

Die zytogenetische Analyse von nicht fertilisierten Oozyten – Möglichkeiten und Grenzen

Heike Eckel¹, Jürgen Kleinstei¹, Peter Wieacker² und Markus Stumm²

- 1) Klinik für Reproduktionsmedizin und Gynäkologische Endokrinologie, Otto-v.-Guericke-Universität Magdeburg
- 2) Institut für Humangenetik, Otto-v.-Guericke-Universität Magdeburg

Zusammenfassung

Die Rate numerischer Chromosomenanomalien ist beim Menschen größer als bei jeder anderen Spezies. Aneuploidien sind für den Verlust von Embryonen und damit für den Eintritt einer Schwangerschaft von Bedeutung. Aneuploidien stellen auch nach erfolgter Implantation die häufigste embryonale Todesursache dar. Diese resultieren überwiegend aus chromosomal aberranten Gameten. Im Zusammenhang mit den Verfahren der assistierten Fertilisation zeigten Chromosomenanalysen an unbefruchteten Oozyten und Spermatozoen, dass eine deutliche Präferenz für chromosomale Verteilungsstörungen während der Oogenese existiert und diese maßgeblich zur Entstehung von Aneuploidien beitragen. Aufgrund spezifischer Probleme bei der Präparation von meiotischen Eizellchromosomen und der Fehlermöglichkeiten bei ihrer Auswertung besteht Handlungsbedarf sowohl im Hinblick auf eine Verbesserung der Fixiertechniken, als auch bezüglich der Weiterentwicklung spezifischer Analyseverfahren. Die korrekte Erfassung numerischer Chromosomenanomalien und ihrer Entstehung ermöglicht nicht nur die Ermittlung zuverlässiger Anomalieraten, sondern ist auch für die Durchführung einer präkonzeptionellen Diagnostik von Aneuploidien im Rahmen der Sterilitätsbehandlung durch die Verfahren der assistierten Fertilisation entscheidend. Somit nimmt die Etablierung von adäquaten FISH-Verfahren, welche möglichst sichere Aussagen anhand der Analyse von Meiosechro-

mosomen einzelner Zellen zulassen, einen besonderen Stellenwert künftiger Entwicklungen ein.

Schlüsselwörter

Aneuploidien, Oozyten, Polkörperchen, Zytogenetik

Summary

The frequency of numerical chromosomal anomalies is much higher in humans in comparison to other species. Aneuploidies are an important factor for the loss of embryos and therefore for the rate of implantation. Aneuploidies are also the most common cause of embryonal death after implantation. Most often embryonal aneuploidies are the result of chromosomal aberrant gametes. Chromosomal analysis of unfertilised oocytes and spermatocytes, gained by assisted reproduction technologies, showed a clear preference for chromosomal segregation errors in oogenesis and therefore, for the genesis of aneuploidies in humans. Nevertheless, because of specific problems during preparation of meiotic chromosomes and possible pitfalls during analysis, further technical progress is necessary. The exact determination of numeric chromosomal anomalies and the unravelling of mechanism underlying formation would allow the determination of reliable anomaly rates. Moreover, reliable methods are the basis for the preconceptional diagnosis of aneuploidies during assisted reproductive treatment. Therefore, the establishment of FISH-tech-

niques, which allow a relatively reliable diagnosis of meiotic chromosomes, will have an important function in the future of reproductive medicine.

Key words

Aneuploidies, Oocytes, Polar Body, Cytogenetics

Der größte Anteil der befruchteten Eizellen degeneriert bereits vor oder unmittelbar nach der Implantation. Schätzungen gehen davon aus, dass ca. 50-70% aller Embryonen unbemerkt zu Grunde gehen. Chromosomenanomalien spielen dabei eine wichtige Rolle und sind damit für den Eintritt einer Schwangerschaft von entscheidender Bedeutung. Von den bewusst registrierten Schwangerschaften enden ca. 15% mit einem Spontanabort. Ungefähr 50% davon weisen eine Aneuploidie auf. Hierbei stellen die Trisomien mit einer Frequenz von ca. 50% bei Spontanaborten und einem Anteil von 0,3% bei allen Lebendgeburten die häufigste Chromosomenanomalie dar (Sperling und Neitzel, 2000). Die fetalen Aneuploidien resultieren zum größten Teil aus chromosomal veränderten Keimzellen. Im Rahmen der Sterilitätsbehandlung durch die Verfahren der assistierten Reproduktion liegen Chromosomenbefunde sowohl an menschlichen Eizellen als auch an Spermien vor. Vergleicht man die Daten, so scheint es eine deutliche Präferenz für chromosomale Verteilungsstörungen während der Eizellreifung zu geben

