

Aus der
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. K. Friese

Polkörperaneuploidie-Diagnostik mit FISH
Einflussfaktoren auf die Hybridisierungseffizienz

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

vorgelegt von
Michaela von der Borch
aus München

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Tina Buchholz

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Tim Strom
Priv. Doz. Dr. Rainer Steldinger

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.05.2014

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Überblick	1
1.1.1.	Einführung in die Thematik der Polkörperdiagnostik	1
1.2.	Assistierte Reproduktion (ART)	2
1.2.1.	Geschichte der assistierten Reproduktion	2
1.2.2.	IVF und ICSI	3
1.2.3.	Präferilisationsdiagnostik	5
1.2.4.	Präimplantationsdiagnostik	5
1.3.	Meiose mit Bildung des ersten und zweiten Polkörpers	7
1.4.	Aneuploidien	9
1.4.1.	Entstehung und Häufigkeit	9
1.4.2.	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zum Nachweis von Aneuploidien	14
1.5.	Polkörperdiagnostik	14
1.5.1.	Indikationen und Vorteile	14
1.5.2.	Einschränkungen	16
1.6.	Embryonenschutzgesetz	16
1.7.	Ziel der Arbeit	17
2.	Material und Methoden	19
2.1.	Patientenkollektiv	19
2.2.	Material	19
2.2.1.	Geräte und Zubehör	19
2.2.2.	Verwendete Chemikalien	20
2.2.3.	Sonden	21
2.3.	Methoden	21
2.3.1.	Zeitplan Aneuploidiediagnostik	21
2.3.2.	Stimulation und Follikelpunktion	21
2.3.1.	ICSI, Polkörperentnahme und -fixierung	22
2.3.2.	Kategorisierung der Polkörper-Morphologie	22

2.3.3.	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zum Nachweis von Aneuploidien	23
2.3.1.	Befundmitteilung und Embryonentransfer	26
2.3.2.	Definition der Hybridisierungseffizienz	26
2.3.3.	Statistische Analyse	27
3.	Ergebnisse	29
3.1.	Allgemeine Daten des Patientenkollektivs	29
3.1.1.	Behandlungszyklen	29
3.1.2.	Alter	29
3.1.3.	Eizellen	30
3.1.4.	Embryonentransfer	31
3.1.5.	Polkörper	31
3.2.	Chromosomenverteilung im Polkörper	34
3.2.1.	Überblick	34
3.2.2.	Zusammenhang zwischen der Polkörper-Morphologie und der chromosomalen Zusammensetzung	36
3.2.3.	Genetische Zusammensetzung der Polkörper - Chromosomen 13, 16, 18, 21, 22	37
3.3.	Altersabhängige Veränderungen der Polkörper	39
3.3.1.	Altersabhängige Veränderungen des Chromosomensatzes	39
3.3.2.	Altersabhängige Veränderungen der Polkörpermorphologie	40
3.3.3.	Zusammenfassung altersabhängiger Einflüsse auf den Chromosomensatz und die Polkörpermorphologie	41
3.4.	Ermittlung der Hybridisierungseffizienz	43
3.4.1.	Hybridisierungseffizienz in Abhängigkeit von der Hybridisierungszeit	44
3.4.2.	Hybridisierungseffizienz in Abhängigkeit von der Morphologie der Polkörper	45
3.4.3.	Verteilung nach Morphologie – morphologische Eigenschaften perfekt hybridisierter Polkörper	46
4.	Diskussion	50
4.1.	Einführung	50
4.2.	Chromosomale Aneuploidien bei Polkörpern	52
4.2.1.	Häufigkeit und Art der Aneuploidien	52

4.2.2.	Zusammenhang zwischen der Polkörper-Morphologie und der Chromosomenzusammensetzung	53
4.2.3.	Genetische Zusammensetzung der Polkörper – Häufigkeit einzelner Aneuploidien	55
4.3.	Altersabhängige Veränderungen der Polkörper	57
4.3.1.	Zusammenhang zwischen dem mütterlichen Alter und der Chromosomenzusammensetzung	57
4.3.2.	Altersabhängige Veränderungen der Polkörpermorphologie	57
4.4.	Hybridisierungseffizienz	59
4.4.1.	Hybridisierungseffizienz im Allgemeinen	59
4.4.2.	Hybridisierungseffizienz und Hybridisierungszeit	60
4.4.3.	Hybridisierungseffizienz und Morphologie der Polkörper	61
4.5.	Mögliche Alternativen	63
4.5.1.	FISH - Vergleichende Genomhybridisierung	63
4.5.2.	Polkörperdiagnostik – Blastomer- und Trophektodermbiopsie	64
4.6.	Ausblick	68
5.	Zusammenfassung	71
6.	Literaturverzeichnis	73
7.	Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	87
8.	Anhang	88
9.	Danksagung	92
10.	Veröffentlichungen	93

1. Einleitung

1.1. Überblick

1.1.1. Einführung in die Thematik der Polkörperdiagnostik

Die Polkörperdiagnostik (PKD) gehört im weitesten Sinne zur Präimplantationsdiagnostik (PID) und ist eine Methode, die zum Nachweis von strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen von Eizellen geeignet ist. Das Ziel der Polkörperdiagnostik ist die Senkung der Abortrate und Steigerung der Schwangerschaftsrate bei Frauen, die bereits mehrere Fehlgeburten oder erfolglose Zyklen von In-Vitro-Fertilisationen (IVF) hinter sich haben oder ein erhöhtes mütterliches Alter aufweisen. In Deutschland ist die Durchführung von Präimplantationsdiagnostik durch das Embryonenschutzgesetz trotz der kürzlichen Lockerung der Gesetzeslage immer noch stark eingeschränkt.

Polkörper sind Nebenprodukte der Meiose von Eizellen und haben nach bisherigem Stand der Forschung keine weitere Bedeutung für die Entwicklung der Eizelle. Mit Hilfe der Polkörperdiagnostik lässt sich eine indirekte Aussage über die Chromosomenzusammensetzung der Eizelle treffen, da sich Polkörper und Eizelle wie Bild und Spiegelbild verhalten. Über den väterlichen chromosomalen Anteil des entstehenden Embryos kann hierdurch allerdings keine Aussage getroffen werden. Da die Mehrzahl der Chromosomenfehlverteilungen jedoch von der mütterlichen Meiose ausgehen, scheint die Betrachtung des paternalen Teils nachrangig (Verlinsky et al. 1990; Würfel et al. 2008; Montag et al. 2009c).

Die Polkörperdiagnostik wird in Deutschland zum Nachweis von chromosomalen Aberrationen, wie Aneuploidien und Translokationen herangezogen. Das Auftreten von Aneuploidien steigt mit dem Alter der Frau an und ist häufig ursächlich für eine ungewollte Kinderlosigkeit bei Frauen in höherem Lebensalter.

Gesellschaftliche Entwicklung

Der unerfüllte Kinderwunsch stellt in Deutschland ein immer größer werdendes Problem in der heutigen Zeit dar. Ursächlich für diese Entwicklung ist unter anderem die veränderte Rolle der Frau in der Gesellschaft und die verbesserten Möglichkeiten der Schwangerschaftsverhütung. Zugunsten der Karriere wird die Familiengründung in der Lebensplanung immer weiter nach hinten geschoben (Griesinger et al. 2004; Propping

2008). Das durchschnittliche Alter von Müttern bei der Geburt des ersten Kindes ist in Deutschland seit etwa 1970 kontinuierlich gestiegen. So lag das Durchschnittsalter 1970 noch bei etwa 24 Jahren, heute werden Frauen in Deutschland im Schnitt erst mit etwa 29 Jahren erstmals schwanger (Bertram et al. 2011; Ritzinger et al. 2011).

Diese Veränderungen der Gesellschaft und die damit verbundene erhöhte Kinderlosigkeit im Alter erhöhten den Druck auf die Entwicklung von neuen Methoden, die es dennoch ermöglichen, auch in höherem mütterlichem Alter gesunde Nachkommen zu zeugen. Die Anzahl der ungewollt kinderlosen Paare in Europa liegt Schätzungen nach zufolge derzeit bei etwa 15% (Brinsden 2009). Während beim Vater keine sicher nachgewiesene Korrelation zwischen dem Alter und der Aneuploidierate der Spermien besteht, stellt ein fortgeschrittenes mütterliches Alter einen erheblichen Risikofaktor für eine chromosomale Anomalie der Oozyten dar (Guttenbach et al. 1997; Gardner et al. 2004; Montag et al. 2009b) (Fragouli et al. 2010). Sowohl die Anzahl der Eizellen als auch deren Qualität nimmt etwa ab dem 35. Lebensjahr kontinuierlich ab (Baird et al. 2005).

1.2. Assistierte Reproduktion (ART)

Die assistierte Reproduktion stellt ein großes Spektrum an Verfahren und ein wichtiges Gebiet der Reproduktionsmedizin dar. Das primäre Ziel einer ART ist das Herbeiführen einer Schwangerschaft, die zur Geburt eines gesunden Kindes führt (Frommel et al. 2010).

Folgende Techniken zählen zu den Methoden der assistierten Reproduktion (ART):

Neben der Inseminationsbehandlung und der In-vitro-Fertilisation in Kombination mit der Intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) wird des Weiteren die In-vitro-Maturation (IVM) und die Konservierung von Keimzellen, sowie von Ovar- und Hodengeweben zu den Methoden der ART gezählt. Auch die Konservierung von Eizellen im sogenannten Pronukleus-Stadium, Embryonen im Furchungs- und Blastozystenstadium, sowie die Polkörperdiagnostik werden unter dem Begriff der ART zusammengefasst.

1.2.1. Geschichte der assistierten Reproduktion

Um dem Problem der ungewollten Kinderlosigkeit entgegenzuwirken wurde in den letzten Jahrzehnten intensiv im Bereich der Reproduktionsmedizin geforscht. Patrick Steptoe und Robert Edwards leisteten in den siebziger Jahren Pionierarbeit. Trotz großem gesellschaftlichem Widerstand und anfänglichen technischen Schwierigkeiten entwickelten

die beiden Forscher Verfahren zur In-vitro-Fertilisation. Im Jahr 1978 wurde ihre Arbeit und ihr Durchhaltevermögen schließlich belohnt und das erste Kind, Louise Brown, kam durch In-vitro-Fertilisation auf die Welt. Als Anerkennung für diese Errungenschaften im Bereich der In-vitro-Fertilisation erhielt Robert Edwards 2010 den Nobelpreis für Medizin (Steptoe et al. 1978; Brinsden 2009; Kirby 2010; Van Steirteghem 2012).

Weitere Fortschritte der assistierten Reproduktion, wie beispielsweise die Entwicklung der Intrazytoplasmatischen Spermieninjektion trugen zur Erfolgsverbesserung der Kinderwunschbehandlung bei. Zur weiteren Steigerung der Geburten- und zur Senkung der Abortrate kann eine zusätzliche genetische Diagnostik in Form von einer Präimplantationsdiagnostik (PID) erfolgen. In Deutschland war die Polkörperdiagnostik bis 2011 die einzige gesetzlich zulässige Form der Präimplantationsdiagnostik. Die zulässigen Verfahren der PID wurden hierzulande im Jahr 2011 um die Blastozysten bzw. Trophektodermbiopsie erweitert, diese dürfen allerdings nur unter sehr strengen Voraussetzungen angewandt werden.

1.2.2. IVF und ICSI

Die In-vitro-Fertilisation und die Intrazytoplasmatische Spermieninjektion sind, wie bereits erwähnt, Verfahren der assistierten Reproduktion. Da sie eine unabdingbare Voraussetzung für die Polkörperdiagnostik sind, soll im Folgenden näher auf diese beiden Verfahren eingegangen werden.

Bei der IVF werden Spermien und Eizelle zur extrakorporalen Befruchtung gemeinsam in ein Reagenzglas gebracht. Dort erfolgt die „normale“ Befruchtung der Eizelle in vitro. Am dritten Tag nach der Befruchtung werden maximal drei Embryonen in den Uterus zur Einnistung eingebracht.

Die IVF wurde Anfang der 1980er erstmals in Deutschland angeboten. Seit der Entwicklung der IVF in den 1970er Jahren hat sich das Spektrum der Möglichkeiten der assistierten Reproduktion stetig erweitert und die Zahlen der durchgeführten Behandlungen sind fast explosionsartig gestiegen. Im Jahr 1982 lag die Anzahl der Behandlungen noch bei insgesamt 742. In den letzten drei Jahrzehnten haben sich die Zahlen der Behandlungszyklen pro Jahr mit Hilfe von Techniken der assistierten Reproduktion verhundertfacht und lagen im Jahr 2011 bei 78.922 Zyklen. Insgesamt sind seit den Aufzeichnungen des IVF-Registers 1997 bis 2011 in Deutschland knapp über 170.000

Geburten durch reproduktionsmedizinische Behandlungszyklen dokumentiert (Stand 2012, (IVF-Register 2011; IVF-Register 2012).

Die Intrazytoplasmatische Spermieninjektion ist ein etabliertes Verfahren zur Behandlung männlicher Unfruchtbarkeit. Sie wurde 1992 eingeführt und erstmals 1994 in Deutschland angeboten (Palermo et al. 1992; Zech et al. 2002; Ludwig et al. 2005; IVF-Register 2012). Hierbei wird mit Hilfe einer Mikronadel ein einzelnes Spermium direkt in die Eizelle injiziert.

Seit 1994 wird die ICSI auch an deutschen Zentren angeboten. Mittlerweile hat sich die Zahl der Zentren von anfänglich 32 auf 128 erweitert. 2011 wurden insgesamt 40.641 Behandlungszyklen verzeichnet (IVF-Register 2011; IVF-Register 2012).

IVF und ICSI sind die beiden meistangewandten und erfolgreichsten Verfahren der assistierten Reproduktion. Im Jahr 2011 führten durchschnittlich 30,2% aller Embryonentransfers bei konventioneller IVF zur gewünschten Schwangerschaft. Die Zahlen bei ICSI waren mit 28,3% auf vergleichbar hohem Niveau (IVF-Register 2011; IVF-Register 2012).

Häufige Indikationen der IVF- und ICSI-Behandlung bei der Frau sind Tubenpathologien, Endometriose, Zyklusstörungen und Hormonstörungen (Hyperandrogenämie, PCO). Beim Mann wird die Indikation zur Anwendung einer assistierten Reproduktionstechnik vor allem bei Abnormalitäten der Spermienzahl, -beweglichkeit und -form gestellt (IVF-Register 2010).

Zur Polkörperdiagnostik ist die Anwendung einer ICSI im Rahmen der IVF zwingend erforderlich.

Es gilt zu bedenken, dass Schwangerschaften, die mit Hilfe von assistierter Reproduktionsmethoden eingeleitet wurden, mit einem geringgradig höheren Risiko von Komplikationen in der Schwangerschaft und einer etwas gesteigerten Fehlbildungsrate verbunden sind. Möglicherweise ist die beobachtete erhöhte Fehlbildungsrate nach IVF und ICSI auf die sterilitätsassoziierten und genetischen Hintergrundrisiken der Patienten, die sich einer Kinderwunschbehandlung unterziehen, zurückzuführen (Strom et al. 2000; Ludwig et al. 2002; Ludwig et al. 2005; Sabarstinski 2007; Diedrich et al. 2011).

Zusätzlich zur IVF und ICSI kann eine genetische Überprüfung des Erbguts erfolgen. Hierbei gibt es grundsätzlich verschiedene Methoden, die nach ihrem Zeitpunkt der Durchführung eingeteilt werden.

1.2.3. Präfertilisationsdiagnostik

Die Präfertilisationsdiagnostik ist definiert als eine Untersuchung des Erbgutes vor Verschmelzung der Vorkerne, die definitionsgemäß den Zeitpunkt der Befruchtung darstellt. Hierunter fällt das Verfahren der Polkörperdiagnostik, welche eine Untersuchung des weiblichen Erbgutes vor dem Zeitpunkt der Befruchtung ermöglicht und somit zur Präfertilisationsdiagnostik gezählt wird.

1.2.3.1. Polkörperdiagnostik

Die Polkörperdiagnostik ist ein Verfahren zur genetischen Untersuchung von Eizellen. Sie findet im Rahmen der IVF statt und ermöglicht durch Entnahme des ersten und zweiten Polkörpers eine indirekte Aussage über die genetische Zusammensetzung der Eizelle. Die Polkörper sind Absonderungen der Eizelle während der Meiose und scheinen für die weitere Entwicklung der Eizelle keine Rolle zu spielen (van der Ven et al. 2008b).

Die Polkörperdiagnostik wurde von der Arbeitsgruppe um Verlinsky in Chicago zum ersten Mal im Jahr 1990 veröffentlicht. Die Einführung und Anwendung der Polkörperdiagnostik fand einige Jahre später statt. Schließlich wurde im Jahr 2002 von der Geburt des ersten Kindes nach Polkörperdiagnostik in Deutschland berichtet (Buchholz et al. 2006).

1.2.4. Präimplantationsdiagnostik

Die Präimplantationsdiagnostik (PID) ist ebenfalls ein Verfahren, das nur im Rahmen der IVF angewendet werden kann. Es findet nach Verschmelzung der Vorkerne, aber vor Implantation des Embryos in den Mutterleib statt. Hierzu zählen die Blastomer-, Blastozysten- bzw. Trophektodermbiopsie. Durch Entnahme und Analyse einzelner Zellen des entstehenden Embryos ist eine direkte Untersuchung des Erbguts möglich (van der Ven et al. 2008b).

1.2.4.1. Blastomerdiagnostik

Die Blastomerbiopsie wird in der Regel am dritten Tag nach der Befruchtung durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Embryonen üblicherweise im 8-Zell Stadium und die Zellen gelten, zumindest noch zum Teil, als totipotent. Eine totipotente Zelle hat die Fähigkeit einen vollständigen menschlichen Organismus zu bilden. Später verlieren die Zellen diese Eigenschaft und sind noch pluripotent, dies bedeutet, dass die einzelnen Furchungszellen

alle Zell- und Gewebetypen unseres Körpers bilden können. Aus einer pluripotenten Zelle allein kann kein lebensfähiges Individuum mehr entstehen.

Bei der Blastomerbiopsie werden in der Regel ein bis zwei Zellen aus dem Embryo im 8-Zell-Stadium entnommen. Bei der Entnahme von nur einer Zelle besteht eine gewisse diagnostische Unsicherheit, da keine Gegenkontrolle vorhanden ist. Bei Entnahme von zwei Zellen wird beim Embryo allerdings etwa ein Viertel der Zellmasse entfernt. Dies birgt das Risiko einer nachfolgenden Entwicklungsstörung (Mastenbroek et al. 2007; Neubauer 2009).

Da die Zellen in dieser Phase noch als totipotent gelten, ist die Blastomerbiopsie rechtlich und ethisch umstritten. In Deutschland ist eine Zellentnahme generell erst nach dem 8-Zell-Stadium erlaubt, da dann davon ausgegangen werden kann, dass alle Blastomere die Totipotenz verloren haben und nur noch pluripotent sind (Montgomery et al. 2011).

1.2.4.2. Blastozysten- bzw. Trophektodermbiopsie

Die Blastozystenbiopsie wird etwa fünf Tage nach der Befruchtung durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt haben sich die Zellen des Embryos bereits in pluripotente Embryoblasten- und Trophektodermzellen differenziert, die jedoch nach wie vor identisches genetisches Material enthalten. Embryonen im Blastozystenstadium bestehen am fünften bzw. sechsten Tag aus etwa 60-80 Zellen. Bei der Blastozystenbiopsie werden Trophektodermzellen, welche später die Plazenta bilden, entnommen. Die Embryoblastenzellen, aus denen der Embryo heranwächst, werden nicht berührt oder entnommen (Neubauer 2009; Wissenschaften 2011).

Vorteil dieser Technik ist, dass durch die Vielzahl an vorhandenen Zellen in diesem Stadium eine Entnahme von mehreren Zellen ermöglicht wird und damit die diagnostische Sicherheit erhöht werden kann. Außerdem ist der Embryo nach heutigem Erkenntnisstand nicht verletzungsgefährdet und die Einnistung nach dem Transfer ist nicht gestört (Neubauer 2009; Montgomery et al. 2011).

Der Nachteil dieses Verfahrens ist zum einen, dass eine In-vitro-Kultivierung bis zu diesem Stadium technisch aufwändig ist und zum anderen die Zellen sehr klein und eng miteinander verbunden sind, wodurch die Entnahme erschwert wird (Neubauer 2009). Nachteilig ist außerdem, dass bei einer Zellbiopsie zu diesem Zeitpunkt nur wenig Zeit für eine genetische Untersuchung bleibt, da der Embryo spätestens an Tag 6 transferiert werden sollte (Sermon et al. 2004).

In Deutschland ist die Trophektodermbiopsie unter strenger Indikationsstellung seit 2011 möglich. Die PID im oben genannten Rahmen ist zulässig, wenn eine schwerwiegende Erbkrankheit oder eine Fehl- bzw. Totgeburt zu erwarten ist. Zum Spektrum der Indikationen gehören monogene Erkrankungen, wie beispielsweise die zystische Fibrose, sowie strukturelle und numerische Chromosomenaberrationen. Es darf nur mit der klaren Absicht des Herbeiführens einer Schwangerschaft und auch nur auf die spezifische Fragestellung hin untersucht werden. Außerdem ist es nur gestattet Embryos in die Gebärmutter zu transferieren, die nicht von der untersuchten Erkrankung betroffen sind (Montgomery et al. 2011).

1.3. Meiose mit Bildung des ersten und zweiten Polkörpers

Die Abläufe in der Meiose der Eizelle bilden die Grundlage für die Entstehung der Polkörper. Das Verständnis der Vorgänge in der Meiose ist essentiell für die Polkörperdiagnostik. Fehler in der Meiose der Eizelle können zur Entstehung von Aneuploidien der Oozyte führen. Die Meiose besteht aus zwei Phasen. Zuerst erfolgt die Reduktionsteilung, im Anschluss die Äquationsteilung.

Zu Beginn der Meiose bei der Frau besitzt die Oozyte einen diploiden Chromosomensatz, das heißt es sind jeweils zwei Ausführungen der autosomalen Chromosomen 1-22, sowie zwei X-Chromosomen vorhanden. Diese Chromosomenpaare werden in der ersten Reifeteilung zu einem haploiden Chromosomensatz reduziert. Dies bedeutet, dass jeweils eines der Chromosomen pro Paar in der Eizelle verbleibt, das zweite wird ausgeschleust. Es entsteht der erste Polkörper, als „Abfallprodukt“ der 1. Reifeteilung. Der Abschluss der 1. meiotischen Teilung findet kurz vor der Ovulation der Eizelle statt. Bei regelrechtem Ablauf dieser Teilung und Ausschleusung des Polkörpers befindet sich in der Eizelle und im Polkörper jeweils ein haploider Chromosomensatz von 23 Chromosomen (van der Ven et al. 2008b; Montag et al. 2009b).

Die 2. Reifeteilung beginnt mit Eindringen eines Spermiums in die Eizelle. Dieser Schritt der Meiose läuft im Grunde wie eine Mitose ab. Die Chromosomen, die aus zwei identischen Schwesterchromatiden bestehen, trennen sich. Ein Schwesterchromatid verbleibt in der Eizelle, das andere wird ausgeschleust. Der 2. Polkörper entsteht.

Abbildung 1.1 zeigt eine schematische Darstellung der Meiose inklusive der Weiterentwicklung des Embryos bis hin zum 8-Zell-Stadium.

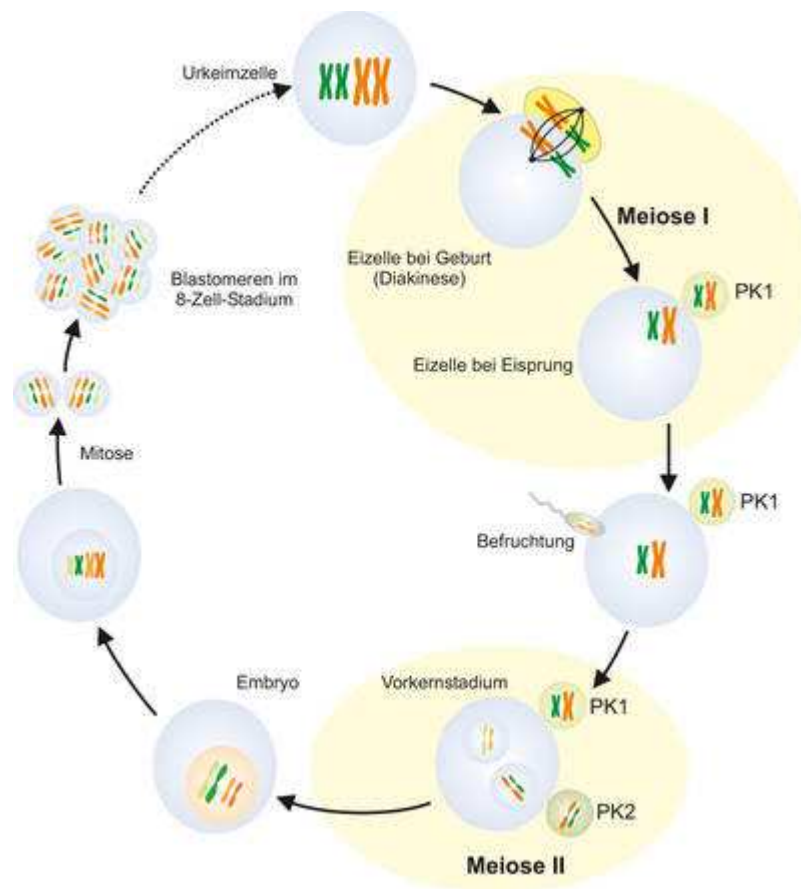


Abbildung 1.1: Ablauf der Meiose, Konzeption und Entwicklung bis zum Blastomerstadium

Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung des regelrechten Ablaufs der ersten und zweiten meiotischen Teilung mit Ausschleusung der Polkörper, exemplarisch an zwei Chromosomen (Wagner et al.).

Als Produkt der Meiose entsteht eine Eizelle mit haploidem Chromosomensatz, deren Chromosomen aus nur einem Chromatid bestehen. Darüber hinaus werden der erste Polkörper in der ersten und der zweite Polkörper in der zweiten Reifeteilung gebildet. Die Polkörperdiagnostik beruht auf der Grundüberlegung, dass sich Eizelle und Polkörper wie Bild und Spiegelbild verhalten. Anhand von genetischen Untersuchungen der Polkörper ist so jeweils eine indirekte Aussage über Chromosomen- bzw. Chromatidenfehlverteilungen möglich, die während der Meiose entstanden sind. Lässt sich im Polkörper ein zusätzliches Chromosom bzw. Chromatid nachweisen, so fehlt dieses in der Eizelle und umgekehrt. Die theoretische Korrelation der im Polkörper detektierten Aneuploidien mit denen der Oozyte, wie oben beschrieben, wurde auch in der Praxis bestätigt (Magli et al. 2012). Nach allen bisherigen Erkenntnissen sind die Polkörper als Nebenprodukte der Meiose zu werten und

haben keinen weiteren Nutzen oder Funktion für die Entstehung des Embryos (Montag et al. 2002b; Buchholz et al. 2009).

1.4. Aneuploidien

1.4.1. Entstehung und Häufigkeit

Der Begriff Aneuploidie ist definiert als eine Abweichung von der normalen Chromosomenzahl (van der Ven et al. 2008a). Da die Häufigkeit von Aneuploidien bei maternalen und paternalen Gameten sehr unterschiedlich ist, muss zwischen mütterlichem und väterlichem Erbgut unterschieden werden.

1.4.1.1. Paternales Erbgut

In der Literatur sind die Angaben zu Aneuploidien bei Spermien nicht einheitlich und weisen zum Teil erhebliche Unterschiede in der Bezifferung der Aneuploidierate auf. Große Studien von Guttenbach beschreiben, dass bis zu 10% der Spermien phänotypisch unauffälliger Männer chromosomal aberrant seien (Guttenbach et al. 1997). Die meisten Auffälligkeiten seien allerdings nicht numerischer, sondern struktureller Art. Trotz unterschiedlicher Literaturangaben lässt sich zusammenfassen, dass es derzeit keine erwiesene Korrelation zwischen numerischen Chromosomenanomalien in Spermien und dem väterlichen Alter gibt. Wahrscheinlicher scheint ein Zusammenhang zwischen der Spermienmorphologie, -konzentration und -motilität und ihrem Chromosomensatz, vor allem im Hinblick auf die erwähnten strukturellen Anomalien. Chromosomale Aberrationen bei Spermien kommen durch Non-disjunction und eine gestörte Paarung der Chromosomen in der Meiose zustande (Guttenbach et al. 1997; Eichenlaub-Ritter 1998; Eckel et al. 2004; Gardner et al. 2004).

Es sollte bedacht werden, dass bei männlicher Indikation zur ICSI aufgrund eines auffälligen Spermioграмms die Aneuploidierate der Spermien gering erhöht ist. Allerdings wird diese durch die Auswahl anhand der Morphologie und Motilität der Spermien ausgeglichen und evtl. sogar weiter gesenkt (Eckel et al. 2004).

Insgesamt sind chromosomale Aberrationen, insbesondere numerische Anomalien, bei Spermien von Männern mit normalem Karyotyp gering und damit als Ursache von Chromosomenanomalien in Embryos zu vernachlässigen (Guttenbach et al. 1997; Montag et al. 2009b).

1.4.1.2. Maternales Erbgut

Im Vergleich zur paternalen Meiose entsteht der weitaus größte Anteil an chromosomalen Fehlverteilungen in der mütterlichen Reifeteilung. Literaturangaben zufolge wird angenommen, dass über 90% der Aneuploidien beim Menschen in der maternalen Meiose entstehen (Geraedts et al. 2010).

