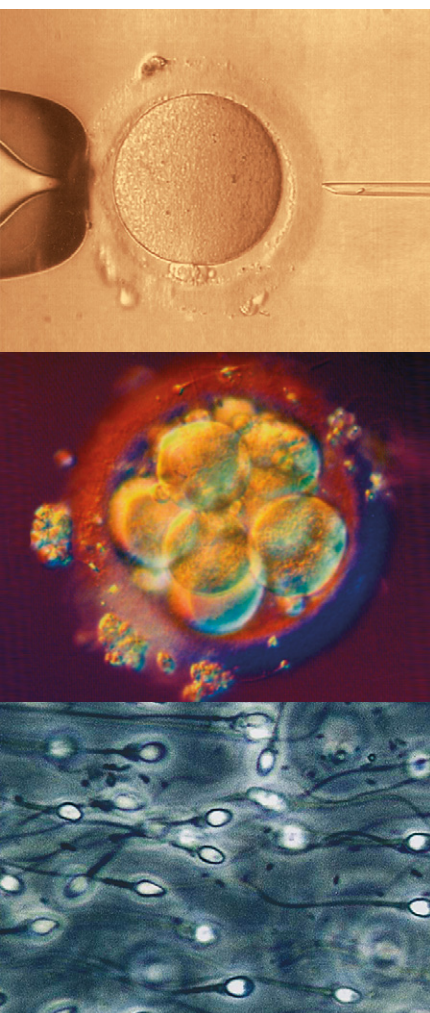


Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

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



3. DVR-Kongress 11.-14.11.2009, Freiburg (Abstracts)

J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2009; 6 (5), 223-245



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

3. DVR-Kongress

11.–14. 11. 2009, Freiburg

Abstracts*

■ Andrologische Endokrinologie

P 01

Follikel-stimulierendes Hormon induziert die Differenzierung von Keimzellen und reduziert die Sekretion von TGF-beta2

S. Kranz¹, J. Gromoll¹, L. Konrad¹, H.-R. Tinneberg¹
¹JLU Gießen, Frauenklinik, AG Konrad, Gießen;
²Institut für Reproduktionsmedizin, Münster

Fragestellung Die mRNA- und Protein-Expression der „transforming growth factor-betas“ (TGF-beta1–3) ist im Hoden bis zur Pubertät hoch und geht mit beginnender Hormonausschüttung deutlich zurück. Sowohl Testosteron als auch das Follikel-stimulierende Hormon (FSH), die mit Beginn der Pubertät vermehrt synthetisiert werden, verringern die Sekretion von TGF-beta2. FSH ist zusammen mit Testosteron einer der wichtigsten Faktoren für eine funktionale Spermatogenese und besonders in den frühen Stadien das wichtigere Hormon. FSH stimuliert über hoch-affine Membranrezeptoren die Proliferation, Genexpression und Proteinsynthese von Sertoli-Zellen. Die Sertoli-Zelle wiederum unterstützt die Differenzierungsvorgänge der Keimzellen bis zu den Spermatozoen über die Ernährung und den direkten Zell-Zell-Kontakt. FSH agiert über verschiedene Signaltransduktionswege wie den PI3K/Proteinkinase B- oder den cAMP/PKA-Weg, wobei besonders bei letzterem Weg die schnelle Mobilisierung von Kalzium-Ionen ein entscheidender Schritt ist. Die Untersuchung von Hormoneffekten an immortalen Zelllinien konnte in der Zellkultur bisher jedoch nicht nachgestellt werden, da die Sertoli-Zellen aufgrund fehlender oder stark reduzierter FSH-Rezeptor-Expression nicht mehr mit FSH ansprechbar waren. Ziel der vorgestellten Experimente war die Etablierung eines In-vitro-Modells mit FSH-stimulierbaren Zellen und die Bestimmung der hormonalen Effekte auf die Sertoli- wie auch auf die Keimzellen. Die Messparameter wa-

ren die Induktion der Differenzierung der Keimzellen und die bekannte Down-Regulation von TGF-beta2.

Methoden Es wurden 2 unterschiedliche Ansätze genutzt. Im ersten Ansatz wurde eine FSH-Rezeptor-transfizierte Sertoli-Zelllinie und eine immortalisierte Keimzelllinie (Spermatozyten) mit FSH stimuliert und über einen definierten Zeitraum kokultiviert. Die Differenzierung der Spermatozyten wurde durch die Analyse der Genexpression von Spermatischen-spezifischen Markern bestimmt. Untersucht wurde die mRNA-Expression von transition protein-1 (TNP1) und TNP2 durch eine PCR. Im 2. Ansatz wurde eine FSH-insensitive Sertoli-Zelllinie zusammen mit einer immortalisierten Keimzelllinie (Spermatozyten) kultiviert. Die Stimulation erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen an Forskolin für verschiedene Zeiträume. Die mRNA-Expression von TNP1 und TNP2 wurde ebenfalls mit PCR bestimmt. Die TGF-beta2-Sekretion wurde bei allen Ansätzen mittels ELISA gemessen.

Ergebnisse In den Kokultur-Ansätzen induzierten sowohl FSH als auch Forskolin die TNP1-mRNA-Expression und somit war eine beginnende Differenzierung der Spermatozyten zu frühen Spermatischen innerhalb einer Woche nachweisbar. Eine weitergehende Differenzierung der Keimzellen konnte nicht gezeigt werden, da keine Expression von TNP2 gefunden wurde. Die TNP1-Spiegel waren in den stimulierten Ansätzen höher als in den unstimulierten Kontrollen. In den Monokulturen konnte keine mRNA für TNP1 oder TNP2 festgestellt werden.

FSH reduzierte nur in den hormon-sensitiven Sertoli-Zellen signifikant die Sekretion von TGF-beta2. Forskolin reduzierte sowohl in den hormon-insensitiven als auch in den hormon-sensitiven Sertoli-Zellen die Sekretion von TGF-beta2. Der stärkste Effekt für Forskolin ergab sich nach 24 Stunden. Interessanterweise wurde TGF-beta2 stets in seiner inaktiven Form von den Zellen sezerniert.

Schlussfolgerung Im In-vitro-Modell konnte eindeutig gezeigt werden, dass sich auch immortalisierte Keimzellen zu Spermatischen differenzieren, wenn Zell-Zell-Kontakte zu Sertoli-Zellen vorhanden sind. Die Stimulation der Sertoli-Zellen mit FSH verstärkte die Induktion der Differenzierung der Keimzellen deutlich. Die Sekretion von TGF-beta2 der Sertoli-Zellen wurde durch FSH und Forskolin wie bekannt negativ beeinflusst und zeigte die erfolgreiche Etablierung des In-vitro-Modells.

P 02

Östrogene, Östrogenrezeptor-expression und Mitoseaktivität der Spermatozoen bei normaler und gestörter Spermatogenese beim Mann

C. Beck¹, O. Raabe¹, S. Kliesch², M. Bergmann¹
¹Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, Justus-Liebig-Universität, Giessen;
²Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster

Fragestellung Östrogene wirken über Östrogenrezeptoren (ER), von denen 2 Isoformen existieren, ERalpha und ERbeta.

Die zelluläre Lokalisation und Expression des ERalpha im humanen Hoden wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Arbeiten zeigen hauptsächlich Ergebnisse auf Proteinebene, ein zusätzlicher Nachweis auf mRNA-Ebene fehlt meist. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind abhängig von der Methodik und dem verwendeten Antikörper [Pentikäinen et al., 2000; Saunders et al., 2001; Mäkinen et al., 2001; Pelletier et al., 2008]. Außerdem gibt es in der Literatur zunehmend Hinweise, dass die Mitoseaktivität der Spermatozoen bei Wirbeltieren und Säugern einschließlich des Menschen über Östrogene getriggert wird [D'Istria et al. 2003, Rana esculenta; Li et al., 2003, Maus; Wagner et al., 2006, Schwein; Pentikäinen et al., 2000, Mensch]. Ziel dieser Arbeit ist der Nachweis der präzisen Lokalisation des ERalpha sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene. Außerdem soll mittels Morphometrie von Ki67-gefärbten Paraffinschnitten mit unterschiedlichen histologischen Diagnosen ein Zusammenhang zwischen der mitotischen Aktivität der Spermatozoen und dem peripheren Östrogenwert im Blut hergestellt werden. Zusätzlich soll mittels quantitativer PCR die Menge der exprimierten ERalpha-mRNA mit unterschiedlichen Spermatogenesedefekten der untersuchten Proben, mit der mitotischen Aktivität der Spermatozoen und dem Östrogenwert verglichen werden.

Methodik Untersucht wurden Hodenbiopsien von Patienten mit unterschiedlichen histologischen Befunden und unterschiedlichen peripheren Östrogenwerten.

Der Nachweis auf Proteinebene erfolgte über Immunhistochemie (IHC) an Paraffinschnitten mit normaler Spermatogenese, sowie mittels Western-Blot. Als Positivkontrolle

* Abstracts begutachtet und zusammengestellt vom wissenschaftlichen Komitee.

Ein alphabetisches Verzeichnis der federführenden Autoren finden Sie auf Seite 245.

ziierte Gene (v. a. Gene für zytosolische ribosomale Proteine sowie Elongationsfaktoren) überrepräsentiert, obwohl Spermatozoen nach allgemeiner Ansicht transkriptionell inaktiv sind.

Schlussfolgerung Diese Ergebnisse zeigen, dass man die Genexpressionsanalysen am Gesamtejakulat durchführen kann, ohne die Spermatozoen durch zusätzliche Reinigungsschritte (Lysis somatischer Zellen, Dichtegradientenzentrifugation, Swim-up) von den begleitenden Rundzellen zu trennen. Im nächsten Schritt werden wir unsere Studien auf eine große Anzahl an Ejakulaten aus dem reproduktionsmedizinischen Programm ausweiten und die Genexpressionsprofile mit dem Fertilisierungserfolg bei der IVF-Behandlung korrelieren.

P 04

Molekulare Charakterisierung humaner Spermatozoen

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

Fragestellung Spermatozonale Stammzellen (SSCs) als Untergruppe der Spermatozoenpopulation stellen die Grundlage für eine lebenslange Spermatozoengenerierung im adulten männlichen Organismus dar. Therapeutisch eingesetzt könnten diese Zellen einerseits zur Behandlung männlicher Fertilitätsstörungen dienen und andererseits Ausgangszellen für eine Restitution der Spermatozoengenerierung nach einer Radiatio und/oder Chemotherapie sein. SSCs könnten weiterhin eine Quelle zur Gewinnung von Zellen mit Stammzellpotenzial in der regenerativen Medizin darstellen.

Die Umsetzung solcher therapeutischer Einsatzmöglichkeiten setzt eine umfassende Charakterisierung der Zellen voraus. Obwohl in der Vergangenheit viele Anstrengungen unternommen worden sind, mehr über SSCs innerhalb der gesamten Spermatozoenpopulation zu erfahren, konnten eindeutige Parameter, die ausschließlich den Stammzellpool der Spermatozoen betreffen, noch nicht festgelegt werden. Dies gilt sowohl auf morphologischer als auch auf molekularer Ebene.

Die von uns initiierte molekulare Charakterisierung hatte vor allem das Ziel, nach Markern zu suchen, die auch später bei der klinischen Umsetzung eine wichtige Rolle spielen dürften. So könnten Zelloberflächenmoleküle für eine Isolierung von Zellen und eine Stimulation über entsprechende Liganden während einer Zellkultur benutzt werden. In dieser Arbeit wurde versucht, vorrangig diesem Aspekt nachzugehen.

Methodik Zur Identifizierung spermatozoenspezifischer Marker führten wir eine Mikroarray-Analyse an Hodenbiopsien von Patienten zweier definierter Testispathologien durch. Der Array-Analyse folgte die Validation der Daten auf mRNA-Ebene mittels „real-time reverse transcription polymerase chain reaction“ („real-time RT-PCR“) sowie auf Proteinebene mittels Immunhistochemie.

Ergebnisse Für die Mikroarray-Analyse wurden Hodenbiopsien von Patienten mit 2 einheitlichen Erscheinungsformen des Keimepithels, modifizierter Johnsen Score 2 (Sertolizell-Syndrom) und modifizierter Johnsen Score 3 (Tubuli seminiferi mit Spermatozoen als einzige Keimzellen) benutzt. Das Hodengewebe wurde im Vorfeld mikroskopisch (Semidünnschnitttechnik und „trial testicular sperm extraction“ [Test-TESE]) analysiert und den entsprechenden Scores zugeordnet. Zur Detektion spermatozoenspezifischer Gene wurde mit den nachfolgend gewonnenen Mikroarraydaten ein hierarchisches Clustering durchgeführt. Mit diesem Ansatz konnten unter Anwendung der Bonferroni-Korrektur 388 Gene ermittelt werden, die mit hoher statistischer Signifikanz zwischen den beiden pathologischen Zuständen differenziell exprimiert sind.

Anschließend wurden ausgewählte Gene, die entweder relevant für die Pluripotenz von Zellen oder die spermatozonale Funktion sind, sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene validiert.

Aus den gemessenen Fluoreszenzwerten (log 2) der Arrayanalyse sowie den „crossing points“ der Real-time-PCR wurden die Ratios der Genexpression zwischen Score 2 und Score 3 berechnet und zwischen den beiden Methoden verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Ergebnisse gut übereinstimmen. Nachfolgende immunhistochemische Untersuchungen ergaben, dass die Mikroarray-Analyse auch für die Detektion neuer Marker für normale humane Spermatozoen geeignet ist, da hier Biopsien von Patienten mit vollständiger Spermatozoengenerierung herangezogen wurden.

Als Oberflächenmarker für Spermatozoen wurden der Wachstumsfaktorrezeptor FGFR3 („fibroblast growth factor receptor 3“), ein Single-pass-Typ-1-Membranprotein, sowie das desmosomale Cadherin Desmoglein 2 (DSG2) nachgewiesen. Liganden der Rezeptor-Tyrosinkinase FGFR3 sind unter anderem der saure und der basische Fibroblastenwachstumsfaktor (aFGF und bFGF). Desmoglein 2 scheint auf den Spermatozoen auch außerhalb des desmosomalen Kontextes, über große Teile der Zelloberfläche verteilt, exprimiert zu sein.

Schlussfolgerung Die hier durchgeführte Mikroarray-Analyse mit nachfolgender Validation führte zur Detektion spermatozoenspezifischer Marker. Aufgrund der Unter-

suchung von Spermatozoen in situ wurde der Gesamtzustand des Hodengewebes nach Erscheinen dieses Zelltyps erfasst und somit jegliche Veränderung in der globalen testikulären Genexpression zu diesem Zeitpunkt detektiert. Zelloberflächenmarker, wie FGFR3 und DSG2, könnten für die Isolierung von Spermatozoen bzw. spermatozonalen Stammzellen aus Hodengewebe sowie deren Proliferation und Differenzierung in Kultur relevant sein. Deswegen sollte man diese Proteine als Kandidaten für die Anreicherung und Isolation von Spermatozoen und möglicherweise auch spermatozonaler Stammzellen betrachten.

P 05

Wahrscheinlichkeit für das Auffinden von Spermien bei einer Hodenbiopsie anhand klinischer Parameter

F. Tüttelmann¹, F. Werny², T. G. Cooper², S. Kliesch², M. Simon², E. Nieschlag²

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

³University of Modena and Reggio Emilia, Department of Medicine, Endocrinology and Metabolism, Modena, Italien

Fragestellung Die Betreuung und Beratung infertiler Männer mit Azoospermie erfordert die möglichst valide Abschätzung der Wahrscheinlichkeit, Spermien bei einer Hodenbiopsie mit testikulärer Spermienextraktion (TESE) zu finden. Eine einfach zu handhabende Übersicht der klinischen Parameter und daraus abgeleitete Erfolgchancen steht derzeit nicht zur Verfügung.

Methodik Retrospektive Analyse der klinischen Parameter von 283 Männern mit Azoospermie. Evaluation der prädiktiven Qualität von Hodenvolumen und FSH, sowie der Ejakulatmarker α -Glukosidase, Fruktose und Zink anhand von ROC-Kurven. Erstellung vergleichender Histogramme der Ejakulatmarker von Männern mit eindeutig obstruktiver Azoospermie (Zustand nach Vasektomie und CBAVD) und Normozoospermie.

Ergebnisse Die ROC-Kurven zeigten in der Einzelanalyse eine vergleichbare prädiktive Qualität für Hodenvolumen und FSH („area under curve“ [AUC] 0,68 bzw. 0,71, p jeweils < 0,0001) gefolgt von der α -Glukosidase (AUC 0,65; p < 0,0001). Fruktose

Tabelle 2: F. Tüttelmann et al. (P05). TESE-Erfolgschance (%) Abhängigkeit von Hodenvolumen und FSH bei allen Männern.

Hoden- volumen (ml)	FSH (U/l)						
	≤ 2,5	2,6–5,0	5,1–10,0	10,1–15,0	15,1–20,0	20,1–30,0	> 30
< 10	–	–	–	<5	< 5	25	33
10–19	–	< 5	25	40	40	36	33
20–29	–	> 95	60	57	30	27	46
30–39	> 95	60	62	36	21	22	29
40–59	> 95	90	79	33	< 5	< 5	< 5
≥ 60	> 95	> 95	> 95	> 95	–	–	–

Tabelle 3: F. Tüttelmann et al. (P05). TESE-Erfolgschance (%) mit α -Glukosidase \leq 18 mU/Ejakulat.

Hoden- volumen (ml)	FSH (U/I)						
	\leq 2,5	2,6–5,0	5,1–10,0	10,1–15,0	15,1–20,0	20,1–30,0	$>$ 30
$<$ 10	–	–	–	–	$<$ 5	20	20
10–19	–	–	–	$<$ 5	20	29	$<$ 5
20–29	–	$>$ 95	$>$ 95	50	33	20	$<$ 5
30–39	$>$ 95	$>$ 95	$>$ 95	50	50	25	–
40–59	$>$ 95	$>$ 95	$>$ 95	$>$ 95	–	–	–
\geq 60	$>$ 95	$>$ 95	$>$ 95	$>$ 95	–	–	–

und Zink erlaubten keine signifikante Voraussage (AUC 0,56; $p = 0,08$ und $0,54$; $p = 0,22$). Unter Verwendung eines oberen Referenzwertes von 10 U/I für FSH, der aus der Gruppe der Patienten mit obstruktiver Azoospermie abgeleitet wurde, stieg die Aussagekraft der α -Glukosidase signifikant an (AUC 0,81; $p < 0,001$). Bis zu einem Grenzwert von 18 mU/Ejakulat betrug die Spezifität 100 %, es wurden also immer Spermien in der Biopsie nachgewiesen. Die Histogramme bestätigten die Möglichkeit, Patienten mit obstruktiver Azoospermie von Männern mit Normozoospermie durch Messung der α -Glukosidase – im Gegensatz zu Fruktose und Zink – zu unterscheiden. Abschließend wurden 2 (im Original farbkodierte) Tabellen erstellt, die die Erfolgchancen bei TESE in Abhängigkeit von Hodenvolumen und FSH (Tab. 2) sowie unter Verwendung des Grenzwertes von 18 mU/Ejakulat für die α -Glukosidase (Tab. 3) zeigen.

Schlussfolgerung Hodenvolumen und FSH stellen die besten klinischen Parameter zur Voraussage des Erfolgs bei einer TESE dar. Die Messung der α -Glukosidase im Ejakulat kann die Genauigkeit dieser Voraussage deutlich verbessern. Mit den erstellten Tabellen ist eine schnelle und einfache Abschätzung der TESE-Chancen in der täglichen Praxis möglich.

P 06

Testosteron-Substitutionstherapie hemmt die Entstehung der experimentellen Autoimmun-Orchitis der Ratte

M. Fijak¹, E. Schneider¹, G. Schuler², A. Meinhardt¹
¹Institut für Anatomie und Zellbiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen; ²Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere, Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Giessen

Einleitung Infektion und Inflammation des männlichen Genitaltraktes gehören zu den wichtigsten Ätiologien männlicher Infertilität. Die experimentelle Autoimmun-Orchitis (EAO) der Ratte dient als ein gut etabliertes Modell zum Studium der Ursachen chronisch-testikulärer Entzündungen und organspezifischer Autoimmunität. Neuere Studien zeigen, dass Testosteron zusätzlich zu seiner bekannten Wirkung auf die Spermatogenese auch eine wichtige Rolle in der Suppression der Immunantwort spielt.

Für die protektive Rolle von Testosteron in der Kontrolle einer überschießenden Immunantwort wird u. a. eine Inhibition der Synthese von proinflammatorischen Zytokinen (z. B. IFN-gamma) bei gleichzeitiger Stimulation der Sekretion von anti-inflammatorischem IL-10 in T-Zellen diskutiert. Da akute und chronische Entzündungen oftmals, wie auch im EAO-Modell, mit einer erniedrigten Serum-Testosteronkonzentration einhergehen, war es unser Ziel und unsere Hypothese, mittels Substitutionstherapie zu testen, ob sich dadurch der Verlauf der EAO günstig beeinflussen lässt.

Methodik Die EAO wurde in Wistar-Ratten durch 3 Injektionen in 2-wöchigem Abstand von syngenen Hodenhomogenat unter Zusatz von Adjuvans und hitzeinaktivierten *Bordetella pertussis*-Bakterien ausgelöst. Kontrollratten wurden nur mit Adjuvans und *B. pertussis* immunisiert. 20 Tage nach der ersten Immunisierung wurden den EAO- und Adjuvans-Ratten s. c. Testosteronimplantate appliziert. Durch die 3 cm (T3) oder 24 cm (T24) langen Testosteronimplantate wird die Testosteronkonzentration experimentell auf niedrigem bzw. hohem Niveau eingestellt. Dies gelingt, da über den hypophysären Rückkopplungsmechanismus die Leydig-Zellen nur eine basale Eigenproduktion aufweisen und der Testosteronspiegel durch die Implantate moduliert wird. T3-Implantate resultieren in der Reduktion der Keimzellentwicklung, während T24-Implantate die Spermatogenese aufrecht erhalten. Es wurden folgende Gruppen untersucht: EAO+T3, EAO+T24, Adjuvans+T3, Adjuvans+T24, EAO, Adjuvans und normale unbehandelte Kontrollen. Die Organe wurden 50 Tage nach der ersten Immunisierung zu einem Zeitpunkt entnommen, bei dem die Erkrankung manifest ist. CD4+ und regulatorische T-Zellen wurden mittels FACS analysiert. MCP-1, TNF-alpha, TGF-beta1-mRNA-Expression wurde mithilfe von Real-time-RT-PCR quantifiziert, während die Sekretion von IL-2 und IFN-gamma in den renalen Lymphknoten mit ELISA untersucht wurde.

Ergebnisse Die Implantatbehandlung führte in der EAO+T3-Gruppe zu einem normalen Testosteronserumwert, während in der EAO+T24-Gruppe supraphysiologische Konzentrationen gemessen wurden. In der EAO+T24-Gruppe entwickelten nur 33 % der Ratten eine Orchitis statt 80 % in der unbehandelten EAO-Gruppe, während in der

EAO+T3-Gruppe nur bei 17 % der Ratten pathologische Veränderungen im Hoden sichtbar waren. Die Testosteron-Substitutionstherapie reduzierte in beiden Gruppen signifikant die Anzahl der CD4+-Zellen im Hoden im Vergleich zu EAO-Kontrollratten, wohingegen die Anzahl der regulatorischen T-Zellen (CD4+CD25+Foxp3+) erhöht war. Gleichsam war auch die Sekretion von Th1-Zytokinen (IL-2 oder IFN-gamma) in mononukleären Zellen aus den ableitenden testikulären Lymphknoten nach der Testosteronbehandlung in den EAO+T3- und EAO+T24-Gruppen signifikant erniedrigt. Die relative mRNA-Expression des Chemokin MCP-1 ebenso wie des regulatorischen Zytokins IL-10 zeigte sich im Hoden von EAO+T3-Ratten im Vergleich zur EAO-Gruppe signifikant reduziert. Die mRNA des proinflammatorischen Zytokins TNF-alpha war sowohl in der EAO+T3- als auch in der EAO+T24-Gruppe herabgesetzt.

