

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Sven Mahner

**Maternale und paternale M2/Annexin-A5-Trägerschaft als Risikofaktor für  
rezidivierendes Implantationsversagen im Rahmen von IVF/ICSI**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Xenia Ennerst  
aus München

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Nina Rogenhofer
Mitberichterstatter:	PD Dr. Robert Ochsenkühn PD Dr. Marlene Reithmair
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	15.07.2021

Meiner Familie in großer Dankbarkeit gewidmet

---

# Inhalt

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1.	<b>Ungewollte Kinderlosigkeit</b>	<b>3</b>
1.2.	<b>Implantation</b>	<b>3</b>
1.2.1.	Physiologie der Implantation	4
1.2.2.	Rezidivierendes Implantationsversagen	9
1.3.	<b>Annexin A5</b>	<b>13</b>
1.3.1.	Die Proteinfamilie der Annexine	13
1.3.2.	Eigenschaften des Annexin A5	14
1.3.3.	Rolle des Annexin A5 in der Schwangerschaft	16
1.4.	<b>Die M2-Mutation im Annexin A5-Gen</b>	<b>17</b>
1.4.1.	M2/ANXA5 und Schwangerschaftskomplikationen	18
1.4.2.	M2/ANXA5 und rezidivierende Spontanaborte	19
1.4.3.	M2/ANXA5 und Kinderwunsch	19
1.5.	<b>Fragestellung dieser Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1.	<b>Studienkollektive</b>	<b>21</b>
2.1.1.	Studiengruppe	21
2.1.2.	Kontrollgruppen	22
2.1.3.	Patientenaufklärung, Ethikvotum, Datenschutz	22
2.2.	<b>Untersuchungsmethoden</b>	<b>23</b>
2.2.1.	Erhobene Patientendaten	23
2.2.2.	Probengewinnung	24
2.2.3.	Genotypisierung	24
2.3.	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>25</b>

---

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>26</b>
3.1.	<b>Demographische Daten und Schwangerschaftshistorie bei Behandlungsbeginn</b>	<b>26</b>
3.2.	<b>Indikationen für IVF/ICSI</b>	<b>27</b>
3.3.	<b>Reproduktionsmedizinische Therapie</b>	<b>29</b>
3.3.1.	Durchgeführte Therapie	29
3.3.2.	Ergebnisse der Therapie	29
3.4.	<b>Analyse des Annexin-A5-Gens</b>	<b>31</b>
3.4.1.	Genetische Analyse der Studiengruppe und Kontrollgruppen	31
3.4.2.	Allelfrequenzen	32
3.4.3.	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	33
3.4.4.	Statistische Auswertung	33
3.5.	<b>Subgruppenanalysen</b>	<b>34</b>
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>39</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>43</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang</b>	<b>45</b>
6.1.	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>45</b>
6.2.	<b>Patientenaufklärung</b>	<b>47</b>
6.3.	<b>Zusage der Ethikkommission</b>	<b>59</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>60</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>70</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>71</b>
<b>10.</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>72</b>

---

# 1. Einleitung

## 1.1. Ungewollte Kinderlosigkeit

Unfruchtbarkeit wird als ein Zustand definiert, bei dem bei einem Paar innerhalb von zwei Jahren regelmäßigem, ungeschütztem Geschlechtsverkehr keine Schwangerschaft eintritt [1]. Je nach Quelle sind 5 bis 15 % aller Paare in Deutschland ungewollt kinderlos [2; 3]. Bei ca. 30 % liegt die Ursachen für die Unfruchtbarkeit bei der Frau, bei ca. 30 % beim Mann, bei ca. 30 % bei beiden Partnern und bei ca. 10 % liegt eine idiopathische Infertilität vor [4]. Zu den häufigen Ursachen bei der Frau gehören hierbei eine unzureichende Tubendurchgängigkeit, endokrinologische Störungen wie das Syndrom polyzystischer Ovarien (PCOS) oder Endometriose [5]. Beim Mann liegt meist eine unzureichende Spermienqualität vor [6].

Daher nehmen Paare in den letzten Jahren vermehrt reproduktionsmedizinische Behandlungen wie die In-Vitro-Fertilisation (IVF) oder intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) in Anspruch. Hierbei werden Eizellen nach der Punktion mit Partnersperma inkubiert (IVF) bzw. dieses gezielt in die Eizellen injiziert (ICSI). Nach drei bis fünf Tagen Inkubation werden ein bis drei gut entwickelte Embryonen bzw. Blastozysten in die Gebärmutter eingespült und die Implantation dieser erhofft [7]. Die Lebendgeburtrate pro Embryonentransfer, die sogenannte Baby Take Home-Rate betrug in Deutschland im Jahr 2018 20,4 % (IVF) bzw. 20,1 % (ICSI) [8].

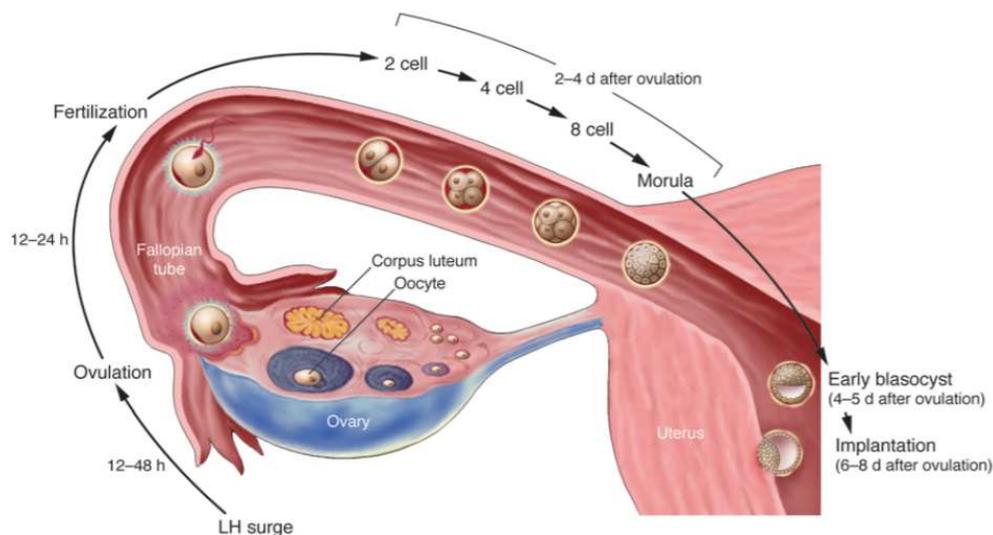
## 1.2. Implantation

Die Implantation bzw. Nidation bezeichnet die Einnistung einer befruchteten Eizelle in das Endometrium am fünften bis sechsten Tag nach der Befruchtung. Sie befindet sich hierbei im Stadium der Blastozyste [9]. Für eine erfolgreiche Implantation müssen drei Voraussetzungen erfüllt sein:

1. Der Embryo muss gesund und intakt sein.
2. Das Endometrium muss sich im differenzierten Stadium befinden.
3. Die Koordination des Implantationsvorgangs muss durch funktionierende Kommunikation zwischen Blastozyste und Endometrium gewährleistet werden.

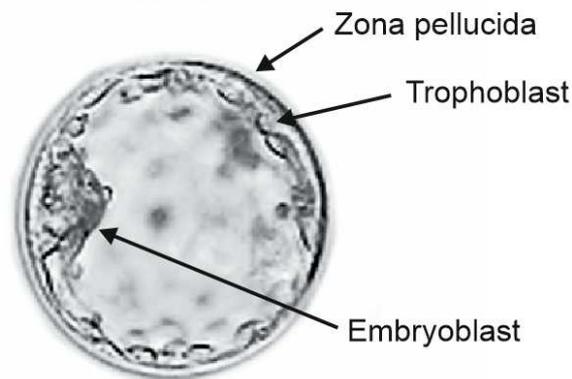
Nur wenn alle drei Voraussetzungen erfüllt sind, kann eine erfolgreiche Implantation erfolgen [9–11].

### 1.2.1. Physiologie der Implantation



**Abb. 1: Zeitlicher Ablauf von Ovulation, Fertilisation und Implantation, modifiziert nach [11]**

Während die Zygote durch die Tube wandert, beginnen bereits die ersten Zellteilungen (Abb. 1). Nach etwa drei Tagen entsteht hierdurch die Morula, eine von der Zona pellucida umschlossene, ungerichtete Häufung von 8 bis 16 Zellen. Nach etwa zwei weiteren Tagen wird das Stadium der Blastozyste erreicht, hierbei findet eine Differenzierung zum Embryoblast (innere Zellmasse) und dem umgebendem Trophektoderm statt (Abb. 2), zudem löst sich die Zona pellucida auf („hatching“). Inzwischen hat die Blastozyste, die nun ca. 32 bis 64 Zellen umfasst, bereits das Cavum uteri erreicht [9].

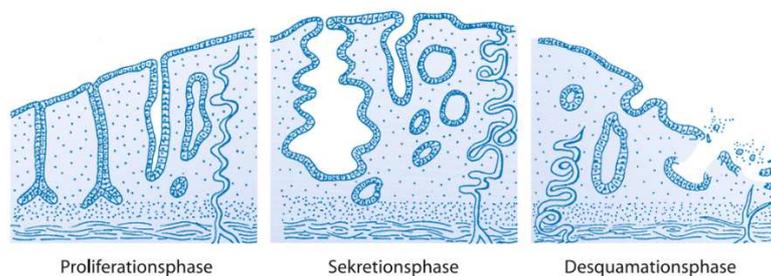


**Abb. 2: Humane Blastozyste an Tag 5. Nach [12]**

Beim Menschen gibt es je Zyklus ein enges zeitliches Fenster von vier bis fünf Tagen, in dem sich das Endometrium differenziert sowie rezeptiv ist und somit eine Implantation möglich ist. Bei einem 28-tägigen Zyklus liegt das Implantationsfenster zwischen den Zyklustagen 19 bis 24 [13]. Bei der assistierten Reproduktion mittels IVF oder ICSI wird der Embryo am dritten Tag bzw. die Blastozyste am fünften Tag nach der Eizellpunktion in das Cavum uteri eingespült [14].

Für eine erfolgreiche Einnistung ist eine Differenzierung des Endometriums essenziell. Den eigentlichen Prozess der Implantation kann man in Apposition, Adhäsion und Invasion unterteilen.

### Differenzierung des Endometriums:



**Abb. 3: Veränderungen des Endometriums im Menstruationszyklus [15]**

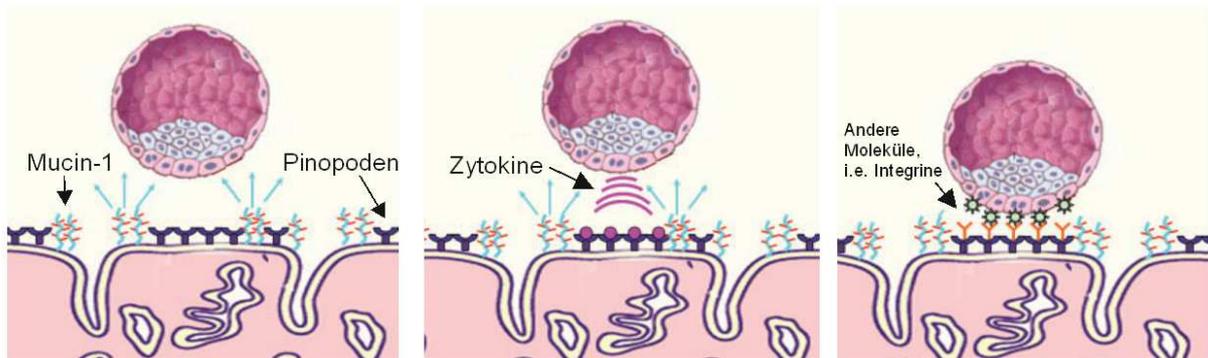
Abb. 3 zeigt die physiologische Differenzierung des Endometriums. Nach Abschluss der Desquamationsphase geht das Endometrium in die Proliferationsphase über. Durch das während der Follikelreifung gebildete

---

Östrogen proliferieren die Epithelzellen des Endometriums, sodass dieses eine Dicke von bis zu 10 mm annimmt. Das vom Corpus luteum nach der Ovulation produzierte Progesteron führt zu einer weiteren Differenzierung des Endometriums (Sekretionsphase). Es bilden sich Spiralarterien aus. Die Glandulae uterinae vergrößern sich und bilden eine Spiralförmigkeit. Sie sezernieren unter Progesteroneinfluss ein glykogenreiches Sekret und Zytokine in das Cavum uteri. Eine wichtige Rolle spielen hierbei die Sezernierung von epidermalemem Wachstumsfaktor (EGF), transformierenden (TGF-a und -b) und insulinähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF), die das Wachstum der Stromazellen fördern [14]. Die Stromazellen nehmen eine epitheloide Form an und lagern zur Vorbereitung auf die Implantation Glykogen und Lipide ein, die dem Embryo als Nährstoffe dienen sollen. Dies wird als Prädezidualisierung bezeichnet und geschieht unabhängig von einer eventuellen Embryoimplantation. Zudem lagern sich natürliche Killerzellen im Endometrium ein. Der Prozess der Dezidualisierung wird nach einer Implantation weitergeführt [15].

#### **Apposition und Adhäsion:**

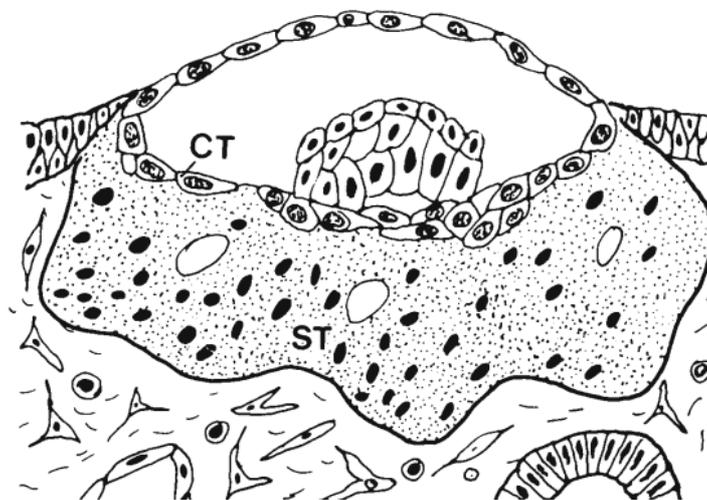
Für die Implantation muss der Embryo an eine geeignete Einnistungsstelle im Cavum uteri gelenkt werden. Die exakten molekularen Mechanismen der Apposition und Adhäsion sind höchst komplex und Gegenstand aktueller Forschungen. Es wird angenommen, dass das Endometrium zum Teil mit Muzinen (v.a. Mucin-1) bedeckt ist. An muzinbedeckten Stellen ist es dem Embryo nicht möglich, sich zu implantieren, sodass dieser damit zu muzinfreien Stellen im Uterus gelenkt wird, wo eine erfolgreiche Implantation wahrscheinlicher ist [14; 16–18]. Die Adhäsion der inzwischen geschlüpften Blastozyste wird durch verschiedene molekulare Mechanismen unterstützt (siehe Abb. 4).



**Abb. 4: Überblick über die Mechanismen der Apposition und Adhäsion. Nach [19]**

Die Kommunikation zwischen Integrinen, die sowohl auf Blastozysten, als auch auf dem Epithel exprimiert werden, scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen [20]. Es wird angenommen, dass Osteopontin als Brückenprotein die beiden Seiten der Integrine verbindet und somit zur Adhäsion entscheidend beiträgt [21].

#### **Invasion:**



**Abb. 5: Blastozysteninvasion. CT: Zytotrophoblast; ST: Synzytiotrophoblast [22]**

Die Implantation findet beim Menschen zwischen dem fünften und sechsten Tag post ovulationem statt. Bei der Invasion der Blastozyste in das Endometrium dringen die sich am Pol der Blastozyste befindenden Trophoblastzellen in das Endometrium ein (siehe Abb. 5). Der Trophoblast teilt sich im weiteren Verlauf in zwei Zellschichten auf, den innen liegenden Zytotrophoblasten (ZT) und den außen liegenden Synzytiotrophoblasten (ST), der sich durch Verschmelzung

---

benachbarter Trophoblasten bildet [23]. Die begonnene Prädezidualisierung setzt sich bei Eintritt einer Schwangerschaft weiter fort. Die endometrialen Stromazellen wandeln sich während dieses Prozesses zu Deziduazellen um, die vor allem sekretorische und endokrine Aufgaben übernehmen [24]. Während der Invasion wächst die Blastozyste vollständig in das Stratum functionale des Endometriums ein.

Der Prozess der Invasion ist von zahlreichen Faktoren abhängig, von denen ausgewählte im Folgenden erläutert werden.

#### Hormone: Östrogen und Progesteron

Die Rolle der Hormone Östrogen und Progesteron ist seit langem bekannt und gut erforscht [25]. Der präovulatorische Anstieg von  $17\beta$ -Estradiol bewirkt die Proliferation und Differenzierung der Epithelzellen des Endometriums. Das Corpus luteum produziert weiterhin Progesteron, welches die Proliferation und Differenzierung der Stromazellen stimuliert [10].

#### Uterine natürliche Killerzellen-Zellen und Immuntoleranz

Die uterinen natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) stellen die häufigste Immunezellart des Endometriums dar und spielen eine wichtige Rolle bei der Immuntoleranz dem Embryo gegenüber, der als genetisch fremd eigentlich vom Immunsystem erkannt und bekämpft werden würde [26]. Die uterinen NK-Zellen können den „major histocompatibility complex“ (MHC) humanes Leukozytenantigen (HLA-) G, der von den einwachsenden Trophoblastzellen exprimiert wird, erkennen. Dies scheint für die uterinen NK-Zellen ein wichtiges Signal zu sein, diese Zellen nicht zu lysieren [27]. Ein weiterer Faktor, der zur Immuntoleranz beiträgt ist das Fehlen der MHC-Klasse-I-Komplexe HLA-A und HLA-B auf dem Trophoblasten [28].

#### Prostaglandine

Prostaglandine sind für die Implantation essentiell und werden vor allem von den Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX-1, COX-2) produziert [29]. Es gibt Hinweise darauf, dass bei Patientinnen mit einem rezidivierenden Implantationsversagen eine verminderte endometriale COX-2 Expression vorliegt, sodass dieses eine wichtige Rolle in der Implantation spielen könnte [30].

### Leukämiehemmender Faktor (LIF)

Der leukämiehemmende Faktor (LIF) ist ein Zytokin der Interleukin-Klasse 6. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine Embryoimplantation bei LIF-defizienten Mäusen nicht möglich ist [31]. Diese Ergebnisse lassen sich allerdings nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragen [32]. Aktuellere Studien konnten zeigen, dass eine Behandlung mit rekombinantem LIF bei Patientinnen mit rezidivierendem Implantationsversagen nicht zu einer signifikanten Verbesserung der Implantationsraten nach IVF/ICSI führen konnten [33].