Bei der normalen Reifung der Eizelle entsteht bei der ersten und zweiten meiotischen Teilung jeweils ein Polkörper, die sich direkt nach der Teilung wie Bild und Spiegelbild zu der Eizelle verhalten. In der ersten Reifeteilung werden die homologen Chromosomen nach der Paarung zu gleichen Teilen in die Eizelle und den 1. Polkörper aufgeteilt. Es entsteht eine Eizelle, sowie der 1. Polkörper mit jeweils 23 Chromosomen, bestehend aus zwei Chromatiden. Im Anschluss daran findet in der zweiten Reifeteilung die Trennung der Chromosomen in jeweils zwei identische Schwesterchromatiden statt. Die Eizelle hat nun einen haploiden Chromosomensatz, die Chromosomen bestehen aus einem Chromatid. Ist dieser normale Ablauf in irgendeiner Weise gestört, kann es zu Aneuploidien, also einer Abweichung des normalen genetischen Materials in der Eizelle kommen.

Der Großteil der Aneuploidien entsteht aus zwei Arten von Teilungsfehlern. In der mütterlichen Meiose entstehen die meisten während der ersten Reifeteilung (Handyside et al. 1999). Der erste Mechanismus ist wie beim paternalen Erbgut die sogenannte Non-disjunction. Diese beschreibt die nicht vollzogene Trennung der homologen Chromosomenpaare in der Meiose I bzw. die fehlende Segregation der Schwesterchromatiden in Meiose II. Der zweite Mechanismus ist die vorzeitige Zentromertrennung (premature separation of sister chromatids – PSSC). Bei diesem Fehler kommt es zur verfrühten Trennung der Schwesterchromatiden in Meiose I und damit einhergehender Fehlverteilung der Einzelchromatiden. Die Zentromertrennung und Aufteilung in die Schwesterchromatiden findet regelhaft erst in der zweiten meiotischen Teilung statt. Dieses Verhalten ist nach aktuellen Erkenntnissen gerade im Hinblick auf die Entstehung altersbedingter maternaler Aneuploidien der entscheidende Mechanismus und hochsignifikant mit dem Alter der Frau korrelierend (Angell et al. 1993; Hassold et al. 2001; Pellestor et al. 2002; Pellestor et al. 2003; Eckel et al. 2004; Rosenbusch 2004b; Vogt et al. 2008; Montag et al. 2009c).

Abbildung 1.2 veranschaulicht die typischen Fehler die während der Reifeteilungen zu Aneuploidien führen können: Non-disjunction und vorzeitige Chromatidentrennung.

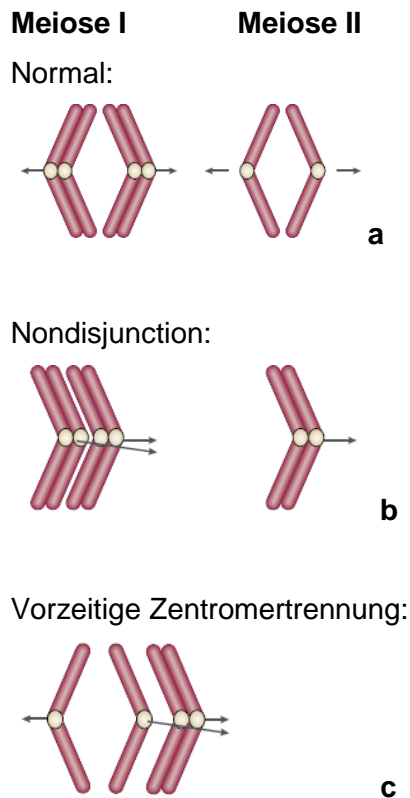


Abbildung 1.2: Fehler in der meiotischen Teilung.

Bild a zeigt die normale Verteilung der Chromosomen exemplarisch anhand eines Chromosoms. Bild b beschreibt den Fehler der Non-disjunction. Bild c verdeutlicht den Ablauf der vorzeitigen Zentromertrennung und verfrühten Chromatidsegregation. Abbildung aus Hassold et al. (Hassold et al. 2001) (modifiziert und übersetzt).

Für eine zuverlässige Aussage über den Chromosomengehalt der Eizelle ist die Untersuchung beider Polkörper von Bedeutung. Aufgrund der Tatsache, dass der überwiegende Teil der Aneuploidien in der ersten Reifeteilung entsteht, ist der erste Polkörper besonders wichtig.

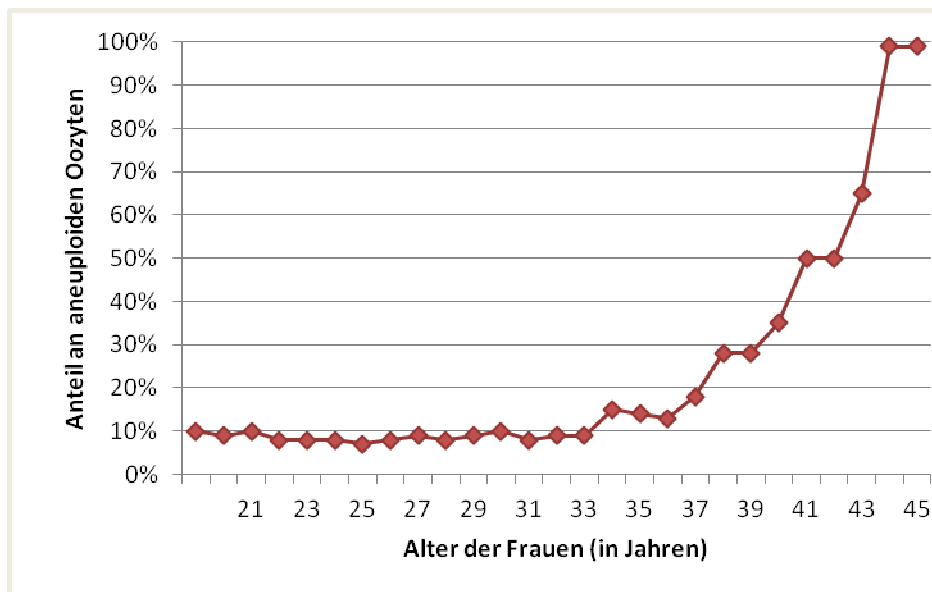


Abbildung 1.3: Übersicht über den Anteil der numerischen Chromosomenaberrationen von Eizellen in Abhängigkeit vom Alter der Frau.

Ab dem 35. Lebensjahr kommt es zu einer starken Zunahme von Aneuploidien der Eizelle (Pellestor et al. 2005).

Mit dem Alter der Frau nimmt die Häufigkeit von numerischen Aberrationen, insbesondere ab dem 35. Lebensjahr, kontinuierlich zu. Die Angaben in der Literatur variieren stark und es muss zwischen direkten Untersuchungen von Oozyten und genetischen Analysen von Abortmaterial unterschieden werden. Im Alter von 40 Jahren sind demnach bis zu 70% der Spontanaborte aneuploid (Hassold et al. 1985). Da die Chromosomenveränderungen auch postzygotisch in der embryonalen Entwicklung entstehen könnten, liefern Untersuchungen von reifen Oozyten genauere Daten über die Aneuploidierate von Oozyten. Von Pellestor et al. wurde eine große Studie zur Evaluation der Aneuploidierate bei Oozyten durchgeführt, in der insgesamt knapp 1400 Eizellen karyotypisiert wurden. Auch hier war der Anstieg der numerischen Chromosomenaberrationen mit dem Alter der Frau sehr deutlich erwiesen. Die Aberrationsrate in Abhängigkeit des Alters der Frau stellt sich demnach wie in Abbildung 1.3 dar (Pellestor et al. 2005). Dieser Anstieg an Aneuploidien wird unter anderem auf eine Zunahme an Mutationen in der mitochondrialen DNA der Eizelle zurückgeführt. Dadurch ist die Energieproduktion gestört, die für die Mechanismen zum Zusammenhalten der Schwesterchromatiden essentiell ist. Auch eine Beteiligung von altersbedingten Proteinveränderungen, die für den Chromatidzusammenhalt notwendig sind, wird diskutiert. Dies könnte die im Alter gehäuft auftretende vorzeitige Chromatidsegregation erklären (Munne et al. 1999; Gutierrez-Mateo et al. 2004; Warburton 2005; Jessberger 2012).

Die erhöhte Aneuploidierate der Eizellen im Alter ist zum großen Teil für das zunehmend schlechtere Outcome der IVF bei Frauen ab 35 Jahren verantwortlich.

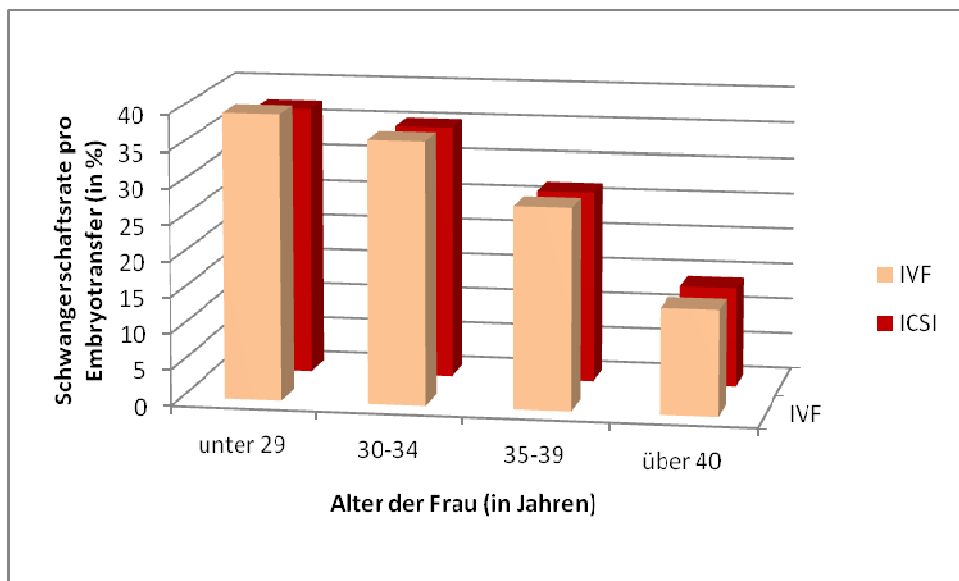


Abbildung 1.4: Schwangerschaftsrate pro Embryotransfer bei IVF und ICSI in Abhängigkeit vom Alter der Frau

Im Verlauf des Lebens nimmt die Fruchtbarkeit der Frau deutlich ab. Ab dem 35. Lebensjahr sind die Behandlungszyklen der assistierten Reproduktion ineffektiver. Je älter die Frau ist, desto weniger wahrscheinlich kommt es nach einem Embryotransfer zu einer Schwangerschaft (IVF-Register 2011).

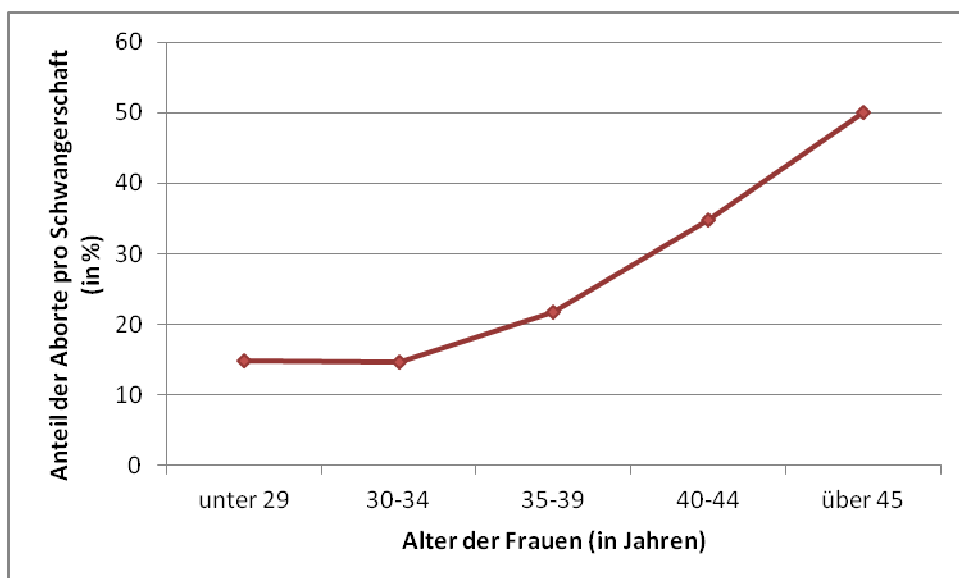


Abbildung 1.5: Abortrate pro Schwangerschaft in Abhängigkeit vom Alter der Frau

Mit steigendem Alter der Frau mehren sich die Aborte. Die Zahlen sind relativ auf die Schwangerschaften gesehen. Während die Schwangerschaftsrate ab 35 Jahren stetig sinkt, steigt die Abortrate pro Schwangerschaft zusätzlich an, was zu einer insgesamt geringen Baby-take-home Rate führt (IVF-Register 2011).

Die Schwangerschaftsraten pro Embryotransfer nehmen ab und im Gegenzug steigt die Abortrate im Alter rapide an (Abbildung 1.4. und Abbildung 1.5). Aus Untersuchungen des Abortmaterials wurden die Erkenntnisse über die am häufigsten aberranten Chromosomen gewonnen, welche zur Auswahl der FISH-Sonden führte.

1.4.2. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zum Nachweis von Aneuploidien

Das Standardverfahren zum Nachweis von Aneuploidien bei der Polkörperdiagnostik ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Hierbei werden bestimmte Chromosomenabschnitte mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert und können in einem speziellen Mikroskop sichtbar gemacht werden. Da die Anzahl der untersuchbaren Chromosomen aus technischen Gründen begrenzt ist, wurden die Chromosomen zur Testung ausgewählt, die am häufigsten in Spontanaborten und Aneuploidien bei Lebendgeburten zu finden sind. Im Speziellen handelt es sich vor allem um die Chromosomen 13, 16, 18, 21, 22 und X (Verlinsky et al. 1997; Eckel et al. 2004; Gutierrez-Mateo et al. 2004; Montag et al. 2009c).

Einschränkung dieser Methode ist aus technischer Sicht die Möglichkeit des FISH-drop out. Dies bedeutet, dass Chromosomen zwar vorhanden sind, aber durch die zugehörige Sonde nicht markiert werden und damit fälschlicherweise das Bild einer Chromosomenfehlverteilung vortäuschen. Zum anderen können mit diesem Verfahren nicht alle Chromosomen in einer Hybridisierungsrunde markiert werden, da die Anzahl der möglichen Farben, die noch sicher unterschieden werden können, begrenzt ist. Auf Grund des engen zeitlichen Rahmens des Embryonenschutzgesetzes waren zum Zeitpunkt der Durchführung und Datenerhebung maximal zwei Runden pro Polkörperdiagnostik-Zyklus möglich, was zur Folge hat, dass mit der herkömmlichen FISH nicht alle Chromosomen untersucht werden konnten.

1.5. Polkörperdiagnostik

1.5.1. Indikationen und Vorteile

Die Polkörperdiagnostik bietet Patientinnen, die eine genetische Diagnostik wünschen, eine Alternative zur später stattfindenden Pränataldiagnostik. Genetisch auffällige Eizellen können vor dem Transfer aussortiert werden und die oft kritisierte „Schwangerschaft auf Probe“ kann verhindert werden. Dadurch kann die psychische Belastung, die durch Aborte von chromosomal aberranten Embryos entstehen würde, für die Patientinnen minimiert werden (Wieacker et al. 2003; Buchholz 2009; Montag et al. 2009c).

Da die Polkörperdiagnostik zwangsläufig eine IVF mit ICSI erfordert, die mit gewissen Risiken und Nebenwirkungen und außerdem mit einem relativ hohen finanziellen Aufwand verbunden ist, welcher von den Patienten selbst getragen werden muss, sollten die Indikationen zur Polkörperdiagnostik streng gestellt werden.

Die Polkörperdiagnostik kann zur Untersuchung numerischer (Aneuploidien) und struktureller Chromosomenstörungen (Translokationen) sowie von monogenen Erkrankungen herangezogen werden (Buchholz et al. 2004; Montag et al. 2009b). Zu den Patientinnen, die sich einer Polkörperdiagnostik unterziehen, gehören Frauen mit gesteigertem, genetisch bedingtem Risiko durch ein erhöhtes Alter oder Frauen mit bekannter chromosomaler Translokation oder bekannter monogen vererbter Erkrankung. Auch Frauen mit habituellen Aborten (drei oder mehr Aborte unklarer Ursache) oder mit rezidivierenden Aborten aufgrund von Aneuploidien gehören zum Patientinnenkreis. Außerdem kann bei wiederholtem IVF- oder Implantationsversagen eine Polkörperdiagnostik erwogen werden (Buchholz et al. 2006).

In diesem Bereich ist durch eine Polkörperdiagnostik möglicherweise eine Verbesserung der Schwangerschafts- und Geburtenrate, auf jeden Fall aber eine Minimierung der Abortrate möglich (Verlinsky et al. 1996b; van der Ven et al. 2008a).

Die Polkörperdiagnostik bietet im Vergleich zu anderen Verfahren der Präimplantationsdiagnostik einige entscheidende Vorteile. Durch die Polkörperdiagnostik kann eine indirekte Aussage über das maternale Erbgut, welches in fast allen Fällen für Chromosomenaberrationen verantwortlich ist, getroffen werden. Die Polkörperdiagnostik ist im Vergleich zur Blastomer- bzw. Blastozystenbiopsie weniger invasiv. Es werden nur die abgesonderten Polkörper entnommen, die nach aktuellem Stand der Wissenschaft keine Bedeutung für die Entwicklung der Eizelle beziehungsweise des Embryos haben (van der Ven et al. 2008b). Die Eizelle selbst bleibt unangetastet, wodurch eine Schädigung sehr unwahrscheinlich erscheint. Zum anderen birgt das Problem eines postzygotischen Mosaiks bei der Polkörperdiagnostik keine Fehlerquelle. Bei der Blastomerbiopsie können durch ein zelluläres Mosaik des Embryos, bestehend aus chromosomal auffälligen und unauffälligen Zellen, falsch-positive Befunde auftreten, da die Entnahme von ein bis zwei Zellen nicht repräsentativ für die übrigen Zellen sein muss. Bei der Polkörperdiagnostik tritt dieses Problem nicht auf, da der erste und zweite Polkörper zwangsläufig den komplementären Chromosomengehalt der Eizelle aufweisen müssen (Dawson et al. 2006; Buchholz 2009).

Die Polkörperdiagnostik beinhaltet keine Embryonenkultivierung auf Probe, wie es bei einer Blastomeruntersuchung der Fall ist. Auch eine Schwangerschaft auf Probe, die nach Auffälligkeiten in der pränatalen Diagnostik elektiv beendet werden könnte, wird durch die Anwendung der Polkörperdiagnostik verhindert (Buchholz 2009).

1.5.2. Einschränkungen

Es gibt wesentliche Nachteile und somit Einschränkungen der Aussagekraft der Polkörperdiagnostik. Diese beruhen zum einen auf der Tatsache, dass es sich bei der Polkörperdiagnostik um eine Einzelzellanalyse handelt. Methodisch bedingte Fehlanalysen durch degenerierende Polkörper können zu einer Fehlinterpretation führen (Dechend 2009).

Des Weiteren kann mit Hilfe der Polkörperdiagnostik nur das mütterliche Erbgut untersucht, paternale chromosomale Anomalien können mit dieser Methode nicht detektiert werden. Allerdings erscheint diese Einschränkung nachrangig, da laut aktueller Literatur mindestens 90% der Aneuploidien maternalen Ursprungs sind (van der Ven et al. 2008b). Die Angaben zu Häufigkeiten chromosomaler Aberrationen beim Mann variieren in der Literatur stark. Der Konsens ist allerdings, dass Aneuploidien selten sind und bei embryonalen chromosomalen Anomalien nur eine sehr untergeordnete Rolle spielen (Guttenbach et al. 1997; Eckel et al. 2004; Montag et al. 2009b).

Darüber hinaus gibt es eine gewisse diagnostische Unsicherheit bei der Untersuchung auf maternal vererbte monogene Erkrankungen unter anderem aufgrund von chromosomaler Rekombination. Väterliche Störungen im Bezug auf monogene Erkrankungen können mit der Polkörperdiagnostik, wie oben erwähnt, ebenfalls nicht erkannt werden (Schwinger 2004).

Die Anzahl der untersuchbaren Chromosomen mittels FISH ist aufgrund des zeitlichen Rahmens sowie der Anzahl der zur Verfügung stehenden Fluoreszenzfarbstoffe, die gleichzeitig in einer Hybridisierungsrunde verwendet werden kann, begrenzt (Basille et al. 2009).

1.6. Embryonenschutzgesetz

Das Embryonenschutzgesetz (ESchG) trat im Jahr 1990 in Kraft und regelt die Möglichkeiten und den zeitlichen Rahmen der künstlichen Befruchtung in Deutschland.

Das Wissen im Bereich der Reproduktionsmedizin und Stammzellforschung hat sich seit den neunziger Jahren in erheblichem Maße weiterentwickelt. Daraus ergeben sich viele neue Chancen im Bereich der Reproduktionsmedizin. In anderen Ländern wurden die Gesetze im Laufe der Jahre an die aktuellen Gegebenheiten angepasst. Im Gegensatz dazu hat sich die Gesetzeslage in Deutschland seit der Einführung des ESchG bis ins Jahr 2011 lange nicht verändert.

Vor dem Beschluss 2011 galt die Präimplantationsdiagnostik in Deutschland als generell verboten. Laut § 8 Abs. 1 des ESchG wird die Befruchtung der Eizelle als Verschmelzen der Vorkerne definiert. Ab diesem Zeitpunkt gelten die Regelungen des ESchG. Da die Polkörperdiagnostik zeitlich vor der Verschmelzung der Vorkerne stattfindet, war die indirekte Eizelldiagnostik bis zur Gesetzesänderung die einzig zulässige Form der genetischen Diagnostik in der Reproduktionsmedizin in Deutschland. Die Untersuchungen an der Eizelle mussten vor der Befruchtung abgeschlossen sein. Für die Polkörperdiagnostik ergab sich so ein enger Zeitrahmen von maximal 22 Stunden von der ICSI bis zur Verschmelzung der Vorkerne, der Befruchtung (Montag et al. 2002a; Buchholz et al. 2006).

Im Juli 2011 hatte der Bundesgerichtshof die Vereinbarkeit der Präimplantationsdiagnostik mit dem Embryonenschutzgesetz, unter bestimmten Voraussetzungen, erklärt und das Embryonenschutzgesetz wurde in der Folge dahingehend verändert. Demnach ist nun die genetische Untersuchung an nicht mehr totipotenten embryonalen Zellen unter strenger Indikationsstellung rechtlich zulässig (Montgomery et al. 2011). Das Bundeskabinett hat hierzu im November 2012 eine Rechtsverordnung verabschiedet, die die Durchführung der PID reglementiert. Die Zustimmung des Bundesrates erfolgte im Februar 2013 (Richter-Kuhlmann 2013). Inwieweit die Polkörperdiagnostik nun durch andere Verfahren abgelöst wird, bleibt abzuwarten.

1.7. Ziel der Arbeit

Seit 2004 wird im Zentrum für Polkörperdiagnostik in München die Polkörperanalyse durchgeführt. Im Laufe der Jahre wurden verschiedene Teilschritte der Polkörperdiagnostik verändert und Handlungsabläufe optimiert, um die Effizienz der Diagnostik zu verbessern. Das Ziel dieser Arbeit war es, durch eine retrospektive Auswertung der Daten von 2004 bis 2009 die optimalen Bedingungen herauszuarbeiten, die zur einer möglichst effizienten Polkörperanalyse führen.

Eine wichtige Schlüsselrolle spielt hierbei die Hybridisierung mittels FISH, die eine Auswertung der Polkörper hinsichtlich Aneuploidien erst möglich macht. Deshalb soll in dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk auf die Hybridisierungseffizienz der Polkörper durch FISH gelegt werden. Dabei wird insbesondere Wert auf die Ermittlung der idealen Hybridisierungszeit gelegt. Ein weiteres Ziel der Arbeit ist es einen möglichen Zusammenhang zwischen der Morphologie der Polkörper nach Entnahme und der Güte der Hybridisierung herzustellen. Gibt es hierbei eine Korrelation zwischen der Morphologie und der Chromosomenzusammensetzung der Polkörper? Von Interesse sind darüber hinaus auch die Gründe für eine mangelnde Hybridisierbarkeit. Es stellt sich die Frage, ob es bestimmte Faktoren gibt, die die Hybridisierungseffizienz verbessern und so die Auswertung und den Nutzen für die Patientinnen erhöhen.

Da nicht alle Polkörper mithilfe von FISH ausreichend ausgewertet werden können, wäre es wünschenswert, durch die Morphologie der Polkörper eine Aussage über deren Chromosomenzusammensetzung gewinnen oder durch die Morphologie Rückschlüsse auf die Güte der Eizelle ziehen zu können.

Fragestellung:

- Welcher Zusammenhang besteht zwischen der Morphologie der Polkörper und deren Chromosomenzusammensetzung?
- Gibt es Unterschiede in der Hybridisierungseffizienz in Abhängigkeit von der Dauer der Hybridisierung?
- Welcher Zusammenhang besteht zwischen der Morphologie der Polkörper und deren Hybridisierungseffizienz?

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Bei dem untersuchten Patientenkollektiv handelt es sich um Frauen, die sich zwischen 2003 und 2009 im Zentrum für Polkörperdiagnostik bei Frau PD Dr. Tina Buchholz vorgestellt hatten und sich einer Polkörperdiagnostik unterzogen haben. Alle Frauen stimmten der Polkörperdiagnostik zu. Die Kosten der Untersuchung wurden durch die Patientinnen selbst getragen.

Zu den Einschlusskriterien gehört die Unterzeichnung des Aufklärungsbogens nach ausführlicher humangenetischer Beratung. Die Frauen mussten mindestens eines der folgenden Kriterien aufweisen: mindestens ein vorangegangener Abort, fortgeschrittenes mütterliches Alter oder Vorliegen einer idiopathischen Sterilität.

Es wurden keine Patienten von der Auswertung der Daten ausgeschlossen.

2.2. Material

2.2.1. Geräte und Zubehör

Kategorie	Typ	Firma
Hybridisierungsöfen	HYBrite	Vysis, USA
Mikroskop	M 12	Leica, Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop + Sensor control system	Axioplan Imaging	Zeiss, Deutschland
UV Lampe Mikroskop	ebq100	Kübler, Deutschland
Koordinatenfinder	Sensor Control Display SCD	Märzhäuser Wetzlar, Deutschland
Analyseprogramm FISH	ISIS	MetaSystems GmbH, Deutschland

pH-Meter	CheckerHI	HANNA instruments, USA
Deckgläser	18 x 18 mmm	Roth, Deutschland
Wasserbäder	WB22/WB7	Memmert, Deutschland
Pipetten	Research/Reference	Eppendorf, Deutschland
Vortexer	TopMix11118	Fisher Bioblock Scientific, Frankreich
Zentrifuge	ohne Typenbezeichnung	Fisher Bioblock Scientific, Frankreich
Fixogum	Montagekleber	Marabu, Deutschland

2.2.2. Verwendete Chemikalien

Substanz	Firma
20xSSC	Roth, Deutschland
Propidiumjodid	Sigma, Deutschland
DAPI	Vysis, USA
Igepal CA 630 „Nonidet P40“	Fluka, Deutschland
PBS Dulbecco	Biochrom AG, Deutschland
Ethanol Rotisolv 100%	Roth, Deutschland
Formamid	Sigma, Deutschland
Natronlauge NaOH 4N	Roth, Deutschland
Dabco	Sigma, Deutschland

Pepsin	Roth, Deutschland
H2O doppelt destilliert	Roth, Deutschland

2.2.3. Sonden

Sonden	Firma
MultiVysion- PB Multi-Color Probe Kit	Abbott/Vysis, USA

2.3. Methoden

2.3.1. Zeitplan Aneuploidiediagnostik

Untersuchungsschritte	zeitlicher Ablauf
Follikelpunktion	8-9 Uhr
ICSI	10-11 Uhr
Polkörperentnahme und -fixierung	15-17 Uhr
ggf. Transport	17-18 Uhr
Anfärbung und Identifikation	18-19 Uhr
Hybridisierungsansatz	19-20 Uhr
FISH	20-5 Uhr
Auswertung und Übermittlung der Befunde	5-7 Uhr
ggf. Rehybridisierung	6-7 Uhr
Auswertung und Übermittlung der Befunde	7-8 Uhr

Beispielhafter zeitlicher Ablauf der Polkörper-Aneuploidiediagnostik mit FISH (Buchholz et al. 2006):

Aufgrund des engen zeitlichen Rahmens des zum Untersuchungszeitpunkt geltenden Embryonenschutzgesetzes muss die Diagnostik organisiert und standardisiert ablaufen.

2.3.2. Stimulation und Follikelpunktion

Die Vorbereitung zur Polkörperdiagnostik erfolgte in enger Zusammenarbeit mit zuweisenden Kollegen. Dort erfolgte zunächst die hormonelle Stimulation der Frauen, sowie die Eizellentnahme, welche nach Standardprotokollen durchgeführt wurden.

2.3.1. ICSI, Polkörperentnahme und -fixierung

Nach Punktion der Oozyten wurden die Eizellen einer ICSI unterzogen. Frühestens fünf und maximal zwölf Stunden nach Spermieninjektion wurde mittels Dioden-Laser die Zona pellucida eröffnet und die beiden abgesonderten Polkörper gemeinsam durch Absaugung mit einer Glaspipette entnommen (Clement-Sengewald et al. 2000). Die extrahierten Polkörper wurden anschließend auf einem Glasobjektträger fixiert und uns für die weitere Diagnostik zugesandt. Die Eizellen wurden bis zum Abschluss der Polkörperdiagnostik in einem Brutschrank vor Ort kultiviert.

Die einzelnen Schritte zur Aufbereitung und Diagnostik der Polkörper wurden detailliert protokolliert. Beim Aufbringen der Polkörper auf die Objektträger erfolgte eine genaue Lagebestimmung mit Angabe der Koordinaten, um die Reidentifikation der einzelnen Zellen zu sichern. Es wurde in engmaschigen mikroskopischen Untersuchungen eine Dokumentation der Polkörpermorphologie und weiterer objektiver Kriterien vorgenommen.

