

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. hc. W. Jonat)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Morphologische Qualitätsmerkmale der Mäuseeizelle und deren
Zusammenhang mit einer Fehlverteilung des Chromosoms 16**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
SABINE ROGGE
aus Bamberg
Kiel 2009

1. Berichtersteller:

2. Berichtersteller:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

gez.

Inhaltsverzeichnis		<u>Seite</u>
I.	Abkürzungsverzeichnis	5
II.	Einleitung	7
1.	Klinischer Hintergrund	7
2.	Oogenese	9
3.	Entstehung von Aneuploidie	9
4.	Aufbau der Eizelle	14
III.	Fragestellungen	15
1.	Qualitative Unterschiede der Eizellmorphologie	15
2.	Aneuploidie bei Eizellen der Maus	15
3.	Korrelation von Morphologie und Chromosomenstatus	18
IV.	Material und Methoden	19
1.	Versuchstiere	19
2.	Hormonelle Stimulation	19
3.	Adnexexplantation	19
4.	Eizellpräparation	20
5.	Pipetten	22
6.	Mikroskopische Bewertung	22
7.	Bewertung Polkörper	23
8.	Bewertung Zytoplasma	23
9.	Fixierung	24
10.	Fluoreszenz- in- situ- Hybridisierung (FISH)	25
11.	Auswertung der Fluoreszenz- in- situ- Hybridisierung	27
12.	Statistik	33
V.	Ergebnisse	34
1.	<u>Morphologische Qualität der Eizellen</u>	34
1.1	Anzahl und „Reife“	34
1.2	Polkörperqualität	36
1.3	Zytoplasmaqualität	38

2.	<u>Chromosomaler Status der Eizellen</u>	41
2.1	Effizienz der FISH	41
2.2	Fehlverteilung des Chromosoms 16	42
2.3	Überschüssiges und fehlendes Chromosomenmaterial	43
3.	<u>Korrelation von Morphologie und Chromosomenstatus</u>	44
3.1	Polkörpermorphologie und Anomalie Chromosom 16 (gesamt)	44
3.2	Zytoplasmaqualität und Anomalie Chromosom 16 (gesamt)	46
3.3	<i>Balanced Predivision (bpd)</i>	47
3.3.1	<i>Balanced Predivision - Polkörper- Morphologie</i>	47
3.3.2	<i>Balanced Predivision - Zytoplasma- Morphologie</i>	48
3.4	<i>Unbalanced Predivision (nbpd)</i>	49
3.4.1	<i>Unbalanced Predivision - Polkörper- Morphologie</i>	49
3.4.2	<i>Unbalanced Predivision - Zytoplasma- Morphologie</i>	50
3.5	<i>Nondisjunction (ndj)</i>	51
3.5.1	<i>Nondisjunction - Polkörper- Morphologie</i>	51
3.5.2	<i>Nondisjunction - Zytoplasma- Morphologie</i>	52
VI.	Diskussion	53
1.	Methodik	53
1.1	Superovulation	53
1.2	Fixierungstechnik	54
1.3	Fluoreszenz- in- situ- Hybridisierung	55
2.	Qualitative Unterschiede der Eizellmorphologie	56
3.	Aneuploidie bei Eizellen der Maus	61
4.	Korrelation von Morphologie und Chromosomenstatus	64
5.	Eignung des B6D2F1- Maus- Modells	68
6.	Ausblick	69
VII.	Zusammenfassung	70
VIII.	Literaturverzeichnis	72
IX.	Danksagung	82
X.	Lebenslauf	83

I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADM	<i>Air- Drying Method</i>
Aqua dest.	Aqua destillata
bpd	<i>Balanced Predivision</i>
°C	Grad Celsius
Chr. 16	Chromosom 16
c M	Centimorgan
COC	Kumuluszell- Oophorus- Komplex
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	Zytoplasma
DAPI	4', 6-Diamidino-2-Phenylindol
Diagr.	Diagramm
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EZ	Eizelle / -n
FISH	Fluoreszenz- in- situ- Hybridisierung
GFAD	<i>Gradual- fixation air drying technique</i>
g/l	Gramm pro Liter
GV	<i>Germinal vesicle</i>
HCG	Humanes Chorion- Gonadotropin
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermatozoeninjektion
ISIS	<i>In situ Imaging System</i>
IVF	In- vitro- Fertilisation
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Mb	<i>Megabases</i>

MgSO ₄	Magnesiumsulfat
M I	Metaphase I
M II	Metaphase II
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
mosmol/kg	mosmol pro Kilogramm
m RNA	Boten- (<i>messenger</i> -) Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
nbpd	<i>Unbalanced Predivision</i>
ndj	<i>Nondisjunction</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pH	pH- Wert
PK	Polkörper
PMSG	<i>Pregnant Mare Serum Gonadotropin</i>
PVR	Perivitelliner Raum
RT	Raumtemperatur
SSC	Natriumchlorid- Tri- Natriumcitrat
SSCT	Natriumchlorid- Tri- Natriumcitrat mit Tween
Tab.	Tabelle
U/ml	Einheiten (<i>units</i>) pro Milliliter
ZP	Zona Pellucida

II. Einleitung

II.1. Klinischer Hintergrund:

Als „Unfruchtbarkeit“ definiert die *World Health Organization (WHO)* das Ausbleiben einer Schwangerschaft in einem Zeitraum von zwei Jahren, in denen die Gelegenheit zu einer Schwangerschaft besteht (WHO 2004). In Deutschland wird die Prävalenz der Infertilität auf 15% aller Paare im reproduktionsfähigen Alter geschätzt. Die Ursachen der ungewollten Kinderlosigkeit sind in circa 30 % der Fälle beim Mann und in circa 50 % der Fälle bei der Frau zu suchen. In 20% der Fälle liegen die Ursachen bei beiden Partnern (Schmidt-Matthiesen und Hepp 1998).

1978 konnten P. Steptoe und R. Edwards erstmals einer Frau mit tubarer Sterilität die Geburt eines gesunden Kindes durch In- vitro- Fertilisation (IVF) ermöglichen. Bei männlicher Subfertilität wurden verschiedene Verfahren mit mikromanipulatorischen Eingriffen an der Eizelle entwickelt, um die Spermienpenetration zu erleichtern [Zona Drilling, Partielle Zona Dissektion (PZD), Subzonale Spermatozoeninjektion (SUZI)]. Seit 1992 etablierte sich die Intrazytoplasmatische Spermatozoeninjektion (ICSI), bei der die Befruchtung durch direktes Einbringen des Spermiums in die Eizelle erleichtert wird (Diedrich et al. 2000). Durch hormonelle Stimulation wird dabei die Anzahl der verfügbaren Eizellen erhöht und durch Transfer mehrerer Embryonen die Schwangerschaftsrate verbessert. Die klinischen Schwangerschaftsraten lagen in Deutschland im Jahr 2002 nach IVF bei 26,84% und nach ICSI bei 27,21% (Felberbaum 2004).

Nach den Bestimmungen des Embryonenschutzgesetzes von 1990 dürfen in Deutschland nicht mehr als drei Embryonen transferiert werden (§1 Abs.1 Nr.3 ESchG). Ziel ist es, Mehrlingsschwangerschaften mit ihrer höheren Belastung durch Schwangerschaftspathologien und Fehlgeburten sowie neonatale Morbidität und Mortalität zu vermeiden. Auch geht aus Daten der *Human Fertilization and Embryology Authority (HFEA)* hervor, dass nach Transfer von drei statt zwei Embryonen die Mehrlingsrate von 25,7% auf 34,3% anstieg, die Geburtenrate jedoch gleich blieb (Kentenich 2000).

Die Empfehlung der Bundesärztekammer lautet, Frauen unter 38 Jahren im ersten oder zweiten IVF- und / oder ICSI- Versuch nur bis zu zwei Embryonen zu transferieren.

Nach §1 Abs.1 Nr.5 des Embryonenschutzgesetzes ist es zudem unzulässig, mehr Eizellen zu befruchten, als einer Frau innerhalb eines Zyklus übertragen werden sollen

(Bundesärztekammer 2006). Somit wird die Bedeutung einfacher Kriterien für die Auswahl der besten Eizellen zur Befruchtung deutlich.

Den natürlichen Selektionsmechanismus gegen chromosomale Anomalien konnten Plachot et al. an einem klassischen IVF- Kollektiv nachweisen. 37% der befruchteten Eizellen, 20% der präimplantativen Embryonen und nur noch 0,6% der Neugeborenen zeigten chromosomale Veränderungen (Plachot et al. 1988).

Aneuploidien entstehen beim Menschen überwiegend während der ersten meiotischen Teilung der weiblichen Keimzelle. Dies trifft zum Beispiel für die Autosomen 13, 16 und 21 zu. Dagegen geht die Trisomie 18 am häufigsten aus der zweiten meiotischen Teilung der Eizelle hervor. Die gonosomalen Aberrationen 47 XXY und 47 XYY sind in 50% bzw. 100% väterlichen Ursprungs (Angell 1997, Mahmood et al. 2000, Dailey et al. 1996). Die Ursache der autosomalen Aneuploidien liegt also überwiegend schon in der reifen Metaphase II-Eizelle vor.

In den vergangenen Jahren wurden mehrere Studien zum Vorhersagewert der Morphologie von Eizellen auf Fertilisations-, Schwangerschafts- und Geburtenrate beim Menschen durchgeführt (Ciotti et al. 2004, De Sutter et al. 1996, Ebner et al. 2002, Serhal et al. 1997, Verlinsky et al. 2003, Xia 1997).

Während bei Untersuchungen an menschlichen Eizellen zumeist auf ein Kollektiv von über mehrere Stunden kultivierten und nach ICSI / IVF unbefruchtet gebliebenen Eizellen zurückgegriffen wird, ermöglicht das Modell der Maus die Verwendung frischer Eizellen in großer Zahl.

Im ersten Teil dieser Arbeit soll überprüft werden, ob die Eizellen (der Maus) nach bestimmten lichtmikroskopischen Kriterien bewertet und in Güteklassen eingeteilt werden können. Im zweiten Teil werden die Eizellen auf das Vorkommen der, beim Menschen nachgewiesenen, meiotischen chromosomalen Fehlverteilungen, wie *Nondisjunction*, *Balanced Predivision* und *Unbalanced Predivision*, hin untersucht. Im dritten Teil wird geprüft, ob anhand der morphologischen Beschaffenheit der Eizelle Rückschlüsse auf deren chromosomalen Status möglich sind.

Die Einordnung der Arbeit kann in Teilgebiete der Zytologie und Genetik erfolgen. Relevanz für den Menschen besteht im Bereich der assistierten Reproduktion, insbesondere der Methode der ICSI, da die Erarbeitung von Auswahlkriterien für Eizellen eine einfache Art der Präkonzeptionsdiagnostik ermöglichen kann.

II.2. Oogenese:

Die Entwicklung sowohl der männlichen als auch der weiblichen Keimzelle der Säugetiere wird bestimmt durch die meiotische Teilung der Zellen, wobei durch Trennung homologer Chromosomen der diploide ($2n$) auf den haploiden ($1n$) Chromosomensatz reduziert wird (Mensch: $2n = 46$; $1n = 23$ / Maus: $2n = 40$; $1n = 20$) (s. Abb. 1a).

Im zeitlichen Ablauf unterscheiden sich Oogenese und Spermiogenese grundlegend. Bei männlichen Individuen durchlaufen die von den Urkeimzellen abstammenden Spermatogonien erst ab der Pubertät mehrere mitotische Zellteilungen und die Tochterzellen vollziehen anschließend kontinuierlich die Meiose.

Im Gegensatz dazu entwickeln sich bei weiblichen Individuen schon in der Embryonalperiode durch Mitose Millionen von Oogonien aus den Urkeimzellen. Einige dieser Oogonien ($2n$) differenzieren sich zu primären Oozyten ($2n$) und treten in die Meiose ein. Während der Großteil dieser Zellen vor und nach der Geburt abstirbt, bleiben einige tausend primäre Oozyten bis zur Pubertät in der Prophase (Dictyotän) der ersten meiotischen Reifeteilung arretiert. Dann nimmt mit jedem Zyklus eine Kohorte von Eizellen die erste Reifeteilung wieder auf.

Diese wird, nach Auflösung der Kernmembran, Kondensation des Chromatins zu Bivalenten und Trennung der homologen Chromosomen, kurz vor der Ovulation mit dem Ausstoßen des ersten Polkörpers vollendet.

Es kommt zum erneuten Arrest der Eizelle in der zweiten Reifeteilung (Meiose II). Die Eizelle wird nun als Metaphase II-Eizelle bzw. sekundäre Oozyte bezeichnet. Definitionsgemäß muss eine reife Metaphase II-Eizelle den ersten Polkörper ausgestoßen haben (Benkhalifa und Menezo 1993, Wu et al. 2000).

Erst der Penetrationsvorgang eines Spermiums bei der Befruchtung löst den Abschluss der zweiten Reifeteilung durch Trennung der Schwesterchromatiden der Chromosomen (mitotische Teilung) und Abschnürung des zweiten Polkörpers aus. Auch der erste Polkörper kann eine mitotische Teilung durchlaufen.

Nach der Befruchtung wandeln sich die haploiden Zellkerne der Eizelle ($1n$) und des Spermiums ($1n$) in den weiblichen und den männlichen Vorkern um. Durch Verschmelzen der Vorkerne entsteht der diploide Chromosomensatz ($2n$) der Zygote (Drews 1993).

II.3. Entstehung von Aneuploidie

Während der Meiose kann es zu Fehlverteilungen des Erbguts zwischen Eizelle und Polkörper kommen, wodurch die Eizelle bezogen auf den haploiden Satz entweder einzelne Chromosomen zuviel (Hyperhaploidie) oder zuwenig (Hypohaploidie) erhält.

Hyper- und Hypohaploidie werden als Aneuploidie zusammengefasst. Des Weiteren treten strukturelle Chromosomenaberrationen auf.

Verschiedene Mechanismen werden für die Entstehung von Aneuploidie der Eizelle beschrieben. Klassischerweise wurde *Nondisjunction*, das heißt ein Ausbleiben der Trennung homologer Chromosomen (s. Abb. 1b) bzw. der Chromatiden eines Chromosoms während der Reifeteilungen verantwortlich gemacht. Dabei kann die Eizelle entweder keine oder zwei Kopien eines Chromosoms erhalten, wodurch nach Befruchtung mit einem normalen Spermium eine monosome oder trisome Zygote entsteht.

Angell postulierte 1994 einen anderen Mechanismus, nämlich die frühzeitige Trennung von Schwesterchromatiden homologer Chromosomen in der Anaphase der ersten meiotischen Teilung, woraus deren willkürliche Verteilung auf Polkörper und Eizelle resultiert. Neben einer ausgewogenen Aufteilung der Chromatiden [Eizelle: $22 + \frac{1}{2} + \frac{1}{2}$; Polkörper $22 + \frac{1}{2} + \frac{1}{2} = \textit{Balanced predivision}$ (s. Abb. 1c)] kann dabei auch ein überschüssiges Chromatid in Eizelle oder Polkörper gelangen [Eizelle: $23 + \frac{1}{2}$; Polkörper $22 + \frac{1}{2}$ oder Eizelle: $22 + \frac{1}{2}$; Polkörper $23 + \frac{1}{2} = \textit{Unbalanced predivision}$ (s. Abb. 1d)] (Angell et al. 1994).

Während Metaphase II-Eizellen mit einem ganzen Extrachromosom nach regulärem Abschluss der zweiten Reifeteilung und nach Befruchtung mit einem normalen Spermium immer zur Trisomie führen, beträgt die Wahrscheinlichkeit bei einem überschüssigen Einzelchromatid auf Grund zufälliger Verteilung in der Meiose II theoretisch nur 50 % (Mahmood et al. 2000). In der Praxis wurde bei FISH- Untersuchungen des ersten und zweiten Polkörpers festgestellt, dass bei Eizellen mit nachgewiesenem Fehler in der Meiose I in fast einem Drittel der Fälle ein nachfolgender Fehler in der Meiose II zur Korrektur und somit zu scheinbar euploiden Zygoten führte (Kuliev und Verlinsky 2004).

Am häufigsten von Aneuploidien betroffen sind in menschlichen Eizellen nach Auffassung von Rosenbusch (Rosenbusch 2004) die Chromosomengruppe D (13 – 15), E (16 – 18) und G (21, 22, Y). Pellestor berichtet in einer früheren Studie ebenfalls über ein gehäuftes Vorkommen von Aneuploidien in den Gruppen D und G (Pellestor 1991) und in einer neueren Studie in den Gruppen E und G (Pellestor et al. 2005).

Abb. 1(a-d): Schematische Übersicht über die normale Meiose (Abb.1a) und die Entstehung chromosomaler Verteilungsstörungen (Abb. 1b, 1c und 1d) am Beispiel eines der 20 Chromosomenpaare der Maus.

Abb. 1b zeigt *Nondisjunction* in M1. Abb. 1c zeigt *Balanced Predivision*. Abb. 1d skizziert *Unbalanced Predivision*. Das zum Zeitpunkt der Untersuchung zu erwartende Stadium ist grau unterlegt.

M1 = erste meiotische Teilung; M2 = zweite meiotische Teilung; EZ = Eizelle; PK1 = erster Polkörper; PK2 = zweiter Polkörper; n steht für den haploiden Chromosomensatz. *) stellt eine von verschiedenen Möglichkeiten dar.

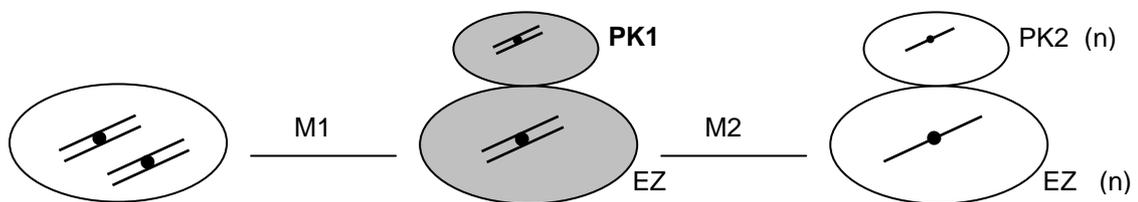


Abb. 1a: Normale Meiose

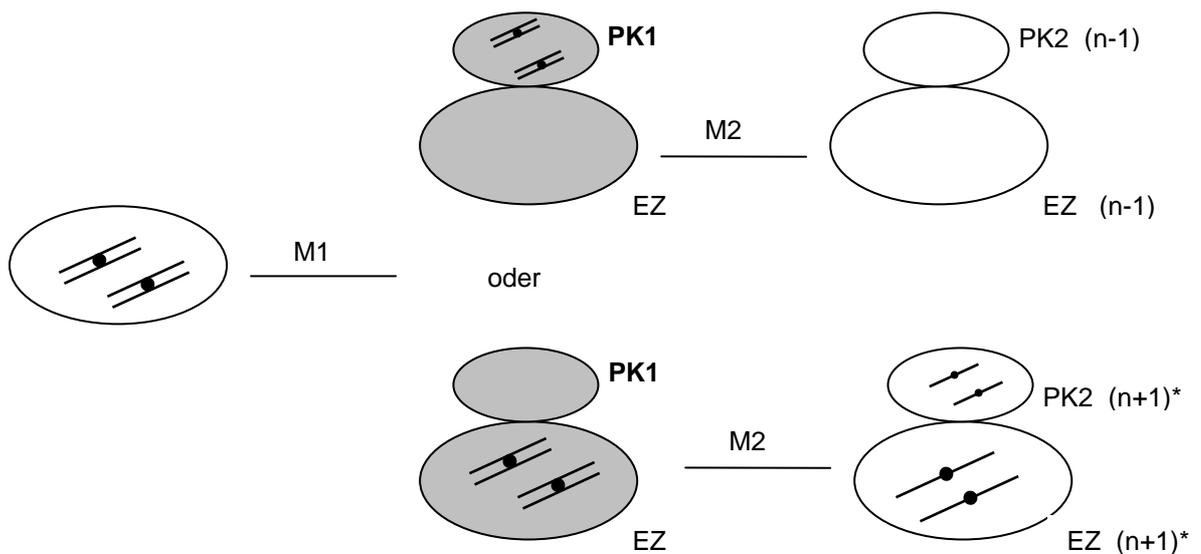


Abb. 1b: *Nondisjunction* (ndj) in M1

Abb. 1c: Balanced Predivision

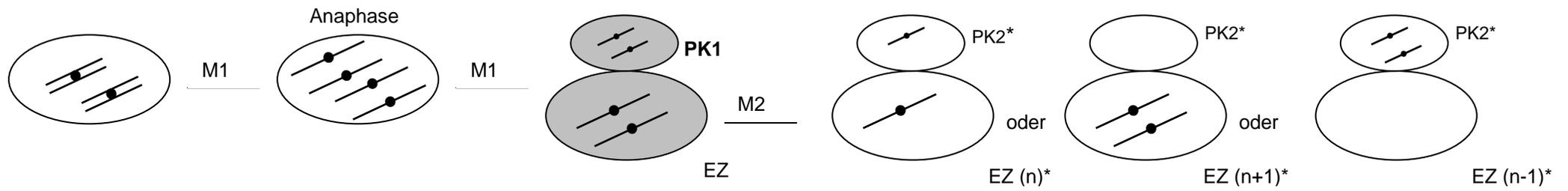
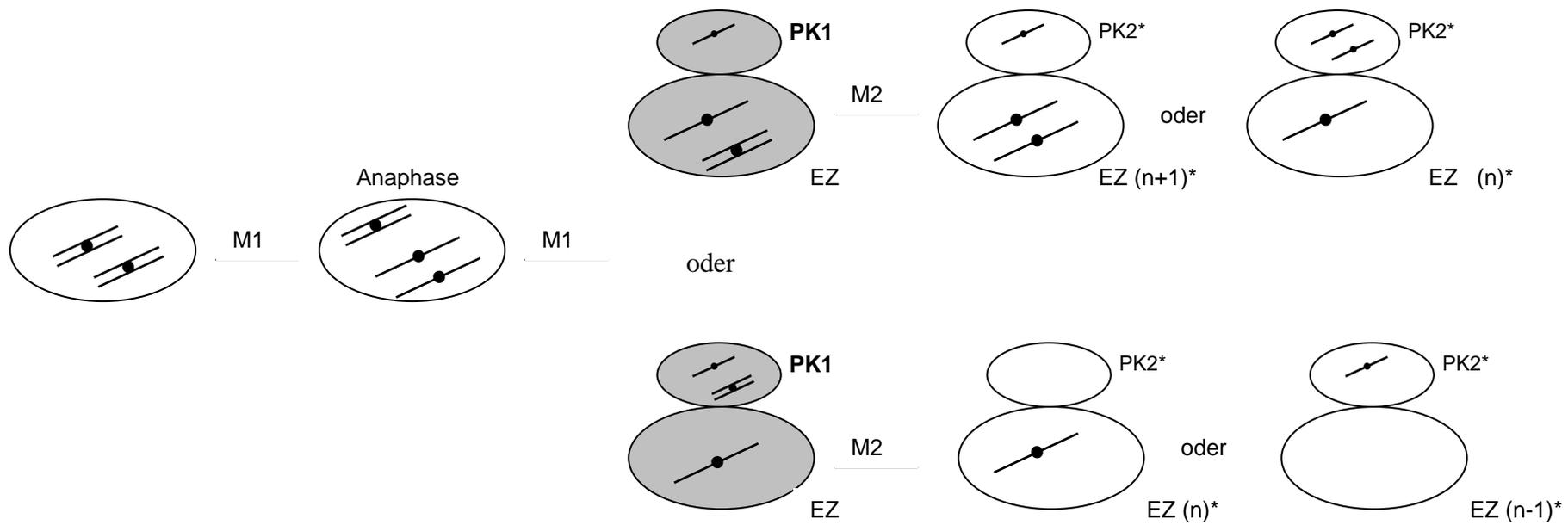


Abb. 1d: *Unbalanced Predivision*

II.4. Aufbau der Eizelle:

Nach der Ovulation sind die Eizellen von Follikel­epithel­zellen des Cumulus oophorus umgeben, die die Corona radiata bilden. Nach Ablösen der Kumuluszellen wird der Blick auf die Oozyte frei. Die reife Metaphase II- Eizelle besteht aus Zytoplasma und erstem Polkörper, die von einer Glykoproteinschicht, der Zona Pellucida umgeben sind. Der Raum zwischen Zytoplasmamembran und Zona Pellucida, in dem der erste Polkörper liegt, wird als Perivitelliner Raum bezeichnet (s. Abb. 2).