(Abruzzo und Hassold, 1995; Griffin, 1996). Neueren Untersuchungen zufolge können in Abhängigkeit vom Alter der Patientinnen zwischen 20-40% aller Oozyten, die nach ovarieller Stimulation für eine anschließende Sterilitätsbehandlung durch die in-vitro-Fertilisation (IVF) oder intrazytoplasmatische Spermatozoeninjektion (ICSI) gewonnen werden, von numerischen Chromosomenaberrationen betroffen sein (Dailey et al., 1996; Verlinsky et al., 1998, 1999). Nach einer IVF- oder ICSI-Behandlung liegen die zu erwartenden klinischen Schwangerschaftsraten pro Embryotransfer in Deutschland bei 20-30% und übersteigen damit die Schwangerschaftsrate nach natürlicher Fortpflanzung nicht (DIR, Jahrbuch 1999). Es steht zur Diskussion, dass hierfür neben methodisch bedingten Problemen vor allem numerische Chromosomenanomalien der Oozyten entscheidend sind.

Gemäß dem Gesetz zum Schutz von Embryonen (Embryonenschutzgesetz vom 13.12.1990) ist in Deutschland die Durchführung einer Präimplantationsdiagnostik zum Nachweis chromosomaler Anomalien an menschlichen Embryonen verboten und deren Selektion nicht möglich. Im rechtlichen Konsens könnte aber eine Verbesserung der Schwangerschaftsraten durch die zytogenetische Analyse des 1. Polkörperchens erreicht werden. Dabei würde eine Erkennung aneuploider Oozyten vor der Befruchtung ermöglicht und diese könnten aus dem weiteren Fertilisationsverfahren ausgeschlossen werden.

Die Kenntnisse über die Entstehung von Aneuploidien im Verlauf der Fortpflanzung sind relativ gering. Wichtige Hinweise haben Mikrosatellitenanalysen ergeben, mit denen die elterliche Herkunft der Aneuploidien ermittelt wurde. Generell zeigte sich dabei, dass die meisten autosomalen Trisomien auf meiotische Verteilungsstörungen in der Oogenese zurückzuführen sind. Charakteristisch ist dabei die starke Abhängigkeit des Auftretens von Trisomien vom mütterlichen Alter, doch scheinen auch prädisponierende genetische Faktoren und exogene Faktoren eine gewisse Rolle

zu spielen (Cozzi et al., 1999; Sperling und Neitzel, 2000).

Mit der Einführung der ovariellen Stimulation mit anschließender IVF oder ICSI in die Sterilitätstherapie wurden reife humane Eizellen für wissenschaftliche Untersuchungen verfügbar, da nach erfolgter Insemination bzw. Mikroinjektion nicht alle Oozyten befruchtet werden oder in einigen Fällen ungeteilt bleiben. Diese Keimzellen verlieren während ihrer weiteren Kultivierung jegliches Entwicklungspotential, ermöglichen aber die direkte Analyse von weiblichen Gameten hinsichtlich chromosomaler Anomalien meiotischen Ursprungs. Zytogenetische Untersuchungen von humanen Eizellen sind aber mit spezifischen Schwierigkeiten und Fehlermöglichkeiten behaftet. In der vorliegenden Arbeit versuchen wir, einen Überblick über die Möglichkeiten und Grenzen der derzeitigen Analysetechniken zu verschaffen. Des weiteren sollen die daraus gewonnenen Erkenntnisse zusammengefasst und zukünftige Entwicklungsmöglichkeiten aufgezeigt werden.

Die meiotische Eizellreifung (Oogenese)

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

durch die Existenz eines großen, blasigen Nukleus gekennzeichnet, in welchem das chromosomale Material lokalisiert ist und der auch als Keimzellbläschen oder Germinalvesikel (GV) bezeichnet wird.

Die Fortsetzung der Meiose wird durch die präovulatorische Gonadotropinausschüttung induziert. Es erfolgt mit dem Ausschleusen des 1. Polkörperchens die Trennung der homologen Chromosomen und damit die Reduktion auf einen haploiden Chromosomensatz (sekundäre Oozyte). Während der letzten Stadien der Follikelreifung und der Ovulation bleiben die Chromosomen ausgereifter Eizellen in der Metaphase II (MII) arretiert. Erst der Penetrationsvorgang eines Spermatozoons bei der Befruchtung löst den Abschluss der zweiten meiotischen Teilung mit der Ausbildung des 2. Polkörperchens aus (Veeck, 1999).