2.3.2. Kategorisierung der Polkörper-Morphologie

Die Polkörper wurden hinsichtlich morphologischer Kriterien wie Zellintegrität, -größe und Oberflächenstruktur in verschiedene Kategorien eingeteilt (siehe Abbildung 2.1):

- kompakt
- wolkig
- fragmentiert
- segmentiert
- ausgelaufen

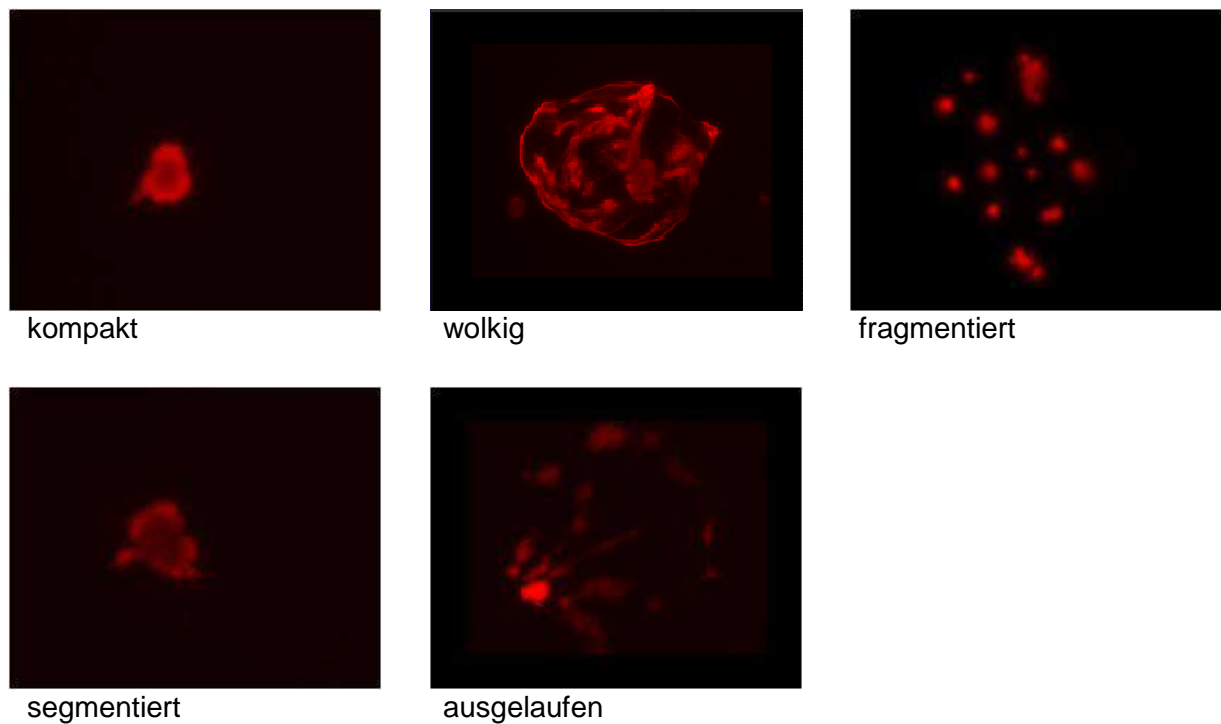


Abbildung 2.1. Morphologie Polkörper

Die Polkörper wurden anhand ihrer Morphologie in verschiedene Gruppen aufgeteilt. Die Abbildungen zeigen jeweils beispielhaft einen Vertreter aus jeder Kategorie.

Die Einteilung der Polkörper erfolgte in Anlehnung an die Beobachtungen von Ebner et al. (Ebner et al. 2000). Hier wurden die ersten Polkörper anhand ihrer Morphologie in Kategorien eingeteilt. Diese umfassten die Kriterien Form, die Oberflächenstruktur und die Integrität.

2.3.3. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zum Nachweis von Aneuploidien

Der Nachweis von Aneuploidien erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Dies ist ein Verfahren zum Nachweis von bestimmten DNA-Sequenzen mit Fluoreszenzfarbstoffen. Im Falle der Polkörperdiagnostik werden bestimmte Abschnitte an Chromosomen markiert und so das Vorhandensein bzw. Fehlen eines Chromosoms bewertet (Nath et al. 2000).

Grundlage dieser Methode ist die Paarung der FISH-Sonden an komplementären Basen der DNA des Untersuchungsmaterials. Die fluoreszierenden Farbstoffe ermöglichen den Nachweis bestimmter DNA-Sequenzen. Im Speziellen werden im Rahmen der Polkörperdiagnostik mit diesem Verfahren fünf Chromosomen markiert. Hierzu wurde das Vysis 5-Farben-Kits (MultiVysion PB Multi-Color Probe Kit, Abbott/Vysis) verwendet. Dieser Kit enthält Sonden für die Chromosomen 13, 16, 18, 21 und 22. Die Polkörper wurden

gemäß des Protokolls des Herstellers hybridisiert. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung läuft in mehreren Einzelschritten ab.

Zunächst mussten sowohl die DNA der Sonde als auch die DNA des Chromosoms mit Hilfe der sogenannten Kodennaturierung in Einzelstränge zerlegt werden, um eine Hybridisierung der Sonde zu ermöglichen. Die DNA der auf dem Objektträger fixierten Polkörper wurde mit Hilfe von Alkohollösungen, Pepsin und Erhitzung in Einzelstränge zerlegt. Um eine Schädigung der Chromosomen durch die Erhitzung entgegenzuwirken, wurde bei dem Verfahren Formamin verwendet. Dies ermöglicht das Auftrennen der DNA in Einzelstränge bei niedrigeren Temperaturen. Auch die Hybridisierungs sonden wurden denaturiert. Im Anschluss wurde die Sondenlösung auf die Objektträger aufgebracht und diese dann für mehrere Stunden, meist über Nacht, im Hybridisierungs ofen (HYBrite, Vysis) inkubiert. Nach Ablauf der Hybridisierungszeit waren aufwendige und sehr präzise Waschvorgänge notwendig um unspezifische Verbindungen zu lösen. Am Ende des Waschvorgangs wurde DAPI zur Gegenfärbung verwendet (siehe Abbildung 2.2).

Nach erfolgter Hybridisierung im Hybridisierungs ofen wurden die Polkörper mit einem entsprechenden Fluoreszenz-Mikroskop (Axioplan, Zeiss), sowie dazugehörigen Filtern beurteilt und die jeweiligen Chromosomensignale protokolliert. Für den ersten Polkörper wären zwei Signale für den zweiten jeweils ein Signal pro untersuchtem Chromosom normwertig (siehe Abbildung 2.3 und Abbildung 2.4). Die Entscheidung, ob eine Eizelle als auffällig oder unauffällig gilt, wurde gestützt auf die Informationen der Polkörperdiagnostik nach folgendem Schema durch einen Rater (PD Dr. Buchholz) festgelegt: War nur ein Polkörper pro Eizelle vorhanden, resultierte aus einem auffälligen Polkörper eine auffällige Eizelle sowie aus einem unauffälligen Polkörper eine unauffällige Eizelle. Eizellen von nicht sicher beurteilbaren Polkörpern wurden je nach Umfang der Informationen und anhand zusätzlicher Kriterien als eher auffällig oder eher unauffällig bzw. transferierbar von dem Rater eingestuft. Reichten die Informationen aus der Polkörperdiagnostik nicht aus war keine Aussage möglich. Waren zwei Polkörper pro Eizelle vorhanden und mindestens einer auffällig, so wurde die Eizelle als auffällig bewertet. Eine Ausnahme bildete hier der Fall, bei dem sich die chromosomalen Fehlverteilungen der beiden auffälligen Polkörper aufgehoben haben, wie z.B. ein Chromatid des Chromosom 21 im ersten Polkörper überzählig und wiederum im zweiten Polkörper fehlend. In diesen Situationen wurde die Eizelle insgesamt als unauffällig bewertet. Bei einem unauffälligen und einem nicht sicher beurteilbaren Polkörper galt die Eizelle als unauffällig.

Die Empfehlungen des Herstellers wurden befolgt. Bei der Hybridisierungszeit wurde variiert, um ein mögliches günstigeres Outcome in Abhängigkeit von der Hybridisierungsdauer herauszuarbeiten.

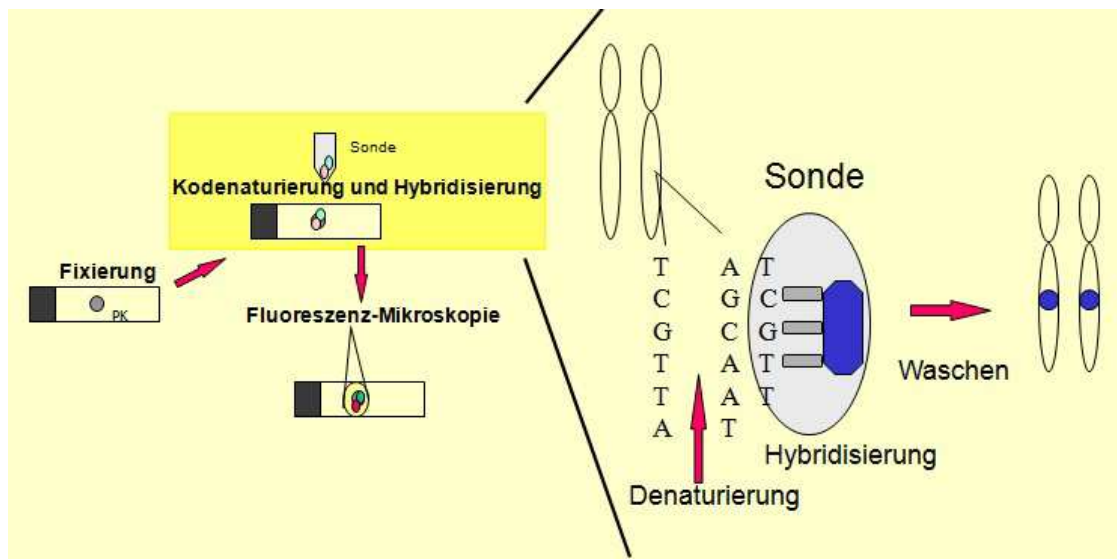


Abbildung 2.2. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Abbildung zeigt den schematischen Ablauf der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung im Rahmen der Polkörperdiagnostik.

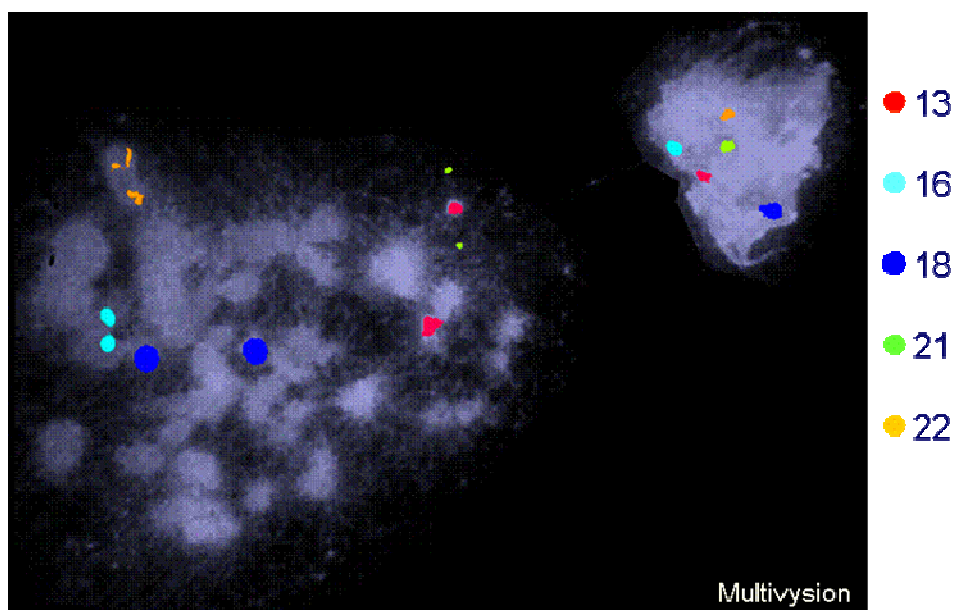


Abbildung 2.3 Darstellung der Chromosomen bei Polkörpern mit Hilfe von FISH

Die Abbildung zeigt eine normale chromosomale Verteilung der Chromosomen im ersten und zweiten Polkörper. Für den ersten Polkörper sind zwei Signale pro Chromosom, für den zweiten jeweils ein Signal pro Chromosom regelhaft. Auf der Abbildung sind die Chromosomen 13 (rot), 16 (hellblau/aqua), 18 (dunkelblau), 21 (grün) und 22 (goldgelb) zu sehen (Quelle: MultiVysion).

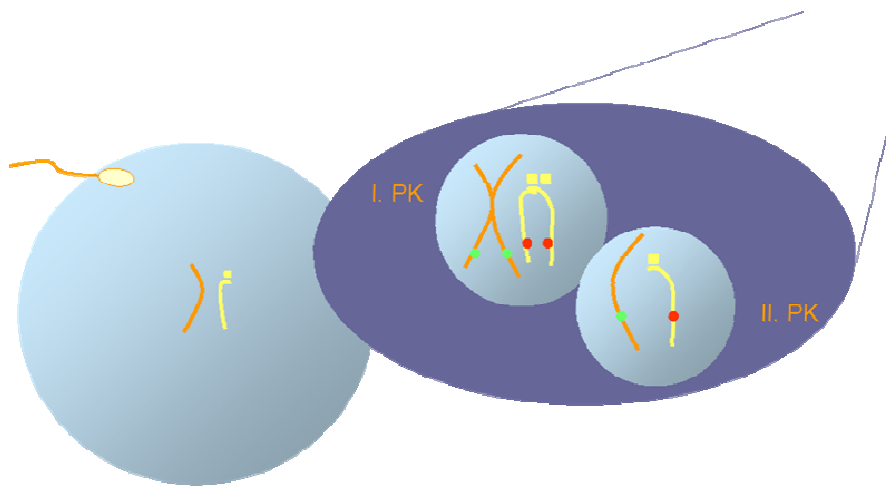


Abbildung 2.4. Schematische Darstellung von FISH-Signalen

Die linke runde Struktur zeigt die Eizelle nach Eindringen eines Spermiums und Vervollendung der zweiten meiotischen Teilung mit noch haploidem Chromosomensatz. Rechts im Bild sind der erste und zweite Polkörperchen mit beispielhaft zwei Chromosomen vergrößert dargestellt. Für den ersten Polkörperchen sind zwei FISH-Signale, für den zweiten Polkörperchen ein Signal pro Chromosom die Norm.

2.3.1. Befundmitteilung und Embryonentransfer

Nach Beendigung der Polkörperdiagnostik wurden die Ergebnisse dem jeweils zuweisenden Zentrum mitgeteilt. Diese Informationsübermittlung erfolgte noch vor Verschmelzung der Vorkerne, also vor der Befruchtung. Sofern auf Grund der Polkörperdiagnostik von euploiden Eizellen auszugehen war, wurden bis zu drei Eizellen weiterkultiviert und transferiert. Eizellen, die einen aneuploiden Chromosomensatz trugen, konnten noch vor der Verschmelzung der Vorkerne verworfen werden ohne mit dem zu dieser Zeit geltenden Embryonenschutzgesetz in Konflikt zu geraten.

2.3.2. Definition der Hybridisierungseffizienz

Die Hybridisierungseffizienz ist definiert als Effektivität der Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung an den Chromosomen der ersten Hybridisierungsrunde (13, 16, 18, 21, 22). Die Effizienz wurde in 5 Gruppen unterteilt, welche wie folgt definiert waren:

- 1: entspricht einer perfekten Hybridisierung mit 5 von 5 auswertbaren Chromosomensignalen
- 2: entspricht einer Auswertbarkeit von 4 von 5 Chromosomensignalen
- 3: entspricht einer Auswertbarkeit von 3 von 5 Chromosomensignalen
- 4: entspricht einer Auswertbarkeit von 2 von 5 Chromosomensignalen

5: entspricht einer Auswertbarkeit von 1 von 5 Chromosomensignalen

2.3.3. Statistische Analyse

Zunächst erfolgte die Datenerhebung und -sammlung aus den Unterlagen und Protokollen zur Polkörperdiagnostik der Jahre 2003-2009. Zum Teil konnten die Daten aus dem eigenen Archiv entnommen werden, teilweise wurden die notwendigen Informationen von den Zuweisern angefordert. Die gesamten Daten wurden zu Beginn codiert und in eine Excel-Datei überführt (Microsoft Office 2007). Eine zusammenfassende tabellarische Übersicht der 106 Zyklen Polkörperdiagnostik ist im Anhang dieser Arbeit abgebildet (Tabelle 7). Nach abgeschlossener Datensammlung wurde mit SPSS die Excel-Datei importiert und anschließend die Informationen statistisch ausgewertet.

Folgende Kriterien wurden in die Datenerhebung mit aufgenommen:

- Alter der Patientinnen
- Zuweisende Praxis
- Anzahl der punktierten Eizellen, durchgeführten ICSI, morphologisch unauffälligen Eizellen, transferierten Eizellen
- Anzahl der entnommenen ersten und zweiten Polkörper
- Morphologie der Polkörper bei Entnahme, nach Fixation und Färbung
- Anzahl der Signale der FISH für jeweils den ersten und zweiten Polkörper und folgender Chromosomen: 13, 16, 18, 21, 22, sowie teilweise für X, Chromosom 2, 3, 7 und 15
- Bewertung aneuploider/euploider Chromosomensatz des Polkörper
- Transfer ja/nein
- Zeitintervall von der ICSI bis zur Hybridisierung
- Hybridisierungsdauer
- Hybridisierungseffizienz

Für die statistische und mathematische Analyse der erhobenen und ausgewerteten Daten wurden folgende Verfahren angewandt: Im Bereich der explorativen sowie deskriptiven Datenanalyse erfolgte die Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen, sowie

der Normalverteilung. Mittels Kreuz- und Häufigkeitstabellen wurden die Daten veranschaulicht. Bei Variablen mit nominalem Skalenniveau fand der Chi-Quadrat-Test nach Pearson, sowie bei geringeren Fallzahlen der exakte Test nach Fisher Anwendung. Vor dem Vergleich von Mittelwerten wurde mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors-Tests untersucht, ob eine Normalverteilung vorliegt. Zum Vergleich ordinalskaliertter Variablen wurde bei nicht normalverteilten, unabhängigen Stichproben der H-Test nach Kruskal & Wallis, sowie der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt.

Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Programms SPSS Statistics 19.0 (SPSS Inc., Chicago, USA), PSPP GNU General public license Version 3 (Free Software Foundation, Inc.) und Microsoft Office 2007 durchgeführt. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mit SPSS und Microsoft Office 2007. Die Niederschrift wurde mit Hilfe des Programmes Microsoft Office Word 2007 verwirklicht.

3. Ergebnisse

3.1. Allgemeine Daten des Patientenkollektivs

3.1.1. Behandlungszyklen

In den Jahren 2003 bis 2009 wurden im Zentrum für Polkörperdiagnostik insgesamt 106 Behandlungszyklen zur Aneuploidiediagnostik durchgeführt. Unter Behandlungszyklus versteht man den Vorgang der hormonellen Stimulation der Frau mit anschließender Eizellgewinnung und -untersuchung. Das untersuchte Patientenkollektiv umfasst insgesamt 85 Patientinnen, von denen acht Patientinnen jeweils zwei Behandlungszyklen, fünf Patientinnen drei Behandlungszyklen und eine Patientin vier Behandlungszyklen durchführen ließen.

3.1.2. Alter

Das mittlere Alter der Patientinnen beträgt 40,8 Jahre (Standardabweichung +/- 3,9 Jahre, Spanne 31-49 Jahre). Die Frauen wurden in fünf Altersklassen eingeteilt. Die Verteilung ist wie folgt: unter 34 Jahren fünf Patientinnen (4,7%), zwischen 34 und 37 Jahren 19 Patientinnen (17,9%), zwischen 38 und 41 Jahren 33 Patientinnen (31,1%), zwischen 42 und 45 Jahren 37 Patientinnen (34,9%) und über 45 Jahren zwölf Patientinnen (11,3%) (siehe Abbildung 3.1).

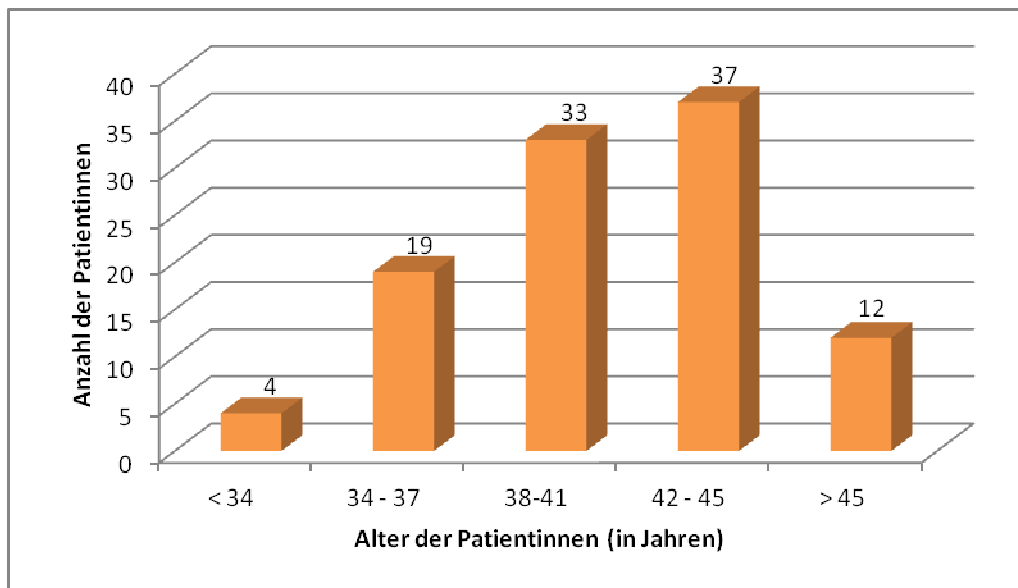


Abbildung 3.1 Altersgruppen und deren Häufigkeit

Die Abbildung zeigt die Verteilung der Patientinnen nach ihrem Alter, gruppiert in fünf Altersgruppen.

3.1.3. Eizellen

Insgesamt wurden 1100 Eizellen punktiert, im Mittel 10,4 pro Zyklus (Standardabweichung +/- 6,1, Spanne 1 bis 38 Eizellen).

Von den 1100 punktierten Eizellen konnten insgesamt 860 Eizellen einer ICSI mit nachfolgender Polkörperdiagnostik zugeführt werden, die restlichen Eizellen waren unreif oder degeneriert (Anzahl der injizierten Eizellen: 8,1 im Mittel, Standardabweichung +/- 5,0, Spanne 1 bis 33 Eizellen). Von den Eizellen, die einer ICSI zugeführt wurden, konnten 1190 Polkörper extrahiert werden. Die Differenz zu den rechnerisch möglichen 1720 Polkörpern resultiert entweder aus Irregularitäten der Polkörper wie Degeneration oder nicht ausgebildeten Polkörpern oder technischen Schwierigkeiten wie Verlust der Zelle bei der Präparation.

In den durchgeführten 106 Behandlungszyklen wurden nach erfolgter Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der Polkörper 207 (24,1%) unauffällige bzw. transferierbare Eizellen ermittelt. Im Mittel 1,9 Eizellen pro Zyklus (Standardabweichung +/- 1,5 Eizellen mit einer Spanne von 0 bis 7 unauffälligen Eizellen).

3.1.4. Embryonentransfer

Bei 84 von 106 Behandlungszyklen (79,2%) ist ein Embryonentransfer erfolgt. Bei weniger als drei unauffälligen Eizellen in der Polkörperdiagnostik wurden auch – sofern vorhanden – Embryonen aus nicht untersuchten Eizellen transferiert, um die Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaft möglichst zu erhöhen. Bei sechs Zyklen wurden nur Embryonen aus nicht untersuchten Eizellen verwendet. Insgesamt gab es 22 (20,8%) Behandlungszyklen ohne Transfer (siehe Abbildung 3.2).

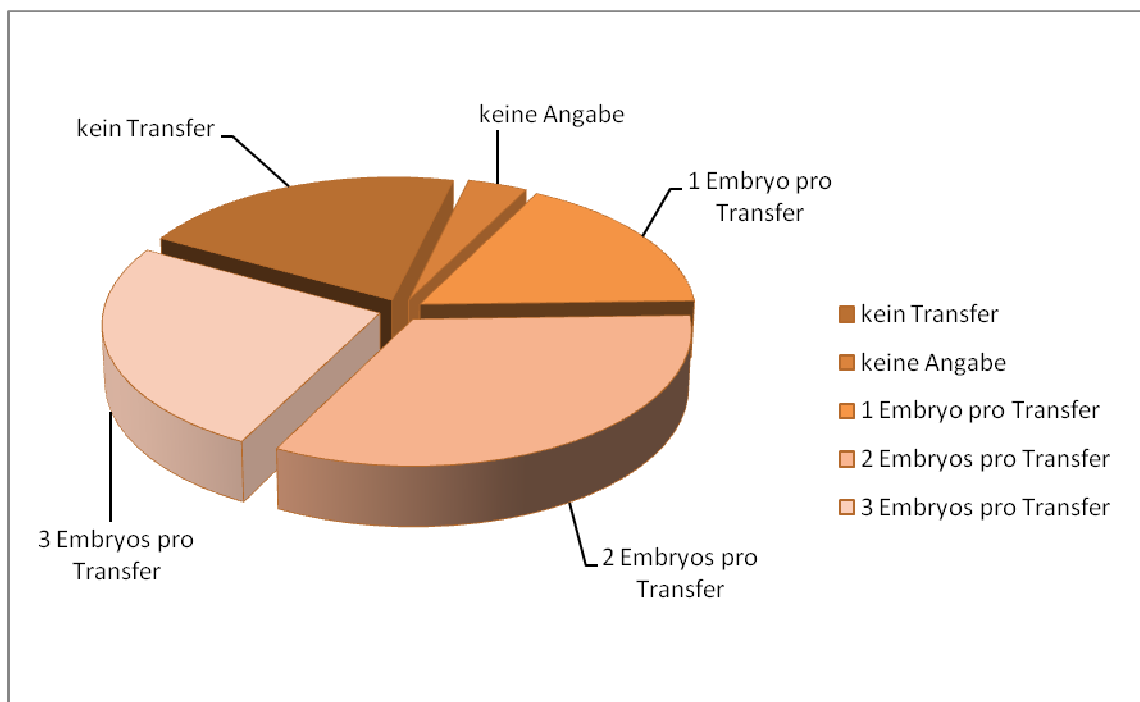


Abbildung 3.2 Transfer: Übersicht über alle Behandlungszyklen

Die Abbildung zeigt eine Übersicht über alle Behandlungszyklen mit der Anzahl der Embryos pro Transfer: 18 Zyklen mit einem Embryo pro Transfer, 35 Zyklen mit zwei Embryonen pro Transfer, 27 Zyklen mit drei Embryonen pro Transfer, vier Zyklen ohne Angabe der Anzahl der Embryonen.

3.1.5. Polkörper

3.1.5.1. Entnahme

Insgesamt wurden 1190 (782 erste und 408 zweite Polkörper) entnommen, von denen 1066 Polkörper der FISH-Diagnostik zugeführt wurden. Bei den übrigen 124 Polkörpern konnte keine FISH-Analyse durchgeführt werden, da sie auf dem Objektträger nicht mehr lokalisiert werden konnten. Von den 1066 Polkörpern war durch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bei 824 (77,3%) mindestens ein Chromosom beurteilbar (567 erste Polkörper und 257 zweite

Polkörper), 242 (22,7%) Polkörper konnten nach der FISH nicht mehr lokalisiert werden oder zeigten keinerlei Signale (siehe Abbildung 3.5).

3.1.5.2. Morphologie

Die Polkörper wurden anhand ihrer Morphologie in verschiedene Kategorien eingeteilt (siehe 2.3.2).

Von den 1190 extrahierten Polkörpern wiesen 429 (36,1%) eine kompakte Morphologie auf, 44 (3,7%) waren wolkig. Desweiteren zeigten 199 (16,7%) Polkörper eine fragmentierte und 159 (13,4%) eine segmentierte Form. 235 (19,8%) Polkörper waren zum Zeitpunkt der Beurteilung ausgelaufen. Die übrigen 124 (10,4%) Polkörper konnten morphologisch nicht begutachtet werden, da sie an markierter Stelle auf dem Objektträger nicht aufzufinden waren. Zu ihnen lag demnach „keine Angabe“ vor (siehe Abbildung 3.3).

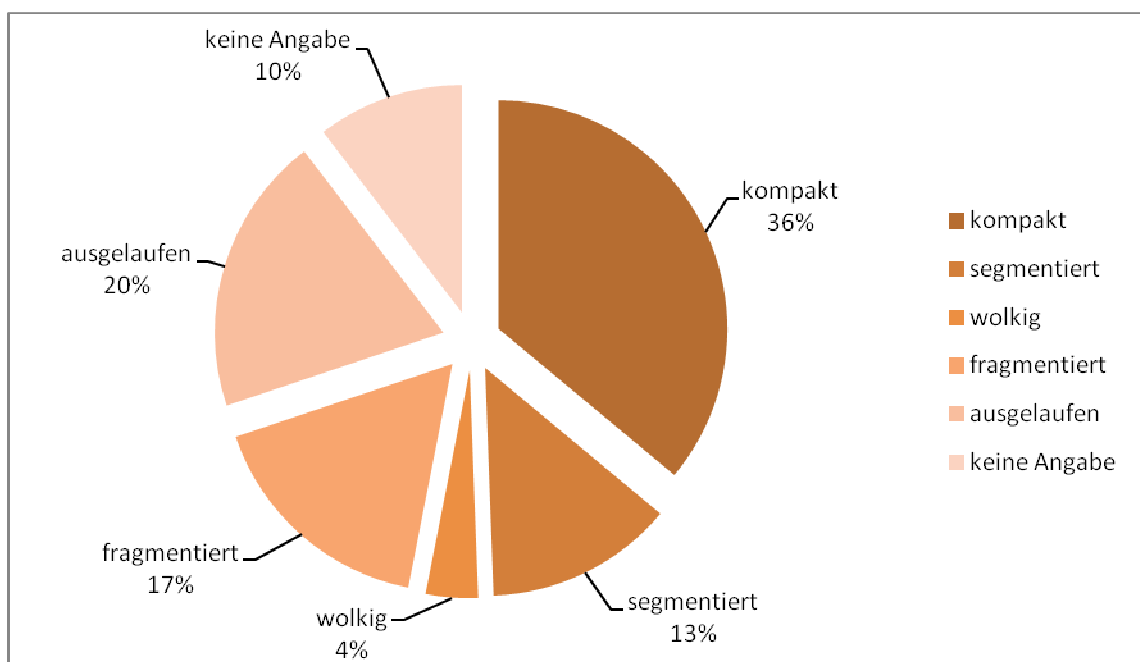


Abbildung 3.3 Polkörper-Morphologie

Die Verteilung der Polkörper (erste und zweite Polkörper) im Bezug auf die Morphologie zeigt sich wie in der Abbildung dargestellt. Der größte Teil (36%) wies eine kompakte Morphologie auf.