#### **1.2.2. Rezidivierendes Implantationsversagen**

Ein rezidivierendes Implantationsversagen (RIF) liegt vor, wenn trotz mehrmaliger Embryotransfers keine Schwangerschaft eintritt [34; 35]. Es existiert keine allgemeingültige Definition [36–38]. Die Problematik der Definition ist dadurch bedingt, dass die Implantationswahrscheinlichkeit pro Zyklus nur etwa 30 % beträgt. Somit liegt die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei Embryonen nicht implantieren bei  $(1-0,3)^2 = 0,49$ , bzw. bei  $(1-0,3)^4 = 0,24$  nach Transfer von vier Embryonen [39]. Kriterien für verschiedene Definitionsansätze sind die Anzahl der Embryonentransfers, die Anzahl der transferierten Embryonen sowie eine Kombination beider Merkmale [40]. Mögliche Definitionen sind beispielsweise drei oder mehr Embryonentransfers oder der Transfer von  $\geq 10$  Embryonen in mehreren Transfers [35], zwei aufeinanderfolgende Embryonentransfers von insgesamt vier Embryonen oder zwei Blastozysten [40] oder der Transfer von  $\geq 8$  8-Zellern bzw.  $\geq 5$  Blastozysten ohne Schwangerschaftseintritt [36], jeweils mit Embryonen von hoher Qualität [36]. Im Rahmen dieser Studie wurde im Kinderwunschzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität eine RIF-Definition erarbeitet, die Patientinnen  $\leq 41$  Jahren ohne Schwangerschaftseintritt nach vier konsekutiven Transfers von mehr als vier Blastozysten oder acht Pronucleus (PN)-Zellen optimaler Qualität einschließt. Das höhere Implantationspotential bei Blastozystentransfer [41; 42] wird somit berücksichtigt, ebenso wie die geringeren Schwangerschaftsraten bei steigendem maternalem Alter [43; 44].

### **1.2.2.1. Maternale Faktoren**

#### Anatomische Faktoren

Das Vorliegen von Hydrosalpingen, Endometriumpolypen, Myomen oder Uterusfehlbildungen wie ein Uterus septus kann die Implantationsrate verringern [34; 45; 46]. Beim Vorliegen eines Implantationsversagens sollten daher eine Hysteroskopie oder weitere diagnostische Schritte diskutiert werden.

#### Endometriale Faktoren

Patientinnen mit RIF zeigen eine hohe Prävalenz an chronischen Endometritiden von 14 – 46 % je nach Quelle [47; 48]. Inflammatorische Prozesse führen zu einer verminderten Trophoblasteninvasion und somit einer verminderten Implantationsrate [49]. Ein weiterer Faktor ist die Endometriumdicke. Es zeigten sich signifikant höhere Schwangerschaftsraten nach IVF, wenn die Endometriumdicke > 9 mm betrug [50].

Vom Endometrium exprimierte Prostaglandine spielen ebenso eine wichtige Rolle für eine erfolgreiche Implantation [29] und werden von COX-1 und COX-2 produziert [51]. Die Exprimierung der COX-1 und -2 wird durch Progesteron hochreguliert [52]. Studien konnten zeigen, dass RIF-Patientinnen im Vergleich zu fertilen Frauen eine verminderte endometriale COX-2 Expression aufweisen [30].

#### Thrombophilie

Der Zusammenhang zwischen RIF und Thrombophilien, sowohl hereditärer als auch erworbener Art (Prothrombin-, Faktor-V-Leiden-Mutation, Protein-C/Protein-S-Mangel, Antiphospholipidsyndrom (APLS)) wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Azem konnte zeigen, dass thrombophile Genmutationen die Implantationsraten beeinflussen [53]. Patientinnen mit vier oder mehr erfolglosen IVF-Zyklen wiesen etwa 3,6-mal so häufig thrombophile Genmutationen auf wie Patientinnen mit mindestens einer spontanen, unkomplizierten Schwangerschaft. Martinelli et al. konnten diesen Zusammenhang mit einer größeren Stichprobe nicht bestätigen [54]. Folgestudien konnten jedoch den Zusammenhang zwischen thrombophilen Genmutationen und RIF erneut nachweisen [55; 56]. Zudem konnte gezeigt

werden, dass das Vorliegen mehrerer thrombophiler Genmutationen hochsignifikant mit RIF assoziiert ist und RIF-Paare daher auf thrombophile Genmutationen untersucht werden sollten [57]. Eine neuere Metanalyse zeigte jedoch erneut keinen Zusammenhang zwischen thrombophilen Genmutationen und RIF [58].

Der vermutete Pathomechanismus zeigt sich ähnlich zu dem hereditärer Aborte und beschreibt „einen gestörten Blutfluss zwischen Endometrium und Plazenta“, der entweder „die normale endometriale Rezeptivität behindert und auf der anderen Seite Fehlgeburten auslösen kann.“ [59]

Qublan et. al konnten nach Therapie mit niedermolekularen Heparinen signifikant höhere Schwangerschafts- und Lebendgeburtsraten bei Patientinnen mit RIF und mindestens einer nachgewiesenen Thrombophilie nachweisen [60].

#### Immunologische Faktoren

Die erfolgreiche Implantation eines Embryos stellt einen komplexen immunologischen Prozess dar, da dieser zu 50 % genetisch fremdes Material enthält (vgl. 1.2.1). Es gibt Hinweise darauf, dass Paare mit einer hohen HLA-Kompatibilität vermehrt unter rezidivierenden Spontanaborten (RSA) [61] und RIF [62] leiden. Der genaue molekulare Mechanismus ist aktuell noch unbekannt. Eine Immunisierungstherapie mit Partnerlymphozyten wurde in Studien mit kontroversen Ergebnissen erforscht [61; 63], sollte jedoch aufgrund potentieller Nebenwirkung für Mutter [64] und Fetus [65] nicht mehr durchgeführt werden. Weitere Therapieansätze stellen die intravenöse Immunglobulingabe [62] und die intravenöse Intralipidgabe [66] dar.

#### **1.2.2.2. Embryonale Faktoren**

Für eine erfolgreiche Implantation spielt auch der Embryo selbst eine essentielle Rolle. Bei nicht erfolgreicher Implantation sind bei etwa einem Drittel der Fälle embryonale Gründe ursächlich [19].

#### Genetische Faktoren

---

Die Genetik des Embryos spielt sowohl bei der natürlichen als auch bei der assistierten Reproduktion eine wichtige Rolle. Chromosomale Aberrationen des Embryos sind für etwa 50 bis 70 % der Spontanaborte ursächlich [67]. Ein erhöhtes Risiko für Chromosomenstörungen liegt bei erhöhtem maternalem Alter, RSA-Patientinnen und Trägerinnen und Trägern von Chromosomenaberrationen vor [68]. Vorliegende Störungen können numerische Chromosomenaberrationen wie Aneuploidie (z.B. Monosomie, Trisomie), Polyploidie (z.B. Triploidie) oder strukturelle Chromosomenaberrationen wie Inversionen, Deletionen oder Translokationen sein. Träger von balancierten Translokationen sind selbst phänotypisch unauffällig, haben jedoch ein erhöhtes Risiko, Nachkommen mit unbalancierten Translokationen (z.B. Translokations-Trisomie-21) zu zeugen. Eine Metaanalyse zeigte, dass etwa 27 % von 2434 im Rahmen von IVF-Programmen untersuchten Eizellen chromosomale Störungen aufwiesen [69]. Mittels Präimplantationsdiagnostik untersuchte Embryonen von RIF-Paaren zeigten eine etwa 1,9 mal höhere Rate an numerischen Chromosomenstörungen als die Kontrollgruppe [70]. Es wird daher empfohlen, RIF-Paare zu karyotypisieren um eventuelle Chromosomenanomalien bei dem Paar zu detektieren.

#### Zona pellucida und gestörtes Hatching

Die Zona pellucida ist eine Glykoproteinschicht, die eine Schutzschicht um die Oozyte formt. Sie erleichtert den Transport durch die Tube Richtung Cavum uteri und schützt den Embryo dabei vor Immunzellen und Mikroorganismen [71]. Beim Hatching „schlüpft“ der Embryo durch die Zona pellucida, damit sich dieser in das Endometrium einnisten kann [72]. Ursachen für ein gestörtes Hatching bei IVF/ICSI-Patientinnen können eine Verhärtung der Zona pellucida sein, bedingt durch IVF-Kulturbedingungen oder Kryokonservierung [73; 74]. Weitere Probleme können durch fehlende Synchronisation der Entwicklung des Embryos und des Endometriums bedingt durch die ovarielle Stimulation entstehen [75]. Durch künstlich assistiertes Hatching können höhere Schwangerschaftsraten erzielt werden [76].

## 1.3. Annexin A5

### 1.3.1. Die Proteinfamilie der Annexine

Die Annexine bilden eine Familie von Proteinen, die calciumabhängig an negativ geladene Phospholipide in der Zellwand binden. Annexine weisen eine spezielle molekulare Struktur auf, die es ermöglicht, reversibel an Membranen zu binden. Dies wird durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierte Bindestelle ermöglicht, die sich aus vier wiederholten  $\alpha$ -helikalen Strukturen (siehe Abb. 6), welche von jeweils 70 Aminosäuren gebildet werden, mit zentralem, dichtem hydrophoben Kern zusammensetzt [77].

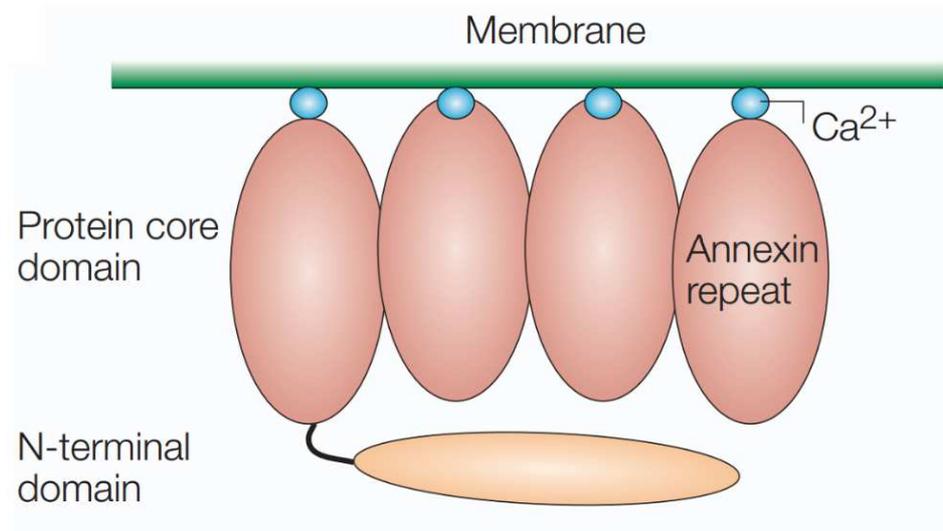


Abb. 6: Struktur der Annexine [78]

Beim Menschen und anderen Wirbeltieren sind zwölf verschiedene Annexine bekannt, insgesamt kennt man jedoch mehr als 500 verschiedene Annexine. Die Annexin-Subtypen unterscheiden sich sowohl durch verschiedene N-terminale Domänen, als auch durch anders positionierte  $\text{Ca}^{2+}$ - und Membranbindestellen innerhalb des Kerns, was zu verschiedenen Funktionen in vivo führt. Humane Annexine sind in der Regel intrazelluläre Proteine, jedoch konnten Annexin A1, A2 und A5 auch extrazellulär, beispielsweise im Blut nachgewiesen werden [79]. Wie Annexine in den Extrazellularraum gelangen können, ist momentan noch unklar und Gegenstand aktueller Forschungen. Es ist bekannt, dass Annexine eine Rolle bei membranvermittelten Prozessen wie Endo- und Exozytose,

Entzündungsvorgängen, Apoptose, Thrombose, Fibrinolyse und der Blutgerinnung spielen [78; 80]. Im Folgenden wird auf die spezifischen Funktionen des Annexin A5 näher eingegangen.

### 1.3.2. Eigenschaften des Annexin A5

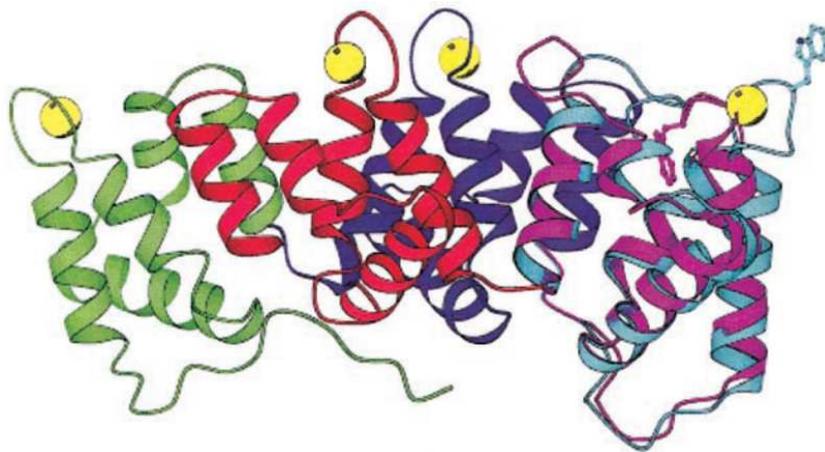


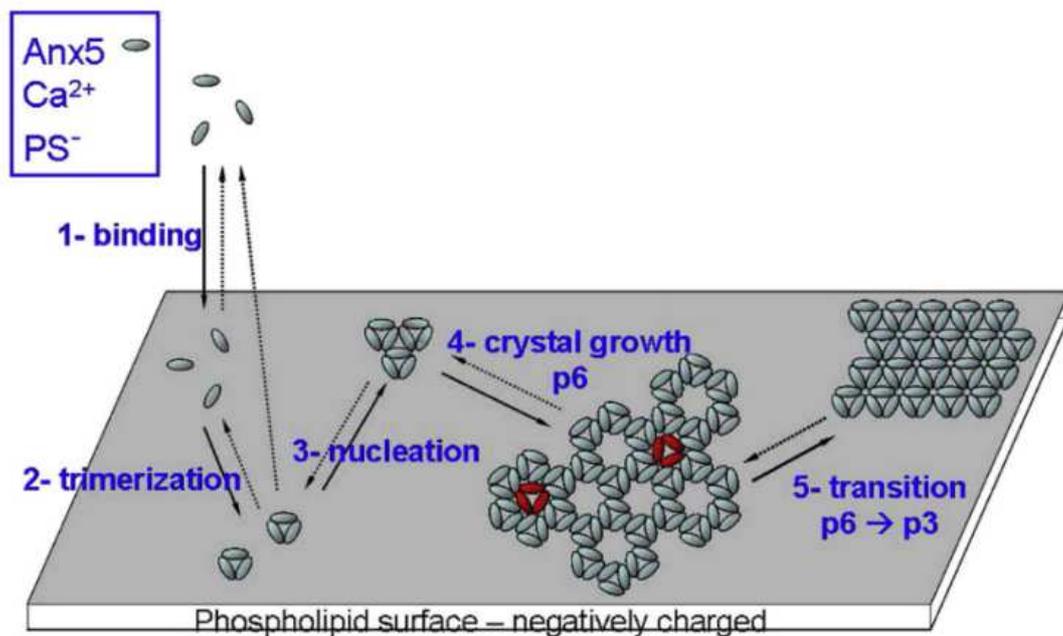
Abb. 7: Struktur des Annexin A5 [77]

Annexin A5 (Abb. 7) wurde Ende der 1970er Jahre zum ersten Mal aus humaner Plazenta isoliert und zunächst als placenta protein 4 bzw. placental anticoagulant protein bezeichnet. Als die molekulare Struktur des Proteins aufgeklärt wurde, zeigte sich, dass es sich um ein Annexin handelt und wurde seither als Annexin A5 (ANXA5) bezeichnet [81]. ANXA5 wird ubiquitär exprimiert, zeigt jedoch die höchsten Konzentrationen in Plazenta, Leber und Niere [82]. Das für ANXA5 kodierende Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 4 [83]. ANXA5 bindet calciumabhängig an Phosphatidylserin-exprimierende Membranen und lagert sich dabei zu Trimeren zusammen, die zweidimensionale Strukturen entlang der Membranen bilden [84].

#### 1.3.2.1. Annexin A5 und Zellmembranreparatur

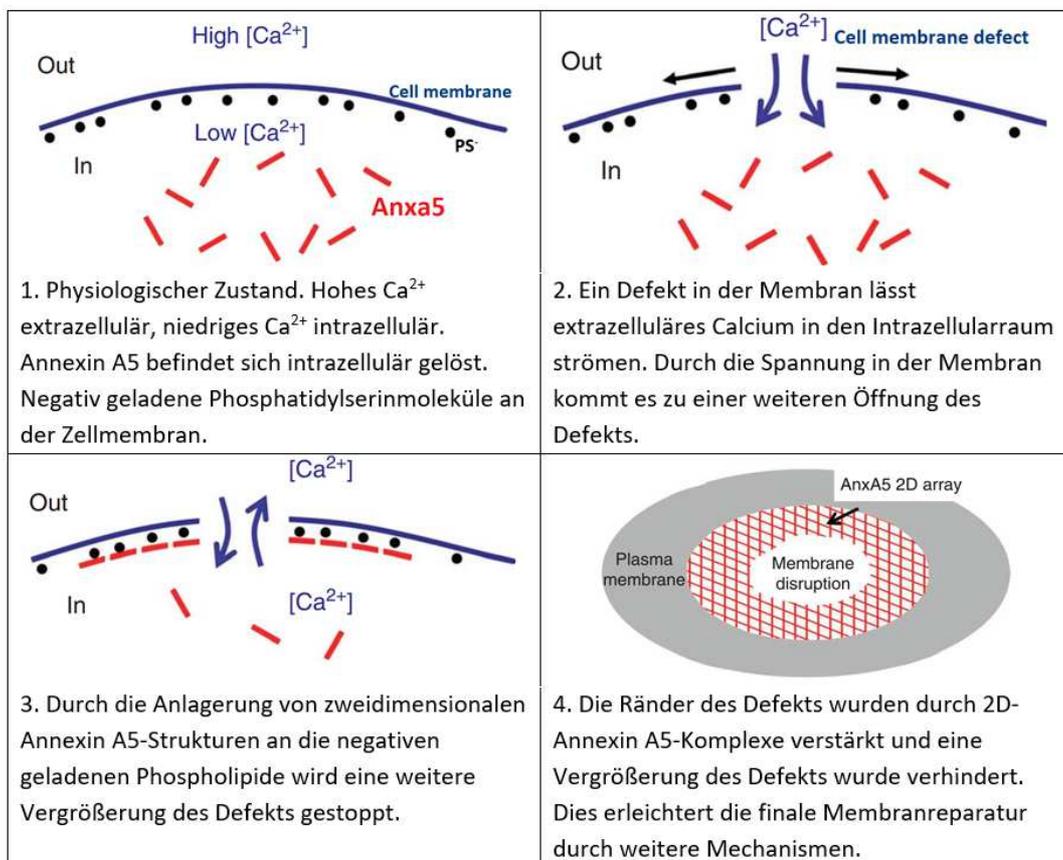
Gewebe wie Muskelzellen, Haut oder Gefäßendothel sind häufig mechanischem Stress ausgesetzt, was zu Einrissen in den Zellmembranen führen kann. Ein schnelles, effektives Membranreparatursystem ist hier essentiell, da eine

ineffektive oder fehlende Reparatur zum Zelltod führt [85]. Defekte in der Zellmembran führen zu einem Calciumeinstrom in die Zelle, worüber die Zellmembranreparatur gesteuert wird [86].



