

Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

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



5. DVR-Kongress 2013, 4.–7.12.2013, Münster.

Poster-Abstracts

J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2013; 10 (5-6)

294-337

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



5. DVR-Kongress 2013

4.–7.12.2013, Münster

Poster-Abstracts*

■ Endometrium und Endometriose

P001

Serum Levels of micro-RNA miR-21, miR-145, and miR-142-3p are associated with the Presence of Endometriosis and its Clinical Phenotype

J. Boeckenholt, A. Schüring, L. Kiesel, C. Ruckert, M. Götte
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe,
Universitätsklinikum Münster, Germany

Background Endometriosis is an enigmatic disorder associated with pelvic pain and infertility. While the etiology of the disorder is not clarified to date, epigenetic regulation involving micro RNAs (miRs) appears to be of significance as has been shown for endometriotic lesions in comparison with eutopic endometrium. Because the definite diagnosis of endometriosis requires laparoscopy, the establishment of non-invasive biomarkers has become a focus of interest. We therefore studied three miRs (miR-21, miR-145 and miR-142-3p) in serum of patients with endometriosis compared with healthy controls.

Methods 85 female individuals aged 22 to 45 years who underwent laparoscopy in the tertiary endometriosis referral centre of the university hospital were included in this study. Serum samples were used to extract miR applying standard procedures and converted to cDNA using the TaqMan® Reverse Transcription kit. Quantitative TaqMan® real-time PCR analysis was performed using the comparative cycle threshold method. Clinical data of patients were related to miR expression.

Results In endometriosis patients, miR-145 and miR-142-3p were expressed significantly higher compared with controls (5.71 vs 2.243, $p < 0.001$ and 0.449 vs -1.728, $p = 0.012$; respectively). Patients with deep infiltrating endometriosis displayed a significantly higher expression of miR-145 and of miR-142-3p when compared with controls (0.327

vs -1.728, $p = 0.012$ and 5.297 vs 2.243, $p = 0.002$; respectively). In addition, subjects displaying an endometrioma expressed miR-145 and miR-142-3p significantly higher in comparison with healthy controls (6.124 vs 2.243, $p = 0.006$ and 0.527 vs -1.728, $p = 0.030$; respectively). In patients diagnosed with an endometriosis of the bowel, all three markers, miR-21, miR-145 and miR-142-3p were expressed significantly higher compared with healthy controls (-0.199 vs -2.497, $p = 0.023$; 7.146 vs 2.243, $p = 0.001$; and 1.069 vs -0.1728, $p = 0.014$; respectively).

Conclusions In this study serum miRs were associated with the presence of endometriosis and its clinical phenotype. In future, diagnostic potential of these results should be evaluated in larger, well characterized populations to confirm and extend the reported findings.

P002

The Expression of the Adult Stem Cell Marker Musashi 2 in Eutopic Endometrium is associated with Severity of Endometriosis and with Cycle Phase

K. Hermes, A. Schüring, J. Strahl, L. Kiesel, M. Götte
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe,
Universitätsklinikum Münster, Germany

Background Endometriosis is a disorder of unknown etiology associated with infertility and pain. A dysfunction of endometrial stem cells has been hypothesized as a pathologic mechanism of the disorder. We have recently functionally characterized adult stem cells in endometrium samples derived by transcervical biopsy enabling for an easily accessible tool to study a contribution of endometrial stem cells to the development of endometriosis. Adult stem cells express members of the Musashi (Msi) gene which are involved in the central determination of cell fate. Two gene homologues have been described, Msi1 and Msi2. While we have demonstrated an association of Msi1 with endometrial cancer and endometriosis, data on an association of Msi2 with clinical conditions are more limited than for Msi1. Given the potential role of adult stem cells in endometriosis and the absence of data on Msi2 in the endometrium, we studied the expression of Msi2 in endometrial samples obtained by transcervical biopsy in subjects with endometriosis compared with healthy controls.

Methods Female individuals undergoing standardized diagnostic procedures in a university based IVF-unit, were subject to mid-luteal endometrial biopsy using a Probet catheter. Endometrial dating was performed. All patients underwent laparoscopy in the tertiary endometriosis referral centre of the university hospital and endometriosis was classified according to the ASRM criteria. Applying standard procedures, immunohistochemistry was performed and staining intensity was correlated with clinical patient data.

Results When comparing Msi2 expression between all endometriosis patients and healthy controls, no significant difference was detected. However, endometriosis patients with ASRM stages 1 and 2 displayed a significantly higher luminal Msi2 expression compared with ASRM 3 and 4 ($p = 0.032$). Additionally stromal Msi2 expression was higher in proliferative endometrial samples compared with secretory samples in all patients ($p = 0.032$) and the same was the case for luminal Msi2 expression ($p = 0.041$).

Conclusions Results of our pilot study suggest an association of stem cell marker Msi2 with endometriosis of a lighter manifestation as reflected by ASRM stages 1 and 2. Potentially Msi2 could serve as a marker to differentiate suspected endometriosis according to the severity of the disorder. The association of Msi2 with cycle phase allows for speculation if stem cell dysfunction is a mechanism conveying progesterone resistance as suggested before and it points to the necessity to control for cycle phase in studies on endometrial stem cells.

P003

Significance of Transvaginal Ultrasound Applying Elastography for Identifying Deeply Infiltrating Endometriosis – a Feasibility Study

M. Schiffmann, S. Schäfer, A. Schüring, L. Kiesel, C. Sauerland, M. Götte, R. Schmitz
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe,
Universitätsklinikum Münster, Germany

Introduction Endometriosis is an under diagnosed disorder leading to pelvic pain and infertility. Because definite diagnosis requires laparoscopy there is a need to improve non-invasive diagnostic procedures eligible to detect endometriosis. We therefore evaluated the presence of a deep infiltrating lesion indicative of endometriosis applying transvaginal ultrasound applying elastography.

* Begutachtet und zusammengestellt vom wissenschaftlichen Komitee.

Ein alphabetisches Verzeichnis der federführenden Autoren finden Sie auf Seite 337.

Methods Transvaginal ultrasound and clinical examination was carried out in 48 women with clinical symptoms indicative of endometriosis. In 31 cases strain values were measured at two regions of interest (ROIs) in the Douglas' cul de sac during a cycle of compression and decompression with the vaginal probe. Cases with a deep infiltrating endometriosis nodule were examined.

Results A significant difference was found for the ratio of the ROI measuring points in the Douglas's cul-de-sac of women with a palpable nodule in examination compared to women without a palpable nodule ($p = 0.002$). Additionally, endometriotic lesions are semi-quantitative accessible by elastography.

Conclusion The ratio of strain values between two ROIs in the Douglas's cul-de-sac is associated with the presence of an endometriotic lesion. In future, these findings could allow for a more detailed pre-surgical evaluation and possibly serve as a novel diagnostic tool predicting deeply infiltrating endometriosis.

P004

Einfluss der mikroRNA miR-142-3p auf Zellviabilität, Migrationsfähigkeit und proinflammatorische Signaltransduktionsvorgänge in endometrialen Stromazellen

C. Kästingschäfer, L. Kiesel, M. Götte
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe,
Universitätsklinikum Münster, Deutschland

Hintergrund MikroRNAs (miRNAs) sind aus 19–25 Nukleotiden bestehende nicht-kodierende RNAs, die in Zellen natürlich im Zytoplasma vorkommen und die Genexpression regulieren. Der Mechanismus der Genregulation erfolgt über eine Anlagerung der miRNAs an mRNAs proteinkodierender Gene und eine damit einhergehende Verhinderung der Translation dieser mRNAs. Beeinflusst werden auf diese Weise unter anderem die Differenzierung, das Wachstum und die Apoptose der Zellen [1, 2]. Im Endometrium sind mindestens 65 der insgesamt über 1000 beim Menschen nachgewiesenen mikroRNAs exprimiert [3]. Für zahlreiche dieser mikroRNAs konnte eine Fehlregulation im pathologisch veränderten Endometrium, wie z. B. bei der mit Fertilitätsstörungen assoziierten Endometriose, beschrieben werden [4]. Dies lässt aufgrund der wichtigen Rolle der mikroRNAs bei der Regulation ganzer Gengruppen und damit kompletter pathophysiologischer Prozesse einen Zusammenhang mit diesen Veränderungen vermuten. Auch die mikroRNA-142-3p gehört zu diesen herunterregulierten mikroRNAs [3, 4]. Eine bioinformatische Analyse möglicher Zielstrukturen der miR-142-3p ergab hierbei, dass Komponenten des Interleukin-6-Signalwegs, eine möglicherweise die Dezydualisierung beeinflussende Adenylatzyklase, sowie verschiedene mit dem Zytoskelett in Verbindung stehende Proteine durch diese miRNA reguliert werden könnten.

Fragestellung und Methoden Ziel der vorliegenden Studie war eine Identifizierung von Zielstrukturen der miRNA miR-142-3p und die Untersuchung der funktionellen Auswirkungen einer veränderten miRNA-Expression in endometrialen Stromazellen. Hierzu wurde in der immortalisierten endometrialen Stromazell-Linie ST-T1b [5] sowie in primären endometrialen Stromazellen die Expression von miR-142-3p durch transiente Transfektion mit miRNA-Vorstufen erhöht und mittels qPCR bestätigt. Die Auswirkung auf die Expression von Zielgenen wurde mittels qPCR, Western-Blotting und Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Funktionelle Veränderungen wurden mittels MTT-Zellviabilitätsassays, Migrationsassays und Western-Blot-Signaltransduktionsanalysen erforscht.

Ergebnisse Eine erhöhte Expression von miR-142-3p führte zu einer signifikant reduzierten Expression der Adenylatzyklase ADCY9, des Interleukin-6-Rezeptors IL6ST/gp130, sowie zahlreicher mit dem Zytoskelett in Verbindung stehender Proteine, unter anderem N-WASP und ITG- α V. Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte in miR-142-3p überexprimierenden Zellen eine deutlich geringere Anfärbarkeit des ITG- α V, dessen Verteilungsmuster zudem verändert war. Gleiches galt für das in Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Kontakten vorkommende Vinculin. Diese Veränderungen waren indirekt durch die Verminderung anderer Proteine bedingt, da Vinculin kein direktes Zielgen der miR-142-3p darstellt. Auf funktioneller Ebene war die verminderte Expression der miR-142-3p-Zielgene mit einer signifikant reduzierten Zellviabilität und einer verminderten Fähigkeit der Zellen zur Migration assoziiert. miR-142-3p-überexprimierende Zellen zeigten darüber hinaus eine reduzierte IL-6-vermittelte STAT3-Aktivierung und eine veränderte basale Expression des Transkriptionsfaktors NFkB.

Schlussfolgerung Die miRNA miR-142-3p reguliert in endometrialen Stromazellen Zellviabilität, Migrationsfähigkeit und proinflammatorische Signalvorgänge. Diese Funktionen könnten die mechanistische Grundlage für eine Beteiligung fehlgeleiteter miRNA-Expression bei endometrialen Pathologien wie der Endometriose darstellen und markieren die miR-142-3p als potenzielle Zielstruktur dieser Erkrankungen. Dies eröffnet neue Perspektiven für experimentelle Studien zur Untersuchung der Rolle der mikroRNAs.

Literatur:

1. Neubauer C et al. J Endometriosis 2012; 4: 1–16.
2. Götte M et al. Oncogene 2010; 29: 6569–80.
3. Ohlsson-Teague EMC et al. Mol Endocrinol 2009; 23: 265–75.
4. Pan Q et al. Mol Hum Reprod 2007; 13: 797–806.
5. Samalecos A et al. Reprod Biol Endocrinol 2009; 7: 76.

Förderung: Medizinische Fakultät Münster (to CK), IMF Münster GÖ-111110 (to MG).

P005

TGF-betas induce Smad-dependent Signaling and Apoptosis in Human Endometrial and Endometriotic Cells

E. Mecha¹, C. O. Omwandho², C. Sui¹, H.-R. Tinneberg¹, L. Konrad³

¹Institut für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Gießen, Germany; ²Dept. of Biochemistry, Nairobi, Kenya; ³Zentrum für Frauenheilkunde, Uniklinikum Gießen, Germany

Questions The transforming growth factor-beta (TGFbeta) superfamily play a prominent role in various cellular processes. TGFbetas are highly expressed in the peritoneal fluid of patients with endometriosis, as well as in endometriotic sites. Thus, TGFbetas might be involved in the pathogenesis of endometriosis. This study aimed to analyse the effects of TGFbeta1 or TGFbeta2 on cell numbers, on apoptosis and on signal transduction in endometrial and endometriotic cells *in vitro*.

Methods Immortalized human endometrial stromal (T-HESC), epithelial (HES), endometriotic stromal (22B) and epithelial (12ZVK) cell lines were used. Cells were treated with or without TGFbeta1 or TGFbeta2, respectively, and the cell numbers were quantified. By using specific inhibitors targeting TGFbeta signaling, Smad-dependent pathways and apoptotic pathways were studied. With ELISAs phosphorylation of Smad2 and Smad3 was investigated.

Results Our results showed that: (1) TGFbeta1 or TGFbeta2 significantly decreased cell numbers of all cell lines at high initial cell numbers. The decrease in cell numbers of endometrial cells was higher (T-HESC = 61%, HES = 29%) compared to endometriotic cells (22B = 24%, 12ZVK = 21%). (2) A TbetaRI kinase inhibitor completely blocked the TGFbeta-induced reduction in cell numbers. A Smad3 inhibitor partly blocked it, suggesting that the Smad pathway is the main pathway of TGF- β signaling in endometrial and endometriotic cells. After stimulation with TGFbeta1 or TGFbeta2 Smad2 as well as Smad3 are phosphorylated. Additionally, TGFbeta1 or TGFbeta2 reduced the cell numbers of both endometrial and endometriotic cells through apoptosis via the mitochondrial pathway. The apoptotic effect was Smad-dependent. In addition, the TbetaRI inhibitor completely blocked TGFbeta-induced PAI-1 (plasminogen activator inhibitor) secretion.

Conclusions TGFbeta1 as well as TGFbeta2 reduced cell numbers by stimulating apoptosis and PAI-1 production. Recently, we found that bioactive PAI-1 reduced cell adhesion of endometrial and endometriotic cells to the extracellular matrix, thus favouring deadhesion. The Smad pathway is the main pathway of TGFbeta signaling in endometrial and endometriotic cells. TGFbetas may play an important role in the pathogenesis of endometriosis because of the strong increase in PAI-1 secretion which anticipates cell adhesion.

P006

Syndecan-4 as a Potential Pathogenesis Factor of Endometriosis

C. Schneider, M. Brand, L. Kiesel, M. Götte
Forschungslabor, Klinik für Frauenheilkunde und
Geburtshilfe, Universitätsklinikum Münster, Germany

Introduction Endometriosis is characterized by ectopic growth of endometrial tissue, and is associated with pain symptoms and reduced fertility. Syndecan-1, a heparan sulfate proteoglycan, was shown before to influence invasiveness, MMP expression and inflammatory cytokine secretion of epithelial endometriotic cells (1). Syndecan-4 is a homologous molecule which influences cell-cell and cell-matrix interaction, and which – like Syndecan-1 – is expressed in a menstrual-cycle specific manner (2). In the present work, the influence of Syndecan-4 on the behavior of endometriotic cells was investigated *in vitro*.

Methods Syndecan-4 expression was knocked down by siRNA in the epithelial endometriotic cell line 12Z. Changes in candidate gene expression and successful silencing were confirmed by qPCR. By a matrigel invasion assay, the invasive behavior of the cells was tested. Furthermore, the adhesion capability was investigated by an adhesion assay, and cell viability was assessed by MTT assay. The protein levels of target molecules were analyzed by western blotting.

Results The mRNA expression of Rac1 and the transcription factor ATF2 were down-regulated upon Syndecan-4 knockdown up to 50% ($p < 0.05$). Syndecan-4-depleted 12Z cells were 40% less invasive compared to control cells ($p < 0.05$). The adhesion assay, however, did not show any significant difference. Syndecan-4-depletion did not alter cell viability. Focal adhesion kinase protein levels were significantly down regulated by 15% ($p < 0.05$).

Conclusion Syndecan-4 influences the invasive behavior of 12Z endometriosis cells, which may correlate to less efficient implantation of endometriotic tissue at ectopic sites *in vivo*. As focal adhesion kinase and the small GTPase Rac1 regulate cytoskeletal function and cell motility, and ATF-4 is involved in this process, they may have contributed to the invasion phenotype of Syndecan-4-deficient cells (3). Further investigations should demonstrate how exactly Syndecan-4 decreases the invasion behavior of 12Z cells in order to potentially use it as a target for therapeutic approaches in the future.

References:

1. Schneider C et al. Fertil Steril 2013; 99: 871–81.
2. Germeyer A et al. Fertil Steril 2007; 87: 657–63.
3. Saoncella S et al. J Biol Chem 2004; 279: 47172–6.

P007

Expression und Regulation der Klasse-3-Semaphorine im Endometrium

G. Dias Ferreira¹, F. Lasitschka², J. Jauckus³,
T. Strowitzki³, A. Germeyer²

¹Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasilien; ²Pathologisches Institut der Universitätsklinik Heidelberg; ³Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin Universitätsfrauenklinik Heidelberg, Deutschland

Fragestellung Klasse-3-Semaphorine, bekannt als Axonguidancefaktoren im Gehirn, sind u. a. auch als Ko-Rezeptoren für Neuropeptide – wichtige endometriale Angiogenese und Proliferationsrezeptoren – bekannt. Erste Mikroarrayuntersuchungen gaben Hinweise auf eine Genexpression dieser Faktoren in eutopen Endometrium, sodass wir nun die Genexpression und zyklische Regulation der Klasse-3-Semaphorine (SEMA3A–F) im eutopen Endometrium gesunder Frauen und Analyse der Proteinexpression von Semaphorin 3A & 3D mittels ELISA und Immunfluoreszenz durchgeführt haben.

Methodik Endometriale Biopsien gesunder, regelmäßig menstruierender Frauen wurden nach Einwilligungserklärung in der späten Proliferationsphase ($n = 7$) und mittleren Sekretionsphase ($n = 7$) gewonnen. Gewebeproben für die Genanalytik nach Anweisung des Herstellers mit TRIZOL aufgearbeitet. Für die Proteinbestimmung wurde für spätere Immunfluoreszenzanalysen (IF) Gewebe nativ bzw. in OCT kryokonserviert. Die Real-time-PCR von SEMA3A–F erfolgte nach cDNA-Synthese im Lightcycler mit entsprechenden Tagman-Primern. SEMA3A und -3D wurden darüber hinaus mit IF in Kryoschnitten auf Proteinebene untersucht. Darüber hinaus erfolgt nach Proteingewinnung von Gesamtgewebe die Untersuchung, auf die SEMA3A-Proteinexpression mittels Sandwich-ELISA quantifiziert wurde.

Ergebnisse Sekretorisch zeigte sich auf mRNA-Ebene eine signifikante Reduktion der Expression für SEMA3A, SEMA3C, SEMA3D und SEMA3E im Vergleich zu Proben der proliferativen Phase ($p < 0,05$). Die RNA-Ergebnisse konnten sich auf Proteinebene für SEMA3A mit einer verminderten Proteinexpression in der sekretorischen Phase ($p \leq 0,05$) bestätigen. Mittels IF konnte SEMA3A und SEMA3D insbesondere in Epithelzellen mit entsprechender Regulation in den beiden Zyklushälften lokalisiert werden.

Schlussfolgerung Dies ist der erste Nachweis der Genexpression der Klasse-3-Semaphorine im eutopen Endometrium. Eine Translation der Genexpression von SEMA3A und -3D in Protein konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Eine zyklische Regulation findet sich für SEMA3A, 3C, 3D und 3E mit einer verstärkten Expression derselben in der ersten Zyklushälfte, sodass deren Bedeutung bei der endometrialen Proliferation vermutet werden kann.

P008

MicroRNA miR-145 – A Novel Modulator of Stem Cell Phenotype, Proliferation and Invasiveness in Endometriosis

M. Adammek¹, A. Schüring¹, N. Kässens¹, C. Schneider¹,
L. Kiesel¹, B. Greve², M. Götte¹

¹Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe; ²Klinik für Strahlentherapie, Universitätsklinikum Münster, Germany

Background MicroRNAs are small non-coding RNAs involved in the regulation of gene expression at the posttranscriptional level. microRNA expression is dysregulated in endometriosis suggesting a potential as diagnostic markers and therapeutic targets. Our objective was to study the function of miR-145, known to be dysregulated in endometriosis, and to identify its target genes in an *in vitro* endometriosis model. As miR-145 was predicted to target multiple stemness-related factors based on database analyses (microRNA.org), we hypothesized that it may influence endometriotic stem cell function, which may promote disease progression by conferring unlimited proliferation potential and developmental plasticity.

Methods The human endometriotic cell line 12Z and primary eutopic and ectopic endometrial stroma cells derived from eutopic endometrium of three ASRM stage III endometriosis patients and from ectopic lesions of four patients with deep infiltrating endometriosis were transiently transfected with miR-145 precursors or anti-miR-145 inhibitors. Posttranscriptional regulation of predicted target genes and changes in cell behavior were monitored *in vitro* using qPCR, Western blotting, Matrigel invasion assays, MTT cell proliferation assays and flow cytometric analysis for stem cell properties.

Results miR-145 overexpression inhibited cell proliferation and induced downregulation of the pluripotency-associated transcription factors OCT4, KLF-4 and SOX2, of the adult stem cell marker MSI2, and of the cytoskeletal element FASCIN-1. miR-145 up-regulation increased Matrigel invasiveness and reduced side population and aldehyde dehydrogenase-1 activity. Additional down-regulated targets in 12Z cells included PODXL, JAM-A, and SERPINE1/PAI-1. ACTG2 and TAGLN were upregulated following pre-miR-145 transfection. JAM-A, FASCIN-1, and PAI-I down-regulation in 12Z cells were confirmed by Western blotting.

Conclusions miR-145 inhibits endometriotic stem cell phenotype, invasiveness, and proliferation by targeting multiple pluripotency factors, cytoskeletal elements, and protease inhibitors. As these processes can be expected to influence establishment and growth of the endometriotic lesion, miR-145 emerges as an interesting therapeutic structure for this disease.

Acknowledgements: This project was partially funded by a Bayer Grants for Targets grant (to MG).

P009

Inhibition of the Notch/Msi Signaling Pathway Reduces Stemness and Expression of SOX2, LIFR, and PODXL in a Human Endometriotic Cell Line

M. Hubert¹, N. Achmad¹, K. Brüggemann¹, L. Kiesel¹, B. Greve², M. Götte¹

¹Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe; ²Klinik für Strahlentherapie, Universitätsklinikum Münster, Germany

Background Adult stem cells are involved in the regeneration of the endometrium during the menstrual cycle [1]. Recent data indicate that dysregulated stem cell function may also be implicated in the pathogenesis of endometriosis. We have previously demonstrated that expression of Msi1, a modulator of the stemness-associated notch signaling pathway, is upregulated in endometriosis and endometrial carcinoma [2]. Interference with Msi1 function leads to a downregulation of notch-1 and to an induction of apoptosis in endometrial carcinoma cells [3]. In the present study, we investigated the effects of notch pathway inhibition via gamma secretase inhibitors (GSI) on stemness-associated properties of the epithelial endometriotic cell line 12Z [4].

Methods 12Z cells were subjected to gamma secretase inhibitor treatment and analyzed for changes in gene expression by TaqMan low density arrays and qPCR. The impact of notch pathway inhibition on stem cell properties was investigated by flow cytometric aldehyde dehydrogenase activity assays.

Results qPCR analysis demonstrated expression of the notch pathway components notch 1-4, Msi1-2, numb, DLL1,3,4, Hes1, Hey1 and the presence of an ALDH+ cell pool, a surrogate marker of stem cell activity in this cell line. GSI treatment lead to a reduction of ALDH+ cells, reduced cell viability in MTT assays, and increased apoptosis. TaqMan Low density array analysis followed by qPCR confirmation revealed a significant downregulation of the pluripotency-associated transcription factor SOX2, previously shown to be associated with endometriosis [5], of the LIF receptor, IFITM1, a regulator of primordial germ cell function, and the stemness-associated factor PODXL. Expression of Msi1 and the notch antagonist numb was upregulated by GSI, while treatment of 12Z cells with recombinant notch-1 induced transcriptional downregulation of Msi1, numb, and the notch ligands DLL1 and DLL4.

Conclusions Our data suggest that pharmacological interference with the notch signaling pathway may be a worthwhile approach in the treatment of endometriosis that warrants further investigation.

References:

- Götte M, Kiesel L. J Reproduktionsmed Endokrinol 2013; 1: 120–5.
- Götte M et al. J Pathol 2008; 215: 317–29.

- Götte M et al. Intern J Can 2011; 129: 2042–9.
- Zeitvogel A et al. Am J Pathol 2001; 159: 1839–52.

Grants: This project was partially funded by a Bayer Grants for Targets grant (to MG).

P010

Apoptose endometrialer Epithelzellen durch embryonale Stimuli und Einfluss von Syndecan-1

S. J. Bötdeker, O. Altergot-Ahmad, D. M. Baston-Büst, A. P. Hess, J. S. Krüssel

UniKiD, Universitäts-Frauenklinik Düsseldorf, Deutschland

Fragestellung Eine regelrechte Implantation des Trophoblasten in die maternale Dezidua ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Schwangerschaft. Während der Invasion leitet das endometriale Epithel nach Zell-Zell-Kontakt mit dem Embryo die Apoptose über den Todesrezeptor Fas ein. Dem Oberflächenmolekül Syndecan-1 (Sdc-1) als Ko-Rezeptor für Zytokine konnte bereits ein Einfluss auf die Apoptose diverser Zelltypen zugeschrieben werden. In dieser Studie soll untersucht werden, in wie weit embryonale Stimuli die Apoptose in endometrialen Epithelzellen einleiten, über welche Signalwege und Regulationsmechanismen dies vermittelt wird und inwiefern Sdc-1 darauf einwirkt.

Methodik In der endometrialen Epithelzelllinie RL95-2 wurde ein stabiler „knock down“ (kd) für Sdc-1 generiert. Wildtyp (wt-) und kd-Zellen wurden auf die Grundexpression 35 verschiedener Apoptose-beteiligter Proteine hin untersucht. Die Induktion der Apoptose wurde über Aktivierung der Caspase-3 und Spaltung von PARP nach Behandlung mit verschiedenen embryonalen Stimuli, einem anti-Fas Antikörper (Ak) und einer Kombination der Zytokine IL-1beta, IFN-gamma, TGF-beta1 und TNF-alpha (IITT), untersucht. Die Inkubationsbedingung, die die höchste Aktivierung der Caspase-3 zur Folge hatte, wurde gewählt, um die Expression 35 verschiedener Apoptose-beteiligter Proteine nach Apoptoseinduktion, sowie die Aktivität der Initiatorcaspasen-8 und -9 zu untersuchen, um differenzieren zu können, ob die Reaktion über den extrinsischen oder intrinsischen Apoptoseweg erfolgt.

Ergebnisse Es wurde eine neue endometriale Epithelzelllinie mit einem stabilen Sdc-1 kd von 80 % generiert und RLSdc1kd genannt. Im Grundzustand wurde eine signifikant geringere Expression verschiedener Proteine mit antiapoptotischer Wirkung in den kd's detektiert. Zu diesen zählten die „inhibitor of apoptosis“- (IAP-) Mitglieder cIAP-1 und -2, XIAP und Survivin, sowie die Hämoxigenase (HO) 2, die Hitzeshockproteine (HSP) 27 und -70, denen ebenfalls allesamt eine protektive, antiapoptotische Wirkung zugeschrieben wird. Eine Inkubation der Zellen mit einem anti-Fas Ak induzierte die Apoptose in den endometrialen Epithelzellen mit

einem Maximum nach 7h. Behandlung mit der Zytokin-Kombination IITT führte zu keinem Anstieg der aktiven Caspase-3, erhöhte aber in Form einer Vorinkubation die Sensitivität gegenüber Fas-vermittelter Apoptose. Eine kombinierte Behandlung aus 24 h IITT und 7h anti-Fas Ak führte zur höchsten Aktivierung der Caspase-3 und einer Spaltung von PARP als direktes Target der Caspase-3. Hierbei konnte außerdem beobachtet werden, dass die Sdc-1-kd-Zellen eine größere Apoptosesensitivität besaßen als die wt-Zellen, was sich in einer signifikant höheren Aktivierung der Caspase-3 widerspiegelte. Die kombinierte Behandlung aus 24 h IITT und 7 h anti-Fas Ak wurde gewählt, um die Expression Apoptose-beteiligter Proteine nach Apoptoseinduktion zu untersuchen. Hierbei zeigte sich eine erhöhte Expression der Todesrezeptoren Fas und TRAIL in den RLSdc1kd. Weiterhin wurden beide Initiatorcaspasen-8 und -9, die den extrinsischen und intrinsischen Signalweg der Apoptose vermitteln, durch die Behandlung induziert.

Schlussfolgerung Die Behandlung endometrialer Epithelzellen mit einer Kombination aus IL-1beta, IFN-gamma, TGF-beta1 und TNF-alpha, in Verbindung mit einem anti-Fas Ak führte zu einer starken Aktivierung der Caspase-3 sowie Spaltung von PARP und somit Induktion der Apoptose. Bei der Implantation scheint dieses Zusammenspiel aus Zytokinen und dem Fas-Ligand-tragenden Trophoblasten für den Zelltod maternaler Zellen zur Schaffung des nötigen Raums zur regelrechten Invasion verantwortlich zu sein. Weiterhin zeigen die Epithelzellen mit dem Sdc-1 kd eine höhere Sensitivität gegenüber Apoptose, die im Grundzustand durch eine verringerte Ausbildung antiapoptotischer Proteine, nach Induktion der Apoptose wiederum durch eine höhere Expression beteiligter Todesrezeptoren vermittelt wird. Somit ist davon auszugehen, dass Sdc-1 bei der Feinregulierung der Apoptose während der Implantation eine wichtige Rolle spielt. Eine erhöhte Apoptoseinduktion wie sie in den RLSdc1kd beobachtet wurde, könnte eine zu Tiefe Invasion (*placenta percreta*) zur Folge haben. Somit stellt der Ko-Rezeptor Sdc-1 einen bedeutenden Vermittler der embryo-maternalen Schnittstelle dar.

■ Männlicher Hypogonadismus und Erektile Dysfunktion

P011

Molekularer Einfluss verschiedener Testosteron- und Dihydrotestosteron-Konzentrationen auf die adipogene Differenzierung humaner SGBS-Präadipozyten

M. Kraus¹, T. Greither¹, M. Wabitsch², H. M. Behre¹
¹Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum, Halle (Saale); ²Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie, Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Ulm, Deutschland

Fragestellung Altershypogonadismus, eine Erkrankung des Mannes im zunehmenden Alter, geht einher mit einem klinisch signifikanten erniedrigten Serum-Testosteronspiegel und den daraus resultierenden Folgeerkrankungen wie eine Vermehrung des viszeralen Fettgewebes oder eine Verminderung der Insulinsensitivität. Für ein besseres Verständnis des Krankheitsbildes wurden in der eigenen Arbeitsgruppe molekulare Studien hinsichtlich der Androgenwirkung im Zellkulturmodell durchgeführt. Die microRNA-375, welche im Fettgewebe als verstärkt exprimiert beschrieben ist und eine inhibierende Wirkung auf den Adiponektinrezeptor 2 (ADIPOR2) hat, ist von großem Interesse für die Durchführung molekularer Studien. In unseren Studien konnte gezeigt werden, dass im Zellkulturmodell die microRNA-375 verstärkt und dem gegenüber ADIPOR2 vermindert während der Adipogenese exprimiert wurden. In weiteren Versuchen konnte durch die Zugabe von Testosteron (100 nM) und Dihydrotestosteron (30 nM) eine Verminderung der microRNA-375-Expression und eine Erhöhung der ADIPOR2-Expression erzielt werden. Aus diesem Grund wurden Androgen-Dosisstudien durchgeführt, in denen dargestellt werden sollte, welche Androgenkonzentrationen den kleinsten bzw. größten Effekt auf die adipogene Differenzierung und des Weiteren auf die Expression der microRNA-375 bzw. ADIPOR2 ausüben.

Methodik Humane SGBS-Präadipozyten wurden kultiviert und der adipogenen Differenzierung über 14 Tage ausgesetzt. Die Zellen wurden in jeweils 3-fach-Versuchen einerseits mit Testosteron (T) in den Konzentrationen 5, 10, 25, 50, 100 und 200 nM bzw. Dihydrotestosteron (DHT) in den Konzentrationen 5, 10, 20, 30, 50 und 75 nM und parallel dazu mit dem selektiven Androgenrezeptorantagonisten Flutamid in der Konzentration 200 nM kombiniert behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem Farbstoff Oil Red O gefärbt und Absorptionsbestimmungen (485 nm) durchgeführt.

Ergebnisse Wir konnten in ersten Versuchen zeigen, dass Testosteron bzw. Dihydrotestosteron die adipogene Differenzierung dosisabhängig inhibiert und die Gabe von

Flutamid einen gegenteiligen Effekt erzielte. T (10 nM) zeigte dabei die geringste Inhibierung (1,77-fach), während T (200 nM) mit einer 2,65-fachen Verminderung den größten Effekt erzielte. Bei Zugabe von DHT (20 nM) konnte im Vergleich zu den adipogen differenzierten Zellen eine Verringerung der Differenzierung um das 2,5-Fache, bei einer Konzentration von 75 nM eine 2,9-fache Inhibierung erzielt werden. Im Gegensatz dazu bewirkte die Zugabe von Flutamid (200 nM) in Testosteron- bzw. DHT-behandelten Zellen im Vergleich zu adipogen differenzierten Zellen einen gegenteiligen Effekt. Konzentrationen von T (5 nM) und Flutamid (200 nM) konnten hierbei den alleinigen Effekt von Testosteron am wirksamsten aufheben (1,38-fach), im Gegensatz zu T 200 nM/Flutamid 200 nM (2,03-fach). Im Vergleich dazu zeigten Konzentrationen von DHT 20 nM/Flutamid 200 nM die effizienteste Wirksamkeit (1,1-fach) und DHT 75 nM/Flutamid 200 nM den geringsten Effekt (1,33-fach).

Schlussfolgerung Die erzielten Daten zeigen dosisabhängige Effekte von Androgenen und Androgen-Antagonisten auf die adipogene Differenzierung von Präadipozyten. Dadurch können in weiteren Versuchen durch feiner dosierte Androgengaben die Expressionsprofile der microRNA-375 bzw. ADIPOR2 genauer untersucht werden, um gerade noch signifikante Effekte auf die Expression beider Marker zu erzielen. Diese Daten sind für Vergleichsstudien mit selektiven Androgenrezeptormodulatoren von großer Bedeutung.

P012

miR-130/301 Cluster Regulates Adipogenesis-associated Target Genes in a Testosterone-dependent Manner

C. Wenzel¹, M. Kraus¹, M. Wabitsch², T. Greither¹, H. M. Behre¹
¹Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum, Halle (Saale); ²Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie, Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Ulm, Germany

Background Obesity is a growing public health challenge in industrialized nations. Besides supernutrition, one causal cofactor can be late-onset hypogonadism (LOH) in elderly men, which is characterized by a significant decrease in serum testosterone (T) and concurrent clinical symptoms of a hypogonadism. LOH is frequently associated with an increase in visceral adipose tissue mass. Several studies demonstrated that specific microRNAs are important posttranscriptional gene regulators in the adipogenic differentiation of mouse preadipocytes. Androgens in turn may regulate these microRNAs, resulting in a decreased adipogenic differentiation of precursor cells. The aim of our study was to identify miR-130/301 cluster and miR-375 as potential gene regulators in adipogenesis and to determine the effect of testosterone on these microRNAs and their specific target genes.

Methods Putative adipogenesis-associated target genes of miR-130/301 and miR-375 were identified in silico by using TargetScan database (release 12.0). Reporter Luciferase assays were performed in human osteosarcoma cells (Saos-2) to validate that androgen receptor (AR), leptin, adiponectin (ADIPOQ), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma), rho guanine nucleotide exchange factor 12 (ARHGEF 12), ras GTPase 1 (RASD 1) and tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) are regulated by miR-130/301 cluster and ARHGEF 12 and RASD 1 are regulated by miR-375. The seed regions of microRNA binding sites on the mRNA of these genes were mutated (mt) to reinforce potential results. Furthermore, after cultivation and induction of adipogenic differentiation in human SGBS preadipocytes for up to 14 d ± T in a dose dependent manner, mRNA expression of the selected genes and the expression of both microRNAs were measured by quantitative RT-PCR.

Results In Reporter Luciferase assays transfection with miR-130a-mimic (50 nM) displayed a decrease of luminescence at the wild-type (wt) 3'UTR of AR (40%), ADIPOQ (30%) and PPAR-gamma (20%), whereas the luciferase expression of mt constructs was not affected by this microRNA. On the other hand, the luciferase expression of leptin-3'UTR coupled construct was not altered by miR-130a overexpression. Transfection with RASD 1 (wt and mt) and co-transfection with miR-375 mimic did not effect a change of the luciferase expression either. Summarizing we could demonstrate that AR, ADIPOQ and PPAR-gamma are direct targets of the miR-130/301 cluster. Moreover, quantitative RT-PCR analyses revealed that T (100 nM) supplementation to differentiating preadipocytes inhibits the expression of ADIPOQ, Leptin, TNF-alpha, AR and PPAR-gamma in contrast to differentiating preadipocytes without testosterone supplementation. In contrast, the mRNA of ARHGEF 12 is constantly expressed during the whole adipogenic differentiation. An initial quantitative RT-PCR analysis displayed a low expression of miR-130a during the adipogenic differentiation, but an increased miR-130a expression with addition of testosterone to differentiating adipocytes.

Conclusion We conclude that a decreased serum testosterone level is associated with a decreased miR-130/301 cluster expression, leading to an elevation of the mRNA expression of its target genes AR, ADIPOQ and PPAR-gamma in human preadipocytes. These genes promote adipogenic differentiation and thereby support the increase of visceral adipose tissue mass. Our results may contribute to a better understanding of the molecular mechanisms of hypogonadism-associated obesity, which is a risk factor for the development of cardiovascular diseases, and in consequence potentially to the development of new therapeutic approaches.

P013

Intratesticular Testosterone is Increased in Men and Mouse Models with Klinefelter Syndrome and may not be Released into the Circulation due to altered Testicular Vascularisation

Q. Damm¹, F. Tüttelmann², M. Bald³, J. Gromoll¹,
C. M. Luetjens⁴, S. Kliesch⁵, E. Nieschlag⁶,
M. Zitzmann⁵, M. Simon⁶, J. Wistuba¹

¹Institute of Reproductive and Regenerative Biology, Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University of Münster; ²Institute of Human Genetics, Münster, Germany; ³University Hospital Turin, Italy; ⁴Covance Laboratories, Münster; ⁵Department of Clinical Andrology, Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University of Münster, Germany; ⁶Department of Biomedicine, University of Modena and Reggio Emilia Modena, Italy

Background Patients with Klinefelter Syndrome (47,XXY = KS) and the 41,XX^{Y*} mouse model for KS have lowered peripheral serum testosterone levels compared to controls. However, Leydig cells are hyperplastic and hyperactive in the KS mouse model and ITT concentrations per testis are not different. We therefore analysed ITT in biopsies from KS patients and tested the hypothesis that altered testicular vasculature might be the cause of low testosterone transfer into the circulation.

Material and Methods ITT concentrations were measured in biopsies of 11 KS and in 10 vasectomized patients and serum testosterone in blood of 41,XX^{Y*} and control mice (n = 5). In the testes of 41,XX^{Y*} and control mice areas covered by blood vessels were measured and presented as percentage of the total testicular areas by image processing software.

Results KS patients showed significantly reduced serum testosterone compared with controls (10.2 ± 6.0 vs 15.2 ± 3.8 nmol/l) while ITT (per whole testis) was in the same range (132.8 ± 84.0 vs 152.1 ± 100.7 nmol/testis). Concerning testicular hormones, ITT was the highest in KS when analysed per gram of tissue. Serum testosterone was also reduced in adult XX^{Y*} mice, although significance was not reached.

In XX^{Y*} mice areas covered by blood vessels within the testes were significantly lower ($262.8 \pm 143.8 \mu\text{m}^2$ vs. $906.9 \pm 369.9 \mu\text{m}^2$ in XY*, $p < 0.01$). The ratio calculating blood vessel per testes and therefore correcting for the smaller XX^{Y*} testes also revealed a significant reduction in XX^{Y*} ($1.5 \pm 0.3\%$) compared with fertile controls XY* ($4.1 \pm 1.3\%$, $p < 0.01$). Further, the distribution of blood vessel size was different: larger blood vessels covering an area of more than $867 \mu\text{m}^2$, which comprised 13% of all vessels and occupied 55% of the total vessel area in XY* mice were only found in XY* males.

Conclusion KS patients exhibited low peripheral serum testosterone but normal ITT (per testis). However, the ITT was increased in KS when analysed per gram tissue. In con-

junction with the different vasculature observed in mice, hampered hormone release from the testis seems a likely explanation for the lower serum testosterone. Whether this is primarily caused by a general disturbance in angiogenesis or is secondary to the architectural changes following postnatal germ cell loss remains to be determined.

Acknowledgement: The study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG grant No WI 2723/4-1).

P014

Serum Inhibin B, but not AMH or INSL3 levels are helpful in Discriminating between Prepubertal Boys with constitutional Delay of Growth and Puberty (CDGP) and Hypogonadotropic Hypogonadism (HH)

J. Rohayem¹, J.-R. Nofer², S. Kliesch¹, M. Zitzmann¹

¹Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie; ²Klinische Chemie, Universitätsklinikum Münster, Germany

Background In boys ≥ 14 years of age, the differentiation between CDGP and a permanent developmental arrest is challenging. Diagnostic aids such as basal gonadotropin serum levels and stimulation tests with GnRH, hCG or GnRH-agonists all have limitations in sensitivity and specificity. In CDGP mistakenly assigned as HH, hormonal replacement will suppress the pubertal activation of the gonadotropic axis, the condition may remain unrecognized and an unnecessary life-long hormonal treatment may ensue. Sertoli cells are the most active cell population in the prepubertal testis, secreting Inhibin-B and AMH. Inhibin-B increases, AMH declines during puberty. INSL3 is produced concomitantly to testosterone by Leydig cells.

Aim To assess the diagnostic utility of Inhibin-B, AMH and INSL3 in male patients with delayed puberty in the differentiation between CDGP and HH.

Material and Methods Tanner stage, testicular volume, basal and GnRH-stimulated hormone levels and the sense of smell of 52 boys aged > 14 years, referred for late puberty were assessed. Patients were grouped into 3 groups: n = 15 boys with HH, n = 9 prepubertal boys with CDGP and n = 28 early pubertal boys with CDGP. The sera drawn at the time of the first referral were analysed for Inhibin B, AMH and INSL3.