Betrachtet man die beiden Polkörper gesondert, zeigt sich ein deutlich häufigeres Vorkommen von kompakten zweiten Polkörpern. Die genaue Verteilung der Polkörpermorphologie ist in folgender Tabelle (Tabelle 1) dargestellt. Abbildung 3.4 veranschaulicht diese Ergebnisse graphisch.

	1. Polkörper (n=782)	2. Polkörper (n=408)
kompakt	247 (31,6%)	182 (44,6%)
segmentiert	111 (14,2%)	48 (11,8%)
wolkig	32 (4,1%)	12 (2,9%)
fragmentiert	153 (19,6%)	46 (11,3%)
ausgelaufen	166 (21,2%)	69 (16,9%)
keine Angabe	73 (9,3%)	51 (12,5%)

Tabelle 1 Verteilung des ersten und zweiten Polkörpers im Bezug auf die Morphologie

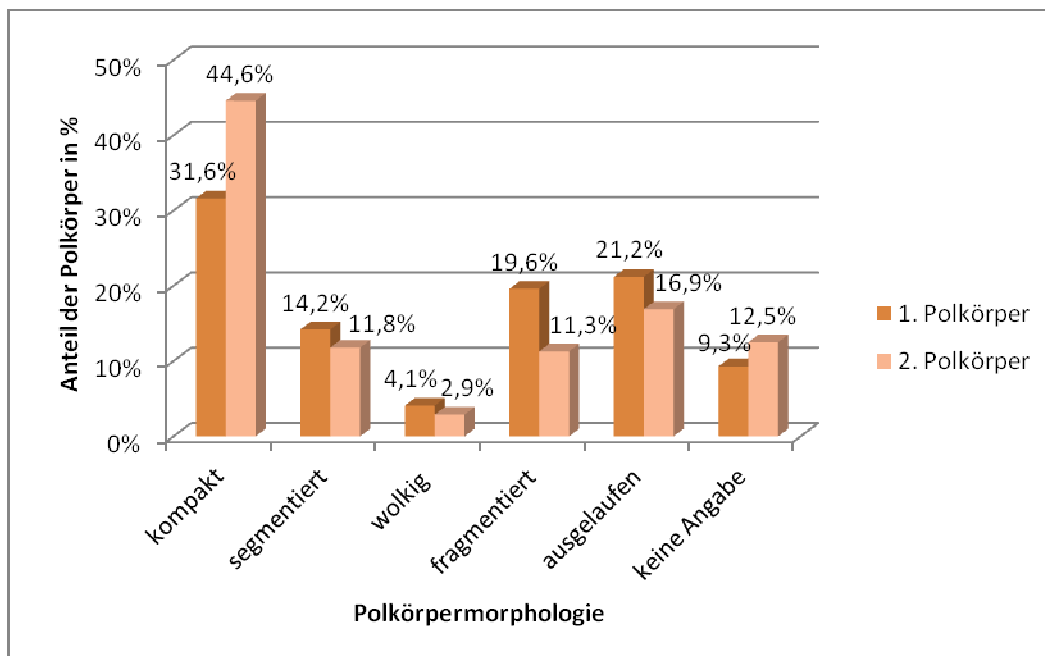


Abbildung 3.4 Verteilung des ersten und zweiten Polkörper im Bezug auf die Morphologie

Die Abbildung zeigt die Verteilung der Polkörper auf die verschiedenen Kategorien. Auffällig ist eine deutlich höheres Vorkommen von kompakten zweiten Polkörpern im Vergleich zu ersten Polkörpern.

3.2. Chromosomenverteilung im Polkörper

Um eine Aussage über den Chromosomensatz der Eizelle zu erlangen, wurden die Polkörper mittels FISH hybridisiert und ausgewertet. Anhand der Ergebnisse können indirekte Rückschlüsse auf den genetischen Gehalt der Eizelle getroffen werden (siehe 1.3 und 1.4.2) (Montag et al. 2002b). Die Polkörper wurden mit der MultiVysion-Probe von Vysis auf die fünf häufigsten Aneuploidien (Chromosomen 13, 16, 18, 21, 22) untersucht.

3.2.1. Überblick

Die nachfolgende Übersicht (Abbildung 3.5) vermittelt einen Überblick über die Anzahl der Polkörper auf der die Berechnungen in den folgenden Abschnitten basieren.

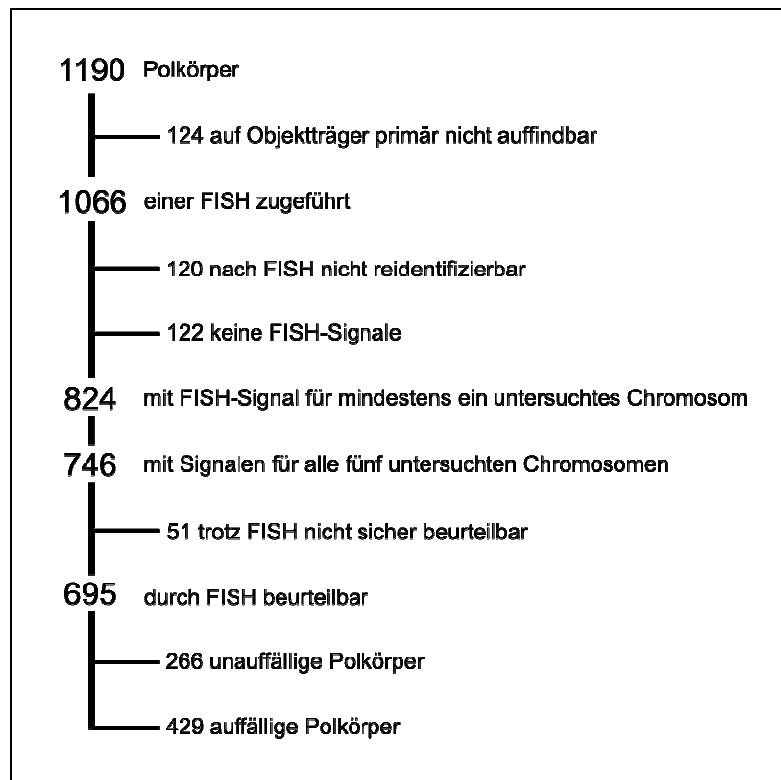


Abbildung 3.5 Übersicht über die Polkörperanzahl

Die Abbildung zeigt eine Übersicht über die Anzahl der Polkörper, die den folgenden Berechnungen zugrunde liegen.

Um eine möglichst zuverlässige Aussage über die Chromosomenzusammensetzung des untersuchten Polkörpers bzw. der korrespondierenden Eizelle zu erlangen, sollten alle Chromosomen mittels FISH-Signalen beurteilbar sein. Dies trifft auf insgesamt 746 Polkörper zu (siehe auch 3.4). Bei insgesamt 51 Polkörpern war aufgrund der FISH-Konstellation keine

eindeutige Aussage hinsichtlich Euploidie/Aneuploidie des Polkörpers möglich. Diese Daten wurden bei der folgenden Berechnung ausgeschlossen. Von den verbliebenen 695 Polkörpern waren 266 (38,3%) unauffällig, hingegen 429 (61,7%) auffällig. Auffällig ist definiert als Abweichung vom normalen Chromosomensatz. Aufgeschlüsselt auf die beiden Polkörper ergibt sich folgendes Ergebnis:

1. Polkörper

Von 484 ersten Polkörpern waren 202 (41,7%) unauffällig, im Gegensatz dazu 282 (58,3%) auffällig.

2. Polkörper

Von 211 zweiten Polkörpern waren 64 (30,3% unauffällig) und 147 (69,7%) auffällig.

Gesamt

Eine graphische Darstellung dieser Ergebnisse zeigt Abbildung 3.6. Statistisch besteht ein Zusammenhang zwischen den Variablen, der Anteil der auffälligen und unauffälligen Polkörper unterscheidet sich bei den ersten und zweiten Polkörpern signifikant (Chi-Quadrat-Test, $p=0,004$).

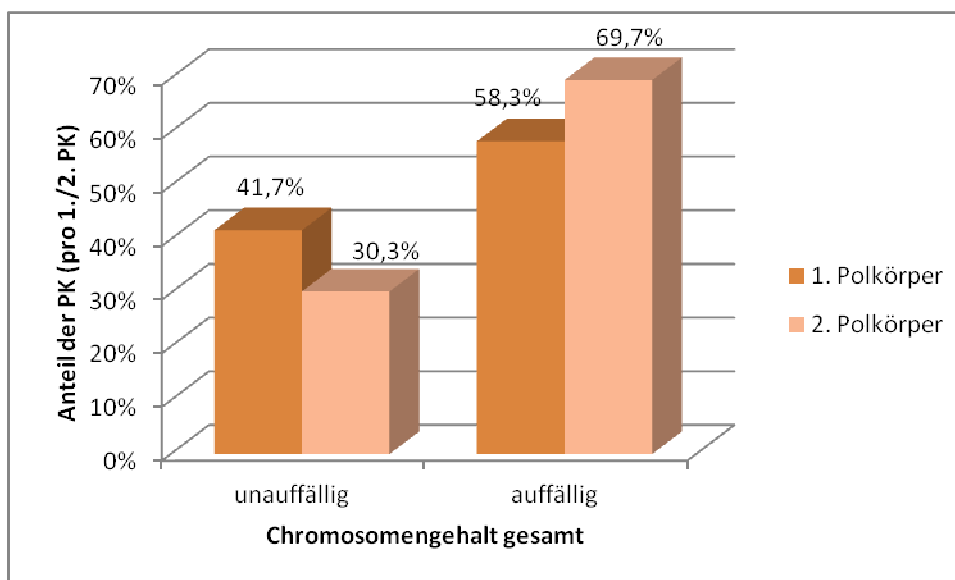


Abbildung 3.6 Chromosomenzusammensetzung der Polkörper

In der vorliegenden Abbildung ist dargestellt, welcher Anteil des jeweils ersten und zweiten Polkörpers chromosomal unauffällig bzw. auffällig ist. Der zweite Polkörper zeigt sich deutlich häufiger auffällig als der erste Polkörper. Die Graphik bezieht sich dabei nur auf Polkörper, bei denen alle getesteten Chromosomen (13, 16, 18, 21, 22) beurteilbar waren und die FISH-Signale eine eindeutige Aussage zuließen.

3.2.2. Zusammenhang zwischen der Polkörper-Morphologie und der chromosomalen Zusammensetzung

Da die Polkörperdiagnostik mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung nicht immer eine ausreichende Auswertung ermöglicht, wäre es wünschenswert, durch die Morphologie der Polkörper eine Aussage über deren Chromosomenzusammensetzung gewinnen zu können. Im Folgenden wurde daher der genetische Gehalt der Polkörper in Abhängigkeit von der jeweiligen Morphologie betrachtet. In die Berechnung gingen wie in Abschnitt 3.2.1 nur Polkörper ein, bei denen eine eindeutige Aussage über die chromosomale Zusammensetzung getroffen werden konnte (n=695). Hier zeigt sich keine statistische Abhängigkeit der Variablen (Chi-Quadrat-Test; $p=0,96$). Die Verteilung der chromosomal auffälligen Polkörper ist über alle Morphologie-Kategorien nahezu gleich. Somit lassen sich von der Morphologie der Polkörper keine Rückschlüsse auf die chromosomale Zusammensetzung ziehen (siehe Abbildung 3.7).

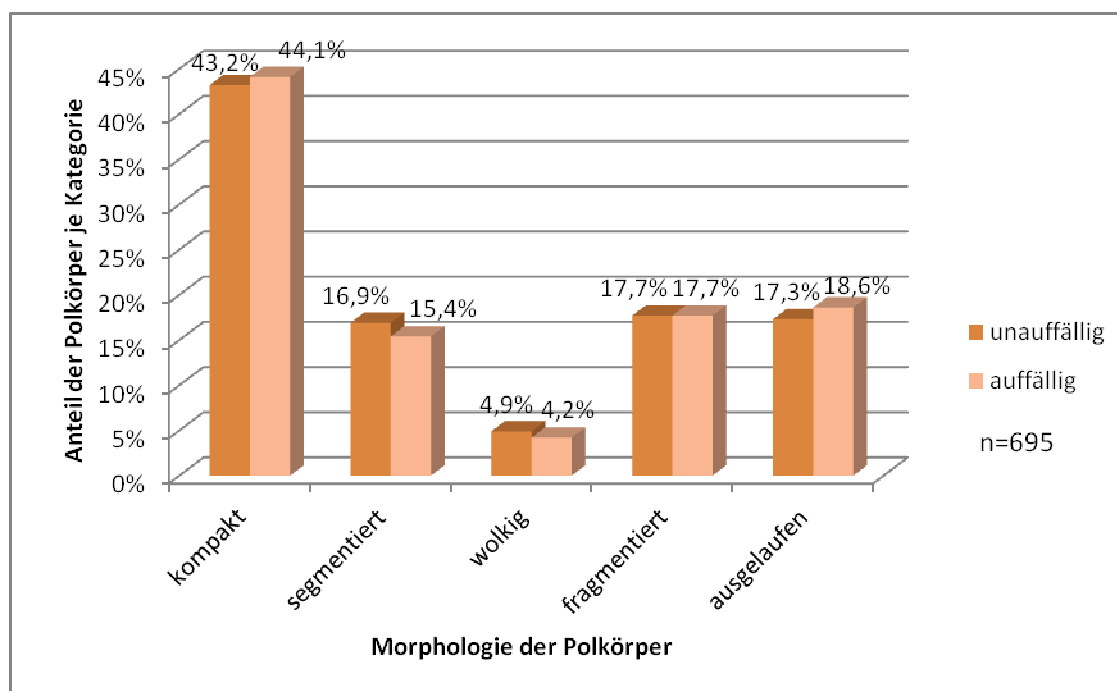


Abbildung 3.7 Zusammenhang zwischen der Morphologie und der chromosomalen Zusammensetzung der Polkörper

Die Abbildung verdeutlicht, wie sich chromosomal unauffällige bzw. auffällige Polkörper in Abhängigkeit von deren Morphologie verteilen. Es besteht keine Abhängigkeit der Chromosomenverteilung von der Morphologie der Polkörper.

3.2.3. Genetische Zusammensetzung der Polkörper - Chromosomen 13, 16, 18, 21, 22

Im Folgenden wird jedes Chromosom einzeln betrachtet. Darüber hinaus werden die FISH-Signale für jeweils den ersten und zweiten Polkörper aufgeschlüsselt. Normwertig sind zwei Signale beim ersten Polkörper und ein Signal beim zweiten Polkörper. Eine Übersicht über die genauen Ergebnisse ist in Tabelle 2 dargestellt.

	1. PK	hypoploid	euploid	hyperploid	2. PK	hypoploid	euploid	hyperploid
Chromosom 13	n=550	22,1%(122)	73,5%(404)	4,4%(24)	n=251	13,1%(33)	55,8%(140)	31,1%(78)
Chromosom 16	n=546	19,8%(108)	77,3%(422)	2,9%(16)	n=248	13,7%(34)	60,5%(150)	25,8%(64)
Chromosom 18	n=564	15,9%(90)	82,8%(467)	1,2%(7)	n=255	3,5%(9)	75,7%(193)	20,8%(53)
Chromosom 21	n=553	18,8%(104)	74,9%(414)	6,3%(35)	n=244	8,6%(21)	60,2%(147)	31,1%(76)
Chromosom 22	n=544	20,0%(109)	76,7%(417)	3,3%(18)	n=247	14,6%(36)	56,3%(139)	29,1%(72)

Tabelle 2 Darstellung der chromosomalen Zusammensetzung des ersten und zweiten Polkörpers

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die Anzahl der FISH Signale je untersuchtem Chromosom. Die Ergebnisse sind aufgeteilt in ersten und zweiten Polkörper.

Die Daten zeigen, dass die chromosomal auffälligen ersten Polkörper überwiegend hypoploid waren, also zu wenige FISH-Signale aufwiesen. Hingegen präsentierten sich die aneuploiden zweiten Polkörper häufiger hyperploid mit mehr als einem erwarteten FISH-Signal. Die Ergebnisse der Tabelle 2 werden in Abbildung 3.8 und Abbildung 3.9 zur besseren Anschaulichkeit graphisch dargestellt.

3.2.3.1. Zusammenfassende Übersicht der chromosomalen Zusammensetzung der ersten und zweiten Polkörper

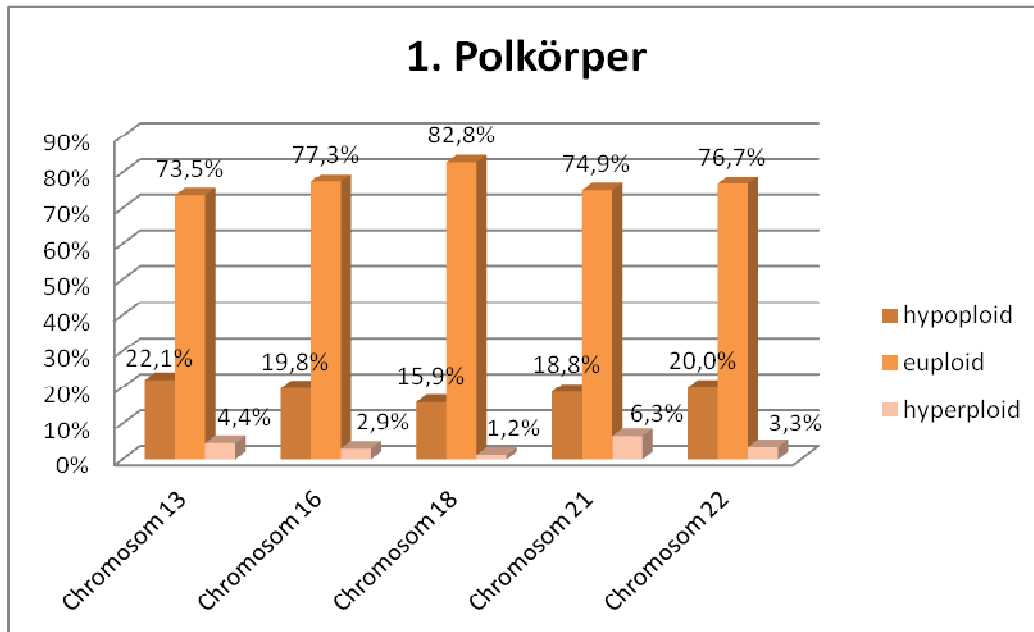


Abbildung 3.8 Übersicht der chromosomalen Zusammensetzung der 1. Polkörper

Die Abbildung verdeutlicht die Verteilung der FISH-Signale aufgeschlüsselt auf die einzelnen Chromosomen. Die ersten Polkörper zeigen sich eher hypoploid als hyperploid.

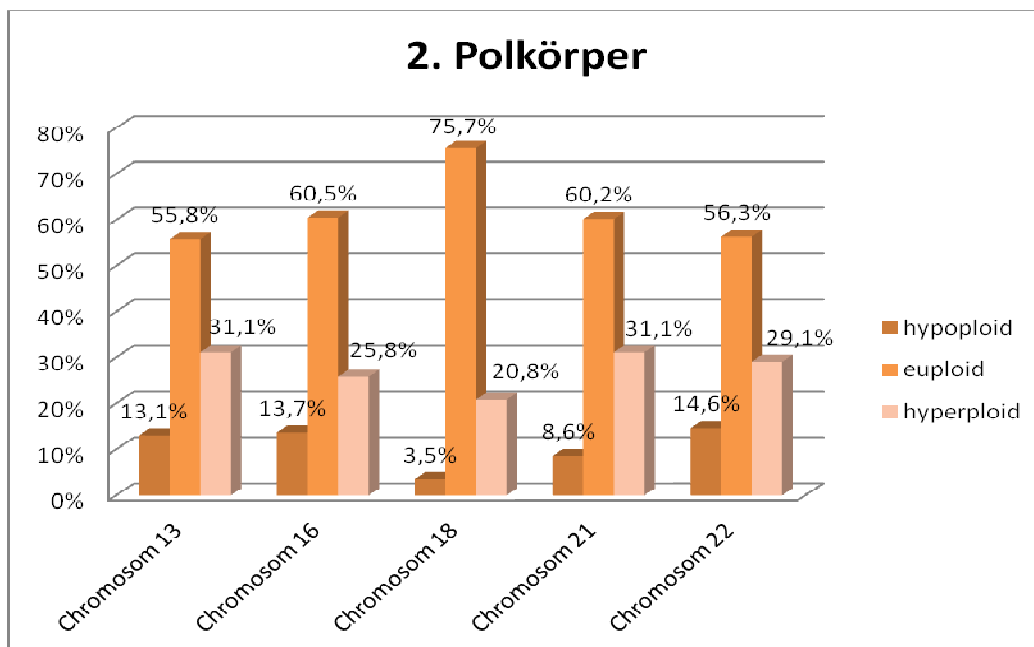


Abbildung 3.9 Übersicht der chromosomalen Zusammensetzung der 2. Polkörper

Die Abbildung zeigt, dass bei den zweiten Polkörpern Hyperplodien bei den untersuchten Chromosomen häufiger zu finden sind.

3.3. Altersabhängige Veränderungen der Polkörper

Die Einteilung der Patientinnen in Alterskategorien erfolgte wie in 3.1.2 beschrieben. Den untersuchten Polkörpern wurde das jeweilige Alter der Patientin zugeordnet, von der die Polkörper stammten.

3.3.1. Altersabhängige Veränderungen des Chromosomensatzes

Die Zunahme der Aneuploidien bei weiblichen Keimzellen mit steigendem Alter der Frau ist gesichert (siehe Abschnitt 1.4 und 3.3.1). Zur Einordnung unserer Daten wurden diese auch auf die altersabhängigen Veränderungen des Chromosomensatzes hin untersucht. In die Berechnung gingen, wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, alle Polkörper ein, die eine eindeutige Aussage über ihre chromosomale Zusammensetzung erlaubten (n=695).

In Tabelle 3 sind die prozentualen sowie absoluten Werte der Datenauswertung bezüglich des Chromosomensatzes in Abhängigkeit des Alters aufgeführt.

Altersklassen	< 34 Jahre	34-37 Jahre	38-41 Jahre	42-45 Jahre	> 45 Jahre
unauffällig	42,4%(25)	43,0%(77)	39,1%(81)	35,1%(79)	16,0%(4)
auffällig	57,6%(34)	57,0%(102)	60,9%(126)	64,9%(146)	84%(21)
Gesamtzahl (n=695)	59	179	207	225	25

Tabelle 3 Beurteilung des Chromosomensatzes in Abhängigkeit vom Alter

Das Alter der Polkörper bzw. der entsprechenden Patientinnen wurde in Alterskategorien eingeteilt. Die Zahlen in Klammern geben die absoluten Werte an.

In der graphischen Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 3.10 wird anschaulich, dass der Anteil chromosomal auffälliger Polkörper mit dem Alter ansteigt, der Anteil unauffälliger Polkörper hingegen dementsprechend abnimmt.

Der Zusammenhang zwischen dem genauen Alter der Patientinnen bzw. der Polkörper als unabhängige Variable und ihrem Chromosomensatz ist statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,015$).

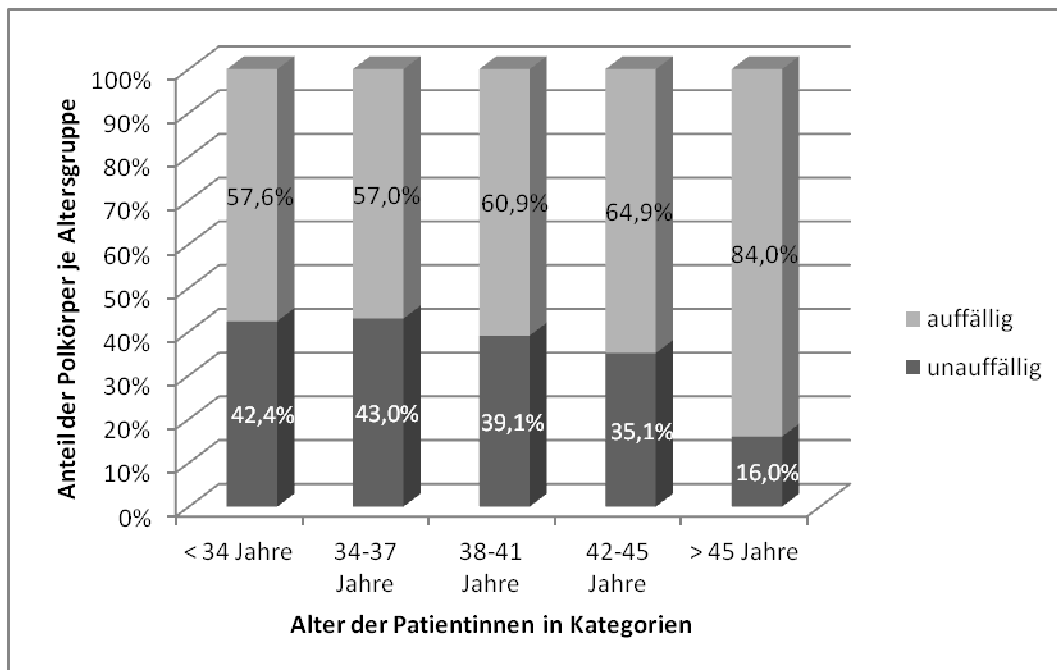


Abbildung 3.10 Euploidien und Aneuploidien in Abhängigkeit vom Alter der Patientinnen

Die Abbildung veranschaulicht die Verteilung der chromosomal auffälligen bzw. unauffälligen Polkörper in Abhängigkeit vom Alter der Patientinnen. Es ist zu erkennen, dass der Anteil auffälliger Polkörper mit dem Alter ansteigt (mittelgrauer Balken). Der Anteil unauffälliger Polkörper sinkt entsprechend (dunkelgrauer Balken).

3.3.2. Altersabhängige Veränderungen der Polkörpermorphologie

Die Betrachtung der Daten erfolgte kategorisiert nach Altersklassen. In die Auswertung gingen alle 1190 extrahierten Polkörper ein. Eine Übersicht über die Verteilung der Polkörper zeigt Tabelle 4.

Altersklassen	< 34 Jahre	34-37 Jahre	38-41 Jahre	42-45 Jahre	> 45 Jahre
kompakt	40,5% (34)	34,8% (104)	35,5% (131)	37,8% (142)	29,0% (18)
segmentiert	16,7% (14)	15,1% (45)	15,4% (57)	9,0% (34)	14,5% (9)
wolkig	0% (0)	4,0% (12)	4,9% (18)	3,5% (13)	1,6% (1)
fragmentiert	9,5% (8)	19,4% (58)	11,4% (42)	22,1% (83)	12,9% (8)
ausgelaufen	22,6% (19)	14,4% (43)	21,4% (79)	20,2% (76)	29,0% (18)
keine Angabe	10,7% (9)	12,4% (37)	11,4% (42)	7,4% (28)	12,9% (8)
Gesamtzahl	84	299	369	376	62

Tabelle 4 Verteilung der Polkörper nach Morphologie kategorisiert in Altersklassen

Die Tabelle zeigte die prozentuale Verteilung der Polkörper anhand ihrer Morphologie über die verschiedenen Alterskategorien. In Klammern sind die absoluten Zahlen angegeben.

Die Ergebnisse zeigen eine Verschlechterung der Zellintegrität mit zunehmendem Alter. Bei jüngeren Patientinnen präsentierten sich deren Polkörper eher kompakt, mit steigendem Alter waren diese hingegen vermehrt ausgelaufen.

Zwischen dem Alter und der Morphologie scheint ein Zusammenhang zu bestehen. Zwar ist dieser statistisch nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test; $p=0,094$), allerdings ist ein klarer Trend zu erkennen. In Abbildung 3.11 wird die altersabhängige Veränderung der Polkörpermorphologie graphisch dargestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit sind in der Graphik nur die beiden Extreme der morphologischen Ausprägung gegenübergestellt.