Die zytogenetische Analyse meiotischer Eizellchromosomen

Bislang wurde im Rahmen zahlreicher zytogenetischer Studien der Versuch unternommen, die Art und Häufigkeiten von strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen bei unbefruchteten Oozyten nach IVF oder ICSI zu bestimmen. Hierbei wurden verschiedene Untersuchungsverfahren wie konventionelle Homogenfärbungen und Chromosomenbänderungstechniken sowie die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) eingesetzt (Dailey et al., 1996; Boiso et al., 1997; Cozzi et al., 1999; Eckel et al., 2000). Fasst man die Ergebnisse aus der Literatur zusammen, so zeigt sich, dass die verschiedenen Arbeiten extrem differierende Anomalieraten aufweisen. Eine Variationsbreite von unter 10 % bis zu über 60% lässt die Vermutung zu, dass nicht nur endogene biologische Prozesse diese Variabilität herbeiführen, sondern dass auch präparations- und auswertungsbedingte Analysefehler einen möglichen Grund für diese großen Unterschiede darstellen (Michelmann und Tavmergen, 1991; De Sutter und Dhont, 1994; Boiso et al., 1997).

Fehlermöglichkeiten bei der Untersuchung von Chromosomen humaner Eizellen ergeben sich unabhängig von

der angewandten zytogenetischen Analysetechnik allein schon durch die Herkunft und Gewinnung des Untersuchungsmaterials. Das derzeit geltende Embryonenschutzgesetz besagt unter anderem, dass die Befruchtung einer Eizelle mit der Syngamie der Vorkerne abgeschlossen ist und von diesem Zeitpunkt an das geschützte Embryonalstadium beginnt. Somit können wissenschaftliche Untersuchungen an unbefruchteten menschlichen Eizellen nur durchgeführt werden, wenn zweifelsfrei feststeht, dass eine Fertilisation nicht stattgefunden hat. Damit bleibt ein Zeitraum von mindestens 48 Stunden nach Insemination bzw. Mikroinjektion abzuwarten, bevor unbefruchtete Oozyten der Kultur entnommen und fixiert werden dürfen. Durch dieses Vorgehen können Alterungsartefakte nicht sicher ausgeschlossen werden, auch wenn in der Literatur der Einfluss der Kulturdauer auf das chromosomale Material einer Eizelle unterschiedlich bewertet wird (Kamiguchi et al., 1993; Dailey et al., 1996; Lim und Tsakok, 1997; Angell, 1997). Desweiteren sind die meiotischen Teilungen von humanen Oozyten während einer IVF- oder ICSI-Behandlung nicht mit Colcemid oder Colchicin arretiert worden. Demzufolge ist der chromosomale Kondensationsstatus, der sich nach einer Kulturdauer von 48 Stunden zeigt, zufällig und heterogen. Je nach Entwicklungsstatus unmittelbar vor oder nach der meiotischen Metaphase II erscheinen die Chromosomen extrem kondensiert und kompakt oder de-kondensiert mit Trennungen in den Zentromerbereichen. Weiterhin resultieren hierbei neben Metaphasen mit optimaler Chromosomenverteilung auch Präparate, bei denen die Eizellchromosomen eng beieinander liegen, sich zum Teil überschneiden und sich dadurch nicht in ihre einzelnen Chromatiden differenzieren lassen. Eine zusätzliche Schwierigkeit bei der Analyse von Oozyten ist das Vorhandensein von Chromosomen unterschiedlicher Herkunft. Die Chromosomen der Eizelle können mit denen von Spermatozoen oder Polkörperchen vermischt werden, so dass eine eindeutige Identifizierung der Eizellchromosomen erschwert bzw. in der Mehrzahl der Fälle nicht möglich ist.

Neben den unterschiedlichen Fehlermöglichkeiten, die beim Analysieren auftreten können, ist zu bedenken, dass in der Regel pro Behandlungszyklus eine nur relativ geringe Anzahl von Eizellen unbefruchtet bleibt und damit für eine Chromosomenanalyse verfügbar wird. Hinzu kommt, dass diese Zellen zumeist von Patientinnen mit Sterilität unterschiedlichster Genese stammen und dies die Vergleichbarkeit der einzelnen Untersuchungsergebnisse einschränkt. Angesichts dieser Schwierigkeiten und aufgrund der kleinen Fallzahlen sind die Möglichkeiten einer umfangreichen statistischen Absicherung der erhobenen Daten begrenzt und damit bleibt in vielen Fällen die korrekte Einschätzung der Ergebnisse von Chromosomenanalysen menschlicher Eizellen problematisch.