Schlussfolgerung Unsere Ergebnisse zeigen, dass Testosteron einen immunmodulierenden und protektiven Effekt in der Behandlung der EAO aufweist. Mechanistisch übt Testosteron einen hemmenden Effekt auf die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine durch Makrophagen und T-Zellen und auf die testikuläre Chemokinproduktion aus. Die Testosteronsubstitution erscheint somit als eine mögliche Therapieoption in der Behandlung chronischer Hodenentzündungen.

P 07

Diagnosis of Inflammation in Semen: A New Approach

A. Fathy^{1,2}, I. Oltermann³, T. Bieber⁴, N. Novak⁴, G. Haidl⁵, J. P. Allam⁶

¹Andrologie, Universitätsklinikum Bonn; ²Cairo University and Beni Sweif University, Cairo, Ägypten; ³Andrologisches Labor, Universitätsklinikum Bonn; ⁴Dermatologie, Universitätsklinikum Bonn; ⁵Andrologie/Dermatologie, Universitätsklinikum Bonn

Background Inflammation of the genital tract is common in male infertility. The diagnosis may be difficult in asymptomatic cases. Also inappropriate definitions and unspecific diagnostic criteria may be a limitation in proper management.

Aim and Method The aim of this study was to set an accurate leucocyte count of inflammatory cells in semen by flowcytometry (FACS) using Trucount tubes[®] and comparing it to the widely accepted peroxidase test. Furthermore leucocyte infiltrate was characterized by lineage markers and cytokine production.

Results In 37/46 of cases, the Trucount value was higher than that of the peroxidase test. More interestingly, below the value of 10⁶ leucocytes/mL (i.e. semen sample negative for inflammation according to the WHO definition) there were 14/30 cases with Trucount values of more than 10⁶. Altogether the leading leucocyte population appeared to be neutrophils as detected by CD66 expression. However, the macrophages were predominant in 3/20 cases, while in 4/20 cases

the difference between these populations was not significant. Most interestingly, the macrophages were shown to produce significantly more intracellular cytokines than leucocytes in respect to TNF alpha, IL 1 and IL 6.

Conclusion FACS detection of inflammatory cells in semen significantly correlates with and supersedes the standard peroxidase test. Phenotypic identification and grade of activation of neutrophil and macrophage could be detected through staining of surface markers and intracellular pro-inflammatory cytokine detection. The macrophages seem to be the responsible population secreting most of the inflammatory cytokines.

P 08

Male Diabetes Mellitus and Assisted Reproductive Outcome

C. Mallidis¹, J. Mullholland², I. Agbaje², N. McClure²
¹Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Münster; ²Obstetrics and Gynaecology, Queens University, Belfast, United Kingdom

Introduction Beyond erectile dysfunction and retrograde ejaculation, diabetes impact on male reproductive health remains controversial. Studies on DM's influence on both the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and semen quality have yielded varying and often conflicting results consequently, there is some scepticism amongst fertility specialists about its importance. DM therefore, has been largely ignored when assessing male fertility. Recent studies have shown that DM is associated with subtle yet important changes in the testicular metabolomic profile; spermatogenic gene expression, levels of CML (a compound implicated in numerous diabetic complications), its receptor (RAGE) and significantly higher percentage of sperm with DNA damage. Various studies of ART outcomes have found a major difference in the percentage of sperm with fragmented DNA between those who successfully conceived and those who did not. Concurrently, sperm DNA integrity has also been associated with decreased embryo quality and increased miscarriage rates. Interestingly, a significantly higher incidence of miscarriage was the only difference found in an early study of the effects of male diabetes on reproductive outcome.

Aim To determine the incidence of couples with male diabetes attending a fertility centre for treatment and to assess whether there was a correlation between the presence of Diabetes Mellitus in the male and the outcome of IVF and ICSI.

Methods and Materials Retrospective chart review of semen analysis, ART procedures and outcomes for 3000 couples seeking assisted reproductive treatment for infertility in the Regional Fertility Centre, Royal Victoria Hospital, Belfast Trust, between 2003 and 2008.

Results 80 (2.7 %) couples were identified where the male partner was recorded as diabetic, 38 % reported their condition as well controlled. 18 couples underwent ART (5

IVF, 12 ICSI, 1 both). All females were nulliparous; two men had retrograde ejaculation and two were azoospermic. Apart from a reduction in sperm motility, all semen parameters for the remaining 14 men were within the WHO normal range. ART fertilization rates (IVF: 68 %, ICSI 62 %) were similar to those of non diabetics (IVF: 70 %, ICSI: 71 %) and no discernable difference in embryo quality was found. Embryo transfers after IVF did not result in a pregnancy while those after ICSI produced only one. The 3.3 % combined IVF/ICSI pregnancy rate per embryo transfer was significantly below the expected rate (30.8 %) for the Regional Fertility Centre. The pregnancy rate achieved with the seven frozen embryo transfer cycles (28.6 %) undertaken was comparable to the expected pregnancy rate (28.9 %).

Conclusions Despite being an underestimate of true prevalence, approximately three times more couples with diabetic men were found to be seeking fertility treatment with a larger percentage of these couples having 'unexplained infertility'. ART fertilisation rates and embryo quality did not differ from those of non diabetics. However, pregnancy rates were significantly lower in the couples with a diabetic male. These findings though preliminary are consistent with previous reports that have shown diabetic men to have a greater percentage of damaged sperm nuclear DNA and form the basis for larger, more extensive studies on the influence of diabetes on male fertility in general and ART outcome in particular.

P 09

Einfluss der Lagerungszeit auf Motilität und Vitalität kryokonservierter Spermatozoen

F. Ochsendorf, M. Mayer, H. Beschmann
 Zentrum Dermatologie und Venerologie, Klinikum d. J. W. Goethe-Universität, Frankfurt/M

Fragestellung Die Kryokonservierung von Spermatozoen vor einer Chemo-/Strahlentherapie maligner Tumoren wird heute standardmäßig durchgeführt. In Aufklärungsgesprächen fragen Patienten oft, wie lange diese Proben gelagert werden können. Es sollte daher untersucht werden, wie die Lagerungszeit die Qualität der kryokonservierten Proben beeinflusst.

Material und Methoden Die im eigenen Zentrum gelagerten Proben, bei denen seit dem Jahr 2000 die Verträge zur Lagerung gekündigt worden waren, wurden bezüglich des Einflusses der Lagerungszeit auf die Motilität bzw. Vitalität der Spermatozoen ausgewertet (n = 35). Von allen Proben war unmittelbar nach Kryokonservierung (Medium SpermFreeze, Gerät Nicoool 10) ein Aliquot aufgetaut und die Motilität/Vitalität bestimmt worden. Vor Entsorgung der Proben wurden diese nun aufgetaut und diese Parameter erneut untersucht.

Ergebnisse Die Patienten waren 18–45 Jahre alt (durchschnittlich 32 Jahre). Das ursprüngliche Ejakulatvolumen lag zwischen

0,1 und 9 ml (durchschnittlich 3,7 ml), die Spermatozoenkonzentration zwischen 0,3 und 128 Mill/ml (durchschnittlich 30 Mill/ml). Die Motilität (a+b+c) vor dem Einfrieren lag signifikant höher als danach ($39,9 \pm 27,3 \%$ vs. $18,2 \pm 19,8 \%$; $p < 0,003$). Das Gleiche galt für die Vitalität vor ($71,8 \pm 24 \%$ zu $47,7 \pm 23 \%$; $p < 0,0001$). Zwischen Motilität/Vitalität unmittelbar nach dem Einfrieren und nach der Lagerung bestand kein Unterschied. Es fand sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Gesamtmotilität (a+b+c) bzw. Vitalität vor der Kryokonservierung und unmittelbar nach dem Auftauen (Motilität $r = 0,75$; $p < 0,0001$; Vitalität $r = 0,73$; $p < 0,0001$) sowie nach der Lagerung (Motilität/Vitalität $r = 0,45$; $p < 0,0001$): Es bestand kein Zusammenhang zwischen der Lagerungszeit und der Gesamtmotilität oder Vitalität nach der Lagerung.

Schlussfolgerung Die Motilität/Vitalität nach der Kryokonservierung hängt von der initialen Motilität/Vitalität ab. Eine Lagerungszeit von bis zu 8 Jahren hat keinen wesentlichen Einfluss auf diese Parameter.

■ Sexuelle Dysfunktion

P 10

Operatives Outcome und Langzeitergebnisse nach Penisfraktur

D. Kaminski¹, G. Hatzichristodoulou¹, A. Dorstewitz¹, J. Gschwend¹, N. Zant², K. Herkommer¹
¹Urologie, Klinikum rechts der Isar der TU München; ²Urologie, Klinikum Konstanz

Einleitung Die Penisfraktur stellt einen seltenen urologischen Notfall dar. Die frühzeitige operative Therapie mit Defektverschluss der Tunica albuginea ist allgemein anerkannt. In der vorliegenden Studie werden die operative Therapie der Penisfraktur sowie Langzeitergebnisse bei betroffenen Patienten vorgestellt.

Material und Methode Von 1995 bis 2008 stellten sich n = 34 Patienten mit Verdacht auf Penisfraktur vor. Das mittlere Patientenalter betrug 38,5 Jahre (Streubreite: 17–60 J). Bei 14 Patienten (41,2 %) erfolgte zur Diagnosesicherung eine Kernspintomographie und bei 13 (38,2 %) ein Cavernogramm. Bei 7 Patienten (20,6 %) wurde aufgrund des eindeutigen klinischen Bildes auf eine Bildgebung verzichtet. Die Patienten wurden 2008 mittels Fragebogen reevaluiert.

Ergebnisse Bei 27/34 Patienten (79,4 %) wurde eine Penisfraktur gesichert. N = 25 dieser Patienten (92,6 %) wurden operiert, 2 (7,4 %) lehnten die Operation ab. Als Zugangsweg erfolgte bei 21 Patienten (84 %) die Zirkumzision und bei 4 (16 %) eine Längsinzision. Der Verschluss der Tunica albuginea erfolgte mit PDS, 2–0,7 Patienten (28 %) hatten eine begleitende Urethraläsion, die mitversorgt wurde. Bei 13/25 Patienten (52 %) konnte nach durchschnittlich 3,8 Jahren (Streubreite: 0,3–10,7 J) eine

Reevaluierung durchgeführt werden. Der IIEF-5-Score reduzierte sich bei 7 Patienten (53,8 %) um 5,6 Punkte (Streuung: 2–11) im Vergleich zum prä-OP-IIEF-Score. 6 Patienten (46,2 %) hatten keine Erektionseinschränkung. Eine Penisdeviation und Erektionsschmerzen traten bei respektiv 30,8 und 84,6 % der Patienten auf. Vier Patienten wiesen eine Miktionsverschlechterung auf, wobei je eine Urethrastrikture und Urethrafistel nachweisbar war.

Schlussfolgerung Die operative Therapie der Penisfraktur ist sicher und erfolgreich. Gleichzeitig bestehende Urethraläsionen können mitversorgt werden. Eine erektile Dysfunktion wird langfristig gelegentlich beobachtet. Jedoch ist eine engmaschige Nachsorge der Patienten erforderlich, um Komplikationen frühzeitig zu erkennen.

P 11

Geschlechtsverkehr nach radikaler Prostatektomie – Diskrepanz zwischen Patient und Partnerin

D. Kaminski, C. Mücke, G. Hatzichristodoulou, J. Gschwend, K. Herkommer
Urologie, Klinikum rechts der Isar der TU München

Fragestellung Patienten und deren Partnerinnen wurden präoperativ und im postoperativen Verlauf nach radikaler Prostatektomie zu deren Sexualleben befragt. Hierbei wurden insbesondere die GV-Frequenz und die Zufriedenheit mit dem Sexualleben verglichen.

Material und Methodik Es wurden präoperativ potente Patienten, welche zw. Juli und Dez. 2007 beidseits nerverhaltend radikal prostatektomiert wurden, und deren Partnerinnen, die in eine Befragung einwilligten, 6 und 12 Monate postop. zu GV-Frequenz und erwünschter GV-Frequenz befragt. Insgesamt waren dies 21 Paare (Alter der Patienten im Median 60,9 Jahre, Alter der Partnerinnen im Median 55,9 Jahre). Zusätzlich wurde vom Patienten der IIEF5 ausgefüllt und nach den evtl. verwendeten Hilfsmitteln gefragt (PDE-Hemmer, SKAT, Muse, Vakuumerektionshilfe). Von der Partnerin wurde der FSFI ausgefüllt.

Ergebnisse Bis Jan. 2009 konnten 18 Paare in die Befragung eingeschlossen werden. Zufrieden mit ihrem Sexualleben waren nach 6 Monaten bei den Männern 50 % und bei den Partnerinnen 67 %, nach 12 Monaten betrug die entsprechenden Werte in beiden Gruppen 64 %. Die Zufriedenheit war unabhängig davon, ob und welches Hilfsmittel die Patienten verwendeten. Der IIEF-Score betrug im Durchschnitt nach 6 Monaten 13,4 und nach 12 Monaten 14,9. 6 Monate postop. hatten die Patienten 4,8x GV/Monat, deren Partnerin nur 3,7x GV/Monat. Die gewünschte Frequenz lag bei den Männern bei 7,8x GV/Monat, bei den Frauen bei 5,1x GV/Monat. Nach 12 Monaten hatten die Männer 4,1x GV/Monat, die Frauen 3,8x GV/Monat. Die erwünschte Frequenz lag bei den Männern bei 7,1x GV/Monat und bei den Frauen bei 5,5x GV/Monat.

Schlussfolgerung Patienten neigen im Vergleich zu ihren Partnerinnen dazu, die GV-Frequenz als höher zu beschreiben. Während die Partnerinnen mit der durchgeführten Anzahl an GV nach RPX zufrieden sind, wünschen sich die Patienten fast doppelt so häufig GV als sie haben. Die GV-Frequenz nach 12 Monaten war niedriger als nach 6 Monaten.

■ Fertilitätschirurgie

P 12

Fertilitätspotenzial bei onkologischen Patienten: Analyse der Effizienz der Onko-TESE vor und nach gonadotoxischer Therapie

F. M. Werny, M. Zitzmann, C. M. Luetjens, S. Kliesch
Klinische Andrologie, Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster

Fragestellung Die testikuläre Spermienextraktion (TESE) stellt eine akzeptierte Behandlungsoption für azoosperme bzw. schwer oligozoosperme (< 0,1 Mill/ml) Patienten dar. Der Erfolg der TESE vor bzw. nach gonadotoxischer Therapie bei onkologischen Patienten, insbesondere mit testikulären Tumoren, Lymphomen oder Leukämien, ist bislang nur wenig untersucht. Wir evaluieren die TESE bei azoospermen/schwer oligozoospermen onkologischen Patienten in Hinblick auf den Erfolg einer positiven Spermienextraktion und ihrer möglichen Abhängigkeit von verschiedenen Variablen.

Methodik Bei 74 Patienten mit zurückliegender oder aktueller onkologischer Erkrankung wurden zwischen 1998 und 2009 eine TESE und Biopsie zur Histologie durchgeführt. Die Studienpopulation wurde aus der elektronischen Datenbank (Androbase®) ausgewählt und statistisch mittels binominaler Regression und t-Test ($p < 0,005$) analysiert.

Ergebnisse Der maligne Keimzelltumor (KZT) bildete mit 70 % die größte Gruppe an malignen Erkrankungen, gefolgt von Lymphomen (19 %). Das mittlere Erkrankungsalter bei Erstdiagnose betrug 26 Jahre (3–45 J). 35 Patienten (Gr. I) stellten sich vor Beginn und 39 Patienten (Gr. II) nach Abschluss der Therapie vor. Insgesamt war die Onko-TESE in 50 % (37/74 Patienten) erfolgreich. In Gr. I wurden in der TESE bei 54 % (19/35) Spermien gefunden; die histologische Untersuchung zeigte in 51 % elongierte Spermatozoen. In Gr. II erfolgte die TESE durchschnittlich 11 Jahre (1–29 J) nach Therapie mit einem positiven Spermienachweis bei 46 % (18/39). Elongierte Spermatozoen waren in 41 % in der histologischen Untersuchung nachweisbar. Bei 6 Patienten der Gr. II trat ein Tumor vor Eintritt der Pubertät auf. Im Erwachsenenalter wurde bei diesen Patienten in 100 % ein Sertoli-Cell-Only-Syndrom diagnostiziert. Bei einem der 6 Männer konnte eine positive Spermienextraktion durchgeführt werden. Insbesondere beim KZT konn-

ten nach Krebstherapie im Vergleich zu anderen Karzinomen deutlich häufiger Spermien gefunden werden (60 % vs. 27 %). FSH war ein Prädiktor für das Vorhandensein von Spermien sowohl in der TESE ($p = 0,004$) als auch in der histologischen Untersuchung ($p = 0,008$). Der t-Test zeigte ein signifikant niedrigeres FSH bei positiver TESE (12,9 vs. 20,5 IU/l; $p = 0,004$) und Histologie (13,2 vs. 20,3 IU/l; $p = 0,009$).

Schlussfolgerung Die vorliegende Studie basiert mit 74 Männern auf einer großen Gruppe onkologischer Patienten, bei denen in einem Untersuchungszeitraum von über 10 Jahren eine TESE vor bzw. nach Krebstherapie durchgeführt wurde. Vor allem bei der posttherapeutischen TESE wiesen Hodentumoren deutlich bessere Erfolgschancen als andere Tumorentitäten auf. Die Ergebnisse sind wertvoll in der Beratung onkologischer Patienten und unterstreichen die Bedeutung der Kryokonservierung von Spermien möglichst vor Beginn der weiteren potenziell gonadotoxischen Therapie.

P 13

Verbessert die mikrochirurgische TESE (M-TESE) die Spermienausbeute bei Patienten mit hypergonadotroper Azoospermie? Ein Vergleich zwischen Standard und M-TESE

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

Einleitung Die testikuläre Spermienextraktion (TESE) ist in der Behandlung der andrologischen Infertilität etabliert. Die mikrochirurgische TESE (M-TESE) scheint zu besseren Ergebnissen zu führen, wobei nur eine Studie die beiden Techniken vergleicht. In dieser Analyse vergleichen wir die beiden Extraktionsverfahren, die simultan in jedem Hoden der Patienten (P.) angewendet wurden.

Material und Methoden 65 Patienten (davon 14 Klinefelter, Gruppe 1) wurden beidseitig ($n = 61$) oder einseitig ($n = 4$) operiert. 29/65 (44 %) Patienten hatten eine hypergonadotrope Azoospermie (Gruppe 2), 5/65 (7 %) eine normogonadotrope Azoospermie (Gruppe 3) und 20/65 (30,7 %) zeigten im Sediment vereinzelte (< 20), überwiegend immotile Spermatozoen (Gruppe 4). Zusätzlich zur diagnostischen Hodenbiopsie wurden aus jedem Hoden 4 Standard TESE sowie 4 Mikro-TESE-Proben entnommen und kryokonserviert. Von jeder wurde ein winziges Aliquot enzymatisch aufgearbeitet und die gesamte Anzahl der Spermien in der Probeaufbereitung dokumentiert.

Ergebnisse FSH und Hodenvolumen lagen bei den Klinefelter- bzw. den anderen Infertilitätspatienten im Mittel bei $36,12 \pm 16,65$ bzw. $22,8 \pm 17,91$ IU/L und $2,42 \pm 1,87$ bzw. $13,5 \pm 6,55$ ml. Es wurden bei 32/65 (49 %) P. Spermatozoen gefunden. Bei 5/14 P. in der Gruppe 1 wurden Spermien gefunden (127 mit TESE, 117 mit Mikro-

TESE). In Gruppe 2 wurden 271 Spermatozoen mit TESE und 199 mit M-TESE gefunden. In Gruppe 3 wurden 708 Spermatozoen mit TESE und 937 mit M-TESE gefunden. In Gruppe 4 wurden 793 Spermatozoen mit TESE und 859 mit M-TESE gefunden.

Zusammenfassung Der Einsatz der M-TESE zeigt eine leicht verbesserte Spermienausbeute, besonders in der P. mit normogonadotroper Azoospermie (Gruppe 3), obgleich in Rahmen der M-TESE deutlich weniger Material aus dem Hoden entnommen wird. Durch die verbesserte Spermienengewinnung stehen für eine erfolgreiche TESE-ICSI-Behandlung mehr Spermatozoen zur Auswahl. Die Histologie alleine erlaubt keinen Rückschluss auf die erfolgreiche Spermienengewinnung. Bei den schwerstgestörten Patienten mit hypergonadotroper Azoospermie (Gruppe 2) und Klinefelter (Gruppe 1) erhöht sich die Zahl mit positiver Spermienausbeute um ca. 7 % durch die Mikro-TESE.

■ Genetik in der Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

P 14

Kasuistik: Sterilitätstherapie bei Kallmann-Syndrom der Frau mit einer neuen, heterozygoten Mutation des FGFR1-Gens

V. Wolk¹, B. Wetzka¹, J. Kohlhasse², F. Geisthövel¹
¹CERF, Freiburg; ²Praxis für Humangenetik, Freiburg

Fragestellung Das Kallmann-Syndrom kommt deutlich seltener bei Frauen (1:50.000) als bei Männern (1:10.000) vor. Bei einigen Patienten/Patientinnen konnten Mutationen der sog. KAL-Gene gefunden werden, von denen KAL 1 (Anosmin, x-chromosomal rezessiv) in ca. 10 % und KAL 2 („fibroblast growth factor receptor 1“ [FGFR1], autosomal dominant) in ca. 8 % der Fälle nachgewiesen wurden. Mutationen des KAL-1-Gens verursachen immer eine deutliche Fertilitätsminderung, während bei Mutationen des KAL-2-Gens heterogene reproduktive Einschränkungen beobachtet werden. Diese Kasuistik beschreibt die Sterilitätstherapie einer Patientin mit Kallmann-Syndrom durch eine Mutation im KAL-2-Gen.

Methodik, Anamnese Eine 24-jährige Frau und ihr 26-jähriger Partner stellten sich mit unerfülltem Kinderwunsch seit 2 Jahren vor. Bei der Patientin fielen eine Pubertas tarda und eine hypogonadotrope Amenorrhö auf. Unter oraler Kontrazeption erfolgten regelmäßige Abbruchblutungen. Die Körpergröße betrug 1,70 m bei einem Gewicht von 61 kg. Die Mammæ waren im Tanner-Stadium IV, es fand sich eine spärliche Axilla- und juvenile Pubes-Behaarung. Vaginalsonographisch waren beide Ovarien und der Uterus deutlich verkleinert, die Ovarien erschienen afollikulär und das Endometrium war strichförmig. Der Geruchtest ergab eine An-

osmie. Ansonsten zeigte die Patientin keine somatischen Auffälligkeiten. Die Zytogenetik war normal bei beiden Partnern. In der Familienanamnese fanden sich keine weiteren Mitglieder mit Kallmann-Syndrom. Beim Partner bestand eine familiäre Epilepsie mit Anfallsfreiheit unter Valproinsäure und ein OAT-Syndrom II.

