

Molekularzytogenetische Analyse menschlicher Polkörper  
zur Präimplantationsdiagnostik

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel  
vorgelegt von

Melanie Glander

Kiel  
2006

**Gewidmet meiner Tochter Carolina Marie.  
Mit Deiner Geburt hast Du mich zum glücklichsten  
Menschen der Welt gemacht.  
Dein Lächeln bringt Sonne in mein Herz.  
Dich glücklich zu sehen bedeutet alles für mich.**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Der Aufbau einer menschlichen Eizelle	2
1.2	Oogenese	3
1.3	Die Meiose	4
1.4	Menstruationszyklus	4
1.5	Numerische Chromosomenaberrationen	6
1.6	Entstehung von Aneuploidien in Eizellen	7
1.6.1	Auswirkungen von Aneuploidien	8
1.7	Reproduktionsmedizinische Techniken	8
1.7.1	In-Vitro-Fertilisation (IVF)	9
1.7.2	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)	9
1.7.3	Präimplantationsdiagnostik (PID)	10
1.8	Chancen und Grenzen der Polkörperdiagnostik	11
1.9	Zielsetzungen	11
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>13</b>
2.1	Extrakorporale Befruchtung	13
2.1.1	Oozytengewinnung	13
2.1.2	Aufbereitung der Spermien – Swim-Up	13
2.1.3	In-Vitro-Fertilisation (IVF)	14
2.1.4	Vorbereitung der Intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI)	14
2.1.5	Durchführung der Intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI)	15
2.1.6	Überprüfung der Befruchtung	16
2.2	Etablierung der Polkörperdiagnostik	16
2.2.1	Vorarbeiten	16
2.2.2	Polkörperbiopsie	18
2.2.3	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) an Polkörpern	19
2.2.4	Auswahl der Eizellen für den Embryotransfer nach Polkörperbiopsie	22
2.2.5	Patientenauswahl und Ausschlusskriterien für die Polkörperbiopsie	23
2.2.6	Erstellung von Bewertungskriterien für die Ergebnisse der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)	25

2.3	Biometrische und morphologische Evaluierung der Eizellen _____	27
2.3.1	Messungen von Eizellparametern _____	27
2.3.2	Erstellung eines qualitativen Bewertungssystems für Eizellen _____	28
2.3.3	Rauchverhalten _____	29
2.3.4	Statistische Auswertung der Daten _____	29
2.4	Vergleichende Chromosomenhybridisierung mit Einzelzellen (CGH) _____	29
2.4.1	Proteinase K Verdau _____	30
2.4.2	PCR mit degenerierten Oligonucleotid-Primern (DOP-PCR) _____	30
2.4.3	DOP-PCR mit Super Taq Plus Polymerase (STP-DOP) _____	31
2.4.4	Produktkontrolle aus der DOP-PCR mittels Agarose Gelelektrophorese: _____	32
2.4.5	Markierung der chromosomalen DNA mittels DOP-PCR _____	32
2.4.6	Markierung der chromosomalen DNA mittels Nick Translation _____	33
2.4.7	Markierung in der STP-DOP: _____	33
2.4.8	Fällen der DNA _____	34
2.4.9	Herstellen und Denaturieren von Metaphaseobjektträgern _____	34
2.4.10	Vorbereitung und Hybridisierung _____	35
2.4.11	Posthybridisierungswaschung _____	35
2.4.12	Vergleichende Chromosomenhybridisierung (CGH) an Buccalzellen _____	35
2.4.13	Vergleichende Chromosomenhybridisierung (CGH) an Polkörpern _____	36
<b>3</b>	<b>Ergebnisse _____</b>	<b>40</b>
3.1	Etablierung der Polkörperdiagnostik _____	40
3.1.1	Vorarbeiten _____	40
3.1.2	Bewertungskriterien für Ergebnisse der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) _____	42
3.1.3	Erfassung der Aneuploidie- und Schwangerschaftsrate _____	42
3.2	Biometrische und morphologische Evaluierung der Eizellen _____	44
3.2.1	Morphologische Bewertung _____	44
3.2.2	Größenverteilungen _____	51
3.2.3	Rauchverhalten der Patienten/ innen und Eizellqualität _____	53
3.2.4	Multiples logistisches Regressionsmodell _____	54
3.2.5	Konditionelle Regressionsanalyse mit einer Stratifizierung nach Individuen _____	55
3.3	Vergleichende Chromosomenhybridisierung an Einzelzellen (CGH) _____	55
3.3.1	Zeitverkürzung bei der vergleichenden Chromosomenhybridisierung _____	55
3.3.2	Vergleichende Chromosomenhybridisierung (CGH) an Polkörpern _____	56

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
4.1	Etablierung der Polkörperdiagnostik	62
4.1.1	Kriterien der Patientenauswahl für eine Polkörperdiagnostik anhand der Eizellqualität	62
4.1.2	Polkörperbiopsie	63
4.1.3	Biopsiefähigkeit abhängig vom Alter der Eizellen	64
4.1.4	Fixierung der Polkörper	65
4.1.5	Hybridisierung und Auswertung	66
4.1.6	Erfassung der Aneuploidierate	67
4.1.7	Erfassung der Schwangerschaftsrate	67
4.2	Biometrische und morphologische Evaluierung der Eizellen	69
4.2.1	Korrelation zwischen Eizellmorphologie und deren genetischem Status	69
4.3	Vergleichende Chromosomenhybridisierung an Polkörpern	74
4.3.1	Fazit der vergleichenden Chromosomenhybridisierung an Polkörpern	77
4.4	Ausblick	78
<b>5</b>	<b>Literatur</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>87</b>
6.1	Material	87
6.1.1	Software	87
6.1.2	Geräte	87
6.1.3	Verbrauchsmaterialien	88
6.1.4	Medikamente	89
6.1.5	Gebrauchsfertige Chemikalien, Medien und Puffer	89
6.1.6	PCR-Reagenzien	90
6.1.7	Herzustellende Puffer und Waschlösungen	91
6.1.8	Reaktionsansätze	91
6.1.9	Koordinaten der ROC-Kurve	96
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>98</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>100</b>

<b>9</b>	<b>Erklärung</b>	<b>102</b>
<b>10</b>	<b>Publikationsliste</b>	<b>103</b>
10.1	Buchbeitrag	103
10.2	Kongress-Abstracts	103
<b>11</b>	<b>Danksagung</b>	<b>105</b>

---

## Abkürzungen

---

AIH	Artificial Insemination Husband
CGH	Comparative genomic hybridization
Cot-1-DNA	repetitive menschliche DNA
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindole
dATP	Desoxyadenintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DOP	Degenerate oligonucleotide priming
dTTP	Desoxythymintriphosphat
E <sub>2</sub>	Östrogen
ESchG	Embryonenschutzgesetz
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescence Isothiocyanat
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
HCG	Humanes Chorion Gonadotropin
HMG	Humanes menopausales Gonadotropin
ICSI	Intracytoplasmatische Spermieninjektion
IVF	In-vitro-Fertilisation
LH	Luteinisierendes Hormon
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase chain reaction
PID	Präimplantationsdiagnostik
PKB	Polkörperbiopsie
PKD	Polkörper-Diagnostik
PVP	Polyvenyl pyrrolidone
PVR	Perivitelliner Raum
SDS	Sodium dodecyl sulfate
STP-DOP	Super-Taq-Polymerase-DOP
ZPT	Zonadicke (Zona pellucidathickness)
ZPTV	Zona pellucidathickness variation

---





# 1 Einleitung

Das derzeit in Deutschland geltende Embryonenschutzgesetz (ESchG) ermöglicht es durch hormonelle Stimulation der Frau mehrere Follikel zur Reifung anzuregen und die daraus gewonnenen Eizellen durch In-Vitro-Fertilisation (IVF) oder Intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) zu befruchten. Das Gesetz definiert eine befruchtete Eizelle dann als Embryo, wenn es zur Syngamie der beiden Vorkerne gekommen ist. Ab diesem Zeitpunkt ist jede Selektion unzulässig. In der Praxis bedeutet dies, dass der Reproduktionsmediziner sich bereits im Vorkernstadium für maximal drei der Eizellen entscheiden muss, die er für den Embryotransfer weiterkultiviert. Wenn das Paar die Kryokonservierung der zusätzlichen befruchteten Eizellen wünscht, muss dies ebenfalls in diesem Stadium geschehen. Die Auswahl der Eizellen geschieht in Unkenntnis des Potentials des Embryos sich zu teilen und später zu implantieren. Die bisher gängigste Methode der Eizellauswahl ist die Betrachtung verschiedener morphologischer Gesichtspunkte. Die Auswahl basiert im Wesentlichen auf der Bewertung der Zahl und Anordnung der Nukleolus-Vorläufer-Strukturen in den beiden Vorkernen (Scott et al. 1998, Tesarik et al. 1999). Die Auswahl nach diesen Kriterien bietet eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine gute Embryonalentwicklung (Scott et al. 2000) und erreicht eine höhere Schwangerschaftsrate (Montag et al. 2001).

International werden die Embryonen hinsichtlich Symmetrie (Puissant et al. 1987), Teilungsrate (Steer et al. 1992; Sakkas et al. 2001; Lundin et al. 2001) und Kontinuität der Teilung (Lewin et al. 1994) bewertet und ausgewählt, was zu einer Implantationsrate von 30-40 % pro Embryo führt gegenüber einer Implantationsrate von 9-12 % pro Embryo nach einer Auswahl im Eizellstadium (Montag et al. 2002a).

Da die Möglichkeit der Embryoselektion in Deutschland nicht zur Verfügung steht, müssen andere früher ansetzende Auswahlkriterien Anwendung finden. Eine relativ neue Form der Eizellselektion ist die Untersuchung des genetischen Status der Eizelle mit Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH). Auch hier ist anzumerken, dass die meisten internationalen Arbeitsgruppen ein bis zwei Blastomeren des Embryos genetisch untersuchen, was aus zuvor beschriebenen Gründen in Deutschland nicht zulässig ist.

Die in Deutschland rechtlich und ethisch unbedenkliche Alternative ist die Untersuchung der Eizellen mittels Polkörperdiagnostik. Das Ergebnis über den genetischen Zustand der Eizelle ist hierbei vor der Syngamie erreichbar, und eine Auswahl der Eizellen kann gemäß dem Embryonenschutzgesetz erfolgen. Diese Methode sollte in unserer Arbeitsgruppe etabliert und in den Routineablauf integriert werden. Da diese Methode auch einige Nachteile, auf die später näher eingegangen werden soll, in sich birgt, war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit herauszufinden, ob andere morphologische Kriterien als

Auswahlkriterien für die Steigerung der Schwangerschaftsrate dienlich sein könnten, bzw. in direktem Zusammenhang mit der Ploidie der Eizellen stehen. Außerdem sollte überprüft werden, ob eine genetische Analyse aller Chromosomen mittels vergleichender Chromosomenhybridisierung (CGH = comparative genomic hybridisation) im rechtlichen Zeitrahmen möglich ist, um die Implantations- und Schwangerschaftsrate zu steigern.

Im Folgenden sollen die biologischen Grundlagen, die zum Verständnis der Arbeit notwendig sind kurz erläutert werden:

## 1.1 Der Aufbau einer menschlichen Eizelle

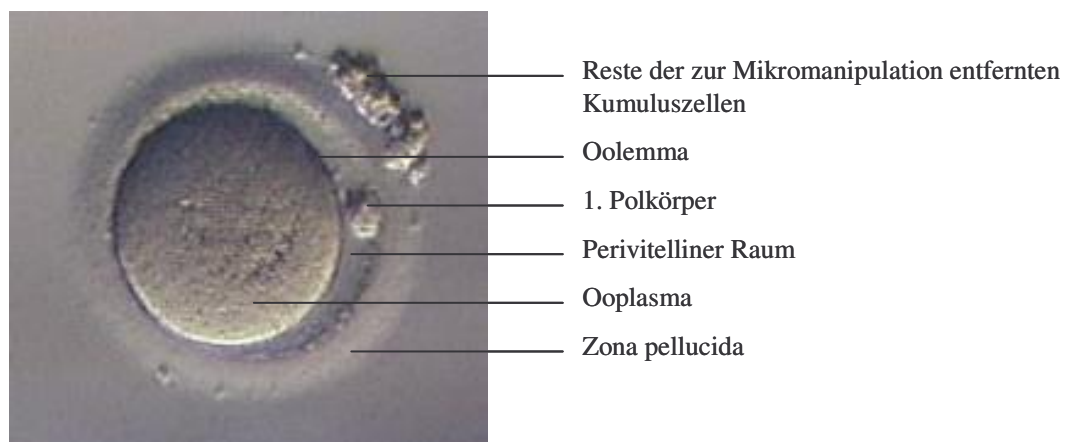


Abb. 1 Menschliche Eizelle nach dem Entfernen der Kumuluszellen

Die menschliche Eizelle ist eine kugelförmige, zytoplasmareiche Zelle mit einem Durchmesser von ca. 160  $\mu\text{m}$  und ist als weiblicher Gamet der Ort der meiotischen Reduktionsteilung. Kurze Zeit vor der Ovulation ist die erste Reifeteilung der Eizelle abgeschlossen, wobei der erste Polkörper entstanden ist. Die Eizelle wird von der Zona pellucida, einer extrazellulären, relativ dicken (ca. 10-20  $\mu\text{m}$ ), durchscheinenden Glykoprotein-Hülle umgeben und von ihr durch den perivitellinen Raum getrennt. Die menschliche Zona pellucida stellt zum einen ein Hindernis für die mehrfache Befruchtung dar, zum anderen ist sie ein kompliziertes biologisches Schutz- und Sicherungssystem (Nichols und Gardner 1989), das zur Speziespezifität bei der Befruchtung beiträgt (Wassarman und Albertini 1994).

Einen zusätzlichen Schutz der Eizelle bietet eine dichte Schicht aus Kumuluszellen, die die Eizelle bei der Ovulation umgeben (siehe Abb. 1).

## 1.2 Oogenese

Die Oogonien werden in der Rindenschicht der embryonalen Gonade angelegt und durchlaufen zuerst eine Phase mitotischer Proliferation. Nach Abschluss der Zellteilungsrunden heißen die Keimzellen Oozyten. Im Ovar eines menschlichen Fetus finden sich ca. 500.000 Oozyten. Im dritten bis siebten Schwangerschaftsmonat treten die Oozyten in die Prophase der Meiose I ein (vgl. Kap.1.3, Abb. 2). Die Chromosomen werden

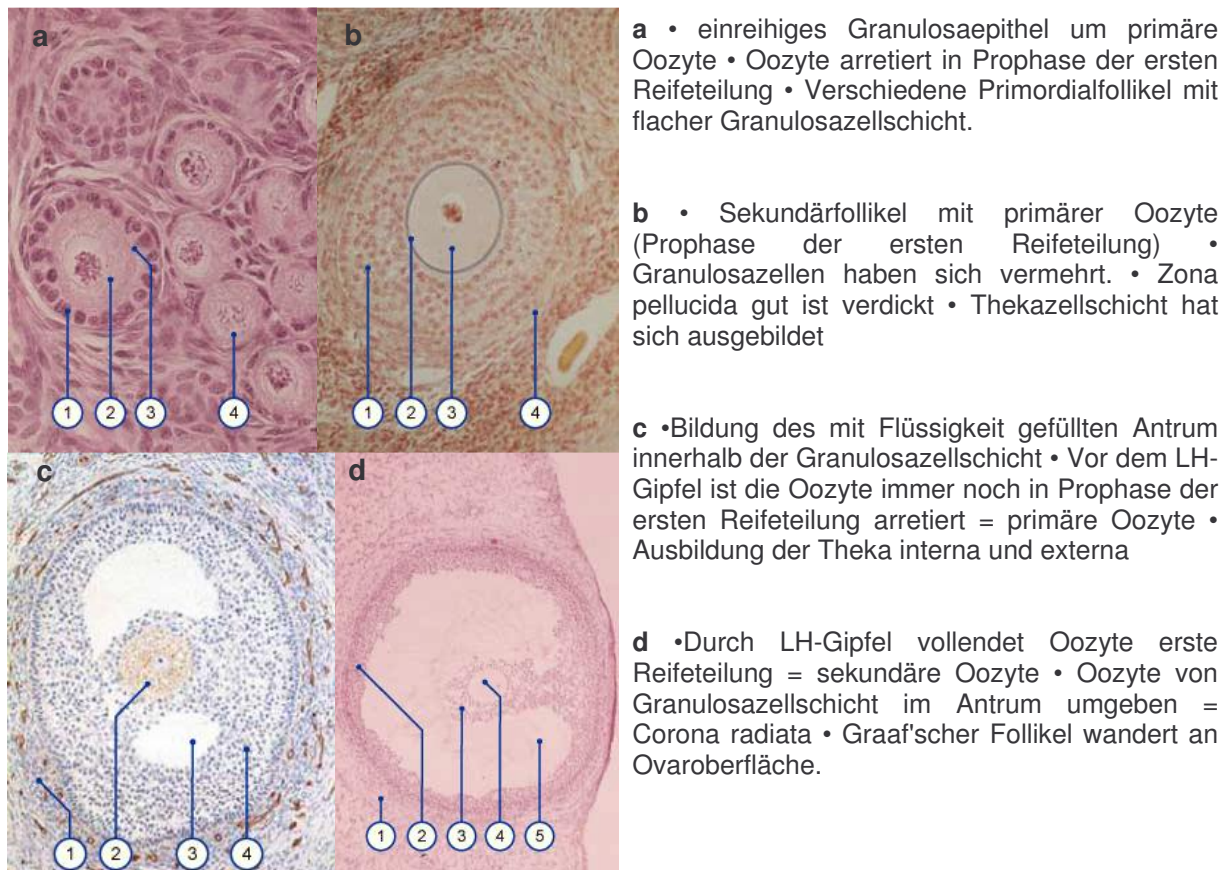


Abb. 2 Oozytenentwicklung im Ovar **a**: Primärfollikel: 1 = Granulosazellen, 2 = primäre Oozyte, 3 = Zona pellucida, 4 = Primordialfollikel **b**: Sekundärfollikel: 1 = Granulosazellschicht, 2 = Zona pellucida, 3 = Primäre Oozyte, 4 = Thekazellschicht **c**: Tertiärfollikel vor LH-Gipfel : 1 = Thekazellen, 2 = Primäre Oozyte, 3 = Antrumbildung, 4 = Granulosazellen **d**: Tertiärfollikel nach LH-Gipfel = Graaf'scher Follikel: 1 = Thekazellen, 2 = Granulosazellen (randständig), 3 = Corona radiata (Granulosazellen) 5 = Antrum [© Mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. F. Schoeni-Affolter]  
<http://www.unifr.ch/histologie/elearningfree/allemand/biochemie/endokrin/ovar/d-ovar.php>

in der S-Phase verdoppelt und die homologen Chromosomen legen sich nun im Zygotän der Prophase zu Bivalenten zusammen. In dieser Phase wird die Eizelle arretiert. Die Chromosomen bleiben gepaart, lockern sich aber zu den sogenannten Lampenbürstenchromosomen auf. An ihnen werden unter anderem Proteine hergestellt, ins Zytoplasma ausgeschleust und für die frühe Embryonalentwicklung gespeichert. Nach der

Geburt eines Mädchens wird, anders als in der Spermatogenese des Mannes, die Proliferation nicht mehr fortgesetzt. Zu Beginn der Pubertät sind 90 % der Oozyten zugrunde gegangen.

### 1.3 Die Meiose

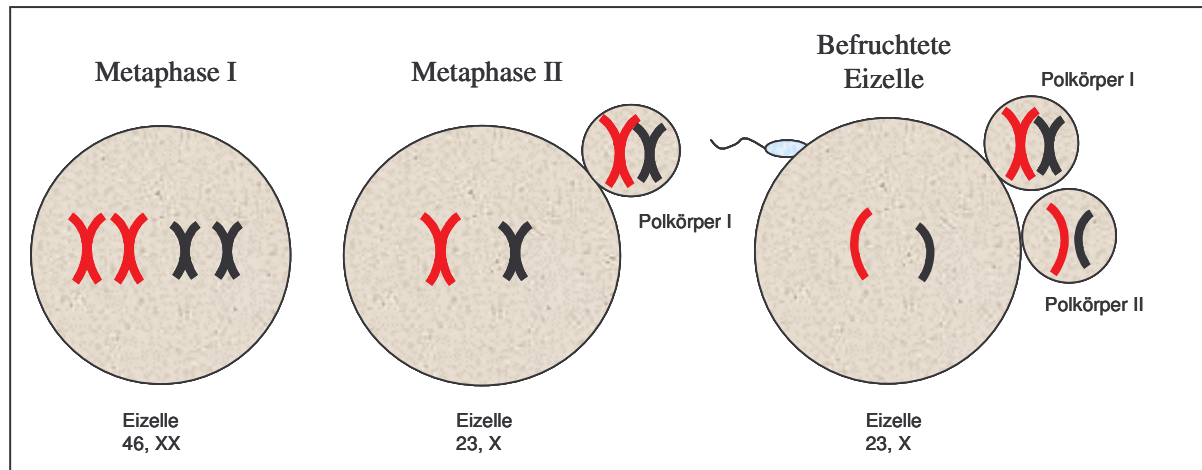


Abb. 3 Schematische Darstellung der Reifeteilungen bei menschlichen Eizellen. Die verschiedenfarbig dargestellten Chromosomen stellen zwei verschiedene Chromosomen dar, z.B. Chromosom 1 und 2.

Während der Eizell-Reifung muss der bis dahin diploide Chromosomensatz auf einen haploiden Satz reduziert werden. Dies geschieht in den beiden Reifeteilungen der Meiose. Hierbei wird das überschüssige genetische Material in die Polkörper abgeschnürt (siehe Abb. 3). Während der Prophase der Meiose I (In der 1. Reifeteilung) kommt es zur Paarung der homologen Chromosomen, die in der Anaphase getrennt und jeweils zu gegenüberliegenden Spindelpolen gezogen werden. Es kommt anschließend zu einer Zellteilung mit ungleicher Zytoplasmaverteilung und die kleinere Zelle wird als erster Polkörper abgeschnürt.

Die Befruchtung durch das Spermium induziert in der Eizelle die 2. Reifeteilung. Hierbei werden die beiden Schwesterchromatiden jedes Chromosoms voneinander getrennt und der zweite Polkörper wird abgeschnürt (siehe Abb. 3).

### 1.4 Menstruationszyklus

Der Menstruationszyklus kann in drei Phasen eingeteilt werden.

#### 1. Die Follikelphase

In dieser Phase kommt es zur Reifung der Follikel. Es beginnen einige Primordialfollikel ohne hormonelle Stimulation mit dem Wachstum. Die Eizelle vergrößert sich und das

Follikel­epithel wird kubisch (Primärfollikel). Der zu Beginn des Zyklus relativ hohe Spiegel an Follikel­stimulierendem-Hormon (FSH) induziert die Reifung von mehrschichtigen Sekundärfollikeln, von denen einer einen Wachstumsvorsprung erhält. Parallel hierzu kommt es in der Follikelphase zu einem Anstieg der Östrogenproduktion in den Ovarien und zu einem Auffüllen des LH-Speichers (LH = Luteinisierendes Hormon) in der Hypophyse bei gleich bleibend niedriger Konzentration von LH im Blut. Im heranwachsenden Tertiärfollikel bilden die Granulosazellen Progesteron, das im Follikel verbleibt und die Eizellreifung fördert. Die Theka interna bildet das Östradiol ( $E_2$ ), das ins Blut abgegeben wird und die Proliferation des Endometriums stimuliert. Außerdem wirkt das Östradiol hemmend auf das Hypothalamus-Hypophysensystem zurück, so dass sich ein gleichmäßiger Spiegel von FSH, LH und Östradiol einstellt.

Zunächst werden alle Tertiärfollikel stimuliert und tragen so zur Hormonbildung bei, bis sie zwischen dem 7. und 14. Zyklustag zugrunde gehen.

Der reife Follikel hat viele Rezeptoren für FSH (auf den Granulosazellen) und LH (auf der Theka interna).

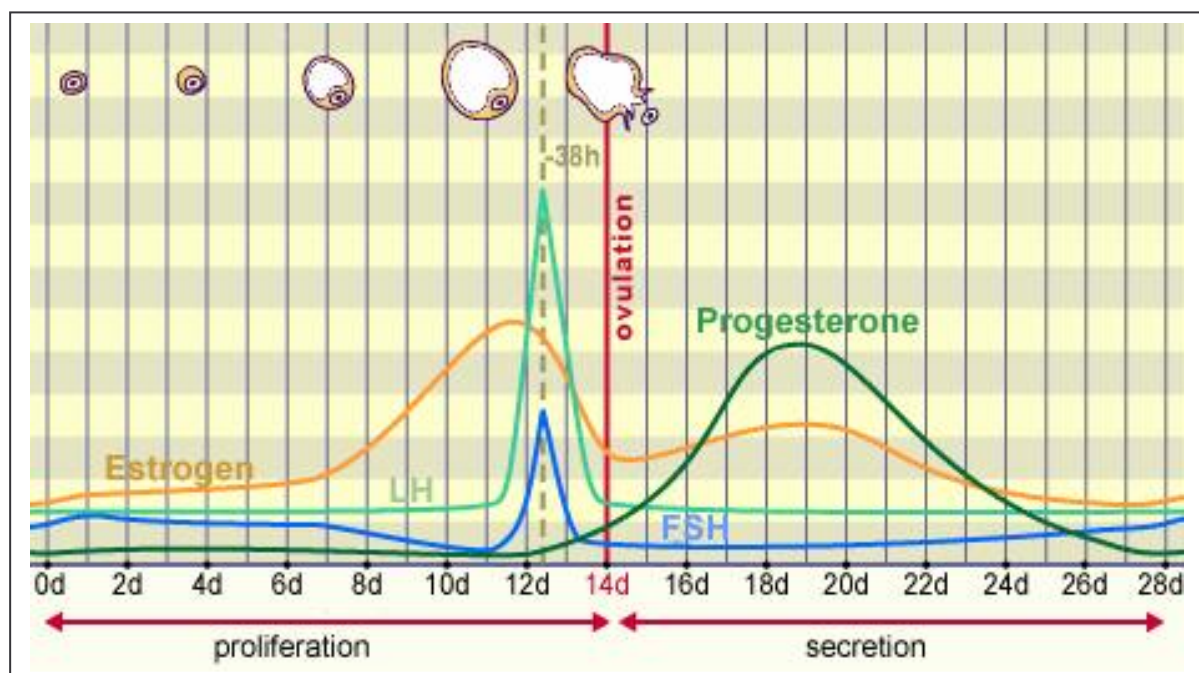


Abb. 4 Schematische Darstellung des Menstruationszyklus: Der Hypothalamus steuert die Hirnanhangsdrüse. Diese schüttet u.a. die Hormone LH (luteinisierendes Hormon) und FSH (Follikel­stimulierendes-Hormon) in das Blut aus mit der höchsten Konzentration in der Mitte des Zyklus. FSH und LH steuern die Reifung der Eizelle, und LH ist an der Auslösung des Eisprungs beteiligt. Die Hormone Östrogen und Progesteron werden in den Ovarien gebildet. [© Mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. F. Schoeni-Affolter] <http://www.unifr.ch/histologie/elearningfree/allemand/biochemie/endocrin/ovar/d-ovar.php>

## 2. Die Ovulationsphase

Die Ovulation wird vom sprungreifen Follikel selbst ausgelöst. Das Östradiol aus seiner Theka interna stimuliert die Granulosazellen unabhängig von der Hypophyse zur Östrogenproduktion. Zusätzlich werden in der Granulosa Androgene, die in der Theka gebildet werden, zu Östradiol aromatisiert. Der Östradiol Gehalt im Blut steigt stark an, und der Östradiol Peak löst in der Hypophyse 14 Stunden später die Entleerung des LH-Depots im Hypophysenvorderlappen und damit den LH-Peak aus (siehe Abb. 4).

Der LH-Peak bewirkt, dass die Granulosazellen ihre Ausläufer aus der Eizelle und der Zona pellucida zurückziehen. Weiterhin löst sich die Eizelle von der Zona pellucida, so dass ein perivitelliner Raum (PVR) entsteht. Im Zellkern wird die 1. Reifeteilung beendet. Die Chromosomen kondensieren zur Transportform, die Kernmembran löst sich auf (gerrninal vesicle breakdown) und der 1. Polkörper wird abgeschnürt. Nach einer kurzen Dekondensation der Chromosomen beginnt die 2. Reifeteilung, die wieder in der Metaphase arretiert wird. Es kommt zur Ovulation. Hierbei wird die Follikelwand aufgelockert, ein Flüssigkeitsstrom schwemmt schließlich die Eizelle mit einer Wolke aus abgelösten Granulosazellen in den Eileiter.

## 3. Die Lutealphase

Der gesprungene Follikel wandelt sich zum Gelbkörper (Corpus luteum) um und produziert große Mengen an Östradiol und Progesteron. Letzteres bewirkt die Differenzierung des Endometriums. Zwischen FSH und LH stellt sich wieder ein Gleichgewicht ein. Findet keine Implantation statt, entsteht im Corpus luteum selbst Oxytozin, das den Gelbkörper degenerieren lässt. Durch den Abfall des vom Corpus luteum gebildeten Progesteron und Östrogenspiegels wird die Menstruation ausgelöst (siehe Abb. 4).

## **1.5 Numerische Chromosomenaberrationen**

Von numerischen Aberrationen spricht man, wenn es zu Abweichungen in der Anzahl einzelner Chromosomen oder des gesamten Chromosomensatzes einer Zelle kommt. Sie können sowohl bei Autosomen als auch bei Geschlechtschromosomen (Gonosomen) auftreten.

Eine Form numerischer Aberrationen beim Menschen ist die Aneuploidie, die sowohl in somatischen Zellen als auch in Keimzellen anzutreffen ist. Hierbei treten einzelne Chromosomen in vermehrter (Hyperploidie) oder in verminderter Zahl (Hypoploidie) auf. Es entstehen Monosomien ( $2n-1$ ) oder Trisomien ( $2n+1$ ).

Kommen Aneuploidien dagegen in Keimzellen vor, sind diese für den entstehenden Embryo zumeist letal, d.h. es tritt entweder keine Schwangerschaft ein, oder es kommt in der Frühschwangerschaft zum Abort. Einige Aneuploidien führen dennoch zu lebendgeborenen Nachkommen, die dann jedoch klinisch auffällig sind. Beispiele hierfür sind: Trisomien der autosomalen Chromosomen 13 (Patau Syndrom), 18 (Edwards Syndrom), 21 (Down Syndrom) sowie die Monosomie X (Turner) und die Konstellation XXY (Klinefelter) und XXX unter den Geschlechtschromosomen.

Unter Polyploidie, einer weiteren numerischen Aberration, versteht man eine Vervielfachung des gesamten Chromosomensatzes, die bei menschlichen Embryonen letal ist.

## **1.6 Entstehung von Aneuploidien in Eizellen**

Der Prozess der Meiose (siehe 1.3) ist sensibel gegenüber inneren und äußeren Einflüssen, so dass es in der Eizellentwicklung hin und wieder zu Fehlverteilungen der Chromosomen kommt.

Man unterscheidet hierbei zwei Arten von Fehlverteilungen: (1) die Nondisjunction von zwei homologen Chromosomen, bei der beide Chromosomen entweder vollständig in die Eizelle oder den Polkörper gelangen und (2) die Predivision, die eine vorzeitige Trennung von Schwesterchromatiden darstellt. Die Predivision kann balanciert oder unbalanciert erfolgen. Balanciert bedeutet, dass je zwei Chromatiden eines Chromosoms in Polkörper oder Eizelle gelangen, diese aber nicht mehr verbunden sind. Bei einer unbalancierten Predivision wird entweder nur eines oder drei Chromatiden in den Polkörper abgeschnürt. Die unbalancierte Predivision in der Meiose I verursacht Trisomien oder Monosomien der entsprechenden Chromosomen, welche das häufigste Krankheitsbild beim Menschen darstellen (Angell 1991).

Auch in der Meiose II können Fehlverteilungen auftreten (Sherman et al. 1991). Sherman et al. beschreiben, dass 74,2 % der Aneuploidien bereits in der Meiose I auftreten, einer neueren Untersuchung von Kuliev und Verlinsky (2004) nach treten 41,9 % der Aneuploidien nach der I. und 37 % nach der II. Meiose auf. Unter 10 % der Aneuploidien sind paternal. Zum Beispiel wird eine Aneuploidie paternaler Herkunft in Chromosom 21 in zwischen 5 % und 8 % der Fälle berichtet (Ballesta et al. 1999, Hixen et al. 1998 und Petersen et al. 1993). In Chromosom 18 liegt die Rate bei ca. 3 % (Fischer et al. 1995).

### 1.6.1 Auswirkungen von Aneuploidien

Durch das Auftreten von Fehlverteilungen in der Meiose kommt es zu aneuploiden Gameten und folglich zu aneuploiden Embryonen. Die meisten numerischen chromosomalen Aberrationen, insbesondere Monosomien, sind letal und enden mit einem Abort.

Trotzdem kommen Aneuploidien beim Menschen recht häufig vor. Etwa 0,3 % aller lebendgeborener Kinder weisen Aneuploidien auf, die zumeist in den Geschlechtschromosomen auftreten oder es handelt sich um eine Trisomie 21. Bei spontanen Aborten werden sogar in 1/3 der Fälle Aneuploidien gefunden, am häufigsten eine Monosomie in den Geschlechtschromosomen (45,X) oder eine Trisomie 16 (Hassold und Hunt 2001). Kinder, die trotz einer Aneuploidie lebensfähig sind, weisen meist schwerwiegende geistige und körperliche Auffälligkeiten auf. Die am häufigsten auftretende Erkrankung ist die Trisomie 21 (Down-Syndrom), die mit Veränderungen des Gesichts, kurzer Statur und geistiger Retardierung einhergeht. Seltener ist die Trisomie 13 (Patau-Syndrom), die zu schweren Störungen der Augen, des Kreislaufs und des Gehirns sowie zu einer Gaumenspalte führt.

Die Trisomie 18 (Edwards-Syndrom) verursacht Schäden in fast allen Körperorganen und führt meist innerhalb eines Jahres zum Tode.

Weil diese Aneuploidien am häufigsten auftreten und aus ihnen lebensfähige Kinder entstehen können, die dann schwere Schäden aufweisen, werden die betroffenen Chromosomen in die meisten Untersuchungen zur Präimplantationsdiagnostik und Pränataldiagnostik einbezogen.

## 1.7 Reproduktionsmedizinische Techniken

Die Reproduktionsmedizin ist ein Gebiet, das sich mit der Erforschung aller Prozesse der menschlichen Fortpflanzung beschäftigt. Ihr wichtigster Aspekt ist es zu versuchen unfruchtbaren Paaren durch assistierte Befruchtung zu Kindern zu verhelfen. Ein Paar gilt als unfruchtbar, wenn nach einem Jahr mit regelmäßigem, ungeschütztem Geschlechtsverkehr keine Konzeption stattgefunden hat. Ca. 10 –15 % aller Paare werden nach Untersuchung als unfruchtbar eingestuft. Bei unfruchtbaren Paaren ist die ungewollte Kinderlosigkeit zu 30 % auf männliche Ursachen, zu 25 % auf weibliche, zu 40 % auf beide und 5 % auf ungeklärte Ursachen zurückzuführen (BRZ Stand April 2005).

Durch die Techniken der Reproduktionsmedizin werden diesen Paaren neue Möglichkeiten eröffnet, Nachwuchs zu bekommen.

Ein relativ neuer Aspekt ist hierbei die genetische Untersuchung von Eizellen (und im Ausland auch der Embryonen), um durch das Auswählen genetisch intakter Eizellen die



Schwangerschaftsrate zu steigern, die Abortrate zu senken und / oder den Eltern, die spezifische genetische Defekte aufweisen, zu genetisch gesunden Nachkommen zu verhelfen.

### **1.7.1 In-Vitro-Fertilisation (IVF)**

Die In-Vitro-Fertilisation wurde zuerst 1978 in England mit der Geburt des ersten durch extracorporale Befruchtung entstandenen Babys Luise Brown (Harris 1978) etabliert. Heute sind in der assistierten Reproduktion verschiedene Methoden etabliert, die in der Routinearbeit erfolgreich angewendet werden. Neben der eigentlichen In-Vitro-Fertilisation wird die Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) und zunehmend auch die Präimplantationsdiagnostik (PID) angewendet.

Bei der In-Vitro-Fertilisation werden die gewonnenen Eizellen und Spermien eines Paares zusammen in ein Röhrchen gegeben und so die Befruchtung außerhalb des Körpers herbeigeführt. Zwei bis drei Tage später werden der Embryo bzw. die Embryonen in den Uterus der Frau zurückgesetzt. Dort implantieren sie entweder wie bei einer natürlichen Empfängnis oder werden mit der nächsten Monatsblutung abgestoßen.

### **1.7.2 Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)**

Die Intrazytoplasmatische Spermieninjektion ist mittlerweile ebenfalls eine weltweit gut etablierte Methode. Erstmals wurde sie von Lanzendorf et al. (1988) an menschlichen Eizellen durchgeführt, Palermo et al. (1992) erzielte die erste Schwangerschaft. Die Spermieninjektion wird angewendet, wenn der Mann aufgrund nicht ausreichender Menge oder Beweglichkeit der Spermien die Ursache für eine ausbleibende Schwangerschaft darstellt. Bei der Intrazytoplasmatische Spermieninjektion wird lichtmikroskopisch ein Spermium mit Hilfe eines Mikromanipulators aktiv in eine zuvor durch Follikelpunktion gewonnene Eizelle injiziert. Die entstandenen Embryonen werden wie bei der In-Vitro-Fertilisation einige Tage später in den Uterus zurückgesetzt.

Um eine Intrazytoplasmatische Spermieninjektion durchführen zu können, müssen zuvor die Kumuluszellen, die sich um die Eizelle herum befinden, entfernt werden. Dadurch wird auch die Beobachtung verschiedener morphologischer Kriterien der Eizelle wie Farbe und Granulierung des Zytoplasmas, Größe und Granulierung des perivitellinen Raumes (PVR), die Morphologie des oder der Polkörper und die Dicke und Struktur der Zona pellucida ermöglicht. Welchen Einfluss die einzelnen morphologischen Faktoren auf die Befruchtungsrate, die Embryoqualität, die Implantation und schließlich auf die Geburt eines gesunden Kindes haben, wird in der Literatur noch immer kontrovers diskutiert (Serhal et al 1997, Balaban et al. 1998, Kahraman et al. 2000).