Aneuploidien und mögliche Entstehungsmechanismen

Die Mehrzahl der für die Präparation von Eizellchromosomen angewandten Methoden sind modifizierte Verfahren einer Fixiertechnik, welche ursprünglich von Tarkowski (1966) beschrieben wurde. Bei dieser Methode soll eine optimale Chromosomenausbreitung erreicht werden, indem das Zytoplasma der Oozyten bei der Präparation eröffnet wird. Aufgrund der häufigen Zerspaltung von Metaphasen gilt dieses Verfahren jedoch als problematisch, da ein artifizierlicher Verlust von Chromosomen oder Chromatiden während der Eizellpräparation nicht ausgeschlossen werden kann. Dies erschwert die Analyse von Aneuploidien in Oozyten (Kamiguchi et al., 1993; De Sutter und Dhont, 1994). In diesem Zusammenhang bieten schonendere Fixiermethoden eine Verbesserung. So entwickelten Kamiguchi et al. (1976) ein graduelles Präparationsverfahren, bei dem die Eizellen durch drei verschiedene Fixierlösungen passagiert werden. Hierbei sollen die Zytoplasmagrenzen der Oozyten erhalten bleiben und damit das Auftreten artifizierlicher Hypohaploidien unterbunden werden (Kamiguchi et al., 1993; De Sutter und Dhont, 1994). Bei kritischer Durchsicht der Ergebnisse bisheriger Chromosomenanalysen von humanen Eizellen fällt zusätzlich auf, dass in vielen Fällen unspezifische zy-

togenetische Analysetechniken zur Anwendung kamen und damit die daraus erhobenen Daten eine nur begrenzte Aussagekraft besitzen. Während für die Darstellung und Identifizierung von Mitosechromosomen zahlreiche Bänderungsverfahren zur Verfügung stehen, ist eine Bandenfärbung meiotischer Eizellchromosomen aufgrund ihrer kompakten Struktur schwer durchführbar. Somit existieren nur wenige Studien, bei denen die Darstellung gebänderter Metaphase-II-Chromosomen aus unbefruchteten Oozyten gelang und eine präzise Klassifizierung anhand der Bandenmuster vorgenommen werden konnte (Martin et al., 1986; Pellestor und Séle, 1988). Im Rahmen der meisten Untersuchungen wurden die Oozytenchromosomen aber lediglich homogen gefärbt (z.B. Giemsa), gezählt und nach Größe und Zentromerindex gruppiert (Michelmann und Tavmergen, 1991; De Sutter und Dhont, 1994). Bei diesen Analysen traten Aneuploidien von Chromosomen aus der D- und G-Gruppe signifikant häufiger auf (Pellestor, 1991; Plachot 1992). Außerdem führte bei diesen Studien der Nachweis von überzähligen oder fehlenden ganzen Chromosomen in aneuploiden Metaphase-II-arretierten Eizellen zu der Vorstellung, dass eine ausbleibende Trennung (Nondisjunction) homologer Chromosomenpaare während der ersten meiotischen Teilung der Entstehung von numerischen Anomalien in reifen weiblichen Keimzellen zugrunde liegt. Im Gegensatz hierzu konnte Angell nach Auszählung von insgesamt 200 homogengefärbten Metaphasen hyperhaploide MII-Chromosomenkomplemente unbefruchteter Oozyten mit ausschließlich zusätzlichen Einzelchromatiden identifizieren; überzählige ganze Chromosomen waren nicht nachweisbar (Angell 1991, 1997; Angell et al. 1994).

Hinsichtlich des Entstehungsmechanismus von Aneuploidien in weiblichen Gameten entwickelte sich aufgrund dieser Daten die Hypothese, dass sich bereits während der ersten meiotischen Anaphase die Chromatiden betroffener Chromosomen vorzeitig voneinander trennen (Premature Centromere Division = PCD). Deren