Ergebnisse, Verlauf Die molekulargenetische Anamnese ergab die Mutation c.268_283del, p.D90TfsX8 im FGFR1-Gen in heterozygoter Form. Aufgrund des OAT-Syndroms bestand die Indikation zur Durchführung einer IVF-ICSI-Therapie. Die ovarielle Stimulation erfolgte mit Gonadotropindosen zwischen 75 und 100 IU/Tag ohne zusätzliche Gabe von GnRH-Agonist oder -Antagonist. Im ersten Zyklus konnten 5 Metaphase-II-Oozyten gewonnen werden, wovon mittels ICSI nur eine befruchtet wurde. Am 3. Tag nach der Follikelpunktion hatte sich ein 8-Zell-Embryo entwickelt, welcher *in utero* transferiert wurde. Es kam zu einer Schwangerschaft, die nach hormoneller Substitution mit Progesteron intravaginal und Estradiolvalerat oral im ersten Trimenon mit einer Vaginalgeburt in der 39. Schwangerschaftswoche endete. In der Pränataldiagnostik fiel eine verbreiterte Nackentransparenz bei normalen Serummarkern auf, weiterhin eine singuläre Nabelschnurarterie und ein auffälliger Verlauf der kardialen Ausflusshbahnen. Das Ehepaar wünschte den Erhalt der Schwangerschaft und keine weiteren genetischen Untersuchungen. Postnatal zeigte das Mädchen einen rechtsseitigen Aortenbogen und einen membranösen Ventrikelseptumdefekt, bislang war eine operative Korrektur noch nicht indiziert.

Schlussfolgerung Die Fertilität von Frauen mit Mutationen des KAL-2-Gens ist bei adäquater Sterilitätstherapie gut. Diese unserer Kenntnis nach bisher noch nicht beschriebene Mutation des FGFR1-Gens führt zu einem vorzeitigem Abbruch der Translation und damit zu einem Funktionsverlust des betroffenen Allels. Bei leerer Familienanamnese ist von einer zufälligen Neumutation auszugehen, die mit 50%iger Wahrscheinlichkeit an die Nachkommen weitergegeben werden kann. Die Ursache der kindlichen Fehlbildung ist unklar, denkbar wäre ein Zusammenhang mit der väterlichen Epilepsie, der IVF-ICSI-Therapie oder eine zufällige Neubildung, möglich wäre auch eine Verbindung mit der FGFR1-Mutation der Mutter.

P 15

Adaptation der Array-CGH für die Polkörper-Analyse

T. Buchholz¹, M. Klehr-Martinelli¹, M. Russmann², B. Seifert³, M. Bals-Pratsch³
¹Gyn-Gen-Lehel, München; ²Perkin Elmer LAS, Rodgau; ³Kinderwunschzentrum Regensburg

Chromosomenfehlverteilungen, insbesondere während der Meiose der Eizellen, sind eine sehr häufige Ursache für Aborte oder für Implantationsversagen. Die Analyse von Polkörpern mittels Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) für eine limitierte Anzahl

von Chromosomen ist hierfür bereits seit längerem etabliert. In den vergangenen Jahren wurden große Anstrengungen unternommen, neue Techniken zur Detektion von Aneuploidien möglichst aller Chromosomen aus Einzelzellen zu entwickeln. Dabei sind eine Vervielfältigung der DNA mittels „whole genome amplification“ (WGA) und eine vergleichende Hybridisierung z. B. mit einer Array-CGH nötig. Ziel unserer Untersuchung war es nachzuweisen, dass diese Methode auch für extrem kleine DNA-Mengen wie bei Polkörpern anwendbar ist.

In einer Pilotstudie haben wir, nach vorangegangener Optimierung zur Entwicklung eines Standardverfahrens, die Anwendbarkeit in einem klinischen IVF-Ablauf und im zeitlich vorgegebenen Rahmen geprüft. Hierzu haben wir Polkörper von jeweils max. 5 Eizellen (insgesamt 45 Eizellen) von 10 Patientinnen (Durchschnittsalter 37,3 Jahre) zunächst mittels WGA amplifiziert und mit einem Bac CGH-Array mit 600 Klonen (Constitutional Chip 3.0, Perkin Elmer LAS) analysiert.

Dabei hat sich gezeigt, dass die Standardauswertung der Array-CGH für amplifizierte Polkörper modifiziert werden muss. Mehr als 20 % der Klone zeigen in mehr als 60 % der untersuchten Zellen eine konstante Über- oder Unterrepräsentation. Eine Erklärung könnte eine präferenzielle Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte sein. Auf der Basis der gesammelten 45 Datensätze wurde eine für die Polkörper-Diagnostik spezifische Auswertung durch eine chromosomen-spezifische Mittelwertkorrektur und eine Eliminierung spezifischer Klone entwickelt. Im Resultat ergibt sich eine neue Berechnungsgrundlage für die Analyse von Polkörpern, die eine Aussage über das Vorliegen einer Aneuploidie in der entsprechenden Eizelle erlaubt.

Zur Klärung der Plausibilität unserer Berechnungsgrundlage sollte eine weitere Pilotstudie mit einer größeren Zahl von Patienten durchgeführt werden.

P 16

Vitrifikation von Eizellen und ihre Anwendung zur Polkörperdiagnostik (PKD) monogener Erkrankungen

B. Seifert¹, B. Paulmann¹, D. Seifert¹, U. Hehr², A. Hehr², M. Bals-Pratsch¹
¹Kinderwunschzentrum Regensburg; ²Zentrum für Humangenetik Regensburg

Fragestellung Die Vitrifikation von Eizellen wurde in unserem Zentrum bislang nur im Rahmen der Fertilitätsprophylaxe junger Frauen ohne Partner bzw. bei Zyklen ohne Spermagewinnung angewendet. Diese Option kann jedoch auch für die Polkörperdiagnostik (PKD) in Einzelfällen bei reduzierter ovarieller Reserve oder technischen Problemen bei der Gendiagnostik von Bedeutung sein.

Methodik Die Vitrifikation der Eizellen erfolgte nach zeitlicher Modifikation des „Blastocyst vitrification medium“ der Firma Gynemed.

Ergebnisse Anhand von 3 Falldarstellungen wird die Wirksamkeit dieses Verfahrens dargestellt.

1. Fall: 35-jährige Patientin, sekundäre Sterilität nach Geburt eines Mukoviscidose-erkrankten Kindes. Nach Ovarstimulation konnten 11 reife Eizellen gewonnen werden. Wegen unvorhersehbarer technischer Probleme bei der molekulargenetischen Aufarbeitung mussten die Eizellen vitrifiziert werden. Nach Überarbeitung des familienspezifischen Diagnostiksystems erfolgte 4 Monate später in einem artefiziellen Zyklus mit Progynova die molekulargenetische Diagnostik des 1. und 2. Polkörpers. Nach dem Auftauen waren 8 Eizellen intakt und konnten biopsiert werden. Am folgenden Tag waren 5 Vorkern-Stadien (PN) vorhanden. Der Embryotransfer von 2 Embryonen 6A und 2A (Wildtyp-Allel) erfolgte am 2. Tag nach dem Auftauen. Daraus resultierten eine klinische Schwangerschaft und die Geburt eines genetisch gesunden Kindes.

2. Fall: 39-jährige Patientin, sekundäre Sterilität nach Geburt eines Kindes mit myotoner Dystrophie. Aus 2 Diagnostikzyklen mit 7 bzw. 9 Eizellen konnten keine mutationsfreien Embryonen transferiert werden. Zwei weitere Stimulationen wurden zur Vitrifikation von 3 und 5 reifen Eizellen genutzt. Eine 5. Punktion ergab weitere 5 reife Eizellen, 4 davon waren imprägniert. Zwei Embryonen mit dem Wildtyp-Allel (1 frühe Blastozyste, 1 Morula) konnten transferiert werden. Von den zusätzlich aufgetauten 8 Eizellen waren 6 vital. Nach dem Ergebnis der genetischen Diagnostik konnte gleichzeitig eine Blastozyste 3BB (Wildtyp-Allel) transferiert werden, die vermutlich zu der klinischen Schwangerschaft geführt hat.

3. Fall: 39-jährige Patientin, sekundäre Sterilität nach der Geburt eines Kindes mit fragilem X-Syndrom. Es wurden zunächst 2 erfolglose Diagnostikzyklen ohne Transfer von gesunden Embryonen durchgeführt. Danach erfolgten 4 Stimulationen mit Clomifen und Puregon zum Sammeln von reifen Eizellen (2–1–2–8 Eizellen) zur Vitrifikation. Im Herbst 2009 ist eine weitere Stimulation mit gleichzeitiger molekulargenetischer Untersuchung, auch der bisher vitrifizierten Eizellen, geplant.

Schlussfolgerung Die Vitrifikation von Eizellen stellt im Rahmen eines PKD-Programms zur Diagnostik monogener Erkrankungen vor allem bei älteren Frauen mit geringer ovarieller Reserve eine unverzichtbare Maßnahme dar.

P 17

Polkörperdiagnostik monogener Erkrankungen unter Routinebedingungen

B. Seifert¹, B. Paulmann¹, D. Seifert¹, U. Hehr², A. Hehr², M. Bals-Pratsch¹

¹Kinderrwunschzentrum Regensburg; ²Zentrum für Humangenetik Regensburg

Fragestellung Die Polkörperdiagnostik (PKD) zum Ausschluss monogener Erkrank-

kungen wird in unserem Zentrum seit dem Jahr 2001 erfolgreich praktiziert. In den vergangenen Jahren konnte eine beträchtliche Zunahme der Behandlungsfälle verzeichnet werden. Neben den Einschränkungen des Embryonenschutzgesetzes (ESchG) sind neue Regelungen nach Inkrafttreten des Gendiagnostikgesetzes zu erwarten. Für die tägliche Routine ist eine effektivere Ablaufplanung der PKD notwendig.

Methodik Die Festlegungen des ESchG erfordern, dass nach der Entnahme des 2. Polkörpers am Punktionsstag 21.00 Uhr der Hauptanteil molekulargenetischer Aufarbeitung über Nacht erfolgt. Die Ergebnisse stehen zum Zeitpunkt der Vorkern-Beurteilung (PN) zur Verfügung.

Seit Anfang des Jahres 2009 sind 2 Diagnostikzyklen wöchentlich geplant, sodass ein neuer Algorithmus unter Berücksichtigung des ESchG validiert wurde. Der 1. Polkörper wird 3 Stunden nach der Punktion (15.00 Uhr) entfernt. Die Entnahme des 2. Polkörpers wird am Morgen des folgenden Tages (07.00 Uhr) durchgeführt. Nicht imprägnierte Eizellen und Eizellen mit fehlerhaften Befunden des 1. Polkörpers scheidet für die weitere Diagnostik aus.

Ergebnisse Die molekulargenetischen Ergebnisse der transferrelevanten PN-Stadien stehen im Rahmen einer 22-Stunden-Grenze zur Verfügung. Die aktuell vorhandenen Behandlungszyklen werden dargestellt.

Schlussfolgerung Die Diagnostik des 1. und 2. Polkörpers für den Ausschluss monogener Erkrankungen ist im Rahmen des ESchG ohne Nacharbeit möglich.

P 18

Chromosomenanomalien unter Patienten mit Oligozoo- und Azoospermie: Therapiemöglichkeiten, IVF-ICSI-PGD

K. Rajczy¹, M. Kónya², S. Mátyás¹, A. Bernard¹, P. Kovács¹, G. Papp³, S. Kaali¹

¹Kaali Institut, Budapest; ²Istenhegyi Gendiagnostikzentrum, Budapest; ³HM Staatliches Gesundheitszentrum, Budapest, Ungarn

Fragestellung Die Autoren haben die Häufigkeit der Chromosomenanomalien unter Patienten mit Oligozoo- und Azoospermie untersucht. Anhand der Diagnose stellen sie Therapiemöglichkeiten und die Effektivität der PGD (Präimplantationsdiagnostik) dar.

Methodik Wir haben 738 Männer mit Oligozoospermie und 162 mit Azoospermie zytogenetisch analysiert. Die Bestimmung von Karyotypen wurde mittels G-Bandenfärbung in RPMI-1640-Medium, mit einer Züchtungszeit von 72 Stunden durchgeführt. Die weitere Vermehrung der Zellen wurde in der Metaphase durch Zugabe von Cholchicine blockiert, nach Hypotonisierung und Fixierung wurde die G-Bandenfärbung mittels Giemsa-Lösung erstellt. Die Metaphasen wurden mit einer 1500-fachen Vergrößerung digitalisiert gespeichert und mithilfe von „Lucia Karyo Software“ analysiert.

Bei auffälligem Karyotyp, nach genetischer Indikation, haben wir in 74 Fällen nach Superovulationsbehandlung IVF-ICSI-PGD initiiert.

Die Züchtung von Embryonen wurde im sequenziellen Medium (VITROLIFE) durchgeführt, die Blastomerbiopsie fand am 3. Tag an Embryonen bestehend aus 8–10 Zellen statt (G-PGD-VITROLIFE).

Die Blastomere wurden zur Diagnosestellung in fixiertem Zustand auf Objektträgern in das genetische Zentrum eingesandt. Bei 71 von 74 Fällen (95,94 %) fand der Embryotransfer am 5. Tag statt.

Ergebnis Unter Patienten mit Oligozoospermie betrug die Häufigkeit der Chromosomenanomalien 4,1 % (30 Fälle), bei Patienten mit Azoospermie 11,7 % (19 Fälle).

Aufgrund der PGD konnten von 814 untersuchten Embryonen 260 (31,94 %) Embryos mit normalem Karyotyp verifiziert werden.

Die klinische Schwangerschaftsrate betrug 17,64 % bei 2,19 implantierten Präembryonen pro Patient.

Schlussfolgerung Bei Patienten mit Oligozoo- und Azoospermie kommen häufiger Chromosomenanomalien als im Vergleich zur Normalpopulation vor. Im Falle numerischer und struktureller Anomalien mittels IVF-ICSI sowie PGD können bereits in der frühen embryonalen Entwicklungsphase die Embryos mit Chromosomenanomalien nachgewiesen werden.

Die Implantationsrate kann mithilfe der im indizierten Fall durchgeführten genetischen Untersuchung gesteigert werden.

P 19

Idiopathic Male Infertility is Strongly Associated with Aberrant Methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1

A. Poplinski¹, S. Kliesch¹, F. Tüttelmann², D. Kanber³, B. Horsthemke³, J. Gromoll¹

¹Centre of Reproductive Medicine & Andrology, University Clinics Münster; ²Institute of Human Genetics, University Clinics Münster; ³Institute of Human Genetics, University Clinics Essen

Objectives Children conceived via assisted reproduction techniques display an unexpected high incidence of certain congenital diseases such as Beckwith-Wiedemann syndrome or Angelman syndrome. The general mutation frequency is not increased by ART procedures; however, those children show an aberrant pattern of DNA methylation at imprinted loci. Two alternative explanations for this phenomenon are that either ART impairs proper epigenetic reprogramming in the conceived embryo or that the aberrant DNA methylation arises from the male or female germ cells. This would imply that those “epimutations” are trans-generationally inherited to the ART children. It has been postulated in earlier studies that a subset of infertile men display aberrant methylation patterns in their spermatozoa. Detailed analyses of sperm parameters of large clinically evaluated cohorts with adequate controls however are missing.

Patients and Methods 144 idiopathic infertile men were included in the patient cohort. They presented at the Centre of Reproductive Medicine & Andrology (CeRA) seeking advice for infertility problems and no known reason for infertility could be assigned to these men. The control cohort consisted of 33 men who were recruited from the pool of healthy normozoospermic semen donors. DNA methylation of the paternal imprint IGF2/H19 imprinting control region 1 (ICR1) and the maternal imprint MEST were assessed by sequencing based methylation analysis from swim-up purified spermatozoa.

Results All control individuals displayed a high average degree of DNA methylation of the paternal imprint IGF2/H19 ICR1 (95.9 %) and a low degree of methylation of the maternal imprint MEST (4.3 %). Low total sperm counts below 40 million were associated with aberrant imprinting in spermatozoa as IGF2/H19 ICR1 methylation in these patients was significantly reduced to 89.6 % ($p < 0.05$) and MEST methylation was significantly increased to 9.6 % ($p < 0.05$). Further, MEST hypermethylation was also significantly associated with poor sperm morphology and sperm motility. Patients with less than 5 % normal sperm morphology or less than 40 % progressively motile sperm displayed 7 % or 6.6 % MEST methylation, respectively, whereas controls displayed only 3.5 % MEST methylation ($p < 0.05$). Ageing could be ruled out as the reason for IGF2/H19 ICR1 hypomethylation and MEST hypermethylation in our cohort. To clarify whether a particular genetic reason accounts for the observed epimutations we performed mutation analysis of CTCFL, the key regulator of epigenetic reprogramming in the male germ line. However, no bona-fide mutation could be found in the 20 patients with most aberrant IGF2/H19 ICR1 or MEST methylation.

Conclusion We present the first study assessing imprinting defects in spermatozoa of infertile men in a clinically well characterised patient cohort with adequate controls. We could show that hypermethylation of the maternal imprint MEST is a strong indicator for sperm quality in terms of morphology and motility. If those epimutations can be transmitted to children conceived by ART they represent a major risk factor for epimutation-based congenital diseases in these children. We propose that DNA methylation analysis of imprinted genes should be integrated into the routine semen analysis to clarify whether epimutations can be transmitted to the progeny.

The study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG GR 1547/8-1 and HO 949/14-1.

P 48

Kasuistik: Swyer-Syndrom (46 XY): Verlauf von der Diagnose bis zur Gravidität nach Oozytendonation

P. Faas-Fehervary, F. Geisthövel
Centrum für Gynäkologische Endokrinologie & Reproduktionsmedizin Freiburg (CERF)

Fragestellung Die Abklärung einer hypergonadotropen Ovarialinsuffizienz (WHO Klasse III) im Jugendalter gehört zu den seltenen Fällen in der Endokrinologie. Das Swyer-Syndrom (46, XY) ist eine Rarität. Durch die Degeneration des Hodens zu einer Stranggonade fehlt die Testosteronsekretion, in der primär indifferenten Urogenade können sich die Müller'schen Gänge ausdifferenzieren, die Wolff'schen Gänge degenerieren. Wir beschreiben einen Fall, der von der Diagnosestellung in der Adoleszenz bis zur Oozytendonation und Geburt von Gemini im Erwachsenenalter durchgehend dokumentiert ist.

Anamnese Bei der damals 16-jährigen Patientin wurde bei Pubertas tarda mit primärer Amenorrhö und unauffälligem äußeren Genitale eine hypergonadotrope Ovarialinsuffizienz festgestellt. Die zytogenetische Abklärung ergab den o. g. männlichen Karyotyp mit Punktmutation im SRY-Gen und damit die Diagnose eines Swyer-Syndroms. Die bereits veränderte rechte Stranggonade (Gonadoblastom und Dysgerminom) wurde entfernt, die linke Stranggonade war nicht nachweisbar. Seit frühester Kindheit war bei der Patientin zudem eine Doppelnieren rechts mit Ureter duplex bekannt. Wegen rezidivierender Harnwegsinfekte im Kindesalter wurde eine Ureterplastik durchgeführt. Seit Diagnosestellung stand die Patientin unter Hormontherapie und Substitution mit Kalzium und Vitamin D3.

Verlauf Die Patientin stellte sich im Alter von 26 Jahren bei uns vor. Auffällig war der hypoplastische Uterus (ap 45 mm). Die Patientin organisierte für sich eine Oozytendonation im Ausland, bereits im ersten Behandlungsversuch trat eine Geminigravidität ein. Während der ersten 12 Schwangerschaftswochen wurden die Östrogen- und Gestagensupplementierung fortgesetzt. Die unauffällige Schwangerschaft wurde *per sectionem* beendet. Stillen war problemlos möglich. Im Wochenbett kam es zu einem schweren Harnwegsinfekt und einer Endometritis, wohl auf dem Boden der angeborenen urogenitalen Fehlbildung, welche stationär behandelt werden musste.

Schlussfolgerung Bisher wurde in der Literatur erst über wenige Fälle einer erfolgreichen Schwangerschaft bei Swyer-Syndrom berichtet. Dieser durchgehend von der Erstdiagnose bis zur Entbindung dokumentierte Fall wirft neben den medizinischen und psychologischen Aspekten auch die Frage zum Patientin-Arzt-Verhältnis auf. Da in Deutschland die Oozytendonation verboten ist (§ 1. Abs. 1. Nr. 2 Embryonenschutzgesetz in Verbund mit § 1591 BGB), fühlt sich ein betroffenes Patientenpaar bei der Organisation einer entsprechenden Behandlung im

Ausland oft allein gelassen. Sicherlich müssen juristisch die ärztlichen Beratungsrechte und -pflichten in solchen Fällen geklärt werden.

■ Gynäkologische Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

P 20

Stabiler und induzierbarer Knock-down des Heparansulfat-Proteoglykans Syndecan-1 in humanen endometrialen Stromazellen

D. M. Baston-Büst¹, D. Schuldt¹, M. Götte², A. Schanz¹, J. Hirchenhain¹, J.-S. Krüssel¹, A. P. Hess¹
¹Frauenklinik, UniKID, Universitätsklinikum Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf; ²Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Münster

Fragestellung Eine regelrechte Implantation eines Embryos in das mütterliche Stroma ist durch eine intensive, synchronisierte feto-maternale Kommunikation gekennzeichnet. Wichtige Mediatoren dieser Kommunikation sind Chemokine, wie z. B. „chemokine ligand 1“ (CXCL1), das in der mütterlichen Dezidua bei Kontakt mit Trophoblastkonditioniertem Medium (TCM) hochreguliert wird [1]. Chemokine binden an klassische 7 Transmembran-enthaltende G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Neben diesen klassischen Rezeptoren agieren die Heparansulfat-bindenden, membranständigen Proteoglykane-Syndecane (Sdc) als Korezeptoren, die verschiedene Aufgaben hinsichtlich der Vermittlung von Chemokin-Signalen wahrnehmen. Einerseits intensivieren sie die Bindung des Ligand-Rezeptor-Paares durch die räumliche Konformation an der Zelloberfläche, speichern Chemokine vor der Bindung an den Rezeptor und sind am Aufbau von Chemokingradienten beteiligt, wie sie beispielsweise zur Leukozytenrekrutierung genutzt werden [2]. Die Expression der Sdc-1 bis 4 im Endometrium normzyklischer Frauen mit einer Hochregulation der Sdc-1 und -4 im sekretorischen Abschnitt des Zyklus, in dem sich das mütterliche Gewebe auf eine potenzielle Implantation eines Embryos vorbereitet, ist bereits bekannt [3].

Da CXCL1 eine wichtige Komponente des frühen feto-maternalen Dialogs darstellt, sollte der stabile und induzierbare knock-down des Korezeptors Sdc-1 Aufschluss über die Bedeutung des Korezeptors an der feto-maternalen Schnittstelle mit Hinblick auf die Regulation von CXCL1 und dessen Einfluss auf die Implantation geben.

Methodik Kultur humaner endometrialer Stromazellen der Linie ST-T1 [4], T-REX™ System (Invitrogen), Transfektion des für den Tetrazyklin-Repressor kodierenden Plamids pcDNA6/TR via Nukleofektion, Selektion, Klonierung dreier potenzieller Short-hairpin-RNAs gegen Sdc-1 in pENTR/H1/TO und Sequenzierung, Transfektion erfolgrei-

cher Klone in mit pcDNA6/TR transfizierte ST-T1, Selektion, Induktion des Sdc-1-knock-down mit Tetrazyklin, Nachweis mittels Real-Time-PCR, Dezidualisierung mit cyclo-Adenosinmonophosphat (cAMP) und Progesteron, RNA-Isolation, Reverse Transkription, PCR für beta-Aktin (Haushaltsgen) und Prolaktin (Dezidualisierungsmarker).