Results Inhibin-B levels of HH-patients (median [$\pm 95\%$ CI]: $13.4 [12.4-23.4]$ pg/ml) were significantly lower than those of prepubertal patients with CDGP ($66.1 [31.8-86.2]$ pg/ml; $p = 0.0028$) and of early pubertal patients with CDGP ($136.7 [115.5-162]$ pg/ml; $p < 0.0001$). Receiver operating characteristics for diagnosis of CDGP vs. HH (Inhibin-B ≥ 29 pg/ml): sensitivity 95%, specificity 80%, positive predictive value 91 % ($p < 0.001$). Inhibin B correlated with delta-LH during GnRH testing. INSL3 levels

and AMH were not significantly higher in the pre-pubertal CDGP group than in the HH group.

Conclusions Inhibin-B, but not AMH, nor INSL3 constitutes a biomarker to assess whether a prepubertal boy with pubertal delay will enter puberty spontaneously or not.

P015

Cardiometabolic Factors and Endogenous Male Hormones: Data from the Baseline Cohort of the Registry of Hypogonadism in Men (RHYME)

H. M. Behre¹, M. Maggi², A. Yassin³, M. Julia⁴,
A. Araujo⁴, R. Rosen⁴

¹Center for Reproductive Medicine and Andrology, Martin Luther University, Halle (Saale), Germany; ²Sexual Medicine and Andrology, University of Florence, Italy; ³Segeberger Kliniken, Norderstedt-Hamburg, Germany; ⁴Department of Epidemiology, New England Research Institutes, Inc., Watertown, USA

Question Hypogonadism (HG) is a prevalent condition in men with broad health and quality of life consequences. How do endogenous total testosterone levels relate to cardiometabolic factors in the Registry of Hypogonadism in Men (RHYME)

Methodology RHYME is a multi-center registry of 999 men with clinically-diagnosed HG (naïve to androgen treatment) from 25 sites in 6 European countries (DE/ES/IT/NL/SE/UK). Total testosterone was measured in a central laboratory by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Cardiometabolic factors included measured height and weight (used to calculate body mass index [BMI]), waist circumference and blood pressure (high blood pressure, defined as systolic blood pressure ≥ 140 or diastolic blood pressure ≥ 90 mmHg). Hypercholesterolemia, diabetes, and use of anti-hypertensive, lipid-lowering, and anti-diabetic medications were assessed by medical record. Smoking and physical activity were assessed by self-reported questionnaire. Unadjusted associations with total testosterone were assessed via Pearson's correlation coefficient (r) for continuous variables and t-tests for binary categorical variables. Differences in geometric mean total testosterone (log-scale) in relation to cardiometabolic factors were assessed via multivariable linear regression models controlling for age, BMI, HG duration, smoking, physical activity, self-rated health, number of comorbidities, blood draw time, and country.

Results Mean age and total testosterone were 59 ± 10.5 y and 9.5 ± 1.6 nmol/L, with high rates of obesity (44%), high blood pressure (50%), hypercholesterolemia (31%), and diabetes (29%). There were significant differences in total testosterone by country (range: UK, 9.9 nmol/L; DE, 11.8 nmol/L). Total testosterone levels were significantly correlated with BMI ($r = -0.23$) and waist ($r = -0.20$) but not systolic or diastolic blood pressure. Mean total testosterone levels were

unrelated to smoking, physical activity, high blood pressure, hypercholesterolemia, diabetes, or use of medications to treat these conditions in unadjusted or adjusted analyses. More men with lower total testosterone were taking anti-hypertensives and lipid-lowering agents, but the relation between total testosterone and high blood pressure or hypercholesterolemia was not different in men taking or not taking these medications. BMI did not modify associations between other cardiometabolic factors and total testosterone.

Conclusion Among men with diagnosed HG, endogenous total testosterone levels are strongly associated with body composition but not with other cardiometabolic outcomes. Future analyses will be important to understand directionality of these associations and whether total testosterone therapy improves cardiometabolic outcomes in obese men with HG.

P016

Male Sexual Function and Endogenous Hormones prior to Hormone Replacement Therapy: Baseline data of the Registry of Hypogonadism in Men (RHYME)

H. M. Behre¹, H. Porst², F. Debruyne³, F. Jockenhoevel⁴, A. Araujo⁵, R. Rosen⁶

¹Center for Reproductive Medicine and Andrology, Martin Luther University, Halle (Saale); ²Private Practice of Urology and Andrology, Hamburg, Germany; ³Andros Men's Health Institutes, Amhem, Netherlands; ⁴Klinik für Innere Medizin, Evangelisches Krankenhaus Herne, Germany; ⁵Department of Epidemiology, New England Research Institutes, Inc., Watertown, USA

Question Hypogonadism (HG) and sexual dysfunction are common disorders in the aging male. Community studies have revealed a moderate association between sub-normal total testosterone and decreased sexual desire and erectile function, although these findings have not been confirmed in untreated, patient populations and the impact of PDE-5 inhibitor (PDE5i) use is unknown. We investigate the baseline prevalence of sexual dysfunction (loss of desire, erectile dysfunction [ED]), as assessed by validated questionnaires (international index of erectile function [IIEF]) and medical record review, its association with endogenous total testosterone levels and whether this relationship is influenced by PDE5i use in a large, well-characterized registry cohort of hypogonadal men.

Methodology RHYME is a multi-center registry of 999 men with clinically-diagnosed HG (naïve to androgen treatment) from 25 sites in 6 European countries (DE/ES/IT/NL/SE/UK). ED, PDE5i use, and low sexual desire were assessed in all patients (n = 999) by medical record review. In sexually active patients (n = 752), ED and low sexual desire were also assessed by the IIEF sexual desire and erectile function domains.

Serum total testosterone at baseline was assessed centrally by mass spectrometry. Differences in geometric mean in relation to sexual activity, ED, PDE5i use and low sexual desire were assessed via linear regression models.

Results The mean age of the cohort was 59.1 ± 10.5 years and mean baseline total testosterone was 9.5 ± 1.6 nmol/L. More than 3 quarters (76.4%) of the sample were sexually active at the time of enrollment and sexually active hypogonadal men had higher baseline total testosterone relative to inactive men (9.9 vs 8.5 nmol/L; $p < 0.001$). High overall rates of sexual dysfunction were observed in both sexually active and inactive participants. 64.7% of the total sample presented with decreased desire and 81.0% with loss of erection. Those with complaints of low desire had significantly lower mean total testosterone than those without (9.3 vs 10.0 nmol/L; $p = 0.03$). Based on IIEF erectile function domain scores in sexually active men, 34.8% had severe ED, 31.1% had moderate ED, and 34.1% had mild or no ED. While men with ED (presenting complaints or severe/moderate IIEF scores) did not have lower total testosterone overall, those being treated with PDE5i had significantly higher mean total testosterone than untreated men (11.0 vs 9.1 nmol/L, $p < 0.0001$). Rates of PDE5i use were highest in Spain (44.2%) and lowest in Italy (9.4%), and were more than twice as high in urology (35.9%) compared to endocrinology or general medicine (16.1%) practices.

Conclusion Prevalence of sexual dysfunction and rates of PDE5i use are high in our large cohort of European hypogonadal men before starting androgen treatment, although substantial variations were observed by practice specialty and country. PDE5i use was associated with higher endogenous total testosterone in men with ED whereas loss of sexual desire and sexual inactivity were associated with the lowest levels of total testosterone.

P017

Prevalence of Cardiovascular Risk Factors and Systemic Endothelial Function in Patients with Erectile Dysfunction

O. Apolikhin, E. Efremov, S. Dorofeev, Y. Melnik, S. Krasnyak

Research Institute of Urology, Andrology and Human Reproduction, Moscow, Russian Federation

Purpose Myocardial infarction and ischemic stroke are the main causes of death in adult males. According to many studies, time interval from onset of erectile dysfunction (ED) to cardiovascular complaints is 2–3 years and to vascular accident (myocardial infarction or stroke) 4–5 years. The highest predictive value of ED as a marker of vascular disease is manifested in patients aged 40–59 years. In addition, the identification of ED may indicate the presence of these disorders

in a patient in a latent form, according to some authors.

Materials and Methods We conducted an assessment of endothelial function in 126 men complaining of erectile dysfunction (42.6 ± 6.8 years). All patients filled the International Index of Erectile Function questionnaire (IIEF). Waist circumference, blood pressure, blood chemistry and penile duplex Doppler ultrasound were also assessed.

Results Among patients with ED incidence of risk factors of cardiovascular disease was: dyslipidemia –62%, hypertension –42%, abdominal obesity –34% insulin resistance –18%. Furthermore, the presence of risk factors somatic diseases and diseases of the heart and vascular distribution varied forms of ED in severity. Thus, in patients without accompanying cardiovascular system, mild ED occurred in 23% of cases, moderate ED 36%, the average –26% of patients, severe ED –15%. For patients with cardiovascular these figures were 18%, 30%, 28%, and 24%, respectively. The regression analysis and determination of the Spearman rank correlation coefficient ($p < 0.05$) was performed. The analysis shown a high degree of correlation of endothelial dysfunction with increased blood glucose more than 6.0 mmol/l ($r = 0.75$), moderate with a waist circumference greater than 94 cm ($r = 0.65$), age ($r = 0.63$), increased triglycerides ($r = 0.6$), decreased high density cholesterol levels ($r = 0.5$), increased low density cholesterol ($r = 0.48$), reduced number of points by IIEF ($r = 0.45$), the lowest degree of association with the identified reduced peak systolic velocity ($r = 0.3$), low Index of resistance ($r = 0.28$), end diastolic velocity ($r = 0.2$), elevated blood pressure > 130 mmHg ($r = 0.2$), retention time of blood flow in deep dorsal vein > 15 minutes ($r = 0.1$).

Conclusion The evaluation of postcompressive reactive hyperemia index is a highly accurate method of assessing systemic endothelial function in the complex diagnosis of ED. ED is a predictor of cardiovascular dysfunction, and it is necessary to examine not only the local penile blood flow, but also to assess systemic endothelial function.

P018

Rezidivierender Priapismus – Fallanalyse und Diskussion moderner PDE-5-Hemmer-Therapie

B. Schwindl¹, M. Mathers², A. Meißner³, T. Klotz¹

¹Klinik für Urologie, Andrologie und Kinderurologie, Kliniken Nordoberpfalz, Weiden; ²PandaMed Remscheid, Urologische Gemeinschaftspraxis, Remscheid, Deutschland; ³Academic Medical Center, Universität von Amsterdam, Amsterdam, Niederlande

Fragestellung Der rezidivierende Priapismus ist durch eine, von einer sexuellen Stimulation unabhängig, wiederholt auftretende Penissteife gekennzeichnet, die unbehandelt zum irreversiblen Erektionsverlust führen kann. Beim sogenannten „Stuttering“ liegt eine Sonderform des Low-flow-Pri-

Tabelle 1: B. Schwindl et al. (P018). Ursachen des Priapismus.

- Hämatologisch: Sichelzellanämie, Thalassämie, Glc6PD-Defizit, Leukämie, Multiples Myelom, Polyzthämie
- Medikamentös: Antidepressiva, Psychopharmaka, Antiepileptika, Alpha-Blocker, Anabolika, Antihypertensiva, Antikoagulantien, Narkotika, Potenzmittel (SKAT, selten PDE-5-Hemmer)
- Metabolische Störungen: Amyloidose, Gicht, Diabetes, Dialyse, Infusion fettreicher Lösungen
- Tumorbedingt: primär, Metastasen
- Vaskuläre, entzündliche Erkrankungen im kleinen Becken
- Neurologisch: Bandscheibenvorfall, Lumbalstenose
- Drogen-induziert: Kokain, Alkohol, Marihuana; Toxisch (Gift der brasilianischen Wanderspinnne etc.)

Tabelle 2: B. Schwindl et al. (P018). Auswahl der Therapie-Modalitäten.

Etilephrinhydrochlorid (Effortil®) (1 ml = 10 mg); Auslandsapotheke; Boehringer Ingelheim (> 2 h) maximal bis 5 A (Tageshöchstosis)	1 A in erigierten Penis, bei drohender Major-Episode
Digoxin (Novodigal®) 0,25–0,5 mg p. o./die	Nebenwirkungsprofil, Spiegelkontrolle
Baclofen (Lioresal®) 3 × 10 mg p. o.	Ind.: neurologisch-reflektorische Causa
GnRH-Analoga, z. B. Leuprolide 7,5 i. m./Monatsdepot	NW: Erektile Dysfunktion, Libidoverlust
Bicalutamid (Casodex®) 50 mg p.o./die	NW: Erektile Dysfunktion
Ketoconazol 200 mg p. o./die	NW: Erektile Dysfunktion, Lebertoxizität
Finasterid 5 mg p. o./die	NW: Erektionsstörung
Sildenafil (Viagra®, Generika) 1(–2) × 25 mg p. o./die	Off-label-Use, bei nicht erigiertem Penis
Vardenafil (Levitra®) 1(–2) × 5 mg p. o./die	Off-label-Use, bei nicht erigiertem Penis
Tadalafil (Cialis®) 5 mg/die bzw. 10 mg p.o. (3×/Wo)	Off-label-Use, bei nicht erigiertem Penis

pismus vor, der in die Major-Form (> 4 h) münden kann (**Tab. 1**).

Diagnostisch erfolgen Farbduplexsonographie, Blutgasanalyse, Labor (incl. Hormonstatus, Differentialblutbild und Hämoglobinelektrophorese), ggf. weitere Bildgebung des kleinen Beckens und der Wirbelsäule (CT, MRT).

Therapeutisch kommen Sympathikomimetika-Injektionen intrakavernös zum Einsatz.

Zur oralen Dauerbehandlung sind bisherige Konzepte (**Tab. 2**) nur bedingt wirksam bzw. mit Nebenwirkungen verbunden. Es stellt sich die Frage, inwieweit ein neueres Konzept mit langfristiger PDE-5-Hemmer-Therapie das Priapismus-Risiko senken kann.

Methodik Es wird der Stuttering-Priapismus am Beispiel eines 30-jährigen Übergewichtigen Patienten, der an einer medikamentös behandelten Schizophrenie, an Gicht, unter einer Bandscheibenerkrankung

und Schlafstörungen leidet, demonstriert. Nach Major-Episode Auftreten von immer häufigeren Priapismen am Morgen. Die psychischen (und wirtschaftlichen) Folgen, Einschränkungen der Lebensqualität durch wiederholte Vorstellung in der Notfallambulanz wird durch Anleitung zur Selbstinjektion von Etilefrin verbessert. Eine prophylaktische, orale Dauerbehandlung mit PDE-5-Hemmern wird anhand einer Literaturrecherche erhobener Daten analysiert (**Tab. 3**).

Ergebnisse Die aufgelisteten Arbeitsgruppen weisen die Effizienz der niedrig bis moderat dosierten PDE-5-Hemmer in der Dauer-Medikation (über Monate bis zu 1 Jahr) nach. Die Wirkung trat in einigen Fällen bereits nach 2 Wochen ein.

Pathophysiologisch wird ein veränderter NO bzw. cGMP-Signalweg postuliert. Eine geringe basale NO-Aktivität (im geschädigten Endothel des kavernösen Corpus) und konsekutiver Down-Regulation der Phospho-

diesterase-5 mit überschießendem Anstieg von cGMP (durch sexuelle Stimulation, nächtliche REM-Phasen induzierte Erektion, morgendlichem Testosteron-Anstieg) erhöhen die Priapismus-Bereitschaft. Vermehrte Expression der PDE-5 durch kontinuierliche PDE-5-Inhibitor-Gabe wirkt gegensinnig. Unterstützend wirken körperliche Aktivitäten (zur Verringerung von Stase und oxidativem Stress), Schlafhygiene und Vermeidung eines hyperalimentären Syndroms.

Schlussfolgerung Die PDE-5-Hemmer-Medikation ist in einschleichender Dosierung, überlappend in Kombination mit intrakavernöser Sympathomimetika-Injektion, eine bei derzeit geringer Studiendatenlage im Heilversuch einzusetzende, wahrscheinlich erfolgversprechende Konstanz-Therapieoption, insbesondere für den Adoleszenten und jungen Erwachsenen. In Hinblick auf die geringe Inzidenz ist eine Datensammlung in einem zentralen Register anzustreben.

■ Männliche Infertilität – Grundlagen

P019

Distribution of the Estrogen Receptor GPER in the Testis: Expression by Testicular Peritubular Cells and Changes Associated with Testicular Function

F. Sandner¹, J. Schwarzer², F. Köhn³, H. Urbanski⁴, H. Welter¹, A. Mayerhofer¹

¹Anatomy III–Cell Biology, LMU München; ²Andrologie-Centrum-München; ³Andrologicum, München, Germany; ⁴Oregon National Primate Research Center/ West Campus OHSU, Beaverton, USA

Introduction To date three estrogen receptors, which mediate estrogenic effects, are known: two nuclear estrogen receptors 1 and 2 (ER-1/2) and the more recently discovered G-protein coupled estrogen receptor (GPER). Neither the function, nor the distribution of GPER in the testis, especially the human testis, is well understood. We explored this topic.

Material and Methods Testicular biopsies from men with normal and impaired spermatogenesis, from rhesus monkeys (post-

Tabelle 3: B. Schwindl et al. (P018). Literaturrecherche.

Burnett et al. (2006)	n = 7 Pat. (3 idiopathisch, 4 Sichelzellanämie)	Sildenafil 25–50 mg 1-0-0 bzw. Tadalafil 10 mg/48 h	3 Pat. kein, 3 Pat. seltenes, 1 Pat. häufiges Rezidiv
Finlay (2008)	n = 1 (Glc6PD-Defizit)	Vardenafil 5 mg 0-0-1	3 Monate episodenfrei
Burnett, Bivalacqua (2008)	n = 1 (Glc6PD-Defizit)	Sildenafil 25 mg 1-0-0, nach 3 Wochen Steigerung auf 50 mg	nach 3 Monaten Therapie Pause, nur Minor-Episoden
Nardoza et al. (2009)	n = 6 (5 idiopathisch, 1 Sichelzellanämie)	Sildenafil 6,25 mg/die	4 Pat. kein, 2 Pat. selteneres Rezidiv
Tzortzis et al. (2009)	n = 1 (Thalassämie, Z. n. Splenektomie)	Sildenafil 25 mg 1-0-0 (2 Monate), dann Tadalafil 5 mg jeden 3. Tag über 6 Monate	nach 2 Monaten deutlich gebessert

natal to adulthood), and adult mice and rats were immunostained using 2 commercially available antibodies. Pre-adsorption controls and controls with non-immune serum were performed. We also studied human testicular peritubular cells (HTPCs). These were used for Western blotting and RT-PCR/sequencing. Functional studies in HTPCs were initiated using estradiol and G_{11} , which acts as a specific stimulator for GPER.

Results Testes of adult men, monkey and rodents showed robust and strong GPER-expression mainly in the peritubular compartment. The staining was to some degree dependent on the antibody used but either one stained myoid, peritubular cells. Western Blot and PCR of HTPCs confirmed this finding. Some positive cells were observed in the interstitial region. They do not express the Leydig cell marker StAR, nor the mast cell marker tryptase, and remain to be identified. The study of monkey samples furthermore revealed an age-dependent expression pattern for GPER: GPER in the peritubular cell compartment was detectable only around the time of puberty. Before puberty only interstitial cells were stained. When we studied biopsies of infertile men with impaired spermatogenesis, we observed a partial or complete loss of GPER staining of peritubular cells surrounding the tubule in which spermatogenesis was impaired. In the same samples contractile, smooth muscle cell markers are also reduced [Welter et al., Andrology 2013] suggesting a possible involvement of GPER. Cell culture studies with HTPCs were initiated to follow this lead.

Conclusion The results show that testicular peritubular cells throughout several mammalian species express the estrogen receptor GPER. The onset of expression around puberty and loss in infertility imply roles associated with male fertility.

Grants: Supported by Friedrich-Baur Stiftung and in parts by DFG MA1080/21-1.

P020

Cellular and Molecular Hallmarks of Testicular Inflammation in Infertile Men

T. Haggene¹, A. Pilatz², T. Diemer², W. Weidner², H.-C. Schuppe², M. Bergmann¹

¹Institute of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology; ²Department of Urology, Pediatric Urology and Andrology, Justus Liebig University, Gießen, Germany

Introduction Multiple immunoregulatory mechanisms are involved in maintaining tolerance towards germ cells and normal function within the adult testis. Under physiological conditions, both immune cells in the interstitium as well as pro- and anti-inflammatory cytokines are considered to play a key role. The immune-privileged status of the testicular environment, however, does not preclude immune activation resulting in inflammatory reactions and potential testicu-

lar damage, e.g. in the course of urogenital infections. Notably, testicular biopsies of infertile patients frequently show focal inflammatory infiltrates, indicating a disturbance of the local immunoregulation. The infiltrates are dominated by T-lymphocytes, with a concomitant increase in macrophage and mast cell numbers. Infiltrating inflammatory cells obviously overcome the immunosuppressive environment in the testis. However, our knowledge concerning specific subpopulations of participating immune cells and their function in infectious and non-infectious testicular inflammation is still rather limited.

Material and Methods Using sections of bouin-fixed, paraffin-embedded biopsies, testicular inflammatory infiltrates were characterized immuno-histochemically in order to identify T lymphocytes (CD3⁺/CD45R0⁺/CD45RA⁺), B cells (CD20⁺/CD45RA⁺), macrophages (CD68⁺), dendritic cells (CD11c⁺/CD83⁺) and mast cells (tryptase⁺). In addition, the pattern and degree of spermatogenic failure was analyzed in areas affected by inflammatory reactions compared to non-inflamed tissue. With regard to putative functions of participating immune cells, gene expression profiles of a series of pro- and anti-inflammatory cytokines were determined in cryopreserved tissue matched to fixed biopsies by means of quantitative RT-PCR.

Results Testicular biopsies with focal or multi-focal inflammatory lesions revealed high numbers of activated, CD45R0⁺ T cells, whereas B lymphocytes were almost absent. Immune cells were typically found in peritubular and/or perivascular localization. Affected or adjacent seminiferous tubules showed partial or complete loss of germinal epithelium, thickening of the lamina propria, or complete tubular fibrosis. Few dendritic cells could be identified in the proximity of the lymphocytic infiltrates. In contrast, the number of macrophages and mast cells was increased in comparison to testicular tissue with normal spermatogenesis, but not restricted to inflammatory areas.

Measurements of transcripts encoding pro- and anti-inflammatory cytokines revealed individually different profiles, depending on the presence of inflammatory lesions and the overall degree of tubular damage. TNF- α proved to be up-regulated in specimens categorized as Sertoli-cell-only syndrome (SCO) with residual spermatogenic activity or mixed atrophy (MA), each containing focal inflammatory infiltrates, compared to non-inflamed tissue revealing normal spermatogenesis. Maximal expression was observed with inflammatory MA. Comparable differential profiles could be obtained for IL-1 β and IL-6, whereas IFN- γ , IL-12(p35) as well as IL-10 and IL-12(p40) showed a more variable expression.

Conclusion Recruitment of activated T cells and altered cytokine gene-expression profiles reflect major disturbance of the testicular immunoregulation, which is linked in turn to impairment of spermatogenesis. In line with this concept, up-regulation of TNF- α

hallmarks testicular inflammatory reactions observed in infertile men. Of note, a more in-depth analysis of cytokine expression profiles and their intra- and inter-individual variation is required to elucidate the etio-pathology – e.g. bacterial or viral infection, autoimmune reaction – of human testis dysfunction associated with inflammation.

Supported by LOEWE (excellence initiative of the state government of Hessen, Germany) focus group MIBIE (Male Infertility during Infection and Inflammation).

P021

Lokalisation und Funktion von Clusterin im Hoden

A. Stammeler¹, A. Riaz¹, B. Lüftner¹, M. Bergmann², S. Kliesch³, L. Konrad¹

¹Institut für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Gießen; ²Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, Gießen; ³Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Münster, Deutschland

Fragestellung Clusterin (syn. ApoJ, SGP2, TRPM-2, CLI) wird im Hoden ausschließlich von Sertoli-Zellen in großen Mengen sezerniert. Neben der Induktion von Sertoli-Zell-Clustern wurde ebenfalls ein Einfluss auf die Apoptose beschrieben. Sezerniertes Clusterin soll anti-apoptotisch wirken, während nukleäres Clusterin die Apoptose induziert. In der vorliegenden Studie werden die verschiedenen Isoformen von Clusterin, die Steuerung der Sekretion und die Lokalisation in der gestörten Spermatogenese näher untersucht.

Methodik Sowohl von immortalisierten Sertoli-Zellen als auch von Tubulus-Kulturen von Ratten wurde die Clusterin-Sekretion mittels ELISAs gemessen. Ebenso wurden Stimulationen mit TGF β 2 (transforming growth factor-beta) durchgeführt und ebenfalls die Clusterin-Menge quantifiziert. Mit rekombinantem Clusterin wurde die inhibierende/stimulierende Wirkung auf die Apoptose-Induktion mit Apoptose-Assays bestimmt. Paraffin-Schnitte von Hoden mit histologisch normaler Spermatogenese versus gestörter Spermatogenese wurden mit verschiedenen Antikörpern gegen Clusterin inkubiert und die Lokalisation immunhistochemisch quantifiziert.

Ergebnisse Die Clusterin-Syntheserate wurde in immortalisierten Sertoli-Zellen durch die TGF β 2 über den bekannten Smad-Signalweg deutlich stimuliert. Die Tubulus-Kulturen sezernierten ebenfalls Clusterin. Die Induktion der Apoptose in den Tubulus-Kulturen konnte durch die parallele Stimulation mit rekombinantem Clusterin deutlich reduziert werden. Die Lokalisation von Clusterin im menschlichen Hoden zeigte sich hauptsächlich im Zytoplasma der Sertoli-Zellen. Clusterin konnte weder im Nukleus nachgewiesen werden noch war es möglich, den vermutlichen Rezeptor Megalin in den Tubuli zu finden. Interessanterweise zeigte sich in histologisch normalen Hoden ein basal-zu-luminaler Gradient der Clusterin-Expression, der bei Biopsien mit gestörter

Spermatogenese nicht mehr nachweisbar war.

Schlussfolgerung Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass Clusterin von Sertoli-Zellen und Tubulus-Fragmenten sezerniert wird und durch die TGF β regulierbar ist. Die anti-apoptotische Funktion von Clusterin neben der veränderten Lokalisation bei der gestörten Spermatogenese sind ein wichtiger Hinweis auf die Bedeutung des Proteins im Hoden.

Danksagung: Die Studie wurde finanziert von der DFG KFO 181/2 und der JLU Gießen.

P022

Testosteron als Regulator von inflammatorischen Antworten in testikulären- und Immunzellen

M. Fijak¹, L.-J. Sauber¹, J.-P. Wenzel¹, M. Walecki¹, E. Wahle¹, S. Bhushan¹, H. Hackstein², G. Schuler³, A. Meinhardt¹

¹Institut für Anatomie und Zellbiologie; ²Zentrum für Transfusionsmedizin und Hämotherapie; ³Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere, Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland

Einleitung Eine zunehmende Anzahl von Studien zeigt, dass die Androgene neben deren Funktion in der Spermatogenesesteuerung, auch eine Rolle in der Modulation von Autoimmunerkrankungen und Unterdrückung von entzündlichen/autoimmunen Reaktionen spielen.

Unsere früheren Studien haben gezeigt, dass die Testosteronsubstitution von erniedrigten Testosteronwerten im Rattenmodell der experimentellen Autoimmun-Orchitis (EAO) zur signifikanten Inhibition der Erkrankung führte. Dies wurde durch starke Abnahme der erhöhten Anzahl von Makrophagen und CD4⁺-T-Zellen im Interstitium sowie gleichzeitige Erhöhung der Population von regulatorischen T-Zellen (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺; Tregs) dokumentiert. Zugleich wurde auf der mRNA-Ebene erniedrigte testikuläre MCP-1-, TNF- α - und IL-6-Expression gemessen. Anti-inflammatorische Effekte von Testosteron-Supplementation während der chronischen Hodenentzündung haben uns veranlasst, einen direkten Einfluss von Androgenen auf die Generierung von regulatorischen T-Zellen und Immunantwort in testikulären Makrophagen (TM), Sertoli-Zellen (SC) und peritubulär Zellen (PTC) zu untersuchen.

Material und Methoden Testosteronsekretion wurde in den isolierten Ratten-Leydig-Zellen (LC) mittels hCG stimuliert. Die LC-Zellkulturüberstände wurden für die Kultivierung von isolierten T-Zellen aus der Milz eingesetzt. Differenzierung von Tregs wurde durch die Messung der Expression von Transkriptionsfaktor Foxp3 (Durchflusszytometrie) und Sekretion IL-10 (ELISA) untersucht.

In einem weiteren Ansatz wurden die isolierten TM, SC und PTC vor der Stimulation einer inflammatorischen Antwort mit LPS (5 μ g/ml) mit verschiedenen Konzentrationen

von Testosteron vorinkubiert und die mRNA-Expression von pro-inflammatorischen Mediatoren (MCP-1, IL-6, IL-10, TNF- α) und kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86, MHC II) mittels quantitativer Real-time-RT-PCR analysiert.

Resultate LC-sezerniertes Testosteron stimulierte die Foxp3-Expression sowie die Sekretion von IL-10 in CD4⁺-T-Zellen. Auf der testikulären Ebene beeinflusste eine Vorinkubation mit 1000 nM Testosteron signifikant eine Inhibition der pro-inflammatorischen Antwort in Sertoli- und Peritubulär-Zellen sowie in Makrophagen. Ein direkter Androgeneinfluss konnte auf SC, PTC sowie testikuläre Makrophagen, ebenso wie auf die De-novo-Generation und funktionelle Differenzierung von regulatorischen T-Zellen gefunden werden. Die anti-inflammatorische Wirkung von Testosteron wurde durch die Gabe des Anti-Androgens Flutamid bestätigt.

Schlussfolgerungen Die gewonnenen Resultate zeigen eine neue Rolle des männlichen Sexualhormons Testosteron in der Regulation der Immunantwort. Es konnte gezeigt werden, dass Androgene nicht nur eine wichtige Funktion in der testikulären Immunregulation spielen, sondern auch systemisch an der Generation von „anti-inflammatorischen“ Treg-Zellen beteiligt sind.

P023

Identifizierung Hoden-spezifischer miRNAs im Seminalplasma: Eine Möglichkeit zur nicht-invasiven Abklärung der männlichen Fertilität und Biomarker zur Prognose des Erfolgs bei operativer Spermengewinnung

A. Paradowska-Dogan¹, M. Bergmann², T. Diemer¹, D. Schultheiss³, H.-C. Schuppe¹, K. Steger¹, W. Weidner¹, A. Pilatz¹

¹Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie;

²Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, Justus-Liebig-Universität Gießen;

³Abteilung für Urologie, Evangelisches Krankenhaus Gießen, Deutschland

Fragestellung miRNAs sind kurze (ca. 22 Nukleotide) nicht-kodierende RNA-Moleküle, welche durch 3'UTR-Bindung an die mRNA posttranskriptional an der Regulierung der Expression von Zielgenen involviert sind. Bislang existieren jedoch nur wenige Studien zur Rolle von miRNAs in der Spermatogenese und Vorkommen im Ejakulat. Ziel der Studie ist die Identifikation von im Seminalplasma zirkulierenden spezifischen miRNA mit Ursprung aus Hoden/Nebenhoden bei Patienten vor und nach Vasektomie sowie Vergleich der Ergebnisse bei Patienten mit Azoospermie.

Methodik Die Isolation von miRNAs aus Seminalplasma von einem Patienten vor und nach Vasektomie als auch einem Patienten mit Sertoli-Cell-Only-Syndrom (SCO) wurde mithilfe von 84 miRNA-Targets (miRNA

Finder; SABiosciences/Qiagen) untersucht. Initial erfolgte die Isolation von miRNA aus der Seminalplasma-cDNA-Synthese und die Präamplifikation des Materials mithilfe von universellen Primer Mix PreAmp PCR-Mix (Qiagen). Die Proben wurden mittels Syber Green-basierter Real-time-qPCR im Bio-Rad CFX96-Thermocycler analysiert. Die Kalkulation der relativen Expression der miRNA und die Auswertung der Daten erfolgte mit dem SABioscience Webtool <http://pcrdata.analysis.sabiosciences.com/mirna>.

Ergebnis Die differentielle Expression aller 84 miRNAs im Seminalplasma vor und nach Vasektomie zeigte, dass 6 Wochen nach Vasektomie die Expression mehrerer miRNAs hoch signifikant ansteigt. 56 miRNA waren nach der Vasektomie stark überexprimiert (4- bis 443-fach), während nur 7 miRNAs runterreguliert waren (0,85- bis 2-fach). Die miRNA mit dem höchsten Anstieg war hsa-miR-141-3p, die mit dem stärksten Abfall hsa-miR-181a-5p. Bei einem infertilen Patienten mit SCO-Syndrom wurden 26 miRNAs hochreguliert gefunden (5- bis 50-fach), während nur 3 miRNAs signifikant runterreguliert waren (5- bis 14-fach; hsa-miR-210; hsa-miR-210; hsa-miR-22-3p). Die ersten Ergebnisse erlaubten eine Selektion von 19 miRNAs, die von den Keimzellen (und einige davon wahrscheinlich auch von Sertoli-Zellen) in das Seminalplasma freigesetzt wurden.

Schlussfolgerung In dieser Pilotstudie konnten wir zeigen, dass freie zirkulierende miRNAs im Seminalplasma regelmäßig zu finden und gut zu detektieren sind. Ferner werden genomweit miRNA-Kandidaten mithilfe von Next-Generation-Sequencing-Analyse (HiSeq2000, Illumina) identifiziert, die spezifisch aus dem Nebenhoden/Hoden stammen und an einer größeren Anzahl von Gesunden als auch azoospermischen Patienten überprüft werden müssen. Hieraus ergäbe sich in der Zukunft möglicherweise ein nicht-invasiver Marker zur Vorhersage einer erfolgreichen Spermengewinnung bei Patienten, die sich einer testikulären Spermienextraktion (TESE) unterziehen.

P024

Decorin may Inhibit Androgen Receptor Expression in Human Testicular Peritubular Cells through Interaction with the Epidermal Growth Factor

K. Schubert¹, F. Köhr², J. Schwarzer³, A. Mayerhofer¹
¹Anatomy III, Cell Biology, LMU; ²Andrologikum, Munich;
³Andrologie-Centrum-München, Munich, Germany

Introduction Decorin (DCN) is a small leucine-rich proteoglycan, which is produced by the cells forming the wall of the seminiferous tubules, human testicular peritubular cells (HTPCs). Its expression is increased in testes of patients with impaired spermatogenesis and fibrosis, presumably due to the actions of products of mast cells and immune cells. DCN has structural roles in the extra-

cellular matrix. In addition, it interferes with growth factors and/or their receptors. HTPCs express several growth factor receptors (e.g. epidermal growth factor receptor, EGFR, platelet derived growth factor receptor, PDGFR). In HTPCs, DCN interacts with EGFR and with PDGF and thereby blocks downstream actions. Only few of these actions are known to date but include the regulation of proliferation in HTPCs [Adam et al., Hum Reprod 2011]. That EGF also can modulate androgen receptor (AR) expression and down-stream signalling, was recently shown in a human cancer [Izumi et al., Int J Oncol 2012]. Whether this is also the case in HTPCs is not established. Yet, the importance of peritubular cell-mediated processes and the role of androgens in the regulation of peritubular cells is emerging from recent studies in mice [Welsh et al., FASEB J 2009]. In the present study we started to explore whether EGF may regulate AR of HTPCs and tested whether DCN can affect this crosstalk.

Material and Methods HTPCs from several patients were studied. Immunohistochemistry/immunocytochemistry was performed. The impact of EGF on the expression of AR was examined by Western blotting. Cellular studies included transfection with DCN siRNA.

Results Immunohistochemistry/immunocytochemistry and Western blotting showed EGFR- and AR-expression by peritubular cells in sections of human testes and in HTPCs. Analyses of Western blot experiments revealed that the treatment of HTPCs for 24 h with recombinant human EGF increased levels of AR (seen in 4 individual experiments). When expression of DCN was knocked down by siDCN, the increase was higher (seen in 3 out of 4 experiments). Experiments with blockers of EGF and addition of DCN are presently being performed. We are also testing actions of PDGF.

Conclusion These preliminary results show that EGF increases AR protein expression levels in HTPCs. The abundant peritubular cell-derived factor DCN may inhibit the crosstalk between EGF and AR. Thus, it is possible that in cases of male infertility increased amounts of DCN may impair androgen receptor mediated events.

Grants: Supported by DFG MA1080/21-1

P025

Piwi-like 2 promoter Activity is Influenced by Hormones Regulating Spermatogenesis

M. Giebler, T. Greither, H. M. Behre
Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie,
Universitätsklinikum Halle (Saale), Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany

Background Spermatogenesis is a highly coordinated cell differentiation process which involves a complex interplay of different cell types and regulators. The Piwi gene family (P-element induced wimpy tes-

tis) is the germ-line expressed subclade of the Argonaute proteins and plays an essential role in RNAi and posttranscriptional gene regulation. Piwi genes are expressed in pre-pachytene and pachytene stages of spermatogenesis where they are associated with germ cell development and silencing of retrotransposons to maintain genomic integrity. Little is known about transcriptional regulation of the Piwi gene family. We investigated the regulation of transcriptional activation using Luciferase Reporter Assay System after stimulation with testosterone, dihydrotestosterone (DHT), follicle-stimulating hormone (FSH) and estrogen which are known to regulate spermatogenesis.

Methods Promoter fragments of human Piwi-like 1–4 were obtained by PCR amplification, subcloned into pCR2.1-TOPO vector and promoter sequence validated by sequence analysis. After digestion, fragments were ligated into promoterless pGL4.10 luciferase reporter vector (Promega).

Human SaOS-2, LNCaP and MCF-7 cells were seeded into 0.34 cm² 96-well-plates. After 24 h cells were transiently transfected with a mixture of 2 µg of the respective promoter fragment containing pGL4.10 plasmid and pGL4.74 vector using FuGENE HD (Roche). pGL4.74 vector with renilla luciferase reporter gene was used for normalization. After 48 h transfected cells were treated with testosterone, DHT, FSH and estrogen of different concentrations for further 24h. Luciferase activity was measured on a luminometer. Promoter activity was calculated as the ratio of the luminescence values for each Piwi-like promoter firefly-luciferase reporter construct and the corresponding value for cotransfected pGL4.74 vector for normalization of transfection efficiency. pGL4.10 basic was set as control. Promoter activities were compared using student's T-Test. P-values below 0.05 were considered significant.

Results Two promoter constructs per gene (pGL4.10-short and -long) were designed and tested. However, only Piwi-like 2 fragments showed significant effects upon promoter activation.

Cells stimulated with testosterone showed an increased promoter activity from 6 fold (short fragment, $p = 0.04$) at a hormone concentration of 30 nm to 10 fold (short fragment, $p = 0.01$) at a hormone concentration of 10 nm. Significant activation of luciferase expression was also demonstrated in cells attributed to DHT exposition. DHT exposure created even stronger effects than testosterone and increased promoter activity up to 41 fold.

Stimulation of cells with estrogen resulted in a similar increased luciferase activation. Signals were increased up to 28 fold compared to the control dependent of estrogen concentration and fragment length. Exposure of cells to FSH exhibited moderate luciferase expression activation.

Both Piwi-like 2 promoter fragments showed cell specific response to reproduction-hor-

mones displaying in different luciferase expression.

Conclusion Piwi-like 2 is expressed in diverse organisms during spermatogenesis and absence leads to spermatogenic arrest. In this study, for the first time we demonstrated an *in vitro* promoter activation of Piwi-like 2 by hormones essential for spermatogenesis. These results provide first evidence about the transcriptional regulation of Piwi-like 2 and may add a new aspect to the various molecular mechanisms driving spermatogenesis.

P026

Changes in Sertoli Cell Specific Gene Expression in Patients with Klinefelter Syndrome – Preliminary Results

D. Fietz¹, S. Kliesch², W. Weidner³, M. Bergmann¹
¹Institute for Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Gießen; ²Department of Clinical Andrology, Centre for Reproductive Medicine and Andrology, Münster; ³Department of Urology, Pediatric Urology and Andrology, Gießen, Germany

Background and Hypothesis Klinefelter Syndrome is the most prevalent genetic cause for male infertility, affecting 11% of azoospermic men. It is defined by the presence of a supernumerary X chromosome resulting in a 47,XXY karyotype. Clinical symptoms of Klinefelter Syndrome are gynecomastia, reduced testicular size, firm testes and azoospermia. Most frequently, testicular biopsies reveal a Sertoli cell only syndrome (SCO) with Leydig cell hyperplasia, but also immature Sertoli cells, tubular shadows and foci of preserved spermatogenesis may be found. Interestingly, germ cells develop normally during fetal and even post-natal period but start to degenerate during childhood. We hypothesize, that Sertoli cells from Klinefelter men are not capable of maintaining germ cells during childhood and puberty due to a lack of differentiation and function. In this preliminary study, we therefore wanted to compare the gene expression pattern of Sertoli cells from Klinefelter men to either normal spermatogenesis as well as to SCO of unknown cause.

Methods For this study, we examined seven different patient groups: Klinefelter patients with (1) SCO and Leydig cell hyperplasia ($n = 3$), (2) SCO and immature Sertoli cells ($n = 6$), (3) foci of preserved spermatogenesis ($n = 3$), and (4) tubular shadows and Leydig cell hyperplasia only ($n = 3$). As controls served 46,XY patients with (5) SCO but without Leydig cell hyperplasia ($n = 6$), (6) SCO and Leydig cell hyperplasia ($n = 4$), and (7) normal spermatogenesis ($n = 8$). mRNA was extracted using formalin fixed and paraffin embedded testis material and subsequently used in quantitative RT-PCR. Primers were created to detect the expression of androgen receptor (AR) and androgen-dependent genes (androgen binding protein [ABP], reproductive homeobox on the X chromosome [RHOX]), blood-testis barrier

associated genes (claudin 11, zona occludens protein 2 (ZO-2) as well as Sertoli cell specific genes (transferrin, laminin 5 alpha [LAMA], Wilm's tumour gene 1 [WT-1], vimentin). Relative fold expression was calculated using the ddC_q method.

Preliminary Results In 47,XXY samples with preserved spermatogenesis, relative gene expression was equal to healthy control samples, despite the expression of RHOX, which seems to be higher in Klinefelter patients. In samples without foci of spermatogenesis, we compared 47,XXY Sertoli cells to normal spermatogenesis and detected a higher expression of AR mRNA. Comparing 47,XXY and 46,XY Sertoli cells, we found a higher expression of AR and androgen-dependent genes. In contrast to that, the expression of blood-testis barrier genes and most genes responsible for Sertoli cell maturation and function seemed to be lower in 47,XXY Sertoli cells.

Conclusions These preliminary data suggest differences in Sertoli cell gene expression in Klinefelter patients compared to either normal spermatogenesis as well as to Sertoli cells from karyotypic normal men showing SCO, although Sertoli cells seem to be morphologically equal. These expression distinctions may be due to an influence of the supernumerary X chromosome on Sertoli cell differentiation.