### 1.7.3 Präimplantationsdiagnostik (PID)

Mit der Entwicklung der Polkörperdiagnostik, die erstmals 1990 in Amerika von Verlinsky angewendet wurde (Verlinsky et al. 1990), wurde zugleich ein Einblick in die genetischen Zustände der Eizellen gestattet. Während im Ausland die genetische Untersuchung der Embryonen möglich ist, und auch die Embryonen nach morphologischen und genetischen Faktoren selektiert werden dürfen, erlaubt das deutsche Embryonenschutzgesetz nur die Auswahl von Eizellen vor dem Eintreten der Kernverschmelzung. Diese Limitierung macht es erforderlich nach morphologischen und genetischen Kriterien zu suchen, die eine Eizelle mit hoher Potenz zur Implantation von anderen unterscheidet.

In der Gynäkologie der Uni-Klinik Bonn wurde im Jahre 2002 erstmals in Deutschland die Polkörperdiagnostik bei Paaren angewendet (van der Ven et al 2002), die sich einer künstlichen Befruchtung mit Intrazytoplasmatischer Spermieninjektion unterzogen. Die Methode wurde zunächst entwickelt, um die Schwangerschafts- und Geburtenrate nach einer künstlichen Befruchtung zu steigern bzw. die Abortrate in der Frühschwangerschaft zu senken.

Da die meisten Aneuploidien in den weiblichen Gameten auftreten, entsteht für die Patientinnen durch die Auswahl einer gesunden Eizelle ein Vorteil, auch wenn die paternalen Chromosomen unbeachtet bleiben. Für die Polkörperentnahme aus der Eizelle stehen derzeit drei gängige Methoden zur Verfügung: Die Öffnung der Zona pellucida mittels saurer Tyrode-Lösung, wie sie von Gordon et al (1990) und der Arbeitsgruppe um Munné (Gutierrez-Mateo et al. 2004a) durchgeführt wird. Hierzu wird eine Mikronadel mit saurer Tyrode-Lösung (pH 2,3) gefüllt, der Polkörper in die zwölf Uhr Position gebracht und die Lösung an der Zona pellucida neben dem Polkörper langsam ausgeblasen, bis sich die Zona an dieser Stelle auflöst.

Die zweite Möglichkeit ist die Zona-Öffnung durch Mikrodissektion, wie sie von der Arbeitsgruppe um Verlinsky durchgeführt wird (Cieslak et al 1999). Hierbei wird über dem Polkörper eine Mikronadel durch die Zona pellucida und den perivitellinen Raum geführt, so dass die Eizelle nach dem Lösen von der Haltepipette an der Mikronadel hängt. Nun wird mit der Haltepipette an der Mikronadel gerieben und so der erste Schnitt gemacht. Ein zweiter Schnitt wird senkrecht dazu ausgeführt, bis ein kreuzförmiger Schlitz entstanden ist. Durch diesen wird der Polkörper biopsiert.

Die dritte Methode ist das Zona Drilling mit Hilfe eines 1,48 µm Dioden Lasers, mit dessen Hilfe ein Loch in die Zona pellucida geschossen wird. Diese Methode wird in dieser Arbeit verwendet (siehe 2.2.2) und wird auch von Montag et al. (1998) favorisiert.

Chromosomenfehlverteilungen treten vor allem bei höherem mütterlichen Alter auf. Daher ist die Präimplantationsdiagnostik insbesondere Paaren höheren reproduktionsbiologischen Alters, ca. ab 35 Jahren, zu empfehlen, die sich einer künstlichen Befruchtung unterziehen. Auch bei Frauen, die mehrere Frühaborte mit numerischen Aberrationen der Chromosomen hatten, kann die Auswahl einer genetisch gesunden Eizelle das weitere Abortrisiko senken.

## **1.8 Chancen und Grenzen der Polkörperdiagnostik**

Die Polkörperdiagnostik kann nur bei Paaren angewendet werden, die sich einer künstlichen Befruchtung unterziehen. Da die Untersuchung sich nur auf die Eizellen beschränkt, bleiben Schäden des väterlichen Chromosomensatzes unerkannt. Zudem können genetische Schäden auch noch während der Befruchtung und der frühen Embryonalentwicklung entstehen, die von der Polkörperdiagnostik aber ebenfalls nicht erfasst werden.

Da aber sehr viele schwerwiegende Aneuploidien auf das weibliche Erbgut zurückgehen (Antonarakis 1992), wie zum Beispiel die Trisomien 13 und 18 und auch von dem mütterlichen Alter abhängen wie z.B. Trisomie 21 könnten mit der Untersuchung der Polkörper möglicherweise viele chromosomenbedingte Aborte und Fehlbildungen verhindert werden.

Wünschenswert für die Zukunft wäre die Entwicklung einer Technik, die es ermöglicht alle Chromosomen gleichzeitig zu untersuchen und nicht nur wie zur Zeit fünf Chromosomen mit der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung. Hierzu wäre die vergleichende Chromosomenhybridisierung (CGH = comparative genomic hybridisation) eine geeignete Methode. Um ein solches Verfahren nach geltendem Recht auch in Deutschland durchführen zu können müsste das genetische Ergebnis 18-20 h nach der Spermieninjektion vorliegen. Da die vergleichende Chromosomenhybridisierung aber bisher vorwiegend in der onkologischen Diagnostik Anwendung findet, existieren nur Protokolle in denen zwei bis drei Tage nötig sind, um ein Ergebnis zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit soll daher versucht werden, ein Protokoll für die vergleichende Chromosomenhybridisierung zu entwickeln, das eine Auswertung des Ergebnisses im erlaubten Zeitrahmen zulässt.

## **1.9 Zielsetzungen**

- In dieser Arbeit soll einerseits das noch nicht weit verbreitete Verfahren der Polkörperdiagnostik in der Uni Frauenklinik Kiel etabliert und eine gleichgute oder bessere Schwangerschaftsrate wie bei der konventionellen Intracytoplasmatischen Spermieninjektion erzielt werden, um anschließend eine Studie zu beginnen, die den Erfolg der Polkörperdiagnostik untersucht.

- Die Klärung der Frage, ob und in welchem Maße die Polkörperdiagnostik einen Anstieg in der Schwangerschaftsrate und der Baby-Take-Home-Rate bedingt und ob eine genetische Untersuchung der Polkörper auch einen Vorteil bei jüngeren Patientinnen darstellt, soll im Rahmen dieser Arbeit und einer sich anschließenden Studie untersucht werden.
- Weiterhin soll durch die Erhebung von biometrischen und morphologischen Daten der Eizellen eine mögliche Korrelation zwischen der Morphologie einer Eizelle und deren genetischem Zustand untersucht werden. Diese könnte zu einer Indikationsstellung für oder gegen die Durchführung der Polkörperdiagnostik bei einer Patientin beitragen. Anhand dieser Daten sollen Kriterien herausgestellt werden, anhand derer eine bessere Auswahl der Eizellen nach morphologischen Kriterien möglich ist.
- Außerdem sollen in dieser Arbeit neue Wege der Polkörperdiagnostik gesucht werden, die eine Untersuchung des gesamten Genoms in der vom Embryonenschutzgesetz geforderten Zeitspanne erlauben (s.o.). Zu diesem Zweck wurde versucht, eine vergleichende Chromosomenhybridisierung (CGH) an Polkörpern durchzuführen, welche im Ausland bereits praktiziert wird (Gutierrez-Mateo 2004a, b), und zudem das Protokoll so zu variieren, dass die Untersuchung reproduzierbare Ergebnisse bereits nach 18 Stunden liefert.

---

## 2 Methoden

Alle verwendeten Materialien wie Chemikalien, Kits, Puffer, Lösungen, Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien sind in entsprechenden Tabellen im Anhang dieser Arbeit aufgelistet. Angaben zu den jeweiligen Herstellern, sowie Zusammensetzungen von Lösungen sind im folgenden Text nicht weiter aufgeführt, sondern ebenfalls den Tabellen im Anhang zu entnehmen. Auch die Pipettierschemata für die PCR-Ansätze wurden dort zusammengestellt.

### 2.1 Extrakorporale Befruchtung

#### 2.1.1 Oozytengewinnung

Durch Ärzte der Frauenklinik in Kiel wurde bei 60 Patientinnen durch Verabreichung von GnRH- (Gonadotropin releasing hormone) Agonisten ein Ausschalten der endogenen Produktion von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) und luteinisierendem Hormon (LH) herbeigeführt. Zugleich erfolgte eine ovarielle Stimulation mit rekombinantem FSH bis die Follikel der Patientinnen einen Durchmesser von >16 mm aufwiesen. Dann wurde durch die einmalige Injektion von Humanem Chorion Gonadotropin (HCG) die Ovulation ausgelöst.

Die Follikelpunktion erfolgte 36 h nach HCG-Gabe. Hierbei wurden transvaginal unter Ultraschallkontrolle mit einer Punktionsnadel die Follikel im Ovar durch den Scheidengrund punktiert und die Follikelflüssigkeit samt Eizellen abgesaugt.

Anschließend wurde die Follikelflüssigkeit auf Eizellen hin untersucht. Die aufgefundenen Eizellen wurden mit dem sie umgebenden Kumuluskomplex mit einer Pasteurpipette in einer Petrischale mit 37°C warmen Kulturmedium gewaschen. Anschließend wurden die Eizellen bis zur weiteren Behandlung in 5 ml Röhrchen (je zwei im Falle einer In-Vitro-Fertilisation (IVF) und fünf im Falle einer Intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) im gleichen Kulturmedium im Brutschrank (37°C, 0,5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert.

#### 2.1.2 Aufbereitung der Spermien – Swim-Up

Frisch gewonnenes Ejakulat wurde zunächst eine halbe Stunde zum Verflüssigen bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden jeweils 1 ml Ejakulat mit 2,5-3 ml Kulturmedium in einem Röhrchen gut gemischt. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt für zehn Minuten bei 250 x g für die Intrazytoplasmatische Spermieninjektion, und bei 180 x g für die In-Vitro-Fertilisation und die Insemination (Assisted insemination husband = AIH). Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml Kulturmedium für die In-Vitro-Fertilisation und mit 0,5 ml Medium für die Spermieninjektion und die Insemination überschichtet. Der Ansatz wurde 30-60 Minuten zum Aufschwimmen der Spermien in einem

begasten Brutschrank bei 37°C und einer CO<sub>2</sub> Konzentration von 0,5 % inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand, der lediglich vitale Spermien enthielt, in ein neues Röhrchen überführt.

### **2.1.3 In-Vitro-Fertilisation (IVF)**

Nach dem Spermien-Swim-Up wurde durch Auszählen mit Hilfe einer Markler-Kammer die Spermienkonzentration ermittelt. Drei bis sechs Stunden nach der Eizellgewinnung wurden zu einer Eizelle ca. 100.000, zu zwei Eizellen ca. 150.000 Spermien in das Röhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden dann im Inkubator bei 37°C und 0,5 % CO<sub>2</sub> bis zu 20 h inkubiert und anschließend eine Überprüfung der Befruchtung durchgeführt (siehe 2.1.6). Hierzu mussten zunächst die Kumuluszellen mit dünn ausgezogenen Pasteurpipetten entfernt werden.

### **2.1.4 Vorbereitung der Intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI)**

Vor Beginn einer Spermieninjektion wurden zunächst dicke und dünne Pasteurpipetten (160-300 µm) durch Erhitzen und Ausziehen steriler Glas-Pasteurpipetten hergestellt:

Hierzu wurden 250 mm lange Glas-Pasteurpipetten kurz vor ihrer Verdickung mit der Flamme eines Bunsenbrenners erhitzt. Sobald das Glas weich wurde, wurde die Pipette aus der Flamme genommen und auseinander gezogen. Zum Durchbrechen der Verbindung wurde der dünne Teil der ausgezogenen Pipette in die Flamme gehalten. Dann wurde die lange Spitze vorsichtig abgebrochen. Durch verschieden schnelles und weites Ziehen der Pipetten ließen sich Öffnungen mit unterschiedlichen Durchmessern herstellen.

Es wurden mehrere Kulturschälchen mit je 1 ml Kultur-Medium und Hyaluronidase vorbereitet und auf 37°C vorgewärmt.

Die Hyaluronidasebehandlung diente der enzymatischen und mechanischen Entfernung von Kumuluszellen von der Eizelle. Hierzu wurden alle Eizellen aus einem Röhrchen in die Hyaluronidase-Schale gegeben und vorsichtig durch Ein- und Ausblasen zunächst mit den größeren, dann mit den kleineren Pipetten von den Kumuluszellen befreit. Bei der anschließenden Übertragung in Kulturmedium wurden die restlichen Kumuluszellen mechanisch durch Pipettieren entfernt. In die Petrischalen für die Spermieninjektion wurden zwei Tropfen PVP (Poly vinyl pyrrolidone) und mehrere Tropfen HAMS F 10 Medium pipettiert und mit Öl überschichtet (siehe Abb. 6a). Ein kleiner Tropfen des aufgearbeiteten Spermas wurde in die vorbereitete Petrischale in einen Tropfen PVP geben. Das zähflüssige PVP diente hierbei dem Einschränken der Spermienbeweglichkeit.

Die Eizellen wurden in die Mediumtropfen der Spermieninjektions-Schale pipettiert und diese auf den beheizten Ring des Mikroskops gestellt.

### 2.1.5 Durchführung der Intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI)

Die Halte- und Injektionspipette wurden in den entsprechenden Halterungen am Mikromanipulator installiert (siehe Abb. 5), in den PVP-Tropfen abgesenkt und durch die Kapillarkräfte mit PVP bis über deren Winkel hinweg gefüllt.

Vor dem Einsaugen der Spermien wurden diese durch einen Schlag auf den Schwanz immobilisiert. Wenn sich das ausgewählte Spermium nicht mehr bewegte, wurde es mit dem Schwanz voran in die Injektionspipette aufgenommen.

Die Injektionspipette wurde zunächst in einem Mediumtropfen gewaschen, da PVP in größeren Mengen schädlich für die Eizellen ist.

Dann wurde die Eizelle mit der Haltepipette angesaugt und der Polkörper auf 6 bzw. 12 Uhr Stellung positioniert. Das Spermium wurde in die Spitze der Injektionspipette gebracht, diese in die Eizelle eingestochen, eingesaugt bis das Oolemma gerissen ist und dann ausgeblasen bis das Spermium gerade die Pipette verlassen hat. Fertig injizierte Eizellen wurden an der Oberkante des Mediumtropfens positioniert.

Die Eizellen wurden in Kultur-Medium gespült und dann im gleichen Medium bei 37°C inkubiert.

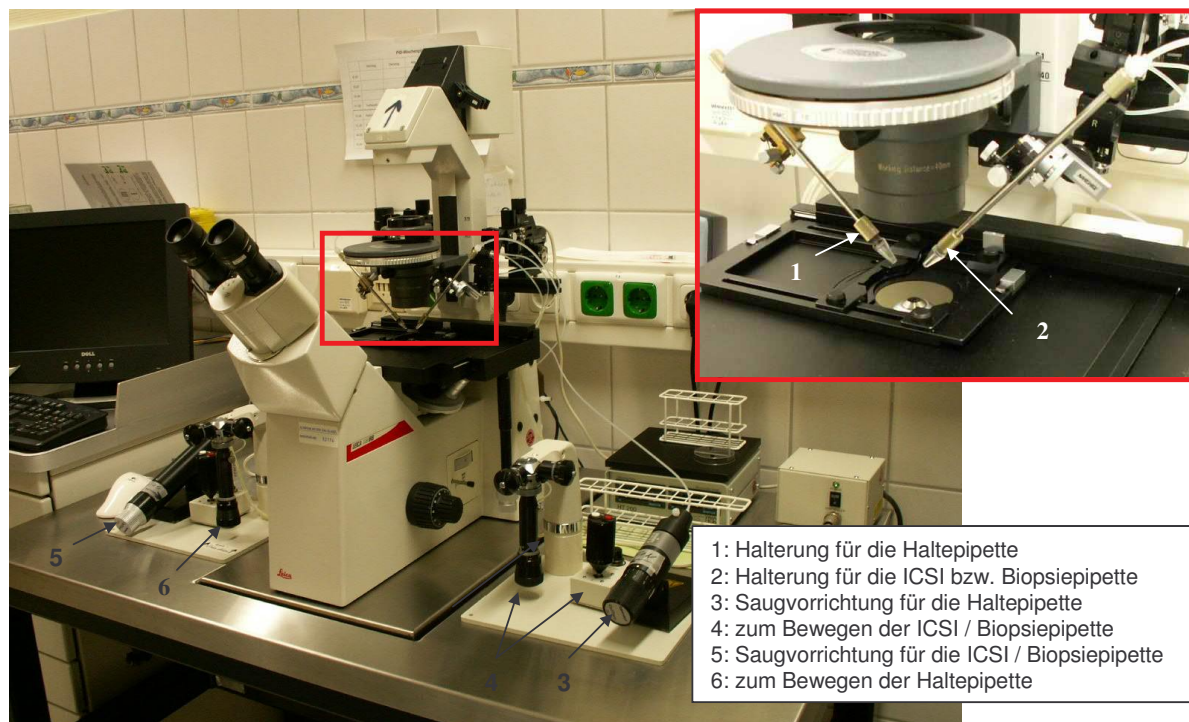


Abb. 5 Mikromanipulator zum Durchführen der Spermieninjektion und der Polkörperbiopsie

### **2.1.6 Überprüfung der Befruchtung**

18 bis 20 Stunden nach der Intrazytoplasmatischen Spermieninjektion wurden die Eizellen auf ihre Befruchtung hin untersucht und die Morphologie an Tag 1 beschrieben. Hierzu mussten die Eizellen aus einer In-Vitro-Fertilisation zunächst von ihren Kumuluszellen befreit werden. Dies geschah wie bei der Vorbereitung der Spermieninjektion, mit dem Unterschied, dass nach erfolgter In-Vitro-Fertilisation keine Behandlung mit Hyaluronidase mehr erforderlich war. Es wurde überprüft, ob und wie viele Vorkerne eine Eizelle enthielt. Nur Eizellen mit zwei Vorkernen galten als regelrecht befruchtet und wurden gegebenenfalls weiterkultiviert. Neben der Lage und der Größe der Vorkerne wurden auch die in ihnen enthaltenen Nukleoli betrachtet. Je nach deren Anzahl, Größe und Anordnung wurden die Eizellen nach Tesarik und Greco (1999) in die Gruppen Pattern 0 bis 5 eingeteilt. Zusätzlich wurden auch die Morphologie der Polkörper und die Beschaffenheit des Zytoplasmas bewertet. Das Zytoplasma wurde in vier Qualitätsstufen eingeteilt, von 1 = homogen bis 4 = stark granuliert bzw. beginnende Degeneration.

## **2.2 Etablierung der Polkörperdiagnostik**

### **2.2.1 Vorarbeiten**

Um das Handling zu erlernen wurde zunächst die Biopsie des ersten Polkörpers an ca. 200 unbefruchtet gebliebenen Eizellen durchgeführt. Anschließend wurde die Übertragung der Polkörper auf einen Objektträger geübt und verschiedene Fixierungstechniken getestet, die im Folgenden näher erläutert werden:

#### 2.2.1.1 Fixierungsverfahren

1.) Bei dem Verfahren nach Tarkowski (1966) wurde der Polkörper für 10 bis 15 Minuten in einer hypotonischen Lösung inkubiert. Der Polkörper wurde mit möglichst wenig hypotonischer Lösung auf einen sauberen Objektträger übertragen, und ein 20 µl großer Tropfen 3:1 (Methanol: Eisessig) Fixativ wurde auf Polkörper und hypotonische Lösung aufgetropft. Die Bewegung des Polkörpers in der Flüssigkeit wurde unter dem Mikroskop verfolgt und die letztendliche Position mit einem Diamantschreiber markiert. Durch das Fixativ platzte der Polkörper und die Chromosomen wurden auf dem Objektträger gespreitet und fixiert.

2.) Bei der graduellen Fixierung nach Kamiguchi und Mikamo (1986) wurde der Polkörper nach Inkubation in der hypotonischen Lösung in das erste Fixativ (Methanol: Eisessig: Wasser = 5:1:4) übertragen und hierin fünf Minuten inkubiert. Dann wurde er mit einer kleinen Menge des Fixativs auf einen Objektträger übertragen und bevor dieses getrocknet



war mit einer Schicht des zweiten Fixativs (Methanol: Eisessig = 3:1) bedeckt. Im Anschluss wurde der Objektträger sofort in eine Glasküvette mit dem zweiten Fixativ gestellt und dort fünf Minuten inkubiert, bevor er für eine Minute in einer Glasküvette mit einem dritten Fixativ (Methanol: Eisessig: Wasser = 3:3:1) inkubiert und anschließend getrocknet wurde.

3.) Die letztendlich in dieser Arbeit verwendete Methode ist eine Abwandlung der Methode von Tarkowski (1966). Hierbei wurden die Polkörper in einen 0,2-0,4 µl großen Tropfen hypotonischer Lösung überführt, der auf dem Objektträger vorgelegt wurde und in diesem vollständig eingetrocknet. Erst nachdem alle Polkörper auf diese Weise auf den Objektträger übertragen waren, erfolgte die Fixierung. Hierzu wurden neben die eingetrockneten Polkörper zügig 10 µl des eisgekühlten 3:1 Methanol: Essigsäure-Fixativs pipettiert und beobachtet, dass das Fixativ sich über alle Polkörper hinweg verteilte. Bevor es vollständig verdampft war, wurden weitere 10 µl neben die Polkörper-Kreise pipettiert.

Danach wurde der Objektträger vollständig getrocknet und fünf Minuten in reinem Methanol bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger luftgetrocknet und bis zum Auftragen der Hybridisierungsprobe staubdicht aufbewahrt.

#### 2.2.1.2 Biopsieverfahren

1.) Bei der enzymatischen Öffnung der Zona pellucida mit saurer Tyrode Lösung wurde nach Gordon and Gang (1990) vorgegangen. Die Eizelle wurde an der Haltepipette fixiert und der Polkörper bei sechs Uhr oder 12 Uhr positioniert. Die Tyrodelösung wurde in die Drillingpipette eingesaugt. Dann wurde sie neben dem Polkörper an die Zona geblasen bis durch die enzymatische Einwirkung ein Loch entstand. Wenn der Polkörper nicht spontan aus der Zona austrat, wurde mit der Drillingpipette an der dem Loch gegenüberliegenden Seite an die Zona gedrückt und so der Polkörper herausgeschoben. Anschließend wurde die Drillingpipette entfernt und die Biopsiepipette eingespannt und justiert. Mit dieser wurde nun der Polkörper aufgenommen und auf den Objektträger übertragen.

2.) Für die Zona Dissektion wurde das durch Cieslak (1999) beschriebene Verfahren verwendet. Die Eizelle wurde in einen Tropfen Medium mit Sucrose in die Biopsieschale pipettiert. Die Sucrose verursacht das Schrumpfen des Plasmas und macht die Eizelle dadurch weniger verletzlich. Die Eizelle wurde mit der Haltepipette angesaugt und dann mit einer Mikronadel (in diesem Fall wurde hierfür eine Injektions-Pipette verwendet, wie sie auch für die Spermieninjektion benutzt wird) so positioniert, dass der Polkörper sich in sechs oder 12 Uhr Stellung befand. Nun wurde die Nadel bei vier bis fünf Uhr (bzw. ein bis zwei Uhr) vorsichtig in die Zona ein- und bei sieben bis acht Uhr (bzw. zehn bis elf Uhr) wieder rausgestochen ohne den Polkörper zu verletzen. Dann wurde die Eizelle von der

Haltepipette losgelassen, so dass sie ausschließlich von der sie durchstechenden Nadel fixiert wurde. Die Haltepipette und die Nadel wurden gegeneinander gerieben, bis die Zona auf der Oberseite durchtrennt war und die Eizelle von der Nadel herunterfiel. Die Eizelle wurde anschließend wieder mit der Haltepipette aufgenommen und mit dem nun entstandenen Schlitz nach vorne positioniert. Die beschriebene Prozedur wurde wiederholt so dass man einen Kreuzschlitz erhielt. Anschließend wurde der Polkörper in der drei Uhr Stellung positioniert und mit der Biopsiepipette entnommen.

3.) Für die Patientenbehandlung wurde die Biopsie mit Hilfe eines Dioden Lasers ausgewählt (siehe 2.2.2).

### **2.2.2 Polkörperbiopsie**

Für die Polkörperbiopsie mit dem Laser-Manipulator (Octax, MTG) wurden zunächst die Biopsieschalen vorbereitet (siehe Abb. 6). Verwendet wurden Petrischalen mit extra niedrigem Rand, um ein Anstoßen der Manipulatorhalterung zu verhindern. Oben in der Petrischale befand sich ein Tropfen PVP (Poly vinyl pyrrolidone), darunter pro Eizelle links nebeneinander drei Tropfen HAMS F 10 Medium.

Zunächst wurden die Biopsie- und die Haltepipette in den Manipulator eingespannt und justiert. Das Ölsystem der Biopsiepipette wurde durch Ausblasen von Luft befreit. Dann wurde in die Biopsiepipette etwas Medium eingesogen, so dass die Grenze zwischen Öl und Medium noch im Mikroskop sichtbar blieb.

Die Haltepipette wurde mit einem Luftsystem gesteuert und daher mit zähflüssigem PVP gefüllt, um ein gleichmäßigeres Ansaugen der Eizellen zu gewährleisten.

Die Eizellen wurden mit Hilfe einer Mundschlauch-kontrollierten, ausgezogenen Pasteurpipette in den linken Mediumstropfen abgelegt. Dort wurden sie mit der Haltepipette angesaugt und mit der Biopsiepipette so positioniert, dass der erste Polkörper in der drei Uhr Stellung zu liegen kam. Nun wurde mit dem Laser bei drei Uhr direkt vor dem Polkörper mit ein bis zwei Schüssen (13,1 ms) ein Loch in die Zona pellucida geschossen. Die Biopsiepipette wurde an den Polkörper gelegt und dieser durch leichtes Ansaugen von der Eizelle gelöst und in die Biopsiepipette aufgenommen (siehe Abb. 12). Die Eizelle wurde von der Haltepipette gelöst und diese aus der Flüssigkeit hochgefahren. Die Biopsiepipette mit dem Polkörper wurde ebenfalls ein Stück hochgefahren, das Mikroskop zurückgeklappt und die Biopsieschale entnommen. Die biopsierten Eizellen wurden nun in Kulturmedium gewaschen und in entsprechend nummerierte Kulturtropfen überführt. Auf dem Objektträger wurde ein Tropfen (0,2-0,4 µl) hypotonische Lösung vorgelegt. Der Objektträger wurde unter

das Mikroskop gelegt, der Tropfen fokussiert und die Biopsiepipette abgesenkt. Nun wurde der Polkörper auf den Objektträger in den Tropfen hypotonischer Lösung abgelegt.

Unter dem Stereomikroskop wurde der Polkörper im Tropfen lokalisiert und das Eintrocknen der hypotonischen Lösung beobachtet. Um die Position des Polkörpers wurde mit einem Diamantschreiber ein Kreis in den Objektträger eingeritzt.

Die einzelnen Kreise wurden mit geritzten Linien verbunden und nummeriert, so dass man im Fluoreszenzmikroskop bei großer Vergrößerung den Linien zum nächsten Kreis folgen konnte und so eine sichere Zuordnung der Polkörper ermöglicht wurde (siehe Abb. 6). Vor der Biopsie der nächsten Eizelle wurde die Biopsiepipette in dem mittleren Tropfen von innen und außen gespült und mit neuem Medium gefüllt.

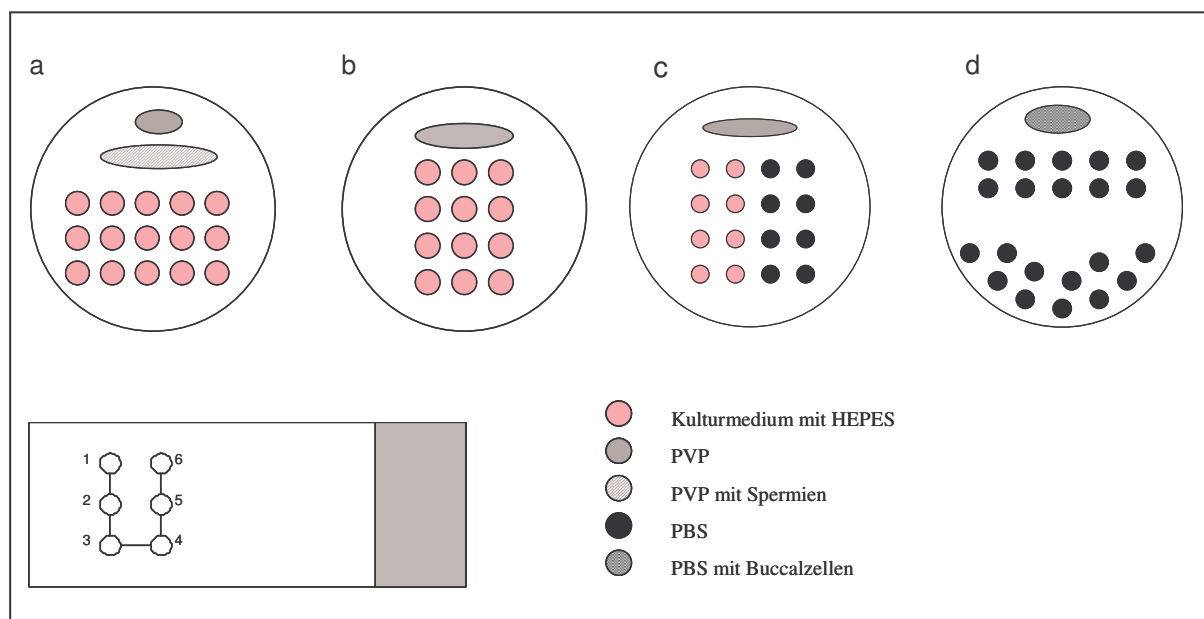


Abb. 6 a) Schale für die Intrazytoplasmatische Spermieninjektion b) Schale für die Polkörperbiopsie für die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) c) Schale für die Polkörperbiopsie für die vergleichende Chromosomenhybridisierung (CGH) d) Schale für die Buccalzellisolierung e) Positionierung der Polkörperkreise auf dem Objektträger

## 2.2.3 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) an Polkörpern

### 2.2.3.1 Fixierung des Polkörpers für die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung

Zur Fixierung der Polkörper für die Diagnostik mit Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung wurde die zuvor beschriebene Abwandlung der Tarkowski (1966) Methode verwendet (siehe 2.2.1)

### 2.2.3.2 Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurde das MultiVysion PB–Kit der Firma Vysis für die Chromosomen 13, 16, 18, 21, 22 verwendet, wobei es sich bei den Sonden 16 und 18 um Zentromersonden handelte, während 13, 21 und 22 lokusspezifische Sonden waren (siehe Tab. 1) Es wurde 1 µl der Sonde auf ein 7 x 7 mm Deckglas pipettiert und dieses mit dem invertierten Objektträger aufgenommen, so dass alle geritzten Kreise vom Deckglas bedeckt waren. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen entstanden. Außerdem durfte die Probe mit den Fluoreszenzfarbstoffen nicht über längere Zeit Licht exponiert werden. Das Deckglas wurde mit Fixogum versiegelt, um ein Austrocknen zu verhindern.

Tab. 1 Genloki der Chromosomensonden in der Polkörper-Probe (MultiVysion PB–Kit) der Firma Vysis

Chromosomen	Sonde	Locus
13	LSI 13 Spectrum Red	RB 1 Gene Locus 13q14
16	CEP 16 Spectrum Aqua	Zentromer Region (Satellite II, D16Z3) 16q11.2
18	CEP 18 Spectrum Blue	Zentromer Region (alpha-satellite, D18Z1) 18p11.1-q11.1
21	LSI 21 Spectrum Green	D21 S 259 D21 S 341 D21 S 342 21q 22.13 – 21q 22.2
22	LSI 22 Spectrum Gold	bcr locus 22q 11.2

Zur Hybridisierung wurde der Slide-Booster (Advalytix; siehe Abb. 7) verwendet. Dieses Gerät beinhaltet zwei Behälter (Abb. 7a), in die Aqua dest. gegeben wurde, um eine feuchte Kammer zu erzeugen. Die Röhrelemente (Abb. 7b) erzeugten durch Schallwellen eine Durchmischung der Probe auf dem Objektträger ohne in direkten Kontakt mit der Flüssigkeit zu treten. Da die einzelnen Kammern des Boosters, anders als bei PCR-Geräten, nur eine Temperatur halten aber nicht herunterkühlen können, wurde eine Kammer auf 75°C vorgeheizt. In dieser wurde eine fünfminütige Denaturierung bei 75°C durchgeführt. Eine weitere Kammer wurde für die Hybridisierung auf 37°C vorgeheizt.

Zur Hybridisierung wurde zwei Stunden mit einer Frequenz von 5:5 Sekunden geboostet (fünf Sekunden mischen – fünf Sekunden Pause). Danach wurde der Objektträger bis zur Auswertung bei 37°C im Slide-Booster belassen.

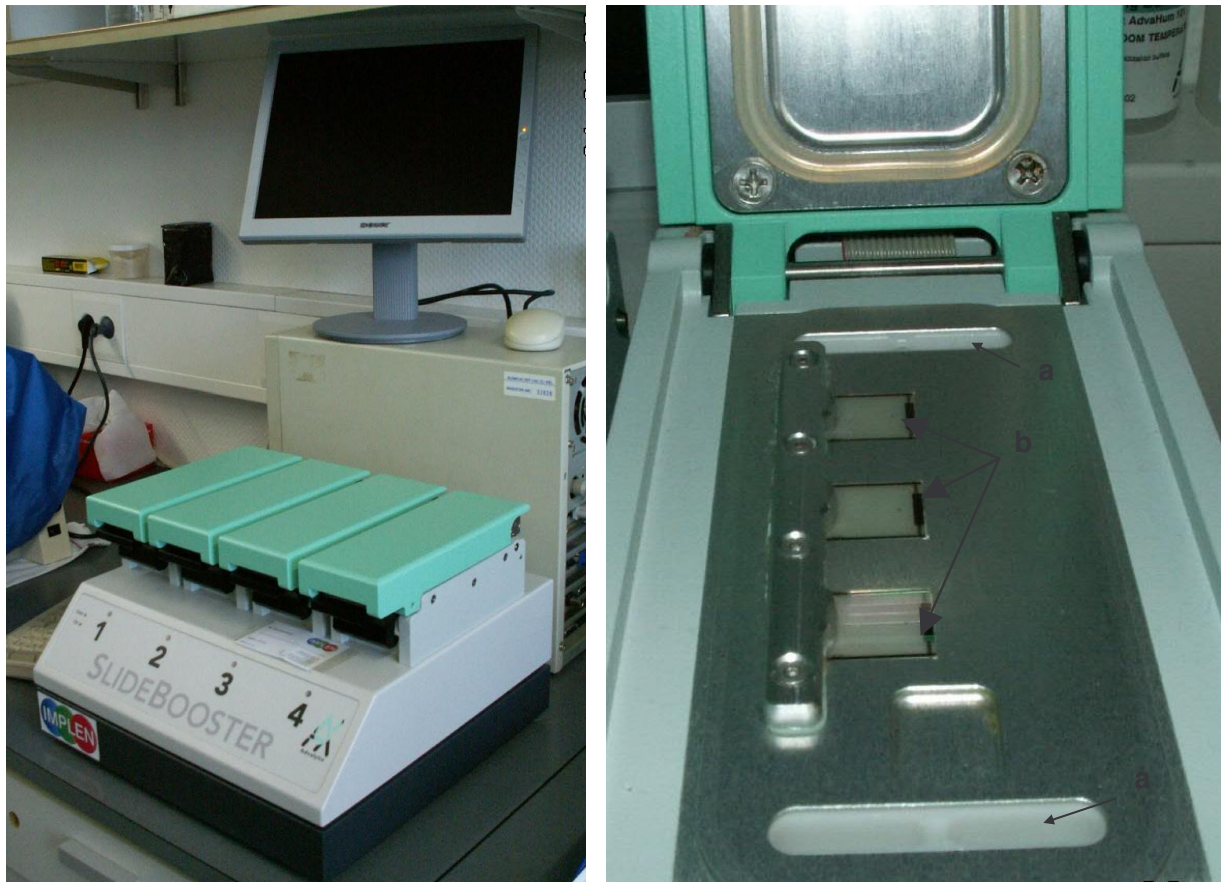


Abb. 7 Slide-Booster der Firma Advalytix. links: Booster mit Computer als Steuerungseinheit rechts: Blick auf die Röhrelemente des Boosters a) Behälter für Wasser zur Erzeugung einer feuchten Kammer b) Röhrelemente des Boosters

### 2.2.3.3 Detektion der Hybridisierungssignale

Nach der Hybridisierung wurde der Objektträger aus dem Booster genommen und das Fixogum sowie das Deckglas vorsichtig entfernt. Der Objektträger wurde fünf bis sieben Minuten in 72°C heißer 0,5 % SSC Lösung (siehe 6.1.7) gewaschen. Dazu wurde die Glasküvette mit dem Objektträger einige Sekunden geschwenkt und dann abgedunkelt weiter inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger in SSCT (siehe 6.1.7) bei Raumtemperatur überführt und erneut kurz geschwenkt. Nach zweiminütigem Waschen in SSCT folgte eine Inkubation in PBS für eine Minute. Der Objektträger wurde kurz in destilliertem Wasser abgespült, um die überschüssigen Salze zu entfernen, und trockengepustet. Dann wurden einige Tropfen Vecta Shield (ohne DAPI) auf ein 24 x 32 mm Deckglas gegeben und dieses mit dem invertierten Objektträger aufgenommen. Die Polkörper wurden schließlich mit dem Fluoreszenzmikroskop detektiert und ausgewertet.