Ergebnisse Nach erfolgreicher Selektion stabiler und mit Tetrazyklin (Tet) induzierbarer Sdc-1-Knock-down-Klone wurden die generierten Zellen als auch die Kontrollen mit cAMP und Progesteron für 72 Stunden dezidualisiert. Anhand der durchgeführten PCRs für den Dezidualisierungsmarker Prolaktin konnte gezeigt werden, dass sich auch die mit Tetrazyklin induzierten Knock-down-Zellen (KdS1) dezidualisieren lassen.

Schlussfolgerung Wir konnten erfolgreich eine stabile und mit Tet induzierbare humane endometriale Stromazelllinie (KdS1) generieren, die hinsichtlich des Prozesses der Dezidualisierung funktionell erscheint. Somit steht dieses Modellsystem für weitere Untersuchungen zur Aufdeckung der Signalwege des para-, auto- und endokrin wirksamen CXCL1 im Rahmen von Dezidualisierung und Implantationsgeschehen zur Verfügung.

Literatur:

- Hess et al. Dezidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators. *Biol Repro* 2007; 76: 102–17.
- Götte et al. Syndecans as modulators of chemokine function. In: *Progress in chemokine Research*. Editor WP. Linkes, 2007.
- Germeyer et al. Expression of syndecans, cell-cell interaction regulating heparin sulphate proteoglycans within the human endometrium and their regulation throughout the menstrual cycle. *Fertil Steril* 2007; 87: 657–63.
- Brosens et al. Human endometrial fibroblasts immortalized by Simian Virus 40 large T antigen differentiate in response to a dezidualization stimulus. *Endocrinology* 1996; 137: 2225–31.

P 21

Embryonaler Stimulus zur Chemokine ligand 1- (CXCL1-) Expression in humanen endometrialen Stromazellen wird über MEK- und STAT-Signalwege vermittelt

*D. Schuldt, D. M. Baston-Büst, D. Ziegler, A. Schanz, J.-S. Krüssel, A. P. Hess
Frauenklinik, Universitätsklinikum, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; UnikID, Düsseldorf*

Fragestellung Eine synchronisierte fetomaternal Kommunikation kennzeichnet die Implantation eines Embryos in das mütterliche Stroma. Chemokine sind wichtige Komponenten dieser Kommunikation, z. B. „chemokine ligand 1“ (CXCL1), das in der mütterlichen Dezidua bei Kontakt mit Trophoblast-konditioniertem Medium (TCM) hochreguliert wird [1]. Die humane Stromazelllinie ST-T1 [2, 3] fungiert in vitro als ideales Untersuchungsobjekt der frühen fetomaternalen Schnittstelle, da diese Zellen dezidualisierbar sind und die In-vivo-Eigenschaften des Endometriums widerspiegeln.

Da CXCL1 eine wichtige Komponente des frühen fetomaternalen Dialogs darstellt, sollte der Signalweg untersucht werden, über den die Aktivierung von CXCL1 bei Imitation des embryonalen Kontakts durch Interleukin-1beta (IL-1beta) an der fetomaternalen Schnittstelle erfolgt.

Methodik Kultur humaner endometrialer Stromazellen der Linie ST-T1 [2, 3], Dezidualisierung mit zylo-Adenosinmonophosphat (cAMP) und Progesteron, Inkubationen mit rekombinantem humanem IL-1beta (Konzentrations- und zeitabhängig) und Inhibitoren der Signalwege von Mitogen-activated protein kinase kinase (MEK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) und Signal Transducers and Activator of Transcription (STAT3), RNA-Isolation, Reverse Transkription, PCR für beta-Aktin (Haushaltsgen), Prolaktin (Dezidualisierungsmarker) und CXCL1 sowie CXCL1-ELISA.

Ergebnisse Wir konnten zeigen, dass dezidualisierte endometriale Stromazellen 100-mal sensitiver gegenüber dem IL-1beta-Stimulus hinsichtlich der Expression von CXCL1 auf Ebene der mRNA reagieren. Auf Proteinebene wird um den Faktor 2,5-mal mehr CXCL1 in den Kulturüberstand sezerniert. Die stärkste Hemmung des CXCL1-Signals erhielten wir durch den Einsatz von MEK-Inhibitor, gefolgt von STAT3-Inhibitor.

Schlussfolgerung Die Weiterleitung des embryonalen Signals – hier imitiert durch IL-1beta – scheint hauptsächlich über den MEK-Signalweg zu verlaufen. Dieser Signalweg ist in Zellproliferation und -wachstum involviert, initiiert unter anderem durch Wachstumsfaktoren, die ebenfalls in den Prozess der Implantation bei Vaskulo- und Angiogenese involviert sind. Im Rahmen dieser frühen fetomaternalen Kommunikation scheint CXCL1 bei den grundlegenden Mechanismen der Implantation eine wichtige Rolle zu spielen, die für die sichere Etablierung und den anschließenden weiteren Verlauf einer Schwangerschaft von großer Bedeutung sind.

Literatur:

- Hess et al. Dezidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators. *Biol Repro* 2007; 76: 102–17.
- Brosens et al. Human endometrial fibroblasts immortalized by Simian Virus 40 large T antigen differentiate in response to a dezidualization stimulus. *Endocrinology* 1996; 137: 2225–31
- Samalecos et al. Characterization of a novel telomerase-immortalized human endometrial stromal cell line, St-T1b. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7: 76.

P 22

Etablierung endometrialer Stammzellkulturen zur Charakterisierung potenzieller Pathogenesefaktoren der Endometriose

N. Schulte, A. N. Schüring*, M. Wolf, R. Kelsch*, O. Buchweitz*, L. Kiesel*, M. Götte*
*Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Münster; *Institut für Transfusionsmedizin und Transplantationsimmunologie, Universitätsklinikum Münster*

Fragestellung Die Endometriose ist definiert als das Vorkommen endometriumartiger Zellverbände außerhalb des Cavum uteri. Endometrioseherde erzeugen unspezifische zyklusabhängige Beschwerdesymptomatiken wie Unterbauchschmerzen, Dysmenorrhö und Dyspareunie. Bei einer Inzidenz der Erkrankung von 10 % der Frauen zwischen dem 15. und 50. Lebensjahr und einer 35–50%igen Korrelation zwischen Unterbauchschmerzen und Infertilität mit Endometriose handelt es sich um eine epidemiologisch sehr relevante Erkrankung. Ätiologie und Pathogenese der Erkrankung sind bis heute nicht vollständig geklärt, neue Daten deuten jedoch auf eine fehlgeleitete Funktion endometrialer Stammzellen als einen Pathogenesemechanismus hin. Die Transplantationstheorie postuliert, dass während der Menstruation vitales Endometriumgewebe retrograd durch die Tuben in den Bauchraum gelangt, wo eine ektope Implantation erfolgen kann. Das hohe proliferative Potenzial und die erweiterten Differenzierungsmöglichkeiten fehllokalisierter Stammzellen könnten hierbei eine Etablierung des Endometrioseherdes begünstigen. Ziel der vorliegenden Studie war die Etablierung einer Stammzellkultur aus Endometriumgewebe und deren molekulare Charakterisierung als Grundlage zur Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Ansätze der Endometriose.

Material und Methoden Stromazellen nativer Endometriumbiopsien (n = 44) wurden nach enzymatischer Dissoziation mit Kollagenasen durch Immundepletion von Drüsenepithelzellen und Leukozyten separiert. In klonaler Dichte ausgesäte Stromazellen wurden seriell passagiert und mittels quantitativer Real-time-PCR und Durchfluss-Zytometrie auf die Expression der mesenchymalen Stammzellmarker CD146, Notch-1, Msi-1, sowie des Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktors Sox-2 untersucht. Zum Nachweis des Differenzierungspotenzials wurde eine osteogene Differenzierung mit anschließender Aktivitätsfärbung des Enzyms durch alkalische Phosphatase vorgenommen. Zur Überprüfung einer möglichen Relevanz endometrialer Sox-2-Expression für die Ätiologie der Endometriose wurde eine vergleichende immunhistochemische Untersuchung an Paraffinschnitten von Endometriumgewebe aus Endometriosepatientinnen und gesunden Probandinnen vorgenommen (n = 30).

Ergebnis Primärkulturen von Endometriumbiopsien zeigten eine Klonierungseffizienz von 0,795 %, die nach der ersten Passa-

gierung auf 4,329 % anstieg. Die klonalen Zellen ließen sich über einen Zeitraum von > 12 Monaten über mehr als 20 serielle Passagen kultivieren, ohne Chromosomenaberrationen zu zeigen. Mittels quantitativer Real-time-PCR ließ sich die Expression von Sox-2, Notch-1, Msi-1 und CD146 in den klonalen Kulturen nachweisen. Durchflusszytometrisch konnte die Expression von CD146 und des mesenchymalen Stammzellmarkers CD73 nachgewiesen werden. Eine Teilpopulation der klonalen Zellen ließ sich reproduzierbar osteogen differenzieren. Die immunhistologische Untersuchung ergab im proliferativen Endometrium eine signifikante 2,1-fache Erhöhung der Sox2-Expression im Vergleich zum Endometrium der sekretorischen Phase. In Endometriosebiopsien zeigte sich die Zahl Sox-2-positiver Zellen im Stroma im Vergleich zum sekretorischen Gewebe signifikant erhöht.

Schlussfolgerung Mittels der Technik der seriellen klonalen Passagierung gelang in dieser Studie die Etablierung klonaler Endometriumzellkulturen, welche Stammzeleigenschaften wie das Potenzial zur osteogenen Differenzierung, die nicht durch chromosomale Aberrationen bedingte Langzeitkultivierbarkeit, sowie die Expression Stammzell-typischer Markergene aufweisen. Die im Vergleich zum gesunden sekretorischen Endometrium signifikant veränderte Expression des Stammzellmarkers Sox-2 in Endometriosegewebe legt eine mögliche Beteiligung an der Pathogenese dieser Erkrankung nahe, welche eine häufige Ursache weiblicher Fertilitätsprobleme darstellt. Die neu etablierten endometrialen Stammzellkulturen könnten hierbei ein wichtiges Werkzeug zur zukünftigen In-vitro-Untersuchung der Pathogenesemechanismen stammzell-assoziiierter Ursachen weiblicher Fertilitätsprobleme darstellen.

* N. Schulte und A. Schüring sind gleichberechtigte Erstautoren dieser Studie.

P 23

Effect of Uterine Immune Cells on Endometrial Stromal Cells

A. Germeyer¹, A. Sharkey², K. Heim¹, R. Sherwin², M. Prasadajudic¹, L. Gardner², A. Moffett², M. von Wolff¹, T. Strowitzki¹

¹Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, UFK Heidelberg; ²Department of Pathology, University of Cambridge, United Kingdom

Introduction While the distribution of uterine immune cells within endometrium has been well described, little is known about their impact on other cells within the endometrial tissue. We previously reported a substantial effect of uterine leucocytes on non-dezidualized stromal cells, leading to homing of uterine natural killer cells (uNK) into the endometrium and therefore contributing to the increase in uNK numbers during the secretory phase endometrium. Herein we plan to examine the effect of uterine immune cells on the effect of dezidualization of endometrial stromal cells. Furthermore the impact of uterine immune cells on the gene ex-

pression signal of dezidualized stromal cells will be assessed.

Methods After informed consent (under the ethical committee of the University of Heidelberg) endometrial biopsies (n = 8) were taken from healthy women with regular menstrual cycles during laparoscopy. Uterine immune cells were isolated from dezidual tissue donated by women who underwent legal determination of pregnancy out of personal reasons. After isolation of endometrial stromal cells, stromal cells were dezidualized in-vitro and the effect of uterine immune cells on classical dezidualization markers was assessed. To further understand their role in implantation a global cDNA microarray was performed on dezidualized stromal cells incubated with uterine leucocyte conditioned media and results were confirmed with specific Tagman primers using Realtime PCR.

Results The anticipated effect of uterine immune cells on stromal cell dezidualization could not be shown. Nevertheless a profound paracrine effect was noted in dezidualized stromal cells treated with uterine leucocyte conditioned medium, leading to the up-regulation of many chemokines and other genes, many of which are also found to be stimulated by trophoblast conditioned media, including IL-8, CXCL1, CCL2.

Conclusion Our findings suggest that uterine leucocytes have a local paracrine effect on stromal cells mainly influencing the local chemokine/cytokine production, leading to homing of immune cells as well as trophoblast. We therefore suggest a supporting effect of uterine immune cells in the process of trophoblast implantation. A prior assumed effect on stromal cell dezidualization could not be confirmed.

P 24

Expression von Vascular-Endothelial-Growth-Factor und seinem Korezeptor Neuropilin-1 an der feto-maternalen Schnittstelle

A. C. Porn, D. M. Baston-Büst, A. Schanz, J. S. Krüssel, W. Janni, A. P. Hess
Frauenklinik, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf; UniKid, Düsseldorf

Fragestellung Angiogenese stellt eine der Grundvoraussetzungen für eine erfolgreiche Implantation des Konzeptus dar. Störungen dieses Prozesses können Fehlgeburten, aber auch schwangerschaftsassozierte Erkrankungen, wie z. B. Präeklampsie, zur Folge haben. Dem „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) wird eine Schlüsselfunktion bei der Angiogenese im Rahmen der zyklus-spezifischen Umbauprozesse im Endometrium sowie bei der Implantation zugeschrieben. VEGF vermittelt seine Wirkung über die etablierten Rezeptoren VEGFR1 und VEGFR2, beides Mitglieder der Tyrosin-Kinase-Familie. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein weiterer Rezeptor, das Neuropilin-1 (NRP-1) durch Steigerung der Bindung von VEGF165 an VEGFR2 ebenfalls eine Rolle im Rahmen der Signalprozes-

se der Angiogenese im Endometrium spielt. Die letztlich beschriebene Expression von NRP-1 im humanen Endometrium während des menstruellen Zyklus führt zu der Hypothese, dass NRP-1 auch bei der Regulation der dezidualen Angiogenese im Rahmen der Implantation eine wichtige Rolle spielt [1].

Methodik Untersuchung von NRP-1-Proteinexpression und Lokalisation in humaner Dezidua aller 3 Schwangerschaftstrimester mittels immunhistochemischer Analyse. RT-PCR von murinen Präimplantationsembryonen auf die mRNA-Expression von VEGF.

Ergebnisse Es konnte eine NRP-1-Expression in der Dezidua und den Villi aller Proben gezeigt werden, wobei die stärkste Expression in den Proben des ersten Trimesters und hier in dezidualen Gefäßen, im Stroma und in den Drüsen sowie im invadierenden Zytotrophoblasten nachgewiesen werden konnte. Im 2. Trimenon zeigte sich in der Dezidua eine reduzierte, im Zytotrophoblasten noch starke NRP-1-Expression, gefolgt von einer schwachen dezidualen und kaum darstellbaren NRP-1-Expression im Zytotrophoblasten des 3. Trimesters. Des Weiteren wurde mittels RT-PCR die mRNA-Expression von VEGF in murinen Präimplantationsembryonen untersucht. Von den untersuchten 77 Blastozysten zeigten 67 eine VEGF-mRNA-Expression (87,01 %).

Schlussfolgerung Dies ist die erste Studie über die NRP-1-Expression in der humanen Dezidua und Trophoblasten, die die Wichtigkeit des VEGF-Korezeptors NRP-1 neben den etablierten VEGF-Rezeptoren im Rahmen der Implantation aufzeigt. Die beschriebenen Ergebnisse unterstützen die These, dass die Haupt-Umbauprozesse im Sinne einer Gefäßneubildung und -einsprossung in den ersten Schwangerschaftswochen stattfinden. Darüber hinaus zeigt die embryonale VEGF-Expression, hier aus ethischen Gründen am Mausmodell untersucht, dass ein fein synchronisierter Dialog von Ligand und Rezeptor an der feto-maternalen Schnittstelle notwendig ist, um die Implantation sicher durchzuführen. Durch die Bereitstellung des alternativen VEGF-Korezeptors wird dieser durch VEGFR2-vermittelte Vorgänge verstärkt [1].

Literatur:

1. Hess AP, Schanz A, Baston-Buest DM, Hirchenhain J, Stoff-Khalili MA, Bielfeld P, Krüssel JS. Expression of the vascular endothelial growth factor receptor neuropilin-1 in the human endometrium. J Reprod Immunol 2009; 79: 129–36.

P 25

Nabelschnur-Endothelzellen von männlichen Neugeborenen produzieren signifikant mehr löslichen VEGF-Rezeptor-1 und Angiopoietin-1 als diejenigen von weiblichen Neugeborenen

J. Neulen, K. Motejlek
Gynäkologische Endokrinologie, Universitätsklinikum Aachen

Fragestellung In der Angiogenese spielen der „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) und sein löslicher Rezeptor 1

(sVEGFR-1) eine besonders wichtige Rolle. Während VEGF das Auswachsen von Blutgefäßen fördert, wirkt sVEGFR-1 als VEGF-Antagonist dem entgegen. Ein weiteres proangiogen wirksames Protein ist die Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9), die an der Umgestaltung der extrazellulären Matrix mitwirkt und über den „inhibitor of metalloproteinase“1 (TIMP-1) reguliert wird. Auch Angiotensin II (Ang-II), das für die Ausdifferenzierung und Stabilisierung bereits vorhandener Gefäße verantwortlich ist, unterstützt die Blutgefäßausbildung. Da Endothelzellen in der Angiogenese eine Schlüsselposition einnehmen, war es das Ziel dieser Arbeit, festzustellen, ob geschlechtsabhängige Unterschiede in der endothelialen Produktion der genannten Faktoren vorhanden sind.

Material und Methoden Endothelzellen wurden aus der Nabelschnurvene (HUVEC) von 6 männlichen und 6 weiblichen Neugeborenen isoliert und anschließend in einer Konzentration von 100.000 Zellen/Well in einer 24-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Nach einem Mediumwechsel am nächsten Tag wurden VEGF, sVEGFR-1, TIMP-1, MMP-9 und Ang-II nach weiteren 4 Tagen Kultivierung über ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“) im Zellkulturüberstand quantifiziert und die Werte der männlichen und weiblichen Neugeborenen miteinander verglichen.

Ergebnis Auffallend bei den Untersuchungen war der hohe Gehalt an TIMP-1 von durchschnittlich 13.961 pg/ml im Kulturüberstand, bei dem allerdings kaum ein Unterschied zwischen den HUVEC männlicher und denjenigen weiblicher Neugeborener zu sehen war. Auch bei den, im Vergleich zu TIMP-1, eher geringen durchschnittlichen Konzentrationen an VEGF (372 pg/ml) und MMP-9 (284 pg/ml) im Zellkulturüberstand war kein auffälliger Unterschied zwischen den beiden Endothelzellgruppen festzustellen. Im Gegensatz zu diesen 3 Faktoren sezernierten die von männlichen Neugeborenen isolierten Endothelzellen jedoch signifikante 57 % mehr sVEGFR-1 (3169 pg/ml vs. 2023 pg/ml) und sogar signifikante 94 % mehr Ang-II (1037 pg/ml vs. 534 pg/ml) in das umgebende Kulturmedium als die HUVEC der weiblichen Neugeborenen. Bei einem Vergleich bezüglich Größe, Gewicht, pH-Wert des Blutes und Gestationsalter sowie der Anzahl der mütterlichen Geburten waren keine bedeutenden Unterschiede zwischen den männlichen und weiblichen Neugeborenen zu finden.

Schlussfolgerung Endothelzellen aus der Nabelschnurvene männlicher Neugeborener produzieren signifikant mehr sVEGFR-1 und Ang-II als diejenigen weiblicher Neugeborener. Dies könnte ein Hinweis sein, dass bei männlichen Feten möglicherweise stabilere, aber zahlenmäßig etwas weniger venöse Kapillaren in der Plazenta ausgebildet sind als bei weiblichen Feten. Die Folge wäre eine etwas schlechtere Sauerstoffversorgung der männlichen Feten während der Schwangerschaft.

Diese Arbeit wurde vom DFG NE 388/6-1 unterstützt.

P 26

Syndecan-3 Polymorphismen bei Adipositas und weiblicher Hyperandrogenämie

A. Schüring¹, F. Lutz¹, F. Tüttelmann², J. Gromoll¹, L. Kiesel¹, M. Götte¹

¹Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Münster; ²Institut für Humanogenetik, Universitätsklinikum Münster; ³Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster

Hintergrund Syndecan-3 (SDC3), einem Heparinsulfat-Proteoglykan mit zentralen Funktionen bei der Organisation der Zell-Zell-Adhäsion, wird neuerdings eine Rolle auch bei der Energie-Homöostase zugeschrieben. Unter fettreicher Kost sind SDC3-Null-Mäuse resistent gegenüber einer Gewichtszunahme und weisen eine bessere Glukosetoleranz auf als Wild-Typ-Mäuse. Eine klinische Studie zeigte eine Korrelation von Polymorphismen des SDC3 mit Adipositas in einer koreanischen Population. Da Adipositas bei Frauen mit Hyperandrogenämie und Infertilität einhergehen kann, untersuchten wir die Rolle von SDC3-Polymorphismen in weiblichen Individuen, die sich einer standardisierten Diagnostik vor Kinderwunschbehandlung unterzogen.

Fragestellung Korrelieren SDC3-Polymorphismen mit Übergewicht und endokrinen Parametern weiblicher Hyperandrogenämie in einem europäischen Kollektiv?

Patienten und Methode Endokrine Parameter und BMI von 249 Frauen wurden untersucht. Genotypisierung der 3 Polymorphismen V208I, D245N und T329I wurde mit TaqMan-Technologie unter Verwendung von DNA aus Lymphozyten und allelischer Diskriminierungs-PCR durchgeführt. Chi²-Test, Student's-t-test und One-way-ANOVA wurden als statistische Tests verwendet.

Ergebnisse Eine seltene Genotyp- und Allel-Variation von T329I war mit Adipositas korreliert ($p = 0,028$). Genotyp und Allel von V208I korrelierten mit LH ($p = 0,007$ und $p = 0,001$), LH/FSH ($p = 0,002$ und $p < 0,005$), 17-OH-Progesteron ($p = 0,007$ und $p = 0,001$), Androstendion ($p = 0,046$ und $p = 0,013$) und SHBG ($p = 0,021$).

Schlussfolgerung Deutliche ethnische Unterschiede der SDC3-Polymorphismus-Verteilung in unserer europäischen Population könnten zu Korrelationen beitragen, die weniger ausgeprägt sind als im koreanischen Kollektiv. Während seltene Variationen von T329I mit Adipositas korrelierten, war V208I mit endokrinen Parametern assoziiert, die mit weiblicher Hyperandrogenämie in Verbindung stehen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass SDC3-Polymorphismen zu der Verbindung zwischen Übergewicht und weiblicher Hyperandrogenämie beitragen könnten. Sie schlagen außerdem eine neue potenzielle Rolle für SDC3 als Modulator der gonadalen Steroidfunktion vor.

P 27

Äquivalenz von HP-hMG versus Follitropin alpha zur ovariellen Stimulation im GnRH Antagonisten Protokoll

T. Strowitzki¹, G. Wilke², S. Dieterle³, K. J. Thong⁴, W. Ledger⁵, A. Rutherford⁶

¹Abt. Gynäkologische Endokrinologie und Fertilitätsstörungen, UKF Heidelberg; ²Zentrum für Reproduktionsmedizin und Humangenetik, Hildesheim; ³Gemeinschaftspraxis, Dortmund; ⁴Royal Infirmary of Edinburgh, United Kingdom; ⁵Academic Unit of Reproductive & Developmental Medicine, Sheffield, United Kingdom; ⁶The Leeds Reproductive Medicine Unit, Leeds, United Kingdom

Ziel Vergleich der Effizienz und Sicherheit von HP-hMG (Menopur; Ferring Pharmaceuticals) vs. rekombinantem FSH (Follitropin alpha, Gonal-F; Serono) im Rahmen einer IVF-Stimulationsbehandlung unter GnRH-Antagonisten-Protokoll.

