

JOURNAL FÜR FERTILITÄT UND REPRODUKTION

ECKEL H, KLEINSTEIN J, STUMM M, WIEACKER P

Zytogenetische Untersuchungen von humanen unreifen Eizellen

*Journal für Fertilität und Reproduktion 2001; 11 (2) (Ausgabe
für Schweiz), 14-22*

*Journal für Fertilität und Reproduktion 2001; 11 (2) (Ausgabe
für Österreich), 14-22*

Homepage:

www.kup.at/fertilitaet

**Online-Datenbank mit
Autoren- und Stichwortsuche**

ZEITSCHRIFT FÜR IN-VITRO-FERTILISIERUNG, ASSISTIERTE REPRODUKTION UND KONTRAZEPTION

**Erschaffen Sie sich Ihre
ertragreiche grüne Oase in
Ihrem Zuhause oder in Ihrer
Praxis**

Mehr als nur eine Dekoration:

- Sie wollen das Besondere?
- Sie möchten Ihre eigenen Salate,
Kräuter und auch Ihr Gemüse
ernten?
- Frisch, reif, ungespritzt und voller
Geschmack?
- Ohne Vorkenntnisse und ganz
ohne grünen Daumen?

Dann sind Sie hier richtig



ZYTOGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN VON HUMANEN UNREIFEN EIZELLEN

Summary

A considerable number of cytogenetic studies have been performed in order to ascertain the variety and frequency of chromosomal abnormalities in mature human oocytes remaining unfertilised after in-vitro fertilisation (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI). In the course of these analyses various cytogenetic methods like conventional homogeneous staining of meiotic oocyte chromosomes or fluorescence-in-situ-hybridisation (FISH)-techniques were used. The purpose of our study was to analyse whether these methods are also suitable techniques for the cytogenetic analysis of immature human oocytes arrested at the germinal vesicle (GV)-stage. GV-stage oocytes, obtained from patients who underwent laparotomy for different causes of sterility (i.e. reversal of tubal sterilisation, excision of myomas or endometriosis), as well as oocytes remaining arrested at the GV-stage after superovulation treatment followed by IVF/ICSI were prepared according to the gradual fixation method of Kamiguchi et al [Proc

Japan Acad 1976; 52: 316]. The nuclear material was analysed by homogeneous staining with Giemsa and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Thereby, GV-oocytes with different patterns of chromatin condensation could be identified. In addition, FISH analysis was performed using direct-labelled locus specific DNA probes for the chromosomes 13 and 21 (LSI 13, LSI 21, Vysis). 29 oocytes were examined and 20 (69,0%) of them provided analysable patterns of signals indicating the two homologues of the chromosomes 13 and 21 respectively. Consequently, this FISH-technique allows the determination of the number of specific chromosomes in the germinal vesicle and thereby, may facilitate the identification of aneuploid germ cell lines in female patients. Therefore, cytogenetic studies of immature human oocytes could provide new insights into the nuclear changes during oocyte maturation and may be important for the identification of mechanisms associated with oocyte maturation dysfunction.

verschiedene GV-Oozyten mit deutlichen Unterschieden hinsichtlich des Kondensationsgrades ihres Chromatins identifiziert werden. Zusätzlich wurden FISH-Analysen mit direkt markierten Locus-spezifischen DNA-Sonden für die Chromosomen 13 und 21 durchgeführt (LSI 13, LSI 21, Vysis). Von 29 Eizellen konnten bei 20 (69,0%) anhand der spezifischen Signalmuster die jeweiligen homologen Chromosomen 13 und 21 detektiert werden. Damit ermöglicht diese FISH-Technik die Bestimmung der Anzahl spezifischer Chromosomen im Germinalvesikel unreifer Eizellen und die Identifizierung von aneuploiden Keimzelllinien. Zytogenetische Studien von unreifen humanen Eizellen könnten somit sowohl für die Untersuchung der Reifung weiblicher Gameten als auch für die Identifizierung möglicher Störungen im Reifungsprozeß von Bedeutung sein.

ZUSAMMENFASSUNG

Bislang sind zahlreiche zytogenetische Studien durchgeführt worden, um Art und Häufigkeiten chromosomaler Anomalien bei reifen humanen Eizellen zu bestimmen, welche nach einer in vitro-Fertilisation (IVF) oder intrazytoplasmatischen Spermatozoeninjektion (ICSI) unbefruchtet blieben. Hierbei fanden verschiedenste Analysetechniken wie die konventionelle Homogenfärbung meiotischer Eizellchromosomen oder die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) Anwendung. Unsere Zielsetzung war, zu klären, ob diese Verfahren auch für die zytogenetische

Analyse unreifer humaner Eizellen geeignet sind, welche sich im Germinalvesikel (GV)-Stadium befinden. Hierfür wurden unreife Oozyten verwendet, welche im Rahmen von Laparotomien bei verschiedenen Sterilitätsursachen (z. B. Wiederherstellung der Eileiterdurchgängigkeit, Entfernung von Myomen oder Endometrioseherden) gewonnen wurden oder die nach ovarieller Stimulation bei IVF oder ICSI im GV-Stadium arretiert blieben. Die Präparation der Zellen erfolgte entsprechend einem von Kamiguchi et al. beschriebenen graduellen Verfahren [Proc Japan Acad 1976; 52: 316]. Nach Homogenfärbung des Kernmaterials mit Giemsa und 4',6-Diamidino-2-phenylindolhydrochlorid (DAPI) konnten