#### 2.2.3.4 Auswertung der Signale

Zur Auswertung der Signale wurde das Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 mit den Filtern für DAPI, FITC, Spectrum Orange, Texas Red und Cy5 verwendet. Später wurden die Filter Spectrum Orange durch Spectrum Gold und DAPI durch Spectrum Blue ersetzt. Zunächst wurden im Texas Red Filter die eingeritzten Kreise inklusive Polkörper gesucht. Wurde ein entsprechendes Signal erkannt, erfolgte mit den anderen Filtern die weitere Signalsuche. Nach Auffinden des Polkörpers, wurde dieser mit dem 63er Objektiv in allen Filtern fotografiert. Die ISIS-Software verwaltete einfarbige Mikroskopbilder und setzte aus diesen mehrfarbige Bilder zusammen. Nun wurde anhand der Aufnahmen und der Mikroskopansicht die Zahl der einzelnen Signale bestimmt. Lagen zwei Signale einer Farbe eng beieinander, wurden sie als 2n (normal) bewertet, lagen sie weit auseinander lag eine balanced Predivision vor und wurde als 1n + 1n bewertet. Auch Eizellen mit dieser Konstellation galten als normal. Abweichungen der Signalanzahl bedeuteten eine Aneuploidie in der Eizelle.

Um eine zuverlässigere Aussage über die Signale treffen zu können, wurden Bewertungskriterien entwickelt, anhand derer die Bewertung der Signale erfolgte.

Hierzu wurden die Signale einiger Polkörper mit einem Graphikprogramm ausgeschnitten und in einer Tabelle gegenübergestellt. Hierdurch konnten Signalgrößen und –abstände für die Erstellung der Bewertungskriterien herangezogen werden (siehe Abb. 8).

Traten bei der Auswertung der Signale Zweifel auf, ob sich Signale innerhalb oder außerhalb der Polkörperstruktur befanden, wurde im Anschluss an die Bewertung eine DNA-Färbung mit DAPI durchgeführt. Hierzu wurde das Deckglas vom Objektträger entfernt und ein neues Deckglas mit einem DAPI enthaltenden Antifade aufgebracht. Im Anschluss wurden dann die Signale auf ihre Lage überprüft. Die Signale von Chromosom 16 und 18 waren nach der Gegenfärbung nicht mehr auswertbar, da der DAPI-Farbstoff die blaue Farbe der Signale überdeckte. Im Zweifel wurden die zuvor angefertigten Fotos zu Rate gezogen.

#### **2.2.4 Auswahl der Eizellen für den Embryotransfer nach Polkörperbiopsie**

Nach einer Polkörperbiopsie wurden in der Regel nur zwei Eizellen zwecks späterer Übertragung in den Mutterleib weiterkultiviert, um das Mehrlingsrisiko zu vermindern. Bei Patientinnen mit vielen Fehlversuchen und erhöhtem mütterlichen Alter wurden auch bis zu drei Embryonen transferiert.

Am Tag 1 nach der Follikelpunktion wurden die Ergebnisse der Polkörpergenetik mit den Befruchtungsergebnissen verglichen. Gab es zwei als euploid eingestufte, morphologisch intakte, befruchtete Eizellen, wurden diese für den Transfer weiterkultiviert. Wurden mehr als

zwei befruchtete Eizellen als euploid eingestuft, wurde nach der morphologischen Qualität ausgewählt. Gab es weniger als zwei euploide, morphologisch intakte, befruchtete Eizellen, wurden stattdessen Eizellen zum Transfer weiterkultiviert, bei denen die Polkörperanalyse kein Ergebnis gegeben hatte. Als aneuploid eingestufte Eizellen wurden von einer weiteren Kultivierung ausgeschlossen.

## **2.2.5 Patientenauswahl und Ausschlusskriterien für die Polkörperbiopsie**

### **2.2.5.1 Patienten:**

Während des Zeitraums dieser Arbeit wurde jedem Paar, das sich einer künstlichen Befruchtung mit Intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) unterziehen wollte, ungeachtet des Alters und der Zahl der vorherigen Versuche die Polkörperbiopsie als neue, sich in der Testphase befindliche Methode vorgestellt. Ihnen wurde hierbei vermittelt, dass wir hoffen, mit diesem Verfahren die Schwangerschaftsrate zu steigern und die Abortrate zu senken. Sie wurden jedoch auch darauf hingewiesen, dass diese Methode, insbesondere weil man nur die maternalen Erbanlagen betrachtet, keinen Anspruch erhebt, mit Sicherheit eine genetisch bedingte Behinderung des Kindes zu verhindern. Zudem wurden die Paare darüber aufgeklärt, dass die biopsierten Eizellen eine Kryokonservierung nicht überleben und wir diese daher nicht zusammen mit der Polkörperdiagnostik anbieten können. Die Durchführung der Biopsie wurde ihnen kostenfrei angeboten.

Wenn die Patienten Interesse an der Polkörperdiagnose bekundeten, wurden sie für eine eingehende Beratung ins Institut für Humangenetik der Uniklinik Kiel überwiesen. Im Anschluss daran konnten die Paare der Polkörperbiopsie zustimmen. Die hormonelle Stimulation der Patientinnen entsprach derer anderer Patientinnen, die sich einer konventionellen Spermieninjektion unterzogen. Nach der Follikelpunktion wurde für die Durchführung der Polkörperbiopsie entschieden, wenn mehr als sechs, später acht reife Eizellen vorlagen und kein anderes Ausschlusskriterium (siehe 2.2.5.2) zutraf.

Im Laufe dieser Arbeit wurde bei insgesamt 60 Paaren eine Polkörperbiopsie durchgeführt. Das Alter der Frauen lag dabei zwischen 23 und 41 Jahren (Durchschnitt 33,8 Jahre).

#### 2.2.5.2 Ausschlusskriterien:

Nach einigen durchgeführten Polkörperbiopsien wurden Kriterien entwickelt, anhand derer entschieden wurde, ob eine Polkörperbiopsie bei einer Patientin durchgeführt werden sollte. Um eine Polkörperbiopsie durchführen zu können, mussten mindestens sechs später acht reife Eizellen vorhanden sein, die keines der nachfolgenden Ausschluss-Kriterien erfüllten:

##### 1) Die Eizellen waren weich und instabil:

Waren die Eizellen bereits bei der Spermieninjektion ungewöhnlich weich und instabil, konnte man sie während der Biopsie nur unzureichend mit der Haltepipette ansaugen ohne sie zu beschädigen. Dadurch war nicht sicherzustellen, dass die Eizelle sich beim Ansaugen des Polkörpers mit der Biopsiepipette nicht von der Haltepipette löste. Zudem wurde bei diesen Eizellen ein hohes Risiko festgestellt, dass sich am nächsten Tag Zytoplasmanasen durch das Loch in der Zona bildeten oder das Zytoplasma komplett aus der Zona pellucida austrat. Wurde die Instabilität bei mehreren Eizellen der Patientin festgestellt, wurde auf eine Biopsie verzichtet, um die Eizellen nicht zu zerstören.

##### 2) Die Kumuluszellen ließen sich nicht hinreichend von den Eizellen entfernen, um den Polkörper zu entnehmen:

Gelegentlich kam es vor, dass sich Eizellen nicht von ihren umgebenden Kumuluszellen befreien ließen. Dies war fast immer bei unreifen Eizellen der Fall. Aber auch bei Eizellen in Metaphase II kam es vor, dass sich der innere Ring der Kumuluszellen nicht entfernen ließ. Die Biopsie wurde durch die Kumuluszellen stark erschwert. Das Durchdringen der Kumuluszellen und der Zona zum Polkörper hin mit der Biopsiepipette war kompliziert, und da die Kumuluszellen sehr klebrig sind, verklebte zum einen die Öffnung der Biopsiepipette sehr leicht und zum anderen hafteten zum Teil Kumuluszellen an der Biopsiepipette, die dann ungewollt mit auf den Objektträger übertragen wurden. In diesem Fall war nach der Hybridisierung nicht zweifelsfrei zu unterscheiden, ob die Signale aus dem Polkörper stammten oder aus einer Kumuluszelle. Zudem wurde bei diesen Eizellen die Beobachtung gemacht, dass der Polkörper noch sehr fest am Zytoplasma saß und sich nicht biopsieren ließ, ohne dass man das Oolemma beschädigte. Dies ist ebenfalls ein Zeichen von Unreife der Eizellen. Folglich wurden die Eizellen mit nicht entfernbaren Kumuluszellen von der Biopsie ausgeschlossen.



3) Das Zytoplasma der Eizelle enthielt Vakuolen, war stark deformiert oder degeneriert: Ein weiteres Kriterium zum Verzicht auf die Polkörperbiopsie war eine schlechte Beschaffenheit des Zytoplasmas der Eizellen. Enthielt das Zytoplasma der Eizelle viele granuläre Einschlüsse, Vakuolen, war deformiert oder sonst in irgendeiner Form degeneriert, wurde die Patientin ebenfalls von der Polkörperdiagnostik ausgenommen. Hierbei war die Befruchtungs- und Entwicklungsrate der Eizellen vermindert und zusätzliche mechanische Manipulation hätte diese unter Umständen weiter herabsetzen können. Außerdem wären möglicherweise nicht genügend befruchtete Eizellen am Tag 1 zu erwarten gewesen, um eine sinnvolle Auswahl nach genetischen Gesichtspunkten zu treffen.

4) Die Eizellen bilden nach der Behandlung mit dem Laser trotz angemessener Wartezeit nach der Spermieninjektion Zytoplasmanasen, die ein Auslaufen der Eizelle befürchten ließen:

Trat dies bei mehreren Eizellen auf, wurde die Biopsie abgebrochen.

5) Die Eizellen hatten keinen ausgebildeten perivitellinen Raum und der Polkörper lag in einer Zytoplasmamulde eingebettet:

Hierbei entstand ein erhöhtes Risiko, beim Entfernen des Polkörpers das Zytoplasma mit anzusaugen, zudem war eine Zytoplasmabrücke zwischen Polkörper und dem Zytoplasma der Eizelle zu erwarten.

7) Extrem schlechte Befruchtungsrate in Vorversuchen nach Intrazytoplasmatischer Spermieninjektion mit der Patientin mit einer Erwartung von weniger als vier befruchteten Eizellen:

Dies hätte bedeutet, dass eine Auswahl nach genetischen Gesichtspunkten nicht sinnvoll gewesen wäre, weil die Frau ohnehin bis zu drei Embryonen hätte zurückbekommen können. Daher war es nicht notwendig die Eizellen einem unnötigen Stress während der Biopsie zu unterziehen.

### **2.2.6 Erstellung von Bewertungskriterien für die Ergebnisse der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)**

Um eine bessere Auswertbarkeit der Polkörpersignale zu erhalten, mussten Kriterien für die Bewertung der Hybridisierungs-Signale erstellt werden. Hierzu wurden zunächst Fotos von mehreren hybridisierten Polkörpern aufgenommen, die einzelnen Signale ausgeschnitten und in einer Tabelle vergleichend gegenübergestellt (siehe Abb. 8). Die folgenden Kriterien wurden zur Bewertung herangezogen.

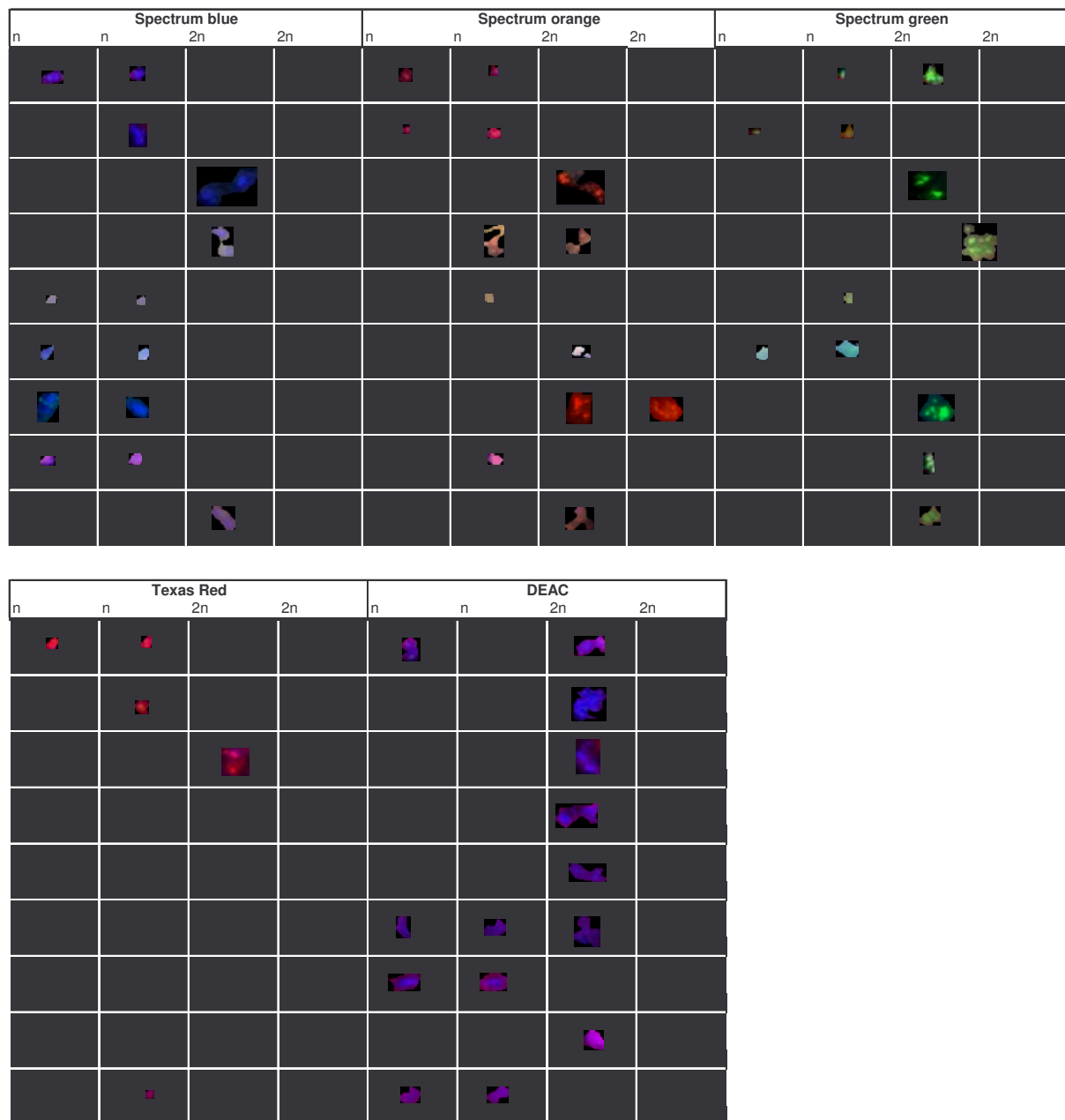


Abb. 8 Referenzabbildung zur Bewertung von Signalen nach der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung. Untereinander sind jeweils mehrere Beispiele (9 Stück) für ein bzw. zwei Signale abgebildet. Jede Zeile stellt die Signale der verwendeten Sonden (5 Stück) innerhalb eines Polkörpers dar.

Die Polkörperfläche war durch eine Reduktion der Hintergrundsignale mikroskopisch erkennbar (schwarzer Hof). Die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung auf Polkörpern ließ je Chromatid ein Signal (= n) erwarten. Je nach Degenerationszustand der Polkörper-DNA konnte „n“ eine unterschiedlich große Fläche und Intensität einnehmen. Daher musste zur

Definition dieser Signalgröße „n“ zunächst die Fläche eines Signals mit anderen Signalen im selben Polkörper verglichen werden (siehe Abb. 8).

- 1) Ein Signal war positiv, wenn es sich innerhalb eines „schwarzen Hofs“ befand und sich von dem dort vorhandenen Hintergrund deutlich abhob.
- 2) Signale, die in mehreren Farbkanälen detektierbar waren und sich an derselben Position befanden, waren Hintergrundsignale (Ausnahme war das DAPI- bzw. Spectrum-Blue- Signal, welches im DEAC- Kanal ebenfalls detektiert wurde).
- 3) Definition von „n“ durch den Vergleich mit anderen Signalen.  
In der Regel nahmen DEAC- Signale die größte Signalfläche ein. DAPI- bzw. Blue- Signale hatten eine etwas geringere Fläche, und die übrigen waren oft noch kleiner.
- 4) Definition von „2n“ über den Signalabstand
  - a) Signale haben meistens Zentren mit maximaler Farbintensität und schwächer gefärbte Bereiche. Wenn die beiden Signale einer Farbe die gleiche Intensität zeigen, und wenn die Signalabstände der Zentren eng benachbart sind und im Vergleich zu den anderen Sonden vergleichbare Abstände haben, spricht man von „2n“.
  - b) Geringere Abstände wiesen eher auf degenerierte DNA hin, die in einem „n“ mehrere Signalspots zuließ (Fiber<sup>1</sup>).

## **2.3 Biometrische und morphologische Evaluierung der Eizellen**

### **2.3.1 Messungen von Eizellparametern**

Während der Polkörperbiopsie wurden von jeder Eizelle mit Hilfe der Octax eyeware Software, die auch den Laser steuert, mehrere digitale Fotos in verschiedenen Perspektiven und verschiedenen Fokusebenen aufgenommen.

Die Bilder wurden durch einen Tastendruck auf der Computertastatur aufgenommen und sofort automatisch im Hintergrund der Lasersoftware abgelegt, ohne dass hierbei der Arbeitsablauf unterbrochen werden musste.

Die Bilder wurden später mit demselben Programm archiviert und dann vermessen.

Folgende Parameter wurden gemessen (siehe Abb. 9):

1. Die Gesamtgröße der Eizelle in Form von zwei senkrecht aufeinander stehenden Durchmessern, jeweils am Außenrand der Zona pellucida beginnend und endend. Es wurde hierbei immer versucht, den jeweils kleinsten und den jeweils größten Durchmesser einzubeziehen.

---

<sup>1</sup> Durch Degeneration der DNA kommt es zu Vereinzelung der DNA-Fäden. Dies ist als Fiber bekannt

2. die Größe des Ooplasmas und
3. die Größe der Polkörper (Verfahren analog der Eizellgrößenbestimmung) und
4. die Zonadicke vom Innenrand bis zum Außenrand der Zona in der Nähe des ersten Polkörpers

Die Eizellen, die sowohl vermessbare Fotos als auch ein genetisches Resultat nach der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung lieferten, wurden in die Auswertung aufgenommen. Aus den Durchmessern von Eizellen, Ooplasma und Polkörper wurde der Radius berechnet und für weitere Betrachtungen verwendet.

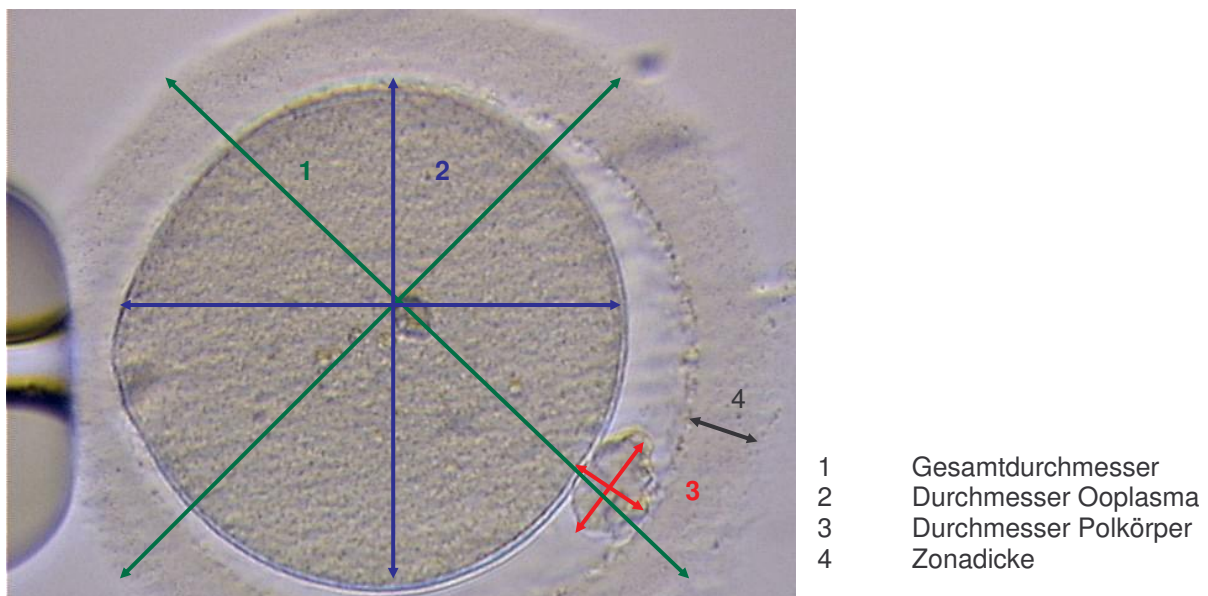


Abb. 9 Durchführung der Messungen für die Biometrieauswertung: Die Zonadicke wurde immer in der Nähe des ersten Polkörpers gemessen, die Durchmesser jeweils an der dicksten und dünnsten Stelle, möglichst senkrecht zueinander.

### 2.3.2 Erstellung eines qualitativen Bewertungssystems für Eizellen

Es wurde eine eigene Skalierung entwickelt, um die Granulierung des perivitellinen Raumes, dessen Größe inklusive der Lage der Polkörper, die Zytoplasmaqualität und die Struktur der Zona pellucida zu klassifizieren. Zur Beurteilung des Polkörperfragmentierungsgrades wurde ein System in Anlehnung an Ebner (1999) gewählt.

Für die Einteilung der Eizellen in das qualitative Schema wurden zunächst Bilder verschiedener Qualität für die einzelnen Komponenten ausgesucht. Die Qualitätsunterschiede wurden gut abgrenzbar gewählt und nicht zu fein abgestuft, um eine möglichst klare Zuteilung der Eizellen in die einzelnen Kategorien zu gewährleisten. Die

Einteilung erfolgte anhand der Referenzbilder für die verschiedenen Bereiche (siehe Abb. 14 Abb. 15 Abb. 16 Abb. 17 und Abb. 18).

Zudem wurde für jede Eizelle eine subjektive Bewertung ihres Allgemeinzustandes durchgeführt, der mit 1 für sehr gut bis 4 für sehr schlecht bzw. degeneriert bewertet wurde.

Die Einteilung der Eizellen in die verschiedenen Schemata erfolgte ohne Kenntnis des genetischen Status der jeweiligen Eizelle.

### **2.3.3 Rauchverhalten**

Das Rauchverhalten der Patientinnen und ihrer in häuslicher Gemeinschaft lebenden Partner wurde dokumentiert.

### **2.3.4 Statistische Auswertung der Daten**

Die statistische Analyse wurde am Institut für Medizinische Informatik und Statistik im Klinikum S.H. - Campus Kiel - mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS (V.10) durchgeführt.

Die Zonadicke und die anderen gemessenen Parameter wurden durch Mittelwerte und Standardabweichungen beschrieben. (siehe Tab. 12)

Basierend auf dem Kolmogorov-Smirnov-Test konnte in allen Fällen eine Normalverteilung der Messwerte angenommen werden. Daher wurde die t-Test-Statistik angewendet, um bei den entsprechenden Parametern einen Vergleich zwischen aneuploid und euploid durchzuführen. Bei der Zonadicke wurden zudem auch Raucherinnen und Nichtraucherinnen verglichen. Die Polkörperfragmentierung (Grad 0-3) und die Größe des perivitellinen Raumes (auffällig / unauffällig) sowie die anderen kategoriellen Parameter wurden in Kontingenztabellen analysiert. Assoziationen wurden mit dem  $\chi^2$ -Test und speziell im Falle der Polkörper-Fragmentierung mit Hilfe des Cochran-Armitage-Test auf Trends untersucht. Für alle Tests wurde als Signifikanzlevel  $p < 0,05$  zugrunde gelegt. Um die Hauptkriterien herauszufinden, anhand derer man euploid und aneuploid unterscheiden kann, wurde eine multiple logistische Regression durchgeführt.

Zusätzlich wurde eine konditionelle Regressionsanalyse mit einer Stratifizierung nach Individuen durchgeführt, die eine patientenbezogene Beziehung berücksichtigt.

## **2.4 Vergleichende Chromosomenhybridisierung mit Einzelzellen (CGH)**

Als Positivkontrolle für die vergleichende Chromosomenhybridisierung an Einzelzellen wurden diploide Buccalzellen verwendet, weil diese schnell und in großer Zahl frisch zu

isolieren waren und keine Aufzucht in einer Zellkultur benötigten. Außerdem hat sich gezeigt, dass sich Buccalzellen gut mit dem verwendeten PCR-Protokoll amplifizieren ließen (Gutierrez-Mateo 2004a, b).

#### **2.4.1 Proteinase K Verdau**

Zu den vereinzelt Buccalzellen (siehe 2.4.12.1) bzw. Polkörpern wurde jeweils 0,17 µM SDS (Sodium dodecyl sulfate) und 0,00488 mg/ml Proteinase K hinzugefügt. Der Ansatz wurde mit 17 µl unbestrahltem Mineralöl überschichtet und anschließend für eine Stunde bei 37°C inkubiert. In einem nachfolgenden Schritt wurde die Proteinase K durch eine 10-minütige Inkubation bei 95°C inaktiviert.

Danach wurden die unten beschriebenen Verfahren zu Amplifikation, Markierung und Hybridisierung durchgeführt.

#### **2.4.2 PCR mit degenerierten Oligonucleotid-Primern (DOP-PCR)**

##### **Vorbereitung:**

Vor Ablauf der Inkubationszeit der Proteinase K wurden die benötigten PCR-Lösungen AB bis E angesetzt (siehe 6.1.8).

Die DOP-PCR (nach Telenius et al. 1992) wurde in einem Thermocycler (Minicycler PTC 150: Biozym; Hessisch-Oldendorf, Germany) durchgeführt.

Der erste Programmschritt bei 92°C für fünf Minuten diente der Inaktivierung der Proteinase K. Anschließend wurden zu jeder Probe 0,24 µl der Lösung C pipettiert. Da die verwendete Sequenase Ver 2.0 nicht thermostabil war, musste dieser Schritt vor jedem der insgesamt acht Zyklen wiederholt werden.

Nach den acht Zyklen der ersten Phase (siehe auch Temperaturprofil) erfolgte die Zugabe von 45 µl Lösung D. Nach dem Herunterkühlen auf 56°C wurden 5 µl Lösung E zugegeben und 32 Zyklen ohne weitere Zugaben durchgeführt.

Das Pipettierschema befindet sich im Anhang (siehe 6.1.8).

##### Das DOP-PCR Programm:

Schritt 1: 92°C für 5 Minuten

    Zugabe der Lösung C

Schritt 2: 25°C für 2:20 Minuten

Schritt 3: 34°C für 2:00 Minuten

Schritt 4: 90°C für 1:00 Minute

Schritt 5: Wiederholen der Schritte 2 bis 7 für weitere 7 Zyklen

    Zugabe der Lösung D

Schritt 6: 30 °C für 2:20 Minuten

Schritt 7: 92 °C für 1:00 Minute

Zugabe der Lösung E

Schritt 8: 56 °C für 2:20 Minuten

Schritt 9: ramp at 0,1 °C/sec to 74 °C

Schritt 10: 70 °C für 2:00 Minuten

Schritt 11: 92 °C für 1:00 Minute

Schritt 12: 56 °C für 1:00 Minute

Schritt 13: ramp at 0,1 °C/sec to 74 °C

Schritt 14: 70 °C für 2:00 Minuten

Schritt 15: Wiederholen der Schritte 11 bis 31 für weitere 31 Zyklen

Schritt 16: 70 °C für 10:00 Minuten

Schritt 17: 4 °C für unbegrenzte Zeit

### **2.4.3 DOP-PCR mit Super Taq Plus Polymerase (STP-DOP)**

Die STP-DOP wurde zunächst mit extrahierter männlicher und weiblicher genomischer DNA etabliert. Bei den Ausgangskonzentrationen von 100 ng/ml, 10 ng/ml und 1 ng/ml genomischer DNA, die in die DOP-PCR eingesetzt wurden, waren nach der vergleichenden Chromosomenhybridisierung das X- bzw. das Y-Chromosom deutlich als Über- bzw. Unterrepräsentation zu erkennen. Bei einer Ausgangskonzentration von 0,1 ng/ml war das Ergebnis weniger deutlich aber dennoch in den meisten Fällen auswertbar. Versuche bei denen parallele Proben mit unterschiedlichen SDS- und Proteinase K-Konzentrationen durchgeführt wurden, lieferten bei einer Konzentration von 0,17 µM SDS und 4,88 µg/ml Proteinase K pro Ansatz die besten Ergebnisse. Bei diesen Vorversuchen stellte sich heraus, dass das System der STP-DOP sehr sensibel auf eine SDS Überdosierung reagiert. Ab einer Konzentration von > 0,34 µM ergab die PCR kein Amplifizierungsprodukt mehr. Später wurden stets ca. 0,6 µg genomische DNA als Positivkontrolle in den Versuchen mitgeführt.

Die DNA bzw. die lysierten Zellen wurden mit dem STP-DOP Mix versetzt. Jeder Ansatz enthielt 1x PCR-Puffer ohne Mg<sup>2+</sup>, 1,75 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,2 mM dNTP, 2 µM DOP-Primer (CCGACTCGAG NNNNNN ATGTGG) und 0,05 U/µl Super Taq Plus Polymerase. Das finale Reaktionsvolumen betrug pro Ansatz 50 µl. Dieser Ansatz wurde in die DOP-PCR eingesetzt.

Das Pipettierschema zu der PCR befindet sich im Anhang (siehe 6.1.8).

#### Das STP-DOP Programm:

Schritt 1: 94 °C für 5,5 Minuten

Schritt 2: 95 °C für 1 Minute zum Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge

Schritt 3: 30 °C für 1,5 Minuten zum Hybridisieren der Primer

Schritt 4: 68 °C für 3 Minuten für die Kettenverlängerung durch die Polymerase

Die Schritte 2 bis 4 werden 8 mal wiederholt.

Schritt 5: 95 °C für 0,5 Minuten zum Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge

Schritt 6: 56 °C für 1 Minute zum Hybridisieren der Primer

Schritt 7: 68 °C für 3 Minuten für die Kettenverlängerung durch die Polymerase

Die Schritte 5 bis 7 werden 40 wiederholt.

Schritt 8: 68 °C für 8 Minuten zum Kettenverlängerungsabschluss

Schritt 9: 4 °C für unbegrenzte Zeit zum Kühlen der Reaktionsansätze bis zur Weiterbearbeitung

In den ersten acht Zyklen ermöglichte die geringe Hybridisierungstemperatur eine weniger spezifische Bindung der DOP-Primer an die DNA. In den folgenden 40 Zyklen wurden bei höherer Temperatur die bereits amplifizierten DNA-Sequenzen spezifisch weiter amplifiziert.

#### **2.4.4 Produktkontrolle aus der DOP-PCR mittels Agarose Gelelektrophorese**

Nach der PCR wurden 7 µl des PCR Produktes mit 2 µl Probenpuffer gemischt und auf ein auspolimerisiertes 2 %iges Agarosegel geladen. Als Größenstandard diente Marker VI der Firma Roche. Die Gelelektrophorese wurde 35 Minuten bei 100V / 40 mA durchgeführt. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation in Ethidiumbromid (0,1 %). Dann wurde das Gel kurz in Wasser gespült und unter UV-Licht fotografiert.

#### **2.4.5 Markierung der chromosomalen DNA mittels DOP-PCR**

Zur Markierung der STP-DOP Amplifikate wurden fluorchrommarkierte dUTPs verwendet. Als Fluorchrome dienten hierbei Spectrum Orange-dUTPs, Texas Red-dUTPs und Spectrum Green-dUTPs. Es wurden jeweils 2 µl des STP-DOP Amplifikates mit 18 µl des Markierungsmastermix versetzt. Der Markierungsmastermix enthielt 1x Replitherm Reaktionspuffer, 2 µM DOP Primer, 2,5 µM MgCl<sub>2</sub>, je 0,2 mM dATP, dGTP und dCTP und 0,03 U / µl Ampli-Taq Polymerase. Die dTTP- und Markierungsnukleotidkonzentrationen variierten je nach Fluorchrom. Bei Texas Red-dUTP und Spectrum Orange-dUTP wurde ein Verhältnis von 9 : 1 verwendet (0,18 mM dTTP zu 0,02 mM Texas Red bzw. Spectrum Orange-dUTP). Für Spectrum Green wurde ein Verhältnis von 2 : 1 benutzt. (0,1 mM 0,05 mM).



Im Anhang sind die Pipettierschemata beigefügt. Die DOP-Markierung wurde in einem PTC 200 Peltier Thermal Cycler der Firma MJ Research durchgeführt. Die Markierung mittels DOP-PCR erbrachte gute Erfolge. Dieses Verfahren benötigt 4,5 h für die PCR zuzüglich der Pipettierzeiten. Die Hybridisierungsergebnisse nach DOP Markierung waren etwas besser als mit den anderen Markierungsverfahren.

#### Das Markierungsprogramm:

Schritt 1: 92°C für 3 Minuten zum Aufschmelzen der DNA Doppelstränge

Schritt 2: 92°C für 1 Minute zum Aufschmelzen der DNA Doppelstränge

Schritt 3: 56°C für 1 Minute zum Hybridisieren der DOP-Primer

Schritt 4: Temperatursteigerung um 0,1°C/ Sekunde auf 74°C

Schritt 5: 70°C für 2 Minuten zur Kettenverlängerung

Schritt 6: Wiederholen der Schritte 2 bis 5 für weitere 30 Zyklen

Schritt 7: 72°C für 5 Minuten zur abschließenden Kettenverlängerung

Schritt 8: 4°C für unbegrenzte Zeit zum Kühlen bis zur Weiterverarbeitung

#### **2.4.6 Markierung der chromosomalen DNA mittels Nick Translation**

Für die Markierung mittels Nick Translation wurden 22,5 µl des Amplifikationsproduktes aus der STP-DOP (ca. 600-1000 ng DNA) eingesetzt. Pro Ansatz waren 0,0075 mM dTTP, je 0,02 mM dATP, dCTP und dGTP, 1x Nicktranslation Puffer, 1x NT Enzymmix und 0,005 mM Spectrum Red bzw. 0,01 mM Spectrum Green enthalten. Der Ansatz wurde auf Eis pipettiert. Das Pipettierschema wurde im Anhang beigefügt. Der Ansatz wurde für 1,5 Stunden bei 15°C inkubiert. Hierbei wurde das beste Markierungsergebnis erzielt. Eine längere Inkubationszeit schnitt die DNA in zu kleine Fragmente. Dann wurde die Reaktion durch eine 10-minütige Inkubation bei 70°C gestoppt.

#### **2.4.7 Markierung in der STP-DOP**

Zur zeitlichen Verkürzung des Protokolls wurde die STP-DOP direkt mit markierten Nucleotiden in geeigneter Konzentration durchgeführt. Hierzu wurden anstelle der in der STP-DOP beschriebenen dNTP Label-dNTP mit einer Konzentration von 0,5x und Spectrum Green (0,05 mM Endkonzentration) bzw. Fluoro-Label dNTP (1 x) und 0,02 mM Spectrum Red zugegeben. Das Pipettierschema befindet sich im Anhang. Der Rest des Protokolls entspricht dem der STP-DOP.

Durch die Zugabe der markierten Nucleotide direkt zu dem STP-DOP Ansatz wurde eine Verkürzung des Gesamtprotokolls von ca. 2 Stunden erreicht, weil die anschließende Nick-Translation mit dem dazugehörigen Pipettieraufwand entfiel. Bei einem Zeitumfang von 5 h

für die PCR inklusive Markierung konnte ein zufriedenstellendes Amplifizierungs- und Markierungsergebnis erzielt werden.

#### **2.4.8 Fällen der DNA**

Zur Fällung der DNA wurden je 50 µl der markierten PCR Produktes, 5 µg Human COT-1 DNA und 10,5 µl 3 M NaAc gemischt. Dann wurden 262,5 µl reiner eisgekühlter Ethanol zugesetzt. Diese Lösung wurde gut gemischt und entweder über Nacht bei –20°C oder für 1 Stunde bei –80°C zur Fällung der DNA inkubiert. Darauf erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 4°C mit ca. 14.000 x g für 30-45 min. Dann wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet für ca. 20 min in der Speedvac getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 10 µl Hybmix (50 % FDA/ 10 % DxSO<sub>4</sub>) aufgenommen. Dann erfolgte eine Denaturierung im Wasserbad bei 73°C für 10 min. Die Proben wurden erneut gut gemischt und auf den vorbehandelten Objektträger aufgebracht.

#### **2.4.9 Herstellen und Denaturieren von Metaphaseobjektträgern**

In Methanol:Eisessig (3:1) fixierte Zellen, die im Fixativ bei –20°C gelagert waren, wurden vorsichtig durch auf- und abpipettieren resuspendiert. Die Objektträger, die bis zur Verwendung in Ethanol 100 % / HCl 1 % gelagert waren, wurden mit einem sauberen fusselfreien Papiertuch trocken gewischt und schräg innen gegen den Rand einer Metallbox mit Deckel gestellt, die sich auf einer 37°C warmen Wärmeplatte befand. In dieser Box befand sich ein feuchtes Papier. Der Deckel der Box war nur einen Spalt offen, um das Auftropfen der Zellen zu ermöglichen. Es wurden je ein 7 µl Tropfen Zellsuspension auf die linke und die rechte Seite an der Oberkante des Objektträgers aufgetropft, die den Objektträger herunterliefen. Dann wurde in der Mitte des Objektträgers etwas tiefer ein weiterer Tropfen aufpipettiert. Nachdem das Fixativ getrocknet war, wurden die Zellen in PBS gewaschen und in einer Alkoholreihe (70 %, 90 %, 100 %, je 2 min) dehydriert. Die Objektträger wurden für zwei Stunden bei 60°C inkubiert.

Alternativ hierzu wurden gekaufte Metaphaseslides der Firma Vysis verwendet.

Anschließend erfolgte die Denaturierung der Objektträger durch Inkubation für 5 min in der Denaturierungslösung (70 % Formamid, 2 x SSC, pH 7,0) bei 73°C, eine min in eiskaltem 70 %igen Ethanol, dann je drei min in 90 % und 100 % Ethanol bei Raumtemperatur. Die denaturierten Objektträger wurden bis zur Hybridisierung auf einer 37°C Wärmeplatte vorgewärmt.