**Abb. 8: Bildung von 2D-Strukturen von Annexin A5 an negativ geladenen Phospholipidmembranen. Nach [87] nach [88]**

Wie in Abb. 8 gezeigt, bindet gelöstes ANXA5 in Anwesenheit von Calcium an negativ geladene Phospholipidmembranen und lagert sich zu Trimeren zusammen, die sich abhängig von Oberflächendichte und Calciumkonzentration zu verschiedenen zweidimensionalen Strukturen zusammenlagern [88]. Diese bilden mit der Membranoberfläche eine starke Bindung aus, die von der Stärke der negativen Ladung und von der Calciumkonzentration abhängig ist [89]. Abb. 9 zeigt die exakten molekularen Mechanismen der Reparaturmechanismen des ANXA5.



**Abb. 9: Mechanismus der Membranreparatur durch Annexin A5. Nach Bouter et al. (2011)**

Im Tierversuch wurden perivaskuläre Zellen von ANXA5-Knockout-Mäusen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen, die kein ANXA5 exprimierten, nicht in der Lage waren, künstlich erzeugte Membrandefekte zu reparieren. Dagegen wiesen die Zellen der Wildtyp-Mäuse eine schnelle und effektive Membranreparatur auf. Nach exogener Zugabe von ANXA5 konnten auch Zellen der ANXA-Knockout-Mäuse Membrandefekte reparieren [90].

### 1.3.3. Rolle des Annexin A5 in der Schwangerschaft

Annexine bilden etwa 1 bis 2 % der Proteine in der menschlichen Plazenta [91; 92]. ANXA5 wird vor allem auf der apikalen, die Chorionzotten bedeckenden Seite des ST exprimiert [93]. Der ST stellt eine Verschmelzung zahlreicher Zytotrophoblasten zu einem vielkernigen Synzytium dar und erfüllt in der Schwangerschaft wichtige Funktionen. Im Verlauf der Schwangerschaft dehnt

sich der ST durch Fusion mit weiteren Zytotrophoblasten immer weiter aus und erneuert sich so [23].

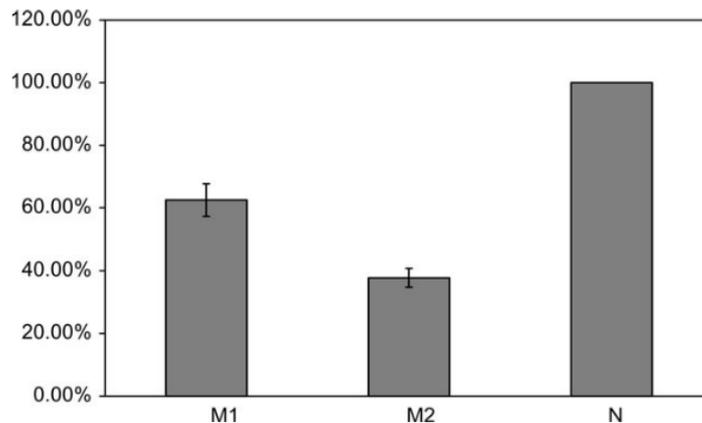
### **Membranreparatur in der menschlichen Plazenta**

Auf der apikalen Seite des ST, die sich im Kontakt mit dem mütterlichen Blut befindet, bilden sich im Verlauf der Schwangerschaft zahlreiche Mikrovilli aus, die die Oberfläche des ST deutlich vergrößern. Diese Mikrovilli sind durch den maternalen Blutfluss deutlichen Scherkräften und damit dem Risiko von Membranrupturen ausgesetzt. Zudem ergibt sich durch die kontinuierliche Erneuerung des ST durch die ZT, die diesem als Stammzellen dienen, Zellmaterial, das in den intervillösen Raum abgegeben wird. Die entstehenden Membrandefekte bedürfen ebenso einer Reparatur [94; 95]. Effektive Membranreparaturmechanismen sind für die Plazenta überlebensnotwendig.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ANXA5 an der Membranreparatur in perivaskulären Zellen der Maus beteiligt ist [90], stellte sich aufgrund der reichlichen Expression von ANXA5 auf dem ST die Frage, ob es auch dort an der Membranreparatur beteiligt ist. Carmeille et al. untersuchten sowohl ZT als auch ST in Chorionkarzinomzelllinien und in primären Trophoblasten [96]. ZT und ST konnten Membranrupturen im  $\mu\text{m}^2$ -Bereich innerhalb von 30 Sekunden effektiv reparieren. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass ANXA5-defiziente ZT und ST deutliche Membranreparaturdefekte aufwiesen.

## **1.4. Die M2-Mutation im Annexin A5-Gen**

Bogdanova et al. entdeckten 2007 eine Mutation im ANXA5-Gen, die mit der Veranlagung zu rezidivierenden Aborten in Verbindung gebracht werden konnte [97]. Reporter-gen-Assays konnten dabei zeigen, dass die M2-Mutation die Aktivität des ANXA5-Promotors in vitro auf 37 bis 42 % des normalen Levels reduzierte (siehe Abb. 10). Zudem konnte eine weitere Mutation, M1, identifiziert werden. Das Vorliegen dieser senkte die Aktivität des ANXA5-Promotors ebenso wie die M2-Mutation, jedoch weniger ausgeprägt, auf 57 bis 62 % der normalen Aktivität [97].



**Abb. 10: Veränderung der Promotoraktivität der M1- und M2-Mutation im Annexin A5-Gen im Vergleich zum Wildtyp [97]**

Im M2-Haplotyp zeigten sich im Vergleich zum Wildtyp vier Punktmutationen, (19G→A, 1A→C, 27T→C und 76G→A). M1 weist dahingegen nur zwei Punktmutationen (1A→C, 27T→C) auf [97].

In Deutschland sind etwa 15 % der Bevölkerung Träger des M2-Haplotyps [98]. Weitere europäische Kollektive zeigten Prävalenzen von 11,0 % in den Niederlanden [99] bis 14,5 % in Bulgarien [98].

#### **1.4.1. M2/ANXA5 und Schwangerschaftskomplikationen**

Die Prävalenz des M2-Haplotyps ist bei Frauen mit plazentaassoziierten Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie, intrauteriner Wachstumsretardierung, Frühgeburten im Vergleich zu Frauen mit komplikationslosen Schwangerschaften signifikant erhöht (23,8 % vs. 15,4 %,  $p < 0,001$ ) [100]. Dieser Zusammenhang zeigt sich ebenso bei schwangerschaftsassozierten venösen Thrombembolien sowie Schwangerschaftshypertonie [101; 102]. Untersuchungen an Plazenten von Patientinnen mit Präeklampsie oder IUGR-Feten zeigten, dass die ANXA5-Genexpression bei diesen Patientinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit komplikationsloser Schwangerschaft signifikant erniedrigt war [103]. Im Tierversuch mit ANXA5-Knockout-Mäusen zeigte sich sowohl eine signifikante Verringerung der Wurfgröße als auch des Geburtsgewichts [104].

### **1.4.2. M2/ANXA5 und rezidivierende Spontanaborte**

RSA werden von der WHO ab der dritten spontanen Fehlgeburt vor der 20. Schwangerschaftswoche definiert [105]. Thrombophile Genmutationen wie die Faktor-V-Leiden-Mutation (FVL) oder die Prothrombin-Mutation sind dabei mit einem erhöhten Risiko für RSA assoziiert [106]. Die Trägerschaft des M2-Haplotyps geht mit einem etwa vierfach erhöhten Risiko für RSA im Vergleich zur Kontrollgruppe (Frauen mit negativer Abortanamnese und mit komplikationslosen Schwangerschaften) einher [97].

#### **Paternale M2/ANXA5-Mutation**

Rogenhofer et al. konnten zeigen, dass das paternale Vorliegen des M2-Haplotyps für RSA einen gleichwertigen Risikofaktor wie das maternale Vorliegen darstellt [107]. Da die paternale Trägerschaft im Vergleich zu maternalen einen genauso großen Risikofaktor darstellt, scheint der Mechanismus über den Embryo erfolgen. Andere thrombophile Genmutationen wie die FVL- und Prothrombin-Mutation sind im Bezug auf rezidivierende Fehlgeburten nicht mit paternaler Trägerschaft assoziiert [108].

### **1.4.3. M2/ANXA5 und Kinderwunsch**

Fishel et al. untersuchten 157 Paare mit einem oder mehr IVF-Zyklen ohne Schwangerschaftsnachweis auf das Vorhandensein der M2/ANXA5-Mutation [109]. Bei 44 % der Paare lag bei einem oder beiden Partnern der M2-Haplotyp vor, wobei bei 24 % der Patientinnen und 26 % der Partner der M2-Haplotyp registriert wurde.

Das Vorhandensein von Anti-Annexin-A5-Antikörper (aANXA5) wurde mit Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematodes [110] und rheumatoider Arthritis [111] in Verbindung gebracht. Matsubayashi et al. konnten zeigen, dass sowohl RSA-Patientinnen (zwei oder mehr Aborte vor der 10. SSW) als auch RIF-Patientinnen (zwei oder mehr Embryonentransfersversuche ohne Eintritt einer Schwangerschaft) im Vergleich zu schwangeren und nicht schwangeren Kontrollgruppe signifikant häufiger aANXA5 im Plasma aufweisen (8,3 % vs. 1,1 %,  $p < 0,05$ ) [112]. Annexin-A5-Antikörper inhibieren die in 1.3

genannten Funktionen des Annexin A5 und sind als Hinweis für die Rolle des Proteins bei der Implantation zu werten.

### **1.5. Fragestellung dieser Arbeit**

Ungewollte Kinderlosigkeit ist für viele Paare eine große psychische und soziale Belastung, weswegen sie die Hilfe assistierter Reproduktionstherapien (ART) in Anspruch nehmen. Jedoch führen Therapien wie die IVF oder ICSI bei einigen Paaren auch nach mehreren Versuchen nicht zum Eintritt einer Schwangerschaft. Man spricht dann von einem rezidivierenden Implantationsversagen (RIF). Verschiedene Ursachen sind bekannt, einige werden diskutiert, aber häufig kann kein fassbarer Grund gefunden werden. In Vorstudien konnte mit der M2/ANXA5-Mutation maternalen oder paternalen Ursprungs ein Risikofaktor für Fehlgeburten und Schwangerschaftspathologien identifiziert werden [97; 100; 107]. Wie Fishel et al. zeigen konnten, liegt bei Kinderwunschpaaren eine hohe Prävalenz (44 %) der M2-ANXA5-Mutation vor [109]. Bisher gab es jedoch keine Untersuchungen an Paaren mit wiederholt erfolglosen ART-Versuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einer klinischen Fall-Kontroll-Studie untersucht, ob die maternale und/oder die paternale Trägerschaft des M2-Haplotyp im ANXA5-Gen auch mit RIF assoziiert ist, mit dem Ziel, Einblicke in die pathophysiologischen Zusammenhänge bei RIF zu gewinnen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Studienkollektive

#### 2.1.1. Studiengruppe

Das Studienkollektiv bestand aus Paaren, die im Hormon- und Kinderwunschzentrum der LMU in Behandlung waren bzw. zum Zeitpunkt der Datenerhebung ein rezidivierendes Implantationsversagen (RIF) zeigten.

Dieses wurde definiert als (vgl. 1.2.2):

- kein Eintritt einer Schwangerschaft nach konsekutivem Transfer von  $\geq 4$  optimal entwicklungsfähigen Blastozysten oder  $\geq 8$  Pronucleus (PN)-Zellen
- im Rahmen von  $\geq 4$  IVF/ICSI-Behandlungen
- Alter zwischen 18 und 41 Jahren

Voraussetzung für die Teilnahme war die schriftliche Einverständnis zur Studienteilnahme sowie zur genetischen Untersuchung von Patientin und Partner.

Die Paare wurden prospektiv eingeschlossen oder es erfolgte eine retrospektive Datenanalyse. Im Gesamten konnten 63 Paare eingeschlossen werden.

Bei allen Paaren erfolgte aufgrund des RIF eine intensive Abklärung im Rahmen der Sprechstunde des Hormon- und Kinderwunschzentrums. Hierbei wurden etablierte Ursachen für ein RIF ausgeschlossen: Hysteroskopie zum Ausschluss uteriner Fehlbildungen sowie einer chronischen Endometritis. Falls uterine Fehlbildungen vorlagen wurden diese, falls möglich, operativ entfernt, bei Vorliegen einer chronischen Endometritis wurde eine antibiotische Therapie mit Doxycyclin durchgeführt. Der Therapieerfolg wurde durch eine Kontrollbiopsie überprüft. Zudem erfolgte eine Thrombophilieabklärung mit Untersuchung auf Faktor-V-Leiden- sowie Prothrombinmutation. Ausgeschlossen wurden Patientinnen mit Adipositas ( $\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$ ), sowie starke Raucherinnen ( $\geq 20$  Zigaretten pro Tag). Lag bei der Patientin eine Hypothyreose vor, wurde diese mit L-Thyroxin auf eine euthyreote Stoffwechsellage eingestellt ( $\text{TSH} < 2 \text{ mU/l}$ ).

### 2.1.2. Kontrollgruppen

Die Studiengruppe wurde mit drei verschiedenen Kontrollgruppen verglichen. Die jeweiligen Einschlusskriterien sind in Tab. 1 aufgeführt.

<p><b>Kontrollen München (n = 90) [107]</b></p>	<p>Frauen mit mindestens einer spontanen Schwangerschaft mit termingerecht geborenen, gesunden, normalgewichtigen Säuglingen ohne Schwangerschaftskomplikationen, negative Abortanamnese</p> <p>Rekrutiert über das Zentrum für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin der LMU München</p>
<p><b>Kontrollen Münster (n = 500) [97]</b></p>	<p>Identische Einschlusskriterien wie Kontrollen München.</p> <p>Rekrutiert über das Institut für Humangenetik der Universitätsklinik Münster</p>
<p><b>Kontrollen Popgen Biobank (n = 533) [113]</b></p>	<p>Gesunde Frauen und Männer aus Schleswig-Holstein</p> <p>Einschluss annähernd gleich vieler Frauen wie Männer in den Altersgruppen 18 bis 30 Jahre, 30 bis 50 Jahre und 50 bis 80 Jahre</p> <p>aus der Biobank des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein</p>

**Tab. 1: Kontrollgruppen**

### 2.1.3. Patientenaufklärung, Ethikvotum, Datenschutz

Alle Teilnehmerinnen und Teilnehmer wurden ausführlich über Inhalt und Zweck der Studie aufgeklärt und erteilten die schriftliche Einwilligung zur genetischen Untersuchung und Studienteilnahme. Die erhobenen Daten wurden pseudonymisiert ausgewertet und nach Mitteilung des Studienergebnisses an die Probanden, falls gewünscht, irreversibel anonymisiert. Die Aufklärungsbögen für Patientinnen, Partner und Kontrollen finden sich im Anhang auf den Seiten 60 bis Seite 72.

Die Genehmigung der Ethikkommission des Klinikums München zur Durchführung der Studie (Projekt 238-16) wurde im Juni 2016 schriftlich erteilt, die Zusage findet sich im Anhang auf Seite 72. Die Empfehlungen des Weltärztebundes (Deklaration von Helsinki in der vom Weltärztebund aus der 52.

Generalversammlung im Oktober 2000 in Edinburgh beschlossenen revidierten Fassung) wurden beachtet.

## 2.2. Untersuchungsmethoden

### 2.2.1. Erhobene Patientendaten

Die Patientendaten wurden aus den Patientenakten, Stimulationsbögen oder digital aus Meditex (Dokumentationsprogramm für das Deutsche IVF-Register) im Hormon- und Kinderwunschzentrum der LMU München erhoben. Folgende Daten wurden zusammengetragen:

- Alter der Patientin und des Partners zu Behandlungsbeginn
- Anzahl der Schwangerschaften, Geburten, Extrauteringraviditäten, Aborte bei Behandlungsbeginn
- Herkunft der Patientin und des Partners
- Body-Mass-Index (BMI) der Patientin
- Indikation für ART
  - Weibliche Indikationen: tubarer Faktor, endokrinologisch, Endometriose, idiopathisch
  - Männliche Indikation: andrologischer Faktor, nach den Richtlinien der WHO eine ART indizierend
- Anamnese bei ggf. erfolgter auswärtiger Kinderwunschbehandlung
- Anzahl der Transfers nach Stimulation, Anzahl der dabei transferierten Vorkernstadien (PN-Zellen) oder Blastozysten
- Anzahl der Transfers nach Kryokonservierung, Anzahl der dabei transferierten Vorkernstadien (PN-Zellen) oder Blastozysten
- Anzahl der durch ART entstandenen Schwangerschaften mit jeweiligem Outcome
- Vorhandensein thrombophiler Genmutationen bei der Patientin (Faktor-V-Leiden-Mutation, Prothrombin-Mutation)
- Antikörperdiagnostik: antitrophoblastäre Antikörper (ATAK), antinukleäre Antikörper (ANA), Antiphospholipid-Antikörper (APLS-AK)
- Vitaminspiegel (Vitamin B12, Vitamin D)

- Reproduktionsmedizinische Parameter des jeweils letzten Stimulationszyklus
  - Anti-Müller-Hormon (AMH)
  - Antral follicle count (AFC)
  - Folsäure an Tag 3, Progesteron an Tag 3
  - Estradiol und Progesteron am Tag der Ovulationsinduktion
  - Stimulationsdauer
  - Anzahl der gewonnenen Oozyten
  - Anzahl der Metaphase-II-Oozyten
  - Anzahl der Oozyten, die erfolgreich fertilisiert werden konnten (Fertilisationsrate)
  - Implantationsrate mit Outcome

### **2.2.2. Probengewinnung**

Den Patientinnen und Partnern, die sich zum Studienzeitpunkt in reproduktionsmedizinischer Behandlung befanden, wurden im Rahmen klinischer Blutentnahmen EDTA-Vollblutproben entnommen und im Fachbereich für Molekulare Diagnostik des Instituts für Laboratoriumsmedizin des Klinikums Großhadern (Marchioninistraße 15, 81377 München) analysiert. Paare, die die Behandlung bereits abgeschlossen hatten, erhielten im Rahmen der Studie eine EDTA-Vollblutentnahme. Diese Proben wurden bis zur DNA-Isolierung bei 4°C gelagert.

Die genetische Analyse dieser Proben erfolgte im Institut für Humangenetik der Universitätsklinik Münster (Vesaliusweg 12, 48149 Münster).

### **2.2.3. Genotypisierung**

Ein Teil der Proben wurde im Fachbereich für Molekulare Diagnostik des Instituts für Laboratoriumsmedizin des Klinikums Großhadern analysiert. Die genomische DNA wurde hierzu aus dem gewonnenen EDTA-Vollblut isoliert. Es erfolgte die Sequenzierung des Promotorbereichs des Annexin-A5-Gens. Dabei wurde ein Sequenzabgleich mittels der UCSC Genome Browser database (Human GRCh37/hg19) durchgeführt.

