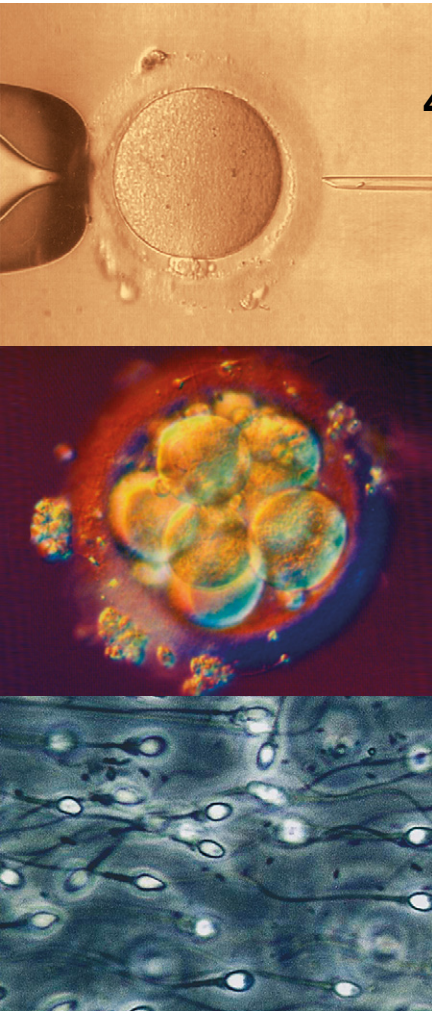


Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

Andrologie • Embryologie & Biologie • Endokrinologie • Ethik & Recht • Genetik
Gynäkologie • Kontrazeption • Psychosomatik • Reproduktionsmedizin • Urologie



4. DVR-Kongress 9.-12.11.2011, Berlin (Programm und Abstracts)

J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2011; 8 (5), 305-345

www.kup.at/repromedizin

Online-Datenbank mit Autoren- und Stichwortsuche

Offizielles Organ: AGRBM, BRZ, DVR, DGA, DGGEF, DGRM, D-I-R, EFA, OEGRM, SRBM/DGE

Indexed in EMBASE/Excerpta Medica/Scopus

Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, A-3003 Gablitz



ENDO FERTI FORUM

ENDOKRINOLOGIE & FERTILITÄT
FÜR KLINIK & PRAXIS

20.-21. März 2026

Universitätsmedizin Mainz

Einladung zu unserer wissenschaftlichen Veranstaltung Endo-Ferti-Forum

Brücke(n) zwischen Unikliniken und Praxen an Rhein und Main(z)

– die aus dem bisherigen Format „Ferti Forum“ ab 2026 hervorgeht –



Freuen Sie sich auf spannende Vorträge und den lebendigen Austausch mit Kolleg:innen und Expert:innen aus Klinik und Praxis. Freitagabend laden wir Sie herzlich zu einem entspannten Empfang ein – eine perfekte Gelegenheit, Kontakte zu knüpfen und den Tag genussvoll ausklingen zu lassen.

Wissenschaftliche Leitung: Univ.-Professorin Annette Hasenburg, Dr. Susanne Theis, Universitätsmedizin Mainz, Sanitätsrat Dr. Werner Harlfinger, BVF Rheinland-Pfalz Dr. Rüdiger Gaase, BVF Hessen Dr. Klaus J. Doubek

Schirmherrschaften: Prof. Nicole Sänger, Uniklinik Bonn, Prof. Jan-Steffen Krüssel, Uniklinik Düsseldorf, Dr. Annette Bachmann, Uniklinik Frankfurt am Main, Prof. Christine Skala, Uniklinik Köln

Weitere Informationen
& Anmeldung unter



4. DVR-Kongress – Wissenschaftliches Programm

Der Kongress wurde von der Ärztekammer Berlin zertifiziert. Teilnehmer erhalten die folgenden Fortbildungspunkte: 3 Punkte Kategorie B pro Halbtage für die Kongressteilnahme. Pro Workshop erhalten Teilnehmer 3 Punkte in der Kategorie A. Urologen erhalten ein Zertifikat der Akademie für Urologie.

Mittwoch, 09.11.2011

Sitzungen der Gesellschaften

Veranstaltungsort: Park Inn Alexanderplatz, Alexanderplatz 7, 10178 Berlin

15:00–16:15 h

Salon Panorama 1/2

Vorstandssitzung des DVR e.V.

16:15–17:30 h

Salon Panorama 1/2

Mitgliederversammlung des DVR e.V.

17:30–19:00 h

Salon Panorama 1/2

JRE-Herausgebersitzung

ab 19:00 h

Salon Panorama 1/2

Vorstandssitzung der DGA

Fortsetzung der Vorstandssitzung am 10.11.2011 von 08:30–12:30 h im bcc (Saal B96)

Öffentliche Abendveranstaltung

Veranstaltungsort: Langenbeck-Virchow-Haus, Luisenstr. 58/59, 10117 Berlin

19:30–21:30 h

„Kinderwunsch trifft Politik“

Was sind die wirklichen Hintergründe für das veränderte Verhalten bei der Familiengründung. Warum entscheiden sich Frauen und Männer nicht mehr automatisch FÜR Kinder und was bewegt sie, sich für die Verwirklichung des Kinderwunsches immer später zu entscheiden. Dass allein finanzielle Anreize nicht erwartungsgemäß funktionieren, deutet darauf hin, dass man noch nicht restlos versteht, wo die Gründe liegen. Die Reproduktionsmedizin erforscht nicht die Hintergründe, sondern sie leistet ihren individuellen und gesellschaftlichen Beitrag, indem sie Paare bei der Verwirklichung ihres Kinderwunsches unterstützt.

Welchen Beitrag könnte, dürfte und sollte die Politik leisten, dass reproduktionsmedizinische Möglichkeiten gerecht zur Verfügung stehen?

Dazu diskutieren bei der Veranstaltung der Mikrosoziologe Prof. Hans Bertram (Humboldt Universität zu Berlin), der Reproduktionsmediziner Prof. Heribert Kantenich (Fertility Center Berlin und DRK Kliniken Berlin Westend, Frauenklinik) und Vertreter der politischen Parteien und die Öffentlichkeit.

Die Moderation übernimmt Martin Spiewak, Journalist der Wochenzeitung ZEIT und Buchautor, der sich seit Jahren mit dem Thema Reproduktionsmedizin befasst.

Eröffnungsworte

H. M. Beier, Aachen

Das demografische Dilemma

H. Bertram, Berlin

Das soziale und juristische Dilemma in der Reproduktionsmedizin

H. Kantenich, Berlin

Donnerstag, 10.11.2011

07:30–12:00 h

DGGEF-Sitzungen

Ablauf, Tagungsort und Programm siehe Seite 212

08:00 h

Run for Fun

mit Klaus Fiedler

10:00–12:40 h

Interaktive Workshops

Parallel

10:00–12:40 h

Saal B05–06

Workshop I

Andrologie: Spermogramme: Erstellung, QS und Beurteilung nach WHO 2010

G. Haidl, Bonn; F. Ochsendorf, Frankfurt a. Main

Parallel	10:00–12:40 h Saal B09	Workshop II Gynäkologische Endokrinologie: AGS, Hormonelle Kontrazeption, Klimakterium <i>D. Foth, Köln; U. Hugo, Hamburg</i>
	10:00–12:40 h Saal C01	Workshop III Reproduktionsbiologie im Dialog: Alte Konzepte – Neue Einblicke – und jede Menge Fragen, die wir uns und Ihnen stellen <i>M. Montag, Heidelberg; C. Sibold, Berlin</i>
	10:00–12:40 h Saal C03	Workshop IV Sexualität und Kinderwunsch <i>H. Berberich, Frankfurt a. Main; T. Wischmann, Heidelberg</i>
	10:00–12:40 h Saal B07–08	Workshop V Reproduktionsmedizinische Problemfälle aus der täglichen Praxis <i>A. Jantke, Berlin; S. von Otte, Kiel</i>
	11:30–12:30 h Saal C04	Mitgliederversammlung der AG Reproduktionsgenetik
	12:45–13:30 h Saal C01	Eröffnung des 4. DVR-Kongresses durch die Tagungspräsidenten <i>Vorsitz: H. M. Behre, Halle</i> Eröffnungsvortrag: Wie findet das Spermium zur Eizelle <i>U. B. Kaupp, Bonn</i> mit freundlicher Unterstützung der Gynemed GmbH & Co. KG
	13:30–14:30 h	Mittagessen und Besuch der Industrieausstellung
	13:30–14:30 h Saal C04	Mitgliederversammlung der AG URZ
	14:30–16:00 h Saal C01	Keynote Lectures <i>Vorsitz: K. Diedrich, Lübeck; M. Sohn, Frankfurt a. Main</i> Refertilisierung beim Mann <i>U. Schwarzer, Freising</i> bei der Frau <i>J. Kleinstein, Magdeburg</i> ODER gleich IVF-ICSI? <i>J.-S. Krüssel, Düsseldorf</i> Hormonelle Kontrazeption bei der Frau <i>T. Rabe, Heidelberg</i> Hormonelle Kontrazeption beim Mann <i>H. M. Behre, Halle</i>
	16:00–16:20 h	Kaffeepause und Besuch der Industrieausstellung
	16:20–17:00 h Ebene C	Posterbegehung <i>Vorsitze:</i> <i>GERM I: P. Sydow, Berlin</i> <i>GERM II: S. Dieterle, Dortmund</i> <i>GERM III: C. Keck, Hamburg</i> <i>Reproduktionsbiologie: U. Montag, Berlin</i> <i>Reproduktionsgenetik: T. Buchholz, München</i> <i>Andrologische Endokrinologie u. männl. Fertilitätsstörungen:</i> <i>1: W. Schulze, Hamburg</i> <i>2: H. Sperling, Mönchengladbach</i>
Parallel	17:00–18:30 h Saal C01	MSD-Symposium: Endokrinologie und Hormonelle Stimulation <i>Vorsitz: L. Kiesel, Münster; F. Ochsendorf, Frankfurt a. Main</i> Elonva – Neue Therapieoption in der ovariellen Stimulation <i>A. Hess, Düsseldorf</i> Das Ende der Agonisten-Ära in der ovariellen Stimulation? <i>G. Griesinger, Lübeck</i> Antagonisten vs. Agonisten in der Therapie des Prostatakarzinoms <i>S. Hinz, Berlin</i>

Parallel	17:00–18:30 h Saal B05–06	Operative Andrologie <i>Vorsitz: G. Popken, Berlin; U. Schwarzer, Freising</i> Varicocele testis: Wait or Treat <i>W. Weidner, Gießen</i> Update Chirurgische Therapie M. Peyronie <i>S. Lahme, Pforzheim</i> Technik der mikrochirurgischen Refertilisierung <i>U. Schwarzer, Freising</i> Troubleshooting bei Penisprothetik <i>T. Pottek, Hamburg</i> Peniserhaltung und Rekonstruktion bei Penis-CA <i>M. Sohn, Frankfurt a. Main</i> Lichen sclerosus bei Kindern und Jugendlichen. Bei Circumcisio immer histopathologische Untersuchung? <i>F. M. Köhn, München</i>
	18:30–19:00 h Saal B05–06	Arbeitskreis Andrologie der Dermatologen
Parallel	18:30–21:00 h Saal B09	Arbeitskreis Donogene Insemination
	18:30–19:30 h Saal C04	Vorstandssitzung der AGRBM
	19:00–22:00 h Saal C03	Vorstandssitzung der DGRM
	07:30–12:00 h	DGGEF-Sitzung Alle nachstehenden Sitzungen der DGGEF finden statt im: Haus der Arbeitsgemeinschaften – Geschäftsstelle der DGGEF e.V. Hausvogteiplatz 12, 10117 Berlin (ca. 10 Minuten vom bbc Berliner Congress Center) Tel: +49 30 51 48 83 340 • Fax: +49 30 51 48 83 44
	07:30–08:30 h	Vorstandssitzung der DGGEF
	08:00–11:00 h	Wissenschaftliches Programm DGGEF Teil 1 <i>Vorsitz: T. Strowitzki, Heidelberg; H. van der Ven, Bonn</i> Neues aus der Reproduktionsbiologie <i>M. Montag, Heidelberg</i> Neues in der Reproduktionsmedizin & Bericht aus der AG Molekularbiologie <i>J.-S. Krüssel, Düsseldorf</i> Präimplantationsdiagnostik – aktueller Stand <i>F. Geithövel, Freiburg</i> Genetik und Reproduktion <i>C. Nevinny-Stickel-Hinzpeter, München</i> Neue Behandlungsmöglichkeiten bei habituellen Aborten und Implantationsversagern <i>W. Würfel, München</i> FertiProtekt <i>B. Lawrenz, Tübingen</i> Wissenschaftliches Programm DGGEF Teil 2 <i>Vorsitz: T. Rabe, Heidelberg; W. Würfel, München</i> Natürliche Familienplanung <i>P. Frank-Herrmann, Heidelberg; G. Freundl, Düsseldorf</i> Neues aus der Endometrioseforschung <i>L. Kiesel, Münster</i> Hormontherapie in der Postmenopause – neue Studien, neue Blickwinkel? <i>M. Ziller, Marburg</i> Neues in der Gynäkologischen Endokrinologie <i>T. Rabe, Heidelberg</i>
	11:00–12:00 h	Mitgliederversammlung der DGGEF

Freitag, 11.11.2011

07:00 h

Run for Fun*mit Klaus Fiedler*

08:15–09:40 h

Saal C01

Gynäkologische Endokrinologie + Reproduktionsmedizin I (GERM I)*Vorsitz: A. Schüring, Münster; A. Schultze-Mosgau, Lübeck***Sanfte vs. Konventionelle Reproduktionsmedizin – viel Lärm um nichts?***J. Weiss, Jena***OHSS – Handeln oder Scheitern... das ist hier die Frage!***S. von Otte, Kiel***Wie definiert man „Erfolg“ in der Reproduktionsmedizin ODER Ende gut – alles gut?***A. Schultze-Mosgau, Lübeck*

08:15–09:40 h

Saal B09

Junge Andrologie: Testosteron und Metabolismus – Wechselwirkungen und Syndrome*Vorsitz: T. Greither, Halle; M. Zitzmann, Münster***Einführungsvortrag: Hypogonadismus und Metabolisches Syndrom***M. Zitzmann, Münster***Androgene und körperliche Leistungsfähigkeit – Ergebnisse der Study of Health in Pomerania (SHIP)***N. Friedrich, Greifswald***Testosteron-Substitution bei FTM-Transsexuellen: Einfluss auf Insulin-Resistenz und Lipid-Parameter***S. Hildebrandt, Erlangen***Testosteron-induzierte Expression von microRNAs***M. Kraus, Halle*

08:15–09:40 h

Saal B05–06

TESE und ICSI: Tipps und Tricks zur Optimierung des Erfolgs*Vorsitz: W. Schulze, Hamburg; U. Schwarzer, Freising***Welche TESE-Techniken – wann und wie***T. Diemer, Gießen***Die Protamin-Story***K. Steger, Gießen***Gynäkologischer Einfluss und Prognosefaktoren***U. A. Knuth, Hamburg***Optimale Gewebeaufbereitung nach TESE unter Beachtung der gesetzlichen Regelungen***W. Schulze, Hamburg*

08:15–09:40 h

Saal B07–08

Endometriose*Vorsitz: K. Bühler, Hannover-Langenhagen; L. Kiesel, Münster***Gestagene oder GnRHa bei der medikamentösen Therapie der Endometriose?***K. Bühler, Hannover-Langenhagen; L. Kiesel, Münster***Gen-Polymorphismen als Biomarker für die Endometriose-Diagnostik?***T. Buchholz, München***Endometriose & Infertilität – noch OP oder gleich ART?***U. Ulrich, Berlin*

09:45–10:45 h

Saal C01

Andrologie*Vorsitz: E. Nieschlag, Münster; W. B. Schill, Gießen***Männliche Fertilität in der Zukunft – Stammzellen als Fertilitätsreserve?***S. Schlatt, Münster***Intersexualität als Herausforderung***H. A. G. Bosinski, Kiel***Maldescensus Testis – Andrologische und reproduktionsmedizinische Therapie nach aktuellen Leitlinien***S. Kliesch, Münster*

10:45–11:15 h

Kaffeepause

Parallel

11:15–12:30 h

Saal C01

GERM (Freie Vorträge)

Vorsitz: M. Kupka, München; S. Schmutzler, Kiel

- V01** Thromboserisiko unter kombinierten Ovulationshemmern im Vergleich zu kombinierten, Levonorgestrel enthaltenden Ovulationshemmern
M. Ziller, Marburg
- V02** Wann ist eine intrauterine Insemination erfolgreich? – Erfahrungen an 6053 Zyklen
R. Gomez, Mainz
- V03** Präovulatorische Progesteronwerte und kumulative Lebendgeburtenrate nach Agonisttrigger, elektiver Vitrifikation aller 2PN-Eizellen und Kryo-ET(s)
H. Götttsching, Lübeck
- V04** Kryokonservierung von Ovarialgewebe nach Transport in einer zentralen Kryobank: Erfahrungen nach 8 Jahren
J. Liebenthron, Bonn
- V05** Zum Stillverhalten von Frauen nach IVF/ICSI – Spielen psychosoziale Faktoren eine Rolle?
S. Ludwig, Berlin

11:15–12:30 h

Saal B05–06

Reproduktionsgenetik (Freie Vorträge)

Vorsitz: M. Bloeckle, Berlin; U. Hehr, Regensburg

- V06** Direct counting of chromatids in polar bodies with digital PCR – a new method for aneuploidy screening in oocytes
A. Daser, Wiesbaden
- V07** Non-invasive prenatal detection of chromosome aneuploidies using next-generation sequencing: Rapid development towards clinical application
M. Stumm, Berlin
- V08** Etablierung einer Präimplantationsdiagnostik (PID) für Tuberöse Sklerose
T. Harasim, Martinsried
- V09** PID für monogene Erkrankungen nach Polkörper- und/oder Trophektoderm-biopsie
A. Hehr, Regensburg
- V10** FSHB promotor polymorphism influences male reproductive parameters
F. Tüttelmann, Münster

11:15–12:30 h

Saal B09

Andrologische Endokrinologie & männl. Fertilitätsstörungen (Freie Vorträge)

Vorsitz: S. Grunewald, Leipzig; J. Jacobeit, Hamburg

- V11** Untersuchung der Ejakulatqualität nach akuter Epididymo-orchitis
A. Pilatz, Gießen
- V12** Auto-antibodies against disulphide isomerase ER-60 as a possible diagnostic marker in male immunological infertility
M. Fijak, Gießen
- V13** High prevalence and interaction of hypogonadism and the metabolic syndrome in long-term survivors with germ cell tumours
M. Zitzmann, Münster
- V14** Junge Klinefelter-Patienten haben bessere Chancen für eine erfolgreiche mikrochirurgische testikuläre Spermienextraktion (M-TESE): Auswertung prädiktiver Parameter für eine positive M-TESE
R. Bongers, Münster
- V15** Aktueller Stand der Genitalrekonstruktion bei Frau-zu-Mann Transsexuellen
K. Wirsam, Frankfurt
- V16** Das Sexualdelikt in der gerichtlichen Medizin – ein historischer Rückblick auf die Entwicklung der forensischen Spurenanalytik
K. Albrecht, Hannover

11:15–12:30 h

Saal C03

Reproduktionsbiologie (Freie Vorträge)

Vorsitz: I. Hoppe, Jena; K. Rosenberg, Berlin

Sitzung in memoriam Hardi Schmiady, verstorben 2011 (Laborleiter des IVF-Labors der Freien Universität Berlin und später Humboldt-Universität zu Berlin)

- V17** Development of mouse fetuses after embryo culture in different media
S. Hemkemeyer, Münster

Parallel

- V18** **Veränderte Expression der Hedgehog Gene Sonic und Indian in in vitro kultivierten Mausembryonen**
D. Baston-Büst, Düsseldorf
- V19** **Non-invasive assessment of inner mitochondrial redox potential of vitrified metaphase II oocytes or germinal vesicle oocytes vitrified within preantral follicles**
T. Trapphoff, Bielefeld
- V20** **Six years of routine vitrification of 2PN oocytes: embryo survival and follow-up**
D. Beyer, Lübeck
- V21** **Polarisation microscopy for exact timing of ICSI increases the time from ovum pick-up until injection**
V. Nordhoff, Münster

12:30–13:00 h

Saal C01

Vortrag*Vorsitz: R. Fischer, Hamburg; E. Holinski-Feder, München***Erste Schwangerschaft nach Präimplantationsdiagnostik für eine monogene Erkrankung (Desbuquois-Syndrom)***K. Diedrich, Lübeck*

13:00–14:00 h

Mittagessen und Besuch der Industrieausstellung

13:30–14:00 h

Pressekonferenz

Saal C04

13:00–14:00 h

Mitgliederversammlung der DGRM

Saal B07-08

Parallel

14:00–15:30 h

Saal C01

Merck-Serono-Symposium: Gonadotropins Go Pharmacogenomic – Neue Behandlungsoptionen*Vorsitz: J. Gromoll, Münster; H. M. Behre, Halle***Unterschiede bei der LH- und hCG-Signalerweiterung (Differences in LH and hCG signal transduction)***M. Simoni, Modena (I)***Impact on SNPs on fertility and pregnancy outcome***M. Laan, Tartu (EST)***Hyperglycosylated hCG and placental function***T. Fournier, Paris (F)***FSH und männliche Infertilität (FSH and male infertility)***H. M. Behre, Halle*

14:30–15:30 h

Saal B05-06

Jenapharm-Symposium: Erektile Dysfunktion: Neue Aspekte der Therapie von PDE5-Inhibitoren in der erektilen Dysfunktion und assoziierten Erkrankungen*Vorsitz: F. Sommer, Hamburg; U. Wetterauer, Freiburg***Assoziation zwischen erektiler Dysfunktion, Subfertilität und metabolischem Syndrom***T. Linn, Gießen***Sublinguale on-demand Medikation und niedrig dosiertes daily-dosing***U. Wetterauer, Freiburg***Kombinationstherapie bei hypogonadalen Männern***F. Sommer, Hamburg***Standortbestimmung zur medikamentösen Therapie bei Ejakulationsstörungen***H. Sperling, Mönchengladbach*

15:30–16:00 h

Saal C01

Vortrag*Vorsitz: F. Geithövel, Freiburg; U. Hilland, Bocholt***Die Dreierregel im ESchG: Ende einer Legende?***H. Frister, Düsseldorf*

Parallel

15:30–18:00 h

Saal C04

DFG Workshop: Netzwerk Reproduktionswissenschaft*Vorsitz: A. Mayerhofer, München*

15:30–16:15 h

Förderung reproduktionsmedizinischer/biologischer Forschung in Deutschland*T. Grimm (Lebenswissenschaften II, Deutsche Forschungsgemeinschaft)**A. Lindner (Referat 615 – Gesundheitsforschung, Bundesministerium für Bildung und Forschung)*

Berichte aus den Forschergruppen und Schwerpunktprogrammen

- **KFO 181: Male Factor Infertility due to Impaired Spermatogenesis**
W. Weidner, K. Steger, Gießen
- **FOR 1041: Germ Cell Potential**
J. Gromoll, Münster
- **FOR 1369: Sulfated Steroids in Reproduction**
M. Bergmann, Gießen
- **SPP 1384: Mechanisms of Genome Haploidization**
R. Jessberger, Dresden

16:20–16:30 h

Pause

16:30–17:45 h

Forschungsspektrum der Reproduktionswissenschaften in Deutschland

- **Medizin**
Testis Tumor Formation
H. Schorle, Bonn
Mechanisms of Immune Tolerance During Pregnancy
A.C. Zenclussen, Magdeburg
- **Fortpflanzungsbiologie**
Reproductive Strategies in Ants
J. Heinze, Regensburg
Does Testicular Noise Underlie Reproductive Problems in Females?
M. Treier, Berlin
- **Pharmaindustrie und Technologie**
Target Finding and Evaluation in the Ovary – From Basic Research to Company Projects
B. Lindenthal, Bayer Pharma AG, Berlin

17:45–18:00 h

Perspektiven der Reproduktionswissenschaft

Allgemeine Diskussion

16:00–16:30 h

Kaffeepause und Besuch der Industrieausstellung

16:30–18:00 h

Saal C01

GERM II Grundlagen: Reproduktives AlternVorsitz: *C. Thaler, München; W. Würfel, München***Der Blick auf die biologische Uhr. Sagt uns das AMH die Zeit?***C. Gnoth, Grevenbroich***Einfluss von MTHFR 677 C > T auf AMH: dreht jemand an der Uhr?***C. Thaler, München***Familiengründung in der Zukunft. Ist Eizellkryobanking schon eine empfehlenswerte Option?***F. Nawroth, Hamburg*

16:30–18:00 h

Saal B05–06

Donogene InseminationVorsitz: *W. Bleichrodt; T. Katzorke, Essen***Die Samenspende – was gibt es zu beachten***S. Wehrstedt, Düsseldorf***Medizinische Aspekte der donogenen IVF***T. Katzorke, Essen***Bedeutung und Darstellung des Spenders im Leben des durch Samenspende gezeugten Kindes***K. Werdehausen, Mülheim a. d. Ruhr***Semenbanking – International Developments***O. Schou, Aarhus (DK)*

16:30–18:00 h

Saal B07–08

Infektion und InfertilitätVorsitz: *W. Weidner, Gießen; A. Tandler-Schneider, Berlin***Moderne mikrobiologische Diagnostik urogenitaler Sekrete einschließlich des Ejakulats***H. Hossain, Gießen***Urogenitale Infektion und Infertilität aus gynäkologischer Sicht***A. Clad, Freiburg*

Parallel

16:30–18:00 h
Saal B09**Urogenitale Infektion und Infertilität aus urologisch-andrologischer Sicht***F. Wagenlehner, Gießen***Hepatitis, HIV und Kinderwunsch***A. Tandler-Schneider, Berlin***Klinische Reproduktionsbiologie***Vorsitz: J. Hirchenhain, Düsseldorf; K. Pribbernow, Magdeburg***Epigenetische Aspekte der frühen Embryonalentwicklung***T. Haaf, Würzburg***State of the ART of the Vitrification of Human Oocytes, Embryos and Blastocysts***E. van den Abbeel, Brüssel (B)***Selection of the Best Gametes and Embryos – Can We Learn from our Dutch Neighbors?***S. Mastenbroek, Amsterdam (NL)***Mitgliederversammlung des D.I.R**

Parallel

18:00–19:00 h
Saal C0118:00–19:00 h
Saal B05–06**Mitgliederversammlung der DGA**18:00–19:00 h
Saal B07–08**Mitgliederversammlung der AGRBM**

ab 20:00 h

Abendveranstaltung*DVR-Party im Restaurant „12 Apostel“ in Berlin-Mitte
veranstaltet von der INTERPLAN AG, München***Samstag, 12.11.2011**

08:00 h

Run for Fun*mit Klaus Fiedler*

08:45–09:15 h

Saal C01

Vortrag*Vorsitz: A. Jantke, Berlin; J. Kleinstein, Magdeburg***FertiProtekt – Aktuelle Daten aus dem Netzwerk***M. von Wolff, Bern (CH)*09:15–11:00 h
Saal C01**25. Jahrestreffen der deutschen IVF-Gruppen***Vorsitz: K. Bühler, Hannover-Langenhagen; G. Wilke, Hildesheim***15 Jahre BRZ***M. Thaele, Saarbrücken***10 Jahre Quadega Auswertungen***E. Nieschlag, Münster***Daten zur konservativen Sterilitätstherapie (AKF)***T. Schill, Hannover***DIR Auswertungen 2010***K. Bühler, Hannover-Langenhagen*

Parallel

09:15–11:00 h
Saal B09**Vasektomie-Seminar***Vorsitz: U. Schwarzer, Freising; M. Sohn, Frankfurt a. Main***Praktische Durchführung der modernen Vasektomie – step by step***U. Schwarzer, Freising***Warum gibt es keine Leitlinien zur Vasektomie***I. Schröder-Printzen, Gießen***Juristische Aspekte der Vasektomie***M. Flotho, Wolfenbüttel***Problemfälle und Trouble-Shooting vor, bei und nach Vasektomie***A. Jungwirth, Salzburg (A)*

Parallel	09:15–11:00 h Saal B07–08	Sitzung der Grundlagenforscher (DFG geförderte Forschergruppe „Germ Cell Potential“) <i>Vorsitz: S. Schlatt, Münster</i> Testicular Stem Cells <i>A.M. van Pelt, Amsterdam (NL)</i> Ovarian Stem Cells <i>H. Picton, Leeds (UK)</i> Endometrial Stem Cells <i>M. Götte, Münster</i>
	11:00–11:15 h Saal C01	Preisverleihung 3 Preise werden durch das Komitee verliehen
	11:15–11:45 h	Kaffeepause
Parallel	11:45–13:00 h Saal C01	Ferring-Symposium <i>Vorsitz: M. Bals-Pratsch, Regensburg; K. Bühler, Hannover-Langenhagen</i> Sind große Datenbanken heute in der ART noch zeitgemäß? <i>K. Bühler, Hannover-Langenhagen; G. Griesinger, Lübeck</i> The Prospective Randomised Trial in ART <i>A. N. Andersen, Kopenhagen (DK)</i> The MEGAsset-Trial <i>P. Devroey, Brüssel (B)</i>
	11:45–13:00 h Saal B05–06	Andrologie Update 2011 – Was gibt es Neues <i>Vorsitz: A. Meinhardt, Gießen; H. Sperling, Mönchengladbach</i> – in der andrologischen Grundlagenforschung? <i>A. Meinhardt, Gießen</i> – in der andrologischen Diagnostik? <i>U. Paasch, Leipzig</i> – in der operativen Therapie? <i>T. Diemer, Gießen</i> – in der konservativen Therapie? <i>H.-C. Schuppe, Gießen</i>
	13:00–13:15 h Saal C01	Verabschiedung und Ausblick Ende des 4. DVR-Kongress
	13:15–16:30 h Saal C01	16. BRZ-Herbsttreffen

4. DVR-Kongress 09.–12.11.2011, Berlin Abstracts*

Vorträge

■ Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin

V 01

Thromboserisiko unter kombinierten Ovulationshemmern im Vergleich zu kombinierten, levonorgestrelhaltigen Ovulationshemmern

M. Ziller¹, K. Kostev², V. Ziller¹, U. Wagner¹, P. Hadji¹
¹Schwerpunkt Gynäkologische Endokrinologie, Reproduktionsmedizin und Osteologie, Klinik für Gynäkologie, Gynäkologische Endokrinologie und Onkologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg – Standort Marburg; ²IMS HEALTH GmbH & Co. OHG, Marburg

Einleitung Die Einnahme von Ovulationshemmern (OH) zur Empfängnisverhütung erhöht das Risiko thromboembolischer Ereignisse. Unterschiede in Abhängigkeit des verwendeten Gestagens haben immer wieder zu Unsicherheiten in der Beratung und Anwendung der OH geführt. Ziel dieser Studie war es, die Thromboseinzidenz unter den in Deutschland verfügbaren kombinierten OH im Vergleich zu levonorgestrelhaltigen OH zu untersuchen.

Methode Es wurden aus Diagnosedaten der IMS Disease Analyzer®-Datenbank Patientinnen mit Verordnung eines kombinierten OH (ATC: G03A oder Cyproteron) extrahiert, die ab der Erstverordnung mindestens 1 Jahr nachbeobachtet werden konnten und in der Vorgeschichte keine Thrombose aufwiesen. Es erfolgte eine Gruppierung in Abhängigkeit der enthaltenen Gestagene sowie eine logistische Regressionsanalyse bezüglich des Thromboserisikos vs. levonorgestrelhaltiger OH.

Ergebnisse Es wurden die Daten von 1,74 Millionen Frauen zwischen 2005 und 2009 aus 374 gynäkologischen Praxen untersucht. Aus 502.332 Frauen mit OH-Verordnungen konnten die Daten von 79.194 Frauen im Sinne der Fragestellung erhoben werden.

* Begutachtet und zusammengestellt vom wissenschaftlichen Komitee.

Ein alphabetisches Verzeichnis der federführenden Autoren finden Sie auf Seite 345.

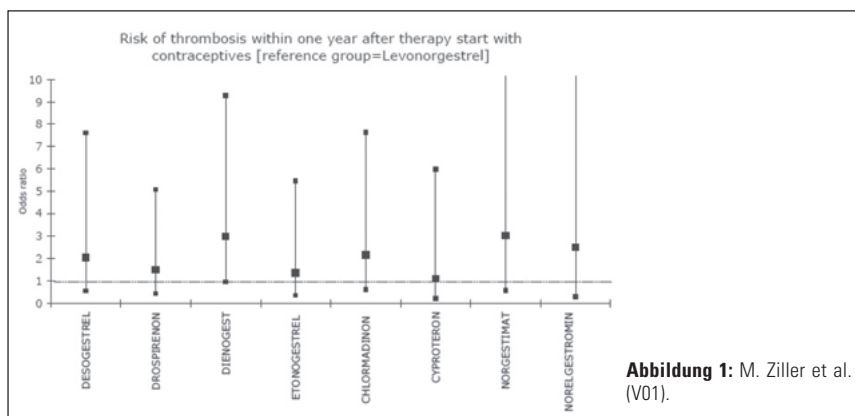


Abbildung 1: M. Ziller et al. (V01).

Das absolute Risiko, innerhalb eines Jahres nach Therapiebeginn eine Thrombose zu erleiden, lag zwischen 0,03 % und 0,09 %. Die logistische Regressionsanalyse, nach Adjustierung für relevante Kovariablen, ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den verwendeten Gestagenen.

Diskussion Die Inzidenz einer Thrombose im ersten Jahr nach OH-Verordnung ist niedrig und vergleichbar zu früheren Veröffentlichungen. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gestagengruppen konnte trotz der hohen Fallzahlen der vorliegenden, repräsentativen und populationsbezogenen Datenbankanalyse nicht aufgezeigt werden. Eine klinisch relevante Erhöhung des Risikos beim Einsatz von kombinierten OH mit verschiedenen Gestagenen im Vergleich zu levonorgestrelhaltigen OH erscheint daher wenig wahrscheinlich (Abb. 1).

V 02

Wann ist eine intrauterine Insemination erfolgreich? – Erfahrungen an 6053 Zyklen

R. Gomez¹, C. Skala¹, R. Seufert¹, M. Schorsch^{1,2}
¹Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Frauenklinik, Universitätsmedizin Mainz; ²Kinderwunschzentrum Wiesbaden

Fragestellung Obwohl die IUI eine der ältesten reproduktionsmedizinischen Techniken ist, wird ihr aktueller Stellenwert kontrovers diskutiert – wie auch zentrale Fragen ihrer praktischen Durchführung.

In der Literatur wird eine Fülle unterschiedlicher Prognosefaktoren genannt, die einen Einfluss auf eine mögliche Schwangerschaft nach IUI haben sollen. Gelegentlich wird sogar der Wert einer IUI ganz in Frage gestellt. Ziel dieser Studie – an einem der größten Kollektive einer Einzelstudie – ist die Charakterisierung von Prognosefaktoren, die über den Erfolg einer IUI entscheiden.

Methoden Zwischen 1998 und 2010 wurden bei 2268 Patientinnen insgesamt 6053 Inseminationen durchgeführt. Die Stimulation erfolgte entweder mit Clomifen, mit FSH, mit HMG oder im Nativzyklus. Die Spermioogramme wurden nach den gängigen WHO-Kriterien beurteilt. Die statistische Analyse erfolgte mittels aktueller multivariabler Regressionsverfahren, wobei auch das Problem des multiplen Testens berücksichtigt wurde. Dabei wurden relevante Subgruppen analysiert und die Daten im Gruppenvergleich ausgewertet.

Ergebnisse Das Durchschnittsalter der Patientinnen betrug 34,2 J (19–50). Im Mittel wurden 2,36 Zyklen pro Paar durchgeführt (1–20). Der durchschnittliche BMI betrug 22,83 (15–47,3 kg/m²). 385 IUIs (6,36 %) wurden bei einem normalen Spermioogramm (weibliche Indikation) und 5668 IUIs (93,64 %) aufgrund andrologischer Indikationen indiziert. In 5425 Fällen zeigte sich eine gestörte Motilität (89,63 %), in 3122 Fällen eine gestörte Morphologie (51,6 %), in 690 Fällen ein gestörtes Volumen (11,4 %), in 531 Fällen zeigte sich gestörte Konzentration (8,8 %), in 327 Fällen eine gestörte Gesamtspermienanzahl (5,4 %).

In den meisten Fällen war mehr als ein Kriterium beeinträchtigt.

4536 Pat. (75 %) wurden mit recomb-FSH stimuliert, 689 Pat. (11,4 %) mit Clomifen, 206 Pat. (3,4 %) mit urinärem FSH, 503 Pat. (8,31 %) wurden nicht stimuliert und 118 Pat. (19,5 %) mit anderen Methoden. 5436 Zyklen (89,81 %) blieben ohne Schwangerschaft (Vergleich PI: 80). 616 Patientinnen (10,18 %) wurden schwanger, davon kam es zu 381 Geburten (Geburtsrate bei IUI: 63 %), 127 Aborten (21 %), 8 EUG (EU-Rate bei IUI: 1,3 %) und 100 Schwangerschaften mit unbekanntem Ausgang (16,5 %).

Die Suche nach unabhängigen Prognosefaktoren mittels der linearen Diskriminationsanalyse zeigt, dass bei gestörter Morphologie die Schwangerschaftsrate um 21,1 % verringert ($p = 0,0073$; OR: 0,659–0,944) ist. Das Lebensalter der Patientin hat – wie aus den IVF- und ICSI-Prozeduren bekannt – einen ganz erheblichen Einfluss auf den Erfolg. Pro Lebensjahr verringert sich die Schwangerschaftsrate um 4,5 % ($p < 0,001$; OR: 0,937–0,974). In Bezug auf die Stimulation zeigt sich, dass Patientinnen mit Clomifenstimulation eine 30,4 % geringere Schwangerschaftsrate als Patientinnen mit rekombinanter FSH-Stimulation haben. Überraschenderweise haben die folgenden Faktoren nur einen geringen Einfluss auf die Schwangerschaftsrate: Gestörte Motilität ($p = 0,4181$), gestörtes Volumen ($p = 0,2749$) und gestörte Gesamtspermienanzahl ($p = 0,0802$). Hier zeigt sich wahrscheinlich die Bedeutung einer guten Spermaaufarbeitung und der richtigen Indikationsstellung.

Schlussfolgerung Eine gestörte Spermienmorphologie ($p = 0,0073$) sowie das Alter der Frau ($p < 0,0001$) und die Art der ovariellen Stimulation haben in unserem Kollektiv den höchsten Einfluss auf die Schwangerschaftsrate. Bei richtiger Indikationsstellung, entsprechender Durchführung und adäquater ovarieller Stimulation ist die IUI weiterhin ein wertvolles Verfahren, das allerdings bei älteren Patienten nicht den Übergang auf effektivere Verfahren verhindern darf.

V03

Präovulatorische Progesteronwerte und kumulative Lebendgeburtenrate nach Agonisttrigger, elektiver Vitrifikation aller 2PN-Eizellen und Kryo-ET(s)

H. Götsching

Universitäres Kinderwunschzentrum Lübeck

Fragestellung Präovulatorische Serumprogesteronwerte führen ab einem kritischen Cut-off-Wert von 1,5 ng/ml zu einer reduzierten Schwangerschaftsrate nach IVF [Bosch et al. 2010]. Ursächlich dafür werden Effekte des Hormons an Ovar und/oder Endometrium angesehen. Die Uterusschleimhaut wird durch eine vorzeitige Wirkung des Gelbkörperhormons vorzeitig sekretorisch transformiert, was sich negativ auf die Im-

plantationswahrscheinlichkeit auswirken kann [Bosch et al. 2003; Bourgain et al. 2003]. Die präovulatorischen Progesteronwerte korrelieren mit der Anzahl reifender Follikel nach ovarieller Stimulation. Erhöhte Werte treten typischerweise bei Patientinnen mit Hyperresponse auf [Griesinger et al. 2010]. Zur Sekundärprävention eines OHSS wird seit 2004 am universitären Kinderwunschzentrum in Lübeck bei Risikopatienten die HCG-Gabe durch eine Bolusgabe eines GnRH-Agonisten ersetzt [Griesinger et al., Hum Reprod 2007]. Es erfolgen dann die elektive Kryokonservierung aller befruchteten Eizellen und ein Transfer nach Auftau in einem substituierten Zyklus. Die vorliegende Arbeit untersucht, ob eine Assoziation zwischen präovulatorischen Progesteronwerten und Lebendgeburtenwahrscheinlichkeit in Kryo-ET-Zyklen besteht.

Methoden Retrospektive Zusammenfassung individueller Patientendaten aus 3 verschiedenen Studien [Griesinger et al. 2010, 2011, 2011]. Bei OHSS-Risikopatienten nach Stimulation in einem GnRH-Antagonisten-Protokoll erfolgte die Induktion der finalen Eizellreifung mit GnRH-Agonist, gefolgt von Vitrifikation aller 2PN-Eizellen und Übertragung nach Auftau in einem substituierten Zyklus. Die Kohorte wurde gemäß der Perzentilenverteilung der Progesteronwerte in 3 Gruppen unterteilt (Gruppe 1: ≤ 25 . Perzentile, Gruppe 2: 26–74. Perzentile und Gruppe 3: ≥ 75 . Perzentile). Die Gruppen wurden bezüglich demographischer Charakteristika, Stimulationscharakteristika und der kumulativen Lebendgeburtenrate analysiert. Die statistische Auswertung erfolgt mittels ANOVA- bzw. χ^2 -Test.

Ergebnisse 121 Patientinnen mit insgesamt 284 Kryo-ETs wurden ausgewertet. Bei 114 der 121 Patientinnen lag ein präovulatorischer Progesteronwert vor, sodass die Daten dieser Patientinnen in die Analyse eingeschlossen wurden. Der präovulatorische Progesteronwert lag im Mittel bei 1,36 ng/ml. Die Grenze der 25. Perzentile lag bei 1,0 ng/ml, die der 75. Perzentile bei 1,8 ng/ml. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Perzentilengruppen hinsichtlich der Mittelwerte für Alter, Gewicht, Nikotinabusus, Stimulationsdauer und Stimulationsdosis. Die Zahl der gewonnenen Eizellen war $18 (\pm 9,1)$ in Gruppe 1, $17,7 (\pm 8,3)$ in Gruppe 2 und $21,5 (\pm 10)$ in Gruppe 3 ($p = 0,04$). Der präovulatorische Östrogenwert lag in der Gruppe 1 im Mittel bei 3328 pg/ml (± 2044), in Gruppe 2 bei 3899 pg/ml (± 1491) und in Gruppe 3 bei 5317 pg/ml (± 2286). Der Progesteronwert war signifikant positiv mit dem Östradiolwert assoziiert (Korrelation nach Pearson = 0,407). Die Lebendgeburtenrate war 8/34 (23,5 %) in Gruppe 1, 15/45 (33,4 %) in Gruppe 2 und 12/35 (34,3 %) in Gruppe 3 ($p = 0,554$).

Schlussfolgerung Die vorliegende univariate Auswertung des Zusammenhangs zwischen präovulatorischen Progesteronwerten und kumulativer Lebendgeburtenrate zeigte keinen negativen Einfluss erhöhter Progesteronwerte. Somit ist ein Einfluss des Progesterons auf die Eizellqualität unwahrschein-

lich. Der negative Einfluss des Progesterons begründet sich somit vorrangig in einem Effekt auf das Endometrium. Bei erhöhten Progesteronwerten ist die zeitliche Verschiebung der Embryonenübertragung eine erwägenswerte Option des klinischen Handelns, unter der Voraussetzung, dass ein effizientes Kryoprotokoll etabliert ist.

V04

Kryokonservierung von Ovarialgewebe nach Transport in einer zentralen Kryobank: Erfahrungen nach 8 Jahren

J. Liebenthron¹, M. Köster¹, K. van der Ven², H. van der Ven¹, M. Montag³

¹Universitätsfrauenklinik, Bonn; ²Abteilung Gynäkologische Endokrinologie & Reproduktionsmedizin, Universitätsklinik Bonn; ³Abteilung Gynäkologische Endokrinologie & Fertilitätsstörungen, Universitätsklinikum Heidelberg

Fragestellung In der Bonner Kryobank wurde seit 2003 bei über 600 Patientinnen die Kryokonservierung von Ovarialgewebe durchgeführt. In der Mehrzahl der Fälle erfolgte nach der Entnahme des Gewebes der Transport zur Zustellung in der Kryobank am nächsten Tag mit Spezialbehältern und unter kontrollierten Bedingungen. Auf der Grundlage eines Vitalitäts-Assays wurde in der vorliegenden Studie die Frage nach Problemfällen im Rahmen dieses Vorgehens untersucht.

Methodik Bei allen Proben wurden nach dem Transport die Temperatur bei Probenzugang und die makroskopische Beschaffenheit des Gewebes notiert. Anschließend wurde der ovarielle Kortex für die nachfolgende Kryokonservierung präpariert. Von einem Referenzprobenstück wurde nach kurzzeitiger Inkubation die Anzahl an vitalen Primordialfollikeln mit einem Kalzein-Lebendfarbstoff bestimmt. Die Rate an vitalen Follikeln wurde in Relation zu den Eingangsparametern ausgewertet.

Ergebnisse Eine Auswertung bei Kryokonservierung nach einem vorausgegangenen Transport erfolgte für 429 Patientenproben. 375 Proben waren unauffällig und zeigten im Mittel 68 vitale Follikel. Bei 47 Patientenproben (10,9 %) wurde eine eingeschränkte Vitalität festgestellt (46 vitale Follikel; $p = 0,089$, n. s.). Makroskopisch zeigten diese Proben entweder Auffälligkeiten beim Gewebe (Elektrokoagulationen bei der Ovarbiopsie, Gelbkörper-Läsionen im Kortex oder Gelbkörper-Einschlüsse, schwammige/fragile Beschaffenheit bei unklarer Genese) oder bei der Dauer des Transports bzw. der Transporttemperatur. Bei insgesamt 7 Proben (1,6 %) konnten keine vitalen Follikel aufgefunden werden: 4 Proben waren vollständig koaguliert, 2 waren gefroren und 1 zeigte einen schwammigen/fragilen Kortex unklarer Genese.

Schlussfolgerungen Die zentrale Kryokonservierung von Ovarialgewebe ist ein interdisziplinäres Projekt und von der optimalen

Zusammenarbeit aller beteiligten Zentren abhängig. Kritisch zu bewerten sind die komplett avitalen Patientenproben, insbesondere, da es sich dabei fast ausschließlich um vermeidbare Probleme der operativen Entnahmetechnik oder der Vorbereitung der Gewebe zum Transport bei den jeweiligen Entnahmezentren handelt. Die vor Entnahme seitens der Kryobank bereitgestellten SOPs weisen explizit auf diese möglichen Probleme hin. Unabhängig davon kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Chancen einer späteren Re-Transplantation im Wesentlichen davon abhängen, dass vitale Follikel vorhanden sind, unabhängig von deren Anzahl. Die erste Schwangerschaft mit Ovarialgewebe in Deutschland wurde mit dem hier vorgestellten Konzept nach Entnahme, Transport, Kryokonservierung und externer Transplantation unter Beteiligung dreier FertiProtekt-Zentren erzielt.

V05

Zum Stillverhalten von Frauen nach IVF/ICSI – spielen psychosoziale Faktoren eine Rolle?

Q. Ludwig¹, H. Kantenich²

¹Fertility Center Berlin (FCB); ²DRK-Kliniken Berlin/Westend

Einleitung Die Mutter-Kind-Beziehung und die weitere medizinische, psychomotorische sowie mentale Entwicklung von Kindern nach IVF oder ICSI sind gut untersucht. Es gibt aber Hinweise, dass Kinder nach IVF/ICSI kürzer gestillt werden und dass die Mütter mehr Probleme beim Stillen haben. Die aktuelle Empfehlung der WHO (World Health Organisation) für das Stillen sieht eine ausschließliche Brusternährung des Säuglings von 6 Monaten bzw. eine generelle Stilldauer (unter Zufütterung von geeigneter Beikost) über 2 Jahre vor und ist nicht nur wegen der optimalen Zusammensetzung der Muttermilch wichtig. Auch die frühe Mutter-Kind-Bindung erhält durch langes Stillen eine gute Grundlage. Das Stillverhalten von Frauen nach Sterilitätsbehandlung (IVF oder ICSI) soll untersucht werden. Dieses soll mit Frauen verglichen werden, die in demselben Zeitraum spontan schwanger geworden sind.

Material und Methoden Es handelt sich um eine retrospektive Fall-Kontroll-Studie von 472 Frauen (n = 472) zwischen 19 und 45 Jahren, die in der geburtshilflichen Abteilung der Frauenklinik der DRK-Kliniken Berlin-Westend in einem Zeitraum von Januar 2006 bis Dezember 2009 einen Einling geboren haben. 236 dieser Geburten war eine IVF/ICSI-Behandlung vorausgegangen, welche mehrheitlich im Fertility Center Berlin (FCB) durchgeführt worden war; bei weiteren 236 handelte es sich um eine spontane Konzeption. Frühgeburten (< 37 + 0 Schwangerschaftswoche/SSW) sowie übertragene Schwangerschaften (> 42 + 0 SSW) wurden von der Studie ausgeschlossen. Beide Gruppen erhielten einen strukturierten Fragebogen, der 53 verschiedene Items bezüglich der ausschließlichen bzw. generellen

Stilldauer enthielt sowie verschiedene Fragen bezüglich der elterlichen Zugewandtheit, des Suchtverhaltens und verschiedener soziodemographischer Faktoren. Des Weiteren wurden die Teilnehmerinnen dazu angehalten, die Hauptgründe anzuführen, die sie bei der Entscheidung zu stillen bzw. abzustillen beeinflusst hatten. Die Darstellung der Messwerte erfolgte in Mittelwerten und deren Standardabweichungen ($\bar{x} \pm \text{SD}$).

Ergebnisse Das endgültige Patientinnenkollektiv bestand aus n = 288 Frauen (Rücklaufquote: 61 %), von denen 48 % (n = 138) über eine IVF/ICSI-Behandlung schwanger geworden waren und 52 % (n = 150) ohne jegliche reproduktionsmedizinische Verfahren. Beide Gruppen wiesen eine hohe Stillprävalenz auf (98,1 % in der IVF-/ICSI-Gruppe bzw. 94,1 % nach spontaner Konzeption). Es zeigte sich keine relevante Differenz in der ausschließlichen Stilldauer (6,5 Monate $\pm$ 1,6 bzw. 6,1 Monate $\pm$ 1,7; p = 0,096), jedoch ein signifikanter Unterschied bezüglich der generellen Stilldauer (11,5 Monate $\pm$ 4,9 bzw. 10,0 Monate $\pm$ 4,0; p = 0,028): Frauen nach einer IVF-/ICSI-Behandlung wiesen eine relevant längere generelle Stilldauer auf als Frauen nach spontaner Konzeption. Bezüglich der Entscheidungsgründe für eine langfristige Stillbeziehung führten Frauen nach IVF/ICSI signifikant häufiger die positiven Einflüsse der Brusternährung auf die Mutter-Kind-Bindung an als in der Vergleichsgruppe (n = 61 vs. n = 44). Der Großteil aller Studienteilnehmerinnen wies einen hohen Bildungsgrad auf; bezüglich weiterer psychosozialer Faktoren, wie elterliche Zugewandtheit, Suchtverhalten oder mütterliches Einkommen, sowie dem Geburtsmodus divergierten beide Untersuchungsgruppen nicht.

Diskussion Diese Ergebnisse zeigen, dass Frauen nach IVF/ICSI-Therapie eine hohe Bereitschaft aufweisen, eine langfristige Stillbeziehung einzugehen, und damit das Ziel einer engen und intensiven Mutter-Kind-Bindung verfolgen. Es konnten keine weiteren Faktoren (Geburtsmodus, elterliche

Zugewandtheit, mütterliche Bildung/Einkommen, Suchtverhalten) ermittelt werden, die im Zusammenhang mit der Konzeption stehen.

Reproduktionsgenetik

V06

Direct Counting of Chromatids in Polar Bodies with Digital PCR – A New Method for Aneuploidy Screening in Oocytes

A. Daser¹, E. Day², H. Turley³, A. Immesberger², T. Haaf⁴, U. Zechner⁵, T. Hahn¹, P. Dear², M. Schorsch¹
¹SH-Gen Forschungsgesellschaft BR, Wiesbaden; ²MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK; ³Kinderwunschzentrum Wiesbaden; ⁴Institut für Humangenetik, Würzburg; ⁵Institut für Humangenetik, Mainz

Introduction Pregnancy and baby take home rates after assisted reproduction are notoriously low. The high frequency of chromosomally abnormal (i. e. aneuploid) oocytes is the major reason for the low success rate. Selection of euploid oocytes is thus an attractive strategy to increase the number of live births following IVF procedures. The ploidy status of oocytes can be indirectly investigated by analysing the chromosome content in polar bodies (PB) I and II. They are products of the first and second meiotic division prior before and after fertilisation; errors in meiotic divisions are due to chromosome non-disjunction or early sister chromatid separation. Investigation of the chromosome content of PB I and II requires techniques which allow investigation of all chromosomes and at a the resolution of chromatids. We have established a method which counts chromatids of all chromosomes directly – molecular copy number counting (MCC) applied to a single cell, in this case polar bodies.

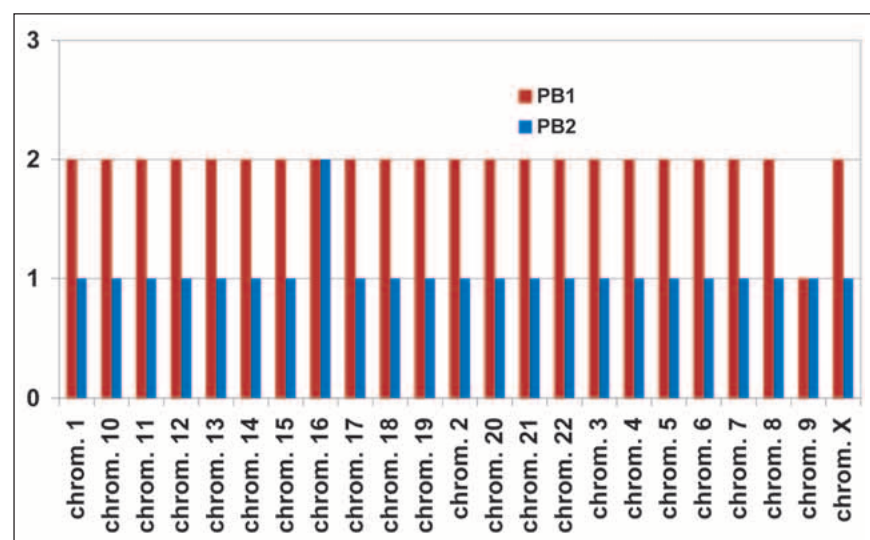


Figure 2: A. Daser et al. (V06).

Materials and Methods PB I and II are digested and each cell lysate is dispensed over 8 PCR reaction wells (aliquots) – leading to single DNA molecules at limiting dilution. After 2 rounds of specific PCR amplification with at least 4 markers per chromosome the amount number of chromatids per chromosome is analyzed.

Results The principle is simple and based on limiting dilution of DNA to a concentration of less than one molecule of DNA per PCR reaction and digital PCR. The amount number of chromatids per chromosome is analyzed by counting the amounts numbers of positive PCR reactions representing target sequences on all chromosomes. To investigate all chromosomes with at least four markers (= 96 markers) two rounds of specific PCR amplifications are required – a first round multiplex PCR containing primers for all markers and a second, specific single marker PCR which is run on the BioMark system from Fluidigm. It provides a fast and convenient PCR system that allows to run and analyse 96 markers with 12 cells à 8 aliquots (= 9216 PCRs) in less than 4 hours. Presence or absence of PCR products is assessed through melting curve analysis (Fig. 2).

In this example two errors occurred: during meiosis I only one chromatid of chromosome 9 segregated into PB1 (red) resulting in a disomy 9 in the oocyte; during meiosis II this error was not compensated and in addition both remaining chromatids of chromosome 16 segregated into PB2 (blue) thus leaving the zygote with a trisomy 9 and a monosomy 16 (in the case of fertilisation with a euploid sperm cell).

Conclusions With a sensitivity at the chromatid level for all chromosomes this new approach is highly suitable for aneuploidy screening in oocytes. The microfluidics device allows analysis of 12 PB at a time thus providing a fast and reasonably priced system.

V07

Non-Invasive Prenatal Detection of Chromosome Aneuploidies Using Next-Generation Sequencing: Rapid Development Towards Clinical Application

M. Stumm¹, M. Entezami¹, N. Trunk², M. Beck³, J. Löcherbach³, R. Becker¹, R. Wegner¹, W. Hofmann¹
¹Zentrum für Pränataldiagnostik und Humangenetik, Berlin; ²Life Codex AG, Konstanz; ³GATC Biotech AG, Konstanz

Objectives The rapid development of next generation sequencing technologies allows now the detection of fetal aneuploidies analysing circulating cell free fetal DNA (ccffDNA) from maternal plasma samples by non-invasive prenatal diagnosis (NIPD). First large scale clinical studies demonstrated that massively parallel sequencing (MPS) of ccffDNA from maternal plasma is a reliable method for non-invasive detection

of trisomy 21. Here we describe the successful application of MPS and the proof of concept study of our modified test system.

Methods Maternal blood samples were recruited from 63 singleton pregnancies. ccffDNA was prepared and analysed using Solexa/Illumina sequencing platforms and work flows. To reduce sequencing costs and increase throughput, samples were barcoded and pooled permitting multiplexed sequencing. To compare the sequence data with the “gold standard”, conventional cytogenetic analysis was performed on cells obtained by chorionic villous sampling or amniocentesis to get the corresponding fetal karyotype.

Results In 42 sequenced samples analysed on Genome AnalyzerIIIX, all trisomy 21 samples (n = 8) were correctly identified and confirmed by conventional cytogenetics. In order to reduce sequencing costs and to increase throughput in the following clinical trial, the samples were barcoded and pooled permitting multiplex analyses on HiSeq2000. These multiplex analyses could reconfirm the results for the detection of trisomy 21.

Conclusions Our sequencing results confirm previous reports that the technical set up for NIPD based on MPS of ccff DNA from maternal plasma allows the reliable detection of trisomy 21. However, further studies are required to improve the quality of this new test system for the detection of a broader spectrum of fetal aneuploidies. A non-invasive prenatal aneuploidy test system would be of great benefit for couples using reproductive medicine technologies allowing a diagnostic follow up without any additional risk for fetal loss.

V08

Etablierung einer Präimplantationsdiagnostik (PID) für Tuberöse Sklerose

T. Harasim¹, A. Wagner¹, K. Mayer¹, W. Würfel², K. Fiedler², G. Krüsmann², R. Suttner², D. Shakeshaft², H. Klein¹, I. Rost¹
¹Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin, Dr. Klein & Dr. Rost, Martinsried; ²Kinderwunsch Centrum München

Fragestellung Ein Ehepaar, bei dem der männliche Partner an Tuberöser Sklerose (TSC) erkrankt ist, stellte sich in unserer genetischen Beratung mit dem Wunsch nach einer PID vor, nachdem ein pränataler Mutationsnachweis bereits zu 2 Schwangerschaftsabbrüchen geführt hatte. Im Vorfeld war beim Indexpatienten eine 4-Basenpaar-Deletion im TSC2-Gen als krankheitsverursachend identifiziert worden. Anhand dieser Erbkrankheit sollte nun überprüft werden, wie sich eines der vielen in unserem Hause etablierten Routine-Mutationsnachweisverfahren an die Anforderungen der Einzelzellanalytik anpassen lässt. Ziel war es somit, einen PCR-Ansatz mit der üblichen Menge an Ausgangsmaterial von ca. 40–100 ng genomischer DNA so herunter zu skalieren, dass eine sichere Analytik mit nur 7 pg DNA

(entspricht dem DNA-Gehalt einer Zelle) durchgeführt werden konnte. Die Leitlinien und Qualitätskriterien für eine amplifikationsbasierte PID sollten ebenfalls eingehalten werden [1].

Methoden Nach eingehender Aufklärung und Einwilligung des ratsuchenden Paares in die Untersuchung und unter Berücksichtigung der medizinisch-ethischen Beurteilung der Gesamtsituation erfolgte die Probenentnahme für die Etablierung des Untersuchungssystems. Die Anforderungen der Einzelzellanalytik umfassten die Etablierung eines familienspezifischen Nachweisverfahrens, welches aus einer direkten Mutationsdetektion (4-Basenpaar-Deletion) und einer indirekten, genetischen Kopplungsanalyse anhand von Mikrosatelliten-Markern (Short Tandem Repeats, STR) bestand. Des Weiteren war es notwendig, Artefakte der Multiplex-Fluoreszenz-PCR weitestgehend auszuschließen und eine Haplotypisierung anhand der DNA aus den beiden vorausgegangen Pränataldiagnostiken durchzuführen. Das entwickelte Nachweissystem wurde mithilfe von mehr als 50 Einzelzellen der Mundschleimhaut des Indexpatienten und seiner Partnerin validiert. Zur Abschätzung der methodischen Robustheit wurde dabei die Rate von Allelic Drop Out (ADO), totalem Amplifikationsversagen (AV), der Experiment-zu-Experiment Variabilität und des Kontaminationsrisikos ermittelt.

Ergebnisse Das hier entwickelte diagnostische Nachweisverfahren konnte erfolgreich und nach den derzeit geltenden Richtlinien der ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) für eine Amplifikations-basierte Präimplantationsdiagnostik auf Einzelzellen angewendet werden. Speziell ist das familienspezifische Nachweissystem mit 3 proximalen und 6 distalen STR-Markern sehr robust und zuverlässig. Dabei konnte insbesondere die krankheitsverursachende 4 Basenpaar-Deletion mittels Fragmentlängenanalyse präzise nachgewiesen werden. Anhand der DNA aus den beiden vorangegangenen Schwangerschaften konnte eine genetische Kopplung der Deletion mit definierten Mikrosatelliten-Markerallelen, welche gemeinsam vererbt werden (= Haplotyp), ermittelt und überprüft werden. Die Auswertung von 378 PCRs aus 50 Einzelzellreaktionen ergab eine ADO-Rate von 2 % (Akzeptanzbereich 10 %) und eine Amplifikationseffizienz von 98 % (Akzeptanzbereich 90 %). Alle mitgeführten NTC („Non Template Controls“) waren negativ.

Schlussfolgerungen Routine-Nachweisverfahren für monogene Erkrankungen wie z. B. TSC müssen für eine familienspezifische PID komplett neu entwickelt werden. Insbesondere die sorgfältige Auswahl der Mikrosatelliten-Marker, die Absicherung des Resultats durch indirekte Konsegregationsanalyse sowie die Validierung des Verfahrens an einer ausreichenden Zahl von Einzelzellen sind für das Erreichen einer hohen diagnostischen Sicherheit und entsprechender Qualitätsstandards unerlässlich.

Literatur:

1. Harton GL, De Rycke M, Fiorentino F, Moutou C, SenGupta S, Traeger-Synodinos J, Harper JC. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD. *Human Reprod* 2010; 26: 33–40.

V09**PID für monogene Erkrankungen nach Polkörper- und/oder Trophektodermiopsie**

A. Hehr¹, B. Paulmann², U. Köhler³, C. Gassner², M. Bals-Pratsch², E. Holinski-Feder³, B. Seifert², U. Hehr¹
¹Zentrum für Humangenetik, Regensburg; ²Kinderwunschzentrum Regensburg; ³Medizinisch Genetisches Zentrum München

Fragestellung Eignung der Polkörperdiagnostik für monogene Erkrankungen und Etablierung der Präimplantationsdiagnostik (PID) nach Trophektodermiopsie. Wir berichten hier über die kumulativen Ergebnisse von 11 Jahren Polkörperdiagnostik für monogene Erkrankungen in Regensburg und über erste Ergebnisse unseres Zentrums zu insgesamt 5 PKD-Zyklen mit zusätzlicher Trophektodermiopsie.

Methode Ergebnisoffene Aufklärung und Einverständniserklärung der Paare über Ablauf, Möglichkeiten und Grenzen der Polkörper- bzw. Trophektodermiopsie, Etablierung eines familienspezifischen Testsystems indirekt mit mindestens 4 eng gekoppelten informativen Markern und bei intragenetischen Mutationen (Missense-Mutationen, kleine Deletionen), mindestens 2 gekoppelten Markern und zusätzlich direkter Mutationsnachweis mittels SnapShot, Sequenzierung oder Fluoreszenz-PCR. Für alle Familien Untersuchung von 1. und 2. Polkörper. Entsprechend Studienprotokoll Weiterkultivierung von solchen Vorkernstadien mit mittels PKD nachgewiesener maternalen Mutation oder unklarem PKD-Ergebnis, Trophektodermiopsie am Tag 5 und molekulargenetische Untersuchung mit dem familienspezifischen PKD-Testsystem zur internen Qualitätskontrolle und Optimierung der molekulargenetischen Analyse von Trophektodermzellen. Die Ergebnisse wurden hinsichtlich Amplifikationseffizienz und Konformität mit den PKD-Daten der entsprechenden Eizellen verglichen.

Ergebnisse Für die Polkörperdiagnostik wurden in 72 PKD-Zyklen insgesamt 752 reife Eizellen entnommen (Ø 10,44 pro Zyklus, Ø Alter der Patientinnen 34,11 Jahre). Für 550 Eizellen konnte der 1. und 2. Polkörper entnommen werden (73,14 %). Von diesen wurden 423 Eizellen mittels PKD diagnostiziert (76,91 %). 169 waren aus genetischer Sicht transferierbar (maternale Mutation lag nicht vor) und 115 Embryonen wurden in 56 Zyklen transferiert (77,78 % Zyklen mit Embryotransfer, Ø 2,05 Embryos pro Zyklus). Daraus resultierten 17 klinische Schwangerschaften (Schwangerschaftsrate 30,36 % pro Zyklus mit Transfer), 14 Kinder wurden geboren (2 × Zwillinge), 2 Schwangerschaften bestehen derzeit, 2 Schwanger-

schaftstests stehen aus, 3 Schwangerschaften endeten mit einem Abort im ersten Trimenon.

Für bisher 5 PKD-Zyklen erfolgte zusätzlich eine Trophektodermiopsie: ausgehend von insgesamt 66 entnommenen Eizellen entwickelten sich 24 Blastozysten (36,4 %), für 16 konnte eine Trophektodermiopsie durchgeführt und für 6 von diesen (37,5 %) ein Amplifikationsergebnis erhalten werden, welches jeweils mit den Ergebnissen der vorangegangenen PKD für die entsprechende Eizelle übereinstimmte.

Schlussfolgerungen Unsere vorläufigen Daten zur Trophektodermiopsieanalyse unterstreichen die Bedeutung der Zellintegrität der Biopsieprobe für die Amplifikationseffizienz der PID-Testsysteme: eine schonende Entnahme der Trophektodermzellen ist nach unseren Erfahrungen entscheidende Voraussetzung für die Durchführung einer PID nach Trophektodermiopsie. Unter den artifiziellen Bedingungen in vitro entwickeln sich nur wenige Eizellen bis zur Blastozyste, deren Anzahl wird durch die zusätzliche genetische Analyse nochmals deutlich weiter reduziert, sodass sich im Vergleich zur PKD der Anteil an Behandlungszyklen ohne Transfer erhöhen sollte. Ebenso muss erst noch an größeren Fallzahlen belegt werden, ob die PID für monogene Erkrankungen an Trophektodermzellen der PKD tatsächlich bzgl. der Schwangerschaftsrate überlegen ist. Vor diesem Hintergrund bieten wir an unserem Zentrum derzeit weiterhin primär die PKD für monogene Erkrankungen an, mit der wir einen Großteil der genetischen Fragestellungen für schwerwiegende monogene Erkrankungen mit guten Behandlungsergebnissen bearbeiten können. Gleichzeitig etablieren wir im Rahmen der bestehenden gesetzlichen Möglichkeiten auch die PID an unserem Zentrum für die Nachuntersuchung von Blastozysten mit unklarem Ergebnis nach PKD sowie für Familien mit ausschließlich über das väterliche Erbgut determinierten autosomal-dominant vererbten Erkrankungen.

V10**FSHB Promotor Polymorphism Influences Male Reproductive Parameters**

F. Tüttelmann¹, N. Terwort², M. Laan³, J. Gromoll⁴
¹Institute of Human Genetics, University of Münster; ²Centre of Reproductive Medicine and Andrology, Münster; ³Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu, Estonia; ⁴Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University of Münster

Background Recently, a single nucleotide polymorphism (SNP) in the FSH (follicle stimulating hormone)-beta gene (FSHB 211G > T, rs10835638) that leads to reduced mRNA transcription was associated with serum FSH levels in an Estonian population cohort of young men [1]. Further investigations showed an increased frequency of the T-allele in patients with oligozoospermia compared to men with normozoospermia

[2]. Another Baltic study [3] revealed significant associations with additional reproductive parameters (e.g. testicular volume). Since the three previous studies are limited to men from the Baltic area, a comparable approach was undertaken with patients from the Centre of Reproductive Medicine in Münster.

Methods A large number of 1213 patients visiting for infertility workup (615 with normal and 598 with reduced sperm concentration, cut-off 20 mill./ml) were retrospectively selected. Patients with known causes for male infertility (e.g. cryptorchidism, infections, chromosomal aberrations) were excluded. The SNP in the FSHB gene was analysed by TaqMan assay.

Results The T-allele frequency was higher in the oligozoospermic group compared with men with normal sperm concentration (18.1% vs 14.7%; $p = 0.023$). The T-allele showed significant dosage effects (each $p < 0.05$) for FSH (-0.56 U/l per T-allele), LH (0.27 U/l) and bi-testicular volume (-5.0 ml). Fitting trends were found for associations with sperm concentration (-7.5 mill/ml; $p = 0.057$) and total sperm count (-24.1 mill/ml; $p = 0.088$).

Conclusions The associations between FSHB genotype and serum FSH as well as testicular volume were confirmed in our study population and further substantiate the FSHB 211G > T SNP as a novel risk factor for male infertility.

Supported by a grant from the Alexander-von-Humboldt foundation.

References:

1. Grigorova M, et al. FSHB promoter polymorphism within evolutionary conserved element is associated with serum FSH level in men. *Hum Reprod* 2008; 23: 2160–6.
2. Grigorova M, et al. Increased Prevalence of the -211 T allele of follicle stimulating hormone (FSH) beta subunit promoter polymorphism and lower serum FSH in infertile men. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 100–8.
3. Grigorova M, et al. Genetically Determined Dosage of Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Affects Male Reproductive Parameters. *J Clin Endocrinol Metab* 2011 [Epub ahead of print].

■ Andrologische Endokrinologie und männliche Fertilitätsstörungen**V11****Untersuchung der Ejakulatqualität nach akuter Epididymoorchitis**

A. Pilatz, F. Wagenlehner, H. Schuppe, W. Weidner
 Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, JLU, Gießen

Fragestellung Zur prospektiven Erfassung der Ejakulatqualität nach akuter unilateraler Epididymoorchitis.

Methodik In einer prospektiven Studie wurde bei 27 Patienten nach leitlinien-

Tabelle 1: A. Pilatz et al. (V11). Veränderung der Ejakulatparameter nach antibiotischer Therapie der akuten Epididymitis

Ejakulatparameter	2 Wochen Median (Range)	12 Wochen Median (Range)	p
Volumen [ml]	2,2 (0,25–8,0)	2,5 (0,5–5,5)	p = 0,5
pH-Wert	8,7 (7,4–9,0)	8,4 (7,6–9,0)	p < 0,05
Spermienkonzentration [Mio/ml]	13,1 (0–66,4)	30,4 (0–148,0)	p < 0,05
Gesamtzahl Spermien [Mio]	31,6 (0–324,8)	58,8 (0–444)	p < 0,05
Globalmotilität [%]	55 (0–85)	59,5 (5–89)	p < 0,05
Normalformen [%]*	3 (0–30)	6 (0–38)	p < 0,05
Peroxidase + Leukozyten [Mio]	0,52 (0–6)	0,08 (0–2,8)	p < 0,05
Elastase [ng/ml]	411 (10–1000)	360 (10–3340)	p < 0,05

*nach strikten Kriterien

gerechter antibiotischer Therapie einer unilateralen Epididymoorchitis die Ejakulatqualität 2 und 12 Wochen nach Erstvorstellung untersucht. Die Bestimmung der Basisparameter Ejakulatvolumen, pH-Wert, Spermienkonzentration, -Motilität und Anteil der Normalformen erfolgte nach WHO-Empfehlungen [WHO 1999], als Entzündungsindikator dienten die Peroxidase pos. Leukozyten und die Granulozytenelastase im Seminalplasma. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Wilcoxon-Test.

Ergebnisse Die Patienten hatten ein medianes Alter von 32 Jahren (Altersspanne: 18–66). Als Pathogen wurden *E. coli* (n = 10), *Chlamydia trachomatis* (n = 2) sowie in 15 Fällen kein Erreger nachgewiesen (davon 8 Patienten antibiotisch vorbehandelt). Es zeigte sich eine signifikante Abnahme des pH-Wertes, der Leukozyten und der Granulozytenelastase bei einer signifikanten Verbesserung der Spermienkonzentration, der Spermiengesamtzahl, der Globalmotilität und des Anteils der Normalformen nach strikten Kriterien im zeitlichen Verlauf. Ein Patient entwickelte nach akuter unilateraler Epididymitis eine persistierende Azoospermie.

Schlussfolgerung Unter leitliniengerechter antibiotischer Therapie der akuten Epididymoorchitis kommt es nach Behandlung zu einer signifikanten Verbesserung der Ejakulatqualität. Eine irreversible Azoospermie ist die Ausnahme (Tab. 1).

V12

Auto-Antibodies Against Disulfide Isomerase ER-60 as a Possible Diagnostic Marker in Male Immunological Infertility

M. Fijak¹, T. Zeller², T. Petry¹, J. Klug¹, E. Schneider¹, G. Haid³, J. Allam³, A. Pilatz⁴, W. Weidner¹, H. Schuppe⁴, A. Meinhardt¹

¹Department of Anatomy and Cell Biology, JLU, Gießen; ²R&D Department, DRG Instruments GmbH, Marburg-Gießen; ³Department of Dermatology, Andrology Unit, University of Bonn; ⁴Department of Urology, Pediatric Urology and Andrology, JLU, Gießen

Infection and inflammation of the male genital tract have been reported in up to 15% of cases as main aetiologies of fertility distur-

bances in men. In the majority of these patients, however, diagnosis is hampered by an asymptomatic course of the disease, especially subacute or chronic inflammatory conditions in the testis and/or epididymis remain obscure. Specific seminal or serological markers are not yet available; hence, definitive diagnosis of suspected chronic testicular inflammation is based only on invasive testicular biopsy. In this study we conducted experiments to identify possible diagnostic markers of chronic testicular inflammation. By proteomic approach using high resolution 2D-SDS-PAGE and immunoblotting followed by mass spectrometry, we have identified three proteins (disulfide isomerase ER-60, transferrin, TCP-1) as immunodominant antigens recognized by auto-antibodies in sera from patients with testicular inflammation. Of note, ER-60 was also identified previously as an auto-antigen in a rodent model of experimental testicular inflammation. To establish an immunodiagnostic assay highly purified recombinant human ER-60 (recognized by 92% of sera from patients with testicular inflammation) was selected and used for an ELISA development. Sera from the following groups were screened: healthy normozoospermic men (n = 22, control group 1); male blood donors (n = 14, control group 2); patients with impaired semen quality according to WHO reference values, without symptoms of genital tract infection/inflammation (n = 16, group 3); patients similar to group 3, but with symptoms of genital tract infection/inflammation (n = 22, group 4); patients with chronic testicular inflammation confirmed by testicular biopsy (n = 15, group 5); patients after pharmacotherapy of genital tract infection/inflammation (n = 15, group 6); patients with acute epididymo-orchitis (n = 31, group 7). Significantly elevated titers of auto-antibodies against ER-60 were found in the sera from infertile men with chronic testicular inflammation confirmed by testicular biopsies (group 5; p < 0.001) and patients suffering from acute epididymo-orchitis (group 7; p < 0.05) as compared to healthy normozoospermic man (group 1) and male blood donors with unknown fertility status (group 2). Compared to group 5 and 7 significantly lower levels of anti-ER-60 antibodies were measured in the sera from pa-

tients after the use of anti-inflammatory pharmacotherapy (group 6, p < 0.001). Important to note that sera from other investigated groups such as patients with impaired spermatogenesis (group 3) or patients with symptoms of genital tract infection/inflammation (group 4) did not significantly differ from those of the control groups.

Our preliminary results show that determination of ER-60 auto-antibodies in serum may be a promising marker for the diagnosis of asymptomatic inflammatory processes in the testis among infertile men. Moreover, the ELISA-based detection of anti-ER-60 reactivity in serum might offer a novel non-invasive approach to unravel silent testicular inflammation as main cause or co-factor of male fertility disorders previously classified “idiopathic”.

V13

High Prevalence and Interaction of Hypogonadism and the Metabolic Syndrome in Long-Term Survivors with Germ Cell Tumours

M. Zitzmann¹, F. Gottardo¹, L. Grunwald¹, A. Secker², S. Kliesch¹

¹Klinische Andrologie, Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie; ²Klinik für Urologie, Universitätsklinikum Münster

Introduction and Objectives Testicular cancer survivors (TCS) are at risk to develop premature testosterone deficiency (TD). Age-adjusted ratio is 3.8 and increases with the intensity of treatment. Cardiovascular morbidity is also increased and probably mediated via the metabolic syndrome (MS). To date, two studies found a strong inverse association between total testosterone (T) levels and the prevalence of MS in TCS, but the clinical and biochemical components of TD and MS have not been thoroughly described in such patients. Some of the most recent guidelines mention these topics but still provide no details on how to monitor MS and/or TD among TCS. Thus, we assessed the prevalence of TD and MS in a cohort of long-term TCS trying to define which parameters are likely to predict the risk for developing TD and/or MS.

Material and Methods 163 TCS treated between 1985 and 2009 at the Department of Urology or at the Dpt. of Andrology of the University of Muenster took part in the study. Tumour characteristics and type of treatment were collected from patients records. Patients were clinically investigated, sex hormones and biochemical parameters were measured in fasting morning blood samples, MS was defined according to the harmonized criteria of 2009 (IDF&NCEP). Intima-media thickness of carotid arteries was measured. Validated German Questionnaires of AMS scale and IIEF 15 were administered.

Results Mean age at presentation was 40.3 ± 8.4 yrs and median follow-up was 7 yrs (range 1–24 yrs). 102/163 pts. (62.6%) had received adjuvant polychemotherapy, 49

(30%) a retroperitoneal radiotherapy. 15 pts. had undergone bilateral orchiectomy and are under T substitution, 24 pts. with unilateral tumour were at the time of the study already under T substitution. 39/163 pts. (23.9%) had a total T level of < 12 nmol/l. 57/163 pts. (35.0%) fulfilled the criteria for the MS. In multivariate models correcting for age and therapy, waist circumference, high triglyceride levels and decreased insulin sensitivity (QUICKI-method) were markedly associated with low testosterone levels ($p = 0.006$, $p = 0.005$ and $p = 0.002$, respectively). TD was predictive for the overall presence of the MS ($p = 0.01$) and for the number of fulfilled criteria ($p = 0.01$). Tumour characteristics and type of chemotherapy were not associated with a increased risk to develop TD. $T < 12$ nmol/l was significantly associated with lower hemoglobin and hematocrit levels, lower sexual drive (SD) and lower intensity of sexuality (IS) of IIEF15.

Conclusions Our data confirm the high prevalence of TD and MS in long-term TCS. We demonstrate that TD predicts the occurrence of MS. Pivotal clinical and biochemical components of TD as well as the MS are strongly exhibited in TCS. TCS should be closely monitored beyond a 10-years-follow-up-period and according to risk-prediction models encompassing pertinent markers for both clinical entities, TD and MS. This could help to identify patients who could benefit from an early T replacement, thus improving their quality of life and probably reducing their cardiovascular risk.

V14

Junge Klinefelter-Patienten haben bessere Chancen für eine erfolgreiche mikrochirurgische testikuläre Spermienextraktion (M-TESE): Auswertung prädiktiver Parameter für eine positive M-TESE

B. Bongers, F. Gottardo, M. Zitzmann, S. Kliesch
Klinische Andrologie, Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster

Einleitung Das Klinefelter-Syndrom (KS) als häufigste numerische Chromosomenaberration geht mit einer irreversiblen Fertilitätsschädigung bei 97 % der Betroffenen einher. Für die Patienten besteht die Möglichkeit der M-TESE und bei einem positiven Befund die Option einer späteren intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI).

Material und Methoden Wir haben konsekutiv alle seit Einführung der mikrochirurgischen TESE ab Juni 2008 durchgeführten M-TESE-Prozeduren an 47 KS-Patienten (Karyotyp 47,XXY; keine Mosaiken) bis einschließlich 2011 ausgewertet. Untersucht wurde die Korrelation zwischen dem Nachweis von Spermatozoen in den ausgewerteten Anteilen der M-TESE-Proben und Alter, Maldescensus testis, präoperativen Hormonparametern sowie der hormonellen Vorbehandlung.

Ergebnisse Bei 40 % (19/47) der Patienten konnten zwischen 1–84 Spermien (16 ± 23

Spermien, Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) kryokonserviert werden (Gruppe 1). In 60 % (28/47) waren keine Spermien nachweisbar (Gruppe 2). In einer binomialen Regressionsanalyse fanden sich niedrigeres Alter (22 ± 8 vs. 27 ± 8 Jahre), präoperative Testosteronwerte $\geq 7,5$ nmol/l und präoperative hCG-Behandlung als Prädiktoren für eine erfolgreiche M-TESE ($p = 0,05$; $p = 0,009$ bzw. $p = 0,07$). Bei einem präoperativen Testosteronwert $< 7,5$ nmol/l ($n = 7$) wurden keine Spermien gefunden. Im χ^2 -Test ist bei Testosteronwerten $\geq 7,5$ nmol/l die Chance Spermien zu finden 1,9-fach höher ($p = 0,03$; 95 %-CI: 1,4–2,6). Insgesamt hatten 15 Patienten eine exogene Testosteronvorbehandlung, die mindestens 3 Monate vor der Operation pausiert wurde.

Schlussfolgerung Die Option der M-TESE als Zeugungsreserve sollte möglichst schon jungen KS-Patienten eröffnet werden. Präoperative Testosteronwerte $\geq 7,5$ nmol/l haben einen positiven Einfluss auf das Ergebnis. Eine bereits eingeleitete Testosteronbehandlung, die mindestens 3 Monate präoperativ pausiert wurde, scheint bei der geringen Fallzahl keinen negativen Effekt zu haben.

V15

Aktueller Stand der Genitalrekonstruktion bei Frau-zu-Mann-Transsexuellen

K. Wirsam¹, M. Sohn¹, K. Exner²
¹Urologische Klinik; ²Klinik für Plastische und Wiederherstellungs-Chirurgie, Markus-Krankenhaus, Frankfurt

Fragestellung Seit 1984 haben sich Penoid-Rekonstruktionen aus freiem, mikrochirurgisch transplantiertem Unterarmappen als Methode der Wahl zur Penisrekonstruktion weltweit durchgesetzt. Nach 20 Jahren Erfahrung mit dieser Technik soll die Technik des Genitalaufbaus sowie die typischen Komplikationen dargestellt werden.

Methoden Von 1990–2010 wurden in Kooperation mit der Plastischen Chirurgie bei 160 Patienten Radialis Penoiden rekonstruiert, hiervon in 150 Fällen bei Frau-zu-Mann-Transsexuellen. Nach Heilung der Harnröhre und Rückkehr der Sensibilität wurde bei bisher 93 Patienten eine vollständige prothetische Versorgung des Penoids und des Neoskrotums vorgenommen. Insgesamt waren 743 Eingriffe erforderlich.

Ergebnisse Harnröhren- und Prothetik-Komplikationen verursachen die hohe Rate an Revisionseingriffen. Auch aus den wenigen anderen europäischen Zentren, die diese Eingriffe in nennenswerter Zahl durchführen, sind ähnliche Komplikationsraten in den vergangenen Jahren berichtet worden. Trotz der aufwendigen, mehrzeitigen Operationsplanung ist die subjektive Zufriedenheit der Betroffenen mit über 80 % hoch.

Schlussfolgerung Die Rekonstruktion des männlichen Genitals kann bei Anwendung des mikrochirurgisch transplantierten Unterarmappens in Kooperation zwischen Urolo-

gen und Plastischen Chirurgen mit reproduzierbarem Resultat realisiert werden, wobei die prothetische Versorgung auch die sexuelle Funktion wiederherstellen kann. Die operativen Techniken können auch bei Zustand nach traumatischem oder iatrogenem Penisverlust in ähnlicher Technik angewandt werden.

V16

Das Sexualdelikt in der gerichtlichen Medizin – ein historischer Rückblick auf die Entwicklung der forensischen Spurenanalytik

K. Albrecht¹, A. Debertin¹, D. Schultheiss², S. Ueckert³
¹Institut für Rechtsmedizin, Klinik für Urologie, Medizinische Hochschule Hannover; ²Urologische Belegabteilung, Evangelisches Krankenhaus Gießen; ³Klinik für Urologie, Medizinische Hochschule Hannover

Fragestellung Die körperliche Untersuchung von geschädigten und beschuldigten Personen bezüglich des forensischen Nachweises eines vermeintlich stattgehabten Sexualdeliktes gehört zu den Kernaufgaben der gerichtlichen Medizin. Das Untersuchungsspektrum reicht von der Erhebung genitaler Befunde bei beiden Geschlechtern, über die Erfassung extragenitaler Verletzungen bis hin zur Spurensicherung. Insbesondere vor dem Hintergrund der Spurenbearbeitung und -auswertung wurden in den vergangenen Jahrzehnten unterschiedliche Methoden publiziert.

Methodik In der Präsentation wird ein Rückblick über die Erhebung und Bewertung von forensisch wichtigen Befunden, welche im Rahmen eines angeschuldigten Sexualdeliktes erhoben werden können, gegeben, wobei der Fokus auf die Entwicklung der spurenkundlichen Methodik gerichtet ist.

Ergebnisse Der sichere strafrechtliche Beweis für einen sexuellen Kontakt zwischen Täter und Opfer kann dadurch erbracht werden, indem fremdes Spurenmaterial im oder am Körper der geschädigten Person festgestellt wird. Begleitend zur körperlichen Untersuchung mit entsprechender Dokumentation, muss insbesondere das Spurenmaterial sachgerecht asserviert, aufgearbeitet und ausgewertet werden. Neben der Möglichkeit, lichtmikroskopisch Spermatozoen nachzuweisen, stehen seit mehr als 80 Jahren insbesondere Verfahren zum Nachweis von Inhaltsstoffen des Ejakulats im Falle einer Azoospermie und der Individualzuordnung von Körperzellen im Blickpunkt der forensischen Fachberichte. Vor Beginn des 20. Jahrhunderts etablierten sich deskriptive, mechanische und chemische Analysen, wie die „Florence-Reaktion“, bei forensischen Untersuchungen spermaverdächtigter Spuren. Neben Paul Uhlenhuth, welcher die nach ihm benannte Methode einer Präzipitinreaktion an Blutproben im Jahr 1901 veröffentlichte und gleichsam mit Antiseren gegen Spermaproteine experimentierte, beschäftigte sich Karl Landsteiner (Entdecker des ABO-Blutgruppensystems, Nobelpreis-

träger von 1930) mit den Blutgruppeneigenschaften humaner Samenzellen vor dem Hintergrund der Individualtypisierung. Der andrologische Ansatz zur Untersuchung des seminalen Plasmas fällt in die 1930er-Jahre und beschreibt den biochemischen Nachweis der sauren Phosphatase. Versuchsreihen erfolgten insbesondere an Ejakulatproben von Männern mit zuvor diagnostizierter Azoospermie. Diese Methode gehört auch noch in der modernen Rechtsmedizin zu den gängigen Voruntersuchungen im Rahmen der Begutachtung von Opfern sexueller Gewalt. Im Jahr 2002 präsentierte Sato den sog. „SMITEST“ zur Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA) in der Samenflüssigkeit und im Urin. Der Nachweis von körperfremden Zellen eines Spurenlegers ist im Zeitalter molekularbiologischer Identifizierungsverfahren nahezu problemlos möglich. Seit der Entdeckung individualtypischer DNA-Sequenzen durch Jeffreys et al. im Jahr 1985, etablierte sich der sog. „DNA-fingerprint“ in der forensischen Spurenanalytik. Zuvor wurden mikroskopische Methoden präsentiert, welche beispielsweise die individuellen Färbereigenschaften von Körperzellen darstellten. Eine verbreitete Methode war die Anfärbung peniler Abriebe mittels Lugol'scher Lösung, welche glykogenhaltige Vaginalepithelzellen bräunlich anfärbte. Neuere experimentelle Abhandlungen beschreiben die Möglichkeit des Nachweises von selektiven Phosphodiesterase-Isoenzymen in vaginalen Epithelzellen. Eine Besonderheit in der forensischen Spurenkunde stellt der Nachweis der Benutzung eines Kondoms dar. Hierbei erfolgte der Versuch, am vaginalen Abstrichmaterial typische in der Kondomherstellung eingesetzte Begleitstoffe lichtmikroskopisch nachzuweisen. Diesbezüglich wurde im Jahr 1993 der Nachweis von sogenannten „Bärlappsporen“ (*Lycopodium clavatum*) präsentiert, welche mikroskopisch im pudrigen Trennmittel von Latexkondomen sichtbar waren.

Schlussfolgerungen Die Begutachtung von Sexualdelikten gehört zur Routinetätigkeit des Gerichtsmediziners. Neben der Erfassung von körperlichen Verletzungen stellt insbesondere die Spurenanalytik einen wichtigen Bestandteil der Beweissicherung dar. In der Vergangenheit bestand, unabhängig vom lichtmikroskopischen Nachweis von Spermatozoen, eine besondere Herausforderung in der forensisch sicheren Verifizierung körperfremder Materialien, u. a. durch chemische- und Färbeverfahren; Methoden, die heutzutage, bei Nachweis von DNA-fähigem Spurenmaterial, nahezu vollständig von der molekularbiologischen Analytik abgelöst wurden und nur noch als orientierende „Vor-tests“ Anwendung finden.

■ Reproduktionsbiologie

V17

Development of Mouse Fetuses after Embryo Culture in Different Media

S. Hemkemeyer¹, C. Schwarzer², M. Boian², J. Ehmcke¹, T. Esteves², V. Nordhoff¹, S. Schlatt¹
¹Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University of Münster; ²Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, Münster

Introduction In Europe 1.0–4.1% newborn infants are conceived with the help of Assisted Reproductive Technologies. Several recent studies present data indicating that ART-embryos show differences compared to in vivo-embryos. Suboptimal embryo culture conditions are considered, among other factors, as responsible for these traits of ART embryos.

To date, the sole functional assay for testing the quality of human embryo culture media prior to clinical use is the mouse embryo assay: Embryos are evaluated up to the blastocyst stage in vitro but are mostly not followed up in vivo. In our project we analyse pre- and post-implantation development of mouse embryos and the effects of culture media. The study exposed differences in pre- and post-implantation development (blastocyst/implantation/fetal rate) after culture of zygotes in 13 commercially available human IVF culture media.

The aim of the present study was to investigate the fetal development and to gather systematic information on the effect of culture media on ontogenesis. We hypothesized that embryo culture media differ in their interference with post-implantation fetal development, as detectable by gross anatomical or histological abnormalities.

Material and Methods B6C3F1 females were mated to CD1 or C57Bl/6 males, zygotes were flushed from oviducts at embryonic-day (E)0.5, and were cultured or promptly transferred to pseudopregnant CD1 females. Experimental groups were established (B6C3F1xC57Bl/6), as follows: 1. mating followed by in vivo pre- and post-implantation development; 2. mating followed by embryo recovery in HCZB medium and direct embryo transfer into pseudopregnant CD1 females (no-culture-condition); 3. mating followed by embryo recovery in HCZB medium, culture in human IVF medium ISM1/ISM2 (Origio) until E3.5 and embryo-transfer into pseudopregnant CD1 females; 4. as group 3, but using human HTF/Multiblast (IrvineScientific); 5. as group 3, but using KSOM(aa) medium; 6. as group 3, but using Whitten's medium. At E15.5 fetuses were recovered by caesarean-section and analysed for body weight, crown-rump-length (CRL) and Theiler-Stage. Anatomical features were analyzed in sagittal sections and AlcianBlue/AlizarinRed-stained whole mount preparations of fetuses; length of femur, fibula, tibia, humerus, ulna

and radius was determined and extend of ossification was evaluated. For statistical analysis Student's T-test or Kruskal-Wallis, Dunn's post-hoc test was performed.

Results The determined developmental stage for all fetuses was Theiler-Stage 23. Fetuses without embryo culture from two different genetic backgrounds showed a significant difference in body weight (mean 395 mg and 506 mg in fetuses from B6C3F1xC57Bl/6 and B6C3F1xC57Bl/6, respectively, $p \leq 0.01$) but no significant difference in CRL ($p = 0.055$).

No significant differences were found between the media culture groups and no-culture-condition concerning the fetal body weight (B6C3F1xC57Bl/6; Kruskal-Wallis $p < 0.0001$, Dunn's $p > 0.05$). Fetuses from in vitro-cultured-embryos showed a significantly higher weight compared to in vivo (Dunn's $p < 0.05$), only exception was the Whitten's medium.

Regarding the CRL the no-culture-condition differed significantly from the KSOM(aa) group (B6C3F1xC57Bl/6; Kruskal-Wallis $p < 0.0001$, Dunn's $p < 0.05$) and KSOM(aa) fetuses had a significantly higher CRL than Whitten's fetuses (Dunn's $p < 0.05$). All other media groups showed no significant differences among each other (Dunn's $p > 0.05$). KSOM(aa), ISM1/ISM2 and HTF/Multiblast differed from the in vivo group (Dunn's $p < 0.05$).

Analysis of the histological tissue sections showed no detectable pathologies in any of the groups. Furthermore, no changes in skeletal development, bone length and ossification extend were observed among groups.

Conclusion Mouse fetuses derived after embryo culture and embryo transfer show a significant increase in body weight compared to in vivo-derived fetuses. However, analysis of Theiler stage, histology and skeletal development reveals no significant deviation from the normal parameters. This indicates that embryo culture has no impact on the anatomical features of mouse fetuses: This stands in contrast with the fact that differences in pre-implantation development of mouse embryos were observed in the first part of our study.

V18

Veränderte Expression der Hedgehog Gene Sonic und Indian in in vitro kultivierten Maus-embryonen

D. Baston-Büst, D. Ziegler, N. Pfeifer, O. Altergot, S. Bötdeker, W. Janni, J. Hirschhain, J. Krüssel, A. Hess
 Frauenklinik, Universitätsklinik Düsseldorf

Fragestellung Die extrakorporale Kultur der Embryonen stellt bei der Assistierte Reproduktion einen sehr sensiblen Bereich dar, bei dem bis heute versucht wird, die natürliche In-vivo-Situation durch geeignete Medien nachzuahmen. Eine Untersuchung

von 2010 betreffend humaner ART konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem verwendeten Medium und dem resultierenden Geburtsgewicht der Kinder aufzeigen, sodass die Wichtigkeit der Forschung auf diesem Gebiet deutlich wird [Human Reproduction 2010; 25: 605–12]. In Säugtieren sind 3 Homologe der Hedgehog- (hh-) Genfamilie bekannt: Sonic (shh), Indian (ihh) und Desert Hedgehog (dhh). Aufgrund der frühen Transkription im Embryo beschränkt sich die hier vorgestellte Studie auf Untersuchungen zu shh und ihh. Die Expression von Shh beginnt kurz nach der Gastrulation im späteren Mittellinienmesoderm (Notochord) und ist unter anderem in frühen Embryonalstadien für die Rechts-Links-Musterbildung verantwortlich. In späteren Stadien spielt es eine Schlüsselrolle in der Entwicklung des Neuralrohres, der Gliedmaßen, epithelialer Organe (z. B. Haut, Lunge, Magen-Darm-Trakt) sowie der Somiten. Ihh wird in der Embryonalentwicklung in den Knochenanlagen während der enchondralen Ossifikation exprimiert und reguliert die Chondrozytenproliferation und -differenzierung. Des Weiteren stimuliert IHH die Angiogenese im Dottersack (extraembryonales Endoderm). Ziel dieser Studie ist die Ermittlung des Einflusses der In-vitro-Kultur von Mausembryonen (Tag 0,5 *post coitum* [pc] bis Tag 3,5) in 2 verschiedenen Medien (Cleavage Medium COOK® vs. G1-v5 Vitrolife™) auf die mRNA- und Proteinexpression von shh und ihh während der Embryonalentwicklung gegenüber einem in vivo belassenen Kontrollkollektiv.

Methoden In-vitro-Kultur von Mausembryonen bis zum Blastozystenstadium (Tag 0,5 bis 3,5 pc) vs. Isolation von Mausembryonen an Tag 3,5 pc für das In-vivo-Kollektiv; Reverse Transkription einzelner Mausblastozysten zur Wahrung der Individualität; Polymerasekettenreaktion (PCR) für beta-Aktin als Kontrollgen und „nested-Real-Time PCR“ für shh und ihh; Untersuchung der Proteinexpression von shh und ihh mittels Immunhistochemie nach Retransfer von in vitro kultivierten Mausembryonen (Tag 8–13 pc bzw. nach Geburt); Knochen-Knopfel-Färbung an neugeborenen Mäusen.

Ergebnisse Signifikante Veränderungen der shh- und ihh-mRNA-Expression in einzeln untersuchten Mausblastozysten an Tag 3,5 pc beim Vergleich in vivo vs. in vitro kultivierter Embryonen gegen beta-Aktin als Haushaltsgen (Anzahl je Kollektiv > 15). Sowohl bei Betrachtung von shh- als auch ihh-mRNA in den in Vitrolife™ G1-v5-Medium-inkubierten Embryonen fiel hier der größte Unterschied in der Expression mit einer bis zu 27-fachen Steigerung im Fall von shh und einer Reduktion auf 1/3 gegenüber des In-vivo-Kollektivs für ihh auf. In den in COOK®-Medium inkubierten Embryonen konnte eine Erhöhung der shh-mRNA auf das 6-Fache und eine Reduktion um fast die Hälfte für ihh-mRNA festgestellt werden. Die Immunhistochemie für shh und ihh konnte bereits an Darm und Gehirn als Gewebe der Wahl erfolgreich etabliert werden,

ebenso wie die Durchführung der Knochen-Knopfel-Färbung.

Schlussfolgerung Heutzutage weist die extrakorporale Kultur von Embryonen immer noch Unterschiede zur physiologischen Entwicklung in vivo auf, sodass mit dem heutigen Stand der Technik die Physiologie des weiblichen Reproduktionstrakts noch nicht imitiert werden kann.

Finanziell unterstützt von Merck-Serono.

V19

Non-Invasive Assessment of Inner Mitochondrial Redox Potential of Vitrified Metaphase II Oocytes or Germinal Vesicle Oocytes Vitrified Within Preantral Follicles

T. Trapphoff, P. Treffon, N. Staubach, U. Eichenlaub-Ritter

Faculty of Biology, Gene Technology/Microbiology, University of Bielefeld

Introduction Although healthy life births have been obtained from vitrified human metaphase II oocytes, further assessment of risks by vitrification at different stages of oogenesis is required. Oxidative stress by cryopreservation may affect mitochondrial function, chromosome segregation, fertilization, or development. Glutathione (gamma-glutamylcysteinylglycine, GSH), a thiol tripeptide, is the major mitochondrial redox buffer and a central element in oocyte antioxidant defence (1). In order to study disturbances in the mitochondrial glutathione redox potential (E^m_{GSH}) by vitrification at different stages and in dependence of GSH donor in medium we established a non-invasive in vivo fluorescence based assay to assess safety of vitrification for clinical applications.

Methods Glutaredoxin-1 (Grx1) interacting with the GSH/GSSG system and the redox sensitive roGFP2 were cloned into a pspO-vector with a mitochondrial signal sequence for live imaging of E^m_{GSH} in mouse oocytes microinjected with in vitro transcribed, polyadenylated message [1, 2]. After 8 hour arrest by 1 microM cilostamide GV oocytes matured in absence or presence of glutathione donor (1 mM glutathione ethyl ester; GSH-Oet) for 16 hours followed by vitrification at MII stage by CryoTop [3, 4]. E^m_{GSH} was determined in MII oocytes by confocal laser scanning microscopy (CLSM) [1, 2].

A novel method of microinjection of message into GV stage oocytes within preantral follicles was established and E^m_{GSH} was studied in control and vitrified GV stage oocytes from C57Bl6xCBA/Ca mice throughout follicle culture [4] up to in vitro ovulation of MII oocytes.

Results The Mito-Grx1-roGFP2 fusion protein was efficiently expressed in microinjected oocytes. Double labelling by MitoTracker and Mito-Grx1-roGFP2 re-

vealed fusion protein in mitochondria. Mitochondria were enriched in the vicinity of the MII spindle after in vitro maturation. The amount of oxidized sensor was $57.5 \pm 2.7\%$ ($n = 50$) in control and $65.7 \pm 2.4\%$ ($n = 33$) in vitrified MII oocytes of MF1 mice, corresponding to E^m_{GSH} of -334.1 ± 1.7 mV and -329.2 ± 1.5 mV, respectively, significantly different from each other ($p < 0.05$). Preliminary results for E^m_{GSH} in control oocytes of MF1 females matured in absence or presence of the glutathione-donor revealed no difference.

In the second experimental approach Mito-Grx1-roGFP2 fusion protein was detected already 48 hours after microinjection of message into the ooplasm of immature GV oocytes within preantral follicles. The E^m_{GSH} was determined and corresponds to -338.8 ± 26.9 mV, suggesting it is more negative than in fully grown and matured MII oocytes of the same strain or MF1 mice.

Conclusion This is the first time that E^m_{GSH} has been determined in living GV stage oocytes implying that development and genetic background influence E^m_{GSH} . There was evidence for a small but significant alteration in E^m_{GSH} after CryoTop vitrification at MII stage suggesting that mitochondrial activity and ATP production may be decreased by vitrification. Within a clinical background of sufficient numbers of mitochondria in young, healthy oocytes this may not be critical for fertilization and developmental potential but appears more relevant for aged oocytes containing close to threshold numbers of functional mitochondria that are required for normal maturation and fertilization. It is now feasible to analyse influences of different in vitro growth and maturation conditions, oocyte ageing or cryopreservation procedures on E^m_{GSH} to improve safety in ART.

(Supported by DFG; FOR 1041)

References:

1. Eichenlaub-Ritter U, et al. Age related changes in mitochondrial function and new approaches to study redox regulation in mammalian oocytes in response to age or maturation conditions. Mitochondrion 2011; Mitochondrion 2011; 11: 783–96.
2. Tatone C, et al. Evidence that carbonyl stress by methylglyoxal exposure induces DNA damage and spindle aberrations, affects mitochondrial integrity in mammalian oocytes and contributes to oocyte ageing. Hum Reprod 2011; 26: 1843–59.
3. Kuwayama M, et al. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. Theriogenology 2007; 67: 73–80.
4. Trapphoff T, et al. DNA integrity, growth pattern, spindle formation, chromosomal constitution and imprinting patterns of mouse oocytes from vitrified pre-antral follicles. Hum Reprod 2010; 25: 3025–42.

V20

Six Years of Routine Vitrification of 2PN Oocytes: Embryo Survival and Follow-up

D. Beyer, K. Diedrich, G. Griesinger, S. Al Hasani, B. Schöpper, M. Schultze-Mosgau
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

Purpose To evaluate the impact of cold-storage duration, patients' age and number of transferred embryos on survival rate and pregnancy rate after vitrification of 2PN oocytes.

Methods Retrospective cohort analysis of $n = 704$ thawing cycles performed between 2004 and 2010. The results were analyzed dividing the cycles according to: cold-storage duration (< 365 d, > 365 d), patients age (< 30 yrs, 30–34 yrs, 35–40 yrs, > 40 yrs), the transferred embryos (1, 2, 3). Primary outcome was defined as: survival rate of 2PN oocytes after thawing, implantation rate (IR) per transferred embryo and clinical pregnancy rate (CPR).

Results In 576 thawed cycles warming 1349 2PN oocytes the survival rate of the 2 PN oocytes was 89, 39%. Similar results concerning the survival rates of the 2PN oocytes after thawing for all age groups (< 30 yrs: 85,67%, 30–34 yrs: 89,21%, 35–40 yrs: 91,8%, > 40 yrs: 99,9%) could be seen. Clinical pregnancy rate decreased with age: CPR < 30 : 28,6%, 30–34 yrs: 16,5%, 35–40 yrs: 9,2%, > 40 yrs: 5,8%. Creating two groups of cold-storage duration (< 365 d and > 365 d) the clinical pregnancy rate was stable at 17,5% vs 16,4%.

Conclusion Cold-storage duration itself seems of no significant influence on pregnancy rate. Undoubtedly, age is a limiting factor in assisted reproduction what can be seen through decreasing PR by increasing age.

V21

Polarisation Microscopy for Exact Timing of ICSI Increases the Time From Ovum Pick-up Until Injection

V. Nordhoff¹, S. Schlatt¹, A. Schüring², L. Kiesel¹, S. Kliesch¹

¹Klinische Andrologie, Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie; ²Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Münster

Introduction The exact timing of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) plays a pivotal role for good success rates. An oocyte with extruded first polar body seems to be in metaphase II (MII), but new techniques as polarisation microscopy can allocate the oocyte to its specific phase of the meiotic cycle due to visualisation of the spindle (Octax, PolarAIDE™). During meiosis the spindle can be visualized as follows: in telophase I (TI) the spindle is located in the cytoplasmic bridge between first polar body and oocyte, in prophase II (PII) the spindle disappears for about 1–2h and reappears in the cytoplasm in metaphase II (MII).

Material and Methods We evaluated 53 ICSI cycles from January to March 2008 (G1) where light microscopy was used to grade the oocytes and compared them to 46 ICSI cycles from January to March 2009 (G2) in which grading of oocytes was done in addition also with PolarAIDE™. Oocytes were denuded 15–60 min after ovum pick-up (OPU) and were grouped by light microscopy according to their maturity status into germinal vesicle (GV), MI and MII oocytes. All oocytes were incubated in single drops.

Results In G1 we aspirated 611 oocytes in 53 cycles (11.3/cycle). Median time of ovum pick-up (OPU) was $35:35 \text{ h} \pm 0:17 \text{ h}$ post hCG injection. In G2 we obtained 503 oocytes in 46 ICSI cycles (10.9/cycle). Mean time of OPU was $35:32 \text{ h} \pm 0:21 \text{ h}$ post hCG. Both groups showed by light microscopy equal amounts of oocytes which exhibited a first polar body (G1: 78.56% vs G2: 79.52%).

The amount of GV, MI and other oocytes (e.g. degenerated) was not different in G1 in comparison to G2 (GV: 2.98% vs 7.35%; MI: 9.49% vs 10.14%; others: 8.51% vs 7.36%). Until time point of ICSI, 18 additional oocytes gained a polar body in G1 (498/611, 81.51%). Injection was performed $4:35 \text{ h} \pm 1:7 \text{ h}$ after OPU. In G2, 17 additional oocytes gained a polar body at time point of ICSI (417/503, 82.5%). Interestingly by applying polarisation microscopy in G2 only 226 from 415 oocytes with polar body exhibited a metaphase II spindle (54.2%) while 175/415 (41.97%) had no spindle considering them to be still in prophase II. Another 16/415 (3.84%) were in telophase I. These findings led us to the decision either to inject directly or to wait for further maturation. Longest waiting time was 7:40 h after OPU. Mean time point of injection was $5:19 \text{ h} \pm 1:14 \text{ h}$ after OPU, which means 44 min later compared to G1. Still we were able to reach equal fertilisation rates of 59.3% in G1 vs 61.6% in G2. Interestingly aberrant fertilisation with one pronucleus (1PN) was significantly higher in G1 in comparison to G2 (9.72% vs 3.54%; $p < 0.001$) while the formation of three pronuclei (3PN) was lower in G1 compared to G2 (3.04% and 5.42%; $p = 0.07$). Clinical pregnancy rates were equal in both groups.

Conclusion The allocation of the oocytes to their meiotic phase by polarisation microscopy resulted in an increase of waiting time between OPU and ICSI. To enhance maturation rather in vivo and not in vitro we discussed to increase the interval of hCG to OPU by 30min. The timing of ICSI due to spindle visualisation did not enhance our fertilisation rates. However, the number of aberrant fertilised oocytes with 1PN was significantly decreased while the amount of aberrant pronuclear oocytes with 3PN was enhanced. It might well be that it is not the localisation of the spindle but rather the maturational status of the oocyte cytoplasm that might be responsible for the differences in abnormal fertilization at early and late injection time points.

Poster

■ GERM 1

P01

„IVF-Naturelle“ – einfach, schmerzarm und weniger belastend als eine klassische IVF

M. von Wolff, E. Ocon, A. Santi

Abteilung Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Universitäts-Frauenklinik, Bern

Einführung Als Natural Cycle-IVF wird eine gonadotropinfreie IVF genannt, bei dem nur die Ovulation medikamentös induziert wird. In Bern wurden und werden zusätzlich verschiedene Techniken entwickelt, um die Ovulation besser zu kontrollieren und somit die Erfolgsrate zu steigern. Für die Summe dieser in Bern optimierten gonadotropinfreien IVF-Techniken wurde der Begriff IVF-Naturelle geprägt. Die Berner IVF-Naturelle ermöglicht einen Embryotransfer in jedem 2. Zyklus bei Schwangerschaftsraten (< 40 Jahre) von 30 % pro Transfer von einem Embryo ohne Mehrlinge. Da neben den reinen Erfolgszahlen die Belastung der Patientinnen durch die Behandlung mit entscheidend ist, wurde diese in einer Pilotstudie überprüft.

Material und Methoden 29 Frauen, die sowohl eine IVF-Naturelle als auch eine klassische IVF in unserem Zentrum durchgeführt hatten, füllten einen Fragebogen aus. Bei der IVF-Naturelle wird die Follikelpunktion im Untersuchungsraum ohne Narkose durchgeführt. Die Follikelpunktion bei der klassischen IVF erfolgt im OP in Analgosedierung. Bei der IVF-Naturelle in Bern sind bis zur Punktion 1–2 Konsultationen mit einer vaginalen Sonographie und ggf. einer Laborkontrolle und bei der klassischen IVF ca. 3–4 Konsultationen erforderlich.

Ergebnisse

Schmerzhaftigkeit der Follikelpunktion bei der IVF-Naturelle: 7 % der Frauen empfanden die Follikelpunktion im Vergleich zu einer venösen Blutabnahme als deutlich weniger schmerzhaft, 17 % als etwas weniger schmerzhaft, 45 % als gleich schmerzhaft, 21 % als etwas schmerzhafter und 10 % als deutlich schmerzhafter.

Die Gesamtsituation bei der Follikelpunktion bei der IVF-Naturelle: 7 % empfanden die Situation auf dem Untersuchungsstuhl am unangenehmsten, 3 % den vaginalen Ultraschall, 52 % das Austupfen der Scheide vor der Punktion und 38 % die Follikelpunktion.

Die gesamte IVF-Naturelle-Behandlung: 15 % empfanden die Ultraschall- und Laborkontrolle am unangenehmsten, 85 % die Punktion und 0 % den Transfer.

Klassische IVF im Vergleich zur IVF-Naturelle: Bei der klassischen IVF im Vergleich zur IVF-Naturelle fanden 33 % die Ultraschall- und Laborkontrollen als belastender, 61 % als gleich belastend und 6 % als weniger belastend, 72 % empfanden die Follikelpunktion als belastender, 11 % als gleich belastend und 17 % als weniger belastend.

Schlussfolgerung Bei der in Bern durchgeführten IVF-Naturelle-Behandlung ist die Belastung der Patientinnen durch die Gesamtbehandlung als auch durch die Follikelpunktion geringer als bei der klassischen IVF.

P02

Prävalenz und Inzidenz der weiblichen Sterilität in Deutschland – Analyse einer populationsbasierten, repräsentativen Datenbank (IMS Disease Analyzer®)

V. Ziller¹, K. Kostev², M. Ziller¹, U. Wagner¹, P. Hadji¹

¹Schwerpunkt Gynäkologische Endokrinologie, Reproduktionsmedizin und Osteologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg-Standort Marburg;

²IMS HEALTH GmbH & Co. OHG Centre of Excellence Patient Data, Frankfurt

Fragestellung Diagnostik und Therapie der Sterilität stellen Patienten, Gynäkologen und das Gesundheitssystem vor große Herausforderungen. Die Kenntnis der Häufigkeit der Erkrankungen in der Bevölkerung sind in der Beratung der Betroffenen aber auch aus gesundheitsökonomischer Sicht von großer Bedeutung. Ziel der vorliegenden Studie war es, mithilfe der repräsentativen Datenbank IMS Disease-Analyzer® aktuelle Hochrechnungen zur Inzidenz und Prävalenz der Sterilität in Deutschland durchzuführen.

Methode Diagnosedaten der IMS Disease Analyzer®-Datenbank aus den Jahren 2006–2010 wurden bezüglich der Diagnose Sterilität (ICD-10 N97 bzw. Z31) ausgewertet und in Bezug auf Daten des statistischen Bundesamtes für Deutschland hochgerechnet.

Ergebnisse Es konnten die Daten aus 158 gynäkologischen Arztpraxen in Deutschland herangezogen werden. Von 1.975.253 Patientinnen, die in den Jahren 2006–2010 in diesen Praxen versorgt wurden, konnten 38.407 Patientinnen mit einer Sterilitätsdiagnose extrahiert werden. Davon waren 10.742 mit einer Erstdiagnose kodiert. Die auf Gesamtdeutschland für Frauen zwischen 18 und 50 Jahren hochgerechte Inzidenz der Sterilität lag somit von 2006–2010 bei 0,5–0,6 %. Die Prävalenz bei 1,9–2,1 %.

Schlussfolgerung In Deutschland wurde im Jahr 2010 hochgerechnet bei ca. 47.000 Frauen erstmalig eine Sterilitätsdiagnose gestellt, insgesamt wurden 2010 rund 367.000 Pati-

entinnen mit einer Sterilitätsdiagnose in gynäkologischen Praxen versorgt. Die Auswertungen von 2006–2010 zeigten keine weitreichenden Veränderungen der Häufigkeiten. Eingeschränkt wird der Bezug auf die Gesamtbevölkerung durch die ausschließliche Analyse gynäkologischer Praxen, die Beschränkung auf „weibliche Sterilität“ sowie die Unschärfe in der Kodierung der Sterilität im ICD-System. Der populationsbezogene und repräsentative Charakter der Datenbank bietet aber eine hohe Validität der Schätzungen, die somit eine verlässliche Grundlage zur Beurteilung der Inzidenz und Prävalenz der Sterilität in Deutschland darstellt.

P03

Die Inhibition der Expression von Syndecan-1 durch die mikroRNA miR-10b führt zu verringerter Invasivität und Proliferation humaner Endometriosezellen

C. Schneider, N. Kässens, L. Kiesel, M. Götte

Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Münster

Fragestellung mikroRNAs sind kleine, nicht-kodierende RNAs, die die Genexpression auf posttranskriptionaler Ebene regulieren [1]. Die Endometriose ist durch ein Wachstum endometrialen Gewebes außerhalb des Uterus charakterisiert und mit Fertilitätsstörungen assoziiert [2]. Bei der Endometriose ist die Expression zahlreicher mikroRNAs im Vergleich zum gesunden Gewebe fehlreguliert, was eine Beteiligung am Pathogenesemechanismus nahelegt [3, 4]. Ziel der vorliegenden Studie war eine funktionelle Untersuchung der Rolle von miR-10b, einer bei der Endometriose vermindert exprimierten mikroRNA [3] und ihrer potenziellen Zielgene in einem In-vitro-Zellkultursystem. Die Rolle des Heparansulfatproteoglycans Syndecan-1, welches als neues Zielgen von miR-10b identifiziert werden konnte, wurde hierbei im Detail untersucht.

Methodik Die humane immortalisierte epitheliale Endometriosezelllinie 12Z [5] wurde transient mit einer Vorstufe der mikroRNA miR-10b oder einer Kontroll mikroRNA transfiziert. Mittels qPCR wurden die ektopische Expression bestätigt und Veränderungen in der Expression mittels Datenbankanalysen identifizierter potenzieller Ziel-mRNAs untersucht. Durch Immunfluoreszenzmikroskopie wurden Veränderungen in der Expression von Syndecan-1, einem „predicted target“ der miR-10b, untersucht. Die direkte Regulation der 3' untranslatierten Region der mRNA von Syndecan-1 durch miR-10b wurde mittels eines Luciferase-Plasmid-Konstruktes in transient transfizierten Zellen

untersucht. Veränderungen der Zellproliferation wurden mit MTT-Assays, und Veränderungen in der Invasivität mittels Matrigel-Invasionskammer-Assays analysiert. Zur Untersuchung der Rolle von Syndecan-1 wurde die 12Z-Zell-Linie mit Syndecan-1 siRNA oder einer Kontroll siRNA transfiziert. Der erfolgreiche Knockdown des Zielgens wurde mittels qPCR bestätigt und potenzielle Veränderungen in der Expression Syndecan-1-abhängiger Zielgene untersucht. Veränderungen der Proliferation und die Migrationsfähigkeit Syndecan-1-defizienter Zellen wurden mit MTT-Assays und Matrigel-Invasionskammer-Assays analysiert.

Ergebnisse Die ektope Expression von miR-10b führte zu einer um 20 % signifikant ($p < 0,03$) verringerten Invasivität und zu einer um 14 % verringerten Proliferationsrate ($p < 0,04$) von 12Z-Endometriosezellen. Mittels qPCR wurde in miR-10b-überexprimierenden Zellen eine signifikante Reduktion von Syndecan-1 um 58 % ($p < 0,001$) und eine um 50 % erhöhte Expression von Notch-4 ($p < 0,04$) nachgewiesen. Die Expression der möglichen Zielgene JAM-A, KLF-4 und LEFTY2 war nicht signifikant verändert. Eine erniedrigte Expression von Syndecan-1 konnte auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Luciferase-Assays zeigten eine direkte Regulation des 3'UTR von Syndecan-1 durch miR-10b auf ($p < 0,001$). Der siRNA-vermittelte Knockdown von Syndecan-1 führte in den Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Invasivität (65 %). Die Proliferationsrate zeigte keine deutliche Veränderung im Vergleich zu den Kontrollzellen. Vorläufige Analysen der Expression verschiedener Matrix-Metalloproteinasen mittels qPCR deuten auf eine Änderung durch den Syndecan-1-Knockdown hin.

Schlussfolgerungen Die ektope Expression von miR-10b führt in Endometriosezellen zu einer verringerten Invasivität und zu moderaten Veränderungen der Zellproliferation. Als neue Zielstruktur der miR-10b wurde das Zelloberflächen-Proteoglykan Syndecan-1 identifiziert, welches als wichtiger Modulator der Invasivität und Proliferation von Tumorzellen beschrieben worden ist [6]. Der Knockdown von Syndecan-1 in Endometriosezellen führt zu einer deutlich verringerten Invasivität. Unsere experimentellen Daten deuten darauf hin, dass eine pharmakologische Modulation der miR-10b oder Syndecan-1-Expression ein vielversprechendes therapeutisches Konzept bei der Endometriose darstellen könnte.

Literatur:

1. Götte M. *Minerva Ginecol* 2010; 62: 559–71.
2. de Ziegler D et al. *Lancet* 2010; 376: 730–8.
3. Pan Q et al. *Mol Hum Reprod* 2007; 13: 797–806.
4. Ohlson-Teague EM et al. *Mol Endocrinol* 2009; 23: 265–75.
5. Zeitvogel A et al. *Am J Pathol* 2001; 159: 1839–52.
6. Nikolova V et al. *Carcinogenesis* 2009; 30: 397–407.

P04

Dosisabhängige Regulation von Metformin auf die IGFBP-1-, -2- und -3-mRNA-Expression und Proliferation in endometrialen Stromazellen

T. Renke¹, M. Jung¹, O. Nowak², J. Jauckus¹, B. Toth¹, T. Strowitzki², A. Germeyer¹

¹Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Universitätsfrauenklinik Heidelberg; ²Abteilung Gynäkologie, GRN Gesundheitszentren, Schwetzingen

Fragestellung Metformin, ein Antidiabetikum, wird in der Reproduktionsmedizin bei Frauen mit polycystischem Ovarsyndrom (PCOS) zur Ovulationsinduktion eingesetzt. Neuere Studien zeigten eine Reduktion der Abortrate unter Metformingabe bei Frauen mit PCOS. Zudem konnte erstmals ein direkter Effekt von Metformin auf das Endometrium nachgewiesen werden. Dabei fiel eine reduzierte Prolaktinfreisetzung und „insulin-like growth factor-binding protein-1“-Expression während der In-vitro-Dezidualisierung auf. IGFBP-1, ebenso wie IGFBP-2 und -3 sind Progesteron-abhängig und werden durch Insulin in ihrer Expression modifiziert. IGFBPs regulieren die endometriale Proliferation vermutlich durch eine verlängerte Bioverfügbarkeit von IGF I. Ziel dieser Arbeit war es daher, einen dosisabhängigen Zusammenhang des Metformineffektes auf die Beeinflussung der Dezidualisierungsmarker und der Expression von IGFBP, IGFBP-1, -2 und -3 zu untersuchen, so wie einen Zusammenhang mit der Proliferationsfähigkeit der Zellen darzustellen.

Methoden Endometriale Biopsien wurden von 9 gesunden, regelmäßig menstruierenden Frauen nach Einverständniserklärung entnommen. Nach enzymatischer Digestion wurden Stromazellen in typischer Weise isoliert und nach zweimaliger Passage mit 17-Estradiol (10 & 30 nM), Progesteron (1 µM) und 10ng/ml EGF mit verschiedenen Konzentrationen Metformin (0; 0,01; 0,1; 1; 10 mM) dezidualisiert ($n = 3-6$). Die Dezidualisierung der Zellen wurde mittels Prolaktinbestimmung im Überstand der Zellen bestätigt. Im Anschluss wurden die Zellen in Trizol gelöst und die RNA entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert. Die Analyse der RNA erfolgte mittels „realtime“-PCR mit IGFBP-1, -2, und -3 Tagman Primern (Applied Biosystems).

Darüber hinaus wurden Zellen in 96 Well-Platten mit verschiedenen Konzentrationen Metformin (0; 0,01; 0,1; 1 mM) kultiviert und wie beschrieben dezidualisiert. Nach 12 Tagen erfolgte die Messung der Proliferation mittels CellTiter-Glo-Assay ($n = 6$).

Die anschließende statistische Analyse der Ct-Werte erfolgte mittels Student's-T-test, dabei wurde $p < 0,05$ als statistisch signifikant festgelegt.

Ergebnisse Die Prolaktinsekretion zeigte eine Metformindosis-abhängige Reduktion. Während 0,01 mM und 0,1 mM Met-

formin keine Reduktion der Prolaktinsekretion bewirkten, führte eine höhere Dosierung zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Prolaktinsekretion. Die mRNA-Expression des IGFBP-1-Gens wies eine ausgeprägte Reduktion der Genexpression bei hohen Metforminkonzentrationen auf, während eine niedrige Konzentration keinen signifikanten Einfluss zeigte. Die Expression von IGFBP-2 und -3 steigerte sich bei niedrigen Metforminkonzentrationen, bei hohen Konzentrationen war sie nicht mehr nachweisbar. Die Zellproliferation veränderte sich nicht bei höheren Metforminkonzentrationen, während eine niedrige Konzentration (0,01 mM Metformin) zu einem geringgradigen, aber dennoch statistisch signifikanten Proliferationsanstieg führte.

Schlussfolgerung Entgegen der Erwartung korreliert die Prolaktinausschüttung unter Metformintherapie nicht mit der Proliferation der endometrialen Stromazellen. Während eine hochdosierte Metforminkonzentration zu einer Verzögerung der Dezidualisierung führte, hatte eine niedrige Metforminkonzentration keinen negativen Effekt auf die Prolaktinausschüttung. Darüber hinaus wirkte sich eine geringe Metforminkonzentration positiv auf die Expression von IGFBP-2 und -3 aus. Die Tatsache, dass niedrig dosiertes Metformin zu einer endometrialen Proliferationssteigerung führte, könnte den protektiven Effekt einer Metformingabe bei Frauen mit rezidivierenden Aborten mit erklären.

P05

Kultur von mehr als 3 2PN-Stadien in der täglichen Praxis – Jahresergebnisse einer Pilotstudie

A. Müller¹, M. Bals-Pratsch², T. Hildebrandt¹, W. Würfel¹, M. Beckmann¹, M. Fromme¹, R. Dittrich¹
¹Frauenklinik Erlangen; ²Profertilita, Zentrum für Fruchtbarkeitsmedizin, Regensburg; ³Kinderwunsch Centrum München-Pasing; ⁴Institut für Sanktionenrecht und Kriminologie, Kiel

Fragestellung Ziel dieser Pilotstudie war zu evaluieren, wie viele entwicklungsfähige Embryonen bei Kultur von mehr als 3 2PN-Stadien entstehen.

Methodik Eingeschlossen wurden prospektiv alle Patientinnen im 1. oder 2. IVF- oder ICSI-Zyklus des Jahres 2010. Individuell wurde mit den Paaren festgelegt, wie viele 2PN-Stadien bzw. wie lange diese kultiviert werden sollen.

Ergebnisse 112 Patientinnen wurden auf diese individualisierte Weise behandelt. Pro Paar wurden durchschnittlich 2–6 2PN-Stadien für 3–6 Tage kultiviert. Bei 26 Patientinnen waren nach Kultur keine entwicklungsfähigen Embryonen identifizierbar, bei 37 Patientinnen zeigte sich ein entwicklungsfähiger Embryo, bei 45 Patientinnen entwickelten sich 2 vitale Embryonen. Bei 3 Patientinnen entwickelten sich 3 und bei einer Patientin 4 entwicklungsfähige Embryonen. Zwei Patientinnen mit 3 entwicklungs-

fähigen Embryonen wünschten den Transfer dieser 3 Embryonen, es wurden bei einer Patientin ein Präimplantations- und bei einer Patientin 2 Präimplantationsembryonen kryokonserviert. Die Schwangerschaftsrate betrug 23 % pro Embryotransfer. Alle kryokonservierten Embryonen wurden in einem nachfolgenden Zyklus transferiert.

Schlussfolgerung Es ist im Einzelfall gut möglich zu prognostizieren, wie viele 2-PN-Stadien sich weiter entwickeln werden, um höchstens 2 entwicklungsfähige Embryonen zu erhalten. Lediglich bei 4 Patientinnen (3,6 %) entwickelten sich mehr als 2 Embryonen. Die Rate an sogenannten überzähligen Embryonen (2,1 %) war damit akzeptabel niedrig.

P06

Prävalenz von psychosozial (mit-)bedingten Fertilitätsstörungen: Resultate einer Pilotstudie

K. Schilling¹, B. Toth², S. Rösner², T. Strowitzki², T. Wischmann²

¹Institut für Medizinische Psychologie; ²Abteilung Gynäkologische Endokrinologie und Fertilitätsstörungen; ³Institut für Medizinische Psychologie, Zentrum für Psychosoziale Medizin, Universitätsklinikum Heidelberg

Fragestellung Der Begriff der psychogenen Infertilität hat sich inhaltlich in den vergangenen Jahren gewandelt. Psychogene Infertilität bedeutet heute fertilitätsschädigende Verhaltensweisen durch das Paar trotz Kinderwunsch. Das Ziel dieser Pilotstudie war, erste Prävalenzraten der psychisch (mit-)bedingten Infertilität unter den Kinderwunschpaaren zu erheben.

Methoden Alle Patienten, die von Februar 2010 bis August 2010 zum Erstgespräch in die Kinderwunschprechstunde der Universitätsfrauenklinik Heidelberg kamen, erhielten einen selbst entworfenen Fragebogen. Dieser wurde nach Literaturrecherchen unter Berücksichtigung der neuesten Ergebnisse der Forschung zu Fruchtbarkeitschädigendem Verhalten zusammengestellt. Von den 156 angesprochenen Paaren nahmen 110 Frauen und 100 Männer an der Studie teil.

Ergebnisse Als sicher psychogen infertil wurden 9 % der Frauen und 3 % der Männer aufgrund eines BMI < 18,5, sexueller Störung oder Anabolikaabusus gewertet. Zählt man den Anteil an Rauchern dazu, steigt die Zahl um 18 % männliche Raucher und 11 % weibliche Raucher. Weitere 19 % der Frauen betrieben exzessiv Sport. Einen BMI > 25 hatten 26 % der Frauen und 53 % der Männer.

Schlussfolgerung Übergewicht und Rauchen sind Faktoren, die weniger psychogene als vielmehr soziale Aspekte der Infertilität darstellen, sodass die Definition „psychogene Infertilität“ bezüglich psychosozialer Aspekte neu durchdacht werden sollte. Zur Prävention psychosozial (mit-)bedingter Infertilität ist es wichtig, die Bevölkerung über Fertilitätsrisiken aufzuklären.

■ GERM 2

P07

Endokrinologische Diagnostik bei Frauen mit Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser- (MRKH-) Syndrom

A. Müller¹, P. Strissel¹, R. Dittrich¹, S. Renner¹, P. Oppelt¹, S. Brucker², D. Wallwiener², M. Beckmann¹, K. Ralf², R. Strick¹

¹Frauenklinik Erlangen; ²Frauenklinik Tübingen

Fragestellung Endokrinologische Diagnostik bei Frauen mit Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH-) Syndrom.

Methodik Retrospektiv wurden die klinischen Daten und Hormonwerte von 290 Patientinnen mit MRKH-Syndrom ausgewertet. Die Klassifikation der genitalen Morphologie erfolgte anhand der VCUAM-Klassifikation. Um eine Interpretation der Hormonwerte zu ermöglichen, wurden bei 5 MRKH-Patientinnen und bei 5 Kontrollpatientinnen Hormonverläufe über 4 Wochen aufgezeichnet.

Ergebnisse Bei den Hormonverläufen über 4 Wochen zeigten sich die typischen, zyklusabhängigen Schwankungen für FSH, LH, Estradiol und Prolaktin bei den Kontrollpatientinnen und auch bei den MRKH-Patientinnen. Die Zyklusphasen bei den MRKH-Patientinnen wurden anhand der Progesteronwerte identifiziert und die Hormonwerte zugeordnet. Kaum Schwankungen in den Zyklusphasen zeigten sich dagegen bei Gesamttestosteron, SHBG, freiem Testosteron und DHEA. Von 215 MRKH-Patientinnen lagen alle klinischen Daten und Hormonwerte vollständig vor, sodass diese in die Auswertung eingeschlossen werden konnten. 30 MRKH-Patientinnen (14 %) zeigten eine Hyperprolaktinämie, 104 MRKH-Patientinnen (48 %) hatten eine Hyperandrogenämie, 81 MRKH-Patientinnen (38 %) hatten unauffällige Hormonwerte. Die biochemische Hyperandrogenämie korrelierte nicht mit klinischen Androgenisierungserscheinungen. Auffällige Hormonwerte waren nicht mit morphologischen Veränderungen der Ovarien assoziiert.

Schlussfolgerung Eine biochemische Hyperandrogenämie kommt bei MRKH-Patientinnen häufig vor und kann unabhängig von der Kenntnis der Zyklusphase diagnostiziert werden. Es zeigt sich aber selten ein klinisches Korrelat im Sinne einer kutanen Androgenisierung. Bei der Interpretation der Prolaktinwerte sind zyklusabhängige Schwankungen zu beachten.

P08

Xenotransplantation von humanem Ovarikortex in SCID-Mäusen

B. Fritz¹, S. Klocke¹, K. Diedrich¹, G. Griesinger¹

¹Gynäkologie und Reproduktionsmedizin, Lübeck

Einleitung Die Kryokonservierung von Ovarikortex für eine spätere Re-Transplantation ist eine Option des Fertilitätserhalts vor

gonadotoxischer Therapie. Die optimale Methode der Kryokonservierung ist allerdings umstritten. Die vorliegende Studie untersucht die Vitalität von Ovargewebe nach Einfrierung mittels entweder Slow-cooling (SC) oder Vitrifikation (VITRI). Zur Vitalitätsprüfung nach Auftauung wurde ein Xenotransplantationsmodell (SCID-Maus) verwendet.

Methoden Positive Bescheide der Ethik- und Tierversuchskommission liegen vor. Nach schriftlicher Einverständniserklärung wurde 3 Patientinnen (Alter: 24 ± 3 Jahre) im Rahmen einer Sectio Ovarikortex entnommen. Die Biopsate wurden unter sterilen Bedingungen in ca. 1–2 × 1 × 1 mm Stücke geteilt und dann zufällig mittels VITRI oder SC kryokonserviert. Für die VITRI wurden Akupunkturnadeln als Träger für das Ovargewebe verwendet, dadurch konnte das Gewebe einer jeden Patientin unter gleichen Bedingungen (Inkubationszeit; Eintauchen in flüssigen Stickstoff) vitrifiziert werden. Die Proben wurden in Ham's 10, mit steigender Konzentration von Dimethylsulfoxid (DMSO) und Ethylenglykol in 20 % humanem Serumalbumin (HSA) inkubiert (15 min 7,5 %, 2 min 15 % + 0,5 M Saccharose; 38 °C). Für das SC wurden 10 Ovarstücke in Ham's F10 mit 1,5 M DMSO, 10 % HSA und 0,1 M Saccharose bei 4 °C für 30 min inkubiert. Mittels eines Multi-Step-Freezing-Protokolls wurden die Proben danach auf –150 °C gefroren und für 2 Wochen gelagert. Für das SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell wurden 20 weibliche ovarektomierte SCID-Mäuse verwendet, die unter standardisierten Bedingungen gehalten wurden. Nach dem Auftauen des Ovarikortex wurde dieser in die Nackenmuskulatur der Mäuse transplantiert. Zur Stimulation der Follikel wurde 1 IE rFSH intraperitoneal jeden zweiten Tag gespritzt (Start: Tag 7 post OP). Bei jeweils 2 SCID-Mäusen (SC und VITRI) wurde das Gewebe nach 8, 16, 24 und 56 Tagen (Kurzzeitversuch) entnommen. Für die übrigen 12 Mäuse erstreckte sich der Versuchszeitraum über 24 Wochen (Langzeitversuch). Vier Wochen vor Entnahmetag erfolgte eine hormonelle Umstellung auf 5 IE HMG. 12 Stunden vor Entnahme des Ovarikortex erfolgte eine Injektion von 20 IE HCG. Anschließend Fixierung des Gewebes in Formalin, Paraffineinbettung, Serienschritte (5 µm), Hämatoxylin-Eosin-Färbung mit anschließender Follikelzählung in jeweils 12 Schnitten. Klassifizierung der Follikel in primordial, primär, sekundär und antral. Klassifizierung der Follikel nach morphologischer Integrität. Immunhistochemische (IHC) Färbungen wurden mit Anti-Caspase-3-(AC-3)-Antikörper, Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen-(PCNA)-Antikörper und Cluster-of-differentiation-(CD)-31-Antikörper durchgeführt. Die Einteilung erfolgte anhand der Follikelstadien und ihrem Färbeverhalten (positiv/negativ). Die Auswertung erfolgte verblindet. Allen Mäusen wurde terminal ca. 1 ml Blut aus dem Herzen entnommen und im Serum die Estradiolkonzentration bestimmt. Statistik: nicht-parametrische Gruppenvergleiche.

Ergebnisse Die mittlere Zahl an Follikeln pro Maus war im Kurzzeitversuch 7,25 und 1,75; im Langzeitversuch 10,33 und 0,33 in der SC-, bzw. VITRI-Gruppe. Bei Auswertung beider Versuche ($n = 20$ Mäuse) findet sich eine signifikant geringere Zahl an Follikeln pro Maus nach Vitrifikation (Mittelwert 9,1 vs. 0,9 Follikel nach SC vs. VITRI; $p = 0,005$). Morphologisch intakt waren 18,7 % vs. 0 % der Follikel nach SC vs. VITRI ($p = 0,143$). In der IHC waren für Apoptose (AC3) positiv 19/90 (21,1 %) vs. 0/4 (0 %) Follikel nach SC vs. VITRI. Positiv für den Proliferationsmarker PCNA waren 41/96 (42,7 %) vs. 1/1 (100 %). Die IHC für CD31 und die Östradiolwerte liegen gegenwärtig noch nicht vor.

Schlussfolgerung Das Xenotransplantationsmodell generiert in der VITRI-Gruppe keinen einzigen morphologisch intakten Follikel. Auch die Zahl der überlebenden Follikel war im Vergleich zu SC signifikant geringer. Dies verunmöglicht auch eine sinnvolle weitergehende statistische Auswertung hinsichtlich Follikelqualität und IHC-Markern. Es bestehen somit aber begründete Zweifel, ob das Gewebe nach VITRI ähnlich vital ist wie nach SC. Limitierende Faktoren in einem Xenotransplantationssetting ist die begrenzte Verfügbarkeit von Versuchstieren und humanen Proben. Der Kryoschaden scheint jedoch auch nach SC beträchtlich, da nur ein Antralfollikel bei einem Versuchstier beobachtet werden konnte, hingegen nach Frischtransplantation Antralfollikel regelmäßig auftreten (eigene Ergebnisse). Zu beachten ist jedoch auch, dass das Ovargewebe schwangeren Frauen entstammte, und die Reifung in fortgeschrittene Follikelstadien dadurch möglicherweise verzögert worden ist.

P09

Evaluation von 4 Ovarretransplantationen an der Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Fertilitätsstörungen der UFH Heidelberg

B. Toth¹, J. Liebenthrone², M. Montag¹, M. Koester², J. Jauckus¹, A. Germeyer¹, S. Roesner¹, T. Strowitzki¹
¹Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Universitätsfrauenklinik Heidelberg; ²Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Universitätsfrauenklinik Bonn

Fragestellung Seit der Gründung des Netzwerkes zum Erhalt der Fertilität „Ferti-Protekt“ vor mehr als 5 Jahren wurden in Deutschland allein an der Kryobank Bonn über 600 Ovarretransplantate zum Zwecke des Fertilitätserhalts bei Tumorpasientinnen kryokonserviert. Sowohl 2010 als auch 2011 erfolgten insgesamt 4 Ovarretransplantationen bei 2 Patientinnen an der Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Fertilitätsstörungen der UFH Heidelberg.

Methode Aufgrund einer Chemotherapie bei Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) bzw.

Mammakarzinom wurde 2006 bzw. 2008 bei 2 Patientinnen die laparoskopische Entfernung von etwa 30 % eines Ovars durchgeführt. Das Gewebe wurde gekühlt an die Kryobank der UFH Bonn transportiert und dort kryokonserviert. Auf Wunsch der Patientinnen erfolgte 2010 jeweils die erste Retransplantation. Das Gewebe wurde von Biologen der Kryobank Bonn in Heidelberg aufgetaut und sofort nach Auftauen transplantiert. Dabei wurden Teile des Transplantates im Rahmen einer LSK auf das Restovar appliziert. Nach 5 bzw. 7 Monaten erfolgte jeweils die 2. Retransplantation per Laparotomie (auf das andere Ovar) bzw. per Laparoskopie (peritoneale Tasche unterhalb des Ovars).

Ergebnisse Bei der Ma-Ca-Patientin war mit 40 Jahren die Ovarresection erfolgt, mit 43 Jahren die 1. Retransplantation, die lediglich zum Auftreten einer einmaligen Schmierblutung führte. Im Anschluss an die 2. Retransplantation (01/2011) hatte die Patientin bereits 3× eine periodenstarke Blutung. Das FSH betrug 44,2 U/l vor der 2. Retransplantation und fiel 5 Monate postoperativ auf 10,1 U/l ab, bei gleichzeitig im nicht nachweisbaren Bereich bleibendem AMH.

Bei der NHL-Patientin wurde mit 25 Jahren die Ovarresection durchgeführt, mit 29 Jahren die 1. und mit 30 Jahren die 2. Retransplantation (05/2011). Auch hier führte erst die 2. Retransplantation zum Auftreten einer regelmäßigen Periode, das FSH fiel von 105,4 U/l präoperativ auf 16,1 U/l nach der Transplantation ab, das AMH blieb im nicht nachweisbaren Bereich. Bei einer ersten Follikelpunktion (07/11) konnte keine Oozyte gewonnen werden.

Schlussfolgerung Die Ovarresection, Kryokonservierung und anschließende Retransplantation stellt eine mögliche Option des Fertilitätserhalts bei Tumorpasientinnen vor Chemotherapie dar. Eine stete Optimierung der Operationstechniken (LSK vs. Laparotomie) sowie der Applikation des Transplantates (orthotop vs. peritoneal) ist notwendig. Die interdisziplinäre Zusammenarbeit von der Ovarresection über den Transport mit anschließender Kryokonservierung bis hin zum Auftauen und der zeitnahen Retransplantation ist ein wesentlicher Aspekt für ein erfolgreiches Fertilitätsprotektionsprogramm.

P10

Analyse und Subtypisierung von Mikropartikeln in Follikelflüssigkeit

C. Franz¹, R. Nieuwland², A. Rank³, M. Montag¹, S. Rösner¹, A. Germeyer¹, T. Strowitzki¹, B. Toth¹
¹Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Fertilitätsstörungen, Universitätsfrauenklinik Heidelberg; ²Departments of Clinical Chemistry, Academic Medical Center Amsterdam; ³Klinikum Augsburg

Fragestellung Als Biomarker für die Qualität und Reife der Oozyte sind G-CSF, Interleukin 15, AMH und andere Botenstoffe be-

kannt. Ihre jeweilige Konzentration steht im Zusammenhang mit dem Reifegrad der Oozyte bzw. der Fertilisierungs-, Schwangerschafts- und Geburtenrate.

Mikropartikel sind Membranvesikel von 0,1–1 µm Größe, die durch Aktivierung oder Zelltod sowie durch Scherkräfte entstehen, indem sie sich von ihren Ursprungszellen abschnüren. Sie weisen zyklus- und geschlechtsspezifische Konzentrationsunterschiede auf und entfalten im Blut eine prokoagulatorische Wirkung.

Bislang gibt es keinen Hinweis für das Vorkommen von Mikropartikeln in Follikelflüssigkeit. Daher wurde versucht, die Detektion und Subtypisierung von Mikropartikeln in Follikelflüssigkeit zu etablieren.

Methoden Alle Studienpatientinnen befanden sich zum Zweck der IVF/ICSI-Therapie unter einer kontrollierten ovariellen Hyperstimulation in der Kinderwunschprechstunde. Am Tag der Follikelpunktion wurde die unverdünnte Follikelflüssigkeit nach der Eizellsuche dem Studienzweck zugeführt. Die Proben wurden 20 Minuten bei 1550 g zentrifugiert und der Überstand in Aliquots à 300 µl zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bis zur endgültigen Analyse bei –80 °C gelagert.

Zur Messung wurden die Proben zunächst über eine Stunde auf Eis aufgetaut und anschließend über 30 Min. bei 17460 g zentrifugiert. In verschiedenen Zentrifugations- und Verdünnungsschritten wurden sie nach Nieuwland et al. weiter verarbeitet und schließlich mit Kalzium-Pufferlösung, FITC-markiertem Annexin V und weiteren spezifischen Antikörpern (Anti-CD45 PC5, Anti-LIF PE) inkubiert. Die Mikropartikel wurden mittels Durchflussszytometrie (FACSscan, Beckton Dickinson, Heidelberg) mithilfe der CellQuest Software dargestellt. Anhand der Formel von Berckmans et al. wurde die Konzentration der Mikropartikel näherungsweise bestimmt.

Ergebnisse Bislang wurden bei ersten Patientinnen unter einer IVF/ICSI-Behandlung sowohl Serum als auch Follikelflüssigkeit asserviert und auf die Anwesenheit von Mikropartikeln in der Follikelflüssigkeit untersucht. In allen Proben konnten Annexin-V-positive Mikropartikel in der Follikelflüssigkeit nachgewiesen werden, ebenso war eine Subtypisierung mithilfe der Antikörper möglich. Derzeit werden die Ergebnisse an einem größeren Patientenkollektiv weiter untersucht.

Schlussfolgerung Follikelflüssigkeit enthält Mikropartikel, welche mittels Annexin V durch FACS-Analyse nachweisbar sind. Ebenso kann eine Subtypisierung dieser Mikropartikel erfolgen. Inwieweit Mikropartikel in der Follikelflüssigkeit einen prädiktiven Marker darstellen und Aufschluss über den Reifezustand der Oozyte geben, bzw. einen Hinweis auf die Fertilisierungs- und Schwangerschaftsrate darstellen, ist Teil unserer weiteren Studie.

P11

Wirkung von G-CSF auf dezidualisierte endometriale Stromazellen

C. Knieper¹, J. Jauckus¹, A. Germeyer¹, W. Würfel², T. Strowitzki¹, B. Toth¹

¹Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Fertilitätsstörungen, Universitätsfrauenklinik Heidelberg, ²Kinderwunsch Centrum München

Fragestellung Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF), ein Cytokin aus dem hämatopoetischen System, wird von verschiedenen Zellen des Endometriums gebildet und scheint aufgrund seiner strengen zyklusabhängigen Regulation ein wichtiger Modulator schwangerschaftsrelevanter Prozesse zu sein. Während einige klinische Studien die Wirkung einer s. c.-Gabe sowohl bei Patienten mit wiederholtem Implantationsversagen (RIF) als auch mit rezidivierenden Aborten untersuchten, ist wenig über seine spezifische Wirkung auf das Endometrium bekannt. Aus diesem Grund untersuchen wir den Einfluss von G-CSF auf dezidualisierte endometriale Stromazellen in vitro.

Methoden Die endometrialen Biopsien wurden von 5 prämenopausalen Frauen gewonnen, die sich im Rahmen einer Kinderwunschbehandlung einer operativen Hysteroskopie/Laparoskopie unterzogen. Das Vorliegen einer Endometriose, eine Hormoneinnahme innerhalb der letzten 3 Monate, maligne Erkrankungen und akute Infektionen galten als Ausschlusskriterien. Die Gewebeproben wurden durch 2-maliges Passagieren und mehrmaliges Filtrieren aufgereinigt und kultiviert. Die Stromazellen wurden über 12 Tage in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen an G-CSF (0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml) dezidualisiert. Um ein Profil der synthetisierten Zytokine durch die vollständig dezidualisierten Zellen zu erstellen, wurde ein Zytokinarray des Zellüberstandes des 12. Tages angefertigt. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS für Windows (19.0), $p < 0,05$ signifikant.

Ergebnisse Die Prolaktinkonzentrationen zeigten im Verlauf der Dezidualisierungsreaktion einen signifikanten Anstieg: am 6. Tag betrugen sie $48,55 \pm 12,52$ mU/l und am 12. Tag $834,00 \pm 460,25$ mU/l; $p < 0,001$ (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung). Die Prolaktinwerte ohne G-CSF betrugen am 12. Tag $722,80 \pm 239,58$ mU/l (431–1059) im Vergleich zu $1108,00 \pm 839,48$ mU/l (192–2481) bei der höchsten G-CSF-Konzentration (10 ng/ml); $p > 0,05$.

Der Zytokinprofiler zeigte im Vergleich der höchsten G-CSF-Konzentration (10 ng/ml) zur Kontrolle ohne G-CSF deutliche Unterschiede bei folgenden Zytokinen: Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF), Chemokine Ligand 1 (CXCL-1), Interleukin 8 (IL-8) und Plasminogen Activator Inhibitor (PAI1).

Schlussfolgerung Die endometrialen Stromazellen zeigten bei Kostimulation mit G-CSF eine gesteigerte Dezidualisierungsreaktion

im Vergleich zu einer alleinigen E2P4-Stimulation. Die G-CSF-Applikation führte zu einer vermehrten Expression mehrerer Zytokine, im Besonderen CXCL-1, MIF und IL-8. Bei allen 3 genannten Zytokinen wurden in zahlreichen Studien multiple Wirkungen auf Ovulation und Follikelwachstum beschrieben. G-CSF scheint somit das uterine Milieu unter anderem über eine Veränderung des Zytokinmusters zu beeinflussen.

P12

Blastozysten und Schwangerschaftsraten nach Kultivierung vitrifizierter, menschlicher 2PN-Oozyten für 4 Tage: Vorläufige Ergebnisse

S. Al-Hasani, B. Schöpfer, E. Abu Marar, T. Cordes, A. Schultze-Mosgau, K. Diedrich, G. Griesinger Frauenklinik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

Fragestellung Mit der Einführung des „Sequentiellen Mediums“ wurde die Blastozysten-Kultivierung ermöglicht, mithilfe derer sich Mehrlingsschwangerschaften verhindern lassen können. Zudem wurden mit der Vitrifizierung menschlicher 2PN-Oozyten, im Vergleich zum konventionellen langsamen Einfrieren, vielversprechende Ergebnisse erzielt.

In dieser vorläufigen Studie wurde bei „High-responder“-Patientinnen kein „frischer“ Embryotransfer durchgeführt, sondern vitrifizierte 2PN-Oozyten aufgetaut und für 4 Tage kultiviert, um eine ovarielle Hyperstimulation zu verhindern.

Methoden Die Studie umfasste bisher 29 Patientinnen. Diese wurden entweder mit lang wirkenden FSH „Elonva-Organon“ oder rek. FSH stimuliert. Sie wurden mit GnRH-Agonist getriggert, um eine ovarielle Hyperstimulation zu vermeiden. Es wurde kein „frischer“ Embryotransfer durchgeführt, sondern die erhaltenen 2PN-Oozyten wurden mit der Cryotop-Methode [1] vitrifiziert. 4–6 Oozyten wurden aufgetaut und für 4 Tage in „Sage sequential media“ unter Öl kultiviert. Maximal 2 Blastozysten wurden in einem programmierten Zyklus transferiert, überschüssige wurden revitrifiziert.

Ergebnisse Insgesamt wurden bisher 160 2PN-Oozyten von 29 Patientinnen aufgewärmt, 42 Embryos erreichten die frühe und expandierende Blastozystenstufe, 9 entwickelten sich bis zur Morula (32 %). Für die Bewertung wurde das Scoring-System nach Gardner et al. [2] genutzt. Die in dieser Studie erreichte Implantationsrate beträgt 31,4 %, die Schwangerschaftsrate 34,5 %.

Schlussfolgerung Die Ergebnisse dieser vorläufigen Studie lassen 2 Vorteile für die Patientinnen erkennen. Zum einen wird eine ovarielle Hyperstimulation verhindert, zum anderen wird das Risiko für Mehrlingsschwangerschaften reduziert. Die genannten Zahlen ermutigen uns, diese Strategie weiterzuverfolgen.

Literatur:

1. Al-Hasani S, Ozmen B, Koutlaki N, Schoepper B, Diedrich K, Schultze-Mosgau A. Three years of routine vitrification of human zygotes: is it still fair to advocate slow-rate freezing? RBM online 2007; 14: 288–93.

2. Gardner DK, Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocyst. In: Jansen R, Motimer D (eds). Towards reproductive certainty: infertility and genetics beyond 1999. Parthenon Press, Canford, 1999; 378–88.

■ GERM 3

P13

Fertilitätserhalt bei Krebspatientinnen: Erfahrungen mit Kryokonservierung und Retransplantation von ovariellen Gewebe

R. Dittrich, A. Mueller, L. Lotz, I. Hoffmann, M. Beckmann

Frauenklinik, Universitätsklinikum Erlangen

Fragestellung Moderne Behandlungen von onkologischen Erkrankungen haben die Überlebensrate von Krebspatienten deutlich erhöht, führen jedoch häufig zur Infertilität. Eine vielversprechende Methode zum Fertilitätserhalt bei betroffenen Frauen besteht in der Kryokonservierung von Ovarialgewebe mit anschließender Retransplantation nach überstandener rezidivfreier Krebserkrankung. Durch die Anwendung dieser Methode kam es weltweit inzwischen zur Geburt von 13 Kindern. Trotzdem bleiben noch viele Fragen hinsichtlich des geeignetsten Transplantationsorts, der Langlebigkeit des Gewebes und der Gefahr der Übertragung von malignen Zellen durch die Transplantation von Ovarialgewebe offen. Dieser Beitrag stellt 6 Retransplantationen von kryokonservierten Ovarialgewebe von Patientinnen mit maligner Erkrankung aus Erlangen und deren Langzeitverlauf vor.

Methoden Ovariell Gewebe von 6 Krebspatientinnen ($n = 3$ Hodgkin, $n = 2$ Analkarzinom, $n = 1$ Brustkrebs) wurde vor Chemo- und/oder Radiotherapie laparoskopisch entnommen und mit einem langsamen Einfrierungsverfahren („slow freezing“) kryokonserviert. Nach erfolgreicher Behandlung der malignen Erkrankung und Feststellung einer durch die Behandlung bedingten frühzeitigen Ovarialinsuffizienz wurde das Ovarialgewebe jeweils orthotrop (entweder in eine Peritoneal-Tasche an der Beckenwand oder an das inaktive Ovar) retransplantiert.

Ergebnisse Bei allen Patientinnen konnte durch die Retransplantation des ovariellen Gewebes die Ovarialfunktion wiederhergestellt werden. Während die FSH- und LH-Spiegel vor der Retransplantation sehr hoch und die Estradiolspiegel entsprechend niedrig waren, zeigten sich nach Transplantation ein Abfall der Gonadotropine sowie ein Anstieg von Estradiol. Sonographisch ließen sich im Bereich des transplantierten Gewebes Follikel nachweisen und die Patienten

hatten regelmäßige Zyklen. Auch konnten bei 4 Frauen Eizellen aus dem Transplantat gewonnen und befruchtet werden. (Die Lebensdauer des transplantierten Gewebes betrug zwischen 6 und 12 Monaten). Ein Rezidiv konnte in keinem der Fälle beobachtet werden.

Schlussfolgerung Die Kryokonservierung von Ovarialgewebe ist eine vielversprechende Methode des Fertilitätserhalts bei Frauen, die unmittelbar vor einer die Fertilität bedrohenden Radio- oder Chemotherapie stehen. Die Technik befindet sich aber noch im experimentellen Stadium und Verbesserungen hinsichtlich der Kryokonservierung und Replantation sind nötig. Auch bedürfen weitere Faktoren, wie zum Beispiel die Schädigung der Gebärmutter nach Strahlentherapie weiterer Abklärung, um die Möglichkeit einer Schwangerschaft zu optimieren. Im Allgemeinen sollte die Option zur Fertilitäts-erhaltung, unter anderem auch die ovarieller Kryokonservierung, jeder Krebspatientin nach individueller Beratung und Nutzen-Risiko-Abwägung in dafür logistisch eingerichteten Zentren angeboten werden. Das Netzwerk „FertiProtekt“ (www.fertiprotekt.de) gibt Empfehlungen, welche Maßnahmen bei den einzelnen Tumorerkrankungen angewendet werden sollten.

P14

Fertilitätserhalt bei Krebserkrankungen: Keine Hinweise auf maligne Zellen im ovariellen Transplantat bei Patientinnen mit Ovarialtumoren

R. Dittrich¹, M. Montag², A. Mueller¹, I. Hoffmann¹, D. Wachter², M. Beckmann¹, L. Lotz¹

¹Frauenklinik, Universitätsklinikum Erlangen;

²Universitätsfrauenklinik Bonn; ³Pathologisches Institut, Universitätsklinikum Erlangen

Fragestellung Moderne Behandlungen von malignen Erkrankungen haben die Überlebensrate von Krebspatienten deutlich erhöht, führen jedoch häufig zu Sterilität. Eine vielversprechende Möglichkeit für Frauen ist die Kryokonservierung von Ovarialgewebe mit anschließender Replantation nach überstandener rezidivfreier Krebserkrankung. Es besteht jedoch die Gefahr, dass maligne Zellen im Ovarialgewebe nach Replantation zu einem Wiederauftreten der malignen Grunderkrankung führen könnte. In diesem Projekt wurde daher das mögliche Vorhandensein von malignen Zellen im Ovarialgewebe von Patientinnen mit Ovarialtumoren im Gewebe und nach Transplantation in immundefiziente Mäuse untersucht.

Methoden Referenzproben von Ovarialgewebe aus Patientinnen mit Ovarialtumoren wurde histologisch bezüglich des Vorhandenseins von Tumorzellen untersucht. Zudem wurde ovarielles Gewebe dieser Patientinnen in immundefiziente Mäuse transplantiert. Die Tiere wurden nach 24 Wochen getötet und die Transplantate entnommen. Histologische Serienschritte von dem Ge-

webe in H&E-Färbung wurden auf das Vorhandensein von Tumorzellen begutachtet. Des Weiteren wurden Schnitte mit Antikörpern gegen Panzytokkeratin angefärbt, um eine mögliche Infiltration von einzelnen Tumorzellen zu entdecken. Die Tiere wurden zudem nach Tötung auf das Vorhandensein von Tumoren oder Veränderungen im Abdomen hin untersucht.

Ergebnisse Die Präparate von den Ovarialgewebeproben hatten ein normales histologisches Erscheinungsbild und in fast allen Schnitten ließen sich Follikel in unterschiedlichen Reifestadien nachweisen. In keinem Serienschritt, weder nach H&E-Färbung noch nach Färbung mit Panzytokkeratin-Antikörpern, waren maligne Zellen nachweisbar. Es konnte in keinem der untersuchten Ovarialgewebe die maligne Grunderkrankung der Patientin mikroskopisch festgestellt werden. Des Weiteren war die makroskopische Untersuchung der getöteten Mäuse vollkommen unauffällig. Es gab keine Anhaltspunkte für tumoröse Veränderungen im Abdomen der Tiere.

Schlussfolgerung Trotz der negativen Befunde in diesem Projekt kann eine Kontamination mit residualen malignen Zellen nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden, da es sich bei den untersuchten Proben nur um Stichproben aus dem Ovarialgewebe handelt und nicht um das ganze Ovar. Dennoch scheint die Replantation von kryokonserviertem Ovarialgewebe bei Patientinnen mit Ovarialtumoren eine vielversprechende Möglichkeit zu sein, die im Hinblick auf fertilitätserhaltende Maßnahmen in Erwägung gezogen werden kann.

P15

Expression von Östrogenrezeptor alpha (ER- α), Östrogenrezeptor beta (ER- β) und Progesteronrezeptor (PR) in klonalen Kulturen von mesenchymalen Stammzellen aus humanen Endometriumbiopsien

A. Schüring, L. Kiesel, M. Götte

Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Münster

Fragestellung Proliferation und Differenzierung des Endometriums werden durch die endokrinen „key-player“ Östrogen und Progesteron gesteuert. Für die enorme regenerative Kapazität des Endometriums werden adulte Stammzellen verantwortlich gemacht, die kürzlich in Hysterektomiepräparaten [Gargett et al. 2009] und in Endometriumbiopsien [Schüring et al., Fertil Steril 2011] nachgewiesen wurden. Auch bei der Ätiologie hormonabhängiger Pathologien des Endometriums wie Endometriose und Endometriumkarzinom könnten endometriale Stammzellen eine zentrale Rolle spielen. Im Mausmodell zeigten „label retaining cells“ des endometrialen Epithels keine Expression des ER- α und des PR- α , auch die Mehrzahl der stromalen Zellen wies keine Rezeptorexpression auf [Chan and Gargett, Stem

Cells 2006]. Im Gegensatz dazu gibt es bisher nur begrenzte Kenntnisse über mögliche endokrine Steuerungsmechanismen adulter Stammzellen des humanen Endometriums. Wir untersuchten das Expressionsmuster von ER- α , ER- β und PR in klonalen Kulturen humaner endometrialer Stammzellen aus transzervikal gewonnenen Endometriumbiopsien.

Methoden Endometriale Gewebeproben wurden per transzervikaler Biopsie von 11 Patientinnen in der Lutealphase gewonnen. Nach enzymatischer Dissoziation, mechanischer und immunspezifischer Reinigung wurden Zellsuspensionen in klonaler Dichte von 630 Zellen/3 ml ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Klonierungseffizienz (CE) wurde bestimmt. Die Expression von ER- α , ER- β und PR wurde vor und nach einer Klonierungsrunde mittels quantitativer Real-time-PCR bestimmt und auf das „housekeeping gene“ 18S rRNA bezogen.

Ergebnisse In der gesamten Gruppe wurde die Expression von ER- α und ER- β nach der ersten Klonierungsrunde um 64 % bzw. 89 % signifikant herunterreguliert ($p = 0,002$ und $p < 0,0001$). Dagegen war die „Downregulation“ von PR für die gesamte Gruppe nicht signifikant. Dies wurde durch ein abweichendes Expressionsmuster verursacht, da in 2 Patientinnen eine „Upregulation“ und in einer Patientin eine unveränderte Expression des PR beobachtet wurde.

Schlussfolgerung Humane endometriale Stammzellen in klonaler Kultur zeigten eine „Downregulation“ der Expression von ER- α und ER- β , während die Expression von PR unverändert blieb, bedingt durch ein abweichendes Expressionsmuster in individuellen Patienten. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Stammzellen keiner vorrangig endokrinen Stimulation unterliegen, sondern indirekt über parakrine Mechanismen durch Zellen der Stammzellnische gesteuert werden. Mit fortschreitender Charakterisierung der Stammzellnische könnten zukünftig vielversprechende therapeutische Alternativen entwickelt werden, insbesondere bei Versagen einer endokrinen Therapie, wie es beispielsweise bei der Progesteronresistenz der Endometriose der Fall ist.

P16

Das Anlegen und Nutzen von unbefruchteten Fertilitätsreserven bei gesunden Frauen – eine ethische Bewertung des „social egg freezing“

U. Bittner

Institut für Geschichte, Theorie und Ethik der Medizin, Universität Ulm

Fragestellung Neuartige Einfrier- und Auftautechniken ermöglichen ein Einfrieren von unfertilisierten Oozyten ohne Kristallisationsschäden und ihr langjähriges Aufbewahren sowie unbeschädetes Auftauen. Dadurch ergeben sich – vor allem für Frauen – neue Wahlmöglichkeiten bei der Gestaltung

der eigenen Lebens- bzw. Familienplanung [1, 2]. Frauen, die eine eigene Fertilitätsreserve anlegen, können dann in späteren Lebensjahren – wenn die ovarielle Funktion abnimmt – auf junge, unbefruchtete Eizellen zurückgreifen und eine Schwangerschaft mit eigenen Keimzellen austragen, ohne sich frühzeitig schon auf den genetischen Kindsvater festlegen zu müssen [3]. Da diese Form der Fertilitätsreservenschaffung in Deutschland gesetzlich erlaubt ist, kann es hierzulande zukünftig u. a. auch zu postmenopausalen Schwangerschaften kommen. Aber auch anderweitige Konsequenzen sind an diese Form des Fertilitätsmanagement gebunden. Es stellt sich daher die sowohl medizinisch als auch ethisch brisante Frage: Wie ist das Anlegen und die Nutzung eigener Fertilitätsreserven zu bewerten? Hier besteht Bedarf einer fundierten ethischen Evaluation.

Methoden Anhand der 4-Prinzipien-Ethik von Beauchamp und Childress (4 Prinzipien: Autonomie, Gerechtigkeit, Nicht-Schaden, Wohltun) werden zunächst die Vor- und Nachteile des „social egg freezing“ aufgezeigt. Um diese Evaluation vorzunehmen, werden verschiedene Fälle und Szenarien vorgestellt (inklusive der Option zu postmenopausalen Schwangerschaften). Gleichfalls wird die Möglichkeit einer Zuordnung des „social egg freezing“ als Therapie- oder Enhancement-Maßnahme untersucht. In Ergänzung zum prinzipienethischen Ansatz werden weitergreifende ethische Überlegungen etwa zur Technisierung der Fortpflanzung oder zur Veränderung der intergenerationalen Verhältnisse angestellt.

Ergebnisse Die oftmals verwendete Unterscheidung von Therapie und Enhancement hilft nicht, die Frage nach der Legitimität und den Grenzen des Einsatzes von „social egg freezing“ zu beantworten. Der Vorschlag, durch das Setzen einer willkürlichen Altersgrenze den Einsatz von „social egg freezing“ zu regeln, stellt indes kein probates Mittel dar. Denn oftmals entspricht das chronologische Alter einer Frau nicht ihrem biologischen Alter, und Grenzfälle könnten solche Alterssetzungen schnell in Frage stellen. Frauenärzte, Reproduktionsmediziner und Ethiker sollten daher in einen intensiven Dialog treten, um sich über einen vernünftigen Umgang mit diesen neuen Herausforderungen zu verständigen. Dabei sind nicht nur die 4 Prinzipien zu berücksichtigen, sondern es müssen auch die sozialen, individuellen, politischen und intergenerationellen Implikationen von „social egg freezing“ evaluiert und diskutiert werden.

Schlussfolgerung Es bedarf eines fundierten Dialogs und Aushandlungsprozesses zwischen Medizinern und Ethikern, um zu einheitlichen Regelungen und Richtlinien bzgl. des Umgangs und Angebots von „social egg freezing“ in Deutschland zu gelangen. Die Anwendung der Prinzipienethik alleine genügt nicht. Eine umfassendere ethische Betrachtung ist notwendig. Diese sollte von einer empirischen Erhebung der Präferenzen und Einstellungen der Frauen sowie der Reproduktionsmediziner zum Phänomen

des „social egg freezing“ begleitet werden. Erst dann können Handlungsempfehlungen zum Umgang mit „social egg freezing“ konzipiert werden.

Literatur:

1. Bittner U, Eichinger T. An ethical assessment of postmenopausal motherhood against the backdrop of successful anti-aging medicine. *Rejuvenation Res* 2010; 13: 741–7.
2. Bittner U, Müller O. Technisierung der Lebensführung. Zur ethischen Legitimität des Einfrierens von Eizellen bei gesunden Frauen als Instrument der Familienplanung. *Jahrbuch für Wissenschaft und Ethik* 2009; 14: 23–45.
3. Bittner U. Ethische Aspekte der Fertilitätsreservenschaffung bei gesunden Frauen. *Geburtsh Frauenheilk* 2011; 71: 601–5.

P17

Die Behandlung mit intravenösen Immunglobulinen verbessert die klinische Schwangerschaftsrate bei Frauen mit habitueller Abortneigung und Implantationsversagen

*B. Seifert, C. Gaßner, D. Seifert
KITZ – Kinderwunschtherapie Im Zentrum, Regensburg*

Fragestellung Der Anlass für diese Studie war die Fragestellung, ob die Behandlung mit intravenösen Immunglobulinen die Schwangerschaftsrate bei habitueller Aborten und Implantationsversagen verbessern kann. Zu dieser Problematik ist die Meinung der Literatur widersprüchlich. Immunglobuline können den Embryo durch verschiedene Mechanismen schützen. Sie senken die aktivierten natürlichen Killerzellen (NK), deaktivieren die T-Zellen und polyklonalen B-Zellen. Immunglobuline sind in der Lage einen erhöhten Serumspegel von TH2-Zytokinen zu gewährleisten, die für eine normale Schwangerschaft Voraussetzung sind.

Methoden Über einen Zeitraum von etwa 2 Jahren wurden insgesamt 85 Patientinnen behandelt. Eine erste Infusion von Immunglobulinen erfolgte 2 Tage vor dem Embryotransfer. Zunächst wird nach Bestimmung eines Blutbildes die Infusionsbehandlung mit physiologischer Kochsalzlösung zur Verbesserung des Hämatokrits eingeleitet, danach wird die Infusionsbehandlung mit Sandoglobulin® oder Privigen® durch langsame Tropfenfolge und ärztlicher Überwachung fortgesetzt.

Im wöchentlichen Intervall erfolgen jeweils weitere Infusionen. Diese werden nach Erreichen einer Schwangerschaft unter Kontrolle des Kreatinins, der Immunglobuline und der Lymphozytendifferenzierung bis zur 12. Woche fortgesetzt. In Einzelfällen mit erhöhten peripheren Killerzellwerten > 20 % bis zur 24. SSW in dann größeren Intervallen. Die Halbwertszeit der Immunglobuline beträgt etwa 3 Wochen.

Ergebnisse Bei den insgesamt 85 behandelten Frauen konnten 59 Schwangerschaften

erzielt werden, das entspricht einer biochemischen Schwangerschaftsrate von 69 %. Die Abortrate war 18,8 % (16 Pat.), sodass die Rate fortbestehender Schwangerschaften und Geburten 50,6 % (43 Grav.) betrug.

Die Infusionen wurden ohne Ausnahme sehr gut vertragen. Es kam in keinem Fall zu einer allergischen Reaktion. Die kontrollierten Immunglobuline und das Kreatinin waren bei allen Behandlungsfällen im Normbereich. Diese Ergebnisse sind besonders bemerkenswert, da es sich um langjährige Kinderwunschpatientinnen handelt, die entweder mehr als 3 Frühaborte bzw. eine Vielzahl von erfolglosen IVF/ICSI-Behandlungen in mehreren IVF-Zentren zu beklagen hatten.

Schlussfolgerung Diese Untersuchung widerlegt die These, dass bei einer habituelleren Abortneigung nur eine fürsorgliche Unterstützung („tender loving care“) und eine gesunde Lebensführung nachweisbar die Chancen für eine erfolgreiche Schwangerschaft erhöhen.

P18

Untersuchungen von Endometriumbiopsien zum Zeitpunkt der Follikelpunktion bei Implantationsversagen

B. Seifert¹, U. Kämmerer², M. Schwab², G. Just³, C. Gaßner¹, B. Paulmann¹, D. Seifert¹

¹KITZ – Kinderwunschtherapie Im Zentrum, Regensburg; ²Universitäts-Frauenklinik Würzburg; ³MVZ Synlab Weiden

Fragestellung Ein bisher ungeklärtes Problem der Reproduktionsmedizin stellen Implantationsversagen bzw. frühe Schwangerschaftsverluste dar. Diese immunologischen Störungen der Implantation machen etwa 40 % aller Fehlversuche der Kinderwunschbehandlung aus.

Es gibt nur wenige Untersuchungen, die sich direkt dem Endometrium zuwenden und Genexpressionsanalysen oder biochemische Untersuchungen im sogenannten Implantationsfenster vorgenommen haben.

Die Studie an Gewebeproben nach Strichkürretage des Endometriums sollen Veränderungen von Zytokinen und Wachstumsfaktoren bewerten.

Methoden Die Strichcurettage zum Zeitpunkt der Implantation erfolgte mit der Einmalbiopsiekanüle Pipelle de Cornier®. Es wurden 3 Gruppen untersucht:

1. Normalgruppe von Frauen, die keine Risikofaktoren aufweisen und im Untersuchungszyklus schwanger geworden sind.
2. Gruppe von Implantationsversagen bzw. habitueller Abortneigung.
3. Gruppe von Endometriosepatientinnen, speziell der Endometriosis genitalis interna.

Bei einem normal aufgebauten Endometrium gelingt es, einen Gewebestreifen von etwa 1,5–2 cm nahezu blutungsfrei zu gewinnen.

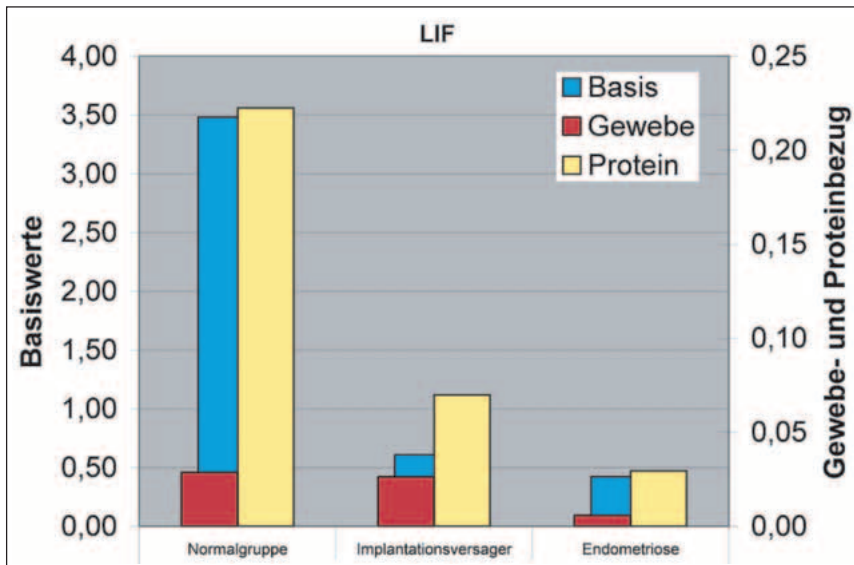


Abbildung 3: B. Seifert et al. (P18). Leukaemia inhibitory factor (LIF) im Endometrium.

Nach der Gewebepreparation und der Extraktion der Proteinfractionen erfolgt die Analyse der Zytokine und Wachstumsfaktoren mit dem Multiplex-Bead-Assay. Es wurden nachfolgende Parameter untersucht: EGF (Epidermal-Growth-Factor), GRO- α (Growth-Regulated-Oncogene-alpha), IL-17 α (Interleukin-17 α), IL-1 β (Interleukin-1 β), IP-10 (Interferon-gamma-induced-protein 10), LIF (Leukaemia inhibitory factor), MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1), MIF (Macrophage migration inhibitory factor), PlGF-1 (Placenta growth factor-1), TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor-alpha), VEGF- α (Vascular-Endothelial-Growth-Factor-alpha), TGF- β (Transforming growth factor-beta).

Ergebnisse Es konnten bisher 29 Proben komplett ausgewertet werden. Für eine Reihe der analysierten Zytokine und Wachstumsfaktoren ergaben sich im Vergleich zwischen den 3 untersuchten Gruppen Unterschiede, die für die Zukunft interessante Diagnosekriterien darstellen könnten. Für den Leukaemia inhibitory factor (LIF) haben wir für das Implantationsversagen und die Endometriose deutlich niedrigere Konzentrationen nachweisen können (Abb. 3). Ein ähnlicher Trend war zu TGF- β für die Endometriose zu beobachten. Ebenfalls war zu erwarten, dass IL-17 α sowohl bei der Endometriose als auch bei den Implantationsversagen erniedrigt gemessen werden konnte. Auch eine Reihe anderer Zytokine zeigten Veränderungen, die jedoch durch weitere Untersuchungen bestätigt werden müssen.

Schlussfolgerungen Es bestätigen sich die Hinweise, dass die Entnahme von Endometrium zum Zeitpunkt der Implantation nicht nur die Schwangerschaftsraten durch eine verletzungsinduzierte Immunmodulation verbessern kann, sondern dass auch die Untersuchung der Zytokinprofile wichtige Anhaltspunkte zur Diagnostik des Implantationsversagens ergeben kann. Es besteht die Vision, durch eine automatisierte Auswertung solcher Gewebeproben eine bessere immunologische Diagnose stellen zu können.

P19

Aufbereitung von Ultraschallsonden mithilfe eines Wasserstoffperoxid-Nebels

P. Heeg

Institut für Med. Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Tübingen

Fragestellung Die Aufbereitung von benutzten Ultraschallsonden ist erforderlich, um die Übertragung von Krankheitserregern von Patient zu Patient bzw. vom Patienten auf Mitarbeiter sicher zu unterbinden. Bei Ultraschallsonden, wie sie z. B. in der Frauenheilkunde verwendet werden, handelt es sich um Medizinprodukte der Risikoklasse „semikritisch A“. Das bedeutet, dass diese Produkte nach Verwendung am Patienten einer Reinigung und Desinfektion zu unterziehen sind. Die Desinfektion muss ein breites Spektrum an Krankheitserregern erfassen, darunter vegetative Bakterien einschließlich Mykobakterien, Sprosspilze und Viren, vor allem solche, die bevorzugt durch Blut übertragen werden. Das Desinfektionsgerät Trophon EPR (Nanosonics Europe GmbH, Hamburg) dient der Desinfektion von Ultraschallsonden mithilfe eines Wasserstoffperoxid-Nebels mit einer Wirkstoffkonzentration von 34,9–35,5 % (NanoNebulantTM). Während des Desinfektionsprozesses wird Wasserstoffperoxid als sehr feines Aerosol (Teilchengröße nach Herstellerangabe unter 1 μ m, „Trockennebel“) in der Gerätekammer bzw. auf der Oberfläche des zu behandelnden Objekts verteilt.

Methodik Grundlage der Prüfung waren Standardarbeitsanweisungen des Herstellers zur Durchführung von praxisnahen Keimträgerversuchen; diese Anweisungen orientieren sich eng an international standardisierten, sog. „carrier tests“. Als Testorganismen dienten *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium terrae* und *Mycobacterium avium*. Als Prüfkörper („Keimträger“) wurden

Streifen aus Hartpolymer verwendet. Die zur Kontamination der Prüfkörper mit den Testorganismen verwendeten Suspensionen enthielt als organische Belastung 5 % Pferdeserum. Das Inokulum je Prüfkörper betrug 25 μ l. Pro Testorganismus wurde jeweils ein Desinfektionszyklus im Prüfgerät gefahren, jeder Test wurde 5x wiederholt. Die Validierung des Prüfverfahrens erfolgte in Anlehnung an EN 14561.

Ergebnisse Der in Deutschland normativ geforderte Reduktionswert von 5 log-Stufen (99,999 %) für die eingesetzten Testorganismen wurde bei insgesamt 180 Prüfkörpern in 179 Fällen erreicht bzw. bei 92 % der Prüfkörper um mindestens Faktor 10 übertroffen. Bei den geprüften Mykobakterien wurde der erforderliche Reduktionswert von 4 log-Stufen (99,99 %) bei 120 Prüfkörpern in allen Fällen erreicht bzw. bei 97,5 % der Prüfkörper um mindestens Faktor 10 übertroffen.

Schlussfolgerung Die im geltenden „Anforderungskatalog für die Aufnahme von chemischen Desinfektionsverfahren in die Desinfektionsmittel-Liste der DGHM, Stand 04.02.2002“ genannten Reduktionswerte für die Prüfbakterien wurden deutlich übertroffen. Hinsichtlich seiner bakteriziden Eigenschaften eignet sich das Trophon-EPR-Verfahren zur Desinfektion gereinigter Medizinprodukte der Klasse „semikritisch A“, wie z. B. Ultraschallsonden.

Reproduktionsgenetik

P20

Array-CGH bei Männern mit hochgradig eingeschränkter Spermato-genese und dem histologischen Bild einer „bunten Atrophie“

A. Röpke¹, K. Hagen¹, S. Kliesch², P. Wieacker¹, F. Tüttelmann¹

¹Institut für Humangenetik, Universität Münster;

²Klinische Andrologie, Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universität Münster

Einleitung und Fragestellung Die Analyse von Copy Number Variants (CNVs) führt bei immer mehr Krankheiten zur Identifikation neuer Ursachen, d. h. beteiligter Gene. Im Rahmen einer vorherigen Studie wurden bereits Patienten mit hochgradiger Oligozoospermie oder Azoospermie aufgrund eines histologisch gesicherten Sertoli-Cell-Only-Syndroms bzw. Meiosearrestes auf CNVs untersucht und mögliche krankheitsrelevante Gene identifiziert [1]. Bei den untersuchten Phänotypen fehlte bislang die Gruppe mit dem relativ häufigen Phänotyp der „bunten Atrophie“, d. h. einem histologischen Nebeneinander von Tubuli seminiferi mit qualitativ erhaltener Spermato-genese und Tubuli ohne Spermato-genese.

Methoden Mithilfe der vergleichenden genomischen Hybridisierung (Array-CGH) können Zugewinne und Verluste von genomischen Material dargestellt werden. DNA

von 18 Patienten mit idiopathischer Infertilität (bei denen bekannte klinische Ursachen ausgeschlossen wurden) der Klinischen Andrologie des Centrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Münster, wurde durch Array-CGH mit dem 400K Array Set (Agilent Technologies) untersucht. Zum Vergleich dienten die Ergebnisse der Array-CGH bei 100 Männern mit einer qualitativ und quantitativ normalen Spermatogenese.

Ergebnisse Die untersuchten Patienten zeigten im Durchschnitt 22,2 Auffälligkeiten und unterschieden sich damit nicht signifikant von den untersuchten Kontrollen mit durchschnittlich 18,9 Auffälligkeiten. Der Vergleich beider Gruppen ergab 65 Auffälligkeiten, die nur bei den idiopathisch infertilen Patienten vorkamen.

Schlussfolgerung Die Array-CGH ergab bei Patienten mit einer gemischten Atrophie Auffälligkeiten, die in der Kontrollgruppe nicht zu finden waren. Innerhalb dieser patientenspezifischen CNVs liegen insofern Gene, die potenziell krankheitsrelevant sein können. Einige dieser Gene sollen in einem zweiten Schritt bei Patienten mit gemischter Atrophie sequenziert werden.

Diese Studie wurde im Rahmen der DFG Forschergruppe „Germ Cell Potential“ (FOR 1041, Förderkennzeichen TU 298/1-1) durchgeführt.

Literatur:

1. Tüttelmann F, et al. Copy number variants in patients with severe oligozoospermia and Sertoli-cell-only syndrome. *PLoS One* 2011; 29: e19426.

P21

Präimplantationsdiagnostik: Array-CGH-Untersuchungen an Trophoblastzellen nach Trophektodermbiopsie

U. Koehler¹, B. Paulmann², U. Hehr³, B. Seifert², E. Holinski-Feder¹

¹MGZ – Medizinisch Genetisches Zentrum, München;

²KITZ – Kinderwunsch Im Therapiezentrum, Regensburg; ³Zentrum für Humangenetik Regensburg

Einleitung Am 07.07.2011 stimmte der Deutsche Bundestag für eine begrenzte Zulassung der Präimplantationsdiagnostik (PID) in Deutschland. Lizenzierten Zentren wird es unter strengen Auflagen erlaubt sein, eine PID zur Feststellung einer schwerwiegenden Schädigung des Embryos, die mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Tot- oder Fehlgeburt führen wird, vorzunehmen. Voraussetzung ist eine medizinische und psychosoziale Beratung sowie ein positives Votum einer unabhängigen, interdisziplinären Ethikkommission. Im Rahmen einer wissenschaftlichen Studie zur Validierung der PID wurden Array-CGH-Untersuchungen an pluripotenten Trophoblastenzellen nach Trophektodermbiopsie von Blastozysten durchgeführt. Für diese wissenschaftliche Studie liegt ein positives Votum der Ethikkommission

sion der Ludwig-Maximilians-Universität München vor.

Methodik In Zusammenarbeit mit dem Kinderwunschzentrum Regensburg (KITZ – Kinderwunsch im Therapiezentrum) und dem Zentrum für Humangenetik Regensburg wurden Array-CGH-Untersuchungen (24sure, BlueGnome) zur Feststellung von chromosomalen Fehlverteilungen infolge einer bei einem der Kinderwunschpartner vorliegenden balanzierten Chromosomenveränderung (reziproke Translokationen, Robertson'sche Translokationen) durchgeführt. Am Tag 5 nach der Befruchtung (intrazytoplasmatische Spermieninjektion, ICSI) wurden der Blastozyste eine bis 10 pluripotente Trophektoblastzellen des Trophektoderms entnommen. Diese Zellen entsprechen genetisch dem Embryooblasten. Nach Amplifizierung der DNA (Whole Genome Amplification, WGA) und Fluoreszenz-Markierung wurde die Trophektodermprobe zusammen mit einer Referenzprobe auf einen Array aufgetragen. Das Ergebnis der Array-CGH liegt etwa 18 Stunden nach der Trophektodermbiopsie vor, sodass ein Embryotransfer im gleichen Zyklus erfolgen kann.

Ergebnisse Von 22 Trophektodermproben aus 7 Zyklen (3 reziproke Translokationen, 3 Robertson'sche Translokationen, 1 Deletion Xp21.2) wurde eine Array-CGH durchgeführt. Nur 3 Proben waren euploid (normale Anzahl der Chromosomen), während 19 Proben eine Chromosomenfehlverteilung zeigten, entweder aufgrund der reziproken oder Robertson'schen Translokation bei einem der Partner oder aufgrund weiterer zusätzlicher chromosomaler Aneuploidien. In 6 Proben einer PID für eine Muskeldystrophie Duchenne wurde eine 300 Kilobasen große Deletion im kurzen Arm des X-Chromosoms (Xp21.2) nachgewiesen, nachdem diese Deletion bereits molekulargenetisch im Rahmen einer Polkörperdiagnostik festgestellt wurde.

Schlussfolgerung Anders als die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ermöglicht die Array-CGH-Diagnostik den gleichzeitigen Nachweis von Chromosomenveränderungen infolge einer balanzierten Chromosomenveränderung bei einem der Partner als auch von Aneuploidien aller anderen Chromosomen. Die 24sure-Array-CGH-Technologie erlaubt die Durchführung einer PID innerhalb von 12–18 Stunden, sodass ein Embryotransfer im gleichen Zyklus erfolgen und dadurch eine Vitrifikation oder Kryokonservierung vermieden werden kann. Erste Ergebnisse sind sehr vielversprechend. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Häufigkeit von chromosomalen Mosaiken in den verwendeten Trophektodermproben zu untersuchen. Die Array-CGH kann darüber hinaus neben einer Mutationsanalyse für monogene Erkrankungen eingesetzt werden, für den seltenen Fall, dass bei den Kinderwunschpaaren sowohl eine monogene Erkrankung als auch eine Chromosomenveränderung vorliegt.

P22

Translocation and Aneuploidy Analyses of First Polar Bodies and of Trophectoderm Cells by Array-CGH: First Results in a Clinical Setting

M. Stumm¹, R. Wegner², C. König³, M. Schlawinsky³, M. Klein³, J. Gerike⁴, D. Mühlberger⁴, S. Marr⁴, M. Bloechle⁴

¹Zentrum für Pränataldiagnostik und Humangenetik;

²BG Berlin-Genetics GmbH; ³ImaGenes/Source BioScience LifeSciences; ⁴Kinderwunschzentrum an der Gedächtniskirche, Berlin

Objective Recent studies have shown that biopsy of polar bodies (PB) from oocytes and trophoctoderm cells (TE) from blastocysts followed by array comparative genomic hybridisation (aCGH) might be a good strategy for the detection of genomic imbalances in human gametes and embryos. Array-CGH enables in just one experiment a combined detection of aneuploidies for all chromosomes and for segmental chromosomal aberrations due to an unbalanced inheritance of a balanced parental translocation. That makes aCGH-analyses very helpful for couples with a high genetic risk, especially for carriers of a balanced translocation. Here, we report our first experiences and data from aCGH analyses in a real clinical setting.

Methods Polar bodies and/or trophoctoderm cells of more than 20 couples were biopsied. Our study group includes balanced translocation carriers with various translocations: e.g. Robertsonian translocations, whole arm translocations, as well as large and small segmental translocations. The samples were amplified by whole genome amplification (WGA) using the SurePlex Kit [BlueGnome] and their genomes examined by aCGH using 24sure and 24sure+ Cytochips [BlueGnome].

Results aCGH results of more than 70 PB- and TE-samples are presented. Technical problems and methodical limitations are discussed. Different strategies are shown for technical efficient and cost effective analyses of polar bodies and trophoctoderm cells in a clinical setting using 24sure and 24sure+ Cytochips.

Conclusion Molecular karyotyping by aCGH allows a combined detection of segmental chromosomal imbalances due to unbalanced inherited parental translocation and simultaneously the detection of aneuploidies of chromosomes not involved in the parental translocation. Thus, pregnancies with unviable or severely malformed embryos can be avoided. Furthermore, aCGH may help to identify euploid embryos with higher implantation potential.

P23

ProNGF, a Novel Player in the Ovarian Follicle?

S. Ströhl¹, S. Saller¹, D. Berg², U. Berg², S. Ojeda³, G. Disser³, A. Mayerhofer¹

¹Institut für Anatomie und Zellbiologie der LMU;

²A.R.T. Bogenhausen, München; ³Division Of Neuroscience, Oregon National Primate Research Center, Beaverton, USA

Background/Objectives Neurotrophins play important roles in survival, differentiation and death of neuronal and non-neuronal cells. The prototype neurotrophin nerve growth factor (NGF) is produced as precursor (proNGF), which is cleaved by various proteases. Importantly, proNGF differs from NGF by its binding abilities to receptors. ProNGF binds preferentially to the p75 neurotrophin receptor (p75NTR) and a co-receptor, sortilin, while the mature NGF binds to the trkA receptor, a tyrosine kinase, and the p75NTR. Furthermore, trkA is linked to growth and differentiation, while p75NTR/sortilin is associated with cell death. Neurotrophins and their receptors are present in the ovary. NGF, in particular, was previously shown to promote the development of pre-antral follicles in rat ovary and seems involved in the regulation of ovulation and ovarian angiogenesis mainly via the trkA receptor. In the human ovary trkA is expressed by human granulosa cells (hGC), which also release NGF into follicular fluid (FF), as shown in women undergoing in vitro fertilization (IVF). Whether the NGF precursor, proNGF, is also released and present in FF is unknown. ProNGF can be cleaved by a matrix metalloproteinase (MMP7) into the mature form. Hence we studied the proNGF – NGF – MMP7 – p75/trkA/sortilin system of human and monkey ovary.

Methods Expression and localization of proNGF, MMP7, trkA, p75NTR in human and monkey ovarian samples were analyzed by immunohistochemistry. ProNGF, NGF, MMP7, trkA, p75NTR, sortilin and furin, the intracellular enzyme able to cleave proNGF, were studied by RT-PCR and sequencing and/or Western Blot, using FFs or IVF-derived hGCs. The influence of synthetic NGF and proNGF on cell viability (ATP-levels) of IVF-derived hGCs and on mitogen-activated protein kinases (MAPKs; Western blotting) were examined.

Results Immunohistochemistry with an antibody recognizing proNGF revealed positive granulosa cell of monkey and human large antral follicles. In addition, FF in sections was also immunoreactive, suggesting presence of proNGF in the FF. In line with this observation, proNGF was unequivocally detected by Western Blot analysis in the FFs derived from IVF-patients, indicating that this NGF precursor is indeed released by granulosa cells in vivo. ProNGF is cleaved by MMP7 and furin to mature NGF. We hence searched for these enzymes in the ovary and in hGCs. Immunohistochemical staining results showed expression of MMP7 in granulosa cells of monkey and human

ovarian sections. MMP7 is also present in the FFs of humans and monkeys and by Western blotting and RT-PCR analyses it was found in cultured hGCs, which also express furin. The proNGF/NGF receptors p75NTR and trkA were detected in cultured hGC by Western Blot analysis and RT-PCR. We also found sortilin, a recently described proNGF receptor connected to cell death. Synthetic human proNGF and NGF when added to cultured hGCs in a broad concentration range, did however not consistently alter cell viability judged from unaffected cellular ATP levels observed after 24 h. Studies with MMP-inhibitors are under way to further explore a role for proNGF as a ligand for sortilin. However, both factors within minutes phosphorylated Erk1/2 MAPK, indicating the presence of a functional proNGF/NGF-receptor system.

Summary and Conclusions The results show that substantial amounts of “immature” proNGF are released into the FFs of primate antral follicles, which are endowed with a proNGF degrading enzyme and express proNGF/NGF receptors linked to cell survival/differentiation or death. The full spectrum of actions of proNGF/NGF remains to be shown but we propose that these factors via interaction with up to three receptors are involved in determining the fate of granulosa cells and thus possibly of ovarian follicles.

Supported by a grant from DFG MA 1080/17-3.

P24

Mutationsanalysen im NR5A1-(SF1)-Gen bei infertilen Männern

A. Tewes¹, F. Tüttelmann¹, S. Kliesch², P. Wieacker¹, A. Röpke¹

¹Institut für Humangenetik; ²Klinische Andrologie, Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universität Münster

Einleitung Das SF1 (Steroidogenic Factor 1)-Protein wird vom NR5A1-Gen (OMIM 184757) kodiert und spielt eine zentrale Rolle bei der Entwicklung der Gonaden und bei der Steroidsynthese. Mäuse mit einer homozygoten Deletion des NR5A1-Gens zeigten eine adrenale Agenesie, eine komplette testikuläre Dysgenese, persistente Müller'sche Strukturen bei XY-Tieren, partiellen hypogonadotropen Hypogonadismus und andere Auffälligkeiten. Außerdem hat das SF1-Protein eine zentrale Bedeutung in der endokrinen Entwicklung und Funktion.

Mutationsanalysen im NR5A1-Gen wurden in der Literatur zuerst bei Patienten mit primärer Nebenniereninsuffizienz beschrieben. Im weiteren Verlauf konnte auch bei Patienten mit 46,XY-DSD (Disorder of Sex Development), penoskrotaler Hypospadie oder bilateraler Anorchie und Mikropenis sowie bei Frauen mit primärer Ovarialinsuffizienz Mutationen nachgewiesen werden. Bei Patienten mit 46,XY-DSD wurden neben Missense- teilweise auch Nonsense-Mutationen nachgewiesen, die zu einem vorzeitigen

Stoppcodon führen. In einer Studie [1] wurden nun kürzlich auch bei ca. 4 % der untersuchten infertilen Männer mit Azoospermie- bzw. Oligozoospermie-Mutationen im NR5A1-Gen nachgewiesen, wobei es sich ausschließlich um Missense-Mutationen handelte, die zu einem Aminosäureaustausch führen.

Fragestellung Da es sich bei der Studie von Bashamboo et al. [1] um die bislang einzige Studie zu NR5A1 und eingeschränkter Spermatogenese handelt, sollte eine vergleichbare Analyse bei klinisch vollständig charakterisierten infertilen Männern erfolgen.

Methoden Sequenzanalyse bei 300 Patienten (100 mit hochgradiger Oligozoospermie, Spermienkonzentration < 5 Mill/ml, 100 mit Azoospermie und 100 mit Normozoospermie als Kontrollen) der Klinischen Andrologie des Centrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Münster, die sich wegen unerfüllten Kinderwunsches vorstellten. Patienten mit bekannten Ursachen für eine männliche Infertilität (u. a. Maleszensus, Infektionen, Chromosomenstörungen) wurden ausgeschlossen. Es handelt sich um idiopathisch infertile Patienten.

Ergebnisse Bei zwei der 200 untersuchten infertilen Männer wurde eine Sequenzveränderung im NR5A1-Gen gefunden, die jeweils zu einem Aminosäureaustausch führt. Ein Patient zeigte eine Kryptozoospermie (wiederholt nur wenige Spermien im Ejakulat nachweisbar, < 0,1 Mill/ml), der andere Patient eine Azoospermie aufgrund eines vollständigen Meiosearrest. Die nachgewiesenen Mutationen konnten nicht bei den untersuchten Kontrollen nachgewiesen werden und sind auch nicht in der dbSNP-Datenbank für polymorphe Veränderungen (Small Nuclear Polymorphism, SNP; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) vorhanden.

Schlussfolgerung Im Gegensatz zur Studie von Bashamboo et al. [1] wurden in unserem Patientenkollektiv nur bei 2 von 200 (1 %) der infertilen Männer Mutationen im NR5A1-Gen nachgewiesen. Weitere Analysen bei Männern mit eingeschränkter Spermatogenese sind nötig, um die Häufigkeit von NR5A1-Mutationen in Patientengruppen mit spezifischen Phänotypen (histologisch gemischte Atrophie, Meiosearrest, usw.) zu bestimmen. Ob eine routinemäßige Analyse des NR5A1-Gens bei Männern mit hochgradig eingeschränkter Spermienzahl sinnvoll ist, kann aufgrund der bisherigen Daten noch nicht entschieden werden.

Diese Studie wurde im Rahmen der DFG Forschergruppe „Germ Cell Potential“ (FOR 1041, Förderkennzeichen TU 298/1-1) durchgeführt.

Literatur:

1. Bashamboo A et al. Human male infertility associated with mutations in NR5A1 encoding steroidogenic factor 1. Am J Hum Genet 2010; 87: 505–12.

P25

Key Genetic and Epigenetic Factors Contributed From Male Germ Cell to Early Embryo: a Novel Bovine Model for Studies on Idiopathic Infertility

U. Schagdarsurengin¹, T. Dansranjav¹, Y. Yang¹, B. Samans², H. Blum³, M. Reichenbach⁴, S. Krebs³, E. Wolf⁴, K. Steger¹

¹Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie;

²IFZ Biometrie und Populationsgenetik, JLU Gießen;

³Genzentrum, München; ⁴Molecular Animal Breeding and Biotechnology, LMU München

Objectives During spermiogenesis histones are replaced by protamines, which ensure a compact, protected and transportable genome. However, this process is incomplete (85%) with the result that chromatin of mature sperm exhibits a dual protamine/nucleosome structure. Whereas protamines are well investigated, the function of residual histones remains to be clarified. Microarray-based studies showed recently that sperm-histones exhibit specific modifications (acetylation and methylation on different lysine residues) and associate with distinct genomic regions relevant for early embryo development (HOX gene cluster, gene promoters). Thus, epigenetic signature of a sperm is discussed to have a biological function at fertilization and early embryogenesis and might be a crucial factor for idiopathic male infertility. The aim of our study was to analyze epigenetic factors contributed from male germ cell to early embryo using a new established bovine model, allowing investigations in embryos, and to evaluate candidate risk factors for human idiopathic male infertility.

Methods The presence of histones (H3K9ac, H4K12ac, H4K16ac and H4K8ac) was examined in bull and human sperms by IHC (immunohistochemistry). H3K9ac was further analyzed in bull sperm by ChIP (chromatin immunoprecipitation) and ChIP-sequencing (Illumina Technology) followed by bioinformatics (gene ontology analysis) to evaluate and characterize gene promoters interacting with H3K9ac. The bond of H3K9ac to gene promoters was controlled by ChIP-PCR. The CpG-methylation within bovine sperm in gene promoters interacting with H3K9ac was analyzed by COBRA (combined bisulfite restriction analysis). Candidate genes associating with H3K9ac in bull sperm were further analyzed in bovine oocytes and in in-vitro fertilized bovine early embryos (1-, 2- and 4-cell stages) regarding their mRNA-expression status (RT-PCR). To ensure the expression of paternal allele, the cDNAs were analyzed regarding SNPs (single nucleotide polymorphisms) by sequencing.

Results IHC in bovine and human sperm revealed presence of H3K9ac, H4K12ac and H4K16ac, whereas H3K9ac showed the highest signal in both species. Our first ChIP and ChIP-sequencing experiments in bovine sperm revealed that H3K9ac is predomi-

nantly associated with gene promoters, which control cytoplasmic Ca^{2+} levels (*SLC24A1*, *HPCAL1*, *LCP1*, *CDH13*, *PADI2*, *MACF1*, *ITPR2*, *SMOC2*, *CAPN3*) and induce apoptosis (*TGFB2*, *WFOX*, *PRKCA*). Interestingly, most of these promoters were CpG-promoters and unmethylated on spots associating with H3K9ac. RT-PCR analyses in bovine early embryos showed high mRNA expression in almost all evaluated candidate genes (except *CAPN3* and *SMOC2*) in bovine zygote as well as in 2- and 4-cell embryo stages, which confirms their involvement in early embryo development.

Conclusion The present study benefits from microarray analysis and goes into the detail dealing with epigenetic status of single candidate genes contributed from sperm to early embryo in order to evaluate potential risk factors for human idiopathic male infertility as well as to investigate the underlying common molecular mechanisms. It demonstrates the great potential of a new established bovine model to investigate genetic and epigenetic issues relevant for fertility. Our first candidate genes for idiopathic infertility comprise genes involved in regulation of cytoplasmic Ca^{2+} level and apoptosis. It is known that Ca^{2+} level is crucial for post-fertilization events including pronuclear migration, nuclear envelope breakdown and cell cleavage. Apoptosis is important through elimination of abnormal cells and controlling the cell number of the early embryo.

P26

Diagnostik der spinalen Muskelatrophie Typ 1 (SMA1) durch Trophektodermbiopsie von Blastozysten

B. Seifert¹, U. Schön², B. Paulmann¹, D. Seifert¹, A. Hehr¹, U. Köhler², E. Holinski-Feder²

¹KITZ – Kinderwunschtherapie Im Zentrum, Regensburg; ²MGZ – Medizinisch Genetisches Zentrum; München; ³Zentrum und Institut für Humangenetik, Universität Regensburg

Fragestellung Im Rahmen einer interdisziplinären Studie wurde die Präimplantationsdiagnostik durch Trophektodermbiopsie für monogene Erkrankungen etabliert. Die Ergebnisse konnten hinsichtlich der Amplifikationseffizienz und Konformität mit den Befunden der Polkörperdiagnostik (PKD) validiert werden.

Methoden Bei dem Ehepaar liegt jeweils eine heterozygote Deletion der Exons 7 und 8 des SMA1-Gens vor. Es wurden 2 IVF- und ICSI-Zyklen außerhalb durchgeführt. Nach der 2. Behandlung kam es zu einer Schwangerschaft und Geburt durch Sectio; das Kind ist nach 4 Monaten infolge SMA1 verstorben.

Diagnosen: PCO-Syndrom, Endometriosis genitalis externa, Oligoasthenozoospermie.

Im März 2011 wurde ein langes Protokoll für eine weitere IVF/ICSI-Behandlung mit Decapeptyl 0,1 mg, Puregon 225 IE, ab 6. Stimulationstag Mischprotokoll Puregon/Menogon jeweils 225 IE durchgeführt. Die

Ovulationsinduktion erfolgte am 13. Stimulationstag. Die Follikelpunktion ergab 16 Eizellen, davon 10 reif, alle 10 imprägniert, 1x1 Vorkern, jedoch insgesamt grob granuliert mit intrazytoplasmatischen Einschlüssen.

Am Tag 6 erfolgte die Trophektodermbiopsie von 3 Embryonen, die danach vitrifiziert wurden. Es standen jeweils Proben von 3–5 Trophektodermmzellen zur Verfügung, die lysiert durch eine Multiplex PCR mit 3 Markersystemen und 2 spezifischen Nachweis-systemen amplifiziert werden konnten. Danach wurden die Amplifikate zusätzlichen spezifischen PCRs unterzogen und anschließend mittels Fragmentanalyse, Sequenzierung und Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Ergebnisse Im Juni 2011 erfolgte ein artifizierter Kryozyklus mit Progynova und Utrogest und dem Transfer von 2 sicher diagnostizierten Blastozysten. Am 11.07.2011 konnte eine Schwangerschaft mit einem HCG-Wert von 185,5 mIU/ml festgestellt werden. Es besteht eine klinische Schwangerschaft.

Schlussfolgerung Die Diagnostik von monogenen Erkrankungen mithilfe der Trophektodermbiopsie von Blastozysten ist möglich. Nicht selten sind die Blastozysten erst am Tag 6 für eine Biopsie geeignet. Der Transfer am Tag 7 macht aus reproduktionsmedizinischer Sicht keinen Sinn, deshalb sollten die Blastozysten am Tag 6 vitrifiziert und der Embryotransfer in einem Folgezyklus vorgenommen werden.

P27

Präimplantationsdiagnostik an Polkörpern bei familiärer Translokation

A. Wagner¹, T. Harasim¹, W. Würfel², K. Fiedler², G. Krüsmann², R. Suttner², D. Shakeshaft², H. Klein¹, I. Rost¹

¹Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin, Dr. Klein u. Dr. Rost; ²Kinderwunsch Centrum München

Fragestellung Die zytogenetische Untersuchung des dritten Frühaborts in Folge bei einer 39-jährigen Patientin ergab einen unbalancierten Karyotyp. Die Chromosomenanalyse beider Eltern zeigte, dass die Mutter Trägerin einer balancierten Translokation t(7;8) war. Nach einem weiteren Abort entschloss sich das Paar zu einer Polkörperdiagnostik (PKD) nach künstlicher Befruchtung durch ICSI. Im zweiten ICSI-Zyklus mit PKD wurde die Patientin schwanger, erlitt jedoch wieder eine Fehlgeburt. Nach erneuter Stimulation und PKD wurde nach inzwischen 5 Aborten Anfang 2010 ein gesunder Junge geboren. Inzwischen wurde auch der Bruder der Patientin als Träger der t(7;8) identifiziert, dessen Ehefrau ebenfalls Fehlgeburten hatte. Der Bruder wandte sich im September 2010 ebenfalls an uns mit der Anfrage, ob eine PID durchgeführt werden könnte. In 2 ICSI-Zyklen entwickelten sich die befruchteten Eizellen (5 EZ bzw. 3 EZ)

nicht über das Zweizellstadium hinaus. Eine PID war deswegen bisher nicht möglich. Die Patientin, heute 42 Jahre alt, hat weiteren Kinderwunsch. Im derzeitigen ICSI-Zyklus wird mithilfe der Array-basierten vergleichenden Genom-Hybridisierung (CGH) erstmals eine gleichzeitige Überprüfung von Translokation und Aneuploidien vorgenommen. Da sich aus der Literatur Hinweise ergeben, dass eine reziproke Translokation zu zusätzlichen Aneuploidien prädestiniert, bringt die Array-Technik mit Erfassung aller Imbalancen hier eine wesentlich höhere diagnostische Sicherheit.

Methoden FISH-Verfahren: Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung erfolgte mit einer 3-Farben-Sondenkombination, die zuvor an einer Lymphozytensuspension der Patientin an einer Verwendbarkeit für eine Polkörperdiagnostik getestet wurde. Verwendet wurden die Subtelomersonde 7QTEL (VYJyRM2000, 7qter, rot) sowie die Zentromersonden CEP7 (D7Z1, 7p11.1-q11.1, aqua) und CEP8 (D8Z2, 8p11.1-q11.1, grün). Mit diesem Sondenset wurden in der 1. PKD 4 Polkörper (PK) von 2 Eizellen (EZ), in der 2. PKD 15 PK von 8 EZ und in der 3. PKD 6 PK von 4 EZ untersucht.

Array-CGH-Verfahren: Die PK1 und PK2 wurden entsprechend dem 24sure™ (BlueGnome, Cambridge)-Protokoll lysiert und einer Gesamtgenom-Amplifikation (WGA, whole genome amplification) unterzogen. Parallel wurden 2 Positiv- und 2 Negativkontrollen mitgeführt. Die Amplifikate sowie gegengeschlechtliche Referenz-DNA wurden fluoreszenzmarkiert und eine Array-CGH mit dem 24sure™-array durchgeführt. Der verwendete Array hat ein durchschnittliches Auflösungsvermögen von 0,5 Mb. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Bluefuse-Software (Vers. 2.3).

Ergebnisse Die 3. PKD mit dem FISH-Verfahren ergab 2 balancierte EZ und eine unbalancierte EZ; über eine EZ war keine Aussage möglich. Der Patientin wurde ein Mehrzellembryo transferiert, der zur Geburt eines Jungen (46,XY nach PND) führte. Im derzeitigen IVF-Zyklus standen 7 EZ für die ICSI zur Verfügung. Die WGA war für alle 11 gewonnenen PK erfolgreich. Von 4 EZ wurden jeweils PK1 und PK2 auf den Array hybridisiert. Bezüglich der Translokation waren davon 3 EZ unbalanciert und eine EZ balanciert. Alle 4 EZ hatten zusätzliche Aneuploidien, sodass keine EZ zum Transfer geeignet war. Bei der für die Translokation balancierten EZ wurde im PK2 eine Fehlverteilung von Chromosom 1 nachgewiesen.

Schlussfolgerungen Array-CGH ist bei PKD (PID) sinnvoll für die Diagnostik balancierter reziproker Translokationen, weil sie neben der Erkennung unbalancierter Eizellen (Embryonen) auch Aneuploidien feststellen kann, die nach Pujol et al. [1] durch das Vorliegen einer Translokation gehäuft auftreten können.

Literatur:

1. Pujol A, Durban M, Benet J, Boiso I, Calafell JM, Egozcue J, Navarro J. Multiple aneuploidies

in the oocytes of balanced translocation carriers: a preimplantation genetic diagnosis study using first polar body. *Reproduction* 2003; 126: 701.

■ Andrologische Endokrinologie und männliche Fertilitätsstörungen 1

P28

Molekulare Charakterisierung humaner Spermatogonien

K. von Kopylow, A. Spiess, W. Schulze, C. Kirchhoff
Abteilung für Andrologie, Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

Fragestellung Spermatogoniale Stammzellen (SSCs) als Untergruppe der Spermatogonienpopulation bilden durch ständige Selbsterneuerung die Grundlage für eine lebenslange Spermatogenese im adulten männlichen Organismus. Therapeutisch eingesetzt könnten diese Zellen zur Behandlung männlicher Fertilitätsstörungen dienen, Ausgangszellen für eine Restitution der Spermatogenese nach Radiatio und/oder Chemotherapie sein sowie weiterhin die Quelle zur Gewinnung von Zellen mit Stammzellpotential in der regenerativen Medizin darstellen. Ein solcher therapeutischer Einsatz setzt die umfassende Charakterisierung der Zellen voraus. Trotz vieler Anstrengungen in der Vergangenheit, konnten bisher keine eindeutigen Parameter für die spermatogoniale Stammzellpopulation sowohl auf morphologischer als auch auf molekularer Ebene festgelegt werden. Die von uns initiierte molekulare Charakterisierung hatte vor allem das Ziel, nach Markern zu suchen, die auch später bei der klinischen Umsetzung eine wichtige Rolle spielen dürften und weiterhin einen Beitrag zur Aufklärung der Spermatogeniogenese leisten könnten. Zelloberflächenmoleküle können darüber hinaus zur Isolierung und Stimulierung von Spermatogonien über entsprechende Liganden während einer Zellkultur dienen.

Methodik Zum Auffinden spermatogonien-spezifischer Marker führten wir eine Mikroarray-Analyse an Hodenbiopsien von Patienten zweier definierter Testispathologien durch. Einige der identifizierten Spermato-

gonien-Marker wurden mittels Immunhistochemie getestet. Koexpressionsanalysen mit diesen und zusätzlichen Markern dienten zur Charakterisierung der spermatogonialen Gesamtpopulation. Ein Antikörper gegen das in der Mikroarray-Analyse als spermatogonien-spezifisch identifizierte Oberflächenprotein FGFR3 wurde zur Isolierung einer spermatogonialen Subpopulation mithilfe des MACS-Verfahrens eingesetzt.

Ergebnisse Für die Mikroarrayanalyse wurden Hodenbiopsien von Patienten mit zwei einheitlichen Erscheinungsformen des Keimepithels, modifizierter Johnsen Score 2 (Sertolizell-Syndrom) und modifizierter Johnsen Score 3 (*Tubuli seminiferi* mit Spermatogonien als einzige Keimzellen), benutzt. Das Hodengewebe wurde im Vorfeld mikroskopisch (Semidünnschnitttechnik und „tissue testicular sperm extraction“ [Test-TESE]) analysiert und den entsprechenden Scores zugeordnet. Mit diesem Ansatz konnten unter Anwendung der Bonferroni-Korrektur 388 Gene ermittelt werden, die mit hoher statistischer Signifikanz zwischen den beiden pathologischen Zuständen differenziell exprimiert sind. Als Oberflächenmarker für Spermatogonien wurde der Wachstumsfaktorrezeptor FGFR3 („fibroblast growth factor receptor 3“) nachgewiesen. Mittels Immunfluoreszenz-Mehrfachmarkierung wurde innerhalb der Spermatogonienpopulation eine unerwartete Heterogenität bzgl. der exprimierten Marker und keine einfache Korrelation mit der klassischen Zelltypisierung festgestellt. Neben einer Vielzahl an koexprimierten Markern wurden einige sich hinsichtlich ihrer Expression abschließende Proteine detektiert (Tab. 2).

FGFR3- und/oder UTF1-positive Spermatogonien könnten die Stammzellpopulation darstellen. Mittels MACS-Verfahren über den spermatogonialen Oberflächenmarker FGFR3 wurde eine 15-fache Anreicherung von UTF1-positiven Spermatogonien erreicht.

Schlussfolgerung Die Mikroarrayanalyse führte zur Detektion spermatogonien-spezifischer Marker. Einer dieser Marker, das Oberflächenprotein FGFR3, diente zur Isolierung und Anreicherung einer potenziellen Spermatogonien-Stammzellpopulation. Hiermit wurde die Grundlage zur Kultivierung dieser Zellen gelegt. Die Erkenntnisse

Tabelle 2: K. von Kopylow et al. (P28). Protein-Koexpression in humanen Spermatogonien.

Marker	Ausschluss	weitgehender Ausschluss	Koexpression
DMRT1	FGFR3	UTF1	Ki-67 c-Kit
Ki-67	FGFR3		DMRT1 c-Kit
FGFR3	DMRT1 Ki-67		UTF1
UTF1		DMRT1 c-Kit	FGFR3
c-Kit		UTF1	DMRT1 Ki-67

aus den Koexpressionsanalysen liefern im Zusammenhang mit den publizierten Beschreibungen der Proteine Hinweise auf mögliche funktionelle Zustände der Zellen mit entsprechendem Expressionsmuster.

P29

TCAM2: The Right Model for Seminoma Studies?

U. Eppelmann¹, F. Gottardo¹, J. Wistuba¹, F. Wuebbeling², M. Burger², S. Schlatt¹, S. Kliesch¹, C. Mallidis¹

¹Klinische Andrologie, Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie; ²Institut für Numerische und Angewandte Mathematik, Universität Münster

Background Germ cell tumours (GCTs) constitute over 60% of all malignancies diagnosed in men between the ages of 17 and 45 years. Of these, the most frequent are seminomas and embryonal carcinomas. Although testicular tumours have excellent cure rates, the success of the therapy is dependant on the accuracy of diagnosis and choice of treatment. Derived from a human seminoma, TCAM2 cells constitute the main model for in vitro studies of the condition. Despite their wide spread use, they have only been partially characterised, hence questions remain regarding the homogeneity of TCAM2 and as a consequence there are doubts as to how representative the cell line is of the true pathological state. Raman microspectroscopy is a laser based non invasive technique which can provide a detailed chemical “fingerprint” of a living cell and as such is being increasingly employed in medical research.

Aim To systematically assess the Raman spectral profiles of our TCAM2 cell line, in order to determine its homogeneity and to identify any cellular sub populations.

Materials and Methods TCAM2 cells (Hubert Schorler Lab., Bonn) were streaked onto suprasil microscope slides and either air dried or desiccated. Raman spectra were obtained using the Horiba LabRAM ARAMIS system. After determination of the optimal analytical settings, a map consisting of a 200 spectral array was obtained from 20 cells/grouping. A further 200 cells/grouping were assessed using “duoscan” providing an overall spectral average of the cells’ constituents. Beyond broad peak assignments, spectra were further analysed using Principal Component Analysis (PCA), Clustering Methods, Sparsity Separation and Harmonic Analysis. Results were compared to control spectra obtained from the previously characterised mouse embryonic fibroblast cell line, embryonic carcinoma and MCF7 breast cancer cell lines.

Results Overall spectral accumulations showed the assessed TCAM2 cells to possess one of three distinct patterns. Closer examination of peak distribution and relative size indicated that although there were similarities in the spectra differences were prominent in Raman shifts in the 809, 1002,

1032, 1450 and 1608 cm⁻¹ regions. Desiccated samples did not differ substantially from the air dried samples indicating that Raman vibrations were not influenced by the presence/absence of water. Spectra obtained from mouse embryonic fibroblasts, MCF7 and embryonic carcinoma cells were all similar indicating homogeneous populations. Distinct differences were seen in the profiles of the TCAM2, MCF7 and fibroblasts but there was a similarity in spectral profile of one of the TCAM2 profiles and that from the embryonic carcinoma.

Conclusions Our findings of three differing spectral fingerprints suggest that TCAM2 comprise three differing cell populations, one of which is embryonic carcinoma in origin. This adds further credence to the proposal that the cell line is not homogeneous but is made up of seminoma cells, apoptotic cells and differentiated embryonic carcinoma cells.

P30

ROS and Consequences for Human Testicular Peritubular Cells

C. Kampfer¹, S. Hebele¹, J. Schwarzer², A. Mayerhofer¹

¹Institut für Anatomie und Zellbiologie, LMU München; ²Praxis Urologie/Andrologie, Freising

Objectives Evidence for inflammation-like events and oxidative stress in the testes of infertile men is mounting. In particular reactive oxygen species (ROS) may play a critical role [Aitken et al., 2008, Turner et al., 2008, Valko et al., 2007]. Having established that COX-2 and a highly reactive prostaglandin derivative, 15-deoxy-delta-(12-14)-PG-J2 (15dPGJ2), are present in testicular biopsies of infertility patients [Frungeri et al., 2006, Welter et al., 2011; unpublished data], we speculate that COX-2 directly and/or via 15dPGJ2, may be involved in the generation of ROS, which may mediate further changes.

Indeed 15dPGJ2 can induce the generation of ROS in human testicular peritubular cells (HTPCs; isolated from men with normal spermatogenesis) thereby also reducing the contractile abilities of these cells and the levels of smooth muscle actin [SMA; Schell et al., 2010]. Whether this is also the case for HTPC-Fs, the corresponding cells isolated from men with impaired spermatogenesis and testicular fibrotic remodelling of the peritubular wall, is not known. Likewise, the signalling cascade of ROS in HTPC-/Fs is unknown, but in other cells phosphorylation of MAP kinases, including MAPK p44/42, was described upon the generation of ROS [Klotz et al., 2002, Lee et al., 2002, Sigaud et al., 2005].

This study focuses on the role of ROS, its signalling via MAPK p44/42 and the consequences for SMA, representing a prototype contractility factor, and cGKI, a factor required for smooth muscle cell dilatation, in HTPCs and HTPC-Fs.

Methods Primary cell cultures of human testicular peritubular cells (HTPC and HTPC-F) were used to study MAPK signalling. 15dPGJ2 (Cayman Chemicals) induced ROS generation was monitored with the fluorescent dye Cell ROX™ Deep Red Reagent (Invitrogen™) using a fluorescence microscope. Western Blot with anti-MAPK p44/42, anti-P-MAPK p44/42 (both Cell Signaling), anti-cGKI (gift Robert Feil; Tübingen) and anti-SMA (Sigma-Aldrich) complemented the study.

Results 15dPGJ2 induced the generation of ROS in both cell models. In HPTCs, phosphorylation and hence activation of MAPK p44/42 occurred, while in HTPC-Fs levels of MAPK p44/42 were reduced upon stimulation. The levels of cGKI, a marker for smooth muscle relaxation, did not change significantly after incubation of HTPC/Fs with 15dPGJ2. However, the contractility factor SMA was reduced in both HTPCs and HTPC-Fs.

Conclusion MAPK signalling is elicited by 15dPGJ2 upon ROS in HPTCs, but this signalling pathway is down-regulated in HTPC-Fs. Additional studies are required to elucidate other components of the signalling pathway of ROS induced by 15dPGJ2. Downstream actions of 15dPGJ2 were however comparable in both cellular systems and indicate that ROS are linked to a loss of smooth-muscle characteristics of human testicular peritubular cells.

Supported in part by DFG and Friedrich-Baur Stiftung.

P31

UVb Irradiation Causes Sperm Nuclear DNA Fragmentation but the Accompanying Mitochondrial Dysfunction Does Not

C. Mallidis¹, L. Weigend¹, V. Sanchez¹, K. Redmann¹, J. Wistuba¹, P. Groß², F. Wübbeling², C. Fallnich², M. Burger², S. Kliesch¹, S. Schlatt¹

¹Centre for Reproductive Medicine and Andrology; ²Optics group, Department of Applied Physics, University of Münster

Introduction New molecular based techniques have highlighted the importance of sperm nDNA integrity to embryo quality and implantation. The focus of many studies over the passed decade, it is now acknowledged the DNA fragmentation found in sperm is the consequence of oxidative stress. However what instigates this stress remains contentious. Presently the prevailing hypothesis is that either internal (e.g. varicocele, aging) and/or external (e.g. smoking, pesticides) factors set into action a cascade of events that result in mitochondrial dysfunction and the release of reactive oxygen species (ROS) culminating in nDNA damage. Unable to explain various inconsistencies, the plausibility of this proposition has been questioned.

Question Our aim was to induce mitochondrial dysfunction by UVB irradiation, evalu-

ate the sperm nDNA for any contribution by mitochondrial ROS and determine the influence of seminal plasma.

Materials and Methods Semen samples were collected from 30 patients attending the Clinical Andrology Department, CeRA. Samples were grouped: PBS (0%), 20%, 40%, 60%, 100% seminal plasma then UVB irradiated for 15s, 30s, 45s, 60s, 120s, 180s, 240s. Sperm motility, viability were assessed (WHO criteria), nDNA status determined by acridine orange test, mitochondrial leakage with MitoRed and lipid peroxidation with BODIPY (final three tests by flow cytometry). Selected samples were left for 15 mins assessed as before then irradiated for the identical time and again assessed. nDNA damage was localized using Raman micro-spectroscopic spectral mapping.

Results Even short UVB exposure was found to significantly decrease sperm motility and viability, however nDNA fragmentation remained unaltered. Damage was seen to increase at high dosages but only after the death of the sperm. At levels where sperm were immotile but not dead (i.e. mitochondria had been damaged but the cell survived) no difference was seen in nDNA integrity. Increasing concentrations of seminal plasma were found to ameliorate the actions of UVB with as little as 40% capable of providing maximum protection. Raman spectral mapping found nDNA damage primarily in the proximal region of the head.

Conclusion The oxidative attack caused by UVB irradiation is capable of causing serious damage to sperm mitochondria (manifest as decreased motility), nDNA and ultimately can kill the cell. However, no evidence was found that damaged mitochondria and their proposed ROS leakage caused any nDNA damage (neither the quantity nor location). In light of these findings and the accumulating evidence from other studies, the current hypothesis is unable to adequately explain the origin of sperm nDNA fragmentation.

P32

The Apo E-/-/LDL Receptor-/- Double Knockout Mouse as a Novel Model of Atherosclerosis Related Disturbances of Spermatogenesis in Human

A. Paradowska¹, K. Steinfeld¹, A. Langheinrich², B. Altinkilic¹, K. Steger², M. Bergmann³, W. Weidner¹
¹Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie;
²Klinik für Radiologie; ³Institut für Anatomie, Veterinär anatomie und Embryologie, JLU Gießen

Introduction Age-related testicular changes are associated with an increase of germ cell degeneration, reduction of tubular diameters and androgen decline resulting in a gradual decrease of sperm count. Less is known about the association of these findings to vascular atherosclerotic alterations, however arterial lesions in testicular biopsies of azoospermic men have been identified. Using

Apolipoprotein E (APOE) and Low Density Lipoprotein Receptor (LDL) Deficient Mice Model (ApoE-/-/LDL Receptor-/- Double Knockout Mouse) exhibiting hypercholesterolemia and the formation of atherosclerotic lesions similar to those in human, we aimed to investigate mechanisms underlying atherosclerosis related infertility.

Methods Testes (n = 10) from ApoE-/-/LDL receptor-/- double knockout mice at the age of 80 weeks were perfused in vivo with contrast agent, harvested and scanned with micro-CT at (4.9 µm³) voxel size. Testes (n = 8) of C57/BL mice at the same age served as controls. Testis volume (mm³) and total vascular volume fraction (mm³) were quantified using micro-CT. Serum testosterone levels were determined. Testicular histology and epididymal sections were analyzed for tubular structure, spermatogenic scores and sperm count. The expression of protamine 2 as a marker for elongated spermatids, inflammation markers (CD4, F4/80) and hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF1 alpha) were investigated using immunohistochemistry.

Results ApoE-/-/LDL receptor-/- double knockout mice exhibit diminished testis and vascular volume fraction compared to controls (p < 0.001). These findings were associated with a reduction of testosterone levels (p < 0.001). Mixed atrophy was present in 41% of the seminiferous tubuli in ApoE-/-/LDL receptor-/- double knockout mice at the age of 80 weeks. Sperm counts from the epididymis demonstrated a significant decrease in ApoE-/-/LDL receptor-/- double knockout mice (p < 0.001). In addition, sperm specific protamine 2 expression was decreased in testicular tissue and epididymis of ApoE-/-/LDL receptor-/- double knockout mice as compared to control mice. Peritubular inflammatory infiltration and the expression of the hypoxia related marker was observed.

Conclusions Mixed testicular atrophy in ApoE-/-/LDL receptor-/- double knockout mice is linked to reduced testis volume, vascular volume fraction and low testosterone serum levels, suggesting a direct relation between atherosclerosis and disturbed spermatogenesis.

■ Andrologische Endokrinologie und männliche Fertilitätsstörungen 2

P33

Langzeitverlauf bei präpubertärer Gynäkomastie im Rahmen eines Aromatase-Exzess-Syndroms

S. Schanz, G. Fierlbeck
 Universitäts-Hautklinik, Tübingen

Fragestellung Das Aromatase-Exzess-Syndrom ist sehr selten und wurde 1998 erstmals beschrieben. Die betroffenen männlichen Patienten fallen typischerweise durch prä-

pubertäre Akzeleration der Wachstumsgeschwindigkeit, vorzeitige Knochenreifung, Zeichen des Hypogonadismus und präpubertäre Gynäkomastie auf. Wir berichten über den Verlauf und die Therapie eines lang-jährigen Patienten mit diesem Syndrom.

Fallbericht Bereits im 11. Lebensjahr war es zur Ausprägung einer Gynäkomastie gekommen, bevor die Pubertät im 12. Lebensjahr einsetzte. Der Pubertätsverlauf war insgesamt verzögert und mit 19 Jahren war es noch nicht zu einer vollständigen Virilisierung, allerdings zum Hypophysenschluss bei Kleinwuchs, gekommen. In der männlichen Verwandtschaft war eine ähnliche Symptomatik in unterschiedlicher Ausprägung bereits beim Großvater, bei einem Cousin und bei 3 Onkel mütterlicherseits aufgetreten. Von pädiatrischer Seite war die Diagnose mittels Nachweis eines Repeat-Polymorphismus im P450-Aromatase-Gen gesichert worden. Die Gynäkomastie wurde im 17. Lebensjahr operativ korrigiert. Bei normalen Werten für LH und FSH lagen in unbehandeltem Zustand die Androgene deutlich unterhalb und die Östrogenwerte deutlich oberhalb der Norm, was meist mit Androgenmangelsymptomatik einherging. Der mittlerweile 30-jährige Patient wurde daher mehrfach über längere Zeiträume mit dem Aromatase-Inhibitor Anastrozol in verschiedenen Dosierungen von 0,5–1 mg täglich behandelt, worunter sich die Hormonwerte korrigieren ließen und sich das körperliche Befinden vor allem hinsichtlich der Leistungsfähigkeit und der virilen Körperbehaarung jeweils rasch besserte.

Schlussfolgerung Das Aromatase-Exzess-Syndrom ist sehr selten. Wegen des Auftretens einer präpubertären Gynäkomastie ist es didaktisch sehr interessant, da es helfen kann, pathogenetische Aspekte der Gynäkomastie zu veranschaulichen.

P34

Ist die Verwendung des AMS-Fragebogens zum Screening für Hypogonadismus in der andrologischen Sprechstunde sinnvoll?

F. Zengerling, I. Damjanoski, T. Schnöller, A. Schrader, L. Rinnab
 Klinik für Urologie, Universitätsklinikum Ulm

Fragestellung Das Altern beim Mann ist mit einer progredienten Abnahme der Serumtestosteronproduktion verbunden. Circa 15–20 % aller Männer weisen nach dem 50. Lebensjahr ein altersassoziiertes Testosterondefizit auf. Dieses geht mit einem vermehrten Auftreten von Symptomen einher – wie Konzentrationsstörungen, Nervosität, verminderte kognitive Funktionen sowie Depressivität, Antriebsstörung, Libidomangel, erektile Dysfunktion, Osteoporose und Hitzewallungen. Das klinische Syndrom wird als „late onset hypogonadism“ (LOH) bezeichnet. Ziel dieser Untersuchung war es zu untersuchen, ob der AMS-Fragebogen als Screeninginstrument zur Detektion eines Hypogonadismus geeignet ist.

Methoden Es erfolgte die Evaluation mittels AMS-Fragebogen bei 109 Patienten mit einem Alter von 27–85 Jahren (Median: 56 Jahre). Der AMS-Fragebogen ist gegliedert in einen somato-vegetativen, psychischen sowie sexuellen Fragenkomplex. Die Ergebnisse wurden mit den Werten für das Gesamttestosteron (gT), das freie Testosteron (fT) und das SHBG als biochemische Goldstandards für die Diagnose von Hypogonadismus korreliert. Ein fT-Wert < 180 pmol/l bzw. gT-Wert von < 8 nmol/l wurde als Grenzwert für einen signifikanten Hypogonadismus definiert.

Ergebnisse Der Median für fT bzw. gT lag bei 239,4 pmol/l (13,9–676,6 pmol/l) bzw. 12,7 nmol/l (0,2–35,2 nmol/l) und für SGHB bei 34,4 nmol/l (5,5–103,6 nmol/l). 20 (19,2 %) bzw. 18 (16,5 %) Patienten zeigten ein signifikantes Defizit an fT bzw. gT. Die Werte für fT und gT korrelierten untereinander hochsignifikant ($r = 0,81$; $p < 0,001$, Pearson). 13,8 % der Patienten mit normalem oder leicht pathologischem AMS-Score (< 37) litten unter einem signifikanten fT-Defizit, hingegen 26,1 % der Patienten mit einem AMS-Score von ≥ 37 ($p = 0,14$; Fisher's exact). 9,8 % der Patienten mit einem AMS-Score < 37 zeigten signifikanten gT-Mangel, dagegen 25 % jener mit einem AMS-Score von ≥ 37 ($p = 0,10$; χ^2). Die Sensitivität des AMS-Score zum Nachweis eines fT- bzw. gT-Mangels lag bei 60 bzw. 66,7 %, die Spezifität bei 59,5 bzw. 61,1 %. Eine identische Sensitivität bei verbesserter Spezifität (65,4 bzw. 65,9 %) zeigte sich für einen AMS-Fragebogen ohne den sexuellen Fragenkomplex. Hier korrelierte ein pathologischer AMS-Score auch signifikant mit einem laborchemisch nachgewiesenen Defizit an fT ($p = 0,04$, Fisher's exact) und gT ($p = 0,03$, χ^2).

Schlussfolgerung Der AMS-Fragebogen ist in seiner Gesamtbeurteilung kein optimales Tool zum Screening für Hypogonadismus. Allerdings ist, im Gegensatz zum sexuellen Fragenkomplex, eine signifikant erhöhte Punktzahl im somato-vegetativen und psychischen Teil des AMS-Fragebogens mit einem Defizit an freiem und Gesamttestosteron assoziiert und damit für sich potenziell besser geeignet, einen Testosteronmangel zu detektieren als der Gesamtfragebogen.

P35

Case report: High Flow Priapismus nach Implantation eines hydraulischen Penisimplantats

C. Leiber¹, U. Wetterauer¹, W. Euringer²

¹Abteilung Urologie, Chirurgische Universitätsklinik;

²Abteilung Angiologie, Radiologische Universitätsklinik; Freiburg i. Br.

Anamnese 1988 erfolgte bei einem 30-jährigen Patienten wegen einer ausgeprägten Colitis ulcerosa eine Rektumexstirpation mit Anlage eines Anus praeter. Seither bestand eine neurogene erektile Dysfunktion. Die anfängliche Therapie bestand in einer intrakavernösen Pharmakotherapie (SKAT). Hier

trat regelmäßig das Problem von Priapismen auch bei geringer Dosis auf. Die Anwendung verschiedener PDE-5-Inhibitoren führte zu keinen ausreichenden Erektionen. Im Oktober 2008 wurde zusätzlich ein Altershypogonadismus diagnostiziert, der primär mit 50 mg und inzwischen mit 100 mg Testosteron gel substituiert wird. Aufgrund der für ihn sehr störenden rezidivierenden Priapismen hatte sich der Patient nach eingehender Aufklärung zur operativen Therapie mit einem hydraulischen Penisimplantat entschlossen.

Verlauf Am 06.11.2009 erfolgte die Implantation eines hydraulischen Penisimplantates von einem penoskrotalen Zugang (18 cm AMS 700 LGX Penisimplantat mit 1,0 cm Rear-Tip-Extendern). In der ersten Nacht post-operativ kam es zu einem ausgedehnten skrotalen Hämatom, sodass eine Revisionsoperation notwendig wurde. Am Folgetag konnte das Implantat vermeintlich nicht mehr vollständig abgelassen werden. Auf jeden Fall bestand eine nahezu vollständige Erektion. Unter der Fehlannahme einer mechanischen Komplikation an der Pumpe erfolgte am 11.11.2009 eine nochmalige Revision mit Austausch der Pumpe. Als sich bereits im Aufwachraum wieder eine vollständige Erektion zeigte, wurde klar, dass es sich um einen Priapismus-ähnlichen Zustand bei vorhandenem Penisimplantat handelt. In der Farbduplexsonographie zeigte sich jetzt ein High-Flow-Priapismus. Nachdem konservative Maßnahmen (Kühlung, Analgetika, Antiphlogistika) zu keiner Besserung der Situation führten, wurde die Entscheidung zur supra-selektiven Embolisation getroffen. In der Angiographie vom 13.11.2009 zeigte sich im Bereich der schmalkalibrigen rechtsseitigen Arteria penis profunda ein typisches „Blush“-Phänomen. Mit 3 Platiniumcoils konnte das Gefäß supraselektiv verschlossen werden. In der Folge kam es zu einer allmählichen Rückbildung des Priapismus.

Ergebnis Nach vollständiger Rückbildung der Schwellung und des vorhandenen Resthämatoms zeigte sich eine einwandfreie Funktion des hydraulischen Penisimplantats. Inzwischen berichtet der Patient über eine für ihn und seine Partnerin sehr zufriedenstellende Anwendung.

Schlussfolgerung Auch nach operativer Implantation eines Schwellkörperimplantats kann es offensichtlich in Einzelfällen aufgrund des noch vorhandenen Restschwellkörpergewebes zu einem Priapismus kommen. Nach unserer Kenntnis handelt es sich um den Erstbericht einer solchen Komplikation.

P36

Erfahrungen mit selbstexpandierenden Hydrogel-Hodenprothesen

K. Wirsam, M. Sohn

Urologische Klinik, Markus-Krankenhaus, Frankfurt

Fragestellung Ko-Polymere aus Methylmethacrylat und N-Vinyl-Pyrrolidon können zu einem osmotisch expandierenden Hydrogel vernetzt werden. Die Technik wird

zur Herstellung selbstexpandierender Gewebsexpander und zur Kontaktlinsherstellung genutzt.

Material und Methoden Für den Einsatz der selbstexpandierenden Hodenprothesen bei fehlender Skrotumanlage wurden 26 Prothesenprototypen bei 19 Patienten eingesetzt. Bei 18 dieser Patienten handelt es sich um Frau-zu-Mann-Transsexuelle, die im Rahmen des Genitalaufbaus diese Prothetik erhielten, bei einem Patienten handelte es sich um eine isolierte Anorchie.

Ergebnisse 2 Hodenprothesen mussten aufgrund einer Erosion 4 Wochen postoperativ explantiert werden. Die übrigen 24 Prothesen heilten bei diskreter Kapselbildung problemlos ein. Es kam zu keinen Infektionen. Das Volumen der Prothesen nahm wie geplant innerhalb von 3 Wochen von 2 auf 24 ml zu.

Schlussfolgerung Bei fehlender Anlage oder nach traumatischem Verlust des Skrotums sowie bei Hypotrophie ist die Implantation von Hodenprothesen physiologischer Größe aufgrund des Erosions- und Protrusionsrisikos problematisch. Die Implantation einer osmotisch expandierenden Hodenprothese ermöglicht eine langsame Dilatation des Skrotums über mehrere Wochen ohne die Notwendigkeit einer Wiederholung, von extern zugeführten Auffüllung. Palpatorisch imponieren die osmotischen Hodenprothesen nur wenig härter als die bisher kommerziell erhältlichen Prothesen bei ähnlich weicher Kapselbildung. Das kosmetische Ergebnis war in allen Fällen sehr zufriedenstellend.

P37

Seltene Nebenwirkung nach Penisprothesenapplikation: Blasenentleerungsstörung

B. Schwindl, T. Klotz
Klinikum Weiden

Nach Implantation einer hydraulischen, 3-teiligen Penisprothese treten gelegentlich passagere Miktionsbeschwerden auf. Diese sind zumeist Drangbeschwerden, wohl durch (kurzzeitig eingelegten) Katheter, Schwellung bzw. Fremdmaterial bedingt.

Ein seltener Fall einer postoperativen, konservativ behandelbaren Blasenentleerungsstörung soll hier skizziert werden: Ein 58-jähriger Pat. mit hochgradiger, multifaktorieller, konservativ nicht beherrschbarer, erektiler Dysfunktion wird mittels einer hydraulischen Penisprothese (AMS 700 LGX) versorgt. Das Reservoir (100 ml) wird vom penoskrotalen Zugang via äußeren Leistenring rechts-perivesikal platziert. Eine kompensierte Prostatavergrößerung ist bekannt. Das Postoperativum ist zunächst unkompliziert. Im Verlauf berichtet der Patient eine Harnstrahlabschwächung. Sonographisch zeigt sich eine Restharnbildung um 250 ml. Der Reservoirballon findet sich unmittelbar median der Blase (mit Impression) und legt sich obstruktiv von kranial auf die sich endovesikal entwickelte Prostata.

Dem Patienten fällt auf, dass er die Blase leichter entleeren kann, wenn er das Reservoir partiell entleert (mit mäßiger peniler Tumescenz). Durch das teilweise Aufpumpen der Schwellkörper verschiebt sich Flüssigkeit in die Zylinder, der obstruktiv wirksame Ballon wird kleiner. Unterstützend verordneten wir einen Alpha-Blocker. Auf eine Finasteridmedikation wurde in Hinblick auf eine Libidoverminderung verzichtet. Der Patient ist im Verlauf mit den Miktionsverhältnissen zufrieden, die Restharmengen lagen unter 100 ml, sodass eine TUR-Prostata nicht erfolgen musste.

Schlussfolgerung Bei vorbestehender Prostatahyperplasie und Implantation eines größeren Reservoirs ist ein gesonderter Zugang mit intraabdomineller Positionierung vorzuziehen (auch in Hinblick auf weitere, selten beschriebene Komplikationen, wie z. B. Blasenverletzung). Die sich in der Entwicklung befindlichen Modelle, die ganz auf ein Reservoir verzichten können, versprechen diesbezüglich einen Fortschritt.

■ Reproduktionsbiologie

P38

Endocrine Regulation of Testicular Function in the Male Marmoset (*Callithrix jacchus*) Differs From other Non-Human Primate Models: Results From Contraceptive Trials

J. Wistuba¹, C. Luetjens¹, J. Ehmecke¹, K. Redmann¹, O. Damm¹, R. Sandhove-Klaverkamp¹, E. Nieschlag¹, M. Simoni², S. Schlatt¹

¹Klinische Andrologie, Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster;

²Department of Medicine, Endocrinology Metabolism and Geriatrics, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italia

Background and Aim The marmoset (*Callithrix jacchus*) is a primate model used in reproductive research and toxicology. As the marmoset can be bred relatively easy in captivity and has acceptable gestation times, it was suggested for testing male hormonal contraception. Here we experimentally tested the suitability of the marmoset for male contraceptive studies, examining effects of testosterone undecanoate (TU) and norethisterone enanthate (NETE) on reproductive endocrinology, spermatogenesis and fertility.

Methods Eight groups of male marmosets (n = 6 each) were analysed, of which one served as an untreated control (group 8) and the other seven were administered TU (25 mg/kg, 3 weekly interval) and NETE (70 mg/animal, three weekly interval) for different periods: TU and NETE (6, 12, 24 and 36 months, groups 1,2, 4, 6), TU and NETE followed by NETE only (6 and 24 followed by 16 and 26 months, respectively; groups 5, 7) and NETE only (18 months; group 3). Endpoints analysed were testicular volume, cellular composition and histology; serum and intratesticular testosterone (ITT),

bioactive chorionic gonadotropin (bioCG) in the pituitaries and sperm parameter. Fertility was assessed by the number of offspring fathered under the contraceptive regimen when mated under controlled conditions.

Results TU and NETE administration influenced pituitary secretion (by lowering the CG levels), and spermatogenesis, but was insufficient to suppress fertility. While testicular volumes dropped, serum testosterone stayed on a superphysiological level and histology revealed only mildly affected spermatogenesis, although ITT levels were lowered by the combined TU and NETE administration. Similar results were observed when after initial TU and NETE treatment NETE alone was administered; however ITT suppression was less pronounced, as well as in the NETE only group. Serum testosterone also dropped when NETE was given alone, but the fertility of the animals was maintained. In all groups, motile sperm were present and the males fathered offspring. However, when compared with control breedings from our colony, fertility was reduced by approximately 40–50% in all groups treated for more than 6 months.

Conclusions The administration of TU and NETE as well as of NETE alone revealed that fertility of male marmosets was only slightly affected. In contrast to macaques, in which the endocrine status resembles that of the human closely, the endocrinology of reproduction differs in the marmoset and does not allow complete suppression of fertility. Administration of TU and NETE had only mild effects on the marmoset testis and fertility indicating that the CG/testosterone axis is less important for spermatogenesis compared to macaques and men. Therefore, the value of marmosets as a model in studies on the efficiency of hormonal contraception in men is limited.

P39

Loss of Expression of Lin28 in the Postnatal Testis of 41,XX^Y Mice

H. Demond, S. Werler, S. Schlatt, J. Ehmecke, J. Wistuba

Klinische Andrologie, Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster

Background and Aim Klinefelter's syndrome (KS) is a male genetic disorder, characterized by a supernumerary X-chromosome. KS patients present a heterogeneous phenotype that is frequently associated with hypergonadotropic hypogonadism, cognitive deficits and complete germ cell loss resulting in infertility. So far, the general understanding considering the molecular mechanisms underlying the pathophysiology is limited. Therefore, animal models, such as the 41,XX^Y mouse enabling experimental approaches are of enormous value. Previous studies with mouse models for KS showed that germ cell depletion starts during postnatal development, becoming significant shortly before and around the initiation of meiosis, driving the assumption that meiotic

failure is involved in the germ cell depletion. However, a meiotic failure due to the supernumerary X chromosome can not fully explain, why almost the entire germ cell population is depleted from the testis and not only a meiotic arrest occurs. We hypothesize that the maintenance of the spermatogonial stem cell (SSC) population in these males might also be affected by the chromosomal imbalance caused by the presence of the supernumerary X. Therefore, we aimed at the investigation of Lin28 expression, a marker for undifferentiated spermatogonia, in order to identify and characterize the SSC population during development in 41,XX^Y mice.

Materials and Methods Immunohistochemical staining of the spermatogonial marker LIN28 (A177, Cell Signalling Technology, 1:50) was performed to examine the expression in the testis of different developmental stages (1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 dpp and 30 wks pp) of male mice with the karyotype 41,XX^Y and controls (karyotype 40,XY⁺ and C57BL/6 karyotype 40,XY).

Results In the controls Lin28 expression was found in a subpopulation of spermatogonial cells of all developmental stages. After birth almost all gonocytes were stained positively and afterwards a steadily decreasing but still substantial subpopulation of SSCs was positively stained up to the adult state, which is in consistence with previous findings indicating Lin28 as a marker for undifferentiated spermatogonia. In contrast, in 41,XX^Y mice at day 1 pp, Lin28 positive cells were found, but to a lesser extent than in control animals. From day 3 dpp onwards, Lin28 expression was no longer observed. At day 14 pp the germ cells were completely depleted in 41,XX^Y mice. However, in two animals we were able to detect a few tubules with remaining focal spermatogenesis at day 14 pp and day 21 pp, respectively. Only in these tubules, Lin28 positive spermatogonia were detected.

Conclusion We provide evidence that germ cell loss in male mice with a supernumerary X chromosome starts already during early postnatal development. Additionally, the absence of Lin28 expression in 41,XX^Y mice from day 3 pp onwards implies a loss of „stemness“ in the SSC population becoming evident during the first postnatal week. This altered differentiation status is very likely involved in the early and complete germ cell loss in males with a supernumerary X chromosome. The finding that in remaining foci of spermatogenesis Lin28 expression appears normal indicates that in those surviving germ cell clones the SSC status remained unaffected. These findings have implications for future fertility preservation treatment of Klinefelter patients.

P40

Dreidimensionale Kultivierung testikulärer Zellen: Hodenzellen immaturer Mäuse besiedeln Kollagenschwämmchen in vitro

K. Reuter, J. Ehmecke, S. Schlatt, J. Wistuba
Klinische Andrologie, Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster

Fragestellung Zum Erhalt einer vollständigen Spermatogenese müssen aus spermatogonialen Stammzellen unter Erhalt der Stammzellpopulation differenzierende Tochterzellen entstehen, die danach Mitosen und die Meiose durchlaufen und zu haploiden Gameten reifen. Diese Prozesse erfordern die Unterstützung der somatischen Zelltypen ebenso wie eine fein abgestimmte endokrine Regulation. Daneben ist die räumliche Zuordnung der verschiedenen Zelltypen zueinander sowie zu den Komponenten der extrazellulären Matrix wichtig. Studien zur In-vitro-Differenzierung männlicher Keimzellen der Maus in 3-dimensionalen Kulturanisätzen haben diese Voraussetzungen nachzubilden versucht und konnten in verschiedenen Matrices wie etwa Soft-Agar, Methylcellulose oder Matrigel die Differenzierung von Keimzellen der Maus zum Teil bis zu morphologisch reifen Spermien zeigen und eine ansatzweise Reorganisation testikulärer Zellen belegen. Bisher fehlen jedoch Kulturansätze, die einerseits eine effiziente Ausbeute an reifen Gameten erreichen, andererseits die Rekonstruktion von Hodengewebe in vitro erlauben. Die vorgestellte Studie zielt darauf, die Besiedelung einer künstlichen, 3-dimensionalen, schwammartigen Matrix bestehend aus Kollagen durch testikuläre Zellen aus immaturren Mäusen zu prüfen. Diese Matrices wurden bereits in anderen Feldern der regenerativen Medizin, wie etwa der Knochenheilung eingesetzt, sind kommerziell erhältlich und können transplantiert und so möglicherweise auch zur Geweberegeneration verwendet werden.

Methodik Testikuläre Zellen wurden enzymatisch aus den Hoden transgener eGFP-enhanced green fluorescent protein-) Mäuse (5–7 dpp) isoliert. Die ubiquitäre Expression des Transgens erlaubte die mikroskopische Verfolgung der Kolonisierung mit einem Life-Cell-Imaging-System (Pecon, Zeiss). Einzelzellsupensionen wurden auf Kollagenschwämme (Matricel, Größe 5×1,5 mm und 13×1,5 mm) transferiert und anschließend in Kultur genommen. Zur Methodenetablierung wurden verschiedene Aussaat-Konzentrationen (5000–20.000 Zellen/μl) und Aussaat-Methoden (drop-on [Zellen werden auf den Schwamm aufgetropft] vs. drop in [Zellen werden mit dem Schwamm aufgesaugt]) getestet. Auch wurden Kulturen unter Zugabe von Gonadotropinen (LH und FSH je 5 IU/ml) gegen solche aus hormonfreien Kulturbedingungen verglichen.

Die besiedelten Schwämmchen wurden bis zu 21 Tagen in DMEM mit Glutamax und PenStrep (Gibco-Invitrogen) bei 35 °C und

5 % CO₂ kultiviert. Die Auswertung der besiedelten Schwämmchen erfolgte rasterelektronenmikroskopisch, histologisch und immunhistochemisch (Antikörperfärbungen gegen Vasa (Keimzellmarker), -smooth muscle actin, (Peritubulärzellmarker), Vimentin (Sertolizellmarker) und Oct3/4 (Stammzellmarker). Zur Ermittlung der Leydigzellfunktion wurden Messungen der Testosteronwerte im Medienüberstand zu unterschiedlichen Zeitpunkten vorgenommen.

Ergebnisse Die aus den Maushoden isolierten Zellen lassen sich sowohl mit der Drop-in- als auch mit der Drop-on-Methode in die Kollagenschwämmchen einbringen, ohne dass eine der beiden Methoden sich überlegen zeigte. Es gelang Zellen der Einzelzellsuspension initial über das gesamte Schwammvolumen zu verteilen. Die testikulären Zellen zeigten nach wenigen Tagen die Tendenz, in Kultur zu reaggregieren, wobei sie vereinzelt Cluster ausbilden, die sich an das Schwammmaterial anlagern. Im Life-Cell-Imaging-System konnten bis zu 3 Wochen lebende Zellen in Kultur beobachtet werden. Testosteronmessungen zeigen steroidogene Aktivität der Leydig-Zellen in Kultur unter Gonadotropinstimulation. Immunhistochemisch konnten Aggregate aus Keimzellen und den somatischen Zelltypen in den Schwämmchen nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung Testikuläre Zellen aus den Hoden immaturer Mäuse können eine artifizielle Matrix, wie sie die Kollagenschwämmchen darstellen, besiedeln und in diesen für mehrere Woche in Kultur genommen werden. Dabei zeigen sie erste Anzeichen einer Reorganisation. In weiteren Experimenten gilt es nun, diese Kulturbedingungen zu optimieren und eine Keimzeldifferenzierung zu erreichen. Nach Etablierung besiedelter Schwämmchen werden Transplantationsexperimente zeigen, ob auf diesem Wege die Regeneration von tubulusähnlichen Strukturen und eine In-vitro-Spermatogenese möglich ist.

P41

Testicular Stem Cells and Response To Testis Injury in Different Developmental Stages of the Mexican Axolotl (*Ambystoma mexicanum*)

E. Lorsy, J. Wistuba, J. Gromoll, S. Schlatt, J. Ehmecke
Klinische Andrologie, Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster

Background and Aim The Mexican Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) has been in the focus of regenerative biology, given its ability to regenerate limbs after amputation and to heal large skin wounds.

The regeneration of limbs, skin, and nerves has been extensively studied. But little is known about the regenerative potential of inner organs, in particular of the gonads. In our study, we first identified a population of putative tissue resident stem cells in testes of different ontogenetic stages. Subsequently, we performed an interventional study, re-

moving parts of one testis in larval and adult axolotls and monitoring the response for up to 6 months. The aim of our study was to determine whether the Axolotl's testis has a regenerative potential, focusing on the role of putative tissue resident stem cells.

Materials and Methods First, testes from early larval wildtype Axolotls (n = 4, 2.5–3.0 cm total length), late larvae (n = 4, 9.8–10.5 cm total length), Axolotls during partial metamorphosis (n = 7, 13.0–16.4 cm total length) and adults (n = 12, 20.0–22.0 cm total length) were fixed and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained immunohistochemically to detect the spermatogonial marker Pgp9.5 and the stem cell marker Oct3/4. Some tissue was snap frozen. RNA was extracted, and the expression of germ (Vasa, Dazl, Pgp9.5) and stem cell (Oct3/4, Nanog, c-kit) markers was analyzed by PCR.

Second, in 12 adult male Axolotls (wild type, length 20.0–22.0 cm) and one larval Axolotl (wild type, length 9.3 cm) a large part of the right testis was removed surgically through a ventrolateral abdominal incision under general anaesthesia, and animals were allowed to recover. Adult testes were harvested after 1 or 3 weeks, or 6 months, the larval tissue after 3 months. Germ and stem cell markers were analyzed. To assess wound healing and scar formation, we stained connective tissue, neutrophilic granulocytes, α-smooth muscle actin and TGF-β.

Results The larval testis is made up from spermatogenic cysts. Each cyst is composed of few somatic cells, encapsulating one primordial germ cell (PGC), which shows a distinct polylobulated appearance of the nucleus, and expresses Oct3/4 and Pgp9.5. In metamorphosis, beginning spermatogenic differentiation can be observed, but sperm is detected in adult animals only. The testes of adult Axolotls extend through 2/3 of the abdominal cavity and are made up from several large lobes. Each lobe is formed by smaller lobuli, and each lobulus is composed by cysts. Each cyst contains only one type of germ cells (e.g. only spermatocytes). Interestingly, older ontogenetic stages present a thin anterior projection of the testis (APT). This APT contains only cysts with single PGCs, strikingly resembling the early larval gonad. Also, Vasa, Dazl, Pgp9.5, Oct3/4 and c-kit were detected by PCR in all studied ontogenetic stages.

Even months after surgery, the partially resected testis is smaller than the contralateral testis. Full regeneration does not occur. 1 and 3 weeks after surgery, increased amounts of connective tissue, smooth muscle actin and neutrophil granulocytes are present at the wound site. But no increased TGF-β-1 signalling was apparent, and no putative tissue resident stem cells (Oct3/4 positive) were present. But 3 or 6 months after surgery, additional connective tissue or smooth muscle action were not observed.

Conclusions We show that the Axolotl testis contains PGCs expressing Oct3/4 and

Pgp9.5 throughout development, and that the testis does neither regenerate fully in response to injury, nor form a scar. We conclude that the testis contains PGCs which might act as germ line stem cells, but that somatic tissue resident stem cells, driving a full regeneration of the organ, are not present. The situation in other tissues and organs remains to be elucidated.

P42

Das Genexpressionsprofil humaner Ejakulate aus einem IVF-Programm

A. Spiess¹, H. Cappallo-Obermann¹, V. Baukloh², W. Schulze¹

¹Abteilung für Andrologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf; ²Fertility Center Hamburg

Fragestellung Sowohl bei der In-vitro-Fertilisierung (IVF) als auch der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) herrscht nach wie vor eine erhebliche Diskrepanz zwischen den Fertilisierungs- (IVF: 92,6 %; ICSI: 96,3 %) und erzielten Schwangerschaftsraten (IVF: 29,5 %; ICSI: 28,6 %). Neben offensichtlichen gynäkologischen Faktoren ist es möglich, dass auch Spermatozoen Merkmale in sich tragen, die im kleineren Maße die Fertilisierung, aber im größeren Maße die „Qualität“ des Embryos und dessen Fähigkeit zur Implantation beeinflussen. Hier scheinen klassische Parameter wie Morphologie und Motilität einen eher geringen prädiktiven Wert zu haben [1].

Mit der Beschreibung des Transkriptoms [2] hat das mRNA-Repertoire der humanen Spermatozoen in den vergangenen Jahren verstärkte Aufmerksamkeit gewonnen.

In Zusammenarbeit mit dem Fertility Center Hamburg haben wir die Genexpressionsprofile humaner Spermatozoen aus einem IVF-Programm untersucht, um diese mit dem Outcome zu korrelieren und prognostisch relevante Gene zu identifizieren.

Methoden Innerhalb der Projektzeit wurden 35 IVF-Ejakulate erfasst, RNA extrahiert und diese auf Whole-Genome Chips (Codelink 55k) hybridisiert. Wir haben nachträglich 10 Proben aus unseren Analysen herausgenommen, da wir bei diesen anhand verschiedener Parameter einen dominanten gynäkologischen Faktor (wenige Behandlungszyklen, wenige Eizellen/Zyklus, nur ein Embryo übertragen) nicht ausschließen konnten. Die verbleibenden 25 Proben wurden einer rigorosen statistischen Analyse unterzogen. Zur Darstellung der Korrelation der Genexpressionsprofile mit dem Outcome (Fertilisierer/Nicht-Fertilisierer und Schwangerschaft/Nicht-Schwangerschaft) diente die „Principle Component Analysis“ (PCA). Zur Filterung einzelner Gene, die den Outcome maximal diskriminieren, wurden t-Tests und lineare Modelle verwendet.

Ergebnisse Bei der Untersuchung der Genexpression von Ejakulaten tritt das Problem der „Vermischung“ der Spermatozoen-spezifischen Genexpression mit der Genexpression kontaminierender somatischer Zellen auf. Die PCA auf Grundlage der Expression aller 55.000 gemessenen Gene in den 25 Proben (12 Schwanger, 3 Nicht-Schwanger, 7 Fertilisierer, 3 Nicht-Fertilisierer) zeigt, dass es keine scharfe Trennung der Proben in Bezug auf den IVF-Outcome gibt, resultierend in einer ungeordneten Verteilung der Proben auf den ersten 3 Hauptkomponenten (**Abb. 4A**). Die Einbeziehung von 3 Testis-Biopsien mit

homogenem Phänotyp der vollständigen Spermatogenese zeigt jedoch, dass ähnliche Genexpressionsprofile definierte Gruppen bilden (blaue Kugeln, bzw. blauer Balken). Mittels t-Tests wurden diejenigen Transkripte herausgefiltert, die mit einer erhöhten Schwangerschafts- bzw. Fertilisierungsrate korrelieren. **Abbildung 4B** zeigt 25 Gene, die in NICHT zu einer Schwangerschaft führenden Ejakulaten höher exprimiert sind. Zahlreiche Gene spielen eine signifikante Rolle in der Spermatogenese (rot markiert) oder korrelieren mit Teratozoospermie (blau markiert, abgeglichen mit Daten in [3]).

Schlussfolgerung Die Genexpressionsprofile humaner Ejakulate zeichnen sich durch eine sehr hohe Variabilität aus. Der Effekt somatischer Transkripte bringt ein starkes Rauschen in die Ergebnisse. Prinzipiell ist es aber möglich, Gene zu filtern, die mit dem IVF-Outcome korrelieren. Um die Ergebnisse zu verbessern, und die bereits erhaltenen Daten zu bestätigen, bedarf es eines zweiten unabhängigen Satzes von Ejakulaten (test set).

Literatur:

1. Hotaling JM, Smith JF, Rosen M, Muller CH, Walsh TJ. The relationship between isolated teratozoospermia and clinical pregnancy after in vitro fertilization with or without intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2011; 95: 1141–5.
2. Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P, Krawetz SA. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* 2002; 360: 772–7.
3. Platts AE, Dix DJ, Chemes HE, Thompson KE, Goodrich R, Rockett JC, Rawe VY, Quintana S, Diamond MP, Strader LF, Krawetz SA. Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 763–73.

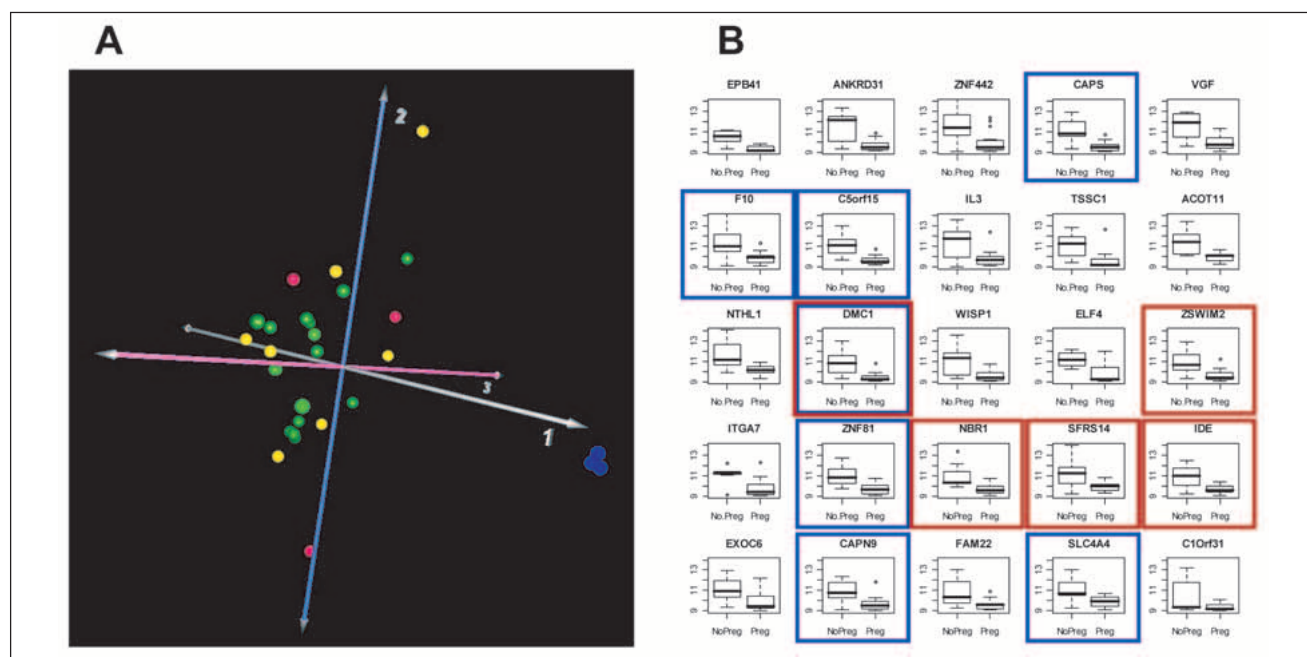


Abbildung 4: A. Spiess et al. (P42) (A) PCA von 25 hybridisierten Ejakulaten mit verschiedenem Outcome. Farbkodierung: Dunkelgrün = Schwanger (12); Hellgrün = Nicht-Schwanger (3); Gelb = Fertilisierer (7); Rot = Nicht-Fertilisierer (3); Blau = Testis-Biopsien. (B) 25 Gene aus einem t-Test ($p < 0,02$), die in NICHT zu Schwangerschaft führenden Ejakulaten höher exprimiert sind. No.Preg = keine Schwangerschaft; Preg = Schwangerschaft

P43

Reduced Numbers of Sertoli, Germ, and Spermatogonial Stem Cells in Impaired Spermatogenesis

M. Wolter¹, A. Hentrich¹, A. Stammler¹, G. Lüers², M. Bergmann³, S. Kliesch⁴, L. Konrad¹

¹Department of Obstetrics and Gynecology, JLU Gießen; ²Department of Anatomy and Experimental Morphology, Hamburg; ³Institute of Veterinary-Morphology, -Histology and -Embryology, JLU Gießen; ⁴Center of Andrology and Reproductive Medicine, Münster

Background A key step in investigation of male infertility is the appropriate classification of impaired spermatogenesis. Research on human infertility revealed defects in mitotic divisions of spermatogonia and in early meiotic events which are thought to play a critical role in male fertility. These results suggest, that the three phases of spermatogenesis, proliferation, meiosis, and differentiation as well as the Sertoli cells are involved in germ cell degeneration in infertile men. In this study, we precisely identified Sertoli and distinct germ cell types in the rat, mouse and human testis. As a proof of principle, we studied testis biopsies from azoospermic patients with defined spermatogenic defects.

Materials and Methods Testicular biopsies (n = 110) were obtained from normogonadotropic obstructive or non-obstructive azoospermia. Spermatogenesis was classified into histologically normal spermatogenesis (n = 33), hypospermatogenesis (n = 44) and maturation arrest at the level of spermatocytes (n = 33) according to Bergmann & Kliesch. We used antibodies for identification of certain cell types inside the tubules. Sertoli cells or immature Sertoli cells were identified by the androgen receptor or cytokeratin 18, respectively. The undifferentiated embryonic cell transcription factor (UTF1) was used for detecting a subset of spermatogonia including the spermatogonial stem cells. Spermatocytes were identified with Smad3. Meiotic divisions were analyzed with histone H3 phosphorylated at serine 10. Round spermatids were identified by the cAMP response element modulator (CREM). Cell numbers were obtained from at least 10 cross-sections per specimen from each patient. After calculation of the means a cut-off for each cell type was determined and values below the specific cut-off were defined as deficient. According to the specific combination of deficiencies, patients were classified in three groups: mainly meiotic deficiencies, mainly founder pool-related deficiencies or both. The innovation of this system of classification is the distinct recognition of patients who face meiotic problems in combination with a deficient pool of founder cells. Analysis of meiotic deficiencies is incomplete without considering that many patients enter meiosis with already reduced cell numbers.

Results Remarkably, we found that already the numbers of Sertoli cells, spermatogonia and a subset of spermatogonia including stem cells are significantly reduced in pa-

tients with maturation arrest at the level of primary spermatocytes (84%) compared to patients with histologically normal spermatogenesis. However, the strongest reduction (96%) was revealed in the numbers of spermatids. In patients with hypospermatogenesis a significant reduction of spermatogonial cell numbers was observed but they showed only modestly reduced numbers of spermatocytes and spermatids compared to normal spermatogenesis. No correlation was found with age or obstruction. For a detailed analysis of the patients, we distinguished between “pool of founder cells”-related deficiencies (reduced numbers of Sertoli cells, spermatogonia, and spermatogonial stem cells) and “meiotic” deficiencies (reduced numbers of spermatocytes, meiotic divisions, and spermatids). Interestingly, patients with maturation arrest showed meiotic deficiencies (36%), while the majority additionally demonstrated deficiencies in the founder pool (58%). In contrast, patients with normal spermatogenesis most often had no deficiencies at all (45%) or founder pool-related deficiencies (33%) but an apparently normal meiosis.

Conclusions In conclusion, by antibody-based quantification of Sertoli and germ cells in testes of three species we have corroborated earlier data on quantification of germ cells. Our thorough analysis of patients with maturation arrest clearly showed besides the strongly reduced numbers of primary spermatocytes, meiotic divisions, and round spermatids due to mitotic and meiotic defects also a significant reduction in Sertoli, spermatogonial, and spermatogonial stem cell numbers. Thus, we have developed a new classification system which allows the distinction of founder pool-related and meiotic deficiencies. Our findings pave the way to novel routes of investigation into the role of Sertoli cells and spermatogonial stem cells in male infertility.

P44

The Relevance of Acetylated Histone H4 at Lysine 12 (H4K12ac) for RNA Transcripts in Human Spermatozoa, Mouse Pronucleus Formation and Parthenogenetic Activation of Murine Oocytes

A. Paradowska¹, M. Vieweg², A. Spiess³, M. Cerna⁴, K. Dvorakova-Hortova⁴, H. Schuppe¹, W. Weidner¹, K. Steger¹

¹Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie; ²Department of Urology, Pediatric Urology and Andrology, JLU Gießen; ³Department of Andrology, Molecular Andrology Unit, University Hospital Hamburg Eppendorf; ⁴Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

Introduction H4K12ac, activating epigenetic mark, and mRNAs stored in mature spermatozoa may both represent the fingerprint for monitoring past events, especially the development profile of gene expression during spermatogenesis or spermiogenesis. Also H4K12ac has been observed prior to

full decondensation of sperm chromatin during early embryogenesis. We aimed to investigate whether promoter association with H4K12ac in specific promoters is possibly correlated to mRNA transcripts stored in mature spermatozoa of fertile and subfertile men. Furthermore, we studied the role of paternally derived H4K12ac for the embryo development in murine model.

Methods We compared the data set of genes interacting H4K12ac in sperm of fertile and subfertile men (Chromatin Immunoprecipitation with H4K12ac in combination with promoter microarray HG18 NimbleGen) with genome wide expression profiling of mRNAs from human sperm of fertile and subfertile patients (CodeLink Human Whole Genome Bioarray, Applied Microarrays). For functional study of mouse embryos, in vitro fertilisation or parthenogenetic activation of oocytes was carried out and embryos were fixed in 2.5% paraformaldehyde, washed, and permeabilized for 0.1% TritonX-100 in PBS for the immunofluorescence with H4K12ac antibodies. Samples were examined with Leica DM IRE2 High-speed confocal/two photon system for Live Cell Imaging and Dynamics.

Results We found that H4K12ac associated promoters express high level of mRNA transcripts that are stored in fertile mature spermatozoa (10–15). Moreover many of highest expressed mRNA transcripts are coding testis specific proteins: PHF7 (PHD finger protein 7) Testis development protein NYD-SP6 (mRNA level 15). Aberrant mRNA level of testis specific genes was observed in subfertile patients. Immunofluorescence analysis of mouse preimplantation embryos showed strong signal of H4K12ac over the male pronucleus compared to a weaker one in female pronucleus. During pronuclei migration and at the point of pronuclei fusion, there was observed an increasing H4K12ac signal in female pronucleus as well, however, the male pronucleus remained strongly labelled. After parthenogenetic oocyte activation, both established female pronuclei were positively labelled for H4K12ac.

Conclusion The aberrant acetylation of H4K12ac within developmentally important promoters in infertile men might reflect insufficient sperm chromatin compaction during spermatogenesis. This may also lead to inappropriate transfer of specific mRNA transcripts and epigenetic information to the zygote.

P45

Time-lapse-Imaging-Untersuchungen zum Einfluss der künstlichen Eizellaktivierung auf die Kinetik des 1. Zellzyklus nach ICSI

M. Montag^{1,2}, J. Liebenthron², M. Köster²,
K. van der Ven², H. van der Ven²

¹Abteilung Gynäkologische Endokrinologie & Fertilitätsstörungen, Universitätsklinikum Heidelberg;

²Abteilung Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Universitätsklinikum Bonn

Fragestellung Bei Patienten mit eingeschränkter oder ausbleibender Befruchtung nach intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) kann mit einer künstlichen Aktivierung der Eizellen nach ICSI die Befruchtungsrates gesteigert werden. Der dabei eingesetzte Kalzium-Ionophor führt zu einer Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum und zu einem zusätzlichen Einstrom von Kalzium aus dem Kulturmedium. Ungeklärt ist bislang, ob die künstliche Eizellaktivierung die Kinetik des 1. Zellzyklus beeinflusst. Diese Fragestellung wurde in der vorliegenden Studie mit einem Time-lapse-Imaging-System untersucht.

Methodik In der Studiengruppe wurde bislang bei 10 Patientinnen (mittleres Alter der Frau 36,6 Jahre) mit stark eingeschränkter Befruchtungsrates in den Vorzyklen die künstliche Eizellaktivierung nach ICSI durchgeführt. Die Kontrolle umfasste eine altersgematchte Gruppe von 25 Patientinnen (mittleres Alter der Frau 36,7 Jahre) ohne künstliche Eizellaktivierung. Die Eizellen aller Patienten wurden nach ICSI in einem Time-lapse-Imaging-System (EmbryoScope, Unisense Fertilitatech, Dänemark) inkubiert. Eine vergleichende Auswertung erfolgte für das Ausschleusen des 2. Polkörpers, die Bildung der Vorkerne, die Differenz zwischen Ausschleusen des 2. Polkörpers und der Vorkernbildung, die erste Zellteilung und die Anzahl der Blastomere der Embryonen am Tag 2.

Ergebnisse Nach ICSI und künstlicher Aktivierung zeigten in der Studiengruppe 69 von 126 Eizellen (54,8 %) eine erfolgreiche Befruchtung. In der Kontrolle lag die Befruchtungsrates wie erwartet signifikant höher (162 von 213, 76,0 %; $p < 0.001$). Zwischen der Studiengruppe und der Kontroll-

gruppe gab es keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf den Zeitpunkt des Ausschleusens des 2. Polkörpers (196 ± 67 vs. 195 ± 60 min.), die Bildung der Vorkerne (438 ± 92 vs. 443 ± 88 min.) und den Zeitintervall zwischen diesen beiden Ereignissen (242 ± 70 vs. 247 ± 74 min.). Eine Auswertung für die 1. Zellteilung konnte für 26 Embryonen in der Studiengruppe und 55 Embryonen in der Kontrollgruppe durchgeführt werden. In der Studiengruppe erfolgte die 1. Zellteilung 1,5 Stunde früher als in der Kontrollgruppe ($26,0 \pm 3,0$ h vs. $27,5 \pm 3,6$ h; $p = 0,0333$). Am Tag 2 war die embryonale Entwicklung hinsichtlich der Anzahl der Blastomere der Embryonen in der Studiengruppe etwas weiter fortgeschritten als in der Kontrollgruppe ($4,1 \pm 0,9$ vs. $3,9 \pm 1,0$ Blastomere).

Schlussfolgerungen Trotz einer Steigerung der Befruchtungsrates hat die künstliche Eizellaktivierung nach ICSI keinen Einfluss auf den Zeitpunkt des Ausschleusens des 2. Polkörpers oder die Bildung der Vorkerne. Sie führt jedoch zu einer signifikant früheren 1. Zellteilung. Obwohl die Anzahl der Blastomere in den Embryonen sich am Tag 2 nicht wesentlich unterscheidet, kann ein Einfluss auf die spätere Embryonalentwicklung hinsichtlich einer schnelleren Entwicklung der Embryonen nach Aktivierung derzeit nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse belegen, dass die künstliche Eizellaktivierung die Kinetik des ersten Zellzyklus nicht negativ beeinflusst. Dies wird auch durch die bisher erzielten fortlaufenden Schwangerschaften (6/10 in der Studiengruppe, 11/25 in der Kontrollgruppe) bestätigt.

P46

Gene Expression Analysis as a Tool to Characterize Human Testicular Biopsies and Cell Cultures for the Presence of Germ Cells

N. Kossack, J. Ehmcke, J. Wistuba, S. Kliesch,
S. Schlatt, J. Gromoll
Centre of Reproductive Medicine and Andrology,
Münster

Introduction While some studies have reported that human spermatogonial stem cells

can be isolated and propagated in vitro, the germ cell origin of these cells has subsequently been called into question [1]. In this study, we aimed to establish a marker panel that facilitates the reliable detection of germ cells in cultures on the RNA as well as on the protein level.

Material and Methods Following written informed consent, testicular biopsies were obtained in the frame of fertility treatment procedures. Gene expression analysis for 20 alleged germ cell specific marker genes was performed using biopsies with qualitatively normal spermatogenesis ($n = 9$) and Sertoli cell only syndrome ($n = 7$), respectively. In addition, immunohistochemical analysis for a selection of these markers was performed. Finally, testicular cell cultures were established from both patient groups ($n = 3$) following published protocols [2, 3] and were analyzed at day 10 of culture using the methods outlined above.

Results Of the 20 genes analyzed, we have identified 7 germ cell specific marker genes, including FGFR3, UTF1, MAGE A4 and VASA, which clearly reflect the presence of germ cells in testicular biopsies on the RNA and the protein level. Furthermore, cell culture experiments revealed that the expression of these marker genes could only be detected in cultures obtained from patients with spermatogenesis ($n = 3$) but not in controls lacking the germ cell population.

Conclusion Our data therefore demonstrates that RNA profiling for our selected germ cell specific marker genes correlates with the presence of the protein in tissue sections and is a sensitive and rapid method to analyze biopsies and cell cultures for the presence of germ cells.

References:

1. Ko K, Araúzo-Bravo MJ, Tapia N, et al. Human adult germline stem cells in question. *Nature* 2010; 465: E1.
2. Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Daalen SK, et al. Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. *JAMA* 2009; 302: 2127–34.
3. Kossack N, Meneses J, Shefi S, et al. Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells. *Stem Cells* 2009; 27: 138–49.

Autorenindex

(nur federführende Autoren)

A			K		
Albrecht K.	321		Kampfer C.	337	
Al-Hasani S.	329		Knier C.	329	
B			Koehler U.	333	
Baston-Büst D.	322		Kossack N.	344	
Beyer D.	324		L		
Bittner U.	330		Leiber C.	339	
Bongers R.	321		Liebenthron J.	316	
D			Ludwig O.	317	
Daser A.	317		M		
Demond H.	340		Mallidis C.	337	
Dittrich R.	329, 330		Montag M.	344	
E			Müller A.	326, 327	
Ehmcke J.	341		N		
Eppelmann U.	337		Nordhoff V.	324	
F			P		
Fijak M.	320		Paradowska A.	338, 343	
Franz C.	328		Pilatz A.	319	
Fritz B.	327		R		
G			Renke T.	326	
Gomez R.	315		Reuter K.	341	
Göttsching H.	316		Röpke A.	332	
H			S		
Harasim T.	318		Schagdarsurengin U.	335	
Heeg P.	332		Schanz S.	338	
Hehr A.	319		Schilling K.	327	
Hemkemeyer S.	322		Schneider C.	325	
			Schultze-Mosgau M.	324	
			Schüring A.	330	
			Schwindl B.	339	
			Seifert B.	331(2x), 335	
			Spiess A.	342	
			Ströbl S.	334	
			Stumm M.	318, 333	
			T		
			Tewes A.	334	
			Toth B.	328	
			Trapphoff T.	323	
			Tüttelmann F.	319	
			V		
			von Kopylow K.	336	
			von Wolff M.	325	
			W		
			Wagner A.	335	
			Wirsam K.	321, 339	
			Wischmann T.	327	
			Wistuba J.	340	
			Wolter M.	343	
			Z		
			Zengerling F.	338	
			Ziller M.	315	
			Ziller V.	325	
			Zitzmann M.	320	

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

☒ Medizintechnik-Produkte



Neues CRT-D Implantat
Intica 7 HF-T QP von Biotronik



Artis pheno
Siemens Healthcare Diagnostics GmbH



Philips Azurion:
Innovative Bildgebungslösung

Aspirator 3
Labotect GmbH



InControl 1050
Labotect GmbH

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

☒ Bestellung e-Journal-Abo

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

Impressum

Disclaimers & Copyright

Datenschutzerklärung