EINLEITUNG

Im weiblichen Organismus laufen die ersten Phasen der Meiose pränatal ab. In der frühen Embryogenese wandern die primordialen Keimzellen zu den sich bildenden Ovarien, wobei sich in einem Prozeß, der durch Zellwachstum und Neuverteilung von zytoplasmatischen Organellen gekennzeichnet ist, die sogenannten Oogonien bilden. Während des 3. bis 7. Schwangerschaftsmonats differenzieren sich aus diesen Oogonien nach einer mitotischen Proliferationsphase die primären Oozyten. Zu diesem Zeitpunkt setzt die erste meiotische Teilung ein. Nach dem Durchlaufen des Leptotäns, Zygotäns und Pachytäns erreicht die primäre Oozyte das Diplotän der ersten meiotischen Prophase kurz vor oder unmittelbar nach der Geburt. Bis mit Beginn der Pubertät die Ausreifung einzelner Oozyten im Rahmen des weiblichen Zyklusgeschehens einsetzt, verbleiben humane Eizellen im Stadium des verlängerten Diplotäns (Diktyotän).

Hierbei sind sie morphologisch durch die Existenz eines großen, blasigen Nukleus gekennzeichnet, in welchem das chromosomale Material lokalisiert ist und der auch als Keimzellbläschen oder Germinalvesikel (GV) bezeichnet wird [1, 2].

Die Fortsetzung der Meiose wird durch die präovulatorische Gonadotropinausschüttung induziert. Es erfolgt mit dem Ausschleusen des 1. Polkörperchens die Trennung der homologen Chromosomen und damit die Reduktion auf einen haploiden Chromosomensatz (sekundäre Oozyte). Während der letzten Stadien der Follikelreifung und der Ovulation bleiben die Chromosomen ausgereifter Eizellen in der Metaphase II (MII) arretiert. Erst der Penetrationsvorgang eines Spermatozoons bei der Befruchtung löst den Abschluß der zweiten meiotischen Teilung und die Ausbildung des 2. Polkörperchens aus.

Seit Einführung der ovariellen Stimulation mit anschließender in vitro Fertilisation (IVF) oder intrazytoplasmatischer Spermatozoeninjektion (ICSI) in die Sterilitätstherapie wurden unbefruchtete, reife, humane Eizellen für wissenschaftliche Untersuchungen verfügbar, da nach erfolgreicher Insemination bzw. Mikroinjektion nicht alle Oozyten befruchtet werden oder in einigen Fällen ungeteilt bleiben. Diese Keimzellen verlieren während ihrer weiteren Kultivierung jegliches Entwicklungspotential, ermöglichen aber die direkte Analyse von weiblichen Gameten hinsichtlich chromosomaler Anomalien meiotischen Ursprungs. So sind bislang zahlreiche zytogenetische Studien durchgeführt worden, um die Art und Häufigkeiten von strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen bei unbefruchteten reifen Oozyten nach IVF oder ICSI zu bestimmen. Hierbei zeigte sich, daß überwiegend numerische chromosomale Anomalien in humanen Oozyten vorzufinden sind. Im Rahmen dieser Studien fanden, wie auch bei der zytogenetischen Analyse

somatischer Zellen, verschiedene Untersuchungsverfahren Anwendung, angefangen von der konventionellen Homogenfärbung meiotischer Eizellchromosomen bis hin zur Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) [3–6]. Bei kritischer Durchsicht der Ergebnisse fällt jedoch auf, daß die verschiedenen Studien extrem differierende Anomalieraten aufweisen. Eine Variationsbreite von unter 10% bis zu über 60% an chromosomalen Anomalien in humanen weiblichen Keimzellen lassen die Vermutung zu, daß nicht nur endogene biologische Prozesse diese Variabilität herbeiführen, sondern daß auch präparations- und auswertungsbedingte Analysefehler ein möglicher Grund für diese unterschiedlichen Daten sind (Übersichten in [4, 7, 8]).

Des weiteren ist zu bedenken, daß es sich bei den bisherigen Untersuchungen um zytogenetische Analysen von überwiegend reifen, d. h. Metaphase II-arretierten Oozyten handelt. Hierbei bleibt offen, ob die bei humanen MII-Oozyten nachgewiesenen, numerischen, chromosomalen Anomalien das Ergebnis von Chromosomenfehlverteilungen während der 1. meiotischen Reifeteilung sind oder ob aneuploide reife Eizellen bereits im unreifen Stadium als primäre Oozyten Träger dieser Chromosomenaberrationen waren. Letzteres würde für das Vorhandensein aneuploider weiblicher Keimzelllinien sprechen. Ein direkter Nachweis für deren Existenz steht allerdings noch aus, da bislang in nur einem Fall die FISH-Analyse einer nach IVF unbefruchteten MII-Eizelle und dem zugehörigen 1. Polkörperchen einen ersten indirekten Hinweis auf eine trisome Keimzelllinie liefern konnte [5]. Insofern stellt sich die Frage nach geeigneten zytogenetischen Techniken, welche die direkte Analyse von unreifen humanen Oozyten hinsichtlich chromosomaler Aberrationen ermöglichen.

In diesem Zusammenhang war die Zielsetzung unserer Untersuchungen,

zu prüfen, ob die bislang für die zytogenetische Analyse von reifen humanen Oozyten etablierten Verfahren auch für entsprechende Untersuchungen zum Nachweis chromosomaler Anomalien bei unreifen Eizellen geeignet sind, welche sich im Germinalvesikel (GV)-Stadium befinden.