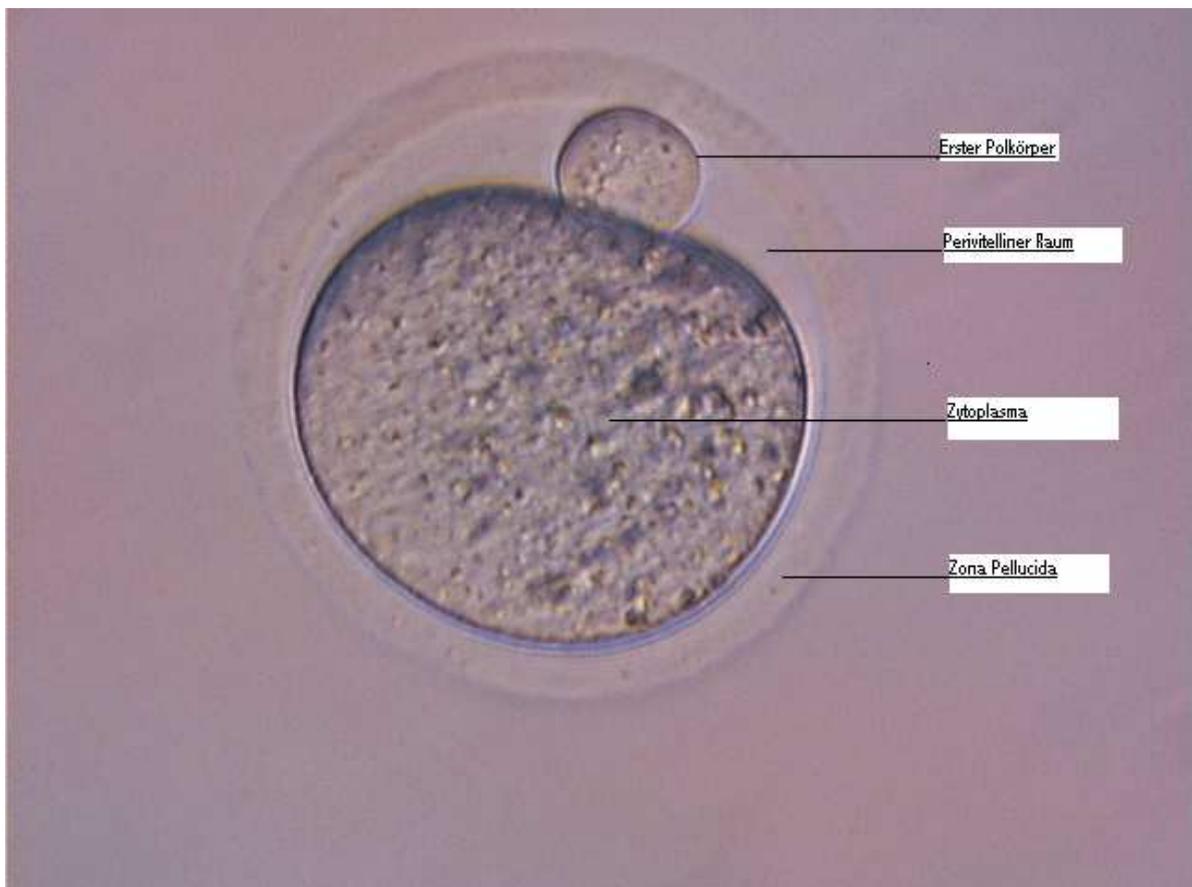


Abb. 2: Metaphase II-Eizelle: Zytoplasma der Eizelle und erster Polkörper werden umschlossen von der Zona Pellucida. Zwischen Zytoplasmamembran und Zona Pellucida befindet sich der Perivitelline Raum.

III. Fragestellungen

III.1. Qualitative Unterschiede der Eizellmorphologie:

Beim Mann sind die Referenzwerte für die Beurteilung des Ejakulats zur Sterilitätsdiagnostik und -therapie im Spermogramm festgelegt.

Für die Bewertung und Auswahl von zur künstlichen Befruchtung gewonnenen weiblichen Gameten können dem Untersucher dagegen keine gesicherten Kriterien an die Hand gegeben werden.

Wegen der Belastung durch die hormonelle Stimulation und wegen der Invasivität der transvaginalen Follikelpunktion ist eine Eizellgewinnung allein für wissenschaftliche Zwecke beim Menschen kaum möglich.

Daher entstammen die in Studien verwendeten Eizellen einem Kollektiv von Frauen, die sich diesem Eingriff auf Grund ungewollter, durch weibliche oder männliche Faktoren verursachter Kinderlosigkeit unterzogen haben. Vergleichswerte der Normalpopulation existieren bisher nur in Ausnahmefällen (Plachot 1997).

Beim Menschen wurde bereits eine Einstufung der Qualität von Eizellen zum Beispiel anhand der Morphologie des ersten Polkörpers beschrieben (Ebner et al. 2000). Für das Mausmodell sind morphologische Klassifikationskriterien bislang nicht definiert und sollen hier erstmals erarbeitet werden.

Die Fragestellung lautet:

- Gibt es bezüglich des ersten Polkörpers und Zytoplasmas deutliche morphologische Unterschiede zwischen den nach Superovulation gewonnenen Eizellen der Maus?
- Ist eine morphologische Einteilung in Qualitätsklassen möglich?
- Wie sind die Eizellen der fertilen Maus auf die einzelnen Qualitätsklassen verteilt?

III.2. Aneuploidie bei Eizellen der Maus:

Seit 1959 (Lejeune et al. 1959) ist mit der Trisomie 21 die Ursache für das von Down beschriebene Syndrom (Down 1866) mit seinen komplexen Fehlbildungen bekannt. Die Häufigkeit der Trisomie 21 liegt bei einer von 650 bis 1000 Lebendgeburten (0,1% bis 0,15%).

Das Down- Syndrom ist die häufigste, postnatal lebensfähige, autosomale Chromosomenabnormalität des Menschen mit einer geschätzten pränatalen Letalität von 70 - 80% (Galdzicki und Siarey 2003, Opitz 1991).

Ein Anstieg der Aneuploidierate des Chromosoms 21 bei Eizellen (Dailey et al. 1996, Sandalinas et al. 2002, Warburton 1987), Feten (Murken und Cleve 1994, Schreinemachers et al. 1982) und Lebendgeburten (Schmidt-Matthiesen und Hepp 1998) in Abhängigkeit vom mütterlichen Alter ist beim Menschen belegt. Eine im Vergleich zu Lebendgeburten deutlich höhere Rate von Trisomien 21 in Amniozentesebefunden wird als Folge von Spontanaborten bei Feten mit Trisomie 21 angesehen (Schreinemachers et al. 1982, Hook 1978).

Bei pränatal diagnostizierter fetaler Trisomie 21 stammte das überschüssige Chromosom zu 89% von der Mutter (77% aus Meiose I; 23% aus Meiose II) und zu 11% vom Vater (44% aus Meiose I; 56% aus Meiose II) (Muller et al. 2000). Als Ursache für die chromosomale Verteilungsstörung kommen – wie in Kap. II.3. ausgeführt – klassische *Nondisjunction* und *Predivision* in Frage.

In inhomogenen Studien an menschlichen Eizellen werden für das Chromosom 21 Hyperhaploidieraten von 7 - 8% (Mahmood et al. 2000, Cupisti et al. 2003, Benzacken et al. 1998) aber auch Aneuploidieraten bis zu 22,7% (Weier et al. 2004) beziehungsweise 29,4% (Glander 2006) angegeben.

In den meisten Fällen des Down- Syndroms (92%) liegen drei freie Kopien des Chromosoms 21 vor (freie Trisomie 21). In etwa 5% der Fälle ist eine Translokationstrisomie (meist auf Chromosom 14 oder 21) zu beobachten, die zur Hälfte neu entstanden und zur Hälfte von einem Elternteil (meist der Mutter) ererbt ist. In etwa 3% bestehen Mosaik mit normalen Zelllinien, wodurch der Ausprägungsgrad des Syndroms gemildert wird. Untersuchungen von Menschen mit partieller Trisomie 21 zeigten, dass das charakteristische Erscheinungsbild hauptsächlich durch die Trisomie des Chromosomenabschnitts 21q22 verursacht wird (Murken und Cleve 1994).

Mausmodelle des Down- Syndroms basieren auf einer Trisomie des distalen Chromosoms 16. Für die Region 21q 11.1 bis 21q 22.3 des Menschen wurde eine Übereinstimmung mit dem Mäusechromosom 16 nachgewiesen. Dagegen entspricht das distale Ende von Chromosom 21 in Teilen den Chromosomen 10 und 17 der Maus (Cabin et al. 1998) (s. Abb. 3).

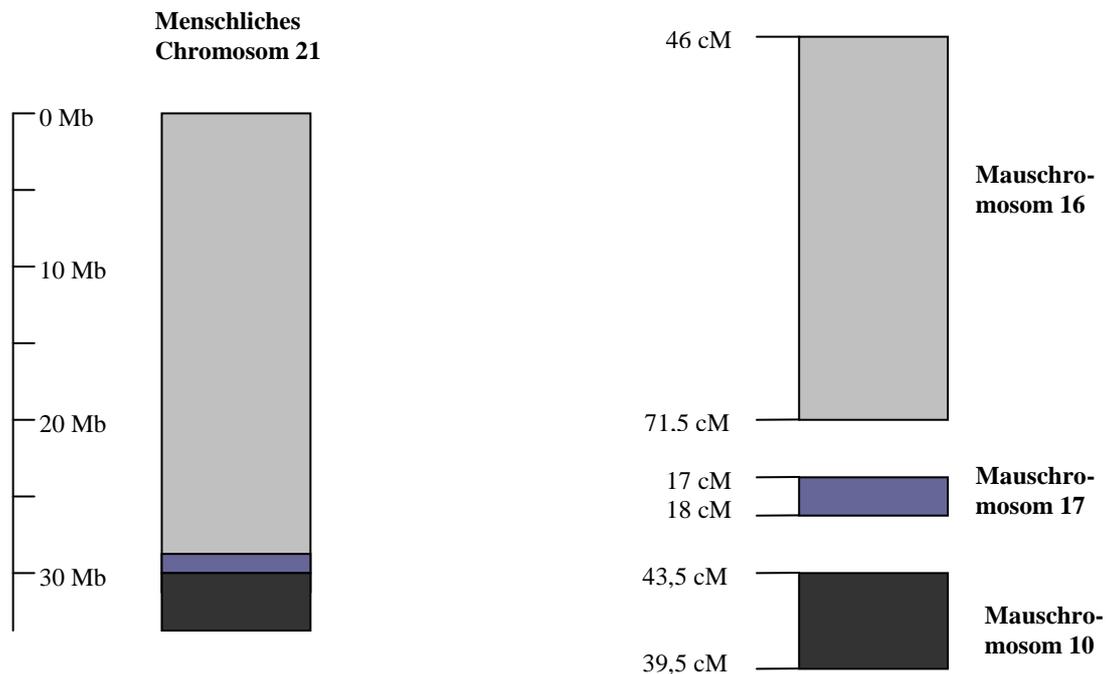


Abb. 3: Schema der Übereinstimmungen zwischen dem menschlichen Chromosom 21 und den Mausechromosomen 16, 17 und 10 (Nach: *The chromosome 21 mapping and sequencing consortium* 2000).

Zur Untersuchung der Mäuseeizellen auf numerische Chromosomenanomalien wurde in dieser Arbeit daher aus den 20 Chromosomenpaaren ($2n=40$) der Maus das Chromosomenpaar 16 ausgewählt. Die hier angewandte Fluoreszenz- in- situ-Hybridisierung wurde für das Chromosom 16 der Mäuseeizelle bislang nur in einer Arbeit beschrieben (Chen et al. 2006). Frühere Studien arbeiteten dagegen mit Giemsa-Bandenfärbung (Gates et al. 1981, Hansmann und El- Nahass 1979) oder Centromer-Bandentechnik (Golbus 1981, Mailhes et al. 1998, Martin et al. 1976) und Auszählung der Chromosomen zur Feststellung von Hyper- oder Hypohaploidien.

Die Fragestellung lautet:

- Kommen die in Eizellen des Menschen beschriebenen chromosomalen Verteilungsstörungen (*Balanced predivision*, *Unbalanced predivision*, *Nondisjunction*) auch bei der Maus vor?
- Wie hoch ist die Aneuploidierate bezüglich des Chromosoms 16? Ist sie der Aneuploidierate des Chromosoms 21 in menschlichen Eizellen vergleichbar?

III.3. Korrelation von Morphologie und Chromosomenstatus:

Mehrlingsschwangerschaften sind in den IVF- Zentren weltweit eines der Hauptprobleme. Eine Möglichkeit, das Risiko von Mehrlingsschwangerschaften im Rahmen der ICSI zu senken ohne die Erfolgsrate zu beeinflussen, ist die Verbesserung der Implantationsrate, wodurch die Zahl der zurückgesetzten Embryonen reduziert werden kann. Bislang werden aufgrund dieses Problems Embryonen zum Teil bis zum Blastozystenstadium kultiviert, um dann diejenigen mit der höchsten Entwicklungskapazität auszuwählen (Ebner et al. 1999). Ein solches Vorgehen ist in Deutschland nicht möglich, da befruchtete Eizellen nach dem Embryonenschutzgesetz nicht länger als bis zum Pronukleusstadium kultiviert werden dürfen. Umso wichtiger erscheint daher die Entwicklung einfacher Kriterien zur Auswahl von Eizellen mit den besten Entwicklungschancen. Hierzu wurden in der Vergangenheit mehrere Studien veröffentlicht, die teilweise einen Zusammenhang morphologischer Kriterien der menschlichen Eizelle mit dem Entwicklungspotential nachweisen konnten (Ciotti et al. 2004, De Sutter et al. 1996, Ebner et al. 2002, Glander 2006, Serhal et al. 1997, Verlinsky et al. 2003, Xia 1997). Für das Mausmodell liegen bislang keine Daten vor. Als Ursache von Implantationsfehlern und Spontanaborten werden zumeist Aneuploidien des Embryos verantwortlich gemacht, die am häufigsten durch Fehler in der mütterlichen Meiose I entstehen (Gates et al. 1981). Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob die bereits in der Metaphase II- Eizelle vorliegenden chromosomalen Verteilungsstörungen mit der Morphologie von Zytoplasma oder Polkörper der Eizelle korrelieren.

Die Fragestellung lautet:

- Gibt es eine Korrelation zwischen der Morphologie der Mäuseeizelle und Verteilungsstörungen des Chromosoms 16?
- Können anhand des Erscheinungsbildes euploide von aneuploiden Eizellen unterschieden werden?
- Welche Kriterien können bei der Auswahl „chromosomal gesunder“ Eizellen helfen?

IV. Material und Methoden

IV.1. Versuchstiere:

Als Versuchstiere dienten geschlechtsreife Weibchen des Stammes B6D2F1 mit schwarzem Fell (Jackson- Laboratorien), im Alter von 8,5 - 14,5 Wochen.

F1- Hybriden aus der Kreuzung zweier „homozygoter“ Inzuchtstämme (hier Weibchen B6 x Männchen DBA/2) sind genetisch identisch und Studien mit diesen Tieren sind daher unabhängig von Raum und Zeit miteinander vergleichbar. Gegenüber den Inzuchtstämmen weisen die Hybriden zudem Vorteile hinsichtlich Kraft, Fertilität und Krankheitsresistenz auf (Silver 1995). Die Haltung erfolgte in Käfigen mit maximal acht Tieren. Der Tag- Nacht- Rhythmus wurde durch je 12- stündige Hell- Dunkel- Perioden simuliert. Pellet- Trockenfutter und Wasser standen ad libidum zur Verfügung. Pro Versuchstag wurden 1- 2 Tiere zum Zwecke der Eizellgewinnung geopfert. Die erforderlichen Tierschutzgenehmigungen wurden eingeholt.

IV.2. Hormonelle Stimulation:

Durch Superovulation konnte Unabhängigkeit vom natürlichen 4 bis 6- tägigen Zyklus der Weibchen (Grüneberg 1943) erreicht werden. Hierzu wurde den Tieren 62 Stunden vor der geplanten Operation 10 IU PMSG in 0,2 ml NaCl (0,9 %) intraperitoneal zur Stimulation der Follikelreifung injiziert. 48 Stunden später wurden - ebenfalls intraperitoneal - 10 IU HCG in 0,2 ml NaCl (0,9%) zur Auslösung des Eisprungs verabreicht. Zwischen 8 Uhr und 10 Uhr des dritten Tages, 14 Stunden nach HCG- Gabe, wurden die Tiere durch Genickbruch geopfert.

IV.3. Adnexexplantation:

Zur Explantation der Adnexe wurde die Haut am Unterbauch durch Scherenschlag eröffnet und der Schnitt durch seitlichen Zug am Fell erweitert. Nach Eröffnung des Peritoneums und Auslagerung der Gedärme aus der Bauchhöhle wurden Tube und Ovar beidseits aufgesucht, am distalen Ende der Uterushörner abgesetzt und in körperwarmes Kulturmedium (s. Tab.1) gegeben. Seltene Besonderheiten wie Aszites oder ein Fibrinbelag der Adnexe sowie die Färbung der Eierstöcke wurden registriert. Zu unterscheiden waren rote, hyperämisierte von blassen, wenig durchbluteten Ovarien.

IV.4. Eizellpräparation:

Im Anschluss erfolgte die Eröffnung der Eileiterampullen unter dem Mikroskop (Laborlux 11, Leitz) bei 100- facher Vergrößerung in einem mit Kulturmedium gefüllten Schälchen (Falcon, Center- Well Organ Culture Dish). Nach Anritzen der Ampulle mit einer feinen Kanüle quollen die Eizell- Kumuluszell- Verbände in 2 - 3 deutlich voneinander abgegrenzten Komplexen hervor. Ein Kumuluszell- Oophorus- Komplex (COC) bestand dabei aus jeweils 5 - 15 Eizellen mit umgebenden Kumuluszellen (Abb. 4 zeigt exemplarisch eine einzelne Eizelle mit umgebenden Kumuluszellen).

Zusätzlich zu den im Komplex befindlichen, fielen in einigen Versuchen einzelne „nackte“ Eizellen auf, die nicht von Kumuluszellen umgeben waren und ein sehr dunkles, geschrumpftes Zytoplasma aufwiesen. Deren Anzahl wurde mit 0 - 7 pro Maus registriert. Aufgrund der offensichtlichen, starken Degeneration wurden diese Eizellen in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Nach Umsetzen mittels Pasteurpipette (Assistent, 230 mm; No.567/2) in frisches Medium wurden die COC vor der weiteren Präparation für einige Minuten inkubiert (37°C, 5% CO₂, Luftfeuchtigkeit 95-100%).

Zum enzymatischen Ablösen der Kumuluszellen von den Eizellen erfolgte die Inkubation der einzelnen COC für 5-6 Minuten in auf 37°C vorge wärmter Hyaluronidase (Sigma, Typ 8) in einer Konzentration von 80 U/ml. Anschließend wurden die nun größtenteils von Kumuluszellen befreiten Eizellen (s. Abb. 5) sofort in Waschmedium (s. Tab. 1) umgesetzt. Hierfür wurde eine feine Pipette (ca. 150 µm) verwendet, um möglichst geringe Mengen Hyaluronidase in das Medium zu übertragen.

Mit einer noch feineren Pipette (ca. 120 µm) erfolgte nun die mechanische Präparation zum Ablösen der restlichen Kumuluszellen, wozu die Eizellen einzeln mehrmals in den Pipettenhals eingesogen und wieder ausgestoßen wurden. Ein vollständiges Ablösen des Kumulus ist vor allem für die spätere Fixierung und zytogenetische Aufarbeitung der Eizellen unabdingbar.

Die Eizellen wurden in vorbereitete Kulturschälchen (Sarstedt, Tissue Culture Dish) mit Mediumtropfen (s. Tab. 1) unter weißem Mineralöl (Sigma, No.232-455-8) umgesetzt und wiederum inkubiert. Das Mineralöl verhindert die Verdunstung des Kulturmediums. Durch Einsetzen nur einer Eizelle pro Mediumtropfen in gekennzeichnete Position war jede Eizelle individuell benenn- und wiederauffindbar (zum Beispiel: Schale IV / Mediumtropfen 8: IV / 8).

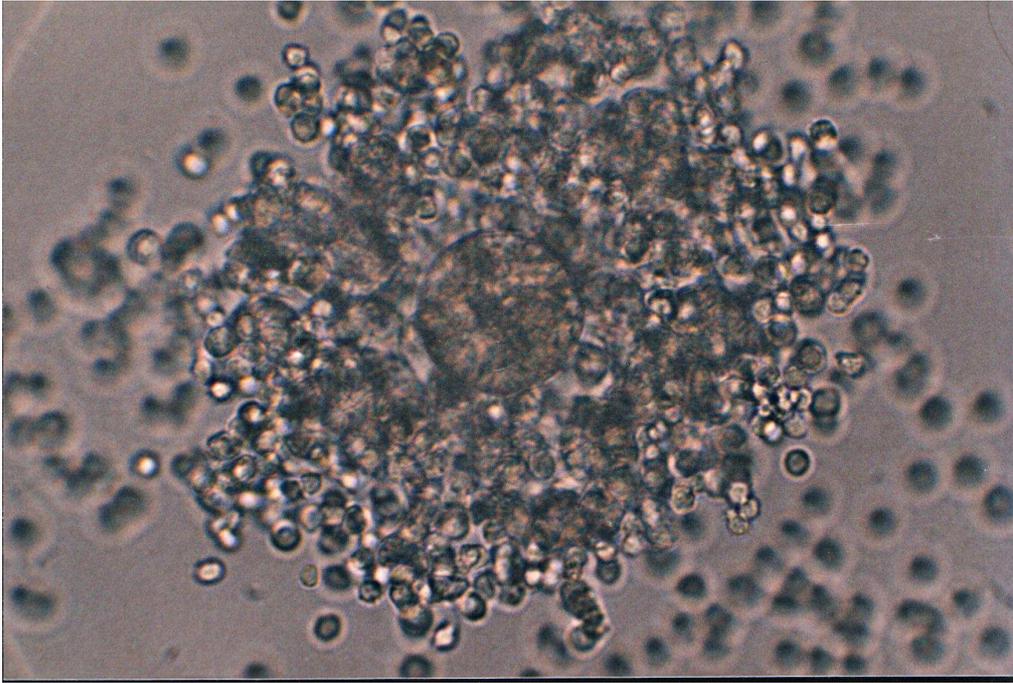


Abb. 4: Eizelle mit umgebenden Kumuluszellen

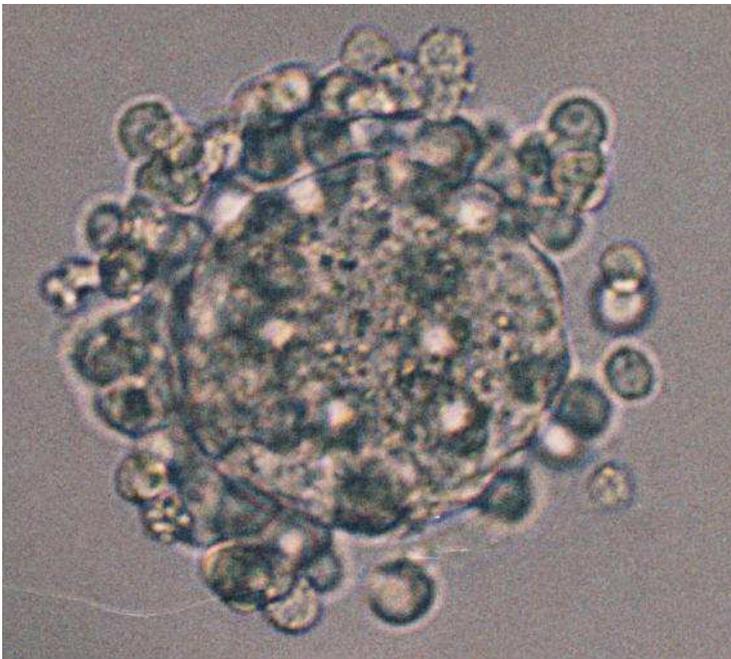


Abb. 5: Eizelle mit Kumuluszellresten nach Behandlung mit Hyaluronidase

Upgraded B2 INRA Medium	
Mineralsalze	KCl, NaCl, MgSO ₄ , NaHCO ₃ , Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄
Aminosäuren	Asparagin, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, u.a.
Lipide	Cholesterol
Zucker und metabolische Nebenprodukte	Glucose, Pyruvat, Laktat, Acetat
Basen	Pyrimidine, Purine
Antibiotika	Penicillin G, Streptomycin
Rinderalbumin	10 g/l
Phenolrot	1,5%
pH	7,20 - 7,50
Osmolarität	275- 305 mosmol/kg
Vitamine	-

Tab. 1: Zusammensetzung Kultur-/ Waschmedium (Upgraded B2 INRA Medium, Laboratoire C.C.D., Paris)

IV.5. Pipetten:

Für die verschiedenen Versuchsschritte wurden Glaspipetten mit individuell angepasstem Durchmesser benötigt. Die „Rohpipetten“ (Pasteurpipetten Assistent, 230mm, No.567/2) wurden hierzu über der offenen Flamme eines Bunsenbrenners erhitzt und ausgezogen. Durch ein weiteres Auseinanderziehen in erkaltetem Zustand entstanden glatte Bruchkanten.

Für jeden Arbeitsschritt wurde eine gesonderte Pipette verwendet, um Rückstände (Hyaluronidase, Mineralöl u.a.) zu vermeiden.

IV.6. Mikroskopische Bewertung:

Im nächsten Arbeitsschritt erfolgte unter dem Invertmikroskop (Olympus) mit speziellem Aufsatz (Hoffmans Contrast Modulation, Optics Inc. Greenvale N.Y. 11548) bei 400-facher Vergrößerung die Beurteilung der Eizellen nach morphologischen Kriterien und die Einteilung in Qualitätsklassen. Seit der Tötung der Mäuse waren nunmehr 2 - 3 Stunden vergangen.

Der Polkörper (PK) und das Zytoplasma (CP) jeder einzelnen Eizelle wurden bewertet und festgehalten (z.B.: Versuch 20, IV/8: PK/CP: 4/2).

IV.7. Bewertung Polkörper:

In dieser Arbeit wurde der erste Polkörper der Mäuseeizellen wie folgt bewertet: Note „1“: rund oder oval mit glatter Oberfläche; Note „2“: rund oder oval mit eingezogener Oberfläche; Note „3“: klein mit unregelmäßiger Oberfläche; Note „4“: klein, sichelförmig; Noten „5“ und „6“: gesamte Eizelle fragmentiert oder degeneriert, somit ist eine weitere Beurteilung des Polkörpers nicht möglich. Bei Bewertung „0“ und „8“ ist kein erster Polkörper nachweisbar, bei Bewertung „8“ ist dieser jedoch in Abschnürung begriffen (s. Tab. 2).

