

# Häufigkeit von Aneuploidien in Gameten und Embryonen beim Menschen

Heike Eckel und Peter Wieacker

Institut für Humangenetik,  
Otto-v.-Guericke-Universität  
Magdeburg

## Zusammenfassung

Zahlreiche Studien belegen, dass das Implantationsversagen von Embryonen nach erfolgter IVF/ICSI-Therapie sowie das Auftreten von Aborten im 1. Trimenon zu einem erheblichen Teil auf spontan entstandene Aneuploidien zurückzuführen ist. Für die Durchführung einer IVF/ICSI-Behandlung liegt daher der Gedanke nahe, durch Polkörperdiagnostik (PKD) aneuploide Eizellen vom Befruchtungsvorgang auszuschließen und damit den Anteil transferierter euploider Embryonen maßgeblich zu erhöhen. Um das Potential eines solchen Verfahrens abzuschätzen, ist es sinnvoll zu klären, wie oft und welche Aneuploidien in Spermien, Eizellen und Embryonen vor und nach ihrer Implantation vorkommen. Der vorliegende Artikel soll hierfür einen theoretischen Überblick liefern.

## Schlüsselwörter

Aneuploidien, Spermien, Eizellen, Präimplantationsembryonen

## Summary

Numerous studies indicate that aneuploidies are a major cause of implantation failure and loss of early embryos. Therefore, it can be suggested that the selection of euploid oocytes by polar body diagnosis may improve the results of IVF/ICSI treatment. For estimating the potential of such a diagnostic procedure it is necessary to clarify the frequencies of aneuploidies in sperms, oocytes and embryos before and after implantation.

## Key words

aneuploidies, sperms, oocytes, preimplantation embryos

## Einleitung

Numerische Chromosomenaberrationen tragen maßgeblich zum Verlust von Embryonen vor und nach der Implantation bei (Sperling und Neitzel, 2000). Dies erklärt u. a. die begrenzten Erfolgsaussichten reproduktionsmedizinischer Maßnahmen wie IVF und ICSI. Für eine Abschätzung, inwieweit Methoden der Präfertilisations- und Präimplantationsdiagnostik zu einer Verbesserung dieser Situation beitragen können, ist die Häufigkeit von Aneuploidien in Gameten und Embryonen entscheidend.

## Numerische Chromosomenaberrationen in Spermien

In männlichen Keimzellen liegt das chromosomale Material in Form von stark kondensiertem Chromatin vor. Erst nach der Penetration einer Eizelle bilden sich Chromosomenstrukturen in Spermien aus. Daher werden erst in diesem Stadium die Chromosomen des paternalen haploiden Genoms sichtbar. Die Tatsache, dass zonafreie Hamstereizellen die Penetration menschlicher Spermien erlauben und über eizellspezifische Faktoren verfügen, die eine Dekondensierung des Spermienchromatins und die Ausbildung chromosomaler Strukturen ermöglichen, führte zur Entwicklung des Hamsteroovum-Penetrations(HOP)-Tests. Mit Hilfe dieses Tests wurde es möglich, menschliche Spermienchromosomen zu präparieren und unter Anwendung konventioneller Färbetechniken zytogenetisch zu analysieren (Rudak et al., 1978).

Zahlreiche Untersuchungen zur Karyotypisierung von Spermienchromosomen wurden mit Hilfe des HOP-Tests durchgeführt. So liegen über 20.000 Spermienkaryotypen von phänotypisch unauffälligen Probanden vor. Danach sind ca. 10% der Spermien phänotypisch unauffälliger Männer chromosomal aberrant. Größtenteils handelt es sich hierbei um strukturelle Anomalien. Aneuploidien dagegen waren nur in 1%-4% der Spermien nachweisbar (Übersicht bei: Guttenbach et al., 1997).

Ein zentraler Kritikpunkt dieser Methode ist, dass bei der Durchführung des HOP-Tests eine Selektion gegen chromosomal aberrante Spermien nicht auszuschließen ist. Dies könnte möglicherweise ein Grund für die relativ niedrigen Aneuploidieraten sein, die aus den vorliegenden Daten dieser frühen Untersuchungen hervorgegangen sind. In neueren Studien wird diese Problematik durch die Anwendung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) umgangen, da die Analyse direkt am Chromatin fixierter Spermienköpfe erfolgt und chromosomale Strukturen zum Nachweis von Aneuploidien nicht notwendig sind. Ein weiterer Vorteil ist, dass eine viel höhere Anzahl von Spermien durch FISH untersucht werden kann. Dies wird eindrucksvoll deutlich anhand von Schätzungen, die besagen, dass weltweit bereits über 5.000.000 Spermien von ca. 500 Probanden mittels Ein-, Zwei- oder Drei-Farben-FISH untersucht wurden (Shi und Martin, 2000). Vergleicht man die Ergebnisse, dann zeigt sich auch hier eine relativ niedrige Frequenz von numerischen Chromosomenanomalien. So wird die durchschnittliche Disomierate für jedes Autosom bei nur 0,1%-0,2% angegeben (Shi und Martin, 2000). Signifikant höhere Disomieraten werden mit 0,29% für das Chromosom 21 und mit 0,25%-0,43% für die Geschlechtschromosomen genannt (Spriggs et al., 1996; Shi und Martin, 2000). Diese Werte können zwar als ein Hinweis für das häufigere Auftreten von Aneuploidien der Chromosomen 21, X und Y in Spermien interpretiert werden, dennoch ist festzuhalten, dass die angegebenen Diso-