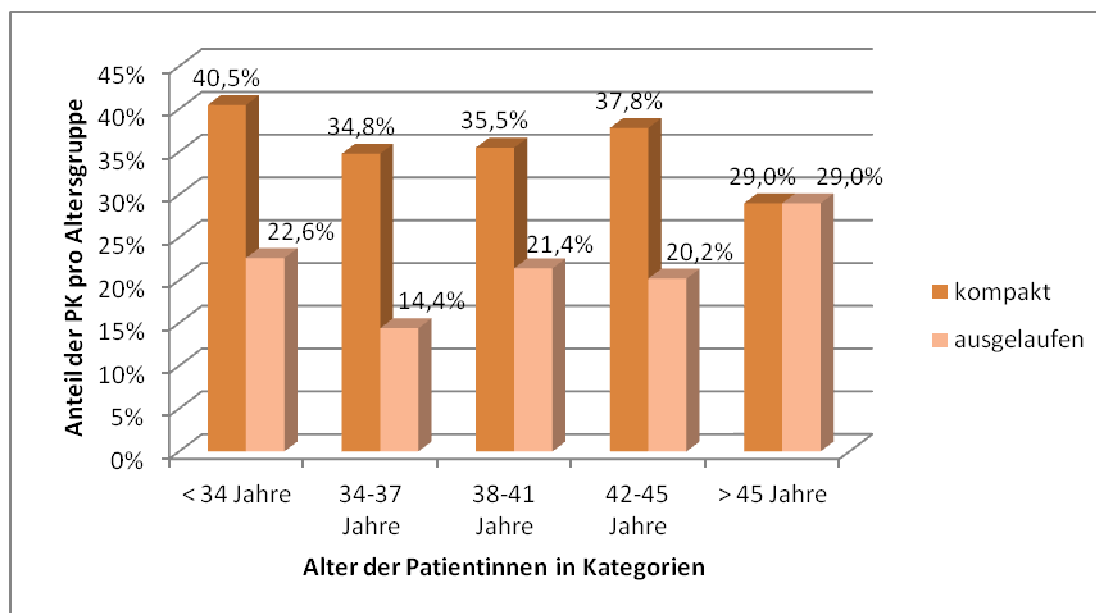


Abbildung 3.11 Altersabhängige Morphologie der Polkörper

In der Abbildung ist die altersabhängige Veränderung der Polkörpermorphologie dargestellt. Dabei ist ein tendenzieller Abfall an kompakten Polkörpern mit dem Alter festzustellen. Der Anteil an ausgelaufenen Polkörpern steigt mit zunehmendem Alter der Frau an.

3.3.3. Zusammenfassung altersabhängiger Einflüsse auf den Chromosomensatz und die Polkörpermorphologie

Es besteht ein klarer Zusammenhang zwischen dem Alter und der Chromosomenzusammensetzung der Polkörper und somit auch der korrespondierenden Eizelle. Die Polkörper verschlechtern sich morphologisch tendenziell mit zunehmendem Alter und erreichen damit eine geringere Hybridisierungseffizienz. Zwischen der Morphologie der Polkörper und ihrer chromosomalen Zusammensetzung besteht keine Abhängigkeit (Chi-Quadrat-Test; $p=0,96$). Auch bei der Gegenüberstellung beider Extreme, ausgelaufene Polkörper versus kompakte Polkörper, ergibt sich kein Unterschied in den Gruppen. Damit

kann anhand der Morphologie der Polkörper kein Rückschluss auf deren Chromosomenzusammensetzung gezogen werden. Zusammenfassend verlieren die Polkörper mit steigendem Alter der Frau an Integrität und sind somit schlechter hybridisierbar, allerdings lassen sich diese Eigenschaften nicht mit dem Chromosomensatz in Zusammenhang bringen.

3.4. Ermittlung der Hybridisierungseffizienz

Um die Effektivität der Hybridisierung mittels FISH objektiver betrachten zu können, wurden die Ergebnisse in fünf Grade der Effektivität, die sogenannte Hybridisierungseffizienz (HyE) eingeteilt. Für eine perfekte Hybridisierungseffizienz mussten fünf von fünf untersuchten Chromosomen beurteilbar sein, für eine gute vier von fünf, für eine befriedigende drei von fünf, für eine ausreichende zwei von fünf und für eine schlechte Hybridisierungseffizienz eines von fünf Chromosomen.

Hybridisierungs- effizienz	untersuchte Chromosomen (Anzahl)	auswertbare Chromosomen (Anzahl)	Anzahl der PK	Ergebnis (prozentual)
perfekt (1)	5	5	746	90,5%
gut (2)	5	4	51	6,2%
befriedigend (3)	5	3	24	2,9%
ausreichend (4)	5	2	3	0,4%
schlecht (5)	5	1	0	0%

Tabelle 5 Hybridisierungseffizienz

Die Tabelle beschreibt die Vorgaben zur Einteilung in die verschiedenen Gruppen der Hybridisierungseffizienz. Die Tabelle zeigt außerdem die Anzahl und Prozentangaben der beurteilbaren Polkörper hinsichtlich ihrer Hybridisierungseffizienz.

Von den beurteilbaren Polkörpern (824) mit mindestens einem FISH-Signal wiesen 90,5% (746 Polkörper) eine perfekte, 6,2% (51 Polkörper) eine gute, 2,9% (24 Polkörper) eine befriedigende und 0,4% (3 Polkörper) eine noch ausreichende Hybridisierung auf. Bei keinem der beurteilbaren Polkörper konnte lediglich ein Chromosom bewertet werden.

Im Falle von vollständig fehlenden Signalen bei allen fünf untersuchten Chromosomen kann von einem methodischen Fehler ausgegangen werden. Darüber hinaus wurde ein Teil der Polkörper nach der Färbung nicht wieder auf dem Objektträger identifiziert. Wahrscheinlichste Ursache ist auch hier ein technisches Problem, welches durch die Teilschritte der Hybridisierung zu einem Lösen der Polkörper vom Objektträger geführt hat. Im Einzelnen betrachtet, konnten von den 1066 Polkörpern, die einer FISH unterzogen wurden, 120 Polkörper nicht reidentifiziert werden, weitere 122 Polkörper zeigten keinerlei Signale (siehe Abbildung 3.5). Schließt man diese beiden Gruppen in die Berechnung mit ein

und betrachtet nun den Anteil der Polkörper, die eine Beurteilung zuließen, bezogen auf alle der FISH zugeführten Polkörper (1066), so erhält man eine Gesamteffizienz von 77,3%.

Die beiden Gruppen, die aufgrund von gänzlich fehlenden FISH-Signalen oder Reidentifizierungsproblemen keine Beurteilung ermöglichten, werden zu einem späteren Zeitpunkt betrachtet und gingen nicht in die folgende Berechnung der Hybridisierungseffizienz ein.

3.4.1. Hybridisierungseffizienz in Abhängigkeit von der Hybridisierungszeit

Um einen möglichen Einfluss der Hybridisierungsdauer auf die Qualität der FISH aufzudecken, wurde die Hybridisierungseffizienz in Abhängigkeit der Hybridisierungsdauer untersucht. Die Polkörper wurden gemäß den Vorgaben des Hybridisierungskits vorbereitet und hybridisiert. Bezüglich der Hybridisierungszeit wurde variiert. Die zwei anhand der erfolgten Hybridisierungszeit gebildeten Gruppen wurden anschließend miteinander verglichen. Die Zeitgrenze wurde hierbei willkürlich auf unter und über 7 Stunden festgelegt. Von den auswertbaren 824 Polkörpern befanden sich insgesamt 155 Polkörper in der Gruppe unter 7 Stunden, 623 Polkörper wiesen eine Hybridisierungszeit über 7 Stunden auf. Bei 46 Polkörpern lag keine Angabe über die Hybridisierungszeit vor. Die durchschnittliche Hybridisierungszeit in der Gruppe unter 7 Stunden betrug 4,2 Stunden, die mittlere Hybridisierungszeit in der Gruppe über 7 Stunden lag bei 9,8 Stunden.

3.4.1.1. Hybridisierungszeit unter 7 Stunden

Von den insgesamt 155 Polkörpern in dieser Gruppe wiesen 141 (91,0%) eine sehr gute Hybridisierungseffizienz auf. 7 Polkörper (4,5%) waren gut hybridisierbar, 7 weitere Polkörper (4,5%) zeigten eine befriedigende Hybridisierungseffizienz und keine der auswertbaren Polkörper waren schlechter als befriedigend hybridisierbar.

3.4.1.2. Hybridisierungszeit über 7 Stunden

Von den insgesamt 623 Polkörper in der Gruppe der über 7 Stunden hybridisierten, wiesen 567 Polkörper (91,0%) eine sehr gute Hybridisierungseffizienz auf. 38 Polkörper (6,1%) waren gut hybridisierbar, 15 Polkörper (2,4%) zeigten eine befriedigende Hybridisierungseffizienz und drei der auswertbaren Polkörper (0,5%) waren nur ausreichend zu hybridisieren.

3.4.1.3. Vergleich der Gruppen - Hybridisierungszeit

Bei einem Vergleich der beiden Gruppen mit über und unter 7 Stunden Hybridisierungszeit ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der Hybridisierungseffizienz (Mann-Whitney-U-Test; $p=0,948$). Durch Variationen in der Hybridisierungszeit lässt sich somit die Effizienz nicht steigern. Einen Überblick über die Ergebnisse liefert Abbildung 3.12.

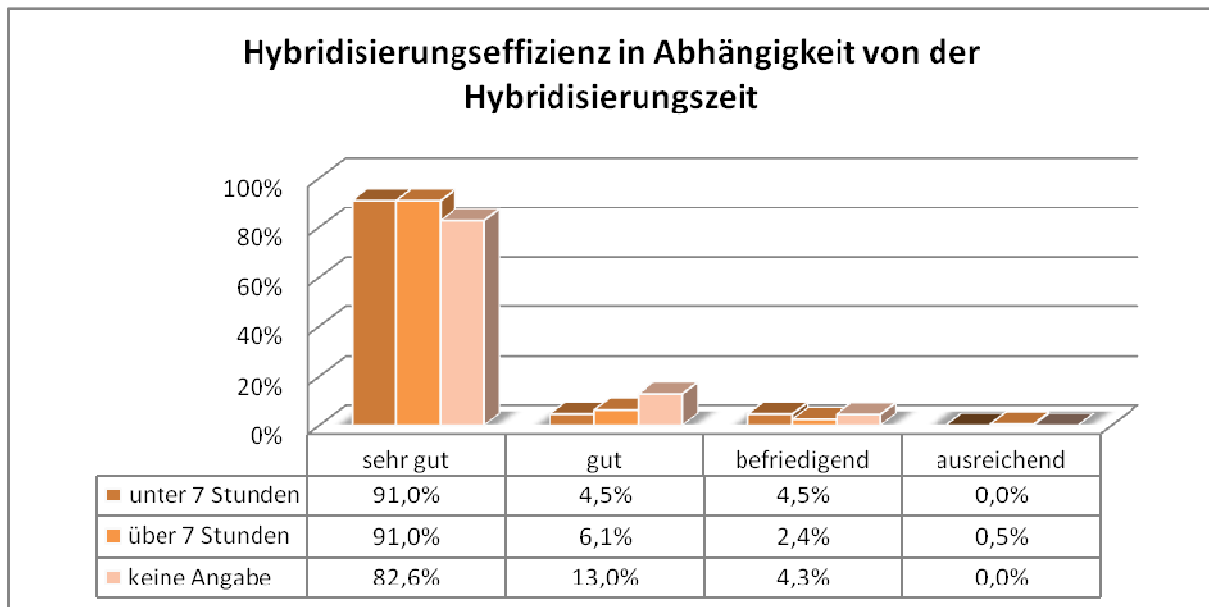


Abbildung 3.12 Vergleich der Gruppen bezüglich der Hybridisierungszeit

Diese Abbildung zeigt die Hybridisierungseffizienz in Abhängigkeit der Hybridisierungszeit.

3.4.2. Hybridisierungseffizienz in Abhängigkeit von der Morphologie der Polkörper

3.4.2.1. Verteilung nach Morphologie

In die Berechnung gingen alle 1066 Polkörper, die einer Hybridisierung zugeführt wurden, ein. Es wurden auch die beiden Gruppen ohne Signale und „nicht reidentifizierbar“ betrachtet, da von Interesse ist, ob die Morphologie einen Einfluss auf ein komplettes Hybridisierungsversagen bzw. den Verlust des Polkörpers hat. Tabelle 6 zeigt einen Überblick über die Verteilung der Polkörper nach deren Hybridisierungseffizienz in Abhängigkeit der Morphologie. Die Prozentangaben beziehen sich jeweils auf alle Polkörper dieser Morphologie.

Hybridisierungs- effizienz	1	2	3	4	5	keine Signale	nicht reidentifiziert
kompakt	75,8%(325)	3,5%(15)	2,6%(11)	0,2%(1)	0%(0)	4,9%(21)	13,1%(56)
segmentiert	75,5%(120)	3,1%(5)	0,6%(1)	0%(0)	0%(0)	11,9%(19)	8,8%(14)
wolkig	72,7%(32)	4,5%(2)	0%(0)	0%(0)	0%(0)	13,6%(6)	9,1%(4)
fragmentiert	67,3%(134)	8,0%(16)	2,5%(5)	0,5%(1)	0%(0)	12,6%(25)	9,0%(18)
ausgelaufen	57,4%(135)	5,5%(13)	3,0%(7)	0,4%(1)	0%(0)	21,7%(51)	11,9%(28)

Tabelle 6 Hybridisierungseffizienz in Abhängigkeit der Morphologie

In den einzelnen Morphologiegruppen befanden sich 429 kompakte, 159 segmentierte, 44 wolkige, 199 fragmentierte, 235 ausgelaufene Polkörper.

An den Zahlen lässt sich erkennen, dass die Hybridisierbarkeit mit abnehmender Zellintegrität sinkt. Es ergibt sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang (Kruskal-Wallis-Test; $p=0,018$) zwischen der Hybridisierungseffizienz und der Morphologie der Polkörper. Das bedeutet: Die Morphologie und der Grad der Hybridisierungseffizienz treten nicht unabhängig voneinander auf.

Betrachtet man nur die beiden gegensätzlichen Extreme der morphologischen Ausprägung, ausgelaufen und kompakt, dann zeigt sich ein signifikanter statistischer Zusammenhang. Ausgelaufene Polkörper weisen eine schlechtere Hybridisierungseffizienz als kompakte Polkörper auf (Mann-Whitney-U-Test; $p=0,042$).

3.4.3. Verteilung nach Morphologie – morphologische Eigenschaften perfekt hybridisierter Polkörper

Von besonderer klinischer Relevanz ist die Frage, welche Polkörpermorphologie am besten zu hybridisieren und damit am effektivsten auszuwerten ist. Auf der anderen Seite ist von Interesse, welche Morphologien besonders schlecht bzw. gar nicht durch FISH zu hybridisieren waren, da in diesem Fall keine Aussage über die Polkörper und damit über die korrespondierende Eizelle getroffen werden kann.

Deshalb werden diese beiden Aspekte in Abbildung 3.13 bis Abbildung 3.16 zur Veranschaulichung noch einmal gesondert dargestellt und zur Übersichtlichkeit nach Hybridisierungseffizienz gruppiert. Die Prozentangaben beziehen sich jeweils auf den Anteil in der Morphologie-Kategorie.

Hier zeigt sich der Trend, dass ausgelaufene und fragmentierte Polkörper schlechter zu hybridisieren sind und somit seltener ein sicheres Ergebnis über die

Chromosomenzusammensetzung gemacht werden kann. Bei den Polkörpern, bei denen die Hybridisierung gänzlich versagt hat, lässt sich Folgendes feststellen: Je weniger integer die Polkörper sind, desto häufiger ist keinerlei Hybridisierung möglich.

Bei der Betrachtung der nicht-reidentifizierten Polkörper zeigt sich eine relativ gleichmäßige Verteilung der verlorenen Polkörper über alle Morphologien. Dies untermauert die These, dass der Verlust eines Polkörpers überwiegend durch handwerkliche Fehler bedingt und somit nicht von der Morphologie abhängig ist.

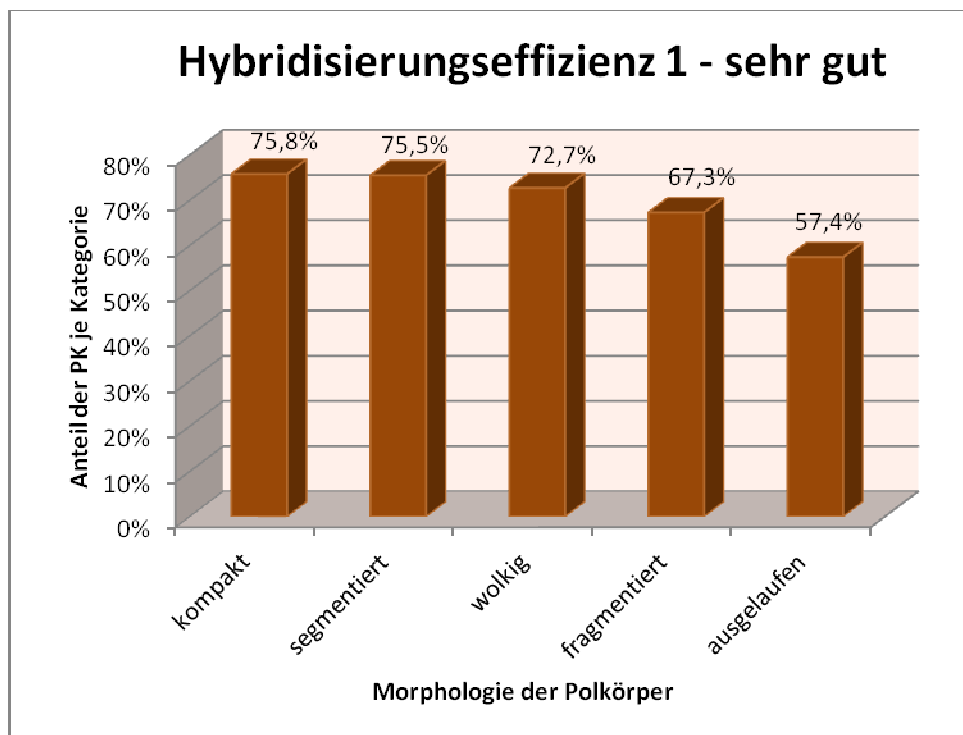


Abbildung 3.13 Morphologie perfekt hybridisierter Polkörper

Die vorliegende Abbildung bezieht sich nur auf die Gruppe der perfekt hybridisierten Polkörper (n=746). Fragmentierte und ausgelaufene Polkörper zeigten deutlich seltener eine sehr gute Hybridisierbarkeit mit FISH.

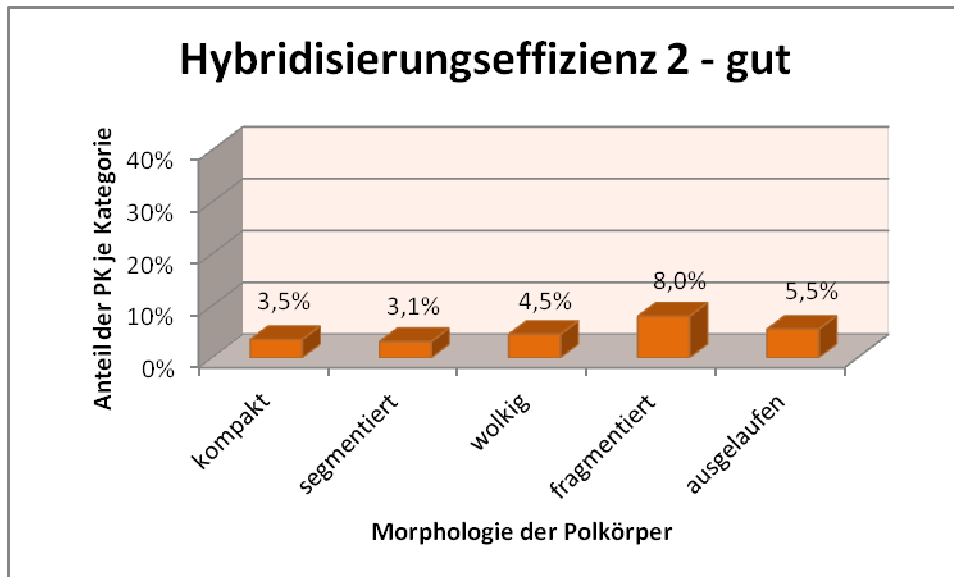


Abbildung 3.14 Morphologie bei guter Hybridisierungseffizienz

Bei guter Hybridisierungseffizienz können vier von fünf untersuchten Chromosomen ausgewertet werden. Eine Aussage über die korrespondierende Eizelle ist also nur anhand eines untersuchten Chromosoms nicht möglich. In dieser Gruppe ist die Fallzahl mit 51 Polkörpern recht gering und daher nur begrenzt aussagekräftig.

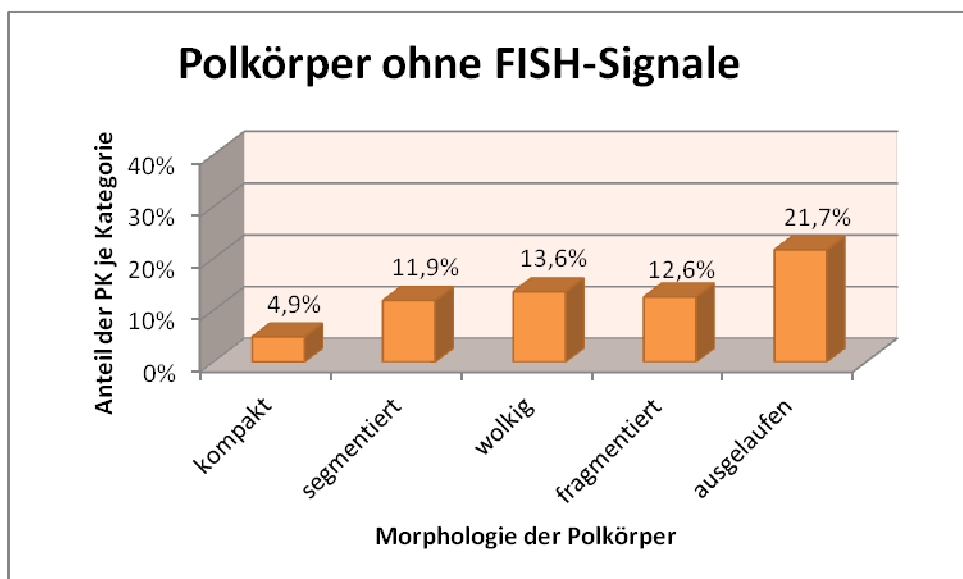


Abbildung 3.15 Morphologie der Polkörper bei fehlenden Signalen

Diese Abbildung veranschaulicht die Gruppe derjenigen Polkörper, die keine Signale bei der FISH zeigten (Hybridisierungseffizienzklasse 5). In dieser Kategorie machen die ausgelaufenen Polkörper den größten Anteil aus. Der Anteil der Polkörper ohne Signale steigt nahezu stetig mit dem Verlust der Zellintegrität.

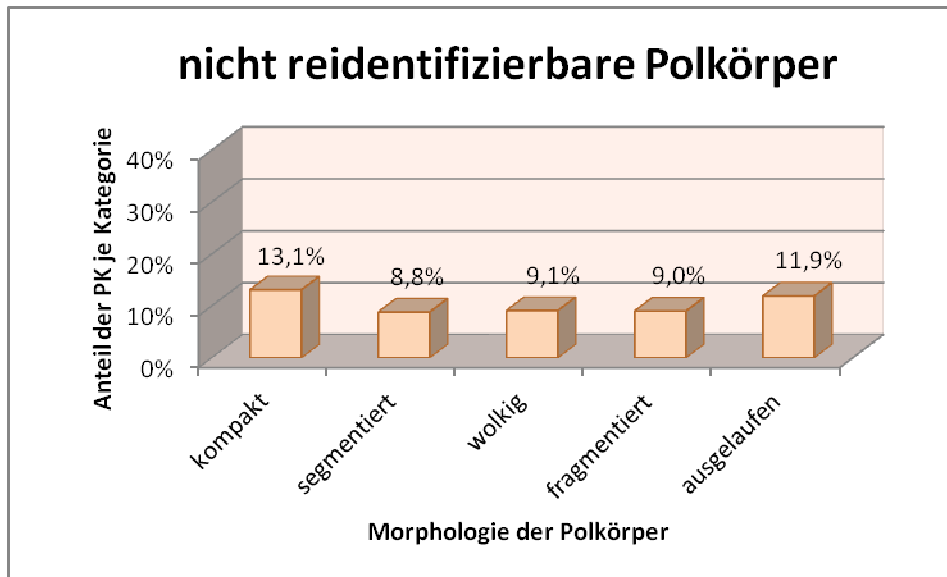


Abbildung 3.16 Morphologie der nicht reidentifizierbaren Polkörper

Die Verteilung der Polkörper, welche nach der Hybridisierung nicht mehr reidentifiziert werden konnten, ist über alle Morphologiegruppen ähnlich. Dies unterstreicht, dass der Verlust eines Polkörpers überwiegend durch menschliches Versagen bedingt und somit nicht von der Morphologie abhängig ist.

4. Diskussion

4.1. Einführung

Die Polkörperdiagnostik ist ein in Deutschland etabliertes Verfahren zur genetischen Beurteilung von Eizellen. Wir werteten die Daten aus sieben Jahren Polkörperdiagnostik im Zentrum für Polkörperdiagnostik in München aus. Eingeschlossen wurden 106 Behandlungszyklen mit 1190 extrahierten Polkörpern.

Das mittlere Alter der Patientinnen deren Eizellen entnommen wurden und eine Polkörperdiagnostik durchgeführt wurde, betrug in unserem Kollektiv 40,8 Jahre. Die Häufigkeit der Aneuploidien nimmt mit dem mütterlichen Alter zu und auch die Art der chromosomalen Fehlverteilungen steht damit in Zusammenhang (Pellestor et al. 2005). Deshalb ist es wichtig zum Vergleich der Daten möglichst ähnliche Kollektive heranzuziehen und zu beachten, dass variierende Faktoren die Aussagekraft und die Vergleichbarkeit mitunter limitieren können. Die im folgenden zitierten Untersuchungen über Aneuploidien bei Polkörpern konzentrieren sich aus diesen Gründen überwiegend auf Frauen mit einem fortgeschrittenen mütterlichen Alter. Beispielsweise lag bei einer großen Studie über Aneuploidiediagnostik von Polkörpern von Kuliev et al. das durchschnittliche Alter mit 38,5 Jahren auf vergleichbar hohem Niveau mit unseren Daten (Kuliev et al. 2003).

Für unsere Analyse wurden retrospektiv Daten von 1100 punktierten und 860 einer Intrazytoplasmatischen Spermieninjektion zugeführten Eizellen ausgewertet. 1190 Polkörper, 782 erste sowie 408 zweite, konnten zur weiteren Diagnostik entnommen werden. Insgesamt wurden 58,3% erste und 69,7% zweite aneuploide Polkörper detektiert und daraus ein Anteil von 75,9% auffälliger oder zumindest nicht sicher unauffälliger Eizellen ermittelt. In einer Übersichtsarbeit von Pellestor et al. über die Auswirkungen des mütterlichen Alters auf die Chromosomenzusammensetzung der Eizelle werden durchschnittliche Aneuploidieraten von 17-69% angegeben. Die breite Spanne wird unter anderem auf die Auswahl und Qualität der Oozyten und die damit möglicherweise verbundenen methodischen Probleme zurückgeführt. Darüber hinaus wurde bei diesen Angaben das Alter der Frauen nicht berücksichtigt. Bei Betrachtung der Daten von Patientinnen in fortgeschrittenem Alter über 34 Jahren ergibt sich eine deutlich höhere Aneuploidierate mit Angaben von 32-52% (Verlinsky et al. 1996b; Verlinsky et al. 1997; Verlinsky et al. 1999; Kuliev et al. 2003; Pellestor et al. 2005). Die in unseren Daten erhobene Aneuploidierate der Eizellen liegt mit maximal 75,9% über den altersangepassten Daten wie oben beschrieben. Dies könnte an dem erhöhten

durchschnittlichen, sowie auch absoluten Alter der Patientinnen in unseren Daten liegen. Insgesamt 12 Patientinnen waren sogar älter als 45 Jahre. Pellestor et al. beschrieb in einer weiteren Studie, dass bei Frauen zwischen 35 und 41 Jahren die Aneuploidierate bei 36% liegt und bei Frauen zwischen 42 und 46 Jahren sogar 50-100% beträgt (Rosenbusch 2004a). In einer Studie von Fragouli et al. wurden bei gleichem Durchschnittsalter von 40,8 Jahren wie bei unserem Patientinnenkollektiv eine Aneuploidierate von 70% beschrieben (Fragouli et al. 2011b).

Bei etwa einem Fünftel der Behandlungszyklen konnte kein Embryonentransfer durchgeführt werden, da entweder lediglich aneuploide oder nicht vitale Eizellen vorhanden waren. Ohne eine vorherige genetische Diagnostik wären zumindest die vitalen aber aneuploiden Eizellen kultiviert und die Embryonen in den Uterus transferiert worden. Durch das Aussortieren der aberranten Zellen konnte ein fast sicheres Implantationsversagen oder ein Abort verhindert und damit eine zusätzliche psychische Belastung der Frau durch falsche Hoffnungen vermieden werden (Montag et al. 2009c).

4.2. Chromosomale Aneuploidien bei Polkörpern

4.2.1. Häufigkeit und Art der Aneuploidien

In unseren Daten überwogen die Fehler des zweiten Polkörpers im Vergleich zum ersten. Genauer waren 58,3% der ersten und 69,7% der zweiten Polkörper bezüglich mindestens eines der untersuchten Chromosomen auffällig. Hingegen wurde beispielsweise bei Magli et al. eine entgegengesetzte Beziehung mit 58% fehlerhaften ersten und nur 42% auffälligen zweiten Polkörpern beobachtet (Magli et al. 2012). Auch bei Kuliev et al. wurden ähnliche Verhältnisse bei niedrigeren Gesamtwerten mit 41,9% fehlerhaften ersten und 37,3% aneuploiden zweiten Polkörpern beschrieben (Kuliev et al. 2004). Bei Fragouli et al. hingegen, bei deren Studie das Durchschnittsalter der Patientinnen im Vergleich zu unseren Daten übereinstimmt, überwogen ähnlich wie bei unseren Daten die Aneuploidien des zweiten Polkörpers (Fragouli et al. 2011b). Die Ursache der variierenden Angaben über die Häufigkeit der Aneuploidien in erster sowie zweiter meiotischer Teilung ist nicht gänzlich geklärt. Es ist allerdings von Fragouli et al. eine Verschiebung des Verhältnisses der Fehlerverteilung beschrieben. Mit zunehmendem Alter nahm der Anteil der Aneuploidien in der zweiten meiotischen Teilung in Relation zur ersten zu. Bei Frauen ≤ 37 Jahren bestand demnach ein Verhältnis von Fehlern der Meiose I zu Meiose II von 26% zu 29%, bei Frauen ≥ 42 Jahren betrug dies 44% zu 73%. Es wurde von der Arbeitsgruppe postuliert, dass die zweite meiotische Teilung anfälliger für altersbedingte Effekte sei. Demnach ist eine Untersuchung des zweiten Polkörpers gerade in höherem mütterlichem Alter von großer Bedeutung (Fragouli et al. 2011b).