Design Prospektiv randomisiert, open label, Parallelgruppen, vergleichende Pilotstudie.

Material und Methoden Die Studie schloss 76 Patientinnen (≥ 20 –35 Jahre; BMI > 18 –32 kg/m²) ein, die ≤ 2 vorherige IVF-Zyklen hatten. Die Partner hatten ein normales Spermogramm. Die Patientinnen erhielten eine fixe Tagesdosis (150 U) von HP-hMG ($n = 37$) oder Follitropin alpha ($n = 39$), ab Tag 2–3 des Zyklus für maximal 13 Tage. Die Dosis konnte angepasst werden. Der GnRH-Antagonist (Cetrorelix; Serono; 0,25 mg/d) wurde vom 5. Tag der Stimulation bis zur Ovulationsinduktion gegeben (hCG; 250 µg). Das primäre Ziel der Studie war die laufende Schwangerschaft, das sekundäre Ziel schloss die klinische SS-Rate, die Lebendgeburt rate, die Implantationsrate und die Nebenwirkungen (AEs) ein.

Ergebnisse 31 Patientinnen erhielten HP-hMG und 34 Follitropin alpha, („per-protocol population“ [PPP]); von diesen Pat. erreichten 83,9 % ($n = 26$) und 97,1 % ($n = 33$) die hCG-Kriterien, wobei 74,2 % ($n = 23$) und 82,4 % ($n = 28$) der Pat. einen Embryotransfer erhielten. Ein positiver beta-hCG-Test 11–14 Tage nach ET fand sich bei 51,6 % ($n = 16$) bzw. 47,1 % ($n = 16$) Patientinnen (HP-hMG vs. Follitropin alpha). In der 9. SSW wurde die fortbestehende SS bei Patientinnen mit initial positivem SS-Test mit 35,5 % ($n = 11$) vs. 38,2 % ($n = 13$); $-0,028$ [95 %-CI: $-0,262, 0,207$]; HP-hMG vs. Follitropin alpha) ermittelt. Die Lebendgeburt rate aller behandelten Pat. betrug 35,1 % ($n = 13$) vs. 30,7 % ($n = 12$), HP-hMG vs. Follitropin alpha. Unter HP-hMG wurden weniger Nebenwirkungen (AEs) vs. Follitropin alpha (69 vs. 123) beobachtet; 59,5 % und 69,2 % der Patientinnen hatten keine Nebenwirkungen. Eine Überstimulation (OHSS) wurde bei 3 HP-hMG (1 mild, 2 moderat) vs. 4 (1 mild, 3 moderate bei Follitropin-alpha-Patientinnen) diagnostiziert.

Schlussfolgerung Die Studie weist auf eine Äquivalenz zwischen HP-hMG und Follitropin alpha im GnRH-Antagonisten-Protokoll in Bezug auf die laufende SS-Rate hin.

P 28

„Notfall-ICSI“ als fertilitätserhaltende Maßnahme bei einem progressiv wachsenden Burkitt-Lymphom beider Ovarien

A. Schüring^{1*}, N. Schulte^{1*}, W. E. Berde², V. Nordhoff², S. Kliesch³, L. Kiesel³, S. Koschmieder²
¹Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Münster; ²Universitätsklinikum Münster, Medizinische Klinik A (Hämatologie und Onkologie), Münster; ³Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster

Hintergrund Ein ovarielles Lymphom ist eine seltene Manifestation einer systemischen Erkrankung, die eine effektive onkologische Therapie von hoher Gonadotoxizität erforderlich macht.

Fallbericht Wir berichten von einer jungen Frau mit einem Burkitt's-Non-Hodgkin-Lymphom, das anlässlich einer laparoskopischen einseitigen Ovariectomie bei unklarem Adnexitumor diagnostiziert wurde. Die Patientin war verheiratet und hatte Kinderwunsch. Mit dem Ziel einer ICSI mit Kryokonservierung von Pronukleostadien wurde eine Gonadotropinstimulation des verbliebenen Ovars vor Chemotherapie durchgeführt. Im Verlauf der hormonellen Stimulation wurden eine „low response“ und ein progressives Wachstum des Ovars beobachtet. Unter dem Verdacht einer malignen Infiltration des verbliebenen Ovars als Ursache für die „low response“ wurde die während der Follikelpunktion asservierte Follikelflüssigkeit durchflusszytometrisch analysiert. In der Follikelflüssigkeit wurden lymphoblastische Zellen identifiziert, die auf eine progressive Infiltration des verbliebenen Ovars durch das Lymphom weisen.

Schlussfolgerung Nach unserer Kenntnis ist dies der erste Bericht über ein Burkitt-Lymphom beider Ovarien im Zusammenhang mit fertilitätserhaltenden Maßnahmen. Wegen seines dynamischen Wachstums und seiner kritischen Lokalisation, die die follikuläre Reserve bereits vor onkologischer Therapie gefährdet, stellt die Erkrankung nicht nur einen onkologischen Notfall dar, sondern verlangt auch unverzügliche Maßnahmen, wenn der Erhalt der Fertilität indiziert ist.

* A. Schüring und N. Schulte sind gleichberechtigte Autoren dieser Studie.

P 29

MedITEX-FemaleAndroAID: Software zur elektronischen Erfassung von Patientinnen mit Funktioneller Androgenisierung (FA)

F. Geithövel¹, M. Schindler²

¹Centrum für Gyn. Endokrinologie & Reproduktionsmedizin Freiburg (CERF), Freiburg i. Br.; ²CRITEX GmbH, Regensburg

Fragestellung Die weibliche FA von der Pubertät bis zur Postmenopause stellt ein Kaleidoskop unterschiedlichster Dysfunktionen und Erkrankungen dar. Umfangreiche

Studien unserer Arbeitsgruppe haben einen Paradigmenwechsel in der inhaltlichen Auffassung dieser Beschwerdebilder eingeleitet: eine deutlich veränderte Nomenklatur und eine neuartige Klassifikation wurden eingeführt. Nachdem in 2007 aufbauend auf früheren Studien eine umfangreiche kritische Bewertung des Rotterdam Konsensus zum Polyzystischen Ovarsyndrom [1] vorgenommen worden ist [2], ist in 2008 eine Publikation [3] mit der klinischen Umsetzung dieser neuartigen Systematik erfolgt. Deren wissenschaftliche Basis ist dann in 2009 [4] detailliert erörtert worden. In dieser Publikation wird zusätzlich als Anhang ein von uns entwickelter Anamnese-, Befund- und Diagnosebogen („FuncAndroAID“) zur FA veröffentlicht, in dem der wissenschaftlich belegte Algorithmus [4] zur klinischen Anwendung kommt. Die Logistik dieses Bogens soll nun in eine elektronische Software umgesetzt werden.

Material und Methoden FuncAndroAID (abgefasst in englischer Sprache) basiert auf den Ergebnissen unserer aktuellen Studie [4], in der eine neu entwickelte Gruppeneinteilung der FA mit zahlreichen Standards, die es zur Erfassung der breiten Spektrums der FA weltweit gibt, verknüpft worden ist. Nach Erfassung der Stammdaten und systematisierter Anamnese- und Befunderhebung erfolgt die Klassifikation auf der Basis eines spezifischen Gruppenclusters unter Zuhilfenahme exakt definierter Cluster-Variablen. Die weitere individuelle Charakterisierung der Patientin kommt durch den Einsatz ebenso exakt definierter fakultativer Variablen zustande. Das Worddokument FuncAndroAID ist nun in ein softwarebasiertes Diagnosesystem (MedITEX-FemaleAndroAID) transformiert worden. Dieses System besteht aus 2 Objekttypen, die als eigenständige Programmobjekte im modularen Anwendungsrahmen MedITEX umgesetzt werden. Ein übergeordnetes Klassifikationsobjekt (Gesamtheit der Gruppencluster) verwaltet in einer hierarchischen Struktur einzelne Klassifikationsobjekte (Variablen: z. B.: anthropometrischer Befund, Ovarscore, Labordaten) und führt die standardisierten Ergebnisse zur Gruppeneinteilung zusammen. Damit wird auch ein Großteil der abschließenden Diagnosestellung fertig gestellt. Neben dem automatisierten Processing steht genügend Raum für freie individualisierte Eingaben zur Verfügung. Am Ende des Vorgangs entsteht ein halb-automatisierter Arztbericht. Nach der elektronischen Fertigstellung dieser Software erfolgt die Prüfung der Eingabesicherheit.

Ergebnis Die Dateneingabe pro Patientin wird problemlos entsprechend der vorgegebenen Systematik von der Software erarbeitet. Das exakt definierte Gruppencluster einer jeden Patientin wird übereinstimmend mit dem klinischen Bild automatisch erstellt, daraus ergibt sich zusammen mit der individuellen Charakterisierung der Patientin die endgültige Diagnose. Mit der freien Verfügung individueller Eingaben kann halbautomatisiert der Arztbericht abgefasst werden. Die Zuverlässigkeit des elektronischen Vorgangs wird mittels der Eingabe einer große-

ren Anzahl an Patientinnen bestätigt und kann auch als Plausibilitätstest des zugrundeliegenden Klassifizierungssystems gewertet werden.

Schlussfolgerung MedITEX-FemaleAndroAID beruht auf einer umfangreichen Studie zur vollständig definierten Systematik der FA. Mit diesem modularen und flexiblen Softwareprogramm steht erstmals ein elektronisches Hilfsmittel zur standardisierten, halbautomatischen Erfassung des individuellen Beschwerdebildes von Patientinnen mit FA zur Verfügung. Neben den klinischen Vorteilen eines standardisierten Eingabe- und Bewertungssystems wird diese algorithmische Erfassungslogistik auch die wissenschaftliche Methodik von zukünftigen Studien zur Thematik FA verbessern können. Die Freigabe ist für Ende 2009 geplant. MedITEX-FemaleAndroAID untersteht einem fortlaufenden Entwicklungsprozess: so ist z. B. die Entwicklung einer automatischen Erstellung von Therapieoptionen in Bearbeitung.

Literatur:

1. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Hum Reprod 2004; 19: 41–7.
2. Geithövel F, Rabe T. The ESHRE/ASRM consensus on polycystic ovary syndrome (PCOS) – an extended critical analysis. Reproductive BioMedicine Online 2007; 14: 522–35.
3. Geithövel F, Wacker A, Wetzka B. Funktionelle Androgenisierung des peri- und postpuberalen Mädchens sowie der Frau. J Reproduktionsmed Endokrinol 2008; 5: 21–38.
4. Geithövel, F, Wacker A, Brabant G, Botsch F, Maechtel A, Wetzka B, Ochsner A. Accepted, J Reproduktionsmed Endokrinol 2009.

■ Psychologie in der Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

P 35

Entwicklung von Lebensqualität, Lebenszufriedenheit und Partnerschaftsqualität bei Männern mit unerfülltem Kinderwunsch im Verlauf von 5 Jahren

S. Schanz, T. Reime, C. Bräunlich, G. Fierlbeck
 Andrologie, Universitäts-Hautklinik Tübingen

Einleitung Zur Veränderung von Lebensqualität, Lebenszufriedenheit und Partnerschaftsqualität von Männern mit unerfülltem Kinderwunsch im zeitlichen Verlauf liegen bislang nur wenige Untersuchungen vor. Die vorgestellte Studie hatte das Ziel, die Entwicklung dieser Parameter im zeitlichen Verlauf zu untersuchen und Abhängigkeiten von der Erfüllung des Kinderwunsches und durchgeführten reproduktionsmedizinischen Maßnahmen zu identifizieren.

Patienten und Methoden 275 Männer wurden mit einem neu entwickelten Fragebogen zur Erfassung der Lebensqualität bei unerfülltem Kinderwunsch (TLMK) und den bereits validierten Instrumenten „Fragebogen zur Lebenszufriedenheit (FLZ)“ und

„Partnerschaftsfragebogen (PFB)“ befragt. An einer erneuten Befragung nach 5 Jahren nahmen 101 Männer teil. Parallel wurden 272 Frauen mit unerfülltem Kinderwunsch befragt, von denen 113 Frauen an der zweiten Befragung teilnahmen.

Ergebnisse Für die Gesamtpopulation zeigten sich im Verlauf von 5 Jahren keine signifikanten Veränderungen für Lebensqualität, Lebenszufriedenheit und Partnerschaftsqualität. Diese fanden sich jedoch in Subgruppenanalysen. Bei Patienten mit nach 5 Jahren erfülltem Kinderwunsch zeigte sich eine Abnahme der Zufriedenheit mit den Bereichen „Sexualität“, „Freizeit“ und „Finanzen“ (FLZ) im Gegensatz zu Patienten mit weiterhin unerfülltem Kinderwunsch. Bezogen auf die Frage nach dem Erfolg reproduktionsmedizinischer Maßnahmen fand sich neben dem genannten eine größere Zufriedenheit der Patienten mit Zustand nach erfolgreicher medizinischer Behandlung mit der spezifischen TLMK-Skala „Kinderwunsch“, allerdings auch eine geringere Zufriedenheit mit der Situation der „Ehe“ (FLZ). Vergleicht man die Zufriedenheiten von Männern und Frauen, zeigten sich Männer mit erfülltem Kinderwunsch unzufriedener mit ihrer „Freizeit“ (FLZ), während bei Frauen die Erfüllung des Kinderwunsches zu einer Abnahme der Zufriedenheit mit der Situation der „Arbeit“ (FLZ) führte.

Schlussfolgerung Bei insgesamt großer Zufriedenheit auch im zeitlichen Verlauf nach 5 Jahren lassen sich dennoch einige markante Unterschiede in Abhängigkeit von der Erfüllung des Kinderwunsches erkennen. Interessanterweise liegen die Zufriedenheiten bei Teilnehmern mit erfülltem für mehrere Bereiche niedriger als bei Teilnehmern mit auch nach 5 Jahren unerfülltem Kinderwunsch.

P 36

Sexualstörungen bei unerfülltem Kinderwunsch

T. Wischmann

Institut für medizinische Psychologie, Universitätsklinikum Heidelberg

Fragestellung Die Prävalenz sexueller Störungen bei ungewollter Kinderlosigkeit wird mit 10–60 % angegeben, was an verschiedenen Studiendesigns und unterschiedlichen Erhebungsinstrumenten liegen dürfte, worauf in diesem Überblick eingegangen wird.

Methodik Systematische Literaturrecherche in den gängigen Literaturdatenbanken mit den Schlüsselwörtern „infertil“ und „sexual dysfunction“ bzw. „sexual satisfaction“. Es wurden nur die Ergebnisse sorgfältig konzipierter (kontrollierter bzw. replizierter) Studien berücksichtigt.

Ergebnisse Die Prävalenz sexueller Funktionsstörungen bei unerfülltem Kinderwunsch beträgt konservativ geschätzt etwa 5 %. Bei Paaren mit idiopathischer Infertilität läge damit bei einem Drittel bis der Hälfte dieser Paare eine Fertilitätsstörung vor, die ursächlich vorwiegend auf sexuellen Funk-

tionsstörungen beruht. Im Durchschnitt geben ca. 50 % der Befragten (deutlich mehr Frauen als Männer) eine Veränderung der Sexualität als Folge des unerfüllten Kinderwunsches an. Wenn auch nicht unbedingt von einer hohen Prävalenz klinisch relevanter sexueller Störungen im Sinne der ICD-10 ausgegangen werden kann, weist die Mehrzahl der Studien auf einen deutlich negativen Einfluss des unerfüllten Kinderwunsches auf die Sexualität der Paare hin. So gaben bspw. in einer Studie die untersuchten infertilen 100 Frauen mehr als doppelt so häufig Störungen in der sexuellen Erregungsphase im Vergleich zu Frauen der Normalbevölkerung an, die Angaben in anderen Bereichen (wie Appetenz, Orgasmuserleben und Schmerzen beim Geschlechtsverkehr) waren hingegen unauffällig. Bei ihren Partnern traten leichte Formen von Erektionsstörungen häufiger auf im Vergleich zu Männern der Normalbevölkerung, bezüglich moderater bis schwerer Erektionsstörungen gab es diesen Unterschied hingegen nicht. In einer Studie an 121 Paaren zu Beginn einer Kinderwunschbehandlung wurden bei jedem 5. Mann Erektionsstörungen festgestellt, mehr als doppelt so häufig wie in der Allgemeinbevölkerung. Die Häufigkeit der Ejaculatio praecox liegt einigen Studien zufolge bei infertilen Männern sogar 2–3-mal höher als in der Allgemeinbevölkerung. Beim Vorliegen eines andrologischen Faktors als allein ursächlich für die Infertilität berichteten Männer deutliche Einschränkungen in ihrer persönlichen und sexuellen Lebensqualität, auch unabhängig von eventuell bereits vorhandenen Kindern. Untersuchungen an Männern mit unerfülltem Kinderwunsch erbrachten zudem das – wenig überraschende – Resultat, dass ihre sexuelle Zufriedenheit in erster Linie mit der Koitushäufigkeit zusammenhing. Einer Übersichtsarbeit zufolge können die meisten Ergebnisse der vorliegenden Studien zu Sexualstörungen bei Paaren mit unerfülltem Kinderwunsch aufgrund der hohen Nonresponderraten (oft ~50 %) nicht generalisiert werden. Alle Studien weisen übereinstimmend darauf hin, dass es in der Lebensqualität und in der Lebenssituation zwischen kinderlos gebliebenen Paaren und Eltern (bzw. gewollt kinderlosen Paaren) nur geringe Unterschiede gibt, einige Studien nennen aber starke Einschränkungen im mittel- und langfristigen Verlauf des Sexuallebens der Paare. Es ist allerdings unklar, ob diese Einschränkungen in der Sexualität auf die Situation der dauerhaft ungewollten Kinderlosigkeit zurückzuführen sind oder auf die zu diesem Zeitpunkt lange Partnerschaftsdauer. Zur Generalisierbarkeit aller Ergebnisse zu ungewollt kinderlos gebliebenen Paaren ist auch hier einschränkend auf die Rate der Nonresponder von durchschnittlich einem Drittel hinzuweisen. Es gibt Hinweise darauf, dass sich bei den Nonrespondern die Lebenssituation etwas ungünstiger gestaltet, was wahrscheinlich auch die Sexualität dieser Paare betrifft.

Schlussfolgerung Sexuelle Störungen als Ursache ungewollter Kinderlosigkeit sind eher selten. Als Folge der Diagnosestellung und insbesondere der medizinischen Therapie sind (vorübergehende) sexuelle Störungen

bei Paaren mit Fertilitätsstörungen häufig anzutreffen. Die Störungen betreffen bei den Frauen meist die Erregungsphase, bei Männern sind Erregungs- und Ejakulationsstörungen zu beobachten. Klinisch relevant im Sinne einer Behandlungsbedürftigkeit sind diese Störungen meist nicht. Ob bei langfristiger ungewollter Kinderlosigkeit die Sexualität der Paare sich eher als beeinträchtigt darstellt oder ob es sich hierbei wahrscheinlicher um ein Artefakt handelt, muss noch geklärt werden. Aktuelle systematische Studien zu Sexualstörungen bei ungewollt kinderlosen Paaren im deutschsprachigen Raum stehen weitestgehend noch aus.

Literatur:

Wischmann T. Sexualstörungen bei Paaren mit unerfülltem Kinderwunsch. *Sexuologie* 2009 (im Druck).

■ Reproduktionsbiologie

P 37

Das CAG-Repeat des humanen Androgenrezeptors – Molekularer Marker für männliche Infertilität?

F. Fietz¹, J. Geyer², J. Gromoll³, S. Kliesch³, M. Bergmann¹

¹Institut für Veterinär Anatomie, Justus-Liebig-Universität, Giessen; ²Institut für Veterinärpharmakologie, Justus-Liebig-Universität, Giessen; ³Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinik, Münster

Einleitung Bei dem humanen Androgenrezeptor (AR) handelt es sich um einen ligan- denaktivierten Transkriptionsfaktor, der im Hoden von Sertoli-, Leydig- und peritubulären Myoidzellen exprimiert wird. Die Transaktivierungsdomäne des AR auf Exon 1 enthält eine polymorphe CAG-Sequenz, die aus 9–36 Repeats besteht. Eine Verlängerung dieses Trinukleotidrepeats soll mit einer verminderten Transkriptionsaktivität assoziiert sein, die CAG-Bestimmung soll deswegen einen Hinweis auf die Fertilität des Mannes geben können. Bei vielen sub- bis infertilen Männern kann in der Biopsie eine bunte Atrophie diagnostiziert werden, Tubuli seminiferi mit normaler und gestörter Spermato-genese liegen dabei dicht aneinander. Unsere Untersuchungen sollen klären, ob es einen Zusammenhang zwischen der CAG-Repeatlänge und der männlichen Fertilität [1] gibt und ob die bunte Atrophie mit einem Mosaik des AR einhergehen kann.

Methoden Nach der histologischen Untersuchung der Biopsien wurde von den Parafinschnitten DNA (= gesamte testikuläre Zellpopulation) und mRNA (= AR exprimierende Zellen) gewonnen. Um die Expression des AR in den verschiedenen Zellpopulationen des Hodens untersuchen zu können, wurden mittels Laser-assistierter Mikrodisektion (LAM) Tubuli seminiferi und interstitielles Gewebe getrennt voneinander gepickt und daraus mRNA gewonnen. Nach einer (RT-)PCR zur Amplifikation des CAG-Repeats wurde das PCR-Produkt in ein p-GEMT-Vektorsystem kloniert, in *E. coli*

JM109 exprimiert und sequenziert. Die PCR-Produkte wurden außerdem mittels hochauflösender Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt, um das CAG-Repeat zu bestimmen. Das Repeat aus Blutlymphozyten-DNA wurde im Rahmen der Routineuntersuchung bestimmt.

Ergebnisse Die Untersuchung des CAG-Repeats aus Sertolizell-mRNA von 22 Patienten mit unterschiedlichem Spermatogenesezustand mittels PAGE ergab Repeatlängen von 15–33, die damit innerhalb der physiologischen Grenzen liegen. Von diesen Patienten lag in 16 Fällen der CAG-Wert aus dem Blut vor. Bei 14 dieser Patienten konnte ein Unterschied zwischen der Blut-DNA und der Sertolizell-mRNA ermittelt werden, in 57 % der Fälle hatten die Sertoli-Zellen das kürzere CAG-Repeat.

Bei 8 Patienten ergab die Klonierung des CAG-Repeats aus Sertoli-Zellen insgesamt 39 verschiedene Klone im Bereich von 19 bis 26 Repeats, die damit innerhalb der physiologischen Grenzen lagen. Die Klone der Sertoli-Zellpopulation einzelner Patienten wiesen zum Teil eine große Varianz auf und unterschieden sich ebenfalls von der Blut-DNA des jeweiligen Patienten. Eine Re-Klonierung führte wiederum zu unterschiedlichen CAG-Repeatlängen.

Bei einem Patienten konnte im Hodenhomogenat eine Differenz der CAG-Repeatlänge von 12 Repeats zwischen dem rechten (SCO, 24 Repeats) und dem linken Hoden (Hypospermatogenese, 12 Repeats) auf DNA-Ebene festgestellt werden. Die Untersuchung auf mRNA-Ebene des rechten bzw. linken Hodens führte zu einer Aufspaltung der Bande in der PAGE („Laddering“), d. h. dem Auftreten verschiedener CAG-Repeatlängen von 14–24 (rechter Hoden) bzw. 12–18 Repeats (linker Hoden). Die Untersuchung getrennt voneinander gepickten Sertoli- bzw. Leydigzellpopulationen zeigte kein Laddering und somit eine konstante CAG-Repeatlänge des AR.