Die DNA-Proben der Paare, die im Institut für Humangenetik analysiert wurden, wurden ebenfalls aus EDTA-Vollblut gewonnen. Die Mutationsanalyse erfolgte mittels Amplicon-Sequenzierung. Zunächst wurde die DNA aus Lymphozyten extrahiert und die gesamte für ANXA5 codierende Sequenz (Promotorregion und flankierende Introns) per PCR amplifiziert, anschließend gereinigt. Die entstandenen Amplicons wurden sequenziert [97].

### **2.3. Statistische Auswertung**

Die erhobenen Daten wurden bis zur Auswertung in einer Microsoft Excel-Tabelle (Microsoft Inc., Redmond, USA) zusammengetragen.

Als statistische Tests wurden der Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest nach Pearson, der exakte Test nach Fisher und der t-Test für unverbundene Stichproben verwendet. Odds-Ratios und relative Risiken wurden für die Studiengruppe und Kontrollgruppen berechnet. Als Signifikanzniveau wurden p-Werte  $< 0,05$  für signifikante Unterschiede gesetzt. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm SAS-Studio Version 9 (SAS Institute, Cary, USA).

Die ermittelten Genotypen des Annexin A5-Gens wurden mittels des Hardy-Weinberg exact test aus dem Genepop-Package auf das Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichts untersucht [114]. Allelfrequenzen und erwartete Genotypfrequenzen wurden ebenfalls mit Hilfe des Genepop-Package berechnet [115].

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Demographische Daten und Schwangerschaftshistorie bei Behandlungsbeginn

Die demographischen Daten und Schwangerschaftshistorie der Studiengruppe und der Kontrollgruppen sind in Tab. 2 aufgeführt.

	RIF-Patientinnen	RIF-Partner	Kontrollen München	p
<b>Anzahl</b>	63	63	90	-
<b>Alter</b>	35,2 ± 2,9 (26–41)	38,9 ± 5,4 (27–50)	33,9 ± 4,6 (21–40)	0,049
<b>Schwangerschaften</b>	0,2 ± 0,5 (0–2)	-	1,4 ± 0,6 (1–5)	<0,001
<b>Geburten</b>	0,0 ± 0,2 (0–1)	-	1,4 ± 0,6 (1–5)	<0,001
<b>Aborte</b>	0,1 ± 0,4 (0–2)	-	0	<0,001
<b>Extrauterin-graviditäten</b>	0,0 ± 0,2 (0–1)	-	0	1

**Tab. 2: Demographische Daten und Schwangerschaftshistorie der RIF-Patientinnen, RIF-Partner und der Münchner Kontrollgruppe. RIF: Rezidivierendes Implantationsversagen**

Die Patientinnen der Kontrollgruppen München und Münster waren definitionsgemäß mindestens einmal schwanger und hatten ein normalgewichtiges, gesundes Kind nach komplikationsloser Schwangerschaft termingerecht geboren, die Abortanamnese war negativ.

Eine primäre Sterilität (ohne vorangegangene Schwangerschaft) lag bei 54 RIF-Paaren (86 %) vor, bei neun RIF-Paaren (14 %) war vor dem Beginn der ART eine spontane Schwangerschaft eingetreten, bei einem erneuten Kinderwunsch zeigte sich bei diesen Paaren ein RIF.

Der BMI betrug  $23 \pm 2 \text{ kg/m}^2$ . 45 Patientinnen (71 %) zeigten sich normalgewichtig (BMI 18,5–24,9  $\text{kg/m}^2$ ), 15 (24 %) präadipös (BMI 25,0–29,9  $\text{kg/m}^2$ ). Zwei RIF-Patientinnen (3 %) waren untergewichtig (BMI  $< 18,5 \text{ kg/m}^2$ ) und eine RIF-Patientin (2 %) übergewichtig (BMI = 30  $\text{kg/m}^2$ ).

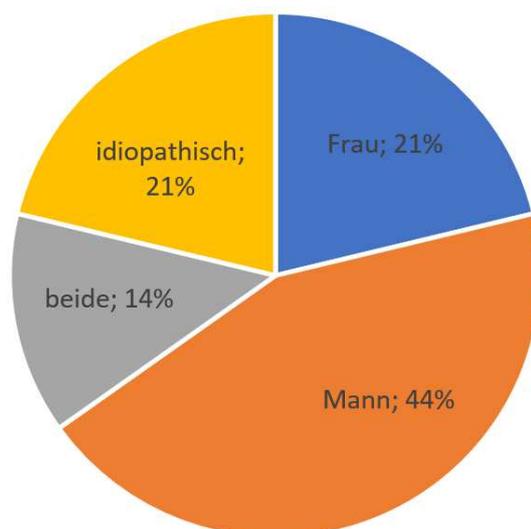
Die Ergebnisse der Thrombophiliediagnostik sind in Tab. 3 dargestellt:

	Prothrombin G20210A		Faktor-V-Leiden	
	n	%	n	%
<b>Wildtyp</b>	36	97,3	36	94,7
<b>Heterozygot</b>	1	2,7	2	5,2
<b>Homozygot</b>	0	0	0	0
<b>Gesamt</b>	37	100	38	100

**Tab. 3: Ergebnisse der Thrombophiliediagnostik bei den RIF-Patientinnen. RIF: Rezidivierendes Implantationsversagen**

### 3.2. Indikationen für IVF/ICSI

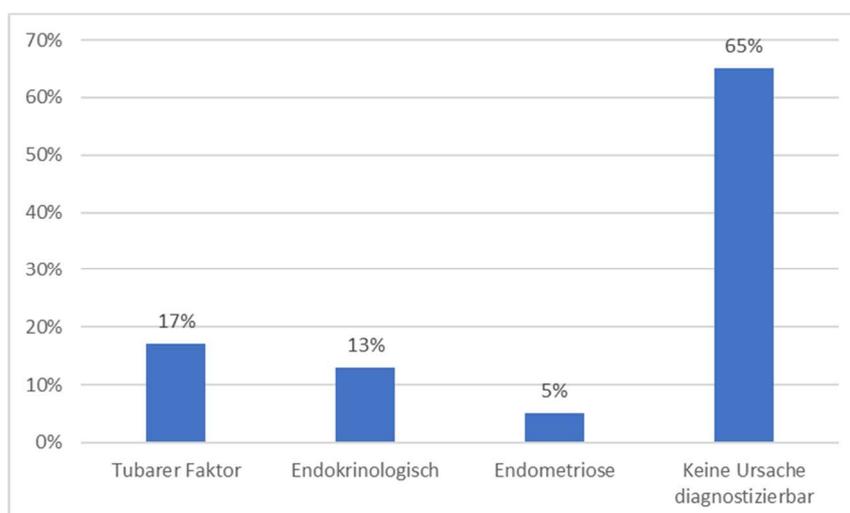
Bei 14 % der RIF-Paare ( $n = 9$ ) konnten bei der Patientin und dem Partner Ursachen des unerfüllten Kinderwunsches gefunden werden, die eine ART notwendig machten. Bei 21 % der RIF-Paare ( $n = 13$ ) lag die Ursache bei der Frau, bei 44 % ( $n = 28$ ) nur beim Mann. Bei 21 % der RIF-Paare ( $n = 13$ ) konnte keine Ursache gefunden werden, womit eine idiopathische Sterilität vorlag (Abb. 11).



**Abb. 11: Verteilung der Ursachen der Infertilität der RIF-Paare. RIF: Rezidivierendes Implantationsversagen**

### Indikationen bei der Frau

Bei 17 % (n = 11) der Patientinnen lag eine Tubenpathologie vor, bei 13 % (n = 8) der Patientinnen eine endokrinologische Störung und bei 5 % (n = 3) eine Endometriose vor. Bei 65 % der Paare (n = 41) konnte bei der Frau keine Ursache für den unerfüllten Kinderwunsch gefunden werden (Abb. 12).



**Abb. 12: Indikationen für IVF/ICSI bei der Frau**

### Indikation beim Mann

Bei 60 % der Partner (n = 38) zeigte sich ein andrologischer Faktor, welcher nach den Referenzwerten der WHO die Indikation zur ART stellte [116].

## 3.3. Reproduktionsmedizinische Therapie

### 3.3.1. Durchgeführte Therapie

Die durchgeführten Zyklen sind in Tab. 4 dargestellt:

	<b>RIF-Paare</b>
<b>Durchgeführte IVF-/ICSI-Zyklen (Frischzyklen + Kryozyklen)</b>	6,8 ± 3,4 (4–23)
<b>Transferierte Blastozysten (gesamt)</b>	4,1 ± 3,5 (0–14)
<b>Transferierte PN-Zellen (gesamt)</b>	7,3 ± 6,3 (0–35)
<b>Transferierte Blastozysten bzw. PN-Zellen (pro Transfer)</b>	1,7 ± 0,4 (1–3)

**Tab. 4: Durchgeführte IVF/ICSI-Zyklen pro RIF-Paar. RIF: Rezidivierendes Implantationsversagen**

Insgesamt wurden bei den 63 RIF-Paaren in 426 Transfers (Frischzyklen + Kryozyklen) 257 Blastozysten und 458 PN-Zellen transferiert.

### 3.3.2. Ergebnisse der Therapie

Tab. 5 zeigt das Outcome der Schwangerschaften im Therapieverlauf. Falls im Laufe der ART mehr als einmal eine Schwangerschaft eintrat, wurde in der Auswertung die am weitesten vorangegangene Schwangerschaft (Geburt > Extrauterin gravidität > Abort > biochemische Schwangerschaft) berücksichtigt.

	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Biochemische Schwangerschaft</b>	4	12,9
<b>Extrauterin gravidität</b>	1	3,2
<b>Aborte</b>	12	38,7
<b>Geburten</b>	14	45,2
<b>n</b>	31	100

**Tab. 5: Schwangerschaften nach IVF/ICSI und deren Outcome**

Insgesamt konnten nach 434 Embryonentransfers (ET) 42 positive Schwangerschaftstests dokumentiert werden. Das Outcome der Schwangerschaften ist in Tab. 6 abgebildet.

	<b>n</b>	<b>Prozent der ET</b>	<b>Prozent der nach IVF/ICSI etablierten Schwangerschaften</b>
<b>Biochemische Schwangerschaft</b>	10	2,3	23,8
<b>Extrauterin gravidität</b>	1	0,2	2,4
<b>Aborte</b>	17	3,9	40,5
<b>Geburten</b>	14	3,2	33,3
<b>n</b>	42	10,0	100

**Tab. 6: Outcome der Schwangerschaften nach IVF/ICSI. ET: Embryonentransfer**

Die Patientinnen, bei denen sich im Verlauf der Kinderwunschbehandlung einmal oder häufiger ein positiver Schwangerschaftstest zeigte, waren bei Behandlungsbeginn  $35,5 \pm 3,6$  (28–41) Jahre alt. Die Patientinnen, bei denen durch ART nie ein positiver Schwangerschaftstest nachgewiesen werden konnte, waren  $35,0 \pm 4,0$  (26–41) Jahre alt. Die beiden Gruppen unterschieden sich somit nicht signifikant ( $p = 0,574$ ). RIF-Patientinnen mit sekundärer Sterilität ( $n = 9$ ) zeigten im Verlauf der Kinderwunschbehandlung zu 56 % mindestens einmal einen positiven Schwangerschaftstest und damit nicht signifikant häufiger als RIF-Patientinnen mit primärer Sterilität ( $n = 54$ ), die zu 48 % mindestens einmal einen positiven Test zeigten ( $p = 0,56$ ).

### 3.4. Analyse des Annexin-A5-Gens

#### 3.4.1. Genetische Analyse der Studiengruppe und Kontrollgruppen

Tab. 7 zeigt die genetische Analyse des ANXA5-Gens.

Genotyp		RIF-Paare		Kontrollen München		Kontrollen Münster		Kontrollen PopGen	
		Beobachtet	Erwartet	Beobachtet	Erwartet	Beobachtet	Erwartet	Beobachtet	Erwartet
N/N	n	75	73,8	62	60	356	343,6	415	413,3
	%	59,5	-	68,9	-	71,2	-	77,9	-
N/M1	n	15	17,7	15	14,8	87	99,5	35	47,8
	%	11,9	-	16,7	-	17,4	-	65,7	-
M1/M1	n	3	1,0	0	0,8	16	7,2	1	1,5
	%	2,4	-	0	-	3,2	-	0,2	-
N/M2	n	28	27,7	8	12,3	30	40,7	72	76,5
	%	22,2	-	8,9	-	6,0	-	13,5	-
M1/M2	n	2	3,3	3	1,5	1	5,9	5	3,4
	%	1,6	-	3,3	-	0,2	-	0,9	-
M2/M2	n	3	2,5	2	0,6	10	1,4	5	1,4
	%	2,4	-	2,2	-	2,0	-	0,9	-
M2-Träger	n	33	33,5	13	14,6	41	49,8	82	70,4
	%	26,2	-	14,4	-	51	-	15,4	-
<b>Total</b>	<b>n</b>	<b>126</b>	<b>126</b>	<b>90</b>	<b>90</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>533</b>	<b>533</b>

**Tab. 7: Ergebnisse der genetischen Analyse des ANXA5-Gens der RIF-Paare und der Kontrollgruppen und erwartete Genfrequenzen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. RIF: Rezidivierendes Implantationsversagen**

Die M2-Mutation (homo- und heterozygot) lag bei den RIF-Patienten mit 28,6 % nicht signifikant häufiger vor als bei den RIF-Patientinnen mit 23,8 % ( $p = 0,543$ ) (Tab. 8).

Genotyp		RIF-Paare		RIF-Patientinnen		RIF-Partner	
		Beobachtet	Erwartet	Beobachtet	Erwartet	Beobachtet	Erwartet
N/N	n	75	73,8	41	41,2	34	32,8
	%	59,5	-	65,1	-	54,0	-
N/M1	n	15	17,7	6	6,5	9	10,9
	%	11,9	-	9,5	-	14,2	-
M1/M1	n	3	1,0	1	0,2	2	0,8
	%	2,4	-	1,6	-	3,2	-
N/M2	n	28	27,7	14	13,1	14	14,6
	%	22,2	-	22,2	-	22,2	-
M1/M2	n	2	3,3	0	1,0	2	2,4
	%	1,6	-	0	-	3,2	-
M2/M2	n	3	2,5	1	1,0	2	1,5
	%	2,4	-	1,6	-	3,2	-
M2-Träger	n	33	33,5	15	15,1	18	18,5
	%	26,2	-	23,8	-	28,6	-
<b>Total</b>	<b>n</b>	<b>126</b>	<b>126</b>	<b>63</b>	<b>63</b>	<b>63</b>	<b>63</b>

Tab. 8: Verteilung der Genotypen der RIF-Paare, RIF-Patientinnen und RIF-Partner und erwartete Genfrequenzen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. RIF: Rezidivierendes Implantationsversagen

### 3.4.2. Allelfrequenzen

Die Allelfrequenzen der Studiengruppe im Vergleich zu den drei Kontrollgruppen sind in Tab. 9 dargestellt:

	RIF-Paare	RIF-Patientinnen	RIF-Partner	Kontrollen München	Kontrollen Münster	Kontrollen PopGen
<b>N</b>	0,766	0,810	0,722	0,817	0,829	0,879
<b>M1</b>	0,091	0,063	0,119	0,100	0,120	0,039
<b>M2</b>	0,143	0,127	0,159	0,083	0,051	0,082

Tab. 9: Allelfrequenzen im Annexin-A5-Gen. RIF: Rezidivierendes Implantationsversagen

### 3.4.3. Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Die Studiengruppe lag im Gesamten, sowie getrennt untersucht nach Patientinnen und Partner mit  $p \geq 0,05$  im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Tab. 10).

<b>RIF-Paare</b>	$p = 0,2090$
<b>RIF-Patientinnen</b>	$p = 0,3378$
<b>RIF-Partner</b>	$p = 0,4703$

Tab. 10: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht der Studiengruppe nach Markov-Chain-Monte-Carlo (MCMC). RIF: Rezidivierendes Implantationsversagen

### 3.4.4. Statistische Auswertung

Odds-Ratios (OR) und Konfidenzintervalle (KI) wurden für den M2-Haplotyp für die RIF-Paare, RIF-Patientinnen und RIF-Partner berechnet und jeweils mit den Kontrollgruppen verglichen (Tab. 11).

		<b>RR [95 % KI]</b>	<b>OR [95 % KI]</b>	<b>p</b>
<b>RIF-Paare</b>	<b>Kontrollen München</b>	1,81 [1,01–3,25]	2,10 [1,03–4,27]	0,037
	<b>Kontrollen Münster</b>	3,19 [2,11–4,83]	3,97 [2,39–6,61]	<0,001
	<b>Kontrollen PopGen</b>	1,70 [1,19–2,42]	1,95 [1,23–3,10]	0,004
<b>RIF-Patientinnen</b>	<b>Kontrollen München</b>	1,65 [0,84–3,22]	1,85 [0,81–4,23]	0,141
	<b>Kontrollen Münster</b>	2,90 [1,71–4,93]	3,50 [1,80–6,78]	<0,01
	<b>Kontrollen PopGen</b>	1,55 [0,95–2,51]	1,72 [0,92–3,21]	0,087
<b>RIF-Partner</b>	<b>Kontrollen München</b>	1,98 [1,05–3,73]	2,37 [1,06–5,29]	0,027
	<b>Kontrollen Münster</b>	3,48 [2,14–5,68]	4,48 [2,38–8,43]	<0,001
	<b>Kontrollen PopGen</b>	1,86 [1,20–2,88]	2,20 [1,21–3,99]	0,008

Tab. 11: Vergleich des Vorliegens des M2-Haplotyps der RIF-Paare mit den Kontrollgruppen. RIF: Rezidivierendes Implantationsversagen, RR: Relatives Risiko, OR: Odds Ratio, KI: Konfidenzintervall

Es zeigen sich mit Ausnahme der Gruppen RIF-Patientinnen vs. Kontrollen München bzw. Kontrollen PopGen signifikante p-Werte ( $p < 0,05$ ).

Analog dazu wurden die entsprechenden Werte für den M1-Haplotyp berechnet (Tab. 12).

		RR [95 % KI]	OR [95 % KI]	p
RIF-Paare	Kontrollen München	0,79 [0,45–1,41]	0,75 [0,37–1,53]	0,43
	Kontrollen Münster	0,76 [0,49–1,18]	0,72 [0,43–1,21]	0,21
	Kontrollen PopGen	2,06 [1,25–3,39]	2,26 [1,28–4,02]	0,005

Tab. 12: Vergleich des Vorliegens des M1-Haplotyps der RIF-Paare mit den Kontrollgruppen. RIF: Rezidivierendes Implantationsversagen, RR: Relatives Risiko, OR: Odds Ratio, KI: Konfidenzintervall

### 3.5. Subgruppenanalysen

#### Anzahl der durchgeführten IVF-/ICSI-Zyklen

Bei 60 % der Paare ( $n = 38$ ) wurden vier bis sechs ET durchgeführt, bei 40 % ( $n = 25$ ) mehr als sechs Transfers. Es zeigt sich, dass der M2-Haplotyp bei Paaren mit mehr als sechs ET nicht signifikant häufiger vorliegt als bei Paaren mit vier bis sechs ET (28,0 % vs. 25,0 %) ( $p = 0,71$ ) (Tab. 13).