In den letzten Jahren fand ein Umdenken in den Erklärungsversuchen zur Entstehung von Aneuploidien im Alter statt. Man löste sich nach und nach von der Theorie der wahren Non-disjunction, die von einer Fehlverteilung ganzer Chromosomen in der ersten meiotischen Teilung ausgeht, hin zur Theorie der vorzeitigen Trennung der Schwesterchromatiden. Zunächst wurde die vorzeitige Chromatidsegregation als Artefakt biologisch minderwertiger Zellen abgetan, doch im Laufe der Zeit kamen unterschiedlich designte Studien, die einen Confounder unwahrscheinlich machten, immer wieder auf dieselben Ergebnisse (Rosenbusch 2004a; Gabriel et al. 2011; Jessberger 2012). In einer aktuellen Studien von Magli et al. wurden Aneuploidien beim ersten Polkörper durch eine vorzeitige Chromatidsegregation mit einer Häufigkeit von 89% beziffert. Lediglich 11% der Fehler entstanden durch die klassische Non-disjunction (Magli et al. 2012).

Bei einer fehlerhaften Meiose I mit vorzeitiger Chromatidsegregation verbleibt in der Eizelle nach der Meiose II ein zusätzliches Chromatid. Daraus resultiert ein hypoploider erster Polkörper. Beim zweiten Polkörper birgt die Meiose II dann eine erhöhte Fehleranfälligkeit, da sich noch drei Chromatiden in der Eizelle befinden. Der zweite Polkörper kann nun entweder ein Signal tragen und als normal befunden werden oder zwei Signale aufzeigen und sich hyperploide darstellen. Dieses Phänomen spiegelt sich in unseren Daten häufig wider. Der erste Polkörper präsentierte überwiegend zu wenige FISH-Signale und wurde daher als hypoploid bezeichnet. Der zweite Polkörper hingegen zeigte deutlich häufiger zu viele FISH-Signale und wurde damit hyperploide gewertet. Die Ursache der Hypoploidie des ersten Polkörpers ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass das überzählige genetische Material nicht zufällig auf die Zellen aufgeteilt wird, sondern eine Tendenz dazu hat, in der Eizelle zu verbleiben (Kuliev et al. 2005a). Dies erklärt auch das Überwiegen der Trisomien im Abortmaterial im Vergleich zu Monosomien. Diese Ergebnisse waren bei vielen Studien zu beobachten (Angell et al. 1993; Verlinsky et al. 1997; Hassold et al. 2001; Pellestor et al. 2002; Pellestor et al. 2003; Eckel et al. 2004; Kuliev et al. 2005a; Montag et al. 2009c).

In unseren Daten fand sich überwiegend eine Hyperploide der zweiten Polkörper. Neben einer möglichen Korrektur, der in der ersten meiotischen Teilung aufgetretenen Aneuploidien, sind auch „Folgefehler“ möglich. Bei einer überzähligen Anzahl an genetischem Material in der Eizelle, nach fehlerhafter Meiose I, ist die theoretische Wahrscheinlichkeit für hyperploide zweite Polkörper erhöht. Bezüglich der Aneuploidien des zweiten Polkörpers wird ein unterschiedlicher Entstehungsmechanismus vermutet und im Gegensatz zur Tendenz bei der Meiose I eine zufällige Fehlverteilung der Chromosomen bzw. Chromatide in Meiose II beschrieben (Kuliev et al. 2004).

Diese Mechanismen könnten theoretisch die höhere Rate an Aneuploidien beim zweiten im Vergleich zum ersten Polkörper erklären.

4.2.2. Zusammenhang zwischen der Polkörper-Morphologie und der Chromosomenzusammensetzung

Im Vordergrund der Datenauswertung stand außerdem, die Zusammenhänge zwischen der Morphologie der Polkörper und ihrer Chromosomenkonstellation zu eruieren.

Unabhängig von der Methode zur Darstellung der Chromosomen in den Polkörpern besitzt jedes einzelne Verfahren gewisse Grenzen, ein Fehldeutungsrisiko, sowie die Möglichkeit

eines technischen Fehlers ohne nachfolgende Auswertbarkeit. Es liegt der Wunsch nahe, ein davon unabhängiges Charakteristikum der Polkörper, der Eizelle oder des Embryos zu finden, welches eine Aussage über den genetischen Gehalt, bei Versagen der Chromosomendarstellung, bietet.

Ein häufig verwendetes Merkmal, welches leicht zu bestimmen und relativ gut objektivierbar ist, stellt die Morphologie der Zelle(n) dar. Deshalb gab es in der Vergangenheit eine Reihe von Bemühungen auf diesem Gebiet. Die Spanne reichte von der Klassifikation von Polkörpern über Eizell-Scoring bis hin zur morphologischen Bewertung embryonaler Zellen (Xia 1997; Ebner et al. 1999; Ebner et al. 2000; Ebner et al. 2002; Ciotti et al. 2004; Fancsovits et al. 2005; Munne 2006; Senn et al. 2006; Gianaroli et al. 2007; Maille et al. 2009; Montag et al. 2009a; Navarro et al. 2009; Ebner et al. 2011).

Für unsere Datenanalyse wurden die Polkörper nach ihrer Entnahme anhand ihrer Morphologie kategorisiert und auf mögliche Zusammenhänge zur chromosomalen Zusammensetzung hin untersucht. Es zeigte sich, dass sich die zweiten Polkörper mit einem Anteil von 44,6% deutlich häufiger kompakt darstellten als die ersten. Die ersten Polkörper waren im Vergleich dazu mit einem Anteil von 31,6% morphologisch kompakt. Dazu konkordant präsentierte sich der erste Polkörper wiederum öfter ausgelaufen als der zweite.

Dies ist möglicherweise auf die große Zeitspanne des Stillstandes im Zellzyklus der Oozyte zurückzuführen die unter Umständen mehrere Jahrzehnte betragen kann. Es liegt die Vermutung nahe, dass der erste Polkörper, der früher als der zweite Polkörper entsteht, beim Altern seine Integrität verliert. Die zweiten Polkörper entwickeln sich dagegen erst nach Eindringen eines Spermiums und werden zur Polkörperdiagnostik wenige Zeit nach ihrer Entstehung extrahiert. Die Zelle könnte sich daher vitaler präsentieren und dadurch eine bessere Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ermöglichen (siehe 4.4.3).

Die Ergebnisse der Studien über den Zusammenhang von morphologischen Gesichtspunkten und der Chromosomenzusammensetzung sind kontrovers. Younis et al. konnten aus ihren Daten eine positive Korrelation zwischen der Morphologie des ersten Polkörpers und der Implantations- bzw. Schwangerschaftsrate nachweisen. Ein Zusammenhang zur Embryonenqualität gelang nicht. Ebner et al. fanden ebenfalls Hinweise auf den Einfluss der Polkörper-Morphologie auf den Implantationserfolg, Verlinsky et al. widerlegten in einer groß angelegten prospektiven Studie wiederum einen signifikanten Einfluss auf den Implantationserfolg. Fancsovits et al. postulierten einen Einfluss der Polkörpermorphologie auf die Embryonenqualität und schrieben Oozyten, die einen

fragmentierten ersten Polkörper besaßen ein höheres Entwicklungspotenzial zu. Eine Korrelation zur chromosomalen Zusammensetzung erfolgte hierbei nicht. Verlinsky et al. führten darüber hinaus auch eine genetische Testung der Polkörper auf Aneuploidien durch und korrelierten diese mit der Morphologie (Ebner et al. 2000; Verlinsky et al. 2003; Fancsovits et al. 2006; Younis et al. 2009).

In Einklang mit den Daten von Verlinsky et al. ließen auch unsere Daten keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Polkörper-Morphologie und dem Chromosomensatz erkennen (Verlinsky et al. 2003). Die Polkörper wiesen zwar eine variierende Integrität auf, welche die Auswertbarkeit negativ beeinflusste. Allerdings kann man durch die morphologische Begutachtung keine direkten Rückschlüsse auf den chromosomalen Inhalt gewinnen. Ein solcher Zusammenhang hätte bei FISH-Versagen oder Polkörperverlust durch Beurteilung der Morphologie eine - wenn auch eingeschränkte - Aussage über die Genetik ohne direkte Chromosomenuntersuchung erlaubt.

4.2.3. Genetische Zusammensetzung der Polkörper – Häufigkeit einzelner Aneuploidien

Des Weiteren wurden der genetische Gehalt der Polkörper anhand der untersuchten Chromosomen 13, 16, 18, 21, 22 näher spezifiziert. Hier kamen wir einerseits zu den bereits dargestellten Ergebnissen zur Hypo- bzw. Hyperploidie der Polkörper (siehe 4.2.1).

Zum anderen wurde ein Augenmerk auf die Häufigkeit der einzelnen Chromosomenaberrationen gelegt. Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden die Polkörper auf Aberrationen der Chromosomen 13, 16, 18, 21 und 22 hin untersucht.

In unseren Ergebnissen zeigte sich neben der oben bereits erwähnten Tendenz zur Hypoploidie der ersten, sowie Hyperploidie der zweiten Polkörper, eine unterschiedliche Aneuploidierate der verschiedenen getesteten Chromosomen. Das sowohl im ersten als auch im zweiten Polkörper am häufigsten aberrante Chromosom war Nummer 13. Die klinische Manifestation dieser singulären Trisomie 13 entspricht dem Patau-Syndrom. Dieses tritt mit einer Häufigkeit von etwa 1:5000 auf und stellt damit die dritthäufigste Chromosomenaberration bei Lebendgeburten dar (Duarte et al. 2004). Die meisten euploiden FISH-Signale waren für Chromosom 18 zu finden. Diese Chromosomenstörung wird bei alleinigem Auftreten als Edwards-Syndrom bezeichnet und stellt nach der Trisomie 21 die zweithäufigste chromosomale Aberration bei Lebendgeburten dar (Carey 2012). Die Entstehung der Trisomie 18 wird auf eine Non-disjunction in der Meiose II zurückgeführt

(Pellestor et al. 2005). Theoretisch müsste sich also ein hypoploider zweiter Polkörper darstellen. Dies spiegeln unsere Daten nicht wider. Wie bei allen zweiten Polkörpern der untersuchten Chromosomen waren diese überwiegend hyperploid. Die übrigen untersuchten Chromosomen wiesen abhängig von der Betrachtung des ersten oder zweiten Polkörpers eine variierende Aneuploidierate auf, die in ihrer Häufigkeit zwischen den Erwähnten lagen.

Diese Daten erscheinen zunächst widersprüchlich zu den oben genannten Häufigkeitsangaben bei Lebendgeburten. Jedoch ist der Zeitpunkt des Vergleichs von entscheidender Bedeutung und eine Korrelation der Daten nur bei ähnlichen Entwicklungsstufen sinnvoll. So unterscheidet sich die Art der Aneuploidien bei Polkörpern, Blastomeren, Spontanaborten und Lebendgeburten (Eckel et al. 2004; Kuliev et al. 2004). Diese Beobachtung wird vor allem mit der variierenden Überlebensfähigkeit der Chromosomenstörungen in Verbindung gebracht.

Aufgrund der steigenden Anzahl älterer Mütter, nimmt auch die Häufigkeit von Trisomien zu, da diese mit dem mütterlichen Alter korrelieren (Strauss et al. 2013). Allerdings blieb, einer großen Studie zufolge, die Prävalenz der untersuchten Trisomien 13, 18 und 21 über die letzten Jahre im europäischen Raum relativ konstant, da auch die Möglichkeiten der Pränataldiagnostik mit folgendem Abbruch gestiegen sind (Loane et al. 2013).

4.3. Altersabhängige Veränderungen der Polkörper

4.3.1. Zusammenhang zwischen dem mütterlichen Alter und der Chromosomenzusammensetzung

Des Weiteren wurde ein besonderes Augenmerk auf die Zusammenhänge der Polkörpergenetik mit dem Alter der Patientinnen gelegt. Im Gegensatz zum Einfluss der Polkörper-Morphologie auf den Chromosomensatz ist der Alterseffekt unumstritten. Es besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter der Patientinnen und der chromosomalen Zusammensetzung der Polkörper. Mit steigendem mütterlichem Alter, besonders ab 35 Jahren, nimmt der Anteil an Aneuploidien drastisch zu (Verlinsky et al. 1995; Montag et al. 2009c). Die eindeutige Korrelation von Fehlern, die in Polkörpern detektiert werden, mit denen in Oozyten wurde durch Magli et al. demonstriert (Magli et al. 2012).

Auch wir konnten einen eindeutigen Zusammenhang des mütterlichen Alters auf die Chromosomenzusammensetzung der Polkörper und damit der korrespondierenden Eizelle nachweisen. So fiel der Anteil unauffälliger Polkörper mit dem Alter deutlich ab. Der Prozentsatz auffälliger Polkörper nahm dagegen dementsprechend zu. Übereinstimmend mit der wissenschaftlichen Erkenntnis wiesen die Polkörper mit steigendem mütterlichem Alter einen zunehmend auffälligen genetischen Gehalt auf.

Aufgrund der großen Bedeutung der altersabhängigen chromosomalen Veränderungen der weiblichen Keimzellen, gerade in Anbetracht der alternden Bevölkerung in der immer mehr Frauen erst in fortgeschrittenem Alter die Familienplanung beginnen, befassen sich unzählige Studien mit diesem Thema. Die Untersuchungen auf diesem Gebiet zeigten, dass die Genese der Aneuploidien auf verschiedenen Mechanismen, wie der vorzeitigen Chromatidsegregation beruhen und unterschiedliche Faktoren, wie Umwelteinwirkungen weiteren Einfluss auf die Entstehung der Chromosomenaberrationen haben können. Der mütterliche Alterseffekt ist also bei Weitem nicht einfach erklärbar, sondern ein kompliziertes Zusammenspiel von endogenen und exogenen Ursachen (Review von Nagaoka et al. 2012).

4.3.2. Altersabhängige Veränderungen der Polkörpermorphologie

Bei der Betrachtung der altersabhängigen Veränderungen der Polkörpermorphologie konnte in unseren Daten ein tendenzieller Zusammenhang dieser Variablen hergestellt werden. Die Auswertung unserer Daten zeigte einen Trend zur altersabhängigen Veränderung der

Polkörpermorphologie. Je höher das Alter der Frauen, desto weniger integer stellten sich auch deren Polkörper dar. Junge Patientinnen wiesen eher einen größeren Anteil kompakter Polkörper auf, mit steigendem Alter der Patientinnen präsentieren sich die Polkörper vermehrt ausgelaufen.

Diese morphologische Veränderung geht mit einer schlechteren Auswertbarkeit mittels FISH einher (siehe 4.4.3). In unseren Daten ist diese morphologische Veränderung nicht durch die chromosomale Zusammensetzung erklärbar. Möglicherweise kann die allmähliche Degeneration der Polkörper durch Alterung der Zellstrukturen erklärt werden. Die Eizelle befindet sich von der Geburt bis zur Ovulation, die unter Umständen Jahrzehnte später stattfindet, im Arrest und ist biologischen und Umwelteinflüssen ausgesetzt (Hassold et al. 2001; Nagaoka et al. 2012).

4.4. Hybridisierungseffizienz

4.4.1. Hybridisierungseffizienz im Allgemeinen

Seit der Einführung der Polkörperdiagnostik durch Verlinsky et al. im Jahre 1990 wurden verschiedene Ansätze getestet, um die Effizienz der Polkörperanalyse zu steigern und möglichst verlässliche Ergebnisse zu erzielen. Neben verschiedenen Verfahren zur Eröffnung der Zona pellucida stellt vor allem die Art und Weise der Chromosomendiagnostik einen entscheidenden Faktor der Beurteilbarkeit von Chromosomen dar (Dawson et al. 2006).

Die meisten Erfahrungen wurden mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung gemacht. Sie ist das am häufigsten angewandte Verfahren auf dem Gebiet der Polkörper-Aneuploidie- und Translokationsdiagnostik, seit ihrer Einführung bis heute. Für die Entscheidung, ob eine Eizelle euploid ist und sie transferiert werden soll, ist eine effiziente FISH-Diagnostik von grundlegender Bedeutung. Deshalb untersuchten wir verschiedene Faktoren und deren Auswirkung auf die Beurteilbarkeit der Polkörper mittels FISH, die sogenannte Hybridisierungseffizienz.

Die Hybridisierungseffizienz der Polkörper aus unserer Datensammlung war mit Ergebnissen aus ähnlichen Untersuchungen vergleichbar. In großen Polkörperstudien, unter anderem von Verlinsky et al., wurde eine Auswertbarkeit von Polkörpern durch FISH in durchschnittlich 80% der Fälle beschrieben (Verlinsky et al. 1996a; Verlinsky et al. 1996b; Verlinsky et al. 1997; Kuliev et al. 2003; Vialard et al. 2006). Diese Angaben decken sich mit unseren Erfahrungen. In unseren Daten konnte in knapp 80% der Fälle, bei denen eine FISH-Auswertung durchgeführt wurde, ein Teil der getesteten Chromosomen der Polkörper ausgewertet, in 70% sogar alle fünf untersuchten Chromosomen beurteilt werden. Haaf et al. beschrieben in ihren Untersuchungen, dass etwa 60-70% der von ihnen getesteten Polkörper eine Beurteilung aller fünf Chromosomen mittels FISH zuließen (Haaf et al. 2010). Unsere Daten lagen im Vergleich dazu mit 70% perfekter Hybridisierungseffizienz auf hohem Niveau.

Die Häufigkeit eines Ausfalls einer FISH-Sonde, der sogenannte FISH-Drop-out, wird mit 2-3% pro untersuchtem Chromosom beziffert. Hierbei wird ein Chromosom trotz dessen Existenz nicht durch FISH sichtbar gemacht (Dechend 2009). Rechnerisch wäre demnach mit 10-15% falsch negativen Ergebnissen bei fünf untersuchten Chromosomen zu rechnen.

Da die Auswertung der FISH-Ergebnisse nicht maschinell durchgeführt wird, muss unabhängig von der Hybridisierungseffizienz und der Morphologie von einer Fehlinterpretationsrate, aufgrund von menschlichem Versagen, von etwa 6% ausgegangen werden (Montag et al. 2002b; van der Ven et al. 2004). Bei Betrachtung der Polkörper, die nach der Hybridisierung nicht mehr reidentifiziert werden konnten und daher keine Auswertung zuließen, wird der mögliche menschliche Einfluss auf die Ergebnisse deutlich. Die Verteilung der verlorenen Polkörper in unseren Untersuchungen ist über alle Morphologiegruppen ähnlich, was eine Abhängigkeit der Morphologie auf die Methodik, die zum Verlust des Polkörpers führt, unwahrscheinlich macht.

4.4.2. Hybridisierungseffizienz und Hybridisierungszeit

Da das Embryonenschutzgesetz vor Lockerung der Gesetzeslage im Jahr 2011 nur einen sehr engen Zeitrahmen für die Diagnostik zugestand (ESchG 1990), wurde viel Energie darauf verwendet, die einzelnen Schritte der Polkörperdiagnostik zeitlich effizienter zu gestalten. Dadurch entstand die Möglichkeit, bei Bedarf eine zweite Hybridisierungsrunde mit weiteren Chromosomen anzuschließen und so zusätzliche Informationen über die Chromosomenzusammensetzung der korrespondierenden Eizelle zu erhalten.

In der Literatur konnten lediglich grobe Angaben zur empfohlenen Hybridisierungszeit, bei dem von uns verwendeten Fluoreszenz-Kit, gefunden werden. Demnach sollte die Hybridisierungsdauer zwischen vier und acht Stunden liegen (van der Ven et al. 2002). Wir fanden aber keine Daten, welche die Effektivität der Hybridisierung in Abhängigkeit von der Dauer innerhalb dieser Zeitspanne untersuchten. Daher variierten wir die Hybridisierungszeit, um zu evaluieren, wie eine veränderte Hybridisierungsdauer die anschließende Beurteilbarkeit der Chromosomensignale beeinflusst. Es wurden hierzu zwei Gruppen gebildet und die Hybridisierungseffizienz dieser miteinander verglichen. Wir haben gezeigt, dass es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen einer langen und einer kürzeren Hybridisierungszeit gibt. Damit erscheint es möglich, die Dauer der FISH möglichst kurz zu halten und bei Bedarf eine weitere Hybridisierungsrunde auch in der engen zulässigen Zeitspanne des ESchG zu ermöglichen. Diese Aussage gilt mit Einschränkung auf die perfekt hybridisierten Polkörper, da die übrigen Kategorien aufgrund der geringen Fallzahlen nicht aussagekräftig genug waren. Im Prinzip sind diese Gruppen auch vernachlässigbar, da eine perfekte Hybridisierung angestrebt wird und die Faktoren hierfür gemessen werden sollten.

4.4.3. Hybridisierungseffizienz und Morphologie der Polkörper

In vorangegangenen Kapiteln wurde bereits auf die Zusammenhänge zwischen der Morphologie und dem Chromosomensatz eingegangen. Nun soll die Beziehung der Polkörpermorphologie zu der Hybridisierungseffizienz diskutiert werden.

Mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Polkörpern gibt es gerade um Verlinsky et al. groß angelegte Studien (Verlinsky et al. 1996a; Verlinsky et al. 2001). In der bisherigen Literatur wurden vor allem die Art und Weise sowie Häufigkeit der Chromosomenfehlverteilungen betrachtet. Auch eine mögliche Korrelation der Morphologie mit der Implantations-, Schwangerschaftsrate oder generell der Chromosomenzusammensetzung wurde untersucht (siehe 4.2.2). Daten über den Zusammenhang der Hybridisierungseffizienz mittels FISH und der Morphologie der Polkörper fehlen nach unserer Recherche. Wir legten einen weiteren Schwerpunkt unserer Untersuchungen auf die Einflussfaktoren der Morphologie der Polkörper auf die Hybridisierungseffizienz. Um ein möglichst zuverlässiges Ergebnis durch die Hybridisierung zu erhalten, sollten alle beeinflussbaren Faktoren optimiert werden. Zunächst wurde deshalb ein genereller Einfluss der Polkörpermorphologie untersucht.

Hier zeigte sich in unseren Daten ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Integrität der Polkörper und der Güte der Hybridisierung. Polkörper, die sich kompakt, rundlich und integer darstellten, präsentierten ein deutlich besseres Hybridisierungsverhalten als ausgelaufene. Dies führte zu einer eindeutig besseren Auswertbarkeit im Vergleich zu ausgelaufenen Polkörpern.

Da optimalerweise alle untersuchten Chromosomen auswertbar sein sollen, wurden die Daten nochmals von diesem Standpunkt aus untersucht. Bei Betrachtung dieses Idealfalls, einer Beurteilbarkeit von allen untersuchten Chromosomen, ist der Effekt besonders deutlich nachvollziehbar. Die Effizienz der Hybridisierung nahm hier kontinuierlich mit zunehmendem Verlust der Polkörperintegrität ab. Bei rund 76% der kompakten Polkörper konnten alle fünf Chromosomen beurteilt werden, hingegen war dies aber nur bei 57% der ausgelaufenen möglich. Ursächlich hierfür ist am wahrscheinlichsten eine Degeneration der Zellstrukturen im Polkörper, die nicht nur äußerlich durch Verlust der Integrität sichtbar wird, sondern sich auch auf chromosomaler Ebene abspielt. Dadurch ist eine Hybridisierung durch die Sonden methodisch erschwert oder sogar unmöglich und es resultiert eine Einbuße der Auswertbarkeit, da das Gelingen der Hybridisierung von intakten Zellstrukturen maßgeblich abhängt.

Diese These wird nochmals bei Betrachtung der Polkörper, die keinerlei Hybridisierung zuließen, bestärkt. Je aufgelöster und weniger integer sich die Polkörper darstellten, desto häufiger war keinerlei Hybridisierung möglich. Hier waren in unseren Daten mehr als viermal so viele Polkörper ausgelaufen als kompakt. Auch die Daten der schlecht hybridisierbaren Polkörper sind demnach von klinischer Relevanz, da die Faktoren die zu einer mangelnden Auswertbarkeit führten, wenn möglich vermieden werden sollten.

Mit den Erkenntnissen aus diesen Ergebnissen sollte in Zukunft eine Gewinnung von möglichst kompakten Polkörpern angestrebt werden.

4.5. Mögliche Alternativen

4.5.1. FISH - Vergleichende Genomhybridisierung

Die Einschränkungen und Risiken, die bei der Anwendung bei FISH im Rahmen der Polkörperdiagnostik bestehen, haben in den letzten Jahren zu Bestrebungen geführt, neue Methoden zur Chromosomendiagnostik zu entwickeln. Einer der größten Nachteile der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bei Polkörpern, die immer wieder im Zentrum der Kritik steht, ist die begrenzte Anzahl an untersuchbaren Chromosomen pro Hybridisierungsrunde (Landwehr et al. 2008; Colls et al. 2009; Geraedts et al. 2010). Die bei der FISH-Analyse untersuchten Chromosomen sind zwar die am häufigsten in Aborten gefundenen, allerdings ist es möglich, dass andere Chromosomen für Frühaborte und Implantationsversagen verantwortlich sind. Daher ist eine erweiterte Diagnostik erstrebenswert, die eine umfassendere Chromosomenanalyse, idealerweise aller Chromosomen erlaubt. Die vergleichende Genomhybridisierung (comparative genome hybridization - CGH-Technologie) ist eine Alternative, in die große Hoffnungen gesetzt und die diesen Ansprüchen gerecht werden kann. Bei dieser Methode kann der komplette Chromosomensatz untersucht werden. Sie basiert auf einem Vergleich der zu untersuchenden DNA des Polkörpers mit einer Referenz-DNA. Mithilfe dieser Technik können Verluste sowie Zugewinne an genetischem Material sichtbar gemacht werden. Erste Erfahrungen zeigen bereits, dass viele Aneuploidien, die mittels CGH detektiert werden, bei einer FISH-Analyse unerkannt geblieben wären (Gutierrez-Mateo et al. 2004; Pellestor et al. 2005; Fragouli et al. 2010; Geraedts et al. 2011). Einschränkungen bestehen auch bei dieser Methode, u.a. sind balancierte Translokationen mit der CGH bisher nicht zu detektieren (Buchholz et al. 2006; Basille et al. 2009). Die CGH hat gegenüber der FISH Analyse den weiteren Vorteil, dass für die CGH keine Objektträgerfixierung der Polkörper nötig ist. Dadurch wird auch das Risiko des Polkörperverlustes bzw. Beschädigung mit Verlust von Genmaterial oder die folgende Nicht-Beurteilbarkeit verringert und die diagnostische Sicherheit wächst (Fragouli et al. 2010).

Bislang lagen die größten Probleme der CGH im hohen finanziellen und zeitlichen Aufwand, sowie in der Fehleranfälligkeit der Diagnostik. Zum einen muss die DNA vor Hybridisierung mittels PCR amplifiziert werden, was bei einer einzelnen Zelle als Material störanfällig für mögliche Verunreinigungen ist. Zum anderen ist für die CGH an Metaphasen eine durchschnittliche Zeit von drei Tagen für die Untersuchung veranschlagt. Für eine Einzelzellanalyse an Polkörpern oder Blastomeren ist dieser Zeitraum problematisch. Die Zellen müssten bis zum Abschluss der Diagnostik eingefroren werden, was wiederum eine

negative Auswirkung auf die spätere Überlebensfähigkeit und Implantationsrate der Embryos haben kann (Levrán et al. 1990; Gutierrez-Mateo et al. 2004; Thornhill et al. 2005). Verschiedene Arbeitsgruppen, beispielsweise Hu et al. (Hu et al. 2004) und Landwehr et al. (Landwehr et al. 2008), modifizierten die Methodik und ermöglichten durch eine array-CGH bzw. rapid CGH die Diagnostik an Einzelzellen in adäquater Zeit (Wieacker et al. 2003; Eckel et al. 2004; Montag et al. 2010). Erste Studien belegten bereits einen positiven Effekt auf die Implantationsrate bei Anwendung der CGH (Sher et al. 2009). Die Effektivität der CGH bei Polkörpern liegt sogar über den Raten der FISH (Geraedts et al. 2011).

Auch dem Ziel der Verringerung von IVF-bedingten Mehrlingsschwangerschaften und der Abortrate soll dadurch näher gekommen werden. Weitere Studien auf diesem Gebiet sind noch nötig, um den genauen Nutzen zu eruieren und mehr Erfahrung zu sammeln (Wilton et al. 2003; Pellestor et al. 2005; Buchholz et al. 2006; Sher et al. 2007; Basille et al. 2009).

4.5.2. Polkörperdiagnostik – Blastomer- und Trophektodermbiopsie

Auf dem Gebiet der Polkörperdiagnostik wurden bereits über 20 Jahre Erfahrungen gesammelt. Vor allem die Arbeitsgruppe um Verlinsky et al. etablierte die Analyse von Polkörpern, die sich von den Vereinigten Staaten ausgehend verbreitete. Obwohl die Präimplantationsdiagnostik in den meisten Staaten der USA nur wenig bis gar nicht eingeschränkt ist, sahen Verlinsky et al. in der Analyse von Polkörpern, trotz einiger Einschränkungen, die Zukunft (DRZE 2011). Es bieten sich jedoch auch alternative Untersuchungszeitpunkte für die Präimplantationsdiagnostik an. Insbesondere wurden zwei weitere Verfahren zu späteren Zeitpunkten der Embryogenese eingehender erforscht; die Biopsie an Blastomeren und die Trophektodermbiopsie an Blastozysten.