mieraten unterhalb von 1% liegen und damit relativ gering bleiben. Es gilt als erwiesen, dass keine Korrelation zwischen numerischen Chromosomenanomalien in Spermien und dem väterlichen Alter besteht (Gardner und Sutherland, 2004). Angesichts der Tatsache aber, dass es sich bei den männlichen Patienten, die sich einer Sterilitätsbehandlung durch IVF/ICSI unterziehen, zu einem großen Teil um solche handelt, die ein Oligoasthenoteratozoospermie (OAT)-Syndrom aufweisen, sollte der Einfluss von Parametern wie Spermienkonzentration, -motilität und -morphologie auf das Auftreten von Aneuploidien betrachtet werden.

#### **Zusammenhang zwischen Aneuploidiehäufigkeiten in Spermien und veränderten Spermioigrammparametern**

Es gibt mittlerweile eine Fülle an Studien, die sich mit dem Zusammenhang zwischen Chromosomenaneuploidien und morphologisch abnormalen Spermien beschäftigen. Allerdings konnte bisher kein einheitliches Ergebnis erzielt werden. Während Bernardini und Mitarbeiter (1998) beispielsweise eine erhöhte Disomie-13-Rate in den Spermien von Patienten, die besonders viele Keimzellen mit pathologischer Morphologie aufwiesen, beobachten konnten, wurde in anderen Arbeiten keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Disomiefrequenz von Chromosom 13, 16 sowie 21 und der Spermienmorphologie gefunden (Rives et al., 1999). Ebenso uneinheitlich sind die Beobachtungen zum Zusammenhang zwischen der Spermienmotilität und der Aneuploidiehäufigkeit. Auch hier gibt es Untersuchungen, die keine signifikante Korrelation zwischen diesen beiden Parametern herstellen können (Rives et al., 1999).

Bei Durchsicht der Literatur lässt sich am ehesten ein Zusammenhang zwischen einer verringerten Spermienkonzentration und einer erhöhten Aneuploidierate erkennen (Finkelstein et al., 1998; Rives et al., 1999; Asada et al., 2000). Weiterhin gibt es Arbeiten, die bei OAT-Patienten eine Korrelation zwischen allen drei betrachteten Parametern (Spermienkonzentration,

-motilität und -morphologie) und einer erhöhten Aneuploidiefrequenz nachweisen (Ditzel und Gläser, 2003). Aufgrund dieser Resultate wird spekuliert, dass eine gestörte Paarung der Meiosechromosomen sowohl zur Oligoasthenozoospermie als auch zu Nondisjunction-Ereignissen führen könnte (Martin, 1996). Dennoch bleibt zu bedenken, dass die angegebenen durchschnittlichen Aneuploidieraten für Spermien von OAT-Patienten relativ gering sind und beispielsweise für die Chromosomen 13, 16 und 21 einen Wert von 3% nicht überschreiten (Ditzel und Gläser, 2003). In Fällen von OAT-Syndrom konnten zudem Ditzel und Gläser (2003) zeigen, dass allein durch die mikroskopische Vorselektion von Spermien nach den Kriterien gute Morphologie und Motilität die Aneuploidie- und Diploidierate signifikant gesenkt werden kann. Aufgrund dieser Beobachtungen darf man annehmen, dass das Risiko einer Weitergabe von paternalen Aneuploidien während einer IVF/ICSI-Behandlung, die durch fest etablierte Präparationstechniken eine Selektion von gut beweglichen Spermien mit unauffälliger Morphologie einschließt, eher verringert wird.

#### **Numerische Chromosomenaberrationen in Oozyten**

Im Vergleich mit männlichen Keimzellen ist die Datenmenge, die zur Art und Häufigkeit von Aneuploidien in Oozyten vorliegt, geringer und weniger einheitlich und daher auch schwieriger einzuschätzen. Erst mit der Einführung der ovariellen Stimulation und 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, ermöglichten aber erstmals die direkte Analyse einer Vielzahl von weiblichen Gameten hinsichtlich chromosomaler Anomalien meiotischen Ursprungs. Da es sich bei diesen Eizellen üblicherweise um reife Oozyten in der Metaphase II

handelt (MII-Oozyten), gibt ihre zytogenetische Analyse Aufschluss über chromosomale Fehlverteilungen, die während der ersten meiotischen Reifeteilung entstanden sind.