	Durchgeführte ET	RIF-Paare		RIF-Patientinnen		RIF-Partner	
		n	%	n	%	n	%
4–6 ET	4,7 ± 0,8	19	25,0	9	23,7	10	26,7
> 6 ET	9,9 ± 3,4	14	28,0	6	24,0	8	32,0
p	-	0,71	-	0,60	-	0,62	-

Tab. 13: M2-Trägerschaft der RIF-Patientinnen und Partnern in Abhängigkeit der Anzahl der durchgeführten ET. RIF: Rezidivierendes Implantationsversagen, ET: Embryonentransfer

Tab. 14 zeigt den Vergleich der Paare mit höhergradigem RIF und den Kontrollgruppen.

		RR [95 % KI]	OR [95 % KI]	p
<b>Höher-gradiges RIF (&gt;6 ET)</b>	<b>Kontrollen München</b>	1,94 [0,99–3,79]	2,30 [0,98–5,40]	0,052
	<b>Kontrollen Münster</b>	3,41 [2,00–5,82]	4,35 [2,17–8,72]	<,0001
	<b>Kontrollen PopGen</b>	1,82 [1,12–2,96]	2,14 [1,10–4,14]	0,021

Tab. 14: Vergleich des Vorliegens des M2-Haplotyps der RIF-Paare mit höhergradigem Implantationsversagen (>6 ET) mit den Kontrollgruppen. RR: Relatives Risiko, OR: Odds Ratio, KI: Konfidenzintervalle, ET: Embryonentransfer

### Analyse nach Paaren

Tab. 15 zeigt das Vorliegen des M2-Haplotyps in Abhängigkeit der Indikation zur ART.

	M2-Mutation vorhanden		Keine M2-Mutation vorhanden		p
	n	%	n	%	-
<b>Idiopathische Sterilität der Frau, n = 41</b>	20	48,8	21	52,2	0,549
<b>Idiopathische Sterilität bei Frau und Mann, n = 13</b>	7	53,8	6	46,2	0,527
<b>Schwangerschaftstest im Verlauf positiv, n = 31</b>	14	45,2	17	54,8	0,888

Tab. 15: Indikationen zur Kinderwunschbehandlung bei Paaren (Patientin und/oder Partner) mit und ohne M2-Mutation

Bei Paaren ohne M2-Mutation konnte nach Eintritt einer Schwangerschaft häufiger ein Kind geboren werden als bei Paaren mit M2-Mutation (Tab. 16). Dies steht im Einklang zu bisherigen Studien (vgl. 1.4.2).

	M2-Mutation bei Patientin und oder Partner		Keine M2-Mutation bei Patientin oder Partner		p
	n	%	n	%	-
<b>Kein Schwangerschaftseintritt nach ET, n = 32</b>	15	46,9	17	43,8	0,888
<b>Biochemische Schwangerschaft, n = 4</b>	2	50,0	2	50,0	ns
<b>Abort, n = 12</b>	7	58,3	5	41,2	0,343
<b>Extrauterin gravidität, n = 1</b>	1	100,0	0	0	ns
<b>Geburt, n = 14</b>	4	28,6	10	71,4	0,137
<b>Gesamt</b>	29	-	34	100	-

**Tab. 16: Outcome der Schwangerschaft bei positivem Schwangerschaftstest nach IVF/ICSI und Paare ohne Schwangerschaftseintritt. ns: nicht signifikant, ET: Embryonentransfer**

### Analyse nach Indikation zur ART

#### Idiopathische Sterilität des Paares

Der M2-Haplotyp liegt in der Subgruppe der Paare mit idiopathischer Sterilität von Patientin und Partner nicht signifikant häufiger vor, als bei Paaren mit bekannter Indikation (30,8 % vs. 25,0 %,  $p = 0,549$ ) (Tab. 17). Bei Paaren mit idiopathischer Sterilität wurden durchschnittlich  $7,8 \pm 3,9$  ET durchgeführt, bei Paaren mit bekannter Indikation  $6,6 \pm 3,4$  ET.

Genotyp	RIF-Paare mit idiopathischer Sterilität		RIF-Paare mit bekannter Indikation	
	n	%	n	%
<b>N/N</b>	14	53,8	61	61,0
<b>N/M1</b>	2	7,7	13	13,0
<b>M1/M1</b>	2	7,7	1	1,0
<b>N/M2, M1/M2</b>	6	26,9	24	24,0
<b>M2/M2</b>	2	7,7	1	1,0
<b>Total</b>	26	100	100	100

**Tab. 17: Ergebnisse der genetischen Analyse des ANXA5-Gens der RIF-Paare mit idiopathischer Sterilität und RIF-Paaren mit bekannter Indikation. RIF: Rezidivierendes Implantationsversagen**

Im Folgenden wird die Subgruppe der RIF-Paare mit idiopathischer Indikation zur ART mit den Kontrollgruppen verglichen. Bei Berechnung der OR mit KI, sowie des p-Werts nach Pearson zeigen sich signifikante Werte im Vergleich zu den Kontrollgruppen Münster und PopGen (Tab. 18).

		RR [95 % KI]	OR [95 % KI]	p
<b>Idio- pathische Sterilität</b>	<b>Kontrollen München</b>	2,13 [0,99–4,58]	2,63 [0,95–7,29]	0,057
	<b>Kontrollen Münster</b>	3,75 [1,97–7,17]	4,98 [2,04–12,14]	0,001
	<b>Kontrollen PopGen</b>	2,00 [1,09–3,68]	2,44 [1,03–5,81]	0,043

**Tab. 18: Vergleich des Vorliegens des M2-Haplotyps der RIF-Paare mit idiopathischer Indikation mit den Kontrollgruppen. RR: Relatives Risiko, OR: Odds Ratio, KI: Konfidenzintervalle**

### Idiopathische Sterilität der Patientin

Der M2-Haplotyp liegt in der Subgruppe der Paare mit idiopathischer Sterilität der Patientin nicht signifikant häufiger vor, als in der Subgruppe der Paare mit bekannter Indikation der Patientin (27,9 % vs. 23,9 %,  $p = 0,62$ ) (Tab. 19).

Genotyp	Idiopathische Sterilität der Patientin		Bekannte Indikation bei der Patientin	
	n	%	n	%
<b>N/N</b>	48	58,3	27	61,4
<b>N/M1</b>	9	11,0	6	13,6
<b>M1/M1</b>	3	3,7	0	0
<b>N/M2, M1/M2</b>	20	24,4	10	22,8
<b>M2/M2</b>	2	2,4	1	2,3
<b>Total</b>	82	100	44	100

**Tab. 19: Ergebnisse der genetischen Analyse des ANXA5-Gens der RIF-Paare mit idiopathischer Sterilität der Patientin und der Kontrollgruppen. RIF: Rezidivierendes Implantationsversagen**

Tab. 20 zeigt den Vergleich der RIF-Paare mit idiopathischer Sterilität der Frau mit den Kontrollgruppen.

		RR [95% KI]	OR [95 % KI]	p
<b>Idio-pathische Sterilität der Patientin</b>	<b>Kontrollen München</b>	1,86 [1,00–3,44]	2,17 [1,01–4,66]	0,044
	<b>Kontrollen Münster</b>	3,27 [2,06–5,20]	4,10 [2,29–7,36]	<0,001
	<b>Kontrollen PopGen</b>	1,74 [1,16–2,63]	2,01 [1,17–3,47]	0,010

**Tab. 20: Vergleich des Vorliegens des M2-Haplotyps der RIF-Paare mit idiopathischer Sterilität der Frau mit den Kontrollgruppen. RIF: Rezidivierendes Implantationsversagen, RR: Relatives Risiko, OR: Odds Ratio, KI: Konfidenzintervall**

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine Assoziation zwischen dem Vorliegen des M2-Haplotyps im Annexin-A5-Gen und rezidivierendem Implantationsversagen (RIF) besteht. Hierzu wurden RIF-Patientinnen und deren Partner auf das Vorliegen des M2-Haplotyps untersucht und die Häufigkeiten mit zwei fertilen Kontrollgruppen sowie einer unselektierten Kontrollgruppe verglichen. Dies ist die erste Studie, die den Zusammenhang zwischen rezidivierendem Implantationsversagen nach extrakorporaler Befruchtung und der maternalen sowie paternalen ANXA5-Mutation untersucht.

Die Diagnostik bei RIF gestaltet sich häufig frustran. Beim Vorliegen dieser Problematik werden vor Durchführung einer extrakorporalen Befruchtung etablierte Ursachen für ein Implantationsversagen wie uterine Anomalien oder endometriale Faktoren evaluiert. Weitere Diagnostik beispielsweise durch eine Karyotypisierung des Paares oder die Evaluation immunologischer Faktoren erbringt häufig keine richtungsweisenden Befunde. Häufig liegt keine ausreichende Evidenz vor. Bekannte Ursachen für ein RIF wurden bei den Studienpaaren untersucht und ausgeschlossen. Weitere Einflussfaktoren für eine erfolgreiche Implantation müssen daher identifiziert werden.

Die M2-Mutation im ANXA5-Gen stellt eine thrombophile Genmutation auf plazentarer Ebene dar und ist mit rezidivierenden Spontanaborten sowie Schwangerschaftskomplikationen wie intrauteriner Wachstumsretardierung und Präeklampsie assoziiert [100; 107]. Hierbei ist die Risikoübertragung etwa identisch bei Vorliegen maternaler oder paternaler Mutation [107]. Eine hohe Inzidenz (24 % der Patientinnen und 26 % der Partner) der M2/ANXA5-Mutation bei Paaren mit unerfülltem Kinderwunsch und mindestens einem erfolglosem IVF-Versuch konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden [109].

Als Studiendesign diente eine Fall-Kontroll-Studie. Die Studiengruppe bestand aus RIF-Patientinnen ( $\leq 41$  Jahre) und deren Partner, definiert als mindestens vier Transfers von insgesamt mindestens vier optimal entwicklungsfähigen Blastozysten oder mindestens acht optimal entwicklungsfähigen Vorkernstadien ohne Eintritt einer Schwangerschaft. Es konnten 63 Paare rekrutiert werden. Die

angestrebte Zahl von 100 Paaren konnte nicht erreicht werden, da zahlreiche Paare, die aufgrund der Studie kontaktiert wurden, die Teilnahme ablehnten. Bei größerem Stichprobenumfang wären aussagekräftigere Ergebnisse zu erwarten gewesen.

### **Pathophysiologie des Implantationsversagens bei Vorliegen des M2-Haplotyps**

Die RIF-Paare wiesen im Vergleich zu allen drei Kontrollgruppen eine signifikant höhere Prävalenz des M2-Haplotyps auf, daher scheint die M2-Mutation einen Risikofaktor für RIF darzustellen (vgl. 3.4.4). Unsere Studienergebnisse legen nahe, dass ein von der sich implantierenden Blastozyste ausgehender Mechanismus vorliegt, der die Implantation erschwert bzw. verhindert. In der aktuellen Literatur gibt es keine Untersuchungen dazu, ob Annexin A5 bereits auf Blastozysten exprimiert wird. Während der Invasion der Blastozyste in das Endometrium liegt bereits eine Differenzierung des Blastozyste in den Zytotrophoblasten und Synzytiotrophoblasten vor (vgl. 1.2.1) [22]. Carmeille et al. konnten Annexin A5 sowohl in Synzytiotrophoblasten als auch Zytotrophoblasten in Plazenten nachweisen [96]. Daher wäre es möglich, dass eine ANXA5-Defizienz bereits bei der Implantation eine Rolle spielt. Falls die Hypothese der ANXA5-Defizienz in Blastozysten zutrifft, ist dies ebenso ein Erklärungsansatz für die Paare mit idiopathischer Infertilität im Rahmen der natürlichen Reproduktion. Es ist anzunehmen, dass sowohl intrakorporal befruchtete Embryonen während der Wanderung durch die Tube Richtung Uterus als auch extrakorporal befruchtete Embryonen während der Einspülung in das Cavum uteri Scherkräften ausgesetzt sind, die effektive Membranreparaturmechanismen notwendig machen (vgl. 1.3.2.1, 1.4). Liegt eine durch die M2/ANXA5-Mutation ausgelöste ANXA5-Defizienz vor, sind diese Membranreparaturmechanismen behindert und dies könnte in einem Implantationsversagen resultieren.

### **Klinische Bedeutung und mögliche Therapieansätze**

Die Diagnostik bei rezidivierendem Implantationsversagen gestaltet sich oftmals schwierig. Die betroffenen Paare leiden unter einer enormen psychischen Belastung. Oftmals besteht der Kinderwunsch seit mehreren Jahren und die

---

extrakorporale Befruchtung wird von den Paaren nach Ausschöpfung konservativer Maßnahmen als letzter Ausweg zur Realisierung des Kinderwunsches gesehen. Wenn auch nach mehreren Transfers keine Schwangerschaft eintritt, ist dies häufig ein für das Paar sehr traumatisches Ereignis. Zudem sind wiederholte Kinderwunschbehandlungen für die Paare auch eine große finanzielle Belastung. Daher ist die Erforschung von Ursachen des Implantationsversagens und Entwicklung von Therapien von großer Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der M2-Haplotyp als thrombophile Genmutationen bei RIF-Paaren signifikant häufiger vorliegt als bei fertilen Frauen als auch bei Kontrollen der Normalbevölkerung verschiedenen Alters, womit die M2-Mutation als Risikofaktor für RIF zu werten ist.

Der M2-Haplotyp spielt auch eine wichtige Rolle bei rezidivierenden Spontanaborten, wobei der Abortmechanismus wahrscheinlich vom Embryo selbst ausgeht und nicht von der Mutter [107]. Dies legt die Annahme nahe, dass auch beim M2-assoziierten Implantationsversagen der Mechanismus vom Embryo ausgeht, da maternales und paternales Vorliegen mit dem gleichen Risiko für RIF assoziiert sind.

Seit langem wird die Therapie mit niedermolekularen Heparinen (NHM) bei RIF kontrovers diskutiert. Unklar ist, ob eine Therapie mit NMH bei M2-Mutation sinnvoll ist.

Es gibt Hinweise darauf, dass Patientinnen mit M2-Mutation und RSA von einer Therapie mit NHM profitieren könnten, jedoch ist aktuell noch keine abschließende Aussage zu treffen [120]. Die Ergebnisse von Rogenhofer et al. [120] gehen mit den Erkenntnissen von Ueki et al. [104] einher, die im Mausmodell nach Applikation von NMH eine größere Wurfzahl bei ANXA5-KO-Mäusen nachweisen konnten. Ob NHM bei RIF eine Therapieoption darstellen, ist aktuell unklar und sollte in weiterführenden Studien untersucht werden.

Abschließend ist zu sagen, dass das rezidivierende Implantationsversagen ein komplexer Prozess ist, welcher wahrscheinlich ein Zusammenspiel aus embryonalen, endometrialen und immunologischen Faktoren darstellt. Dabei scheinen die Einzelprozesse für eine detaillierte, strukturierte Interaktion

essenziell zu sein. Die M2-Mutation scheint dabei ein relevantes Puzzlestück des Gesamtbildes zu sein.

## 5. Zusammenfassung

Ungewollte Kinderlosigkeit betrifft 5 bis 15 % aller Paare in Deutschland. Durch die Reproduktionsmedizin kann heute mittels assistierter Reproduktionstherapien (IVF, ICSI) vielen Paaren geholfen werden. Tritt jedoch trotz mehrfacher Embryotransfers keine Schwangerschaft ein, so spricht man von rezidivierendem Implantationsversagen (RIF). Neben maternalen Faktoren können auch embryonale Faktoren ursächlich sein.

Die Prävalenz des M2-Haplotyp im Annexin A5-Gen beträgt ca. 15 % in Europa und wurde bereits im Zusammenhang mit verschiedenen Schwangerschaftspathologien (rezidivierende Spontanaborte, Präeklampsie, Frühgeburt, intrauterine Wachstumsretardierung) beschrieben [97;107]. In Vorstudien konnte gezeigt werden, dass die maternale oder paternale Risikoübertragung für rezidivierende Spontanaborte (RSA) fast identisch ist [107]. Annexin A5 ist ein Protein, das zunächst in der Plazenta nachgewiesen wurde und wichtige Funktionen in der Membranreparatur und Antikoagulation übernimmt. Das Vorliegen des M2-Haplotyps führt zu einer geringeren chorialen ANXA5-Expression, womit die thrombotische Aktivität im intravillösen Raum erhöht wird [103]. Es sind zwei Mutationen beschrieben, bei denen die Promotoraktivität herabgesetzt ist und somit weniger Annexin A5 gebildet wird. Klinisch relevant ist die M2-Mutation [97]. Da die embryonale Implantation eine Balance zwischen pro- und antikoagulatorischen Mechanismen an der embryomaternalen Grenzschicht erfordert, untersuchten wir, ob sich die Inzidenz der M2/ANXA5-Trägerschaft bei Paaren mit RIF von Kontrollgruppen unterscheidet.

In einer Fallkontrollstudie untersuchten wir 63 Paare mit RIF, die sich zwischen 2016 und 2018 im Hormon- und Kinderwunschzentrum der LMU München vorstellten. RIF wurde definiert als vier oder mehr konsekutive Transfers von vier oder mehr optimal entwicklungsfähigen Blastozysten oder acht oder mehr Vorkernstadien ohne Eintritt einer Schwangerschaft und einem maternalen Alter von  $\leq 41$  Jahren. Die Studiengruppe wurde mit drei Kontrollgruppen verglichen. Die Kontrollen München (n = 90) und Münster (n = 500) bestanden aus Frauen

mit mindestens einer spontanen Schwangerschaft mit termingerecht geborenen, gesunden, normalgewichtigen Säuglingen ohne Schwangerschaftskomplikationen und ohne Aborte in der Historie. Die PopGen Kontrollen aus der Biobank des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein waren eine heterogene Bevölkerungspopulation bestehend aus 533 Frauen und Männern im Alter von 18 bis 80 Jahren.

Bei Eignung zur Studienteilnahme wurden die Paare ausführlich über die Studie aufgeklärt, eine schriftliche Einverständniserklärung zur genetischen Diagnostik wurde von allen Patientinnen und Patienten erteilt. Ein positives Ethikvotum lag vor Beginn der Studie vor.