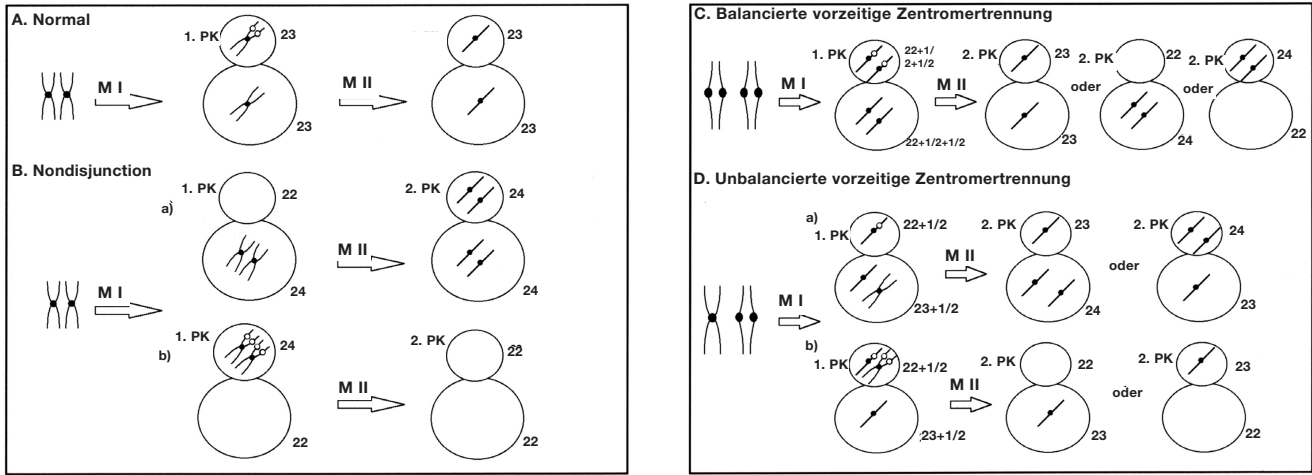


Abb 1 Die weibliche Meiose und mögliche chromosomale Fehlverteilungen während der Eizellreifung

Dargestellt sind die zu erwartenden Signalmuster bei einer präkonzeptionellen Analyse des 1. Polkörperchens mit zentromerspezifischen (schwarz gefüllte Punkte) und Locus-spezifischen FISH-Sonden (ringförmige Punkte). Im Fall einer unbalancierten vorzeitigen Zentromertrennung (D), bei der die Eizelle ein zusätzliches Chromatid enthält (a), ergibt eine zentromerspezifische Sonde nach Hybridisierung des 1. Polkörperchens ein Signal. Auch im Normalfall (A) ist mit einer zentromerspezifischen FISH-Sonde nur ein Signal zu erwarten. Die korrekte Bestimmung der Anzahl der Chromatiden im 1. Polkörperchen durch die Verwendung Locus-spezifischer Sonden ermöglicht hier eine Differenzierung zwischen unauffälligen Oozyten (1. Polkörperchen: 2 Signale) und hyperhaploiden Eizellen mit überzähligen Einzelchromatiden (1. Polkörperchen: 1 Signal) im Rahmen einer präkonzeptionellen Diagnostik.

MI = 1. Meiotische Teilung
 MII = 2. Meiotische Teilung
 1. PK = 1. Polkörperchen
 2. PK = 2. Polkörperchen

Fehlverteilung führt dann nach Abschluss der ersten meiotischen Teilung entweder zu zusätzlichen oder zu fehlenden Einzelchromatiden in den entsprechenden Eizellen. Studien, bei denen in aneuploiden Oozyten sowohl zusätzliche und fehlende ganze Chromosomen als auch einzelne Chromatiden nachgewiesen wurden, führten schließlich zu der Annahme, dass beide Mechanismen zur Entstehung numerischer Chromosomenanomalien in reifen weiblichen Gameten beitragen (Kamiguchi et al., 1993; Lim et al., 1995). Dem gegenüber steht jedoch die Vorstellung, dass die Trennung humaner Eizellchromosomen in ihre Chromatiden mit einer verlängerten Kulturdauer einhergeht und ein degeneratives Merkmal darstellen kann (Kamiguchi et al., 1993; Dailey et al., 1996; Boiso et al., 1997; Lim und Tsakok; 1997).

Im Rahmen neuerer Untersuchungen wurde die Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zur Analyse von meiotischen Eizellchromosomen und Polkörperchen angewendet. Damit eröffnete sich die Möglichkeit, spezifische Chromosomen in weiblichen Gameten nachzuweisen und hinsichtlich numerischer Aberrationen zu untersuchen. Überwiegend kamen hierbei spezifische FISH-Sonden für diejenigen Chromosomen zur Anwendung, welche bei Lebendgeburten und Spontanaborten am häufigsten als Aneuploidien auftreten (Chromosomen X, 13, 21, 16 und 18). Bezüglich des

Entstehungsmechanismus numerischer Chromosomenanomalien erbrachten diese Untersuchungen jedoch keine neuen Resultate, da nach FISH-Analyse unbefruchteter MII-Oozyten und ihrer 1. Polkörperchen eine Fehlverteilung sowohl ganzer Chromosomen als auch einzelner Chromatiden während der ersten meiotischen Teilung nachgewiesen wurde (Dailey et al., 1996; Boiso et al., 1997; Munné et al., 1995, 1998; Cozzi et al., 1999; Eckel et al., 2000)