MATERIAL UND METHODEN

Gewinnung unreifer humaner Eizellen

Nach Aufklärung und Einholen des Einverständnisses der Patienten wurden unreife Eizellen zumeist bei Routineeingriffen im Rahmen von Laparotomien (Refertilisierungen, Exzision von Myomen oder Endometrioseherden usw.) an der Universitätsklinik für Reproduktionsmedizin und Gynäkologische Endokrinologie in Magdeburg Frauen im fortpflanzungsfähigen Alter entnommen. Hierbei wurden die Oozyten durch Follikelpunktion der Ovarien entsprechend der Technik, wie sie bei der assistierten Reproduktion zur Anwendung kommt, am offenen Bauch gewonnen.

Zusätzlich wurden unter Anwendung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs (FISH) -Technik Eizellen analysiert, welche bei der Sterilitätsbehandlung durch die Maßnahmen der assistierten Fertilisation (IVF oder ICSI) nach ovarieller Stimulation unreif blieben.

Die entsprechenden Studienunterlagen inklusive der Patienteninformation waren der zuständigen Ethikkommission der Universität Magdeburg vorgelegt worden und wurden von dieser genehmigt.

Präparation von Oozyten im Germinalvesikel (GV)-Stadium

Nach Punktion wurden die unreifen Eizellen in 1 x Ham's F-10-Kulturmedium (Biochrom KG, Berlin,

Deutschland) überführt und von umgebenden Kumuluszellen sowohl mechanisch als auch enzymatisch mittels Hyaluronidase (80 IE/ml; Typ VIII, Sigma, St. Louis, MO, USA) befreit. Es erfolgte dann die mikroskopische Kontrolle auf Vorhandensein eines Germinalvesikels zur eindeutigen Bestimmung des Maturitätsstatus.

Anschließend wurden die GV-Oozyten dem Kulturmedium entnommen und für 10–15 Minuten in einer hypotonen Lösung (0,9% tri-Natriumcitrat-Dihydrat) inkubiert. Danach erfolgte die graduelle Fixierung der Zellen auf Objektträger nach einem von Kamiguchi und Mitarbeitern beschriebenen Verfahren [9]. Hierbei wurden die Eizellen zunächst in Fixativ I (Methanol : Essigsäure : Wasser = 5 : 1 : 4) gegeben und nach Wiederaufhellung des Zytoplasmas auf Objektträger transferiert. Danach wurde Fixativ II (Methanol : Essigsäure = 3 : 1) über die Zellen gegeben. Die Objektträger wurden dann bis zu 5 Minuten in Fixativ II belassen und anschließend für 1 Minute in Fixativ III (Methanol : Essigsäure : Wasser = 3 : 3 : 1) getaucht. Nach dem Trocknen in einem feuchtwarmen Luftstrom und der Kontrolle der Präparate unter dem Phasenkontrastmikroskop wurden die Objektträger mit den fixierten Eizellen bis zur weiteren Analyse bei -20°C aufbewahrt.

Sequentielle Homogenfärbungen des Kernmaterials mit Giemsa und DAPI

Die Homogenfärbungen der Präparate mit Giemsa (Merck, Darmstadt, Deutschland) erfolgten in einer 0,008%igen Lösung in Phosphatpuffer (0,06 M, pH 6,8) für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Spülen und Trocknen der Objektträger wurden die Präparate dann lichtmikroskopisch ausgewertet.

Anschließend wurden entsprechend einer von Zhao und Mitarbeitern [10] entwickelten Technik zur Entfärbung Giemsa-behandelter Chromosomen-

präparate ausgewählte Objektträger mit Xylol entfärbt und zum spezifischen Nachweis von DNA mit dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindolhydrochlorid (DAPI) behandelt. Hierbei wurden jeweils 10 μl einer DAPI-haltigen Stabilisatorlösung (Vectaschield antifade medium with DAPI 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Vector Laboratories, Heidelberg, Deutschland) auf die Präparate gegeben und mit einem Deckglas (22 x 50 mm²) abgedeckt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte dann die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop (LEICA DMRB/E-Fotomikroskop; Leica Vertriebs GmbH, Bensheim, Deutschland).

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Für die FISH-Analysen wurden die beiden folgenden direkt markierten Lokus-spezifischen DNA-Sonden der Fa. Vysis (Vysis, Downers Grove, IL, USA) verwendet: 1. LSI-Sonde 13 (LSI 13 SpectrumGreen), komplementär zur Retinoblastom-Gensequenz innerhalb der Bande 13q14 auf dem langen Arm des Chromosoms 13 und 2. LSI-Sonde 21 (LSI 21 SpetrumOrange), lokalisiert im Bereich der Down Syndrom-kritischen Region (21q22.13-21q.22.2) von Chromosom 21. Die Durchführung der Hybridisierungen erfolgte nach modifizierten Protokollen des Herstellers:

Geeignete Präparate wurden zunächst mit Pepsin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; 0,01% in 0,01 N HCl) für 20 Minuten bei 37°C zur Entfernung von Zytoplasmabestandteilen vorbehandelt und danach in einer PBS (phosphate buffered saline)-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Formaldehyd (4% Formaldehyd / 50 mM MgCl₂ / PBS) nachfixiert, erneut 5 Minuten in PBS gewaschen und über eine aufsteigende Ethanolreihe (70%, 80%, 100%) je 2 Minuten dehydriert. Um

die DNA der fixierten Eizellen für die Hybridisierung in Einzelstränge zu überführen, wurden die Präparate dann für 2 Minuten in 70% Formamid / 2 x SSC (standard salt concentration, pH 7,0) bei 72°C denaturiert und in einer eiskalten (-20°C) Ethanolreihe (70%, 80%, 100%) nochmals je 2 Minuten dehydriert.