Erste Publikationen über zytogenetische Untersuchungen an Oozyten, die unbefruchtet aus einer IVF/ICSI-Behandlung hervorgegangen sind, erschienen Anfang der achtziger Jahre. Inzwischen dürften mehr als 50 Studien zu dieser Thematik vorliegen. Vergleicht man die Daten, so zeigt sich, dass die verschiedenen Arbeiten extrem differierende Anomalieraten aufweisen (8%-59%) und zu widersprüchlichen Aussagen bezüglich des Einflusses unterschiedlicher Faktoren wie z.B. mütterliches Alter oder Art der ovariellen Stimulation kommen (Pellestor et al., 2002). Ein möglicher Grund für diese unterschiedlichen Resultate dürfte die oftmals doch sehr geringe Anzahl analysierter Oozyten sein, die in den einzelnen Untersuchungen vorgestellt wird. Ein weiterer Grund ist, dass die Präparation von vollständigen Metaphasen aus Oozyten problematisch ist und zahlreiche Fehlermöglichkeiten bei der Auswertung von Eizellchromosomen auftreten können (Eckel et al., 2001). Hinzu kommt, dass der Entstehungsmechanismus von Aneuploidien in Eizellen über längere Zeit unklar war und dies Unsicherheiten in der Bestimmung von numerischen Chromosomenaberrationen in Oozyten zur Folge hatte. Im Sinne eines klassischen Nondisjunction bestand die Vorstellung, dass eine ausbleibende Trennung homologer Chromosomenpaare während der ersten meiotischen Teilung zu aneuploiden MII-Oozyten mit überzähligen oder fehlenden ganzen Chromosomen führt. Dieser Mechanismus wurde über lange Zeit als einzige Ursache für die Entstehung von Aneuploidien in Oozyten gehalten. Erst mit den Untersuchungen von Roslyn R. Angell (1991) entwickelte sich eine zweite Vorstellung, nach der es in der Metaphase I zu einer vorzeitigen Trennung von Chromosomen in ihre Einzelchromatiden (PCD, premature centromere division) kommt, die anschließend fehlverteilt werden. In diesem Fall resultieren aneuploide MII-Oozyten mit fehlenden oder zusätz-

lichen Einzelchromatiden. Mittlerweile gilt es als erwiesen, dass beide Mechanismen d.h. eine Fehlverteilung ganzer Chromosomen sowie einzelner Chromatiden zur Entstehung von numerischen Chromosomenaberrationen in Eizellen beitragen (Pellestor et al., 2002).

Trotz des sehr uneinheitlichen Bildes, welches die Literatur zur Häufigkeit von Aneuploidien in weiblichen Gameten vermittelt, geht man heute davon aus, dass ca. 20%-25% der Eizellen chromosomal aberrant sind, wobei ungefähr die Hälfte eine numerische Chromosomenaberration trägt (Gardner und Sutherland, 2004). Nach neueren Arbeiten von Pellestor und Mitarbeitern (2002; 2003), bei denen eine besonders große Anzahl von Oozyten ( $n = 1397$ ) zytogenetisch untersucht wurde, beträgt die Aneuploidierate für unbefruchtete Oozyten sogar 20%. Hierbei konnte gezeigt werden, dass numerische Aberrationen aller Chromosomengruppen entstehen können, wobei Aneuploidien der Gruppen E und G signifikant häufiger auftreten und der Anteil an Aneuploidien der Chromosomengruppen A und B signifikant geringer ist (Pellestor et al., 2002). Hinzu kommt, dass numerische Aberrationen durch Fehlverteilungen von Einzelchromatiden signifikant häufiger auftreten als solche, die auf eine klassische Fehlverteilung ganzer Chromosomen zurückzuführen sind (Pellestor et al., 2002; 2003). Ein weiteres sehr wichtiges Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass eine hochsignifikante Korrelation zwischen dem mütterlichen Alter und dem Auftreten von Einzelchromatid-Aneuploidien nachgewiesen werden konnte (Pellestor et al., 2003). Man darf demnach schlussfolgern, dass eine vorzeitige Zentromertrennung und Fehlverteilung von Einzelchromatiden in Eizellen der entscheidende Mechanismus für die Entstehung altersbedingter Aneuploidien weiblichen Ursprungs ist.