Ein entscheidender Vorteil der Polkörperdiagnostik ist die Annahme, dass Polkörper keine weitere Funktion für die Entwicklung des Embryos besitzen. Die Eizelle selbst bleibt unangetastet (Buchholz 2009). Bisher gilt besonders die Blastomerbiopsie in diesem Punkt als umstritten. Bei der Entnahme von 1-2 Zellen des Embryos im Acht-Zell-Stadium wird bis zu einem Viertel des Embryos für die genetische Diagnostik entfernt. Es liegt nahe, dass ein solch invasiver Eingriff das Entwicklungspotential des werdenden Menschen gefährdet (Mastenbroek et al. 2007; van der Ven et al. 2008b). Die Blastomerbiopsie ist aufgrund der gesetzlichen Regelungen im Ausland schon länger etabliert und es existieren einige Erfahrungen. Dennoch sind die Ergebnisse zum Nutzen dieser Diagnostik nach wie vor widersprüchlich. Randomisierte Studien konnten bisher noch keine gesteigerte Baby-take-home Rate zeigen. Die Europäische Gesellschaft für Reproduktion und Embryologie

(European Society for Human Reproduction and Embryology, ESHRE), die regelmäßig Daten zur Präimplantationsdiagnostik auswertet, rät in ihren Leitlinien von der Blastomerbiopsie ab, da so die Schwangerschaftsrate nicht verbessert werden kann (Gianaroli et al. 1999; Hassold et al. 2001; Munne et al. 2003; Ferraretti et al. 2004; Gutierrez-Mateo et al. 2004; Kuliev et al. 2005b; Harper et al. 2010a; Diedrich et al. 2011). In Deutschland werden zur Zeit die ersten Erfahrungen auf dem Gebiet der Trophektodermbiopsie gemacht. Auch im Ausland ist dieses Verfahren noch relativ wenig etabliert. Erste Studien belegen eine bessere Implantationsrate durch Trophektodermbiopsie (Basille et al. 2009; Schoolcraft et al. 2011).

Der Trend geht mittlerweile, aus den eben genannten Gründen, eindeutig weg von der Blastomerbiopsie. Stattdessen empfiehlt die ESHRE in ihren Leitlinien andere Zeitpunkte für eine genetische Diagnostik zu wählen. Explizit wird hier auf die Polkörperdiagnostik, sowie die Trophektodermbiopsie verwiesen (Harper et al. 2010b; Harton et al. 2011).

Darüber hinaus spricht das Argument, dass etwa 90% der Aneuploidien in der maternalen Meiose entstehen, für die Polkörperdiagnostik (Geraedts et al. 2010). Eine Untersuchung des paternalen Erbguts scheint nachrangig. Eine invasive Diagnostik an Blastozysten ist nur dann sinnvoll, wenn die genetische Fragestellung es erfordert, wie beispielsweise bei rezessiven monogenen Erkrankungen, sowie paternal vererbten Defekten. Bei einer der Hauptindikationen, der Aneuploidiediagnostik bei älteren Frauen, ist demnach die Aussage der Polkörperdiagnostik theoretisch vollkommen ausreichend (Montag et al. 2009c). Zudem bietet die Polkörperdiagnostik deutlich mehr Zeit bis zum Zeitpunkt des Embryonentransfers, der nicht beliebig weit nach hinten geschoben werden kann. Spätestens am sechsten Tag sollte der Embryo in den Uterus transferiert werden. Durch eine frühzeitige genetische Analyse an Polkörpern bleibt genügend Zeit für die aufwendige Diagnostik bis zum Embryonentransfer. Somit kann die Problematik rund um die Kryokonservierung der Eizelle umgangen werden. Bei der Trophektodermbiopsie an Tag 5 bis 6 herrscht in dieser Hinsicht ein enormer Zeitdruck und hohe Anforderungen an die Technik, da eine Wiederholung oder Bestätigungstests zeitlich nicht möglich sind.

Auf der anderen Seite bietet die Trophektodermbiopsie auch beträchtliche Vorteile. Zum einen werden nur Zellen untersucht, die sich bis zu diesem Zeitpunkt entwickelt haben (5. bis 6. Tag). Dies geht mit einer deutlichen Kostenersparnis einher. Eine aufwendige genetische Diagnostik an zahlreichen Polkörpern durchzuführen, deren Eizellen zum Teil degenerieren, ist wirtschaftlich nicht effektiv (Gutierrez-Mateo et al. 2004). Zum anderen können mit diesem

Verfahren, wie bereits mehrfach erwähnt, auch paternale Einflussfaktoren untersucht werden.

Die Trophektodermbiopsie bietet theoretisch einen weiteren Pluspunkt im Hinblick auf die diagnostische Sicherheit. Aus den äußeren Trophektodermzellen, aus denen sich die Plazenta entwickelt, können mehrere Zellen entnommen werden, ohne die innere Zellmasse, aus der sich der Embryo entwickelt, anzutasten (Basille et al. 2009). Durch die Verfügbarkeit mehrerer Zellen für die Diagnostik erhöht sich auch die Effizienz der Untersuchungsmethode im Vergleich zur Einzelzellanalyse wie bei der Polkörperdiagnostik. So war beispielsweise bei Fragouli et al. (Fragouli et al. 2011a) eine Beurteilung der Blastozyste durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Trophektodermzellen bei allen untersuchten Proben möglich. Um überhaupt eine Aussage über die genetische Zusammensetzung der Embryoblasten treffen zu können, ist es unabdingbare Voraussetzung, dass eine genetische Gleichheit der äußeren Trophektodermzellen und der inneren Embryoblasten besteht. Johnson et al. lieferte hierzu Daten, die auf eine gute Korrelation zwischen den Trophektodermzellen und Embryoblasten hinweisen. Eine genetische Diagnostik der Trophektodermzellen lässt somit einen Rückschluss auf den genetischen Gehalt des Embryos zu, ohne diesen selbst zu untersuchen. Allerdings bereitet das Phänomen des postzygotischen Mosaiks weiterhin Probleme (Johnson et al. 2010).

Untersuchungen zeigten, dass postzygotisch eine Vielzahl von Embryos sowohl aus euploiden als auch aneuploiden Zellen bestehen. Besonders häufig ist das Phänomen eines postzygotischen Mosaiks bei Blastomeren zu finden (Delhanty 2005; Geraedts et al. 2010; Harper et al. 2010a; Harton et al. 2010; Delhanty 2011). Das Auftreten eines chromosomalen Mosaiks nimmt zwar im Verlauf der frühen Embryogenese ab und ist im Blastozystenstadium nur noch selten, es kann aber dennoch zu Fehldiagnosen führen.

Eine Erklärung für die fallende Inzidenz eines chromosomalen Mosaiks liefert folgende Theorie: Chromosomale Fehlverteilungen treten vor allem zu Beginn der Embryogenese relativ häufig auf. Bis zu 60% der Embryos im Blastomerstadium haben mindestens eine chromosomal abweichende Zelle. Der Zellverband besitzt aber im Laufe der frühen Entwicklung die Möglichkeit der Detektion aneuploider Zellen und zu deren Selbstreparatur. Diese Theorie entstand bei der Untersuchung von Trophektodermzellen, die einen deutlich geringeren Anteil an Aneuploidien als noch die Blastomere zeigten (Kearns 2011; Mertzaniidou et al. 2013). Darüber hinaus besteht noch eine alternative Hypothese. In den frühen Schritten der Embryogenese wird die Problematik des chromosomalen Zellmosaiks demnach folgendermaßen gelöst: Neben den Möglichkeiten der Selbstreparatur

chromosomal auffälliger Zellen findet eine zusätzliche Selektion der aneuploiden Zellen statt, die dann das Trophektodermgewebe bzw. die spätere Plazenta bilden. Die genetisch unauffälligen Zellen formen die innere Zellmasse, den späteren Embryo (Fishel et al. 2010). Dieser Mechanismus wäre besonders problematisch hinsichtlich einer Präimplantationsdiagnostik an Trophektodermzellen. Größere Studien hierzu sollten folgen, um die genauen Mechanismen in der Embryogenese zu erforschen.

Außerdem liegt nicht nur die Rate an Aneuploidien, die im Blastomerstadium gefunden wurde, bedeutend höher als in späteren Spontanaborten. Auch die Art der Chromosomenfehlverteilung unterscheidet sich. Dies legt die Vermutung nahe, dass zwischen IVF und Einnistung eine negative Selektion hinsichtlich Anomalien bestimmter Chromosomen stattfindet, die später in Spontanaborten und Lebendgeburten nicht mehr auftauchen. Daher erscheint es besonders wichtig, eine möglichst komplette Untersuchung aller Chromosomen durchzuführen, da so möglicherweise auch die Implantationsrate erhöht werden kann. Mithilfe von FISH werden zur Zeit vor allem die Chromosomen untersucht, welche in Spontanaborten zu finden sind. Diejenigen Chromosomen, die bei Aberrationen eine Implantation verhindern, werden vernachlässigt, was zur Folge hat, dass es gar nicht erst zu einer Schwangerschaft kommt. Dadurch ändert sich zwar nicht die Anzahl der Aborte, die aufgrund der großen psychischen Belastung für die Paare niedrig gehalten werden muss. Allerdings ist oberstes Ziel der Präimplantationsdiagnostik das Herbeiführen einer Schwangerschaft mit Austragung eines gesunden Babys.

4.6. Ausblick

Die Präimplantationsdiagnostik ist ein sensibles und diffiziles Gebiet. Ein eindeutig bestes Verfahren gibt es derzeit nicht. Die Erfahrungen mit den dargestellten Methoden stehen zum Teil noch am Anfang. Es gibt zahlreiche kontroverse Diskussionspunkte, sowie großes Potential erweiterte Erkenntnisse über die frühe Embryonalentwicklung zu erlangen. Fest steht, dass die Präimplantationsdiagnostik in jedem Falle nur dann effektiv und ethisch vertretbar ist, wenn die Diagnostik in erfahrenen Zentren unter standardisierten Bedingungen erfolgt (Munne et al. 2007).

Neuere Studien konnten erste Erfolge durch Anwendung der Präimplantationsdiagnostik zeigen. Die Ergebnisse anderer Studien sind aber zum Teil widersprüchlich. Einige nicht-randomisierte Studien zeigten einen Anstieg der Implantationsrate, sowie eine Absenkung der Abortrate (Gianaroli et al. 1999; Munne et al. 2003; Ferraretti et al. 2004; Kuliev et al. 2005b; Basille et al. 2009; Schoolcraft et al. 2011). Andererseits kamen zwei randomisierte kontrollierte Studien, sowie eine nicht-randomisierte retrospektive Studie zu dem Ergebnis, dass die Anwendung der PID die Baby-take-home Rate nicht steigern könne (Staessen et al. 2004; Mastenbroek et al. 2007; Haaf et al. 2010). Es existiert nur eine kleine Zahl von randomisierten Studien mit Fokus auf die Effektivität bei Patientinnen mit erhöhtem mütterlichem Alter. Hierzu gehören Twisk et al. sowie Collins et al. (Twisk et al. 2006; Collins 2007). Diese konnten aber ebenfalls keinen positiven Effekt der Präimplantationsdiagnostik auf die Baby-take-home Rate nachweisen. Jedoch bleibt anzumerken, dass es sich hierbei fast ausschließlich um Untersuchungen mit Anwendung der Blastomerbiopsie handelt.

Die Ergebnisse sind allerdings bezüglich vieler verschiedener inhaltlicher Punkte kritisiert worden und von der ESHRE wurde keine klare Ablehnung der Präimplantationsdiagnostik formuliert. Die einzige Möglichkeit, die Debatte um den Nutzen und die Effektivität der PID endgültig zu klären, sei die Durchführung einer gründlich geplanten, gut strukturierten, randomisierten Studie (Basille et al. 2009; Harper et al. 2010a). Die Indikation sollte in allen Fällen streng gestellt werden. Da nicht alle Patientinnen gleichermaßen von der genetischen Untersuchung profitieren, ist eine entsprechende gründliche Auswahl notwendig.

Nach den ersten Versuchen der Eizell-Karyotypisierung in den siebziger Jahren konnten Mitte der neunziger Jahre wichtige Errungenschaften auf dem Gebiet der Chromosomenanalyse mit Hilfe molekulargenetischer Verfahren gemacht werden. Auch wenn die Polkörperdiagnostik durch FISH nicht immer das Optimum an diagnostischer Sicherheit und Effizienz darstellt, so waren doch die Erkenntnisse durch große Studien mit

Tausenden von Eizellen und Polkörpern ein enorm großer Schritt in die richtige Richtung. Es bleibt abzuwarten, was die Präimplantationsdiagnostik in den nächsten Jahren, mit immer neuen Techniken und verbesserten Methoden und nicht zuletzt nach Lockerung der Gesetzeslage in Deutschland, noch leisten kann.

Bei Kinderwunschaaren steht die Geburt eines gesunden Kindes letztlich im Vordergrund. Mehrlingsgeburten werden von den Patienten meist nicht negativ gesehen. Zieht man jedoch die medizinischen Risiken in Betracht, die bei Mehrlingsgeburten deutlich erhöht sind, so erscheint es logisch, dass es ein großes Ziel der Reproduktionsmedizin ist, die Mehrlingsrate zu senken. Diesem Ziel kann man mit einem Transfer von nur einem Embryo nach genauer und wenig fehleranfälliger Präimplantationsdiagnostik näher kommen.

Eine vielversprechende Zukunft bietet hier die array-CGH mit einer Untersuchung des gesamten Chromosomensatzes. Erste Ergebnisse einer proof-of-principle Studie zeigen die generelle Machbarkeit einer Polkörperanalyse mit Hilfe von array-CGH und legen den Schluss nahe, dass die Chromosomenzusammensetzung der Eizelle dadurch mit einer akzeptablen Genauigkeit vorausgesagt werden kann (Geraedts et al. 2011; Magli et al. 2011). Die array-CGH kann außerdem auch an Trophektodermzellen angewandt werden. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung hat viele Jahre gute Dienste in der Präimplantationsdiagnostik geleistet, doch scheint die Ablösung durch die beschriebene Chip-Technik in nicht allzu weiter Ferne.

Neben der Frage nach der besten Methode zur genetischen Untersuchung ist auch der ideale Durchführungszeitpunkt der Präimplantationsdiagnostik noch umstritten. Neben der Polkörperdiagnostik stellen die Blastomer- und die Trophektodermbiopsie mögliche Alternativen dar.

In den letzten Jahrzehnten konnten zwar enorme Fortschritte in der Wissenschaft gemacht werden, welche zum Verständnis von Chromosomenaberrationen beitragen. Nach wie vor sind allerdings die genauen molekularen und biochemischen Mechanismen, die zum Auftreten der Aneuploidien führen, nicht ausreichend verstanden (Nicolaidis et al. 1998; Hassold et al. 2001; Hassold et al. 2009; Jessberger 2012).

Trotz der zahlreichen Studien gibt es bislang nicht die erhoffte Allheilmethode. Ein Test, welcher mit einer hundertprozentigen Genauigkeit den Chromosomengehalt der Eizelle vorhersagen könnte, ist zwar wünschenswert, aber es gilt zu bedenken, dass selbst ein chromosomal unauffälliger Embryo keine Garantie für eine erfolgreiche Schwangerschaft

und ein gesundes Baby darstellt (Scriven et al. 2012). Inwiefern die Präimplantationsdiagnostik überhaupt eine Methode zur Effizienzsteigerung darstellen kann, ist nach wie vor umstritten (Montgomery et al. 2011).

5. Zusammenfassung

Die Polkörperdiagnostik ist ein reproduktionsgenetisches Verfahren zum indirekten Nachweis von strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen von Eizellen. Mit Hilfe der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung können einzelne Chromosomen in Polkörpern sichtbar gemacht werden. Die Analyse der genetischen Konstellation der Polkörper erlaubt eine indirekte Aussage über den Chromosomensatz der Eizelle, ohne das Entwicklungspotential des späteren Embryos zu gefährden. Die Polkörperdiagnostik hat zum Ziel, ungewollt kinderlosen Frauen, die bereits mehrere Fehlgeburten erlebt haben oder in einem fortgeschrittenen Alter sind, zu einer Schwangerschaft und einem gesunden Kind zu verhelfen.

Ziel der Arbeit war, die Effizienz der Polkörperdiagnostik zu analysieren und Zusammenhänge zwischen der Morphologie der Polkörper und Faktoren wie deren Chromosomenzusammensetzung oder deren Auswertbarkeit aufzudecken. Hierzu führten wir eine retrospektive Auswertung aus sieben Jahren Polkörperdiagnostik durch.

Unseren Untersuchungen zufolge wirkt sich eine Verkürzung der Hybridisierungszeit nicht negativ auf die Hybridisierungseffizienz aus. Dies ermöglicht eine zusätzliche Untersuchung von weiteren Chromosomen im vorgegebenen Zeitrahmen. Da ein gewisser Anteil der Polkörper auf Grund verschiedener technischer oder methodischer Probleme nicht durch FISH beurteilbar ist, haben wir einen möglichen Zusammenhang zwischen der Morphologie und der Chromosomenzusammensetzung untersucht, um auch bei FISH-Versagen oder Polkörperverlust eine Auswahl - wenn auch mit begrenzter Aussagekraft - treffen zu können. Dieser Zusammenhang hat sich in unserer Untersuchung nicht nachweisen lassen. Die in der Literatur häufig beschriebene Zunahme der Aneuploidierate mit ansteigendem Alter der Frau konnte in unseren Daten bestätigt werden. Darüber hinaus haben wir eine Veränderung der Polkörper-Morphologie mit dem Alter der Frau beobachtet, die zwar nicht direkt mit deren Chromosomensatz zusammenhängt, aber mit einer erschwerten Hybridisierung mit FISH korreliert.

Die Polkörperanalyse ist ein geeignetes Verfahren zur Präimplantationsdiagnostik, insbesondere auf Grund der Tatsachen, dass der Großteil der Aneuploidien auf mütterlicher Seite entstehen. Mit der bisherigen Standardmethode FISH zur Darstellung der Chromosomen konnten wir gute Ergebnisse erzielen: Trotz Einzelzellanalyse wiesen die Polkörper insgesamt eine gute Hybridisierungseffizienz auf. Gerade auf Grund des

schlechteren Hybridisierungsverhaltens der Polkörper älterer Frauen ist in Zukunft eine Ablösung der aufwendigen FISH denkbar, beispielsweise durch die array-CGH. Ein Verlassen der Polkörperdiagnostik hin zur Blastozysten- bzw. Trophektodermbiopsie ist zwar seit Kurzem unter strenger Indikationsstellung in Deutschland rechtlich zulässig, zum jetzigen Zeitpunkt aber umstritten. Groß angelegte Studien sollten hier noch einen eindeutigen Vorteil der Trophektodermbiopsie erbringen und die jetzigen Zweifel der Methode beseitigen.

6. Literaturverzeichnis

Angell R. R., Xian J. and Keith J. (1993):

"Chromosome anomalies in human oocytes in relation to age." Hum Reprod **8**(7): pp. 1047-1054.

Baird D. T., Collins J., Egozcue J., Evers L. H., Gianaroli L., Leridon H., Sunde A., Templeton A., Van Steirteghem A., Cohen J., Crosignani P. G., Devroey P., Diedrich K., Fauser B. C., Fraser L., Glasier A., Liebaers I., Mautone G., Penney G. and Tarlatzis B. (2005):

"Fertility and ageing." Hum Reprod Update **11**(3): pp. 261-276.

Basille C., Frydman R., El Aly A., Hesters L., Fanchin R., Tachdjian G., Steffann J., LeLorc'h M. and Achour-Frydman N. (2009):

"Preimplantation genetic diagnosis: state of the art." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **145**(1): pp. 9-13.

Bertram H., Bujard M. and Rösler W. (2011):

"Rush-hour des Lebens: Geburtenaufschub Einkommensverläufe und familienpolitische Perspektiven." Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie **8**(2): pp. 91-99.

Brinsden P. R. (2009):

"Thirty years of IVF: the legacy of Patrick Steptoe and Robert Edwards." Hum Fertil (Camb) **12**(3): pp. 137-143.

Buchholz T. (2009):

"Polkörperdiagnostik (PKD) - Pro." Reproduktionsmedizin und Endokrinologie **6**: pp. 13-14.

Buchholz T. and Clement-Sengewald A. (2004):

"Polkörperdiagnostik bei Translokationsträgerinnen." Medizinische Genetik **16**: pp. 416-421.

Buchholz T., Klehr-Martinelli M., Seifert B. and Bals-Pratsch M. (2009):

"Polar body analysis - current clinical practice and new developments for preimplantation genetic screening and diagnosis." J. Reproduktionsmed. Endokrinol **6** (1): pp. 32-34.

Buchholz T., Vogt U., Bals-Pratsch M. and Clement-Sengewald A. (2006):

"Polkörperdiagnostik in Deutschland - Erfahrungen und neue Entwicklungen." Reproduktionsmedizin und Endokrinologie **3** pp. 215-218.

Carey J. C. (2012):

"Perspectives on the care and management of infants with trisomy 18 and trisomy 13: striving for balance." Curr Opin Pediatr **24**(6): pp. 672-678.

Ciotti P. M., Notarangelo L., Morselli-Labate A. M., Felletti V., Porcu E. and Venturoli S. (2004):

"First polar body morphology before ICSI is not related to embryo quality or pregnancy rate." Hum Reprod **19**(10): pp. 2334-2339.

Clement-Sengewald A., Buchholz T. and Schutze K. (2000):

"Laser microdissection as a new approach to prefertilization genetic diagnosis." Pathobiology **68**(4-5): pp. 232-236.

Collins J. A. (2007):

"Preimplantation genetic screening in older mothers." N Engl J Med **357**(1): pp. 61-63.

Colls P., Goodall N., Zheng X. and Munne S. (2009):

"Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy by testing 12 chromosomes." Reprod Biomed Online **19**(4): pp. 532-538.

Dawson A., Griesinger G. and Diedrich K. (2006):

"Screening oocytes by polar body biopsy." Reprod Biomed Online **13**(1): pp. 104-109.

Dechend F. (2009):

"Polkörperdiagnostik (PKD) - Contra." Reproduktionsmedizin und Endokrinologie: pp. 15-16.

Delhanty J. D. (2005):

"Mechanisms of aneuploidy induction in human oogenesis and early embryogenesis." Cytogenet Genome Res **111**(3-4): pp. 237-244.

Delhanty J. D. (2011):

"Is the polar body approach best for pre-implantation genetic screening?" Placenta **32 Suppl 3**: pp. S268-270.

Diedrich K., Banz-Jansen C. and Ludwig A. (2011):

"Schwangerschaftsrisiken und Outcome der Kinder nach ART." Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie **8** (2): pp. 108-111.

DRZE (2011):

"PID - rechtliche Aspekte." <http://www.drze.de>.

Duarte A. C., Menezes A. I., Devens E. S., Roth J. M., Garcias G. L. and Martino-Roth M. G. (2004):

"Patau syndrome with a long survival. A case report." Genet Mol Res **3**(2): pp. 288-292.

Ebner T., Moser M., Sommergruber M., Yaman C., Pflieger U. and Tews G. (2002):

"First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients." Hum Reprod **17**(9): pp. 2415-2418.

Ebner T., Moser M., Yaman C., Feichtinger O., Hartl J. and Tews G. (1999):

"Elective transfer of embryos selected on the basis of first polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy." Fertil Steril **72**(4): pp. 599-603.

Ebner T., Vanderzwalmen P., Shebl O., Mayer R., Moser M. and Tews G. (2011):

"Morphological Aspects of Human Blastocysts and the Impact of Vitrification." Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie **8**(1): pp. 13-20.

Ebner T., Yaman C., Moser M., Sommergruber M., Feichtinger O. and Tews G. (2000):

"Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection." Hum Reprod **15**(2): pp. 427-430.

Eckel H. and Wieacker P. (2004):

"Häufigkeit von Aneuploidien in Gameten und Embryonen beim Menschen." Medizinische Genetik **16**(4): pp. 398-403.

Eichenlaub-Ritter U. (1998):

"Genetics of oocyte ageing." Maturitas **30**(2): pp. 143-169.

ESchG (1990):

"Embryonenschutzgesetz." from <http://www.gesetze-im-internet.de/eschg/index.html>.

Fancsovits P., Toth L., Takacs Z. F., Murber A., Papp Z. and Urbancsek J. (2005):

"Early pronuclear breakdown is a good indicator of embryo quality and viability." Fertil Steril **84**(4): pp. 881-887.

Fancsovits P., Tothne Z. G., Murber A., Takacs F. Z., Papp Z. and Urbancsek J. (2006):

"Correlation between first polar body morphology and further embryo development." Acta Biol Hung **57**(3): pp. 331-338.

Ferraretti A. P., Magli M. C., Kopcow L. and Gianaroli L. (2004):

"Prognostic role of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in assisted reproductive technology outcome." Hum Reprod **19**(3): pp. 694-699.

Fishel S., Gordon A., Lynch C., Dowell K., Ndukwe G., Kelada E., Thornton S., Jenner L., Cater E., Brown A. and Garcia-Bernardo J. (2010):

"Live birth after polar body array comparative genomic hybridization prediction of embryo ploidy-the future of IVF?" Fertil Steril **93**(3): pp. 1006 e1007-1006 e1010.

Fragouli E., Alfarawati S., Daphnis D. D., Goodall N. N., Mania A., Griffiths T., Gordon A. and Wells D. (2011a):

"Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation." Hum Reprod **26**(2): pp. 480-490.

Fragouli E., Katz-Jaffe M., Alfarawati S., Stevens J., Colls P., Goodall N. N., Tormasi S., Gutierrez-Mateo C., Prates R., Schoolcraft W. B., Munne S. and Wells D. (2010):

"Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure." Fertil Steril **94**(3): pp. 875-887.

Fragouli E., Wells D. and Delhanty J. D. (2011b):

"Chromosome abnormalities in the human oocyte." Cytogenet Genome Res **133**(2-4): pp. 107-118.

Frommel M., Taupitz J., Ochsner A. and Geithövel F. (2010):

"Rechtslage der Reproduktionsmedizin in Deutschland." J. Reproduktionsmed. Endokrinol **7**(2): pp. 96-105.

Gabriel A. S., Thornhill A. R., Ottolini C. S., Gordon A., Brown A. P., Taylor J., Bennett K., Handyside A. and Griffin D. K. (2011):

"Array comparative genomic hybridisation on first polar bodies suggests that non-disjunction is not the predominant mechanism leading to aneuploidy in humans." J Med Genet **48**(7): pp. 433-437.

Gardner R. J. M. and Sutherland G. R. (2004):

"Chromosome abnormalities and genetic counseling". New York, **Oxford University Press**.

Geraedts J., Collins J., Gianaroli L., Goossens V., Handyside A., Harper J., Montag M., Repping S. and Schmutzler A. (2010):

"What next for preimplantation genetic screening? A polar body approach!" Hum Reprod **25**(3): pp. 575-577.

Geraedts J., Montag M., Magli M. C., Repping S., Handyside A., Staessen C., Harper J., Schmutzler A., Collins J., Goossens V., van der Ven H., Vesela K. and Gianaroli L. (2011):

"Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results." Hum Reprod **26**(11): pp. 3173-3180.

Gianaroli L., Magli M. C., Ferraretti A. P., Lappi M., Borghi E. and Ermini B. (2007):

"Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and embryo chromosomal complement." Hum Reprod **22**(1): pp. 241-249.

Gianaroli L., Magli M. C., Ferraretti A. P. and Munne S. (1999):

"Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed." Fertil Steril **72**(5): pp. 837-844.

Griesinger G., Schultze-Mosgau A. and Diedrich K. (2004):

"Polkörperdiagnostik aus reproduktionsmedizinischer Sicht." Medizinische Genetik **4**: pp. 393-397.

Gutierrez-Mateo C., Benet J., Wells D., Colls P., Bermudez M. G., Sanchez-Garcia J. F., Egozcue J., Navarro J. and Munne S. (2004):

"Aneuploidy study of human oocytes first polar body comparative genomic hybridization and metaphase II fluorescence in situ hybridization analysis." Hum Reprod **19**(12): pp. 2859-2868.

Guttenbach M., Engel W. and Schmid M. (1997):

"Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosome aberrations. A review." Hum Genet **100**(1): pp. 1-21.

Haaf T., Tresch A., Lambrecht A., Grossmann B., Schwaab E., Khanaga O., Hahn T. and Schorsch M. (2010):

"Outcome of intracytoplasmic sperm injection with and without polar body diagnosis of oocytes." Fertil Steril **93**(2): pp. 405-415.

Handyside A. H. and Ogilvie C. M. (1999):

"Screening oocytes and preimplantation embryos for aneuploidy." Curr Opin Obstet Gynecol **11**(3): pp. 301-305.

Harper J., Coonen E., De Rycke M., Fiorentino F., Geraedts J., Goossens V., Harton G., Moutou C., Pehlivan Budak T., Renwick P., Sengupta S., Traeger-Synodinos J. and Vesela K. (2010a):

"What next for preimplantation genetic screening (PGS)? A position statement from the ESHRE PGD Consortium Steering Committee." Hum Reprod **25**(4): pp. 821-823.

Harper J. C., Coonen E., De Rycke M., Harton G., Moutou C., Pehlivan T., Traeger-Synodinos J., Van Rij M. C. and Goossens V. (2010b):

"ESHRE PGD Consortium data collection X: cycles from January to December 2007 with pregnancy follow-up to October 2008." Hum Reprod **25**(11): pp. 2685-2707.

Harton G., Braude P., Lashwood A., Schmutzler A., Traeger-Synodinos J., Wilton L. and Harper J. C. (2011):

"ESHRE PGD consortium best practice guidelines for organization of a PGD centre for PGD/preimplantation genetic screening." Hum Reprod **26**(1): pp. 14-24.