Zukünftige Entwicklungen

Trotz der zahlreichen Chromosomenanalysen von unbefruchteten menschlichen Eizellen nach IVF oder ICSI und der Anwendung spezifischer zytogenetischer Untersuchungsmethoden vermitteln die Ergebnisse in der Literatur über die Art und Frequenz von Chromosomenanomalien in weiblichen Gameten bislang kein einheitliches Bild. Durch das Fehlen optimaler Chromosomenstrukturen und geeigneter Bänderungsverfahren ist mit den bisher benutzten Präparationstechniken und den konventionellen zytogenetischen Analysemethoden keine deutliche Verbesserung der Auswertungsmöglichkeiten zu erwarten. Hinzu kommt, dass sich Fehler aufgrund von Alterungsartefakten nicht sicher ausschließen lassen, da unbefruchtete Eizellen erst nach einem IVF- oder ICSI-Versuch für wissenschaftliche Studien verfügbar werden. So ist zu erklären, dass Fehler bei der Auswertung von Metaphasen unbefruchteter

reifer Oozyten entstehen und zu variierenden Daten führen können.

Um die Quantität und Qualität der analysierbaren Metaphasen zu erhöhen, ist die Weiterentwicklung der Präparationsverfahren für humane Oozyten wichtig. Schonendere graduelle Fixiertechniken, welche den artifiziellen Verlust von Chromosomen vermeiden sollen, stellen bereits erste Verbesserungen dar. Diese Verfahren sind der Ausgangspunkt für weiterführende Optimierungen im Hinblick auf die Qualität der Präparate. Zur Zeit ist die eindeutige Identifizierung individueller Chromosomen mit konventionellen zytogenetischen Methoden nicht möglich. Diese Unsicherheit der Beurteilung der Ergebnisse löste eine kontroverse Diskussion hinsichtlich des Entstehungsmechanismus numerischer Chromosomenanomalien bei der meiotischen Eizellreifung aus (Angell, 1997). Der klassischen Hypothese, nach der eine ausbleibende Trennung homologer Chromosomenpaare während der ersten meiotischen Teilung zu einer fehlerhaften Verteilung von ganzen Chromosomen auf die Eizelle und ihr 1. Polkörperchen führt, steht die Hypothese gegenüber, dass eine vorzeitige Zentromertrennung überzählige bzw. fehlende Einzelchromatiden zur Folge hat. Inzwischen hat sich die Meinung etabliert, dass beide Mechanismen zur Entstehung von Aneuploidien in weiblichen Gameten beitragen und eine entsprechende Anpassung der Nomenklatur zur korrek-

Abb 2a nur in der Druckversion

Abb 2b nur in der Druckversion

Abb 2 Metaphasen unbefruchteter humaner Eizellen mit unauffälligem Signalmuster für die Locus-spezifischen Sonden LSI 13 (grün) und LSI 21 (rot) (aus Eckel et al., 2000)

A: Die Zuordnung der Hybridisierungssignale zu den korrespondierenden Chromatiden ist möglich.

B: Metaphase einer Eizelle mit nur geringer Chromosomenspreitung

ten Beschreibung abnormer Karyotypen, welche auf eine vorzeitige Zentromertrennung von Chromatiden zurückzuführen sind, wird bereits diskutiert und erscheint sinnvoll (Rosenbusch und Schneider, 2000).

Die Etablierung von Techniken zur FISH ermöglichte erstmals den sicheren Nachweis spezifischer Chromosomen in weiblichen Gameten. Mittlerweile finden diese Verfahren auch bereits in der Praxis bei der Sterilitätsbehandlung durch die Methoden der assistierten Fertilisation ihre Anwendung, um anhand der zytogenetischen Analyse von 1. Polkörperchen aneuploide Eizellen zu identifizieren und vor einem Befruchtungsversuch zu selektieren (Munné et al. 1995, 1998; Verlinsky et al. 1996, 1998, 1999). Es fällt auf, dass hierbei zumeist zentromerspezifische FISH-Sonden verwendet werden. Da diese insbesondere bei Chromosomenpräparaten von ge-

ringer Qualität, wie sie für Eizellen und vor allem für Polkörperchen typisch sind, eine zweifelsfreie Differenzierung zwischen ganzen Chromosomen und einzelnen Chromatiden nicht zulassen, erscheinen zentromerspezifische FISH-Proben für die Analyse von Aneuploidien und ihrer Entstehung in Oozyten eher ungeeignet.