#### **Die zytogenetische Analyse meiotischer Eizellchromosomen**

Für die differentielle Darstellung und Identifizierung von Mitosechromosomen stehen im Bereich der zytogenetischen Diagnostik zahlreiche Bände-

rungsverfahren zur Verfügung. Es hat sich allerdings gezeigt, dass eine Bandenfärbung meiotischer Eizellchromosomen nur schwer durchzuführen ist, da diese eine extrem kompakte Struktur aufweisen (Übersicht bei: Eckel et al., 2001). Folglich 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 (z.B. Pellestor et al. 2002; 2003). Eine Folge der eingeschränkten Möglichkeiten zur Bandenfärbung war, dass im Rahmen der meisten Untersuchungen an Eizellen die Chromosomen lediglich homogen gefärbt (z.B. Giemsa), gezählt und nach Größe und Zentromerindex gruppiert wurden (z.B. Angell 1991). Ein Nachweis spezifischer Aneuploidien ist mit diesen konventionellen Techniken allerdings nicht möglich und eine korrekte Differenzierung zwischen ganzen Chromosomen und Einzelchromatiden, die für die Bestimmung des Entstehungsmechanismus von numerischen Aberrationen notwendig ist (s.o.), wird insbesondere in Fällen von kleineren Chromosomen erschwert.

Im Rahmen neuerer Untersuchungen wurde auf molekularzytogenetische Verfahren zurückgegriffen und die FISH zur Analyse von meiotischen Eizellchromosomen und Polkörpern eingesetzt. Damit eröffnete sich die Möglichkeit, spezifische Chromosomen in weiblichen Gameten nachzuweisen und hinsichtlich numerischer Aberrationen zu untersuchen (Eckel et al., 2003a). Überwiegend kamen hierbei FISH-Sonden für diejenigen Chromosomen zur Anwendung, welche bei Lebendgeburten oder Spontanaborten häufig als Aneuploidien auftreten (z.B. Chromosomen 13, 16, 18, 21 und X). In einer Studie von Mahmood und Mitarbeitern (2000) beispielsweise werden die FISH-Ergebnisse von 127 unbefruchteten Oozyten und 52 Polkörpern vorgestellt. Die Zellen stammten von insgesamt 127 IVF-Patientinnen mit einem durchschnittlichem Alter von 33 Jahren. Unter Einsatz von sieben FISH-Sonden wurden die Chromosomen 1, 9, 13, 16, 18, 21 und X untersucht. Hierbei konnten in

9 der insgesamt 127 untersuchten Eizellen (7%) Hyperhaploidien nachgewiesen werden (Disomien 13, 16, 18, 21, X), wobei 5 Oozyten von einer Disomie 21 betroffen waren. Anhand dieser Untersuchungen wird allerdings deutlich, dass ein wesentlicher Nachteil von Mehrfarben-FISH-Studien darin besteht, dass die Anzahl der gleichzeitig einsetzbaren Sonden und damit nachweisbaren Chromosomen begrenzt ist. Da nur eine Zelle untersucht wird, ergibt sich zudem ein erhöhtes Risiko für falsch-positive und falsch-negative Befunde. Aus eigenen Mehrfarben-FISH-Untersuchungen an Eizellchromosomen ist außerdem bekannt, dass die Gefahr eines artifiziellen Verlustes von FISH-Signalen (FISH "drop out") vorhanden ist, was teilweise durch Hybridisierung mit mehreren Single-Locus-Sonden für das entsprechende Chromosom behoben werden kann (Eckel et al., 2003b).

Um Aneuploidien aller Chromosomen nachweisen zu können, besteht die Möglichkeit einer Vielfarben-FISH-Karyotypisierung mittels Spectral Karyotyping (SKY-FISH) oder Multicolor-FISH (M-FISH). Diese Verfahren bieten zwar den Vorteil einer gesamtgenomischen Analyse durch FISH, setzen aber eine ausreichende Anzahl gut analysierbarer und überlagerungsarmer Metaphasen voraus, die bei der Untersuchung von Eizellen nur sehr selten zu Verfügung stehen. Dies führt zu einer nur sehr geringen Rate an auswertbaren Chromosomenpräparaten aus Oozyten (z.B. 37% bei Sandalinas et al., 2002). Eine weitere Möglichkeit, numerische Aberrationen aller Chromosomen zu erfassen, bietet das Verfahren der vergleichenden gesamtgenomischen Hybridisierung (CGH). Prinzipiell wird hierbei die genomische DNA der zu untersuchenden Zellen und eine Referenz-DNA mit unterschiedlichen Markersystemen markiert und in einem 1:1-Verhältnis auf Metaphasen, die einen normalen Chromosomensatz aufweisen, hybridisiert. Es folgt die Detektion mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen. Die Fluoreszenzintensitäten der beiden Signale werden mit Hilfe eines speziellen Computerprogrammes berechnet und ins Ver-