Parallel erfolgte die Denaturierung der DNA-Sonden für 5 Minuten bei 72°C . Nach Präinkubation über 15 Minuten bei 37°C wurden jeweils 5 μl des Hybridisierungsansatzes auf die denaturierten Präparate aufgetragen und mit Deckgläsern (18 x 18 mm²) luftblasenfrei abgedeckt. Die Objektträger wurden dann für die Hybridisierung über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Danach wurden unspezifisch gebundene DNA-Sequenzen durch Waschen mit 2 x SSC für 2 Minuten bei 72°C und mit 2 x SSC / 0,1% NP-40 für 2 Minuten bei Raumtemperatur entfernt. Nach Gegenfärbung der Präparate mit DAPI (s.o.) folgte die mikroskopische Auswertung im Auflichtfluoreszenzverfahren mit einem LEICA DMRB/E-Fotomikroskop (Leica Vertriebs GmbH, Bensheim, Deutschland). Hierbei wurden die verschiedenen Fluoreszenzfarbsignale mit Hilfe von Einzelbandanregungsfiltern für DAPI, FITC und Rhodamin betrachtet und aufgenommen. Die Dokumentation der mikroskopischen Bilder und deren digitale Aufarbeitung erfolgte per Computer unter Anwendung der CytoVision-Programmssoftware der Fa. Applied Imaging (Applied Imaging Int. Ltd., Sunderland, UK).

ERGEBNISSE

Homogenfärbungen des Kernmaterials mit Giemsa und DAPI

Nach gradueller Fixierung und Behandlung mit Giemsa zeigten die präparierten humanen GV-Oozyten unter dem Lichtmikroskop Giemsa-

positive Strukturen innerhalb ihrer Zytoplasmagrenzen (Abbildung 1 und 2). Damit war ein Verfahren gegeben, welches die Herstellung mikroskopischer Präparate von humanen unreifen Eizellen unter Erhal-

tung ihrer Zytoplasmagrenzen und zellulären Strukturen ermöglichte.

Hierbei kamen Präparate vor, bei denen nach Giemsa-Behandlung im mikroskopischen Bild eine eindeuti-

ge Identifizierung des Kernmaterials erschwert war (Abbildung 1 a und b). Somit erschien zum Nachweis von nukleären Strukturen die Anwendung einer spezifischeren Färbetechnik sinnvoll. Hierfür wurden ausgewählte

Abbildung 1 a, b: Humane Oozyten im GV-Stadium nach Fixierung und sequentieller Färbung mit Giemsa (Vergrößerung: 100 x) und DAPI (Vergrößerung: 400 x).

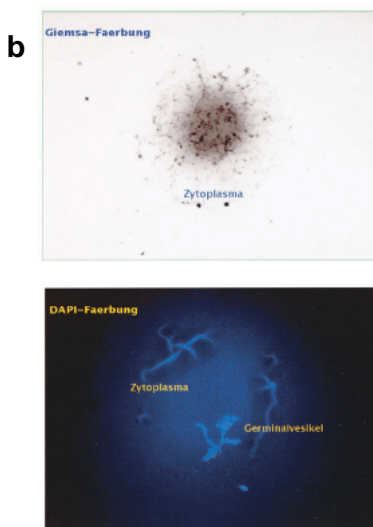
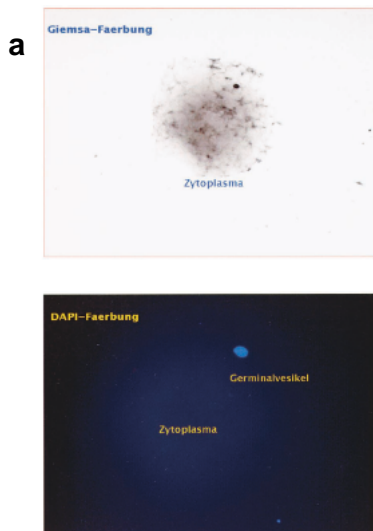


Abbildung 2 a, b: Präparate unreifer Eizellen mit Chromatin von unterschiedlichem Kondensationsgrad im Bereich des Germinalesikels (Giemsa: 100 x; DAPI: 400 x).