#### **2.4.10 Vorbereitung und Hybridisierung**

Die im Hybridisierungsmix gelöste DNA wurde für zehn Minuten im Wasserbad bei 73°C denaturiert. Anschließend wurden je 0,8 µl der Proben unter 7 x 7 mm Deckgläser auf die vorgewärmten Objektträger aufgebracht. Die Deckgläser wurden mit Fixogum versiegelt und die Objektträger mit dem Deckglas nach unten in einer feuchten Kammer bei 37°C über Nacht hybridisiert. Um die Hybridisierungszeit zu verkürzen wurde alternativ der Slide-Booster (Advalytix) für die Hybridisierung benutzt. Hierzu wurden je 5 µl der Copling solution (Advalytix) auf die Rührbereiche des Boosters gegeben und der Objektträger ohne Fixogum in die feuchte Kammer des Boosters gelegt. Dann wurde mit einer Frequenz von 7:3 (sieben Sekunden mischen, drei Sekunden Pause) für eine Stunde geboostet.

#### **2.4.11 Posthybridisierungswaschung**

Nach der Hybridisierung wurden mit einem Diamantschreiber die Positionen der Deckgläser markiert, bevor die Deckgläser vorsichtig vom Objektträger entfernt wurden. Der Objektträger wurde mit einem Tuch auf der Unterseite von der Copling Solution befreit und dann in einer Küvette mit 0,4 x SSC/ 0,3 % NP-40 bei 73°C für zwei Minuten inkubiert. Daraufhin erfolgte eine Waschung in 2 x SSC / 0,1 % NP-40 bei Raumtemperatur für zwei Minuten. Dem schloss sich eine Alkoholreihe mit 70, 85 und 100 % Ethanol für je eine Minute an. Alle Waschungen wurden im Dunkeln durchgeführt. Zum Schluss wurde der Objektträger mit DAPI-Antifade eingedeckelt.

#### **2.4.12 Vergleichende Chromosomenhybridisierung (CGH) an Buccalzellen**

##### **2.4.12.1 Isolierung von Buccalzellen**

Für die Gewinnung von Buccalzellen wurden ca. 30 ml destilliertes Wasser von einer beliebigen männlichen Person in den Mund genommen, kurz gespült und dann in ein steriles Gefäß gespuckt.

Es wurden Petrischalen mit PBS-Tropfen zum Waschen der Einzelzellen vorbereitet (siehe Abb. 6). Zum Überführen der Buccalzellen wurden ausgezogene Pipetten hergestellt wie dies schon für die Eizellpipetten beschrieben wurde (siehe 2.1.4).

Zum Waschen der Buccalzellen wurden einzelne Zellen mit Hilfe der ausgezogenen Pipette in den ersten Waschtropfen hineinpipettiert. Dann wurde die Pipette geleert und in einem gesonderten Tropfen erneut gefüllt. Im Anschluss wurden die einzelnen Zellen in den zweiten Waschtropfen überführt. Dies wurde bis zum letzten Waschtropfen wiederholt. Es folgte die Überführung der einzelnen Zellen in bestrahlte PCR-Caps.

Hierbei wurden jeweils männliche und weibliche Buccalzellen isoliert, in unterschiedlichen Farben markiert und später gegeneinander hybridisiert.

### 2.4.13 Vergleichende Chromosomenhybridisierung (CGH) an Polkörpern

#### 2.4.13.1 Herstellen der Transferpipetten

Die Pipetten zur Übertragung von Polkörpern in das PCR-Gefäß wurden mit Hilfe eines Pipetten-Pullers (PB-7) aus 25 cm langen Glas-Pasteurpipetten hergestellt. Hierzu wurden die Pipetten mit der dünnen Seite nach unten in den Puller eingespannt und in zwei Schritten gezogen. Nach dem ersten Zug wurde die Heizspirale an die dünnste Stelle gebracht und erneut gezogen. Diese Pipetten konnten direkt in die eigens dafür hergestellte Halterung für den Manipulator eingespannt werden.

Diese Halterung wurde von einem Feinmechaniker für die Zwecke dieser Doktorarbeit hergestellt (siehe Abb. 10).

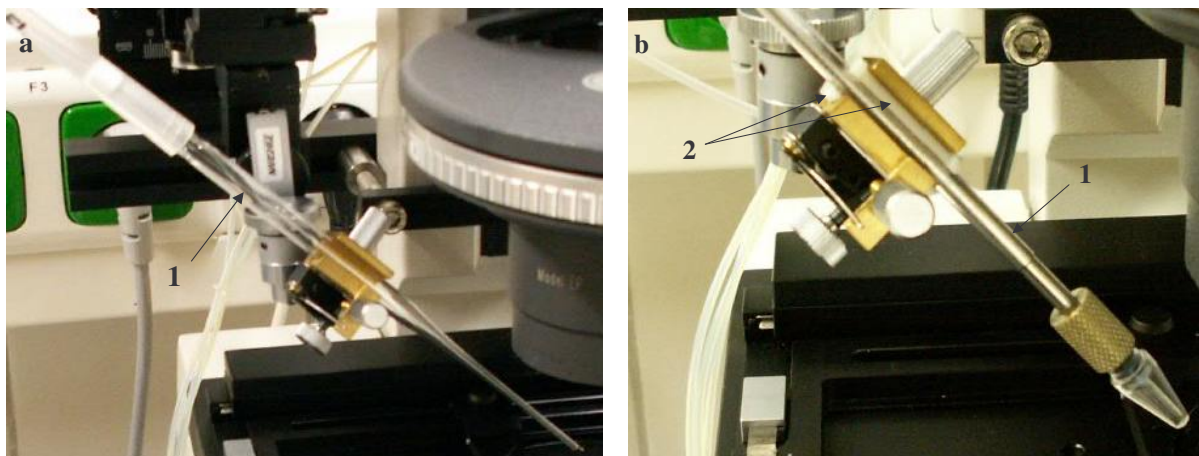


Abb. 10 Spezialanfertigung einer Halterung um die dicken Pasteurpipetten aus Glas (a,1) halten und diese trotzdem mit der elektronischen Manipulatorsteuerung bewegen zu können. Um die Halterung der Haltepipette (b,1) weiterhin einspannen zu können wurde der Schaft der Halterung in eine Verdickung aus Plastik (b,2) eingefasst

#### 2.4.13.2 Material

Es wurden Polkörper aus unbefruchtet gebliebenen Eizellen biopsiert, nachdem die Eizellen nach einer regulären In-Vitro-Fertilisation oder einer Intrazytoplasmatischen Spermieninjektion 24 h im Kulturmedium bei 37°C bei 0,5 % CO<sub>2</sub> inkubiert wurden.

#### 2.4.13.3 Biopsie und Überführung der Polkörper in ein PCR-Cap

Zur Polkörperbiopsie für die vergleichende Chromosomenhybridisierung wurde eine Biopsieschale hergestellt, die neben 2 Reihen HAMS F 10 Medium noch zwei Reihen mit

PBS-Puffer enthielt (siehe Abb. 6). In den ersten Mediumtropfen wurde die Eizelle abgelegt, der zweite Mediumtropfen diente der Zwischenlagerung der biopsierten Polkörper. Im PBS-Tropfen wurden die Polkörper gewaschen, bevor diese in PCR-Gefäße überführt wurden. Nach der Biopsie wurde die Haltepipette durch die ausgezogene Transferpipette ersetzt und diese justiert.

Der Polkörper wurde zunächst aus dem Mediumtropfen in die Biopsiepipette aufgenommen und diese in den ersten PBS-Tropfen gebracht. Hier wurde der Polkörper zum Waschen kurz aus der Pipette ins PBS gegeben (3x an verschiedenen Stellen des Tropfens) und wieder aufgenommen. Hierbei musste vermieden werden, dass der Polkörper den Schalenboden berührt, um ein Festkleben zu verhindern. Dann wurde die Biopsiepipette mit dem Polkörper in den zweiten PBS-Tropfen gebracht. Nun wurde die Transferpipette heruntergefahren und direkt vor der Biopsiepipette positioniert. Durch die Kapillarkraft saugt sich die Transferpipette mit PBS voll. Dann wurde der Polkörper aus der Biopsiepipette ausgeblasen und mit Hilfe des Mundschlauches in die Transferpipette eingesaugt. Im Folgenden wurde diese aus der Halterung genommen und der Inhalt in ein PCR Tube ausgeblasen. Zur Sicherheit wurde die Spitze der Transferpipette im Cap abgebrochen, falls der Polkörper darin steckengeblieben sein sollte. Für den nächsten Polkörper wurde dann eine neue Transferpipette eingesetzt und justiert. Anschließend wurde mit dem Proteinase K Verdau und der Amplifizierung weiterverfahren, wie zuvor beschrieben.

Als Referenz- DNA für die Polkörper wurden einzelne männliche Buccalzellen verwendet, die auf die gleiche Weise behandelt wurden, wie die Polkörper. Die Markierung von Polkörpern und Buccalzellen erfolgte in unterschiedlichen Farben.

#### 2.4.13.4 Herstellung künstlicher Aneuploidien

Um eine künstliche Aneuploidie zu erzeugen, wurde einer Reihe von Polkörpern ein zusätzlicher durch Mikrodissektion gewonnener Chromosomenarm zugegeben<sup>2</sup>. Hierzu wurden Metaphase-Chromosomen auf einem Objektträger fixiert und mit Hilfe eines Mikromanipulators das gewünschte Chromosom mit einer Mikronadel vom Objektträger gekratzt und in eine Pasteurpipette überführt, in der ein Sammeltropfen mit Proteinase K vorgelegt war. Diese Pipette wurde zwei Stunden bei 60 °C inkubiert.

Polkörper und Chromosomen wurden in dasselbe PCR-Cap überführt und in die DOP-PCR und die anschließende Markierungsreaktion eingesetzt.

---

<sup>2</sup> Zur Verfügung gestellt von Dr. Jörg Weimer und Regina Grunewald

2.4.13.5 Auswertung der Hybridisierungsergebnisse

Die in DAPI eingedeckelten Objektträger wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Hierzu wurden pro Polkörper ca. 20 Metaphasen gesucht und jeweils ein Bild

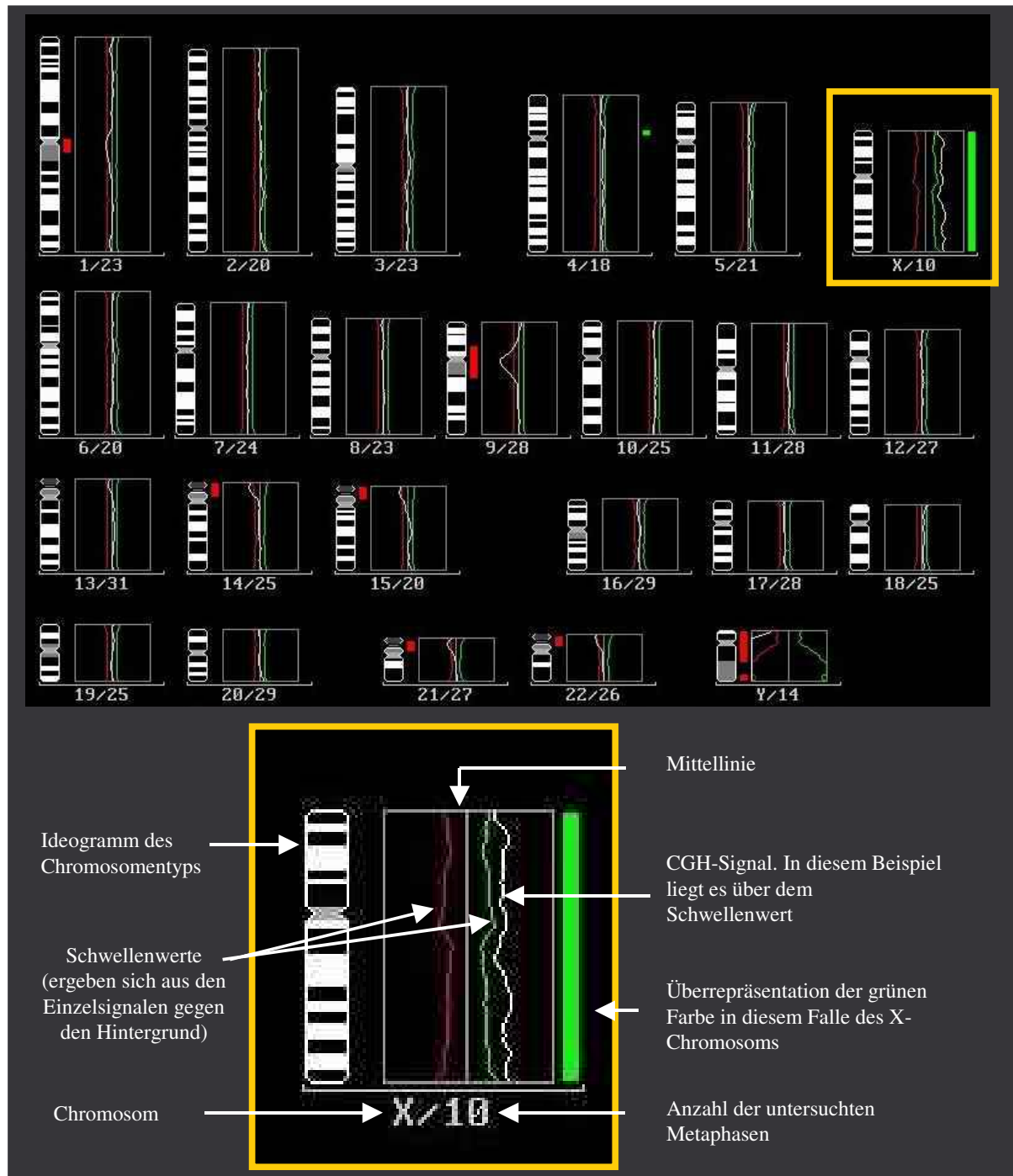


Abb. 11 Beispielabbildung zur Auswertung der vergleichenden Chromosomenhybridisierung (CGH). Hier wurden männliche gegen weibliche Zellen hybridisiert. Die männliche DNA (Referenz-DNA) ist hier rot dargestellt, die weibliche DNA (Testz-DNA) grün. Daher zeigt das Profil eine Überrepräsentation des X-Chromosoms und eine Unterrepräsentation des Y-Chromosoms in der weiblichen DNA.

der Hybridisierung der Referenz-DNA, der Polkörper-DNA und der allgemeinen DNA-Färbung mit DAPI bei den Wellenlängen 518 nm für FITC, 518 nm für Spectrum Orange und 461 nm für DAPI, aufgenommen. Dann wurden die Chromosomen mit Hilfe der ISIS Software auseinandergeschnitten und karyotypisiert. Die ISIS Software ermöglichte eine Überlagerung und Auswertung der Signalintensitäten in Form eines Profils (siehe Abb. 11). Das Programm fertigt hierbei ein Gesamtprofil aus allen karyotypisierten Metaphasen an. Die gerade weiße Mittellinie symbolisiert dabei den Wert, bei dem der Quotient zwischen Test-DNA und Referenz-DNA (die Referenz-DNA ist der Subtraktor) einen Wert von 1 erreicht (Ratio 1,0).

Wenn die Polkörper DNA und die Referenz-DNA beide im gleichen Verhältnis vorliegen, sollte der Quotient der Intensitäten in den Autosomenprofilen sich idealer Weise auf dieser Mittellinie anordnen. Durch die im menschlichen Genom vorkommenden repetitiven Sequenzen in den Zentromer- und einigen Telomerregionen kommt es in den Profilen der vergleichenden Chromosomenhybridisierung oftmals zur Darstellung von Über- bzw. Unterrepräsentationen in diesen Bereichen (Kallioniemi et al. 1994). Anomalien in diesen Bereichen wurden daher nicht in die Analyse mit aufgenommen.

Als interne Kontrolle wurde bei der vergleichenden Chromosomenhybridisierung jeweils männliche Referenz-DNA gegen die weibliche Polkörper-DNA hybridisiert. Die Hybridisierungsprofile des X- und Y-Chromosoms stellen sich somit als Über- oder Unterrepräsentation dar. Es wurde also zunächst überprüft, ob sich die Chromosomen X und Y als deutliche Über- bzw. Unterrepräsentation darstellen lassen. War dies der Fall, wurden die anderen Chromosomen ebenfalls analysiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung der Polkörperdiagnostik

##### 3.1.1 Vorarbeiten

Nach einer sechsmonatigen Übungsphase konnte die Biopsie der Eizellen sicher durchgeführt werden, ohne die Eizellen zu beschädigen (siehe Abb. 12).

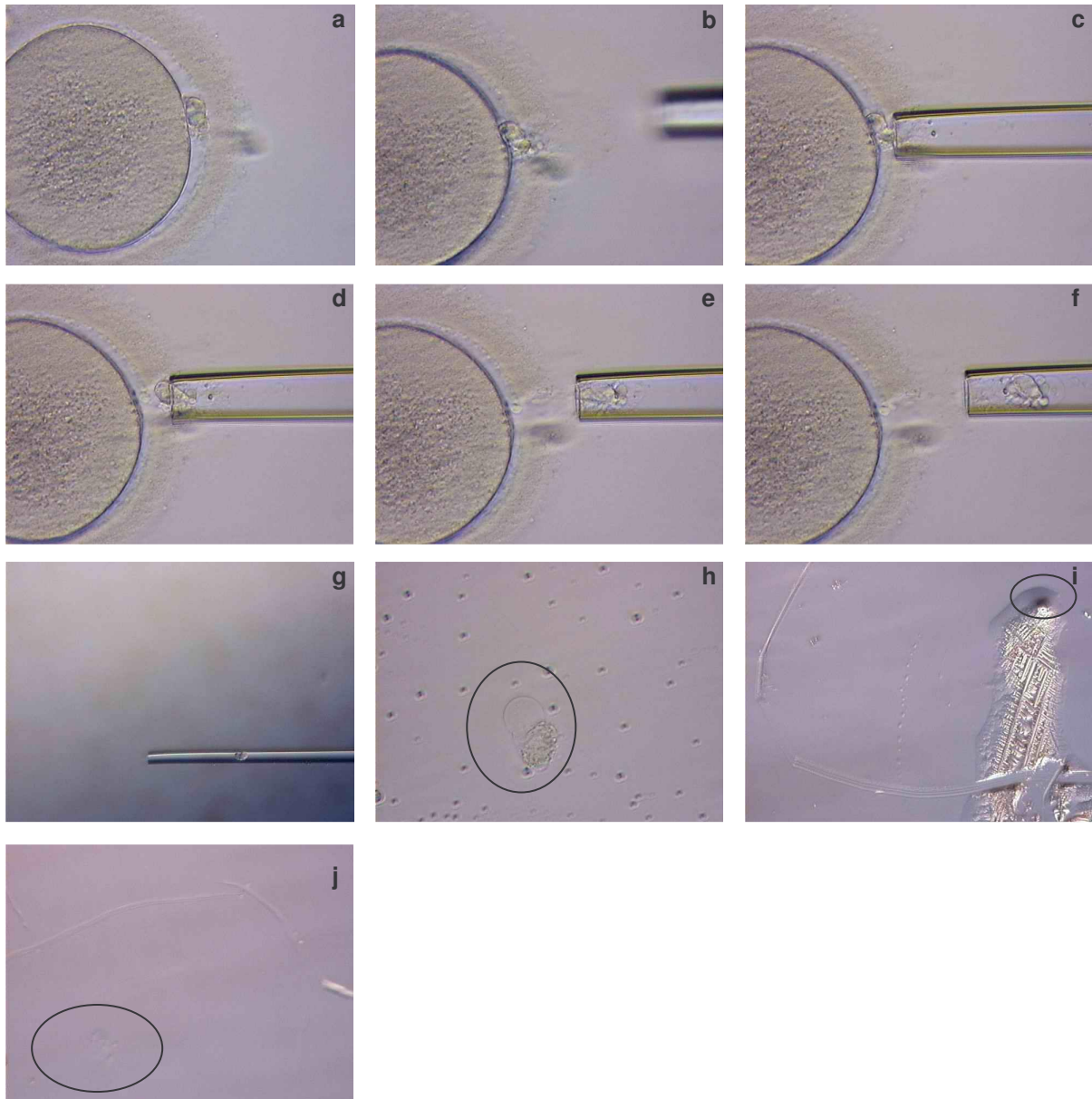


Abb. 12 Polkörper-Biopsie: a) Eizelle vor der Biopsie, Polkörper in 3h Stellung b) Eizelle nach dem Öffnen der Zona c-f) Entnahme des Polkörpers g) Polkörper in der Biopsiepipette h) Polkörper in der hypotonischen Lösung i) Polkörper nach dem Eintrocknen der hypotonischen Lösung j) Polkörper nach der Fixierung



Auch die Übertragung der Polkörper auf Objektträger, sowie ihre Fixierung und Hybridisierung zeigten sich unproblematisch. Die Resultate der genetischen Untersuchung waren innerhalb der gesetzlich (ESchG) vorgeschriebenen Zeit von 18 Stunden nach der Durchführung der Spermieninjektion zu erhalten.

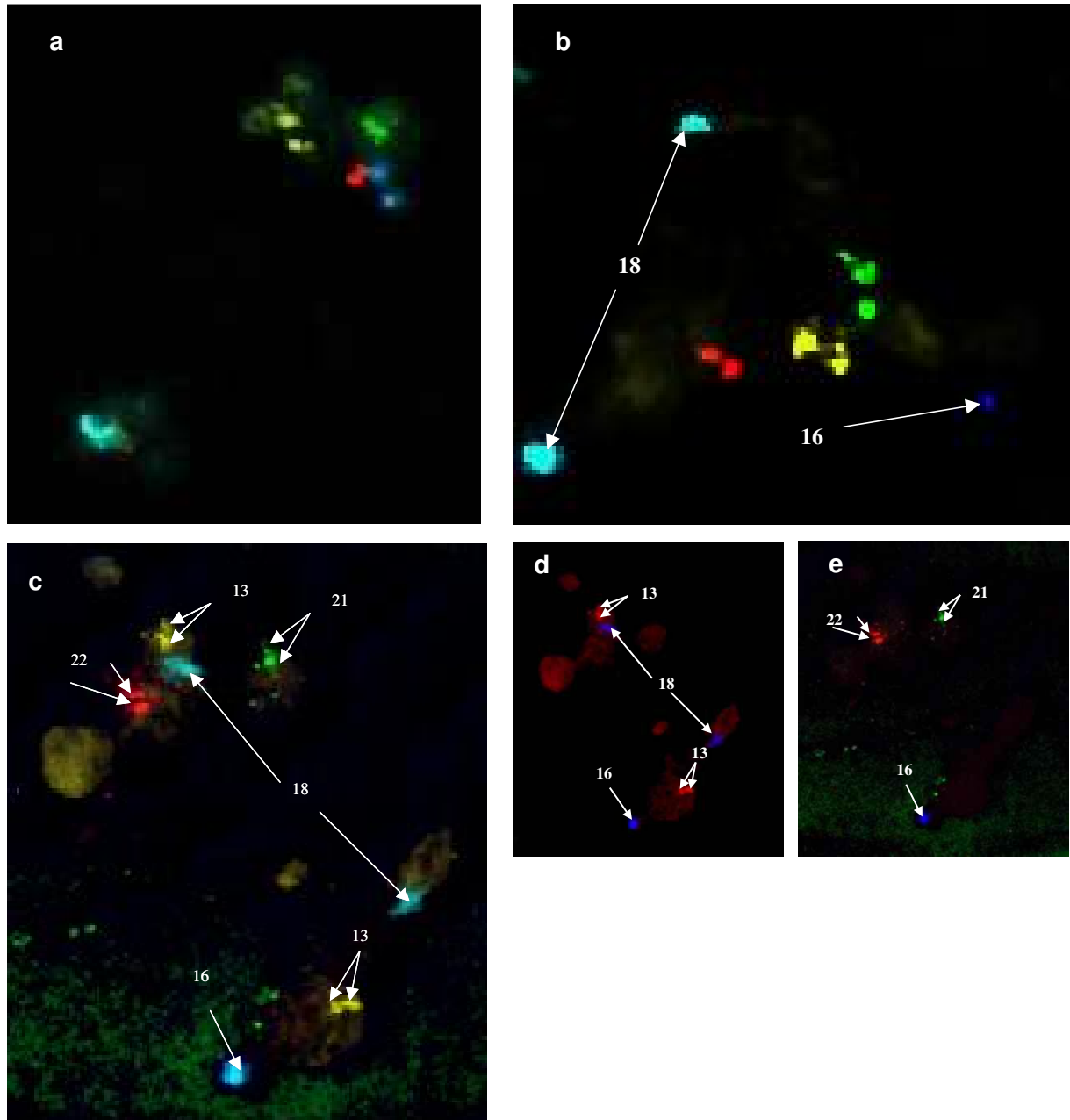


Abb. 13 Bilder der Polkörper nach der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung. Die Signale wurden in einem Bild zusammengefasst und zum Teil mit neuen Falschfarben versehen. a) **normaler** Polkörper, die roten Signale liegen etwas übereinander aber in verschiedenen Ebenen b) Polkörper mit einer „**balanced predivision**“ in Chromosom 18, einer „**unbalanced predivision**“ in Chromosom 16 und einer normalen Verteilung der restlichen Chromosomen. c) Polkörper mit einer „**balanced predivision**“ in Chromosom 18 und einer **Nondisjunction** in Chromosom 13 d + e) derselbe Polkörper wie Bild c.

Der Bundesverband Reproduktionsmedizinischer Zentren Deutschlands (BRZ 2003) fordert ein auswertbares Ergebnis der Polkörper Diagnose in 75 % der Fälle. Dieses Kriterium, das der Qualitätssicherung dient, wurde nach einem Jahr und 36 Patientinnen erreicht.

### 3.1.2 Bewertungskriterien für Ergebnisse der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

Anhand der erstellten Bewertungskriterien zur Interpretation der Hybridisierungs-Ergebnisse (siehe 2.2.6) konnte eine zuverlässige Bewertung der Polkörper Signale gewährleistet werden. Bei der Auswertung wurde unterschieden zwischen „normal“, „Balanced Predivision“, „Unbalanced Predivision“ und „Nondisjunction“ (siehe Abb. 13).

### 3.1.3 Erfassung der Aneuploidie- und Schwangerschaftsrate

Im Zeitraum dieser Arbeit wurde bei 60 Paaren eine Polkörperbiopsie durchgeführt. Insgesamt wurden bei diesen Patientinnen 496 Eizellen biopsiert und untersucht. Hiervon waren 127 (38,5 % der auswertbaren Eizellen) euploid, 203 (61,5 % der auswertbaren Eizellen) aneuploid und 166 (33,5 %) nicht auswertbar (siehe Tab. 2).

Die Patientinnen, die jünger waren als 31 Jahre zeigten hierbei annähernd den gleichen Anteil an aneuploiden Eizellen (62,1 %) wie diejenigen zwischen 31-35 (59,3 %) und jene über 35 Jahren (62,7 %) (siehe Tab. 2). In der Altersgruppe  $\leq 30$  Jahre verteilten sich die Häufigkeiten der Aneuploidien gleichmäßig auf die Chromosomen 18, 21 und 22 (je 29,3 %); Chromosom 13 machte mit 36,6 % den größten, Chromosom 16 mit 14,6 % den geringsten Teil der Aneuploidien aus (siehe Tab. 3).

Tab.2 Häufigkeit von euploiden und aneuploiden Eizellen (EZ) in den verschiedenen Altersgruppen

Alter der Patientin	Zahl der untersuchten EZ	euploide EZ (% der auswertbaren)	aneuploide EZ (% der auswertbaren)	nicht auswertbare EZ	Zahl der Patientinnen
$\leq 30$	95	25 (37,9)	41 (62,1)	29	12
31-35	192	50 (40,7)	73 (59,3)	69	23
> 35	209	52 (36,9)	89 (63,1)	68	25
$\Sigma$	496	127 (38,5)	203 (61,5)	166 (33,5)	60

Bei den Patientinnen im Alter von 31 bis 35 Jahren stellte ebenfalls Chromosom 13 (28,8 %) zusammen mit Chromosom 22 (30,1 %) den größten Anteil der Aneuploidien. Die restlichen Chromosomen zeigten eine ähnliche Aneuploidierate zwischen 21 und 25 % (siehe Tab. 3).

In der Altersgruppe über 35 Jahre war das Chromosom 13 zwar mit 25,8 % recht häufig aneuploid, stellte in dieser Altersgruppe aber den geringsten Teil der Aneuploidien dar (siehe Tab. 3).

Die Aneuploidierate von Chromosom 21 befand sich bei den  $\leq 30$ -Jährigen im mittleren, bei den 31-35-Jährigen sogar im unteren Bereich. Bei den  $>35$ -Jährigen stellte es jedoch mit 37,1 % sowohl die zweithäufigste Aneuploidie dieser Altersgruppe dar, als auch eine deutliche Erhöhung im Vergleich zu den anderen Altersgruppen. Das Chromosom 22 lag durchgehend im oberen Bereich der Aneuploidien und war in der Gruppe der  $>35$ -Jährigen mit 47,3 % in fast der Hälfte aller aneuploiden Eizellen zu finden (siehe Tab. 3).

Es wurde nach Möglichkeit versucht, einer Frau zwei Embryonen aus genetisch intakten, morphologisch gutaussehenden, befruchteten Eizellen zu transferieren. Konnten entweder keine zwei Eizellen als euploid eingestuft werden oder waren diese nicht befruchtet oder sahen sie morphologisch am Tag 1 schlecht aus, wurden auch Embryonen aus Eizellen mit nicht auswertbaren Polkörpern transferiert (siehe Tab. 4).

27 Patientinnen bekamen je zwei Embryonen übertragen, die aus zwei getesteten und als eindeutig euploid befundenen Eizellen entstanden waren. 14 Patientinnen bekamen einen Embryo aus einer euploiden Eizelle und einen aus einer Eizelle mit unklarem genetischen Status transferiert. Bei 15 Patientinnen fand eine Übertragung von zwei Embryonen mit unklarem genetischen Status statt (siehe Tab. 4) und bei vier Patientinnen wurde kein Embryo transferiert.

Bei insgesamt sechs Patientinnen traten keine Aneuploidien in den befruchteten Eizellen auf (siehe Tab. 4).

Tab. 3 Häufigkeit des Auftretens von Aneuploidien in den verschiedenen Chromosomen in den verschiedenen Altersgruppen. In Klammern % der Aneuploiden Eizellen

Alter	Aneupl. Häufigkeit der Chromosomen in %					aneuploide Eizellen (% der auswertbaren)
	13	16	18	21	22	
$\leq 30$	15 (36,6)	6 (14,6)	12 (29,3)	12 (29,3)	12 (29,3)	41 (62,1)
31-35	21 (28,8)	15 (20,5)	18 (24,7)	16 (21,9)	22 (30,1)	73 (59,3)
$> 35$	23 (25,8)	28 (31,5)	29 (32,6)	33 (37,1)	42 (47,2)	89 (63,1)

Tab. 4 Transferierte Embryonen. Anzahl der transferierten Embryonen aus euploiden bzw. nicht auswertbaren Eizellen

	Nur euploide Eizellen	euploid / n.a. Eizellen	Nur n.a. Eizellen	keinen Embryotransfer
<b>Anzahl Patienten</b>	27	14	15	4
<b>Keine Aneuploiden Eizellen im Pool</b>	1	1	4	-

Von den 60 behandelten Patientinnen konnte bei 56 ein Embryotransfer durchgeführt werden (93,3 %), 13 Frauen wurden schwanger. Daraus ergibt sich eine Schwangerschaftsrate von 21,7 % pro Zyklus und 23,2 % pro Embryotransfer.

Die erste Geburt gesunder Gemini erfolgte im Oktober 2004. Inzwischen wurden sieben weitere Babys geboren; 4 Schwangerschaften endeten mit Aborten mit ungeklärter Ursache, eine Schwangerschaft wurde nur biochemisch festgestellt, entwickelte aber keine embryonalen Strukturen (siehe Tab. 5).

Tab. 5 Ergebnisse der Schwangerschaften

Alter	Zahl der Patientinnen	Embryo-transfer	Schwangerschaften	Biochem. Schwangersch.	Aborte	Einlinge	Zwillinge	Schwangerschafts-Rate/ET
≤ 30	12	11	4	0	0	3	1	36,4
31-35	23	21	6	1	2	3	0	28,6
> 35	25	24	3	0	2	1	0	12,5

## 3.2 Biometrische und morphologische Evaluierung der Eizellen

In die statistische Auswertung von Biometrie und Morphologie gingen die Eizellen von 36 Patientinnen des ersten Jahres (2004) ein.

### 3.2.1 Morphologische Bewertung

Für die morphologische Bewertung standen 189 Eizellen zur Verfügung.

### 3.2.1.1 Struktur der Zona pellucida

Bei der Struktur der Zona wurden folgende Kriterien betrachtet:

1. ob die Zona gleichmäßig dick war
2. ob sie viele dunkle Granula enthielt oder ungranuliert war
3. ob die Außenkante der Zona als klare Linie erkennbar war oder ausgefranst wirkte
4. ob die Zona pellucida sehr dünn und instabil war

Die Einteilung erfolgte in drei Qualitätsgruppen, wobei Bild c und d in der Gruppe 3 zusammengefasst wurden (siehe Abb. 14).

Bei der Bewertung der Struktur der Zona wurden 82 Eizellen in die Gruppe 1, 57 in die Gruppe 2 und 50 in die Gruppe 3/4 eingeteilt. Die statistische Auswertung ergab keine Korrelation zwischen der Zonaqualität und dem genetischen Status der Eizelle ( $p= 0,210$ ) (siehe Tab. 6).

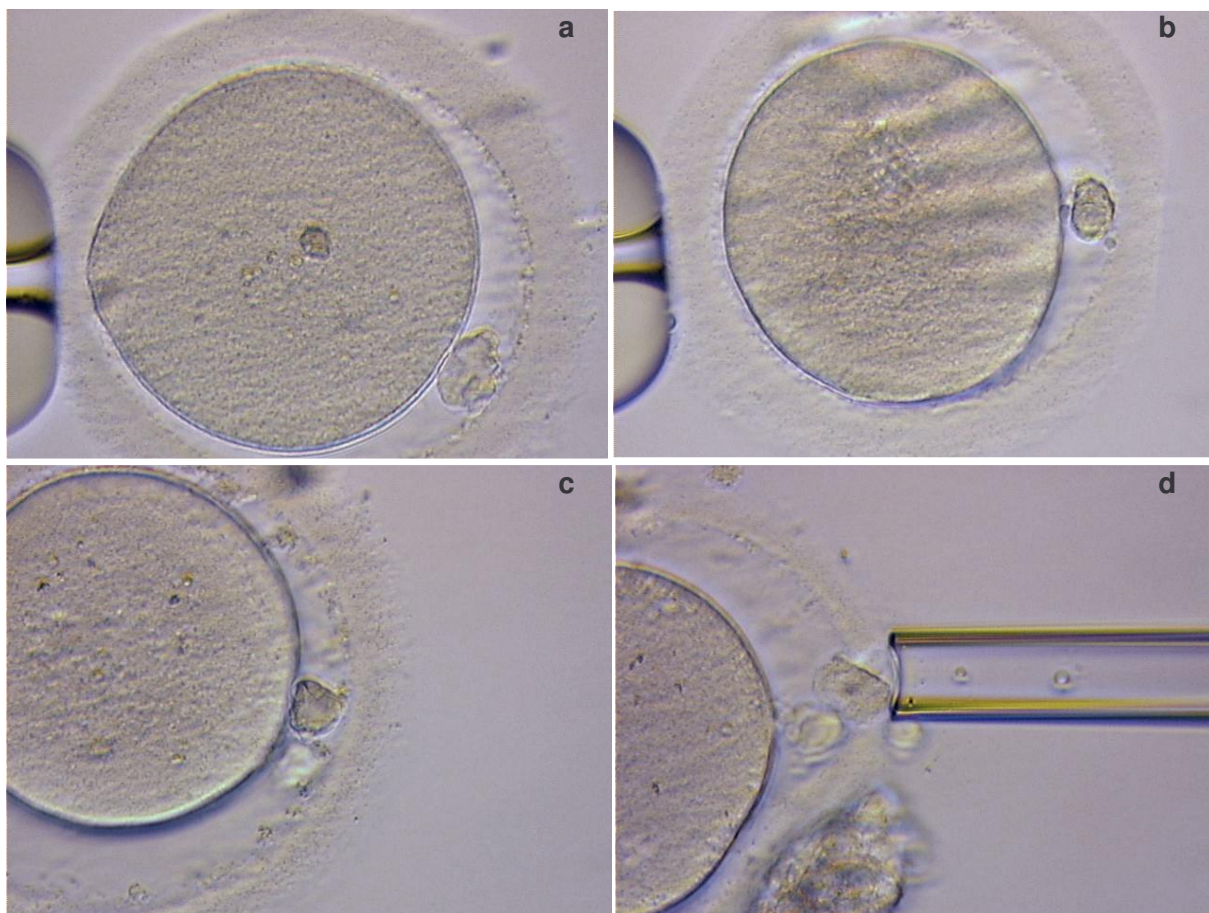


Abb. 14 Struktur der Zona pellucida. **a**: gleichmäßig, klare Grenzen, granuliert **b**: gleichmäßig, klare Grenzen, nicht granuliert, **c**:Unklare Außengrenze **d**: Zona dünn und instabil oder Zona unregelmäßig dick

Tab. 6 Struktur der Zona pellucida ( $\chi^2$ -test,  $p=0,210$ )

Gruppe	Struktur der Zona pellucida			gesamt
	1	2	3	
euploid	33	25	14	72
aneuploid	49	32	36	117

### 3.2.1.2 Zytoplasmaqualität der Eizelle

Die Zytoplasmaqualität wurde gemäß folgender Bewertungskriterien in vier Gruppen (1-4) eingeteilt:

Gruppe 1 war ausschließlich in Eizellen der polkörperfreien Metaphase I anzutreffen.

Gruppe 2 hat eine qualitativ gute homogene Zytoplasmabeschaffenheit.

Gruppe 3 eine grobkörnige Zytoplasmabeschaffenheit.

Gruppe 4 weist degeneriertes Zytoplasma auf (siehe Abb. 15).



Abb. 15 Referenzbilder für die Bewertung der Zytoplasmaqualität. a) Grad 2, das Zytoplasma ist homogen und feinkörnig b) Grad 3, das Zytoplasma ist grob granuliert c) das Zytoplasma beginnt sich in der Mitte der Eizelle zu zentrieren (beginnende Degeneration)

79 Eizellen wurden in Gruppe 2, 101 in Gruppe 3 und 10 Eizellen in Gruppe 4 eingeteilt (siehe Tab. 7). In Gruppe 1 wurden keine Eizellen eingestuft, da keine unreifen Eizellen in die Analyse gingen. Die Zytoplasmaqualität zeigte keine Korrelation zu feststellbaren Chromosomenaberrationen der Eizellen ( $p = 0,594$ ).