hältnis gesetzt. Anhand der Quotienten können dann Verluste sowie Gewinne chromosomalen Materials und infolgedessen auch numerische Aberrationen bestimmt werden. Um diese Technik für die Analyse von Einzelzellen wie z.B. Eizellen oder Polkörpern anwenden zu können, ist zuvor die Amplifikation der genomischen DNA notwendig. In den meisten Arbeiten wird hierfür das Verfahren der PCR mit degenerierten Oligonukleotid-Primern (DOP-PCR) herangezogen (Wells et al., 2002; Gutiérrez-Mateo et al., 2004). Interessante Daten über CGH-Analysen an Eizellen liefert insbesondere eine Studie von Gutiérrez-Mateo und Mitarbeitern (2004), die 25 MII-Oozyten sowie ihre ersten korrespondierenden Polkörper untersucht haben. Die Autoren berichten von einer vergleichsweise hohen Aneuploidierate von 48% (n=12). Zudem weisen sie darauf hin, dass mit einer FISH-Untersuchung für die Chromosomen 1, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22 und X nur 8 der 12 aneuploiden Oozyten erkennbar gewesen wären. Damit wäre das Ergebnis nach FISH eine verringerte Aneuploidiefrequenz von nur 32% gewesen. Die untersuchten MII-Oozyten wurden hier unreif, d.h. im Metaphase I-Stadium gewonnen und in vitro nachgereift. Die damit einhergehende verlängerte Kulturzeit kann zu morphologischen Veränderungen der Meiosespindel führen und eine erhöhte Aneuploidiefrequenz zur Folge haben. Dennoch sprechen die erhobenen CGH-Daten dafür, dass sehr wahrscheinlich alle menschlichen Chromosomen in Eizellen zu einer Aneuploidie führen können und daher eine gesamtgenomische Analyse sinnvoll ist, um zu realistischeren Aneuploidieraten zu gelangen. Zu bedenken bleibt, dass es sich bei der Einzelzell-CGH-Methode um ein äußerst aufwendiges und kontaminationsanfälliges Verfahren handelt, welches zudem mit einem hohen zeitlichen Aufwand von 3-5 Tagen pro Analyse verbunden ist (Wells et al., 2002; Gutiérrez-Mateo et al., 2004). Dies macht den Einsatz der CGH als Routineverfahren bei einer PKD und selbst bei einer Präimplantationsdiagnostik problematisch, da hier engere Zeitrahmen vorgegeben sind, währenddessen die Diagnostik abge-

schlossen sein sollte. Für wissenschaftliche Untersuchungen zum Nachweis von Chromosomenstörungen an weiblichen Gameten dürften allerdings weiter entwickelte CGH-Verfahren wie Matrix-CGH künftig einen wichtigen Stellenwert einnehmen.

Es bleibt anzumerken, dass alle Daten, die zur Art und Häufigkeit von Chromosomenaberrationen in Eizellen vorliegen, durch Herkunft und Gewinnung des Untersuchungsmaterials beeinflusst werden. Wissenschaftliche Analysen an weiblichen Gameten werden in der Mehrzahl nur an Oozyten durchgeführt, die unbefruchtet aus einer IVF/ICSI-Behandlung hervorgegangen sind. Damit wird eine Negativselektion des Zellmaterials vorgenommen. Zudem sollte aus ethischen Gründen zweifelsfrei feststehen, dass keine Fertilisation stattgefunden hat. Eine verlängerte Kulturdauer ist die Folge, so dass Alterungsartefakte nicht ausgeschlossen werden können. Außerdem stammen die Eizellen zumeist von Sterilitätspatientinnen unterschiedlichster Genese und oftmals von Frauen, die ein erhöhtes Alter aufweisen. Auch wenn die zytogenetische Analyse von unbefruchteten Oozyten nach IVF/ICSI einen wichtigen Stellenwert zum Verständnis der Entstehung von Chromosomenaberration in weiblichen Gameten einnimmt, so bleibt die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus den genannten Gründen eingeschränkt und die korrekte Einschätzung der Daten erschwert.

#### **Numerische Chromosomenaberrationen in Embryonen vor Implantation**

Geht man bei Eizellen von einer durchschnittlichen Aberrationsrate von 20% aus und bei Spermien von 10%, dann ergibt sich bei ausgewogenem Fertilisationsspotential der Gameten rein rechnerisch eine Aberrationshäufigkeit von 28% für Zygoten. Die in vitro Kultur von menschlichen Embryonen ermöglicht eine direkte Analyse. So konnten Zenses und Casper (1992) in einer Übersicht Aberrationsfrequenzen für Präimplantationsembryonen angeben, die sich im Bereich von 23% bis 40% bewegen. Hierbei wurden die Ergeb-

nisse zytogenetischer Untersuchungen an Embryonen zusammengefasst, die aus Spendereizellen hervorgegangen waren und eigens für Forschungszwecke kultiviert wurden. Daher sind die Fallzahlen dieser frühen Studien relativ gering.