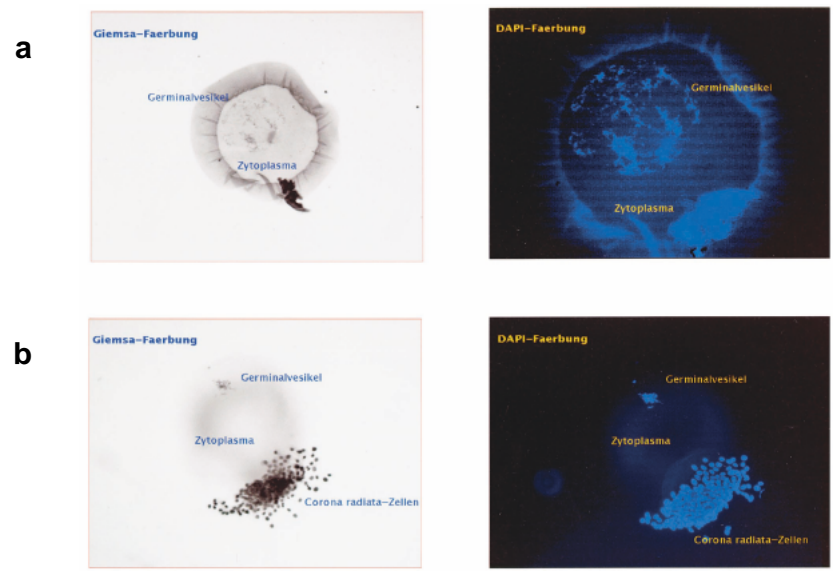
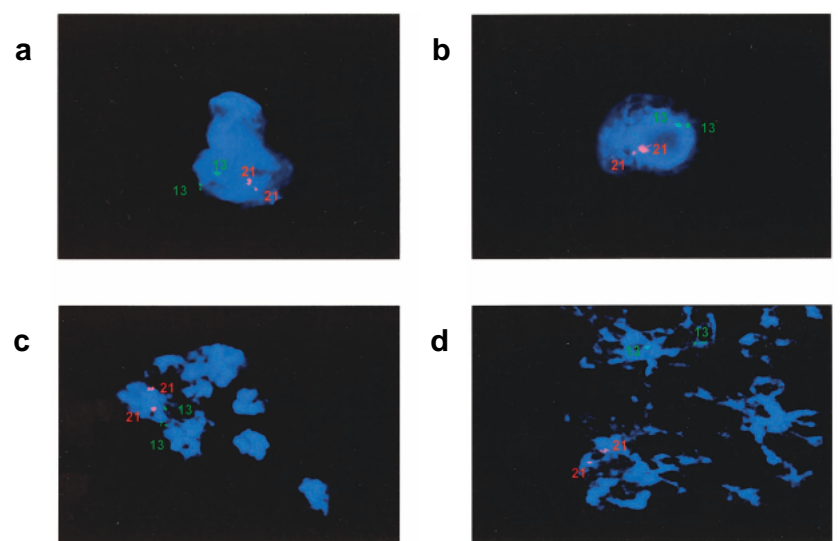


Abbildung 3 a-d: Zweifarben-FISH von DAPI-gefärbten GV-Oozyten mit den Sonden LSI 13 (grün) und LSI 21 (rot) (Vergrößerung: 1000 x). Spezifische Hybridisierungssignale detektieren die homologen Chromosomen 13 und 21.



Giemsa-gefärbte Präparate entfärbt und anschließend mit DAPI behandelt, einem Fluoreszenzfarbstoff, welcher sich an doppelsträngiger DNA anlagert und diese damit unter dem Fluoreszenzmikroskop spezifisch detektiert. Bei Vergleich der mikroskopischen Bilder von Giemsa-gefärbten GV-Oozyten ergab die fluoreszenzmikroskopische Auswertung dieser Präparate nach DAPI-Behandlung, daß erst die DAPI-Färbung eine eindeutige Identifizierung spezifischer Bereiche von Giemsa-positiven Strukturen als Kernmaterial in Form von Chromatin erlaubt (Abbildung 1 a und b).

Des weiteren war es im Rahmen dieser Untersuchungen möglich, durch die Darstellung des Kernmaterials verschiedene humane GV-Oozyten zu identifizieren, welche sich hinsichtlich des Kondensationsgrades ihres Chromatins im Bereich des Germinalvesikels deutlich unterschieden (Abbildung 2).

FISH-Analysen

Abbildung 3 zeigt beispielhaft Präparate von fixierten GV-Oozyten nach deren Hybridisierung mit den LSI-Sonden 13 und 21. Unabhängig von dem Kondensationsgrad des Chromatins war das chromosomale Material der Chromosomen 13 und 21 durch spezifische Hybridisierungssignale im Germinalvesikelbereich zu detektieren (Abbildung 3, vergl. a, b und c, d). Entsprechend Interphase-FISH-Analysen korrespondierte hierbei jedes einzelne Signal mit einem Chromosom. Da vor Abschluß der 1. meiotischen Teilung während der Eizellreifung im Normalfall bei unreifen weiblichen Gameten von einem diploiden Chromosomensatz mit gepaarten Chromatiden auszugehen ist, waren zwei Einzelsignale für die jeweiligen homologen Chromosomen zu erwarten gewesen. Deren auffallend enge Orientierung zueinander erschien mit der Homologenpaarung der Chromosomen während der meiotischen Prophase 1 erklärbar (Abbildung 3).