Tab. 7 Zytoplasmaqualität der Eizelle ( $\chi^2$ -test,  $p=0,594$ ).

Gruppe	Zytoplasmaqualität				gesamt
	1	2	3	4	
euploid	--	32	36	5	73
aneuploid	--	47	65	5	117

### 3.2.1.3 Granulierung des perivitellinen Raumes (PVR)

Die Granulierung des perivitellinen Raumes wurde in drei Gruppen unterteilt. In Gruppe 0 enthält der perivitelline Raum keinerlei Granula, in Gruppe 1 wenige und in Gruppe 2 viele Granula (siehe Abb. 16).

In 15 Eizellen war keine Granulierung vorhanden, in 112 war eine geinge und in 62 Eizellen eine ausgeprägte Granulierung sichtbar. Auch hier wurde keine Korrelation zwischen Vorhandensein von Granula im perivitellinen Raum und Ploidie der Eizelle ( $p = 0,188$ ) mittels statistischer Auswertung festgestellt (siehe Tab. 8).

Tab. 8 Granulierung des perivitellinen Raumes. 0 = nicht granuliert, 1 = wenig granuliert, 2 stark granuliert ( $\chi^2$ -test,  $p = 0,188$ )

Gruppe	Granulierung des perivitellinen Raumes			gesamt
	0	1	2	
euploid	7	47	18	72
aneuploid	8	65	44	117



Abb. 16 Granulierung des perivitellinen Raumes. a) 0 = nicht granuliert, b) 1 = wenig granuliert, c) 2 stark granuliert

### 3.2.1.4 Polkörperfragmentierung

Der Fragmentierungsgrad der Polkörper wurde in Anlehnung an Ebner et al. (1999) in vier Abstufungen eingeteilt: 0 = runder oder ovaler Polkörper mit glatter Oberfläche, 1 = runder

oder ovaler Polkörper mit rauer Oberfläche 2 = gelappter Polkörper, 3 = Polkörper fragmentiert, bestehend aus Einzelteilen (siehe Abb. 17).

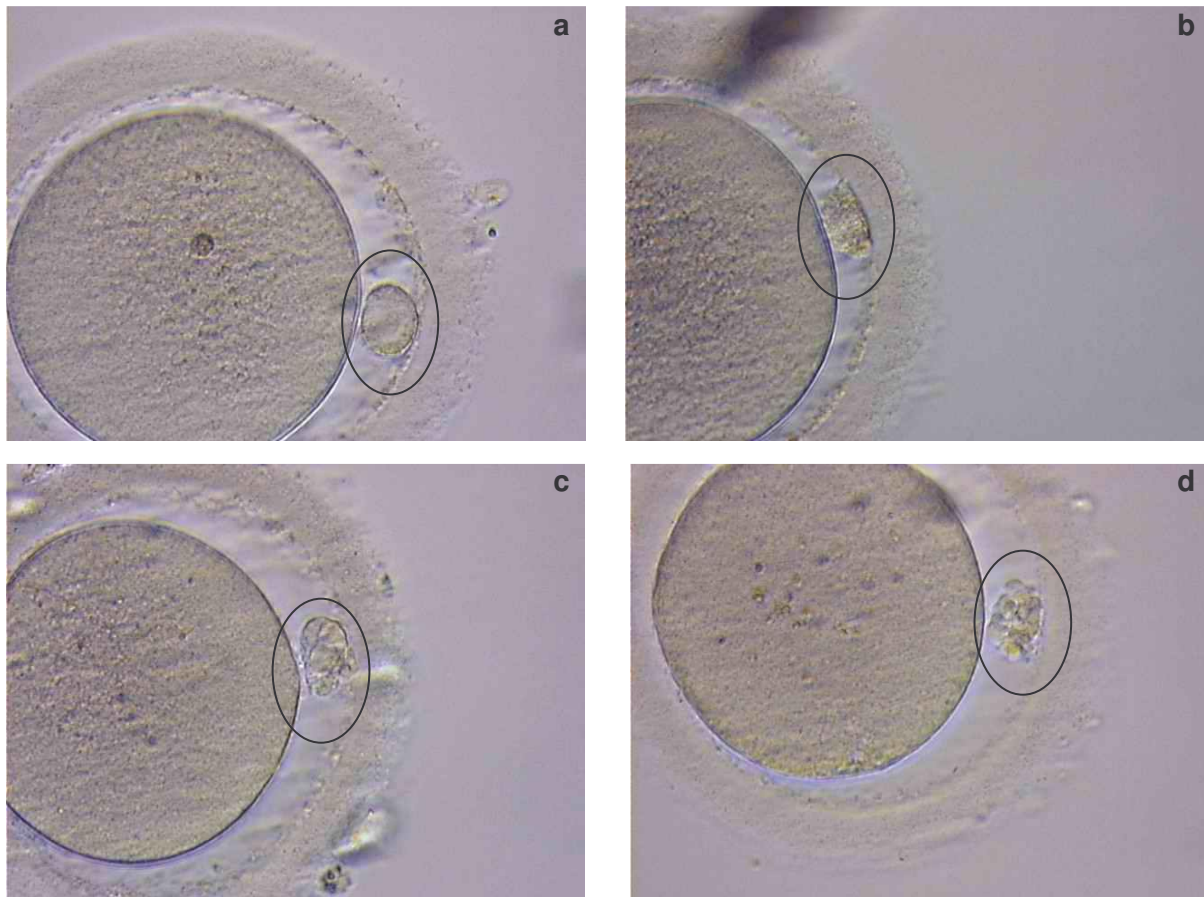


Abb. 17 Polkörperfragmentierung. a) Fragmentierungsgrad 0 = keine Fragmentierung b) Grad 1 = Oberfläche des Polkörpers rau c) Grad 2 = Polkörper gelappt d) Grad 3 = Polkörper in mehrere Teile fragmentiert

20 Polkörper zeigten keine Fragmentierung, 67 Polkörper eine Fragmentierung Grad 1, 47 Grad 2 und 55 Grad 3 (siehe Tab. 9).

Mit einem p-Wert von 0,010 zeigte sich hierbei eine signifikante Korrelation zwischen dem Grad der Fragmentierung und dem Ploidiestatus der Eizelle. Das Model der logistischen Regression machte deutlich, dass ein steigender Fragmentierungsgrad das Risiko einer Aneuploidie um das 1,4-fache steigert. Das bedeutet, dass das Risiko einer Eizelle eine Aneuploidie zu haben bei einem Fragmentierungsgrad von drei 3,1-mal höher ist als bei unfragmentierten Polkörpern (siehe Tab. 16).



Tab. 9 Anzahl der Polkörper in den verschiedenen Kategorien der Fragmentierung zum Ploidie-Status ( $\chi^2$ -test, Cochran-Armitage,  $p=0.010$ )

	Fragmentierungsgrad				gesamt
	0	1	2	3	
<b>aneuploid</b>	10	35	32	40	117
<b>euploid</b>	10	32	15	15	72

### 3.2.1.5 Größe des perivitellinen Raumes:

Die Größe des perivitellinen Raumes wurde in zwei Gruppen unterteilt:

1. Der ersten Kategorie (1) wurden diejenigen Eizellen zugeordnet, die einen perivitellinen Raum besitzen, der nicht breiter war als der Polkörper.

- a) Befand sich die breiteste Stelle des perivitellinen Raumes am Polkörper, wurde die Eizelle in 1a unterklassifiziert.
- b) War dies nicht der Fall erfolgte die Eingruppierung in 1b.

In beiden Fällen berührte der Polkörper sowohl das Ooplasma als auch die Zona pellucida.

2. In Gruppe 2 war der perivitelline Raum vergrößert.

- a) Der Polkörper behielt noch Kontakt zum Ooplasma und zur Zona pellucida.
- b) Der Polkörper verlor diesen Kontakt.
- c) Der perivitelline Raum war stark vergrößert, zwischen Polkörper und Ooplasma war ein deutlicher Abstand
- d) Die Eizelle war abnormal in Form des Ooplasmas der Eizellform insgesamt oder es war kein perivitelliner Raum vorhanden (siehe Abb. 18).

Es wurden 111 Eizellen in die Kategorie 1 (1a = 74, 1b = 37) und 74 in Kategorie 2 (2a = 43, 2b = 11, 2c = 5, 2d = 15) einsortiert (siehe Tab. 10). Für die statistische Auswertung wurden die Kategorien 1 und 2 (unauffällig/ auffällig) gegenübergestellt, ohne die Beachtung der jeweiligen Untergruppen. Es ergab sich eine signifikante Korrelation ( $p= 0,018$ ) zum genetischen Status. Das bedeutet, das Risiko für eine Aneuploidie ist in einer Eizelle mit einem abnormalem perivitellinem Raum 2,9 mal höher als in einer Eizelle mit normalem (siehe Tab. 16).

Tab. 10 Größe des perivitellinen Raumes eingeteilt in auffällig und unauffällig ( $\chi^2$ -Test,  $p=0,018$ )

	PVR		gesamt
	unauffällig	auffällig	
euploid	49	20	69
aneuploid	62	54	116

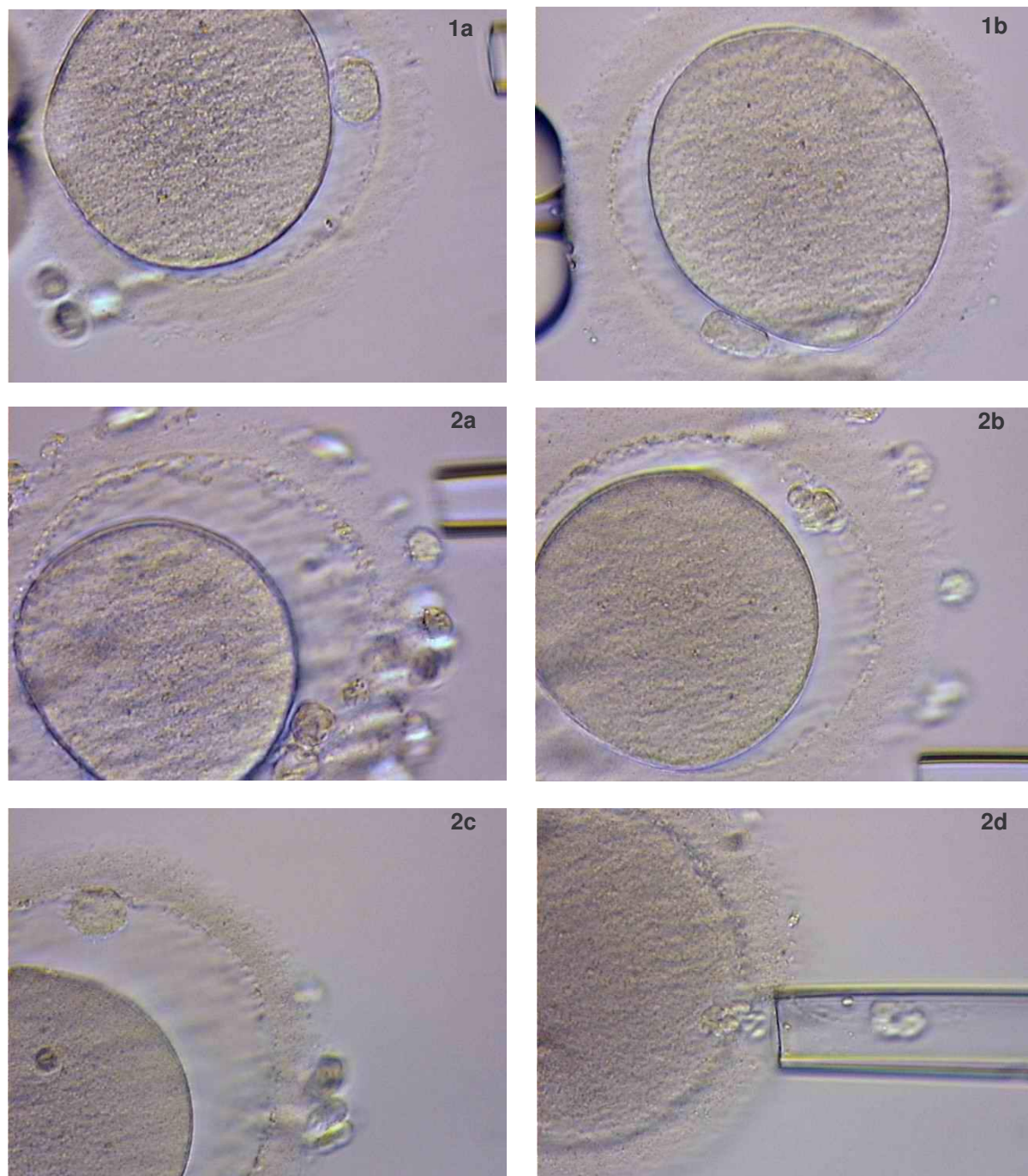


Abb. 18 Größe des perivitellinen Raumes. 1a + b = unauffällig 2a – d = auffällig.

### 3.2.1.6 Gesamteindruck der Eizelle

Als ebenfalls signifikant ( $\chi^2$ -test, Cochran-Armitage,  $p=0.005$ ) erwies sich die subjektive Einteilung der Eizellen nach dem „Gesamteindruck“. Hierin flossen alle einzeln bewerteten Parameter mit ein. Es wurden 10 mit Klasse 1, 71 mit 2, 88 mit 3 und 20 mit 4 bewertet (siehe Tab. 11).

Tab. 11 Gesamteindruck der Eizellen eingeteilt in vier Qualitätsstufen, 1 für sehr gut bis 4 für schlecht ( $\chi^2$ -test, Cochran-Armitage,  $p=0.005$ )

	Gesamteindruck der Eizelle				gesamt
	1	2	3	4	
euploid	6	33	29	4	72
aneuploid	4	38	59	16	117

## 3.2.2 Größenverteilungen

### 3.2.2.1 Deskriptive Statistik der gemessenen Eizellwerte:

Die deskriptive Statistik ergab, dass sich die Mittelwerte der einzelnen gemessenen Komponenten kaum voneinander unterschieden.

Tab. 12 Messwerte der biometrischen Erhebungen. <sup>1</sup> sagt, ob es normalverteilt ist im Kolmogorov Smirnov Test; n= Anzahl der untersuchten Eizellen

Ploidie	Parameter	n	Mittelwert	Standardabw.	Minimum	Maximum	Median	Asympt. Signif. <sup>1</sup>
<b>n.a.</b>	Zonadicke	85	19,475	2,961	10,48	32,07	19,2	0,618
	EZ Radius	85	81,475	2,8	74,45	87,2	81,675	0,983
	Oopl. Radius	85	54,692	2,829	48,1	62,67	54,8	0,486
	PK Radius	78	9,197	1,18	5,8	12,31	9,175	0,997
<b>eupl.</b>	Zonadicke	72	20,362	2,829	15,21	28,81	19,995	0,725
	EZ Radius	72	81,644	3,476	72,78	91,97	81,498	0,806
	Oopl. Radius	72	54,58	2,135	50,38	60,6	54,6	0,975
	PK Radius	68	9,422	1,099	6,88	11,7	9,413	0,911
<b>aneu</b>	Zonadicke	119	18,758	2,955	11,2	26,05	18,61	0,845
	EZ Radius	119	81,664	3,988	71,28	102,8	81,525	0,79
	Oopl. Radius	119	54,462	3,102	46,31	73,13	54,3	0,131
	PK Radius	114	9,264	1,364	6,03	14,02	9,225	0,585

Laut dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest waren alle ermittelten Parameter normalverteilt (siehe Tab. 12). Ein Unterschied wurde in der Zonadicke zwischen den euploiden und aneuploiden Eizellen festgestellt (siehe nächster Absatz). Die anderen Messwerte ergaben keinen Hinweis auf Abhängigkeiten mit dem genetischen Status der Eizellen.

### 3.2.2.2 Dicke der Zona pellucida

Die Dicke der Zona schwankte zwischen 10,5 und 32,1  $\mu\text{m}$ . Die mittlere Zonadicke lag bei den aneuploiden Eizellen bei 18,8  $\mu\text{m}$  und bei den euploiden bei 20,4  $\mu\text{m}$ . Der Kolmogorov-Smirnov-Test zeigte eine Normalverteilung der gemessenen Daten für aneuploid ( $p=0,85$ ) und euploid ( $p=0,73$ ). Der statistische t-Test ergab bei der Zonadicke zum genetischen Status der Eizelle eine signifikante Korrelation ( $p<0,001$ ) bei einem t-Wert von ca.  $-3,7$  (siehe Tab. 13). Aneuploide Eizellen hatten also eine signifikant dünnere Zona als euploide Eizellen. Aus diesen Daten geht hervor, dass eine Abnahme der Zonadicke um 2  $\mu\text{m}$  das Risiko einer Aneuploidie um das 1,5 fache erhöht (siehe Tab. 16).

Tab. 13 Vergleich der Zonadicke bei euploiden vs. aneuploiden Eizellen (t-Test)

	n	Durchschnitt	Standardabweichung	t-Wert	p
<b>aneuploid</b>	119	18,76	2,96	-3,694	0,001
<b>euploid</b>	72	20,36	2,83		

Um herauszufinden, wie gut sich die Zona-Dicke als äußerlich sichtbares morphologisches Kriterium für die genetische Qualität der Eizelle eignet, wurde eine ROC Kurve (Receiver-Operating-Characteristics) berechnet (siehe Abb. 19). Die Kurve liegt links, bzw. oberhalb der Diagonalen, also weist der Test eine 100 %ige Trennschärfe auf. Das Maß für die Güte des Tests, (AUC = Area under curve) beträgt 0,641 mit einem Standardfehler von 0,04 und einer asymptotischen Signifikanz von  $p= 0,001$ . Da die Fläche Werte zwischen 0,5 und 1 annehmen kann, wobei 1 das Optimum ist, weist der Test keine sehr gute Qualität auf. Betrachtet man die Wertetabelle, die dieser Kurve zugrunde liegt (siehe 6.1.9 ), sieht man, dass bei einer Zona-Dicke unter 15,1  $\mu\text{m}$  10,9 % der aneuploiden Eizellen aussortiert werden, ohne dass fälschlicherweise eine gesunde Eizelle ausselektiert wird. Bei unter 17,1  $\mu\text{m}$  sind es 26,1 % Sensitivität und 92 % Spezifität, bei 80 % Sensitivität beträgt die Spezifität nur noch 30 %.

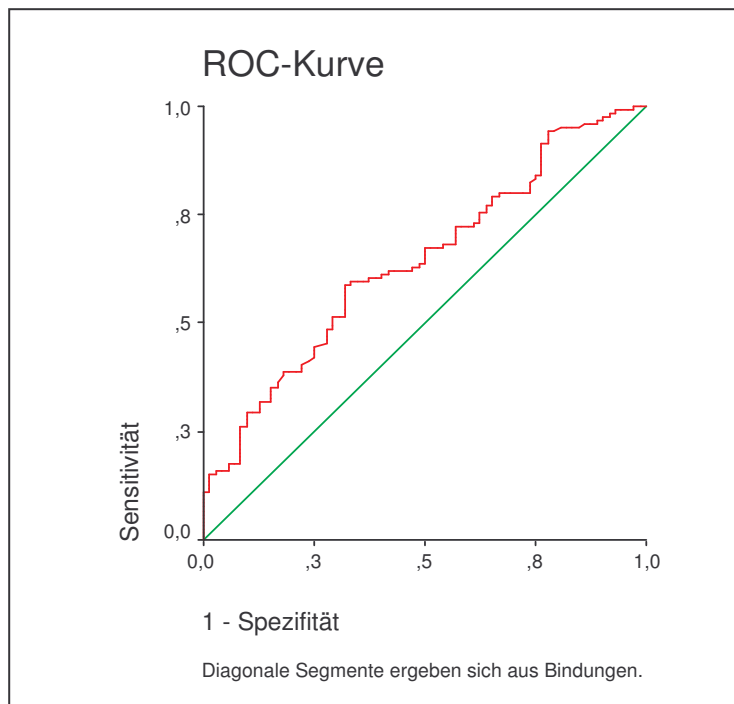


Abb. 19 ROC-Kurve (Receiver-Operating-Characteristics) zur Zona pellucida Dicke: Die rote Linie stellt die ROC-Kurve dar, die grüne Linie ist die Diagonale.

### 3.2.3 Rauchverhalten der Patienten/ innen und Eizellqualität

Da es eine Studie gibt, in der ein Zusammenhang zwischen Nikotin Missbrauch und der Dicke der Zona pellucida beschrieben wurde (Shiloh et al. 2004), wurde dies anhand der Daten dieser Arbeit ebenfalls überprüft. Das Rauchverhalten der Patientinnen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Dicke der Zona pellucida. Die mittlere Zona-Dicke bei Raucherinnen lag bei 19,8  $\mu\text{m}$ , bei Nichtraucherinnen bei 19,2  $\mu\text{m}$  (siehe Tab. 14)..

Tab. 14 Vergleich der Zona pellucida-Dicke bei Rauchern und Nichtrauchern (t-Test; Levene-Test der Varianzgleichheit  $p=0,621$ , t-Test für Mittelwertgleichheit  $p=0,081$ )

	n	Durchschnittl. Zonadicke	Standardabweichung	t-Wert	p
aktives oder passives Rauchen	120	19,8	2,95	-1,754	0,81
Nichtraucher	120	19,2	3,08		

### 3.2.4 Multiples logistisches Regressionsmodell

In die multiple Regression wurden die signifikanten Parameter Zonadicke, Größe des perivitellinen Raums und Polkörperfragmentierung mit einbezogen. Wenn man diese drei Parameter zusammen betrachtet, hat der Test eine Spezifität von 52,8 % und eine Sensitivität von 83,7 %. Das bedeutet, das Gesamtpotential des Tests liegt bei 72,4 %. Wenn man beispielsweise nur die Zonadicke für eine genetische Prognose heranzöge, würden 87 % der aneuploiden Eizellen erkannt, aber nur 26 % der euploiden würden als genetisch intakt eingestuft (siehe Tab. 15).

Tab. 15 Prozente der richtigen Klassifizierung in verschiedenen Stufen des logistischen Regressionsmodells

Getestet mit FISH		Annahme nach der Morphologie		% der Richtigen
		euploid	aneuploid	
<b>Schritt 1</b> (Zona)	euploid	14	39	26,4
	aneuploid	12	80	87,0
	gesamt %			64,8
<b>Schritt 2</b> (Zona/ PVS)	euploid	19	34	35,8
	aneuploid	17	75	81,5
	gesamt %			64,8
<b>Schritt 3</b> (Zona/ PVS/ PK-frag)	euploid	28	25	52,8
	aneuploid	15	77	83,7
	total %			72,4

Tab. 16 Euploide / aneuploide Eizellen in einem logistischen Regressionsmodell

Faktor	Regressions koeffizient $\beta$	Standardfehler	p-Wert	Risk Ratio Exp (B)	95% Konfidenz Intervall	
					oberer Wert	unterer Wert
<b>Zona</b>	- 0.202	0.069	0.003	0.817	0.713	0.935
<b>Fragment.</b>	0.374	0.191	0.050	1.454	0.999	2.116
<b>PVR</b>	1.071	0.415	0.010	2.918	1.295	6,579
<b>Konst.</b>	3.586	1.408	0.011	36.074		

### 3.2.5 Konditionelle Regressionsanalyse mit einer Stratifizierung nach Individuen

Um auszuwerten, ob sich die Eizellen von Patientin zu Patientin unterscheiden, oder ob man die Eizellen als von der Patientin unabhängige Einheit betrachten darf, wurde eine Stratifizierung nach Individuen durchgeführt. Die Signifikanzwerte verschoben sich hierbei leicht, doch die Tendenzen blieben bestehen.

Tab. 17 Aneuploide / Euploide Eizelle in einem konditionellen Regressionsmodell mit Stratifizierung nach Individuen

Faktor	Regressionskoeffizient $\beta$	Standardfehler	p-Wert	Risk Ratio Exp (B)	95% Konfidenz Intervall	
					oberer Wert	unterer
<b>Zona</b>	-0,159	0,091	0,08	0,853	0,714	1,020
<b>Fragmentierung</b>	0,353	0,208	0,09	1	0,546	2,14
<b>PVR</b>	1,361	0,513	0,008	4	1,428	10,66

Bei der Zonadicke stieg das Risiko bei einer Abnahme der Dicke um 2  $\mu\text{m}$  um das 1,4-fache (ohne Adjustierung 1,5 x), bei der Polkörperfragmentierung von Grad 0 auf Grad drei um das 2,9-fache (ohne Adjustierung 3,1 x) und beim perivitellinen Raum lag die Wahrscheinlichkeit einer Aneuploidie bei einer Eizelle mit anormalem perivitellinem Raum um das 3,9-fache (ohne Adjustierung 2,9 x) höher (siehe Tab. 17).

Daher kann man davon ausgehen, dass es sich bei den gefundenen Korrelationen um auf Eizellen basierende und nicht auf Patienten bezogene Korrelationen handelt.

## 3.3 Vergleichende Chromosomenhybridisierung an Einzelzellen (CGH)

### 3.3.1 Zeitverkürzung bei der vergleichenden Chromosomenhybridisierung

Für die vergleichende Chromosomenhybridisierung an Polkörpern mussten diese in PCR Caps übertragen werden. Es stellte sich heraus, dass dieser Vorgang komplizierter war, als das Übertragen auf den Objektträger bei der Diagnostik mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung. Für sechs Polkörper wurden ca. zwei Stunden benötigt. Der Proteinase K Verdau wurde von ehemals zwei Stunden und zehn Minuten auf eine Stunde und zehn Minuten verkürzt. Die STP-DOP-PCR inklusive Markierung dauerte fünf Stunden.

Die herkömmliche DOP-PCR alleine benötigte bereits ca. 5 Stunden, eine zusätzliche Markierung mittels DOP dauerte erneut 4,5 Stunden. Verwendete man anstelle der DOP Markierung die Nick-Translation entfielen auf die Markierungsreaktion ca. 2 Stunden. Das bedeutet, dass die direkte Markierung in der STP-DOP eine Zeitersparnis von ca. 4,5 Stunden zum herkömmlichen DOP-Protokoll und von mindestens zwei Stunden zum Protokoll von Gutierrez-Mateo (2004a, b) einbringt.

Das Fällern der DNA, das zuvor über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  erfolgte, konnte erfolgreich auf eine Stunde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  verkürzt werden. Die gefällte DNA wurde ohne Vorhybridisierung direkt nach der Denaturierung hybridisiert, was eine weitere Zeitersparnis von 30 Minuten erbrachte. Die größte zeitliche Ersparnis entstand durch die Verwendung des Slide-Boosters. Die Hybridisierungszeit wurde hierdurch von 12 Stunden auf eine Stunde reduziert. Der verkürzte Zeitplan wird in Tab. 18 in Kurzform dargestellt.

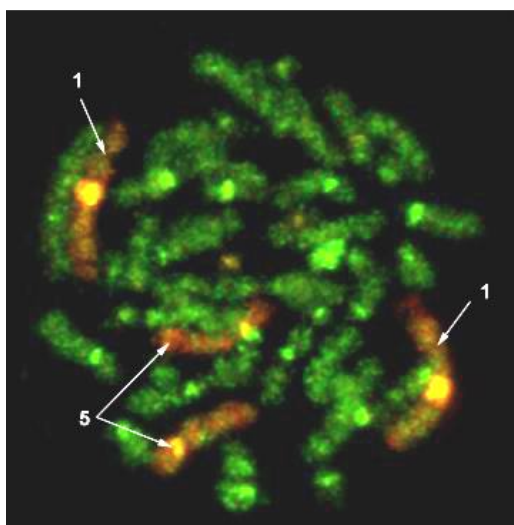
Tab. 18 Ablaufprotokoll der verkürzten vergleichenden Chromosomenhybridisierung

Arbeitsschritt	Dauer [h]	Zeit nach ICSI [h]
Wartezeit nach Spermieninjektion	03:00	03:00
Polkörperbiopsie (6 Polkörper)	02:00	05:00
Proteinase K Verdau	01:10	06:10
STP-DOP-PCR mit Markierung	05:00	11:10
Fällen und Trocknen der DNA	02:00	13:10
Denaturieren und Hybridisieren	01:10	14:20
Pipettierzeiten ca.	02:00	16:20
Waschen und Auswerten	01:30	17:50

### 3.3.2 Vergleichende Chromosomenhybridisierung (CGH) an Polkörpern

#### 3.3.2.1 Vergleichende Chromosomenhybridisierung an Polkörpern mit DOP-PCR und DOP-Markierung

Bei einem Polkörper, der aus einer unbefruchteten gebliebenen Eizelle entnommen wurde, wurde im langen Protokoll mit der DOP-PCR und anschließender DOP-Markierung eine deutliche Aneuploidie der Chromosomen 1 und 5 nachgewiesen (Abb. 20). Diese Aneuploidie ist bereits in der Aufnahme der Metaphase deutlich durch eine Rotfärbung



sichtbar. Da die Polkörper-DNA mit einem roten Farbstoff markiert wurde, handelt es sich hierbei um im Polkörper überrepräsentierte Chromosomen.



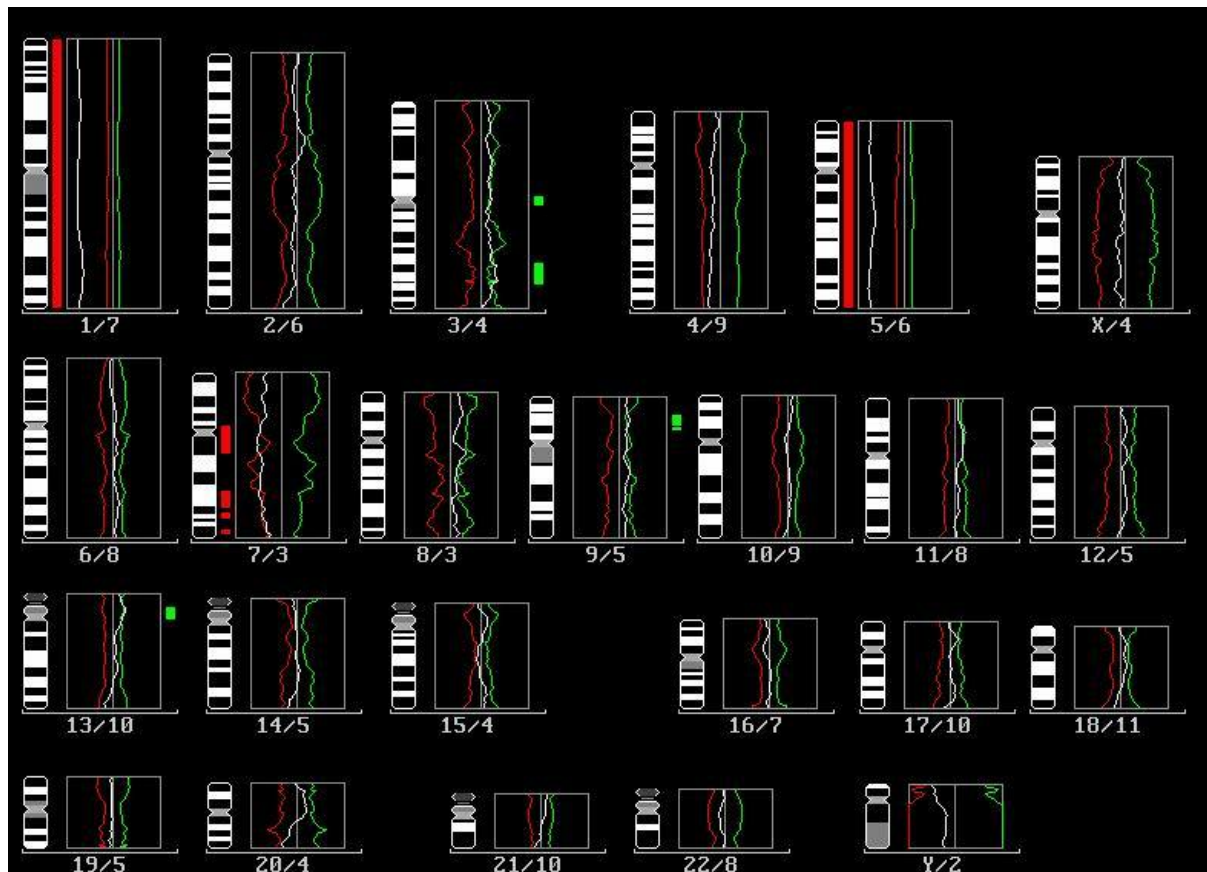
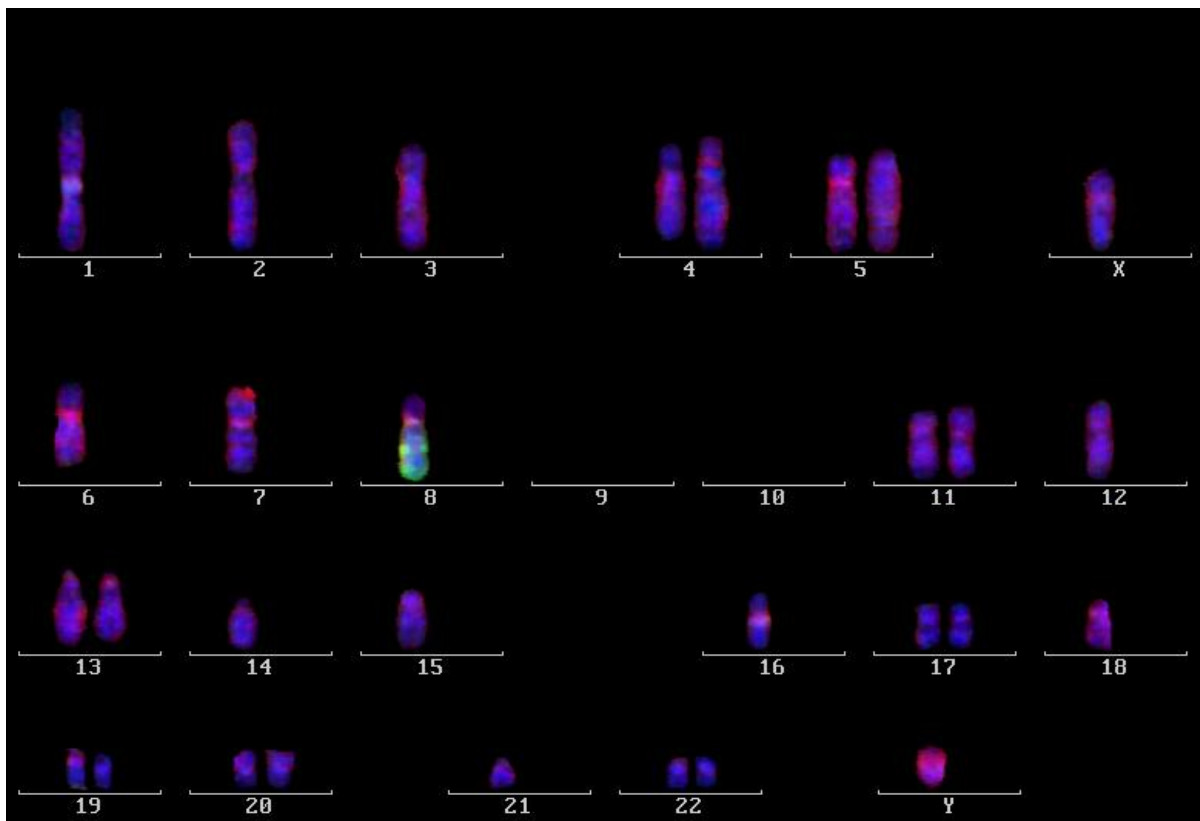
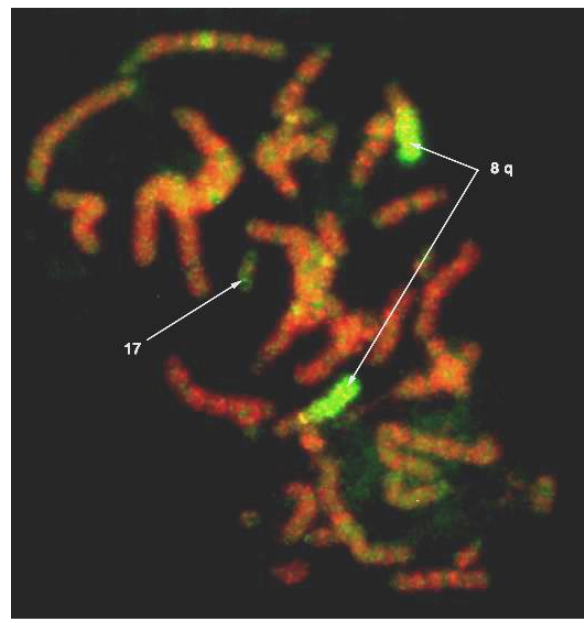
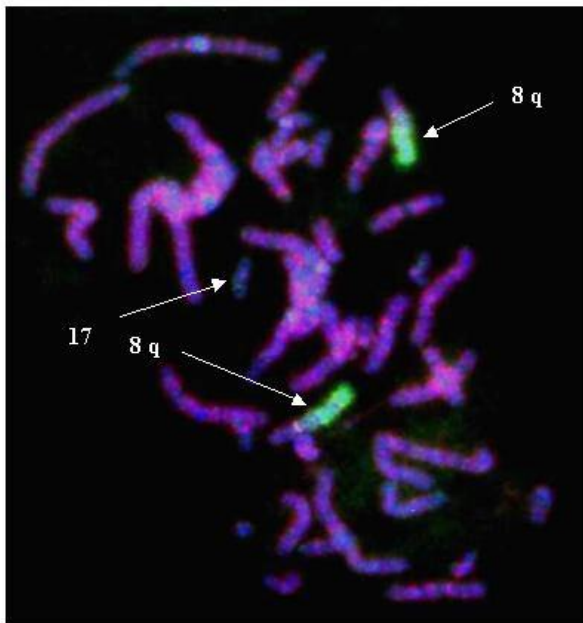


Abb. 20 Vergleichende Chromosomenhybridisierung (CGH) eines Polkörperns nach DOP-PCR und DOP-Markierung. Das obere Bild zeigt eine Metaphase mit einer Überrepräsentation der Polkörper-DNA in den Chromosomen 1 und 5. Diese Aneuploidie stammt aus einem Polkörper, der im langen Protokoll mit der DOP-PCR aus 3.3.2.1 durchgeführt wurde. Das untere Bild zeigt das dazugehörige Profil der vergleichenden Chromosomenhybridisierung. Rot ist jeweils die Polkörper DNA dargestellt, grün die Referenz-DNA.