Seit der Entwicklung von Verfahren zur Präimplantationsdiagnostik an Blastomeren liegen umfangreichere Angaben über die Häufigkeit von Chromosomenaberrationen bei präimplantatorischen Embryonen vor. Auch wenn es sich hier um selektierte Fälle (von Sterilitätspatienten abstammend) handelt, so ermöglichen diese Daten einen wichtigen Einblick in die Häufigkeit von Aneuploidien in Embryonen vor ihrer Implantation. FISH-Untersuchungen, die zum Ausschluss von numerischen Aberrationen der Chromosomen 13, 16, 18, 21, 22, X und Y an insgesamt 62 Embryonen durchgeführt wurden, ergaben eine Aneuploidiefrequenz von 19% (Pellicier et al., 1999). Allerdings wurde gezeigt, dass in präimplantatorischen Embryonen noch weitere Chromosomen von einer Aneuploidie betroffen sein können. So traten im Rahmen einer Präimplantationsdiagnostik von 194 Embryonen numerische Anomalien der Chromosomen 1, 15, 17 und 22 am häufigsten auf (Bahçe et al., 1999). Die Autoren schlussfolgerten anhand ihrer FISH-Daten, dass nicht unbedingt diejenigen Aneuploidien, welche einen Spontanabort zur Folge haben, auch diejenigen seien, die zu einer Verminderung der Implantationsraten führen. Andere numerische Anomalien wie die der Chromosomen 1 und 17 könnten einen Verlust von Embryonen entweder vor oder unmittelbar nach der Implantation verursachen.

Mittlerweile hat sich die Vorstellung etabliert, dass alle Chromosomengruppen von einer Aneuploidie betroffen sein können. Insofern ist die CGH als gesamtgenomische Analysetechnik eine sehr wichtige Methode, um zu realistischen Angaben über die Häufigkeit von Aneuploidien in Präimplantationsembryonen zu gelangen. Ergebnisse von CGH-Analysen an einzelnen Blastomeren liegen z.B. mit der Arbeit von Voullaire und Mitarbei-

tern (2000) vor. Die Autoren haben 63 Blastomeren von insgesamt 12 Embryonen untersucht und festgestellt, dass nur ein Viertel der Embryonen in allen untersuchten Blastomeren chromosomal unauffällig war. Dabei lagen die nachgewiesenen Aneuploidien in der Mehrzahl als Mosaik vor. Gleiche Beobachtungen wurden auch von anderen Autoren gemacht. Man erklärt sich dieses Phänomen mit einer Checkpoint-Kontrolle, die bei den ersten Zellteilungen noch nicht wirkungsvoll funktioniert und postzygotisch zu Mosaikkonstitutionen oder vollkommen aberranten (chaotischen) Karyotypen führt (Sperling und Neitzel, 2000).

Die Weiterentwicklung zur Blastozyste bis hin zur erfolgreichen Implantation wird heute als eine hochselektive Phase betrachtet, währenddessen zahlreiche chromosomal aberrante Präembryonen in ihrer Entwicklung arretieren. Man nimmt an, dass auf diesem Weg die Weitergabe der meisten Monosomien und letalen Trisomien sowie chaotischen Karyotypen verhindert wird (Gardner und Sutherland, 2004). Diejenigen Chromosomenaberrationen, die eine Weiterentwicklung zulassen, unterliegen dann Selektionsmechanismen, die nach der Implantation greifen und schließlich zu Spontanaborten führen. Ferner ist zu berücksichtigen, dass nur ein kleiner Teil der Blastomeren sich zu embryonalen bzw. fetalen Zellen entwickelt, während der überwiegende Anteil später zum Trophoblast beiträgt.

#### **Numerische Chromosomenaberrationen in Embryonen nach Implantation**

Von allen klinisch erkannten Schwangerschaften enden ca. 10%-15% in einem Abort, zumeist im Verlauf des 1. Trimenons. Die Rolle genetischer Faktoren kann teilweise durch die zytogenetische Analyse von Abortmaterial (Chorionzotten oder fetale Fibroblasten) beurteilt werden. Entsprechende Untersuchungen belegen, dass bei Spontanaborten im 1. Trimenon in etwa 50% der Fälle mit Chromosomenanomalien zu rechnen ist. Bei Aborten im 2. Trimenon liegen in ca. 25% der Fälle chromosomale Aberra-

tionen vor. Die Wirksamkeit dieser pränatalen Selektion zeigt sich ferner daran, dass die Häufigkeit von Chromosomenaberrationen bei Neugeborenen auf 0,6 % reduziert ist (Übersichten bei: Sperling und Neitzel 2000, Wieacker et al. 2002).