P027

Die Protamin-mRNA-Ratio als klinischer Parameter zur Abschätzung des Fertilisierungspotenzials menschlicher Spermien

N. Rogenhofer¹, T. Dansranjavir², M. Schorsch³, A. Spiess⁴, H. Wang⁵, V. von Schönfeldt¹, H. Cappallo-Obermann⁴, V. Baukloh⁶, H. Yang⁵, A. Paradowska², B. Chen⁵, C. Thaler¹, W. Weidner², H.-C. Schuppe⁷, K. Steger²

¹Ludwig-Maximilians-Universität, München; ²Molekulare Andrologie, Gießen; ³Kinderwunschzentrum, Wiesbaden; ⁴Klinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Deutschland; ⁵Institute of Andrology, Shanghai, China; ⁶Fertilitätszentrum, Hamburg; ⁷Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Gießen, Deutschland

Fragestellung Die Interaktion von Protaminen mit DNA führt zu Kondensation des Kernchromatins und Stopp der Genexpression in elongierenden Spermiden. Es ist bereits bekannt, dass eine von der Norm abweichende Protamin-Ratio, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene, mit einer Reduktion der männlichen Fertilität korreliert. In dieser Multicenter-Studie sollte geklärt werden, ob das Verhältnis von Protamin-1 zu-2 mRNA (Protamin-Ratio) als Biomarker zur Abschätzung des Fertilisierungspotenzials von Spermien geeignet ist.

Methodik Es wurde eine quantitative RT-PCR für Protamin-1 und -2 durchgeführt. Als Kontrollen dienten Ejakulate von 32 normozoospermen Spendern (Gießen). Zusätzlich standen 306 Patienten zur Verfügung, deren Partnerinnen an einem IVF-Pro-

gramm (n = 76; Hamburg und Shanghai) bzw. an einem ICSI-Programm (n = 230; München und Wiesbaden) teilgenommen haben. Die Protamin-mRNA-Ratio wurde mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert.

Ergebnisse Die Protamin-mRNA-Ratio in Spermien normozoospermer Spender ($0,98 \pm 0,3$) unterscheidet sich signifikant von der in ICSI-Patienten (München $0,81 \pm 0,1$; Wiesbaden $0,78 \pm 0,2$; $p < 0,001$), wohingegen Proben von IVF-Patienten eine normale Protamin-mRNA-Ratio zeigten (Hamburg $1,0 \pm 0,07$; Shanghai $1,0 \pm 0,54$). Eine normale Protamin-mRNA-Ratio korrelierte mit einem signifikant erhöhten „Total Motile Sperm Count“ (TMSC) und einem signifikant erhöhten Prozentsatz an progressiven motilen Spermien. Zudem zeigten Spermien mit einer normalen Protamin-mRNA-Ratio ein erhöhtes Fertilisierungspotenzial (Fp), sowohl bei IVF (53,6 % der Patienten zeigten ein Fp von > 80 %; $p = 0,017$) als auch bei ICSI (65,1 % der Patienten zeigten ein Fp von > 70 %; $p = 0,028$).

Schlussfolgerung Die Protamin-mRNA-Ratio unterscheidet klar zwischen fertilen und subfertilen Männern. Spermien mit einer normalen Protamin-Ratio zeigen eine höhere Fertilisierungswahrscheinlichkeit bei IVF und ICSI.

Danksagung: Förderung durch DFG: STE 892/9-2 (KS, WW, AP), SP 721/1-3 (AS, HCO).

Möglicher Interessenkonflikt: Im Labor von KS erfolgt die Auswertung von FertiCert® (KAIVOS Life Sciences GmbH).

P028

Human Testis Cancer Control by Local Factors? Immunopathology of Carcinoma in situ and Seminoma

B. Klein¹, H.-C. Schuppe², W. Weidner², S. Kliesch³, S. Indumathy⁴, K. Loveland⁴, C. Rudolf⁴, M. Hedger⁵, E. Rajpert-De Meyts⁶, M. Bergmann¹

¹Institute of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology; ²Clinic of Urology, Pediatric Urology and Andrology, Justus Liebig University, Gießen; ³Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University of Münster, Germany; ⁴Department of Anatomy and Developmental Biology; ⁵Monash Institute of Medical Research, Monash University, Melbourne, Australia; ⁶University Department of Growth and Reproduction, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark

Introduction Pre-invasive carcinoma in situ (CIS; syn.: testicular intraepithelial neoplasia) and seminomas almost invariably contain extensive inflammatory infiltrates mainly consisting of lymphocytes. Peri- and intratubular invasion of immune cells might contribute to the development of human testis cancer. Moreover, the contributions of Hedgehog (Hh) signalling to both immune cell maturation and testicular differentiation suggest that the activity of this pathway may influence the transition from CIS to invasive malignancy. The present study was undertaken to delineate the immunopathology and

its key regulators in seminoma and CIS of the human testis.

Material and Methods Using antibodies against CD3 (T cells), CD20 (B cells), CD68 (macrophages), CD11c (dendritic cells) and tryptase (mast cells), we characterised human testis biopsies containing seminoma and/or CIS. Anti-Gli antibodies were used to evaluate the cellular localization of two Hh transcription factors. Preliminary measurements of transcripts encoding pro- and anti-inflammatory cytokines were made using qualitative and quantitative RT-PCR after RNA extraction from cryopreserved tissue sections and cDNA synthesis.

Results Forty three testicular tissue specimens have been analysed to date. Based on haematoxylin-eosin staining, samples were grouped as follows: category 1: CIS associated with distinct lymphocytic infiltrates (n = 18), category 2: CIS with none or minor lymphocytic infiltrates (n = 13), and category 3: seminoma showing lymphocytic infiltrates (n = 12). The results confirm that inflammatory infiltrates associated with both CIS and seminoma are mainly containing CD3⁺ T cells and considerable numbers of CD20⁺ B cells. In a subset of seminomas, structures resembling extranodal lymphoid follicles predominantly composed of B cells could be identified. Moreover, an abundance of CD11c⁺ cells compatible with dendritic cells was observed within seminomas, whereas immune cell infiltrates adjacent to seminiferous tubules with CIS revealed largely variable numbers of CD11c⁺ cells. In contrast, CD68⁺ macrophages are present in any sample without prominent clustering, irrespective of lymphocytic infiltrates. Preliminary immunohistochemical analysis showed nuclear expression of Gli2 and Gli3 protein confined to seminoma cells indicating active Hedgehog signalling. With regard to testicular mRNA expression of cytokines, positive results were obtained for both pro- and anti-inflammatory molecules (e.g. TNF- α , IL-6, IL-12).

Conclusion Our preliminary data show that in contrast to other testicular disorders lymphocytic infiltrates associated with CIS and seminoma are characterized by the presence of B cells. This observation fosters the hypothesis that apart from T cell-driven immunopathological reactions a humoral immune response is initiated by the presence of tumour cells in the testicular environment. Subtypes and possible functional significance of infiltrating immune cells, including CD11c⁺ cells, remain to be elucidated. In this context, the analysis of cytokine gene expression profiles and signalling modulators such as Hh proteins represents a promising tool.

Grants: International Research Training Group Gießen – Melbourne “Molecular Pathogenesis of Male Reproductive Disorders” (DFG GRK 1871/1).

■ Männliche Infertilität – Klinik

P029

Sperm Retrieval Techniques in Patients with Non-Obstructive Azoospermia: Fertilization and Pregnancy Rates

E. Kasatonova¹, E. Efremov¹, Y. Melnik¹, G. Mskhalaya², V. Zaletova², E. Zakharova²

¹Research Institute of Urology, Andrology and Human Reproduction; ²Center for Reproductive Medicine MAMA, Moscow, Russian Federation

Study Question Compare sperm retrieval rate (SRR), fertilization (FR) and pregnancy rate (PR) using different retrieval techniques in patients with non-obstructive azoospermia (NOA). The prevalence of non-obstructive azoospermia (NOA) in patients with infertility is up to 10% and 60% in men with azoospermia. Application of different sperm retrieval techniques, such as conventional testicular sperm extraction (TESE) and microdissection testicular sperm extraction (micro-TESE) together with intracytoplasmic sperm injection (ICSI) allow these patients father their genetically own child. Controlled trials are lacking to compare the efficacy of available methods. We compared sperm retrieval rate (SRR) fertilization (FR) and pregnancy rate (PR) using different retrieval techniques in patients with NOA.

Materials and Methods 48 men with NOA were randomly divided into two groups, depending on sperm retrieval technique used: 1 group (18 men) – conventional TESE technique, 2 group (30 men) micro-TESE. Testicular sperm extraction and oocyte retrieval were performed simultaneously. All patients underwent hormonal analysis (serum FSH, Testosterone and LH levels) and genetic analyses including; AZF deletions and karyotype. Data is presented as a median and quartile range. Statistical analysis was per-

formed using Mann-Whitney U-test and Fisher two-tailed test.

Results There was no difference in age (31 vs 30.5, $p = 0.89$), FSH (14.3 vs 10.2, $p = 0.5$), IU/l, LH (5.35 vs 5.48, $p = 0.87$), IU/l and testosterone (17.7 vs 13.4, $p = 0.2$) nmol/l levels between the study groups. SRR was 17% in the 1 group, compared to 40% in the 2 groups. Neither statistical difference between 2 groups was found in FR (75.0% vs 65.3%, $p = 0.77$) nor in PR (33.3% vs 36%, $p = 1$).

Conclusion Micro-TESE is characterized by higher SRR, with no difference in FR or PR, compared to conventional TESE and should be considered as first-line sperm retrieval technique.

P030

Complete Spermatogenesis in 3 out of 8 Postpubertal Patients with Uncorrected Cryptorchid Testes – Do we have to Reconsider the Management of Cryptorchidism?

K. Czeloth¹, C. Mallidis², G. Puehse³, S. Kliesch¹

¹Department of Clinical Andrology, Centre of Reproductive Medicine and Andrology; ²Centre of Reproductive Medicine and Andrology; ³Department of Urology, University Clinic Münster, Germany

Objective Uncorrected undescended testicles are not only considered unable to perform the necessary endocrine and exocrine functions but also constitute an elevated risk for malignant transformation. If impossible to translocate into the scrotum, the recommended surgical treatment is to remove the testes as early as possible. We describe patients with long term uncorrected cryptorchidism with various abnormal phenotypes yet the contents and function of the hidden testes raise questions as to the appropriateness of the current treatment approach.

Methods A retrospective study was undertaken on 8 patients (14–36 years) with undescended testes who underwent testicular sperm extraction (TESE) between 2007 and 2013. Pre- and intraoperative medical histories were assessed and numerous parameters noted (i. e. testicular position, volume, histology; endocrinological profile; semen analysis; sperm retrieval outcome; previous treatments and any other diseases).

Results All patients entered puberty spontaneously, none had sperm in their ejaculates, three required hormonal supplementation. Biopsies revealed TIN in 2 patients: a 16 year old with multimodal malformation syndrome (Scimitar) and a 33 year old who had 2 years of HCG/FSH stimulation prior to surgery. Both underwent orchiectomy.

At microscopic evaluation during surgery the tissue of the 15 year old testis appeared prepubertal. In 3 patients either sperm was retrieved or complete spermatogenesis was seen in the histological sample. Where sperm was present the quality and quantity was poor but still suitable for cryopreservation.

Conclusion Our findings highlight that beyond the collection of material for histological assessment, detailed andrological evaluation is needed so that uncorrected cryptorchid patients who are capable of producing sperm are identified and their samples preserved.

In contrast to prevailing knowledge, we found that abnormally placed testes in our patients were still capable of providing the endocrinological milieu necessary for the start and completion of puberty. TIN was seen in 25% of patients, however this incidence could be due to reasons other than the testicle's location (e. g. genetics). The histological evaluations of 2 cases where sperm were found may at first appear inconsistent with the outcome, however they illustrate the heterogeneity of the tissue and that samples considered to be the best were selected for microsurgical TESE whilst the remaining

Table 4: K. Czeloth et al. (P030).

Testes (R/L)				Hormones				
Age	Position	Volume (m/l)	Histology	TIN	T (nmol/l)	FSH (U/l)	Preoperative Treatment	Sperm Retrieval
14	A/-	6/-	GCA/-	no/-	5	13	-	+
16	-/l	-/3	-/GCA	-/yes	9.5	102	TU oral (19 months)	+
30	l/l	6/5	Complete spermatogenesis/GCA	no/no	12.5	19.4	-	-
15	-/l	-/4	-/SCO	-/no	9	11.9	-	-
29	A/-	1/-	SCO/-	no/-	10.2	38.6	-	-
32	l/l	3/3	SCO/SCO	no/no	5.7	15	HCG (2 yrs)	-
33	A/l	5/6	GCA/SCO	no/yes	29.9	3.9	HCG/FSH (2 yrs)	-
36	A/A	10/10	GCA/SCO	no/no	17.5	24.2	-	-

SCO: Sertoli Cell Only; GCA: Germ Cell Arrest

tissue was selected for histological assessment.

Based on our results, we have reappraised our management of cryptorchidism in patients who are well beyond puberty. We now recommend that malpositioned testes are not automatically removed as they are capable of functioning endocrinologically, that biopsies are always taken, not only for histology but also determining the possible presence of sperm. Due to the lack of data, the best time for sperm retrieval is as yet undetermined, but early indications favor post pubertal adolescence. Regardless, this more assiduous approach we suggest provides some patients with what was previously considered impossible, the opportunity of fatherhood (Tab. 4).

P031

Congenital Unilateral absence of the vas Deferens in Patients with Germ Cell Cancer: First report of 2 Cases

G. Spiliopoulos, F. Gottardo, S. Kliesch
Department of Clinical Andrology, Center of Reproductive Medicine and Andrology, University Clinic Münster, Germany

Background Congenital unilateral absence of the vas deferens occurs in 1% of the male population. It is reported that CUAVD is associated up to 96% with renal anomalies like renal agenesis or renal ectopy and up to 38% with mutations of the CFTR gene.

Case Presentation We report the cases of two patients, 18 and 35 years old respectively, who had been diagnosed intraoperatively with a CUAVD. The first patient (P1, 18 yrs) presented to our department for fertility preservation prior to an inguinal orchiectomy due to germ cell cancer of the right testis. History revealed that the patient was incidentally diagnosed having a left pelvic kidney two years before. He was offered cryopreservation of his semen but semen analysis revealed an azoospermia. Therefore, the patient underwent in the same surgical session an inguinal orchiectomy of the right side and a left scrotal microsurgical testicular biopsy (m-TESE). Intraoperatively no vas deferens and an residual atrophic epididymal caput were found on the left side, whereas on the right side of the tumour bearing testis a normal vas deferens was seen. The second patient (P2, 35 yrs) presented to our department because of infertility due to azoospermia with an atrophic left and a normally developed right testicle. He underwent a bilateral microsurgical testicular sperm extraction with diagnostic biopsy (m-TESE). Intraoperatively no vas deferens on the right testis was detectable. Histologically a testicular intraepithelial neoplasia (TIN) of the left testicle was finally detected. The left TIN bearing testicle was removed in a second operation. CFTR analysis was initiated and will be reported.

Conclusion CUAVD is frequently associated with renal anomalies and mutations of

the CFTR gene. Therefore all patients with CUAVD should be tested for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutation and undergo a renal sonography. So far no reports have been presented with CUAVD coinciding with testicular malignancies.

P032

Ergebnisse und Analyse von möglichen Erfolgsprädiktoren der mikrochirurgischen Refertilisierungsoperation nach vorausgegangener Vasektomie

G. Spiliopoulos, S. Kliesch
Abteilung für Klinische Andrologie, Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster, Deutschland

Fragestellung Welche Prädiktoren sind entscheidend zur Vorhersage eines Behandlungserfolgs nach mikrochirurgischer Refertilisierung?

Methodik Im Zeitraum von 2000 bis 2011 wurde bei 191 Patienten (Alter: $43 \pm 6,3$ Jahre) eine mikrochirurgische Refertilisierung aufgrund einer obstruktiven Azoospermie nach Vasektomie durchgeführt. Bei der Follow-up-Untersuchung erfolgte die Erfassung der postoperativen Ergebnisse. In Abhängigkeit von den präoperativen (Hodenvolumen, Hormonstatus, Ejakulatbefund), intraoperativen und postoperativen (Ejakulatbefund, Schwangerschaft) Befunden wurde versucht, mögliche Prädiktoren für das Operationsergebnis zu identifizieren. Die histologische Evaluierung von gleichzeitig durchgeführten Hodenbiopsien bei 62 Patienten erfolgte nach dem modifizierten Holstein Score nach Bergmann und Kliesch.

Ergebnisse Die Durchgängigkeitsrate nach Vasovasostomie lag bei 85,1 %, die natürliche Schwangerschaftsrate bei 34,4 %. Die Gesamt-Schwangerschaftsrate unter Einbeziehung der assistierten Reproduktion ($10 \times \text{ICSI}$, $2 \times \text{IVF}$, $1 \times \text{IUI}$) lag bei 48,9 %. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen Offenheitsrate und Silber-Klassifikation ($p < 0,01$). Die postoperativen Glukosidasewerte korrelierten signifikant mit der Offenheitsrate postoperativ. Niedrige präoperative FSH-Werte sind mit höheren Offenheitsraten postoperativ assoziiert ($p = 0,03$). Zwischen Schwangerschaftsrate und Score der histologischen Analyse der Hodenbiopsien besteht eine schwache, nicht-signifikante Korrelation ($p > 0,05$). Das Zeitintervall zwischen vorausgegangener Vasektomie und Vasovasostomie ($8,5 \pm 4,8$ Jahre) hat keinen Einfluss auf den operativen Erfolg.

Schlussfolgerung Wir konnten zeigen, dass niedrige präoperative FSH-Werte, eine gute intraoperative Silber-Klassifikation, sowie hohe postoperative Glukosidasewerte mit dem Operationserfolg korrelieren und somit einen prädiktiven Wert besitzen. Das Ergebnis der histologischen Evaluation kann ggfs. helfen, die Chancen auf eine natürliche Schwangerschaft einzuschätzen. Ein langes

Zeitintervall zwischen Vasektomie und Refertilisierungsoperation beeinträchtigt die Erfolgsaussichten nicht.

P033

Correlation of Classical Andrological Parameters with the Fertilization/Pregnancy Outcome in Assisted Reproduction

A.-N. Spiess¹, D. Zeilmann¹, V. Baukloh², W. Schulze¹
¹Abteilung für Andrologie, Uniklinik Hamburg-Eppendorf; ²Fertility Center, Hamburg, Germany

Aim The Andrological Department of the UKE and Fertility Center Hamburg have acquired extensive data in respect to testicular histology as well as the outcome of assisted reproduction (ART). We aggregated both datasets in order to identify andrological parameters that correlate significantly with the oocyte fertilization/pregnancy outcome. Complex multivariate statistical techniques such as Principle Component Analysis and Decision Trees were used to identify hidden structures in the data and create a tool for the prediction of the ART outcome.

Methods Andrological parameters were collected from 2273 patients presenting at the Andrological Department from April 1999 to May 2009. Among these were spermogram parameters, genetic background (Y-chromosomal microdeletions, Klinefelter Syndrome, Cystic Fibrosis), testicular pathology ("modified Johnsen Score" of testicular tissue obtained from Testicular Sperm Extraction, TESE) and hormonal status. A plethora of parameters derived from ART treatment were available for 833 patients of the Fertility Center Hamburg, i.e. number of oocytes, number of oocytes with pronuclei, fertilization rate, pregnancy rate, number of ART trials and "embryo score".

Both data sets were aggregated based on name/birth data, resulting in an intersecting patient cohort of 415 men. Simple descriptive statistics as well as more complex multivariate techniques (PCA, Decision Trees, bootstrapped linear models) were used to identify parameters that exhibit a strong influence on the ART outcome. The results were validated by splitting the data into „training“ and „test“ sets in order to realistically estimate the performance in predicting the ART outcome.

Results Many tendencies and correlations that were identified in the data are well-established in the andrological literature and will not be repeated here. However, a few interesting findings important to i) the TESE procedure and ii) the oocyte fertilization/pregnancy potential in an ICSI treatment were observed with strong statistical significance:

i) FSH as well as Inhibin B had comparable levels to the control group (vasectomized men with full spermatogenesis) when the seminiferous epithelium presented with a homogeneous meiotic arrest at primary spermatocytes. Hence, in this special case which accounts for ~4% of all TESE procedures,

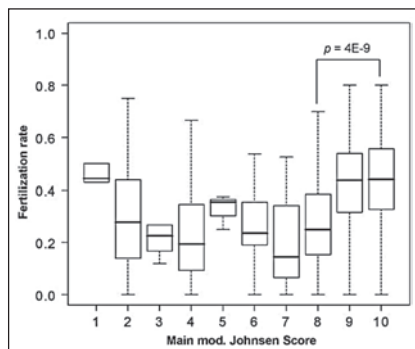


Figure 1: A.-N. Spiess et al. (P033).

these two hormones fail to correlate with impaired spermatogenesis.

ii) A highly significant ($p = 4E-9$) decrease of oocyte fertilization rates (25.3%) in ICSI treatment compared to control (43.7%) was observed when testicular spermatozoa were obtained from men with severe hypospermatogenesis or from spermatogenic foci when the majority of testicular tubules were devoid of sperm/germ cells (Fig. 1).

iii) Fertilization rates decreased even more when the histology between left/right testis displayed a very heterogeneous pattern. When FSH level were > 6 IU/ml, $\sim 40\%$ of all patients exhibited this observation, while only 16% were the case when $FSH < 6$ IU/ml.

iv) If spermatozoa can be identified within the first 5 minutes of the TESE microscopical examination, the pregnancy rate will increase by $\sim 42\%$.

Conclusion These findings clearly demonstrate a strong correlation between fertilization/pregnancy outcome and the spermatogenic state of the testis from which the spermatozoa were derived. It seems that testis with spermatogenic impairment produce spermatozoa with a significantly decreased “quality” in terms of ART outcome, giving an overall “bad testis: bad sperm” impression. The molecular basis for this observation remains to be resolved (i.e. decreased chromatin compaction, altered transcript levels). However, it may be feasible to convey these tendencies in the patient’s consultation.

P034

Clinical Characterization of Patients with Gender Dysphoria (GD) undergoing Sex Reassignment Surgery (SRS) Focusing on Testicular Functions

F. Schneider¹, N. Kossack¹, J. Wistuba¹, M. Zitzmann², P. Hüppe³, T. Potte⁴, H. van Ahlen⁵, S. Schlatt¹, S. Kliesch¹

¹Centre of Reproductive Medicine and Andrology; ²Department of Clinical Andrology, University of Münster; ³University Clinic of Essen; ⁴Urology, Asklepios Westklinikum Hamburg; ⁵Klinikum Osnabrück, Germany

Background The prevalence of male-to-female (MtF) transsexuals in Europe is between 1:11,900 and 1:45,000. According to

standardized guidelines patients with gender dysphoria (GD) receive cross-sex hormone therapy for up to 2 years, which includes the inhibition of androgen secretion and supplementation of estrogens, to feminize their bodies before undergoing sex reassignment surgery (SRS). Additionally they are obligated to get psychological support, to live the real life exposure (RLE) and to legally validate their sex change. While substantial research has been performed regarding GD, the effect of cross-sex hormone treatment on testes, both of its functions – spermatogenesis and steroidogenesis – has not been evaluated so far. In order to assess the effectiveness of the cross-sex hormone treatment, this study aims to evaluate the observed body and testicular changes and the hormonal status of patients suffering from GD on the day of surgery.

Material and Methods Following written informed consent and ethical approval (Ärztchamber Westfalen-Lippe; no. 2012-555-f-S) 77 testicles from 55 patients were obtained from our cooperating clinics in Osnabrück, Essen and Hamburg on the day of SRS. Questionnaires were handed out to 25 patients prior to SRS, asking them about the type and length of their individual cross-sex hormone treatment, about other medication and about their observed body changes. Blood was drawn on the day of operation from 27 patients and hormone levels (LH, FSH, testosterone, estradiol, prolactin, free Testosterone, SHBG) were measured with standardized in-house assays. The karyotype of 26 patients was determined in the Institute of Human Genetics at the University of Münster. Intratesticular testosterone (ITT) of 75 tissues was measured using frozen tissue with radioimmunoassay. PAS-stainings of all the testicular tissues were performed to evaluate the level of spermatogenesis (LoS), morphology and tubular diameter. Concerning the Leydig-cell “functionality” 3- β -HSD-stainings ($n = 10$) and LH-receptor-stainings ($n = 43$) were performed to evaluate the quantity of LH-receptors.

Results The questionnaire was filled out by 25 patients. 21 patients took androgen-receptor inhibitors, 3 patients estrogens and 18 patients both. The top 3 body changes were breast growth, smooth skin, female fat distribution/emotional unstable. The age groups 40–49 and 50+ showed the highest number of patients. LH- and FSH-levels were generally elevated; testosterone and free testosterone decreased simultaneously with the LoS, but were higher than expected. SHBG was within both reference levels and estradiol was below the male and female reference levels. Prolactin was highly elevated in all subjects. All patients showed 46, XY karyotype. Histological analyses of the testicular tissues revealed 23% complete spermatogenesis, 28% meiotic arrest, 30% spermatogonial arrest (SPG-arrest), 15% Sertoli cell only syndrome (SCO) and 4% only tubular ghosts left. The weight of the testes increased simultaneously with the LoS. The percentages of tubules and interstitium increased, the percentage of lumen decreased

with the decrease of LoS. The tubular diameter as well as the number of LH-receptor positive cells decreased simultaneously with the LoS. ITT-levels showed a highly diverse picture not correlated with LoS, serum testosterone, LH-receptor positive cells nor differences in the 3- β -HSD-stainings.

Conclusion The testicular tissues of the 55 GD patients showed a highly heterogeneous picture on the date of surgery at the histological and endocrine level, although the patients should have seen the same treatment. As determined in the PAS-stainings, 51% of the patients were not suppressed completely on the testicular level. Additionally serum testosterone and estradiol levels indicated a rather male than female blood hormone status. We strongly recommend an individual cross-sex hormone treatment, a close follow-up of the treatment and a hormonal check-up with GD patients before SRS.

P035

Der Stellenwert des β -HCG zur Differenzierung zwischen Keimzelltumoren und Nicht-Keimzelltumoren des Hodens

C. G. Ruf, P. Becker, M. Sabellek, W. Wagner, C. Matthies
Urologie, Bundeswehrkrankenhaus Hamburg, Deutschland

Fragestellung Ziel der Arbeit war es, die Bedeutung des β -HCG in der peripheren Vene und der Hodenvene zur Differenzierung von Keimzelltumoren und Nicht-Keimzelltumoren des Hodens zu evaluieren.

Methodik Von 558 Seminompatenten und 112 Nicht-Keimzelltumoren des Hodens (behandelt 2001 bis 2011) wurden die klinischen Daten und β -HCG-Werte aus der peripheren Vene (PV) und Hodenvene (HV) erfasst. Die Patienten wurden nach ihrem Metastasierungsstatus in 4 Gruppen eingeteilt (nicht [cSI], lymphogen [cSIIa-c], hämatogen [cSIII] und unbekannt metastasiert). Den Gruppen wurden 365, 144, 25 und 24 Patienten zugeordnet. Die Werte der Tumormarker lagen vor bei 250, 95, 10 und 6 Patienten (PV) sowie von 136, 45, 5 und 0 Patienten (HV).

Bei den Nicht-Keimzelltumoren waren die Werte verfügbar bei 52 (PV) und 23 (HV) Patienten.

Ergebnisse Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung war das β -HCG erhöht bei 50, 62, 70 und 67 % der Patienten (PV). Die durchschnittliche Höhe betrug 13, 43, 1803 und 2 IU/l. Die Höhe des β -HCG war signifikant mit der Tumorgroße assoziiert ($p = 0,0001$; OR: 1,053).

Das β -HCG in der HV war zum Zeitpunkt der Operation erhöht bei 90; 93 und 80 % der Patienten der Gruppen 1–3 mit einer ϕ Höhe von 135, 395 und 3323 IU/l. Die Markerkhöhe war nicht mit der Tumorgroße assoziiert ($p = 0,25$). Das β -HCG war bei allen Nicht-Keimzelltumoren in der PV und in der HV im Normbereich.

Schlussfolgerung Das β -HCG in der Hodenvene detektiert maligne Tumoren mit einer Sensitivität von bis zu 93 % und einer Spezifität von 100 %. Besonders bei normwertigen Tumormarkern in der peripheren Vene, kleinen Tumoren und frühen Stadien ist die Bestimmung in der Hodenvene sinnvoll. Die maximale und $\emptyset$ Höhe der Tumormarker korreliert in der PV und in der HV mit dem klinischen Stadium. Die β -HCG-Bestimmung in der Hodenvene ist ein zuverlässiges, schnelles und kostengünstiges Verfahren zur Differenzierung von Keimzelltumoren und Nicht-Keimzelltumoren des Hodens.

P036

Evaluation der persönlichen Entscheidungskriterien für oder gegen die Implantation einer Hodenprothese

S. Schmidt, W. Wagner, C. G. Ruf
Urologie, Bundeswehrkrankenhaus Hamburg, Deutschland

Fragestellung Bisher ist unbekannt, welche Entscheidungskriterien für oder gegen eine Implantation subjektiv wichtig sind und sollten mit der Arbeit evaluiert werden.

Methodik Ausgehend von den qualitativen Ergebnissen einer Befragung zu den persönlichen Beweggründen für oder gegen eine Prothesenimplantation [Chapple et al. 2004] wurde die Wichtigkeiten der dort angegebenen Entscheidungsgründe an einem größeren unabhängigen Kollektiv ($n = 348$) einer Hodentumorsprechstunde retrospektiv quantifiziert. Der Fragebogen umfasste 6 Fragen für Prothesenträger (PT) und 10 Fragen für Nicht-Prothesenträger (NPT). Antwortskala mit 7 möglichen Punkten: 1–3: sehr unwichtig bis eher unwichtig, 4 unentschieden, 5–7 eher wichtig bis sehr wichtig.

Ergebnisse Von 348 Fragebögen waren 320 auswertbar (142 PT und 178 NPT). Hinsichtlich des Durchschnittsalters 34,8 Jahre (33,8 Jahre PT/35,6 Jahre NPT) und der $\emptyset$ Nachsorgedauer 52,2 Monate (PT: 47,8 und NPT: 55,7 Monate) unterschieden sich die beiden Gruppen nicht signifikant. Angaben zur Partnerschaft machten 131 von 142 PT und 156 von 178 NPT.

In einer Partnerschaft waren 66 % (87 v. 131) PT und 78 % (122 v. 156) NPT. Singles waren häufiger PT.

Die meisten Durchschnittswerte für den Punktescore der einzelnen Fragen schwankten zwischen 3,0 und 5,0. Ausnahmsweise wurde in beiden Gruppen der perioperative Zeitdruck (PT: 2,4/NPT: 2,73) durchschnittlich deutlich als „unwichtig“ beurteilt. Bei den PT war bzgl. des $\emptyset$ Scores einerseits die Frage nach dem Erhalt des Bodyimage (5, 13), und andererseits der Wunsch, „normal“ auszusehen (5, 53) auffallend „wichtig“. Hierbei war der Einfluss des Status der Partnerschaft gering. Mit Partner (P) lag der Score bei 4,93 und 5,55, bei Singles (S) 5,61 und 5,68. Entsprechend bewegt sich hier der An-

teil der Antworten „war wichtig“ (5–7) bei 70% (P: 67 %, S: 83 %) respektive 83 % (P: 81 %, S: 94 %). Der Wunsch, den Hodenverlust so verheimlichen zu können, war bei den Patienten durchschnittlich mit 3,10 eher niedrig, bei Patienten mit Partner erwartungsgemäß noch niedriger 2,86 vs. Singles mit 3,73. Insgesamt war dieser Aspekt für 65 % aller PT unwichtig.

Bei den NPT war das Wissen, dass der Hodenverlust keinen Einfluss auf die „Männlichkeit“ hat, nur für 47 % wichtig (5–7), ebenso war der Grund, dass es wahrscheinlich ohne Prothese bequemer ist, nur für 49 % wichtig (5–7): Sicherheitsaspekte bzgl. Prothesen waren 54 % wichtig (5–7). Als eher unwichtig (1–3) fanden 52 % der NPT (P: 51 %, S: 39 %) die äußere Erscheinung ohne Prothese (nur 26 % wichtig) und 53 % der NPT (P: 54 %; S: 50 %), dass der Partner sowieso keine Notiz davon nehmen wird (nur 17 % wichtig). Entsprechend der Score NPT-Singles: 2,62. Nur 23% (5–7) der NPT fanden die Idee einer Prothese verrückt.

Schlussfolgerung Zeitdruck spielt keine entscheidende Rolle. Bei PT ist für ihre Entscheidung der Erhalt des Körperbildes ausschlaggebend, weitgehend unabhängig von der Partnerschaftssituation. Besonders wichtige Gründe, auf eine Prothese zu verzichten, konnten nicht identifiziert werden.

P037

Präsenz der Hodentumormarker in der peripheren Vene und der Hodenvene

C. G. Ruf, P. Becker, M. Sabellek, C. Matthies, W. Wagner
Urologie, Bundeswehrkrankenhaus Hamburg, Deutschland

Fragestellung Hodentumormarker spielen in der Diagnosestellung, der Therapieplanung, dem Therapiemonitoring und der Nachsorge eine wichtige Rolle. Ziel der Arbeit war es, Tumormarker in einem großen aktuellen Hodentumorkollektiv hinsichtlich ihrer Präsenz zu untersuchen.

Methodik Bei 1477 Patienten mit einem Hodentumor, welche zwischen 2000 und 2012 in einem Hodentumorzentrum behandelt wurden, sind die Tumormarker (AFP, β -HCG, LDH) prä-/intraoperativ in einer peripheren Vene und der Hodenvene gemessen und auf ihre Wertigkeit hin untersucht worden.

Ergebnisse Die Werte für AFP lagen in der peripheren Vene/Hodenvene bei 693/348, für β -HCG bei 701/352 und für LDH bei 605/226 Patienten vor. Alle Tumormarker waren für 308 Seminome und 311 Nicht-Seminome (NSGCT) verfügbar.

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung war bei 66 % der Seminome und 76 % der NSGCT mindestens ein Tumormarker in der peripheren Vene erhöht.

AFP zeigte sich in den klinischen Stadien I/II/III bei 59/57/74% der NSGCT erhöht.

β -HCG in der peripheren Vene fand sich bei 54/62/89 % der Seminome und 64/74/86 % der NSGCT erhöht.

LDH in der peripheren Vene zeigte sich bei 24/45/29 % der Seminome und 9/28/70 % der NSGCT erhöht.

In der Hodenvene zeigte sich AFP bei 66/57/59 % der NSGCT erhöht. β -HCG fand sich bei 91/98/100 % der Seminome und bei 91/92/91 % der NSGCT erhöht. Für LDH fanden sich erhöhte Werte in der Hodenvene bei 88/97/100 % der Seminome und 83/80/90 % der NSGCT.

Schlussfolgerung Die tatsächliche Anzahl der HCG-positiven Seminome liegt deutlich über den Literaturangaben (real 54–89 % vs. Literatur 20–30 %). In der Hodenvene waren signifikant mehr Patienten markerpositiv als in der peripheren Vene. Die höchste Präsenz aller Hodentumormarker zeigt das β -HCG mit 91–100 % in der Hodenvene.

P038

Das männliche Genitale in der forensisch-andrologischen Begutachtung

K. Albrecht^{1,2}, S. Ückert², L. Hagemeier¹, M. A. Kuczyk², M. Klintschar¹

¹Institut für Rechtsmedizin; ²Klinik für Urologie und Urologische Onkologie, Medizinische Hochschule Hannover, Deutschland

Fragestellung Das Aufgabenspektrum der Klinischen Rechtsmedizin umfasst neben der regelmäßigen Untersuchung von zumeist geschädigten Frauen im Rahmen der forensischen Aufarbeitung von Sexualdelikten, auch die Inspektion des männlichen Genitale beim Tatverdächtigen zur Verifizierung von Verletzungen und zur Asservierung möglicher Spuren. Im Rahmen der kriminalpolizeilichen juristischen Ermittlungsarbeit können im Nachgang seitens des beschuldigten Mannes zudem vermeintlich vorliegende genitale Erkrankungen angegeben werden, welche aus der Sicht des Beklagten beispielsweise eine peno-vaginale Penetrationsfähigkeit oder eine andere Form des Sexualkontaktes ausschließen.

Methodik In der vorliegenden Präsentation werden forensisch-andrologische Fälle vorgestellt, welche durch Strafgerichte der Kooperation des Instituts für Rechtsmedizin mit der Urologischen Klinik der Medizinischen Hochschule Hannover zur Begutachtung vorgelegt wurden.

Ergebnisse Die gutachterliche Aufarbeitung und Bewertung von insgesamt 13 Fällen erforderte bei 7 Männern eine zusätzliche klinische Untersuchung. Seitens der Beschuldigten oder durch den Beklagtenvertreter, wurden folgende potenziell vorliegende Gründe für eine vermeintliche peno-vaginale Penetrationsunfähigkeit angegeben: Erektile Dysfunktion unterschiedlicher Genese (z. B. Diabetes mellitus, Zustand nach radikaler Zystektomie, Schussverletzung), Einlage eines transurethralen Dauerkatheters bei chro-

nischen Blasenentleerungsstörungen, Mikropenis, Induratio penis plastica, unvollständige Erektion (mittlere Rigidität). Weitere gutachterliche Fragestellungen beschäftigten sich mit der Identifikation eines möglichen Tatverdächtigen aufgrund individueller peniler Befunde oder eines seitens des Beschuldigten angegebenen Ausschlusses zur Berührung seines schmerzempfindlichen Genitale aufgrund einer vermeintlich vorliegenden Paraphimose.

Schlussfolgerung Neben den routinemäßig durchgeführten Untersuchungen im Rahmen der rechtsmedizinischen Begutachtung von Sexualdelikten ist zuweilen eine zusätzliche klinische Untersuchung des Beschuldigten zur Verifizierung oder zum Ausschluss einer vermeintlich vorliegenden genitalen Erkrankung/Störung, welche dem Tatvorwurf entgegenstehen könnte, erforderlich. Die mögliche Entwicklung einer neuen Spezialdisziplin „Forensische Andrologie“ wird diskutiert, gutachterliche Grenzen werden aufgezeigt.

■ Natürlicher und stimulierter Zyklus, ART

P039

Niedrige Dosen von Clomifencitrat reduzieren die Rate vorzeitiger Ovulationen und erhöhen die Transferrate pro Zyklus in Natural-Cycle-IVF-Therapien

M. von Wolff¹, M. Nitzschke², P. Stute³, N. Bitterlich⁴, S. Rohner³

¹Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Universitäts-Frauenklinik, Bern, Schweiz;

²Centro Medico Puerta de Hierro, Zapopan, Mexico;

³Universitäts-Frauenklinik, Bern, Schweiz; ⁴Medizin und Service GmbH, Chemnitz, Deutschland

Fragestellung Natural-Cycle-IVF (NC-IVF) wird zunehmend als Alternative zur klassischen, Gonadotropin-stimulierten IVF-Therapie (cIVF) diskutiert. Der Grund liegt zum einen in der geringeren Belastung der Patientinnen, den fraglich geringeren Kosten und in der hohen Implantationsrate von Eizellen aus natürlich gereiften Follikeln. Allerdings ist die Effizienz der NC-IVF durch die hohe Rate prämaturer Ovulationen und die damit geringe Transferrate pro initiiertem Zyklus zu gering, um mit der cIVF konkurrieren zu können. Aufgrund dessen haben wir ein neues Behandlungsprotokoll entwickelt und untersucht, ob die prämatüre Ovulationsrate und die Transferrate bei einer möglichst geringen Anzahl von Konsultationen durch sehr geringe und damit nebenwirkungsarme Clomifencitrat-Gaben verringert werden kann und ob dieser Effekt altersabhängig ist.

Material und Methoden 112 Frauen (35 ± 14,5, 21–42 Jahre) führten 2012 bis Juli 2013 sowohl eine NC-IVF und, wenn sie im ersten Zyklus nicht schwanger wurden, an-

schließend noch eine NC-IVF mit Clomifencitrat (ccNC-IVF) durch. Clomifencitrat wurde in einer Dosierung von 25 mg/Tag, beginnend ab dem 6. oder 7. Zyklustag über durchschnittlich 5,5 Tage bis zur Ovulationsinduktion verabreicht. Untersucht wurden u. a. die Rate prämaturer Ovulationen und die Transferrate pro Zyklus in beiden Therapiegruppen.

Ergebnisse Clomifencitrat reduzierte bei nur 1,2 Konsultationen vor der Aspiration die Rate vorzeitiger Ovulationen von 27,8 % ohne auf 6,8 % mit Clomifencitrat ($p < 0,001$) und erhöhte damit die Transferrate von 39,8 % auf 54,4 % ($p = 0,039$). Die Schwangerschaftsrate pro Transfer betrug 27,9 % mit und 25,0 % ohne Clomifencitrat sowie pro initiiertem Zyklus 11,1 % bzw. 13,6 %. Der Effekt war nicht altersabhängig. Clomifencitrat verursachte in der genannten Dosierung leichte und nicht störende Hitzewallungen und Kopfschmerzen bei jeweils 5 % der Frauen. Die Dosierung erzeugte keine Zystenbildung, sodass monatliche Behandlungszyklen möglich waren.

Schlussfolgerung Die begleitende Behandlung mit niedrig dosierten Dosen von Clomifencitrat erhöht die Effektivität der NC-IVF und ermöglicht bei einer nur minimalen Anzahl von Konsultationen pro Zyklus signifikant höhere Transferraten.

Registrierungsnummer: DRKS00005137

P040

Charakterisierung der Immunzellpopulation in Follikelflüssigkeitsaspiraten: Ein Vergleich zwischen Natural-Cycle-IVF und konventioneller IVF

Z. Kollmann¹, S. Schneider¹, N. A. Bersinger¹, M. D. Mueller¹, C. A. Dahinden², M. von Wolf¹
¹Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Universitätsklinik für Frauenheilkunde; ²Universitätsinstitut für Immunologie, Bern, Schweiz

Fragestellung Die Follikelflüssigkeit (FF) bildet die unmittelbare Umgebung, in welcher die Eizelle heranwächst und reift. Über ihre Zusammensetzung und ihre Rolle in der Follikulogenese ist trotz der weiten Verbreitung der In-vitro-Fertilisation (IVF) jedoch bis heute wenig bekannt. Unklar ist auch, welchen Einfluss die Gonadotropinstimulation auf die Follikulogenese hat. Da die Implantationsrate nach einer Gonadotropinstimulation geringer als nach einer natürlichen Follikulogenese ist, kann spekuliert werden, dass die ovarielle Stimulation einen Effekt auf die Zusammensetzung der FF und somit auch auf deren zelluläre Bestandteile hat. Entsprechend wurde in dieser Studie die Verteilung der Immunzellpopulation innerhalb der FF mit und ohne Gonadotropinstimulation verglichen.