### 3.3.2.2 Vergleichende Chromosomenhybridisierung an Polkörpern mit künstlichen Aneuploidien

Die durch Mikrodissektion den Polkörpern hinzugefügt Chromosomenarme (siehe 2.4.13.4) konnten in den meisten Fällen nach der Hybridisierung als Überrepräsentation nachgewiesen werden. Bei einem der Polkörper konnte zusätzlich eine natürlich entstandene Aneuploidie detektiert werden. Die natürliche Aneuploidie war in der Metaphase und dem Karyogramm weniger deutlich zu erkennen, aber die Software wies eine deutliche Überrepräsentation nach (siehe Abb. 21).



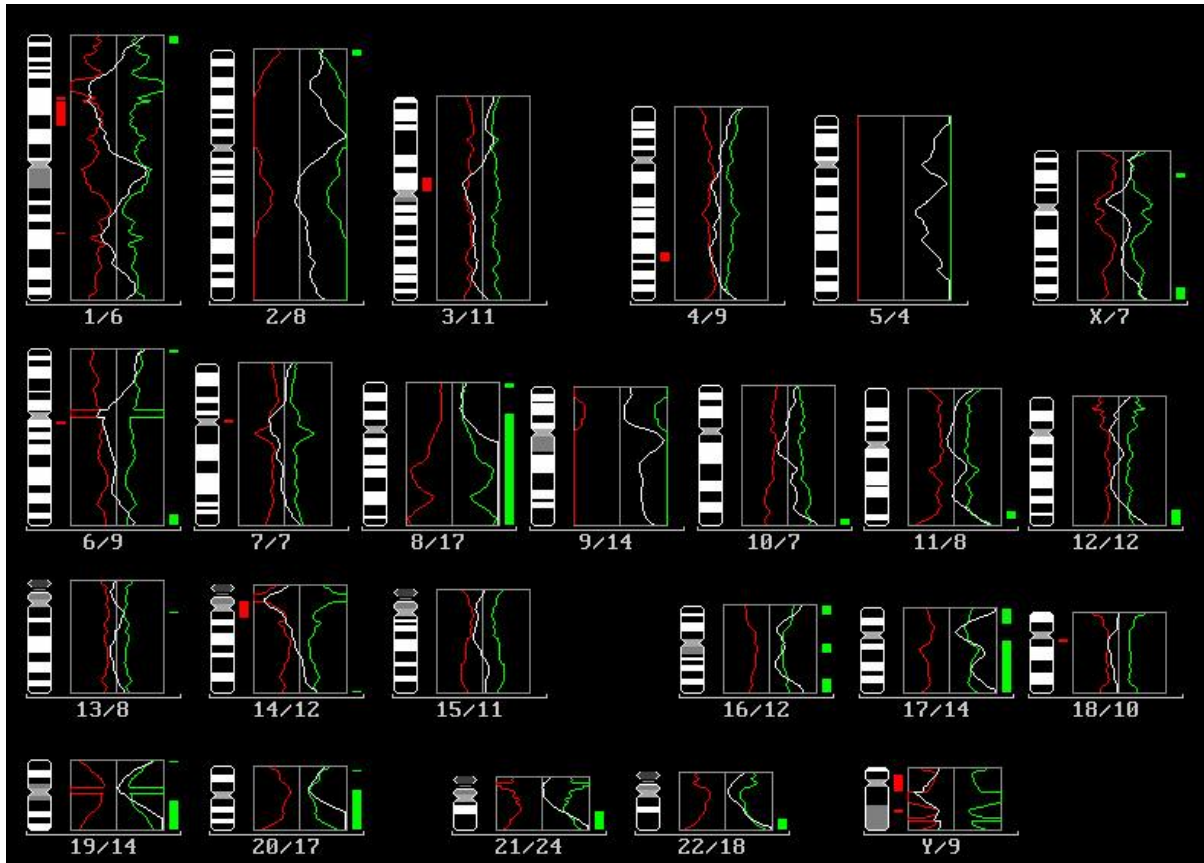
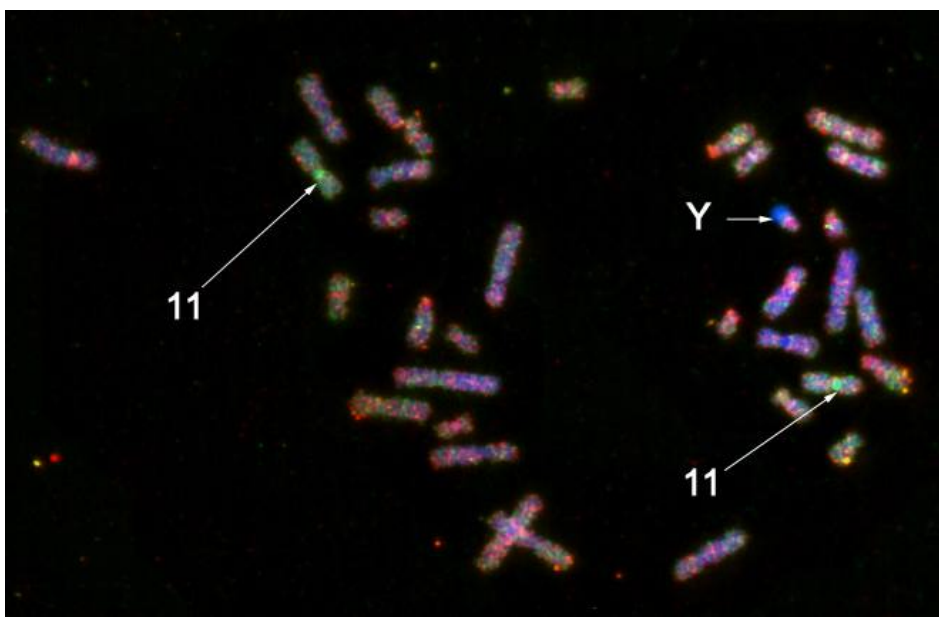


Abb. 21 Vergleichende Chromosomenhybridisierung (CGH) mit künstlich hergestellten Aneuploidien. Oben: Metaphase mit der künstlich hergestellten Überrepräsentation von 8 q. Zusätzlich eine natürlich entstandene Überrepräsentation in Chromosom 17. Oben links eine Aufnahme mit DAPI (blau) und oben rechts ohne die blaue Farbe. Mitte: das Karyogramm und unten das CGH – Profil des Polkörpers. Die Polkörper-DNA wurde grün, die Referenz-DNA rot dargestellt.

### 3.3.2.3 Vergleichende Chromosomenhybridisierung an Polkörpern mit dem verkürzten Protokoll



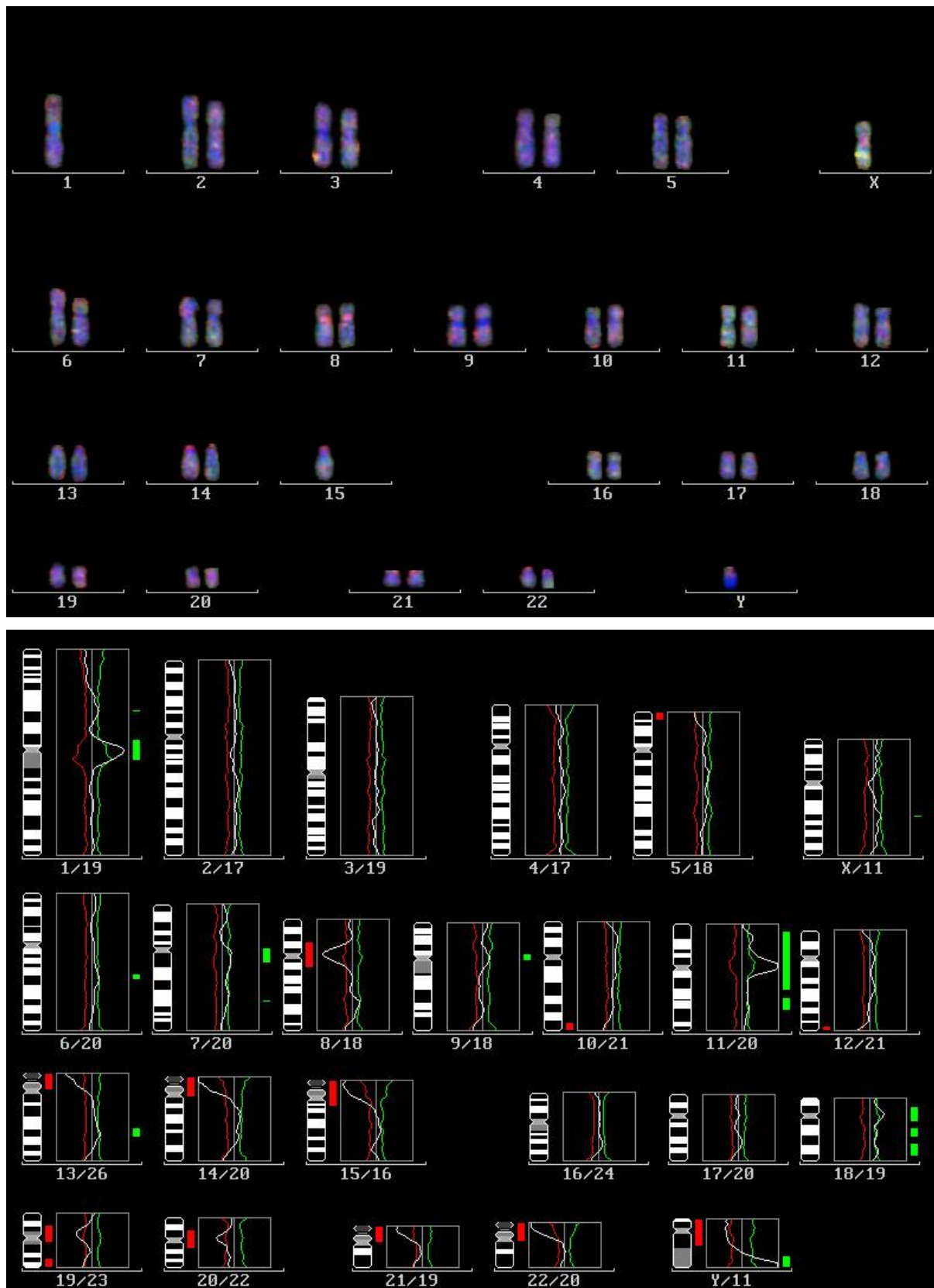


Abb. 22 Vergleichende Chromosomenhybridisierung (CGH) mit einem Polkörper gegen eine männliche Buccalzelle im verkürzten Protokoll a) Metaphase b) und c) Karyogramm d) CGH-Profil. Das CGH – Profil deckt eine Überrepräsentation in den Chromosomen 11 und 18 im Polkörper auf, die anhand der Metaphase nicht zweifelsfrei zu identifizieren wäre. Die Polkörper-DNA wurde grün, die Referenz-DNA rot dargestellt.

Nach der vergleichenden Chromosomenhybridisierung mit dem verkürzten Protokoll waren die Chromosomen oft weniger gleichmäßig gefärbt, jedoch zeigt das Profil eine eindeutige Überrepräsentation in den Chromosomen 11 und 18, welche erst durch die digitale Bildverarbeitung zweifelsfrei interpretierbar wurden (siehe Abb. 22).

## 4 Diskussion

### 4.1 Etablierung der Polkörperdiagnostik

Zur Etablierung der Polkörperdiagnostik wurden zunächst verschiedene Verfahren zur Polkörperentnahme, Übertragung auf den Objektträger, Fixierung und Hybridisierung ausgetestet und das jeweils favorisierte Verfahren perfektioniert.

#### 4.1.1 Kriterien der Patientenauswahl für eine Polkörperdiagnostik anhand der Eizellqualität

Die ermittelte Aneuploidierate lag bei ca. 60 % und die Befruchtungsrate bei der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) bei 74,43 % der injizierten Eizellen. Unter Einbeziehung morphologischer Gesichtspunkte kam man schätzungsweise auf eine Zahl von mindestens acht reifen Eizellen, die mit Polkörperbiopsie untersucht werden mussten. Erst dann ergab sich statistisch gesehen die Möglichkeit, dass zwei bis drei euploide, befruchtete, morphologisch intakte Eizellen für die Übertragung in den Mutterleib kultiviert werden konnten. Waren hingegen weniger als acht Eizellen verfügbar, musste mit der Möglichkeit gerechnet werden, dass weniger als drei Embryonen für den anschließenden Transfer zur Verfügung standen. Montag et al. (2002b) berechneten sogar eine notwendige Eizellzahl von  $7,8 \pm 2,9$  um ein bis zwei Embryonen ohne Aneuploidie in den untersuchten Chromosomen übertragen zu können.

Man durfte hierbei auch nicht außer Acht lassen, dass Eizellen durch die Biopsie zusätzlichem Stress ausgesetzt wurden, was deren Entwicklung beeinflussen konnte. Zudem war auch der finanzielle Aspekt zu beachten, da die Polkörperdiagnostik ein teures Verfahren ist, welches sich nur lohnt, wenn am Ende zwei bis drei gesunde Eizellen ausgewählt und für den Transfer kultiviert werden können.

Ebenfalls sollte die Zahl der biopsierten Eizellen 15 nicht übersteigen, soweit die Frau keine erwiesene besonders hohe Aneuploidierate in den Eizellen hatte, weil überschüssige intakte Eizellen nach der Biopsie verworfen werden mussten.

Zeigten die Eizellen morphologische Auffälligkeiten, die eine Polkörperbiopsie als kontraindiziert erscheinen ließen, wurde die Biopsie ebenfalls nicht durchgeführt. Hier sind z.B. Eizellen mit nicht optimalem Zytoplasma zu nennen, sie hatten eigenen Beobachtungen nach eine niedrigere Befruchtungsrate. Dies wurde auch in der Literatur beschrieben (Xia 1997, Van Blerkom 1992). Zusätzlicher Stress durch die mechanische Manipulation könnte die Befruchtungsrate weiter herabsetzen. Daher war nicht sichergestellt, dass am Tag 1 genügend befruchtete Eizellen zur Verfügung stehen, um eine Selektion nach genetischen

Kriterien vornehmen zu können. Da unsere Untersuchungen keinerlei Zusammenhang zwischen der Beschaffenheit des Zytoplasmas und dem Ploidie-Status der Eizellen für die untersuchten fünf Chromosomen ergeben haben, wurde aufgrund schlechter Zytoplasmaqualität keine Indikation gesehen, die Biopsie dennoch durchzuführen.

#### 4.1.2 Polkörperbiopsie

Zum Biopsieren des Polkörpers musste zunächst die Zona pellucida geöffnet werden. Das Loch in der Zona musste gerade so groß sein, dass man die Biopsiepipette hindurch bis an den Polkörper heranführen konnte. Jedoch durfte die Öffnung nicht zu groß werden, da an dieser Stelle sonst das Ooplasma austreten konnte. Da der Embryo später die künstlich herbeigeführte Öffnung in der Zona dazu benutzt, um zur Implantation im Uterus aus der Zona pellucida zu schlüpfen (hatching), war es wichtig, nur genau ein Loch in die Zona zu bringen, da der Embryo sonst versuchen konnte durch beide Öffnungen gleichzeitig auszutreten und stecken bliebe. Dieser Umstand war vor allem wichtig, wenn beide Polkörper biopsiert werden sollten. Auch sollte die Öffnung mindestens 20 µm Durchmesser betragen, um den ungehinderten Durchtritt des Embryos zu ermöglichen.

Zur Öffnung der Zona gab es drei Möglichkeiten: die enzymatische Öffnung mit saurer Tyrodelösung, die Zona Dissektion und das Öffnen eines Loches mit einem Dioden Laser.

Als Standard wurde die Laser Biopsiemethode etabliert, da sie gegenüber der Verwendung der Zona Dissektionsmethode (siehe 2.2.1) den Vorteil hatte, dass die Mikronadel und die Biopsiepipette während des Biopsievorganges nicht gewechselt werden mussten. Durch einen Wechsel der Pipetten wurde der Arbeitsvorgang der Methode der Zona Dissektion umständlich.

Verlinsky und seine Arbeitsgruppe halten dennoch auch nach vielen Jahren noch an der Zona Dissektionsmethode fest (Cieslak et al. 1999, Gianaroli et al. 2000). Hierbei wurden unterschiedliche Schlitz in die Zona eingebracht, je nachdem, ob eine Blastomere oder ein Polkörper entnommen werden sollte. Für die Entnahme des Polkörpers wurde ein kreuzförmiger Schnitt (siehe 2.2.1), für die Blastomerbiopsie ein V-förmiger Schnitt durchgeführt. Letzterer führte zu einer größeren Öffnung, die für die Entnahme der größeren Blastomeren notwendig war. Der kreuzförmige Schnitt wurde von Cieslak et al. (1999) auch für die assistierte Schlüpfhilfe (Assisted hatching) benutzt.

Auch gegenüber der Methode der Zonaöffnung unter Verwendung von Tyrodelösung (siehe 2.2.1) wie sie in verschiedenen Arbeitsgruppen erfolgreich angewendet wurde (Joris et al. 2003, Gordon and Gang 1990) war die Lasermethode im Vorteil, weil die Auflösung der Zona mit der Tyrode-Lösung mühsam und die Lochgröße schwer zu kontrollieren war. Dieses Problem wurde auch schon von De Vos und Van Steirteghem (2001) beschrieben.

Mit Hilfe eines Diodenlasersystems war die Lochgröße durch Verändern der Pulslänge und -Stärke genau festzulegen. Da das Loch ein Eindringen mit der Biopsiepipette in den perivitellinen Raum ermöglichte, konnte eine Pipette mit gerader Öffnung für die Biopsie benutzt werden, was das Verletzungsrisiko der Eizelle minimierte (Montag et al. 1998). Dies war auch die schnellste Methode, denn die Öffnung der Zona war mit einem einzigen Laserschuss von wenigen Millisekunden Länge zu öffnen. Zudem konnten, nachdem man die Biopsiepipette einmal eingespannt und justiert hatte, alle Eizellen nacheinander biopsiert werden. Auch wenn in anderen Arbeitsgruppen mit allen drei Methoden sehr gute Ergebnisse erzielt wurden, wurde in dieser Arbeit, aus vorgenannten Gründen, die Zona-Öffnung mit Hilfe des Lasers durchgeführt (siehe 2.2.2).

Bei der Polkörperbiopsie mussten nach dem Öffnen der Zona jedoch einige andere Schwierigkeiten überwunden werden, die im Folgenden diskutiert werden:

Eine Schwierigkeit im Prozess der Biopsie war, den Polkörper beim Einsaugen in die Biopsiepipette stabil im vorderen Teil der Pipette zu halten. Wurde er zu tief in die Pipette eingesaugt, ging er verloren. Wurde er hingegen versehentlich aus der Pipette ausgeblasen, solange man sich noch im Tropfen der Eizelle befand, konnte man beim Wiederaufnehmen Teile eines fragmentierten Polkörpers verlieren, was zu fehlerhaften Ergebnissen führen konnte, wenn in dem verlorenen Polkörperfragment Chromosomen enthalten waren. Außerdem war eine Verwechslung mit Kumuluszellen unter Umständen nicht auszuschließen. Um Fehler dieser Art zu vermeiden, wurden speziell für die Polkörperbiopsie hergestellte Pipetten verwendet, die einen besonders langen dünnen Bereich vor dem Winkel der Pipette aufwiesen und so die Flüssigkeitsbewegung in der Pipette gut kontrollierbar machten.

#### **4.1.3 Biopsiefähigkeit abhängig vom Alter der Eizellen**

Die Perfektionierung der Methode konnte trotz der vorangegangenen 200 zu Trainingszwecken biopsierten Eizellen erst mit dem frischen Patientenmaterial erreicht werden. Die frischen Eizellen zeigten während der Biopsie völlig andere Materialeigenschaften als länger kultivierte, und der Laser hat eine andere Auswirkung auf die Lochgröße in der Zona pellucida. Der frühestmögliche Zeitpunkt für die Entnahme des ersten Polkörper war drei Stunden nach der Spermieninjektion (ICSI). Ab diesem Zeitpunkt war die Eizelle weniger empfindlich gegenüber weiterer Manipulation, da sich aufgrund der erfolgten Kortikal-Granula-Reaktion das Oolemma verhärtete. Die Polkörper waren besser biopsierbar, das Oolemma stabiler und das Ooplasma an Tag 1 nach der Biopsie seltener aus der Zona ausgetreten.



#### 4.1.4 Fixierung der Polkörper

Die Fixierung der Polkörper erwies sich zunächst als schwierigster Teil der Prozedur. Für die Anwendung in der Patientenbehandlung hatte das Verfahren verschiedene Ansprüche. Es durften möglichst keine Polkörper während der Fixierung verloren gehen, die Fixierung durfte nicht zu lange dauern und nicht den Biopsieprozess unterbrechen. Außerdem mussten die Polkörper unter dem Fluoreszenzmikroskop gut und schnell wiederauffindbar sein. Zusätzlich sollte möglichst wenig Sondenmaterial eingesetzt werden, um die Kosten für den Patienten bezahlbar zu halten. Daher wurden verschiedene Verfahren zur Fixierung ausprobiert.

Mit dem letztendlich verwendeten Verfahren, einer Abwandlung der Methode von Tarkowski (1966), wurden verschiedene Schwierigkeiten der bisher veröffentlichten Fixierungsverfahren überwunden.

Die Methode nach Tarkowski (siehe 2.2.1) wurde bereits 1966 zur Fixierung von Mäuse-Eizellen entwickelt (Tarkowski 1966). Tarkowski inkubierte die Eizellen für 5 bis 15 min in einem Schälchen mit hypotonischer Lösung, bevor er sie auf den Objektträger pipettierte. Die Polkörper waren jedoch sehr viel kleiner und unter der Stereolupe in der Flüssigkeit kaum von Staubpartikeln oder Kumuluszellen zu unterscheiden. Zudem waren die Polkörper in der hypotonischen Lösung stark adherent. Einmal an den Schalenboden abgesunken, war es nicht möglich, den Polkörper wieder in die Pipette aufzunehmen. Die Verlustrate der Polkörper erwies sich an dieser Stelle als recht hoch. Auch das „Wandern“ des Polkörpers nach dem Auftragen des Fixativs brachte erhebliche Verluste und machte eine exakte Positionierung der Polkörper auf dem Objektträger unmöglich, was bei der Untersuchung von acht und mehr Eizellen eine große Menge an Sondenmaterial erfordert hätte.

Unser Verfahren ermöglichte zunächst eine Biopsie und Übertragung aller Polkörper auf den Objektträger und eine anschließende Fixierung aller Polkörper gleichzeitig. Durch das Antrocknen der Polkörper in der hypotonischen Lösung direkt auf dem Objektträger hatten diese bereits vor der eigentlichen Fixierung eine feste Position erhalten. Hieraus ergab sich der Vorteil, dass die Polkörper auf sehr engem Raum und sehr exakt positioniert abgelegt werden konnten, was die Auswertung stark vereinfachte und nur geringe Mengen an Sondenmaterial erforderte.

Außerdem hatte unsere Fixierung den Vorteil, dass einzelne Chromosomen nicht weit abgetrieben wurden und so zu falschen Ergebnissen führen konnten. Ein Nachteil war jedoch, dass die von Tarkowski (1966) beschriebene deutliche Spreitung der Chromosomen mit der abgewandelten Methode nicht zu erreichen war. Die Chromosomen waren nicht einzeln darstellbar. Dieser Nachteil wurde aber in Kauf genommen, da die vollständige Spreitung bei unserer Diagnose mit Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) eine untergeordnete Rolle spielte.

Im Gegensatz zu dem von Kamiguchi (1986) beschriebenen Verfahren fand bei unserer Methode keine Inkubation im Fixativ statt, wobei viele Polkörper bei dem Versuch verloren gingen, sie nach der Inkubation wieder in eine Pipette aufzunehmen und auf den Objektträger zu übertragen. Ebenfalls war eine geordnete Sortierung mehrerer Polkörper auf einem Objektträger im Vergleich zu der von uns verwendeten Methode schwieriger. Ein weiterer Vorteil der von uns abgewandelten Methode bestand darin, dass die Fixierung ohne Sichtkontrolle und damit unter dem Abzug durchgeführt werden konnte, ohne dass hierbei Polkörper verloren gingen. Auch ein minutenlanges Einatmen der Methanol- und Essigsäuredämpfe und das Pipettieren von Methanol mit der mundschlauchkontrollierten Pipette war hierbei nicht nötig, was bei dem Verfahren von Kamiguchi (1986) eine gesundheitliche Gefährdung darstellte. Die Kristalle, die beim Eintrocknen der hypotonischen Lösung entstanden, verschwanden nach dem Auftragen des Fixativs und wirkten sich im Weiteren nicht störend auf die Fixierungs- und Hybridisierungsqualität aus.

#### **4.1.5 Hybridisierung und Auswertung**

Die Qualität der Hybridisierungsergebnisse schwankte mit der Hybridisierungsmethode. Technische Probleme einer zu Anfang benutzten älteren In-Situ-PCR Maschine, die eine große Menge an Hintergrundsignalen (Sternenhimmel) auf dem Objektträger hinterließ, was die Signale auf dem Polkörper vor allem in Texas Red häufig unauswertbar machte, konnte durch die Verwendung des Hybride (Abbot) und des Slide-Boosters (Advalytix) überwunden werden. Mit beiden Geräten ließen sich zuverlässig qualitativ gute Ergebnisse erzielen.

Bei dem verwendeten Filtersatz wurde zur Auswertung des Chromosoms 22 ein für die entsprechende Sonde nicht ganz optimaler Spectrum Orange Filter verwendet. Trotzdem waren die Signale zufriedenstellend auswertbar.

Der optimale Spectrum Gold Filter wurde im späteren Verlauf dieser Arbeit angeschafft und verbesserte die Auswertbarkeit der Signale deutlich.

Das größte Problem lag in der Interpretierung der Hybridisierungsergebnisse. Manchmal war nicht eindeutig zu entscheiden, ob es sich um zwei oder mehr Signale handelte. Dies war insbesondere dann der Fall, wenn auch um den Polkörper herum andere Signale detektierbar waren und Zweifel bestanden, welche Spots sich in der Polkörperstruktur befanden. Zur Lösung dieses Problems wurden zunächst Fotos von allen Signalen gemacht und der Polkörper danach mit einem allgemeinen Farbstoff für DNA (DAPI) nachgefärbt. Dadurch wurde die gesamte Polkörperstruktur angefärbt, und anhand der vorher aufgenommenen Fotos konnte nun entschieden werden, welche der Signale im Polkörper lagen.

Auch die Hybridisierung ließ sich erst mit dem frischen Material perfektionieren, da Polkörper von länger kultivierten Eizellen nur selten ein verwertbares

Hybridisierungsergebnis erbrachten. Allgemein gilt eine Eizelle in vivo ca. 12 als befruchtungsfähig. Es ist anzunehmen, dass nach Ablauf dieser Zeit die Degeneration der Eizelle beginnt. Da eine ausgebliebene Befruchtung nach der Spermieninjektion im Labor erst ca. 24 Stunden nach der Eizellentnahme erkannt wird, könnte hier bereits eine Degeneration der Eizelle und damit auch der DNA begonnen haben. Diese könnte weiterhin dazu führen, dass nach der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung keine auswertbaren Ergebnisse erhalten wurden.

#### **4.1.6 Erfassung der Aneuploidierate**

Unter Beachtung der geringen Fallzahl liegt der Anteil der in dieser Arbeit als aneuploid eingestuften Eizellen mit ca. 60 % etwas höher als dies in der Literatur beschrieben ist. Verlinsky beschrieb eine Aneuploidierate von durchschnittlich 42 % für die Chromosomen 13, 18, 21 (Verlinsky et al. 1997, 1998, 1999) und 23 bzw. 33 % für die Chromosomen 13, 18, 21 und X (Verlinsky et al. (1995, 1996). Munne et al. (2000) verwendete ein Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierungskit der Firma Vysis mit den Chromosomen 13, 16, 18, 21 und 22 und bestimmte eine Aneuploidierate von 33,3 %.

Da bei den Patientinnen keine Auswahl nach dem Alter der Frau getroffen wurde, nahmen an den Untersuchungen auch sehr junge Frauen teil. Interessant war hierbei, dass sich der prozentuale Anteil der aneuploiden Eizellen zwischen den Altersgruppen nicht unterschied, obwohl allgemein anerkannt ist, dass die Aneuploidierate in den Eizellen mit steigendem mütterlichen Alter zunimmt (Munne et al. 1995a,b, Benadiva et al. 1996, Pelletor et al. 2005). Jedoch war in der vorliegenden Arbeit ebenfalls ein Anstieg der Aneuploidierate in den Chromosomen 16, 21 und 22 mit zunehmendem Alter der Patientinnen deutlich sichtbar. Hingegen war in Chromosom 13 bei den <30-jährigen die höchste Aneuploidierate zu verzeichnen, welche mit dem steigenden Alter deutlich sank. Dieser Umstand trug dazu bei, dass die gesamte Aneuploidierate in allen Altersgruppen nahezu gleich war.

#### **4.1.7 Erfassung der Schwangerschaftsrate**

In den hier vorliegenden Daten hat sich gezeigt, dass eine Erhöhung der Schwangerschaftsrate (23,2 % / ET) gegenüber derjenigen bei einer konventionellen Befruchtung durch intrazytoplasmatische Spermieninjektion (24,48 % / ET) mit den in dieser Studie untersuchten Chromosomen nicht zu erzielen ist.

Warum der Ausschluss von Eizellen mit einer Aneuploidie der untersuchten Chromosomen nicht zur gewünschten Erhöhung der Schwangerschaftsrate führte, kann verschiedene Ursachen haben:

Ein möglicher Kritikpunkt an dem verwendeten Verfahren wäre, dass bei jeder Eizelle nur der erste Polkörper untersucht wurde. Außerdem wurde nur das weibliche Erbgut betrachtet.

Jedoch zeigten Studien, in denen der Ursprung von Chromosomen-Verteilungsstörungen mit Hilfe von DNA-Markern untersucht wurde, dass in den allermeisten Fällen das weibliche Erbgut der Ursprung der Fehlverteilungen war und dass diese vor allem aus der ersten meiotischen Teilung herrührten. So fanden Sherman et al. (1991) heraus, dass in 94 % der Fälle die Fehlverteilung einer Trisomie 21 auf das mütterlich Erbgut zurückging und dass in 70 % der Fälle die Störung bereits in der ersten Meiose auftrat. Hassold et al. (1991) fanden heraus, dass 100 % der von ihnen untersuchten Fälle zur Trisomie 16 auf die Meiose I der Mutter zurückzuführen war. Somit war davon auszugehen, dass mit der Untersuchung des ersten Polkörpers schon die meisten Fehlverteilungen der untersuchten Chromosomen aufgedeckt werden konnten.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass für eine Erhöhung der Schwangerschaftsrate andere Chromosomen auf Fehlverteilungen untersucht werden müssten. Bei den im Vysis Kit enthaltenen Chromosomen 13,16, 18, 21 und 22 handelt es sich um jene Chromosomen, die am häufigsten in Spontanaborten gefunden wurden (Munne et al 2002) oder sogar zu lebensfähigen körperlich und geistig behinderten Nachkommen führen. Dass andere Chromosomen, insbesondere die größeren nicht oder nicht so häufig in Abortmaterial auftreten, könnte bedeuten, dass Eizellen mit diesen Aneuploidien entweder gar nicht befruchtet werden oder der daraus resultierende Embryo sich nicht implantiert und daher gar nicht erst zu einer Schwangerschaft führt. Wie die Ergebnisse der vergleichenden Chromosomenhybridisierung (CGH) gezeigt haben, traten in den Eizellen auch in anderen Chromosomen Veränderungen auf, die mit dem in der Arbeit verwendeten Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierungs-Assay nicht erfasst wurden. Dafür sprach auch, dass alle Frauen, die nach dem Eintreten einer Schwangerschaft einen Abort erlitten haben, mindestens eine im Rahmen der Polkörperdiagnostik in den fünf Chromosomen als euploid eingestufte Eizelle transferiert bekommen hatten.

Zenzes et al. (1992) haben an unbefruchtet gebliebenen menschlichen Eizellen untersucht, welche Chromosomen Aneuploidien aufwiesen und herausgefunden, dass alle Chromosomengruppen betroffen waren. Zenzes et al. (1992) gingen zunächst davon aus, dass jedes Chromosom bei der Meiose das gleiche Risiko für eine Fehlverteilung besitzt und berechneten die erwartete Aneuploidie-Häufigkeit für jede Chromosomengruppe. Diese Zahl verglichen sie dann mit den tatsächlich beobachteten Aneuploidien. Hierbei stellte sich heraus, dass die Chromosomen der G-Gruppe (Chromosomen 21 und 22) mit 23,35 % weit häufiger aneuploid waren als erwartet (8,7 %). Auch die Gruppen E (Chromosomen 16 bis 18; 17,36 %) und D (Chromosomen 13 bis 15; 16,77 %) übertrafen die Erwartungen (13,04 % für beide Gruppen). Bei den Chromosomen der A-Gruppe (Chromosomen 1 bis 3) lag die ermittelte Aneuploidierate (3,59 %) deutlich unter dem erwarteten Wert (13,04 %). Leider gab es keine Aufstellung der einzelnen Chromosomen, aber es war erkennbar, in welchen

Gruppen sich Aneuploidien häuften. Wollte man einen neuen oder sogar zusätzlichen Sondersatz für die Polkörperanalyse mit Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung zusammenstellen, könnte man mit Chromosomen aus der D, E, F und G-Gruppe diejenigen in Betracht ziehen, die am häufigsten aneuploid sind.

Man darf bei der Betrachtung der Schwangerschaftsrate ebenfalls nicht außer Acht lassen, dass durch die Biopsie die Eizellen an sich zusätzlichem Stress ausgesetzt wurden.

Es ist umstritten, ob die assistierte Schlüpfhilfe durch Ausdünnung oder Öffnen der Zona pellucida (assisted hatching), die die übertragenen Embryonen durch die Zona-Öffnung erfahren haben, einen Vorteil für die Schwangerschaftsrate darstellt oder nicht.

Während Montag und van der Ven (1999), Ebner et al. (2002b) und Ma et al. (2006) einen Vorteil für die Implantation nach der assistierten Schlüpfhilfe fanden, bestritten Frydman et al. (2006) einen positiven Effekt. Ghobara et al. (2006) beschrieben in ihrer Studie eine deutlich bessere Schwangerschaftsrate, wenn bei der assistierten Schlüpfhilfe im Vergleich zur vollständigen Öffnung der Zona lediglich eine Ausdünnung der Zona pellucida erfolgte. Dass die Daten der vorliegenden Arbeit keine Erhöhung der Schwangerschaftsrate nach Polkörperbiopsie erbracht haben, kann nun bedeuten, dass die Schlüpfhilfe (assisted hatching) keinen positiven Effekt auf die Implantation hatte oder, dass sie, weil direkt an Eizellen durchgeführt und nicht wie sonst üblich an Embryonen, sogar einen negativen Effekt auf das Implantationsverhalten hatte, welcher den positiven Effekt der Auswahl genetisch getesteter Eizellen kompensierte.

Ob und in welchem Umfang die Polkörperdiagnostik einen Vorteil für die behandelten Patientinnen darstellt, müssen weitere Studien, ggf. auch mit mehr oder anderen Chromosomen, zeigen.

## **4.2 Biometrische und morphologische Evaluierung der Eizellen**

### **4.2.1 Korrelation zwischen Eizellmorphologie und deren genetischem Status**

#### **4.2.1.1 Zytoplasmaqualität der Eizellen**

Es wurden verschiedene Studien zur Zytoplasmaqualität bei Eizellen durchgeführt. Die meisten Studien ergaben, dass die Qualität des Zytoplasmas keinen Einfluss auf die Befruchtungsrate nach der Spermieninjektion hat (Serhal et al. 1997, Kahraman et al. 2000, Balaban et al. 1998). Lediglich Xia 1997 sah eine deutlich schlechtere Befruchtungsrate und Embryoqualität in Eizellen mit Einschlüssen im Zytoplasma. Die Schwangerschaftsrate war hingegen schlechter, wenn Eizellen mit anormalem Zytoplasma verwendet wurden. Im Hinblick auf eine Korrelation zwischen Zytoplasmaqualität und Aneuploidierate konnte in der vorliegenden Arbeit kein Zusammenhang festgestellt werden. Van Blerkom (1992) stellte

hingegen fest, dass Eizellen mit niedrigerer Zytoplasmaqualität häufiger Aneuploidien enthielten als andere.

#### 4.2.1.2 Die Zonadicke als morphologisches Kriterium für den Ploidiegrad der Eizellen:

Die Dicke und Beschaffenheit der Zona ist ein Kriterium, das sofort bei der Spermieninjektion oder der Polkörperbiopsie auffällig ist. Ist sie dünn und instabil, wirkt die Eizelle vom Allgemeinzustand weniger gesund. Daher verdient die Zona pellucida eine genauere Betrachtung.

Shiloh et al. (2004) haben beschrieben, dass die Zonadicke (ZPT) während der Eizell-Embryonen-Entwicklung abnimmt. Misst man die Zonadicke an Embryonen kurz vor dem Embryotransfer an verschiedenen Stellen, lässt sich eine Varianz in der Zonadicke feststellen (Gabrielsen et al. 2000). Sun et al. (2005) fanden heraus, dass eine steigende Varianz in der Zonadicke das Implantationspotential eines Embryos steigerte und Cohen et al. 1988 beschrieben die Varianz in der Zonadicke als einen verlässlichen Marker um Embryonen für einen Transfer auszuwählen. Gabrielsen et al. 2000 zeigten eine signifikante Korrelation zwischen der Varianz in der Zonadicke, den transferierten Embryonen und der Schwangerschaftsrate. Der positive Auswahleffekt nach dem Kriterium der Varianz in der Zonadicke-Messung schien sich stärker auszuwirken, wenn nur Embryonen mit einer weniger optimalen Qualität vorlagen. Hier steigerte die Auswahl nach der Varianz in der Zonadicke die Chance auf eine Schwangerschaft um das 2,5 fache (Gabrielsen et al. 2001). Die Zonadicke direkt nach der Eizellentnahme wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Die durchschnittliche Zonadicke sinkt mit dem Alter (Garside et al. 1997, Gabrielsen et al. 2000, Sun et al. 2005), wie auch die Varianz in der Zonadicke (Sun et al. 2005). Außerdem besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Zonadicke einer Eizelle und dem Stimulationsverlauf der zugehörigen Patientin. Die Dicke der Zona nahm ab, wenn der maximale Östrogen-Level stieg und nahm mit der Dosis von humanem menopausalem Gonadotropin (HMG) zu (Bertrand et al. 1996, Loret et al. 1997). Patientinnen mit einem hohen Level von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) am Tag 3 des Zyklus hatten ebenfalls dünnere Zonae (Loret et al. 1997). Shilo et al. 2004 beschrieben, dass aktives oder passives Rauchen die Zona am Tag 0 nach der Follikelpunktion verdickt. Der Verdünnungsprozess während der Entwicklung war nicht betroffen.