Bei Aborten werden am häufigsten autosomale Trisomien der Chromosomen 13, 15, 16, 18, 21 und 22 beobachtet, unter denen die Trisomie 16, die bei ca. 16% aller chromosomal auffälligen Aborte auftritt, den größten Anteil stellt. Weitere häufige Aberrationen bei Aborten mit Chromosomenstörungen sind Tri- und Tetraploidien (22%) sowie die Monosomie X (20%). Bekannt ist zudem, dass eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Häufigkeit chromosomal bedingter Aborte und dem Alter der Schwangeren besteht, wobei diese altersabhängige Zunahme von Chromosomenstörungen vor allem auf die steigenden Häufigkeiten von Trisomien zurückzuführen ist (Wieacker et al., 2002).

Unter den Lebendgeburten treten Aneuploidien mit einer Frequenz von 0,3%-0,4% auf (Sperling und Neitzel, 2000; Gardner und Sutherland, 2004). Hierbei handelt es sich vor allem um Trisomien. Monosomien des X-Chromosoms (Turner-Syndrom) kommen in der Häufigkeit von ca. 1 : 2.500-5.000 Neugeborenen vor (Gaulden, 1992). Bei Lebendgeburten sind die gonosomalen Aneuploidien fast ebenso häufig wie die autosomalen.

Hinsichtlich des Potentials der Polkörperdiagnostik (PKD) muss berücksichtigt werden, welche Aneuploidien maternalen und welche paternalen Ursprungs sind. Zudem sollte für diejenigen Fälle von numerischen Aberrationen, die während der Oogenese entstehen, geklärt sein, ob sie auf Fehler in der Meiose I oder in der Meiose II zurückzuführen sind. Eine Übersicht von Abruzzo und Hassold (1995) liefert hierfür aufschlussreiche Daten. Die Autoren haben die Ergebnisse von Mikrosatellitenanalysen zusammengefasst, die an über 800 trisomen Feten oder Lebendgeborenen durchgeführt wurden und Abschluss über die elterliche Herkunft der nachgewiesenen Trisomien ge-

ben. Es zeigt sich, dass der überwiegende Anteil autosomaler Trisomien maternalen Herkunft ist. Für die Trisomie 16 konnte kein Fall paternalen Ursprungs nachgewiesen werden; für die Trisomien 13, 15, 18 und 21 lag der Anteil mütterlichen Ursprungs bei 87%-96%. Des weiteren zeigen die durchgeführten Untersuchungen, dass es sich bei den meisten autosomalen Trisomien um chromosomale Fehlverteilungen handelt, die überwiegend während der weiblichen Meiose I stattgefunden haben. Eine Ausnahme stellt die Trisomie 18 dar, die überwiegend auf Segregationsfehler während der weiblichen Meiose II zurückzuführen ist.

Anhand der vorliegenden Resultate zur Herkunft von Aneuploidien lässt sich zusammenfassend ableiten, dass der überwiegende Anteil autosomaler Trisomien aufgrund ihrer maternalen Herkunft durch PKD nachweisbar sein sollte, wenn alle Chromosomen erfasst werden. Die Untersuchung des 2. Polkörpers, die aus technischen und zeitlichen Gründen schwierig ist, wäre wünschenswert, da hiermit auch diejenigen Aneuploidien angezeigt werden können, die während der Meiose II entstehen. Chromosomale Mosaik und auch komplexe Aneuploidien allerdings, die ganz offensichtlich in einem signifikanten Anteil der frühen präimplantatorischen Embryonen vorkommen und postzygotisch entstehen (s.o.), bleiben durch eine PKD nicht erfassbar.

#### Literatur

Abruzzo MA, Hassold TJ (1995) Etiology of non-disjunction in humans. *Environ Mol Mutagen* 25 (Supplement 26): 38-47.

Angell RR, Ledger W, Yong EL, Harkness L, Baird DT (1991) Cytogenetic analysis of unfertilized human oocytes. *Hum Reprod* 6: 568-573.

Asada H, Sueoka K, Hashiba T, Kuroshima A, Kobayashi N, Yoshimura Y (2000) The effects of age and abnormal sperm count on the nondisjunction of spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 17: 51-59.

Bahçe M, Cohen J, Munné S (1999) Preimplantation genetic diagnosis on aneuploidy: were we looking at the wrong chromosomes? *J Assist Reprod Genet* 16: 176-181.

Bernardini L, Borini A, Preti S, Conte N, Flamigni C, Capitanio GL, Venturini PL (1998) Study of aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men. *Hum Reprod* 13: 3406-3413.