Die Bewertung der Polkörper erfolgte in Anlehnung an die Kriterien von Ebner et al. zur Bewertung des ersten Polkörpers bei menschlichen Eizellen (Ebner et al. 2000). Für Eizellen der Maus sind bislang keine entsprechenden Kriterien definiert. Eine Modifikation wurde vor allem in Gruppe 4 vorgenommen, die nach Ebner et al. „riesige“ Polkörper, hier jedoch sehr kleine, sichelförmige Polkörper beinhaltet.

Note Polkörper	Morphologie erster Polkörper
0	kein erster Polkörper vorhanden
1	groß, rund oder oval, prall, Oberfläche glatt
2	groß, rund oder oval, Oberfläche eingezogen
3	klein, Oberfläche unregelmäßig, noch massiv
4	sehr klein, sichelförmig
5	Eizelle (PK+CP) vollständig fragmentiert
6	Eizelle (PK+CP) vollständig degeneriert
7	keine sichere Zuordnung möglich
8	erster Polkörper in Abschnürung begriffen

Tab. 2: Lichtmikroskopische Bewertung der Morphologie des ersten Polkörpers

IV.8. Bewertung Zytoplasma:

Das normale menschliche Eizellzytoplasma wird in der Literatur als klar, mit gleichmäßiger Struktur und homogener Granulierung beschrieben (Mikkelsen und Lindenberg 2001). Diese Kriterien wurden für die Mäuseeizelle übernommen und die entsprechenden Eizellen mit Note „1“ bewertet.

Dagegen sind Inhomogenität mit grobscholliger Strukturierung ebenso wie Dunkelfärbung des Zytoplasmas Zeichen von Überreife und - in zunehmender Ausprägung - Degeneration der Eizelle (Rieckmann 1998). Die Noten „2“ bis „6“ stehen somit für eine zunehmend schlechtere Zytoplasmaqualität (s. Tab.3).

Note Zytoplasma	Morphologie des Zytoplasmas
1	homogen, hell, feine Granulierung, groß
2	homogen, hell, gröbere Granulierung
3	inhomogen, dunkel, grobe Granulierung
4	netzartige Struktur, dunkel, geschrumpft
5	Eizelle (PK+CP) vollständig fragmentiert
6	Eizelle (PK+CP) vollständig degeneriert

Tab. 3: Lichtmikroskopische Bewertung der Morphologie des Zytoplasmas

IV.9. Fixierung:

Ausgewählte Eizellen wurden nun, circa 4 - 5 Stunden nach der Adnexentnahme fixiert. Es wurden nur Eizellen verwendet, die einen ersten Polkörper aufwiesen und somit sicher die erste Reifeteilung abgeschlossen hatten (definitionsgemäß „reife“ Metaphase II- Eizellen). Sowohl Eizellen ohne ersten Polkörper, bei denen Unreife zu vermuten war, als auch Eizellen, bei denen eine Klassifizierung nicht eindeutig möglich war, wurden ausgeschlossen. Eizellen mit eindeutigen Anzeichen von Degeneration und Fragmentierung (PK- und CP- Noten „5“ und „6“) wurden ebenfalls von Fixierung und genetischer Auswertung ausgeschlossen, da in der Literatur über eine starke Fragmentierung der DNA dieser Zellen berichtet wurde (Takase et al. 1995, Wu et al. 2000). Daher wäre eine genetische Analyse nur eingeschränkt möglich gewesen. Verworfen wurden auch Eizellen mit Restkumulusanteil, um eine Überlagerung mit Chromosomen der Kumuluszellen zu vermeiden.

Weiterverwendet wurden somit nur Eizellen der Polkörper- und Zytoplasma- Gruppen 1 - 4.

Die angewandte Fixierungsmethode orientiert sich an der „*Gradual- fixation air drying technique*“ (GFAD; Mikamo und Kamiguchi 1983), ist jedoch durch einige Modifikationen weniger zeitaufwendig (Chen 2002).

Die Eizellen wurden vor Beginn der Fixierung in frischem Medium von Mineralölrückständen freigewaschen, damit die Fixativwirkung nicht beeinträchtigt wurde. Es folgte dann die Behandlung der Eizellen in je einem Tropfen hypotoner Lösung (Natriumcitrat 0,9%, s. Tab. 4) für 6 Minuten bei Raumtemperatur. Die nun angeschwollenen Zellen wurden auf einen Objektträger (Superfrost / Plus, Merck; Dietikon, Schweiz) aufgebracht. Um ein späteres Wiederauffinden und Zuordnen der Chromosomen zu ermöglichen, wurden die Zellen einzeln innerhalb einer vorher angebrachten Kreismarkierung platziert. Natriumcitratreste wurden vorsichtig entfernt, wobei ein Austrocknen der Zelle in diesem Stadium unbedingt zu verhindern war.

Sodiumcitrat 0,9%	
Natriumcitrat	450 mg
Aqua dest.	50 ml

Tab. 4: Hypotone Lösung (Sodiumcitrat 0,9%)

Anschließend wurden 2 µl Fixativ I (Methanol: Eisessig = 1: 1) (s. Tab. 5) vorsichtig in der Nähe der Eizelle auf den Objektträger gegeben. Sobald sich das Fixativ über die Eizelle ausbreitet kommt es zur Quellung der Eizelle und zur Spreitung der Chromosomen auf dem Objektträger. Nach Zugabe der ersten 5 µl Fixativ II (Methanol: Eisessig = 3: 1) neben und Ausbreitung desselben über die Eizelle, wurde der Objektträger für weitere 5 Minuten in eine Küvette mit Fixativ II getaucht (s. Tab. 5). Um die Spreitung der Chromosomen zu verbessern, wurden die Objektträger im Anschluss für eine Stunde in einer Feuchtkammer (37 °C) platziert. Nach Eintauchen in PBS für drei Minuten und anschließender Dehydrierung in einer Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) für jeweils zwei Minuten wurden die Objektträger luftgetrocknet und bei - 20°C bis zur Weiterverwendung eingefroren.

Um die Identifizierung der Eizellen zu erleichtern, wurden pro Objektträger maximal zwei Eizellen fixiert. Alle Schritte erfolgten unter Beobachtung durch ein „*Inverted - Phase - Contrast*“ – Mikroskop.

Lösung	Zusammensetzung	Temperatur	Dauer
Hypotone Lösung	Sodiumcitrat 0,9%	Raumtemperatur	6 Minuten
Fixativ I	Methanol:Eisessig = 1:1	Raumtemperatur	1 Minute
Fixativ II	Methanol:Eisessig = 3:1	Raumtemperatur	1 Minute
Fixativ II	Methanol:Eisessig = 3:1	Raumtemperatur	5 Minuten

Tab. 5: Fixierungstechnik

IV.10. Fluoreszenz- in- situ- Hybridisierung (FISH):

Für die Fluoreszenz- in- situ- Hybridisierung wurde eine mit dem roten Fluoreszenzstoff Rhodamin markierte Probe- DNA verwendet, die an das gesamte Mäusechromosom 16 bindet („*Total Mouse Chromosome DNA Probe, Chromosome 16, Direct labelled – Red**“). Die Probe wurde von *Q-Biogene* (Illkirch, Frankreich) mit einem Probenvolumen von 50 µl geliefert. Die einzelnen Arbeitsschritte folgten dem *Q- Biogene*- Protokoll.

Die FISH beruht auf der Fähigkeit einzelsträngiger Nukleinsäuren mit komplementärer Basensequenz, sich zu einem doppelsträngigen Abschnitt zusammen zu lagern.

Der eine Partner ist dabei die nach Denaturierung als Einzelstrang vorliegende DNA eines Chromosoms der Zielzelle. Den anderen Partner bildet die entweder mit Fluorochromen oder mit Haptenen markierte DNA- Probe.

Um die Penetration in das dichtgepackte Chromatin der Zielzelle zu erleichtern, ist die Proben- DNA in kleine Fragmente (200 - 400 Basenpaare) zerlegt. Durch Basenpaarung der komplementären Proben- und Ziel- DNA- Stränge entsteht eine doppelsträngige Hybrid- DNA. So werden die betreffenden Chromosomen durch ihre Signale unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar (Cremer et al. 1995). Sowohl die fixierten Chromosomen der Eizelle als auch die FISH- Proben müssen denaturiert werden, um ein Vorliegen der DNA in Einzelsträngen und damit die Bindungsfähigkeit herbeizuführen.

Zur Vorbereitung der Eizellen- DNA wurden die Objektträger für 2 Minuten bei 70°C in Denaturierungspuffer (70% Formamid / 2 x SSC, s. Tab. 7) gegeben. Anschließend erfolgte die Dehydrierung mittels 70%igem (- 20°C), 90%igem (RT) und 100%igem (RT) Ethanol für je 2 Minuten. Sowohl für die Herstellung des Denaturierungspuffers als auch der im Folgenden benötigten Waschlösungen I und II wurde eine Basislösung (20 x SSC) angefertigt (s. Tab. 6).

20 x SSC (pH = 7,0)	
Natriumchlorid	175,32 g
Natriumcitrat	88,23 g
Aqua dest.	1000 ml

Tab. 6: Basislösung (20 x SSC)

Formamid 70% / 2 x SSC (pH = 7,0)	
Formamid	70 ml
20 x SSC	10 ml
Aqua dest.	20 ml

Tab. 7: Denaturierungspuffer (Formamid 70% / 2 x SSC)

Zur Vorbereitung der DNA- Proben wurde dem Probengefäß nach vorsichtigem Aufmischen mittels Vortexer und kurzem Abzentrifugieren die benötigte Probenmenge entnommen und in ein separates Röhrchen gefüllt.

Es erfolgte die Denaturierung bei 72°C für 5 Minuten und im Anschluss die sofortige Platzierung in einem Eisblock.

In den auf dem Objektträger markierten Kreis wurden nun 1,5 µl der Proben- DNA gegeben, mit einem Deckglas bedeckt und mit Gummimasse versiegelt. Es folgte eine 12 bis 16- stündige Inkubationsphase in einer dunklen Feuchtkammer bei 37°C.

Nach der Hybridisierung wurden die Deckgläser entfernt und die Objektträger für 2 Minuten in 0,5 x SSC (Waschlösung I, s. Tab. 8) bei 72°C und für 2 Minuten in 1 x PBD= SSCT (Waschlösung II, s. Tab. 9) bei RT gewaschen, um unspezifisch gebundene Signale zu entfernen.

0,5 x SSC	
20 x SSC	2,5 ml
Aqua dest.	97,5 ml

Tab. 8: Waschlösung I (0,5 x SSC)

4 x SSC / Tween (20) 0,05%	
20 x SSC	20 ml
Tween (20)	50 µl
Aqua dest.	80 ml

Tab. 9: Waschlösung II (PBD = SSCT = 4 x SSC / Tween (20) 0,05%)

Anschließend durchliefen die Präparate erneut eine Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) für je 2 Minuten und wurden dann luftgetrocknet. Es war auf Lichtundurchlässigkeit der verwendeten Küvetten zu achten, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden. Abschließend wurde DAPI / Antifade auf die markierte Region des Objektträgers gegeben und mit einem Deckglas belegt. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI bewirkt eine blaue Gegenfärbung der Metaphasechromosomen, wodurch diese im Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden können. Die Einbettung in Antifade wirkt dem Verblässen der Farben entgegen.

Die Eizellchromosomen wurden nun unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Deutschland) aufgesucht und mit Hilfe einer CCD (Charge Coupled Device)- Kamera aufgenommen. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mit dem ISIS- Software- Programm (Metasystems GmbH; Altlußheim, Deutschland).

IV.11. Auswertung der Fluoreszenz- in- situ- Hybridisierung:

Im Gegensatz zu der Metaphasenplatte der Eizelle mit ihren nach DAPI zumeist klar konturierten Chromosomen wirkte das Chromatin des Polkörpers eher unscharf begrenzt und verwaschen, wodurch eine Unterscheidung möglich war.

Die Auswertung basiert auf den von Munne und Dailey erarbeiteten Kriterien für die Einordnung chromosomaler Verteilungsstörungen nach FISH an menschlichen Eizellen bzw. Polkörpern mit Proben für die Zentromerregion der Chromosomen X, 13, 16, 18 und

21. Dort wurden ein zusätzliches oder fehlendes Chromosom (gepaarte Signale der Schwesterchromatiden) als *Nondisjunction*, ein zusätzliches oder fehlendes Chromatid (ein Signal) als *Unbalanced Predivision* bewertet. In beiden Arbeiten konnte die Bewertung zumeist durch den komplementären Polkörper- bzw. Eizellenbefund gestützt werden. Waren die beiden Signale der Chromatiden eines Chromosoms um mehr als den doppelten Signaldurchmesser voneinander getrennt, ging man von *Balanced Predivision* aus (Dailey et al. 1996, Munne et al. 1995).

Da in der vorliegenden Arbeit eine FISH- Probe Anwendung fand, die das gesamte Chromosom 16 der Maus anfärbte, ergaben sich abhängig vom Kondensationszustand der Chromosomen oft Signale mit deutlich größerem Längs- als Querdurchmesser. *Balanced Predivision* wurde angenommen, wenn die Signale der beiden Chromatiden des Chromosoms 16 mehr als einen Signaldurchmesser (größter Durchmesser) voneinander entfernt lagen.

Eine zusätzliche Kennzeichnung der Befunde in dieser Arbeit durch +/- bezieht sich auf den Chromosomenstatus der Eizelle. Lagen zum Beispiel in der Eizelle ein Chromosom 16 und ein überschüssiges Chromatid 16 vor, wurde dies als *Unbalanced Predivision plus* (nbpd +) gewertet. Bei Vorliegen nur eines Einzelchromatids 16 in der Eizelle galt dies als *Unbalanced Predivision minus* (nbpd -).

Konnte in einem Präparat kein Signal im Bereich der Eizellchromosomen nachgewiesen werden und waren die Polkörperchromosomen nicht vorhanden, hing der Befund von der Vollständigkeit der Metaphaseplatte ab. War die Metaphase „geschlossen“, lautete die Beurteilung *Nondisjunction minus* (ndj -). Schien die Metaphase unvollständig, wurde von einem artefiziellen Chromosomenverlust bei der Fixierung ausgegangen. Das Präparat galt dann als nicht auswertbar. Auch bei zu starker Signalgebung konnte das Präparat nicht bewertet werden.

Eine Übersicht über die Auswertung der FISH- Präparate gibt Tab. 10. Die Abbildungen 6 bis 12 zeigen eine Auswahl von Bildern, die mit der CCD- Kamera aufgenommen und mit dem ISIS- Software- Programm verarbeitet wurden (Abb. 6 und Abb. 7: normale Verteilung des Chromosoms 16 auf Eizelle und Polkörper; Abb. 8 und Abb. 9: *Nondisjunction plus*; Abb. 10 und 11: *Unbalanced Predivision plus*; Abb. 12: *Balanced Predivision*).

Bewertung FISH	Abkürzung	Chr.16 Eizelle	Chr.16 Polkörper	Chr.16 Eizelle	Chr.16 Polkörper	Abbildung
Normal	n.	1 x Chr.16, aus 2 Chromatiden bestehend	1 x Chr.16, aus 2 Chromatiden bestehend	X	X	<u>Abb. 6</u> und <u>Abb. 7</u>
Nondisjunction plus	ndj +	2 x Chr.16, jeweils aus 2 Chromatiden bestehend	kein Chr.16 oder Einzelchromatid 16	XX	-	<u>Abb. 8</u> und <u>Abb. 9</u>
Nondisjunction minus	ndj -	kein Chr.16 oder Einzelchromatid 16	2 x Chr.16, jeweils aus 2 Chromatiden bestehend	-	XX	-
Unbalanced Prediction plus	nbpd +	1 x Chr.16, aus 2 Chromatiden bestehend und 1 x Einzelchromatid 16	1x Einzelchromatid 16	X I	I	<u>Abb. 10</u> und <u>Abb. 11</u>
Unbalanced Prediction minus	nbpd -	1 x Einzelchromatid 16	1 x Chr.16, aus 2 Chromatiden bestehend und 1x Einzelchromatid 16	I	X I	-
Balanced Prediction	bpd	2 x Einzelchromatid 16, räumlich getrennt (> 1 Signaldurchmesser)	2 x Einzelchromatid 16	I I	II	<u>Abb. 12</u>
nicht auswertbar	n.a.	z.B. Metaphase nicht geschlossen	-	-	-	-

Tab. 10: Auswertung FISH des Chromosoms 16 mit „Total Mouse Chromosome DNA Probe, Chromosome 16, Direct labelled- Red“

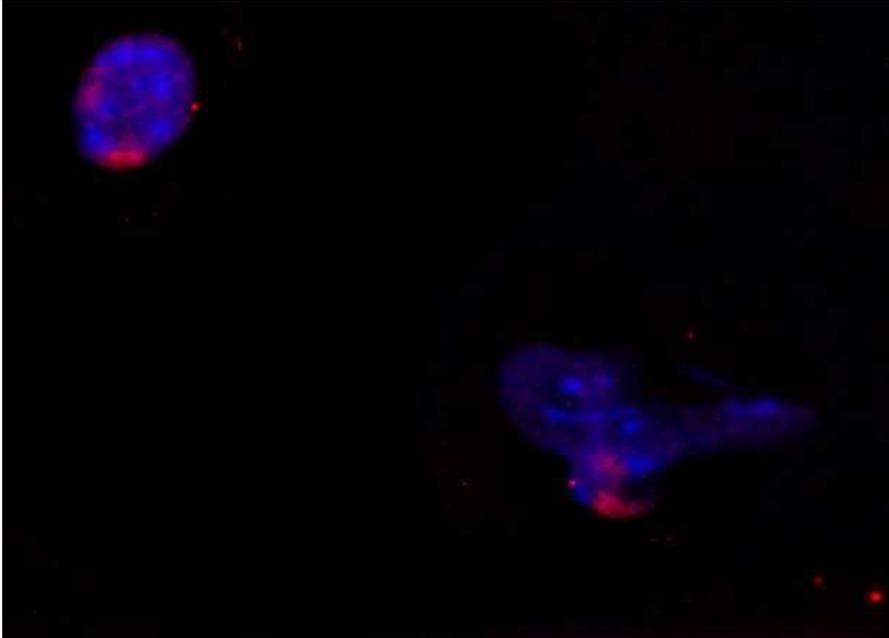


Abb. 6: „Normalbefund“. Links Polkörper, rechts Eizelle. In der Eizelle ein Chromosom 16 bestehend aus zwei zusammenhängenden Chromatiden (Abstand kleiner ein Signaldurchmesser). Im Polkörper zwei Chromatiden mit einem Abstand größer als ein Signaldurchmesser („*Predivision*“ im Polkörper). Wertung als normale Chromosomenverteilung, da Befund der Eizelle entscheidend. Die unterschiedliche Intensität der Signale ist durch unterschiedliche Fokusebenen bedingt.

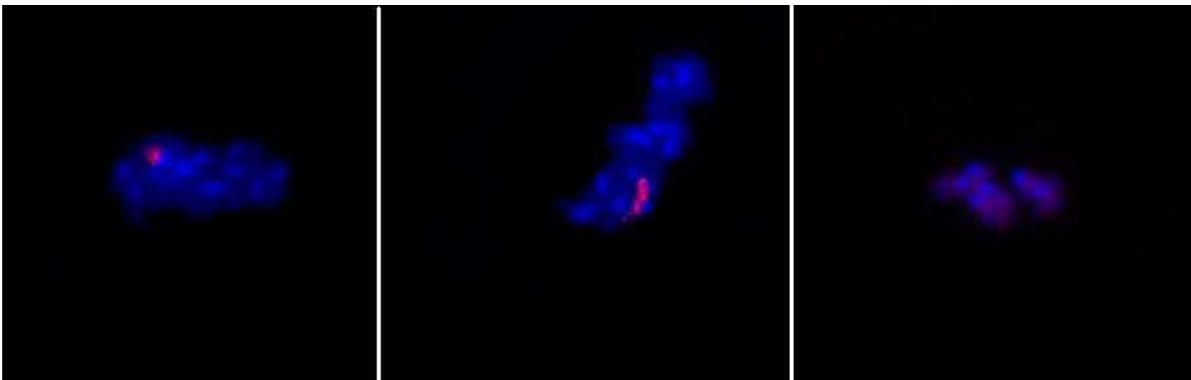


Abb. 7: „Normalbefund“. Links Polkörper, mittig und rechts Chromosomenmaterial der Eizelle. In Polkörper und Eizelle jeweils Nachweis eines ganzen Chromosoms 16.

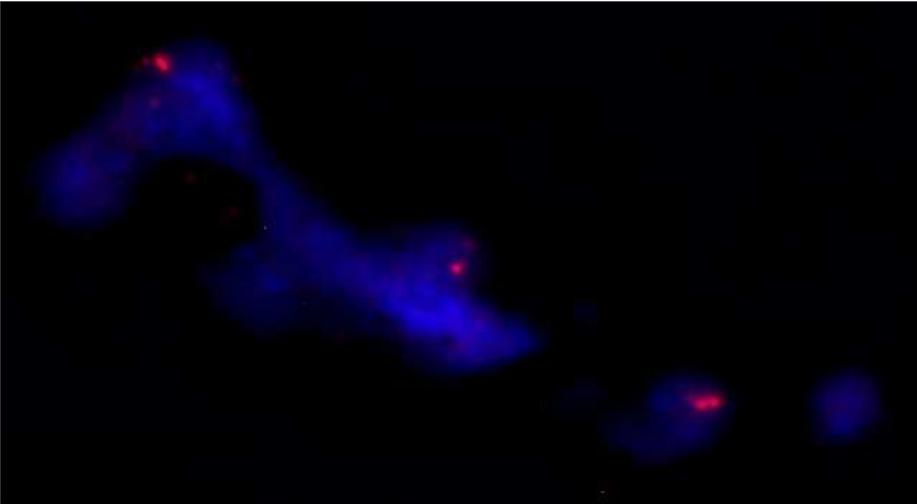


Abb. 8: *Nondisjunction plus*. Im auf drei Gruppen verteilten Chromosomenmaterial der Eizelle finden sich in der mittleren Gruppe ein ganzes Chromosom 16 und in der linken Gruppe die weit auseinander liegenden Signale zweier weiterer Chromatiden 16 (zusätzlich „*Predivision*“).

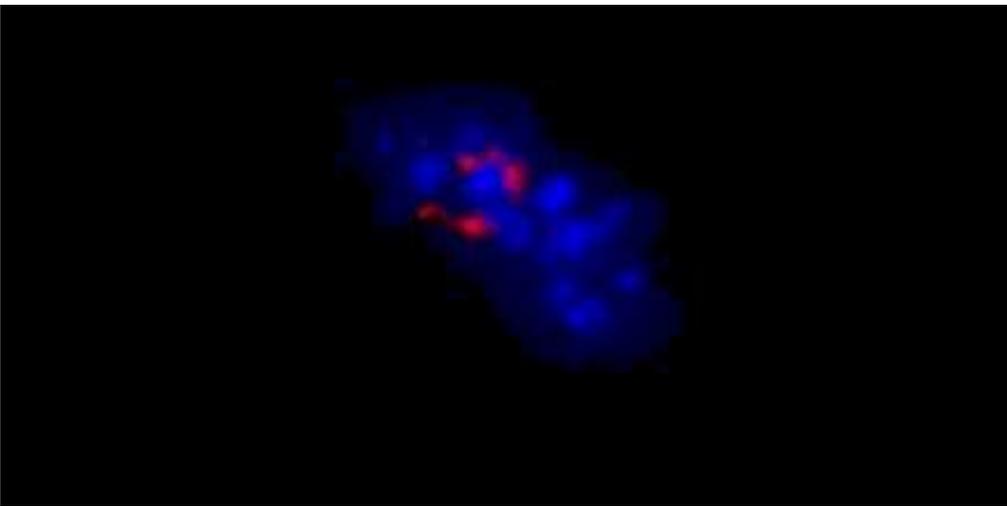


Abb. 9: *Nondisjunction plus*.
Nachweis zweier ganzer Chromosomen 16 in der Eizelle.

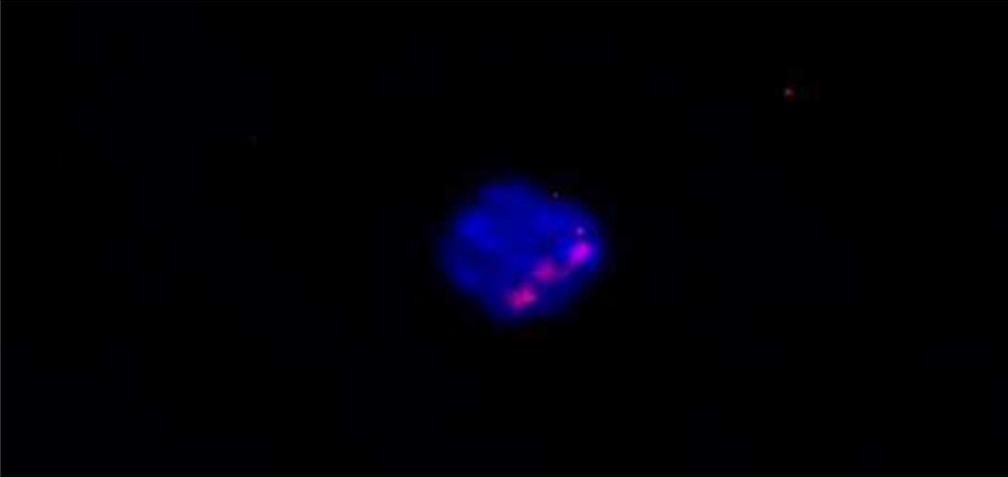


Abb. 10: *Unbalanced Predivision plus*. Im Chromatin der Eizelle lassen sich zwei durch eine zarte DNA- Brücke miteinander verbundene Signale nachweisen, entsprechend einem ganzen Chromosom 16. Unterhalb kommt ein zusätzliches Chromatid 16 zur Darstellung.