Desweiteren bleibt zu bedenken, dass für eine zuverlässige präkonzeptionelle Diagnostik an 1. Polkörperchen die Klärung des zugrundeliegenden Entstehungsmechanismus anhand der Identifizierung überzähliger oder fehlender ganzer Chromosomen und einzelner Chromatiden eine Voraussetzung ist (Abbildung 1). So ist es denkbar, dass sich bei der Polkörperchen-Analyse mit zentromerspezifischen FISH-Sonden aneuploide Eizellen, welche überzählige einzelne Chromatiden enthalten und zu Trisomien nach ihrer Befruchtung führen können, einer

eindeutigen Identifizierung entziehen (Angell, 1994; Egozcue, 1994). Damit erscheint die Anwendung geeigneter FISH-Sonden sowohl für die Chromosomenanalyse von Eizellen als auch für die Durchführung einer zuverlässigen Polkörperchen-Diagnostik unabdingbar.

Im Hinblick auf eine Verbesserung der Auswertungsmöglichkeiten bietet sich in diesem Zusammenhang die Verwendung Locus-spezifischer FISH-Sonden an (Cozzi et al., 1999, Eckel et al., 2000). Im Rahmen der eigenen Untersuchungen wurden die Locus-spezifischen FISH-Sonden LSI 13 und LSI 21 (Fa. Vysis) eingesetzt, um die Anzahl der Chromatiden der Chromosomen 13 und 21 in unbefruchteten Eizellen zu bestimmen und um gleichzeitig zwischen fehlenden oder zusätzlichen ganzen Chromosomen sowie Einzelchromatiden in aneuploiden MII-Oozyten unterscheiden zu können

Anzeige

(Abbildung 2a und 2b). So konnten Aneuploidien der Chromosomen 13 und 21 bei gleichzeitiger Identifizierung des zugehörigen Mechanismus ihrer Entstehung in weiblichen Gameten erfasst werden. Ein weiterer Vorteil, der sich aus der Anwendung der FISH ergibt, ist die Möglichkeit einer zusätzlichen Analyse von Metaphasen mit suboptimaler Chromosomenspreitung und bzw. oder -morphologie (Abbildung 2b). Es bleibt jedoch zu bedenken, dass in diesen Fällen eine eindeutige Zuordnung der Hybridisierungssignale zu den korrespondierenden Chromosomen oder Chromatiden nicht möglich ist. Damit lassen sich artifizielle Signale nicht ausschließen. Insofern erscheint für die Ermittlung zuverlässiger Anomalieraten und im Hinblick auf eine Anwendung Locus-spezifischer FISH-Sonden im Bereich der Polkörperchen-Diagnostik ein weiteres internes Kontrollsystem, wie z.B. die gleichzeitige Hybridisierung einer zweiten Sonde für das gleiche Chromatid, sinnvoll. Die Etablierung entsprechender FISH-Sondenpaare wird zur Zeit in unseren Einrichtungen umgesetzt.