Ditzel N, Gläser B (2003) Zusammenhang zwischen Spermiogrammparametern und chromosomalen Anomalien in Spermien. *Reproduktionsmedizin* 19: 294-300.

Eckel H, Kleinstein J, Wieacker P, Stumm M (2001) Die zytogenetische Analyse von nicht fertilisierten Oozyten – Möglichkeiten und Grenzen. *Med Genet* 13: 25-30.

Eckel H, Stumm M, Kleinstein J, Wieacker P (2003a) FISH-Analysen an unbefruchteten Eizellen – Möglichkeiten und Grenzen. *Reproduktionsmedizin* 19: 48-54.

Eckel H, Kleinstein J, Wieacker P, Stumm M (2003b) Multi-locus (ML)-FISH is a reliable tool for nondisjunction studies in human oocytes. *Cytogenet Genome Res* 103: 47-53.

Finkelstein S, Mukamel E, Yavetz H, Paz G, Aviv L (1998) Increased rate of nondisjunction in sex cells derived from low-quality semen. *Hum Genet* 102: 129-137.

Gardner RJM, Sutherland GR (2004) Chromosome abnormalities and genetic counseling. Third edition. Oxford University Press.

Gaulden ME. (1992) Maternal age effect: the enigma of Down syndrome and other trisomic conditions. *Mutat Res* 296: 69-88.

Gutiérrez-Mateo C, Wells D, Benet J, Sánchez-García JF, Bermúdez MG, Belil I, Egozcue J, Munné S, Navarro J (2004) Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. *Hum Reprod* 19: 2118-2125.

Guttenbach M, Engel W, Schmid M (1997) Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosome aberrations. *Hum Genet* 100: 1-21.

Mahmood R, Brierley CH, Faed MJW, Mills JA, Delhanty JDA (2000) Mechanisms of maternal aneuploidy: FISH analysis of oocytes and polar bodies in patients undergoing assisted conception. *Hum Genet* 106: 620-626.

Martin RH (1996) The risk of chromosomal abnormalities following ICSI. *Hum Reprod* 11: 924-925.

Pellestor F, Andréo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J (2002) Mechanisms of non-disjunction in female meiosis: the co-existence of two modes of malsegregation evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes. *Hum Reprod* 17: 2134-2145.

Pellestor F, Andréo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J (2003) Maternal aging and chromosomal abnormalities: New data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Hum Genet* 112: 195-203.

Pellicier A, Rubion C, Vidal F, Mínguez Y, Giménez C, Egozcue J, Remohí J, Simón C (1999) In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage: an analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos. *Fertil Steril* 71: 1033-1039.

Rives N, Saint Clair A, Mazurier S, Silbert L, Simeon N, Joly G, Mace B (1999) Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. *Hum Genet* 105: 266-272.

Rudak E, Jacobs PA, Yanagimachi R (1978) Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature* 274: 911-913.

Sandalinas M, Márquez C, Munné S (2002) Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes. *Mol Hum Reprod* 8: 580-585.

Shi Q, Martin RH (2000) Aneuploidy in human sperm: A review of the frequency and distribution of aneuploidy, effects and donor age and lifestyle factors. *Cytogenet Cell Genet* 90: 219-226.

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.

Spriggs EL, Rademaker AW, Martin RH (1996) Aneuploidy in human sperm: The use of multicolor FISH to test various theories of nondisjunction. *Am J Hum Genet* 58: 356-362.

Voullaire L, Slater H, Williamson R, Wilton L (2000) Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet* 106: 210-217.

Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JDA, Munné S (2002) First clinical application of comparative genomic hybridization on polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril* 78: 543-549.

Wieacker P, Jakubiczka S, Volleth M (2002) Genetische Aspekte von Aborten. *Reproduktionsmedizin* 18: 83-87.

Zenzes MT, Casper RF (1992) Cytogenetics of human oocytes, zygotes, and embryos after in vitro fertilization. *Hum Genet* 88: 367-375.

#### Korrespondenzadressen

Prof. Dr. med. Peter Wieacker  
Institut für Humangenetik  
Otto-v.-Guericke Universität Magdeburg  
Leipziger Str. 44  
D-39120 Magdeburg  
Tel. 0049-391-6715064  
Fax 0049-391-6715066  
Peter.Wieacker@Medizin.Uni-Magdeburg.de

Dr. rer. nat. Heike Eckel  
Gemeinschaftspraxis Dr. med. M. Bloechle  
und Dr. med. S. Marr in Praxisgemeinschaft  
mit Dr. med. B. Roth  
Rankestr. 34  
10789 Berlin  
Tel. 0049-30-21 90 92 0  
Fax 0049-30-21 90 92 99  
eckelheike@aol.com