Schlussfolgerung Wir schließen aus den Untersuchungen, dass es ein Mosaik zwischen Blut und Hodengewebe und zwischen rechtem und linkem Hoden auf DNA- und mRNA-Ebene geben kann. Das Auftreten verschiedener CAG-Repeatlängen innerhalb einer Probe kann durch die Bildung von Sekundärstrukturen der DNA wie „hairpins“ oder „loops“ innerhalb der repetitiven Sequenz erklärt werden [2]. Diese Strukturen können von bakteriellen und menschlichen Polymerasen nicht immer korrekt abgelesen werden und führen zu Fehlern in der Replikation und/oder Transkription. Die Klonierung des PCR-Produkts zur sicheren Bestimmung des CAG-Repeats ist daher ungeeignet. Bisher konnte keine Korrelation zwischen der Repeatlänge und dem Spermatogenesezustand festgestellt werden. Ob die CAG-Repeatlänge tatsächlich mit einer unterschiedlichen Testosteronsensitivität des AR korreliert, wird in einem Zellkulturmodell untersucht. Gefördert durch DFG KFO 181/1.

Literatur:

1. Davis-Dao CA. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 4319–26.
2. Bower RP. *J Mol Biol* 1996; 264: 82–96.

P 38

Membrantransporter für sulfatierte Steroidhormone und die Steroid-sulfatase – Expression und zelluläre Lokalisation im humanen Hoden

B. Wapellhorst¹, O. Raabe¹, J. Geyer², B. Ugele², M. Bergmann¹

¹Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, Justus-Liebig-Universität, Giessen; ²Institut für Veterinär-Pharmakologie und -Toxikologie, Justus-Liebig-Universität, Giessen; ³Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Fragestellung Der humane „sodium-dependent organic anion transporter“ (SOAT) wurde erstmals 2007 kloniert und beschrieben. Aufgrund seiner sehr ähnlichen Genstruktur mit den übrigen Vertretern der „Solute Carrier Family 10“ (SLC10), einer Familie von natriumabhängigen Gallensäuretransportern, wurde der SOAT unter der Bezeichnung SLC10A6 in diese Familie eingeordnet, ist funktionell aber ein hochspezifischer Transporter für sulfatierte Steroidhormone. Die Substrate des humanen SOAT sind Taurolithocholinsäure-3-Sulfat und sulfatierte Steroide wie Estronsulfat (E1S), Pregnenolonsulfat (PREGS) und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS). SOAT mRNA konnte in hohem Maße im menschlichen Hoden nachgewiesen werden [Geyer et al. 2007].

Weitere Transporter für sulfatierte Steroidhormone sind die „Organic Anion Transporting Polypeptides“ (OATPs). Ratten-OATP6A1 konnte im Hoden in Leydig-Zellen, Spermatogonien und Sertoli-Zellen nachgewiesen werden, mit einer Transportaktivität für DHEAS. OATP1C1 wird im humanen Hoden in Leydig-Zellen exprimiert. Das „Organic Solute Carrier Protein“ OSCP1 wird stark im Hoden exprimiert, seine Funktion ist aber noch nicht genau geklärt.

Die Steroidsulfatase (StS) kann sulfatierte Steroidhormone desulfatieren, d. h. in ihre freie Form überführen und somit „reaktivieren“. Auf diesem Weg („sulfatase pathway“) können lokal aktive Steroidhormone bzw. Prekursoren gebildet werden. Unter den Substraten der StS befinden sich Cholesterinsulfat, DHEAS, E1S und PREGS. StS konnte bisher in vielen Organen des adulten Menschen nachgewiesen werden, darunter auch im Hoden.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Expression von StS sowie der Membrantransporter SOAT, OATP6A1, OATP1C1 und des OSCP1 im humanen Hoden mit intakter und gestörter Spermatogenese auf zellulärer Ebene nachzuweisen.

Diese Untersuchungen sollen klären, ob dem „Sulfatase Pathway“, bei Expression von StS und Membrantransporter in einen Zelltyp, für die Regulation der physiologischen und pathologischen Hodenfunktionen eine Bedeutung zukommt.

Methodik

1. Zelluläre Lokalisation der StS und Transporter mRNA im Hoden mittels In-situ-

Hybridisierung und RT-PCR nach Laser-assistierter Mikrodisektion (LACP) sowie Proteinnachweis durch Immunhistochemie und Western-Blot.

2. Quantitative Expression bei normaler und gestörter Spermatogenese mithilfe von Real-time-PCR nach LACP.

Ergebnis Nachweis von SOAT mRNA im humanen Hodenhomogenat mittels Real-time-PCR, mit einer 678-mal höheren Expression im Hoden als im ZNS, dem Gewebe mit der geringsten SOAT mRNA-Expression [Geyer et al. 2007].

- Nachweis von StS mRNA im humanen Hodenhomogenat nach RT-PCR.
- Nachweis von SOAT mRNA in den Spermatogonien und Spermatozyten bei Maus, Hund und Schwein mithilfe von In-situ-Hybridisierung.
- Nachweis von StS-Protein mittels Immunhistochemie in Leydig-Zellen und elongierenden Spermatozyten.

Schlussfolgerungen Die besonders hohe Expression des SOAT im Hoden sowie sein hochspezifischer Transport von sulfatierten Steroidhormonen macht diesen Membrantransporter zu einem aussichtsreichen Kandidaten für die Aufnahme von sulfatierten Steroidprekursoren in die Zelle. Durch die sich in der Immunhistochemie in Abhängigkeit vom verwendeten Detektionssystem zeigende unterschiedliche Anfärbung von Leydig-Zellen und/oder elongierenden Spermatozyten kann hier noch keine genaue zelluläre Lokalisation der StS genannt werden. Der Nachweis von StS mRNA mittels RT-PCR und qPCR im humanen Hodenhomogenat unterstützt die These der Beteiligung der StS an der Testosteronsynthese.

Weiterführende Literatur:

Geyer J, Döring B, Meerkamp K, Ugele B, Bakhiya N, Fernandes CF, Godoy JR, Glatt HR, Petzinger E. Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6). *J Biol Chem* 2007; 282: 19728–41.

P 39

In-vitro-System der androgen-abhängigen Genexpression des humanen Androgenrezeptors mit unterschiedlicher CAG-Repeatlänge

D. Lang¹, B. Döring², J. Geyer², S. Kranz², L. Konrad², M. Bergmann¹

¹Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, Justus-Liebig-Universität, Giessen; ²Institut für Veterinär-Pharmakologie und -Toxikologie, Justus-Liebig-Universität, Giessen; ³Medizinisches Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Giessen

Einleitung Androgene spielen beim Ablauf der Spermatogenese eine entscheidende Rolle. Sie wirken in ihren Zielzellen über eine Interaktion mit dem Androgenrezeptor (AR). Der AR zählt zu den intrazellulären Liganden-Bindungsproteinen und wird im Hoden in Sertoli-Zellen, peritubulären Zellen und Leydig-Zellen exprimiert. Das AR-Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und besitzt auf Exon 1 eine polymorphe Sequenz aus Nukleotiden (CAG). Dieses CAG-

Repeat kommt in einer Variation von 9–36 aufeinander folgenden CAGs in der normalen Population vor. Es gibt Hinweise, dass ein Zusammenhang zwischen der CAG-Repeatlänge und der Transkriptionsaktivität des AR besteht. Zur Bestimmung der Genexpression bedienen wir uns der Gene Rhox2 und Rhox5. Sie gehören zu einer Gruppe von Homeobox-Genen, die in reproduktiven Geweben exprimiert und testosteronabhängig hochreguliert werden.

Methodik Wir amplifizierten zunächst einen humanen AR (full-length mit 2751bp). Dieser besitzt 18 CAGs und wurde in 2 Expressionsvektoren kloniert. Durch Restriktion und Ligation wurde ein weiterer humaner AR mit einer CAG-Repeatlänge von 36 erstellt. Diesen klonierten wir dann in die 2 Expressionsvektoren. Um ein geeignetes In-vitro-Modell zu finden, testeten wir verschiedene Sertoli-Zelllinien. Anschließend transfizierten wir den AR-Klon mit 18 CAGs sowohl chemisch als auch mittels Elektroporation in die ausgewählten Zellen und selektionierten mit Antibiotika. Positiv selektionierte Zellen wurden mittels PCR auf das Vorhandensein des humanen AR getestet. Danach folgte ein ELISA, der die Funktionalität des AR belegt und abschließend ein Western-Blot zur Bestimmung der Molekularmasse. Der Nachweis der Expression der Rhox-Gene durch die transfizierten Zellen erfolgte durch RT-PCR.

Ergebnisse Die Ratten-Sertoli-Zelllinie 93RS2 exprimiert keinen AR. Es handelt sich um eine mit einem SV 40 Promotor immortalisierte Zelllinie. Wir generierten eine transient transfizierte Sertoli-Zelllinie mit einem funktionellen humanen AR von 110 kDa, mit einer CAG-Repeatlänge von 18 CAG, der die Gene Rhox2 und Rhox5 exprimiert. Die Funktionalität des AR wurde durch eine Downregulierung des testosteronabhängigen „transforming growth protein beta“ (TGF- β) nach Inkubation mit Testosteron gesichert.

Ausblick In dieser Studie ist geplant, die 93RS2-Zellen mit einem weiteren humanen AR (CAG-Repeatlänge 36) zu transfizieren. Die so entstandene zweite Zelllinie wird dann nach dem Beispiel der Zelllinie mit dem AR CAG 18 charakterisiert und auf Funktionalität des AR getestet. Ist das abgeschlossen, werden beide Zelllinien mit Testosteron inkubiert. Mittels quantitativer PCR sollen dann die Expressionsprofile von Rhox2 und Rhox5 verglichen werden.

Diese Studie wird gefördert durch die DFG KFO 181, BE 1016/7-1.

P 40

Zona pellucida retardance – Messung mittels automatisierter Polarisationsmikroskopie

*L. Eue, B. Wrobel, C. F. Stoll, R. Hannen
Gemeinschaftspraxis Dr. Hannen, Dr. Stoll, Kinderwunschenzentrum Berlin*

Die Oozytenqualität ist für den Erfolg einer reproduktionsmedizinischen Behandlung von

entscheidender Bedeutung. Zusätzlich zur morphologischen Evaluierung der Eizelle ist es möglich, mithilfe der Polarisationsmikroskopie beobachterunabhängig doppelt lichtbrechende Strukturen wie die Spindel oder den inneren Layer der Zona pellucida darzustellen und zu vermessen. Zwischen Januar und Juli 2009 wurden in unserem Zentrum insgesamt 875 MII Oozyten mithilfe des OCTAX ICSI Guard™ (OCTAX Microscience GmbH, Altdorf, Deutschland) im Rahmen einer retrospektiven Studie analysiert. Die teilnehmenden Patientinnen waren zwischen 20 und 38 Jahre alt. Alle Eizellen wurden mittels ICSI fertilisiert, wofür jeweils eine andrologische Indikation vorlag. Vor der ICSI wurde für jede Eizelle mittels ICSI-Guard der Zona-Retardance-Score (ZRS) ermittelt und die Eizellen entsprechend ihrer Qualität in 3 Gruppen unterteilt: PolarAIDE-Gruppe 1 (PA1) mit einem ZRS von 0 bis +5, Gruppe 2 (PA2) mit einem ZRS von -5 bis 0 und Gruppe 3 (PA3) mit einem ZRS kleiner -5. Die Software hinterlegt für diese Gruppen eine grüne (PA1), eine gelb/orange (PA2) oder eine rote (PA3) Farbe.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht: Wie hoch ist der Anteil qualitativ hochwertiger Oozyten (PA1)? Unterscheidet sich die Fertilisationsrate (FR) zwischen den Gruppen? Gibt es Unterschiede im Vorkernscore (Anteil der Top-Scores Z1 + Z2)? Gibt es Unterschiede hinsichtlich des Anteils von Top-Embryonen (A + B)? Welchen Einfluss haben verschiedene Stimulationsprotokolle auf die Retardance der Zona pellucida? Resultiert der Embryotransfer von mindestens einem Embryo der Gruppe PA1 in einer höheren Schwangerschaftsrate?

Es wurden insgesamt 85 Zyklen untersucht. Von 875 MII-Oozyten waren 155 (17,7 %) der Gruppe PA1, 393 (44,9 %) der Gruppe PA2 und 327 (37,4 %) der Gruppe PA3 zuzuordnen. Die FR unterschied sich kaum zwischen den Gruppen (PA1-111/155 = 71,6 %, PA2-279/393 = 70,9 % und PA3-227/327 = 69,4 %). Auch der Anteil von Top-Vorkernscores (Z1 + Z2) zeigte nur insignifikante Unterschiede. Insgesamt wurden 614 Oozyten im 2 Vorkernstadium ausgewertet (PA1-62/110 = 56,4 %, PA2-134/279 = 48,0 %, PA3-48,9 %). Der Anteil von Top-Embryonen mit A- und B-Qualität unterschied sich zwischen den Gruppen: Von den am Tag 2 transfizierten Embryonen führten 35,5 % der PA1-Gruppe zu Top-Embryonen, 23,9 % der PA2-Gruppe und 22,7 % der PA3-Gruppe. Beim Embryotransfer am Tag 3 wurden in 15 % der PA1-Gruppe, in 19,6 % der PA2-Gruppe und 7,9 % der PA3-Gruppe Top-Embryonen verwendet. Hinsichtlich des angewendeten Stimulationsprotokolls war ein leichter Vorteil zugunsten des kurzen Agonisten/hMG-Protokolls zu verzeichnen (51/266 = 19,2 % PA1) gegenüber dem kurzen Agonisten/rFSH-, und den Antagonistenprotokollen in Kombination mit hMG bzw. rFSH (21/117 = 17,9 % PA1; 46/309 = 14,9 % PA1 bzw. 39/291 = 13,4 % PA1).

26 der untersuchten 85 Zyklen endeten in einer Schwangerschaft (β hCG > 100 IU/l, 30,6 %). Zehn der 26 schwangeren Patient-

innen wurde mindestens ein Embryo der Gruppe PA1 transferiert (SS, 38,5 %). In der Gruppe der nicht-schwangeren Patientinnen betrug der Anteil 27,1 % (NS, 16/59). Das Alter unterschied sich in den untersuchten Gruppen nicht signifikant ($31,3 \pm 4,3$ [SS] vs. $32,8 \pm 3,8$ [NS]).

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei fast allen untersuchten Parametern ein Trend zur Korrelation mit der Oozytenqualität hinsichtlich des ZRS zu verzeichnen war, der sich im hier verwendeten Studiendesign jedoch nicht statistisch sichern ließ. Für statistisch relevante Aussagen werden wir in einer Fortsetzung der Untersuchung größere Fallzahlen analysieren. In einem zweiten Studienabschnitt soll ein prospektives Vorgehen gewählt werden, bei dem die Entscheidung, welche Oozyten für eine Weiterkultivierung verwendet werden, primär und ausschließlich auf der Grundlage des ZRS getroffen wird.

P 41

Molekulare Untersuchungen zum Einfluss von uropathogenen Infektionserregern auf humane Spermatozoen

*C. Rennemeier¹, T. Frambach¹, J. Dietl¹, P. Staib²
¹Zentrum für gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Universitäts-Frauenklinik Würzburg; ²Hans-Knöll-Institut, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V., Jena*

Fragestellung Ein Zusammenhang zwischen Infertilität und dem Nachweis verschiedener uropathogener Infektionserreger wurde bereits in früheren Studien postuliert, jedoch sind die dafür zugrundeliegenden molekularen Mechanismen noch weitgehend unerforscht. Am Beispiel des opportunistisch humanpathogenen Hefepilzes *Candida albicans*, ein natürlicher Kommensale auf Haut und Schleimhäuten des Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes, sollen mikrobielle Infektionsstrategien und deren Auswirkungen auf humane Spermien untersucht werden. Dabei soll auch die Frage geklärt werden, ob Seminalplasma nicht nur Spermien vor der Phagozytose durch uterine Immunzellen der Frau schützen kann, sondern, im Sinne einer Immunevasionsstrategie, auch den Hefepilz.

Material und Methoden Durch FACS-Analyse und Mikroskopie wurde die Assoziation von Dendritischen Zellen (DCs) an humane Spermien bzw. *C. albicans*-Zellen in An- bzw. Abwesenheit von Seminalplasma getestet. Um zu prüfen, ob lösliche Faktoren der Pilzzellen einen direkten schädlichen Einfluss auf Spermatozoen ausüben, wurden Spermien mit sterilfiltrierten *C. albicans*-Kulturüberständen inkubiert, sowie mit definierten Signalmolekülen, die kürzlich in *C. albicans*-Kulturen nachgewiesen wurden. Dazu wurden verschiedene Spermienparameter (Motilität, Viabilität, DNA-Fragmentierung, Akrosomenreaktion) bestimmt.

Ergebnisse Es konnte gezeigt werden, dass Spermien mit DCs assoziieren und von

ihnen phagozytiert werden. Humanes Seminalplasma inhibierte diese Bindung und Phagozytose. Darüber hinaus wurde auch die Phagozytose der *C. albicans*-Zellen durch DCs in Anwesenheit von Seminalplasma inhibiert, nicht jedoch die von Latexbeads. Zudem wurde deutlich, dass lösliche Faktoren der Pilzzellen eine direkte Schädigung der Spermien auslösen. So wurde die Motilität von Spermien in Gegenwart von *C. albicans*-Kulturüberstand deutlich inhibiert. In Anwesenheit des von *C. albicans* sekretierten Signalmoleküls Farnesol wurde die Motilität der Spermien vermindert, eine DNA-Fragmentierung und Nekrose ausgelöst, sowie bei äußerst niedriger Molekülkonzentration ein frühzeitiger Akrosomenverlust. Eine ähnliche Schädigung der Spermien wurde auch durch ein Signalmolekül hervorgerufen, das von dem Gram-negativen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* ausgeschieden wird.

Schlussfolgerung Da DCs als wichtige Abwehrbarriere bei der mikrobiellen Besiedlung der vaginalen Schleimhäute angesehen werden, müssen kommensale bzw. pathogene Keime über Strategien verfügen, die ihnen eine erfolgreiche Kolonisierung dieser Wirtsnische ermöglichen. In diesem Sinne könnte sich *C. albicans* in Anwesenheit von Seminalplasma der Phagozytose durch DCs entziehen und so bei der Übertragung vom Immunsystem des Wirtes unerkannt bleiben. Darüberhinaus können lösliche mikrobielle Faktoren eine erhebliche Schädigung der Spermatozoen bewirken. Dies erscheint wichtig, da viele Wirtsoberflächen des Genitaltraktes von dichten mikrobiellen Populationen verschiedener Spezies besiedelt werden können und so möglicherweise synergistisch zur Verminderung der Spermienqualität beitragen. Diese Untersuchungen stützen die Annahme, dass auch asymptomatische mikrobielle Besiedlungen einen negativen Einfluss auf die Fertilität des Paares haben können und vor einer Kinderwunschbehandlung abgeklärt werden müssen.

P 42

Intratestikuläre Faktoren steuern das Wachstum und endokrine Faktoren die Steroidogenese in Hodengewebe nach Xenografting

J. Ehmcke^{1,2}, K. Gasse^{2,3}, S. Schlatt^{1,2}

¹Institut für Reproduktions- und Regenerationsbiologie, Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie (CeRA), Universität Münster; ²Dept. of Cell Biology and Physiology, Centre for Research in Reproductive Physiology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, United States;

³Dept. of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, United States

Hintergrund und Fragestellung Im Rahmen der ontogenetischen Hodenentwicklung und der sexuellen Reifung bei Säugetieren wachsen gesunde Hoden zu einer Größe, die innerhalb des artspezifischen Normbereichs liegt. Aber im Falle einer Verletzung oder des Verlustes eines Hoden kann der verbleibende Hoden (über-)kompensieren und seine

Tabelle 4: J Ehmcke et al. (P42). Anzahl verwendeter Rezipienten.

Implantierte Hamster-Hodengewebe	Rezipienten		
	Intakt	Kastriert	Hemikastriert
2 Grafts	4	4	4
8 Grafts	4	4	4

Größe, Spermatogenese-Aktivität und die endokrine Aktivität erhöhen. Nach der Hemikastration eines adulten Männchens wächst der verbleibende Hoden meist nur geringfügig, primär verursacht durch eine erhöhte Anzahl reifender Keimzellen. Bei der Hemikastration eines immaturren Männchens dagegen kommt es zu einem verstärkten Wachstum des somatischen Hodengewebes, und dadurch zu einer deutlicheren Vergrößerung des Hodens. Ob das ontogenetische Größenwachstum des immaturren Hodens und die endokrine Funktion des adulten Hodens durch identische oder unterschiedliche intratestikuläre oder hormonelle Faktoren bestimmt werden, konnte bisher noch nicht untersucht werden. Testikuläres Xenografting eröffnet hier neue Optionen und wurde deshalb experimentell eingesetzt.

Material und Methoden Um zu untersuchen, inwieweit testikuläres Wachstum, Reifung und Funktionen durch intra- bzw. durch extra-testikuläre Faktoren determiniert wird, haben wir das Hoden-Xenografting eingesetzt. Wir haben 2 oder 8 halbe neonatale Hamsterhoden in intakte, hemi-kastrierte oder kastrierte Nacktmäuse implantiert, und haben die Entwicklung und die Funktionen dieser Gewebe unter vollständigem, vermindertem oder fehlendem Einfluss von adulten Maushoden im Rezipienten und unter dem Einfluss von wenig (2 Grafts) oder mehr (8 Grafts) konkurrierendem neonatalem Hamsterhoden-Gewebe untersucht (**Tab. 4**).

Würde das Wachstum der Hodengewebe hauptsächlich durch die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (HPG) gesteuert, dann wären große Grafts zu erwarten, wenn 2 Hodenhälften in einen Kastrierten implantiert werden. Dementsprechend wären kleine Grafts zu erwarten, wenn 8 Hodenhälften in einen intakten Rezipienten implantiert werden. Wenn aber intra-testikuläre Faktoren das Wachstum steuern, dann wären gleich große Graft in allen Rezipienten zu erwarten.

Ergebnisse Das durchschnittliche Graftgewicht in den einzelnen experimentellen Gruppen war nicht signifikant unterschiedlich (25 [± 22] mg–40 [± 32] mg), unabhängig von den experimentellen Rahmenbedingungen. Die durchschnittliche Größe der Seminal-Vesikel (als Indikator für verfügbare Androgene im Serum des Rezipienten) lag sowohl in den Gruppen der intakten und der hemi-kastrierten Rezipienten mit sowohl 2 als auch 8 implantierten Hodenhälften immer im Normbereich (227 [± 42] mg–322 [± 86] mg) als auch in den Gruppen der kastrierten Rezipienten (185 [± 51] mg bzw. 198 [± 62] mg).

Schlussfolgerung Die fehlenden Größenunterschiede der Hodengrafts unter den

unterschiedlichen Bedingungen zeigen, dass das Größenwachstum von Hodengewebe primär intrinsisch gesteuert ist. Die gleichbleibende Größe der Seminalvesikel in den verschiedenen experimentellen Gruppen weist darauf hin, dass die steroidogenetische Aktivität der Hodengewebe eng von der HPG-Achse reguliert wird, und dass daher, unabhängig von der im Rezipienten vorhandenen totalen Menge an Hodengewebe, die Größe der Seminalvesikel immer im Normbereich liegt. Wir schließen aus unseren Beobachtungen, dass das Größenwachstum von Hodengewebe intrinsisch reguliert, die endokrine Aktivität aller Hodengewebe aber sehr fein von hormonellen Feedback-Mechanismen reguliert wird.