Ein Einfluss des Rauchverhaltens auf die Zona pellucida konnte anhand der vorliegenden Daten nicht bestätigt werden: Der mittlere Durchmesser der Zona bei Patientinnen aus einem Raucherhaushalt (19,8  $\mu\text{m}$ ) unterschied sich nicht signifikant ( $p= 0,621$  Levene-Test) von der aus einem Nichtraucherhaushalt (19,2  $\mu\text{m}$ ). Eine Korrelation zum Stimulationsverlauf wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Weder sahen Bertrand et al. (1995) eine Korrelation der Zonadicke zum Ooplasma-Durchmesser noch gab es laut Host et al. (2002) einen signifikanten Unterschied in der Zonadicke zwischen befruchteten und unbefruchteten Eizellen. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Dicke der Zona pellucida einen Hinweis auf den genetischen Status der Eizellen liefern kann. Da die Eizellen für die Weiterkultur nach den genetischen Ergebnissen ausgewählt wurden, wurde eine retrospektive Betrachtung durchgeführt.

Hierzu wurde die Zona-Dicke von jeder Eizelle gemessen und mit dem genetischen Status der Eizelle korreliert. Dabei zeigte sich eine signifikante Korrelation ( $p=0,001$ ) der Zona-Dicke mit der Aneuploidierate. Je dünner die Zona pellucida war, umso höher wurde die Wahrscheinlichkeit für eine Aneuploidie in dieser Eizelle.

Betrachtet man das Maß für die Güte des Tests (ROC-Kurve siehe Abb. 19), stellt man fest, dass bei steigender Sensitivität die Spezifität abnimmt. Man kann nun entscheiden, an welcher Stelle man den Cut-off Level für die Zona-Dicke setzen will. Der Test wird durch keine sehr gute Qualität ausgezeichnet (AUC-Wert liegt bei 0,641 siehe 3.2.2.2). Generell gilt, dass bei ansonsten gleicher morphologischer Eignung diejenigen Eizellen mit dickerer Zona weiterkultiviert werden sollten. Die Eizellen mit einer Zona unter  $15,1 \mu\text{m}$  können direkt von der Weiterkultivierung ausgeschlossen werden.

Verwendet man die Zona-Dicke als Kriterium würde ein großer Teil genetisch intakter Eizellen aussortiert. Dies könnte jedoch auch bedeuten, dass diese Eizellen einen genetischen Defekt in einem der Chromosomen haben, die bei unserer Hybridisierung (FISH) nicht erfasst wurden.

Dies müsste mit einer vergleichenden Chromosomenhybridisierung (CGH) für alle Chromosomen genauer untersucht werden.

#### 4.2.1.3 Polkörper Fragmentierung

In der Literatur wird kontrovers diskutiert, ob die Morphologie des 1. Polkörpers einen prognostischen Wert für die Befruchtungsrate, die Embryoqualität, die Implantations- und Schwangerschaftsrate hat.

Ebner et al. (1999 und 2000a) beschrieben eine Korrelation zwischen der Morphologie des ersten Polkörpers und der Befruchtungsrate, der Embryoqualität und Implantations- und Schwangerschaftsrate. Obwohl Ebner et al. (2002a) in einer neueren Studie für die Korrelation zur Befruchtungsrate keine Signifikanz mehr erreichten, so zeigten sie jedoch auch hier eine höhere Implantations- und Schwangerschaftsrate bei Eizellen mit runden intakten Polkörpern als mit fragmentierten. Im Gegensatz hierzu bestreiten einige andere Studien eine Korrelation zwischen der Morphologie des ersten Polkörpers und der Befruchtungsrate, der Embryoqualität und der Schwangerschaftsrate (Ciotti et al. 2004).

Verlinsky et al. stellten (2003) eine Studie vor, in der sie wie in der hier vorliegenden Arbeit untersuchten, ob der Grad der Polkörperfragmentierung ein Indiz für genetische Auffälligkeiten in der Eizelle darstellte oder nicht. Sie kamen zu dem Schluss, dass dies nicht der Fall war. Auch Verlinsky benutzte für seine Untersuchung das Fluoreszenz-Sonden Kit der Firma Vysis für die fünf Chromosomen 13, 16, 18, 21 und 22. Wir konnten nun in dieser Studie eine signifikante Korrelation feststellen, obgleich in der hier vorliegenden Studie wie auch in der von Verlinsky nur eine geringe Fallzahl vorlag.

Eine etwaige Korrelation der Polkörperfragmentierung zur Schwangerschaftsrate konnte in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden, da zumeist mehr als ein Embryo transferiert wurde und deren Auswahl in erster Linie nach genetischen Gesichtspunkten erfolgte.

#### 4.2.1.4 Der perivitelline Raum als morphologisches Kriterium für die Eizellqualität:

Die Größe und die Granulierung des perivitellinen Raumes (PVR) einer Eizelle ist ein auffälliger Faktor. Es existieren verschiedene Untersuchungen zur Entstehung der Granula im perivitellinen Raum. Der wahre Grund für die Granulierung ist noch unbekannt. Spekuliert wird z.B., dass eine Überdosierung von HMG- (humanes menopausales Gonadotropin), welches als Ersatz für das Follikel-stimulierende Hormon verwendet werden kann, während der Hormonstimulation die Bildung von Granula verursacht (Hassan-Ali et al. 1998). Farhi et al. (2002) zeigten in einer Studie, dass die Implantationsrate und die Schwangerschaftsrate deutlich sank, wenn der perivitelline Raum granuliert war.

Hassan-Ali et al. (1998) zeigten in ihrer Untersuchung dass die Menge der Granula mit steigender Dosis von humanem menopausalem Gonadotropin zunahm. Es ergab sich jedoch keine Korrelation zum Alter der Patientinnen, zur Response auf die Stimulation, zur Anzahl der gewonnenen Eizellen und zur Inkubationszeit in vitro. Sie fanden ebenfalls keine Korrelation zwischen Granulierung und Befruchtungsrate, Embryo-Qualität, Implantations- und Schwangerschaftsrate. Die Daten der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Daten. Hier konnte zwischen Granulierungsgrad und genetischem Ergebnis ebenfalls keine Korrelation festgestellt werden. Anders gestaltete sich das Ergebnis bei der Größe des perivitellinen Raumes. In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Größe des perivitellinen Raumes und dem genetischen Status der Eizelle festgestellt werden. Auch Xia (1997) beschrieb in ihrer Studie, dass Eizellen mit einem vergrößerten perivitellinen Raum gekoppelt mit fragmentierten Polkörpern zu einer niedrigeren Befruchtungsrate und Embryoqualität führten als solche mit normalem perivitellinen Raum und intakten Polkörpern.



#### 4.2.1.5 Logistische Regression

Die logistische Regression mit der Zonadicke, der Größe des perivitellinen Raumes und der Polkörperfragmentierung zeigte, dass eine gemeinsame Betrachtung der Einzelparameter zu einer Steigerung der Gesamtpotenz des Tests führt, d.h. die Vorhersage besser wird.

#### 4.2.1.6 Gesamteindruck der Eizelle

Die Bewertung des Gesamteindruckes der Eizelle geschah subjektiv und vor der retrospektiven Betrachtung der Einzelkriterien. Wahrscheinlich flossen Faktoren wie Zonadicke und Struktur, Polkörpermorphologie, Beschaffenheit des perivitellinen Raumes und Zytoplasmaqualität aber auch die Form der Eizellen in die Bewertung mit ein. Interessanterweise wurde auch durch diese Bewertung ein signifikantes Ergebnis erreicht, ohne dass für diese Bewertung objektive Kriterien definiert wurden. Dies bedeutet also, dass ein Embryologe mit ein wenig Erfahrung schon automatisch die besseren Eizellen auswählen kann, wenn er nach seinem subjektiven Eindruck die Eizellen mit der besten Morphologie auswählt.

#### 4.2.1.7 Fazit:

Auch wenn die hier untersuchten morphologischen Kriterien kein 100 %ig sicheres Merkmal für den genetischen Zustand der Eizellen sind, zeigen sie jedoch Tendenzen auf. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Eizellen mit mindestens einem auffälligen Parameter (Zonadicke, Größe des perivitellinen Raumes oder der Polkörperfragmentierung) ein erhöhtes Risiko besitzen, eine Aneuploidie aufzuweisen.

Die genetische Vorhersage anhand nur eines Parameters ist nicht besonders gut. Betrachtet man hingegen alle Parameter zugleich, werden Spezifität und Sensitivität des Tests verbessert. Trotzdem kann man diesen Ergebnissen zufolge genetisch intakte bzw. defekte Eizellen nicht mit Sicherheit an der Morphologie erkennen. Dies kann daran liegen, dass nur fünf Chromosomen auf Aneuploidien untersucht wurden und daher möglicherweise eine Reihe von Fehlverteilungen unentdeckt geblieben sind.

Es stellte sich die Frage, ob morphologische Besonderheiten der Eizellen innerhalb einer Patientin gehäuft auftreten und ob man die Patientenanamnese mit einbeziehen muss, oder ob man die Eizellen Patientinnen-unabhängig betrachten darf. Mithilfe einer Stratifizierung wurden die Inter- und Intra-Patienten-Korrelationen hinsichtlich der Morphologie der Eizellen untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass die bewerteten Parameter auch nach dieser Stratifizierung eine signifikante Korrelation ergaben, lediglich die Signifikanzwerte schwankten leicht. Daher wurde es als erwiesen angenommen, dass jede Eizelle allein aufgrund ihrer Morphologie über ihren Ploidiezustand Auskunft gibt. Die Ergebnisse

müssten auch hier anhand größerer Fallzahlen und wenn möglich, unter Einbeziehen aller Chromosomen untermauert werden.

Wünschenswert wäre die genauere Überprüfung der Korrelation zwischen Morphologie und Genetik mit Blick auf alle Chromosomen. Gelänge dies, und zeigten sich dann weitere signifikante Korrelationen zu morphologischen Kriterien und würde die Aussagefähigkeit vorhandener Marker eindeutiger, wäre es unter Umständen möglich ein Bewertungssystem zu erstellen, das eine Auswahl der Eizellen nach ihrer Morphologie ermöglicht, ohne dass hierfür eine genetische Untersuchung nötig wäre.

Morphologische Auffälligkeiten könnten dann eine Indikation für die Durchführung einer Präimplantationsdiagnostik sein.

### **4.3 Vergleichende Chromosomenhybridisierung an Polkörpern**

Die vergleichende Chromosomenhybridisierung (CGH = comparative genomic hybridization) ist eine Methode, um genomische Imbalancen mit zytogenetischer Auflösung darzustellen. Hauptsächlich in der Tumorforschung angewandt, erlaubt diese Technik eine simultane Erfassung unterschiedlicher genetischer Veränderungen (Imbalancen der Kopienzahl der Chromosomen und Amplifikationen /Deletionen) und ist daher als Screening-Methode geeignet. Von einigen Zentren wird die vergleichende Chromosomenhybridisierung inzwischen auch zur Präimplantationsdiagnostik angewendet (Wilton 2005, Wilton et al. 2003, Wells et al. 1999). Hierbei werden vor allem die Blastomeren eines Embryos auf genetische Defekte untersucht, aber auch bei der Polkörperanalyse wird die vergleichende Chromosomenhybridisierung mittlerweile erfolgreich durchgeführt (Fragouli et al. 2006a,b, Gutierrez-Mateo et al. 2004a, b, Wells et al. 2002). Dieses Verfahren hat gegenüber der konventionellen Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) den Vorteil, dass bei der Untersuchung der Polkörper (oder Blastomeren) alle Chromosomen auf Aneuploidien hin untersucht werden, während bei der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung die Zahl der Chromosomen zumeist auf fünf pro Hybridisierung beschränkt ist. Hierbei werden mit den Chromosomen 13, 16, 18, 21 und 22 diejenigen Chromosomen untersucht, die am häufigsten bei Aborten auftreten oder zu Kindern führen, die an Behinderungen leiden. Nicht betrachtet werden aber hierbei Chromosomen, deren Aneuploidie keine Schwangerschaft eintreten lassen oder die zum Absterben des Embryos führen, bevor die Schwangerschaft bemerkt wurde. Um die Schwangerschaftsrate bei der In-Vitro-Fertilisation zu erhöhen wäre aber eine Analyse dieser Chromosomen ebenfalls von großer Bedeutung.

Die Schwierigkeit der vergleichenden Chromosomenhybridisierung in der Präimplantationsdiagnostik liegt vor allem in der geringen Menge DNA, die als Ausgangstemplate zur Verfügung steht. Bei der Tumorforschung wird DNA aus Gewebe isoliert und steht dann in hohen Konzentrationen zur Verfügung. In der

Präimplantationsdiagnostik steht bei der vergleichenden Chromosomenhybridisierung an Blastomeren nur eine Einzelzelle zur Verfügung, im Falle der Polkörper sogar nur der haploide Polkörper mit einer einzigen Kopie der DNA.

Das Problem bestand nun darin, eine geeignete Methode zu finden, um die gesamte DNA des zu untersuchenden Materials zu vervielfältigen. Die auch bei der chromosomalen Mikrodissektion verwandte DOP-PCR (Telenius et al. 1992) ist in der Lage, die DNA eines einzelnen Chromosomensomes so zu vervielfältigen, dass sie nach Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen und nach Hybridisierung deutlich auf Metaphasechromosomen sichtbar ist.

Im Gegensatz zu den mikrodisektierten Chromosomensomen ist die Polkörper-DNA noch von Zellplasma und einer Zellmembran umgeben. Um festzustellen ob die Polkörper-DNA trotzdem nach einem Proteinase K Verdau mittels DOP-PCR zu amplifizieren ist, wurden Polkörper in die DOP-PCR eingesetzt, und im Anschluss daran mittels DOP-PCR markiert und dann hybridisiert. Als Referenz-DNA dienten diploide, männliche Buccalzellen. Sie sind leicht in ausreichender Menge frisch zu isolieren, so dass weder eine Zellkultur noch eine Fixierung notwendig ist.

In diesen Vorversuchen konnten bei mehreren Polkörpern Aneuploidien in Form von Über- bzw. Unterrepräsentationen verschiedener ganzer Chromosomen nachgewiesen werden (siehe Abb. 20). Eine Kontamination war auszuschließen, weil die mitgeführten Blindproben keine Auffälligkeiten zeigten. Um zu untersuchen, ob die Aneuploidien mit der vergleichenden Chromosomenhybridisierung nachweisbar sind, wurden mikrodisektierte Chromosomensome<sup>3</sup> zu Polkörpern hinzugegeben und in die vergleichende Chromosomenhybridisierung eingesetzt. Dadurch wurde eine künstliche Aneuploidie hergestellt. Die eingebrachten Chromosomenteile konnten nach der Hybridisierung identifiziert werden (siehe Abb. 21). Eingeschränkt wird das Ergebnis jedoch dadurch, dass die zugefügten Chromosomenteile durch Mikrodissektion gewonnen wurden, was eine vorherige Fixierung auf einem Deckglas erforderlich machte. Diese Fixierung könnte theoretisch dazu geführt haben, dass die Chromosomenteile in der PCR der Polymerase leichter zugänglich waren und somit stärker amplifiziert wurden als die Polkörper-DNA. In einem Fall war jedoch zusätzlich eine offenbar natürlich entstandene Aberration nachzuweisen (siehe Abb. 21), deren Intensität vergleichbar war mit den künstlich hergestellten Überrepräsentationen. Daher konnten wir zeigen, dass die Methode theoretisch geeignet ist, in einem Polkörper Aneuploidien der Chromosomenzahl nachzuweisen. Vor der Etablierung dieser Methode für die Patientenbehandlung sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig. Die Profile der vergleichenden

---

<sup>3</sup> Zur Verfügung gestellt von Dr. Jörg Weimer und Regina Grunewald

Chromosomenhybridisierung zeigten in einigen Fällen eine Über- bzw. Unterrepräsentation in Chromosomenteilen.

Im Rahmen der von der Software durchgeführten Normalisierung der Signale scheint es so zu sein, dass die relative Unterrepräsentation des X-Chromosoms in männlichen diploiden Referenzzellen kaum nachweisbar ist. Dennoch lassen sich aneuploide Überrepräsentationen eines Nondisjunction-Ereignisses oder eines Predivision-Ereignisses eher nachweisen, weil dieses Chromosomenmaterial im Polkörper häufiger präsent ist als das X-Chromosom oder die übrigen Autosomen. Dies begründet sich in der Tatsache, dass die Amplifikation von chromosomalem Material, welches nur mit einem Chromatid mehr im Polkörper präsent ist nach der DOP-PCR exponentiell amplifiziert vorliegt. Ob eine Unterrepräsentation in haploiden Zellen von einer Chromatide nachweisbar ist, bleibt fraglich. Vollständig fehlendes Chromosomenmaterial, welches keine Amplifikation erfährt, sollte hingegen nachweisbar sein, was das Y-Chromosomensignal auch bestätigt.

Um eine verlässliche Auswertbarkeit der vergleichenden Chromosomenhybridisierung zu erhalten, sind weitere Versuche nötig, die klären sollen, ob der in der Software gesetzte Cut-off-Level verschoben werden muss. So zeigt sich in der Abb. 20 neben der deutlichen Überrepräsentation der Polkörperchromosomen 1 und 5 auch eine Überrepräsentation in Teilen des Chromosoms 7. Man könnte nun mutmaßen, dass es sich hierbei um den Nachweis einer Unbalanced Predivision handelt, wobei nur eine überschüssige Chromatide im Polkörper vorhanden gewesen wäre, wohingegen die Chromosomen 1 und 5 jeweils mit zwei überschüssigen Chromatiden auftraten, also eine Nondisjunction vorläge. Gegen diese Theorie spricht, dass das Y-Chromosom in diesem Profil keine Überrepräsentation zeigt, was in diesem Falle vielleicht eher für eine Anpassung des Cut-off-Levels spricht. Allerdings ist bei dieser Aufnahme die Belichtungszeit aufgrund stark leuchtender Zentromerbereiche eventuell zu kurz. Da sich im unteren grau abgebildeten Bereich des Y-Chromosoms Satelliten-DNA befindet, die komplett von Cot-1-DNA in der Hybridisierung abgedeckt wird, könnte die Überrepräsentation des Y-Chromosoms nicht stark genug herausgekommen sein, um im Profil der vergleichenden Chromosomenhybridisierung abgebildet zu werden. Meistens ist dieses jedoch sichtbar, wie in Abb. 22 dargestellt. In der Abb. 21 sieht man neben der künstlich erzeugten Aneuploidie in Chromosom 8q auch eine offenbar natürlich entstandene in Chromosom 17. Das Chromosom 19 hat so starke heterochromatische Bereiche, dass es im Allgemeinen nicht in die Bewertung der vergleichenden Chromosomenhybridisierung mit einbezogen wird, wie auch alle Zentromer- und Satellitenregionen. Die Überrepräsentationen der Chromosomen 11 und 18 in Abb. 22 lassen, sofern die Interpretation der obigen Profile der vergleichenden Chromosomenhybridisierung zulässig ist, aufgrund der Intensität wieder auf das

Vorhandensein einer unbalanced Predivision schließen. Eine Optimierung des Verfahrens und die Validierung der Interpretationsfähigkeit der Polkörperdiagnostik muss erst an gespendeten Eizellen durchgeführt werden. Dies erlaubt eine simultane Überprüfung der Eizelle mit dem korrespondierenden Polkörper. Angesichts der jüngsten öffentlichen Diskussionen bezüglich der Ethik von Eizellspenden, ist zunächst ein Ethikantrag zu stellen, bevor diese Validierungsstudie anlaufen kann.

Um das Verfahren der vergleichenden Chromosomenhybridisierung an Polkörpern in Deutschland für ein Screening von Eizellen bei In-Vitro-Fertilisations-Patientinnen einsetzen zu können, müssen die Grundsätze des Embryonenschutzgesetzes (ESchG) eingehalten werden. So besagt dieses Gesetz, dass eine Eizelle nach der Befruchtung mit dem Verschmelzen der beiden Vorkerne zum Embryo geworden ist und hier der Schutz für werdendes Leben beginnt. In der Praxis bedeutet dies, dass aus dem Gesamtbestand der durch Follikelpunktion gewonnenen Eizellen bis zu drei zur Weiterkultur ausgewählt werden können, diese Selektion muss jedoch vor der Kernverschmelzung geschehen, die natürlicherweise 18-20 Stunden nach der Spermieninjektion erfolgt. Da das reguläre Verfahren der vergleichenden Chromosomenhybridisierung 3 Tage in Anspruch nimmt, war es Ziel dieser Arbeit, die Prozedur so stark zu kürzen, dass ein auswertbares Ergebnis nach höchstens 20 Stunden vorlag. Hierzu wurde die DOP-PCR modifiziert. Eine thermostabile Polymerase wurde eingesetzt wie bei Gutierrez-Mateo et al. (2004a, b) beschrieben (STP-DOP) und zudem wurde die Markierung gleich in der STP-DOP-PCR vorgenommen. Die Hybridisierungszeit wurde durch die Verwendung eines Slide-Boosters (Advalytix) von 12 h im Brutschrank auf 1 h reduziert (vgl. Zeitplan).

Nachdem das verkürzte Protokoll mangels ausreichender Polkörperzahlen mit einzelnen Buccalzellen etabliert worden war, wurden wieder Polkörper gegen männliche Buccalzellen hybridisiert. Hierbei konnten Chromosomenaberrationen in einer vergleichenden Chromosomenhybridisierung innerhalb von 18 Stunden mit einem Ergebnis von befriedigender Qualität festgestellt werden (siehe Abb. 22). Es ist also möglich mit dieser Methode ein Ergebnis mit Polkörpern nach 18 h zu erhalten.

#### **4.3.1 Fazit der vergleichenden Chromosomenhybridisierung an Polkörpern**

Die vergleichende Chromosomenhybridisierung an Polkörpern könnte insbesondere in Deutschland aufgrund des strengen Embryonenschutzgesetzes eine vielversprechende Möglichkeit werden, die Schwangerschaftsrate und auch die Baby-Take-Home Rate deutlich zu erhöhen. Verschiedene internationale Studien zeigen, dass eine vergleichende Chromosomenhybridisierung an Polkörpern möglich ist und zu sicheren Ergebnissen führt. In dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass die vergleichende

---

Chromosomenhybridisierung auch in dem in Deutschland gesetzlich vorgeschriebenen Zeitrahmen durchführbar ist. Um jedoch eine zuverlässige Aussage bei allen untersuchten Polkörpern zu erhalten, muss die Amplifikation der Polkörper-DNA noch optimiert werden. Die Aneuploidie-Aussagekraft einer vergleichenden Chromosomenhybridisierung liegt nach einer erfolgreichen Hybridisierung deutlich über der einer Diagnostik mit Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung, weil man bei der vergleichenden Chromosomenhybridisierung mehrere Metaphasen zur Auswertung heranzieht, während bei der Analyse der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung jeweils nur ein mikroskopisches Bild zur Verfügung steht. Zudem werden alle Chromosomen ausgewertet.

Der Einsatz der vergleichenden Chromosomenhybridisierung im Routinebetrieb der In-Vitro-Befruchtung hat jedoch den Nachteil, dass das Verfahren sehr aufwändig durchzuführen ist und auch über Nacht Mitarbeiter des Labors tätig sein müssten. Trotzdem könnte, unter den jetzigen rechtlichen Gegebenheiten in Deutschland, in der vergleichenden Chromosomenhybridisierung die Zukunft des Polkörper screenings liegen.

#### **4.4 Ausblick**

Die Polkörperdiagnostik mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung am ersten Polkörper konnte erfolgreich in der Uni-Frauenklinik Kiel etabliert werden. Aufgrund der geringen Fallzahl konnte weder die erwünschte Erhöhung der Schwangerschaftsrate noch das Senken der Abortrate erreicht werden. Um dieses Ziel zu erreichen ist anzustreben, die Untersuchung auf den zweiten Polkörper auszudehnen. Damit könnten die ca. 30 % der Aneuploidien erkannt werden, die erst in der Meiose II auftreten. Zudem könnte versucht werden, einen weiteren SONDENSATZ für andere Chromosomen zu erstellen, da möglicherweise Aneuploidien, die nicht mit dem Eintreten einer Schwangerschaft vereinbar sind mit den vorhandenen Sonden nicht erkannt werden. Dieser könnte dann anstatt oder im Rahmen einer zusätzlichen Folgehybridisierung bei der genetischen Untersuchung der Polkörper eingesetzt werden. Dies könnte eine vielversprechende Möglichkeit sein, mehr Chromosomenfehlverteilungen zu erkennen und die Schwangerschaftsrate zu erhöhen. Außerdem ist eine randomisierte Studie anzustreben, die mit einer größeren Patientenzahl Erfolg oder Misserfolg dieser Methode untersucht. Hierbei sollte dann auch eine Homogenisierung des Patienten Klientels bezüglich der Altersstruktur durchgeführt werden.

Die Untersuchung einer Korrelation zwischen der Morphologie einer Eizelle und ihrem genetischen Status hat ergeben, dass gewisse morphologische bzw. biometrische Eigenschaften in Eizellen auf genetische Defekte schließen lassen. Hierbei könnte es sich um einen indirekten Hinweis handeln, wenn ein unabhängiger Parameter sowohl für die Entstehung morphologischer Auffälligkeiten als auch für genetische Defekte verantwortlich

ist. Die Korrelations-Untersuchung sollte erweitert werden indem weitere bzw. im besten Falle alle Chromosomen einbezogen werden. Sollten die gefundenen Korrelationen ein noch zuverlässigeres Ergebnis zeigen bzw. sollten sich weitere morphologische Merkmale als Auswahlkriterien erweisen, könnte man die Erstellung eines morphologischen Bewertungssystems für Eizellen anstreben, anhand dessen Eizellen für die Weiterkultivierung ausgewählt werden könnten, ohne dass eine teure und aufwändige genetische Untersuchung mit all ihren schädlichen Einflüssen auf die Eizelle nötig wäre.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, auch im engen gesetzlichen Zeitrahmen eine vergleichende Chromosomenhybridisierung (CGH) durchzuführen. Um diese Methode in der Patientenbehandlung einsetzen zu können, besteht weiterer Forschungsbedarf zur Optimierung des Verfahrens und zur Validierung der Interpretationsfähigkeit. Könnte man die vergleichenden Chromosomenhybridisierung an Polkörpern in der Patientenbehandlung etablieren, wäre diese eine sehr vielversprechende Möglichkeit die „Baby-take-home-Rate“ zu erhöhen und nicht zuletzt auch, um nach morphologischen Korrelationen zu suchen (s.o.). Die vergleichende Chromosomenhybridisierung böte hier dem Patientenpaar ein Höchstmaß an Aussagefähigkeit zu einem vergleichsweise niedrigen Preis.

---

## 5 Literatur

- Angell (1991):** Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man. *Hum Genet.* 86: 383-387.
- Antonarakis SE, Petersen MB, McInnis MG, Adelsberger PA, Schinzel AA, Binkert F, Pangalos C, Raoul O, Slangenaupt SA, Hafez M, et al. (1992):** The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 50(3): 544-50.
- Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. (1998):** Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 13(12): 3431-3.
- Ballesta F, Queralt R, Gomez D, Solsona E, Guitart M, Ezquerro M, Moreno J, Oliva R. (1999):** Parental origin and meiotic stage of non-disjunction in 139 cases of trisomy 21. *Ann Genet.* 42(1): 11-5.
- Benadiva CA, Kligman I, Munne S. (1996):** Aneuploidy 16 in human embryos increases significantly with maternal age. *Fertil Steril.* 66(2): 248-55.
- Bertrand E, Van den Bergh M, Englert Y (1995):** Does zona pellucida thickness influence the fertilization rate?. *Hum Reprod.* 10(5): 1189-93.
- Bertrand E, Van den Bergh M, Englert Y. (1996):** Clinical parameters influencing human zona pellucida thickness. *Fertil Steril.* 66(3): 408-11.
- BRZ ,** Bundesverband Reproduktionsmedizinischer Zentren 2005 [www.repromed.de](http://www.repromed.de)
- Cieslak J, Ivakhnenko V, Wolf G, Sheleg S, Verlinsky Y (1999):** Three-dimensional partial zona dissection for preimplantation genetic diagnosis and assisted hatching. *Fertil Steril.* 71(2): 308-13.
- Ciotti PM, Notarangelo L, Morselli-Labate AM, 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: 2334-2339.
- Cohen J, Wiemer KE, Wright G. (1988):** Prognostic value of morphologic characteristics of cryopreserved embryos: a study using videocinematography. *Fertil Steril.* 49(5): 827-34.
- De Vos A und Van Steirteghem A (2001):** Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diag.* 21: 767-780.
- Ebner T, Moser M, Sommergruber C, Yaman C, Pflieger U and Tews G (2002a):** First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum Reprod.* 17: 2415-2418.



- Ebner T, Moser M, Yaman C, Feichtinger O, Hartl J and Tews G (1999):** Elective transfers of embryos selected on the basis of first polar body morphology is associated with increased rate of implantation and pregnancy. *Fert Steril.* 72: 599-603.
- Ebner T, Moser M, Yaman C, Sommergruber M, Hartl J, Jesacher K, Tews G. (2002b):** Prospective hatching of embryos developed from oocytes exhibiting difficult oolemma penetration during ICSI. *Hum Reprod.* 17(5): 1317-20.
- Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O and Tews G (2000a):** Prognostic value of first polar body morphology on fertilisation rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 15: 427-430.
- Embryonen Schutzgesetz (ESchG) BGB 1 I 2001, S.2702.**
- Farhi J, Nahum H, Weissman A, Zahalka N, Glezerman M, Levran D. (2002):** Coarse granulation in the perivitelline space and IVF- ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet.* 19(12): 545-9.
- Fisher JM, Harvey JF, Morton NE, Jacobs PA. (1995):** Trisomy 18: studies of the parent and cell division of origin and the effect of aberrant recombination on nondisjunction. *Am J Hum Genet.* 56(3): 669-75.
- Fragouli E, Wells D, Thornhill A, Serhal P, Faed MJ, Harper JC, Delhanty JD. (2006b):** Comparative genomic hybridization analysis of human oocytes and polar bodies. *Hum Reprod.* 21 (9): 2319-28.
- Fragouli E, Wells D, Whalley KM, Mills JA, Faed MJ, Delhanty JD. (2006a):** Increased susceptibility to maternal aneuploidy demonstrated by comparative genomic hybridization analysis of human MII oocytes and first polar bodies. *Cytogenet Genome Res.* 114(1): 30-8.
- Frydman N, Madoux S, Hesters L, Duvernoy C, Feyereisen E, Le Du A, Tachdjian G, Frydman R, Fanchin R. (2006):** A randomized double-blind controlled study on the efficacy of laser zona pellucida thinning on live birth rates in cases of advanced female age. *Hum Reprod.* 21(8): 2131-5.
- Gabrielsen A, Bhatnager PR, Petersen K, Lindenberg S. (2000):** Influence of zona pellucida thickness of human embryos on clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization treatment. *J Assist Reprod Genet* 17 (6): 323-8.
- Gabrielsen A, Lindenberg S, Petersen K. (2001):** The impact of the zona pellucida thickness variation of human embryos on pregnancy outcome in relation to suboptimal embryo development. A prospective randomized study. *Hum Reprod.* 16 (10): 2166-2170.

- Garside WT, Loret de Mola JR, Bucci JA, Tureck RW, Heyner S. (1997):** Sequential analysis of zona thickness during in vitro culture of human zygotes: correlation with embryo quality, age, and implantation. *Mol Reprod Dev.* 47 (1): 99-104.
- Ghobara TS, Cahill DJ, Ford WC, Collyer HM, Wilson PE, Al-Nuaim L, Jenkins JM. (2006):** Effects of assisted hatching method and age on implantation rates of IVF and ICSI. *Reprod Biomed Online.* 13 (2): 261-267.
- Gianaroli L. (2000):** Preimplantation genetic diagnosis: polar body and embryo biopsy. *Hum Reprod.* 15 Suppl 4: 69-75.
- Gordon JW, Gang I. (1990):** Use of zona drilling for safe and effective biopsy of murine oocytes and embryos. *Biol Reprod.* 42(5-6): 869-76.
- Gutierrez-Mateo C, Benet J, Wells D, Colls P, Bermudez MG, Sanchez-Garcia JF, Egozcue J, Navarro J, Munne S. (2004a):** Aneuploidy study of human oocytes first polar body comparative genomic hybridization and metaphase II fluorescence in situ hybridization analysis. *Hum Reprod.* 9(12): 2859-68.
- Gutierrez-Mateo C, Wells D, Benet J, Sanchez-Garcia JF, Bermudez MG, Belil I, Egozcue J, Munne S, Navarro J. (2004b):** Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. *Hum Reprod.* 19(9): 2118-25.
- Harris M (1978):** Louise: the test-tube miracle. *Nurs Mirror.* 147(18): xv-xvi.
- Hassan-Ali H, Hisham-Saleh A, El-Gezeiry D, Baghdady I, Ismaeil I, Mandelbaum J. (1998):** Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 13(12): 3425-30.
- Hassold T. and Hunt P. (2001):** To err (meiotically) is human: The genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet.* 2: 280-91.
- Hassold TJ, Pettay D, Freeman SB, Grantham M, Takaesu N. (1991):** Molecular studies of non-disjunction in trisomy 16. *J Med Genet.* 28(3): 159-62.
- Hixon M, Millie E, Judis LA, Sherman S, Allran K, Taft L, Hassold T. (1998):** FISH studies of the sperm of fathers of paternally derived cases of trisomy 21: no evidence for an increase in aneuploidy. *Hum Genet.* 103(6): 654-7.
- Host E, Gabrielsen A, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. (2002):** Apoptosis in human cumulus cells in relation to zona pellucida thickness variation, maturation stage, and cleavage of the corresponding oocyte after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 77(3): 511-5.
- Joris H, De Vos A, Janssens R, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. (2003):** Comparison of the results of human embryo biopsy and outcome of PGD after zona drilling using acid Tyrode medium or a laser. *Hum Reprod.* 18(9):1896-902.

- Kahraman S, Yakin K, Donmez E, Samli H, Bahce M, Cengiz G, Sertyel S, Samli M, Imirzalioglu N. (2000):** Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 15(11): 2390-3.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. (1994):** Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* 10(4): 231- 43.
- Kamiguchi Y, Mikamo K. (1986):** An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova. *Am J Hum Genet.* 38(5): 724-40.
- Kuliev A. and Verlinsky Y. (2004):** Meiotic and mitotic nondisjunction: lessons from preimplantation genetic diagnosis. *Hum. Repr. Update* 10 (5): 401-7.
- Lanzendorf SE, Maloney MK, Veeck LL, Slusser J, Hodgen GD, Rosenwaks Z. (1988):** A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil Steril.* 49(5): 835-42.
- Lewin A, Schenker JG, Safran A, Zigelman N, Avrech O, Abramov Y, Friedler S, Reubinoff BE. (1994):** Embryo growth rate in vitro as an indicator of embryo quality in IVF Cycles. *J Assist Reprod Genet* 11: 500-503.
- Loret De Mola JR, Garside WT, Bucci JA, Tureck RW, Heyner S. (1997):** Analysis of the human zona pellucida during culture: correlation with diagnosis and the preovulatory hormonal environment. *L Assist Reprod Genet.* 14 (6): 332-6.
- Lundin K, Bergh C, Hardason T (2001):** Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod.* 16: 2652-2657.
- Ma S, Rowe T, Yuen BH. (2006):** Impact of assisted hatching on the outcome of intracytoplasmic sperm injection: a prospective, randomized clinical trial and pregnancy follow-up. *Fertil Steril.* 85(4): 895-900.
- Montag M, van der Ven H (2002a):** Grundlagen der In-Vitro-Fertilisation und Embryonenkultivierung. *Reproduktionsmedizin.* 18: 147-152.
- Montag M, Van der Ven H, Van der Ven K. (2002b):** Erste Klinische Erfahrungen mit der Polkörperdiagnostik in Deutschland. *Journal für Fertilität und Reproduktion.* 12 (4): 7-12
- Montag M, van der Ven H on behalf of the German Pronuclear Morphology Group (2001):** Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further Embryo culture and transfer: Results of a prospective multicenter study. *Hum Reprod.* 16: 2384-2389.
- Montag M, van der Ven H. (1999):** Laser-assisted hatching in assisted reproduction. *Croat Med J.* 40(3): 398-403.

- Montag M, van der Ven K, Delacretaz G, Rink K, van der Ven H. (1998):** Laser-assisted microdissection of the zona pellucida facilitates polar body biopsy. *Fertil Steril.* 69(3): 539-42.
- Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. (1995a):** Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril.* 64(2): 382-91.
- Munne S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J, Cohen J. (1995b):** The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod.* 10 (4): 1014-1020.
- Munne S, Cohen J, Sable D. (2002):** Preimplantation genetic diagnosis for advanced maternal age and other indications. *Fertil Steril.* 78(2): 234-6.
- Munne S, Sepulveda S, Balmaceda J, Fernandez E, Fabres C, Mackenna A, Lopez T, Crosby JA, Zegers-Hochschild F. (2000):** Selection of the most common chromosome abnormalities in oocytes prior to ICSI. *Prenat Diagn.* 20(7): 582-6.
- Nichols J, and Gardner RL (1989):** Effect of damage to the zona pellucida on development of preimplantation embryos in the mouse. *Hum Reprod.* 4(2): 180-187.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. (1992):** Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 340(8810): 17-8.
- Pellestor F, Anahory T, Hamamah S. (2005):** Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes. *Cytogenet Genome Res.* 111(3-4): 206-12.
- Petersen MB, Antonarakis SE, Hassold TJ, Freeman SB, Sherman SL, Avramopoulos D, Mikkelsen M. (1993):** Paternal nondisjunction in trisomy 21: excess of male patients. *Hum Mol Genet.* 2(10): 1691-5.
- Puissant F, van Rysselberge M, Barlow P et al. (1987):** Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment. *Hum Reprod.* 2: 705-708.
- Sakkas D, Percival G, D'Arcy Y et al. (2001) :** Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril.* 76: 1150-1156.
- Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. (2000):** The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod.* 15: 2394-2403.
- Scott LA, Smith S (1998):** The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod.* 13: 1003-1013.
- Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM. (1997):** Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 12(6): 1267-70.

- Sherman SL, Takaesu N, Freeman SB, Grantham M, Phillips C, Blackston RD, Jacobs PA, Cockwell AE, Freeman V, Uchida I, et al. (1991):** Trisomy 21: association between reduced recombination and nondisjunction. *Am J Hum Genet.* 49(3): 608-20.
- Shiloh H, Lahav-Baratz S, Koifman M, Ishai D, Bidder D, Weiner-Meganzi Z, Dirnfeld M. (2004):** The impact of cigarette smoking on zona pellucida thickness of oocytes and embryos prior to transfer into the uterine cavity. *Hum Reprod.* 19(1): 157-9.
- Steer CV, Mills CL, Tan SL et al. (1992):** The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum Reprod.* 7: 117-119.
- Sun YP, Xu Y, Cao T, Su YC, Guo YH (2005):** Zona pellucida thickness and clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization. *Int J Gynaecol Obstet.* 89(3): 258-62.
- Tarkowski AK (1966):** An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenet.* 5: 394-400.
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A. (1992):** Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics.* 13(3): 718-25.
- Tesarik J and Greco E. (1999):** The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod.* 14 (5): 1318-1323.
- Van Blerkom J, Henry G. (1992):** Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod.* 7(3): 379-90.
- Van der Ven H., Montag M., van der Ven K. (2002):** Schwangerschaft nach Polkörperbiopsie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) der Chromosomen 13, 16, 18, 21 und 22. *Geb Frau.* 62: 585-8.
- Verlinsky Y, Cieslak J, Freidine M, Ivakhnenko V, Wolf G, Kovalinskaya L, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, et al. (1995):** Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in- situ hybridization. *Hum Reprod.* 10(7): 1923-7.
- Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Valle J, Ginsberg N, Strom C, Kuliev A. (1998):** Preimplantation diagnosis of common aneuploidies by the first- and second-polar body FISH analysis. *J Assist Reprod Genet.* 15(5): 285-9.

- Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Valle J, Ginsberg N, Strom C, Kuliev A. (1999):** Prevention of age-related aneuploidies by polar body testing of oocytes. *J Assist Reprod Genet.* 16(4): 165-9.
- Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Valle J, Ginsberg N, Strom C, Kuliev A. (1997):** Prepregnancy genetic testing for age-related aneuploidies by polar body analysis. *Genet Test.* 1(4): 231-5.
- Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Lifchez A, Strom C, Kuliev A. (1996):** 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): 126-9.
- Verlinsky Y, Lerner S, Illkevitch N, Kuznetsov V, Kuznetsov I, Cieslak J, Kuliev A. (2003):** Is there any predictive value of first polar body morphology for embryo genotype or developmental potential?. *Reprod Biomed Online.* 7(3): 336-41.
- Verlinsky Y., Ginsberg N., Lifchez A., Valle J., Strom CM. (1990):** Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod.* 5: 826-9.
- Wassarman, P.M. and Albertini, D.F. (1994):** The mammalian ovum, in E. Knobil, J.D. Neill (eds.): *The physiology of Reproduction, Second Edition.* Raven Press, Ltd., New York.
- Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JD, Munne S. (2002):** First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril.* 78(3): 543-9.
- Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, Delhanty JD. (1999):** Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res.* 27(4): 1214-8.
- Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williamson R, 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): 860-8.
- Wilton L. (2005):** Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization. *Hum Reprod Update.* 11(1): 33-41.
- 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: 1750-1755.
- Zenzes MT, Casper RF. (1992):** Cytogenetics of human oocytes, zygotes, and embryos after in vitro fertilization. *Hum Genet.* 88(4): 367-75.

## 6 Anhang

### 6.1 Material

#### 6.1.1 Software

Octax eyeware	MWG Biotech, Ebersberg, Germany
SPSS V. 10	SPSS GmbH München, Germany
ISIS	MetaSystems GmbH, Altlußheim, Germany

#### 6.1.2 Geräte

Brutschrank mit CO <sub>2</sub> Begasung	Heraeus, Germany
Fluoreszenz-Mikroskop inclusive: a) fluoreszenzfähige CCD-Kamera b) HBO-100/2-Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe Filter: Fluorochrom: Anregung [nm] / Emission [nm] DAPI: 360 / 461 FITC: 480 / 518 DEAK: 436 / 480 Spectrum Orange: 564 / 580 Spectrum Gold: 530 / 555 Spectrum Blue: 400 / 450 Texas Red: 592 / 612	Axioplan, Carl Zeiss, Jena  Osram  AHF, Tübingen, Germany AHF, Tübingen, Germany AHF, Tübingen, Germany AHF, Tübingen, Germany Vysis, Abbott, Wiesbaden , Germany Vysis, Abbott, Wiesbaden , Germany AHF, Tübingen, Germany
Hybaid Omni Gene	MWG Biotech, Ebersberg, Germany
HYBrite	Abbott, Wiesbaden , Germany
Invers Mikroskop	Olympus, Hamburg, Germany
Kühlzentrifuge	Hettich, Tuttlingen, Germany
Laser und Software	Octax, eyeware MWG Biotech, Ebersberg, Germany
Manipulatoren	CellTram vario/ air Narishige, London U.K., Eppendorf Germany
Mikro-Manipulator	Luigs Neumann GmbH Ratingen Germany
Mikroskop	DMIRB, Leica Solms, Germany
Pipettensätze	Research, Eppendorf, Germany
Pipettenziehgerät (Puller)	PB-7 Narishige, London U.K.

Slide-Booster	Advantix, Brunthal Germany
Stereomikroskope	SZH10, SZX12, Olympus Hamburg, Germany
Sterile Werkbank mit UV-Lampe	Clean Cab Herolab Wiesloch, Germany
Thermocycler	MJ Research PTC-150 und PTC 200, Biozym Hessisch-Oldendorf, Germany
Speed Vac Plus, Savant	GMI, Minnesota, USA
Wasserbäder	Haake/ Fisons, Karlsruhe, Germany

### 6.1.3 Verbrauchsmaterialien

Behälter aus Edelstahl mit Deckel (ca. 20x30cm)	MWM, Muehlacker, Germany
Biopsiepipette (18µm)	Gynemed, Lensahn, Germany
CenterWell Kulturschalen 60x15mm	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Deckgläser (verschiedene Größen)	Menzel Gläser, Braunschweig, Germany
dünnwandige Reaktionsgefäße (0,5ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Einmal Handschuhe Latex, Nitril	
Embryotransferkatheter	Gynetics, Achel, Belgium
Glasflaschen 500ml	Biochrom KG Berlin, Germany
Haltepipette	Gynemed, Lensahn, Germany
Halterung für Pasteurpipetten	Eigenbau (siehe Abb. 10)
JET quick PCR-Reinigungssäulen	Genomed GmbH, Löhne, Germany
Mikroinjektionspipette	Gynemed, Lensahn Germany
Objekträger	Menzel Gläser, Braunschweig, Germany
Objekträger SuperFrost Plus	Menzel Gläser, Braunschweig, Germany
Pasteurpipetten 230mm Länge	Assistent, Sondheim, Germany
Petischalen 60x15mm	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Petrischalen 50x9mm	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Rundbodenröhrchen 14ml	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Rundbodenröhrchen 5ml	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Serologische Pipetten 10ml	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
sterile Spritzen 10ml	
sterile Spritzen 1ml	
sterile Becher	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Sterile Filter-Pipettenpitzen 5, 20, 100, 200, 1000µl	Biozym, Hessisch-Oldendorf, Germany
Sterile Filter-Pipettenspitzen, 10, 100	Sarstedt, Nümbrecht, Germany



Biopsiepipetten (Ø 18µm)	Eppendorf, Hamburg, Germany
CGH Target slides normal Metaphase	Vysis, Downers Grove USA

#### 6.1.4 Medikamente

HCG (Predalon)	Organon, Oberschleißheim, Germany
FSH (Gonal F)	Serono, Unterschleißheim, Germany

#### 6.1.5 Gebrauchsfertige Chemikalien, Medien und Puffer

Agarose	Biozym Hessisch-Oldendorf, Germany
Aqua dest.	
Anti-Digoxigenin	Boehringer, Ingelheim, Germany,
Antifade (inclusive 0,5µg/ml DAPI)	Vector Laboratories, Peterborough, England
DAPI	Boehringer, Ingelheim, Germany
Eisessig	Merck, Darmstadt, Germany
Embryo Freezing Pack	Medicult, Denmark
Embryo Thawing Pack	Medicult, Denmark
Ethanol (absolut)	Merck Darmstadt, Germany
Ethidiumbromid	Merck Darmstadt, Germany
Fixogum	Marabu, Tamm, Germany
FluoroLink Streptavidin labelled Cy5	Amersham, Little Chalfont; United Kingdom
FluoroLink-Ab-Cy5.5-Labeling-Kit	Amersham, Little Chalfont; United Kingdom
Formamid	Merck Darmstadt, Germany
Glycerol (Nucleasefrei)	Merck; Darmstadt, Germany
HAM's F-10 Medium 1x mit 10mM HEPES	Biochrom, Germany
Hyaluronidase (80IU/ml)	Linaris, Germany
IVF Universal Kulturmedium	Medicult, Denmark
Loading Dye Solution	MBI Fermentas St. Leon-Rot, Germany
Methanol	Merck, Darmstadt, Germany
Mineral Öl (embryo tested)	Sigma-Aldrich Chemie, München, Germany
Mineralöl (500ml)	Sigma-Aldrich Chemie, München, Germany
MultiVision PB	Abbott- Vysis Wiesbaden, Germany
NaCitrat	Merck, Darmstadt, Germany
NaCl (500g)	Sigma-Aldrich Chemie, München, Germany;
Nick-Translation-Reagent Kit	Vysis, Wiesbaden, Germany
PBS (1x ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> )	Biochrom KG, Berlin, Germany

Poly-venyl-pyrrolidon (PVP) 10%	Medicult, Jyllinge Denmark
Proteinase K (1,25ml, 14,4mg/ml in Tris-HCl, pH 7,5)	Boehringer, Ingelheim, Germany
SDS (50g)	Sigma-Aldrich Chemie, München, Germany
Spectrum Green-dUTP	Abbott- Vysis Wiesbaden, Germany
Spectrum Orange-dUTP	Abbott- Vysis Wiesbaden, Germany
Texas Red-dUTP,	Chroma Tide/ MoBiTech,
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, München, Germany;,,
Weight Marker VI (0,15-2,1 kbp)	Roche, Grenzach-Wyhlen, Germany
Vecta Shield (ohne DAPI)	Vector Laboratories, Peterborough, England
Coupling liquid (Advason)	Advalytix, Brunthal, Germany
Human COT 1 DNA	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
HCl	Merck, Darmstadt, Germany
NaAc	Merck, Darmstadt, Germany
NP 40	AppliChem, Darmstadt, Germany

### 6.1.6 PCR-Reagenzien

AmpliAq-DNA-Polymerase (5 Units/ $\mu$ l)	Perkin Elmer; Jügesheim, Germany
AmpliAq-DNA-Polymerase, Stoffel-Fragment (1000 Units, 10 Units/ $\mu$ l) inklusive: a) 10x-Stoffel-Puffer b) 25mM MgCl <sub>2</sub>	Perkin Elmer; Jügesheim, Germany
Ampuva-Wasser (à 5ml)	Fresenius Bad Homburg, Germany
dATP 100mM	Fermentas St. Leon-Rot, Germany
dGTP 100mM	Fermentas St. Leon-Rot, Germany
dCTP 100mM	Fermentas St. Leon-Rot, Germany
dTTP 100mM	Fermentas St. Leon-Rot, Germany
DOP-Primer	
GeneAmp-dNTPs (je 10mM)	Perkin Elmer; Jügesheim, Germany
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt, Germany
Replitherm-Reaktions-Puffer (20x, 1,5ml; 200mM Tris-HCl (pH 8,3), 1M KCl, 0,1%Tween 20 und 0,1% NP 40)	Epicentre Tech. Biozym; Hamburg, Germany
Sequenase dilution buffer	Amersham, Little Chalfont; United Kingdom
Sequenase-DNA-Polymerase (Version 2.0, 200 Units)	Amersham, Little Chalfont; United Kingdom
Sequenase-Puffer (5x)	Amersham, Little Chalfont; United Kingdom

Sequenase Ver 2.0	Amersham, Little Chalfont; United Kingdom
Super Taq plus buffer	Amersham, Little Chalfont; United Kingdom
Super Taq plus Polymerase	Amersham, Little Chalfont; United Kingdom
Taq Polymerase	Amersham, Little Chalfont; United Kingdom

### 6.1.7 Herzustellende Puffer und Waschlösungen

Hypotonische Lösung: Stammlösung 1: 0,56 % (w/v) KCl Stammlösung 2: 1,93 % (w/v) Na-Citrat. Mischen direkt vor Gebrauch: 75µl SL 1 + 25µl SL 2 + 900µl H <sub>2</sub> O
Lable dNTP (für 250 ml): je 5µl dATP (100 mM), dCTP (100 mM) und dGTP (100 mM) + 2,5µl dTTP + 232,5 µl H <sub>2</sub> O
Fluoro lable dNTP (für 250 µl): je 5µl dATP (100 mM), dCTP (100 mM) und dGTP (100 mM) + 5,5µl dTTP (100 mM) + 230,5µl H <sub>2</sub> O.
Degenerated oligo Primer (DOP): 5`ccg act cga gnn nnn nat gtg g 3` HPLC-gereinigt; 48µM
dNTPs: gemischt mit 1mM dTTP, 2mM dA-, dC-, dGTP (= label-mix); Aliquots à20µl bei -20°C gelagert
Fixativ: 3 Teile Methanol und ein Teil Eisessig; (-20°C)
SSCT-Lösung: 4x SSC, 0,05%Tween 20, pH7,0 (bei Raumtemperatur)
Hybmix: 2xSSC, 50 % Formamid, 10 % Dextransulfat, 1% Tween 20, pH 7,0
SSC (20x): 3M NaCl, 0,3M NaCitrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ) pH 7,0
Denaturierungslösung: 70% Formamid, 2xSSC, pH 7,0

### 6.1.8 Reaktionsansätze

#### 6.1.8.1 Pipettierschema für den Proteinase K Verdau

0,1 % SDS Lösung	:	1µl 10 % SDS in 100 µl Ampullen Wasser
17 µM = 0,0005 % SDS Lösung	:	1µl 0,1 % SDS in 200 µl Ampullen Wasser
Proteinase K Lösung (0,122 mg/ml)	:	1µl Stocklösung (~ 20mg/ml)in 164µl Ampullen Wasser

	Stammlösung	Endkonzentration	Menge für einen Ansatz (Vol 3 µl) [µl]
Wasser			0,5 µl
SDS- Lösung	17µM	0,34 µM	0,5 µl
Proteinase K	0,122 mg/ml	0,00488 mg/ml	2,0 µl

## 6.1.8.2 PCR mit degenerierten Oligonucleotid-Primern (DOP-PCR) – Mastermix

*Lösung AB*

	Stammlösung	Endkonzentration	Menge für einen Ansatz (Vol 10µl) [µl]
H <sub>2</sub> O			7,04
Sequenase Puffer	5x	0,6x	1,2
Primer (DOP)	66 µM	5 µM	0,76
dNTP	2 mM	0,2 mM	1

*Lösung C*

	Stammlösung	Endkonzentration	Menge für einen Ansatz (Vol 4µl) [µl]
Sequenase Dilution Buffer			3,5
Sequenase Ver. 2.0	13 U/µl	1,62 U/µl	0,5

*Lösung D*

	Stammlösung	Endkonzentration	Menge für einen Ansatz (Vol 55µl) [µl]
H <sub>2</sub> O			37
Stoffel Frag. Puffer	10x	1x	5,5
dNTP	2 mM	0,22 mM	6,05
Primer DOP	66 µM	1,1 µM	0,92
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM	5,5

*Lösung E*

	Stammlösung	Endkonzentration	Menge für einen Ansatz (Vol 7,5µl) [µl]
H <sub>2</sub> O			5,25
Stoffel Frag. Puffer	10x	1x	0,75
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM	0,75
Taq Polymerase (Stoffel Frag.)	10 U/µl	1 U/µl	0,75

6.1.8.3 DOP-PCR mit Super Taq Plus Polymerase (STP-DOP)

	Stammlösung	Endkonzentration	Menge für einen Ansatz (Vol 50µl) [µl]
Wasser			31,0
Template			4
Super Taq Puffer ohne Mg	10 x	1 x	5
MgSO <sub>4</sub>	25 mM	1,75 mM	3,5
dNTP	2,5 mM	0,2 mM	4
Primer (DOP)	50 mM	2 µM	2
Super-Taq-Plus Polymerase	5 U/µl	0,05 U/µl	0,5

6.1.8.4 Markierung der chromosomalen DNA mittels DOP-PCR (Spectrum Green)

	Stammlösung	Endkonzentration	Menge für einen Ansatz (Vol 20µl) [µl]
H <sub>2</sub> O			11,08
Replithempuffer	20 x	1 x	1
labele dNTP	10 x	0,5 x	1
Fluorescein-12-dUTP Spectrum Green	0,5 mM	0,05 mM	2
DOP-Primer	50 µM	2 µM	0,8
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM	2
TEMPLATE			2
AmpliTaq Polymerase	5 U/µl	0,03 U/µl	0,12

6.1.8.5 Markierung der chromosomalen DNA mittels DOP-PCR (Spectrum Orange)

	Stammlösung	Endkonzentration	Menge für einen Ansatz (Vol 20µl) [µl]
H <sub>2</sub> O			11,28
Replithempuffer	20 x	1 x	1
Fluoro-labele dNTP	10 x	1 x	2
Spectrum Orange-dUTP	0,5 mM	0,02 mM	0,8
DOP-Primer	50 µM	2 µM	0,8
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM	2
TEMPLATE			2
AmpliTaq Polymerase	5 U/µl	0,03 U/µl	0,12

6.1.8.6 Markierung der chromosomalen DNA mittels Nick Translation (Spectrum Green)

	Stammlösung	Endkonzentration	Menge für einen Ansatz (Vol 50µl) [µl]
H <sub>2</sub> O			5,75
TEMPLATE		ca. 600-1000 ng	22,5
dTTP	0,3 mM	0,0075 mM	1,25
dATP	0,3 mM	0,02 mM	3,333
dCTP	0,3 mM	0,02 mM	3,333
dGTP	0,3 mM	0,02 mM	3,333
Nicktranslation Puffer	10 X	1 x	5
Spectrum Green	1 mM	0,005 mM	0,5
NT-Enzym Mix	10 x	1 x	5

6.1.8.7 Markierung der chromosomalen DNA mittels Nick Translation (Spectrum Red)

	Stammlösung	Endkonzentration	Menge für einen Ansatz (Vol 50µl) [µl]
H <sub>2</sub> O			6
TEMPLATE		ca. 600-1000 ng	22,5
dTTP	0,3 mM	0,0075 mM	1,25
dATP	0,3 mM	0,02 mM	3,333
dCTP	0,3 mM	0,02 mM	3,333
dGTP	0,3 mM	0,02 mM	3,333
Nicktranslation Puffer	10 X	1 x	5
Spectrum Red	1 mM	0,005 mM	0,25
NT-Enzym Mix	10 x	1 x	5

6.1.8.8 Markierung in der STP-DOP (Spectrum Green):

	Stammlösung	Endkonzentration	Menge für einen Ansatz (Vol 46µl) [µl]
H <sub>2</sub> O			29,4
SuperTaqPlus Puffer	10 x	1 x	4,6
Spectrum Orange-dUTP	0,5 mM	0,05 mM	4,6
Lable dNTP	10 x	0,5 x	2,3
DOP-Primer	50 µM	2 µM	1,84
MgSO <sub>4</sub>	25 mM	1,75 mM	3,22
SuperTaq Plus Polymerase	5	0,05	0,46

6.1.8.9 Markierung in der STP-DOP (Spectrum Orange)

	Stammlösung	Endkonzentration	Menge für einen Ansatz (Vol 46µl) [µl]
H <sub>2</sub> O			29,9
SuperTaqPlus Puffer	10 x	1 x	4,6
Spectrum Orange-dUTP	0,5 mM	0,02 mM	1,84
Fluoro lable dNTP	10 x	1 x	4,6
DOP-Primer	50 µM	2 µM	1,84
MgSO <sub>4</sub>	25 mM	1,75 mM	3,22
SuperTaq Plus Polymerase	5	0,05	0,46

6.1.8.10 Pipettierschema für die Präzipitation

Amplifikat in Grün	50 µl
Amplifikat in Rot	50 µl
Cot 1 DNA	5µl
3 M NaAc	10,5µl
Ethanol (eisgekühlt)	262,5µl µl

## 6.1.9 Koordinaten der ROC-Kurve

Koordinaten der Kurve			
Variable(n) für Testergebnis: Dicke der Zona			
Positiv, wenn kleiner oder gleich	a	Sensitivität	1 - Spezifität
10,2000		,000	,000
11,6850		,008	,000
12,4350		,017	,000
12,7500		,025	,000
12,8300		,034	,000
12,9300		,042	,000
13,1100		,050	,000
13,3100		,059	,000
13,6000		,067	,000
14,1000		,076	,000
14,5000		,084	,000
14,6650		,092	,000
14,8800		,101	,000
15,1200		,109	,000
15,2300		,109	,014
15,2900		,118	,014
15,3650		,126	,014
15,4100		,134	,014
15,4350		,143	,014
15,4750		,151	,014
15,5100		,151	,028
15,5350		,160	,028
15,7800		,160	,042
16,0550		,160	,056
16,1200		,168	,056
16,2200		,176	,056
16,4100		,176	,069
16,5350		,176	,083
16,6100		,185	,083
16,6800		,193	,083
16,7550		,202	,083
16,8350		,210	,083
16,8650		,218	,083
16,8950		,227	,083
16,9500		,235	,083
17,0200		,244	,083
17,0950		,252	,083
17,1650		,261	,083
17,2300		,261	,097
17,2750		,269	,097
17,2850		,277	,097
17,3050		,286	,097
17,3350		,294	,097
17,3650		,294	,111
17,4000		,294	,125
17,4600		,303	,125
17,5200		,319	,125
17,5900		,319	,153
17,7000		,328	,153



17,7700	,336	,153
17,7950	,346	,153
17,8350	,353	,153
17,9000	,353	,167
17,9700	,361	,167
18,0050	,378	,181
18,0250	,387	,181
18,0600	,387	,194
18,0950	,387	,208
18,1250	,387	,222
18,1500	,395	,222
18,1700	,403	,222
18,1900	,412	,236
18,2300	,420	,250
18,2700	,429	,250
18,2850	,437	,250
18,3000	,445	,250
18,3850	,454	,278
18,4650	,462	,278
18,4850	,471	,278
18,5050	,487	,278
18,5250	,487	,292
18,5750	,496	,292
18,6150	,513	,292
18,6450	,513	,306
18,6900	,513	,319
18,7400	,521	,319
18,7850	,529	,319
18,8300	,555	,319
18,8650	,563	,319
18,9300	,571	,319
18,9950	,580	,319
19,0250	,588	,319
19,0750	,588	,333
19,1100	,597	,333
19,1500	,597	,347
19,2050	,597	,361
19,2500	,597	,375
19,2750	,605	,375
19,2850	,605	,389
19,3200	,605	,403
19,3750	,613	,403
19,4050	,613	,417
19,4150	,622	,417
19,4650	,622	,431
19,5050	,630	,431
19,7200	,622	,472
19,7950	,630	,472
19,8400	,630	,486
19,8550	,639	,486

## 7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Versuch durch die Auswahl genetisch intakter Eizellen die Schwangerschaftsraten bei Patientinnen aus der Kinderwunschbehandlung zu erhöhen und die Abortrate zu senken.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, das Verfahren der Polkörperdiagnostik mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) zu etablieren und in den Routinebetrieb der Reproduktionsmedizin zu integrieren. Nach zwei Jahren der Patientenbehandlung wurde eine Schwangerschaftsrate von 23,2 % pro Embryotransfer erreicht. Eine Erhöhung der Schwangerschaftsrate im Vergleich zur konventionellen Intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) konnte damit nicht verzeichnet werden. Da mit der FISH-Diagnostik eine Analyse von nur fünf Chromosomen möglich war, wurde versucht eine vergleichende Chromosomenhybridisierung (CGH = Comparative Genomic Hybridization) mit Polkörpern durchzuführen. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass dies möglich ist. Anschließend wurde der zeitliche Rahmen der CGH so stark verkürzt, dass das Ergebnis der Polkörper nach 18 – 20 Stunden vorlag, wie vom Embryonenschutzgesetz (ESchG) gefordert. Die CGH weist jedoch noch Probleme bei der Amplifikation der Polkörper DNA auf und muss daher vor dem Einsatz in der Patientenbehandlung weiter perfektioniert werden. Gelingte dies, wäre die CGH eine vielversprechende Möglichkeit die Schwangerschaftsrate zu erhöhen und die Abortrate zu senken.

Die durch die Polkörper-FISH erhaltenen Daten wurden im Hinblick auf eine mögliche Korrelation zwischen der Morphologie einer Eizelle und ihrem Ploidie-Status untersucht. Hierbei wurde nachgewiesen, dass Eizellen, die am Tag der Eizellentnahme eine dünnere Zona pellucida hatten, signifikant ( $p < 0,001$ ) häufiger aneuploid sind als solche mit dickerer Zona pellucida. Weitere Abhängigkeiten wurden für den perivitellinen Raum (PVR) und den Fragmentierungsgrad des ersten Polkörpers ermittelt. Eine Eizelle mit auffälligem PVR ist signifikant häufiger aneuploid als solche mit normalem PVR. Eine stärkere Fragmentierung des ersten Polkörpers bedeutete ebenfalls ein erhöhtes Risiko für die Eizelle eine Aneuploidie zu tragen.

Wünschenswert wäre, eine erneute Analyse des Zusammenhanges von morphologischen Merkmalen und des Aneuploidie- Risikos unter Einbeziehung aller Chromosomen durchzuführen.

## Summary

The presented study deals with the attempt to increase the pregnancy rate and decrease the abortion rate of patients who took advantage of assisted reproduction techniques by the selection of genetically intact oocytes.

The success of this work was the establishment of the polar body diagnosis by using Fluorescence-In-Situ-Hybridization (FISH) analysis and its integration into routine hospital work.

After two years of patient treatment a pregnancy rate of 23.2 % per embryo transfer was reached. An increased pregnancy rate compared to the conventional Intracytoplasmic sperminjection (ICSI) could not be achieved.

Since the FISH diagnosis only allows the analysis of five chromosomes it was tried to perform a comparative genomic hybridization (CGH) with the polar bodies. In this work it could be proved that this is possible. In addition to that the needed time frame could be reduced to 18 – 20 hours as demanded by the German embryo protection law. The CGH still shows problems in the amplification of the polar body DNA and has to be improved prior to patient treatment. If this was possible the CGH would be an auspicious possibility to increase the pregnancy rate and to decrease the abortion rate.

Data gained by FISH diagnosis was examined for a possible correlation between the morphology of the oocyte and its genetic status. In this respect it could be proved that oocytes with a thinner zona pellucida at the day of oocyte retrieval were significantly ( $p < 0,001$ ) more often aneuploid than those with thicker zona. Additional correlations could be found for the perivitelline space (PVS) and the fragmentation degree of the first polar body. An oocyte with an abnormal perivitelline space is significantly more often aneuploid than one with a normal PVS. A greater fragmentation of the first polar body was also an indicator for a higher risk to have an aneuploidy.

It would be desirable to carry out an additional study where morphological features and the risk of aneuploidies are investigated including all chromosomes.

---

## 8 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name:	Melanie Glander
Anschrift:	Amrumring 33
Geburtsdatum:	26.11.1975
Geburtsort:	Kiel
Familienstand:	ledig
Kinder:	Tochter : Carolina Marie (* 26.12.2005)
Staatsangehörigkeit:	deutsch

### Schulbildung

August 1982 – Juli 1986:	Grund- und Hauptschule Suchsdorf, Kiel
August 1986 – Juli 1995:	Ernst-Barlach-Gymnasium, Kiel
Juli 1995:	Abitur am Ernst-Barlach-Gymnasium, Kiel

### Weiterer Bildungsweg

Oktober 1995 – Februar 2001:	Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Februar 2001:	Biologie-Diplom (Zoologie, Limnologie, Geologie)
Februar 2000 – Februar 2001:	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe für Parasitologie am Zoologischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Priv. Doz. Dr. Wolfgang Böckeler): Thema: <i>„Parasitenfauna bei zentralamerikanischen Reptilien“</i>
Februar 2000 – April 2000:	Auslandsaufenthalt in Costa Rica (Zentralamerika) zur Probennahme für die Diplomarbeit im Schlangentierpark „Mundo De Las Serpientes“
März 2001:	Abschlussbericht der Ergebnisse in Costa Rica

## Studienbegleitende Aktivitäten

Oktober 1997 – Februar 1998      Hiwi zur Betreuung des zoologischen

Oktober 1998 – Februar 1999      Anfängerpraktikums

und

Oktober 1999 – Februar 2000:

April 1997 – Juli 1997

Hiwi zur Betreuung des Histologiepraktikums

April 1998 – Juli 1998

und

April 1999 – Juli 1999:

Mai – August 1998

Hiwi in der Phytopathologie (Pflanzenschutz)

und

Mai – August 1999:

## Berufsausübung

April 2001 – Juni 2003:

Wissenschaftliche Angestellte in der Biochemie/  
Molekularbiologie der Medizinischen Fakultät der CAU  
zu Kiel

Enzymreinigung und Sequenzierung

Juni 2003:

Aufnahme der praktischen Arbeit zur Promotion an der  
Frauenklinik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
(Prof. Dr. Norbert Arnold; offizielle Betreuung durch  
Prof. Dr. Thomas C. G. Bosch des Zoologischen  
Instituts der CAU Kiel):

Thema: *„Molekularzytogenetische Analyse  
menschlicher Polkörper zur Präimplantationsdiagnostik“*

Kiel, den 27.09.2006

## 9 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Dissertation – abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer – nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Sie hat weder im Ganzen noch zum Teil an anderer Stelle im Rahmen eines Promotionsverfahrens vorgelegen. Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde bereits publiziert (siehe unten).

Kiel, .....(Melanie Glander)

## 10 Publikationsliste

### 10.1 Buchbeitrag

Contemporary Perspectives on Assisted Reproductive Technology

Herausgeber: Gautam N Allahbadia and Rubina Merchant 2006,

Elsevier First Edition 2006

AG Schmutzler, **M Glander**, L Mettler

Polar Body Biopsy and possible consequences for IVF and ICSI

### 10.2 Kongress-Abstracts

Chanisheva O, Schmutzler AG, **Glander M**, Acar B, Buck S, Martinez-Portillo FJ, Mettler L, Jonat W (2004)

*6 Zyklen ICSI nach Kryo-TESE bei dem selben Paar mit 2 Geburten und einer bestehenden Schwangerschaft (PO-E 2.1)*

55. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG)

Hamburg 14. –17. September 2004

Gynecology and Obstetrics Supplement 1 to Vol. 270 September 2004 S. 188

Schmutzler AG, **Glander M**, Weimer J, Chanisheva O, Acar B, Mettler L, Arnold N, Jonat W

*Inklusion, Exklusion, Präferatation: Hoher biologischer Benefit durch Präimplantationsscreening (PO-E 12.4)*

55. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG)

Hamburg 14. –17. September 2004

Gynecology and Obstetrics Supplement 1 to Vol. 270 September 2004 S. 209

Schmutzler AG, **Glander M**, Weimer J, Grunewald R, Buck S, Salmassi A, Mettler L, Jonat W, Arnold N

*Start-up Aneuploidiescreening mit Polkörperbiopsie (PGD-AS / PBB, FISH):*

*Probleme, Lösungen, Ergebnisse*

4. Tagung Arbeitskreis Molekularbiologie (AK-Mol Biol) der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin (DGGEF) in Essen 19.-20.11.2004

Abstractband

Schmutzler AG, **Glander M**, Weimer J, Acar B, Salmassi A, Hedderich J, Jonat W, Arnold N, Mettler L

*Calculation of intrinsic handicaps of pregestational screening (O-60)*

Sixth international Symposium on Preimplantation Genetics 19 to 21 May 2005

London, UK

Reproductive BioMedicine Online Vol. 10 Supplement 2, May 2005 p. 19-20

Schmutzler AG, **Glander M**, Weimer J, Acar B, Salmassi A, Jonat W, Arnold N, Mettler L

*Detection of the biological benefit of PGD-AS*

13<sup>th</sup> World Congress on In Vitro Fertilization Assisted Reproduction & Genetics

Istanbul, Turkey, 26 to 29 May 2005

Abstract Book p. 5

Schmutzler AG, **Glander M**, Weimer J, Acar B, Salmassi A, Hedderich J, Jonat W, Arnold N, Mettler L

*Stochastics of PGS: High biological benefit as revealed by theoretical pregnancy rate (TPR) (P-529)*

21<sup>st</sup> Annual Meeting of The European Society of Human Reproduction and Embryology 19 to 22 June 2005

Human Reproduction Vol. 20 Supplement 1 2005 p. i191

Schmutzler AG, **Glander M**, Hedderich J, Arnold N, Mettler L, Jonat W

*Verbesserung der reproduktionsmedizinischen Behandlung durch Polkörperbiopsie*

121. Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (NGGG)

Hannover 2.-4. September 2005

Abstractband S. 21

Schmutzler AG, **Glander M**, Hedderich J, Arnold N, Mettler L, Jonat W

*Stochastischer Benefit des genetischen Präimplantations-Screenings (PGS) (P3.8)*

XIX. Akademische Tagung deutschsprechender Hochschullehrer in der Gynäkologie und Geburtshilfe 14.-15. Oktober 2005 in Basel

Geburtshilfe und Frauenheilkunde Supplement 1 65. Jahrgang Sept. 2005 S. 22



## 11 Danksagung

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern der Onkologie II und der ECB bedanken:

### **Prof. Dr. Norbert Arnold**

Dir Norbert danke ich, dass Du Dich bereit erklärt hast, meine Arbeit zu betreuen und dass Du mir zu jeder Zeit tatkräftig zur Seite gestanden hast. Ich konnte mich immer auf Deine Hilfe verlassen.

### **Dr. Jörg Weimer**

Danke Jörg, dass Du mir bei genetischen Problemen auf den richtigen Weg geholfen hast und immer für mich da warst wenn ich Hilfe brauchte, auch im Nacht- und Wochenendeinsatz. Durch Deinen engagierten Einsatz hast Du wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danke, dass ich bei Schwierigkeiten aller Art bei Dir ein offenes Ohr hatte.

### **Regina Grunewald**

Dir danke ich, dass Du mich so lieb im Labor aufgenommen und mit Deiner lustigen Art den Alltag im Labor verschönert hast. Ich konnte mich jederzeit auf Deine Unterstützung im Labor verlassen. Es war schön, dass ich Dir jeder Zeit in allen Bereichen des Lebens das Herz ausschütten konnte und wir so viel zusammen lachen konnten. Du warst immer da wenn ich jemanden zum Ärgern gebraucht habe, - auch wenn ich es nie ganz zum „Oberschrapper“ geschafft habe.

### **Doris Karow**

Auch Dir danke ich für den Spaß im Labor und für die Einführung ins Karyotypisieren.

### **Prof. Dr. Mettler und Dr. Andreas Schmutzler**

Ihnen danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit, für die Beschaffung der Eizellen und für die Einführung in die „Fachwelt“.

### **Kerstin Koch**

Kerstin, Dir danke ich für die freundliche Aufnahme in Dein Büro und dass Du für mich eine Freundin geworden bist. Es hat gut getan in den gemeinsamen Mittagspausen ein wenig von der Arbeit abschalten zu können und gelegentlich zusammen „sinnvolle“ Dinge zu machen.

**Bengi Acar**

Bengi, Dir danke ich für die nette Zusammenarbeit bei der Etablierung der Polkörperdiagnostik, Deine Hilfsbereitschaft und die Einblicke in die türkische Küche und Kultur.

**Die Schwestern der ECB**

Euch Maike, Christine, Dörte, Marie-Louise und Anke danke ich für das nette Arbeitsklima, für eure Freundschaft, eure Hilfsbereitschaft, den Beistand und die aufbauenden Worte. Ich bin froh, dass ich „eine von Euch“ sein durfte, ich habe mich bei Euch sehr wohl gefühlt.

**Dr. Ali Salmassi und Sybille Buck**

Euch danke ich für die Einarbeitung im Labor der Reproduktionsmedizin.

Nicht unerwähnt bleiben dürfen: Eva Nickelsen, Doris Hackauf und Dawn Rüter, die durch ihre freundliche Art und ein Lächeln im Vorbeigehen das Arbeitsklima angenehm gestalteten. Dir Dawn danke ich besonders für das Korrigieren meiner englischen Schriften.

**Prof. Dr. Thomas C.G.Bosch**

Ihnen danke ich für die offizielle Betreuung meiner Arbeit, Ihr Interesse am Thema und die hilfreichen Tipps.

**Vielen lieben Dank auch an meine Familie und meine Freunde:**

Ganz besonders an Dr. Claudia Holtmeier und Dr. Kati Vogt, die mich in der stressigen Zeit unterstützt haben und immer aufmunternde Worte für mich hatten.

Ebenfalls ein herzliches Dankeschön an meinen Freund und Lebensgefährten Ulf Petersen und meine Tochter Carolina Marie Glander, die mir mit ihrer Liebe die Kraft gegeben haben diese Arbeit anzufertigen.

**Last but not least: Meine Eltern**

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ihr seid immer für mich da und helft mir wo ihr könnt. Mami, Dir danke ich hierbei insbesondere für liebevolle Betreuung meiner Tochter in den Zeiten in denen ich arbeiten wollte.