- Harton G. L., Harper J. C., Coonen E., Pehlivan T., Vesela K. and Wilton L. (2010):
"ESHRE PGD consortium best practice guidelines for fluorescence in situ hybridization-based PGD." Hum Reprod.
- Hassold T. and Chiu D. (1985):
"Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy." Hum Genet **70**(1): pp. 11-17.
- Hassold T. and Hunt P. (2001):
"To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy." Nat Rev Genet **2**(4): pp. 280-291.
- Hassold T. and Hunt P. (2009):
"Maternal age and chromosomally abnormal pregnancies: what we know and what we wish we knew." Curr Opin Pediatr **21**(6): pp. 703-708.
- Hu D. G., Webb G. and Hussey N. (2004):
"Aneuploidy detection in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridization." Mol Hum Reprod **10**(4): pp. 283-289.
- IVF-Register D. (2010):
"Jahrbuch 2009." Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie **7**(4): pp. 470-497.
- IVF-Register D. (2011):
"Jahrbuch 2010." Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie **8**(4): pp. 253-280.
- IVF-Register D. (2012):
"Jahrbuch 2011." Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie **9**((6)): pp. 1-40.
- Jessberger R. (2012):
"Age-related aneuploidy through cohesion exhaustion." EMBO Rep **13**(6): pp. 539-546.
- Johnson D. S., Cinnioglu C., Ross R., Filby A., Gemelos G., Hill M., Ryan A., Smotrich D., Rabinowitz M. and Murray M. J. (2010):
"Comprehensive analysis of karyotypic mosaicism between trophectoderm and inner cell mass." Mol Hum Reprod **16**(12): pp. 944-949.
- Kearns W. (2011, 2011):
"Early embryos can correct genetic abnormalities during development: findings have significant implications for fertility treatment and stem cell therapies."

Kirby T. (2010):

"Robert Edwards: Nobel Prize for father of in-vitro fertilisation." Lancet **376**(9749): pp. 1293.

Kuliev A., Cieslak J., Ilkevitch Y. and Verlinsky Y. (2003):

"Chromosomal abnormalities in a series of 6,733 human oocytes in preimplantation diagnosis for age-related aneuploidies." Reprod Biomed Online **6**(1): pp. 54-59.

Kuliev A., Cieslak J. and Verlinsky Y. (2005a):

"Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human oocytes." Cytogenet Genome Res **111**(3-4): pp. 193-198.

Kuliev A. and Verlinsky Y. (2004):

"Meiotic and mitotic nondisjunction: lessons from preimplantation genetic diagnosis." Hum Reprod Update **10**(5): pp. 401-407.

Kuliev A. and Verlinsky Y. (2005b):

"Place of preimplantation diagnosis in genetic practice." Am J Med Genet A **134A**(1): pp. 105-110.

Landwehr C., Montag M., van der Ven K. and Weber R. G. (2008):

"Rapid comparative genomic hybridization protocol for prenatal diagnosis and its application to aneuploidy screening of human polar bodies." Fertil Steril **90**(3): pp. 488-496.

Levrn D., Dor J., Rudak E., Nebel L., Ben-Shlomo I., Ben-Rafael Z. and Mashiach S. (1990):

"Pregnancy potential of human oocytes--the effect of cryopreservation." N Engl J Med **323**(17): pp. 1153-1156.

Loane M., Morris J. K., Addor M. C., Arriola L., Budd J., Doray B., Garne E., Gatt M., Haeusler M., Khoshnood B., Klungsoyr Melve K., Latos-Bielenska A., McDonnell B., Mullaney C., O'Mahony M., Queisser-Wahrendorf A., Rankin J., Rissmann A., Rounding C., Salvador J., Tucker D., Wellesley D., Yevtushok L. and Dolk H. (2013):

"Twenty-year trends in the prevalence of Down syndrome and other trisomies in Europe: impact of maternal age and prenatal screening." Eur J Hum Genet **21**(1): pp. 27-33.

Ludwig M. and Katalinic A. (2002):

"Malformation rate in fetuses and children conceived after ICSI: results of a prospective cohort study." Reprod Biomed Online **5**(2): pp. 171-178.

Ludwig M. and Katalinic A. (2005):

"Die deutsche ICSI-Follow-up-Studie - Zusammenfassung der Ergebnisse publizierter Arbeiten und Einordnung in die aktuelle Studienlage." J. Reproduktionsmed. Endokrinol **2**(3): pp. 151-162.

Magli M. C., Grugnetti C., Castelletti E., Paviglianiti B., Ferraretti A. P., Geraedts J. and Gianaroli L. (2012):

"Five chromosome segregation in polar bodies and the corresponding oocyte." Reprod Biomed Online **24**(3): pp. 331-338.

Magli M. C., Montag M., Koster M., Muzi L., Geraedts J., Collins J., Goossens V., Handyside A. H., Harper J., Repping S., Schmutzler A., Vesela K. and Gianaroli L. (2011):

"Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part II: technical aspects." Hum Reprod **26**(11): pp. 3181-3185.

Maille L., Bergere M., Lemoine E., Camier B., Prevost J. F., Bourdrel J. M., Hammoud I., Selva J. and Vialard F. (2009):

"Pronuclear morphology differs between women more than 38 and women less than 30 years of age." Reprod Biomed Online **18**(3): pp. 367-373.

Mastenbroek S., Twisk M., van Echten-Arends J., Sikkema-Raddatz B., Korevaar J. C., Verhoeve H. R., Vogel N. E., Arts E. G., de Vries J. W., Bossuyt P. M., Buys C. H., Heineman M. J., Repping S. and van der Veen F. (2007):

"In vitro fertilization with preimplantation genetic screening." N Engl J Med **357**(1): pp. 9-17.

Mertzanidou A., Wilton L., Cheng J., Spits C., Vanneste E., Moreau Y., Vermeesch J. R. and Sermon K. (2013):

"Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos." Hum Reprod **28**(1): pp. 256-264.

Montag M., Köster K., Van der Ven H. and Van der Ven K. (2009a):

"Qualität der Eizelle." Reproduktionsmedizin und Endokrinologie **6** (1): pp. 26-28.

Montag M., Köster K., van der Ven K., Bohlen U., Bender F. and van der Ven H. (2010):

"Kombinierte Translokations- und Aneuploidieuntersuchungen nach Polkörperbiopsie und array-Comparative Genomic Hybridisation." J. Reproduktionsmed. Endokrinol **7**(7): pp. 498-502.

Montag M. and van der Ven H. (2002a):

"Grundlagen der In-vitro-Fertilisation und Embryonenkultivierung." Reproduktionsmedizin **18**: pp. 147-152.

Montag M., Van der Ven H. and Van der Ven K. (2002b):

"Erste klinische Erfahrungen mit der Polkörperdiagnostik in Deutschland." Journal für Fertilität und Reproduktion **12**(4): pp. 7-12.

Montag M., van der Ven K., Rosing B. and van der Ven H. (2009b):

"Polar body biopsy: a viable alternative to preimplantation genetic diagnosis and screening." Reprod Biomed Online **18 Suppl 1**: pp. 6-11.

Montag M., van der Ven K. and van der Ven H. (2009c):

"Polkörperdiagnostik." Gynakol Geburtshilfliche Rundsch **49**(2): pp. 62-68.

Montgomery F. and Scriba P. (2011):

"Memorandum zur Präimplantationsdiagnostik." Deutsches Ärzteblatt **108**(31-32): pp. 1449-1456.

Munne S. (2006):

"Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos." Reprod Biomed Online **12**(2): pp. 234-253.

Munne S., Gianaroli L., Tur-Kaspa I., Magli C., Sandalinas M., Grifo J., Cram D., Kahraman S., Verlinsky Y. and Simpson J. L. (2007):

"Substandard application of preimplantation genetic screening may interfere with its clinical success." Fertil Steril **88**(4): pp. 781-784.

Munne S., Magli C., Cohen J., Morton P., Sadowy S., Gianaroli L., Tucker M., Marquez C., Sable D., Ferraretti A. P., Massey J. B. and Scott R. (1999):

"Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos." Hum Reprod **14**(9): pp. 2191-2199.

Munne S., Sandalinas M., Escudero T., Velilla E., Walmsley R., Sadowy S., Cohen J. and Sable D. (2003):

"Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy." Reprod Biomed Online **7**(1): pp. 91-97.

Nagaoka S. I., Hassold T. J. and Hunt P. A. (2012):

"Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem." Nat Rev Genet **13**(7): pp. 493-504.

Nath J. and Johnson K. L. (2000):

"A review of fluorescence in situ hybridization (FISH): current status and future prospects." Biotech Histochem **75**(2): pp. 54-78.

Navarro P. A., de Araujo M. M., de Araujo C. M., Rocha M., dos Reis R. and Martins W. (2009):

"Relationship between first polar body morphology before intracytoplasmic sperm injection and fertilization rate, cleavage rate, and embryo quality." Int J Gynaecol Obstet **104**(3): pp. 226-229.

Neubauer M., Ed. (2009).

"Medizinisch-naturwissenschaftliche, juristische und ethische Aspekte der Präimplantationsdiagnostik", **IGEL Verlag GmbH**.

Nicolaidis P. and Petersen M. B. (1998):

"Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies." Hum Reprod **13**(2): pp. 313-319.

Palermo G., Joris H., Devroey P. and Van Steirteghem A. C. (1992):

"Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte." Lancet **340**(8810): pp. 17-18.

Pellestor F., Anahory T. and Hamamah S. (2005):

"Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes." Cytogenet Genome Res **111**(3-4): pp. 206-212.

Pellestor F., Andreo B., Arnal F., Humeau C. and Demaille J. (2002):

"Mechanisms of non-disjunction in human female meiosis: the co-existence of two modes of malsegregation evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes." Hum Reprod **17**(8): pp. 2134-2145.

Pellestor F., Andreo B., Arnal F., Humeau C. and Demaille J. (2003):

"Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes." Hum Genet **112**(2): pp. 195-203.

Propping P. (2008):

"Die Perfektionierung der Polkörperdiagnostik." Deutsches Ärzteblatt **11**: pp. 189.

Richter-Kuhlmann E. (2013):

"Präimplantationsdiagnostik: Bundesrat gibt grünes Licht." Dtsch Arztebl **110**(6): pp. 196.

Ritzinger P., Dudenhausen J. and Holzgreve W. (2011):

"Späte Mutterschaft und deren Risiken." Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie **8**(2): pp. 112-122.

Rosenbusch B. (2004a):

"Aneuploidie in menschlichen Eizellen." Journal für Fertilität und Reproduktion **14**(3).

Rosenbusch B. (2004b):

"The incidence of aneuploidy in human oocytes assessed by conventional cytogenetic analysis." Hereditas **141**(2): pp. 97-105.

Sabarstinski M. (2007):

"Korrelation der Ergebnisse der Polkörperdiagnostik mit patientenspezifischen Indikationen."

Schoolcraft W. B., Treff N. R., Stevens J. M., Ferry K., Katz-Jaffe M. and Scott R. T., Jr. (2011):

"Live birth outcome with trophectoderm biopsy, blastocyst vitrification, and single-nucleotide polymorphism microarray-based comprehensive chromosome screening in infertile patients." Fertil Steril **96**(3): pp. 638-640.

Schwinger E. (2004):

"Polkörperdiagnostik aus humangenetischer Sicht." Medizinische Genetik **16**: pp. 391-392.

Scriven P., Ogilvie C. M. and Khalaf Y. (2012):

"Embryo selection in IVF: is polar body array comparative genomic hybridization accurate enough?" Human Reproduction **advance access online**.

Senn A., Urner F., Chanson A., Primi M. P., Wirthner D. and Germond M. (2006):

"Morphological scoring of human pronuclear zygotes for prediction of pregnancy outcome." Hum Reprod **21**(1): pp. 234-239.

Sermon K., Van Steirteghem A. and Liebaers I. (2004):

"Preimplantation genetic diagnosis." Lancet **363**(9421): pp. 1633-1641.

Sher G., Keskintepe L., Keskintepe M., Ginsburg M., Maassarani G., Yakut T., Baltaci V., Kotze D. and Unsal E. (2007):

"Oocyte karyotyping by comparative genomic hybridization [correction of hybridization] provides a highly reliable method for selecting "competent" embryos, markedly improving in vitro fertilization outcome: a multiphase study." Fertil Steril **87**(5): pp. 1033-1040.

Sher G., Keskintepe L., Keskintepe M., Maassarani G., Tortoriello D. and Brody S. (2009):

"Genetic analysis of human embryos by metaphase comparative genomic hybridization (mCGH) improves efficiency of IVF by increasing embryo implantation rate and reducing multiple pregnancies and spontaneous miscarriages." Fertil Steril **92**(6): pp. 1886-1894.

Staessen C., Platteau P., Van Assche E., Michiels A., Tournaye H., Camus M., Devroey P., Liebaers I. and Van Steirteghem A. (2004):

"Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial." Hum Reprod **19**(12): pp. 2849-2858.

Step toe P. C. and Edwards R. G. (1978):

"Birth after the reimplantation of a human embryo." Lancet **2**(8085): pp. 366.

Strauss A., Heer I. M., Spelsberg F. and Strauss C. (2013):

"Down Syndrome: what do pregnant women know about their individual risk? A prospective trial." Arch Gynecol Obstet.

- Strom C. M., Levin R., Strom S., Masciangelo C., Kuliev A. and Verlinsky Y. (2000):
"Neonatal outcome of preimplantation genetic diagnosis by polar body removal: the first 109 infants." Pediatrics **106**(4): pp. 650-653.
- Thornhill A. R., deDie-Smulders C. E., Geraedts J. P., Harper J. C., Harton G. L., Lavery S. A., Moutou C., Robinson M. D., Schmutzler A. G., Scriven P. N., Sermon K. D. and Wilton L. (2005):
"ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'." Hum Reprod **20**(1): pp. 35-48.
- Twisk M., Mastenbroek S., van Wely M., Heineman M. J., Van der Veen F. and Repping S. (2006):
"Preimplantation genetic screening for abnormal number of chromosomes (aneuploidies) in in vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection." Cochrane Database Syst Rev(1): pp. CD005291.
- van der Ven H., Montag M. and van der Ven K. (2002):
"Schwangerschaft nach Polkörperbiopsie und Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) der Chromosomen 13, 16, 18, 21 und 22." Geburtshilfe Frauenheilkunde **62**: pp. 585-588.
- van der Ven H., Montag M., van der Ven K., Fimmers R. and Schwinger E. (2004):
"Prospektiv randomisierte multizentrische Studie zum Nachweis des Vorteils einer Aneuploidie Testung nach Polkörperbiopsie bei der künstlichen Befruchtung." Medizinische Genetik **16**: pp. 413-415.
- van der Ven K., Montag M. and van der Ven H. (2008a):
"Polar body diagnosis - a step in the right direction?" Dtsch Arztebl Int **105**(11): pp. 190-196.
- van der Ven K., Montag M. and van der Ven H. (2008b):
"Polkörperdiagnostik - Ein Schritt in die richtige Richtung?" Deutsches Ärzteblatt Jahrgang **105**(11): pp. 190-197.
- Van Steirteghem A. (2012):
"Celebrating ICSI's twentieth anniversary and the birth of more than 2.5 million children--the 'how, why, when and where'." Hum Reprod **27**(1): pp. 1-2.
- Verlinsky Y., Cieslak J., Freidline M., Ivakhnenko V., Wolf G., Kovalinskaya L., White M., Lifchez A., Kaplan B., Moise J. and et al. (1995):
"Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in-situ hybridization." Hum Reprod **10**(7): pp. 1923-1927.

Verlinsky Y., Cieslak J., Freidine M., Ivakhnenko V., Wolf G., Kovalinskaya L., White M., Lifchez A., Kaplan B., Moise J., Valle J., Ginsberg N., Strom C. and Kuliev A. (1996a):

"Polar body diagnosis of common aneuploidies by FISH." J Assist Reprod Genet **13**(2): pp. 157-162.

Verlinsky Y., Cieslak J., Ivakhnenko V., Evsikov S., Wolf G., White M., Lifchez A., Kaplan B., Moise J., Valle J., Ginsberg N., Strom C. and Kuliev A. (1997):

"Prepregnancy genetic testing for age-related aneuploidies by polar body analysis." Genet Test **1**(4): pp. 231-235.

Verlinsky Y., Cieslak J., Ivakhnenko V., Evsikov S., Wolf G., White M., Lifchez A., Kaplan B., Moise J., Valle J., Ginsberg N., Strom C. and Kuliev A. (1999):

"Prevention of age-related aneuploidies by polar body testing of oocytes." J Assist Reprod Genet **16**(4): pp. 165-169.

Verlinsky Y., Cieslak J., Ivakhnenko V., Evsikov S., Wolf G., White M., Lifchez A., Kaplan B., Moise J., Valle J., Ginsberg N., Strom C. and Kuliev A. (2001):

"Chromosomal abnormalities in the first and second polar body." Mol Cell Endocrinol **183 Suppl 1**: pp. S47-49.

Verlinsky Y., Cieslak J., Ivakhnenko V., Lifchez A., Strom C. and Kuliev A. (1996b):

"Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of common aneuploidies by polar body fluorescent in situ hybridization analysis. Preimplantation Genetics Group." Fertil Steril **66**(1): pp. 126-129.

Verlinsky Y., Ginsberg N., Lifchez A., Valle J., Moise J. and Strom C. M. (1990):

"Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis." Hum Reprod **5**(7): pp. 826-829.

Verlinsky Y., Lerner S., Illkevitch N., Kuznetsov V., Kuznetsov I., Cieslak J. and Kuliev A. (2003):

"Is there any predictive value of first polar body morphology for embryo genotype or developmental potential?" Reprod Biomed Online **7**(3): pp. 336-341.

Vialard F., Petit C., Bergere M., Gomes D. M., Martel-Petit V., Lombroso R., Ville Y., Gerard H. and Selva J. (2006):

"Evidence of a high proportion of premature unbalanced separation of sister chromatids in the first polar bodies of women of advanced age." Hum Reprod **21**(5): pp. 1172-1178.

Vogt E., Kirsch-Volders M., Parry J. and Eichenlaub-Ritter U. (2008):

"Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes and susceptibility to meiotic error." Mutat Res **651**(1-2): pp. 14-29.

Wagner A., Harasim T. and Rost I.:

"Präimplantationsdiagnostik." from <http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=6755>.

Warburton D. (2005):

"Biological aging and the etiology of aneuploidy." Cytogenet Genome Res **111**(3-4): pp. 266-272.

Wieacker P. F., Hehr U. and Schwinger E. (2003):

"Überlegungen zur Polkörperdiagnostik von Aneuploidien." Reproduktionsmedizin **3**: pp. 135-136.

Wilton L., Voullaire L., Sargeant P., Williamson R. and McBain J. (2003):

"Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure." Fertil Steril **80**(4): pp. 860-868.

Wissenschaften N. A. d., Ed. (2011).

"Präimplantationsdiagnostik (PID) – Auswirkungen einer begrenzten Zulassung in Deutschland".

Würfel W., Klein H., Wagner A. and Hinrichsen T. (2008):

"Genetisches Spiegelbild der Eizelle: Den Polkörper diagnostisch nutzen." Ärztliche Praxis; Gynäkologie(6): pp. 22-25.

Xia P. (1997):

"Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality." Hum Reprod **12**(8): pp. 1750-1755.

Younis J. S., Radin O., Izhaki I. and Ben-Ami M. (2009):

"Does first polar body morphology predict oocyte performance during ICSI treatment?" J Assist Reprod Genet **26**(11-12): pp. 561-567.

Zech I., Vanderzwalmen P. and Zech N. (2002):

"Entwicklung von Embryonen nach intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) bei "non-male-factor" Infertilität in Relation zur Injektionstechnik." Journal für Fertilität und Reproduktion **2002** **12**(3): pp. 9-13.

7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

ART	Assistierte Reproduktionstechnik
CGH	comparative genomic hybridization
DIR	Deutsches IVF-Register
DNA	Deoxyribonucleic acid
ESchG	Embryonenschutzgesetz
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embryology
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HyE	Hybridisierungseffizienz
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IVF	In-vitro-Fertilisation
PID	Präimplantationsdiagnostik
PK	Polkörper
PKD	Polkörperdiagnostik
PND	Pränataldiagnostik
PSSC	premature separation of sister chromatids

8. Anhang

Tabelle 7 Zusammenfassende Übersicht der 106 Zyklen Polkörperdiagnostik

Zyklus	Alter der Patientin	Punktierte Eizellen	Eizellen ICSI + PKD	Polkörper entnommen	unauffällig	auffällig	nicht sicher beurteilbar	Eizellen unauffällig/ transferierbar	Transfer gesamt
1	42	6	6	6	1	4	1	1	2
2	49	8	8	8	3	4	1	1	2
3	47	4	4	3	2	1	0	1	2
4	44	15	13	13	3	8	2	3	3
5	43	2	2	2	0	2	0	0	0
6	36	6	4	4	1	1	2	1	0
7	42	12	12	12	4	8	0	4	2
8	43	14	14	24	5	6	13	3	3
9	40	7	5	4	1	1	2	2	2
10	39	15	14	14	3	6	5	4	3
11	35	14	12	11	5	3	3	4	2
12	44	5	3	3	1	1	1	1	0
13	37	9	8	6	0	4	2	0	3
14	41	12	11	11	0	8	3	0	2
15	33	8	7	6	1	3	2	3	3
16	35	11	10	10	2	5	3	2	2
17	44	3	3	3	0	3	0	0	0
18	41	6	4	7	1	1	5	1	1
19	41	14	14	22	7	8	7	4	1
20	42	5	5	7	3	2	2	3	2
21	46	3	2	2	0	2	0	0	0
22	43	13	8	8	1	5	2	1	2
23	40	11	8	8	2	2	4	3	2
24	41	10	10	10	4	1	5	4	3
25	34	8	8	13	4	9	0	3	3
26	40	7	6	9	1	0	8	1	1

Zyklus	Alter der Patientin	Punktierte Eizellen	Eizellen ICSI + PKD	Polkörper entnommen	unauffällig	auffällig	nicht sicher beurteilbar	Eizellen unauffällig/ transferierbar	Transfer gesamt
27	36	18	18	19	4	6	9	4	3
28	34	13	12	17	5	6	6	3	2
29	36	4	4	3	1	1	1	1	0
30	33	12	10	17	6	7	4	4	3
31	38	18	16	14	3	7	4	3	3
32	39	8	6	10	4	5	1	2	2
33	32	28	23	42	21	15	6	2	2
34	41	10	10	14	4	7	3	2	2
35	44	7	6	8	4	3	1	2	2
36	41	10	3	4	0	4	0	0	0
37	43	10	7	12	6	4	2	3	2
38	40	10	6	11	4	3	4	3	2
39	41	9	6	7	3	1	3	2	3
40	41	7	7	11	5	2	4	4	2
41	37	13	13	17	9	5	3	7	3
42	38	10	8	8	2	3	3	2	3
43	41	7	5	7	3	1	3	2	2
44	46	6	3	3	2	1	0	2	0
45	42	9	7	7	3	2	2	3	2
46	34	10	10	18	7	8	3	3	3
47	44	7	5	4	2	2	0	2	2
48	40	4	4	7	3	2	2	2	2
49	44	7	3	4	0	1	3	0	0
50	41	16	8	6	3	1	2	3	2
51	47	5	4	6	0	1	5	0	2
52	37	9	8	14	7	4	3	2	2
53	43	6	5	6	2	1	3	2	2
54	43	25	19	26	11	10	5	2	3
55	40	2	2	4	1	1	2	0	0
56	43	7	5	9	2	5	2	0	2
57	47	6	4	6	0	5	1	0	0

Zyklus	Alter der Patientin	Punktierte Eizellen	Eizellen ICSI + PKD	Polkörper entnommen	unauffällig	auffällig	nicht sicher beurteilbar	Eizellen unauffällig/ transferierbar	Transfer gesamt
58	32	10	8	10	2	7	1	2	1
59	46	7	3	3	0	3	0	0	0
60	39	11	9	12	3	3	6	3	2
61	37	18	14	21	3	6	12	2	k. A.
62	44	11	10	10	1	7	2	1	3
63	42	6	6	12	3	5	4	1	1
64	39	16	11	17	7	8	2	3	3
65	46	4	4	8	0	8	0	0	0
66	45	9	9	10	4	5	1	4	3
67	47	6	6	8	1	4	3	2	2
68	44	9	7	9	2	3	4	3	3
69	42	9	8	9	4	2	3	3	3
70	40	14	12	18	1	12	5	2	2
71	47	6	5	10	0	2	8	5	2
72	38	38	33	34	4	11	19	4	3
73	42	11	8	8	3	4	1	1	1
74	41	4	3	4	0	4	0	0	0
75	43	15	11	14	5	6	3	5	1
76	41	9	8	14	3	7	4	2	3
77	41	11	8	15	1	10	4	0	2
78	37	18	9	17	10	6	1	4	3
79	37	19	18	35	13	19	3	4	3
80	42	7	5	7	3	3	1	2	0
81	39	10	9	9	2	2	5	2	1
82	43	6	5	8	1	6	1	1	1
83	43	3	3	4	0	3	1	1	1
84	44	11	8	16	4	7	5	1	1
85	36	14	8	13	2	6	5	1	0
86	45	6	6	9	0	5	4	1	k. A.
87	42	17	14	23	4	7	12	2	2
88	43	5	2	4	2	2	0	1	1

Zyklus	Alter der Patientin	Punktierte Eizellen	Eizellen ICSI + PKD	Polkörper entnommen	unauffällig	auffällig	nicht sicher beurteilbar	Eizellen unauffällig/ transferierbar	Transfer gesamt
89	48	3	3	3	1	1	1	1	0
90	42	18	8	11	2	5	4	1	0
91	43	20	11	17	0	9	8	3	3
92	42	9	8	16	0	8	8	1	1
93	37	12	9	14	1	8	5	1	1
94	41	4	2	3	0	3	0	0	0
95	41	6	3	6	2	1	3	1	1
96	31	24	5	10	0	7	3	0	0
97	39	13	9	15	3	8	4	1	2
98	41	11	8	14	6	8	0	3	3
99	36	14	14	18	9	8	1	6	1
100	42	7	6	11	1	4	6	0	0
101	42	11	8	12	0	5	7	0	0
102	35	13	13	26	3	16	7	2	k. A.
103	46	1	1	2	0	0	2	0	1
104	36	32	16	23	4	10	9	2	k. A.
105	38	13	12	20	5	5	10	4	3
106	44	8	6	11	1	7	3	1	1

9. Danksagung

Zunächst möchte ich meiner Familie für den unermüdlichen Beistand in allen Lebensbereichen danken. Sie unterstützten mich in jeder Lebenslage und trugen einen entscheidenden Teil zum Gelingen meines Studiums und dieser Arbeit bei.

Außerdem geht ein besonderer Dank an meinen Mann, der mir viel Kraft und Motivation gab, die letztendlich zur Vollendung dieser Arbeit führte.

Ich möchte meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. Tina Buchholz einen besonderen Dank aussprechen. Sie war eine vorbildhafte Betreuerin, die sich intensiv um das Vorankommen und Gelingen der Promotionsarbeiten kümmerte und sich sehr dafür einsetzte, die Arbeit auf ein hohes wissenschaftliches Niveau zu bringen. Durch ihr Engagement ermöglichte sie unter anderem die Teilnahme an wissenschaftlichen Kongressen und Symposien, die mir als Doktorandin einen tieferen Einblick in die Fachwelt und ein erhebliches Maß an Motivation gaben.

Dank geht außerdem an Frau Klehr-Martinelli, die mir vor allem zu Beginn der Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Sie führte mich geduldig in die Einzelheiten des Themas ein und gab mir immer wieder Denkanstöße und Ideen, die mir beim Vorankommen meiner Arbeit sehr halfen. Zuletzt möchte ich mich bei Frau Heiliger und Frau Dr. Weiss bedanken, die mich mit wertvollen Tipps weiter voranbrachten.

10. Veröffentlichungen

Originalarbeiten

von der Borch M., Buchholz T., „Polkörperdiagnostik - Evaluation der Hybridisierungseffizienz“ *J. Reproduktionsmed. Endokrinol* – **Manuskript in Arbeit**

Abstracts

WoECK M., Klehr-Martinelli M., Buchholz T.: “Correlation of morphology and efficiency of hybridisation of polar bodies” *J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2010* (Abstracts); **7**: p. 14

Heiliger K.-J., **WoECK M.**, Bartsch T., Adelfalk C., Buchholz T.: „Optimizing polar body diagnosis for translocation analysis“ – *Chromosome Research 2011* (Poster abstracts); Volume 19, Suppl. 1, p. 198

Vorträge

WoECK M., Klehr-Martinelli M., Buchholz T.: “Correlation of morphology and efficiency of hybridisation of polar bodies” – Vortrag auf dem Kongress der International *Federation of Fertility Societies (IFFS)* 2010 in München, Deutschland.

Poster

WoECK M., Klehr-Martinelli M., Buchholz T.: “Polar body analysis by FISH: Evaluation of hybridisation efficiency” – Poster auf dem Kongress der *Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS)* 2010 in Montpellier, Frankreich.

Störmann S., Chiapponi C., Winkel op den M., **WöCK M.**, Bender J., Kern A. B., Gebhardt C., Angstwurm M.: „Mit dem Internet zum Examen - Prüfungsvorbereitung mit dem virtuellen Staatsexamens-Repetitorium der LMU München“ – Poster auf der Jahrestagung der Gesellschaft für Medizinische Ausbildung (GMA) 2010 in Bochum, Deutschland.

Winkel op den M., Störmann S., Chiapponi C., Gebhardt C., Bender J., Kern A. B., **WöCK M.**, Angstwurm M.: „Kontinuierliche Vorbereitung auf das zweite Staatsexamen - Konzept und Erfahrungen nach Abschluss des Pilotjahres des longitudinalen, PJ-begleitenden

Staatsexamens-Repetitoriums der LMU München (L-StaR)“ - Poster auf der Jahrestagung der Gesellschaft für Medizinische Ausbildung (GMA) 2010 in Bochum, Deutschland.

von der Borch M., Kern A.B., Bolzer M., Angstwurm M.: „Evaluation des Kompaktkurses Gynäkologie und Pädiatrie im Rahmen des Staatsexamens-Repetitoriums der LMU München anhand einer Online Klausur“ - Poster auf der Jahrestagung der Gesellschaft für Medizinische Ausbildung (GMA) 2011 in München, Deutschland.

Eidesstattliche Versicherung

von der Borch, Michaela

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Polkörperaneuploidie-Diagnostik mit FISH
Einflussfaktoren auf die Hybridisierungseffizienz**

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 23.05.2014

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand