
PCOS diagnosis [n]	452	20	24
Age (median, IQR) [y]	26.8 (23, 30)	15.1 (14.6, 16.0)	23.0 (21.0, 29.8)
BMI (median, IQR) [kg/m <sup>2</sup> ]	26.3 (21.4, 30.5)	36.0 (31.0, 41.2)	27.8 (22.8, 38.6)

\* >99% with Caucasian ethnicity, i.e., European subjects from Styria, Austria.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249639.t001>

clinical presentation and disease manifestation according to the Rotterdam criteria [3,11]. The androgen status of patients enrolled in the PCOS-A cohort was assessed routinely by the analysis of several steroid hormones, including total testosterone (total Testost.), free testosterone (free Testost.), dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEAS) and androstenedione. Total Testost. was quantified by ELISA (ADVIA Centaur® Immunoassay, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY, USA), whereas free Testost., DHEAS and androstenedione were measured using liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) as described [22].

The investigation was conducted in accordance with the guidelines in the Declaration of Helsinki, informed consent of the patients or parents was obtained, and the samples were analyzed in a blinded manner at a lab distant from the clinical sites. The analyses have been approved by the ethical review committees of the universities in Graz (Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz, LKH-Universitätsklinikum, Austria; EC18-066 ex 06-07), Datteln/Witten/Herdecke (Ethik-Kommission der Universität Witten/Herdecke e.V., Witten, Germany; EV No. 15/2006) and Budapest (University Ethics Committee, Semmelweis University, Budapest, Hungary; ETT-TUKEB 42506-1/2016/EKU).

### Construction of GnRH-R luciferase fusion protein

The open reading frame of human GnRH-R was synthesized by Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany) and used as template for cDNA cloning. DNA primers used for amplification were synthesized by BioTeZ (Berlin, Germany). pSP-Luc+NF vector was obtained from Promega (Promega, Mannheim, Germany, catalog Nr. #E4471), pIRESneo vector from Addgene (Addgene, Teddington, UK, catalog Nr. #6988-1), and a polyclonal rabbit IgG antiserum to human GnRH-R was purchased from Thermo Fisher (rabGnRH-R-Ab, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany, catalog Nr. #PA5-33597). In order to construct a dilution series of positive samples, the commercial polyclonal antiserum to human GnRH-R was diluted step-wise in human control serum.

The expression vector encoding human GnRH-R fused in frame to firefly luciferase (Luc) was constructed by first amplifying the cDNA of firefly luciferase using pSP-Luc+NF as template and inserting it into plasmid pIRESneo generating pIRESneo-Luc. The amplified cDNA of human GnRH-R was inserted N-terminal to Luc giving rise to plasmid pIRESneo-GnRH-R-Luc encoding the GnRH-R-Luc fusion protein. The correct reading frame of the recombinant fusion protein was verified by DNA sequencing of pIRESneo-GnRH-R-Luc using a service provider (LGC Genomics GmbH, Berlin, Germany).

### Stable expression of GnRH-R-Luc in mammalian cells

Human embryonic kidney cells (HEK 293 cells) were grown in DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS) and transfected with pIRESneo-GnRH-R-Luc using FuGENE6 reagent

(Promega, catalog Nr. #E2691). Stable cell clones were selected by adding G418 (0.8 mg/ml, Sigma-Aldrich, catalog Nr. #A1720), and the resulting Luc activity of established cultures was compared. Aliquots of cells were lysed and tested for Luc activity and compared, as the expression levels of the transgene differ between the clones depending on the particular site of integration into the host genome. The most productive clone was expanded in DMEM/FBS/G418 until confluency in 100 mm-cell-culture-dishes, and cells were collected by scraping. The suspension was centrifuged (Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau, Germany) at 3500 rpm (2000 g) at 4°C for 10 min, and washed twice with PBS. After removing the supernatant, the cell pellet was resuspended in a buffer containing 50 mM Tris HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl and 10% glycerol. Finally, Triton X-100 was added (to 10% f.c.) to lyse the cell membranes. After an incubation step of 5 min on ice and another centrifugation step (3500 rpm, 2000 g, 10 min, 4°C), the supernatant was collected and stored at -80°C until it was used in the GnRH-R-aAb assay. A control preparation with recombinant firefly luciferase alone, not containing the human GnRH-R attached, was prepared and tested under the same conditions as above, in order to verify absence of antibodies recognizing the reporter enzyme.

### Immunoprecipitation for quantification of GnRH-R-aAb

The GnRH-R-Luc cell extract was diluted 10-times with buffer containing 50 mM Tris (pH 7.5), 100 mM NaCl, 10% glycerol, 5% milk powder, 5% glucose, 1% Triton X-100 and 0.01% sodium azide. To prepare measurements, 96-well-plates were cooled on ice and pre-loaded with 40 µl of the GnRH-R-Luc extract. Then, 10 µl of pre-diluted serum (1:1, vol/vol, with dilution buffer consisting of 50% glycerol, 100 mM NaCl and 50 mM Tris HCl, pH 7.4) were added and incubated overnight at 4°C in order to allow formation of immune complexes between GnRH-R-specific aAb and the GnRH-R-Luc fusion protein. The following day, 40 µl protein A-Sepharose suspension (Merck KGaA, Darmstadt, Germany, catalog Nr. #GE17096303) was added and incubated for one hour at room temperature. The 96-well-plates were washed and centrifuged six times with 200 µl washing buffer containing 50 mM Tris HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10% glycerol and 0.5% Triton X-100. The supernatant was finally aspirated by vacuum and the pellets were resuspended in luciferase substrate buffer containing 0.5% Triton X-100, and then transferred into glass tubes. Luciferase activity was measured in a chain luminometer (Berthold, Bad Wildbad, Germany) for 5 sec with 200 µl luciferase substrate buffer per tube. Relative light units (RLU) were recorded and analyzed as described [28].