P 43

The Accessibility of Human Sperm Chromatin for H4K12ac Binding is not Limited by DNA Methylation

A. Paradowska¹, D. Miller², D. Iles², M. Bartkuhn³, K. Steger¹, W. Weidner¹

¹Department of Urology and Pediatric Urology and Andrology, Justus Liebig University, Giessen; ²Reproduction and Early Development Group, Institute of Genetics, Health and Therapeutics University of Leeds, United Kingdom; ³Institute for Genetics, Justus Liebig University, Giessen

Introduction Spermatozoal DNA sequences that are packaged by nucleosomes are sequentially replaced by transition proteins and finally by nucleoprotamines during spermatogenesis. Approximately 15 % of their total chromatin retain in a histone-bound, nucleosomal configuration which display various posttranslational modifications. The acetylation of histon H4 at lysine 12 (H4K12ac) has been observed prior to full decondensation of sperm chromatin after fertilisation suggesting its important role for regulation of gene expression in early embryogenesis. Similarly, DNA methylation may contribute to the silencing of several developmentally important genes. Following the identification of H4K12ac binding genes in sperm, we aimed to compare our results with published sperm promoter methylation dataset.

Material and Methods ChIP-assay with anti H4K12ac antibodies was performed on ejaculated sperm from healthy donors. For microarray analysis, co-hybridization of enriched probe with Cy5 and Input with Cy3 was performed and log₂-ratio was measured for each feature on the array (HG18, NimbleGene). Dataset for sperm methylation was obtained from Kim et al., 2007 and Weber et al., 2007.

Results Alignments of our ChIP-chip data with custom tracks along chromosomes 6, 11, 16, 17 and 19 showed clearly H4K12ac association with regions of high gene density and regions of promoter DNA hypermethylation. While the PAX genes showing consistent binding to H4K12ac, its promoter has been demonstrated to be hypermethylated in spermatozoa. HOX gene, however was found to be strongly unmethylated.

Conclusions Comparison of our findings with a sperm DNA-methylation database reveals that histone-packaged DNA is predominantly methylated, but there are important exceptions that include genes essential for embryonic development. These results strongly suggest that a global epigenetic 'marking' of spermatozoal chromatin is also established that may direct chromatin re-packaging events during spermiogenesis.

P 44

Conventional Freezing and Vitrification of Human Ovarian Tissue: Neovascularisation after Xenotransplantation

V. Isachenko¹, E. Isachenko¹, G. Rahimi², K. Hancke¹, F. Nawroth², R. Kreienberg¹, P. Mallmann², J. M. Weiss¹

¹University of Ulm; ²University of Cologne; ³Endokrinologikum Hamburg

One of the new emerging techniques to preserve reproductive potential of patients is cryopreservation of ovarian fragments prior to oncological treatment and their re-transplantation after warming. The most important factor for successful ovarian graft transplantation is the rapid establishment of sufficient blood supply, which is crucial for the survival of ovarian follicles. Prior to re-vascularisation, implants are vulnerable to ischaemia, which is the main obstacle to the survival of tissue after transplantation. It was suggested that transplantation rather than cryopreservation is the major reason for early loss of primordial follicles in grafted ovaries. In our previous study we have shown a non-significant increase of necrotic areas in slow frozen or vitrified human ovarian tissue transplanted to SCID mice. This type of damage may directly or indirectly influence the vascularization machinery after transplantation. The aim of our study was to investigate the influence of different cryopreservation techniques on the ability of ovarian tissue for re-vascularization after transplantation to SCID mice.

The ovarian fragments from 5 patients were cut into pieces (~0.5 × 1.0 × 1.0 mm) and randomly distributed into three groups: fresh non-treated tissue (group A); tissue conventionally frozen in standard 0.5 ml insemination straws with 1.5 M ethylene glycol + 0.1 M sucrose, thawing in a 40 °C water bath and step-wise removal of cryoprotectants at room temperature in 0.5 M, 0.25 M and 0.15 M sucrose with gentle agitation (group B); tissue vitrified in 2.62 M dimethylsulphoxide + 2.6 M acetamide + 1.31 M propylene glycol + 0.0075 M polyethylene glycol, warming by direct plunging of solid specimens with ovarian pieces into 20 ml of 50 % vitrification solution pre-warmed to 40 °C and dilution of cryoprotectants in a decreasing concentration of vitrification solution (25 %, 12.5 %) at room temperature (group C). We used a xenograft model in which ovarian tissue pieces of all three groups were subcutaneously transplanted in SCID mice. The animals were sacrificed on the third day after

ovarian tissue transplantation and then weekly during one month to obtain the ovarian tissue grafts. These samples were examined by immunohistochemical staining with the endothelial cell-specific marker platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) to determinate angiogenesis.

No PECAM-1 staining was observed in all treatment groups prior to grafting. After warming and in vivo culture of ovarian tissue, the beginning of angiogenesis in pieces from all treatment groups on the third day was detected by PECAM-1 staining. After four weeks of in vivo culture overall area of PECAM-1 positive blood vessels significantly increased ($p < 0.05$), independent from the type of cryopreservation (group B and C vs. group A).

In conclusion, the process of neovascularisation of transplanted ovarian tissue is independent from the type of cryopreservation.

P 45

Analyse des Anteils an Spermien mit DNA-Fragmentierung nativ und nach Inkubation bei 4 °C

T. Winkle¹, Y. Wittenbecher¹, B. Rosenbusch², N. Zoller¹

¹Forschung, ReproGen-Ulm, Ulm; ²Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitäts-Frauenklinik, Ulm

Fragestellung Im Rahmen einer ART und besonders bei der Untersuchung des Anteils an Spermien mit DNA-Fragmentierung muss das Ejakulat öfters eine Zeit lang gelagert werden, z. B. während der Liquefizierung oder nach der Aufarbeitung bis zur Verwendung für eine IVF oder eine ICSI. Hierbei wird es meist bei 35 °C gelagert, um die Motilität der Spermien zu erhalten. Bei bestimmten Untersuchungen, wie z. B. der Analyse des Anteils an Spermien mit DNA-Fragmentierung, ist die Motilität jedoch unerheblich, weshalb sie in diesem Fall am längsten bei 4 °C stabil bleiben können, da bei dieser Temperatur die Enzymaktivität am geringsten ist und somit eine sekundäre Schädigung des Chromatins vermieden wird. Es ist bisher jedoch noch nicht an menschlichen Spermien untersucht, wie lange ihre Qualität unter diesen Bedingungen stabil bleibt.

Bei dieser Studie sollte untersucht werden, ob und wie lange Spermien ohne Verlust der Chromatinintegrität, ohne Qualitätsverlust und ohne Zusätze wie Medien o. ä. in Eiswasser bei ca. 4 °C gelagert werden können. Dazu wurde die Qualität zuerst nativ beurteilt, nach verschiedenen Inkubationszeiten wurde die Untersuchung wiederholt.

Methoden Es wurden zuerst 5 gesunde männliche Probanden mit Normozoospermie für diese Studie herangezogen. Die Ejakulatproben wurden nach den Richtlinien der WHO analysiert, um pH-Wert, Volumen, Konzentration, Motilität und Morphologie zu bestimmen. Von jeder Probe wurden noch zusätzlich 2 spezifische Färbungen angefertigt. Einmal wurden die Proben nach einem modifizierten Nicoletti-Assay (Nicoletti et al., 1994) mit Propidiumjodid (PI) gefärbt, um den Anteil an Spermien mit DNA-Frag-

mentierung (DNA-Fragmentierungs-Index = DFI) zu ermitteln, bei der zweiten Färbung handelte es sich um eine Doppelfärbung mit FITC-markiertem Annexin V und 7-Aminoactinomycin (7AAD). Durch das Annexin V wurden apoptotische Zellen angefärbt, durch das 7AAD die DNA bereits abgestorbener Zellen. Die Färbungen wurden mittels Durchflusszytometrie ausgewertet.

Die Ejakulatproben wurden nach Liquefizierung aliquotiert und in Eiswasser bei 4 °C gelagert. Die Analysen wurden nach folgenden Inkubationszeiten wiederholt: 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 14 h, 16 h, 18 h, 20 h, 22 h, 24 h.

In einem zweiten Schritt wurden die Proben von 55 weiteren Probanden analysiert, zuerst nativ und anschließend nach einer Inkubation auf Eiswasser von 3 Tagen. In dieser Gruppe wurde jedoch nur der DFI bestimmt.

Ergebnisse Die Probanden für den 24h-Versuch hatten im Schnitt eine Konzentration von 99,2 mio/ml, eine Motilität von 57,8 % und eine Morphologie von 20,4 %. Der native DFI betrug durchschnittlich 14,68 %, die native Apoptoserate 48,08 % und die Vitalitätsrate 80,68 %. Alles in allem schwankten die Ergebnisse für den DFI, die Apoptose- und die Vitalitätsrate über die 24 Stunden hinweg nur sehr schwach, es konnte auch kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Inkubationszeiten ermittelt werden.

Bei der Inkubation über 3 Tage betrug der durchschnittliche Nativ-DFI 8,61 %, nach 3 Tagen noch 6,31 %, der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant ($p > 0,1$).

Schlussfolgerung Die Ergebnisse zeigen, dass Spermien bis zu 24 h lang in Eiswasser bei 4 °C gelagert werden können, ohne dadurch ihre Chromatinintegrität oder Vitalität zu schädigen und ohne dass sie vermehrt in Apoptose übergehen. Was die Chromatinintegrität betrifft, können sie sogar bis zu 3 Tage bei 4 °C ohne negative Auswirkungen gelagert werden.

P 46

Optimierung von TESE-ICSI durch Injektion laser-selektierter immotiler Spermien in PolarAide®-selektierte Eizellen

V. Nordhoff¹, E. Kößer¹, S. Schlatt¹, A. Schüring², L. Kieseß¹, S. Kliesch¹

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

Fragestellung Für eine erfolgreiche Befruchtung nach intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) ist ein vitales Spermium notwendig. Die hypergonadotrope Azoospermie als schwerste Fertilitätsstörung des Mannes ist letztlich nur durch den Versuch einer testikulären Spermienextraktion (TESE) mittels Hodenbiopsie behandelbar. In den TESE-Präparaten werden oft nur sehr wenige Spermien gefunden,

die dazu häufig immotil sind. Eine Differenzierung zwischen toten und vitalen immotilen Spermien ist per Lichtmikroskop nicht möglich. Die Anwendung eines Lasers bietet die Möglichkeit, immotile Spermien auf ihre Vitalität zu überprüfen, da membran-intakte Spermien nach einem Schuss mit dem Laser auf die Schwanzspitze eine „Einrollreaktion“ zeigen. Avitale Spermien zeigen keine Reaktion. Um die Chancen einer erfolgreichen Befruchtung weiter zu erhöhen ist es sinnvoll, die laser-selektierten vitalen Spermien in die besten der zur Verfügung stehenden Eizellen (EZ) zu injizieren. Zur Beurteilung der EZ können lichtmikroskopische Kriterien wie Granulierung des Zytoplasmas, Vakuolen, Größe des Perivitellin-Raums oder Zonabesonderheiten herangezogen werden. Zusätzlich gibt es die Möglichkeit, mittels PolarAIDE® (MTG, Bruckberg) den Zona-Score und auch die Sichtbarkeit der Spindel zu ermitteln.

Material und Methoden Aus dem Jahr 2008 wurden 38 TESE-ICSI-Zyklen (n = 34 Spermienzahl \geq EZ-Zahl, n = 4 Spermienzahl $<$ EZ-Zahl) ausgewertet, bei denen motile oder immotile Spermien unselektiert in lichtmikroskopisch beurteilte Eizellen injiziert wurden. Von Januar bis Mitte Juli 2009 wurden 17 TESE-ICSI-Zyklen (n = 14 Spermienzahl \geq EZ-Zahl, n = 3 Spermienzahl $<$ EZ-Zahl) ausgewertet, bei denen motile und laser-selektierte immotile Spermien in die EZ nach PolarAIDE®-Scoring und Ranking injiziert wurden.

Ergebnisse Bei 25 von 34 Zyklen (Jahr 2008) konnten ausschließlich motile Spermien in alle Eizellen injiziert werden, bei 8 Zyklen wurden motile und immotile Spermien verwendet und in einem Zyklus konnten ausschließlich immotile Spermien gefunden und injiziert werden. 2009 waren es 7 von 14 Zyklen, bei denen nur motile Spermien in alle Eizellen injiziert wurden, bei 6 Zyklen wurden motile und immotile Spermien injiziert. In einem Fall konnten nach Spermienuche nur immotile Spermien verwendet werden. In allen Fällen aus dem Jahr 2009 wurden motile oder lasergeprüfte immotile Spermien in die besten Eizellen (PolarAIDE®) injiziert.

Die Befruchtungsrate bei der Injektion motiler Spermien lag 2008 bei 54,2 % (157 von 284 EZ), 2009 bei 69,6 % (57 von 100 EZ; n. s.). Bei Injektion ausschließlich immotiler Spermien war die Befruchtungsrate im Jahr 2008 19,5 % (11 von 61 EZ) und 22,3 % (9 von 38 EZ) 2009 (n. s.).

Zusätzlich gab es 2008 4 Zyklen, in denen nicht alle Eizellen injiziert werden konnten, da keine ausreichende Zahl von Spermien gefunden wurde. Daher wurden die ausschließlich immotilen Spermien per Zufall in lichtmikroskopisch geeignete Eizellen injiziert und ergaben eine Befruchtungsrate von 12,3 % (3/23 EZ). 2009 konnten in einem Zyklus nur sehr wenige motile und lasergeprüfte immotile Spermien gefunden werden, in 2 weiteren Zyklen wurden nur immotile Spermien in nicht ausreichender Zahl gefunden. Bei Selektion der Eizellen mittels PolarAIDE® für die wenigen Spermien ergab

sich eine Befruchtungsrate von 38,1 % (6/16 EZ).

Schlussfolgerung Die Befruchtungsrate einer TESE-ICSI kann durch laserunterstützte Selektion vitaler immotiler Spermien in mittels Zona-Score selektierte EZ erhöht werden. Bei TESE-ICSI mit ausschließlich motilen Spermien zeigt die Anwendung von PolarAIDE® allein schon einen positiven Effekt.

P 47

Expression der cGMP-bindenden Phosphodiesterasen PDE2, PDE5 und PDE6 in Hoden und Nebenhoden

A. Mietens¹, R. Middendorff²

¹Institut für Anatomie und Zellbiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen; ²AG Signaltransduktion, Giessen

Fragestellung Seit Längerem ist bekannt, dass im männlichen Reproduktionstrakt das intrazelluläre Signalmolekül „zyklisches Guanosinmonophosphat“ (cGMP) eine Schlüsselrolle bei der Erektion des Penis spielt. Grundsätzlich kann cGMP über die Aktivierung einer löslichen Guanylatzyklase (sGC) durch NO bzw. von membranständigen Guanylatzyklasen durch die natriuretischen Peptide ANP, BNP oder CNP erzeugt werden. Unterschiedlich regulierte Phosphodiesterasen (PDEs) bauen diesen Botenstoff ab und begrenzen so das cGMP-Signal in der Zelle. Hier liegt auch der Angriffspunkt von Sildenafil (Viagra), einem Hemmstoff der cGMP-abbauenden PDE5. Auch in anderen Organen des männlichen Reproduktionstrakts sind Komponenten cGMP-abhängiger Signaltransduktion beschrieben worden, ihre genaue Bedeutung ist aber noch unzureichend geklärt. Diskutiert werden Einflüsse auf die Funktion der Spermatozoen, des Spermatozoentransports in Hoden und Nebenhoden sowie auf die Keimzellreifung und Testosteronsekretion im Hoden. Über die Bedeutung der PDEs, von denen 11 Subtypen existieren, in Hoden und Nebenhoden sind die Kenntnisse noch absolut rudimentär. In dieser Studie wurden Expression und Lokalisation der o. g. PDE5, der PDE2 und PDE6 in Hoden und Nebenhoden von Mensch und Rind untersucht. Die cGMP-spezifische PDE6 ist Teil des retinalen Phototransduktionssystems. Für den cGMP-abhängigen Ionenkanal CNG („cyclic nucleotide gated channel“), einer Komponente dieses Signalweges, ist eine funktionelle Bedeutung auch in Spermatozoen bereits beschrieben worden. Die cGMP-stimulierte PDE2 baut sowohl cGMP als auch den verwandten „second messenger“ cAMP ab und vermittelt so einen Cross-talk zum cAMP-Signalsystem.

Material und Methoden Mittels Western-Blot und Immunhistochemie wurden humane als auch bovine Hoden und Nebenhoden untersucht.

Ergebnis Sowohl in Hoden- als auch Nebenhodengefäßen ließ sich die PDE2A als punktförmige Färbung von kapillären und

venösen Endothelzellen darstellen. Leydig-Zellen zeigten eine homogene Anfärbung im Zytoplasma, Sertoli-Zellen blieben dagegen immunonegativ. Im Keimepithel fand sich eine Immunreaktion in einem Teil der Spermatozyten und Spermatiden. Im Ductus epididymidis war eine Färbung der basalen und vereinzelter luminaler Epithelzellen sichtbar. PDE5 konnte im Western-Blot in Hoden und Nebenhoden nachgewiesen werden. Immunhistochemisch zeigte sich in testikulärem Gewebe von Mensch und Rind eine Expression vor allem in Leydig- und kontraktilen Zellen. Insbesondere die Immunreaktion der Gefäßmuskulatur war deutlich, aber auch Myofibroblasten der peritubulären Lamina propria waren immunopositiv. Keimzellen und Sertoli-Zellen blieben ungefärbt. Im Nebenhodengewebe beider Spezies fand sich die Expression von PDE5 in der glatten Gefäßmuskulatur und peritubulären Muskelzellen, vereinzelte Epithelzellen im Caput epididymidis ließen sich ebenfalls anfärben. Die retinale PDE6 konnte im bovinen Hoden und Nebenhoden nachgewiesen werden. Insbesondere apikale Keimzellen zeigten eine spezifische Immunreaktion, was für eine Korrelation mit bestimmten Entwicklungsstadien der Spermatozytenreifung spricht. Spermatozoen und Sertoli-Zellen waren immunonegativ, Leydig-Zellen zeigten nur ein schwaches Signal in der Immunhistochemie. Im Ductus epididymidis zeigte sich immunhistochemisch lediglich die Expression der PDE6 in einzelnen basalen Epithelzellen.

Schlussfolgerung Die Untersuchungen belegen die Expression der cGMP-bindenden PDE2, PDE5 und PDE6 in Hoden- und Nebenhodengewebe von Mensch und Rind und unterstreichen somit eine Bedeutung des cGMP-Systems für Keimzellentwicklung, Hormonsekretion, Keimzellreifung, Spermatozoentransport sowie Blutversorgung. Hierbei ermöglicht das unterschiedliche Expressionsprofil der PDEs eine zellspezifische Modulation des intrazellulären cGMP-Signals.

Abstracts zur Podiumsdiskussion „Drängende Rechtsfragen der modernen Reproduktionsmedizin in Deutschland“

Fragen aus reproduktionsmedizinischer Sicht

F. Geisthövel

Centrum für Gyn. Endokrinologie & Reproduktionsmedizin Freiburg (CERF), Freiburg i. Br.

Aus reproduktionsmedizinischer Sicht möchte ich zur Rechtslage in der RM zunächst einige allgemeine Gedanken darlegen, um dann auf speziellere Themen einzugehen.

Im Hinblick auf allgemeine Fragestellungen schien es mir in jüngerer Vergangenheit dringend nötig zu sein, dass zunächst einmal die

bestehende, für Ärzte und Biologen ziemlich unübersichtliche Rechtslage in der RM umfassend zusammengestellt wird. Diese Zusammenschau findet sich in einer kürzlich zur Veröffentlichung angenommenen Publikation [Frommel et al, 2009]. Hierbei bestätigt sich, dass das geltende Recht in einem komplexen Netzwerk aus verschiedenen Gesetzen und Verordnungen eingebettet ist. Bei genauer Betrachtung wird deutlich, dass oft vorzeitig nach Schaffung eines Reproduktionsmedizingesetzes (RMGs) gerufen wird, ohne dass man eigentlich konkretisiert, welche Details genau zu ändern wären. Dabei wird z. B. kaum beachtet, dass zunächst erwünschte gesetzliche Veränderungen ein erhebliches Konfliktpotenzial innerhalb eines Gesetzes oder zwischen bestehenden Gesetzen aufbauen könnten. So könnte eine vordergründig als sinnvoll erscheinende Gesetzesnovellierung des Embryonenschutzgesetzes (ESchGs) in der Folge jedoch zu erheblichen rechtlichen Kollisionen z. B. mit dem Personstandsrecht im Bürgerlichen Gesetzbuch (BGB) führen – und möglicherweise daran scheitern. Letztendlich geht es um die Frage, was *de lege lata* befriedigend, was unbefriedigend oder gar nicht gelöst ist, und weiterhin, was *de lege ferenda* Aussicht auf Änderung hätte, und wovon man sich in seinen Forderungen realistischerweise sogar verabschieden sollte. Diese allgemeinen Gedanken zusammengefasst ergeben sich folgende Fragen: Ist nicht das meiste in der RM längst und gut bilanziert geregelt? Brauchen wir überhaupt *de facto* ein RMG? Welches sind aber drängende Rechtsfragen in der modernen RM in Deutschland, die *de lege lata* geklärt und eventuell auch *de lege ferenda* angegangen werden sollten, oder die rechtspolitisch kaum Aussichten auf Änderung hätten?

Definitiv lückenhaft ist die donogene Insemination geregelt; so besteht nach wie vor der Interessenskonflikt zwischen dem Recht des Kindes auf Kenntnis seiner Abstammung und dem Schutz des Spenders vor unterhalts- und erbrechtlichen Forderungen. Wie steht es diesbezüglich mit der Aufklärungspflicht von Spender- und Befruchtungsarzt gegenüber dem Samenspender? Können die Wunscheltern den Samenspender in irgendeiner Weise schützen? Vor allem besteht die Frage, ob nicht zum Schutz des Spenders und seiner Erben die Durchsetzung einer Partialnovellierung im BGB realistisch wäre, derart, dass zwar das Kind seinem genetischen Ursprung nachgehen kann, aber dies ohne weitere Rechtsansprüche.

Weiterhin ist im Rahmen der Fertilitätsprotektion bei malignen Erkrankungen nochmals eine nicht unwichtige Frage zu stellen: ist mit dem Verbot der postmortalen Verfügbarkeit von Samen- und Eizellen durch das ESchG auch die Option einer entsprechenden letztwilligen Verfügung des oder der Betroffenen auszuschließen?

Außerdem ist mit der Samenspende auch die Frage einer Embryonenspende unter klinischen Aspekten eng verknüpft. Ist überhaupt die Embryonenspende erlaubt? Wie verhält es sich hierbei mit familien- und zivilrechtli-

chen Regelungen, die nicht nur das Kind, sondern auch den Samengeber und den behandelnden Arzt betreffen könnten?

In diesem Zusammenhang sollten die juristischen Unterschiede zwischen der Embryonenspende und der Embryonenadoption herausgearbeitet werden. Ist überhaupt eine pränatale Adoption möglich? Wie würde sich z. B. des Vormundschaftsgericht verhalten?

Nicht zuletzt sollte nochmals zu einem Dauerthema aktuell Stellung genommen werden: Wenn auch der „double embryo transfer“ (DET) entsprechend des „Deutschen Mittelwegs“ bei den führenden Juristen *de lege lata* als gesetzeskonform eingestuft ist, besteht die weiterführende Frage, ob nicht sogar ein „single embryo transfer“ (SET) von der Patientin unter bestimmten Umständen als Maßgabe des ESchGs eingefordert werden kann.

Unabhängig davon, ob der Status quo, d. h. ein Netzwerk gesetzlicher Regelungen in der RM vorerst bestehen bleibt oder in naher Zukunft ein RMG entsteht, wird dieses Podium versuchen, noch klarer zu definieren: wo gibt es Spielräume, wo liegen die Grenzen?

Weiterführende Literatur:

Frommel M, Taupitz J, Ochsner A, Geithövel F. Rechtslage der Reproduktionsmedizin in Deutschland. J Reproductive Med Endokrinol, akzeptiert, 2009.

Das Kindeswohl sowie die Rechtsstellung der Eltern, der Spenderin und des Spenders

J. Taupitz

Institut für Deutsches, Europäisches und Internationales Medizinrecht, Gesundheitsrecht und Bioethik der Universitäten Heidelberg und Mannheim, Mannheim

1. Fortpflanzungsmedizin und Schutz des Kindeswohls

a) Das ESchG verbietet Maßnahmen, die zu einer „gespaltenen Mutterschaft“ (Auseinanderfallen von genetischer und austragender Mutter) führen (Grund: Kindeswohl). Verbieten sind:

- die Übertragung einer fremden, unbefruchteten Eizelle auf eine Frau (Eizellspende) (§ 1 I Nr. 1);
- die künstliche Befruchtung zu einem anderen Zweck als dem der Herbeiführung einer Schwangerschaft der Frau, von der die Eizelle stammt (§ 1 I Nr. 2); das Verbot erfasst auch das Weiterkultivieren von 2-PN-Zellen, wenn schon dabei die Absicht besteht, den Embryo später auf eine andere Frau zu übertragen;
- die Entnahme eines Embryos vor Abschluss seiner Nidation, um ihn auf eine andere Frau zu übertragen (§ 1 I Nr. 6);
- die IVF bei einer oder die Embryoübertragung auf eine Frau (Ersatzmutter), die bereit ist, ihr Kind nach der Geburt auf Dauer Dritten zu überlassen (§ 1 I Nr. 7).

Nicht verboten sind die Samenspende sowie die Embryospende nach IVF durch Übertragung des Embryos auf eine Frau, die nicht Ersatzmutter ist (aber Verstoß gegen § 1 I Nr. 2, wenn der Transfer schon bei der Befruchtung geplant war).

b) Es gibt keine Verpflichtung der Frau, sich den Embryo übertragen zu lassen. Ein Embryo, der aus welchen Gründen auch immer nicht transferiert werden kann („überzähliger“, „verwaister“ Embryo), darf verworfen werden. Seine Kryokonservierung ist zeitlich unbegrenzt erlaubt.

c) Das ESchG verbietet die Post-mortem-Befruchtung nach dem Tod des Samengebers (§ 4 I Nr. 3) und nach dem Tod der Eizellspenderin (§ 1 I Nr. 2). Durch eine letztwillige Verfügung (etwa eines Malignom-Patienten) kann dieses strafrechtliche Verbot nicht außer Kraft gesetzt werden. Der Embryotransfer nach dem Tod des Samengebers bzw. nach dem Tod der Eizellgeberin auf eine Frau, die nicht Ersatzmutter ist, ist nicht verboten (beachte aber oben § 1 I Nr. 2).

d) Das ESchG verbietet die künstliche Befruchtung ohne Einwilligung der Gametengeber und die Übertragung eines Embryos auf eine Frau ohne ihre Einwilligung, § 4 Abs. 1 Nr. 1, 2. Abgesehen von diesen strafrechtlichen Verboten ist das Selbstbestimmungsrecht der Gametenspender an Keimzellen, 2-PN-Zellen und Embryonen nur über das zivilrechtliche Allgemeine Persönlichkeitsrecht (APR) geschützt; bei einer Verletzung des APR kommen Schadensersatz/Schmerzensgeld in Betracht. Eine Embryonenspende z. B. ohne Zustimmung der Gametenspender verletzt ihr APR.

e) Das ESchG enthält keine spezifischen Regelungen für gleichgeschlechtliche Paare. Soweit die (Muster-)Richtlinie zur Durchführung der assistierten Reproduktion der Bundesärztekammer (2006) und ihre Umsetzung in Satzungsrecht der Ärztekammern Methoden der assistierten Reproduktion auf (verheiratete oder in festgefügt Partnerschaft lebende) heterosexuelle Paare beschränkt, entfaltet dies keine rechtsverbindliche Wirkung, weil dies die Satzungsautonomie der Kammern überschreitet.

2. (Familienrechtliche) Rechtsstellung der Beteiligten

a) Rechtliche Mutter ist unumstößlich die Frau, die das Kind geboren hat. Dies gilt auch, wenn sie nicht die genetische Mutter ist.

b) Rechtlicher Vater ist nach § 1592 BGB der Mann, der (1) zur Zeit der Geburt mit der Mutter verheiratet ist oder (2) die Vaterschaft anerkannt hat oder (3) dessen Vaterschaft in einem gerichtlichen Verfahren festgestellt wurde. Möglich ist eine pränatale Anerkennung der Vaterschaft, nach überwiegender Auffassung auch präkonzeptionell.

Ist das Kind mit Einwilligung des Mannes und der Mutter durch künstliche Befruchtung mittels Samenspende eines Dritten gezeugt worden, kann nur das Kind die Vaterschaft anfechten (§ 1600 V BGB).

Besteht – etwa nach Anfechtung – keine Vaterschaft nach § 1592 Nr. 1 oder 2 BGB (mehr), kann der Samenspender gerichtlich als rechtlicher Vater festgestellt werden. Daraus resultieren unterhaltsrechtliche und erbrechtliche Ansprüche des Kindes gegen ihn bzw. seine Erben. Der Samenspendearzt hat den Samenspender auf dieses Risiko hin-

zuweisen. Unterlässt er dies, haftet er gegenüber dem Samenspender.

Die Unterhaltspflicht kann von den Wunscheltern nicht dergestalt übernommen werden, dass der Samenspender vollkommen befreit ist. Kommen die Wunscheltern ihrer Unterhaltspflicht nicht nach, kann das Kind nach Feststellung der Vaterschaft des Samenspenders den Unterhalt von ihm verlangen.

Eine Vereinbarung, wonach das Kind aus der erbrechtlichen Stellung nach dem Samenspender in diejenige nach dem Wunschvater wechselt, ist nicht möglich. Ein Erbverzicht des Kindes kommt allenfalls nach seiner Geburt mit Genehmigung des Vormundschaftsgerichts in Betracht. Prüfungsmaßstab: Interesse des Kindes.

Die Einwilligung der Eltern in eine Adoption kann erst erteilt werden, wenn das Kind 8 Wochen alt ist. Eine pränatale Adoption (und damit auch Embryonadoption) ist nach geltendem Recht nicht möglich.

Zur Terminologie: Durch Adoption wird ein rechtliches Eltern-Kind-Verhältnis (wie bei der Vaterschaftsanerkennung/-feststellung) herbeigeführt. Verwandtschaftliche Beziehungen zur Herkunftsfamilie werden beendet. Die Adoption erfolgt durch Beschluss des Vormundschaftsgerichts und kann nur unter engen Voraussetzungen aufgehoben werden. Die Embryospende bezeichnet dagegen den (physischen) Transfer eines Embryos auf eine Frau. Statusrechtliche Folgen hat dies nicht, sondern erst die Geburt; die gebärende Frau wird rechtliche Mutter.

c) Die Embryospende ändert an der familienrechtlichen Rechtsstellung des männlichen Erzeugers nichts. Aufgrund seines APR (s. oben) ist sie nur mit seiner Zustimmung erlaubt.

d) Die Verwendung anonymen Samens/eines „Samencocktails“ ist nach überwiegender Ansicht unzulässig (sittenwidrig) (Verletzung des Rechts des Kindes auf Kenntnis seiner Abstammung). Findet sie gleichwohl statt und kann das Kind deshalb unterhaltsrechtliche Ansprüche nicht gegen den Samenspender durchsetzen, haftet in erster Linie der Befruchtungsarzt, gegebenenfalls auch der Samenspendearzt. Die Wunscheltern haben kein Recht auf Kenntnis des Samenspenders.

e) Eine weitergehende Absicherung des Samenspenders ließe sich erreichen, wenn die Möglichkeit des Kindes zur Anfechtung der Vaterschaft gemäß § 1600 V BGB (s. oben) gestrichen würde, sodass unumstößlich der Wunschvater rechtlicher Vater bliebe. Dies ist ebenso wie eine gelegentlich vorgeschlagene „rechtsfolgenlose Vaterschaftsfeststellungsklage“ rechtspolitisch kaum durchsetzbar. Denn bereits nach geltendem Recht kann das Kind sein Recht auf Kenntnis seiner Abstammung unabhängig von einer Vaterschaftsanfechtung in einem (seit 01.04.2008 möglichen) besonderen Verfahren zur rechtsfolgenlosen Klärung (nur der Abstammung durchsetzen (§ 1598a BGB)).

Rechtslage zu DET und eSET

J. Dauderer

Ratajczak & Partner Rechtsanwälte, München

Nach mittlerweile herrschender juristischer Auffassung ist die Anwendung des Verfahrens Double-Embryo-Transfer (DET) gesetzlich zulässig. Kann aber im Einzelfall auch ein elektive Single-Embryo-Transfer (eSET) erfolgen? Wie weit kann die zulässige Auslegung der geltenden Rechtslage hier gehen? Lassen Sie mich aus Sicht des beratenden Juristen meine Einschätzung hierzu darlegen.

Nimmt man den Gesundheitsschutz der Frau ernst, sind (höhergradige) Mehrlingsschwangerschaften wegen des damit verbundenen gesteigerten Risikos zu vermeiden. Auch eine nachträgliche Mehrlingsreduktion, z. B. durch intrauterinen Fetozid, sollte aus ethischen und rechtlichen aber auch originär medizinischen Gründen möglichst vermieden werden. Dies ist aber nicht möglich, wenn man jegliche Identifizierung der Entwicklungsfähigkeit von Embryonen verneint und ein striktes Selektionsverbot postuliert. Zur Gewährleistung einer akzeptablen Nidationswahrscheinlichkeit müssten dann Mehrfachtransfers in Kauf genommen werden und Frauen mit Kinderwunsch oftmals (vermeidbaren) zusätzlichen Behandlungszyklen unterzogen werden. Die strikte Anwendung der früher von der BÄK formulierten Dreierregel (= Entwicklung und Transfer von 3 Embryonen innerhalb eines Zyklus; nach § 1 Abs. 1 Nr. 3, Nr. 5 ESchG unzweifelhaft zulässig) trägt diesem rechtlich gebotenen Gesundheitsschutz keine Rechnung und folgt einem als veraltet zu qualifizierenden reproduktionsmedizinischen Standard. Wegen dieser Probleme wurde das DET-Verfahren, *de lege lata* im Einklang mit dem ESchG, als sog. „Deutscher Mittelweg“ entwickelt. Das Ziel ist es hierbei, so viele 2-PN-Zellen weiter zu kultivieren, dass 2 entwicklungsfähige Embryonen übertragen werden können. Beim DET werden die Eizellen in den verschiedenen Stadien vor und nach In-vitro-Befruchtung rein morphologisch bzw. nach der embryonalen Teilungsrate bewertet (Eizell-Vorkern- und Embryoscore). Unstreitig dürfen alle Stadien auf ihre Entwicklungsfähigkeit untersucht werden. Unstreitig dürfen auch nicht entwicklungsfähige Embryonen ausgeschieden werden. Daher ist das Embryoscore (= Differenzierung nach der Entwicklungsfähigkeit der Embryonen) erlaubt. Denn betroffen ist hier nicht das Verbot der Vorratshaltung (§ 1 Abs. 1 Nr. 5 ESchG).

Im juristischen Schrifttum wird aber die Auffassung vertreten, dass das eSET-Verfahren *de lege lata* gegen das ESchG verstoße. Auch dies ist zu differenzieren. Ein eSET kann nicht von Anfang an geplant werden, da es dabei nicht nur um die Entwicklungsfähigkeit, sondern um eine echte Auswahl des besten Embryos geht. Da aber die Entscheidungsautonomie der Frau das höchstrangige Rechtsgut ist, auch nach dem ESchG, kann die Frau vor dem Transfer entscheiden, ob sie eine Zwillingsschwangerschaft in Kauf nehmen will oder nicht. Dies folgt aus dem

Verzicht der Gesetzeslage, eine originäre Embryonenerhaltungspflicht zu definieren. Auch stellt § 4 Abs. 1 Nr. 2 ESchG denjenigen Mediziner unter Strafe, der es unternimmt, einer Frau einen Embryo ohne ihre Einwilligung zu übertragen. Es bleibt somit am Ende die alleinige Entscheidungshoheit der Frau, wie viele von maximal 3 und welche Embryonen sie sich transferieren lassen will. Eine sachgerechte ärztliche Aufklärung bezieht sich zeitlich auf den jeweiligen Behandlungsabschnitt. Dies bedeutet, dass Mediziner verpflichtet sind, über die jeweilige Entwicklungsfähigkeit des Embryos aufzuklären, damit die Frau von ihrem Entscheidungsrecht informiert Gebrauch machen kann.

Fragen aus reproduktionsbiologischer Sicht

M. Montag

Gynäkologische Endokrinologie & Reproduktionsmedizin, Universitäts-Frauenklinik Bonn

Im reproduktionsbiologischen Bereich ist eine kritische Auseinandersetzung mit dem Thema elektiver Single-Embryo-Transfer (eSET) und mit der Präimplantationsdiagnostik gefordert.

Der Begriff eSET kennzeichnet die Suche nach der Eizelle bzw. dem Embryo mit dem besten Implantationspotenzial. Die derzeit gängige Praxis der morphologisch bestimmten Auswahl in Verbindung mit einem singulären Beobachtungszeitpunkt steht auf dem Prüfstand. Die Zukunft liegt in der Untersuchung von physiologischen Parametern. Die Vielzahl der derzeit angebotenen Techniken haben eines gemeinsam: sie beruhen auf Analogieschlüssen, während die biologischen Hintergründe weitgehend unerforscht sind. Hier ist eine Intensivierung der Grundlagenforschung wünschenswert, um von der deskriptiven Ebene in substanzuelle Bereiche voranzuschreiten.

Bei der Präimplantationsdiagnostik muss die Frage geklärt werden, welche Methode für welche Untersuchung wann sinnvoll eingesetzt werden sollte. Die seit 1990 im Ausland zunehmend praktizierte Anwendung der Embryobiopsie wird inzwischen selbst von Arbeitsgruppen, welche diese Methode lange praktiziert haben, sehr kritisch betrachtet. Die Entnahme von 1–2 Blastomeren im 6–8-Zellstadium scheint das Implantations- und weitere Entwicklungspotenzial des Embryos zu beeinträchtigen. Die unkritische Anwendung dieser Methode ausschließlich zur Untersuchung von Chromosomen-Fehlverteilungen, sogenannten Aneuploidien, wird inzwischen von vielen Fachgesellschaften als äußerst problematisch eingestuft. Als mögliche Alternative kommen derzeit die Polkörperbiopsie und die Blastozystenbiopsie in Betracht.

Die Polkörperdiagnostik ist für die abschließliche Untersuchung von Eizellen auf mütterlich bedingte Aneuploidien die geeignete Methode. In Hinblick auf die kritische Diskussion um die Aneuploidie-Diagnostik hat die „European Society for Human Repro-

duction and Embryology“ (ESHRE) eine Pilotstudie initiiert, bei der in Vorbereitung zu einer multizentrischen Studie die Machbarkeit der Polkörperdiagnostik zur Untersuchung aller Chromosomen untersucht wird.

Der Einsatz der Polkörperdiagnostik zum Nachweis (mono-)genetischer Veranlagungen ist nur bedingt sinnvoll. So wird beispielsweise bei mütterlich bedingten genetischen Veranlagungen mit einem rezessiven Erbgang die Hälfte der potenziell nicht von der Krankheit betroffenen Eizellen verworfen. Väterliche Merkmale können über die Polkörperdiagnostik generell nicht untersucht werden.

Eine Lösung könnte hier die Biopsie im Blastozystenstadium darstellen. Nach der Entnahme von einigen wenigen Zellen aus dem Trophektoderm können diese untersucht werden, ohne dass die zukünftigen fetalen Anteile geschädigt oder beeinträchtigt werden. Der Differenzierungsschritt bei der Blastozyste, mit dem Trophektoderm als Vorgänger der späteren extra-embryonalen Anteile und der inneren Zellmasse als Vorläufer des Fetus, unterscheidet sich fundamental von der Situation des Embryos im 4–8-Zellstadium. Insofern entspricht die Biopsie von trophektodermalen Zellen eher einer indirekten Methode, vergleichbar der Chorionzottenbiopsie. Dies dürfte für genetische Veranlagungen nicht relevant sein, im Zusammenhang mit der Aneuploidie-Diagnostik wird jedoch diskutiert, wie repräsentativ die an trophektodermalen Zellen durchgeführte Diagnostik für die innere Zellmasse ist.

Eine Einschränkung bei der Blastozystenbiopsie besteht darin, dass je nach Dauer der diagnostischen Untersuchung und in Abhängigkeit vom Entwicklungsstatus der Blastozyste eine Kryokonservierung durchgeführt werden muss. Auch wenn mit dem Verfahren der Vitrifikation von Blastozysten sehr gute Erfolge erzielt werden, stellt dies dennoch eine weitere, unphysiologische Intervention dar.

Fortschritte in der Chiptechnologie bei der genetischen Testung eröffnen auch die Untersuchung auf genetische Veranlagungen und Dispositionen, die nicht direkt letal sind oder bei denen sich entsprechende Krankheitsbilder erst im fortgeschrittenen Alter manifestieren. Auch wenn das neue Gen-

diagnostikgesetz vom 24.04.2009 hier eine klare Regelung getroffen hat, besteht Diskussionsbedarf, wie mit diesen Möglichkeiten umgegangen wird.

Deutsche Rechtskultur, Präimplantationsdiagnostik, Samengeber

M. Frommel

*Institut für Sanktionenrecht und Kriminologie,
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel*

Seit Erlass des Embryonenschutzgesetzes (ESchG) 1991, also seit fast 20 Jahren, wird die mediale Wahrnehmung durch widersprüchliche Botschaften geprägt. Einerseits klagen Mediziner, es sei zu streng und behindere die deutsche Reproduktionsmedizin, andererseits kursieren Dammbrechargumente. Ökologische Feministinnen meinen außerdem, es sei zu befürchten, dass sich Ärzte nicht an das (strenge) Gesetz halten und Frauen als Lieferanten von Eizellen, eines knappen Rohstoffs, missbrauchen. Das ESchG folgt einer gemäßigt konservativen bis liberalen Haltung. Es verbietet Missbrauch, privilegiert aber die ART und lässt genügend Spielraum für eine angemessene Behandlung. Die Reproduktionsfreiheit wird beachtet, aber nur in einer Form zugelassen, die Achtung und Respekt vor dem menschlichen Leben auch in seiner Frühform zeigt. Vergleicht man das ESchG mit ausländischen Regelungen, welche dem Staat verwehren, die Reproduktion zu regulieren, dann springt das Verbot der Leihmutterchaft und der Eizellspende in Deutschland ins Auge. Aber mit Lebensschutz haben diese Verbote nichts zu tun, im Gegenteil: sie erfolgen aus Gründen, welche auf einer ganz anderen Ebene liegen. Vermieden werden soll eine gespaltene Mutterschaft. Die deutsche Rechtskultur definiert Reproduktion sehr viel stärker als die angelsächsische oder skandinavische Kultur als einen geschlechtsspezifisch unterschiedlichen Vorgang, lehnt also eine strikte Gleichbehandlung der Geschlechter ab. Deshalb werden Samen- und Eizellspende ungleich behandelt. Eugenische Überlegungen sind mit dem ESchG unvereinbar.

Bei einer Präimplantationsdiagnostik (PID) in einem späten Stadium vermeidet eine an-

gemessene Auslegung Wertungswidersprüche mit der Pränataldiagnostik (PND) und der medizinisch indizierten Abtreibung. Gerichte stimmen dieser Lesart zu, noch steht aber die abschließende Bundesgerichtshof-Entscheidung in dieser Frage aus. Unvereinbar mit dem ESchG ist das Modell „Designerbaby“. Menschenzüchtung verstößt nicht gegen die Würde des Embryos, sondern verletzt grundlegende Interessen der Bürger und Bürgerinnen. Sie zu verbieten ist daher verfassungsgemäß, auch wenn das Rechtsgut des § 2 ESchG Wissenschaftlern nicht immer einleuchtet.

Somit erweist sich der in den Medien betonte Eindruck, dass das ESchG besonders streng sei, weil es einem Konzept des vorrangigen Lebensschutzes folge, als falsch, wenn man die Reproduktionsmedizin betrachtet. Insgesamt gesehen stehen dort eher die reproduktiven Rechte im Vordergrund. Das Lebensschutzkonzept der §§ 218 ff. StGB und des ESchG ist flexibel. Streng durchgehalten wird der Vorrang des Gedankens des Lebensschutzes nur beim Forschungsverbot des ESchG. Die Konsequenzen dieses Verbotes werden hier aber nicht behandelt. Beschränkungen der RM erklären sich aber nur zu einem ganz kleinen Teil aus Überlegungen des Lebensschutzes und auch dann nur in der schwachen und damit durchaus liberalen Version der Pflicht zur Achtung des menschlichen Lebens. Alle Bürger und Bürgerinnen können – in welcher Rolle auch immer – mit dem geltenden Recht der Fortpflanzungsmedizin ganz gut leben, auch wenn sie persönlich andere Werte in den Vordergrund stellen würden. Eine Ausnahme sei aber benannt. Sie betrifft den im BGB geregelten Status des Samenspenders (bzw. des Mannes, von dem eine Embryonenspende stammt) im heterologen System. In einer Zeit, in der Kinder, die nach reproduktionsmedizinischen Maßnahmen entstanden sind, ein durchsetzbares Recht haben, ihre genetische Herkunft zu erfahren, werden sie dies tun. Daher sollten Unterhaltsansprüche und Erbrecht vom Recht auf Kenntnis der eigenen Wurzeln getrennt werden. Zurzeit arbeiten wir noch mit Behelfskonstruktionen. Wenn es *de lege ferenda* ein Problem gibt, das es zu lösen gilt, dann dieses.

Autorenindex

(nur federführende Autoren)

B			
Baston-Büst D. M.	231	Gottardo F.	228
Beck C.	223	Gromoll J.	230
Buchholz T.	229		
C		I	
Capallo-Obermann H.	224	Isachenko V.	240
D			
Dauderer J.	243	K	
E		Kaminski D.	227, 228
Ehmcke J.	239	von Kopylow K.	225
Eue I.	238	Kranz S.	223
F			
Faas-Fehervary P.	231	L	
Fathy A.	226	Lang D.	237
Fietz F.	236		
Fijak M.	226	M	
Frommel M.	244	Mailidis C.	227
G		Mietens A.	241
Geisthövel F.	235, 241	Montag M.	243
Germeyer A.	233		
		N	
		Neulen J.	233
		Nordhoff V.	240
		O	
		Ochsendorf F.	227
		P	
		Paradowska A.	239
		Porn A. C.	233
		R	
		Rennemeier C.	238
		Rajczyk K.	230
		S	
		Schanz S.	235
		Schuldt D.	232
		Schulte N.	232, 235
		Schüring A. N.	232, 234, 235
		Seifert B.	229, 230
		T	
		Taupitz J.	242
		Tüttelmann F.	225
		W	
		Wapelhorst B.	237
		Werny F. M.	228
		Wetzka B.	229
		Wilke G.	234
		Winkle T.	240
		Wischmann T.	236

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

[Medizintechnik-Produkte](#)



Neues CRTD 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](#)