Methodik Die für die Studie verwendete FF wurde im Rahmen von IVF-Zyklen gewonnen, die in den Jahren 2012 und 2013 an un-

serer Klinik durchgeführt wurden. Hierfür wurden 18 Patientinnen ausgewählt, welche sich einer Natural-Cycle-IVF (NC-IVF) ohne Gonadotropinstimulation unterzogen sowie 23 Patientinnen, die eine konventionelle IVF (cIVF) nach dem Antagonistenprotokoll erhalten haben. Das Durchschnittsalter betrug $35,8 \pm 5,2$ (SD) Jahre in der NC-IVF-Gruppe und $35,2 \pm 4,5$ (SD) Jahre in der cIVF-Gruppe.

Sobald der dominante Follikel einen Durchmesser von 19 mm erreicht hatte, wurden 5000–10.000 IU hCG (Pregnyl, MSD) verabreicht. Anschließend erfolgte die Punktion transvaginal unter Ultraschallkontrolle, wobei das Volumen des Follikelflüssigkeitsaspirats festgehalten wurde. Die Proben wurden zentrifugiert und mit fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen verschiedene Leukozytenepitope versetzt, um eine durchflusszytometrische Charakterisierung mittels Fluorescence-activated cell sorter (FACS) durchzuführen. Die Hämoglobinmessung in allen Proben lieferte nicht nachweisbare Werte, sodass eine bedeutende punktionsbedingte Kontamination durch peripheres Blut ausgeschlossen werden konnte.

Zusätzlich wurden 35 Follikelflüssigkeitsproben (NC-IVF: $n = 12$, cIVF: $n = 23$) mithilfe einer Zytospinzentrifuge auf Objektträger aufgetragen, die Zellen fixiert und immunhistochemisch gefärbt. Hierfür wurden als primäre Antikörper monoklonale Mouse-Anti-Human-CD45-Antikörper (Panleukozyten-Marker; Leucocyte Common Antigen, Clones 2B11 + PD7/26, Dako, Glostrup, Dänemark) sowie das SuperPicTure™ Polymer Detection Kit (invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA) als Sekundärantikörper und Detektionssystem verwendet. Aus jeweils 12 zufällig ausgewählten Arealen pro Slide wurden die gefärbten Zellen lichtmikroskopisch ausgezählt und als prozentualer Anteil an der Gesamtzahl an Zellen ausgedrückt.

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Als statistischer Test diente der Mann-Whitney-U-Test. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt.

Ergebnis In der FF aus cIVF-Zyklen ließ sich eine signifikant höhere totale Anzahl an Leukozyten pro dominantem Follikel nachweisen als in NC-IVF-Aspiraten ($214 \pm 36 \times 10^3$ vs. $102 \pm 29 \times 10^3$), $p = 0,0099$. Hingegen war die Gesamtzahl an Lymphozyten signifikant höher in NC-IVF-Zyklen (3187 ± 1341) im Vergleich zu den cIVF-Zyklen (1077 ± 641), $p = 0,0137$. Auch die Anzahl an CD4⁺-Helferzellen war signifikant höher in NC-IVF-Zyklen ($2082 \pm 939,3$) als in cIVF-Zyklen ($603 \pm 336,4$), $p = 0,0162$. Gleiches ließ sich bei der Anzahl an CD8⁺-zytotoxischen Zellen beobachten ($741 \pm 362,1$ in NC-IVF, $311,1 \pm 224,2$ in cIVF), $p = 0,0234$.

Des Weiteren konnte durch lichtmikroskopische Untersuchungen der zellulären Bestandteile der FF-Aspirate festgestellt werden, dass der prozentuale Anteil an CD45-positiven Zellen in Bezug auf die totale Zellzahl in

der FF in cIVF- ($28,79 \pm 2,78$) signifikant höher war als in NC-IVF-Aspiraten ($14,39 \pm 3,79$), $p = 0,0078$.

Schlussfolgerung Die Induktion einer poly-follikulären Reifung mittels Gonadotropinen bewirkt eine Veränderung in der Zusammensetzung der intrafollikulären Immunzellpopulation. Dies zeichnet sich durch eine Vermehrung der CD45-positiven Zellen und eine Verminderung der Lymphozyten in gonadotropin-stimulierten Follikelflüssigkeitsaspiraten aus. Die Bedeutung dieser Veränderung und ihr Einfluss auf die Eizellreifung muss in weiteren Studien untersucht werden.

P041

4D-Sonography in Reproductive Medicine – Role of Uterine Anatomy and Endometrial Flow Indices in an ART Program

E. Schmitz, S. Preyer, L. Kiesel, W. Klockenbusch, A. Schüring
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Münster, Deutschland

Introduction High end ultrasound applying 3D- and 4D techniques has become a well established standard in prenatal medicine. However, the role of 4D ultrasound in reproductive medicine is still under evaluation.

Methods In this pilot study, 31 patients were included undergoing 4D-sonography at two time points of monitoring for ART procedures, at stimulation start (SS) and at ovulation induction (OI). Sonographic parameters included standard metric parameters and Power Doppler flow indices of the myometrium and the endometrium. Data were correlated with endocrine and reproductive outcome of the respective cycle.

Results Intra-observer and inter-observer correlations were very good to moderate in almost all assessed parameters except for the endometrial flow indices VI (vascularization index) and VFI (vascular flow index) which were not sufficient at ST. Uterine anterior-posterior diameter was negatively correlated with endocrine and clinical parameters reflecting reproductive capacity and prognosis in ART, such as serum levels of estradiol and number of follicles at OI ($p = 0,01$ and $p = 0,028$; respectively). Accordingly, uterine thickness correlated negatively with number of oocytes retrieved during ovarian pick up ($p = 0,024$). Endometrial blood flow difference Δ FI (flow index) was negatively correlated with endometrial VI at ST and with endometrial FI at ST ($p < 0,001$ and $p < 0,001$; respectively). Additionally, endometrial blood flow difference Δ FI was positively correlated with estradiol and number of oocytes at OI ($p = 0,019$ and $p = 0,024$). Furthermore, blood flow difference Δ FI was negatively associated with uterine thickness ($p = 0,025$). No associations of assessed parameters with pregnancy rate was observed.

Conclusions Uterine anatomy and endometrial Doppler flow indices are associated

with endocrine and reproductive parameters reflecting prognosis in an ART program. It remains to be evaluated in larger populations if these parameters offer potential to predict treatment outcome.

P042

Präimplantationsdiagnostik für monogenetische Erkrankungen an Polkörpern und Trophektoderm – Einfluss klinischer Parameter auf das Behandlungsergebnis

B. Paulmann¹, A. Hehr², C. Gaßner¹, Z. Kowalzyk², D. Seifert¹, B. Seifert¹, U. Hehr²

¹KITZ – KinderwunschTherapie im Zentrum; ²Zentrum für Humangenetik, Regensburg, Deutschland

Einleitung Polkörperdiagnostik (PKD) wurde seit 2001 in unserem Kinderwunschzentrum in Regensburg in 111 ICSI-Zyklen bei 59 Familien angewendet, die sich zur Präimplantationsdiagnostik bei monogenen Erkrankungen vorgestellt haben. In 9 Fällen wurden zusätzlich Trophektodermbiopsien (TEB) mit dem familienspezifischen PKD-Assay im Zeitfenster zwischen Juli 2010 und November 2011 analysiert. Bei 91 Transfers konnten 30 Schwangerschaften bei 28 Familien erreicht werden (klinische Schwangerschaftsrate 33,7 %). Um die zukünftigen Behandlungsergebnisse weiter zu optimieren, führten wir eine Analyse kritischer Behandlungsparameter auf die Schwangerschaftsrate durch, einschließlich Oozytenanzahl, mütterlichem Alter und krankheitsspezifischer Faktoren.

Ergebnisse Wie erwartet konnte die Anzahl reifer Eizellen als ein wichtiger Parameter identifiziert werden, wobei die höchste klinische Schwangerschaftsrate pro Transferzyklus (8/17) bei 16–20 gewonnenen reifen Eizellen gesehen wurde. Schlechte Behandlungsergebnisse wurden in Zyklen mit weniger als 7 reifen Eizellen erreicht (1/12 = 8,3 %), sodass wir in dieser Situation routinemäßig die Vitrifikation dieser Eizellen und die Durchführung der PKD in einem Folgezyklus zusammen mit weiteren gewonnen Eizellen empfehlen. Mit dieser Strategie konnten wir den Anteil an Transferzyklen von 74,6 % (47/63) auf 91,7 % (44/48) in den letzten 2 Jahren steigern.

Mütterliches Alter konnte als weiterer wichtiger Parameter, mit den höchsten klinischen Schwangerschaftsraten bei Patientinnen im Alter zwischen 26 und 30 Jahren (7/18 = 38,9 %) bestätigt werden, während ein weibliches Alter zwischen 36 und 40 Jahren mit einer klinischen Schwangerschaftsrate von 28 % (7/25) einherging.

Weiterhin konnten unsere Daten einen bedeutenden Einfluss der zugrundeliegenden genetischen Diagnose nachweisen, die zur PKD führte. Insbesondere PKD-Zyklen für Myotone Dystrophie Typ 1 (14 Eizellentnahmen bei 6 Familien) und weiblichen Trägerinnen für Fragiles-X-Prämutationen (9 Eizellentnahmen bei 4 Familien) resultierten in einer niedrigeren durchschnittlichen Anzahl

an gewonnenen Eizellen (MD1: 11,7; FMR1-Pre: 8,7; Gesamtkohorte: 13,3) und einer niedrigeren klinischen Schwangerschaftsrate im Vergleich zur Gesamtkohorte (MD1: 2/10 = 20 %; FMR1-Pre: 1/7 = 14,3 % gegenüber Gesamtkohorte 30/91 = 33,7 %). Im Gegensatz dazu wurde eine höhere Anzahl gewonnener reifer Anzahl Eizellen (im Schnitt 15,2) und eine unerwartet hohe klinische Schwangerschaftsrate von 47,6 % (10/21) pro Transferzyklus bei weiblichen Anlageträgerinnen für CFTR-Mutationen erreicht.

Schlussfolgerung Insgesamt betrachtet sind die Behandlungsergebnisse für monogenetische Erkrankungen an unserem Zentrum mindestens vergleichbar mit den Resultaten der Blastomerenbiopsie am Tag 3 des ESHRE PGD-Konsortiums. Unsere Daten bestätigen einen bedeutenden Einfluss klinischer Parameter auf das individuelle Behandlungsergebnis und sollten frühzeitig bei der genetischen Beratung und Planung der ovariellen Stimulation berücksichtigt werden, um die Ergebnisse für PKD weiter zu optimieren.

P043

Comprehensive Chromosome Screening on Cleavage Stage Embryos using arrayCGH in Patients with abnormal sperm FISH: Improving IVF Outcome

E. Gómez^{1,2}, M. Martínez-Fresno³, I. Torres¹, E. Fernández³, N. Almunia¹, P. Eibes³, J. C. García-Torón¹, A. M. Villaguirán¹

¹Tahe Fertilidad, Murcia; ²Departamento de Biología Celular e Histología, Universidad de Murcia; ³Genality, Madrid, Spain

Introduction Around 30–50% of infertility problems are of male origin, low sperm count, poor motility, etc. There is a clear relationship between low sperm quality and an increase in the spermatozoa chromosomal aneuploidies. Furthermore, an increase in sperm aneuploidy is undoubtedly involved in the outcome of ART and can lead to implantation failure, repeated miscarriages, and chromosome abnormalities among newborn children. Fluorescence in situ hybridization (FISH) technology is a useful option for estimating aneuploidy frequencies in spermatozoa. Several studies have shown that an increase in the frequency of disomy for the sex chromosomes is related with an increased in the percentage of aneuploid embryos, and high frequencies of spermatozoa with a diploid dotation could produce triploid embryos. Preimplantation genetic screening through Comprehensive Chromosome Screening (CCS) methods such as array comparative genomic hybridisation (arrayCGH) have proven to generate robust chromosome information in embryos, improving outcome in different indications such as advanced maternal age.

Objective The aim of this study was to analyze the contribution in IVF of sperm aneuploidies in patients with abnormal sperm

FISH and to measure the clinical outcome after arrayCGH.

Materials and Methods Multi-color FISH studies were performed with commercial probes for autosomes and sex chromosomes with 2-colour FISH for chromosomes 13 and 21, and 3-colour mixture for chromosomes X, Y and 18. FISH preparations were evaluated with a fluorescent microscope and 1000 sperm nuclei per individual were scored. Data was statistically analyzed using chi-square analysis and $p < 0.05$ was considered significant. Single blastomeres were obtained by cleavage stage laser biopsy. After the cellular lysis, DNA was amplified with Sureplex technique. The amplified product was processed with array-CGH 24sureV3 protocol and images obtained analyzed with BlueFuse software (BlueGnome, Cambridge, UK). In this study, 32 couples with an altered FISH analysis were included. The FISH was indicated by repeat abortion ($n = 5$), male factor ($n = 18$) and IVF failure ($n = 9$). 13 couples underwent 15 cycles without CCS and 23 cycles were performed with CCS through arrayCGH in 19 couples.

Results In the 15 cycles without CCS 12 transfers were performed, with an average of 1.75 embryos per cycle, which the result of a single ongoing pregnancy (8.33% per transfer). In the 23 cycles with CCS 111 embryos were biopsied and 100 successfully analyzed with arrayCGH, being 38 normal (38%). In this group 17 transfers were made, 1.6 embryos per cycle, producing 9 pregnancies (52.94% per transfer). One pregnancy ended in miscarriage (11.11%). In order to eliminate the effect of maternal origin aneuploidy in the analyzed embryos due to advanced maternal age, we performed the same analysis with data retrieved from women < 35 years cycles. Thus, in the group without CCS 11 transfers were made with 1 pregnancy (9.09%). In the CCS group 12 embryo transfer were performed, resulting in 7 pregnancies (58.33%), one of these resulting in miscarriage (14.28%). In this group the percentage of normal embryos was 37.5%.

Conclusions Although the percentage of couples achieving a transfer was similar in the two groups (80% vs 74%), pregnancy rate was higher in patients with abnormal sperm FISH when arrayCGH was performed (52.94% vs 8.33%), even more when the maternal age effect was eliminated (58.33% vs 9.09%). The rate of aneuploid embryos in couples with abnormal sperm FISH is higher than the expected in a control group of women with similar age (30–34) and no chromosome pathology [Harton et al., 2011], 62.5% vs 50.5%.

At the light of these results, we can conclude that sperm aneuploidy study by FISH in infertile men together with CCS is an indispensable tool to enhance the results in an assisted reproduction program.

P044

Fallbericht: Polkörperbiopsie mit nachfolgender Vitrifikation von Embryonen bei Robertson'scher Translokation

A. Wagner¹, T. Harasim¹, U. Heinrich¹, J. Schiller¹, R. Suttner², D. Shakeshaft², C. Santjohanser², W. Würfel², H.-G. Klein¹, I. Rost¹
¹Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsdiagnostik, Dr. Klein, Dr. Rost und Kollegen, Martinsried; ²Kinderwunsch Zentrum München, Deutschland

Fragestellung Ein Patientenpaar mit unerfülltem Kinderwunsch seit Juni 2010 wurde zur genetischen Beratung vorstellig. Beim männlichen Partner wurde neben einem Diabetes mellitus Typ 1 ein eingeschränktes Spermogramm mit der Diagnose OAT-Syndrom Grad 2 festgestellt. Die Chromosomenanalyse ergab einen unauffälligen Karyotyp (46,XY). Das Karyogramm bei der 38-jährigen Patientin zeigte hingegen eine Robertson'sche Translokation der Chromosomen 14 und 21 (45,XX,der(14;21)(q10;q10)). Bei Nachkommen der Träger dieser Art von Translokation besteht bei einer unbalancierten Weitergabe ein Risiko einer Translokationstrisomie, des Weiteren ein geringes Risiko von $< 1\%$ für das Auftreten einer symptomatischen uniparentalen Disomie von Chromosom 14 (UPD14). Das Paar entschloss sich, Eizellen mit unbalancierter chromosomaler Konstitution durch eine Polkörperdiagnostik (PKD) identifizieren zu lassen. Die PKD wurde mittels Array-CGH nach künstlicher Befruchtung durchgeführt.

Methoden Es wurde eine Stimulation mittels Puregon® (Organon) und Synarela® (Pharmacia) durchgeführt. Die Ovulation wurde durch 5000 IU hCG induziert und nach 36 h konnten 22 Eizellen durch eine ultraschall-kontrollierte Follikelpunktion gewonnen werden. Die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) erfolgte bei 15 reifen Eizellen (MII). Die Entnahme der ersten Polkörper erfolgte durch Laser-assistierte Öffnung der Zona pellucida unmittelbar nach ICSI. Am nächsten Morgen (Tag 1 nach ICSI) konnte von 13 befruchteten Eizellen der zweite Polkörper entnommen werden. Nach Transport in das genetische Labor wurden beide Polkörper entsprechend dem 24sure™- (BlueGnome-) Protokoll separat lysiert und einer Gesamtgenom-Amplifikation (WGA, „whole genome amplification“) unterzogen. Parallel wurden 2 Positiv- und 2 Negativkontrollen mitgeführt. Die Amplikons 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. 2.6).

Ergebnisse 6 Eizellen waren bezüglich der Translokation balanciert sowie euploid für alle anderen Chromosomen und somit zum Transfer geeignet. Der Patientin wurden 2 Mehrzellern embryos am Tag 2 nach Punktion

transferiert. Die weiteren Eizellen mit unauffälliger genetischer Konstitution wurden nach dem Protokoll von Kuwayama [RBM online 2005; 11: 5] und unter Verwendung eines DMSO-haltigen Vitrifikationskits (Irvine Scientific) sowie eines offenen Trägersystems (Cryotop) auf Wunsch der Patientin kryokonserviert. Nach dem Embryotransfer (ET) am Tag 2 stellte sich keine Schwangerschaft ein. In einem späteren Auftauzyklus, unterstützt durch Progynova® (Bayer) und Utrogest® (Dr. Kade), wurden 3 der eingefrorenen Eizellen mithilfe eines Vitrifikationsauftau kits (Irvine Scientific) aufgetaut. Der Patientin konnten 2 vitale Embryonen transferiert werden. Zwei Wochen nach ET lag der hCG-Wert bei 357 mIU/ml. Die Schwangerschaft führte zur Geburt eines gesunden Mädchens.

Schlussfolgerungen Polkörperbiopsie in Kombination mit Vitrifikation der biopsierten Eizellen erlaubt mehrfache spätere ETs mit guten Chancen für eine Schwangerschaft. Damit wird eine höhere Flexibilität in Bezug auf Transferzeitpunkt, Zeitspanne für die genetische Analyse und Optimierung der Bedingungen für einen ET bei Frauen mit beginnender Ovarialsuffizienz erreicht.

Literatur:

- Kuwayama M, et al. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. Reproductive Biomedicine Online 2005; 11: 608–614.
- Naether OGJ, et al. Pregnancy after vitrification of pronuclear stage oocytes biopsied for polar body aneuploidy screening. Reproductive Biomedicine Online 2008; 16: 268–70.

P045

Vergleich zweier Kryokonservierungsmethoden von 2 PN-Eizellen

M. Golakov¹, A. Schultze-Mosgau², M. Depenbusch², K. von Horn², S. Al-Hasani², B. Schöpper², G. Griesinger²
¹Universität zu Lübeck; ²Universitäres Kinderwunschzentrum Lübeck, Deutschland

Fragestellung Im Zuge assistierter Reproduktion mittels IVF und ICSI werden regelmäßig überzählige 2-PN-Eizellen kryokonserviert. Dafür existieren im Wesentlichen 2 Methoden: Das „Slow-cooling“ und die „Vitrifikation“. Retrospektive Studien weisen darauf hin, dass die Vitrifikation von 2-PN-Eizellen bezogen auf Zellüberleben und Schwangerschaftswahrscheinlichkeit dem Slow-cooling überlegen sein könnte. Die vorliegenden Studien sind jedoch mehrheitlich durch univariate Analysen, statistische Mängel und geringe Fallzahlen limitiert.

Die aktuellen Fragestellungen sind: Wie unterscheiden sich die Überlebensraten von 2-PN-Eizellen nach Auftau zwischen den Methoden bei Betrachtung unabhängiger Einzelereignisse? Wie hoch ist die Inzidenz von nicht durchgeführten Kryoembryonentransfers (Kryo-ETs) aufgrund einer Degeneration aller aufgetauten 2-PN-Eizellen? Besteht ein Unterschied in der Schwangerschaftsrate, bzw. kumulativen Schwangerschafts-

rate nach Transfer kryokonservierter 2-PN-Eizellen zwischen den Gruppen? Was ist der Unterschied zwischen den Verfahren bei Berücksichtigung signifikanter Einflussfaktoren?

Methodik Zum Methodenvergleich wurden alle Patientinnen identifiziert, die von 1/1999 bis 7/2011 in der Universitätsklinik Lübeck eine IVF/ICSI mit anschließender Kryokonservierung überzähliger 2-PN-Eizellen durchführen ließen (MediTexIVF Datenbank; früher RecDateAdvance). Hierzu wurden demografische und reproduktionsbiologische Variablen aus Datenbank, Patientenakte, Hormonordnern und Aufzeichnungen des IVF-Labors extrahiert. Dateneingabe und Analyse erfolgten mit SPSS Statistics 20. Für die statistische Auswertung wurde der t-test zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben verwendet. Beim Vergleich zweier normalverteilter Parameter kam der Chi-Quadrat-Test zum Einsatz. Eine zweiseitige asymptotische Signifikanz kleiner als 0,05 wurde als signifikant beurteilt ($p < 0,05$).

Die Überlebensrate wurde errechnet als Anteil aller nach Auftauen vitalen 2-PN-Eizellen an allen aufgetauten 2-PN-Eizellen des KryoETs. Eine biochemische Schwangerschaft wurde definiert bei einem, ab dem 12. Tag nach ET, gemessenen hCG-Wert größer als 6 mIU/ml. In der Auswertung wurden nur die ersten, im angegebenen Zeitraum durchgeführten IVF/ICSI-Behandlungen, inklusive daraus resultierender Kryo-ETs, berücksichtigt. Es wurde ein Follow-up von 1,5 Jahren aufgezeichnet, um das kumulative Outcome pro Paar auszuwerten. Die kumulative Schwangerschaftsrate wurde errechnet als Anteil aller Patientinnen, die im Laufe aller durchgeführten Kryo-ETs mindestens einmal eine biochemische Schwangerschaft erzielten, an der Gesamtzahl der Patientinnen bei denen die jeweilige Kryokonservierungsmethode eingesetzt wurde.

Ergebnisse Es gelangten 673 Patientinnen zur Auswertung, die nach Kryokonservierung mindestens einer 2-PN-Eizelle mindestens einen Auftauversuch haben durchführen lassen ($n = 288$ Slow-cooling; $n = 385$ Vitrifikation). Insgesamt wurden 1069 Kryo-ETs erfasst ($n = 354$ Slow-cooling; $n = 715$ Vitrifikation).

Zur Ermittlung der Überlebensraten wurden 665 erste Auftauversuche ausgewertet ($n = 283$ Slow-cooling; $n = 382$ Vitrifikation). Die Differenz von 8 Patientinnen ergab sich durch fehlendes Outcome dieser ersten Kryo-ETs.

Es zeigte sich eine Überlebensrate pro erstem Auftauzyklus von $57,1\% \pm 27,8\%$ für das Slow-cooling und $94,4\% \pm 15,5\%$ für das Vitrifikationsverfahren. Der t-Test ergab eine zweiseitige asymptotische Signifikanz von $< 0,001$ und somit eine signifikante Differenz beider Methoden.

Bei 32 von 1069 Auftauzyklen überlebten keine Vorkernstadien den Auftauvorgang. Hier ergibt sich auch ein signifikanter Unterschied. Die Inzidenz für 0 überlebte 2-PN-Eizellen bei Slow-cooling betrug $2,62\%$ (28/

1069) und bei Vitrifikation $0,37\%$ (4/1069). Die mittels Chi-Quadrat-Test ermittelt zweiseitige asymptotische Signifikanz ist $< 0,001$.

Die unadjustierte, kumulative Schwangerschaftsrate betrug beim Slow-cooling nach 3 Kryo-ETs (maximal 3 durchgeführt) $21,5\%$ und beim Vitrifikationsverfahren nach maximal 7 durchgeführten Kryo-ETs $42,8\%$. Nach 3 Kryo-ETs ergab sich für die Vitrifikation eine kumulative Schwangerschaftsrate von $38,9\%$.

Schlussfolgerung Die Ergebnisse zeigen einen Vorteil des Vitrifikationsverfahrens gegenüber dem Slow-cooling in allen Fragestellungen. Sowohl in der Überlebensrate als auch für die Inzidenz von Degeneration aller 2-PN-Eizellen pro Kryo-ET existieren signifikante Unterschiede zugunsten des Vitrifikationsverfahrens. Die kumulative Schwangerschaftsrate nach 3 Kryo-ETs ist bei der Vitrifikation höher als beim Slow-cooling nach 3 Kryo-ETs. Allerdings ist die Erhöhung der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit möglicherweise durch mehrere Faktoren konfundiert: Anwendung des Blastozysten-transfers nach Vitrifikation, Auslösung mit GnRH-agonist und primär elektive Vitrifikation aller 2-PN-Eizellen, etc.

Beeinflussende Faktoren werden in weiteren Arbeitsschritten identifiziert und in einer multivariaten Analyse berücksichtigt.

P046

Erfahrungen mit der Vitrifikation von Eizellen

*B. Kwiatkowski, B. Paulmann, D. Seifert, C. Gaßner, B. Seifert
KITZ – KinderwunschTherapie im Zentrum, Regensburg, Deutschland*

Fragestellung Die Kryokonservierung von Eizellen ist integrierter Bestandteil eines erfolgreichen IVF-Programms. Das Vorgehen nach dem klassischen langen Protokoll kann eine Eiskristallbildung hervorrufen, sodass die Erfolgsraten seit Jahrzehnten sehr begrenzt sind und sich wohl kaum steigern lassen. Die neue Technik der Vitrifikation hat den Vorteil, die Eiskristallbildung im embryonalen Gewebe zu verhindern, ist aber verfahrenstechnisch anspruchsvoll.

Methodik Mit Beginn des Jahres 2012 erfolgte die routinemäßige Anwendung der Vitrifikation im Rahmen des IVF-Programms unseres Zentrums. Vitrifikation und Auftauen wurden nach dem Kitazato Cryotop Safety Kit vorgenommen. Die retrospektive Zentrumsstudie erfasst den Zeitraum vom Januar 2012 bis Mai 2013. Es wurden insgesamt 23 Patienten mit insgesamt 26 Behandlungszyklen in die Auswertung einbezogen. Das Durchschnittsalter betrug 35 Jahre. Die häufigsten Ursachen waren Überstimulation beim PCO-Syndrom bzw. PKD- oder PID-Planung zum Sammeln von Eizellen.

Ergebnisse Die Überlebensrate von aufgetauten Eizellen betrug bei unseren Untersuchungen 90% , die Verlustrate nach dem

Auftauen 17% . Die Ursache dafür war in der Regel nicht eine mangelnde Technik, sondern eine Atesie der Eizellen. Die klinische Schwangerschaftsrate aller Stimulationszyklen IVF/ICSI betrug im Jahresdurchschnitt 2013 $43,4\%$. In der Gruppe der eingefrorenen MII-Eizellen wurde eine klinische Schwangerschaftsrate nach Blastozystentransfer von $46,2\%$ erreicht. Es sind im Durchschnitt $1,8$ Embryonen übertragen worden. In $8,3\%$ kam es zum Abort und die Mehrlingsrate betrug $41,7\%$.

Schlussfolgerung Die Vitrifikation von Eizellen hat im Wesentlichen den Vorteil, dass die Eiskristallbildung während der Vitrifikation und dem Auftauen im Vergleich zum klassischen langen Protokoll unerheblich ist.

Hinsichtlich der Erfolgsraten stellt die Vitrifikation gegenüber dem klassischen langen Protokoll eine deutliche Verbesserung dar. Die Vitrifikation von Eizellen ist ethisch unproblematisch. Die klinischen Ergebnisse nach Vitrifikation von Eizellen sind identisch zum Vorgehen mit frischen Eizellen. Der Tag-5-Transfer von vitrifizierten Eizellen verspricht die höchsten Schwangerschaftsraten.

P047

Finding Morphokinetic Markers for Implantation in a Retrospective Analysis of ICSI Outcomes

*N. L. Sandi Monroy, T. Winkle, N. Reeka, K. Eibner, N. Huzurudin, F. Gagsteiger, S. Bhojwani
Kinderwunschzentrum Ulm, Praxis Dr. Gagsteiger, Ulm, Germany*

Objective Time-lapse imaging allows exact observation of morphokinetic characteristics of embryos during its culture. It has been suggested that duration of second and third rounds of embryonic cleavage (cc2 and cc3) and synchronization of second and third cell cycles (s2 and s3) are important predictors of embryo blastulation and implantation. Therefore we aimed to identify morphokinetic markers that significantly affect embryo implantation.

Methods Embryos from 323 infertility patients having in vitro fertilization (IVF) treatment were incubated in the EmbryoScope system (Unisense Fertilitelch). Embryo transfer (ET) was canceled in 39 cycles due to medical reasons, irregular fertilization or no adequate embryo development. Only patients having fresh ICSI cycles with SAGE® culture medium, biochemical pregnancy test and at least one ultrasound examination were included in the study ($n = 240$). Injected oocytes were cultured individually in 25 μ l-wells of the EmbryoSlide®. Images of the cultured embryos were acquired every 20 minutes at seven different focal planes. Regarding the time of sperm injection as time zero (t0), the time of occurrence of the following time points were assessed in hours (h): extrusion of second polar body, appearance of pronuclei, syngamy, cleavage into n-cell stage (t2 to t9+), initiation of compac-

tion (tM) and blastulation (tFB), and developing to full (tB), expanded (tEB) and hatching blastocysts (tHB). The following parameters were also studied: cc2, cc3, s2, s3 and i3 (duration of 4-cell stage). Selection of embryos for ET was based on morphology at day 2/3 (n = 77) and day 5/6 (163). Embryos were divided into two groups according to implantation: A, 0% implantation, where none of the transferred embryos implanted (n = 224 embryos); B, 100% implantation, where the number of transferred embryos was equal/larger than the number of gestational sacs (n = 73 embryos). Patients having double or triple embryo transfers and only singleton or twin pregnancies, respectively, were excluded from the study. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 6.0 software and $p < 0.05$ was considered significant. Unpaired t test for nonparametric variables (Mann Whitney test) was used as most of the data did not follow a normal distribution (D'Agostino & Pearson omnibus normality test).

Results From 436 embryos transferred, 137 successfully implanted and 126 had positive heartbeat. Clinical pregnancy and implantation rates were 43.25% and 31.42%, respectively. Maternal age and number of previous cycles were not statistically different among pregnant and non-pregnant patients. Morphokinetic analysis between groups A and B has shown statistically significant differences in the following parameters, respectively: syngamy (24.09 h vs 23.12 h, $p = 0.0371$), t5 (50.15 h vs 47.88 h, $p = 0.0267$), t6 (53.73 h vs 51.07 h, $p = 0.0075$), t7 (58.06 h vs 54.52 h, $p = 0.0021$), tM (91.91 h vs 88.81 h, $p = 0.0232$), tFB (103.4 h vs 99.4 h, $p = 0.0044$), cc3 (13.62 h vs 11.67 h, $p = 0.0014$) and i3 (11.08 h vs 10.2 h, $p = 0.0459$).

Conclusions Non-implanted embryos presented a significant delay in development throughout the different stages of the cell cycle compared to implanted embryos. Delays were observed at syngamy (0.97 h), initiation (0.88 h) and duration of third cell cycle (1.95 h), initiation of compaction (3.1 h) and blastulation (4 h). This might suggest a delay in the important step of genomic activation with transition to embryonic transcription, resulting in later differentiation. However, identification of morphokinetic markers for implantation has to be taken carefully as non-implanted and implanted embryos overlap in several time points throughout *in vitro* development and do not correspond exactly to previously published data, as already suggested. Nonetheless, the markers identified in this patient cohort could be used to establish a hierarchical model for selecting the most developmentally competent embryo.

P048

Does the Use of an Automated Zona Score or a Tool for Spindle Visualization Predict the Maturation Probability of Metaphase I Oocytes?

V. Nordhoff¹, E. Kößer¹, S. Strüwing¹, A. N. Schüring², S. Kliesch¹

¹Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie;

²UKM Kinderwunschzentrum, Universitätsklinik Münster, Germany

Introduction Mature oocytes are inevitable for procedures like intracytoplasmic sperm injection (ICSI). But some patients exhibit numerous or only metaphase I (MI) oocytes at oocyte retrieval for ICSI. This is obviously problematic in poor responders which have anyhow a low number of oocytes available. If such finding occurs the discussion arises whether these oocytes are able to mature *in vitro* or whether they should not be used at all. New tools as for example polarisation microscopy are able to allocate oocytes according to their meiotic cell cycle. In addition an automated zona score can predict oocyte quality, later embryo development and implantation potential. Immature germinal vesicle (GV) or MI oocytes with high zona score values do not have a higher probability to mature *in vitro* in stimulated cycles.

The aim of our study was 1) to confirm that the automated zona score (polarAIDE™, Octax, MTG, Bruckberg) is not able to predict maturation, 2) if the visualisation of the spindle (polarAIDE™) or 3) if both in combination are able to predict the probability of maturation in these MI oocytes.

Material and Methods We retrospectively identified among all ICSI cycles of the year 2012 in total 85 cycles in which the patient had one or up to 5 MI oocytes at oocyte retrieval and zona birefringence and spindle visualization (polarAIDE™) was used to score all oocytes. In total 148 MI oocytes from these 85 ICSI cycles were included in our analysis. Polarization microscopic data were accomplished 3–5 hours after ovum pick up (OPU). The zona score, the visualization of the spindle and their maturation to telophase I or prophase II up to 3h after first scoring was documented and analysed.

A limitation of this study was that the data were retrieved from cycles with normal oocyte numbers (mean 9.3 oocytes/OPU) where only a small amount of oocytes were at the MI stage.

Results From 148 MI oocytes 61 (41.2%) did not exhibit a visible spindle while in 87 oocytes (58.8%) the metaphase I spindle was clearly visible. Maturation was detected in 15 of 61 MI (24.6%) oocytes without spindle and in 50 of 87 (57.5%) MI oocytes with visible spindle. There were no statistical differences between both groups regarding spindle visualization. However, MI oocytes which exhibited a visible spindle at time point of polarisation microscopic analysis had a sig-

nificantly greater chance to mature *in vitro* compared to oocytes without a visible spindle ($p < 0.001$).

In both groups, the matured or not matured MI oocytes equal distribution of a positive or a negative zona score was evident. Although oocytes with higher zona scores tended to have a higher probability to mature *in vitro*, this finding remained not significant. There was no correlation of the zona score values and the probability to visualize a spindle in these MI oocytes.

Discussion and Conclusion The spindle visualization tool is able to predict the probability of the maturation process of MI oocytes retrieved for ICSI while the automated zona score is not. This study was performed in cycles in which the MI oocytes were only a small share of cells among a high number of mature MII oocytes. These findings could have important implications in cases of low responders with high percentage of MI oocytes. The use of the spindle visualisation tool might help to counsel the couple for their chances of successful *in vitro* maturation and for their individual success of the ICSI procedure although this still has to be proven.

Reproduktionsbiologie I

P049

ART Culture Conditions alter Cell Fate in the Inner Cell Mass Cells of the Mouse Blastocyst

T. Pock, M. Boiani, C. Schwarzer

Department of Cell and Developmental Biology, Max Planck Institute for Molecular Biomedicine Münster, Germany

Embryos produced by assisted reproductive technologies (ARTs) are cultured *in vitro* before transfer to the uterus. However, ART culture media are not as physiologic as the natural environment, and may differ in their ability to support pre- and postimplantation development. This possibility warrants discussion on their safety and further improvement. Research on human embryos, however, is ethically unfeasible; therefore the mouse has been used as a model to study the possible effects of ARTs on development. Several mouse studies showed that the adult body is the far progeny of a few cells, ranging from 4 to 8 in number, within the inner cell mass (ICM) of the blastocyst. Since clinical studies showed a correlation between the birth weight of ART babies and the culture medium in which they spent their embryonic life, we ask: do ART culture media change the number of prefetal stem cells in mouse blastocysts? Specifically, we aim to determine if culture conditions change the number and functionality of pluripotent embryonic stem cell (ESC) precursors located in the ICM of the mouse blastocyst, by measuring the blastocyst's ability to form outgrowths and to yield ESC colonies.

Zygotes were retrieved after mating of superovulated B6C3F1 female mice with OGT2 (carrying a stably integrated Oct4-GFP transgene as pluripotency marker) or C57Bl/6 males, and then allocated to three *in vitro* culture environments: two ART culture protocols (HTF/MultiBlast, Irvine Scientific; ISM1/ISM2, Origio), and standard mouse medium (KSOM(aa), made in house). As *in vivo* control, blastocysts were allowed to grow in their natural environment of the mouse oviduct and uterus. At 96 h of development, blastocysts were recovered from culture or from the B6C3F1 uterus and seeded on mouse embryonic fibroblasts in ESC medium for outgrowth formation. Outgrowths were either cultured further for deriving ESCs and colony counting, or fixed for immunofluorescence microscopy of markers of the pluripotent primitive ectoderm (pEct) and trophectoderm (TE) (by counting single Nanog- and Cdx2-positive cells, respectively).

Our results show different ESC derivation rates (passage 2) across conditions (ISM1/2 7.1%, HTF/MB 37.5%, KSOM(aa) 20.4%, oviduct 8.4%). The number of Oct4-GFP-positive colonies detected per embryo ranged between 1–37 (HTF/MB), 1–22 (oviduct), 1–37 (KSOM[aa]), and 1–25 (ISM1/2). Their median values of colonies were 9.5 (HTF/MB), 2 (oviduct), 6 (KSOM[aa]), and 2 (ISM1/2), with HTF/MB and KSOM(aa) being significantly different compared to oviduct (ANOVA, $p < 0.05$). Immunostaining of blastocyst outgrowths revealed differences in the number of TE and pEct cells (median values: 45 and 6 [HTF/MB], 50 and 5 [oviduct], 40 and 7 [KSOM(aa)], 28 and 3 [ISM1/2], respectively). Specifically, compared to oviduct, outgrowths in ISM1/2 have significantly lower Cdx2-positive cells (ANOVA, $p < 0.05$). These findings correlate with a lower blastocyst rate at 96 h in ISM1/2 embryos compared to oviduct (28.6% (ISM1/2) and 70% (oviduct), ANOVA, $p < 0.05$).

We assessed the ability of pluripotent ICM cells in the mouse blastocyst to form outgrowths and to yield pluripotent ESC lines, as measure for their endowment in stem cells. We observed that depending on the culture media used, the number of ICM cells varies, which is reflected in the different ESC derivation rates and confirmed by immunostaining. Altogether, throughout all parameters assessed in this study, blastocysts cultured in ISM1/2 and oviduct present a lower number of cells in the ICM than those in the culture conditions HTF/MB and KSOM(aa). Thus, the commonly used endpoint of blastocyst formation is blind to important differences that exist inside the blastocyst. The embryo is exposed to the culture medium at a time when its cells are totipotent, and this has clear effects on the founder cell lineages of the blastocyst.

P050

Supplementation of Glutathione Ethylester Protects Spindle and Chromosomal Integrity in vitrified *in vitro* and *in vivo* matured Oocytes

M. Heiligentag¹, T. Trapphoff², T. Seidel^{2,3}, G. Arnold⁴, U. Eichenlaub-Ritter¹

¹Microbiology and Genetechnology; ²Dynamic Cell Imaging; University of Bielefeld, Germany; ³Plant Biology, Carnegie Institution, Stanford, USA; ⁴LAFUGA, LMU München, Germany

Introduction Glutathione (GSH) is the major non-enzymatic antioxidant in mammalian cells and is involved in scavenging of reactive oxygen species. Cellular GSH concentration is decreased after *in vitro* maturation (IVM), thereby reducing oocyte developmental competence. Vitrification and cryopreservation may affect mitochondrial functionality, induce ROS and thereby affect spindle integrity and chromosome segregation.

Question Since glutathione ethylester (GEE), a membrane permeable glutathione donor, promoted fertilization and early embryonic development of IVM cumulus-enclosed macaque oocytes [1], we wanted to know if it also improves stress tolerance, and mitochondrial and spindle integrity and chromosome alignment in cumulus denuded IVM mouse oocytes or in *in vivo* ovulated (IVO) metaphase II (MII) oocytes that were preloaded with GEE prior to vitrification.

Methods GV stage oocytes (C57/Bl6xCBA/Ca strain) were IVM in presence or absence of 1mM GEE followed by CryoTop vitrification [2]. Level of ROS, mitochondrial glutathione-dependent redox potential (E^m_{GSH}) and spindle and chromosomal integrity was assessed prior to and after vitrification/warming. IVO MII oocytes were pre-loaded with 1mM GEE for 1h prior to vitrification/warming. Spindle and chromosome alignment were analyzed in IVM and IVO groups by confocal microscopy and non-invasive polarization microscopy 0–2h after vitrification. ROS and E^m_{GSH} was analyzed in the IVM group. E^m_{GSH} was quantified non-invasively prior to and 90min past vitrification in oocytes expressing mitoGrx1-roGFP2 after mRNA microinjection at GV stage [3].

Results

1. Rate of polar body formation did not differ between control and GEE group but ROS was significantly lower in the GEE IVM group.
2. E^m_{GSH} was significantly more negative in GEE IVM group compared to control. E^m_{GSH} did not differ between GEE and control group after vitrification and was more negative in the vitrified compared to the control but not GEE group (E^m_{GSH} control: -324.4 ± 10.4 mV; control vitrified: -335.7 ± 9.1 mV; $p < 0.001$; vitrified after GEE: -334.2 ± 8.1).
3. Vitrification caused alterations in mitochondrial distribution in both vitrified groups (44.69 vs 41.2%, respectively).

4. Polarisation microscopy shows that spindles/birefringence were significantly altered directly after vitrification/warming in both groups compared to controls. At 2 h after recovery differences disappeared but recovery of retardance, an indicator of high order spindle fibres, appeared particularly fast at 30 min in the GEE-supplemented group.

5. Confocal microscopy confirmed the severe effect of vitrification on spindle integrity and chromosome alignment in the IVM control group right after warming while there was no difference found in the GEE-supplemented group compared to control. Differences disappeared after 2 h although aberrant spindles were slightly increased in both vitrified compared to control groups.

6. Vitrification of IVO MII oocytes induce transient spindle alterations, which were mainly prevented by GEE conditioning. However, spindle and chromosomes were similar in all groups 2 h after recovery.

Conclusion GEE supplementation during IVM reduces ROS and increases mitochondrial E^m_{GSH} and in this way may protect oocytes from stress by vitrification. GEE supplementation during IVM appears to support recovery of normal spindle and chromosomal alignment in vitrified MII oocytes. Although in IVO MII oocytes from young females are more robust in response to stress by vitrification compared to IVM ones, preloading of MII oocytes with GEE also supports the rapid recovery in spindle and chromosome alignment and may thereby improve fertilization and developmental competence. Thus, GEE appears to be a promising candidate to prevent post-ovulatory ageing and injury induced by vitrification/warming in mammalian oocytes and may therefore also be useful in vitrification of human MII oocytes.