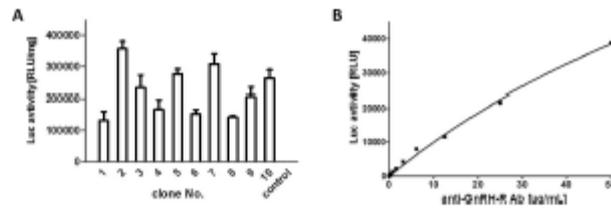
### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism v.7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) or SPSS (version 25, SAS Institute, Cary, NC, USA). Normal distribution was assessed by the Shapiro-Wilk-Test, and quantitative variables were compared by unpaired t test (normal distribution). Alternatively, data were compared by two-sided non-parametric U Mann-Whitney Test. Results are shown as mean ± SD or median with interquartile range (IQR). Statistical significance is assigned as \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$  or \*\*\*,  $P < 0.001$ .

## Results

### GnRH-R expression and generation of GnRH-R-aAb assay

Human HEK293 cells were transfected with pIRESneo-GnRH-R-Luc and stable clones were selected by applying G418 as selection antibiotic. Aliquots of cells were lysed and tested for Luc activity. Several positive clones were isolated, propagated and used to generate stable cell stocks for further use (Fig 1A). The clone with highest expression was expanded and the



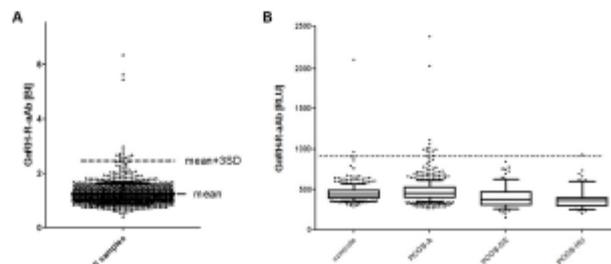
**Fig 1. Generation of stable clones and linearity of the assay for GnRH-R-aAb quantification.** A) Stable cultures of HEK293 cells expressing the recombinant fusion protein were established and ten productive clones were compared for luciferase (Luc) activity, which is indicative of the relative concentration of the desired GnRH-R-Luc fusion protein. B) A commercial polyclonal rabbit antiserum to human GnRH-R (anti-GnRH-R Ab) was diluted and tested in the newly generated assay. The signals obtained were related to the anti-GnRH-R Ab, and a proportional response of signal intensity to the antiserum concentration was recorded. Measurements were conducted in duplicates, control samples without human serum typically yield luminescence signals of <100 RLU.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249639.g001>

GnRH-R-Luc fusion protein was isolated and tested with the commercial antiserum raised to human GnRH-R in rabbit (rabGnRH-R-Ab). Protein A-mediated precipitation of rabGnRH-R-Ab incubated with extracts from HEK293 cells expressing pIRESneo-GnRH-R-Luc but not with extracts from untransfected HEK293 control cells yielded high Luc signals (expressed as relative light units, RLU). The signals of the precipitated protein A-bound complexes between GnRH-R-Luc and the commercial rabGnRH-R-Ab were linear on dilution over a wide concentration range (Fig 1B).

**Prevalence of GnRH-R-aAb in PCOS versus controls**

In order to test for natural GnRH-R-aAb in PCOS, a total of >1000 human serum samples were analyzed by the newly generated assay (Fig 2). Most of the signals obtained were in a close range of 250 to 750 RLU. According to the Shapiro-Wilk normality test, the values are not normally distributed ( $W = 0.7133, P < 0.0001$ ). The threshold for positivity of GnRH-R-aAb was calculated on basis of the bottom half of all signals, and set at the sum of the mean value plus three standard deviations (mean+3SD). The binding index (BI) denotes the factor



**Fig 2. Prevalence of GnRH-R-aAb in serum samples of controls and PCOS patients.** A) The full set of samples ( $n = 1051$ ) was analyzed for GnRH-R-aAb concentrations by measuring GnRH-R-Luc activity in the immunoprecipitates. Binding indices (BI) were calculated based on the lower half of all samples. The mean value plus three standard deviations (mean+3SD) was used as criterion for outliers, indicating positive presence of GnRH-R-aAb. Three samples were strongly positive, and 12 samples were slightly above the threshold (dashed line). B) The signals for GnRH-R-aAb were not normally distributed in the cohorts of samples analyzed. The prevalence of highly positive samples is similar in the cohorts of PCOS patients and control subjects (2 out of 651, i.e., 0.31%, vs. 1 out of 400, i.e., 0.25%).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249639.g002>

above the mean. By applying this criterion, we identified a total set of 15 samples as being positive for containing GnRH-R-aAb (Fig 2A). However, the majority of which ( $n = 12$ ) is close to the threshold ( $BI = 2.4$ ), leaving a set of three samples only as strongly positive, displaying BI of 5.46, 5.65 and 6.36, respectively. Specificity of the three highly positive serum samples for binding to the GnRH-R moiety of the luciferase-fusion protein detector was verified by analysis with an unmodified luciferase as reporter, yielding background signals only.

Comparing the different cohorts of samples tested, the positive samples were identified in the set of healthy controls ( $n = 2$ , with one slightly and one strongly positive signal), in the large cohort of adult PCOS patients from Graz (PCOS-A,  $n = 12$ , with two strongly positive samples), and one sample in the small cohort of Hungarian PCOS patients (PCOS-HU). There was no positive sample in the group of young adolescent PCOS patients (PCOS-DE) (Fig 2B). A direct comparison of samples strongly positive for GnRH-R-aAb in relation to PCOS indicates a similar prevalence in controls and patients, with 0.25% (1/400) in the cohort of self-reported healthy controls, and 0.31% (2/651) in the cohorts of PCOS patients, respectively.

### Stability of GnRH-R-aAb in positive serum samples

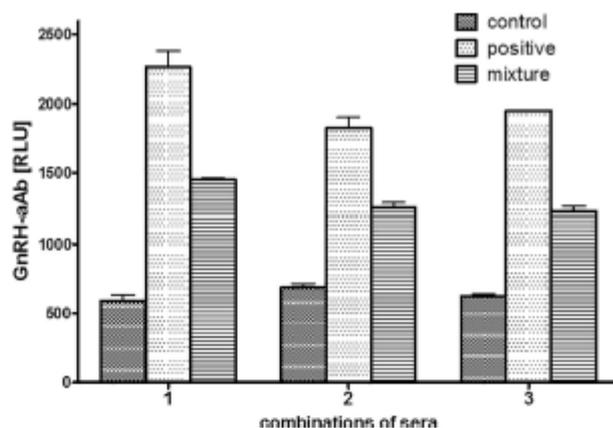
The results were reproducible, and the same three sera (one control and two PCOS; #175 and #225) were verified as strongly positive in a second round of measurements. All three sera were recognizing the GnRH-R moiety of the detector, and showed no binding to luciferase without the fusion partner. In order to test for stability of signals and potential interference by matrix, analyses of mixed serum samples were conducted. To this end, a positive and a negative sample each were combined (1:1, vol/vol) and measured as described above, i.e., one set of test tubes contained 5  $\mu$ l of a negative serum sample (control), another contained 5  $\mu$ l of one of the three positive serum samples (positive), and the third contained 5  $\mu$ l of a mixed serum, consisting of a 1:1 mixture (vol/vol) of the control and the positive serum samples (mixture). The results indicate that the resulting signal from the mixture was equal to the arithmetic mean of the signals from the negative control and the positive GnRH-R-aAb containing serum, highlighting assay reproducibility, and excluding major matrix effects on the signals recorded in the GnRH-R-aAb assay (Fig 3).

### Steroid hormone levels in PCOS patients with GnRH-R-aAb

The GnRH-R on pituitary gonadotrophs controls LH and FSH biosynthesis and secretion and thereby affects steroid hormone status. In order to test for a potential effect of GnRH-R-aAb on circulating steroid hormones, serum concentrations of total Testost., free Testost., DHEAS and androstenedione were determined in GnRH-R-aAb positive PCOS patients and compared to the reference range of healthy women and to the range of the other adult patients of PCOS-A. The direct comparison indicates that both patients with positive GnRH-R-aAb (PCOS #175 and #225) were characterized by hyperandrogenemia in comparison to healthy women (Ref. Range). In particular, the patient with the highest GnRH-R-aAb concentrations (PCOS #175) displayed not only elevated androgen levels in comparison to the Ref. Range, but also relatively high concentrations of total testosterone and DHEAS as compared to the other adult PCOS patients (Fig 4). The second positive PCOS patient with GnRH-R-aAb (PCOS #225) showed the same pattern of elevated steroids as PCOS #175, albeit less pronounced.

### Discussion

In this explorative study, we tested the hypothesis of a high prevalence and considerable diagnostic value of GnRH-R-aAb in PCOS. The notion was based both on endocrine [24] and genetic [29] considerations as well as on a recent report describing high prevalence of

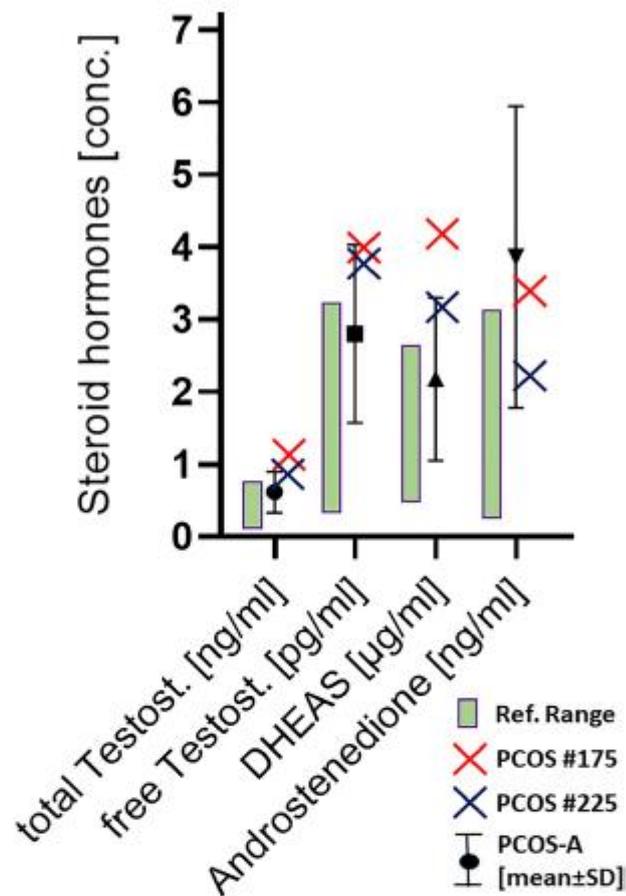


**Fig 3. Test for matrix effects and signal reproducibility.** Three different control samples were equally mixed with one of the three highly positive GnRH-R-aAb samples and analyzed for GnRH-R-aAb concentrations. The signals measured correspond to the theoretical arithmetic mean of the respective serum samples indicating the absence of matrix effects. Measurements were conducted as duplicates.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249639.g003>

GnRH-R-aAb in PCOS sera using an extracellular loop peptide as antigen [30]. In order to generate a reliable and scalable diagnostic assay of high sensitivity, we decided to use as antigen a receptor fusion protein with firefly luciferase (GnRH-R-Luc). In view that the extracellular N-terminus of human GnRH-R is only 34 amino acids in length, and none of the three extracellular loops are any longer, we decided to use the full-length receptor expressed in a human cell line as bait. Choosing the intracellular C-terminus as fusion site, we expect all extracellular domains of the fusion protein to become available to potential GnRH-R-aAb, including the N-terminus and all the extracellular loops. In analogy to our experiences with the TSH-receptor, we expected hereby to enable the detection of both linear and three-dimensional epitopes, respectively, the latter of which are likely to be missed when using small linear peptides of a certain region only [31]. Our results indicate that indeed a few European subjects express natural GnRH-R-aAb, and that the receptor-specific aAb can reproducibly be detected and quantified.

In our study, we were also successful in identifying a suitable positive standard antiserum that recognizes human GnRH-R reliably, and that can be used by other research teams for independent studies on this issue. Importantly, the rabbit antibodies used as standard are also efficiently recognized by protein A during immunoprecipitation, as expected from its ability to bind IgG from different species [32]. However, in our study, the prevalence of natural GnRH-R-aAb was very low and not different between healthy controls and European PCOS patients. This finding indicates that the GnRH-R can be recognized as an antigen, but that it does not constitute a relevant diagnostic parameter in PCOS, in contrast to a recent report [30]. Even our newly developed assay with full-length human GnRH-R expressed in human cells as bait for GnRH-R-aAb seems not to be of diagnostic value for predicting PCOS risk or accelerating diagnosis. Nevertheless autoimmunity to GnRH-R does happen and might develop in selected cases to an extent that may become of pathological relevance, even though such rare cases were not present in our analysis. Even though the two PCOS patients identified as positive for GnRH-R-aAb displayed a particular pattern of circulating androgens in comparison to control and to the other PCOS patients from the same cohort (PCOS-A), the



**Fig 4. Steroid hormone levels in the two patients with high GnRH-R-aAb concentrations in comparison to healthy controls and other PCOS patients.** Two adult female PCOS patients were identified as highly positive for GnRH-R-aAb (PCOS #175; red cross, #225; blue cross). Both patients displayed elevated androgen concentrations in comparison to the reference range of healthy adult women (Ref. Range, green bar), and also in comparison to the other samples from the same cohort of PCOS patients (PCOS-A) (mean  $\pm$  SD; black symbols with error bars).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249639.g004>

prevalence of GnRH-R-aAb in PCOS was very low, the concentrations of the GnRH-R-aAb were not exceedingly high, and the deviation of the steroid levels from the range observed in PCOS is moderate. Collectively, we have to conclude that GnRH-R-aAb are very rare and not of general relevance for the diagnosis of PCOS in subjects with European ethnicity.

It is unfortunate, that the molecular pathogenesis of PCOS is not resolved and the phenotype is heterogeneous, hindering a fast and unequivocal diagnosis. PCOS presents as a highly multifactorial disease, where genetic predisposition, socioeconomic conditions, ethnicity, lifestyle and metabolic factors, as well as inflammatory and immunological reactions are causally involved and interact [12,33,34]. An autoimmune nature of PCOS still is a reasonable theory, in view that other autoimmune diseases and certain aAb are observed in PCOS with a higher

frequency than in the general population [2,16,17]. It was thus unexpected and disappointing to identifying only few positive samples for GnRH-R-aAb in the full collection of samples tested, i.e., a total prevalence of 1.4% (15/1051) only, with just 0.3% being highly positive. Using the same technique of constructing an antigen receptor fusion protein with luciferase as reporter at the intracellular C-terminus, we identified around 10% of subjects positive for aAb to the IGF1-receptor (IGF1R-aAb) [28]. The IGF1R-aAb proved to inhibit growth hormone signaling and proliferation in vitro [28], and were associated with low muscle strength in adolescent subjects [35]. Due to the very small number of positive samples identified in the current study, a similar analysis on a potential physiological role of natural GnRH-R-aAb is not possible. A reason for the low prevalence of GnRH-R-aAb may be given in the nature of the protein as a GPCR, with only small portions of the protein exposed to the extracellular space, i.e., the N-terminus and the three small extracellular loops. This feature may have also contributed to the relatively low concentrations of the GnRH-R-aAb identified, barely surpassing the noise level in several of the statistically positive samples, leaving three samples only with GnRH-R-aAb concentrations in a considerable range that may be disease-relevant, as the disruptive effects of aAb on physiological or endocrine pathways usually correlates to aAb titer [36].

This low prevalence is in contrast to e.g. the TSH-receptor (TSH-R), which likewise belongs to the family of GPCR. Here, the extracellular domain is huge, and different aAb to the TSH-R are known capable of antagonizing TSH signaling or even of acting positively like TSH and causing constant stimulation leading to Graves' disease and hyperthyroidism [37]. Until now, it appears that the complete full-length and correctly processed GPCR molecule is necessary as antigen to reliably measuring TSH-R-aAb, and smaller subdomains or peptides would not be suitable or sufficient [38]. More elaborate bioassays have recently been generated and described capable of discriminating the nature of the TSH-R-aAb as stimulating or not [39]. With the rare occurrence of GnRH-R-aAb detected in our study, the generation of a similar bioassay for the purpose of testing biological effects of these aAb appears not warranted at present.

The inherent complexity of reliably measuring aAb to members of the GPCR family as potential antigens in human disease is a well-recognized issue, and attempts to detecting e.g. aAb against the beta1-adrenergic receptor in Chagas' disease by peptide-based assays failed until now [40,41]. A similar issue emerges when comparing the aAb prevalence reported for other membrane proteins, determined by peptide-based versus full-length protein assays, e.g. in case of the transporters for iodide. Here, peptide-based aAb assay have reported very high prevalence in different thyroid diseases, e.g. 84% of positive samples for the sodium-iodide symporter in Graves' disease [42], or 97.5% positive samples for pendrin in Hashimoto's disease [43]. These astonishing high values were not reproduced when full-length transporter molecules were used as antigens in radioligand binding assays [44], or when the transporters are used as antigens in the form of full-length fusion proteins with Luc [45]. Notably, the direct isotope labeling of the transporters and the Luc-based labeling yielded similar results, verifying the importance of full-length membrane proteins as bait in such analyses [44,45].

Our data do not argue against the notion of PCOS being an autoimmune disease in at least some patients, as there are many more relevant antigen candidates potentially affecting the gonadal axis and androgen concentrations, or the metabolic axes, body composition and insulin sensitivity. Prime candidates of the former are the pituitary receptors for LH and FSH, and comprehensive analyses for the potential involvement of aAb to these GPCR using full-length molecules as antigens are missing. Similarly, aAb to the insulin-receptor may be involved as they can affect insulin signaling along with metabolic control of the reproductive axis, and rare cases of high aAb levels to the insulin receptor have been described in ovarian overgrowth and hyperandrogenemia [46]. This hypothesis needs to be tested experimentally.

Among the strengths of our study are the high quality of the assay developed, its suitability for reproducible production and high throughput screening, and the demonstration of linearity of signals with a commercial antiserum as universally available standard. Moreover, the number of samples analyzed was sufficiently high to obtain a representative picture on the prevalence of natural GnRH-R-aAb in both healthy subjects and patients with PCOS. Finally, using full-length GnRH-R as antigen implies that all potentially relevant antigens were available and correctly processed to the sample tested, and it is unlikely that site-specific GnRH-R-aAb have escaped detection. Among the limitations of the study are the lack of knowledge on any potential clinical phenotype of the purchased set of healthy control samples, that we have analyzed cohorts of Caucasians only, and that we have not mapped the domain(s) recognized by the GnRH-R-aAb identified.

We conclude that the pathogenesis of PCOS remains poorly understood, and that the hypothesis of natural aAb to the GnRH-R constituting a frequent finding of predictive or diagnostic relevance for PCOS is not verified.

## Supporting information

**S1 File.**  
(PDF)

## Acknowledgments

We thank the colleagues, clinicians and technicians involved in obtaining the samples and complementing the PCOS database and serum banks, the patients for their kind participation, and Vartitér Seher, Gabriele Boehm and Anja Fischbach for excellent technical support.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Waldemar B. Minich, Christoph W. Haudum, Julia Münzker, Thomas Reinehr, Barbara Obermayer-Pietsch, Lutz Schomburg.

**Data curation:** Waldemar B. Minich.

**Formal analysis:** Lisa-Marie Sattler, Hanna A. Schniewind, Waldemar B. Minich, Christoph W. Haudum, Petra Nikdowitz, Julia Münzker, Gábor L. Kovács, Lutz Schomburg.

**Funding acquisition:** Barbara Obermayer-Pietsch, Lutz Schomburg.

**Investigation:** Lisa-Marie Sattler, Hanna A. Schniewind, Waldemar B. Minich.

**Methodology:** Lisa-Marie Sattler, Hanna A. Schniewind, Waldemar B. Minich.

**Project administration:** Barbara Obermayer-Pietsch, Lutz Schomburg.

**Resources:** Christoph W. Haudum, Petra Nikdowitz, Gábor L. Kovács, Thomas Reinehr, Barbara Obermayer-Pietsch, Lutz Schomburg.

**Supervision:** Lutz Schomburg.

**Validation:** Waldemar B. Minich, Christoph W. Haudum, Petra Nikdowitz.

**Writing – original draft:** Lisa-Marie Sattler, Hanna A. Schniewind, Lutz Schomburg.

**Writing – review & editing:** Julia Münzker, Gábor L. Kovács, Thomas Reinehr, Barbara Obermayer-Pietsch.

## References

1. Boivin J, Bunling L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod.* 2007; 22(6):1506–12. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem046> PMID: 17378819
2. Heifer-Fischmuth K, Waich K, Huebl W, Baumuehler K, Tempfer C, Heifer L. Serologic markers of autoimmunity in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility.* 2010; 93(7):2291–4. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.01.056> PMID: 19296936
3. Arduc A, Aydoek Dogan B, Bilmez S, Imga Nasiroglu N, Tuna MM, Isik S, et al. High prevalence of Hashimoto's thyroiditis in patients with polycystic ovary syndrome: does the imbalance between estradiol and progesterone play a role? *Endocrine research.* 2015; 40(4):204–10. <https://doi.org/10.3109/07435800.2015.1015730> PMID: 25622940
4. Bednarska S, Szejka A. The pathogenesis and treatment of polycystic ovary syndrome: What's new? *Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University.* 2017; 25(2):359–67. <https://doi.org/10.17219/acem/59380> PMID: 28791858
5. Torchen LC. Cardiometabolic Risk in PCOS: More than a Reproductive Disorder. *Curr Diab Rep.* 2017; 17(12):137. <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0956-2> PMID: 29128916
6. March WA, Moore VM, Willson KJ, Phillips DI, Norman RJ, Davies MJ. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum Reprod.* 2010; 25(2):544–51. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep399> PMID: 19910321
7. Gibson-Helm M, Teede H, Dunaif A, Dokras A. Delayed Diagnosis and a Lack of Information Associated With Dissatisfaction in Women With Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017; 102(2):604–12. <https://doi.org/10.1210/clinem.2016-2863> PMID: 27906550
8. Rosenfield RL, Ehmman DA. The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Hypothesis of PCOS as Functional Ovarian Hyperandrogenism Revisited. *Endocr Rev.* 2016; 37(5):467–520. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1104> PMID: 27459230
9. Spritzer PM, Barone CR, Oliveira FB. Hirsutism in Polycystic Ovary Syndrome: Pathophysiology and Management. *Curr Pharm Des.* 2016; 22(36):5603–13. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160720151243> PMID: 27510481
10. Lerchbaum E, Schwetz V, Rahe T, Giuliani A, Obermayer-Fietsch B. Hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome: exploration of the role of free testosterone and androstenedione in metabolic phenotype. *PLoS One.* 2014; 9(10):e108263. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108263> PMID: 25310662
11. Franks S. Controversy in clinical endocrinology: diagnosis of polycystic ovarian syndrome: in defense of the Rotterdam criteria. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(3):786–9. <https://doi.org/10.1210/er.2005-2501> PMID: 16418209
12. Andrade VH, Mata AM, Borges RS, Costa-Silva DR, Martins LM, Ferreira PM, et al. Current aspects of polycystic ovary syndrome: A literature review. *Revista da Associação Médica Brasileira.* (1992). 2016; 62(9):867–71. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.62.09.867> PMID: 28001262
13. Barber TM, Dimitriadis GK, Andreou A, Franks S. Polycystic ovary syndrome: insight into pathogenesis and a common association with insulin resistance. *Clinical medicine (London, England).* 2016; 16(3):262–6. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.16-3-262> PMID: 27251917
14. Wang J, Wu D, Guo H, Li M. Hyperandrogenemia and insulin resistance: The chief culprit of polycystic ovary syndrome. *Life Sci.* 2019; 236:116940. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116940> PMID: 31604107
15. Gilrtborg D, Andersen M. Medical comorbidity in polycystic ovary syndrome with special focus on cardiometabolic, autoimmune, hepatic and cancer diseases: an updated review. *Current opinion in obstetrics & gynecology.* 2017; 29(6):390–6. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000410> PMID: 28901968
16. Mobeen H, Alzai N, Khashif M. Polycystic Ovary Syndrome May Be an Autoimmune Disorder. *Scientifica.* 2016; 2016:4071735. <https://doi.org/10.1155/2016/4071735> PMID: 27274883
17. Petrikova J, Lazurova I. Ovarian failure and polycystic ovary syndrome. *Autoimmunity reviews.* 2012; 11(6–7):A471–8. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.11.010> PMID: 22154711
18. Lass N, Kleber M, Winkel K, Wunsch R, Reinhr T. Effect of lifestyle intervention on features of polycystic ovarian syndrome, metabolic syndrome, and intima-media thickness in obese adolescent girls. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96(11):3533–40. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-1609> PMID: 21880803
19. Alborzi S, Tavazoo F, Dehaghani AS, Ghaderi A, Alborzi S, Alborzi M. Determination of anti-ovarian antibodies after laparoscopic ovarian electrocauterization in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility.* 2009; 91(4):1159–63. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.01.038> PMID: 18439597
20. John GK, Wang L, Naravati J, Twose C, Singh R, Mullin G. Dietary Alteration of the Gut Microbiome and Its Impact on Weight and Fat Mass: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Genes (Basel).* 2018; 9(3). <https://doi.org/10.3390/genes9030167> PMID: 29647587

21. Craig LB, Reynolds AC, Burks HR, Li H, Yu X, Aston CE, et al. Stimulating Autoantibodies Directed to the Gonadotropin Releasing Hormone Receptor Are Sensitive and Specific for Polycystic Ovary Syndrome. *Fertility and sterility*. 2017; 108(3):E259–E.
22. Cohen-Tannoudji J, Avel C, Garrel G, Couris R, Simon V. Decoding high Gonadotropin-releasing hormone pulsatility: a role for GnRH receptor coupling to the cAMP pathway? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012; 3:107. <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00107> PMID: 22969749
23. Bliss SP, Navratil AM, Xie J, Roberson MS. GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Front Neuroendocrinol*. 2010; 31(3):322–40. <https://doi.org/10.1016/j.ynme.2010.04.002> PMID: 20451543
24. Chaudhari N, Dawalbhakta M, Nampoothiri L. GnRH dysregulation in polycystic ovarian syndrome (PCOS) is a manifestation of an altered neurotransmitter profile. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018; 16(1):37. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0354-x> PMID: 29842911
25. Davies TF, Andersen S, Latif R, Nagayama Y, Barbesino G, Brito M, et al. Graves' disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2020; 6(1):52. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0184-y> PMID: 32616746
26. Becker NP, Goettl P, Mueller J, Wallukat G, Schimke I. Functional autoantibody diseases: Basics and treatment related to cardiomyopathies. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2019; 24:48–95. PMID: 30468647
27. Munzker J, Hofer D, Trummer C, Ubing M, Harger A, Fieber T, et al. Testosterone to Dihydrotestosterone Ratio as a New Biomarker for an Adverse Metabolic Phenotype in the Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocr Metab*. 2015; 100(2):653–60. <https://doi.org/10.1210/clinem.2014-2523> PMID: 25387259
28. Minich WB, Dehina N, Welsink T, Schwiebert C, Morgenthaler NG, Kohler J, et al. Autoantibodies to the IGF1 receptor in Graves' orbitopathy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 99(2):752–60. <https://doi.org/10.1210/c.2012-1771> PMID: 23264397
29. Caburet S, Fruchter RB, Legois B, Fellous M, Shalev S, Veltia RA. A homozygous mutation of GNRHR in a familial case diagnosed with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2017; 176(5):K9–K14. <https://doi.org/10.1530/EJE-16-0968> PMID: 28348023
30. Kem DC, Li H, Yu X, Weedon E, Reynolds AC, Forsythe E, et al. The Role of GnRH Receptor Autoantibodies in Polycystic Ovary Syndrome. *J Endocr Soc*. 2020; 4(8):bvaa078. <https://doi.org/10.1210/endoobvaa078> PMID: 32803090
31. Minich WB, Lenzner C, Morgenthaler NG. Antibodies to TSH-receptor in thyroid autoimmune disease interact with monoclonal antibodies whose epitopes are broadly distributed on the receptor. *Clin Exp Immunol*. 2004; 136(1):129–36. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02417.x> PMID: 15030524
32. Goudswaard J, Vanderdonk JA, Noordzij A, Vandam RH, Vaerman JP. Protein-a Reactivity of Various Mammalian Immunoglobulins. *Scand J Immunol*. 1978; 8(1):21–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1978.tb00492.x> PMID: 100867
33. Petrikova J, Lazurova I, Drapecka I, Vrbikova J, Kozzkova D, Figueroa J, et al. The prevalence of non organ specific and thyroid autoimmunity in patients with polycystic ovary syndrome. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*. 2015; 159(2):302–6. <https://doi.org/10.5507/bp.2014.062> PMID: 25485530
34. Engmann L, Jin S, Sun F, Legro RS, Poitlsky AJ, Hansen KR, et al. Racial and ethnic differences in the polycystic ovary syndrome metabolic phenotype. *Am J Obstet Gynecol*. 2017; 216(5):493 e1–e13. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.01.003> PMID: 28104402
35. Schwiebert C, Kuhn P, Becker NP, Welsink T, Keller T, Minich WB, et al. Antagonistic Autoantibodies to Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor Associate with Poor Physical Strength. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(2). <https://doi.org/10.3390/ijms21020463> PMID: 31940750
36. Tozzoli R. Receptor autoimmunity: diagnostic and therapeutic implications. *Auto Immun Highlights*. 2020; 11(1):1. <https://doi.org/10.1186/s13317-019-0125-5> PMID: 32127047
37. Rapoport B, McLachlan SM. Reflections on Thyroid Autoimmunity: A Personal Overview from the Past into the Future. *Horm Metab Res*. 2018; 50(12):840–52. <https://doi.org/10.1055/a-0725-9297> PMID: 30357776
38. Zophel K, Roggenbuck D, Scholl M. Clinical review about TRAb assay's history. *Autoimmunity reviews*. 2010; 9(10):695–700. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2010.05.021> PMID: 20594972
39. Kahaly GJ, Diana T, Olivo PD. Tsh Receptor Antibodies: Relevance & Utility. *Endocr Pract*. 2020; 26(1):97–106.
40. Becker NP, Muller J, Goettl P, Wallukat G, Schimke I. Cardiomyopathy—An approach to the autoimmune background. *Autoimmunity reviews*. 2017; 16(3):269–86. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.01.012> PMID: 28163240
41. Boege F, Westenfeld R, Jahns R. beta1AAb Determined by Peptide ELISA: A Signal in the Noise? *J Am Coll Cardiol*. 2017; 70(6):807–8. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.03.617> PMID: 28774387

42. Endo T, Kogai T, Nakazato M, Saito T, Kaneshige M, Onaya T. Autoantibody against Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter in the sera of patients with autoimmune thyroid disease. *Biochemical and biophysical research communications*. 1996; 224(1):92–5. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0888> PMID: [8694839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8694839/)
43. Yoshida A, Hisatome I, Taniguchi S, Shirayoshi Y, Yamamoto Y, Miike J, et al. Pendrin is a novel autoantigen recognized by patients with autoimmune thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94(2):442–8. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1732> PMID: [19050049](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19050049/)
44. Brix TH, Hegedus L, Weetman AP, Kemp HE. Pendrin and NIS antibodies are absent in healthy individuals and are rare in autoimmune thyroid disease: evidence from a Danish twin study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014; 81(3):440–4. <https://doi.org/10.1111/cen.12434> PMID: [24612066](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24612066/)
45. Eltthehadou AM, Mehl S, Renko K, Kasim RH, Schaefer JA, Minich WB, et al. Re-visiting autoimmunity to sodium-iodide symporter and pendrin in thyroid disease. *Eur J Endocrinol*. 2020; 183(6):571–80. <https://doi.org/10.1530/EJE-20-0566> PMID: [33055303](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33055303/)
46. Brown RJ, Joseph J, Cochran E, Gewert C, Sempke R, Gordon P. Type B Insulin Resistance Masquerading as Ovarian Hyperthecosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017; 102(6):1789–91. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-3674> PMID: [27911591](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27911591/)

## Lebenslauf

*„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“*

*„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“*

## **komplette Publikationsliste**

### Publikation 1:

Lisa-Marie Sattler, Hanna A. Schniewind, Waldemar B. Minich, Christoph W. Haudum, Petra Niklowitz, Julia Münzker, Gábor L. Kovács, Thomas Reinehr, Barbara Obermayer-Pietsch, Lutz Schomburg, *Natural autoantibodies to the gonadotropin-releasing hormone receptor in polycystic ovarian syndrome*, PLOS ONE, 2021 Apr 2;**16**(4):e0249639

### Publikation 2:

Hanna A. Schniewind, Lisa-Marie Sattler, Christoph W. Haudum, Julia Münzker, Waldemar B. Minich, Barbara Obermayer-Pietsch, Lutz Schomburg, *Autoimmunity to the Follicle-Stimulating Hormone Receptor (FSHR) and Luteinizing Hormone Receptor (LHR) in Polycystic Ovarian Syndrome*, Int. J. Mol. Sci, 2021 Dec 20;22(24):13667

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen beteiligten Personen bedanken, die mich auf meinem Weg der Dissertation unterstützt haben. Danken möchte ich somit dem gesamten Institut für Experimentelle Endokrinologie der Charité. Mein Wunsch, Endokrinologin zu werden und auch in diesem Bereich zu promovieren, hat mich zu euch geführt. Etwas Besseres hätte mir nicht passieren können. Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Lutz Schomburg, Dr. Waldemar B. Minich und Hanna A. Schniewind!

Danke, lieber Lutz, für die sehr gute Betreuung dieser Arbeit, dass du immer ein offenes Ohr für Hanna und mich hattest, für die Beantwortung der unzähligen E-Mails und Fragen, die wir dir geschickt bzw. gestellt haben. Vor allem möchte ich dir für die Unterstützung bei der Fertigstellung der Publikation und das Einreichen bei PLOS ONE danken. Der Weg war etwas steinig, doch am Ende wurde alles gut. Danke!

Lieber Waldemar – ein Labor ohne dich kann ich mir gar nicht vorstellen. Danke für das geduldige Erklären, für das Dasein bei Problemen und für das Anlernen der verschiedensten Methoden.

Meine liebe Hanna - ein großes Dankeschön an dich! Gemeinsam haben wir es geschafft! Immunopräzipitationsassays mit dir machen einfach Spaß!

Ein großes Dankeschön geht auch an Katja Schreiber – wahrlich ein Laborengel. Du wusstest einfach immer, wo wir was finden. Auch danken möchte ich Gabriele Boehm, Anja Fischbach, Julian Hackler und Qian Sun für die Beantwortung jedweder Fragen.

Ebenfalls danken an dieser Stelle möchte ich meinen Eltern. Danke, dass ihr immer für mich da seid, mich immer unterstützt habt und nie müde wurdet, mich zu ermutigen.

Ich hoffe sehr, dass der Kontakt zum Institut für Experimentelle Endokrinologie der Charité bestehen bleibt und ich euch auch in Zukunft als Ärztin bei weiteren spannenden Arbeiten unterstützen darf.