Unter Anwendung der beschriebenen FISH-Technik wurden unreife Eizellen von insgesamt 10 Patientinnen im fortpflanzungsfähigen Alter untersucht (Tabelle 1). Hierbei handelte es sich um Frauen, welche aufgrund verschiedener Sterilitätsursachen an der Universitätsklinik für Reproduktionsmedizin und Gynäkologische Endokrinologie in Magdeburg behandelt wurden. Ihr Alter lag median bei $33,1 \pm 3,6$ (SD) Jahren (25,9 bis 37,5 Jahre). Bei 7 Patientinnen wurden die GV-Oozyten ($n = 21$) durch Punktion der Ovarien im Rahmen von Laparotomien entnommen, während bei 3 Patientinnen auf Eizellen ($n = 8$) zurückgegriffen wurde, welche bei einer Sterilitätsbehandlung durch IVF oder ICSI trotz ovarieller Stimulation mit Gonadotropinen unreif blieben. Die FISH-Analyse der insgesamt 29 GV-Oozyten lieferte 20 (69,0%) auswertbare Präparate von fixierten Eizellen mit spezifischen Hybridisierungssignalen. Diese zeigten alle regelrechte Signale für die Sonden LSI 13 und LSI 21, wodurch die jeweiligen homologen Chromosomen 13 und 21 detektiert wurden. Abweichende Signalmuster konnten hierbei nicht festgestellt werden (Tabelle 1).

DISKUSSION

Darstellung des Kernmaterials unreifer Eizellen

Die Gewinnung von unreifen humanen Eizellen und die Darstellung ihrer Chromatinstrukturen im Bereich des Germinalvesikels (GV) eröffnen die Möglichkeit, das Kernmaterial von primären Oozyten vor Einsetzen der meiotischen Eizellreifung zu untersuchen. Wir konnten mit Hilfe einer für reife Eizellen beschriebenen graduellen Präparationstechnik [9] humane GV-Oozyten unter Erhaltung ihrer Zytoplasmagrenzen auf Objektträger fixieren. Bei der nachfolgenden Behandlung mit Giemsa und DAPI erwies sich aufgrund unspezifisch

gefärbter Bereiche bei einigen unreifen Eizellen die Färbung Chromatin-assoziiierter Proteine durch Giemsa, wie sie für die Darstellung sowohl mitotischer als auch meiotischer Metaphase-Chromosomen üblich ist, als ungeeignet. In diesen Fällen ermöglichte erst die Färbung der DNA durch DAPI eine eindeutige Identifizierung des Kernmaterials in Form von Chromatin (Abbildung 1).

Auch García und Mitarbeiter [11] stellten bei der Anwendung unterschiedlicher Färbeverfahren im Rahmen ihrer mikroskopischen Untersuchungen von humanen Prophase 1-Oozyten Variationen in der Darstellung des Kernmaterials fest. Sie berichteten von sogenannten „runden Körperchen“, welche ausschließlich nach Giemsa-Behandlung im Bereich des Chromatins erkennbar wurden. Derartige Strukturen waren nach Silberfärbung nicht nachzuweisen. Die Autoren vermuteten bei diesen Präparaten artifizielle Veränderungen der Kernstrukturen aufgrund unterschiedlicher Präparations- und Färbebedingungen. Gleichermäßen wäre aber auch hier eine unspezifische Anfärbung von Strukturen durch Giemsa als mögliche Erklärung denkbar.

Für die eindeutige Identifizierung des Kernmaterials von unreifen weiblichen Gameten erscheint die Verwendung spezifischer Farbstoffe notwendig. Die spezifische Färbung von DNA mit YO-PRO-1-Jodid, wie sie von Van Blerkom und Mitarbeitern [12] beschrieben wird, oder mit DAPI entsprechend unserer Untersuchungen haben sich hierfür als geeignete Methoden erwiesen und sollten bei weiterführenden Analysen von unreifen Eizellen im Prophase 1-Stadium Anwendung finden.

Untersuchungen zum Nachweis chromosomaler Anomalien bei weiblichen Gameten sind überwiegend an reifen Metaphase II-arretierten Oozyten vorgenommen worden, die im Rahmen der Sterilitätsbehandlung durch IVF oder ICSI unbefruchtet

blieben. Nur wenige Studien wurden bislang durchgeführt, um die Chromatinkonfigurationen von humanen unreifen Eizellen der ersten meiotischen Prophase darzustellen und hinsichtlich aberranter Strukturen zu untersuchen [11, 13]. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden unauffällige GV-Oozyten als solche mit gleichmäßig verteilten Chromatinsträngen und einem klar erkennbaren Nukleolus beschrieben. Stark kondensierte Giemsa-positive Chromatinfragmente im Bereich des Germinalvesikels wurden dagegen als ein Anzeichen für die Degeneration des Kernmaterials gewertet [13].

Ob die von uns bei verschiedenen GV-Oozyten ebenfalls beobachteten Unterschiede im Kondensationsgrad des Chromatins (Abbildung 2) einen möglichen Hinweis für unterschiedliche Maturitätsstadien darstellen oder in einigen Fällen degenerative Merkmale sind, sollte somit weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

FISH-Analysen von humanen GV-Oozyten

Die Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ermöglicht den Nachweis von numerischen und strukturellen Chromosomenanomalien durch die Hybridisierung von markierten Sequenz-spezifischen DNA-Sonden auf chromosomale Präparate. Mit geeigneten FISH-Sonden können spezifische Aneuploidien sowohl auf Metaphasen proliferierender Zellen als auch im Interphasekern von Zellen ohne Teilungsaktivität identifiziert werden. Hierfür werden in der Chromosomendiagnostik unter anderem Locus-spezifische FISH-Sonden eingesetzt, die die einzelnen Chromatiden von Metaphase-Chromosomen markieren und mit denen die Anzahl spezifischer Chromosomen im Interphasekern zu detektieren ist (Übersicht in [14]).

Diese FISH-Sonden haben mittlerweile auch bei Untersuchungen zum Entstehungsmechanismus von Aneu-

ploidien in reifen humanen Eizellen Anwendung gefunden. So wurden die Locus-spezifischen FISH-Sonden LSI 13 und LSI 21 verwendet, um die Chromatidenanzahl der Chromosomen 13 und 21 in unbefruchteten Eizellen zu bestimmen und um gleichzeitig zwischen fehlenden oder zusätzlichen ganzen Chromosomen sowie einzelnen Chromatiden in aneuploiden MII-Oozyten differenzieren zu können [6].

In Anlehnung an diese Technik konnten wir in der vorliegenden Untersuchung zeigen, daß mit Hilfe Locus-spezifischer FISH-Sonden auch in unreifen Eizellen das chromosomale Material spezifischer Chromosomen zu detektieren ist und deren Anzahl im Germinalvesikel bestimmt werden kann. Es eröffnet sich somit die Möglichkeit, spezifische Aneuploidien in humanen unreifen Eizellen direkt nachzuweisen.

Das wiederholte Auftreten einer freien Trisomie 21 bei mehreren Kon-

Tabelle 1: Ergebnisse der FISH-Analysen von humanen GV-Oozyten (n = 29) mit den Sonden LSI 13 und LSI 21. IVF = in-vitro-Fertilisation; ICSI = intrazytoplasmatische Spermatozoeninjektion; PCO-Syndrom = Polyzystisches-Ovarsyndrom; chr = Chromosom.

Patientin	Alter [Jahre]	Behandlung	Gewonnene GV-Oozyten	Auswertbare GV-Oozyten nach FISH	Detektierte Chromosomenzahl nach FISH
1	36,9	Laparotomie zur Refertilisierung	2	2	2 x (2 x chr 13 + 2 x chr 21)
2	34,2	Laparotomie zur Myomentfernung, PCO-Syndrom	2	1	1 x (2 x chr 13 + 2 x chr 21)
3	37,2	Laparotomie zur Adhäsionolyse, PCO-Syndrom	4	3	3 x (2 x chr 13 + 2 x chr 21)
4	32,0	Laparotomie zur Endometrioseexzision	2	0	–
5	37,5	Laparotomie zur Adhäsionolyse	4	2	2 x (2 x chr 13 + 2 x chr 21)
6	30,5	Laparotomie zur Adhäsionolyse	2	1	1 x (2 x chr 13 + 2 x chr 21)
7	28,4	Laparotomie zur Endometrioseexzision	5	4	4 x (2 x chr 13 + 2 x chr 21)
8	29,1	Ovarielle Stimulation vor ICSI	3	2	2 x (2 x chr 13 + 2 x chr 21)
9	25,9	Ovarielle Stimulation vor ICSI	3	3	3 x (2 x chr 13 + 2 x chr 21)
10	36,1	Ovarielle Stimulation vor IVF	2	2	2 x (2 x chr 13 + 2 x chr 21)

zeptionen von chromosomal unauffälligen Paaren wird üblicherweise mit einem Keimzellmosaik und der Existenz trisomer Keimzelllinien der Eltern erklärt. Der Nachweis trisomer ovarieller Zellen von chromosomal unauffälligen Frauen mit einem erhöhten Wiederholungsrisiko für eine Trisomie 21 in einer Schwangerschaft unterstützte diese Vorstellungen [15–18]. Bei diesen frühen Studien handelt es sich jedoch um Untersuchungen, welche an somatischen Zellen von ovariellen Gewebebiopsien vorgenommen wurden. 1999 lieferten Cozzi und Mitarbeiter [5] anhand der Analyse von weiblichen Gameten einen ersten Hinweis auf die Existenz einer weiblichen trisomen Keimzelllinie. Im Rahmen der IVF-Behandlung einer unauffälligen Patientin mit mehreren vorausgegangenen Konzeptionen mit Trisomie 21 konnten sie mittels FISH ein zusätzliches Chromatid 21 in einer unbefruchteten Eizelle und ihrem zugehörigen 1. Polkörperchen detektieren. Die Autoren schlußfolgerten, daß die betroffene Oozyte im unreifen Stadium Träger eines zusätzlichen Chromosoms 21 gewesen sein mußte.

Bei Durchsicht der wissenschaftlichen Literatur fällt auf, daß numerische chromosomale Anomalien bislang noch nicht bei humanen unreifen weiblichen Gameten beschrieben wurden (Medline-Datenbank-Recherche, 1966 bis dato). Somit steht ein direkter Nachweis von aneuploiden unreifen Eizellen nach unserem Kenntnisstand bis heute aus. Die durchgeführten FISH-Analysen an 29 unreifen Eizellen von 10 Sterilitätspatientinnen unterschiedlicher Genese lieferten bei 20 auswertbaren Oozyten-Präparaten ausschließlich unauffällige Signalmuster für die Sonden LSI 13 und LSI 21 (Tabelle 1). Wir konnten somit hier keine numerischen Aberrationen für die Chromosomen 13 und 21 in humanen GV-Oozyten nachweisen. Als ein möglicher Grund hierfür wäre die relativ kleine Anzahl untersuchter Eizellen denkbar. Somit sollte die Analyse einer



Diplom-Biologin Heike Eckel

Geboren 1967 in Hannover (D). Studium der Biologie 1987 bis 1994 an der Universität Hannover. Von 1994 bis 1996 wissenschaftliche Assistentin an der Urologischen Klinik der Medizinischen Hochschule Hannover (Direktor: Prof. Dr. med. U. Jonas) mit dem Arbeitsgebiet: Molekularbiologische