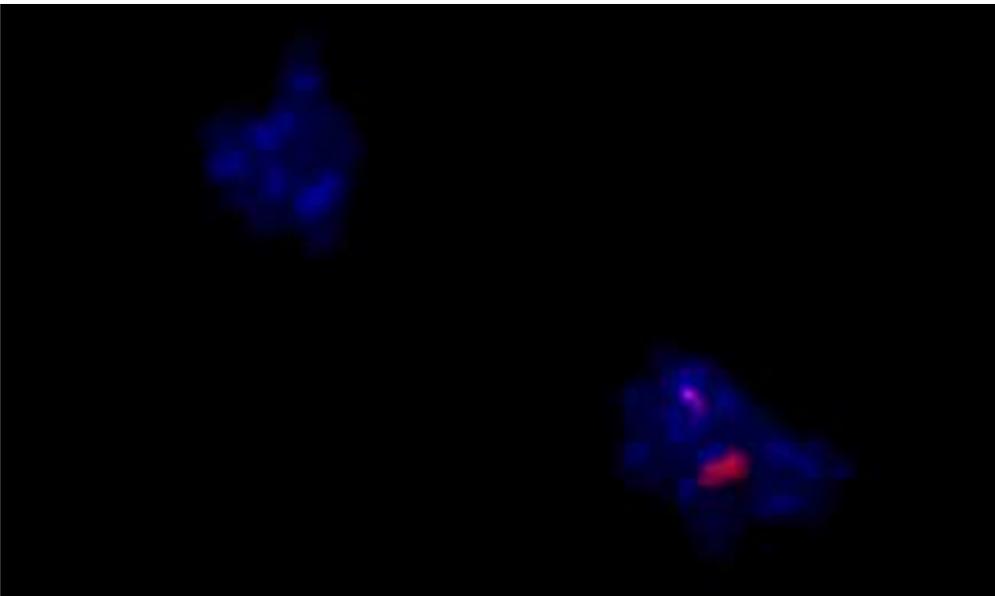


Abb. 11: *Unbalanced Predivision plus*. Die Chromosomen der Eizelle liegen in zwei Gruppen vor. In der rechten Gruppe sind ein ganzes Chromosom 16 sowie in einer weiteren Fokusebene ein zusätzliches Chromatid 16 angefärbt.

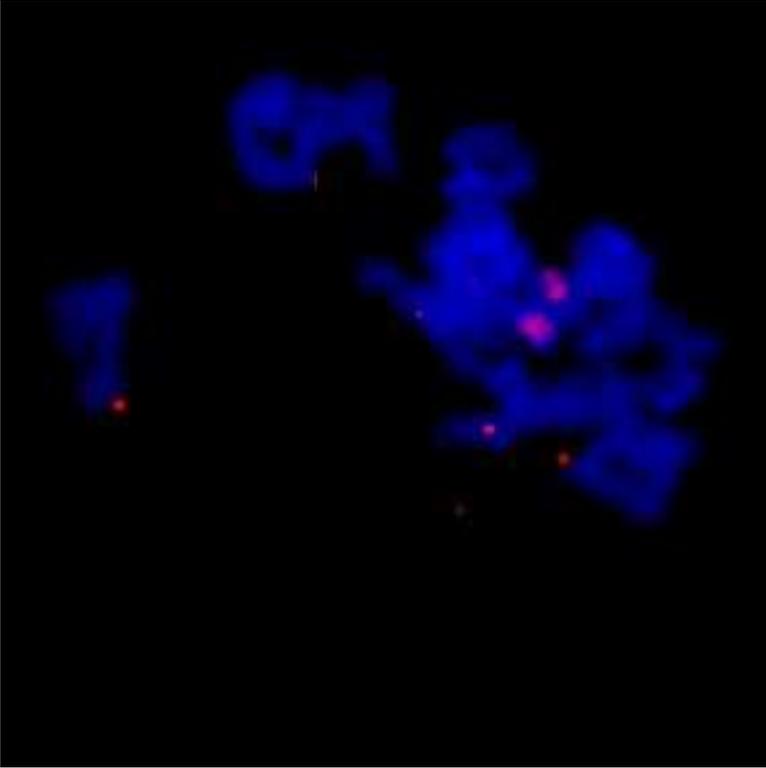


Abb. 12: *Balanced Predivision*. Die Signale der beiden Chromatiden des Chromosoms 16 liegen mehr als einen Signaldurchmesser voneinander entfernt.
Bei den kleineren, teils außerhalb des Chromosomenmaterials liegenden roten Flecken handelt es sich um Artefakte.

IV.12. Statistik:

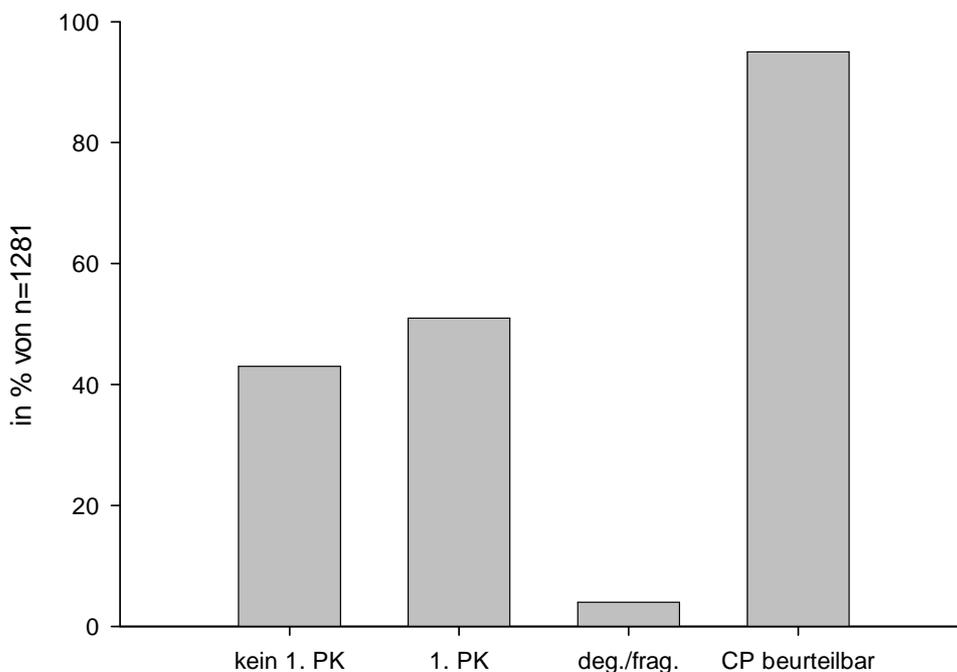
Die Daten wurden nach Darstellung in Kontingenztafeln mit dem Chi- Quadrat Test analysiert. Statistische Signifikanz war als $p < 0,05$ definiert.

V. Ergebnisse

V.1. Morphologische Qualität der Eizellen:

V.1.1. Anzahl und „Reife“:

Die Versuche wurden in der Universitätsfrauenklinik Kiel durchgeführt. An 23 Versuchstagen wurden von 43 Mäusen insgesamt 1281 Eizellen gewonnen. Nach den oben genannten Bewertungskriterien wurden diese 1281 Eizellen in morphologische Gruppen hinsichtlich Polkörper- und Zytoplasma- Beschaffenheit eingeteilt (siehe Kap. IV.7. und IV.8.). Von 1281 Eizellen waren 60 (4,7%) vollständig degeneriert oder fragmentiert (Noten „5“ und „6“) (s. Abb. 13), so dass eine weitere Bewertung nicht möglich war. Hinsichtlich Zytoplasma und Polkörper konnten somit noch 1221 (95,3%) von 1281 Eizellen weiter bewertet werden. Bei 663 (51,8%) der 1281 Eizellen war der erste Polkörper vorhanden. Diese wurden definitionsgemäß als „reife“ Metaphase II-Eizellen eingestuft. Bei 558 (43,5%) der 1281 Eizellen lag kein abgetrennter erster Polkörper vor, weshalb definitionsgemäß eine Einstufung als „unreif“ erfolgte (s. Diagr. 1). Acht (1,4%) der „unreifen“ 558 Eizellen zeigten eine Vorwölbung der Zytoplasmamembran, so dass die Abschnürung des ersten Polkörpers bevorzustehen schien (s. Abb. 14).



Diagr. 1: Auswertbarkeit der gewonnenen 1281 Eizellen hinsichtlich Polkörper- und Zytoplasmamorphologie

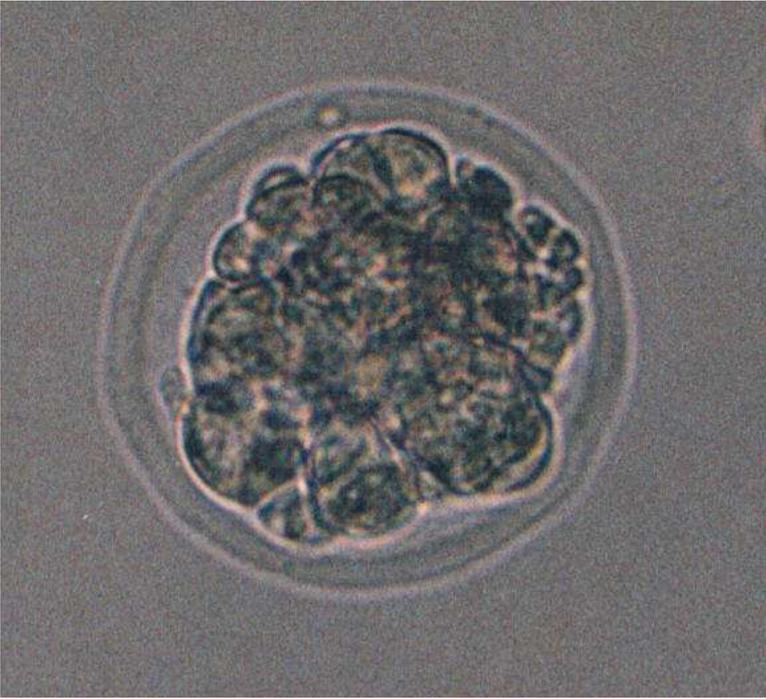


Abb. 13: Degenerierte Eizelle mit vollständig fragmentiertem Zytoplasma



Abb. 14: Zytoplasma Note „1“, Vorwölbung der Zytoplasmamembran als Zeichen beginnender Abschnürung des ersten Polkörpers

V.1.2. Polkörperqualität:

Von 663 Polkörpern wurden 131 (19,8%) mit Note „1“ (s. Abb. 15), 141 (21,3%) mit Note „2“ (s. Abb. 16), 175 (26,4%) mit Note „3“ (s. Abb. 17) und 208 (31,4%) mit Note „4“ (s. Abb. 18) bewertet. Bei 8 (1,2%) der 663 Polkörper war die Zuordnung nicht möglich (s. Diagr. 2 / Tab. 11).



Abb. 15: Polkörper groß, rund mit glatter Oberfläche; Bewertung PK: Note „1“



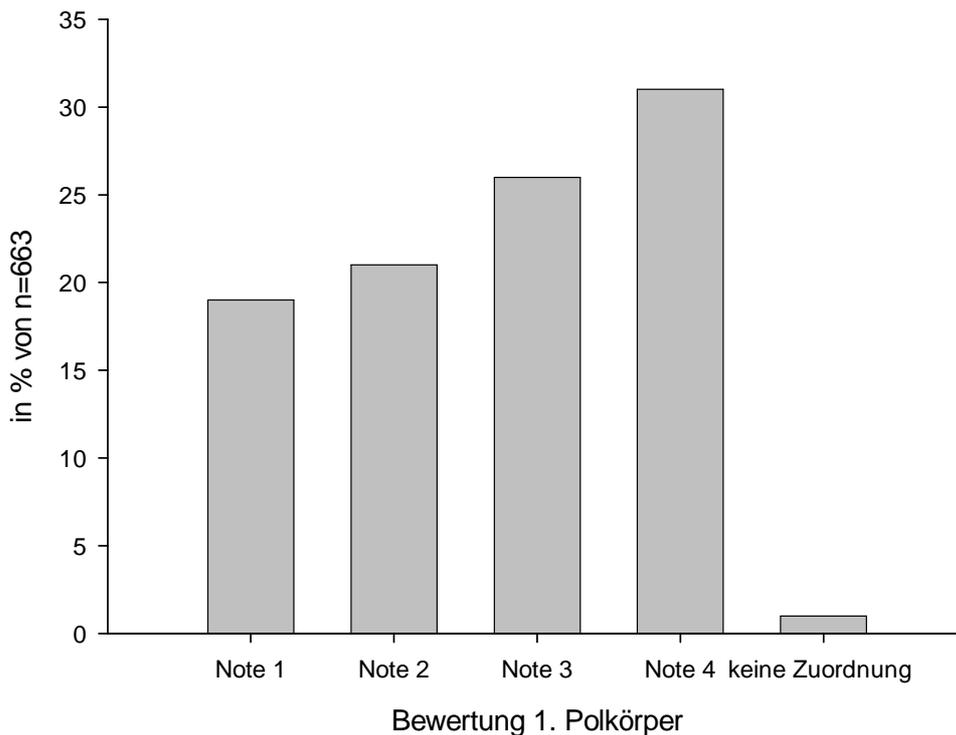
Abb. 16: Polkörper groß, oval mit leicht eingezogener Oberfläche; Bewertung PK: Note „2“



Abb. 17: Polkörper klein, mit unregelmäßiger Oberfläche, noch massiv;
Bewertung PK: Note „3“



Abb. 18: Polkörper klein, sichelförmig; Bewertung PK: Note „4“



<u>Polkörperqualität</u>	<u>Anzahl / % von n</u>
Note „1“	131 / 19,8%
Note „2“	141 / 21,3%
Note „3“	175 / 26,4%
Note „4“	208 / 31,4%
keine Zuordnung	8 / 1,2%
gesamt	n = 663

Diagr. 2 / Tab. 11: Bewertung des ersten Polkörpers der 663 „reifen“ Eizellen

V.1.3. Zytoplasmaqualität:

Nach Abzug der 60 vollständig degenerierten oder fragmentierten Eizellen wurden die verbleibenden 1221 Eizellen hinsichtlich der Zytoplasmaqualität wie folgt beurteilt: 77 (6,3%) Note „1“ (s. Abb. 19), 400 (32,8%) Note „2“ (s. Abb. 20), 572 (46,8%) Note „3“ (s. Abb. 21) und 172 (14,1%) Note „4“ (s. Abb. 22). Dies ist in Diagr. 3 / Tab. 12 dargestellt.

Fasst man die Gruppen „1“ und „2“ als Eizellen mit hellem, fein granuliertem Zytoplasma und die Gruppen „3“ und „4“ als Eizellen mit zunehmend größerer Zytoplasmastruktur (im Sinne zunehmender Degeneration) zusammen, so ergibt sich eine Verteilung von 477 (39,1%; feines CP) zu 744 (60,9%; grobes CP) von 1221 Eizellen.



Abb. 19: Zytoplasma homogen, hell, fein granuliert;

Bewertung CP: Note „1“; kein erster Polkörper vorhanden;



Abb. 20: Zytoplasma homogen, gröbere Granulierung;

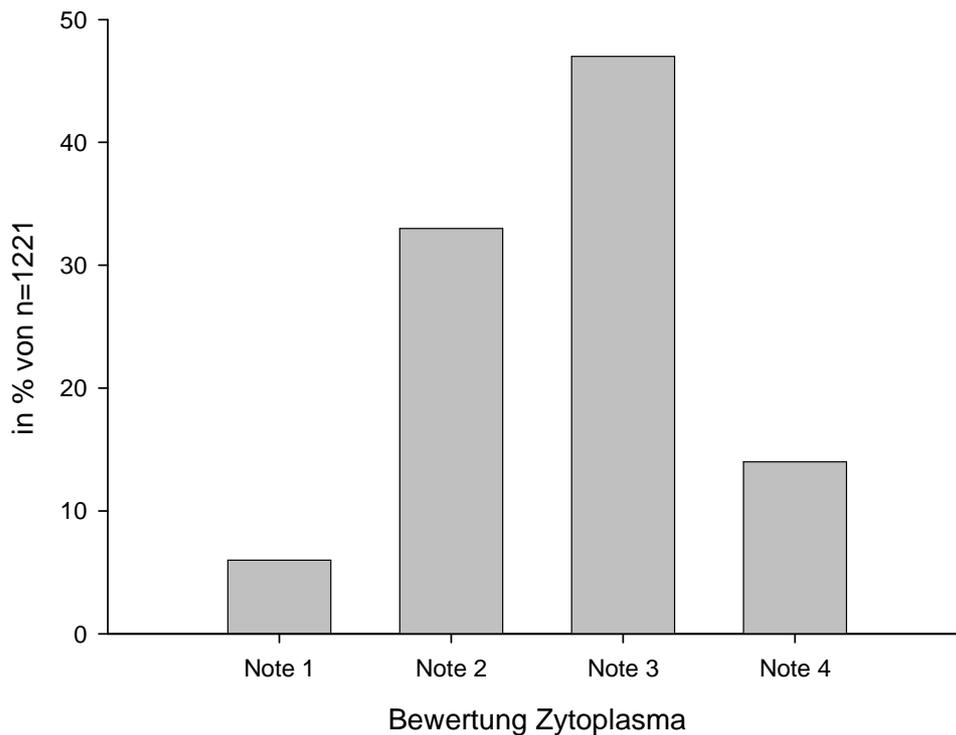
Bewertung CP: Note „2“; kein erster Polkörper vorhanden;



Abb. 21: Zytoplasma inhomogen, dunkel, grob granuliert;
Bewertung CP: Note „3“; kein erster Polkörper vorhanden;



Abb. 22: Zytoplasma dunkel, geschrumpft mit netzartiger Struktur;
Bewertung CP: Note „4“; Bewertung PK: Note „1“;



<u>Zytoplasmaqualität</u>	<u>Anzahl / % von n</u>
Note „1“	77 / 6,3%
Note „2“	400 / 32,8%
Note „3“	572 / 46,8%
Note „4“	172 / 14,1%
Gesamt	n = 1221

Diagr. 3 / Tab. 12: Bewertung des Zytoplasmas bei 1221 auswertbaren Eizellen

V.2. Chromosomaler Status der Eizellen:

Um den Zusammenhang zwischen morphologischer Qualität der Eizelle und Aneuploidie bezüglich des Chromosoms 16 der Maus zu untersuchen, wurden insgesamt 100 Eizellen aus verschiedenen morphologischen Gruppen fixiert, mit der Fluoreszenzprobe für Chromosom 16 hybridisiert und nach den oben ausgeführten Kriterien bewertet (s. Kap. IV.11.).

V.2.1. Effizienz der FISH:

Von 100 hybridisierten Eizellen waren 12 Präparate nicht auswertbar. In 11 von 12 Fällen war kein Fluoreszenzsignal nachweisbar und bei gleichzeitig unvollständiger

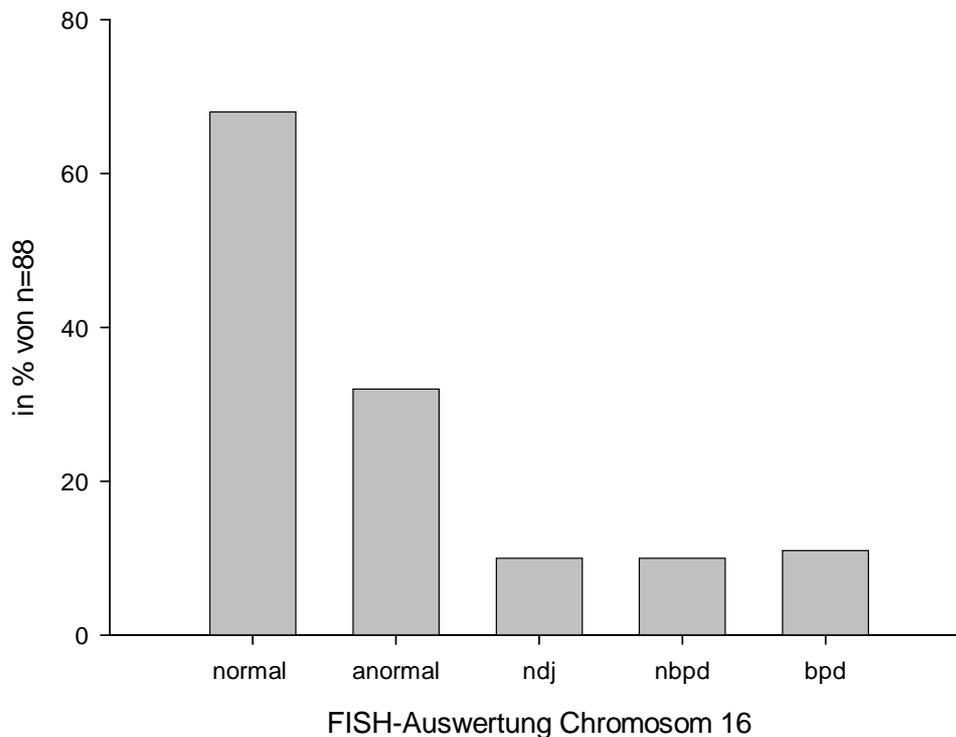
Metaphasenplatte musste von einem artefiziellen Chromosomenverlust ausgegangen werden. In einem Fall bestand eine zu starke Signalgebung.

Von 88 auswertbaren Präparaten lagen bei 84 nur die Metaphasechromosomen der Eizelle vor, so dass auf den chromosomalen Status des Polkörpers zurückgeschlossen wurde. Bei 4 von 88 Präparaten konnte jedoch durch zusätzliche Auswertung der Polkörperchromosomen der Befund untermauert werden.

V.2.2. Fehlverteilung des Chromosoms 16:

Von allen 88 auswertbaren Eizellen wurden 60 (68,2%) als „normal“ bezüglich des Chromosoms 16 bewertet. Im Chromosomenmaterial der Eizelle konnte ein aus zwei Chromatiden bestehendes Chromosom 16 nachgewiesen werden (s. Abb. 6 und Abb. 7).

Die übrigen 28 (31,8%) Eizellen wurden als anormal beurteilt, das heißt, es lag entweder *Nondisjunction*, *Balanced Predivision* oder *Unbalanced Predivision* vor. *Nondisjunction* (ndj + und ndj -) und *Unbalanced Predivision* (nbpd + und nbpd -) kamen jeweils bei 9 (10,2%) der 88 Eizellen vor. Bei 10 (11,4%) von 88 Eizellen konnte *Balanced Predivision* (bpd) nachgewiesen werden (s. Diagr. 4 / Tab. 13).



<u>Bewertung nach FISH</u>	<u>Anzahl der EZ</u>	<u>% von n=88 auswertbaren EZ</u>	<u>% von n=28 EZ mit anormaler Verteilung des Chromosoms 16</u>
Gesamt	88	100%	-
<u>Normal</u>	60	<u>68,2%</u>	-
<u>Anormal gesamt</u>	28	<u>31,8%</u>	100%
<u>Nondisjunction gesamt (ndj)</u>	9	<u>10,2%</u>	<u>32,1%</u>
<i>Nondisjunction plus (ndj +)</i>	3	3,4%	10,7%
<i>Nondisjunction minus (ndj -)</i>	6	6,8%	21,4%
<u>Unbalanced Predivision gesamt (nbpd)</u>	9	<u>10,2%</u>	<u>32,1%</u>
<i>Unbalanced Predivision plus (nbpd +)</i>	8	9,1%	28,6%
<i>Unbalanced Predivision minus (nbpd -)</i>	1	1,1%	3,5 %
<u>Balanced Predivision (bpd)</u>	10	<u>11,4%</u>	<u>35,7%</u>

Diagr. 4 / Tab. 13: Chromosomaler Befund von 88 auswertbaren Eizellen nach FISH für das Chromosom 16 der Maus

V.2.3. Überschüssiges und fehlendes Chromosomenmaterial:

Erfolgt eine Einteilung der Ergebnisse nach - bezogen auf den haploiden Chromosomensatz der Eizelle - überschüssigem sowie fehlendem Chromosomenmaterial des Chromosoms 16 [überschüssiges Einzelchromosom 16 (ndj +) oder überschüssiges Einzelchromatid 16 (nbpd +) sowie fehlendes Einzelchromosom 16 (ndj -) oder fehlendes Einzelchromatid 16 (nbpd -)] ergibt sich folgende Darstellung:

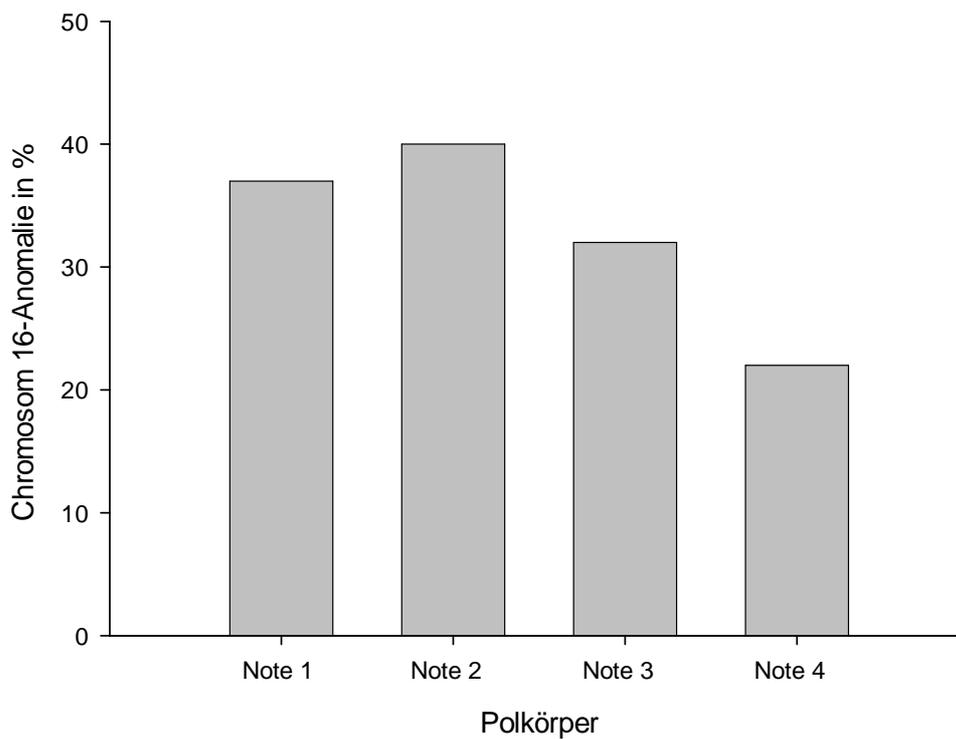
Bei 11 (12,5%) von 88 EZ konnte ein Überschuss und bei 7 (7,9%) von 88 EZ das Fehlen von Chromosomenmaterial 16 beobachtet werden.

V.3. Korrelation Morphologie und Chromosomenstatus:

Vor der Fixierung der Eizellen war eine Bewertung der Polkörper- und Zytoplasmaqualität erfolgt. Die 88 nach FISH auswertbaren Eizellen entstammten den Polkörper- und Zytoplasmagruppen „1“ bis „4“.

V.3.1. Polkörpermorphologie und Anomalie Chromosom 16 (gesamt):

Die Häufigkeit chromosomaler Anomalien des Chromosoms 16 in Bezug auf die Polkörperqualität ist in Diagr. 5 und Tab. 14 dargestellt. Zwischen den Polkörpergruppen besteht kein signifikanter Unterschied im Vorkommen chromosomaler Anomalien des Chromosoms 16 ($p=0,583$).



Polkörpernote	Anzahl der Eizellen	Anzahl / <u>Häufigkeit der Chromosomenanomalien</u>
„1“	27	10 / <u>37%</u>
„2“	15	6 / <u>40 %</u>
„3“	19	6 / <u>32%</u>
„4“	27	6 / <u>22%</u>
gesamt	88	28 / <u>32%</u>

Diagr. 5 / Tab. 14: Fehlverteilung des Chromosoms 16 in den einzelnen Polkörpergruppen

Die Polkörpergruppen „1“ und „2“ wurden als morphologisch „gut“ und die Gruppen „3“ und „4“ als morphologisch „schlecht“ aufgrund zunehmender Degenerationsmerkmale zusammengefasst.

Die mit „1“ und „2“ bewerteten Polkörper wiesen mit 37% und 40% höhere Raten von Anomalien des Chromosoms 16 auf als die Gruppen „3“ und „4“ mit 32% und 22%. Bei Eizellen, deren Polkörper als morphologisch „gut“ (Polkörper groß, glatt begrenzt und homogen) eingestuft worden waren, traten Chromosomenanomalien somit häufiger auf als bei Eizellen, deren Polkörper als morphologisch „schlecht“ (Polkörper klein, unscharf begrenzt und inhomogen) beurteilt worden waren (38% gegenüber 26%) (s. Tab. 15).

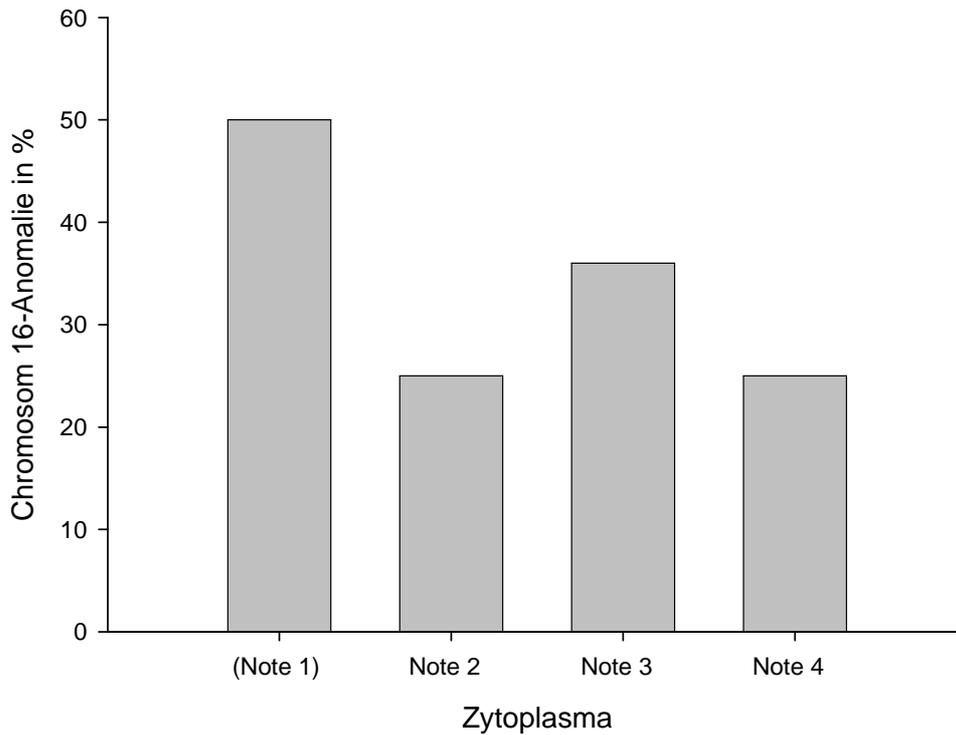
Statistische Signifikanz wurde bei Niveau $p < 0,05$ nicht erreicht ($p = 0,164$).

Polkörperbeurteilung	Anzahl der Eizellen	Anzahl/ <u>Häufigkeit der Chromosomenanomalien</u>
„gut“ („1“ und „2“)	42	16 / <u>38%</u>
„schlecht“ („3“ und „4“)	46	12 / <u>26%</u>
Gesamt	88	28 / <u>32%</u>

Tab. 15: Verteilung der Chromosomenanomalien bei Unterteilung der Polkörper in morphologisch „gut“ (groß, glatt begrenzt, entsprechend Note „1“ und „2“) und „schlecht“ (klein, unscharf begrenzt, entsprechend Note „3“ und „4“)

V.3.2. Zytoplasmaqualität und Anomalie Chromosom 16 (gesamt):

Die Häufigkeit chromosomaler Anomalien des Chromosoms 16 in Bezug auf die Zytoplasmaqualität ist in Diagr. 6 und Tab. 16 dargestellt. Zwischen den Zytoplasmagruppen besteht kein signifikanter Unterschied im Vorkommen chromosomaler Anomalien des Chromosoms 16 ($p=0,687$).



Zytoplasmanote	Anzahl der Eizellen	Anzahl/ <u>Häufigkeit der Chromosomenanomalien</u>
„1“	2	1 / <u>50%</u>
„2“	24	6 / <u>25%</u>
„3“	50	18 / <u>36%</u>
„4“	12	3 / <u>25%</u>
gesamt	88	28 / <u>32%</u>

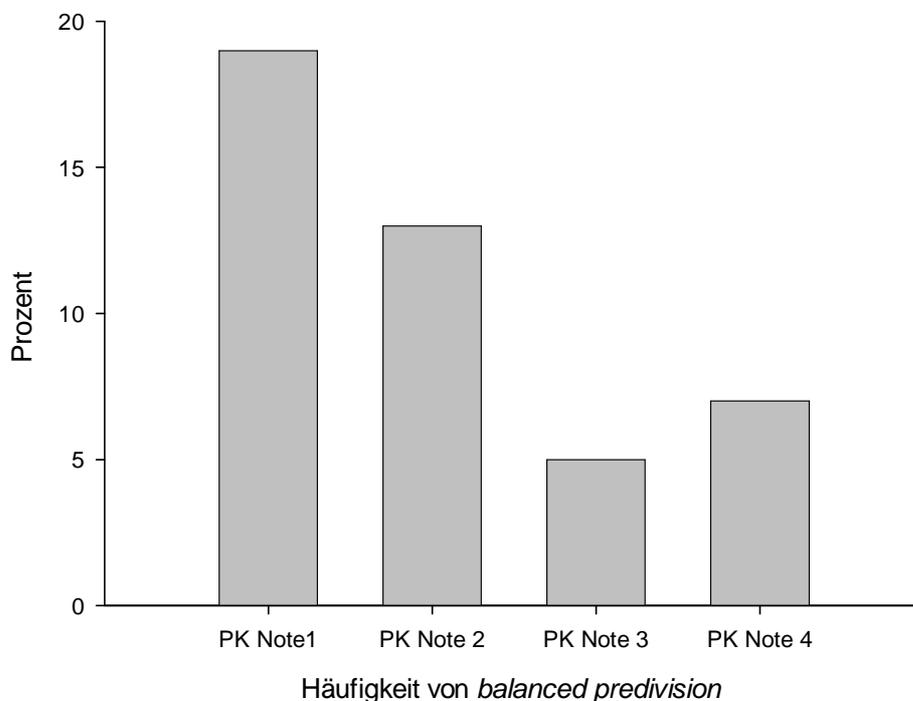
Diagr. 6 / Tab. 16: Fehlverteilung des Chromosoms 16 in den einzelnen Zytoplasmagruppen

V.3.3. *Balanced Predivision* (bpd):

Balanced Predivision (bpd) konnte bei insgesamt 10 (11,4%) der 88 nach FISH auswertbaren Eizellen festgestellt werden (s. Abb. 12)

V.3.3.1. *Balanced Predivision* - Polkörper- Morphologie:

Die Häufigkeit von *Balanced Predivision* betrug 18,5% (5 von 27 EZ) für Polkörper- Note „1“, 13,3% (2 von 15 EZ) für Polkörper- Note „2“, 5,3% (1 von 19 EZ) für Polkörper- Note „3“ und 7,4% (2 von 27 EZ) für Polkörper- Note „4“ (s. Diagr. 7 / Tab. 17). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Polkörpergruppen war nicht nachweisbar ($p=0,466$).



	PK- Note „1“	PK- Note „2“	PK- Note „3“	PK- Note „4“
bpd	18,5% (5 von 27 EZ)	13,3% (2 von 15 EZ)	5,3% (1 von 19 EZ)	7,4% (2 von 27 EZ)

Diagr. 7 / Tab. 17: Vorkommen von *Balanced Predivision* in den einzelnen Polkörpergruppen

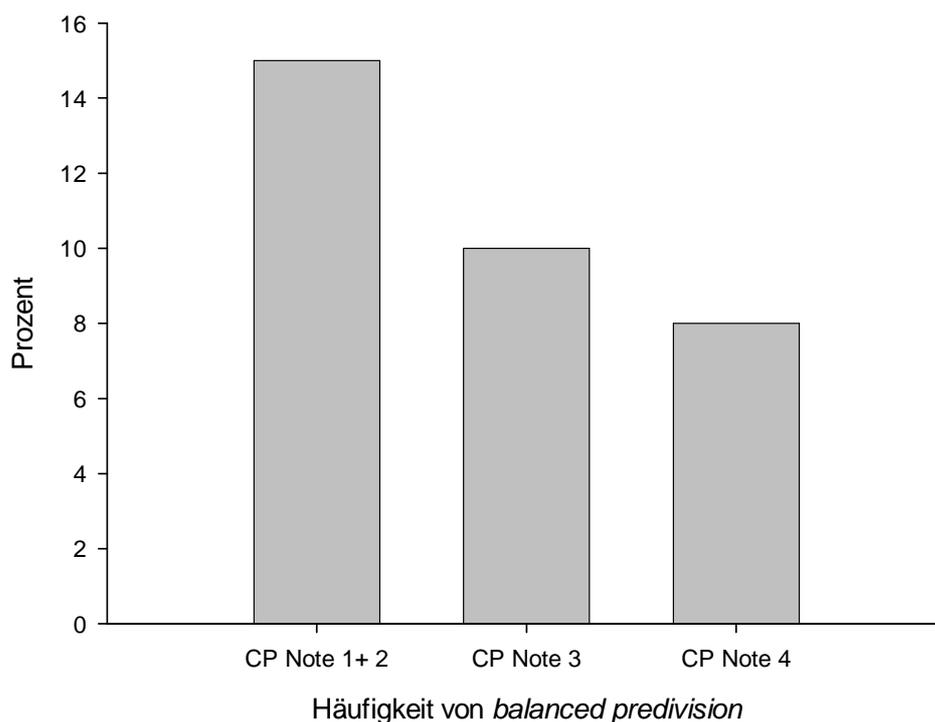
Bei Zusammenfassung der Polkörper- Gruppen „1“ und „2“ als morphologisch „gut“ (Polkörper groß, glatt begrenzt und homogen) und der Polkörper- Gruppen „3“ und „4“ als morphologisch „schlecht“ (Polkörper klein, unregelmäßig begrenzt und inhomogen) lag *Balanced Predivision* deutlich häufiger bei Eizellen vor, deren Polkörper als „gut“ bewertet

worden waren (16,6% (7 von 42 EZ) versus 6,5% (3 von 46 EZ)). Statistische Signifikanz besteht nicht ($p=0,123$).

V.3.3.2. *Balanced Predivision* - Zytoplasma- Morphologie:

Da zu wenig auswertbare Ergebnisse nach FISH in der Zytoplasmagruppe „1“ (2 EZ mit Zytoplasma- Note „1“) vorlagen, wurde diese in den folgenden Darstellungen mit Zytoplasmagruppe „2“ (24 EZ mit Zytoplasma- Note „2“) zusammengefasst.

Balanced Predivision lag bei 15,4% (4 von 26 EZ) der Eizellen mit Zytoplasma- Note „1“ oder „2“, bei 10,0% (5 von 50 EZ) der Eizellen mit Zytoplasma- Note „3“ sowie bei 8,3% (1 von 12 EZ) der Eizellen mit Zytoplasma- Note „4“ vor (s. Diagr. 8 / Tab. 18). Statistisch signifikante Unterschiede für das Vorkommen von *Balanced Predivision* bestanden zwischen den, nach morphologischen Kriterien eingeteilten Zytoplasmagruppen nicht ($p=0,770$).



	CP- Note „1“ oder „2“	CP- Note „3“	CP- Note „4“
bpd	15,4% (4 von 26 EZ)	10,0% (5 von 50 EZ)	8,3% (1 von 12 EZ)

Diagr. 8 / Tab. 18: Vorkommen von *Balanced Predivision* in Bezug auf die Zytoplasma-qualität

V.3.4. Unbalanced Predivision (nbpd):

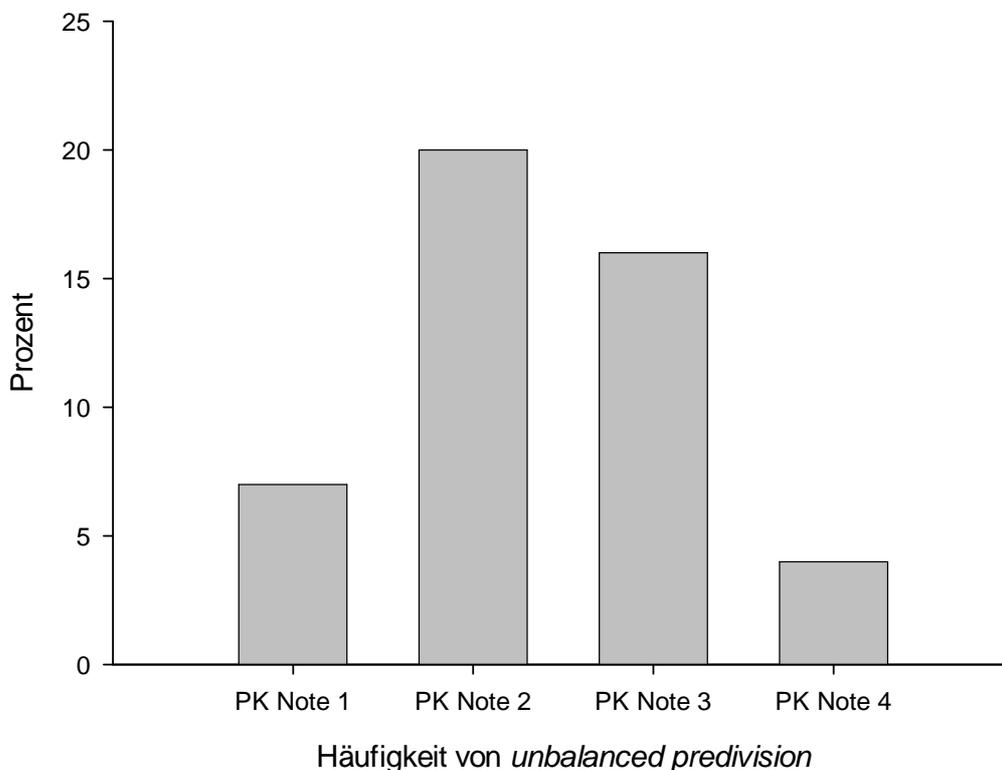
Unbalanced Predivision lag bei insgesamt 9 (10,2%) der 88 nach FISH auswertbaren Eizellen vor (s. Abb. 10 und Abb. 11). Alle morphologischen Gruppen waren betroffen.

Eine weitere Unterteilung des Chromosomenbefundes erfolgte in *Unbalanced Predivision plus* (nbpd +) bei Nachweis eines überschüssigen Chromatids 16 sowie in *Unbalanced Predivision minus* (nbpd -) bei Fehlen eines Chromatids 16 in der Eizelle.

Unbalanced Predivision minus kam nur bei einer Eizelle mit der morphologischen Bewertung „PK / CP“: „1 / 3“ vor. In den übrigen Fällen lag *Unbalanced Predivision plus* (nbpd +) vor.

V.3.4.1. Unbalanced Predivision - Polkörper- Morphologie:

Unbalanced Predivision (nbpd + oder nbpd -) fand sich insgesamt in 7,4% (2 von 27 EZ) der mit Polkörper- Note „1“, 20% (3 von 15 EZ) der mit Polkörper- Note „2“, 15,8% (3 von 19 EZ) der mit Polkörper- Note „3“ und 3,7% (1 von 27 EZ) der mit Polkörper- Note „4“ bewerteten Eizellen (s. Diagr. 9 / Tab. 19). Statistisch signifikante Unterschiede bezüglich des Vorliegens von *Unbalanced Predivision* bestanden zwischen den, nach morphologischen Kriterien eingeteilten Polkörpergruppen nicht ($p= 0,297$).

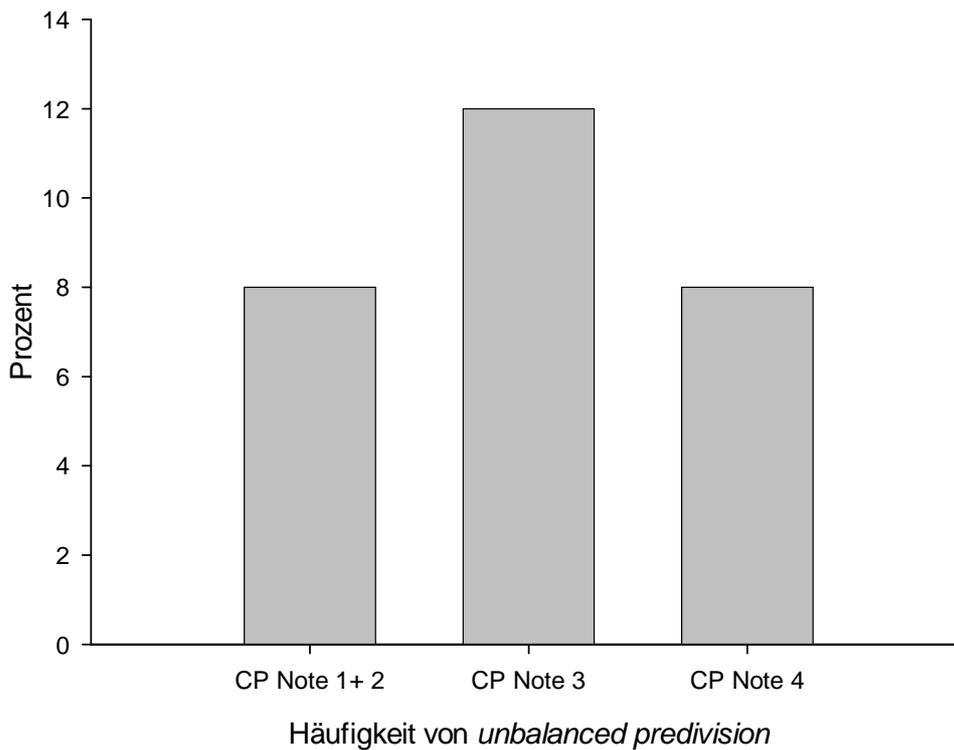


	PK- Note „1“	PK- Note „2“	PK- Note „3“	PK- Note „4“
nbpd gesamt	7,4% (2 von 27 EZ)	20% (3 von 15 EZ)	15,8% (3 von 19 EZ)	3,7% (1 von 27 EZ)

Diagr. 9 / Tab. 19: Vorkommen von *Unbalanced Predivision* in den einzelnen Polkörpergruppen

V.3.4.2. *Unbalanced Predivision* - Zytoplasma- Morphologie:

Unbalanced Predivision (nbpd + oder nbpd -) lag bei 7,7% (2 von 26 EZ) der mit Zytoplasma- Note „1“ oder „2“ bewerteten Eizellen vor. Die Häufigkeit in Zytoplasma- Gruppe „3“ betrug 12,0% (6 von 50 EZ), in Zytoplasma- Gruppe „4“ 8,3% (1 von 12 EZ) (s. Diagr. 10 / Tab. 20) Ein signifikanter Unterschied zwischen den Zytoplasmagruppen war nicht nachweisbar ($p= 0,201$).



	CP- Note „1“ oder „2“	CP- Note „3“	CP- Note „4“
nbpd gesamt	7,7% (2 von 26 EZ)	12,0% (6 von 50 EZ)	8,3% (1 von 12 EZ)

Diagr. 10 / Tab. 20: Vorkommen von *Unbalanced Predivision* in Bezug auf die Zytoplasmaqualität

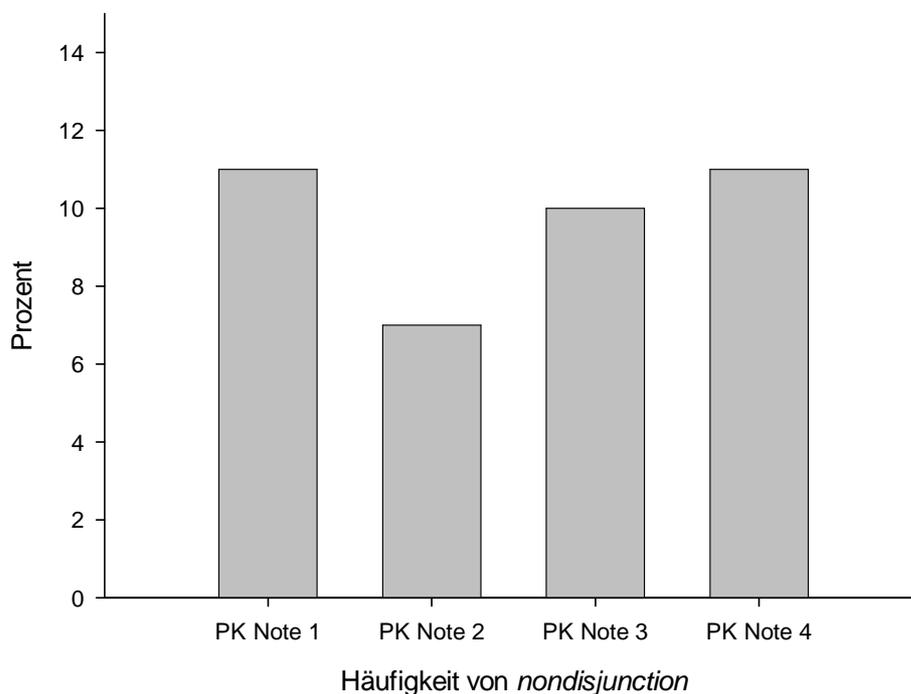
V.3.5. Nondisjunction (ndj):

Nondisjunction (ndj) konnte bei insgesamt 9 (10,2%) der 88 nach FISH analysierbaren Präparate nachgewiesen werden (s. Abb. 8 und Abb. 9).

Eine weitere Einteilung des chromosomalen Status bezüglich des Chromosoms 16 erfolgte in *Nondisjunction* plus (ndj +) bei Vorliegen eines zusätzlichen Chromosoms 16 und in *Nondisjunction* minus (ndj -) bei Fehlen des Chromosoms 16.

V.3.5.1. Nondisjunction - Polkörper- Morphologie

Nondisjunction (ndj + oder ndj -) fand sich insgesamt in 11,1% (3 von 27 EZ) der mit Polkörper- Note „1“, 6,6% (1 von 15 EZ) der mit Polkörper- Note „2“, 10,6% (2 von 19 EZ) der mit Polkörper- Note „3“ und 11,1% (3 von 27 EZ) der mit Polkörper- Note „4“ bewerteten Eizellen (s. Diagr. 11). Eine weitere Aufschlüsselung in *Nondisjunction* plus und minus enthält Tab. 21. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Polkörpergruppen war nicht nachweisbar ($p= 0,968$).



Diagr. 11: Vorkommen der *Nondisjunction*- Ereignisse gesamt (ndj + oder ndj -) in Bezug auf die Polkörpermorphologie

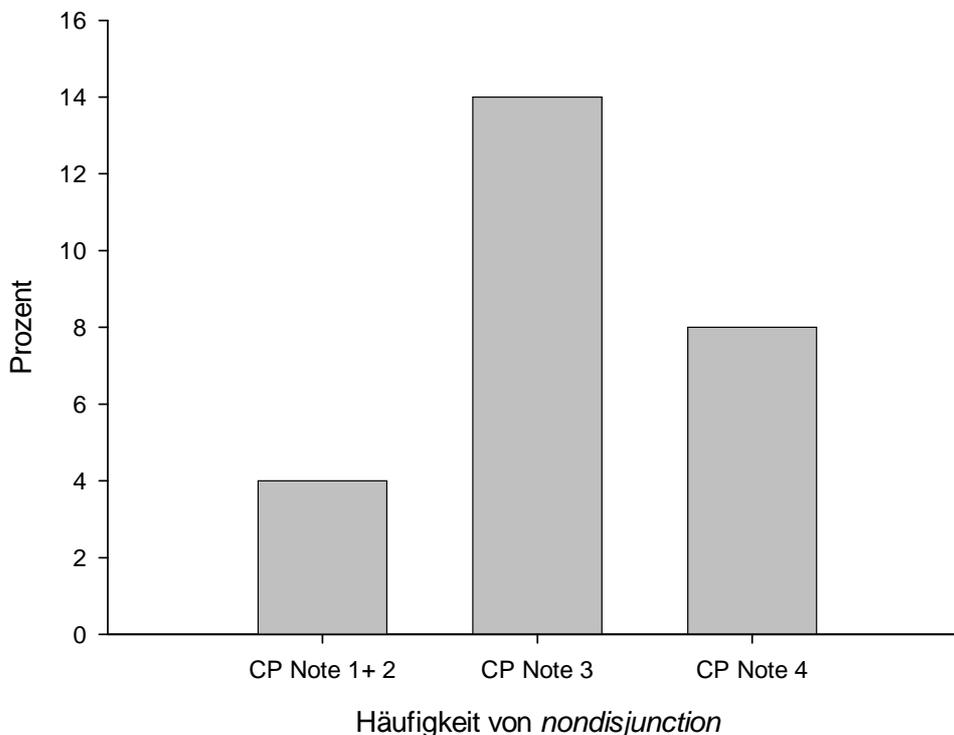
	PK- Note „1“	PK- Note „2“	PK- Note „3“	PK- Note „4“
ndj +	3,7% (1 von 27 EZ)	6,6% (1 von 15 EZ)	5,3% (1 von 19 EZ)	-
ndj -	7,4% (2 von 27 EZ)	-	5,3% (1 von 19 EZ)	11,1% (3 von 27 EZ)
ndj gesamt	11,1% (3 von 27 EZ)	6,6% (1 von 15 EZ)	10,6% (2 von 19 EZ)	11,1% (3 von 27 EZ)

Tab. 21: Aufschlüsselung der *Nondisjunction*- Ereignisse in ndj + und ndj - für die einzelnen Polkörpergruppen

V.3.5.2. *Nondisjunction* - Zytoplasma- Morphologie:

Wegen zu geringer Stichprobengröße wurden zur Darstellung der *Nondisjunction*-Ereignisse erneut die Zytoplasma- Noten „1“ und „2“ zusammengefasst.

Nondisjunction (ndj + oder ndj -) lag bei 3,8% (1 von 26 EZ) der mit Zytoplasma- Note „1“ oder „2“ bewerteten Eizellen vor. Die Häufigkeit in Zytoplasma- Gruppe „3“ betrug 14,0% (7 von 50 EZ), in Zytoplasma- Gruppe „4“ 8,3% (1 von 12 EZ) (s. Diagr. 12). Tab. 22 zeigt eine weitere Aufschlüsselung in *Nondisjunction* plus und minus. Statistisch signifikante Unterschiede für das Vorkommen von *Nondisjunction* bestanden zwischen den, nach morphologischen Kriterien eingeteilten Zytoplasmagruppen nicht ($p=0,570$).



Diagr. 12: Darstellung der *Nondisjunction*- Ereignisse gesamt (ndj + oder ndj -) in Bezug auf die Zytoplasmaqualität

	CP- Note „1“ oder „2“	CP- Note „3“	CP- Note „4“
ndj +	3,8% (1 von 26 EZ)	2,0% (1 von 50 EZ)	8,3% (1 von 12 EZ)
ndj -	-	12,0% (6 von 50 EZ)	-
ndj gesamt	3,8% (1 von 26 EZ)	14,0% (7 von 50 EZ)	8,3% (1 von 12 EZ)

Tab. 22: Aufschlüsselung der *Nondisjunction*- Ereignisse in ndj + und ndj - in Bezug auf die Zytoplasmaqualität

VI. Diskussion

VI.1. Methodik:

VI.1.1. Superovulation:

Die hormonelle Superovulation bietet eine bequeme und kostengünstige Möglichkeit zur Gewinnung einer großen Anzahl von Eizellen (Gates et al. 1981). Durch detaillierte Kenntnisse über den zeitlichen Ablauf der Reifestadien nach HCG- Gabe, der im Gegensatz zum natürlichen Zyklus der Mäuse nur geringe Schwankungen zwischen den Tieren eines Stammes aufweist, ist eine gute Versuchsplanung möglich.

Wie bei den meisten Säugetieren beenden Mäuseeizellen kurz vor der Ovulation die erste Reifeteilung, bleiben dann bis zur Fertilisation in der Meiose II arretiert und sind daher besonders für Chromosomenstudien geeignet (Donahue 1970).

Der Großteil der reifenden Eizellen ist 13 ½ Stunden nach HCG- Gabe ovuliert und nur wenige Eizellen sind zu diesem Zeitpunkt im Ovar zurückgeblieben (Edwards und Gates 1959).

Nachweislich führte ovarielle Stimulation jedoch bei Mäusen aufgrund verminderter Eizellqualität zu verzögerter Embryonalentwicklung, abnormaler Blastozystenformation und fetaler Wachstumsverzögerung (Van der Auwera und D`Hooghe 2001).

Auch wurde vermutet, dass bei menschlichen Eizellen Zytoplasmadysmorphie und die nachgewiesenen hohen Raten von Aneuploidien mit dem Protokoll der ovariellen Stimulation zusammenhängen könnten. Denn GV- Eizellen aus Antralfollikeln unstimulierter Ovarien, die *in vitro* reiften, wiesen mit 1- 3% vergleichsweise niedrige Aneuploidieraten auf und zeigten nur selten Zytoplasmaanomalien (Van Blerkom und Henry 1992). Im direkten Vergleich natürlich ovulierter und nach Superovulation gewonnener menschlicher Eizellen war jedoch keine signifikante Veränderung der Aneuploidieraten nachweisbar (Gras et al. 1992). Im Literaturvergleich unterschiedlicher Stimulationsprotokolle (CI/hMG: 29%, hMG und/oder FSH: 27,7%, GnRH a/hMG: 27,9%)

schien das Auftreten von Chromosomenanomalien der menschlichen Eizellen nicht zu differieren (Plachot 1997).

Bei Mäusen wurde bisher weder nach niedrigen (2IU PMSG / 1IU HCG; Gates et al. 1981), noch nach hohen Dosen (10 IU PMSG / 10 IU HCG; Hansmann und El-Nahass 1979) ein Einfluss auf die Aneuploidie- bzw. *Nondisjunction*rate beschrieben (Golbus 1981).

Bewertung:

Nach der gegenwärtigen Datenlage ist nicht auszuschließen, dass die exogenen Hormone die Aneuploidierate der weiblichen Keimzellen und möglicherweise auch die Morphologie des Eizellzytoplasmas beeinflussen.

VI.1.2. Fixierungstechnik:

Zur Fixierung von Eizellchromosomen wurden in der Vergangenheit verschiedene Methoden erprobt (Dyban 1983, Peters et al. 1997). Die wohl bekannteste „*Air-Drying Method for Chromosome Preparations from Mouse Eggs*“ (ADM; Tarkowski 1966) wurde bis zum Jahr 2004 in 45 verschiedenen Arbeiten mit insgesamt 5959 analysierten menschlichen Eizellen angewandt. Dagegen wurde mit der von Mikamo und Kamiguchi publizierten „*Gradual fixation- air drying method*“ (GFAD; Mikamo und Kamiguchi 1983) in 13 Studien mit insgesamt 3354 Eizellen gearbeitet (Rosenbusch 2004).

Bezüglich der Tarkowski-Fixierung (ADM) vermuteten viele Autoren eine Verfälschung der Hypohaploidie- und dadurch der Aneuploidierate durch artefiziellen Verlust von Chromosomen. Daher wurde das Vorkommen von Aneuploidien oft durch Verdopplung der Hyperhaploidierate abgeschätzt (Kamiguchi et al. 1993).

In Chromosomenpräparationen von Metaphase I-Eizellen war ein Vorkommen von Univalenten nach ADM deutlich häufiger zu beobachten als nach GFAD und wurde als Artefakt gewertet (Sugawara und Mikamo 1986).

Im direkten Vergleich mit früheren Studien ergab eine Fixierung von menschlichen Metaphase II-Eizellen eine Aneuploidierate von 26,1 +/- 11,7% (Hyperhaploidie 8,0 +/- 5,4%; Hypohaploidie 19,6 +/- 13,6%) nach ADM gegenüber 11,4% (Hyperhaploidie 4,3%; Hypohaploidie 5,9%) nach GFAD (Kamiguchi et al. 1993). Und auch Rosenbusch fand bei der Gegenüberstellung von Arbeiten mit weiblichen Keimzellen einen Unterschied der Aneuploidieraten von 25,8% nach ADM versus 12,7% nach GFAD und forderte für zukünftige Studien die Verwendung der Methode von Mikamo und Kamiguchi (Rosenbusch 2004).

Die in dieser Arbeit angewandte Fixierungstechnik stellt eine Modifikation der GFAD dar, die durch hohe Effizienz bei geringerem Zeitaufwand sowie durch gute Spreitung der Metaphasechromosomen vorteilhaft scheint (Chen 2002).

11 von 100 Präparaten, bei denen ein Chromosomenverlust durch die Fixierung zu vermuten war (Metaphase nicht „geschlossen“), wurden nicht in die Wertung einbezogen, um einer Verfälschung der Ergebnisse durch Fixierungsartefakte entgegenzuwirken.

VI.1.3. Fluoreszenz- in- situ- Hybridisierung:

Hintergrund:

Wegen der relativen Einfachheit der Methode und der Verfügbarkeit von zahlreichen DNA-Proben hat die FISH- Technik in den letzten Jahren weite Verbreitung gefunden. Bei menschlichen Eizellen verspricht die Methode eine bedeutende Verbesserung gegenüber der Karyotypisierung, da die Schwierigkeit der Chromosomenspreitung relativiert und die Auswertung von Chromosomenpräparaten schlechterer Qualität möglich wird, die in Karyotypisierungsstudien verworfen würden. Die parallele Polkörperanalyse kann zudem eine interne Kontrolle ermöglichen.

Die Inzidenz von Aneuploidien in FISH- Studien an menschlichen Eizellen zeigte bislang eine große Variabilität ähnlich wie in den, auf Karyotypisierung basierenden Untersuchungen. Als Ursachen werden von Pellestor et al. vor allem technische Aspekte, wie die besondere Morphologie von Metaphase II- Chromosomen, mit Überlagerung von Chromosomenbereichen und folglich FISH- Signalen vermutet. Auch spielen Fehler in der Zuordnung von Fluoreszenzsignalen zu einem Chromosom oder Chromatid ebenso eine Rolle wie schwache und artefizielle Signale. Ineffizienz oder Artefakte bei der Hybridisierung können insbesondere nicht ausgeschlossen werden, wenn nur ein einzelner Probentyp (z. B. *Centromer-* oder *Locus Specific-* Probe) pro Chromosom verwendet wird (Pellestor et al. 2005). Falsche Ergebnisse bei der FISH an menschlichen Eizellen wurden auf 10% (Dailey et al. 1996) bzw. 25,8% (Pujol et al. 2003) geschätzt.

Bewertung:

In dieser Arbeit war in einem Fall (1 von 100) ein Präparat wegen zu starker Signalgebung nicht verwertbar.

Eine Auswertung der FISH- Signale erfolgte in Anlehnung an die von Munne (Munne et al. 1995) und Dailey (Dailey et al. 1996) erarbeiteten Kriterien für *Balanced Predivision*, *Unbalanced Predivision* und *Nondisjunction* (siehe Kap. IV. 11.) nach Anwendung von zentromerspezifischen Proben bei menschlichen Chromosomen. Jedoch kann mit einer zentromerspezifischen FISH- Probe die Unterscheidung zwischen einem Chromosom, das

in Form zweier getrennter Einzelchromosomen vorliegt und einem überzähligen ganzen Chromosom erschwert sein, da in beiden Fällen ein Extrasignal auftritt (Alvin et al. 1997). Für diese Arbeit wurde daher eine Probe gewählt, die alle Regionen des Mäusechromosoms 16 markiert („*Total Mouse Chromosom DNA Probe, Chromosom 16*“). Von Dailey et al. wurde nach erfolgter FISH der menschlichen Chromosomen X, 13, 18 und 21 ein Fehlen von Chromosomen oder Chromatiden als artefizieller Verlust bewertet, wenn die Metaphasechromosomen zwar vollständig erschienen, jedoch der korrespondierende Polkörper fehlte (Dailey et al. 1996).

In dieser Arbeit konnten in den meisten Fällen nur die Metaphasechromosomen der Eizelle, nicht jedoch die Chromosomen des korrespondierenden Polkörpers ausgewertet werden. Dennoch wurde bei geschlossen wirkender Metaphase das Fehlen des Chromosoms 16 in der Eizelle als *Nondisjunction* minus und das Fehlen eines Chromatids 16 in der Eizelle als *Unbalanced Predivision* minus ausgelegt. In einigen (4 von 100) Präparaten konnte durch zusätzliche Auswertbarkeit der Polkörperchromosomen der Befund untermauert werden.

Es ist nicht auszuschließen, dass das Fehlen eines Signals, entstanden durch Chromosomenverluste während der Fixierung oder eine mangelhafte Bindung der FISH-Probe, fälschlicherweise als Aneuploidie gewertet wurde. Gegen die Verursachung durch den Verlust von Chromosomen oder Chromatiden während der Präparation spricht jedoch, dass überschüssiges Material des Chromosoms 16 vergleichsweise häufiger als fehlendes Chromosomenmaterial festgestellt werden konnte (s. Kap. V.2.3.).

Die Ergebnisse werden sicher auch durch die Subjektivität der Untersucher beeinflusst. Die Beurteilung der FISH- Präparate erfolgte daher anhand der oben definierten Kriterien durch zwei unabhängige Untersucher. In strittigen Fällen wurde danach ein Konsens gesucht.

VI.2. Qualitative Unterschiede der Eizellmorphologie:

Hintergrund:

In den letzten Jahren gab es zahlreiche Bestrebungen, morphologische Klassifikationskriterien für die Auswahl von menschlichen Eizellen im Rahmen der assistierten Befruchtung zu definieren. Denn während die meisten biochemischen Methoden zur Beurteilung von Eizellen für den Klinikalltag zu zeitaufwendig sind (Ebner et al. 2003), sind zytogenetische Methoden nicht mit dem Überleben der Zellen vereinbar (Coticchio et al. 2004).

Bei der konventionellen IVF ist die Sicht auf die Eizelle unmittelbar nach der Gewinnung durch die umgebenden Kumuluszellen eingeschränkt. So wurde nach einer Korrelation zwischen der Morphologie des Eizell- Kumuluszell- Komplexes (COC) und der Fertilisationsrate gesucht. Ein signifikanter Unterschied zwischen den COC- Klassen war nicht nachweisbar (Dubey et al. 1995). Auch andere Autoren bewerteten die Morphologie des COC als unzureichenden Marker für die Eizellqualität (Rattanachiyant et al. 1999, Benkhalifa und Menezo 1993).

Eine direkte Beurteilung der menschlichen Eizelle wurde erst mit Einführung der ICSI möglich, da bei ihr die Kumuluszellen enzymatisch und mechanisch entfernt werden und daher eine detailliertere Betrachtung der Eizellen erfolgen kann (Coticchio et al. 2004).

Verschiedene Arbeiten untersuchten seither den Vorhersagewert morphologischer Kriterien der menschlichen Eizelle auf den Erfolg der ICSI.

Den ersten Polkörper betreffend beobachteten Ebner et al. in der Gruppe der wohlgeformten, normalgroßen Polkörper gegenüber der Gruppe der fragmentierten Polkörper keinen Unterschied bezüglich der Fertilisationsrate nach ICSI, jedoch eine deutlich erhöhte Rate von Implantationen und Schwangerschaften (Ebner et al. 2002).

Dagegen wurde dem ersten Polkörper in anderen Studien jeglicher prediktive Wert abgestritten (Ciotti et al. 2004, Verlinsky et al. 2003).

Von Xia wurden Eizellen nach dem Status des ersten Polkörpers, der Weite des Perivitellinen Raums und dem Vorkommen zytoplasmatischer Einschlusskörper eingeteilt und ein Zusammenhang aller drei Faktoren zur Fertilisationsrate und Embryoqualität postuliert (Xia 1997).

Serhal et al. fanden eine von der Zytoplasmaqualität unabhängige Fertilisationsrate, jedoch war die Implantationsrate bei Eizellen mit exzessiver Granulierung oder Einschlusskörpern gegenüber Eizellen mit normalem Zytoplasma deutlich erniedrigt (Serhal et al. 1997).

De Sutter et al. konnten zwischen lichtmikroskopischen Zytoplasmakriterien, wie dunklen Einschlusskörperchen, dunkler Zona Pellucida oder weitem Perivitellinen Raum und den Kategorien Fertilisationsrate oder Embryoqualität keine Korrelation nachweisen (De Sutter et al. 1996). Die teilweise Widersprüchlichkeit der Ergebnisse ist wahrscheinlich auf die Unterschiede bei den angewandten morphologischen Kriterien zurückzuführen.

Polarisationsmikroskopisch scheinen sich Intensität und Uniformität der Doppelbrechung der inneren Zona Pellucida- Schicht als Auswahlkriterien zur Verbesserung der Schwangerschaftsrate bei ICSI zu eignen (Montag et al. 2006 (1), Shen et al. 2005).

In der Zusammenschau der verschiedenen Studien scheint die „normale“ menschliche Eizelle wie folgt definiert: Sie besitzt ein klares, einheitlich strukturiertes Zytoplasma mit feiner, homogener Granulierung, einen runden oder ovalen ersten Polkörper mit glatter Oberfläche und einen normalweiten Perivitellinen Raum.

Die zytoplasmatischen Anomalien beinhalten dunkle Färbung, Einschlusskörper sowie starke Granulierung des Zytoplasmas. Dabei kann die Granulierung entweder gleichmäßig das ganze Zytoplasma betreffen oder als dunkle Masse im Zentrum der Oozyte konzentriert sein. Zu den extrazytoplasmatischen Anomalien zählen Polkörper mit unregelmäßiger Oberfläche oder Fragmentierung und ein geweiteter Perivitelliner Raum (Mikkelsen und Lindenberg 2001).

Die Einteilung der Oocyten in Güteklassen erfolgte in dieser Arbeit in Anlehnung an die menschliche Eizelle, denn für die Maus existieren bisher keine entsprechenden Kriterien.

Nur in einer Arbeit wurden Polkörper von Mäuseeizellen mittels eines Testkits untersucht und in „Intakte“ und „Abgestorbene“ unterschieden. Dabei wiesen die „Intakten“ - den „guten Polkörpern“ des Menschen entsprechend - eine glatte Membran und ein klares Plasma auf, während „Abgestorbene“ ein granuliertes Plasma und eine unvollständige Membran besaßen (Wakayama und Yanagimachi 1998).

Bewertung:

Durch Beurteilung unter dem Invertmikroskop konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die bis zu diesem Zeitpunkt identischen Bedingungen ausgesetzten Eizellen sich deutlich in vorher definierten morphologischen Kriterien unterschieden.

95,3% (1221 von 1281) Eizellen waren anhand morphologischer Merkmale den Zytoplasmagruppen „1“ bis „4“ zuzuteilen (6,3% CP- Note „1“, 32,8% CP- Note „2“, 46,8% CP- Note „3“ und 14,1% CP- Note „4“).

51,8% (663 von 1281) „reife“ Metaphase II-Eizellen konnten bei vorhandenem Polkörper den Polkörperklassen „1“ bis „4“ zugeordnet werden (19,8% PK- Note „1“, 21,3% PK- Note „2“, 26,4% PK- Note „3“ und 31,4% PK- Note „4“).

Bei 43,5% (558 von 1281) der gewonnenen Mäuseeizellen war mikroskopisch kein erster Polkörper nachweisbar. In Anlehnung an die Definition bei menschlichen Metaphase II-Eizellen, die nur als reif gelten, wenn sie einen ersten Polkörper aufweisen (Wu 2000), wurden diese Zellen als „unreif“ eingestuft.

Bei 1,4% (8 von 558) der Eizellen ohne Polkörper konnte eine Vorwölbung des Zytoplasmas und eine Erhebung der Zellmembran beobachtet werden. Dieser Vorgang wurde als erstes Stadium der Polkörperformation bei Mäuseeizellen beschrieben (Zeilmaker et al. 1974).

In der Literatur wird für B6D2F1- Mäuse eine im Vergleich zum Menschen sehr schnell verlaufende Polkörperdegeneration beschrieben, wobei die meisten ersten Polkörper schon vor oder kurz nach der Ovulation degeneriert waren (Wakayama und Yanagimachi 1998). Eine vollständige Auflösung in den Perivitellinen Raum hinein wurde ebenfalls beobachtet (Donahue 1970). In einem IVF- Experiment an B6SJLF1/J- Mäusen wurde bewiesen, dass 40 von 45 Eizellen ohne sichtbaren Polkörper zu einer normalen Entwicklung zum 2- Zell- Embryo fähig waren bzw. 35 von 45 Eizellen ohne sichtbaren Polkörper sich zu Blastozysten weiterentwickelten. Dies wurde als Beweis interpretiert, dass diese Eizellen trotz des Fehlens eines Polkörpers reif waren (Neuber und Powers 2000).

Bei Kung- Ming- Mäusen erreichte der Anteil in vivo gereifter Eizellen mit vorhandenem ersten Polkörper 10 Stunden nach HCG- Gabe ein Maximum. Keiner der Polkörper war zu diesem Zeitpunkt degeneriert. 20 Stunden nach HCG wiesen dagegen nahezu 100% Degenerationszeichen auf und 32 Stunden nach HCG waren nur noch bei 9% der Eizellen erste Polkörper zu beobachten. Bei keinem der mehr als 3500 ersten Polkörper konnte eine spontane Teilung, wie nach dem alten Schema der Oogenese zu erwarten, beobachtet werden (Miao et al. 2004).

Möglicherweise kann diese schnelle Degeneration den großen Anteil (43,5%) von Eizellen ohne nachweisbaren ersten Polkörper in dieser Arbeit erklären. Zum Zeitpunkt der mikroskopischen Bewertung waren trotz sofortiger Präparation bereits 16 bis 17 Stunden seit der intraperitonealen HCG- Gabe vergangen. Viele dieser Eizellen sind daher wahrscheinlich nicht als „unreife“, sondern trotz des fehlenden Polkörpernachweises als „reife“ Metaphase II-Eizellen einzustufen, da zu vermuten ist, dass die erste Reifeteilung mit der Ausstoßung des ersten Polkörpers abgeschlossen wurde, dieser aber bis zum Untersuchungszeitpunkt vollständig degenerierte.

Bei 4,7% (60 von 1281) aller gewonnenen Eizellen zeigte sich nach Entfernung der Kumuluszellen eine vollständige Degeneration oder Fragmentierung sowohl des Zytoplasmas als auch des Polkörpers. In der Literatur werden diese morphologischen Merkmale als Zeichen eines apoptotischen Zelltods der Eizelle bewertet. Nach Eizellgewinnung 16 Stunden nach HCG wurden 5,2% dieser anomalen Eizellen beobachtet, wobei deren Anteil nach einer Kulturzeit von 32 bzw. 40 Stunden deutlich anstieg (9,7% bzw. 39,1%). Es scheint also ein programmierter Zelltod stattzufinden, wenn die Befruchtung der Eizelle innerhalb eines bestimmten Zeitraums nach Ovulation (Mensch 6 - 24 Stunden, Maus 8 Stunden) ausbleibt (Takase et al. 1995).

Laut Wu et al. stellt dabei die Schrumpfung und Kondensation des Zytoplasmas ein frühes Zeichen, die Fragmentierung der Zellen in „*apoptotic bodies*“ dagegen den Endpunkt der Apoptose dar (Wu et al. 2000).

Eine alternative Erklärung für die Zellfragmentierung könnte die von Edwards et al. postulierte parthenogenetische Aktivierung sein. Eine rudimentäre Entwicklung durch Parthenogenese kann stattfinden, wenn die Eizelle nicht befruchtet wird, sie aber dennoch einige Zellteilungen durchläuft (Edwards 1980). Takase et al. vermuteten jedoch, dass Parthenogenese und Apoptose verwandte Prozesse seien (Takase et al. 1995).

In einigen Versuchen dieser Arbeit wurden Eizellen beobachtet, die schon bei der Entnahme aus dem Eileiter frei von Kumuluszellen und außerhalb des Konglomerats aus Eizellen und umgebenden Kumuluszellen lokalisiert waren.

Diese Zellen wiesen stärkste Zeichen der Degeneration auf und wurden nicht in die Wertung eingeschlossen. Teilweise war lichtmikroskopisch nur noch die Zona pellucida nachweisbar. Aufgrund ihrer „Schattenhaftigkeit“ war das Auffinden der Zellen und somit eine zuverlässige Registrierung erschwert.

In der Literatur werden verschiedene Überlegungen zur Herkunft dieser Zellen angestellt. Edwards und Gates entdeckten diese Zellen bei 75% aller Mäuse nach hormoneller Stimulation. Sie nahmen an, dass diese unter den eigenen Hormonen der Weibchen gereift, später unter dem Einfluss des injizierten PMSG im Ovar degeneriert und schließlich nach HCG- Gabe ovuliert worden waren (Edwards und Gates 1959). Dagegen vermuteten sowohl Tarin et al. als auch Takase et al., dass die stark degenerierten Eizellen - durch die hormonelle Stimulation ausgelöst - aus zuvor atretisch gewordenen Follikeln ovuliert wurden (Tarin et al. 2001, Takase et al. 1995). Letztere Theorie wird unterstützt durch Beobachtungen am Ovar juveniler unstimulierter Mäuse. Hier wurden neben „atretischen“ Eizellen mit unregelmäßiger Form und grobkörnigem Zytoplasma und „fragmentierten“ Eizellen auch „*Ghost*“ - Eizellen entdeckt, bei denen nach Degeneration des Zytoplasmas nur noch die Zona pellucida sichtbar war (Weymarn et al. 1980).

Schlussfolgerung:

In dieser Arbeit konnte bei - unter identischen Versuchsbedingungen durch hormonelle Stimulation gewonnenen - Eizellen der B6D2F1- Maus ein deutlicher Unterschied bezüglich morphologischer Kriterien festgestellt werden. Unter dem Invertmikroskop konnten die gewonnenen Eizellen in morphologische Gruppen hinsichtlich Zytoplasma- und Polkörperqualität eingeteilt werden.

Bezüglich des Zytoplasmas wiesen die meisten Eizellen eine deutliche Granulierung und zunehmende Inhomogenität des Zytoplasmas auf (CP- Gruppen „2“ und „3“). Sowohl

Eizellen mit sehr hellem, kaum granuliertem Zytoplasma (CP- Gruppe „1“), als auch Eizellen mit Anzeichen zunehmender Degeneration (CP -Gruppe „4“) kamen dagegen seltener vor. Bei vollständig degenerierten und fragmentierten Eizellen war ein fortgeschrittener apoptotischer Zelltod zu vermuten. Teilweise konnten „schattenhafte“ Eizellen außerhalb des COC beobachtet werden, deren Herkunft nicht sicher erklärbar ist. Bei den gewonnenen Eizellen handelt es sich somit nicht um eine homogene Population. Die Auswertung des ersten Polkörpers ergab eine Häufung morphologischer Anzeichen zunehmender Degeneration.

Auffällig war, dass bei nahezu der Hälfte der Eizellen kein erster Polkörper vorlag. Vermutlich findet bei B6D2F1- Mäusen eine schnell voranschreitende Polkörperdegeneration statt, bis hin zur vollständigen Auflösung des Polkörpers wenige Stunden nach Gewinnung der Eizellen.

Das Kriterium „Vorhandensein des ersten Polkörpers“ zur Beurteilung der „Reife“ von Metaphase II-Eizellen erscheint für das B6D2F1- Modell deshalb unzureichend.

VI.3. Aneuploidie bei Eizellen der Maus:

Hintergrund:

Die Publikationen zur Häufigkeit chromosomaler Anomalien der Mäuseeizelle sind bezüglich der untersuchten Stämme und Entstehungsmechanismen inhomogen.

Insgesamt wurde bisher über eine geringe und kaum zwischen den Mäusestämmen differierende Aneuploidierate berichtet (Golbus 1981). Von Plachot et al. wird die Aneuploidierate für Mäuseeizellen mit 2,4% angegeben (Plachot 1997). Dabei findet *Nondisjunction* ebenso wie beim Menschen auch bei der Maus häufiger in der ersten als in der zweiten meiotischen Teilung statt (De Boer und Van der Hoeven 1980).

Oozyten von präpubertalen (3 - 4 Wochen), hormonell stimulierten C129F1- Weibchen zeigten mit 0 - 2% ein sehr geringes Hintergrundlevel von Hyperhaploidien (Gates et al. 1981). Bei 8 - 12 Wochen alten C3H/ Han-, NMRI/ Han- und (101xC3H) F1- Mäusen wurden *Nondisjunction*ereignisse bei weniger als 1% aller ovulierten Eizellen beobachtet (Hansmann und El- Nahass 1979).

Die Metaphase II-Eizellen von hormonell stimulierten ICR- Mäusen (6 - 12 Wochen) waren nur in 0,2% hyper- und in circa 7% hypohaploid (Mailhes et al. 1998).

Martin et al. beobachteten an Metaphase II-Eizellen nichtstimulierter CBA- Mäusen verschiedener Altersgruppen durchschnittlich bei 7,4% das Fehlen eines und bei 2,4% das Fehlen zweier Chromosomen. Bei 1,3% lag ein zusätzliches Chromosom vor, so dass als konservative Schätzung der *Nondisjunction*rate 2,6% angegeben wurden (Martin et al. 1976).

Nach Untersuchung von Embryonen 6 Monate alter C57B1/J6 x CBA/Ca- Hybridweibchen mittels Karyotypisierung wurden Hyperhaploidien weiblichen Ursprungs in 2,1% beschrieben (Santalo et al. 1992). Bei der Untersuchung an 1924 Feten von Labormäusen fielen in 1,6% chromosomale Anomalien auf, davon waren 23% autosomale Trisomien (Ford 1975). Jedoch wurde für die Maus - wie auch für den Menschen - ein Absterben von 15 - 50% der Embryonen während der Präimplantationsphase angegeben (Warner et al. 1998).

Die menschliche Eizelle weist dagegen eine deutlich höhere Frequenz chromosomaler Anomalien auf. So ergab die Analyse von 55 bis zum Jahr 2004 veröffentlichter Studien folgende Mittelwerte (Rosenbusch 2004): Hyperhaploidie 7,9% (0 - 26,9%), Hypohaploidie 12,0% (0 - 51,9%), Aneuploidie 19,9% (1,3 - 57,7%) bzw. nach konservativer Schätzung 15,8% (0 - 53,8%). Dabei entstammten die Eizellen fast ausschließlich einem Kollektiv von Frauen mit Fertilisationsstörungen, welches wiederum inhomogen zum Beispiel bezüglich der Indikation für assistierte Reproduktion und die Methode der ovariellen Stimulation war (Rosenbusch 2004).

Für das Chromosom 21 wurde bei, nach fehlgeschlagener Befruchtung mittels FISH untersuchten Eizellen eine Aneuploidierate von 22,7% beschrieben. Zusätzlich wurde bei 19,1% der Eizellen eine vorzeitige Chromatidentrennung registriert (Weier et al. 2004).

Bei einer Stichprobe von 56 Eizellen fertiler Frauen konnten chromosomale Anomalien dagegen nur in 3,6% nachgewiesen werden (Plachot 1997).

Selten wird der Mechanismus des „*Anaphase Lagging*“ für eine Hypohaploidie der Eizelle verantwortlich gemacht. Hierbei unterbleibt nach Trennung homologer Chromosomen während der Meiose I der Einschluss eines Chromosoms durch eine der neugebildeten Kernmembranen auf Grund einer Bewegungsverzögerung (Rosenbusch et al. 1992).

Klassischerweise wurde als Ursache für Fehlverteilungen der Chromosomen bzw. Chromatiden in der Meiose *Nondisjunction* angesehen. Als alternativer Mechanismus wurde von Angell die frühzeitige Zentromer- bzw. Chromatidentrennung in der Anaphase der ersten Reifeteilung beschrieben, die entweder - bei Beteiligung beider homologer Chromosomen - zu „*Balanced*“ oder - bei Beteiligung nur eines Homologen - zu „*Unbalanced*“ *Predivision* führen kann (siehe Kap. II.3.).

Grundlage für die frühzeitige Chromatidentrennung (*Predivision*) nach Angell ist ein Auftreten von Univalenten, das heißt ein Vorliegen der homologen Chromosomen in ungepaartem Zustand in der Prophase I, die in der Anaphase I entweder zufällig als ganze Chromosomen auf die Tochterzellen verteilt werden oder deren Schwesterchromatiden sich frühzeitig in der Anaphase I trennen und zu den Polen wandern (Angell et al. 1994).

Normalerweise liegen die homologen Chromosomen in gepaartem Zustand als Bivalente vor und die Einzelchromatiden trennen sich nicht vor der zweiten meiotischen Anaphase (Angell 1995).

Ein gehäuftes Vorkommen von Univalenten war schon 1968 von Henderson und Edwards bei Metaphase I-Eizellen von alten Mäuseweibchen beobachtet worden. Sie traten zusammen mit einer verminderten Frequenz von Chiasmata, das heißt von Bereichen in denen sich während der Prophase I die Chromatiden zweier homologer Chromosomen zum DNA- Austausch überkreuzen, auf (Henderson und Edwards 1968). Diese Beobachtung wurde in weiteren Publikationen bestätigt (Luthardt et al. 1973, Polani und Jagiello 1976).

Balanced Predivision wird von verschiedenen Autoren als Kulturartefakt eingestuft und nicht zu den Aneuploidien gezählt, während *Unbalanced Predivision* und klassische *Nondisjunction* als nebeneinander existierende Ereignisse bei der Entstehung numerischer Chromosomenanomalien akzeptiert werden.

Beim Menschen konnte in verschiedenen Studien eine Zunahme von *Balanced Predivision* aller analysierten Chromosomen in Abhängigkeit von der Kulturzeit beobachtet werden. Dagegen wurden *Nondisjunction* und *Unbalanced Predivision* auch nach mehr als 48 Stunden nicht signifikant häufiger beobachtet (Munne et al. 2000, Schmutzler et al. 2002 Dailey et al. 1996, Kamiguchi et al. 1993, Munne et al. 1995).

Ein Einfluss des postovulatorischen Alterns in vivo auf die Chromosomen der Metaphase II-Eizelle der Maus wurde bereits 1971 von Rodman in Form einer Trennung der Schwesterchromatiden beobachtet (Rodman 1971). Ebenfalls bei Mäuseeizellen konnte Mailhes einen Anstieg der vorzeitigen Zentromertrennung mit der Zeit nach HCG- Gabe nachweisen. Diese lag 25 Stunden nach HCG signifikant häufiger (23,5%) vor als 20 Stunden (13,1%) bzw. 15 (2,8%) Stunden nach HCG (Mailhes et al. 1998). Auch mittels FISH des Chromosoms 16 konnte bei Mäuseeizellen der Einfluß des postovulatorischen Alterns auf die *Balanced Predivision*- Rate belegt werden (Chen et al. 2006).

Das getrennte Vorliegen von Schwesterchromatiden, das als Kulturzeitartefakt beschrieben wurde, kann jedoch nicht mit dem von Angell postulierten Mechanismus der *Balanced Predivision* gleichgesetzt werden.

Bei Angell liegt der Ursprung der *Balanced Predivision* mit dem Auftreten der Univalenten in der Prophase I zeitlich deutlich vor der Ovulation und die Einzelchromatiden stammen von je einem der beiden homologen Chromosomen.

Dagegen entstehen die kulturbedingt beobachteten Einzelchromatiden erst in der ovulierten Metaphase II-Eizelle und stammen vom selben Chromosom.

Jedoch kann *Balanced Predivision* in beiden Fällen zu einer Fehlverteilung der Chromatiden in der zweiten meiotischen Teilung und damit zur Aneuploidie der Zygote führen.

Das Auftreten von *Balanced Predivision* in 11,4% der analysierten Eizellen in dieser Arbeit kann entweder nach Angells Mechanismus entstanden oder als Artefakt durch den zeitlichen Abstand zwischen HCG- Gabe und Fixierung bedingt sein. Eine Klärung dieser Frage ist mittels der hier angewandten FISH- Analyse nicht möglich.

Die Fixierung der Eizellen fand in diesem Versuchsaufbau circa 18 bis 20 Stunden nach HCG- Gabe statt. Zu diesem Zeitpunkt lag in der Studie von Mailhes (Mailhes et al. 1998) eine vorzeitige Zentromertrennung in circa 13% vor, was in der Größenordnung mit der hier nachgewiesenen Häufigkeit von *Balanced Predivision* übereinstimmt. Ein Zusammenhang mit der postovulatorischen Alterung der Eizellen ist somit wahrscheinlich.

Bewertung:

In dieser Arbeit wiesen 31,8% der Metaphase II-Eizellen der B6D2F1- Mäuse eine Fehlverteilung des Chromosoms 16 auf. Dabei lag *Balanced Predivision* bei 11,4% der Eizellen vor. *Unbalanced Predivision* und *Nondisjunction* traten in jeweils 10,2% auf.

Schlußfolgerung:

Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl *Nondisjunction* als auch *Unbalanced Predivision* an der Entstehung von Aneuploidien der Mäuseeizellen beteiligt sind. Das Auftreten von *Balanced Predivision* ist vermutlich - wie bereits bei menschlichen Eizellen bewiesen - teilweise ein Kulturartefakt.

Die Häufigkeit der nachgewiesenen Fehlverteilung des Chromosoms 16 in den Mäuseeizellen lag mit insgesamt 31,8% deutlich höher als bei Vergleichsdaten anderer Mäusestämmen. Diese wurden jedoch mit anderen Methoden als der Fluoreszenz- in- situ- Hybridisierung (FISH) gewonnen, wodurch vermutlich *Balanced* und *Unbalanced Predivision* nicht detektiert wurden. Die Größenordnung der in dieser Arbeit festgestellten chromosomalen Fehlverteilung ist eher mit menschlichen Eizellen vergleichbar.

VI.4. Korrelation von Morphologie und Chromosomenstatus:

Hintergrund:

Um die vollständige Entwicklungskapazität zu erlangen laufen im Zytoplasma der Eizelle weitgehend unabhängig von der Kernreifung verschiedenste Prozesse ab, die als Zytoplasmareifung bezeichnet werden. Während Wachstums- und Reifungsphase erlangt die Eizelle die Fähigkeit, die Meiose wiederaufzunehmen und zu vollenden, den

Befruchtungsprozeß erfolgreich zu durchlaufen sowie die präimplantative embryonale Entwicklung zu unterstützen und zu regulieren.

Dabei finden intrazelluläre Vorgänge wie mRNA- Transkription, Proteintranslation und -modifikation statt. Einige dieser Proteine (wie „*promoting factor*“ und „*mos*“) sind wiederum einbezogen in die meiotische Progression und Zellzykluskontrolle (Krisher 2004). Noch die Blastozystenformation bei der Maus ist abhängig von Eizelltranskripten die vor der Fertilisierung entstanden (Renard et al. 1994, De Sousa et al. 1998).

Kurz nach der Geburt finden sich im Mausovar tausende primäre Oozyten. Im Verlauf der Wachstumsphase nimmt der Durchmesser der Eizellen von 40 µm (Tag 3 - 5) auf circa 80 µm bei der adulten Maus (> 6 Wochen) zu und es kommt zu umfassenden Veränderungen im Zellmetabolismus. Währenddessen können elektronenmikroskopisch vor allem strukturelle und quantitative Veränderungen bei Mitochondrien, glattem endoplasmatischem Retikulum, Golgiapparat und Nukleolus beobachtet werden.

Während der gesamten Wachstumsphase der Eizelle ist die Kernreifung arretiert. Bei der Maus treten die Eizellen am Tag 5 post partum in das Dictyotän ein, in dem sie verharren, bis die Stimulation zur Wiederaufnahme der Meiose erfolgt. Bei der geschlechtsreifen Maus wird die erste meiotische Teilung erst in ausgereiften Eizellen der Graaf- Follikel kurz vor der Ovulation vollendet (Wassarman und Josefowicz 1978). Vermutlich wird die Fähigkeit, die Meiose fortzusetzen, erst ab einem Eizelldurchmesser von 60 µm (circa 14 Tage post partum) erreicht.

Hormonelle Stimulation ermöglicht zwar eine Synchronisation der Kohorte von Follikeln, im Gegensatz zu natürlichen Zyklen scheinen jedoch Kern- und Zytoplasmareifung der Eizellen nach ovarieller Stimulation asynchron abzulaufen (Sundstrom und Nilsson 1988). Vermutlich befinden sich diese zum Zeitpunkt der HCG- Gabe, durch die die Wiederaufnahme der Meiose induziert wird, in unterschiedlichen zytoplasmatischen Reifestadien.

Wahrscheinlich ist auch der von Hodges et al. am Mausmodell aufgezeigte „*Congression failure*“ eine Konsequenz aus parakrinen oder endokrinen Störungen während Eizellwachstum und -reifung, wodurch Transkription und posttranslationale Modifikation von mikrotubulären Motorproteinen beeinträchtigt werden. Als „*Congression failure*“ bezeichnete Hodges die Unfähigkeit der Eizelle, die Chromosomen locker am Äquator der Metaphase I- Spindel auszurichten. Eine kausale Beziehung zur meiotischer *Nondisjunction* wurde angenommen (Hodges et al. 2002).

Montag et al. beobachteten an menschlichen Eizellen polarisationsmikroskopisch die Dynamik des Spindelapparates. Die Spindelbrücke an der Verbindung Ooplasma-Polkörper verschwindet in der Telophase I der Meiose für circa 40 - 60 Minuten, um sich dann für die Meiose II erneut zu formieren.

Bei vorhandener Spindel wiesen die Eizellen bessere Fertilisationsraten nach ICSI auf, so dass dies für die Wahl des Zeitpunktes zur ICSI relevant scheint (Montag et al. 2006 (3)).

Van Blerkom konnte bei frischen, nicht inseminierten, menschlichen Eizellen eine Korrelation zwischen sieben definierten Zytoplasmamerkmalen und der Aneuploidierate nachweisen. Unterschieden wurde in „früh“ im Reifungsprozeß auftretende Abnormalitäten, zum Beispiel „dunkles, grobes Zytoplasma“, „ausgeprägte Vesikelbildung“ und „*organelle Clustering*“ und in „spät“ auftretende, geringfügigere Veränderungen. Dabei wiesen Eizellen mit „späten“ Zytoplasmaabnormalitäten mit durchschnittlich 5% signifikant weniger Aneuploidien auf als Eizellen mit „frühen“ Zytoplasmadysmorphien (38%).

Drei mögliche Wege der Aneuploidieentstehung wurden postuliert (Van Blerkom und Henry 1992):

- Eizellen, die eine ungestörte Zytoplasma- und Kernreifung durchlaufen haben, bei denen jedoch teilweise *Nondisjunction* oder „*Anaphase lagging*“ und möglicherweise auch frühzeitige Zentromertrennung in Aneuploidien resultieren. Nach Befruchtung bestimmen hier Typ und Schwere der Aberration die Entwicklungskapazität.
- Eizellen mit „späten“ Zytoplasmadefekten, bei denen die Aneuploidierate derer morphologisch normaler Eizellen entspricht, da diese Störungen vermutlich die Ausbildung der Metaphasespindel nicht beeinflussen. Diese Eizellen weisen häufig nach normaler Fertilisierung einen Entwicklungsstopp in der frühen Embryonalphase auf, der wahrscheinlich durch intrazelluläre Nekrose bedingt ist.
- Eizellen mit Störungen der Zytoplasmaorganisation aus „frühen“ Meiosestadien, die je nach Schweregrad die Struktur und Stabilität der Meiosespindel beeinflussen und zu Fehlern in der Chromosomenverteilung führen. Diese Eizellen weisen eine reduzierte Fertilisierbarkeit auf.

Dagegen konnte Glander keinen Zusammenhang zwischen Zytoplasmaqualität und chromosomaler Fehlverteilung menschlicher Eizellen nach Polkörperbiopsie und Auswertung der Chromosomen 13, 16, 18, 21 und 22 mittels FISH feststellen. Es korrelierten aber die biometrische Dicke der Zona Pellucida, die Größe des Perivitellinen Raumes und - anders als bei Verlinsky (Verlinsky et al. 2003) - auch der Fragmentierungsgrad des ersten Polkörpers mit der Aneuploidierate (Glander 2006).

Ebenfalls durch Polkörperdiagnostik wurde der Zusammenhang zwischen Aneuploidie der menschlichen Eizelle und der polarisationsmikroskopischen Qualität der Zona pellucida sowie der Spindelpräsenz untersucht. Obwohl beide Parameter mit der Schwangerschaftsrate korrelieren, konnte eine Relation mit einer Fehlverteilung der Chromosomen 13, 16, 18, 21 und 22 in der Eizelle nicht nachgewiesen werden (Montag et al. 2006 (1), Montag et al. 2006 (2)).

Aufgrund der vorhergehenden Ausführungen liegt die Vermutung nahe, dass die Asynchronie zwischen Kern- und Zytoplasmareifung zu einer Dysfunktion in der Fortsetzung der Meiose führen kann und somit zu chromosomalen Fehlverteilungen. So wäre ein Zusammenhang zwischen Zytoplasma- und Polkörpermorphologie und Aneuploidien zu erklären.

Von Eizellen mit intaktem Polkörper und normalweitem Perivitellinem Raum wird angenommen, dass sie die am besten synchronisierte Gruppe bezüglich Kern- und Zytoplasmareifung sind (Xia 1997). Es konnte nachgewiesen werden, dass Eizellen mit solchen Polkörpern signifikant höhere Fertilisationsraten und bessere Embryoqualität aufwiesen. Dagegen zeigten Oozyten mit sehr großen Polkörper und weitem Perivitellinem Raum beim Menschen eine reduzierte Fertilisationsrate und Embryoqualität und waren zu 100% assoziiert mit multiplen morphologischen Zytoplasmaanomalien (Ebner et al. 2000). Ähnliche Untersuchungsergebnisse an Mäuseeizellen liegen bisher nicht vor.

Bewertung:

Anhand lichtmikroskopischer Kriterien für Polkörper- oder Zytoplasmaqualität war bezüglich Chromosom 16 eine Unterscheidung zwischen „gesunden“ und „aneuploiden“ Mäuseeizellen nicht möglich. Dabei wurde mittels FISH das Vorliegen von *Nondisjunction*, *Unbalanced Predivision* und *Balanced Predivision* untersucht.

Schlussfolgerung:

Morphologische Qualitätsmerkmale, die für die Vorauswahl von Eizellen im Rahmen der ICSI verwertbar wären, konnten nicht gefunden werden.

Es zeichnete sich jedoch - wenn auch nicht statistisch signifikant - eine Tendenz im Vorkommen von Chromosom 16- Anomalien in Bezug auf die Polkörpermorphologie ab. Anders als bei der Einteilung der Polkörper nach morphologischen Aspekten in „gut“ (Polkörper groß, glatt begrenzt und homogen) und „schlecht“ (Polkörper klein, unregelmäßig begrenzt und inhomogen) erwartet, scheint nach Auswertung des Chromosomenstatus eine Fehlverteilung des Chromosoms 16 häufiger in den Gruppen „1“ und „2“ (große Polkörper) als in den Polkörper- Gruppen „3“ und „4“ vorzukommen.

Wahrscheinlich muss daher die Bewertung revidiert und Eizellen mit kleinen, Zeichen morphologischer Degeneration aufweisenden, Polkörpern als „gesünder“ angesehen werden. Dies würde durch die Einschätzung Ebners zum schlechteren Entwicklungspotential von menschlichen Eizellen mit sehr großem Polkörper unterstützt (Ebner et al. 2000). Bezüglich der Zytoplasmaqualität konnte keine ähnliche Tendenz dargestellt werden.

VI.5. Eignung des B6D2F1- Maus- Modells:

Bei allen Studien an menschlichen Eizellen ist zu beachten, dass diese von Frauen stammen, die den Versuch einer künstlichen Befruchtung unternommen haben. Ob für die Fertilitätsstörung männliche oder weibliche Faktoren ursächlich waren, wird zumeist nicht differenziert (Rosenbusch 2004).

Bei zytogenetischen Untersuchungen kommt hinzu, dass diese nur an Eizellen durchgeführt werden können, die entweder überschüssig oder sicher unbefruchtet geblieben sind. Somit müssen nach IVF oder ICSI mindestens 48 Stunden vergehen, bevor die nicht befruchteten Eizellen fixiert werden dürfen (Eckel et al. 2001).

Im Hinblick auf moralische, ethische und rechtliche Aspekte sowie die begrenzte Verfügbarkeit menschlicher Eizellen für die Forschung, ist ein Tiermodell von unschätzbarem Wert. Im Bereich der künstlichen Befruchtung ist die Nutzung des Mausmodells daher weit verbreitet (Neuber und Powers 2000).

Beim B6D2F1- Mausmodell zeigten in dieser Arbeit Art (*Nondisjunction, Unbalanced und Balanced Predivision*) und Häufigkeit chromosomaler Fehlverteilungen Übereinstimmungen mit den menschlichen, an IVF- Kollektiven gewonnenen Daten. Eine auffällige Diskrepanz bestand dagegen zu den Angaben über Aneuploidien bei Eizellen anderer Mäusestämmen [C129F1, C3H/ Han, NMRI/ Han, (101xC3H)F1, ICR, CBA] (siehe Kap. VI. 3.). Hierfür wäre eine durch die Art der hormonellen Stimulation bedingte Asynchronität von Kern- und Zytoplasmareifung eine mögliche Erklärung (siehe Kap. VI. 4.). Das Hintergrundlevel von Aneuploidien bei Eizellen unstimulierter B6D2F1- Weibchen ist nicht bekannt.

Eine weitere Erklärung könnte die genauere Detektion chromosomaler Fehlverteilungen durch die hier angewandte FISH im Gegensatz zur Karyotypisierung sein.

Chromosomale Verteilungsstörungen kamen in dieser Arbeit tendenziell häufiger bei sehr großen Polkörpern vor. Bei menschlichen Eizellen wurden sehr große Polkörper als Hinweis für eine verminderte Entwicklungskapazität eingestuft (Ebner et al. 2000). Beim Vergleich der Polkörpermorphologie von Mensch und Maus muss jedoch die schnelle Degeneration der Polkörper bei der B6D2F1- Maus berücksichtigt werden (siehe Kap. VI. 2.). Auch sollte die Anwendbarkeit der für menschliche Metaphase II-Eizellen definierten Reifekriterien (nur Eizellen mit vorhandenem erstem Polkörper werden als reife Metaphase II- Eizellen bewertet) für die Maus kritisch beurteilt werden. Unter Anwendung dieser Kriterien waren 43,5% der in dieser Arbeit gewonnenen Eizellen als „unreif“ einzustufen. Aufschluss über den vorliegenden Chromosomensatz könnte die FISH von Eizellen ohne vorhandenen ersten Polkörper bringen. Beweisend wäre ein hoher Anteil von Eizellen mit haploidem Chromosomensatz und somit abgeschlossener erster Reifeteilung.

VI. 6. Ausblick:

Die Möglichkeiten zur Auswahl von Eizellen für die Weiterkultivierung im Rahmen der ICSI werden seit Jahren untersucht. Vor allem die Überprüfung des genetischen Materials der Eizelle mittels Polkörperdiagnostik hat sich etabliert.

Mit vielversprechenden Verfahren wie der Polarisationsmikroskopie der Zona pellucida oder der biometrischen Beurteilung von Eizellen wird bereits die „invasive“ Diagnostik ergänzt. Die Entwicklung einfacher morphologischer Kriterien zur qualitativen Beurteilung des Zytoplasmas und des Polkörpers, bestätigt durch eine nachgewiesene Korrelation zu chromosomalen Fehlverteilungen, erscheint als zusätzlicher Baustein sinnvoll.

Das Ziel sollte eine möglichst schonende Beurteilung der menschlichen Eizellen sein, um deren Entwicklungspotential nicht zu beeinträchtigen.

Die Eizellen der Maus stellen für die Entwicklung solcher Kriterien scheinbar ein geeignetes Modell dar, insbesondere da in dieser Arbeit hinsichtlich Qualität und Quantität chromosomaler Fehlverteilungen Parallelen zum Menschen belegt werden konnten.

In dieser Arbeit konnte keine Korrelation zwischen Morphologie und Aneuploidie der Eizellen der Maus nachgewiesen werden, jedoch erfolgte die Fluoreszenz- in- situ- Hybridisierung nur eines der 20 Chromosomenpaare der Maus. Eine Untersuchung weiterer Chromosomen könnte daher aufschlussreich sein.

VII. Zusammenfassung

Einleitung und Fragestellung:

Vor dem Hintergrund der ICSI ist die Erarbeitung von morphologischen Bewertungskriterien zur Auswahl der Eizellen mit dem besten Entwicklungspotential hilfreich. Wegen der Verfügbarkeit großer Mengen frischer Eizellen ist das Modell der Maus geeignet.

Im ersten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob die gewonnenen Eizellen unter dem Lichtmikroskop anhand morphologischer Zytoplasma- und Polkörperkriterien unterschieden und in Qualitätsklassen eingeteilt werden können.

Im zweiten Teil wurden die Mäuseeizellen mittels FISH auf das Vorkommen der während der menschlichen Meiose auftretenden chromosomalen Verteilungsstörungen *Nondisjunction*, *Unbalanced Predivision* und *Balanced Predivision* überprüft. Beispielhaft wurde das Chromosom 16 der Maus gewählt, für das in weiten Bereichen eine Übereinstimmung mit dem menschlichen Chromosom 21 besteht.

Der dritte Teil war dem Zusammenhang zwischen den erarbeiteten morphologischen Qualitätskriterien der Mäuseeizelle und dem Vorliegen einer chromosomalen Fehlverteilung gewidmet.

Material und Methode:

Geschlechtsreife weibliche B6D2F1- Mäuse wurden durch Gabe von PMSG und HCG hormonell stimuliert. Nach Präparation erfolgte die Bewertung der kumulusfreien Eizellen unter dem Invertmikroskop. 100 ausgewählte Eizellen wurden nach einem modifizierten Protokoll der „*Gradual- fixation air drying technique*“ fixiert. Die Fluoreszenz- in- situ- Hybridisierung wurde mit einer Rhodamin- markierten Probe- DNA für das gesamte Chromosom 16 der Maus durchgeführt. Es folgte die Aufnahme mit einer CCD- Kamera und die weitere Bearbeitung mit dem *ISIS- Software*- Programm.

Ergebnisse:

Von 43 Mäusen wurden insgesamt 1281 Eizellen gewonnen. 95,3% (1221 Eizellen) konnten anhand definierter morphologischer Merkmale bewertet werden, 4,7% (60 Eizellen) waren dagegen vollständig degeneriert oder fragmentiert. Bei 43,5% aller Eizellen lag kein erster Polkörper vor, weshalb diese definitionsgemäß als unreif eingestuft

wurden. Bei 663 Eizellen mit vorhandenem Polkörper war dieser in 19,8% groß, rund oder oval, mit glatter Oberfläche (Note „1“), in 21,3% groß, rund oder oval, mit eingezogener Oberfläche (Note „2“), in 26,4% klein, noch massiv, mit unregelmäßiger Oberfläche (Note „3“) und in 31,4% klein und sichelförmig (Note „4“).

Das Zytoplasma der 1221 weiter auswertbaren Eizellen war in 6,3% hell, homogen und feingranuliert (Note „1“), in 32,8% hell, jedoch gröber granuliert (Note „2“), in 46,8% dunkel, inhomogen und grobgranuliert (Note „3“), und in 14,1% dunkel, „geschrumpft“, mit netzartiger Struktur (Note „4“).

Von 88 nach FISH auswertbaren Präparaten wiesen insgesamt 31,8% eine Anomalie des Chromosoms 16 auf. *Nondisjunction* und *Unbalanced Predivision* lagen bei jeweils 10,2% und *Balanced Predivision* bei 11,4% der 88 Eizellen vor.

Weder bezüglich der Polkörper- noch der Zytoplasmaqualität konnten statistisch signifikante Unterschiede im Vorkommen von Chromosomenanomalien nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung:

Die nach Superovulation gewonnenen Eizellen der Maus weisen deutliche Unterschiede in der Beschaffenheit von Polkörper und Zytoplasma auf und lassen sich anhand morphologischer Kriterien verschiedenen Qualitätsklassen zuordnen. Am Beispiel des Chromosoms 16 konnte - wie beim Menschen - auch bei der Mäuseeizelle das Vorkommen von *Nondisjunction*, *Unbalanced Predivision* und *Balanced Predivision* in einer entsprechenden Größenordnung belegt werden.

Eine Korrelation zwischen morphologischen Qualitätskriterien der Mäuseeizelle und chromosomalen Fehlverteilungen konnte - das Chromosom 16 betreffend - nicht bewiesen werden, jedoch schienen diese häufiger bei Eizellen mit großen Polkörpern vorzukommen.

VIII. Literaturverzeichnis

Alvin ST, Lim BS, Maurine FH, Tsakok MD (1997): Age- related decline in fertility: a link to degenerative oocytes? *Fertil Steril*, 68(2), 265-271

Angell R (1997): First-meiotic-division nondisjunction in human oocytes. *Am J Hum Genet*, 61, 23-32

Angell R (1995): Mechanism of chromosome nondisjunction in human oocytes. In: Wiley-Liss, Inc. (Hrsg.) *Etiology and Pathogenesis of Down Syndrome*, 13-26, New York

Angell RR, Xian J, Keith J, Ledger W, Baird DT (1994): First meiotic division abnormalities in human oocytes: mechanism of trisomy formation. *Cytogenet Cell Genet*, 65, 194-202

Benkhalifa M, Menezo Y (1993): Gamete and Embryo Quality: Role in fertilization failures and reproductive pathology: the contribution of Fluorescent in Situ Hybridization (FISH). http://www.gfmer.ch/Books/Reproductive_health/gamete_and_embryo_quality.html

Benkhalifa M, Kahraman S, Caserta D, Domez E, Qumsiyeh MB (2003): Morphological and cytogenetic analysis of intact oocytes and blocked zygotes. *Prenat Diagn*, 23, 397-404

Benzacken B, Bergere M, Hugues JN, Martin- Pont B, Selva J, Wolf JP (1998): Chromosome 21 detection in human oocyte fluorescence in situ hybridization: possible effect of maternal age. *J Assist Reprod Genet*, 15(3), 105-110

Bundesärztekammer (2006): (Muster-) Richtlinie zur Durchführung der assistierten Reproduktion -Novelle 2006. *Dt Ärztebl*, 103(20), B-1188-1199

Cabin DE, McKee-Johnson JW, Matesic LE, Wiltshire T, Rue EE, Mjaatvedt AE, Huo YK, Korenberg JR, Reeves RH (1998): Physical and comparative mapping of distal mouse chromosome 16. *Genome Research*, 8(9), 940-950

Chen W (2002): Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of unfertilized human oocytes after in vitro fertilization (IVF). *Med. Diss.*, Kiel

- Chen W, Liu Q, Li Z, Wang XR, Zhu GI (2006): Influence of postovulatory ageing on balanced predivision of sister chromatid in mouse oocytes. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 23(3), 256-259
- Ciotti PM, Notarangelo L, Morselli-Labate AM, Felletti V, Porcu E, Venturoli S (2004): First polar body morphology before ICSI is not related to embryo quality or pregnancy rate. *Hum Reprod*, 19(10), 2334-2339
- Coticchio G, Sereni E, Serrao L, Mazzone S, Iadarola I, Borini A (2004): What criteria for the definition of oocyte quality? *Ann N Y Acad Sci*, 1034, 132-144
- Cremer T, Jauch A, Ried T, Schröck E, Lengauer C, Cremer M, Speicher MR (1995): Fluoreszenz in situ Hybridisierung. *Dt Arztebl*, 92 (22), A-1593-1601
- Cupisti S, Conn CM, Fragouli E, Whalley K, Mills JA, Faed MJW, Delhanty JDA (2003): Sequential FISH analysis of oocytes and polar bodies reveals aneuploidy mechanisms. *Prenat Diagn*, 23, 663-668
- Dailey T, Dale B, Cohen J, Munne S (1996): Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes. *Am J Hum Genet*, 59(1), 176-184
- De Boer P, Van Der Hoeven FA (1980): The use of translocation-derived "marker bivalents" for studying the origin of meiotic instability in female mice. *Cytogenet Cell Genet*, 26, 49-58
- De Sousa PA, Caveney A, Westhusin ME, Watson AJ (1998): Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenic factors. *Theriogenology*, 49, 115-128
- De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M (1996): Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 11, 595-597
- Diedrich K, Holzgreve W, Jonat W, Schneider KT, Weiss JM (2000): *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 1. Aufl., Springer, Berlin

Donahue RP (1970): Maturation of the mouse oocyte in vitro. II. Anomalies of first polar body formation. *Cytogenet*, 9, 106-115

Down JLH (1866): Observation on an ethnic classification of idiots. *London Hosp. Clin. Lect.*, 3, 259

Drews U (1993): *Taschenatlas der Embryologie*. 1. Aufl., Thieme, Stuttgart

Dubey AK, Wang HA, Duffy P, Penzias AS (1995) : The correlation between follicular measurements, oocyte morphology and fertilization rates in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril*, 64(4), 787-790

Dyban AP (1983): An improved method for chromosome preparations from preimplantation mammalian embryos, oocytes or isolated blastomeres. *Stain Technol*, 58(2), 69-72

Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G (2003): Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum Reprod Update*, 9, 251-262

Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Yaman C, Pfeleger U, Tews G (2002): First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum Reprod*, 17(9), 2415-2418

Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G (2000): Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 15(2), 427-430

Ebner T, Moser M, Yaman C, Feichtinger O, Hartl J, Tews G (1999): Elective transfer of embryos selected on the basis of first polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy. *Fertil Steril*, 72(4), 599-603

Eckel H, Kleinstein J, Wieacker P, Stumm M (2001): Die zytogenetische Analyse von nicht fertilisierten Oozyten - Möglichkeiten und Grenzen. *J Med Genet*, 13, 25-30

Edwards RG (1980): Fertilization. In: Academic Press (Hrsg.) *Conception in the human female*, 573-667, London

Edwards RG, Gates AH (1959): Timing of the stages of the maturation divisions, ovulation, fertilization and the first cleavage of eggs of adult mice treated with gonadotrophins. *J Endocrinol*, 18, 292-304

Felberbaum R (2004): Fortpflanzungsmedizin: Methoden der assistierten Reproduktion werden sicherer. *Dt Ärztebl*, 101(3), 95-100

Ford CE (1975): Quoted in Medical Research Council Annual Report 1974-75. Her Majesty's Stationery Office, 107-108, London

Galdzicki Z, Siarey RJ (2003): Understanding mental retardation in Down's syndrome using trisomy 16 mouse models. *Genes, Brain and Behavior*, 2, 167-178

Gates AH, Donaldson CH, Levy MD (1981): Oocyte aneuploidy screening using superovulating prepubertal mice: Effect of Methotrexate. *Teratology*, 24, 321-327

Glander M (2006): Molekularzytogenetische Analyse menschlicher Polkörper zur Präimplantationsdiagnostik. Dissertation Mathematisch- Naturwissenschaftliche Fakultät, Kiel

Golbus MS (1981): The influence of strain, maternal age and method of maturation on mouse oocyte aneuploidy. *Cytogenet Cell Genet*, 31(2), 84-90

Gras L, McBain J, Trounson A, Kola I (1992): The incidence of chromosomal aneuploidy in stimulated and unstimulated (natural) uninseminated human oocytes. *Hum Reprod*, 7, 1396-1401

Grüneberg H (1943): *The genetics of the mouse*. 1. Aufl., University Press, Cambridge

Hansmann I, El-Nahass E (1979): Incidence of nondisjunction in mouse oocytes. *Cytogenet Cell Genet*, 24, 115-121

Henderson SA, Edwards RG (1968): Chiasma frequency and maternal age in mammals. *Nature*, 218, 22-28

Hodges CA, Ilagan A, Jennings D, Keri R, Nilson J, Hunt PA (2002): Experimental evidence that changes in oocyte growth influence meiotic chromosome segregation. *Hum Reprod*, 17(5), 1171-1180

Hook EB (1978): Spontaneous deaths of fetuses with chromosomal abnormalities diagnosed prenatally. *N Engl J Med*, 299(19), 1036-1038

Kamiguchi Y, Rosenbusch B, Sterzik K, Mikamo K (1993): Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes prepared by a gradual fixation- air drying method. *Hum Genet*, 90, 533-541

Kentenich H (2000): Profitiert das kinderlose Paar vom Fortschritt? *Berichtsband 53. Kongress der DGGG: 70-76*

Krisher RL (2004): The effect of oocyte quality on development. *J. Anim. Sci.*, 82, 14-23

Kuliev A, Verlinsky Y (2004): Meiotic and mitotic nondisjunction: lessons from preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod Update*, 10(5), 401-407

Lejeune J, Gautier M, Turpin R (1959): Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *C. R. Acad. Sci.*, 248, 1721-1722

Luthardt FW, Palmer CG, Yu PL (1973): Chiasma and univalent frequencies in aging female mice. *Cytogenet Cell Genet*, 12, 68-79

Mahmood R, Brierley CH, Faed MJW, Mills JA, Delhanty JDA (2000): Mechanisms of maternal aneuploidy: FISH analysis of oocytes and polar bodies in patients undergoing assisted conception. *Hum Genet*, 106, 620-626

Mailhes JB, Young D, London SN (1998) : Postovulatory ageing of mouse oocytes in vivo and premature centromere separation and aneuploidy. *Biol Reprod*, 58, 1206-1210

Martin RH, Dill FJ, Miller JR (1976): Nondisjunction in aging female mice. *Cytogenet Cell Genet*, 17(3), 150-160

Miao Y, Ma S, Liu X, Miao D, Chang Z, Luo M, Tan J (2004): Fate of the first polar bodies in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev*, 69, 66-76

Mikamo K, Kamiguchi Y (1983): A new assessment system for chromosomal mutagenicity using oocytes and early zygotes of the Chinese hamster. In: Ishihara T, Sasaki MS (Hrsg.): Radiation- induced chromosome damage in man. 411-432, Alan R. Liss, New York

Mikkelsen AL, Lindenberg S (2001): Morphology of in-vitro matured oocytes: impact on fertility potential and embryo quality. Hum Reprod, 16(8), 1714-1718

Montag M, Schimming T, Gassner P, van der Ven H (2006) (1): Oocyte zona birefringence is associated with embryonic implantation potential. Hum Reprod, 21 Suppl.1, i67

Montag M, Schimming T, Isachenko E, van der Ven K, van der Ven H (2006) (2): Prädiktiver Wert der Zona- Lichtbrechung als Indikator für Chromosomen- Fehlverteilungen in menschlichen Eizellen. Programm XX. Jahrestreffen der deutschen IVF- Zentren, Abstract / Poster P10

Montag M, Schimming T, van der Ven H (2006) (3): Spindle imaging in human oocytes: the impact of the meiotic cell cycle. RBM Online, 12(4), 442-446

Muller F, Rebiffe M, Taillandier A, Oury JF, Mornet E (2000): Parental origin of the extra chromosome in prenatally diagnosed fetal trisomy 21. Hum Genet, 106, 340-344

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, 582-586

Munne S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J, Cohen J (1995): The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. Hum Reprod, 10(4), 1014-1020

Murken J, Cleve H (1994): Humangenetik. 5. Aufl., Enke, Stuttgart

Neuber E, Powers RD (2000): Is the mouse a clinically relevant model for human fertilization failures? Hum Reprod, 15(1), 171-174

Opitz JM (1991): Developmental abnormalities in humans. Monatsschr Kinderheilkd., 139(5), 259-272

Pellestor F, Anahory T, Hamamah S (2005): The chromosomal analysis of human oocytes. An overview over established procedures. *Hum Reprod Update*, 11(1), 15-32

Pellestor F (1991): Frequency and distribution of aneuploidy in human female gametes. *Hum Genet*, 86, 283-288

Peters AH, Plug AW, van Vugt MJ, de Boer P (1997): A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosome Res.*, 5(1), 66-68

Plachot M (1997): The human oocyte. Genetic aspects. *Ann Genet*, 40(2), 115-120

Plachot M, Veiga A, Montagut J, DeGrouchy J, Calderon G, Lepretre S, Junca AM, Santalo A, Carles E, Mandelbaum J, Barri P, Degoy J, Cohen J, Egozcue J, Sabatier JC, Salat-Baroux J (1988): Are clinical and biological IVF parameters correlated with chromosomal disorders in early life: A multicentric study. *Hum Reprod*, 3, 627

Polani PE, Jagiello GM (1976): Chiasmata, meiotic univalents and age in relation to aneuploid imbalance in mice. *Cytogenet Cell Genet*, 16, 505-529

Pujol A, Boiso I, Benet J, Veiga A, Durban M, Campillo M, Egozcue J, Navarro J (2003): Analysis of nine chromosome probes in first polar bodies and metaphase II oocytes for the detection of aneuploidies. *Eur J Hum Genet*, 11, 325-336

Rattanachayanont M, Leader A, Leveille MC (1999): Lack of correlation between oocyte-corona-cumulus complex morphology and nuclear maturity of oocytes collected in stimulated cycles for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 71, 937-940

Renard JP, Baldacci P, Richoux- Duranthon V, Pournin S, Babinet C (1994): A maternal factor affecting mouse blastocyst formation. *Development*, 120, 797-802

Rieckmann O (1998): Einfluß und Beeinflussung der Eizellmorphologie bei der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI). *Med. Diss., Bonn*

Rodman TC (1971): Chromatid disjunction in unfertilized ageing oocytes. *Nature*, 233, 191-193

Rosenbusch B (2004): Aneuploidie in menschlichen Eizellen. *J Fertil Reprod*, 14(3), 7-12

Rosenbusch B, Sterzik K, Sasse V, Djalali M, Lauritzen C (1992): Art und Häufigkeit zytogenetischer Anomalien in unbefruchtet oder ungeteilt gebliebenen menschlichen Eizellen im Rahmen der In- vitro- Fertilisation. *Zentralblatt für Gynäkologie*, 114, 181-185

Sandalinas M, Marquez C, Munne S (2002): Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes. *Mol Hum Reprod*, 8(6), 580-585

Santalo J, Badenas J, Calafell JM, Catala V, Munne S, Egozcue J, Estop AM (1992): The genetic risks of in vitro fertilization techniques: The use of an animal model. *J Assisted Reproduction and Genetics*, 9(5), 462-474

Schmidt-Matthiesen H, Hepp H (1998): *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 9.Aufl., Schattauer, Stuttgart

Schmutzler AG, Chen W, Weimer J, Mettler L, Jonat W, Arnold N (2002): Mechanisms of aneuploidies in human oocytes. Fourth International Symposium on Preimplantation Genetics, Abstract O-25

Schreinemachers DM, Cross PK, Hook EB (1982): Rates of trisomies 21, 18, 13 and other chromosome abnormalities in about 20 000 prenatal studies compared with estimated rates in live births. *Hum Genet*, 61, 318-324

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), 1267-1270

Shen Y, Stalf T, Mehnert C, Eichenlaub- Ritter U, Tinneberg HR (2005): High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles. *Hum Reprod*, 20, 1596-1606

Silver LM (1995): *Mouse Genetics. Concepts and Applications*. University Press, Oxford

Sugawara S, Mikamo K (1986): Maternal ageing and nondisjunction: a comparative study of two chromosomal techniques on the formation of univalents in first meiotic metaphase oocytes of the mouse. *Chromosoma*, 93, 321-325

Sundstrom P, Nilsson BO (1988): Meiotic and cytoplasmic maturation of oocytes collected in stimulated cycles is asynchronous. *Hum Reprod*, 3, 613-619

Takase K, Ishikawa M, Hoshiai H (1995): Apoptosis in the degeneration process of unfertilized mouse ova. *Tohoku J Exp Med*, 175, 69-76

Tarin JJ, Perez- Albala S, Cano A (2001): Cellular and morphological traits of oocytes retrieved from aging mice after exogenous ovarian stimulation. *Biol Reprod*, 65, 141-150

Tarkowski AK (1966): An air drying method for chromosome preparation from mouse eggs. *Cytogenet*, 5, 394-400

The chromosome 21 mapping and sequencing consortium (2000): The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature*, 405, 311-319

Van Blerkom J, Henry G (1992): Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod*, 7(3), 379-390

Van der Auwera I, D'Hooghe T (2001): Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum Reprod*, 16, 1237-1243

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, 336-341

Wakayama T, Yanagimachi R (1998): The first polar body can be used for the production of normal offspring in mice. *Biol Reprod*, 59, 100-104

Warburton D (1987): Reproductive loss: how much is preventable? *N Engl J Med*, 16(3), 158-160

Warner CM, Cao W, Exley GE, Mc Elhinny AS, Alikani M, Cohen J, Scott RT, Brenner CA (1998): Genetic regulation of egg and embryo survival. *Hum Reprod*, 13(3), 178-190

Wassarman PM, Josefowicz WJ (1978): Oocyte Development in the Mouse: An Ultrastructural Comparison of Oocytes Isolated at Various Stages of Growth and Meiotic Competence. *J. Morph.*, 156, 209-236

Weier HUG, Weier JF, Renom MO, Zheng X, Colls P, Nureddin A, Pham CD, Chu LW, Racowsky C, Munne S (2004): Fluorescence in situ hybridization and Spectral imaging analysis of human oocytes and first polar bodies. *J Histochem Cytochem*, 52, 1-4

Weymarn N von, Guggenheim R, Müller H (1980): Cytogenetic investigations on development and degeneration of oocytes from juvenile mice. *Anat Embryol*, 161, 9-18

WHO (World Health Organization) (2004): Infecundity, Infertility and Childlessness in Developing Countries. *Demographic and Health Surveys (DHS), Comparative Reports 9*

Wu J, Zhang L, Wang X (2000): Maturation and apoptosis of human oocytes in vitro are age-related. *Fertil Steril*, 74(6), 1137-1141

Xia P (1997): Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod*, 12(8), 1750-1755

Zeilmaker GH, Vermeiden JPW, Verhamme CMPM, Vliet ACW van (1974): Observations on rat and mouse oocyte maturation in vivo and in vitro: morphology and physiology. *Europ J Obstet Gynec Reprod Biol*, 4, 15-24

IX. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. hc. W. Jonat danke ich herzlich für die Möglichkeit, die Arbeit in seiner Klinik durchführen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. N. Arnold danke ich sehr für die Möglichkeit, insbesondere den zweiten Teil der Arbeit in den von ihm geleiteten Laboratorien durchzuführen.

Herrn Dr. med. A. Schmutzler danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit.

Meinen Eltern und meinem Ehemann: Danke für die unermüdliche Unterstützung!

X. Lebenslauf**Personalien:**

Name: Sabine Rogge, geb. Reusch

Geburtsdatum: 07.06.1979

Geburtsort: Bamberg

Schulausbildung:

1985 -1989: Grundschule in Bamberg

1989 -1998: Franz- Ludwig- Gymnasium, Bamberg

Studium:

1998 - 2005: Studium der Humanmedizin an der
Christian- Albrechts- Universität zu Kiel

2004 - 2005: Praktisches Jahr mit Stationen in Schleswig
(Neurologie), Wattwil / Schweiz (Innere
Medizin) und Kiel (Chirurgie)

Berufliche Tätigkeit:

Seit 2005: Assistenzärztin in Weiterbildung zum
Facharzt für Innere Medizin in der
Internistischen Abteilung der
Asklepiosklinik Bad Oldesloe