Es zeigte sich eine signifikant höhere Prävalenz des M2-Haplotyps der Studiengruppe im Vergleich zu den drei Kontrollgruppen. Unsere Daten legen nahe, dass die M2-Mutation im Annexin-A5-Gen als Risikofaktor für rezidivierendes Implantationsversagen zu werten ist. Das relative Risiko beträgt bis zu 3,19 im Vergleich zu fertilen Kontrollen und 1,70 im Vergleich zu unselektierten Kontrollen. Bei den Partnern der RIF-Patientinnen lag eine M2-Trägerschaft geringfügig häufiger vor. Es zeigte sich ein nicht signifikant häufigeres Vorkommen des M2-Haplotyps bei Paaren mit idiopathischer Sterilität als bei bekannter Indikation. RIF-Paare mit sechs oder mehr IVF/ICSI-Zyklen wiesen nicht signifikant häufiger den M2-Haplotyp auf als RIF-Paare mit vier bis sechs IVF/ICSI-Zyklen. Da der Stichprobenumfang mit 63 Paaren relativ klein war, sind weiterführende Studien mit größerer Teilnehmerzahl anzustreben, um unsere Ergebnisse zu bestätigen.

Die pathophysiologischen Mechanismen sind aktuell noch unklar. Möglicherweise führt eine ANXA5-Defizienz zu verminderten Membranreparaturmechanismen in Embryonen, so dass die Implantation erschwert wird.

Insgesamt lässt sich sagen, dass der höchst komplexe Vorgang der Implantation vermutlich nicht auf einzelne Faktoren zurückführen ist, sondern ein Zusammenspiel verschiedener Mechanismen ist, die schlussendlich in einem Implantationsversagen resultieren.

## 6. Anhang

### 6.1. Abkürzungsverzeichnis

aANXA5	Anti-Annexin-A5-Antikörper
AFC	Antral follicle count
AK	Antikörper
AMH	Anti-Müller-Hormon
ANA	Antinukleäre Antikörper
ANXA5	Annexin A5
APLS	Antiphospholipidsyndrom
ART	Assistierte Reproduktionstechnik
ATAK	Antitrophoblastäre Antikörper
BMI	Body-Mass-Index
COX	Cyclooxygenase
CT	Zytotrophoblast
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ET	Embyonentransfer
FVL	Faktor-V-Leiden
hCG	humanes Choriongonadotropin
HLA	Humanes Leukozytenantigen
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IVF	In-Vitro-Fertilisation
KI	Konfidenzintervall
LIF	Leukämiehemmender Faktor
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
M2/ANXA5	M2-Mutation im Annexin A5-Gen
MCMC	Markov-Chain-Monte-Carlo
MHC	major histocompatibility complex
NK	Natürliche Killerzellen
NMH	Niedermolekulare Heparine

---

OR	Odds Ratio
PN	Pronucleus
PCOS	Syndrom polyzystischer Ovarien
RIF	Rezidivierendes Implantationsversagen
RR	Relatives Risiko
RSA	Rezidivierende Spontanaborte
ST	Synzytiotrophoblast
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
WHO	World Health Organization
ZT	Zytotrophoblast

## 6.2. Patientenaufklärung

### Patientinnen

	<b>KLINIKUM</b> DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN	<b>CAMPUS GROSSHADERN</b> GYNÄKOLOGISCHE ENDOKRINOLOGIE UND REPRODUKTIVMEDIZIN KLINIK UND POLIKLINIK FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE	
<small>Klinikum der Universität München • Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe-Großhadern          Marchioninistr. 15 • 81377 München</small>		<small>Gynäkologische Endokrinologie und          Reproduktionsmedizin          Leiter: Prof. Dr. med. C. J. Thaler          www.hormone-uni-muenchen.de          Termine: +49-89-7095-6825          Fax: -3844; Arztraum: - 6824          Marchioninstr. 15          D-81377 München</small>	
<small><u>Doktorandin:</u>          Xenia Ennerst  <u>Studienleiterin:</u>          PD Dr. med. Nina Rogenhofer          Stellv. Leiterin des Hormon- und Kinderwunschzentrums der LMU</small>		<small>München, den 26.06.2016</small>	
<h3>Patienteninformation und Einverständniserklärung</h3>			
<p><b>Sehr geehrte Patientin,</b>          wir möchten Sie heute über eine Studie zur Erforschung von Ursachen der erfolglosen Kinderwunschbehandlung informieren, welche im Hormon- und Kinderwunschzentrum der LMU durchgeführt wird.          Der Titel dieser Studie lautet:</p>			
<p style="text-align: center;"><b>Hereditäre thrombophile Marker bei Patientinnen und ggf. deren Partnern mit rezidivierendem Implantationsversagen</b></p>			
<p>Ziel der vorliegenden Studie ist es, neue Ursachen für wiederholtes Einnistungsversagen (Implantationsversagen) zu finden und dadurch neue Therapieansätze zu entwickeln.</p>			
<p>Im Vordergrund steht dabei die Untersuchung über das Vorliegen einer genetischen Veränderung (Mutation) des Annexin A5 (blutgerinnungshemmendes Protein) Gens, welche einen blutgerinnungsfördernden Risikofaktor darstellt und damit die Wahrscheinlichkeit eines Einnistungsversagens erhöhen könnte.</p>			
<p>Es konnte gezeigt werden, dass Patientinnen, die selbst oder deren Partner eine Genvariante im Annexin A5-Gen aufweisen, häufiger Fehlgeburten erleiden. Diese angeborene Genvariante wird Haplotyp M2 genannt und kommt in Mitteleuropa bei ca. 15% der Männer und Frauen vor. Das Vorliegen dieser Genvariante spielt eine wichtige Rolle während der Schwangerschaft, da Annexin A5 den Mutterkuchen vor überschießender Blutgerinnung schützt und ein Mangel somit Schwangerschaftskomplikationen zur Folge haben kann.</p>			
<p>Die Genvariante (M2-Haplotyp) des Annexin A5 könnte auch zu einem wiederholten Implantationsversagen beitragen, was in dieser Studie untersucht werden soll.</p>			
<small>Direktor der Klinik: Prof. Dr. med. Sven Mahner          Das Klinikum der Universität München ist eine Anstalt des öffentlichen Rechts</small>			

Da die befruchtete Eizelle und auch der entstehende Mutterkuchen Erbgut von Mutter und Vater enthalten, sollten wenn möglich beide in dieser Studie untersucht werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das mütterliche und auch väterliche Vorliegen bei Fehlgeburten und Schwangerschaftskomplikationen eine wichtige Rolle spielt.

Durch die Teilnahme an dieser Studie helfen Sie mit, diese Parameter zu erforschen und damit möglicherweise neue Erkenntnisse über Implantationsversagen zu gewinnen. Sollte bei Ihnen oder Ihrem Partner diese Genvariante gefunden werden, könnte man Ihnen möglicherweise therapeutische Optionen (blutgerinnungsverändernde Medikation) anbieten, die die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Befruchtung erhöhen könnte.

**Sie können jederzeit, auch ohne Angabe von Gründen, die Teilnahme an dem Forschungsvorhaben beenden, ohne dass Ihnen ein Nachteil entsteht. Beim Widerruf Ihrer Einwilligung, an dem Forschungsvorhaben teilzunehmen, haben Sie das Recht, die Löschung aller Ihrer bis dahin gespeicherten, verschlüsselten (pseudonymisierten) personenbezogenen Daten zu verlangen.**

**Im Falle des Widerrufs können Sie entscheiden, ob ihre Blutproben vernichtet werden sollen oder in anonymisierter Form (also ohne die Möglichkeit für den Studienarzt, weiterhin einen Bezug zwischen der Probe und Ihrer Person herzustellen) für weitere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden dürfen.**

**Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Personendaten (Name, Vorname, Geburtsdatum) werden von der Studienleiterin oder von der von ihr autorisierten Doktorandin für die Kommunikation während der Studie vermerkt.**

**Die anamnestisch erhobenen Daten (Alter, BMI, Anzahl an Schwangerschaften/Geburten/Aborten), die erfassten Stimulationsparameter (Follikelstimulierendes Hormon (FSH), Luteinisierendes Hormon (LH), hMG (humanes Menopausen gonadotropin), Anzahl an Vorzyklen, Stimulationsdauer, Oozyten, Oozyten in der Metaphase II, die Fertilitäts- und Implantationsrate, Schwangerschaftstest) und Blutproben (Vitamin-D-Serumspiegel, Vitamin-B12-Serumspiegel, Folsäure-Serumspiegel, Östrogen- und Progesteron-Serumspiegel, Anti-Müllerhormon (AMH), MTHFR-Genotyp, Annexin-A5-Genotyp), werden mit einem Verschlüsselungscode markiert bzw. elektronisch gespeichert und weiterverarbeitet (verschlüsselt). Als Verschlüsselungscode (Pseudonymisierung) dient eine Zahlen- und Buchstabenkombination, die durch Dritte keinen Rückschluss auf Ihre Personendaten zulässt. Diese auszuwertenden Studiendaten werden strikt getrennt von den Personendaten verwahrt. Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: Studienleiterin PD Dr. med. Nina Rogenhofer oder von der von ihr autorisierten Doktorandin Xenia Ennerst.**

**Die gespeicherten Personendaten (Name, Vorname, Geburtsdatum) werden, nachdem Sie Ihr persönliches Ergebnis der Blutuntersuchung erhalten haben, irreversibel vernichtet. Damit liegen ausschließlich anonymisierte Daten vor. Ein Zusammenhang zwischen den Daten der Studie und den Studienteilnehmerinnen ist damit nicht mehr nachvollziehbar.**

**In der Patienteninformation wird die Patientin über den Schutz der Personendaten aufgeklärt. Die Patientin wird ausdrücklich drauf hingewiesen, dass alle gemachten Angaben neben der Verschlüsselung zusätzlich der ärztlichen Schweigepflicht unterliegen und eine Weitergabe nur mit ausdrücklicher Zustimmung erfolgen kann. Die Patientin erklärt sich mit der elektronischen Weiterverarbeitung der pseudonymisierten und anschließend anonymisierten Daten, sowie mit der Verwendung dieser Daten zum Zwecke der wissenschaftlichen Veröffentlichung einverstanden.**

**In etwaigen Veröffentlichungen der Daten dieser Studie wird die Patientin aufgrund der Anonymisierung nicht namentlich genannt, sodass die Vertraulichkeit der Personendaten gewährt ist.**

**Ablauf der Studie:**

Patientinnen, die sich im Rahmen eines rezidivierenden Implantationsversagens in der Sprechstunde des Hormon- und Kinderwunschzentrums vorstellen, werden Blutproben entnommen. Dies erfolgt im Rahmen klinisch indizierter Blutabnahmen. Zusätzlich wird das Blut auf den M2-Haplotyp hin untersucht.

Bei Rückfragen zu dieser Studie erreichen Sie uns unter folgender Telefonnummer:

**Doktorandin X. Ennerst** **Tel.:**  
**Studienleiterin: PD Dr. Rogenhofer:** **Tel.:**  
**Hormon- und Kinderwunschzentrum LMU München**

Ich erkläre hiermit, dass ich von \_\_\_\_\_ (Name der/des Ärztin/Arztes bzw. der Doktorandin) ausführlich über die Studie aufgeklärt und meine offenen Fragen beantwortet wurden. Ich erteile meine Zustimmung zur Speicherung meiner Daten unter Berücksichtigung des oben ausgeführten Datenschutzes.

**Über die datenschutzrechtlichen Vorgehensweisen wurde ich informiert und erteile hierzu explizit meine Einwilligung.**

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum, Unterschrift der Patientin

**Mit meiner Unterschrift erkläre ich mich bereit, an der Studie teilzunehmen.**

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum, Unterschrift der Patientin

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum, Unterschrift der/s aufklärenden Ärztin/Arztes/Doktorandin

**Name Patientin:** \_\_\_\_\_

**Geburtsdatum Patientin:** \_\_\_\_\_

**Name Partner:** \_\_\_\_\_

**Geburtsdatum Partner:** \_\_\_\_\_

## Partner

	<b>KLINIKUM</b> DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN	<b>CAMPUS GROSSHADERN</b> GYNÄKOLOGISCHE ENDOKRINOLOGIE UND REPRODUKTIVMEDIZIN KLINIK UND POLIKLINIK FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE	
---	--	---	---

Klinikum der Universität München • Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe-Großhadern  
Münchenstr. 15 • 81377 München

Gynäkologische Endokrinologie und  
Reproduktionsmedizin  
Leiter: Prof. Dr. med. C. J. Thaler  
[www.hormone-uni-muenchen.de](http://www.hormone-uni-muenchen.de)  
Telefon: +49-89-7095-6825  
Fax: -3844; Arztraum: -6824  
Münchenstr. 15  
D-81377 München

Doktorandin:  
Xenia Ennerst  
Studienleiterin:  
PD Dr. med. Nina Rogenhofer  
Stellv. Leiterin des Hormon- und Kinderwunschzentrums der LMU

München, den 26.06.2016

---

### Patienteninformation und Einverständniserklärung

**Sehr geehrter Patient,**

wir möchten Sie heute über eine Studie zur Erforschung von Ursachen der erfolglosen Kinderwunschbehandlung informieren, welche im Hormon- und Kinderwunschzentrum der LMU durchgeführt wird.

Der Titel dieser Studie lautet:

**Hereditäre thrombophile Marker bei Patientinnen und ggf. deren Partnern mit rezidivierendem Implantationsversagen**

Ziel der vorliegenden Studie ist es, neue Ursachen für wiederholtes Einnistungsversagen (Implantationsversagen) zu finden und dadurch neue Therapieansätze zu entwickeln.

Im Vordergrund steht dabei die Untersuchung über das Vorliegen einer genetischen Veränderung (Mutation) des Annexin A5 (blutgerinnungshemmendes Protein) Gens, welche einen blutgerinnungsfördernden Risikofaktor darstellt und damit die Wahrscheinlichkeit eines Einnistungsversagens erhöhen könnte.

Es konnte gezeigt werden, dass Patientinnen, die selbst oder deren Partner eine Genvariante im Annexin A5-Gen aufweisen, häufiger Fehlgeburten erleiden. Diese angeborene Genvariante wird Haplotyp M2 genannt und kommt in Mitteleuropa bei ca. 15% der Männer und Frauen vor. Das Vorliegen dieser Genvariante spielt eine wichtige Rolle während der Schwangerschaft, da Annexin A5 den Mutterkuchen vor überschießender Blutgerinnung schützt und ein Mangel somit Schwangerschaftskomplikationen zur Folge haben kann.

Die Genvariante (M2-Haplotyp) des Annexin A5 könnte auch zu einem wiederholten Implantationsversagen beitragen, was in dieser Studie untersucht werden soll.

Direktor der Klinik: Prof. Dr. med. Sven Mahner  
Das Klinikum der Universität München ist eine Anstalt des öffentlichen Rechts



**Da die befruchtete Eizelle und auch der entstehende Mutterkuchen Erbgut von Mutter und Vater enthalten, sollten wenn möglich beide in dieser Studie untersucht werden.** Es konnte bereits gezeigt werden, dass das mütterliche und auch väterliche Vorliegen bei Fehlgeburten und Schwangerschaftskomplikationen eine wichtige Rolle spielt.

Durch die Teilnahme an dieser Studie helfen Sie mit, diese Parameter zu erforschen und damit möglicherweise neue Erkenntnisse über Implantationsversagen zu gewinnen. Sollte bei Ihnen oder Ihrem Partner diese Genvariante gefunden werden, könnte man Ihnen möglicherweise therapeutische Optionen (blutgerinnungsverändernde Medikation) anbieten, die die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Befruchtung erhöhen könnte.

**Sie können jederzeit, auch ohne Angabe von Gründen, die Teilnahme an dem Forschungsvorhaben beenden, ohne dass Ihnen ein Nachteil entsteht. Beim Widerruf Ihrer Einwilligung, an dem Forschungsvorhaben teilzunehmen, haben Sie das Recht, die Löschung aller Ihrer bis dahin gespeicherten, verschlüsselten (pseudonymisierten) personenbezogenen Daten zu verlangen.**

**Im Falle des Widerrufs können Sie entscheiden, ob ihre Blutproben vernichtet werden sollen oder in anonymisierter Form (also ohne die Möglichkeit für den Studienarzt, weiterhin einen Bezug zwischen der Probe und Ihrer Person herzustellen) für weitere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden dürfen.**

**Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Personendaten (Name, Vorname, Geburtsdatum) werden von der Studienleiterin oder von der von ihr autorisierten Doktorandin für die Kommunikation während der Studie vermerkt.**

Die anamnestisch erhobenen Daten (Alter, BMI, Anzahl an Schwangerschaften/Geburten/Aborten), die erfassten Stimulationsparameter (Follikelstimulierendes Hormon (FSH), Luteinisierendes Hormon (LH), hMG (humanes Menopausen gonadotropin), Anzahl an Vorzyklen, Stimulationsdauer, Oozyten, Oozyten in der Metaphase II, die Fertilitäts- und Implantationsrate, Schwangerschaftstest) und Blutproben (Vitamin-D-Serumspiegel, Vitamin-B12-Serumspiegel, Folsäure-Serumspiegel, Östrogen- und Progesteron-Serumspiegel, Anti-Müllerhormon (AMH), MTHFR-Genotyp, Annexin-A5-Genotyp), werden mit einem Verschlüsselungscode markiert bzw. elektronisch gespeichert und weiterverarbeitet (verschlüsselt). Als Verschlüsselungscode (Pseudonymisierung) dient eine Zahlen- und Buchstabenkombination, die durch Dritte keinen Rückschluss auf Ihre Personendaten zulässt. Diese auszuwertenden Studiendaten werden strikt getrennt von den Personendaten verwahrt. Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: Studienleiterin PD Dr. med. Nina Rogenhofer oder von der von ihr autorisierten Doktorandin Xenia Ennerst.

Die gespeicherten Personendaten (Name, Vorname, Geburtsdatum) werden, nachdem Sie Ihr persönliches Ergebnis der Blutuntersuchung erhalten haben, irreversibel vernichtet. Damit liegen ausschließlich anonymisierte Daten vor. Ein Zusammenhang zwischen den Daten der Studie und den Studienteilnehmerinnen ist damit nicht mehr nachvollziehbar.

In der Patienteninformation wird die Patientin über den Schutz der Personendaten aufgeklärt. Die Patientin wird ausdrücklich drauf hingewiesen, dass alle gemachten Angaben neben der Verschlüsselung zusätzlich der ärztlichen Schweigepflicht unterliegen und eine Weitergabe nur mit ausdrücklicher Zustimmung erfolgen kann. Die Patientin erklärt sich mit der elektronischen Weiterverarbeitung der pseudonymisierten und anschließend anonymisierten Daten, sowie mit der Verwendung dieser Daten zum Zwecke der wissenschaftlichen Veröffentlichung einverstanden.

In etwaigen Veröffentlichungen der Daten dieser Studie wird die Patientin aufgrund der Anonymisierung nicht namentlich genannt, sodass die Vertraulichkeit der Personendaten gewährt ist.

#### **Ablauf der Studie:**

Patientinnen und deren Partner, die sich im Rahmen eines rezidivierenden Implantationsversagens in der Sprechstunde des Hormon- und Kinderwunschzentrums vorstellen, werden Blutproben entnommen. Das Blut des Partners wird auf den M2-Haplotyp hin untersucht.

Zudem wird Patientinnen ohne Kinderwunschbehandlung mit mindestens einem gesunden Kind und ohne Schwangerschaftskomplikation in der Vergangenheit (Kontrollgruppe) Blut entnommen, welches ebenso auf angeborene Störungen im Gerinnungssystem (Annexin A5-Mutation) untersucht wird.