Charakterisierung von Phosphodiesterase-Isoenzymen aus dem humanen *Corpus cavernosum*. Seit 1996 Mitarbeiterin der Klinik für Reproduktionsmedizin und Gynäkologische Endokrinologie an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (Direktor: Prof. Dr. med. J. Kleinstejn) mit den Arbeitsschwerpunkten: In-vitro-Fertilisation, Intrazytoplasmatische Spermatozoeninjektion, Testikuläre Spermatozoenextraktion, Zytogenetik von humanen Oozyten. Mitglied der Arbeitsgemeinschaft für Reproduktionsbiologie des Menschen

Korrespondenzadresse:

Dipl.-Biol. Heike Eckel
Klinik für Reproduktionsmedizin und Gynäkologische Endokrinologie
Otto-v.-Guericke-Universität Magdeburg
D-39108 Magdeburg, Gerhart-Hauptmann-Str. 35

größeren Zahl unreifer Eizellen unter Anwendung des von uns entwickelten FISH-Verfahrens zum direkten Nachweis weiblicher aneuploider Keimzelllinien Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

Mit den vorgestellten Präparations- und Färbemethoden sowie mit der von uns etablierten FISH-Technik stehen Verfahren zur Verfügung, die die zytogenetische Untersuchung von unreifen humanen Eizellen im Germinalvesikel-Stadium erlauben und dabei den Nachweis aberranter Kernstrukturen bzw. spezifischer chromosomaler Aneuploidien ermöglichen. Derartige Analysen könnten sowohl für die Untersuchung der Reifung weiblicher Gameten als auch für die Identifizierung möglicher Störungen im Reifungsprozess von Eizellen bei entsprechenden Sterilitätspatientinnen von Bedeutung sein.

Literatur:

1. Uebele-Kallhardt B-M. Oocytes of fetal ovaries: Prophase of first meiotic division. In: Uebele-Kallhardt B-M (ed). Human oocytes and their chromosomes. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978; 3–35.

2. Veeck LL. Gamete maturation. In: Veeck LL (ed.). An atlas of human gametes and conceptuses. The Parthenon Publishing Group, New York, London, 1999; 15–8.

3. Dailey T, Dale B, Cohen J, Munné S. Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 176–84.

4. Boiso I, Marquez C, Veiga A, Munné S. Cytogenetic and fluorescent in situ hybridization analysis of in vitro matured human oocytes. *Ass Reprod* 1997; 7: 160–4.

5. Cozzi J, Conn CM, Harper J, Winston RML, Rindl M, Farndon PA, Delhanty JDA. A trisomic germ cell line and precocious chromatid segregation leads to recurrent trisomy 21 conception. *Hum Genet* 1999; 104: 23–8.

6. Eckel H, Stumm M, Wieacker P, Kleinstejn J. FISH analysis of unfertilized human oocytes using locus-specific DNA probes. *Reproductive Technologies* 2000; 10: 142–7.

7. Michelmann HW, Tavmergen E. Chromosomenanalysen aus unbefruchteten menschlichen Eizellen nach In-vitro-Insemination. *Fertilität* 1991; 7: 129–39.

8. De Sutter P, Dhont M. Unfertilized oocytes after human in vitro fertilization: A review of cytogenetic findings. *Ass Reprod* 1994; 4: 178–82.

9. Kamiguchi Y, Funaki K, Mikamo K. A new technique for chromosome study of

murine oocytes. Proc Japan Acad 1976; 52: 316–9.

10. Zhao L, Hayes K, Glassman A. A simple efficient method of sequential G-banding and fluorescence in situ hybridization. Cancer Genet Cytogenet 1998; 101: 62–4.

11. García M, Dietrich A, Pujol R, Egozcue J. Nucleolar structures in chromosome and SC preparations from human oocytes at first meiotic prophase. Hum Genet 1989; 82: 147–53.

12. Van Blerkom J, Davis PD, Merriam J. The developmental ability of human

oocytes penetrated at the germinal vesicle stage after insemination in vitro. Hum Reprod 1994; 9: 697–708.

13. Racowsky C, Kaufman ML. Nuclear degeneration and meiotic aberrations observed in human oocytes matured in vitro: analysis by light microscopy. Fertil Steril 1992; 58: 750–5.

14. Stumm M, Tönnies H, Wieacker P. Molecular cytogenetic techniques for the diagnosis of chromosomal abnormalities in childhood disease. Eur J Pediatr 1999; 158: 531–6.

15. Taylor AI. Further observations of cell

selection in vivo in normal /G trisomic mosaics. Nature 1970; 227: 163–4.

16. Uchida LA, Freeman VCP. Trisomy 21 Down syndrome. Hum Genet 1985; 70: 246–8.

17. Nielsen KG, Poulsen H, Mikkelsen M, Steuber E. Multiple recurrence of trisomy 21 Down syndrome. Hum Genet 1988; 78: 103–5.

18. Sachs ES, Jahode MG, Los FJ, Pijpers L, Wladimiroff JW. Trisomy 21 mosaicism in gonads with unexpectedly high recurrence risks. Am J Med Genet 1990; Suppl 7: 186–8.

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere zeitschriftenübergreifende Datenbank

[Bilddatenbank](#)

[Artikeldatenbank](#)

[Fallberichte](#)

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](#)