Literatur

1. Abruzzo MA, Hassold TJ (1995) Etiology of nondisjunction in humans. *Environ Mol Mutagen* 25 (Supplement 26): 38-47.
2. Angell RR (1991) Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man. *Hum Genet* 86: 383-387
3. Angell RR (1994) Polar body analysis: Possible pitfalls in preimplantation diagnosis of chromosomal disorders based on polar body analysis. *Hum Reprod* 9:181-182.
4. Angell RR, Xian J, Keith J, Ledger W, Baird DT (1994) First meiotic division abnormalities in human oocytes: mechanism of trisomy formation. *Cytogenet Cell Genet* 65: 194-202.
5. Angell RR (1997) First-meiotic-division nondisjunction in human oocytes. *Am J Hum Genet* 61: 23-32.
6. Boiso I, Marquez C, Veiga A, Munné S (1997) Cytogenetic and fluorescent in situ hybridization analysis of in vitro matured human oocytes. *Assist Reprod Rev* 7: 160-164.
7. Cozzi J, Conn CM, Harper J, Winston RML, Rindl M, Farndon PA, Delhanty JDA (1999) A trisomic germ cell line and precocious chromatid segregation leads to recurrent trisomy 21 conception. *Hum Genet* 104: 23-28.
8. Dailey T, Dale B, Cohen J, Munné S (1996) Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes. *Am J Hum Genet* 59: 176-184.
9. De Sutter P, Dhont M (1994) Unfertilized oocytes after human in vitro fertilization: a review of cytogenetic findings. *Assist Reprod Rev* 4: 178-182.
10. DIR (Deutsches IVF Register). Jahrbuch 1999. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin, Bundesverband Reproduktionsmedizinischer Zentren Deutschlands.
11. Eckel H, Stumm M, Wieacker P, Kleinstein J (2000) Fluorescence in situ hybridization analysis of unfertilized human oocytes using locus-specific DNA probes. *Reproductive Technologies* 10: 142-147.
12. Egozcue J (1994) Polar body analysis: Possible pitfalls in preconception diagnosis of single gene and chromosome disorders. *Hum Reprod* 9: 1208.
13. Embryonenschutzgesetz – EschG in der Fassung der Bekanntmachung vom 13.12.1990 – BGBl.I S.2747.
14. Griffin DK (1996) The incidence, origin, and etiology of aneuploidy. *Int Rev Cytol* 167: 263-296.
15. Kamiguchi Y, Funaki K, Mikamo K (1976) A new technique for chromosome study of murine oocytes. *Proc Japan Acad* 52: 316-319.
16. Kamiguchi Y, Rosenbusch B, Sterzik K, Mikamo K (1993) Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes prepared by a gradual fixation-air drying method. *Hum Genet* 90: 533-541.
17. Lim AST, Ho ATN, Tsakok MFH (1995) Chromosomes of oocytes failing in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 10: 2570-2575.
18. Lim AST, Tsakok MFH (1997) Age-related decline in fertility: a link to degenerative oocytes?. *Fertil Steril* 68: 265-271.
19. Martin RH, Mahadevan MM, Taylor PJ, Hildebrand K, Long-Simpson L, Peterson D, Yamamoto J, Fleetham J (1986) Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes. *J Reprod Fert* 78: 673-678.
20. Michelmann HW, Tavmergen E (1991) Chromosomenanalysen aus unbefruchteten menschlichen Eizellen nach In-vitro-Insemination. *Fertilität* 7: 129-139.
21. Munné S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J, Cohen J (1995) The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod* 10: 1014-1020.
22. Munné S, Bahçe M, Schimmel T, Sadowy S, Cohen J (1998) Case report: chromatid exchange and predivision of chromatids as other sources of abnormal oocytes detected by preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Prenat Diagn* 18: 1450-1458.
23. Pellestor F, Séle B (1988) Assessment of aneuploidy in the human female by using cytogenetics of IVF failures. *Am J Hum Genet* 42: 274-283.
24. Pellestor F (1991) Differential distribution of aneuploidy in human gametes according to their sex. *Hum Reprod* 6: 1252-1258.
25. Plachot M (1992) Cytogenetic analysis of oocytes and embryos. *Ann Acad Med Singapore* 21: 538-544.
26. Rosenbusch B, Schneider M (2000) Predivision of chromosomes in human oocytes: a reappraisal of cytogenetic nomenclature. *Cytogenet Cell Genet* 89: 189-191.
27. Sperling K, Neitzel H (2000) Chromosomopathien. In D Ganten, K Ruckpaul (Hrsg) *Handbuch der molekularen Medizin*, Band 7; Monogen bedingte Erbkrankheiten, Teil 2, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 43-77.
28. Tarkowski AK (1966) An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenet* 5: 394-400.
29. Veeck LL (1999) Gamete maturation. In LL Veeck (Hrsg) *An atlas of human gametes and conceptuses*. The Parthenon Publishing Group, New York, London 15-18.
30. Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Lifchez A, Strom C, Kuliev A (1996) Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of common aneuploidies by polar body fluorescent in situ hybridization analysis. *Fertil Steril* 66: 126-129.
31. Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Valle J, Ginsberg N, Strom C, Kuliev A (1998) Preimplantation diagnosis of common aneuploidies by the first- and second-polar body FISH analysis. *J Assist Reprod Genet* 15: 285-289.
32. Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Valle J, Ginsberg N, Strom C, Kuliev A (1999) Prevention of age-related aneuploidies by polar body testing of oocytes. *J Assist Reprod Genet* 16: 165-169.

Korrespondenzadressen

Dipl. Biol. Heike Eckel
 Klinik für Reproduktionsmedizin
 und Gynäkologische Endokrinologie
 Otto-v.-Guericke-Universität Magdeburg
 Gerhart-Hauptmann-Str. 35
 D-39108 Magdeburg
 Tel +49-391-6717437
 Fax +49-391-6717398
 Heike.Eckel@medizin.uni.magdeburg.de

Dr. rer. nat. Markus Stumm
 Institut für Humangenetik
 Otto-v.-Guericke-Universität Magdeburg
 Leipziger Straße 44
 D-39120 Magdeburg
 Tel +49-391-6715344
 Fax +49-391-6715066
 Markus.Stumm@medizin.uni.magdeburg.de