References:

1. Curnow EC et al. Hum Reprod 2010; 2465–74.
2. Demant M et al. Hum Reprod 2012; 1096–111.
3. Tatone C et al. Hum Reprod 2011; 1843–59.

Grants: Supported by DFG (FOR 1041).

P051

Transcript level and Poly(A) Content of maternal effect Genes, Spindle Constitution and epigenetic Histone modifications are influenced by pre- and postovulatory Ageing in Mouse Metaphase II Oocytes

H. Demond¹, D. Danker², T. Trapphoff³, M. Heiligentag³, R. Grümmer², U. Eichenlaub-Ritter³, B. Horsthemke¹

¹Institute of Human Genetics; ²Institute of Anatomy, University Clinic of Essen; ³Microbiology and Genetechnology, University of Bielefeld, Germany

Introduction Early embryonic development prior to zygotic genome activation is dependent on maternal factors acquired during oocyte growth. Recruitment, polyadenylation and degradation of maternal mRNAs and

epigenetic occur in a stage-specific fashion, including mRNAs of maternal effect genes (MEG) that are mandatory for preimplantation development. Postovulatory ageing (PostOA) of oocytes from *Xenopus tropicalis* leads to age-dependent deadenylation of maternal mRNAs [1] and PostOA induces loss of chromatid cohesion in mammalian oocytes.

Question We postulate that preovulatory (PreOA) and PostOA can contribute to alterations in the epigenetic histone landscape, and the timed polyadenylation, recruitment and degradation of mRNAs [2]. Therefore we investigated poly(A) tail pattern of ten maternal effect genes and epigenetic modifications as well as spindle and chromosome alignment in *in vivo* or *in vitro* grown and matured PreOA and PostOA mouse oocytes.

Methods *In vivo* aged oocytes were obtained from adult C57Bl/6J mice by delaying ovulation for three days by cetrorelix (PreOA). Postovulatory aged oocytes were obtained by *in vitro* ageing for 12 h or 24 h after isolation of oocytes from the ampullae.

In vitro aged oocytes were obtained from preantral follicle culture [3, 4]. Follicles from C57Bl/6xCBA/Ca mice were cultured for 12 days (control) or 14 days (PreOA) to the antral stage, followed by stimulation by hCG/rEGF and oocyte retrieval at 18 h (control) or 30 h (PostOA). Transcriptome or poly(A) RNA content were determined by quantitative real time PCR (qRT-PCR) using random hexamer primed or oligo(dT)16 primed cDNA, respectively. Hormone production was analysed in spent culture media from day 12 to 15 of culture. Epigenetic profile of histone H3K9trimethylation, spindle and chromosome alignment was analyzed in *in vitro* control or PreOA or PostOA MII oocytes.

Results PostOA: PostOA of *in vivo* matured oocytes led to a decrease in total mRNA level as well as in poly(A) tail length of these mRNAs for certain MEGs. Poly(A) tail reduction could be observed in 3 of the 10 genes after 12 h and in 6 genes after 24 h postovulatory ageing. Oocytes from follicle culture appeared more susceptible to PostOA since total mRNA and poly(A) tail length of most MEGs decreased already after 12 h of PostOA. Spindle integrity and H3K9 trimethylation was significantly altered in PostOA oocytes compared to controls. PreOA: There was no effect of PreOA on overall transcript level or poly(A) tail length in *in vivo* and *in vitro* PreOA oocytes compared to controls. Progesterone concentration was more than doubled after PreOA and PostOA *in vitro* compared to controls, indicating extended luteinization. Spindle and chromosome alignment were significantly altered after PreOA *in vitro*. H3K9trimethylation was not affected compared to *in vitro* controls.

Conclusion PreOA of *in vivo* and *in vitro* does not affect mRNA amount and poly(A) tail length compared to controls. PostOA of

in vitro and *in vivo* causes reductions in total mRNA content and poly(A) tail of some of the selected MEGs, which are developmentally relevant. The age-dependent deadenylation of the poly(A) tail appears to be more prominent in PostOA *in vitro* compared to *in vivo*. This may compromise developmental competence after fertilization of *in vivo* and *in vitro* matured MII oocytes. H3K9trimethylation is enriched at pericentromeric chromatin and alterations in histone code by ageing may therefore contribute to altered transcription, spindle function and chromosome segregation and reduced developmental competence [5, 6]. Possibly, altered activities of enzymes in epigenetic regulation are also linked to expression, recruitment and degradation of mRNAs of MEGs and contribute to ageing associated disturbances in development.

References:

1. Kosubek A et al. PLoS one 2010; 5: e13532.
2. Bittner AK et al. Fertil Steril 2011; 95: 2390–4.
3. Demant M et al. Hum Reprod 2012; 1096–111.
4. Trapphoff T et al. Hum Reprod 2010; 25: 3025–42.
5. Trapphoff T et al. Fertil Steril 2013; [Epub ahead of print].
6. Ji Z et al. Mol Syst Biol 2011; 7: 534.

Grants: Supported by DFG.

P052

Electron Microscopic Evaluation of Spermiogenesis in the HEN1 Mutant Mouse

A.-L. Hempfling¹, K. Steger², M. O'Bryan M³, S. L. Lim³, L. O'Donnell¹, M. Bergmann¹

¹Institute of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology; ²Department of Urology, Pediatric Urology and Andrology, Justus Liebig University, Molecular Andrology, Gießen, Germany; ³Department of Anatomy and Developmental Biology, Monash University, Melbourne, Australia

Background and Aims HEN1 is a putative RNA methyltransferase which is involved in the stabilising 2'-O-methylation of the 3' end of small RNAs in plants, *Drosophila* and Zebra fish. The methylation protects piRNAs in the testis from quick degradation, enabling them to contribute to the RNA-induced silencing complex (RISC) that cleaves target mRNAs. The implication of HEN1 in the methylation of piRNAs in mammals is not yet fully understood but it is presumed to have a critical role in fertility as it does in other clades. Homozygous mutant male mice (Hen1P/P) show a severely impaired spermatogenesis, resulting in sterility. They exhibit lower testis weight and sperm output, complete loss of sperm motility and abnormal sperm heads.

Materials and Methods We investigated the phenotypic consequences of a mutation in the HEN1 gene on the seminiferous epithelium of mice on ultrastructural level by electron microscopy.

Results We found that spermatogonia and spermatocytes do not show any alterations

and spermatids develop normally in the HEN1 mutant until the elongating stage.

Elongating and elongated spermatids revealed numerous phenotypic abnormalities in the HEN1 mutant (mt) compared to wild type mice (wt), such as changes in chromatoid body (cb) development, large cytoplasmic vesicles of unclear origin, a cytoplasmic accumulation of mitochondria including abnormal assembling around the axoneme, multinuclear spermatids and an abnormal development of nuclear manchette.

Step 8 spermatids reveal a premature dissipation of the cb in mt mice, a process that normally starts to occur in step 11 spermatids of wt mice.

Wt step 8 spermatids also show the initiation of manchette development by the occurrence of perinuclear microtubules, which is unaffected in mt spermatids at this stage. In step 9 wt spermatids where nuclear elongation becomes evident the manchette is composed of microtubules and the perinuclear ring (pr) being orientated to the developing acrosome, but in mt spermatids the pr is orientated to the plasma membrane, indicating a disturbance of the contact zone between manchette, pr and acrosome. This results in an ectopic positioning of the manchette. From step 13 onwards, spermatids of mt mice additionally show a considerable heterogeneity in respect of nuclear malformation and the degree of chromatin condensation.

Additional to manchette malformation and premature dissipation of cb, mt mice show noticeable accumulations of mitochondria in the spermatid cytoplasm starting in step 10 spermatids, a malformation of the mitochondrial sheath around the axoneme, and an increase in number and size of intracellular vacuoles.

Conclusion Our data show that normal Hen1 function is essential for correct spermiogenesis, especially for cb development, manchette formation and mitochondrial assembly. The abnormal sperm heads seen in the mt mouse by light microscopy are obviously due to the manchette malformations. The abnormal distribution of mitochondria, especially around the axoneme explains the loss of motility. Considering that the cb is recognized as a centre for piRNA metabolism, the observation of its premature dissipation fits well with the proposed role of HEN1 in mammalian piRNA stabilisation.

However, further analysis of Hen1 function, expression levels and localisation is mandatory to clarify the HEN1 mutant phenotype. First data have shown that HEN1 mRNA is also expressed in human germ cells. We will further analyse HEN1 localisation and expression pattern in human testis biopsies showing normal spermatogenesis as well as phenotypes similar to mutant mice to evaluate whether these phenotypes are also related to altered HEN1 expression pattern.

Grants: International Research Training Group Gießen – Melbourne "Molecular Pathogenesis of Male Reproductive Disorders" (DFG GRK 1871/1).

P053

Influence of L-Carnitine on the Mitochondrial Metabolism and Maturation Characteristics of Murine Oocytes

J. Simon, T. Trapphoff, M. Heiligentag, U. Eichenlaub-Ritter

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

Background Developmental competence of *in vitro* matured (IVM) oocytes is still limited compared to *in vivo* maturation, especially, in denuded oocytes. Supporting appropriate energy metabolism is imperative, and can significantly improve developmental competence. Thus, β -oxidation is essential for maturation of mouse oocytes *in vivo* and *in vitro* [1]. Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I requiring L-carnitine metabolite is a rate limiting step in uptake of activated fatty acids for β -oxidation to provide high energy substrates for oocyte maturation. L-carnitine (LC) supplementation during follicle culture increased developmental competence of follicle-enclosed oocytes [2].

Study Question Does supplementation of culture medium with LC impact maturation rate and kinetics, and redox potential and mitochondrial activity of denuded IVM mouse oocytes?

Material and Methods Maturation was for 16 h with or without 0.25 mM or 1mM LC. Mitochondrial distribution and lipid droplet density were evaluated. Kinetics of anaphase I progression and first polar body (PB) formation was studied by polarization microscopy, cellular redox potential of MII oocytes by quantitative imaging of autofluorescence of NADH, NADPH and FAD^{++} , inner mitochondrial membrane potential (ψ^{mit}) by ratio of red_{high}/green_{low} fluorescence after JC-1 staining [3], and mitochondrial glutathione (GSH)-dependent redox potential (E^m_{GSH}) by determining the ratio of GSSG/GSH and the Nernst equation [4].

Results LC supplementation did not affected PB rate or mitochondria-spindle-association. In 0.25 mM LC oocytes entered anaphase I more synchronously and slightly earlier ($n_{control} = 143$, $n_{0.25mM LC} = 47$, $n_{1mM LC} = 60$; $p < 0.06$). Lipid density decreased slightly in both LC groups ($n_{control} = 275$, $n_{0.25mM} = 151$, $n_{1mM} = 132$). FAD^{++} and NADH fluorescence intensity did not change in mitochondria after LC supplementation, while cytosolic NAD(P)H was significantly increased under the influence of 1 mM LC ($n_{control} = 130$, $n_{0.25mM} = 71$, $n_{1mM} = 77$, $p < 0.01$). Cytosolic but not peri-spindle and subcortical ψ^{mit} was significantly lower with 0.25 mM LC compared to control ($p < 0.05$). 1 mM LC did not affect ψ^{mit} ($n_{1mM} = 83$, $n_{control} = 202$) while E^m_{GSH} showed a significant shift to a more oxidizing potential (decreased ratio of GSH/GSSG) with 1mM LC ($n_{1mM} = 135$, $n_{control} = 112$, $p < 0.001$).

Conclusions LC appears to increase β -oxidation as indicated by the lowered lipid den-

sity in IVM oocytes. However, fine turning of metabolic activities and dose of LC are important. High LC did not affect mitochondrial inner membrane potential, possibly because of efficient buffering by the GSH/GSSG system but it appears that highly activated TCA could be responsible for the more oxidizing mitochondrial milieu as well as an increased NAD(P)H production that may help to regenerate GSH from GSSG in cytoplasm and restore redox homeostasis. Possibly, 0.25 mM LC is too low to provide protection against ROS leading to the down regulation of ψ^{mit} in cytosolic but not of spindle-associated mitochondria. Future work has to show if LC supplementation during IVM affects ATP production, ROS level or stress resistance as implied by recent studies in bovine embryos [5], and improves or rather decreases developmental potential in IVM oocytes with limited pool of intrinsic fatty acids and without cumulus. Thus, while LC increased intracellular GSH levels in IVM pig oocytes and embryos [6], an increased mitochondrial fatty acid oxidation may be the source of high net ROS production as is possibly relevant in diabetes [7]. Therefore, further studies are necessary.

References:

1. Valsangkar D et al. Biol Reprod 2013; 89: 43.
2. Dunning KR et al. Biol Reprod 2011; 548–55.
3. Demant M et al. Hum Reprod 2012; 1096–111.
4. Eichenlaub-Ritter U et al. Mitochondrion 2011; 783–96.
5. Takahashi T et al. Reprod Fertil Dev 2013; 25: 589–99.
6. You J et al. Theriogenology 2012; 78: 235–43.
7. Rosca MG et al. Diabetes 2012; 68: 2074–83.

Grants: Supported by DFG (FOR 1041).

P054

Videomicroscopy as a Tool to Assess Epididymal and Testicular Contractile Smooth Muscle Function

A. Mietens¹, S. Tasch¹, G. Eichner², C. Feuerstacke¹, R. Middendorff¹

¹Institut für Anatomie und Zellbiologie; ²Mathematisches Institut, Justus-Liebig-Universität Gießen, Germany

Introduction Transport of immature spermatozoa, once released from the seminiferous epithelium, is ensured by the contractile function of smooth muscle cells surrounding the seminiferous epithelium and by the smooth muscle cell layer of the epididymal duct. Smooth muscle cell function needs to be well coordinated to ensure a controlled transport of the spermatozoa necessary for maturation. The cGMP-related signaling system influences smooth muscle function by mediating relaxation and components of cGMP-related signaling have been localized to testicular and epididymal tissue. However, there is little knowledge on contractile function within the seminiferous tubules and the epididymal duct.

Methods To assess contractile function in a near-physiological setting, segments of the rat epididymal duct were carefully isolated from fresh tissue and embedded in a collagen lattice to facilitate subsequent analysis. Duct segments were examined by time-lapse videomicroscopy and exposed to substances enhancing cGMP levels by stimulating its generation (SNP (sodium nitroprusside), ANP (atrial natriuretic peptide), CNP (C-type natriuretic peptide)) or interfering with its degradation (sildenafil, a PDE5 inhibitor). The acquired stack of video frames constitutes a time stack and by placing a virtual section through this time stack, the movements of the epididymal walls can be followed over time at a specific section. Contractile frequency and its variations in response to various drugs can be visualized and assessed.

Seminiferous tubules from rat and human biopsies were examined accordingly. Wall movements were tracked and submitted to Fourier analysis to obtain a characteristic spectrum of frequencies which contribute to the complex irregular wall movements.

Results Epididymal duct segments from rat caput and corpus showed regular phasic contractions affecting only a small region of the duct. High speed videomicroscopy revealed peristaltic waves that travel along the observed epididymal duct segment in one direction. Intraluminal content was passively displaced by the contractions towards the adjacent regions of duct that were not contracting at this moment. Net transportation of intraluminal contents over a longer distance was only observed occasionally. Contractile activity was susceptible towards cGMP signaling, increasing cGMP by enhanced production or interference with its degradation resulted in a transient decrease in contractile frequency.

In contrast, the wall of rat seminiferous tubules showed a rather slow, undulating and irregular contraction pattern of very small amplitude. No contractions eliciting a clear reduction of the luminal diameter were observed and intraluminal content was passively moved. Tracking of the wall movements could be characterized by a spectrum of frequencies generated through Fourier analysis. Enhanced cGMP signaling modified this frequency spectrum towards slower frequencies.

Preliminary data from time-lapse videomicroscopy of human seminiferous tubules suggest a different contraction pattern. Very slow contractions appear to displace intraluminal contents, and occasionally, quicker contractions seem to affect longer parts of our preparation.

Conclusion Time-lapse videomicroscopy is a promising tool to investigate contractile activity in the epididymal duct and seminiferous tubule in a setting close to physiological conditions. Our visualization of contraction frequencies reveals the cGMP signaling system to be functional in the epididymis and increased cGMP elicits a transient de-

crease of contractile frequency. The concomitant observation of intraluminal flow suggests that epididymal smooth muscle contractions may serve to agitate intraluminal contents and as well contribute to the actual propulsion of spermatozoa within the lumen.

In seminiferous tubules, videomicroscopy detects a very slow irregular contractions pattern of the tubular wall that can be characterized as a frequency spectrum using Fourier analysis. Enhanced cGMP signaling affects testicular smooth muscle function and shifts this frequency spectrum towards slower frequencies reflecting a relaxing effect.

Preliminary data suggest cGMP-related relaxation and deceleration of intraluminal flow in human seminiferous tubules.

Grants: DFG, KFO 181

P055

The Influence of Human ART Culture Media on Apoptosis in Mouse Preimplantation Embryos

K. Schulte¹, J. Ehmcke², S. Schlatt¹, M. Boiani³, V. Nordhoff¹

¹Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie;

²Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung der Medizinischen Fakultät, Universität Münster; ³Max Planck Institut für Molekulare Biomedizin, Münster, Germany

Introduction Assisted reproductive techniques (ART) are employed worldwide to help infertile couples reaching parenthood. Embryos are produced and cultured in culture media aiming to mimic the natural intratubal and intrauterine environment. These culture media are tested using the mouse embryo assay (MEA) before they are approved for clinical use. They pass the MEA if on day 4 a rate of 80% blastocysts is reached. However we propose that it is not only important to reach a distinct blastocyst development rate but also to analyse pre-implantation embryos cultured under different conditions in more detail. Mouse blastocysts cultured under unfavourable conditions are susceptible to apoptosis. Apoptosis plays a major role in mammalian embryonic development. It is triggered via two different pathways, the intrinsic and the extrinsic pathway. While the intrinsic pathway is induced by cellular stress and involves caspase-9, the extrinsic pathway is induced via binding of specific ligands to death receptors and involves caspase-8. Finally both pathways lead to activation of caspase-3. In the present study we aim to determine the effect of different embryo culture media on the relative number of apoptotic cells in murine preimplantation embryos.

Material and Methods 6 to 10 superovulated female mice (B6C3F1, 6–8 weeks) per group were mated with C57Bl/6 males. Zygotes from the oviduct or blastocysts from the uterus (*in vivo* control) were obtained on day 0.5 or 3.5 pc respectively. Zygotes were cultured in KSOM(aa) (provided by M.

Boiani) or in the human sequential media ISM1 and BlastAssist (Origio, Berlin, Germany) up to day 4.5 pc. Cultured blastocysts were fixed and immunohistochemically stained against cleaved caspase-3, -8, and -9. Total cell numbers as well as cells positive for cleaved caspases were counted. For each group approx. 50 embryos were analysed. Treatment of blastocysts with the potent apoptosis inducer actinomycin D (5 ng/ml) served as positive control for detection of apoptosis. Differences with $p < 0.05$ were considered as significant.

Results Analysing the total cell count of 213 embryos showed that blastocysts of the ISM1/BlastAssist group had significantly lower total cell numbers (50.78 ± 1.78 ; $n = 99$) compared to the KSOM group (70.15 ± 1.99 ; $n = 114$; $p < 0.0001$). In both groups we were able to detect cells which are positive for cleaved caspase-3 (KSOM: 0.60 ± 0.12 ; $n = 47$; ISM1/BlastAssist: 0.56 ± 0.13 ; $n = 48$; Actinomycin D: 3.0 ± 1.27 ; $n = 5$) and for cleaved caspase-9 (KSOM: 0.81 ± 0.22 ; $n = 21$; ISM1/BlastAssist: 1.5 ± 0.34 ; $n = 10$), although results were not significantly different. For cleaved caspase-8 few positive cells were found in both groups (KSOM: 0.13 ± 0.06 ; $n = 46$; ISM1/BlastAssist: 0.02 ± 0.02 ; $n = 41$; Actinomycin D: 1.0 ± 0.55 ; $n = 5$).

Conclusion The significantly lower cell numbers in the ISM1/BlastAssist group suggests that under these culture conditions the developmental rate of 4.5 dpc embryos is clearly restricted in contrast to embryos in the KSOM(aa) group. Since the activity for caspase-3 and -9 was similar in the e-media groups, we can exclude that apoptosis is the main mechanism for the observed restriction in development. Nearly no activity could be observed for caspase-8 in both groups, indicating that programmed cell death in murine preimplantation embryos under current culture conditions is rather intrinsically triggered than extrinsically.

Grants: This study was supported by IMF grant NO. 111212.

P056

The Major Seminal Plasma Peptide CNP is degraded by Neutral Endopeptidase (CD10) that is abundantly expressed in the Epididymis and localized to the Luminal Side of Epithelial Cells

A. Thong, A. Stammler, D. Müller, C. Feuerstacke, A. Miettens, E. Middendorff, AG Signaltransduktion Anatomie und Zellbiologie, Justus Liebig Universität Gießen, Germany

Neutral endopeptidase (NEP/CD10) cleaves and inactivates a variety of biologically active peptides such as enkephalins, bradykinin, and natriuretic peptides. NEP is known to cleave and inactivate C-type natriuretic peptide (CNP), which was found to be present in high concentrations in seminal plasma. However, detailed expression pat-

tern and CNP-related function of NEP in the epididymis are unknown. Comparison of NEP protein levels in various organs revealed an extremely high expression in human and mouse epididymis. In man, strong NEP immunoreactivity was associated with the luminal side of epithelia of efferent ducts and the epididymal duct including stereocilia. Segment-by-segment analysis in mouse revealed a distinct distribution along the epididymal duct. By combination of laser capture microdissection (LCM) and RT-PCR analyses we were able to localize transcripts of CNP and the CNP receptor guanylyl cyclase B (GC-B) to the epithelial layer of mouse and human epididymis. Using immunostaining GC-B was also found in epithelial cells of the epididymal duct at the protein level. By thin layer chromatography using epididymal membrane proteins we showed CNP degradation by NEP. Increased CNP/GC-B-induced cGMP production by NEP inhibition was revealed by guanylyl cyclase assays.

Conclusion Our data suggest an important role of the membrane-bound protease NEP, highly expressed and exclusively found in the apical portion of epithelial cells, for degradation of one of the major seminal plasma peptides, CNP, and highlight new CNP/GC-B functions in epithelial cells, most likely in context of local water balance.

Grants: DFG; KFO 181; LOEWE; MIBIE.

P057

Acetylation of Histone H4 Lysine 12 as a Marker for Metaphase II Oocyte quality and in improving in vitro Maturation

S. Kalhori, M. Heiligentag, T. Trapphoff, U. Eichenlaub-Ritter

Institute of Gene Technology/Microbiology, University of Bielefeld, Germany

Introduction Epigenetic histone modification is a dynamic and reversible process during oogenesis and embryogenesis to regulate chromatin structure and gene expression. Histone H4 lysine12 (H4K12) is hyperacetylated in mature GV stage oocyte, hypoacetylated at metaphase II stage and reacetylated after fertilization [1]. The level of H4K12 acetylation was significantly altered in aged and *in vitro* matured human or murine MII oocytes [2, 3], and in diabetes [4].

Study Question Is H4K12acetylation a quality marker for *in vitro* grown and/or *in vitro* matured oocytes and can it be used to assess and improve culture methods? Is there a difference in acetylation of H4K12 in oocytes from metaphase II oocytes obtained from ovary, preantral follicle culture, *in vitro* maturation with or without cumulus or *in vitro* maturation after “simulated physiological oocyte maturation” (SPOM) [5]?

Methods *In vivo* ovulated MII oocytes (IVO) were obtained from PMSG and hCG primed MF1 mice. *In vitro* maturation (IVM) with cumulus-enclosed (COC) or denuded (DO) GV oocytes was in a-MEM medium

and lactate or by SPOM technique including 1–2 h prematuration with cilostamide, forskolin and IBMX, followed by extended maturation for 16h (DO) or 21h (COC) with low IBMX and/or cilostamide [5]. To optimize SPOM and increase intrinsic cAMP levels, dibutyryl-cAMP (dbcAMP; COC_{dbc}) was added. Preantral follicles from prepubertal C57Bl6xCBA/Ca mice were cultured for 12 days, followed by rEGF/hCG and oocyte retrieval after 18 h [6]. Zona pellucida was removed by pronase prior to fixation. MII oocytes from all experimental groups were fixed in paraformaldehyde and processed for immunofluorescence simultaneously in each replicate experiment, stained by H4K12ac antibody/TRITC conjugated 2nd antibody and analysed by fluorescence microscopy with standard setting. Signal intensity was quantified as ratiometric mean value in [a. u. ± sd] compared to *in vivo* ovulated MII oocytes by ImageJ software.

Results The weakest H4K12ac signal intensity was in *in vivo* ovulated MII stage oocytes. H4K12acetylation appears slightly higher in MII oocytes from preantral follicle culture compared to IVOs. MII oocytes obtained after COC SPOM revealed a significantly higher H4K12acetylation compared to IVOs and also to IVGs but acetylation profile was lower compared to DOs. Supplementation with dibutyryl-cAMP during SPOM of cumulus-enclosed oocytes induced a slightly lower H4K12acetylation compared to SPOM control. The level of H4K12acetylation was therefore highest in the IVM DO group and decreased relatively: DO > COC > COC_{dbc} > IVG > IVO to lowest level characteristic for *in vivo* ovulated oocytes. Addition of dbcAMP to SPOM contributes to decrease acetylation level during maturation and thereby indicates that oocyte quality may become better and more close to the *in vivo* situation.

Conclusions Our results demonstrate that H4K12 acetylation differs significantly between different IVM techniques. Acetylation was closest to the *in vivo* level in preantral follicle culture, and also low in SPOM of COCs with cAMP. Both systems achieve therefore similar characteristics to the *in vivo* grown and ovulated MII stage oocytes, thereby presumably increasing developmental competence as shown recently for SPOM-matured cumulus-enclosed bovine MII oocytes [4]. In culture without cumulus, bidirectional cell communication between the oocyte and the surrounding granulosa cells is lost that possibly not only contributes to proper cAMP homeostasis but also epigenetic regulation and activity of deacetylases. H4K12acetylation appears therefore to be a promising marker to evaluate MII oocyte quality and improve culture and IVM conditions. Further work is required to identify molecular mechanisms related to histone acetylation and oocyte developmental competence.

References:

1. Matsubara K et al. Biochem Biophys Res Commun 2013; 434: 1–7.

2. Akiyama T et al. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2006; 103: 7339–44.
3. Van den Berg IM et al. Hum Reprod 2011; 1181–90.
4. Ding L et al. Theriogenology 2012; 78: 784–92.
5. Albus FK et al. Hum Reprod 2010; 2999–3011.
6. Trapphoff T et al. Hum Reprod 2010; 3025–42.

Grants: Supported by DFG (FOR140).

■ Reproduktionsbiologie II

P058

Acetylcholinesterase in the Ovary

J. Blohberger¹, D. Einwang¹, D. Berg², U. Berg², G. Disen³, S. Ojeda³, S. Saller¹, J. Urra⁴, H. Lara⁴, A. Mayerhofer¹

¹Anatomy III – Cell Biology, University of Munich;

²A.R.T. Bogenhausen, Munich; ³Oregon National Primate Research Center/West Campus OHSU, Beaverton, OR, USA; ⁴Laboratory of Neurobiochemistry, Faculty of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, University of Chile, Santiago, Chile

Background/Objectives Recent proteomic studies of human follicular fluid (FF) revealed the presence of the acetylcholine (ACh) degrading enzyme butyrylcholinesterase (BChE). Its presence may be related to ACh, which is formed by human granulosa cells (GCs). ACh-actions include activation of muscarinic receptors of GCs, entailing changes in intracellular calcium levels, activation of the transcription factor egr-1, regulation of ion channels, phosphorylation of a gap junction molecule and disruption of intercellular communication between GCs and cell proliferation. Assuming that this is an important role for follicular ACh, its actions would be expected to be limited spatially and temporarily. Because BChE and possibly the more efficient ACh degrading enzyme ACh-esterase (AChE) could restrict ACh-actions, we carried out studies to examine this possibility in rat and primate ovary.

Methods/Results Immunohistochemical analysis of rat, monkey and human ovarian sections revealed positive staining of GCs of follicles and the corpus luteum for AChE indicative of ACh degradation. In adjacent sections positive staining for choline acetyltransferase (ChAT) indicated ACh production. In human IVF-derived FFs, enzymatically active AChE and BChE were measured, with BChE activity accounting for about 50% of the overall activity. Activity measurements in rat ovarian homogenates revealed lower AChE than BChE activities. In freshly isolated, IVF-derived human GCs and in cultured human GCs, AChE and BChE proteins and mRNAs were found. AChE activity was measured in lysates of cultured human GCs. Furthermore, in an immortalized rat GC line, previously shown to produce ACh, both AChE protein and AChE mRNA were identified. Hence, AChE and

BChE are produced by non-luteinized and luteinized GCs.

RT-PCR strategies followed by sequencing allowed us to identify three AChE splice-variants in human GCs: the read-through (R), erythrocyte (E) and synaptic (S) AChE variant. The R-AChE is of special interest because it has additional non-catalytic functions, which are related to the regulation of cell growth, differentiation and apoptosis. The R-AChE specific peptide (ARP) was synthesized and is being tested for biological activity. Ongoing life cell imaging revealed that in contrast to a control peptide, ARP is able to induce cell death in cultured human GCs.

Summary/Conclusion AChE/BChE are GC-enzymes which can counteract the ACh-actions in the ovary. In human GCs, three AChE variants are present. The soluble R-AChE variant appears to also act as a signaling molecule involved in the regulation of cell death. The expression of this AChE variant may be of importance for follicular/luteal biology.

Grants: Supported by DFG MA1080/19-1 and P51OD01102.

P059

Elektronenmikroskopische Analyse reifer Humanspermien nach Induktion von Apoptose und Akrosomenreaktion

C. Springsguth¹, G. Fitz², S. Grunewald¹, U. Paasch¹

¹Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Andrologie; ²Institut für Anatomie, Elektronenmikroskopie, Universität Leipzig, Deutschland

Fragestellung Die Aktivierung des programmierten Zelltodes in humanen Spermien hat einen negativen Einfluss auf die männliche Fertilität. Jedoch wird kontrovers diskutiert, ob dies Relikte einer abortiven Apoptose während der Spermatogenese sind oder ob ein aktiver Prozess vorliegt, der in der kontrollierten Degradation der Spermien endet. Daher sollte das Auftreten Apoptose-typischer morphologischer Veränderungen nach Apoptoseinduktion in reifen Humanspermien untersucht, von der Akrosomenreaktion (AR) abgegrenzt und mit der Aktivierung der Apoptose-signalkaskade korreliert werden.

Methodik Nach Aufbereitung mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden reife Spermien 20 gesunder Spendern in 5 Teile aliquotiert und inkubiert: 1.) Kontrolle, 2.) Oxidativer Stress (H₂O₂), 3.) Apoptoseinduktor Betulinsäure, 4.) Apoptose- und AR-induktor Thapsigargin und 5.) AR-induktor Kalzium-Ionophor A23187.

Zum Monitoring der Apoptoseinduktion erfolgte eine flowzytometrische Analyse folgender Spermienparameter: aktive Caspase-9 (CP9) und Caspase-3 (CP3), Integrität des mitochondrialen Membranpotenzials (MMP) und DNA-Fragmentationen (TUNEL-Assay). Zusätzlich wurde der Anteil akrosomen-

reagierter Spermien (CD46⁺) im FACS ermittelt. Die Analyse morphologischer Veränderungen erfolgte bei 10 der Spender in jeweils allen 5 Aliquots elektronenmikroskopisch (TEM). Bewertet wurden: Blasenbildung an der Membran, mitochondriale Veränderungen, Kernfragmentierung und Kernhüllendefekte sowie der Akrosomenstatus an jeweils mindestens 200 Spermien.

Ergebnisse In reifen Spermien gesunder Spender ließ sich Apoptose durch Inkubation mit Betulinsäure, aber auch mit Thapsigargin und Kalzium-Ionophor induzieren. Die Veränderungen waren nicht nur auf der Ebene der Signaltransduktionskaskade (MMP, CP9 und CP3, TUNEL) messbar, sondern konnten auch elektronenmikroskopisch in Analogie zum programmierten Zelltod anderer Zellen nachgewiesen werden (Blasenbildung an der Membran, mitochondriale Veränderungen, Kernfragmentierung und Kernhüllendefekte). Dabei korreliert die Aktivierung der Apoptose-Signalkaskade signifikant mit den elektronenmikroskopischen Veränderungen. Oxidativer Stress durch H₂O₂ führte nicht zur Aktivierung der Apoptose-Signaltransduktion, elektronenmikroskopisch ließ sich lediglich eine Alteration der Integrität der Zellmembran beobachten.

Sowohl Thapsigargin als auch Kalzium-Ionophor induzierten erwartungsgemäß zusätzlich eine Akrosomenreaktion.

Schlussfolgerung Es konnte erstmals an reifen Spermien gesunder Spender eine Induktion des programmierten Zelltodes mit Aktivierung der Apoptose-Signalkaskade und nachfolgender kontrollierter Degradation und den typischen morphologischen Apoptose-Zeichen bis hin zur Kernfragmentation nachgewiesen werden. Dies lässt das Konzept einer rein abortiven Apoptose in Humanspermien fraglich erscheinen. Die Induktion der Akrosomenreaktion mit Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels führt ebenfalls zum programmierten Zelltod. Oxidativer Stress schädigt die Zellmembran, weitere Apoptose-typische Veränderungen ließen sich zumindest durch H₂O₂ nicht auflösen.

P060

Vergleichende Charakterisierung 2- und 3-dimensionaler Kultivierungsmethoden von primären Granulosazellen und der Granulosa-Zell-Linie COV434

T. Bus¹, S. Winkler², A. Fritzsche², E. Schleußner¹, U. R. Markert¹, J. Pastuscheck¹

¹Placenta-Labor, Abteilung Geburtshilfe, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Jena; ²Zentrum für Reproduktionsmedizin Jena & Erfurt, Gemeinschaftspraxis Fritzsche & Hoffmann, Jena, Deutschland

Fragestellung Die Kultivierungsbedingungen von In-vitro-Zellkulturen beeinflussen sowohl Wachstum, Differenzierung und Proliferation als auch die Regulation ver-

schiedener Zellfunktionen. Veränderungen dieser Bedingungen wirken neben basalen Proliferations- und Wachstumsraten sowie der Ausprägung der Morphologie unter anderem auch auf Prozesse der Signalvermittlung und daraus resultierend auf die Expression von Genen und Synthese von Proteinen. Neben der konventionellen 2-dimensionalen (2D-) Kultivierung von Zellen in Kulturflaschen unter Standardbedingungen nimmt die Bedeutung und Entwicklung von 3-dimensionalen (3D-) Kultivierungsmethoden wie beispielsweise der Generierung von Sphäroiden rasant zu. Der Vorteil der 3D-Methodik liegt dabei in der verbesserten Annäherung von In-vitro- an In-vivo-Bedingungen, was die Analyse von Zellen unter nahezu natürlichen Bedingungen ermöglicht.

Eine für die Forschung häufig als In-vitro-Modell für primäre follikuläre Granulosazellen genutzte Zell-Linie ist die aus einem Granulosazelltumor isolierte immortalisierte Zell-Linie COV434. Ziel unserer Untersuchungen war, die Generierung von 3D-Sphäroiden und die Expressionsanalyse von Genen, welche für bedeutende Stammzellmarker codieren, vergleichend für primäre und COV434-Zellen zu analysieren.

Methodik Primäre Granulosazellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Follikelflüssigkeiten von Patientinnen mit ICSI/IVF-Behandlung isoliert. Die Kultivierung erfolgte unter konventionellen 2D-Bedingungen bis zu 14 Tagen oder zunächst in derselben Weise 3 Tage und anschließend in verschiedenen Zellzahlen mit unterschiedlichen 3D-Kultivierungsmethoden für die Generierung von Sphäroiden („Hanging Drops“, Suspensionskultur und Methylzellulosekultur). Zellen der COV434-Linie wurden analog der primären Zellen „2D“ und „3D“ kultiviert. Die Auswertung der Generierung von Sphäroiden erfolgte mikroskopisch in einem Zeitraum von bis zu 21 Tagen (COV434-Zellen). Zu festgelegten Zeitpunkten der „2D“- und „3D“-Kultur wurden die Zellen geerntet, die mRNA isoliert und die Expression der Stammzellmarker *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* und *NOTCH1* mittels PCR analysiert.

Ergebnis Die Kultivierung der COV434-Zell-Linie unter 3D-Bedingungen, insbesondere mit der Suspensionskultur-Methode, führte zur Bildung von Zellkonglomeraten im Gegensatz zu den von der 2D-Kultur bekannten Monolayern. Die Generierung von COV434-Sphäroiden war über einen Zeitraum von bis zu 21 Tagen mit der „Hanging drop“- und der „Methylzellulose“-Methode nicht möglich und formierte mittels der 3D-Suspensionskultur nur vereinzelt Sphäroide nach 14 bis 21 Tagen. Vergleichend dazu war eine Generierung von Sphäroiden aus primären Granulosazellen bereits nach 2 Tagen mit der „Hanging drop“- und der Suspensionskultur-Methode in hoher Anzahl beobachtbar.

Die Ergebnisse der PCR zeigten, dass *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* und *NOTCH1* sowohl bei primären Granulosazellen als auch bei

COV434-Zellen unter 2D- und 3D-Kultivierungsbedingungen konstitutiv exprimiert wurden.

Schlussfolgerung Zusammenfassend zeigen die ersten Experimente mit den hier verwendeten 3D-Kultivierungsmethoden, dass eine mögliche Generierung von Sphäroiden vom verwendeten Granulosazelltyp (immortalisierte Tumorzell-Linie COV434 oder primäre Zellen) abhängt. Grundsätzlich kann sich die Morphologie von COV434-Zellen unter 3D-Kultivierungsbedingungen im Gegensatz zu 2D-Monolayern in Annäherung an physiologische Bedingungen ändern (Konglomeratbildung).

Die beobachtete konstitutive Expression der Stammzellmarker *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* und *NOTCH1* scheint unabhängig vom Granulosazelltyp oder den untersuchten 2D- vs. 3D-Kultivierungsbedingungen zu sein. Die Genexpression und vor allem deren Bewandnis, der für die Pluripotenz von Zellen entscheidenden Stammzellmarker *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* und des für die Zelldifferenzierung bedeutenden Markers *NOTCH1* in Granulosazellen verschiedenen Typs ist weitgehend ungeklärt und bedarf weiterführender Analysen.

P061

Expression and Function of miR-519d and miR-134 in Trophoblast Cells

D. M. Morales-Prieto, S. Ospina-Prieto, W. Chaiwangyen, E. Schleußner, U. R. Markert
Placenta-Lab, Department of Obstetrics, University Hospital Jena, Germany

Objectives Recent studies revealed a group of miRNAs specifically expressed during pregnancy and whose expression correlates with gestational age. MiRNAs regulate cell processes including proliferation and invasion. Therefore, an important role of miRNAs in the control of trophoblast behaviour may be expected. Studying the miRNome in trophoblast cells is restricted by the short lifespan and lack of proliferation *in vitro*. For this reason, trophoblastic cell lines are frequently used as models. We analyzed the miRNome of isolated trophoblast cells and compared it with that of trophoblastic cell lines. Further, functions of miRNAs miR-519d and miR-134 belonging respectively to the pregnancy-specific C19MC and C14MC were investigated.

Methods Total RNA was isolated from cytotrophoblast cells from healthy first and term placentae and the cell lines HTR-8/SVneo, JEG-3, ACH-3P and AC1-M59. Expression level of 762 miRNAs was quantitatively analyzed by TaqMan Human MicroRNA Arrays. Silencing of either miR-519d or miR-134 by miRNA-inhibitors was performed in JEG-3 and HTR-8/SVneo cells. After silencing, cell proliferation and invasion were assessed by BrdU and Matrigel analysis.

Results In first trimester trophoblast cells, C14MC members are high expressed while C19MC members are low expressed. This profile changes in third trimester in which C19MC species are high while C14MC species are low expressed. Unsupervised clustering analysis revealed that profile of primary cells were more similar to those in JEG-3, ACH-3P and AC1-M59 cells than to HTR-8/SVneo cells. JEG-3 cells do not express miRNAs of the cluster C14MC, while HTR8/SVneo cells do not express C19MC miRNAs. Silencing of miR-519d increased JEG-3 proliferation but reduced their invasion ability. MiR-134 inhibition resulted in an increased in HTR-8/svneo invasion while no changes in proliferation were observed.

Conclusion Primary trophoblast cells and cell lines differ in the miRNA profile which confirms that results obtained from trophoblast cell lines may require further validation. Our results suggest a regulatory role of miR-519d and miR-134 in the proliferation and invasion of trophoblastic cells.

P062

Die CXCL1-Expression wird in endometrialen Stromazellen unabhängig von Syndecan-1 über den MAPK-Signaltransduktionsweg reguliert

Q. Altergot-Ahmad, S. J. Böldeker, D. M. Baston-Büst, J. S. Krüssel, A. P. Hess
UniKiD, Universitäts-Frauenklinik Düsseldorf, Deutschland

Fragestellung Eine erfolgreiche Implantation des Embryos in die maternale Dezidua ist einer der essenziellen Vorgänge auf dem Weg zu einer intakten Gravidität. Dieser hochsensible Prozess wird durch eine Reihe von verschiedenen Zytokinen, wie Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Modulationsfaktoren, die in verschiedene Signalwege eingebunden sind, geregelt. CXCL1 (*C-X-C motif ligand 1*), eines der wichtigsten Chemokine während der Implantation, agiert durch eine G-Protein-gekoppelte „Second messenger“-Kaskade mittels seines Rezeptors CXCR2 (*C-X-C receptor 2*) und des Ko-Rezeptors Syndecan-1 (Sdc-1). Vorangegangene Studien unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass ein Sdc-1-Knock down in der endometrialen Stromazell-Linie St-T1 zu einem veränderten Expressionsmuster der Chemokine und angiogenetischer Faktoren nach Dezidualisierung und Behandlung mit Embryostimuli führt. In dieser Studie soll nun untersucht werden, inwieweit der Sdc-1-Knock down einen Einfluss auf die CXCL1-Expression hat und über welche Signaltransduktionswege dieser vermittelt wird.

Methodik Der stabile und induzierbare Sdc-1-Knock down wurde mittels RNA-Interferenz in die immortalisierte endometriale Stromazell-Linie St-T1 eingebracht. Die so entstandene Knock-down-Zell-Linie KdS1

und die originäre Zell-Linie St-T1 wurden nach Inkubation mit Dezidualisierungshormonen zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und Progesteron (P_4) mit Inhibitoren gegen *mitogen activated protein kinase* (MEK) und *c-Jun N-terminal kinases* (JNK) behandelt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Embryosurrogatmarkers Interleukin-1 β (IL-1 β). Die Zellüberstände wurden mittels ELISA auf CXCL1-Expression untersucht und die behandelten Zellen mithilfe einer Phenol-Chloroform-Extraktion einer RNA- und Proteinisolierung unterzogen. Der Dezidualisierungsnachweis erfolgte mittels Amplifikation des Dezidualisierungsmarkers Prolaktin durch eine Standard-PCR.

Ergebnisse Nach Behandlung der beiden Zell-Linien KdS1 und St-T1 mit Dezidualisierungshormonen cAMP und P_4 für 72 h (dKdS1, dSt-T1), Vorinkubation der Zellen mit MEK- und JNK-Inhibitoren für 2 h und IL-1 β für 48h konnte nach Auswertung der Zellüberstände mittels ELISA eine signifikante Abnahme der CXCL1-Expression mit steigender MEK-Inhibitor-Konzentration beobachtet werden. Die Inkubation der dKdS1- und dSt-T1-Zellen mit unterschiedlichen JNK-Inhibitor-Konzentrationen zeigte keine signifikanten Änderungen der CXCL1-Expression.

Schlussfolgerung Die Inhibierung der c-Jun-Aktivität hatte keine signifikante Auswirkung auf die CXCL1-Expression, sowohl in dKdS1- als auch in dSt-T1-Zellen. Sodass davon ausgegangen werden kann, dass die JNK-Signaltransduktionskaskade nicht in den Expressionsvorgang von CXCL1 involviert ist. Die Inkubation der Zellen dKdS1 und dSt-T1 mit dem Inhibitor der MAP-Kinase führte zu einer signifikanten Expressionsabnahme des Chemokins CXCL1, jedoch konnten zwischen den beiden Zell-Linien keine Unterschiede in der Expression von CXCL1 beobachtet werden. Demnach wird die CXCL-Expression höchstwahrscheinlich unabhängig von Sdc-1 über den MAPK-Signalweg reguliert.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass Sdc-1 zwar keinen Einfluss auf die Expression des Liganden CXCL1 hat, jedoch könnte die Abwesenheit des Ko-Rezeptors die Aktivierung der G-Protein-gekoppelten *second messenger* Kaskade durch CXCL1 stören und damit die humane embryonale Implantation negativ beeinflussen. Dysregulationen des MAPK-Signaltransduktionsweges können möglicherweise zu erheblichen Beeinträchtigungen des Implantationsvorgangs führen und damit die Etablierung einer regelrechten Schwangerschaft gefährden.

P063

HTR8/SVneo, but not JEG3, Cells Display Trophoblast Progenitor Cell-like Characteristics Indicative of Self-Renewal, Repopulation Activity and Expression of “Stemness“-Associated Transcription Factors

M. Weber, I. Knoefler, E. Schleussner, U. R. Markert, J. Fitzgerald
Placenta-Labor, Abteilung Geburtshilfe, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Jena, Germany

Introduction JEG3 and HTR8/SVneo cells are popular trophoblastic cell lines for use as models of extravillous trophoblast. Recently, choriocarcinoma is thought to constitute a population of tumor with preserved stem cell properties. Furthermore, a side-population of HTR8/SVneo cells demonstrated self-renewal characteristics. Aim of this study was to correlate expression of various transcription factors associated with “stemness”, cell fate and trophoblast stem cells in these popular cell lines with stem/progenitor cell-like functions e.g. self-renewal and repopulation activity.

Methods JEG3 and HTR8/SVneo cells were propagated in hanging drops to assess spheroid formation, then multi-passaged. The expression of NOTCH1, SOX2, OCT4, NANOG and CDX2 was investigated per immunocytochemistry and immunofluorescence, and then correlated with spheroid formation capacity. HTR8/SVneo spheroids were confronted with placental explants (after elective caesarian sections).

Results HTR8/SVneo, and to a much lesser degree JEG3, displayed self-renewal properties by forming spheroids that could be multi-passaged (> 5 vs 1 passage respectively). HTR8/SVneo expressed most transcription factors (CDX2⁺, NOTCH1⁺, SOX2⁺, NANOG⁺) in contrast to JEG3 (CDX2⁺, NOTCH1⁺). HTR8/SVneo spheroid cells cover and seem to repopulate chorionic villi of placental explants.

Discussion These results indicate that HTR8/SVneo (spheroid) cells possess progenitor cell functions, which are possibly attained through corrupted “stemness“-associated transcription factor networks. HTR8/SVneo cells are probably a better model of the cytotrophoblast- than the extravillous trophoblast-phenotype.

P064

Isolated Peritubular Cells of Semiferous Tubules under Culture Conditions

C. Feuerstacke¹, S. Tasch², I. Schneider-Hüther², A. Mietens², R. Middendorff

¹Institut für Anatomie und Zellbiologie, Signaltransduktion; ²Institut für Anatomie und Zellbiologie, Gießen, Germany

Introduction The wall of human seminiferous tubules consists of so-called peritubular cells, building several layers. These peri-

tubular myofibroblasts are contractile and crucial for the transport of immature sperm towards the epididymis. Men with impaired spermatogenesis show alterations of the testicular tubular wall resembling fibrotic remodeling. Excessive deposition of extracellular matrix proteins may fundamentally influence the contractile function of peritubular cells. Previous studies examining isolated arterial smooth muscle cells (SMCs) from human aorta under culture conditions show a phenotypic change from contractile to synthetic, proliferative phenotype. The synthetic type is characterized by a loss of contractile elements [1] and increase of proliferation rate. In the present study we investigated whether the myofibroblast phenotype is preserved in proliferating, isolated peritubular cells under culture conditions.

Material and Methods To study peritubular cells and their function, we used human testicular biopsies with regular lamina propria for primary culture of peritubular cells according to Albrecht et al. [2]. Biopsies were also fixed in Bouin's solution and embedded in paraffin for morphological studies of cells in their regular environment without culturing. To assign in detail the character of the isolated cells we used immunofluorescence staining with specific markers to show contractile (SMA and calponin) and fibroblast (vimentin and CD90) characteristics in vitro. Cell proliferation was evaluated by the proliferation marker Ki67. Statistical analyses of different staining patterns were performed after cell counting. Furthermore, we also investigated gene expression pattern of contractile and fibrotic markers. Therefore, we assessed relative amounts of various markers for contractile [SMA, cGMP-dependent protein kinase I (PKG1), myosin-heavy chain 11 (MYH11), calponin and smoothelin] and fibrotic cells (CD90, vimentin, collagen I and fibronectin) with Real Time PCR. Data were analyzed with GraphPad Prism (GraphPad Software, USA). For immunostainings we used passages 0 to 6 and for Real Time PCR experiments we used passages 3 to 6.

Results By fluorescence staining we could detect SMA, vimentin and CD90 in all isolated, cultured peritubular cells of all passages. In agreement, we could demonstrate a co-localization of calponin and CD90 demonstrating a myofibroblast phenotype of cultured cells. The proliferation rate, indicated by Ki67, did not alter from passage 3 to 6. In parallel experiments, however, we found that the proliferation marker Ki67 is very low in passage zero, when cells migrate from the tubular wall, in comparison to higher passages, suggesting that migration instead of proliferation dominates under these conditions.

The mRNA levels were measured in all cells and showed the quantitative proportion of fibroblast and contractile markers normalized to the housekeeping gene RPL30. In all passages fibroblast and smooth muscle markers were detectable, but the expression of fibroblast markers (CD90, vimentin, collagen I and fibronectin) was regularly higher in

comparison to contractile markers (SMA, PKGI, MYH11, calponin and smoothelin).

Conclusion Our data show that cultured peritubular cells of diverse passages are not a mixed culture of smooth muscle cells/myofibroblasts and fibroblasts since we could show a co-localization of contractile (calponin) and fibroblast (CD90) markers in all cells. The mRNA data reveal that expression of genes characteristic for fibroblasts predominates under culture conditions, but that smooth muscle cell-specific genes are also expressed at all time points. Thus, our data further support the idea that a myofibroblast phenotype of isolated human peritubular cells is preserved during long term culture.

References:

1. Rybalkin SD et al. J Clin Invest 1997; 100: 2611–21.
2. Albrecht M et al. J Clin Endocrinol Metab 2006; 1956–60.

Grants: DFG, KFO181.

P065

ISG15-Expression in der humanen Plazenta

A. Schanz¹, D. M. Baston-Büst¹, C. Heiss², I. Beyer¹, J. S. Krüssel¹, A. P. Hess¹

¹UnikID, Universitäts-Frauenklinik; ²Kardiologie, Pulmologie und Gefäßmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland

Fragestellung Exprimiert der humane Zytrophoblast *interferon stimulated gene 15* (ISG15)?

In der Etablierung einer Schwangerschaft und deren weiterem Fortgang spielt der Dialog zwischen dem Endometrium, der späteren Dezidua, und dem Embryo eine große Rolle. Die Induktion von ISG15 in der Dezidua durch embryonale Faktoren scheint dabei den Schwangerschaftserhalt und -entwicklung zu fördern. ISG 15 ist ein Ubiquitin-ähnliches Protein, welches an verschiedenen intrazellulären Prozessen beteiligt ist, u. a. RNA-„splicing“, Organisation des Zytoskeletts, Stressreaktionen aber auch Abwehrmechanismen bei bakteriellen Infektionen.

Bislang ist nicht bekannt, ob ISG15 auch in der humanen Plazenta eine Rolle spielen könnte und speziell welche Zellen ISG15 zu unterschiedlichen Schwangerschaftszeitpunkten exprimieren. Diese Fragen dienen als Basis für die hier vorgestellte qualitative Studie.

Methodik Immunhistochemie wurde für ISG15 in Paraffin eingebettetem Plazentagewebe von allen Trimestern (I. n = 5, II. n = 5, III. n = 3) nach einer etablierten Methode des Herstellers (Vector Laboratories, Burlingame, USA) durchgeführt. Die Erstantikörperbindung (anti-ISG15 von Abgent) wurde mit VECTASTAIN ABC und DAB Peroxidase Substrat Kits (Vector) detektiert. Als negative Kontrolle diente unspezifisches IgG anstatt des ersten Antikörpers. Die Ergebnisse wurden semi quantifiziert durch die Verwendung der gleichen Mikroskopeinstellungen und ausgewertet von 3 verschiedenen Untersuchern.

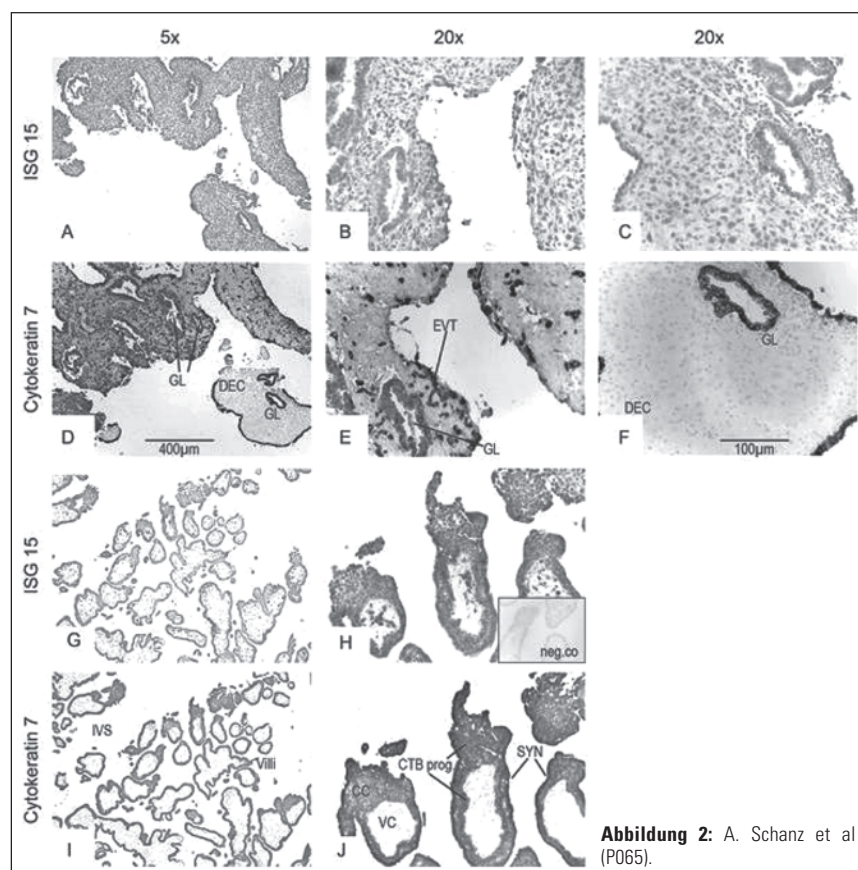


Abbildung 2: A. Schanz et al (P065).

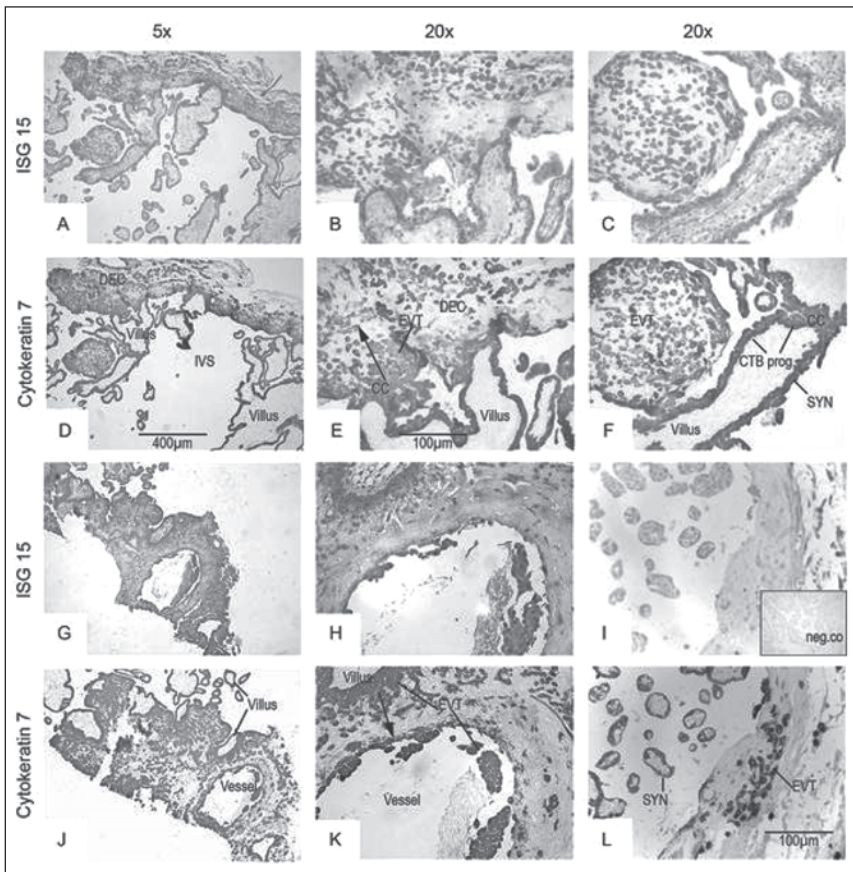


Abbildung 3: A. Schanz et al. (P065).

Ergebnisse ISG15 wurde vom extravillösen, invasiven Zytotrophoblasten in der mütterlichen Wand als auch in den Blutgefäßen exprimiert. Zusätzlich ließ sich ISG15 in Zytotrophoblasten im Plazentavillus darstellen. Die Expression beschränkte sich auf das erste und zweite Trimester. Die Untersuchung des dritten Trimesters ergab keine Expression von ISG15 in der Plazenta.

Schlussfolgerung ISG15 wird vom Zytotrophoblasten ausschließlich im 1. und 2. Trimenon exprimiert und scheint eine Rolle bei der placentaren Entwicklung zu spielen. Da ISG15 an verschiedenen intrazellulären Vorgängen beteiligt ist, kann die Bedeutung von ISG15 zum Beispiel bei der Invasion des Zytotrophoblasten oder auch Differenzierung vielfältig sein. Zudem ist ISG15 auch bei Abwehrmechanismen von bakteriellen Infektionen, insbesondere Mykobakterien involviert, und könnte somit auch eine schützende Rolle für die sich entwickelnde Schwangerschaft übernehmen (Abb. 2, 3).

P066

Raman Microspectroscopy: a Powerful Tool to Characterize Cell Composition

V. Sanchez¹, S. Mader¹, M. Dechant¹, J. Wistuba¹, M. Boian², S. Kliesch¹, S. Schlatt¹, C. Mallidis¹
¹Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University of Münster; ²Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, Münster, Germany

Background and Aim Different types of molecular vibrations are represented in Raman spectra. Each peak in a spectrum corresponds to molecular groups that are present in different biomolecules and can thus be used as indicators of specific components. Each cell provides a unique Raman profile resulting from the biochemical features at the point of the measurement. The information obtained from the Raman acquisitions can be used to describe and characterize a cell according to its composition. Moreover, if multiple Raman measurements are done at different depths, then three-dimensional information can be collected, in contrast to the 2D analyses that are normally available by other microscopic approaches. Our aim was to appraise the method's potential to describe and characterize cell composition.

Methods A detailed Raman analysis was performed on sperm and oocytes using a confocal Raman system (LabRAM Aramis, HORIBA, Jobin Yvon). Spectral maps were

acquired from multiple positions throughout the cell in the X,Y and Z axes. The resulting multidimensional spectral arrays were analyzed using the modelling option of the LabSpec6 software. Reference spectra were selected based on the main differences in spectral features (e.g. band intensity or position) in bands indicative of certain components (e.g. protein). After assigning a color to each reference, the regions in the cell matching each reference were localized and displayed in hyperspectral representations.

Results Three-dimensional representations of sperm and oocytes were obtained. The positions of cell components were localized based on specific bands (e.g. 1004 cm⁻¹-phenylalanine; 1092 cm⁻¹-DNA phosphate backbone) giving an accurate representation of the cells' inner chemical composition (e.g. metabolic products, structural constituents). In sperm, not only were different cell compartments (e.g. acrosome, nucleus) identified but also regions of high DNA damage could be localized within the cell.

Conclusions Raman multiarray profiling of cells provides a descriptive analysis and characterization of their chemical composition. This powerful tool allows for the acquisition of detailed information leading to a better understanding of cellular composition and localization of its various components.

P067

LASP-1 wird in extravillösen Trophoblastzellen und Chorionkarzinomzellen exprimiert und beeinflusst die Migrations- und Proliferationsaktivität

S. E. Segerer¹, M. Kapp², N. Müller³, E. Butt⁴, U. Kämmerer²

¹Endokrinologikum Hamburg; ²Universitäts-Frauenklinik, Würzburg; ³Institut für Immunologie, Würzburg; ⁴Institut für klinische Biochemie, Würzburg, Deutschland

Fragestellung Die Invasion extravillöser Trophoblastzellen in das dezidualisierte Endometrium ist durch eine kontrollierte Migration und einen mitotischen Arrest dieser Zellpopulation im Laufe ihrer Differenzierung charakterisiert. Dagegen kommt es bei der Entwicklung eines Chorionkarzinoms zum Ausfall dieses mitotischen Arrests, was im Verlauf zu einer unkontrollierten Metastasierung der Chorionkarzinomzellen in den mütterlichen Organismus führt. Im Rahmen ihres Migrationsprozesses beginnen Chorionkarzinomzellen ihre Morphologie zu verändern: Es kommt zur Ausbildung eines Pseudopodiums, welches die Zellbewegung erleichtert. Zur Unterstützung dieses Vorgangs der repetitiven Membranextension sind Aktin-Bindungsproteine erforderlich.

Untersuchungen hatten ergeben, dass das „LIM und SH3 Protein 1“ (LASP-1) eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des Aktinzytoskeletts von Mammakarzinomzellen spielt. Ziel dieser Studie war daher die Analyse der LASP-1-Expression in extra-

villösen Trophoblastzellen und Chorionkarzinomzellen, und die Untersuchung der funktionellen Bedeutung dieser Zytoskelettproteine.

Methodik Zunächst wurde die Expression von LASP-1 immunhistochemisch in dehydriertem Gewebe (7.–9. SSW) und in primären Chorionkarzinomen untersucht und in Folge das spezifische Expressionsmuster anhand von Chorionkarzinomzelllinien (JEG, JAR) mittels RT-PCR, Western Blot und immunzytochemischen Färbungen analysiert. Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung von LASP-1 in Chorionkarzinomzellen wurde die LASP-1-Expression mittels Transfektion gesenkt und in Folge die Proliferationsaktivität und Migrationsrate der Chorionkarzinomzellen per WST-8-Test und Matrigel Migrationsassay untersucht.

Ergebnisse Die immunhistochemischen Färbungen zeigten, dass LASP-1 in humanen extravillösen Trophoblastzellen und in primären Chorionkarzinomen exprimiert wird. Diese Beobachtung konnte ebenfalls in den Chorionkarzinomzell-Linien JEG und JAR bestätigt werden. Eine Senkung der LASP-1-Expression mittels spezifischer siRNA führte zu einer Reduktion der Proliferations- und Migrationsrate der Chorionkarzinomzellen.

Schlussfolgerung In dieser Studie konnte erstmalig die Expression von LASP-1 in extravillösen Trophoblasten und Chorionkarzinomzellen dargestellt werden. Da LASP-1 eine wichtige Rolle bei der Migrations- und Proliferationsaktivität in den Chorionkarzinomzellen zu spielen scheint, könnte möglicherweise auch die Plazentation durch LASP-1 beeinflusst werden.

■ Reproduktionsgenetik

P068

Mutationsanalysen im *RSPO1*-Gen bei prämaturner Ovarialinsuffizienz

A.-C. Tewes, P. Wieacker, S. Ledig
Institut für Humangenetik, Münster, Deutschland

Einleitung Prämaturne Ovarialinsuffizienz (premature ovarian failure, POF) ist durch das Auftreten einer hypergonadotropen Amenorrhoe vor dem 40. Lebensjahr charakterisiert. Die Ovardysgenese (OD), welche durch den Verlust der Follikel bereits bei der Geburt gekennzeichnet ist, kann als schwerste Manifestation der POF angesehen werden. Neben exogenen Faktoren kommen bei der POF genetische Veränderungen wie Chromosomenaberrationen oder Gendefekte als Ursachen in Frage.

RSPO1 ist ein sezernierter Aktivator des kanonischen β -Catenin-Signalwegs und stellt einen wichtigen Regulator der Ovarientwicklung dar. Im Ovar induziert *RSPO1* die *WNT4*-Expression und gemeinsam bewirken *RSPO1* und *WNT4* in synergistischer Weise die Stabilisierung von β -Catenin, wo-

durch *SOX9* und somit eine Entwicklung in Richtung Testis gehemmt wird. Ein konditionaler Knock out von *RSPO1* in den Gonaden von weiblichen Mäusen führte zur Bildung hypoplastischer Gonaden bis hin zu Ovotestis, in denen die Zahl der Keimzellen vermindert war. Zusätzlich zeigten diese keinen Eintritt in die Meiose und ihre Anzahl verminderte sich dramatisch nach der Geburt. Beim Menschen sind homozygote Mutationen des *RSPO1*-Gens in seltenen Fällen bei einer syndromalen Form des SRY-negativen XX-Mann-Syndroms berichtet worden.

Fragestellung R-spondin-1 fungiert als Aktivator des Wnt/ β -Catenin-Signalweges und spielt somit eine Rolle bei der Ovarientwicklung und dem Erhalt der Keimzellen. Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob genetische Variationen im *RSPO1*-Gen mit einer POF/OD assoziiert sind.

Methoden Sequenzanalysen nach Sanger bei einem Kollektiv von 151 Patienten mit einer POF/OD. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mithilfe des Programms CodonCode®. Detektierte genetische Veränderungen wurden mit dem Programm Alamut® analysiert und auf ihr Risikopotential hin überprüft.

Ergebnisse Bei 23 der 151 untersuchten Patientinnen (15 %) wurde eine Sequenzveränderung im *RSPO1*-Gen nachgewiesen, welche zu einem Aminosäureaustausch (p.Lys162Gln) führt und nach der Software PolyPhen-2 als eventuell krankheitsverursachend einzustufen ist (Score > 0,6). Bei der nachgewiesenen Sequenzvariante handelt es sich um eine Missense-Variante, die allerdings in der dbSNP-Datenbank mit einer *Minor allele frequency* (MAF) von ca. 5 % angegeben wird. Jedoch konnte die Variante p.Lys162Gln in 2 familiären Fällen nur bei einer der betroffenen Schwestern detektiert werden.

Zudem wurde bei einer Patientin eine andere Missense-Variante nachgewiesen, die nicht in der dbSNP-Datenbank aufgeführt ist. Diese Missense-Variante verursacht zwar einen Aminosäureaustausch (p.Thr15Met) der allerdings von der Software PolyPhen-2 als unbedenklich eingestuft wird (Score = 0,0). Zudem konnte bei der Schwester der Patientin, welche ebenfalls eine POF aufweist, diese Variante nicht detektiert werden.

Schlussfolgerung In dieser Studie wurde die seltene *RSPO1*-Variante p.Lys162Gln 3-fach häufiger als in der Normalbevölkerung bei POF/OD-Patientinnen nachgewiesen, womit diese als möglicherweise krankheitsrelevant einzustufen ist. Jedoch segregierte die Variante bei 2 familiären Fällen nicht mit der Erkrankung. Dennoch könnte p.Lys162Gln einen Risikofaktor darstellen. Um diese Hypothese sowie die Auswirkungen der Veränderung auf die Funktion des R-spondin-1-Proteins zu überprüfen, sollen funktionelle Analysen folgen. Ferner sollte in einer weiteren Untersuchung mit einem größeren Patienten- sowie Kontrollkollektiv die Häufigkeit dieser Variante in

den jeweiligen Kohorten bestimmt werden. Des Weiteren wurde bei einer Patientin mit einer familiären POF eine nicht in dbSNP gelistete Missense-Variante nachgewiesen. Diese Veränderung segregiert aber nicht mit der Erkrankung in der Familie und kann somit nicht allein krankheitsursächlich sein.

P069

Heterozygote Mutationen der Gene *LHX1* und *HNF1B* als Ursache für Entwicklungsstörungen der Müller'schen Gänge

S. Ledig¹, K. Ralf², T. Römer³, C. Schippert⁴, M. Bonir⁵, J. Huckle⁶, S. Brucker², P. Wieacker¹

¹Institut für Humangenetik, Münster; ²Universitäts-Frauenklinik, Universitäts-Klinikum, Tübingen; ³Klinik für Gynäkologie, Evangelisches Krankenhaus Köln-Weyertal, Köln; ⁴Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Medizinische Hochschule Hannover; ⁵Microarray Facility – Medizinische Genetik, Universitäts-Klinikum, Tübingen; ⁶Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Agaplesion Bethesda Krankenhaus, Wuppertal, Deutschland

Einleitung Fusionsanomalien der Müller'schen Gänge wie Uterus bicornis, Uterus septus oder subseptus treten mit einer Inzidenz von ca. 5 % bei infertilen Frauen auf. Das Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser-Syndrom (MRKHS) ist durch eine kongenitale Aplasie des Uterus und der oberen 2/3 der Vagina bei Frauen mit in der Regel unauffälligen Ovarien und einem 46,XX-Karyotyp charakterisiert. Das MRKHS kann isoliert (Typ I) oder im Zusammenhang mit verschiedenen Malformationen als Typ II auftreten. Bis heute ist die zugrunde liegende Ätiologie in den meisten Fällen der Störungen der Müller'schen Gänge weitgehend ungeklärt. In den letzten Jahren konnte jedoch mittels hochauflösender Array-CGH (comparative genomic hybridization) und MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) bei ca. 4–6 % der Patientinnen mit Störungen der Müller'schen Gänge heterozygote Verluste in der chromosomalen Region 17q12 als ursächlich identifiziert werden. Innerhalb des kleinsten allgemeinen Deletionsintervalls sind 2 potenzielle, starke Kandidatengene lokalisiert: *LHX1* und *HNF1B*. Hinweise auf *LHX1* als Kandidat stammen von Untersuchungen an Mäusen. Weibliche Mäuse mit einem Knock out des *LHX1*-Gens weisen neben einem komplexen Fehlbildungsphänotyp auch eine Aplasie der Müller'schen Gänge auf, während Mutationen des *HNF1B* typischerweise mit Nierenzysten und einem Diabetes (OMIM 1379209) assoziiert sind. Jedoch wurden zusätzlich bei einigen Frauen mit heterozygoten *HNF1B* Mutationen auch Fehlbildungen der Müller'schen Gänge berichtet.

Fragestellung Es sollte geklärt werden, ob Mutationen der innerhalb des allgemeinen Deletionsintervalls in 17q12 lokalisierten Gene *LHX1* und *HNF1B* mit Fehlbildungen der Müller'schen Gänge assoziiert sind.

Methoden Die Gene *LHX1* und *HNF1B* wurden bei einer Kohorte von 225 Patientin-

nen mit Störungen der Müller'schen Strukturen mittels direkter Sequenzierung untersucht. 141 der analysierten Patientinnen haben ein MRKHS, während die restlichen 84 Patientinnen Fusionsstörungen der Müller'schen Gänge aufweisen.

Ergebnisse Bei einer Patientin mit einem MRKH Typ II wurde eine heterozygote Frameshift-Mutation im *LHX1* nachgewiesen, durch die ein vorzeitiges Stop-Codon generiert wird. Bei einer weiteren MRKH-Typ-I-Patientin konnte im *LHX1*-Gen eine heterozygote Missense-Mutation detektiert werden. Bei weiteren 5 Patientinnen mit Störungen der Müller'schen Strukturen wurden Missense-Mutationen nachgewiesen, die zwar in der dbSNP-Datenbank für polymorphe Veränderungen gelistet sind, jedoch mit einem MAF-Wert von 0,003–0,005 aufweisen. Die Sequenzanalyse des *HNF1B*-Gens bei dem oben beschriebenen Patientenkollektiv führte zur Detektion von 6 potentiellen Splice-site-Mutationen bei 3 MRKH-Patientinnen sowie 3 Patientinnen mit Fusionsstörungen der Müller'schen Gänge.

Schlussfolgerung Heterozygote Mutationen der Gene *LHX1* und *HNF1B* kommen als Ursache für die heterogene Gruppe der Störungen der Müller'schen Strukturen in Frage und sollten im Anschluss an eine unauffällige Array-CGH-Analyse untersucht werden. Nach aktuellem Kenntnisstand handelt es sich bei *LHX1* um das erste Gen, das im Zusammenhang mit einem MRKHS identifiziert wurde. Um die Bedeutung der *HNF1B*-Veränderungen besser abschätzen zu können, sollten Untersuchungen auf RNA- und Proteinebene durchgeführt werden.

P070

Mosaicism for an Unbalanced Y;21 Translocation in an Infertile Man: a Case Report

A. Röpké¹, Y. Stratis¹, D. Dossow-Scheele¹, P. Wieacker¹, S. Kliesch², F. Tüttelmann¹

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

Purpose To report on an otherwise healthy infertile male patient with severe oligozoospermia caused by mosaicism for an unbalanced Y;21 translocation.

Methods Conventional karyotyping and array-CGH from blood and fluorescence in situ hybridisation (FISH) on spermatozoa.

Results Conventional cytogenetic analysis on peripheral lymphocytes revealed mosaicism of cells with an unbalanced Y;21 translocation found in 10 metaphases and an apparently normal karyotype in 20 metaphases summarised as 45,X,der(Y)t(Y;21)(q12;q21),-21[10]/46,XY[20]. FISH analysis demonstrated the presence of the subtelomeric probe DXYS224 on the derivative Y chromosome indicating a breakpoint close to the telomere of Yqter. Array-CGH analysis revealed loss of 9.2Mb spanning the chromo-

somal region 21q11.2-q21.2 containing 13 genes. Loss of Y chromosomal material was not observed. Both FISH and CGH also indicated mosaicism with aberrant and normal cells. The FISH analyses on spermatozoa with probes for region 21q11.2 and 21q22.3 and centromeric probes for the X and Y chromosomes showed a normal signal pattern with one normal chromosome 21 and one X or one normal Y chromosome in the majority of spermatozoa (73%). In contrast, 10% of the analysed spermatozoa showed only one normal chromosome 21 without any gonosomal signal.

Conclusions The translocation was not only the probably explanation of the man's spermatogenic failure, but has also implications for the clinical management. Fertilisation with spermatozoa lacking gonosomes will lead to 45,X embryos and preimplantation genetic diagnostics may therefore be advised.

Grants: This work was supported by grants from the German Research Foundation (DFG, TU 298/1-2 to F.T. and A.R.) and the German Society of Andrology (Young Researcher Award 2010 to F.T.).

P071

Mutationsanalyse im NR5A1-Gen bei 46,XY-Gonadendysgenese

J. Rehkämper, A.-C. Tewes, P. Wieacker, S. Ledig
Institut für Humangenetik, Münster, Germany

Einleitung Das *NR5A1*-Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 9 (OMIM 184757) kodiert für das Protein SF1 (steroidogenetic factor 1). Dieses spielt eine essentielle Rolle bei der Entwicklung der Gonaden und der Steroidsynthese. Es wird schon früh in den Genitalleisten exprimiert, später in den Gonaden, den Nebennieren, der Hypophyse und dem Hypothalamus. Entsprechend dieses Expressionsmusters wurden bei Mäusen mit homozygoter Deletion des *NR5A1*-Gens eine adrenale Agenesie, eine komplette testikuläre Dysgenese, die Persistenz Müller'scher Strukturen sowie Störungen des Hypothalamus und der Hypophyse festgestellt.

Beim Menschen wurden Mutationen des *NR5A1*-Gens zuerst bei Patienten mit primärer Nebenniereninsuffizienz und kompletter 46,XY-Gonadendysgenese beschrieben. Im Verlauf wurden weitere *NR5A1*-Mutationen auch bei isolierter XY-Gonadendysgenese, prämaturer Ovarialinsuffizienz, Oligo- oder Azoospermie und Hypospadien gefunden.

Fragestellung Nachdem in mehreren Studien *NR5A1*-Mutationen als ursächlich für 46,XY-Gonadendysgenesen beschrieben wurden, sollte mittels Sequenzanalyse in einem großen Patientenkollektiv die Häufigkeit von *NR5A1*-Mutationen bei 46,XY-Gonadendysgenese bestimmt werden.

Methoden Sequenzanalyse von *NR5A1* bei 84 Patienten mit 46,XY-Gonadendysgenese, die keine Mutation des *SRY*-Gens aufwiesen. Eingeschlossen wurden sowohl 72 Patienten mit isolierter Gonadendysgenese

als auch 12 Patienten mit syndromaler Form der XY-Gonadendysgenese.

Ergebnisse Die Auswertung ergab insgesamt 7 Mutationen des *NR5A1*-Gens bei 6 der 84 Patienten (7%). Es handelt sich in 4 Fällen um Missense-Mutationen. Eine betrifft eine Patientin mit syndromaler Form (Auffälligkeiten der Hypophysen- und Hypothalamusfunktion) und einer partiellen 46,XY-Gonadendysgenese. Bei einer anderen Patientin liegt der Basenaustausch im Bereich der Akzeptor Splice Site von Exon 5. Eine Deletion einer einzelnen Base fand sich bei einer weiteren Patientin, bei einer anderen eine Duplikation von 4 Basen. Beide Mutationen verursachen eine Verschiebung des Leserasters („frame shift“), wodurch in beiden Fällen ein vorzeitiges Stop-Codon entsteht. Neben der Duplikation weist letztere Patientin zudem 2 seltene SNP („single nucleotide polymorphisms“) auf.

Schlussfolgerung Die Häufigkeit von Mutationen des *SRY*-Gens bei 46,XY-Gonadendysgenese wird in Studien mit 15 % für größere Deletionen und 15 % für Punktmutationen, Insertionen und Deletionen weniger Nukleotide angegeben.

In dieser Untersuchung fand sich in 7 % der Fälle mit 46,XY-Gonadendysgenese mindestens eine Mutation im Bereich des *NR5A1*-Gens. Nach *SRY* kann *NR5A1* somit derzeit als das Gen angesehen werden, in dessen Bereich Mutationen am zweithäufigsten im Zusammenhang mit 46,XY-Gonadendysgenesen stehen. Daher sollte *NR5A1* bei Patienten mit 46,XY-Gonadendysgenese und einer unauffälligen *SRY*-Sequenz als nächstes Gen untersucht werden. Von den 7 detektierten Mutationen sind bisher 6 nicht beschrieben worden. Funktionelle Untersuchungen dieser bisher nicht bekannten Mutationen sollten durchgeführt werden, um ihre ursächlich pathologische Bedeutung zu klären.

P072

New Technologies and Strategies for the Analysis of DNA Methylation Dynamics in Testis

S. Laurentino¹, T. Haaf¹, S. Kliesch¹, J. Gromoll¹

¹Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University of Münster; ²Institut für Humangenetik, Würzburg, Germany

Background Spermatogenesis is a complex process involving a series of cellular events that culminate in the production of sperm. It is accompanied by widespread epigenetic reprogramming, including genome-wide chromatin remodelling and establishment of genomic imprints. In both the maternal and paternal germline the somatic imprints are erased and germ-cell specific ones are established. Failure in this mechanism can lead to imprinting diseases such as Prader-Willi and Angelman syndromes. Some studies have suggested that assisted reproduction techniques (ART) might increase the prevalence of imprinting disorders in the offspring, although this claim has yet to be proven. Nev-

ertheless, several studies have shown that altered sperm DNA methylation levels at some imprinted genes appear to be correlated with abnormal sperm parameters. Despite this, the pattern and timing of establishment of genomic imprints has not been thoroughly studied in the human male germline and neither has the cellular origin of the aforementioned imprinting defects.

Objectives and Experimental Design The objective of this work was to develop a sensitive and simple protocol enabling the study of DNA methylation levels in germ cells retrieved from fixed testicular tissues in order to be able to study the establishment of imprints in the human male germline. Highly pure fractions of spermatogonia, spermatocytes and round spermatids (each $n = 100$ cells) were collected by laser capture microdissection (PALM Microbeam, Zeiss). The fractions were dissected from 5 μm sections of testicular biopsies fixed in Bouin's fluid and embedded in paraffin. Tissues ($n \geq 3$ each group) displaying normal as well as disrupted spermatogenesis were used for comparison. DNA was isolated, subjected to bisulfite conversion, and amplified by bisulfite PCR using specific primers. Pyrosequencing was the method employed to analyse the methylation levels in several genes of interest, including imprinted genes.

Results and Conclusion The methods developed allowed the analysis of DNA methylation levels of several genes in samples containing as little as 100 laser-microdissected cells dissected from routinely fixed testicular biopsies. The procedure and parameters for the laser capture have been adjusted to work with each particular type of testicular cell. A DNA isolation and bisulfite conversion protocol was optimized to work easily with our small, Bouin fixed samples based on a commercially available kit. Moreover, sensitive bisulfite PCR and pyrosequencing assays were developed to enhance the amplification of the obtained DNA, enabling the study of DNA methylation in several genes. The methylation levels of repetitive element ALU, used as an internal control, confirmed the reliability of the method by showing levels within the same range as those previously observed in sperm. DNA methylation levels of LIT1 were, as expected for a maternally imprinted gene, low in spermatogenic cells. We could not detect statistically significant differences in LIT1 methylation between spermatogonia (5.23 ± 1.89), spermatocytes (3.42 ± 1.11), and round spermatids (1.47 ± 0.15) in samples showing normal spermatogenesis, indicating that the establishment of this imprint might occur at an earlier stage. This method circumvents the usual difficulties found in studying DNA methylation levels in clinical samples and might open new ways to dissect of epigenetic events in testis as well as clarify the cellular origin of epigenetic defects in spermatozoa.

Funding: This work was supported through a pilot project grant by IMF (Innovative Medizinische Forschung, Medizinische Fakultät Münster) and DFG Research Unit "Germ Cell Potential" (FOR1041/2).

P073

New Insights from Sperm Epigenome: Role of Repetitive DNA Elements in Establishment and Function of Sperm Chromatin

Y. Yang¹, B. Samans², M. Reichenbach³, S. Krebs⁴, G. Sarode¹, E. Wolf⁴, H. Blum⁴, T. Dansranjav¹, U. Schagdarsurengin¹

¹Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Molekulare Andrologie, Gießen; ²Research Centre for BioSystems, LandUse and Nutrition, Gießen; ³Molecular Animal Breeding and Biotechnology, Gene Center, Munich; ⁴Laboratory for Functional Genome Analysis (LAFUGA), Gene Center, Munich, Germany

Objective Extensive nucleosome-to-protamine exchange during spermiogenesis ensures a highly compacted, transportable paternal chromatin and a fertile sperm, respectively. Interestingly, mammalian spermatozoa exhibit 1% to 15% retained nucleosomes, which are hypothesized to be involved in future embryogenesis program by tagging genes with specific histone-modifications. However, the regularities of nucleosome-retention in sperm, its genome-wide distribution and function are still not clarified.

Material and Methods To get an alternative point of view on nucleosome-situation in sperm we avoided ChIP-procedures and sequenced the whole 146 bp mononucleosomal DNA fraction isolated from sperm. To isolate the 146 bp mono-nucleosomal DNA from human and bovine sperm we separated nucleosomal and protamine fractions from 10 million sperm cells, which were previously diluted in PBS and incubated with Lysolecithin. After DTT treatment, freed chromatin was digested with micrococcal nuclease and centrifuged to separate nucleosomal (supernatant) from protamine fraction (pellet). Each fraction was utilized for protein isolation and western blot analysis using antibodies against histone H3. Total DNA from nucleosomal fraction was isolated and separated on 2% agarose gel. To avoid non-nucleosomal DNA, 146 bp mono-nucleosomal DNA fragment was purified from the gel. Further, high throughput sequencing of 146 bp fraction was performed using Genome Analyzer IIx (Illumina). The sequencing reads were aligned to the precompiled bosTau7/hg19 genome using Bowtie. Functional areas associated with nucleosomal DNA were analyzed by applying CEAS. Nucleosome associated sites in functional gene areas were analyzed for Gene Ontology enrichment using DAVID. To test the nucleosome associated sites in different repetitive sequences in functional gene areas we used the probability test implemented in R. CpG-methylation in different repetitive DNA sequences and in promoters of nucleosome-free and nucleosome-rich genes was analyzed on bovine sperm DNA by COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) and bisulfite-sequencing through cloning in pGEM-T vector using appropriate primer sets. Nucleosome-free and nucleosome-rich genes were analyzed further regarding mRNA-expression

in bovine germ cells and early embryo stages (zygote, 2-cell, 4-cell, morula and blastocyst) by qRT-PCR using cyber green detection system and appropriate primer sets.

Results We found in 2 mammalian systems (human and bovine) that chromatin assembly in sperm is oriented on repetitive DNA elements and is, in this way, an evolutionary stable and predictable process. Sperm-nucleosomes were remained mainly in centromere repeats and in long and short interspersed nuclear elements within non-coding intergenic and intron sequences. In contrast, strong nucleosome depletion was found in exons, promoters, transcriptional start and termination sites (5'-UTR and 3'-UTR), and was associated particularly to low complexity DNA repeats, simple sequence repeats and DNA-mediated transposons. Unlike to previous reports, all homeobox genes were thoroughly freed from nucleosomes in both, promoter (~3000 bp from transcription start site) and gene body. The majority of detected intragenic nucleosomes was scattered in gene bodies, especially in genes coding for RNA-/protein-processing and cell-cell adhesion factors.

Conclusion Our study demonstrates the segmentation of mammalian sperm chromatin into "nucleosome-poor" and "nucleosome-rich" regions, which contrast in nature of covered DNA. We anticipate our findings to encourage a new point of view concerning the impact of sperm-derived nucleosomes. We suggest them to safeguard the paternal centromere function in earliest cell divisions and to be essential for activation of paternal chromatin and paternal expressional machinery, respectively.

P074

Germ Cell Loss in the 41,XX^y Mouse (KS mouse model) is associated with fading Expression and Deregulation of SSC Markers

S. Werler¹, H. Demond¹, O. Damm¹, J. Ehmcke², R. Middendorff³, J. Gromoll¹, J. Wistuba¹

¹Centre for Reproductive Medicine and Andrology;

²Central Animal Facility, University Clinics Münster, Germany; ³Institute for Anatomy and Cell Biology, Gießen, Germany

Background and Aim Klinefelter Syndrome (KS) is a male sex-chromosomal disorder (47,XXY) causing hypergonadotropic hypogonadism, cognitive and metabolic deficits. The majority of patients are infertile due to germ cell loss after puberty. However the cause of the germ cell depletion including the underlying molecular mechanisms and the exact time course, i.e. when germ cells begin to fade remains unresolved. We utilized our 41,XX^y mouse model resembling KS to characterize the affected germ line during postnatal life. Specifically we aimed at testicular marker expression focussing on spermatogonial stem cell (SSC) markers as well as at their molecular regulation. Furthermore, proliferation and apoptotic events were examined. Performing these approaches,

our aim was to obtain a detailed characterization of the germ cell loss observed in males with a supernumerary X-chromosome.

Materials and Methods Testis of postnatal and adult 41,XX^Y* mice and 40,XY* littermate controls (1dpp, 3dpp, 5dpp, 10dpp, adult; n = 3) were analysed: 1.) Immunohistochemical detection of the stem cell markers Lin28 and Pgp9.5 and analysis of proliferation using PCNA as well as analysis of apoptosis using TUNEL staining and 2.) quantitative Real-Time PCR of the germ cell markers: Lin28, Oct4, Utf-1, Scp-3, Dazl, Vasa. Additionally, quantitative Real-Time PCR of the Lin28 regulating or regulated microRNAs miR-125b and miR-let7g were performed.

Results The germ cell number was already significantly reduced (five times) at day 1pp in 41,XX^Y* mice. Protein expression of Lin28 and Pgp9.5 was consistently decreased from day 1pp onwards (only 48.5% and 38.9% of all germ cells were positive), drastically dropped to 7.8% and 7.3% on day 3pp and was no longer detectable on days 5pp and 10dpp, respectively. In agreement, the differences in the number of proliferating tubular cells, marked by PCNA immunostaining, between wild-type and XX^Y* mice dramatically increased towards day 10pp. The mRNA expression of the germ cell markers Lin28, Oct4, Utf1, Vasa, Dazl and Scp-3 were all reduced and the Lin28 regulating miRNAs were deregulated in 41,XX^Y* mice. The number of apoptotic germ cells was not increased in 41,XX^Y* mice.

Conclusion We suggest a model for the course of germ cell loss starting already during the intrauterine period. Neonatally the reduced expression of SSC markers further fading during the first postnatal week implies a loss of “stemness” in the SSC population. The surviving cells exhibiting disturbed SSC characteristics are afterwards finally lost before or latest during induction of meiosis.

With the help of this study we were able to characterize the developmental time course of the germ cell fading and decipher parts of the regulatory mechanisms behind the phenomenon and these results can be translated to human Klinefelter patients.

Grants: This work was supported by the German Research Foundation [grant No. WI 2723/4-1].

P075

The human *RHOX* genes – Effect of Single Nucleotide Polymorphisms and Expression Pattern in Men with Impaired Spermatogenesis

J. Borgmann¹, J. Wistuba², F. Tüttelmann², S. Kliesch¹, J. Gromoll¹

¹Centre of Reproductive Medicine and Andrology;

²Institute for Human Genetics, Münster, Germany

Background Reproductive homeobox (*RHOX*) genes share a unifying 60 amino acid helix-turn-helix DNA motif called homeobox do-

main and were identified in several species as having important roles in reproductive tissues, notably in testis. *RHOX* knockout mice display a wide range of reproductive abnormalities and several lines of evidence indicate that their human counterparts also have roles in spermatogenesis and male fertility. The human *RHOX* gene cluster is composed of three genes located on the X chromosome at position Xq24: *RHOXF1*, *RHOXF2* and *RHOXF2B*. The latter two are arranged in a head-to-head orientation, share 99.8% sequence identity and thus are referred to as *RHOXF2/2B*. First data show that *RHOX* proteins are expressed exclusively by germ cells in human testis and that aberrant *RHOX* methylation is strongly associated with several sperm parameters.

Aim The objective of this study was to examine the role of the *RHOX* gene cluster in human spermatogenesis and its involvement in male infertility. Therefore, single nucleotide polymorphisms (SNPs) were analyzed in a large cohort of idiopathic infertile men and the expression pattern of *RHOX* protein was investigated in men with impaired spermatogenesis and compared to the expression in men with normal spermatogenesis.

Material and Methods Genomic DNA was extracted from blood samples of 30 subjects (10 female controls, 10 male controls and 10 idiopathic infertile patients), amplified through PCR and sequenced to identify possible polymorphisms in our patient cohort. A genotyping TaqMan[®] Assay (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) was performed in additional 343 infertile patients and the association between SNPs and clinical data was statistically analyzed. For the investigation of *RHOX* expression testicular tissue sections from patients with qualitative normal spermatogenesis (n = 6) and from patients with impaired spermatogenesis (Sertoli cell only syndrome, meiotic arrest and Klinefelter Syndrome, 3 samples each) were stained with *RHOXF1* and *RHOXF2/2B* antibodies.

Results An association between SNPs in the *RHOXF2/2B* gene and clinical parameters of infertile men could be shown. Patients having either SNP 467G > A or SNP 641C > T show significant lower ejaculate volumes compared to patients without the SNPs (3.81 ± 0.09 ml vs 4.48 ± 0.28 ml; p = 0.0024 and 3.70 ± 0.11 ml vs 4.18 ± 0.12 ml; p = 0.0025, respectively). Furthermore, carriers of the CT haplotype for SNP 641C > T showed significantly higher numbers of total sperm count (119 ± 9.11 10⁶) and an increased number of sperm with head defects (92.01 ± 0.31%) than carriers of the CC genotype (151.4 ± 10.03 10⁶; p = 0.0204 and 92.01 ± 0.31%; p = 0.039, respectively). Analyzing *RHOX* protein expression in patients with disturbed spermatogenesis by immunohistochemistry, revealed expression patterns in germ cells comparable to those with qualitatively normal spermatogenesis

Conclusions The fact that not only aberrant methylation of *RHOX* is associated with infertility but also polymorphisms affect dis-

tinct clinical parameters of infertile man lead to the conclusion that *RHOX* genes play an important role in human spermatogenesis. Both investigated SNPs are located near or within the first helix of the homeodomain which suggests that this region is essential for proper function of *RHOXF2/2B*. The unchanged expression of *RHOX* proteins in infertile men is indicative for defects after the *RHOX* functioning window.

Grants: This study was supported by the DFG collaborative grant (GE1547/15-1) and FOR 1041.

P076

The variant *FSHB*-211G > T influences Serum FSH Levels in the Supraphysiological Gonadotrophin Setting in Klinefelter Syndrome

F. Tüttelmann¹, A. S. Busch², M. Zitzmann², S. Kliesch², J. Gromoll¹

¹Institute of Human Genetics; ²Centre of Reproductive Medicine and Andrology, ²University of Münster, Germany

Background Klinefelter Syndrome (KS) is the most frequent genetic cause of male infertility and patients display higher gonadotrophin levels due to deficient testicular function. A single-nucleotide polymorphism (SNP) located within the *FSHB* promoter region (-211G > T, rs10835638) was recently shown to be associated with reduced serum FSH levels and other reproductive parameters in men. The objective of this study was to analyse the impact of *FSHB*-211G > T on endocrine and reproductive parameters in untreated and testosterone-treated KS patients.

Subjects and Methods Patients were retrospectively selected from the clientele attending the Department of Clinical Andrology, Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University Clinics Münster, a tertiary-referral centre, for couple infertility and andrology. A total of 319 non-mosaic KS men between 18 and 65 years were included while excluding subjects with mosaicism or higher-grade aneuploidies. Patients were genotyped for *FSHB*-211G > T by TaqMan assay. Associations of the SNP genotypes with endocrine and reproductive parameters were assessed.

Results The untreated group comprised 253 men and in this subgroup, the *FSHB*-211G > T T-allele was significantly associated with reduced serum FSH levels (-4.6 U/l per T-allele, p = 7.7 × 10⁻³). TT-homozygotes had about 50% lower mean and median FSH levels compared with the common GG-homozygotes. A less pronounced and non-significant gradient for reduced LH levels over the three genotypes was also observed. The subgroup of 166 testosterone-treated men had an overlap of 100 men who had visits at both time points. In the treated group, no significant associations between *FSHB*-211G > T and any parameter were found. However, FSH levels again decreased non-signifi-

cantly from GG- to TT-carriers. When those 100 men with both before and under treatment visits were analysed, testosterone treatment comparably suppressed gonadotrophin levels independently of the *FSHB* genotype.

Conclusions The *FSHB*-211G > T variant has an even more pronounced impact on serum FSH levels in the genetically determined supraphysiological gonadotrophin setting in KS. In contrast, gonadotrophin suppression under testosterone treatment seems to be independent of the *FSHB* genotype.

P077

DNA Methylation in Spermatozoa as a Prospective Marker in Andrology

R. Kläver¹, F. Tüttelmann², A. Bleiziffer¹, S. Kliesch¹, J. Gromoll¹

¹Centre of Reproductive Medicine and Andrology;

²Institute of Human Genetics, Münster, Germany

Introduction Recent studies have described the association of idiopathic male infertility with aberrant spermatozoal DNA methylation, in particular of the imprinted genes *MEST* and *H19*. Thus the evaluation of *MEST* DNA methylation could serve as a valuable diagnostic marker in clinical andrology. Prior to applying DNA methylation analysis in the daily clinical routine, several requirements have to be fulfilled such as the establishment of a rapid and reliable method, the definition of a reference range for normal *MEST* DNA methylation in spermatozoa and the examination of the temporal stability as well as inter- and intra-individual variability of DNA methylation.

Aim of this study was to introduce DNA methylation analysis of spermatozoa in the clinical setting of an andrological unit and to investigate several prerequisites for the use of spermatozoal DNA methylation as a valuable diagnostic marker.

Material and Methods Within this study, we collected one semen sample from 212 consecutive patients and 31 normozoospermic men (control group) and in addition, five consecutive semen samples of ten normozoospermic volunteers during a time period of up to 951 days. In the 212 patients and 31 controls, DNA methylation of *MEST* was quantitatively determined by pyrosequencing. In the five consecutive semen samples, DNA methylation patterns of ten genes were measured to achieve broad information about the temporal and intra-/inter-variability of DNA methylation.

Results By analysing 212 patients, a significant association of spermatozoal *MEST* DNA methylation with sperm concentration, count, motility and morphology as well as with bi-testicular volume and FSH levels was found, supporting the selection of spermatozoal *MEST* DNA methylation as valuable marker in andrological diagnostics. In order to define normal vs. abnormal *MEST*

DNA methylation levels we established a reference range by the 95th percentile of DNA methylation in the control group, which was 15%. Around 23% of the patients had *MEST* DNA methylation levels above this reference value and aberrant *MEST* DNA methylation was significantly associated with bi-testicular volume as well as sperm concentration and count. Further analyses demonstrated that the DNA methylation patterns of five imprinted genes (*H19*, *MEG3*, *SNRPN*, *MEST* and *LIT1*), three spermatogenesis-specific genes (*VASA*, *DAZL* and *BOLL*) and two repetitive elements (*ALU* and *LINE*) were highly stable over time, most of them showing only small variability between the individuals.

Conclusions In summary, our data strongly support that *MEST* DNA methylation in spermatozoa may serve as an additional parameter in the andrological workup in the future. However, further research should elucidate the potential predictive value of spermatozoal DNA methylation for pregnancy rate and outcome.

Grants: This study was supported by Graduate Program Cell Dynamics and Disease (CEDAD), the International Max Planck Research School – Molecular Biomedicine (IMPRS-MBM) and by the German Research Foundation [Research Unit ‘Germ cell potential’ (FOR 1041)].

■ Stammzellen

P078

Transcription factor TFAP2C Regulates Major Programs Required for Murine Fetal Germ Cell Maintenance and Haploinsufficiency Predisposes to Teratomas in Male Mice

J. Schemmer¹, M. J. Araúzo-Bravo², N. Haas¹, S. Schäfer¹, S. Weber¹, A. Becker³, D. Eckert¹, A. Zimmer³, D. Nettersheim¹, H. Schorle¹

¹Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Pathology, University of Bonn Medical School; ²Department of Cell and Developmental Biology, Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, Münster; ³Life&Brain Center, Institute for Regenerative Neurobiology, University of Bonn Medical School, Germany

Background Maintenance and maturation of primordial germ cells (PGCs) is controlled by complex genetic and epigenetic cascades, and disturbances in this network lead to either infertility or malignant aberration. The transcription factor TFAP2C (*Tcfap2c* or *AP-2gamma*) has been described to be essential for PGC development. Furthermore, high levels of TFAP2C protein were found in precursor lesions of human germ cell cancer (*carcinoma in situ* [CIS]) and in classical seminomas. During mouse embryogenesis *Tfap2c* is expressed in PGCs from embryonic day (E)7.25 until E12.5. Lack of *Tfap2c* leads to sterile animals, in which PGCs are specified but lost around E8.0. Therefore,

our aim was to investigate the function of transcription factor TFAP2C in the transcriptional network regulating PGC development and maintenance.

Methods In this study, we analyzed the consequences of *Tfap2c* deficiency in PGCs. We used an *in vitro* differentiation protocol to generate PGC-like cells from wildtype and *Tfap2c*^{-/-} embryonic stem (ES) cells. Using global gene expression profiling and chromatin-immunoprecipitation analyses, we identified genes directly regulated by TFAP2C in PGC-like cells. Since *Tfap2c*^{-/-} PGC-like cells display cancer related deregulations in epigenetic remodeling, cell cycle and pluripotency control, the *Tfap2c*-knockout allele was bred onto 129S2/Sv background.

Results Using global gene expression analysis we discovered 455 genes, which are differentially expressed in *Tfap2c*^{-/-} PGC-like cells (208 genes down- and 247 genes up-regulated). Interestingly, genes involved in germ line maturation and spermatogenesis (e.g. *Stella*, *c-Kit*, *Dazl*, *Dmrt1*) are down-regulated and genes known to maintain pluripotency (e.g. *Fgf4*, *Klf4*, *Eras*), epigenetic modifications (e.g. *Dnmt3l*, *Dnmt3b*, *Uhrf1*) cell cycle regulation (e.g. *Ccnd1*, *Ccnt2*, *Cdk6*) and somatic differentiation (e.g. *Hhex*, *Neurod1*, *Hoxa5*) are up-regulated in *Tfap2c*^{-/-} PGC-like cells. Furthermore, we demonstrated binding of TFAP2C to regulatory regions of deregulated genes (*Sfrp1*, *Dmrt1*, *Nanos3*, *c-Kit*, *Cdk6*, *Cdkn1a*, *Fgf4*, *Klf4*, *Dnmt3b* and *Dnmt3l*) suggesting that these genes are direct transcriptional targets of TFAP2C in PGCs.

Tfap2c heterozygous male mice developed with high incidence (82%) germ cell cancer formation. Precursor lesions were observed as early as E16.5 in developing testes displaying persisting expression of pluripotency markers. We further demonstrated that mice with a heterozygous deletion of the TFAP2C target gene *Nanos3* are also prone to develop germ cell cancer. Analyses of these tumors reveal that they resemble human early childhood germ cell cancer.

Discussion These data suggest that TFAP2C orchestrates all aspects of the genetic network regulating germ cell specification and maintenance. We and others demonstrated recently that *Tfap2c* together with *Blimp1* and *Prdm14* serves as master regulator of the genetic and epigenetic germ cell programs. Perturbations of *Tfap2c* or its target genes *Nanos3* and *Dmrt1* lead to high rate of germ cell cancer in 129S2/Sv mice, which are hallmarked by failure of downregulation of pluripotency markers. Hence, drugs, hormones or endocrine disruptors which lead to modulation of the expression/function of the *Tfap2c*/*Nanos3*/*Dmrt1* axis during pregnancy might contribute to the initiation of germ cell cancer development.

P079

Germ Cell enriched Cultures from adult Marmoset Monkeys

D. Langenstroth¹, N. Kossack¹, R. Behr², J. Gromoll¹, S. Schlatt¹

¹Centre of Reproductive Medicine and Andrology, Münster; ²Stem Cell Biology Unit, German Primate Center, Göttingen, Germany

Introduction Spermatogonial stem cells are the most undifferentiated germ cells in the adult testis. They are able to self-renew and to differentiate into sperm. Additionally, they play an important role in maintaining DNA-integrity within the male germ line. Germ cell cultures containing SSCs and differentiating germ cells would be an interesting source for fertility preservation and for basic investigations on the mechanisms of male germline regulation.

Over the past years some culture protocols for primate germ cells have been published, but they are controversially discussed, because of a lacking germ cell specificity of the markers which were used in these studies. In this study we aimed to establish valid germ cell cultures from marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) which are non-human primates routinely being used as model organisms in reproductive medicine. For analyzing the cultures we used specific germ cell and somatic cell markers.

Materials and Methods Testes obtained from adult marmosets (n = 9) were enzymatically digested, plated onto culture dishes and cultured for up to 11 days using two different conditions: 1.) All cells were cultured in the same dish. 2.) The supernatant (SN) cells were transferred after 24 h into new dishes and cultured separately from the attached (AT) cells. After 3, 6 and 11 days SN and AT cells were analyzed by quantitative real time PCR (qPCR) using marker genes for germ cells (*DDX-4*, *MAGE A-4*, *SALL4*) and somatic cells (*VIM*, α SMA, *CD44*). In addition, cultures were fixed after 6 and 11 days and analyzed using immunofluorescence (IF) stainings. Both methods were used to detect germ cells and somatic cells *in vitro* and to elucidate which conditions are more favorable for culturing germ cells.

Results Under condition 1.) we observed, that a subpopulation of cells attached to the culture dish, whereas most cells remained in the SN. qPCR analyses showed a high expression of germ cell markers (*DDX-4*, *MAGE A-4*) in the SN cells and a high expression of somatic markers (α SMA, *VIM*, *CD44*) in the AT cells. After 3 days the expression of *MAGE A-4* and *SALL4* which are expressed by undifferentiated germ cells is higher in the AT fraction. Until day 11 the expression rapidly declines, whereas the expression of somatic markers rapidly increases. These findings were confirmed by IF stainings showing that most of the AT cells express somatic markers (α SMA, *VIM*) and that most of the round, non-attached cells express germ cell makers (*DDX-4*, *MAGE A-4*), however some spindle shaped AT cells also express *MAGE A-4*.

To reduce the contamination and dilution of germ cells by the more rapidly dividing somatic cells we used condition 2.). qPCR analyses showed similar results for the germ cell markers as for condition 1.). However under condition 2.) the expression of *MAGE A-4* increases in the SN until day 11, whereas it is constant under condition 1.). As expected, the expression of somatic markers in the SN stays at a very low level under condition 2.), while it increases under condition 1.).

Conclusions In this study, we show for the first time that adult marmoset germ cells can be maintained during short-term cultures. We demonstrated that the germ cells can be enriched via differential plating and that culturing germ cells without somatic testicular cells improves the germ cell maintenance, as the viability of the cells is not impaired, while the expression of germ cell markers is elevated. In following experiments we will try to improve and prolong the culture protocol to obtain self-maintaining long-term germ cell cultures, by applying different growth factors and coatings.

Funding: DFG Research Unit "Germ Cell Potential" (FOR1041/3).

P080

Expression of the CXCL12 Chemokine Receptor CXCR7 During Testicular Germ Cell Development in Mice

B. Westenströmer¹, N. Terwort¹, J. Ehmcke², J. Wistuba¹, S. Schlatt¹, N. Kossack¹

¹Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University of Münster; ²Central Animal Facility of the Medical Faculty, ZTE, Münster, Germany

Background The interaction between the chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12) and its C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) regulate the maintenance of the spermatogonial stem cell (SSC) pool in juvenile as well as adult mouse testis. While the chemokine is secreted by Sertoli cells, CXCR4 is expressed in spermatogonia and Sertoli cells. The functional role of the CXCL12/CXCR4 interaction within adult mouse testis has been investigated *in vitro* and revealed that this ligand/receptor pair is essential for SSC proliferation and prevents SSC differentiation. During the embryonic development, the interaction between CXCL12 and CXCR4 is also required for the migration of primordial germ cells (PGCs) as well as for the survival of these early germ cells in mice. In zebrafish, the C-X-C chemokine receptor type 7 (CXCR7) was identified as an alternative receptor for CXCL12 and resulted in a generation of a CXCL12 gradient which afterwards facilitated the directed migration of PGCs. So far, the transcripts of *Cxcr7* were detected in testes from adult rats and humans, but neither the localization nor the function of this receptor during fetal and postnatal mammalian germ cell development have been investigated.

Aim The aim was to investigate the expression of the chemokine receptor CXCR7 during postnatal germ cell development in mouse testes.

Methods Mice were killed at the age of 1 (n = 3), 7, 14, 21 (n = 4 per age group), > 37 (n = 3) days *post partum* (dpp). Testicular tissue was collected for histological analysis as well as for quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis. Relative expression of *Cxcl12*, *Cxcr4* and *Cxcr7* was assessed. In addition, immunofluorescent staining for CXCR7 was conducted.

Findings Testis weights increased gradually from 1.3 ± 0.5 mg on day 1 to 111.8 ± 15.2 mg on day > 37. In neonatal testes, the transcript levels of *Cxcr7*, *Cxcr4* and *Cxcl12* were low and CXCR7 was restricted to gonocytes and spermatogonia. During development, the levels of *Cxcl12* were stable but the levels of *Cxcr7* and *Cxcr4* increased. CXCR7 was expressed in germ cells located at the basement membrane of the seminiferous tubules. In adult testes, the transcript levels of *Cxcl12* were highest and the localization of CXCR7 did not change. Transcript levels of *Cxcr7* were also recalculated relative to the levels of *Lin28a*, in order to adjust for the increasing number of undifferentiated spermatogonia. While mRNA levels of *Cxcr7* are 4 to 6-fold higher on days 1, 14, 21 and > 37 after birth relative to *Lin28a*, transcript levels of *Cxcr7* are only doubled on day 7 pp.

Conclusion We conclude that the receptor CXCR7 play an important role in premeiotic germ cells during spermatogenesis and we assume that this receptor may not act as a scavenger receptor for CXCL12 but may rather be involved in the regulation of growth, survival and adhesion properties, as described in the breast cancer cell line MCF-7.

Grants: The study was supported by a grant from the Innovative Medical Research of the University of Münster Medical School (KO 111014).

P081

Efficient Generation of SSCs from Mouse ESCs through co-culture with Human Testicular Stromal Cells

N. Mellies¹, A. Fitzner², U. Zechner², J. Nolte¹

¹Institut für Humangenetik, Universität Göttingen;

²Institut für Humangenetik, Universität Mainz, Germany

Male gametes originate from a small population of Spermatogonial Stem Cells (SSCs) that self renew and produce large numbers of differentiating germ cells that become spermatozoa throughout postnatal life. Several studies during the last years showed, that Embryonic Stem Cells (ESCs) are able to differentiate into germ cells and more mature gametes. However, the procedures to differentiate SSC from ESCs are not very efficient and often result in incomplete differentiation thereby making it sophisticated to work with

SSCs from ESCs. Therefore our aim was to increase the efficiency of male germ line differentiation of mouse pluripotent ESCs. Since it was known from the literature that co-culture systems can support the differentiation of SSCs from stem cells we decided to co-culture human testicular stromal cells with our genetically modified mouse ESCs. Surprisingly, the cells – when cultured under normal fibroblast culture conditions without the supplementation of any growth factors – started to differentiate into SSCs. The status of the cells could be proven by morphology, AP-staining, immunofluorescence and RT-PCR. To get an idea about the functionality of the cells, we are performing transplantations into germ cell depleted mouse testis at the moment. Furthermore we are planning to investigate the SSCs on the epigenetic level. Interestingly, when culturing these ESC-derived SSCs in normal ESC culture conditions, the cells convert to the pluripotent phenotype while converting to epiblast stem cells phenotype by culturing in germ cell medium.

Our approach is a new possibility for the investigation of mammalian spermatogenesis, germ line gene modification and epigenetic reprogramming. If reproducible with human pluripotent stem cells, it could also be used as a therapeutic approach for the treatment of male infertility.

P082

Spermatogonial Subtypes in newborn Marmosets

K. Tran¹, J. Wistuba¹, D. Langenstroth¹, J. Ehmcke², S. Schlatt¹

¹Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University of Münster; ²Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung der Medizinischen Fakultät, Münster, Germany

Background Spermatogonia are subpopulations of male germ cells of which some expand mitotically and give rise to differentiating germ cells entering meiosis while others maintain an undifferentiated state. Problems at premeiotic stages of spermatogenesis contribute to human infertility. We hypothesize that male infertility may be related to dysfunction of spermatogonia. Due to relevant physiological differences between rodents and primates in respect to spermatogonial physiology and function, marmosets (*Callithrix jacchus*) are selected as an animal model to test if these animals provide a clinically relevant and valid model system. In this study we focus on the germ cell complement in the newborn marmoset to determine the subpopulations of spermatogonia and their function prior to the initiation of spermatogenesis.

Aim Our specific aim is the identification and functional characterization of the subtypes of germ cells in the newborn marmoset testis.

Methods Tissue from newborn marmosets (n = 4) were exposed to Bromodeoxyuridine

(BrdU, 100 mg/kg, IP) for 2 hours after testes were dissected. The tissue was then fixed in Bouin's solution and routinely embedded in paraffin. Sections of 5 mikrometer thickness were prepared and used for immunohistochemical staining of BrdU and spermatogonial markers LIN28 and MageA4. Sections from adult animals became available from previous studies.

Results Five spermatogonial subtypes were defined by morphological criteria (cytoplasm-nuclear ratio, nuclear size and pattern) and their relative contribution accounted in the newborn marmoset testes. The analysis of immunostained sections allowed description of the organization and mitotic activities (BrdU labeling indices) of these five spermatogonial subpopulations. In adult marmoset testes almost all spermatogonia are positive for MageA4 and negative for LIN28. In contrast the newborn testis contained a wide range of positive and negative spermatogonia for both markers. The analysis of subpopulations and their arrangements into clusters revealed functionally distinct spermatogonial subclones in the newborn marmoset.

Conclusion Our results thus far revealed that the organization of spermatogonia in marmosets mimics the situation in man showing a high number of stem and progenitor cells. The situation in the newborn testis indicates a high degree of complexity with germ cells showing a more or less advanced stage of differentiation. This scenario appears to become simple after the onset of spermatogenesis in adult animals. We consider these findings clinically relevant as our observation is similar to the situation in human fetal and adult testes rendering the marmoset a valuable animal model to experimentally explore human germ cell development.

Grants: The study was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (FOR 1041).

P083

Kolokalisation von FGF9 und FGFR3 in adulten humanen Spermatogonien

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

Fragestellung Spermatogoniale Stammzellen (SSCs) als Untergruppe der Spermatogonienpopulation bilden durch ständige Selbsterneuerung die Grundlage für eine lebenslange Spermatogenese im adulten männlichen Organismus. Der Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor 3 (FGFR3) stellt einen putativen humanen spermatogonialen Stammzellmarker dar. Der Ligand für FGFR3 in der adulten humanen Testis wurde bislang noch nicht identifiziert.

Methodik Zum Auffinden möglicher Interaktionspartner, Targets und potenzieller Liganden von FGFR3 auf mRNA-Ebene führ-

ten wir anhand von Mikroarray-Daten eine Pearson-Korrelationsanalyse zur FGFR3-Expression durch. Die Patientenkohorte mit unterschiedlichen homogenen Testispathologien (n = 31) war folgendermaßen unterteilt: vollständige Spermatogenese, n = 8; Hypospermatogenese, n = 10; meiotischer Arrest, n = 5; Spermatogonien als einzige Keimzellen, n = 2; Sertoli-cell-only-Syndrom, n = 5 sowie Tubulusatrophie, n = 1. Bei der Pearson-Korrelationsanalyse wurden die relativen Fluoreszenzwerte von allen sich auf dem Mikroarray befindlichen 54.000 Transkripten bezüglich ihrer Ähnlichkeit zum Verlauf der FGFR3-Expression betrachtet. Immunhistochemie- und Immunfluoreszenz-Einzelfärbungen sowie Immunfluoreszenz-Mehrfachfärbungen von histologischen Schnittpräparaten aus dem humanen adulten Hoden von Patienten mit vollständiger Spermatogenese sollten zeigen, ob sich die Daten auch auf Proteinebene übertragen lassen. Die Zellcharakterisierung erfolgte in Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit dem Nucleolusmarker C23 bzw. dem Proliferationsmarker KI-67. Die Auswertung wurde mittels Lichtmikroskopie, konventioneller sowie konfokaler Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt.

Ergebnisse Bei der Pearson-Korrelationsanalyse wurde FGF9 als einziger Fibroblastenwachstumsfaktor identifiziert, der positiv mit der FGFR3-Expression im adulten humanen Hoden korreliert (Korrelationskoeffizient $r = 0,89$). FGF9, welches mit der hodenspezifischen FGFR3-Variante IIIc (human untersucht von [Ewen et al., 2013]) interagieren kann [Cotton et al., 2008], stellt damit einen potenziellen Liganden von FGFR3 im adulten humanen Hoden dar. Dieser Wachstumsfaktor, der für die Geschlechtsdifferenzierung essenziell ist, wurde in der embryonalen und fetalen Nager-Testis als Produkt von Sertolizell-Vorläufern beschrieben [Schmahl et al., 2004]. FGF9 fördert das Überleben von Keimzellen in der fetalen Testis [DiNapoli et al., 2006], ist als Meiose-Inhibitor bekannt [Barrios et al., 2010; Bowles et al., 2010] und erhält die Expression von Pluripotenzgenen in der fetalen Maustestis [Bowles et al., 2010]. Um zu untersuchen, in welchen Zellen das FGF9-Protein im humanen adulten Hoden vorkommt, wurden histologische Hodenschnittpräparate mit vollständiger Spermatogenese mittels Immunfärbungen untersucht. Hierbei ergab sich, dass FGFR3 und FGF9 in vielen Spermatogonien koexprimiert werden. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die FGF9-exprimierenden Spermatogonien dem A-Typ (A dark und A pale) angehören und meistens KI-67-negativ sind, d. h. nicht proliferieren.

Schlussfolgerung FGF9 stellt einen guten Kandidaten für den Liganden von FGFR3 im adulten humanen Hoden dar. Ob mithilfe von FGF9 die FGFR3-positiven potenziellen humanen SSCs expandiert werden können, muss in Zellkulturexperimenten getestet werden.

P084

Differential expression of Trophoblast-, Endothelial- and Embryonic-stem-cell-associated transcription factors in 1st Trimester, and 3rd Trimester Preeclampsia (PE), Intrauterine Growth Factor (IUGR) and Control Placentae

M. Weber¹, U. Jeschke², U. Markert¹, J. Fitzgerald¹
¹Placenta-Labor, Abteilung Geburtshilfe, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Jena; ²Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe-Innenstadt, Ludwig Maximilians Universität München, Germany

Stem cells are highly proliferative, undifferentiated cells and stem cell markers are involved in maintaining these characteristics. In the blastocyst, differential expression between embryonic and trophoblast stem cell transcription factors is thought to discriminate cell fate. Although villous cytotrophoblasts are functionally considered a trophoblast stem cell or at least a progenitor cell, which replenishes the outer syncytiotrophoblast layer when necessary, little data is available characterizing the expression of stem cell transcription factors beyond the blastocyst stage. We aimed to describe the expression of trophoblast and embryonal stem cell factors in the placenta between 1st and 3rd trimester in order to discriminate if these markers might be involved in progenitor cell functions.

Methods We analyzed 8 each of samples derived from 1st trimester, normal term pregnancy placentae as well as placentae with IUGR and PE. We accomplished immunoperoxidase staining to detect the stem cell markers: Cdx2, Sox2, Notch1, Nanog and Oct4A.

Results We detected all stem cell markers in all samples of 1st trimester placentae. The expression pattern is homogenous in syncytio- and cytotrophoblast in early pregnancy and grows increasingly mosaic-like towards the end of the 1st trimester. It appears that the syncytiotrophoblast loses the signal first. The signals are lost or starkly diminished in the 3rd trimester. Here only singular, apparently cytotrophoblast, cells express these markers.

Conclusion Unexpectedly, both embryonic, as well as trophoblast stem cell markers are expressed in the first trimester trophoblast and appears most vivid among the villous trophoblast of very early pregnancy. Loss of stem cell transcription factor expression in term placenta indicates temporal regulation, and probably a specific function which is yet to be elucidated. Association of stem cell factor expression with reproductive pathologies should constitute the aim of further projects.

P085

Do Mast Cells have a Role in the Renewal of Human Spermatogonial Stem Cells?

S. Windschüttl¹, D. Nettersheim², S. Schlatt³, U. Schwarzer⁴, F. M. Köhr⁵, H. Schorle², A. Mayerhofer¹
¹Anatomy III – Cell Biology – LMU München; ²Department of Developmental Pathology, Institute of Pathology, Medical School, Bonn; ³Centre of Reproductive Medicine and Andrology, Münster; ⁴Andrologie-Centrum-München, ⁵Andrologikum, München, Germany

Introduction Mast cells accumulate in the testes of men with idiopathic infertility. This accumulation specifically occurs in the wall of seminiferous tubules, which is formed by peritubular cells [Meineke et al., 2000; Welter et al., 2011]. These cells border on the tubular compartment, i.e. Sertoli cells and spermatogonia. Testicular mast cells express tryptase, a unique mast cell product, which can activate the protease activated receptor 2, PAR-2. This receptor was previously described in human ejaculated sperm, where it is involved in the regulation of sperm motility [Zitta et al., 2007]. Interestingly, a previous analysis of expression of PAR-2 in human tissues also revealed its expression in the germinal epithelium [D'Andrea et al., 1998]. Neither details of its cellular expression were reported however, nor is there information about physiological ligands of PAR-2 or its roles in the seminiferous tubule, including the process of spermatogenesis. In this study we explored whether tryptase may be able to influence spermatogonial stem cell (SSC) in men, using the human seminoma like cells TCam-2 [Nettersheim et al., 2011] as a model for SSCs.

Methods Immunohistochemistry was used to localize PAR-2 and the SSC marker GFRalpha-1 in human testicular biopsies. Expression of specific stem cell markers and differentiation markers, as well as PAR-2 by TCam-2 were analyzed by RT-PCR/sequencing. The functionality of PAR-2 in TCam-2 was examined by monitoring intracellular Ca²⁺ responses upon the addition of recombinant tryptase, a PAR-2 peptide agonist (SLIGKV) and a control peptide (VKGILS). The influence of tryptase and SLIGKV on apoptosis (Caspase3/7-level), proliferation (DAPI staining) and the state of differentiation (Western-Blot and qPCR) was examined.

Results Immunoreactive PAR-2 was most pronounced in basal cells of the seminiferous epithelium, which represent spermatogonia. Some of these were also stained for the receptors for GDNF (GFRalpha-1) and represent SSCs. TCam-2 express specific stem cell markers (Oct3/4, Nanog, GFRalpha-1) and PAR2, but lack DDX-4 mRNA. TCam-2 robustly (60 %) responded to acute stimulation with SLIGKV and tryptase by increased intracellular levels of Ca²⁺. This response was evoked also by recombinant tryptase and another enzyme activator of PAR-2 (trypsin), SLIGKV, but not by a control peptide VKGILS. Furthermore, treatment with

PAR-2 activators also significantly reduced spontaneous apoptosis and stimulated proliferation. The expression of the stem cell marker Oct3/4 was not altered upon PAR-2 activation, neither at the protein level, nor at the mRNA level in TCam-2.

Conclusion Given that the seminoma like TCam-2 cells resemble to a certain extent human SSCs, the data suggest a role of tryptase in SSC self-renewal. Mast cells in the wall of seminiferous tubules of men with impaired spermatogenesis, which release tryptase, therefore may be viewed as friends not foes of spermatogenesis.

Grants: Supported by DFG MA 1080/20-1 and 21-1.

P086

Comparison of Enzymatic Digestion and Mechanical Dissociation of Human Testicular Tissue with Regard to their Effect on Germ Cell Population

F. Schneider¹, J. Wistuba¹, K. Redmann¹, J. Gromoll¹, S. Schlatt¹, S. Kliesch², N. Kossack¹
¹Centre of Reproductive Medicine and Andrology, University of Münster; ²Department of Clinical Andrology, Center for Reproductive Medicine and Andrology, Münster, Germany

Background The possibility to propagate human spermatogonia *in vitro* provides the basis for autologous spermatogonial transplantations and the *in vitro* derivation of sperm. One prerequisite for successful cultures of human spermatogonia is the ability to extract the highest possible numbers of these germ cells from testicular tissues. In the past, either a combination of enzymatic digestion and mechanical dissociation or solely enzymatic digestion was used to prepare a single cell suspension. However, recently it was demonstrated that a single cell suspension can be effectively generated from rodent testes using the Medimachine System for mechanical dissociation. The advantages of this method are that it is very fast, provides reproducible results and does not selectively damage certain cell types. This study aimed at elucidating whether the Medimachine System can be used for dissociation of human testicular tissues and can therefore be considered an alternative to enzymatic digestion.

Material and Methods Testicular tissue was obtained from patients with gender dysphoria (GD) undergoing sex reassignment surgery (SRS) after written informed consent and ethical approval (ethical commission of Ärztekammer Westfalen-Lippe; no. 2012-555-f-S). In total, 77 testicles were collected from our cooperating clinics in Osnabrück and Essen from 55 patients. Presence of sperm and the status of spermatogenesis were evaluated performing microscopic examination of the epididymal fluid and an analysis of a cold cryogenic tissue sample. Subsequently, 500 mg of testicular tissue were subjected to enzymatic digestion and

mechanical dissociation in parallel. Following this procedure, the number of living and dead cells was counted using the Trypan Blue Exclusion Method. To evaluate whether the two methods result in a selective damage of certain cell types, relative gene expression analysis was performed using quantitative real-time PCR for germ cell markers (FGFR-3, UTF-1, SALL-4, MAGE-A4, VASA) and somatic cell markers (SMA, VIM). Additionally, flow cytometric analysis was performed for SALL-4 and VIM.

Results 6 fresh and 7 cryopreserved testicular tissues with complete spermatogenesis were included into the study. Whilst more cells were obtained using mechanical dissociation in fresh (mean: 13.8×10^6 versus 7.8×10^6) and cryopreserved tissue (9.1×10^6 versus 2.7×10^6) the number of living cells was lower compared to enzymatic digestion in fresh (mean: 38% versus 76%) as well as cryopreserved (mean: 16% versus 74%) tissue samples. Using fresh testicular tissue quantitative real-time PCR revealed similar expression levels of germ cell-specific markers (FGFR-3, SALL-4, MAGE-A4, VASA) but decreased expression levels of somatic and peritubular cell markers (ACTA-2, VIM). At the protein level it could be shown that more SALL-4 positive cells and less VIM positive cells could be detected using the Medimachine System, but the difference was not significant when compared to enzymatic digestion. Using cryopreserved tissue it could be demonstrated at RNA- and protein level that there was not a significant difference between the mechanical dissociation and enzymatic digestion.

Conclusion We conclude that the Medimachine System is a reliable and fast method for the dissociation of cryopreserved human testicular tissue with complete spermatogenesis. The results were comparable at RNA- and protein level. Moreover using fresh tissues, our findings of significantly reduced ACTA-2 levels even suggest a reduction of somatic peritubular cells in the single cell population using the Medimachine System; a finding which is in contrast to published data. However, these results still need to be validated at the protein level. All in all the Medimachine System could become an alternative to enzymatic digestion for yielding comparable living germ cell numbers from human testicular tissue. Additionally, as this method is very fast and does not involve the use of enzymes it may provide an advantage of the establishment of human spermatogonial cultures.

P087

MS profiling of the HTPC Secretome to explore their Contribution to the Spermatogonial Stem Cell Niche

F. Flenkenthaler¹, S. Windschütt², T. Fröhlich¹, J. U. Schwarzer³, A. Mayerhofer², G. J. Arnold¹
¹Laboratory for Functional Genome Analysis LAFUGA, Genzentrum; ²Anatomie III-Zellbiologie, Medizinische Fakultät, LMU München; ³Andrologie-Centrum-München, München, Germany

Background and Aim Human testicular peritubular cells (HTPCs) are a primary component of the wall of seminiferous tubules. They are located close to Sertoli cells and spermatogonial stem cells (SSCs) and spatially separated by the basement membrane. Within seminiferous tubules, SSCs reside in specific niches that promote maintenance of SSCs vital for lifelong spermatogenesis in man. The formation and function of these niches relies on secreted soluble factors and the structural support of surrounding cells. Peritubular cells have recently been shown to secrete proteins that interfere with paracrine signaling pathways and regulate the SSC self-renewal in human testis. In the present study, we aimed to investigate the contribution of HTPCs to the molecular composition of the SSC niche by analyzing the secretome of five primary testicular peritubular cell cultures derived from human testes by LC-MS/MS.

Methods Testicular biopsies were obtained from five human donors with obstructive azoospermia, but normal spermatogenesis. HTPCs were isolated and cultivated for 24 h in serum-free culture media. For quantitative proteome analysis, conditioned media and cell lysates were analyzed separately using 1D SDS PAGE, followed by nano reversed-phase liquid chromatography and high resolution mass spectrometry on an Orbitrap instrument. Protein identifications were filtered at a false discovery rate (FDR) $\leq 1\%$. As evidence for secretion, protein abundance in conditioned media was compared to HTPC cell lysate, based on a “spectral counting” approach. Identification of secreted proteins was substantiated by gene ontology enrichment analysis and signal peptide prediction. Functional annotation clustering was done using the Cytoscape plug-in ClueGO. The *in vivo* expression of selected proteins was visualized on human testicular testis tissue sections by immunohistochemistry.

Results Proteomic characterization led to the identification of 660 proteins in conditioned media, including 263 secretome proteins that are at least 5-fold enriched in the cell supernatant as compared to the proteome of HTPC lysates. Gene ontology enrichment analysis and signal peptide prediction provided further evidence for secretion. The presence of selected secretome proteins in human testis tissue sections was confirmed by immunohistochemistry, demonstrating the relevance of our data for the *in vivo* situation. Apart from structural extracellular matrix components such as collagens, fibronectin, fibrillin-1 and SPARC involved in

skeletal system and vasculature development, the HTPC secretome contained a significant enrichment of chemokines (e.g. CCL2, CXCL12) and growth factors (e.g. CTGF and VEGFC) potentially influencing stem cell activity. The action of HTPC secretome proteins in key signaling pathways such as the multi-stage transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling pathway suggests that HTPCs are also part of the testicular paracrine signaling system. They are able to interact via secretory products with adjacent cell types such as Leydig cells and Sertoli cells and may therefore indirectly affect the testicular function.

Conclusion Our study provides the first comprehensive analysis of the HTPC secretome and strongly suggests that HTPC may contribute to the formation of a stem cell niche in man. Besides, the newly acquired information about the HTPC secretome enables further studies addressing the regulation of human SSCs.

Grants: Supported by DFG FOR1041 “Germ Cell Potential”, AR 362/8-1; MA 1080/20-1.

■ Weibliche Infertilität und Fertilitätsprotektion

P088

Worüber man sprechen sollte: Inhalte von psychosozialer Beratung bei Donogener Insemination

C. Brügge¹, P. Thorn²
¹Praxis für Psychotherapie, Bielefeld; ²Praxis für Paar- und Familientherapie, Mörfelden, Germany

Fragestellung Vor über 10 Jahren wurden Paare nach einem Vorbereitungsseminar zur Familiengründung mit Spermenspenden [Thorn, Daniels, 2003; Daniels et al., 2007] befragt, ob sie planen, ihre zukünftigen Kinder über die Tatsache der Donogenen Insemination (DI) aufzuklären. Im Rahmen dieser Folgestudie wurde ermittelt, inwiefern diese Absicht umgesetzt wurde und welche Faktoren dazu motivierten. Darüber hinaus wurde ermittelt, wie diese Paare im Familienalltag mit der Tatsache der DI umgehen und wie sie die Zeugungsart nach Geburt des Kindes in ihren Alltag integrieren.

Die Antworten wurden hinsichtlich ihrer Beratungsrelevanz interpretiert: An welcher Stelle könnte psychosoziale Beratung im Kontext der Familiengründung mittels DI helfen? Welcher mögliche Beratungsbedarf und welche Beratungsinhalte lassen sich aus den Auskünften der Teilnehmer dieser Studie ableiten?

Methodik Die Teilnehmer von 4 Vorbereitungsseminaren aus den Jahren 1999–2001, die im Rahmen der o. a. Studie befragt worden waren, wurden 2012 erneut um die Teilnahme an einer qualitativ-explorativen Folgestudie gebeten. Es fand eine postalische Befragung mit 22 geschlossenen und 25 offenen Fragen statt. Die Interviewbogen ent-

hielten Fragen zu den Einflussfaktoren bei der Entscheidung zur Samenspende (1.), zu Motivation und Einflussgrößen bei der Aufklärung der Kinder (2.), der Reaktion der Kinder (3.) und der Bedeutung der DI im Alltag (4.). Von 66 Teilnehmern der früheren Studie nahmen 19 Personen teil: Nicht teilgenommen haben 30 Personen, die keine Kinder oder keine nach DI haben, 4 aktuelle Adressen konnten nicht ermittelt werden; 12 nahmen aus unterschiedlichen Gründen nicht teil; ein Paar hatte sich getrennt, nur die Partnerin nahm teil. Von 19 Teilnehmern wurde das Material inhaltsanalytisch danach untersucht, inwiefern sich beraterrelevante Themen herausfiltern lassen.

Ergebnisse Aufgrund der geringen Stichprobenzahl handelt es sich nicht um eine repräsentative Stichprobe. Als Folgestudie lässt sich allerdings berechnen, ob Paare ihre Aufklärungszintention umgesetzt haben: 84 % (16 von 19) der Teilnehmer haben ihre Kinder aufgeklärt. Sie stellen sich heute mit einem sicheren Know-how dar, wie sich mit einem Kind über dessen Zeugungsart sprechen lässt. Im Familienalltag beschreiben die Eltern die DI als unspektakulär und ihre Kinder als unauffällig.

Allerdings zeigte sich, dass es sich bei der Entscheidung zu dieser Familiengründung und zur Aufklärung des Kindes um ein komplexes, multifaktorielles Geschehen handelt, denn die Antworten der Teilnehmer wiesen kein festes Muster auf. Die Komplexität spiegelt sich im Antwortverhalten bezüglich der Einflussgrößen im Vorfeld der Entscheidung zur DI wider: Bei einem Teil der Teilnehmer stand die Klärung der Rechts-situation im Vordergrund, bei anderen die Thematisierung der Geheimhaltung, bei dritten die Wahrnehmung der Seriosität des Behandlers oder die Erfolgserwartung. Von allen wurde die Bedeutung sozialer Unterstützung (innerhalb des Paares, Freunde, Verwandte, Experten und vor allem die Peers anderer DI-Familien) betont.

Schlussfolgerung Für die psychosoziale Kinderwunschberatung lassen sich folgende Hypothesen aufstellen: Paare reagieren auf die hohe Komplexität im Bereich der DI nicht einfach damit, dass sie die Behandlung zügig hinter sich bringen, sie reagieren darauf mit erhöhter Reflexion. Überall, wo sich eine große Spannweite an Themen oder Ambivalenzen (z. B. zwischen Normalitätsanspruch und Unkonventionalität) oder Tabus (Bedeutung des Spenders, Verlusterfahrung, Unsicherheit) zeigen, kann dies als Indikator gewertet werden, dass ein vermehrter Orientierungsbedarf besteht und hierfür professionelle Beratung als eine besondere Form psychosozialer Unterstützung sinnvoll ist. Werden Beratung oder Vorbereitungsseminare in Anspruch genommen, können sie dazu beitragen, dass DI-Familien die Samenspende vor sich und anderen vertreten und mit der Bedeutung des Spenders souverän umgehen können. Es braucht daher nicht nur kurze medizinische Aufklärungsgespräche oder allgemeingehaltene Informationsvermittlung, sondern einen individuellen,

auf das Paar zugeschnittenen Dialog – so wie dies professionelle Kinderwunschberatung anbietet. Hierzu benötigen Fachkräfte sowohl Feldkenntnisse zur DI und Reproduktionsmedizin als auch beraterisch-therapeutische Kommunikationskompetenzen.

P089

Erhöhte Aktivität der Dipeptidyl-Peptidase IV im Serum von Patientinnen mit Polyzystischem Ovarsyndrom

T. Greither, K. Lampe, S. Pelka, E. Seliger, S. Köller, P. Kaltwaßer, H. M. Behre
Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Halle (Saale), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Germany

Fragestellung Das Polyzystische Ovarsyndrom (PCOS) ist mit einer Prävalenz von 6–7 % die häufigste weibliche Endokrinopathie und trägt entscheidend zum Anteil infertiler Frauen in der Gesamtbevölkerung bei. Diagnostische Kriterien sind Oligo- oder Amenorrhoe, Hyperandrogenismus und polyzystische Ovarien im Ultraschallbefund (Rotterdam-Kriterien). Häufig ist das PCOS assoziiert mit metabolischen Störungen wie Adipositas und verminderter peripherer Insulinresistenz. Dipeptidyl-Peptidase IV (DPP IV) ist eine Prolin-abhängige Serin-Protease, die durch Abspaltung von Dipeptiden vom N-Terminus ihrer Zielproteine zu deren Aktivierung oder Inaktivierung führt. Aufgrund der Vielzahl an Zielproteinen scheint DPP IV eine Schlüsselrolle an der Schnittstelle zwischen Metabolismus und Reproduktion zu spielen. Ziel dieser Untersuchung war es, die Aktivität und Expression der DPP IV im Serum von PCOS und Nicht-PCOS-Patientinnen zu bestimmen.

Methodik In einer Kohorte von 109 Patientinnen mit (n = 58) und ohne PCOS (n = 51) wurde die DPP-IV-Aktivität mittels eines Enzymassays (Spaltung des artifiziellen Substrates Glycyl-L-Prolin-p-Nitroanilide) gemessen. Die DPP IV-Proteinkonzentration wurde mittels eines kommerziellen ELISA (eBioscience Inc., San Diego, USA) quantifiziert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels bivariaten Korrelationsanalysen nach Spearman-Rho, Mann-Whitney-U-Tests und einfaktorieller ANOVA durch das Statistik-Programm SPSS 19.0 (IBM, Armonk, USA).

Ergebnisse Die Aktivität der DPP IV im Serum der gesamten Kohorte betrug $507,3 \pm 114,55$ nmol/(l*s). In PCOS-Patientinnen war die Aktivität im Vergleich zu Nicht-PCOS-Patientinnen im Mittel erhöht ($530,3 \pm 135,0$ nmol/(l*s) bzw. $491,0 \pm 75,7$ nmol/(l*s); p = 0,02, einfaktorielle ANOVA). Stratifiziert nach den einzelnen Rotterdam-Kriterien zur Diagnose des PCOS ergab sich eine hochsignifikante Assoziation zwischen einer erhöhten DPP-IV-Aktivität und der Detektion von polyzystischen Ovarien im Ultraschall (p = 0,002, einfaktorielle ANOVA; Hyperandrogenismus: p = 0,29; Oligomenor-

rhoe: p = 0,14). Im Gegensatz dazu unterscheidet sich die Aktivität der DPP IV nicht signifikant im Serum von Patientinnen mit einem BMI ≥ 30 (n = 27) von nicht-adipösen Patientinnen (n = 82; p = 0,723; Mann-Whitney-U-Test). Des Weiteren konnte in bivariaten Korrelationsanalyse eine signifikante negative Assoziation zwischen der DPP-IV-Aktivität und dem Alter (rS = -0,317; p = 0,001, n = 109, Spearman-Rho-Test) detektiert werden. In bivariaten Korrelationsanalysen war die Aktivität von DPP IV zur Proteinkonzentration im Serum der Gesamtkohorte positiv korreliert (rS = 0,342; p = 0,003, n = 74, Spearman-Rho-Test). In einer einfaktoriellen ANOVA zeigt die DPP-IV-Konzentration allerdings keine Assoziation zum Vorliegen eines PCOS (p = 0,28, Mann-Whitney-U-Test; n = 74). In bivariaten Korrelationsanalysen konnte allerdings im Serum der Patientinnen eine signifikante negative Assoziation zwischen der DPP-IV-Proteinkonzentration und der Konzentration von FSH (rS = -0,288; p = 0,038, n = 79, Spearman-Rho-Test) und Prolaktin (rS = -0,303; p = 0,037, n = 48, Spearman-Rho-Test) detektiert werden.

Schlussfolgerung Die Aktivität der Dipeptidyl-Peptidase IV im Serum von Patientinnen mit Polyzystischem Ovarsyndrom ist signifikant erhöht. Die statistische Korrelation deutet darauf hin, dass die gesteigerte DPP-IV-Aktivität nicht im Zusammenhang mit dem Vorliegen einer Adipositas, sondern primär mit dem Auftreten polyzystischer Ovarien steht.

P090

Erhöhte Expression der microRNAs miR-23a und miR-181a im Serum von Patientinnen mit Polyzystischem Ovarsyndrom

W. Würd, J. Werner, S. Pelka, S. Köller, P. Kaltwaßer, T. Greither, H. M. Behre
Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Halle (Saale), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Germany

Fragestellung Ungewollte Kinderlosigkeit betrifft etwa 10–15 % aller Paare in Europa und den USA. In etwa 50 % aller Fälle liegen die Ursachen für die Infertilität bei der Frau, wobei Endokrinopathien wie das Polyzystische Ovarsyndrom (PCOS) zu den häufigsten Gründen für das Ausbleiben einer Schwangerschaft zählen. Symptome zur Diagnostik des PCOS sind An- oder Oligomenorrhoe, Hyperandrogenismus und polyzystische Ovarien im Ultraschallbefund (Rotterdam-Kriterien). Häufig ist das PCOS assoziiert mit metabolischen Störungen wie Adipositas und einer peripheren Insulin-Resistenz. Allerdings sind die Kriterien für die Diagnostik des PCOS umstritten, und diagnostische oder prädiktive molekulare Marker sind rar. MicroRNAs sind kleine (18–25 Nukleotide lange), nicht-kodierende RNAs endogenen Ursprungs. Sie wirken intrazellulär als post-transkriptionelle Regulatoren der Genexpression, können aber auch als zirku-

lierende microRNAs in Blut, Seminalplasma, Ascites oder Urin nachgewiesen werden. In verschiedenen Tumorentitäten hat der Nachweis dysregulierter microRNA-Expressionsprofile diagnostische oder prädiktive Bedeutung. Im Rahmen dieser Studie wurden microRNA-Expressionsprofile aus dem Serum von PCOS- und Nicht-PCOS-Patientinnen angelegt und differenziell exprimierte microRNAs in einer größeren Studienkohorte validiert.

Methodik Die Studienkohorte bestand aus 94 Patientinnen mit unerfülltem Kinderwunsch (46 ohne PCOS, 48 mit PCOS). Gesamt-RNA wurde mittels Phenol/Chloroform-Extraktion aus dem Serum isoliert und quantifiziert. Für die microRNA-Expressionsprofile im Serum von 3 Patientinnen (1× normalgewichtig, ohne PCOS, 1× Adipositas, ohne PCOS, 1× PCOS) wurden jeweils 5 µg Gesamt-RNA mittels eines nicht-radioaktiven Northern-Blot-Verfahrens (microRNA-Arrays, Signosis Inc., Santa Clara, USA) verwendet. Die Expression differenziell exprimierter microRNAs wurden mittels quantitativer Real-time-PCR und spezifischen TaqMan-Primern (Applied Biosystems, Darmstadt) in der gesamten Studienkohorte quantifiziert. Statistische Untersuchungen (Mann-Whitney-U-Test und bivariate Korrelationsanalysen nach Spearman-Rho) wurden mittels SPSS19.0 (IBM, Armonk, USA) durchgeführt.

Ergebnisse Es lagen 24 microRNAs zwischen der PCOS- und Nicht-PCOS-Patientin differentiell exprimiert vor. Aus den differentiell exprimierten microRNAs wurden miR-9, miR-22, miR-23a, miR-181a, miR-186, miR-200a, miR-203, miR-204, miR-221, miR-222, miR-375 und miR-411 selektiert und in der gesamten Studienkohorte (n = 94) gemessen. Die Expression von miR-23a war im Serum von PCOS-Patientinnen signifikant erhöht im Vergleich zu Nicht-PCOS-Patientinnen (p = 0,046, Mann-Whitney-U-Test). Stratifiziert nach den Rotterdam-Kriterien war miR-181a im Serum von Patientinnen mit polyzystischen Ovarien im Ultraschall signifikant stärker exprimiert (p = 0,019, Mann-Whitney-U-Test), während miR-186 bei Patientinnen mit Oligomenorrhoe signifikant niedriger exprimiert war (p = 0,048, Mann-Whitney-U-Test). Weiterhin war in bivariaten Korrelationsanalysen die Expression der miR-9 signifikant mit Progesteron-Konzentration im Serum assoziiert (rS = 0,26; p = 0,027, n = 70; Spearman-Rho), während die Expression der miR-22 mit der LH/FSH-Ratio negativ korrelierte (rS = -0,32; p = 0,015, n = 58; Spearman-Rho).

Schlussfolgerung Im Serum von PCOS-Patientinnen können im Vergleich zu Nicht-PCOS-Patientinnen differentiell exprimierte microRNAs nachgewiesen werden. Eine signifikant stärkere Expression der miR-23a im Serum von PCOS-Patientinnen konnte darüber hinaus in der gesamten Studienkohorte detektiert werden. Da Daten zu putativen Funktionen und zellulären Wechselwirkungen von zirkulierenden microRNAs immer

noch rar sind, sind weitere Untersuchungen zur Rolle dieser RNA-Subpopulation im Serum sowie die funktionelle Verbindung zum Polyzystischen Ovarsyndrom dringend erforderlich.

P091

Lymphozytendifferenzierung bei Frauen mit habituellen Aborten im Verlauf einer aktiven Immunisierungstherapie mit paternalen Lymphozyten

B. Mikat-Drozdzyński¹, A. M. Wienecke², A. Schanz¹, A. P. Hess¹, J. S. Krüssel¹

¹UniKiD, Universitäts-Frauenklinik Düsseldorf; ²Lukas Krankenhaus, Anästhesiologie, Neuss, Deutschland

Fragestellung Zeigen sich bei Abortpatientinnen mit vermuteter immunologischer Genese Normabweichungen der Lymphozyten-subpopulationen – wie erhöhte NK-Zellen im peripheren Blut – und lassen sich im Verlauf einer Immunisierung mit paternalen Lymphozyten Veränderungen aufzeigen?

Haben diese Veränderungen einen prognostischen Wert hinsichtlich des Ausgangs einer weiteren Schwangerschaft?

Hintergrund Habituelle Aborte (≥ 3 Aborte) treten bei 1–3 % aller Frauen mit Kinderwunsch auf.

Bei Patientinnen ohne Hinweis auf anerkannte Abortursachen (genetisch, anatomisch, hämostaseologisch, endokrinologisch, autoimmunologisch) werden alloimmunologische Abortursachen postuliert. Diese Diagnose ist in der Regel eine Ausschlussdiagnose, da spezifische Tests nicht zur Verfügung stehen.

Veränderungen der Subpopulationen der peripheren Lymphozyten werden von einigen Autoren als möglicher Hinweis auf eine immunologische Abortursache gewertet.

Material und Methode Im Rahmen einer retrospektiven Analyse wurden Daten von 44 Frauen erhoben, die im Zeitraum 1994–2008 an der UFK Düsseldorf eine Immunisierung mit paternalen Lymphozyten (patLT) bei v. a. immunologisch bedingte habituelle Aborte erhielten und bei denen im Verlauf der aktiven Immunisierungstherapie eine Lymphozytendifferenzierung durchgeführt wurde. Die Datenerhebung erfolgte durch Akteneinsicht und telefonisches Interview mithilfe eines strukturierten Fragebogens.

Ergebnisse und Schlussfolgerung Insgesamt liegen die Daten über den weiteren Verlauf bei 37 von 44 Patientinnen vor. Bei 33 Frauen trat erneut eine SS ein, bei 28/33 (84,85 %) kam es zur Geburt eines Kindes, 5 Frauen (15,15 %) erlitten einen erneuten Abort. (Im Vergleich dazu wird das Abortrisiko nach 3 Aborten in der Literatur mit 25–40 % angegeben).

Bei einem zahlenmäßig geringeren Anteil der Patientinnen konnten initial auffällige Lymphozytenpopulationen gefunden werden (da-

bei 31,8 % erhöhte NK-Zellen, 11,36 % reduzierte CD3⁺-T-Zellen, 11,36 % erhöhte CD4⁺-T-Helferzellen, 20,45 % erhöhte CD4⁺/CD8⁺-Ratio).

Unter patLT zeigten sich konstant nachweisbare Veränderungen der Lymphozytensubpopulationen bei einem kleineren Anteil der Patientinnen.

Bei 20,46 % wurde eine kontinuierliche Reduktion der NK-Zellen, bei 31 % ein Anstieg der CD3⁺-T-Zellen, bei 25 % eine Reduktion der CD4⁺-T-Helferzellen, bei 34,1 % Verschiebung der CD4⁺/CD8⁺-Ratio zugunsten der CD8⁺-T-Zellen nachgewiesen.

Diese festgestellten Veränderungen hatten keinen prognostischen Aussagewert hinsichtlich des Ausgangs einer erneuten SS. Eine Tendenz für ein erhöhtes Abortrisiko zeigte sich in der Gruppe der 9/44 Frauen mit kontinuierlich erhöhten NK-Zellen (20,45 %), deren erneute Schwangerschaft bei 5 Frauen (55,56 %) mit der Geburt eines Kindes endete, während 3 Frauen (33,3 %) einen erneuten Abort erlitten, allerdings ist bei kleiner Fallzahl eine Signifikantsberechnung nicht möglich.

Zur Diagnosestellung eines autoimmunologischen habituellen Abortgeschehens ist die Lymphozytendifferenzierung nach unseren Daten nicht geeignet.

Ein günstiger Effekt der Immunisierung mit paternalen Lymphozyten ist über eine Veränderung dieser Populationen nicht zu erfassen.

P092

Lymphozyten-Immunotherapie (LIT) nach wiederholtem Implantationsversagen im IVF-Programm: Ergebnisse einer prospektiven Beobachtungsstudie

C. Kling¹, J. Hedderich², C. Both¹, D. Kabelitz¹

¹Institut für Immunologie; ²Institut für Medizinische Informatik und Statistik, Kiel, Deutschland

Fragestellung Die Immuntherapie mit Partnerlymphozyten (LIT) wird bei ausgewählten Paaren zur Verbesserung der Implantationsrate nach Embryotransfer eingesetzt. Zum Effektivitätsnachweis ist jedoch eine randomisierte Studie mit ausreichend hohen Fallzahlen bei Paaren mit wiederholtem Implantationsversagen schwer zu initiieren, weil auch nach weiteren Einflussfaktoren randomisiert werden muss und die Patienten im IVF-Programm unter hohem emotionalen Druck stehen. Daher wurde ein alternatives Studienkonzept verfolgt.

Methodik Prospektive nicht-kontrollierte Beobachtungsstudie aller Patientinnen, die 2009 und 2010 nach mindestens 3 erfolglosen Embryotransfers mittels LIT behandelt worden waren. Im Jahre 2012 wurde ein Fragebogen verschickt, den 393 von 765 Frauen (51 %) beantworteten. Die Daten wurden durch Abgleich mit einer vorangegangenen Studie aus den Jahren 1996–1998 (769 Paa-

re, Rücklauf 93 %) auf Plausibilität geprüft und mit den Daten des Deutschen IVF-Registers (D-I-R 2009) verglichen, in dem erstmalig die in Deutschland erzielten Schwangerschaftsraten (PR) pro Zyklus, bezogen auf das Alter der Frau und die Zahl der Zyklen, ausgewertet wurden.

Ergebnisse Die Gruppe mit Rückmeldungen war annähernd repräsentativ für die Gesamtgruppe von 765 Frauen. Nach $2,6 \pm 0,8$ (1–9) Eizellstimulationen und $4,1 \pm 1,3$ (1–20) erfolglosen Embryotransfers setzten 339 Frauen (87 %) die IVF-Behandlung fort. Binnen 2,1 $\pm$ 0,5 Jahren (0,5–4 Jahre) bekamen 215 von 393 Paaren (54 %) Kinder: 164 von 215 (76 %) nach Embryotransfer, 43 (20 %) nach spontaner Schwangerschaft und 9 (4 %) nach anderen Therapien. Bis zum Alter der Frau von 36 Jahren bei LIT waren die Schwangerschafts- (PR-) und Geburtenraten in den ersten 6 Monaten signifikant um 25 % höher als im 2. Jahr nach LIT ($p < 0,03$). Dieser Effekt ist nicht auf den Anstieg des Lebensalters zurückzuführen. Ab dem 4. IVF-Zyklus lag die PR bei Frauen bis 34 Jahren bei 37,7 % und bei Frauen zwischen 35 und 39 Jahren bei 26,5 % pro Transfer. Damit überstieg die PR bei der 4.–6. Eizellpunktion die Angaben des D-I-R relativ um 30 % in der Gruppe der jüngeren und um 14 % in der Gruppe der älteren Frauen. Eine statistische Auswertung wurde hier wegen der unterschiedlichen Grundgesamtheiten nicht durchgeführt. Die Geburtenrate betrug in diesen Gruppen nach LIT 30,7 % bzw. 23,0 %.

Schlussfolgerung Die Daten weisen darauf hin, dass Frauen mit wiederholtem Implantationsversagen – abhängig vom Alter – von der LIT in den ersten 6 Monaten profitieren. Die Ergebnisse lassen sich erkennen, dass biologische Einflussfaktoren wie z. B. das Alter der Frau in dieser Patientengruppe eine deutliche Rolle spielen.

P093

Impfungen bei Kinderwunsch

C. Kling¹, A. Carstensen²

¹Institut für Immunologie, Kiel; ²KinderwunschKiel, Kiel, Deutschland

Fragestellung Moderne Impfstoffe bieten eine wirksame Infektionsprophylaxe, die Umsetzung der Empfehlungen der Ständigen Impfkommission wird im Gesundheitswesen finanziell gefördert. Dennoch ist die Versorgung von Paaren mit Kinderwunsch und im IVF-Programm mangels klarer Vorgaben nicht selbstverständlich. Hier möchten wir ein angepasstes Impfschema vorschlagen.

Methodik Die Empfehlungen der STIKO 2012/2013 wurden mit der Richtlinie zur Empfängnisregelung 2011, der Gewebeverordnung des Transplantationsgesetzes (TPG) 2009 sowie der DGGG-Leitlinie Infektionsdiagnostik 2010 abgeglichen.

Ergebnisse Vor einer Schwangerschaft sollte gegen folgende impfpräventable Erkrankungen Impfschutz erreicht werden: Tetanus, Diphtherie, Pertussis, Masern, Mumps,

Röteln (MMR) und Windpocken. Bei vollständiger Grundimmunisierung wird maximal ein Termin für Auffrischungsimpfungen benötigt. Auch bei fehlender Grundimmunisierung reichen 2 Impftermine innerhalb von 4 Wochen und eine Wartezeit von insgesamt 6–8 Wochen aus, bevor mit der Kinderwunschbehandlung begonnen werden kann. Wiederholte Titerbestimmungen werden zunehmend durch gültig dokumentierte Impfungen ersetzt; eine Ausnahme bilden derzeit die Windpocken. Nach Lebendimpfung gegen MMR hat sich nach Herstellerangaben die Zeit, in der eine Schwangerschaft verhütet werden soll, auf 4 Wochen verkürzt. Kombinationsimpfstoffen soll im Zweifelsfall der Vorzug gegeben werden. Die Impfungen gegen Grippe und Hepatitis B werden nicht generell von der Krankenversicherung übernommen. Eine Zusammenschau des Impfplans wird in Form einer Tabelle vorgestellt.

Schlussfolgerungen Die Impfempfehlungen nach STIKO können zügig und ohne zusätzliche Kosten für die Patienten umgesetzt werden. Wir schlagen vor, die Grippe-Impfung ggf. als IgEL-Leistung zu Beginn der Grippe-Saison zu geben. Ebenso erscheint die Impfung gegen Hepatitis B sinnvoll, denn sie könnte die nach TPG vorgeschriebenen wiederholten Testungen beider Partner im IVF-Programm ersetzen.

P094

Bedeutung von IL-18 im Serum und in der Follikelflüssigkeit im Rahmen der Kinderwunschbehandlung mit IVF oder ICSI

C. Fuhs¹, L. Mettler², A. G. Schmutzler¹, J. Hedderich², W. Jonat³, A. Salmassi¹

¹Kinderwunschzentrum, Universitäts-Frauenklinik, Kiel; ²Institut für Medizinische Informatik, Kiel;

³Universitäts-Frauenklinik, Kiel, Deutschland

Fragestellung Die Zusammensetzung des Follikelinhalts spiegelt die sekretorische Fähigkeit der Granulosazellen, Thekaluteinzellen und auch immunologischer Zellen wider. Sie kann repräsentativ für den Grad der Eizellreife sein. Um prognostische Aussagen zum IVF-Therapieverlauf machen zu können scheint es sinnvoll, die biochemischen Charakteristika der Follikelflüssigkeit zu bestimmen und auf eventuelle Zusammenhänge der einzelnen Parameter zu untersuchen. IL-18 wird primär in hämatopoetischen Zellen als auch in nicht-hämatopoetischen Zelltypen, wie Kupffer-, T- und B-Zellen, dendritischen Zellen, Osteoblasten, Keratinozyten, Intestinalepithel, Korneaepithel und durch Granulosazellen des Ovars produziert. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die weitere Erforschung von IL-18 in der Reproduktionsmedizin, insbesondere bezüglich der Korrelation zu den Sterilitätsursachen.

Material und Methoden Serum und Follikelflüssigkeit (FF) von 90 IVF/ICSI/ET-Patienten (mittleren Alters = 33,8 Jahre) wurden am Tag der Follikelpunktion (FP) gewonnen und der IL-18-Spiegel mittels ELISA analysiert. In Response zur ovariellen Sti-

mulationstherapie wurden die Patientinnen in eine schlechte Gruppe mit Anzahl der gewonnen Eizellen ≤ 6 ($n = 28$) und eine gute mit Anzahl der gewonnen Eizellen > 6 ($n = 62$) eingeteilt und die IL-18-Cut-off-Level im Serum und in der FF bestimmt. Zusätzlich wurde der IL-18-Spiegel im Serum von Schwangeren und Nicht-Schwangeren verglichen.

Ergebnisse Der Median der IL-18-Konzentration war mit $172,6 \pm 72,1$ pg/ml im Serum signifikant höher als in der FF mit $144,7 \pm 70,1$ pg/ml ($p < 0,001$) am Tag der FP. Eine positive Korrelation zwischen der IL-18-Konzentration im Serum und in der FF ($r = 0,84$; $p < 0,001$) wurde festgestellt. Patientinnen mit BMI ≤ 21 zeigten eine signifikant niedrigere IL-18-Konzentration im Serum und in FF als die Patientinnen mit BMI > 21 ($p = 0,015$).

Der Mittelwert der IL-18-Spiegel im Serum bei Patientinnen mit guter Response ($178,2 \pm 72,2$ pg/ml) war signifikant höher als bei Patientinnen mit niedriger Response auf die ovarielle Stimulationstherapie (IL-18 = $160,2 \pm 81$ pg/ml) ($p < 0,001$). Es ergab sich gemäß ROC-AUC bei einer Sensitivität von 60,7 % und eine Spezifität von 64,3 % ein Cut-off-Level von 158,6 ng/ml in Serum. Die Schwangerschaftsrate betrug 39 % unterhalb und 32 % oberhalb von diesem Cut-off-Level.

Schlussfolgerung Unsere Daten weisen darauf hin, dass IL-18 Einfluss auf die ovarielle Funktion ausübt und somit auch auf das Ergebnis in der hyperstimulierten IVF/ICSI.

P095

A successful Transportation and Cryopreservation Concept of the Cryobank Bonn-Glucose/Lactate Metabolism as a Diagnostically Conclusive Marker for Tissue Integrity

J. Liebenthron¹, L. Bastings², J. R. Westpha³, C. C. M. Beerendonk², H. van der Ven¹, D. Töpfer³, M. Montag⁴, D. D. M. Braat², R. Peek²

¹Department of Gynaecological Endocrinology and Reproductive Medicine, University of Bonn; ²Department of Obstetrics and Gynaecology (791), Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, Netherlands; ³Department of Reproductive Biology, Foundation, University of Veterinary Medicine Hannover; ⁴Department of Gynaecological Endocrinology and Fertility Disorders, University of Heidelberg, Germany

Introduction Oncological treatments still bear the risk of gonadal arrest resulting in functional loss of fertility. Cryopreservation of ovarian tissue for later retransplantation provides a potential option for fertility preservation in young women. At present different protocols for ovarian tissue cryopreservation and thawing are available. In addition, ovarian tissue may require transportation from a peripheral clinic to a more specialized Cryo-centre prior to cryopreservation. We aimed to investigate follicle and stromal tissue viability before and after

transportation, as well as before and after cryopreservation and thawing of ovarian tissue, as recent studies have focused mainly on follicle viability, without assessing stromal cell viability.

Methods This current study is a result of a collaboration between the Cryobank Bonn and the Radboud University Nijmegen Medical Centre (RUNMC), Nijmegen, The Netherlands. This study was performed between January 2012 through July 2013. Ovarian tissue from 26 newly diagnosed cancer patients (median age 28 years) was included after overnight transport from assigning hospitals to the Cryobank in Bonn. Tissue and follicle viability was evaluated before and after cryopreservation using a Calcein AM viability assay, histology and a glucose uptake assay (GUA). Biopsies were normalized for GUA cultured over a seven day period before versus after cryopreservation and thawing. The conditioned supernatant was collected at day 4 and at day 7, stored at -20°C , and transported to the collaboration centre RUNMC for analysis. All values were normalized for the weight of the biopsied material. At the RUNMC the transport procedure of the Cryobank Bonn was mimicked experimentally using ovarian tissue from 13 premenopausal BRCA-mutation carrying women (median age 40 years) following a prophylactic salpingo-oophorectomy. Follicle and stromal cell viability were assessed by a Neutral Red follicle viability assay, histology, and the GUA.

Results After analysis of the Calcein AM viability assay and histology, no statistically significant decrease in the number of viable follicles was found. Glucose uptake, on the other hand, was statistically significantly reduced after cryopreservation and thawing when compared to fresh tissue ($p < 0.05$), indicating a reduction in stromal cell survival. After evaluation of the mimicked transport procedure, the Neutral Red follicle viability assay and histology results of the RUNMC showed that the overnight ovarian tissue transport under regular conditions (median temperature 6.4°C , median duration of transport 22.5 hours) did not negatively influence follicle viability. Even the Glucose uptake did not significantly differ between biopsies cultured before versus after transport, indicating that there is no loss of stromal cell survival.

Conclusions The current study reflects the impact of overnight transport, cryopreservation and thawing on ovarian tissue when using protocols from the Cryobank Bonn. Whereas the number of viable follicles remained unaffected, stromal cell survival was significantly impaired following cryopreservation and thawing of ovarian tissue. Overnight transport of ovarian tissue did not negatively influence follicle or stromal cell survival in this study. The GUA for investigating the glucose/lactate metabolism constitutes an additional diagnostically relevant quantitative marker of human ovarian cortex viability compared to conventional Calcein AM viability assay and Neutral Red follicle

viability assay, which are routinely performed at the Cryobank Bonn. The assay is easy to perform, cost effective and reproducible for evaluating and optimising cryopreservation methods. The concept of the Cryobank Bonn has been successfully validated after ovarian re-transplantation by the birth of one healthy child and two healthy ongoing pregnancies. These study results can be seen as a reference for evaluation and modification of existing protocols.

P096

Reproductive Outcome after Transplantation of Cryopreserved Ovarian Tissue into 19 Patients: Experiences of a Single Center

R. Ditttrich¹, L. Lotz¹, I. Hoffmann¹, A. Müller², T. Hildebrandt¹, M. W. Beckmann¹

¹OB/GYN, University-Hospital Erlangen; ²OB/GYN, Städtisches Klinikum Karlsruhe, Germany

Aim of the Study The aim of this study was to evaluate the ovarian function and fertility after orthotopic autotransplantation of frozen-thawed ovarian tissue in 19 cancer patients after overcoming their disease.

Introduction Cryopreservation of ovarian tissue with subsequent retransplantation following a period of recurrence-free survival is a promising new technique for fertility preservation in patients facing gonadotoxic treatment. Twenty-four pregnancies have been reported worldwide from this procedure and it can be expected that in the near future more and more cancer patients who have been cured of their disease are likely to request reimplantation of cryopreserved ovarian tissue. However, there are still many unanswered questions regarding this subject.

Material and Methods 19 cancer patients (mean age 32, at time of transplantation; $n = 8$ Hodgkin, $n = 2$ anal cancer, $n = 2$ breast cancer, $n = 7$ others) were transplanted with their own frozen/thawed ovarian tissue (between 2010 and 2013), after completed cancer treatment. The tissue had been cryopreserved with slow freezing protocols prior to chemo- and/or radiotherapy in different centers of the network FertProtekt (Bonn, Düsseldorf, Erlangen, Essen, Hamburg). After cancer remission, the cryopreserved ovarian tissues were thawed at the University Hospital Erlangen and retransplanted orthotopically in the vicinity of the ovary (either in the pelvic wall or with reconstruction of the ovary). Endocrine function was assessed by monthly blood tests (FSH, LH, E2, progesterone and testosterone) and ultrasound after transplantation.

Results All patients, who have been transplanted, at least for 5 months, regained ovarian function between 6 and 24 weeks after transplantation, as shown by follicle development and estrogen production. In the patients where IVF was planned, oocytes from the transplanted ovarian tissue could be retrieved and fertilized even without hormonal stimulation. So far three patients conceived

spontaneously, resulting in two healthy live births and one ongoing pregnancy. In two patients with anal carcinoma, however the endometrium thickness did not succeed in increasing to more than 6.2 mm even after hormonal support indicating endometrial insufficiency after pelvic radiation.

Conclusion Autotransplantation of frozen-thawed ovarian tissue is a good method to restore fertility. Therefore cryopreservation of ovarian tissue should be offered to all patients, at least to all where other fertility preserving methods like ovarian transposition or oocyte freezing after stimulation is not possible. However, there are many issues involved with retransplantation of ovarian tissue and factors like uterine damage due to pelvic radiotherapy need stronger investigation in order to optimize the preservation of fertility. Although cryopreservation of ovarian tissue enables patients to conceive when they have overcome their primary disease, reports of pregnancy after transplantation are still scarce and there are many unanswered questions regarding the best place to retransplant ovarian tissue and the longevity of the tissue.

P097

The Effects of Interim Storage at Supra-Zero Temperature of Human Ovarian Cortex before Vitrification

S. Klocke, C. Tappehorn, G. Griesinger
Department of Reproductive Medicine, University Hospital of Schleswig-Holstein, Lübeck, Germany

Study Question Interim storage is often necessary for transportation of ovarian cortex from the retrieval site to the cryopreservation facility. At supra-zero temperatures ($0-7^{\circ}\text{C}$), cellular metabolism is retarded, which in turn reduces the cellular oxygen demand. Various human tissues can be stored for up to 96h without relevant functional damage. However, longer term interim storage will inevitably cause irreversible ischemic damage. Studies on storage of ovarian tissue are limited in numbers and little is known about the optimal transport conditions, though it has been claimed that ovarian tissue transportation is possible for up to 26h.

We hypothesized that ovarian tissue, due to its bradytrophic metabolism, would be exceptionally resistant to ischemic stress, and thus the transportation duration at supra-zero temperatures could be extended for up to 48 hours. We therefore performed a prospective exploratory study to assess the effects of 24h and 48h of supra-zero storage, respectively, before vitrification compared to direct vitrification.

Study Design Ovarian cortical biopsies from 12 pre-menopausal female patients were obtained and cut into pieces of equal size ($5 \times 5 \times 1 \text{ mm}$). Six fresh cortical tissue pieces from each patient were randomly allocated to one of three experimental groups. In the first group, two cortical tissue pieces were immediately vitrified. In the second

group, two tissue pieces were stored separately for 24h in 1.5 ml Celsior® medium on ice in the refrigerator. In the third group, two tissue pieces were stored separately for 48h in 1.5 ml Celsior® medium on ice in the refrigerator. After storage for 24h and 48h, respectively, the tissue pieces were also vitrified and the Celsior® medium was frozen at -80°C for later assessment of MDA (MDA, a biomarker for oxidative stress) concentrations. After warming, one ovarian tissue piece from each experimental group was fixed in formalin and the other was cultured. The main outcome measures were histological (follicle quality) and immunohistochemical (apoptosis rate) analysis, follicle counting, assessment of malondialdehyde during storage and estradiol release in culture.

Results The malondialdehyde concentration increased statistically significant during interim storage in a time-dependent manner (control: 0 pmol/mg protein; 24h group: median 6.14 pmol/mg protein, range 1.96–18.37 pmol/mg protein; 48h group: median 12.3 pmol/mg protein, range 3.54–43.87 pmol/mg protein; $p = 0.029$). A statistically significant decrease in the “area-under-the-curve” of the estradiol release was observed between the direct vitrification group (median 71.661; range 1.619–207.284), the 24h group (median 35.191; range -16.599–139.247) and the 48h group (median 20.052; range 3.645–79.938) ($p = 0.043$). There was a trend for a lower proportion of high quality follicles ($p = 0.359$) and more apoptotic follicles ($p = 0.123$) with increasing storage du-

ration, however this did not reach statistical significance.

Conclusion The interim storage affects the concentration of malondialdehyde in the storage medium and the estradiol release in culture in a time-dependent manner. Additionally, the proportion of follicles with high morphological quality and apoptotic follicles is affected. The present data provide first evidence that interim storage at supra zero conditions exerts significant negative effects already within 24 hours. Accordingly, prolonged tissue transportation must not be considered a routine for the time being, and – as a best estimate – transportation durations should be kept at a minimum to prevent potential damage.

Presenting Authors

A			K			S		
Albrecht K.	P038	309	Kalhor S.	P057	318	Salmassi A.	P094	335
Altergot-Ahmad O.	P062	321	Kasatonova E.	P029	306	Sanchez V.	P066	323
B			Kästingschäfer C.	P004	295	Sandi Monroy N.L.	P047	313
Behre H.	P015	299	Kläver R.	P077	328	Sandner F.	P019	301
	P016	300	Klein B.	P028	305	Schagdarsurengin U.	P073	326
Blohberger J.	P058	319	Kling C.	P092	334	Schanz A.	P065	322
Böddeker S.J.	P010	297		P093	335	Schemmer J.	P078	328
Borgmann J.	P075	327	Klocke S.	P097	336	Schmidt S.	P036	309
Brügge C.	P088	332	Konrad L.	P005	295	Schneider F.	P034	308
C			Krasnyak S.	P017	300		P086	331
Czeloth K.	P030	306	Kraus M.	P011	298	Schneider S.	P040	310
D			Kwiatkowski B.	P046	313	Schubert K.	P024	303
Damm O.	P013	299	L			Schulte K.	P055	318
Dittrich R.	P096	336	Langenstroth D.	P079	329	Schüring A.	P001, P002, P003	294
F			Laurentino S.	P072	325		P041	311
Feuerstacke C.	P064	321	Ledig S.	P069	324	Schwindl B.	P018	300
Fietz D.	P026	304	Liebenthron J.	P095	335	Seegerer S.E.	P067	323
Fijak M.	P022	303	M			Simon J.	P053	317
Flenkenthaler F.	P087	332	Mellies N.	P081	329	Spieß A.-N.	P033	307
G			Mietens A.	P054	317	Spiliopoulos G.	P031, P032	307
Germeyer A.	P007	296	Mikat-Drozdowski B.	P091	334	Springguth C.	P059	319
Giebler M.	P025	304	Morales-Prieto D.M.	P061	320	Steger K.	P027	305
Golakov M.	P045	312	N			T		
Gómez E.	P043	311	Nordhoff V.	P048	314	Tewes A.-C.	P068	324
Götte M.	P006, P008	296	P			Thong A.	P056	318
	P009	297	Paradowska-Dogan A.	P023	303	Tran K.	P082	330
Greither T.	P089	333	Pastuschek J.	P060	320	Trapphoff T.	P051	315
H			Paulmann B.	P042	311	Tüttelmann F.	P076	327
Haggeney T.	P020	302	Pock T.	P049	314	V		
Heiligttag M.	P050	315	R			Von Kopylow K.	P083	330
Hempfling A.-L.	P052	316	Rehkämper J.	P071	325	Von Wolff M.	P039	310
			Riaz A.	P021	302	W		
			Rohayem J.	P014	299	Wagner A.	P044	312
			Röpke A.	P070	325	Weber M.	P063	321
			Ruf C.G.	P035	308		P084	331
				P037	309	Wenzel C.	P012	298
						Werler S.	P074	326
						Westernströer B.	P080	329
						Windschüttl S.	P085	331
						Würl W.	P090	333

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](#)