Bei Rückfragen zu dieser Studie erreichen Sie uns unter folgender Telefonnummer:

**Doktorandin X. Ennerst**

**Tel.:**

**Studienleiterin: PD Dr. Rogenhofer:**

**Tel.:**

**Hormon- und Kinderwunschzentrum LMU München**

Ich erkläre hiermit, dass ich von \_\_\_\_\_ (Name der/des Ärztin/Arztes bzw. der Doktorandin) ausführlich über die Studie aufgeklärt und meine offenen Fragen beantwortet wurden. Ich erteile meine Zustimmung zur Speicherung meiner Daten unter Berücksichtigung des oben ausgeführten Datenschutzes.

**Über die datenschutzrechtlichen Vorgehensweisen wurde ich informiert und erteile hierzu explizit meine Einwilligung.**

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum, Unterschrift des Partners

**Mit meiner Unterschrift erkläre ich mich bereit, an der Studie teilzunehmen.**

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum, Unterschrift des Partners

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum, Unterschrift der/s aufklärenden Ärztin/Arztes/Doktorandin

**Name Patientin:** \_\_\_\_\_

**Geburtsdatum Patientin:** \_\_\_\_\_

**Name Partner:** \_\_\_\_\_

**Geburtsdatum Partner:** \_\_\_\_\_

## Kontrollen

		<p>CAMPUS GROSSHADERN</p> <p>GYNÄKOLOGISCHE ENDOKRINOLOGIE UND REPRODUKTIONSMEDIZIN</p> <p>KLINIK UND POLIKLINIK FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBÜRTSHILFE</p>	
<p>Klinikum der Universität München · Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe-Großhadern Marchioninstr. 15 · 81377 München</p>		<p>Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin Leiter: Prof. Dr. med. C. J. Thaler www.hormons-uni-muenchen.de Termine: +49-89-7095-6625 Fax: -3944; Arztraum: - 6624 Marchioninstr. 15 D-81377 München</p>	
<p><u>Doktorandin:</u> Xenia Ennerst <u>Studienleiterin:</u> PD Dr. med. Nina Rogenhofer Stellv. Leiterin des Hormon- und Kinderwunschzentrums der LIAU</p>		<p>München, den 26.06.2015</p>	
<p><b>Patienteninformation und Einverständniserklärung</b></p>			
<p><b>Sehr geehrte Patientin,</b> wir möchten Sie heute über eine Studie zur Erforschung von Ursachen der erfolglosen Kinderwunschbehandlung informieren, welche im Hormon- und Kinderwunschzentrum der LMU durchgeführt wird. Der Titel dieser Studie lautet:</p>			
<p style="text-align: center;"><b>Hereditäre thrombophile Marker bei Patientinnen und ggf. deren Partnern mit rezidivierendem Implantationsversagen</b></p>			
<p>Ziel der vorliegenden Studie ist es, neue Ursachen für wiederholtes Einnistungsversagen (Implantationsversagen) zu finden und dadurch neue Therapieansätze zu entwickeln.</p>			
<p>Im Vordergrund steht dabei die Untersuchung über das Vorliegen einer genetischen Veränderung (Mutation) des Annexin A5 (blutgerinnungshemmendes Protein) Gens, welche einen blutgerinnungsfördernden Risikofaktor darstellt und damit die Wahrscheinlichkeit eines Einnistungsversagens erhöhen könnte.</p>			
<p>Es konnte gezeigt werden, dass Patientinnen, die selbst oder deren Partner eine Genvariante im Annexin A5-Gen aufweisen, häufiger Fehlgeburten erleiden. Diese angeborene Genvariante wird Haplotyp M2 genannt und kommt in Mitteleuropa bei ca. 15% der Männer und Frauen vor. Das Vorliegen dieser Genvariante spielt eine wichtige Rolle während der Schwangerschaft, da Annexin A5 den Mutterkuchen vor überschießender Blutgerinnung schützt und ein Mangel somit Schwangerschaftskomplikationen zur Folge haben kann.</p>			
<p>Die Genvariante (M2-Haplotyp) des Annexin A5 könnte auch zu einem wiederholten Implantationsversagen beitragen, was in dieser Studie untersucht werden soll.</p>			
<p>Direktor der Klinik: Prof. Dr. med. Sven Mahner Das Klinikum der Universität München ist eine Anstalt des öffentlichen Rechts</p>			

Da die befruchtete Eizelle und auch der entstehende Mutterkuchen Erbgut von Mutter und Vater enthalten, sollten wenn möglich beide in dieser Studie untersucht werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das mütterliche und auch väterliche Vorliegen bei Fehlgeburten und Schwangerschaftskomplikationen eine wichtige Rolle spielt.

Für Sie, als **gesunde Frau**, hat diese Untersuchung in erster Linie keine Konsequenz, allerdings helfen Sie mit Ihrer Teilnahme anderen Patientinnen die an einem wiederholten Einnistungsversagen leiden. Unsere Forschungen decken möglicherweise einen neuen Einflussfaktor auf, der Hinweise für neue Therapiemöglichkeiten geben kann.

Durch die Teilnahme an dieser Studie helfen Sie mit, diese Parameter zu erforschen und damit möglicherweise neue Erkenntnisse über Einnistungsversagen zu gewinnen.

**Sie können jederzeit, auch ohne Angabe von Gründen, die Teilnahme an dem Forschungsvorhaben beenden, ohne dass Ihnen ein Nachteil entsteht. Beim Widerruf Ihrer Einwilligung, an dem Forschungsvorhaben teilzunehmen, haben Sie das Recht, die Löschung aller Ihrer bis dahin gespeicherten, verschlüsselten (pseudonymisierten) personenbezogenen Daten zu verlangen.**

**Im Falle des Widerrufs können Sie entscheiden, ob ihre Blutproben vernichtet werden sollen oder in anonymisierter Form (also ohne die Möglichkeit für den Studienarzt, weiterhin einen Bezug zwischen der Probe und Ihrer Person herzustellen) für weitere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden dürfen.**

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Personendaten (Name, Vorname, Geburtsdatum) werden von der Studienleiterin oder von der von ihr autorisierten Doktorandin für die Kommunikation während der Studie vermerkt.

Die anamnestisch erhobenen Daten (Alter, BMI, Anzahl an Schwangerschaften/Geburten/Aborten), die erfassten Stimulationsparameter (Follikelstimulierendes Hormon (FSH), Luteinisierendes Hormon (LH), hMG (humanes Menopausen gonadotropin), Anzahl an Vorzyklen, Stimulationsdauer, Oozyten, Oozyten in der Metaphase II, die Fertilitäts- und Implantationsrate, Schwangerschaftstest) und Blutproben (Vitamin-D-Serumspiegel, Vitamin-B12-Serumspiegel, Folsäure-Serumspiegel, Östrogen- und Progesteron-Serumspiegel, Anti-Müllerhormon (AMH), MTHFR-Genotyp, Annexin-A5-Genotyp), werden mit einem Verschlüsselungscode markiert bzw. elektronisch gespeichert und weiterverarbeitet (verschlüsselt). Als Verschlüsselungscode (Pseudonymisierung) dient eine Zahlen- und Buchstabenkombination, die durch Dritte keinen Rückschluss auf Ihre Personendaten zulässt. Diese auszuwertenden Studiendaten werden strikt getrennt von den Personendaten verwahrt. Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: Studienleiterin PD Dr. med. Nina Rogenhofer oder von der von ihr autorisierten Doktorandin Xenia Ennerst.

Die gespeicherten Personendaten (Name, Vorname, Geburtsdatum) werden, nachdem Sie Ihr persönliches Ergebnis der Blutuntersuchung erhalten haben, irreversibel vernichtet. Damit liegen ausschließlich anonymisierte Daten vor. Ein Zusammenhang zwischen den Daten der Studie und den Studienteilnehmerinnen ist damit nicht mehr nachvollziehbar.

In der Patienteninformation wird die Patientin über den Schutz der Personendaten aufgeklärt. Die Patientin wird ausdrücklich drauf hingewiesen, dass alle gemachten Angaben neben der Verschlüsselung zusätzlich der ärztlichen Schweigepflicht unterliegen und eine Weitergabe nur mit ausdrücklicher Zustimmung erfolgen kann. Die Patientin erklärt sich mit der elektronischen Weiterverarbeitung der pseudonymisierten und anschließend anonymisierten Daten, sowie mit der Verwendung dieser Daten zum Zwecke der wissenschaftlichen Veröffentlichung einverstanden.

In etwaigen Veröffentlichungen der Daten dieser Studie wird die Patientin aufgrund der Anonymisierung nicht namentlich genannt, sodass die Vertraulichkeit der Personendaten gewährt ist.

**Ablauf der Studie:**

Paare, die sich im Rahmen eines rezidivierenden Implantationsversagens in der Sprechstunde des Hormon- und Kinderwunschzentrums vorstellen, werden Blutproben entnommen. Dies erfolgt im Rahmen klinisch indizierter Blutabnahmen. Zusätzlich wird das Blut auf den M2-Haplotyp hin untersucht.

Bei Rückfragen zu dieser Studie erreichen Sie uns unter folgender Telefonnummer:

**Doktorandin X. Ennerst**

**Tel.:**

**Studienleiterin: PD Dr. Rogenhofer:**

**Tel.:**

**Hormon- und Kinderwunschzentrum LMU München**

Ich erkläre hiermit, dass ich von \_\_\_\_\_ (Name der/des Ärztin/Arztes bzw. der Doktorandin) ausführlich über die Studie aufgeklärt und meine offenen Fragen beantwortet wurden. Ich erteile meine Zustimmung zur Speicherung meiner Daten unter Berücksichtigung des oben ausgeführten Datenschutzes.

**Über die datenschutzrechtlichen Vorgehensweisen wurde ich informiert und erteile hierzu explizit meine Einwilligung.**

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum, Unterschrift der Patientin

**Mit meiner Unterschrift erkläre ich mich bereit, an der Studie teilzunehmen.**

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum, Unterschrift der Patientin

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum, Unterschrift der/s aufklärenden Ärztin/Arztes/Doktorandin

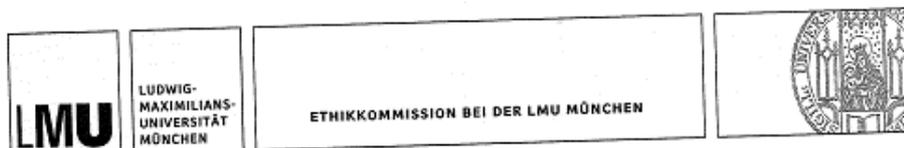
**Name Patientin:** \_\_\_\_\_

**Geburtsdatum Patientin:** \_\_\_\_\_

**Name Partner:** \_\_\_\_\_

**Geburtsdatum Partner:** \_\_\_\_\_

### 6.3. Zusage der Ethikkommission



Frau  
 PD Dr. Nina Rogenhofer  
 Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
 Klinikum Großhadern  
 81377 München

Vorsitzender:  
 Prof. Dr. W. Eisenmenger  
 Telefon+49 (0)89 440055191  
 Telefax+49 (0)89 440055192  
 Ethikkommission@  
 med.uni-muenchen.de  
[www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de](http://www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de)

Anschrift:  
 Pettenkoferstr. 8a  
 D-80336 München

24.06.2016 EM /sc

Projekt Nr: **238-16** (bitte bei Schriftwechsel angeben)

#### Beratung nach Fakultätsrecht Ergänzung zum Votum vom 27.05.2016

Studientitel: Hereditäre thrombophile Marker bei Patientinnen und ggf. deren Partner mit rezidivierendem Implantationsversagen  
 Antragsteller: PD Dr. Nina Rogenhofer, Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Klinikum Großhadern, 81377 München

Sehr geehrte Frau Dr. Rogenhofer,

besten Dank für Ihr Schreiben vom 15.06.2016 mit der Erfüllung der Auflagen und den noch ausstehenden bzw. überarbeiteten Unterlagen:

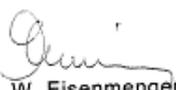
- Patienteninformation und Einverständniserklärung).

Die Ethikkommission (EK) kann Ihrer Studie nun die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zuerkennen.

- Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung des Vorhabens durch die EK die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern verbleibt.
- Änderungen des Studienprotokolls sind der EK mitzuteilen.
- Das Ende der Studie ist anzuzeigen und das Ergebnis der Studie mitzuteilen.

Für Ihre Studie wünsche ich Ihnen viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen

  
 Prof. Dr. W. Eisenmenger  
 Vorsitzender der Ethikkommission

Mitglieder der Kommission:  
 Prof. Dr. W. Eisenmenger (Vorsitzender), Prof. Dr. E. Held (stellv. Vorsitzender), Prof. Dr. C. Bausewein, PD Dr. Th. Beinert, Prof. Dr. B. Emmerich, Prof. Dr. H. U. Gallwas, Prof. Dr. K. Hahn, Dr. B. Henrikus, Dr. V. Mönch, Prof. Dr. D. Nowak, Prof. Dr. R. Penning, Prof. Dr. K. Pfeifer, Dr. A. Yassouridis, Dr. Ch. Zach

## 7. Literaturverzeichnis

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Mouzon J de, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Vanderpoel S. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertility and Sterility* 2009;92;1520–1524.
2. Brähler E, Stöbel-Richter Y, Huinink J, Glander HJ. Zur Epidemiologie gewollter und ungewollter Kinderlosigkeit in Ost- und Westdeutschland. *Reproduktionsmedizin* 2001;157–162.
3. Schmidt L, Munster K 1995. Infertility, involuntary infecundity, and the seeking of medical advice in industrialized countries 1970-1992. A review of concepts, measurements and results. *Human Reproduction Jg.* 10 Nr.6 S. 1407–1418.
4. Tinneberg HR, Michelmann HW, Naether O 2007. *Lexikon der Reproduktionsmedizin*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
5. Broekmans FJ, Fauser BCJM 2016. *Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Edition)*. Chapter 132 - Female Infertility: Evaluation and Management.
6. Turek PJ 2007. *Penn Clinical Manual of Urology*. Chapter 20 - Male Fertility and Sterility.
7. Ginsburg ES, Racowsky C. Chapter 31 - Assisted Reproduction 734-773.e12.
8. Deutsches IVF-Register (D-I-R) e. V. *D.I.R.-Jahrbuch 2018*. *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie* 2018;
9. Moore KL, Persaud TVN, Viebahn C 2011. *Embryologie*. Entwicklungsstadien, Frühentwicklung, Organogenese, Klinik. 5. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer.
10. Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *The New England journal of medicine* 2001;345;1400–1408.
11. Dey S. How we are born. *The Journal of clinical investigation* 2010;952–955.
12. Zhang P, Zucchelli M, Bruce S, Hambiliki F, Stavreus-Evers A, Levkov L, Skottman H, Kerkelä E, Kere J, Hovatta O. Transcriptome profiling of human pre-implantation development. *PloS one* 2009;4;e7844.
13. Domínguez F, Remohí J, Pellicer A, Simón C 2003. Human endometrial receptivity: A genomic approach. *Reproductive biomedicine online Jg.* 6 Nr.3 S. 332–338.
14. Schneider H, Husslein P, Schneider KTM 2004. *Die Geburtshilfe*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

15. Kaufmann M, Costa SD, Scharl A 2013. Die Gynäkologie. 3. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer.
16. Hey NA, Graham RA, Seif MW, Aplin JD. The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1994;78;337–342.
17. Meseguer M, Aplin JD, Caballero-Campo P, O'Connor JE, Martín JC, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biology of reproduction* 2001;64;590–601.
18. Diedrich K, Ludwig M, Griesinger G 2013. Reproduktionsmedizin. Berlin: Springer.
19. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human reproduction update* 2006;12;731–746.
20. Aplin JD. Embryo implantation: the molecular mechanism remains elusive. *Reproductive biomedicine online* 2007;14 Spec No 1;49–55.
21. Johnson GA, Burghardt RC, Spencer TE, Newton GR, Ott TL, Bazer FW. Ovine osteopontin: II. Osteopontin and alpha(v)beta(3) integrin expression in the uterus and conceptus during the periimplantation period. *Biology of reproduction* 1999;61;892–899.
22. Polin RA, Fox WW 1992. Neonatal and Fetal Medicine: Physiology and Pathophysiology. Orlando: Saunders.
23. Baergen R 2006. Manual of Benirschke and Kaufmann's Pathology of the Human Placenta. 1. Aufl. New York, NY: Springer New York.
24. Liebig W, Stegner HE. Die Dezidualisation der endometrialen Stromazelle. *Archiv für Gynkologie* 1977;223;19–31.
25. Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K 2000. Embryo Implantation. *Developmental Biology Jg.* 223 Nr.2 S. 217–237.
26. Germeyer A, Sharkey AM, Prasadajudio M, Sherwin R, Moffett A, Bieback K, Clausmeyer S, Masters L, Popovici RM, Hess AP, Strowitzki T, Wolff M von 2009. Paracrine effects of uterine leucocytes on gene expression of human uterine stromal fibroblasts. *Molecular human reproduction Jg.* 15 Nr. 1 S. 39–48.
27. McIntire RH, Hunt JS. Antigen presenting cells and HLA-G--a review. *Placenta* 2005;26 Suppl A;S104-9.
28. Mor G 2006. MHC Molecules of the Preimplantation Embryo and Trophoblast in "Immunology of Pregnancy". 1. Aufl. New York, NY: Springer New York.
29. Song H, Lim H, Paria BC, Matsumoto H, Swift LL, Morrow J, Bonventre JV, Dey SK. Cytosolic phospholipase A2alpha is crucial correction of A2alpha deficiency is crucial for 'on-time' embryo implantation that

- directs subsequent development. *Development (Cambridge, England)* 2002;129;2879–2889.
30. Achache H, Tsafir A, Prus D, Reich R, Revel A. Defective endometrial prostaglandin synthesis identified in patients with repeated implantation failure undergoing in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 2010;94;1271–1278.
  31. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F, Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature* 1992;359;76–79.
  32. Aghajanova L. Update on the role of leukemia inhibitory factor in assisted reproduction. *Current opinion in obstetrics & gynecology* 2010;22;213–219.
  33. Brinsden PR, Alam V, Moustier B, Engrand P. Recombinant human leukemia inhibitory factor does not improve implantation and pregnancy outcomes after assisted reproductive techniques in women with recurrent unexplained implantation failure. *Fertility and Sterility* 2009;91;1445–1447.
  34. Simon A, Laufer N. Repeated implantation failure: clinical approach. *Fertility and Sterility* 2012;1039–1043.
  35. Thornhill AR, deDie-Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC, Harton GL, Lavery SA, Moutou C, Robinson MD, Schmutzler AG, Scriven PN, Sermon KD, Wilton L. ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Human reproduction (Oxford, England)* 2005;20;35–48.
  36. Rinehart J. Recurrent implantation failure: definition. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2007;24;284–287.
  37. Shufaro Y, Schenker JG, Rao KA 2011. Implantation Failure, Etiology, Diagnosis and Treatment. *International Journal of Infertility & Fetal Medicine S.* 1–7.
  38. Das M, Holzer HEG. Recurrent implantation failure. Gamete and embryo factors. *Fertility and Sterility* 2012;97;1021–1027.
  39. C. Coughlan, W. Ledger, Q. Wang, Fenghua Liu, Aygul Demiroglu, Timur Gurgan, R. Cutting, K. Ong, H. Sallam, T.C. Li. Recurrent implantation failure. Definition and management. *Reproductive BioMedicine Online* 2013;28;14–38.
  40. Polanski LT, Baumgarten MN, Quenby S, Brosens J, Campbell BK, Raine-Fenning NJ. What exactly do we mean by 'recurrent implantation failure'? A systematic review and opinion. *Reproductive biomedicine online* 2014;28;409–423.
  41. Abdelmassih V, Balmaceda JP, Nagy ZP, Abdelmassih S, Abdelmassih R. ICSI and day 5 embryo transfers. Higher implantation rates and lower rate of multiple pregnancy with prolonged culture. *Reproductive biomedicine online* 2001;3;216–220.

42. los Santos MJ de, Mercader A, Galán A, Albert C, Romero JL, Pellicer A 2003. Implantation Rates after Two, Three, or Five Days of Embryo Culture. *Placenta* Nr.2413-19.
43. Zeyneloglu HB, Onalan G. Remedies for recurrent implantation failure. *Seminars in Reproductive Medicine* 2014;32;297–305.
44. Shapiro BS, Daneshmand ST, Desai J, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. The risk of embryo-endometrium asynchrony increases with maternal age after ovarian stimulation and IVF. *Reproductive biomedicine online* 2016;33;50–55.
45. Ajonuma LC. New insights into the mechanisms underlying hydrosalpinx fluid formation and its adverse effect on IVF outcome. *Human reproduction update* 2002;8;255–264.
46. Timeva T, Shterev A, Kyurkchiev S. Recurrent Implantation Failure. The Role of the Endometrium. *Journal of Reproduction & Infertility* 2014;15;173–183.
47. Bouet PE, El Hachem H, Monceau E, Gariépy G, Kadoch IJ, Sylvestre C. Chronic endometritis in women with recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure. Prevalence and role of office hysteroscopy and immunohistochemistry in diagnosis. *Fertility and Sterility* 2016;106–110.
48. Kasius JC, Fatemi HM, Bourgain C, Sie-Go DM, Eijkemans RJ, Fauser BC, Devroey P, Broekmans FJ. The impact of chronic endometritis on reproductive outcome. *Fertility and Sterility* 2011;96;1451–1456.
49. Akopians AL, Pisarska MD, Wang ET. The Role of Inflammatory Pathways in Implantation Failure - Chronic Endometritis and Hydrosalpinges. *Seminars in Reproductive Medicine* 2015;298–304.
50. Noyes N, Liu HC, Sultan K, Schattman G, Rosenwaks Z. Endometrial thickness appears to be a significant factor in embryo implantation in in-vitro fertilization. *Human Reproduction* 1995;919–922.
51. Sales KJ, Jabbour HN. Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in pathology of the endometrium. *Reproduction (Cambridge, England)* 2003;126;559–567.
52. Kotani Y, Iwase A, Ando H, Mizutani S. Oxytocin-induced prostaglandin E2 (PGE2) synthesis is regulated by progesterone via oxytocinase in Ishikawa cells. *Hormone and metabolic research* 2005;37;4–9.
53. Azem F. Increased rates of thrombophilia in women with repeated IVF failures. *Human Reproduction* 2004;19;368–370.
54. Martinelli I, Passamonti SM, Battaglioli T, Taioli E, Ragni G, Levi-Setti P, Lodigiani C, Mannucci PM. Embryo implantation after assisted reproductive procedures and maternal thrombophilia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2003;1;790-793.

- 
55. Coulam CB, Jeyendran RS, La Fishel, Roussev R. Multiple thrombophilic gene mutations are risk factors for implantation failure. *Reproductive biomedicine online* 2006;12;322–327.
  56. Safdarian L, Najmi Z, Aleyasin A, Aghahosseini M, Rashidi M, Asadollah S 2014. Recurrent IVF failure and hereditary thrombophilia. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* Vol. 12 No.7 S. 467–470.
  57. Qublan HS, Eid SS, Ababneh HA, Amarin ZO, Smadi AZ, Al-Khafaji FF, Khader YS. Acquired and inherited thrombophilia: implication in recurrent IVF and embryo transfer failure. *Human Reproduction* 2006;21;2694–2698.
  58. Tan X, Yu Z, Sao J, Chen L, Shen Y, Ding J, Shi W. Association between in vitro fertilization outcomes and inherited thrombophilias. A meta-analysis. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2016;33;1093–1098.
  59. Simon A, Laufer N. Assessment and treatment of repeated implantation failure (RIF). *Journal of assisted reproduction and genetics* 2012;1227–1239.
  60. Qublan HS, Amarin Z, Dabbas M, Farraj A-E, Beni-Merei Z, Al-Akash H, Bdoor A-N, Nawasreh M, Malkawi S, Diab F, Al-Ahmad N, Balawneh M, Abu-Salim A. Low-molecular-weight heparin in the treatment of recurrent IVF-ET failure and thrombophilia. A prospective randomized placebo-controlled trial. *Human fertility (Cambridge, England)* 2008;11;246–253.
  61. Carp HJ, Toder V, Mashiach S, Rabinovici J. Effect of paternal leukocyte immunization on implantation after biochemical pregnancies and repeated failure of embryo transfer. *American Journal of Reproductive Immunology* 1994;112–5.
  62. Elram T, Simon A, Israel S, Revel A, Shveiky D, Laufer N. Treatment of recurrent IVF failure and human leukocyte antigen similarity by intravenous immunoglobulin. *Reproductive biomedicine online* 2005;745–749.
  63. Kling C, Magez-Zunker J, Jenisch S, Kabelitz D. Effect of Allogeneic Leukocyte Immunization on Consecutive IVF/ICSI-Treatment for Failure in the In-Vitro-Fertilization Program. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 2002;62;661–667.
  64. Carp HJ, Toder V, Mashiach S. Graft versus host or host versus graft reaction after paternal immunization. *Fertility and Sterility* 1992;1085–1087.
  65. Tanaka T, Umesaki N, Nishio J, Maeda K, Kawamura T, Araki N 2000. Neonatal thrombocytopenia induced by maternal anti-HLA antibodies: a potential side effect of allogeneic leukocyte immunization for unexplained recurrent aborters. *Journal of Reproductive Immunology* Nr.46 S. 51–57.
  66. Ndukwe G 2011. Recurrent embryo implantation failure after in vitro fertilisation: improved outcome following intralipid infusion in women with

- elevated T Helper 1 response. Abstract. *Human Fertility (Cambridge)* 14(2)21–2.
67. Tur-Torres MH, Garrido-Gimenez C, Alijotas-Reig J. Genetics of recurrent miscarriage and fetal loss. *Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2017;42;11–25.
  68. Pellicer A, Rubio C, Vidal F, Mínguez Y, Giménez C, Egozcue J, Remohí J, Simón C 1999. In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage. An analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos. *Fertility and Sterility Jg.* 71 Nr.6 S. 1033–1039.
  69. Plachot M 2001. Chromosomal abnormalities in oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology Jg.* 183 S59-S63.
  70. Pehlivan T, Rubio C, Rodrigo L, Romero J, Remohi J, Simón C, Pellicer A 2002. Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. *Reproductive biomedicine online* Vol 6. No 2. S. 232–237.
  71. Zhao M, Dean J. The zona pellucida in folliculogenesis, fertilization and early development. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2002;19–26.
  72. Cohen J, Elsner C, Kort H, Malter H, Massey J, Mayer MP, Wiemer K. Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. *Human Reproduction* 1990;7–13.
  73. DeMeestere I, Barlow P, Leroy F. Hardening of zona pellucida of mouse oocytes and embryos in vivo and in vitro. *International Journal of Fertility and Women's Medicine* 1997;219–222.
  74. Carroll J, Depypere H, Matthews CD. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *Journal of reproduction and fertility* 1990;547–553.
  75. Horcajadas JA, Mínguez P, Dopazo J, Esteban FJ, Domínguez F, Giudice LC, Pellicer A, Simón C. Controlled ovarian stimulation induces a functional genomic delay of the endometrium with potential clinical implications. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2008;93;4500–4510.
  76. Carney SK, Das S, Blake D, Farquhar C, Seif MM, Nelson L. Assisted hatching on assisted conception (in vitro fertilisation (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI)). *The Cochrane database of systematic reviews* 2012;CD001894.
  77. Gerke V, Moss SE. Annexins: From structure to function. *Physiological reviews* 2002;82;331–371.
  78. Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: Linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2005;449–461.

- 
79. Rescher U, Gerke V. Annexins - unique membrane binding proteins with diverse functions. *Journal of cell science* 2004;117;2631–2639.
  80. Reutelingsperger CPM 2001. Annexins: Key Regulators of Haemostasis, Thrombosis, and Apoptosis. *Thrombosis and haemostasis* 86(1)413-9.
  81. Boersma HH, Kietselaer BL, Stolk LM, Bennaghmouch A, Hofstra L, Narula J, Heidendal GA, Reutelingsperger CP. Past, Present, and Future of Annexin A5: From Protein Discovery to Clinical Applications. *Journal of Nuclear Medicine* 2005;2035–2050.
  82. Morgan RO, Bell DW, Testa, JR, Fernandez MP. Genomic locations of ANX11 and ANX13 and the evolutionary genetics of human annexins. *Genomics* 1998;100–110.
  83. Cookson BT, Engelhardt S, Smith C, Bamford HA, Prochazka M, Tait JF. Organization of the human annexin V (ANX5) gene. *Genomics* 1994;463–467.
  84. Oling F, Bergsma-Schutter W, Brisson A. Trimers, dimers of trimers, and trimers of trimers are common building blocks of annexin a5 two-dimensional crystals. *Journal of structural biology* 2001;55–63.
  85. McNeil PL, Steinhardt RA. Plasma membrane disruption. Repair, prevention, adaptation. *Annual review of cell and developmental biology* 2003;19;697–731.
  86. Steinhardt RA, Bi G, Alderton JM. Cell membrane resealing by a vesicular mechanism similar to neurotransmitter release. *Science (New York)* 1994;263;390–393.
  87. Bouter A, Carmeille R, Gounou C, Bouvet F, Degrelle SA, Evain-Brion D, Brisson AR. Review: Annexin-A5 and cell membrane repair. *Placenta* 2015;43-49.
  88. Richter RP, Him JLK, Tessier B, Tessier C, Brisson AR. On the kinetics of adsorption and two-dimensional self-assembly of annexin A5 on supported lipid bilayers. *Biophysical journal* 2005;89;3372–3385.
  89. Tait JF, Gibson DF, Smith C. Measurement of the affinity and cooperativity of annexin V-membrane binding under conditions of low membrane occupancy. *Analytical biochemistry* 2004;329;112–119.
  90. Bouter A, Gounou C, Bérat R, Tan S, Gallois B, Granier T, d'Estaintot BL, Pöschl E, Brachvogel B, Brisson AR. Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair. *Nature communications* 2011;270.
  91. Römisch J, Heimburger N 1990. Purification and characterization of six annexins from human placenta. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 371(5) S. 383–388.
  92. Buhl WJ, García MT, Zipfel M, Schiebler W, Gehring U. A series of annexins from human placenta and their characterization by use of an endogenous phospholipase A2. *European Journal of Cell Biology* 1991;381–390.

93. Krikun G, Lockwood C. The Expression of the Placental Anticoagulant Protein, Annexin V, by Villous Trophoblasts: Immunolocalization and In Vitro Regulation. *Placenta* 1994;601–612.
94. Mayhew TM. Villous trophoblast of human placenta: A coherent view of its turnover, repair and contributions to villous development and maturation. *Histology and histopathology* 2001;16;1213–1224.
95. Burton GJ, Jones CJP 2009. Syncytial Knots, Sprouts, Apoptosis, and Trophoblast Deportation from the Human Placenta. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology Jg. 48 Nr. 1 S. 28–37.*
96. Carmeille R, Degrelle S, Plawinski L, Bouvet F, Gounou C, Evain-Brion D, Brisson AR, Bouter A. Annexin-A5 promotes membrane resealing in human trophoblasts. *Biochimica et biophysica acta* 2015;2033–2044.
97. Bogdanova N, Horst J, Chlystun M, Croucher PJ, Nebel A, Bohring A, Todorova A, Schreiber S, Gerke V, Krawczak M, Markoff A. A common haplotype of the annexin A5 (ANXA5) gene promoter is associated with recurrent pregnancy loss. *Human molecular genetics* 2007;573–578.
98. Tüttelmann F, Ivanov P, Dietzel C, Sofroniou A, Tsvyatkovska TM, Komsa-Penkova RS, Markoff A, Wieacker P, Bogdanova N. Further insights into the role of the annexin A5 M2 haplotype as recurrent pregnancy loss factor, assessing timing of miscarriage and partner risk. *Fertility and Sterility* 2013;100;1321–1325.
99. Hiddink L, Visser MC de, van Heerde WL. Polymorphisms in the Annexin A5 gene influence circulating Annexin A5 levels in healthy controls. *Thrombosis research* 2012;815–817.
100. Rogenhofer N, Nienaber LRM, Amshoff L, Bogdanova N, Petroff D, Wieacker P, Thaler C, Markoff A. Assessment of M2/ANXA5 haplotype as a risk factor in couples with placenta-mediated pregnancy complications. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2018;35;157–163.
101. Grandone E, Tiscia G, Colaizzo D, Chinni E, Pisanelli D, Bafunno V, Margaglione M. Role of the M2 haplotype within the annexin A5 gene in the occurrence of pregnancy-related venous thromboembolism. *American journal of obstetrics and gynecology* 2010;461.e1-5.
102. Tiscia G, Colaizzo D, Chinni E, Pisanelli D, Sciannamè N, Favuzzi G, Margaglione M, Grandone E. Haplotype M2 in the annexin A5 (ANXA5) gene and the occurrence of obstetric complications. *Thrombosis and haemostasis* 2009;102;309–313.
103. Chinni E, Tiscia GL, Colaizzo D, Vergura P, Margaglione M, Grandone E. Annexin V expression in human placenta is influenced by the carriership of the common haplotype M2. *Fertility and Sterility* 2009;940–942.
104. Ueki H, Mizushina T, Laoharatchatathanin T, Terashima R, Nishimura Y, Rieanrakwong D, Yonezawa T, Kurusu S, Hasegawa Y, Brachvogel B, Pöschl E, Kawaminami M. Loss of maternal annexin A5 increases the

- likelihood of placental platelet thrombosis and foetal loss. *Scientific reports* 2012;827.
105. WHO. Recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. Modifications recommended by FIGO as amended October 14, 1976. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* 1977;56;247–253.
  106. Rey E, Kahn, SR, David M, Shrier I 2003. Thrombophilic disorders and fetal loss: A meta-analysis. *The Lancet* Nr.9361 S. 901–908.
  107. Rogenhofer N, Engels L, Bogdanova N, Tüttelmann F, Markoff A, Thaler C. Paternal and maternal carriage of the annexin A5 M2 haplotype are equal risk factors for recurrent pregnancy loss: a pilot study. *Fertility and Sterility* 2012;98;383–388.
  108. Toth B, Vocke F, Rogenhofer N, Friese K, Thaler CJ, Lohse P. Paternal thrombophilic gene mutations are not associated with recurrent miscarriage. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 2008;60;325–332.
  110. Matsuda J, Saitoh N, Gohchi K, Gotoh M, Tsukamoto M. Anti-annexin V antibody in systemic lupus erythematosus patients with lupus anticoagulant and/or anticardiolipin antibody. *American journal of hematology* 1994;47;56–58.
  111. Dubois T, Bisagni-Faure A, Coste J, Mavoungou E, Menkes CJ, Russo-Marie F, Rothhut B. High levels of antibodies to annexins V and VI in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 1995;22;1230–1234.
  112. Matsubayashi H, Arai T, Izumi S, Sugi T, McIntyre JA, Makino T. Anti-annexin V antibodies in patients with early pregnancy loss or implantation failures. *Fertility and Sterility* 2001;76;694–699.
  113. Krawczak M, Nikolaus S, Eberstein H, Croucher PJ, El Mokhtari NE, Schreiber S. PopGen. Population-based recruitment of patients and controls for the analysis of complex genotype-phenotype relationships. *Community genetics* 2006;9;55–61.
  114. Raymond M, Rousset F 1995. GENEPOP (Version 1.2). Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity* Jg. 86 Nr.3 S. 248–249.
  115. Rousset F. genepop'007. A complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular ecology resources* 2008;8;103–106.
  116. World Health Organization 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5. Aufl. Geneva: World Health Organization.
  117. Potdar N, Gelbaya TA, Konje JC, Nardo LG. Adjunct low-molecular-weight heparin to improve live birth rate after recurrent implantation

- 
- failure. A systematic review and meta-analysis. *Human reproduction update* 2013;19;674–684.
118. Akhtar MA, Eljabu H, Hopkisson J, Raine-Fenning N, Quenby S, Jayaprakasan K. Aspirin and heparin as adjuvants during IVF do not improve live birth rates in unexplained implantation failure. *Reproductive biomedicine online* 2013;26;586–594.
119. Bohlmann MK. Effects and effectiveness of heparin in assisted reproduction. *Journal of Reproductive Immunology* 2011;90;82–90.
120. Rogenhofer N, Markoff A, Wagner A, Klein HG, Petroff D, Schleussner E, Thaler C. Lessons From the ETHIGII Trial. Proper Putative Benefit Assessment of Low-Molecular-Weight Heparin Treatment in M2/ANXA5 Haplotype Carriers. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2017;23;27–33.

## 8. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. med. S. Mahner, dass ich die vorliegende Arbeit an der Frauenklinik im Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München durchführen durfte.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. med. N. Rogenhofer für die Überlassung des inspirierenden Themas, die kontinuierliche Unterstützung und inspirierenden Diskussionen.

Ebenso möchte ich mich auch bei Prof. Dr. rer. nat. A. Markoff vom Institut für Humangenetik der Universität Münster für die freundliche Kooperation und Durchführung der genetischen Untersuchungen, sowie den wissenschaftlichen Austausch bedanken.

Mein großer Dank gilt auch den Schwestern und Ärztinnen des Kinderwunschzentrums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität für ihre freundliche und tatkräftige Unterstützung.

Ich danke insbesondere allen Patientinnen und Partnern, die an der Studie teilgenommen haben. Ohne Sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Nicht zuletzt gilt mein größter Dank meiner Familie, die mich während der gesamten Zeit der Dissertation tatkräftig unterstützt haben.

## **9. Lebenslauf**

## 10. Eidesstattliche Versicherung



### Eidesstattliche Versicherung

**Ennerst, Xenia**

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel  
**Maternale und paternale M2/Annexin-A5-Trägerschaft als Risikofaktor für rezidivierendes  
 Implantationsversagen im Rahmen von IVF/ICSI**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle  
 Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich  
 gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher  
 Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 08.08.2021

Ort, Datum

Xenia Ennerst

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand