

Aus der Frauenklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. J. Dietl

**Mutationen im Leukaemia Inhibitory Factor (LIF)-Gen
bei wiederholtem Implantationsversagen nach
extrakorporaler Befruchtung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Stephanie Wiest
aus Kiel

Würzburg, Dezember 2004

Referent: Professor Dr. med. T. Steck

Korreferent: Professor Dr. med. H. Höhn

Dekan: Professor Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 03. Mai 2005

Die Promovendin ist Ärztin

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1. Kinderlosigkeit: Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.1 Definitionen: Sterilität und Infertilität	1
1.1.2 Ursachen für Sterilität und Infertilität	2
1.1.3 Idiopathische Sterilität	3
1.2 Reproduktionsmedizin	4
1.2.1 In-vitro-Fertilisation und Embryotransfer (IVF-ET)	4
1.2.1.1 IVF-ET: Indikationen	5
1.2.1.2 IVF-ET: Technischer Ablauf	5
1.2.1.3 IVF-ET: Kryokonservierung	6
1.2.2 Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) und ihre Indikationen	7
1.2.3 IVF/ICSI-ET: Ergebnisse	7
1.2.4 IVF/ICSI-ET: Ursachen für Misserfolge	8
1.3 Implantation	9
1.3.1 Implantationsvorgang	9
1.3.2 Implantationsversagen	10
1.3.2.1 Endometriale Rezeptivität	10
1.3.2.2 Immuntoleranz	11
1.3.2.3 Steuerung der Implantation	12
1.3.2.3.1 Hormonelle Regulation der Implantation	12
1.3.2.3.2 Regulation der Implantation durch lokale Faktoren	12
1.4 Zytokine	13
1.4.1 Definition und Funktionen	13
1.4.2 Zytokine und ihre Rolle bei der menschlichen Reproduktion	14
1.5 Leukaemia Inhibitory Factor (LIF)	16
1.5.1 LIF: Definition und Eigenschaften	16
1.5.2 LIF-Gen	16
1.5.3 LIF und seine Funktionen: Pleiotropie	17
1.5.4 LIF-Rezeptor	19
1.5.4.1 LIF-Rezeptor und Signaltransduktion	19
1.5.4.2 LIF-Rezeptor: Basis für Pleiotropie und Redundanz verwandter Zytokine	20

1.5.5 LIF und seine Rolle bei der Fortpflanzung.....	21
1.5.5.1 LIF im Tiermodell der Fortpflanzung	22
1.5.5.2 LIF und menschliche Fortpflanzung	23
1.5.5.3 Endometriale LIF-Produktion	23
1.5.5.3.1 Hormonelle Regulation der endometrialen LIF-Produktion	25
1.5.5.3.2 Regulation der endometrialen LIF-Produktion durch Zytokine	26
1.5.5.4 LIF und embryonale Entwicklung.....	26
1.5.5.5 LIF und Implantation.....	27
1.5.5.6 LIF und Implantationsversagen	29
1.6 Fragestellung und Ziele der Studie.....	31

2. Patientinnen, Material und Methoden 33

2.1 Patientinnen und Kontrollgruppe.....	33
2.1.1 Einschlusskriterien und Charakteristika der Patientinnen	33
2.1.2 Einschlusskriterien der Kontrollgruppe.....	35
2.1.3 Genehmigung der Studie und Einwilligungserklärung	36
2.1.4 Materialsammlung	36
2.2 Mutationsanalyse	37
2.2.1 Definitionen	37
2.2.1.1 Mutation	37
2.2.1.2 Polymorphismus	38
2.2.2 Gewinnung genomischer DNA aus Leukozyten der EDTA-Blutproben	38
2.2.3 Alkoholische Fällung der DNA.....	39
2.2.4 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA	39
2.2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation des LIF-Gens.....	40
2.2.5.1 PCR: Reaktionsprinzip	40
2.2.5.2 PCR: Auswahl der Primer	42
2.2.5.3 PCR-Programm zur Amplifikation des LIF-Gens.....	43
2.2.5.4 Gel-Elektrophorese von DNA	44
2.2.5.5 Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte des LIF-Gens	46
2.2.6 SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)-Analyse	47
2.2.6.1 Theoretische Grundlagen der SSCP-Analyse.....	47

2.2.6.2 SSCP-Analyse der PCR-Produkte des LIF-Gens	50
2.2.6.3 Silberimprägnierung zur Darstellung der DNA-Banden	52
2.2.7 DNA-Sequenzierung zur Identifizierung auffälliger SSCP-Banden	53
2.2.7.1 Grundlagen der Sequenzierung	53
2.2.7.2 Gewinnung gereinigter DNA.....	55
2.2.7.3 Sequenzierung der LIF-Gen-Abschnitte.....	55
2.2.8 DNA-Datenbank	56
2.3 Statistische Analysen	56

3. Ergebnisse **57**

3.1 Patientinnen: Diagnosen	58
3.2 Mutationsanalyse des LIF-Gens: Ergebnisse	60
3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	60
3.2.2 SSCP-Analyse	61
3.2.3 Sequenzierung	64
3.2.3.1 Nachweis des LIF-Gen-Polymorphismus G3453T bei einer Patientin	64
3.2.3.2 Nachweis des LIF-Gen-Polymorphismus C3235T in der Kontrollgruppe.....	65
3.2.3.3 Kein Nachweis von Mutationen im LIF-Gen	65
3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	66
3.4 Statistische Auswertung	67
3.5 Folgedaten	67

4. Diskussion **69**

4.1 Patientinnenauswahl und Implantationspotential	70
4.1.1 Sterilitätsdiagnose und Implantationspotential.....	71
4.1.2 Zusätzliche Sterilitätsfaktoren und Implantationspotential	72
4.1.3 Alter der Patientinnen und Partner und Implantationspotential	74
4.1.4 Patientinnenauswahl und LIF-Gen-Mutationen	75
4.1.5 IVF/ICSI-Behandlung und Implantationspotential	76
4.1.5.1 Stimulationsbehandlung und Implantationspotential	77
4.1.5.2 Embryotransfer und Implantationspotential	78

4.1.5.3 Kryokonservierung und Implantationspotential	79
4.1.5.4 Anzahl der IVF/ICSI-Versuche und Implantationspotential	80
4.2 PCR-SSCP-Analyse zur Detektion von Mutationen im LIF-Gen	80
4.2.1 PCR als Amplifikations-Methode	80
4.2.2 Methoden der Mutationsanalyse.....	81
4.2.3 PCR-SSCP-Analyse als Screening-Methode	82
4.2.4 Sensitivität der PCR-SSCP-Analyse	83
4.2.4.1 Fragmentlänge und Sensitivität der PCR-SSCP-Analyse	83
4.2.4.2 Elektrophoresebedingungen und Sensitivität der PCR-SSCP-Analyse.....	84
4.2.4.3 Sequenzeigenschaften und Sensitivität der PCR-SSCP-Analyse.....	85
4.2.5 Spezifität der PCR-SSCP-Analyse	86
4.2.6 PCR-SSCP: Methode der Wahl für den Nachweis von LIF-Gen-Mutationen?	87
4.3 Ursachen von LIF-Mangel und Implantationsversagen	88
4.3.1 LIF-Gen-Mutationen und LIF-Mangel.....	88
4.3.2 IVF/ICSI-Behandlung und LIF-Mangel.....	90
4.3.2.1 Gestörte hormonelle Regulation der LIF-Expression bei IVF/ICSI.....	90
4.3.2.2 Defekte im Zytokin-Netzwerk bei Infertilität und IVF/ICSI.....	90
4.3.3 LIF-Rezeptor-/Signaltransduktionsstörungen und LIF-Mangel.....	91
4.4 Klinische Bedeutung von LIF und Konsequenz für die IVF/ICSI-Behandlung	93
4.4.1 Therapeutische Anwendung des LIF-Proteins	94
4.4.2 Diagnostische Anwendung des LIF-Proteins	96
4.5 Schlussfolgerung	97

5. Zusammenfassung **99**

6. Literaturverzeichnis **102**

7. Anhang **116**

7.1 Abkürzungsverzeichnis	116
7.2 Reagenzien und Geräte.....	120
7.2.1 Hersteller	120
7.2.2 Geräte.....	120

7.2.3 Gefäße, Pipetten, Elektrophoresematerial	121
7.2.4 Reagenzien.....	121
7.2.4.1 DNA-Isolation	121
7.2.4.2 PCR.....	122
7.2.4.3 SSCP.....	122
7.2.4.4 Sequenzierung	123
7.3 Patientenaufklärung und -einwilligung	124
7.4 Embryonenschutzgesetz	125

1. Einleitung

Die Fortschritte in der Reproduktionsmedizin konnten in den vergangenen 25 Jahren vielen ungewollt kinderlosen Paaren den ersehnten Kinderwunsch erfüllen. Dennoch bleiben Versuche einer „künstlichen Befruchtung“ immer wieder erfolglos. Als mögliche Ursache wird vor allem ein Versagen des Implantationsvorganges verantwortlich gemacht. Diese Phase der menschlichen Reproduktion unterliegt einer komplizierten Steuerung durch eine Vielzahl von Faktoren, die bislang noch nicht bis ins Detail aufgeklärt werden konnte. Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) spielt eine zentrale Rolle bei der Implantationskontrolle. Tierversuche zeigten, dass bei einem Mangel an LIF, verursacht durch Mutationen im LIF-Gen, die Implantation des Embryos ausbleibt (168). In dieser Arbeit wurde die Prävalenz von Mutationen im LIF-Gen bei Frauen mit wiederholtem Versagen einer IVF/ICSI-Behandlung untersucht.

1.1 Kinderlosigkeit: Epidemiologie und Ätiologie

Kinderlosigkeit stellt ein bedeutendes Gesundheitsproblem dar und übt auf die Betroffenen einen großen sozialen und psychischen Leidensdruck aus (104, 183). Die WHO schätzt, dass weltweit 80 Millionen Menschen von Infertilität betroffen sind, wobei die Infertilitätsraten der einzelnen Länder von weniger als 5% bis mehr als 30% variieren (183). Bis zu 5% aller Geburten sind in einigen europäischen Ländern Ergebnis einer assistierten Reproduktion (183).

Neben sexuell übertragbaren Infektionskrankheiten mit der Folge tubarer Sterilität in den betroffenen Entwicklungsländern trägt in den Industriestaaten unter anderem der durch veränderte gesellschaftliche Bedingungen immer später aufkommende Kinderwunsch zur Zunahme der Kinderlosigkeit bei, da die Fertilität gleichzeitig physiologisch mit zunehmendem Alter abnimmt.

1.1.1 Definitionen: Sterilität und Infertilität

Von einer sterilen Partnerschaft spricht man, wenn bei bestehendem Kinderwunsch und regelmäßiger Kohabitation ohne Antikonzeption innerhalb von zwei Jahren keine klinisch fassbare Schwangerschaft eingetreten ist, die mit der Implantation der befruchteten Eizelle beginnt (WHO). Definitionsgemäß wird zwischen den Begriffen Sterilität und Infertilität unterschieden. Sterilität bezeichnet das Unvermögen einer Frau

zu konzipieren bzw. das Unvermögen eines Mannes, eine fertile Frau zu befruchten. Besteht jedoch nach erfolgter Konzeption die Unfähigkeit, eine Schwangerschaft bis zur Geburt eines lebensfähigen Kindes auszutragen, spricht man von Infertilität. In der angelsächsischen Literatur wird generell von „infertility“ gesprochen.

1.1.2 Ursachen für Sterilität und Infertilität

Mögliche Ursachen für Kinderlosigkeit liegen in einer gestörten Anatomie oder Physiologie des weiblichen oder männlichen Reproduktionssystems, in Defekten der Gametogenese, des Spermien- und Eizelltransports, der Befruchtung, der Zygotenwanderung, der Implantation und der Embryoentwicklung. In einer sterilen Partnerschaft finden sich die Sterilitätsgründe zu ungefähr je einem Drittel beim Mann, bei der Frau oder bei beiden Partnern. Addieren sich gleichzeitig mehrere fertilitätsstörende Faktoren bei Frau und Mann, vermindert sich die Wahrscheinlichkeit für eine Spontanschwangerschaft weiter.

Bei der Frau sind hypothalamisch-hypophysäre Störungen (z.B. Hyperprolaktinämie, Tumore), ovarielle Ursachen (Gonadendysgenese, Ullrich-Turner-Syndrom, Zysten, Tumore), tubare, uterin-zervikale und vaginale Hindernisse (Stenosen/Synechien, Verschluss, Adhäsionen, Dysmukorrhö), psychosoziale Faktoren (Dyspareunie, Vaginismus, Libidoverlust, Konflikte) oder extragenitale Ursachen (Schilddrüsen-, Nebennierenrindenfunktionsstörungen, Diabetes mellitus, Adipositas) mögliche Gründe für eine Sterilität.

Auf Seiten des Mannes liegen bei Sterilität möglicherweise ebenfalls hypothalamisch-hypophysäre Störungen (Hypophyseninsuffizienz/-tumore) vor oder es zeigen sich testikuläre Ursachen (Klinefelter-Syndrom, Testosteronbiosynthesedefekt, Spermatogenesestörung, Anorchie/Kryptorchismus, vorausgegangene Infektionen, Traumen, Radiatio), Hindernisse in den Samenwegen (Obstruktion z.B. nach Infektion oder beim Vorliegen einer CFTR-Mutation) oder am äußeren Genitale (Hypospadie, Phimose), immunologische Defekte (Spermatozoen-Antikörper), psychisch-funktionelle Störungen (erektile Dysfunktion) oder extragenitale Ursachen (Hyperöstrogenämie z.B. bei Leberschaden). Vor jeder invasiven Diagnostik bei der Frau ist die Abklärung der Fertilität des Partners anhand eines SpermioGRAMMS erforderlich, das nach WHO-Kriterien beurteilt wird (Tab. 1.1) (190).

Bezeichnung	Befund
Aspermie	kein Sperma
Azoospermie	keine Spermatozoen im Ejakulat
Kryptozoospermie	< 1Mio. Spermatozoen/ml
Oligozoospermie	< 20Mio. Spermatozoen/ml
Polyzoospermie	>250Mio. Spermatozoen/ml
Asthenozoospermie	<50% progressiv motile Spermatozoen
Teratozoospermie	<30% normale Formen

Tab. 1.1: Pathologische Befunde im Spermogramm (nach WHO 1992 (190)).

Bei andrologischer Sterilität liegt häufig eine Kombination aus Oligo-, Astheno- und Teratozoospermie vor (OAT-Syndrom). Nach der Spermienzahl wird das OAT-Syndrom in drei Schweregrade eingeteilt (190):

OAT I: $\geq 10-20 \times 10^6/\text{ml}$

OAT II: $5-10 \times 10^6/\text{ml}$

OAT III: $< 5 \times 10^6/\text{ml}$ (<20% progressive Motilität, <10% normale Morphologie).

1.1.3 Idiopathische Sterilität

Sind alle Maßnahmen der klinischen Standarddiagnostik ohne ätiologische Klärung der Sterilität ausgeschöpft und primäre Therapiemöglichkeiten erfolglos, kann vom Vorliegen einer idiopathischen Sterilität ausgegangen werden. Ungefähr 10-15% der infertilen Paare sind davon betroffen (63).

Die für die Entstehung einer Schwangerschaft wesentlichen Schritte der Eiaufnahme durch die Tuben, des Eitransports, der Wechselwirkungen zwischen Embryo und Tubenschleimhaut oder Endometrium und schließlich des Implantationsvorganges sind in ihren molekularen Einzelheiten bislang nur unzureichend aufgeklärt. Somit handelt es sich bei dem Phänomen der idiopathischen Sterilität vermutlich um ein Produkt der fehlenden spezifischen Diagnostik. Insbesondere genetische Defekte sollen den meisten Fällen idiopathischer Sterilität zugrunde liegen, wie viele Tiermodelle anhand der Identifizierung von Schlüsselereignissen und Defekten in der Reproduktionsphysiologie zeigen konnten (104).

1.2 Reproduktionsmedizin

Kann der Kinderwunsch nicht auf natürlichem Weg erfüllt werden, existieren in Abhängigkeit von der zugrundeliegenden Sterilitätsursache eine Vielzahl von therapeutischen Möglichkeiten. Ihre Durchführung wird durch die Richtlinien der Bundesärztekammer geregelt, ethische Grundlagen legt das Deutsche Embryonenschutzgesetz von 1991 fest (7, Deutsches Embryonenschutzgesetz 1991 im Anhang, S. 125).

Zu den Methoden der assistierten Reproduktion zählt man folgende Techniken: Bei der IUI (Intrauterine Insemination) wird natives, aufbereitetes Sperma des Partners (homologe IUI) oder eines Spenders (heterologe IUI) periovulatorisch über einen dünnen Katheter ins Uteruskavum eingebracht. Indikationen sind vaginale oder zervikale Hindernisse der Frau oder Einschränkungen der Spermaqualität. Da bei diesem Vorgehen eine Störung der Spermien-Eizell-Interaktion nicht beurteilbar ist, sollten nach drei optimalen Inseminationszyklen ohne Erfolg alternative reproduktionsmedizinische Methoden zur Anwendung kommen.

Beim GIFT (Gamete intrafallopian transfer) erfolgt die Fertilisation der Oozyten in der Eileiterampulle, nachdem maximal drei Eizellen nach ovarieller Stimulation laparoskopisch durch Follikelpunktion entnommen und zusammen mit den Spermatozoen durch das Ostium in die Eileiterampulle eingebracht wurden. Varianten dieses Vorgehens sind der ZIFT und der EIFT (Zygote/Embryo intrafallopian transfer), bei welchen eine bereits in vitro befruchtete Eizelle nach einem Tag (Zygote) oder zwei Tagen (Embryo) auf dieselbe Art und Weise transferiert wird. Angesichts der Modifikation der In-vitro-Fertilisation (IVF) durch die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) mit deutlich besseren Erfolgsraten haben diese Methoden jedoch nur noch geringe Bedeutung.

1.2.1 In-vitro-Fertilisation und Embryotransfer (IVF-ET)

1978 berichteten der Physiologe Edwards und der Gynäkologe Streptoe in England erstmals von der Geburt eines Kindes, das außerhalb des Mutterleibes in vitro gezeugt wurde (169). Die Grundlagen des von ihnen entwickelten Verfahrens der In-vitro-Fertilisation, bei der eine Eizelle und eine Samenzelle extrakorporal im Reagenzglas vereinigt und als Embryo in die Gebärmutter eingeführt werden, erfahren seither eine intensive Fortentwicklung und Verbesserung der Behandlungsergebnisse.

1.2.1.1 IVF-ET: Indikationen

Die ursprüngliche Indikation für die Durchführung einer IVF-Behandlung war die tubare Sterilität, also ein Tubenverschluss oder fehlende Tuben. Zusätzlich stellen die andrologische, die immunologische und die idiopathische Sterilität relative Indikationen dar. Voraussetzung für den Behandlungserfolg sind ein normaler Uterus und funktionsfähige Ovarien.

Der therapeutische Nutzen der IVF-Behandlung liegt darin, dass in ihrem Rahmen Störfaktoren der physiologischen Reproduktionsvorgänge wie eine gestörte Tubenfunktion sowie die physiologische Verminderung der Spermienzahl auf dem Weg durch den weiblichen Genitaltrakt umgangen werden. Die Spermienqualität wird verbessert und die Fertilisationsbedingungen werden optimiert. Für die idiopathische Sterilität bedeutet dies, dass auch latent bestehende Störfaktoren auf ein Minimum reduziert werden.

1.2.1.2 IVF-ET: Technischer Ablauf

Der IVF-Prozess lässt sich in vier Phasen gliedern: Kontrollierte ovarielle Stimulation (1), Follikelpunktion (2), Fertilisation (3) und Embryotransfer (4).

(1) Um gleichzeitig mehrere befruchtungsfähige Oozyten zu gewinnen, werden zunächst die Ovarien ab dem 3. Zyklustag durch die Gabe von Clomiphen, FSH oder HMG überstimuliert. Clomiphen bewirkt als Antiöstrogen über die Aufhebung der negativen Rückkopplung die vermehrte hypophysäre Freisetzung der Gonadotropine. HMG-Präparate enthalten sowohl FSH als auch LH und stimulieren direkt die Reifung mehrerer Follikel. Da es durch die gleichzeitige Östradiolsekretion mehrerer Follikel zu einem vorzeitigen LH-Anstieg und zur Ovulation mehrerer unreifer Eizellen reduzierter Qualität kommen würde, wird die hypophysäre Sekretion zuvor mit der Gabe von GnRH-Agonisten ab dem 20. Tag des vorausgehenden Zyklus supprimiert („Down-Regulation“ über das „Lange Protokoll“). Um den Gonadotropinanstieg zu Beginn der GnRH-Behandlung zu supprimieren, wird zusätzlich ein Gestagen verabreicht.

Die Stimulationsbehandlung verbessert zum einen durch die größere Anzahl geeigneter Oozyten über eine erhöhte Fertilisations- und Embryotransferrate die Chancen auf eine Schwangerschaft. Zum anderen ist die Follikelpunktion durch die exakt gesteuerte Ovulation zeitlich genau planbar und leichter mit der endometrialen Rezeptivität zu

synchronisieren, was deutlich seltener Abbrüche eines IVF-Zyklus zur Folge hat und die IVF-Erfolgsraten erhöht (182).

(2) Wenn sonographisch mehrere sprungreife Follikel vorliegen, wird am Tag 12 HCG verabreicht, dessen LH-ähnliche Wirkung die Ovulation auslöst. Noch vor der spontanen Ovulation erfolgen am Tag 14 die sonographisch gesteuerte transvaginale Follikelpunktion und die Inkubation der so gewonnenen Oozyten.

(3) Die Insemination erfolgt mit durch Masturbation gewonnenen, motilen, vorinkubierten Spermatozoen (ca. 100.000 pro Eizelle). Nach 15–20h befinden sich die imprägnierten Eizellen im Pronukleusstadium. Die eigentliche Fertilisation wird mit der Vereinigung der Vorkerne, also des genetischen Materials von Eizelle und Spermium, und der Entstehung eines Embryos abgeschlossen.

(4) Der Embryotransfer findet im 4-8-Zell-Stadium nach zwei Tagen statt. Zur Verminderung des Mehrlingsrisikos werden höchstens drei Embryos über einen Katheter transvaginal in das Uteruskavum eingebracht.

Um die Transformation des Endometriums als wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Implantation sicherzustellen, wird die bei stimulierten Zyklen verkürzte Lutealphase durch wiederholte HCG-Injektionen unterstützt, bis die HCG-Produktion durch den Trophoblasten selbst erfolgt (7. Tag p.o.), oder über zwei Wochen vaginal Progesteron appliziert. Ist innerhalb von zehn Tagen nach dem Transfer eine HCG-Konzentration von $\geq 50 \text{ U/l}$ als Zeichen einer erfolgreichen Trophoblastimplantation messbar, liegt biochemisch eine normale Frühschwangerschaft vor. Eine klinische Schwangerschaft besteht beim sonographischen Nachweis eines Schwangerschaftsprodukts in der 7. Woche (182).

1.2.1.3 IVF-ET: Kryokonservierung

Durch die ovarielle Stimulationsbehandlung überzählig gewonnene Eizellen können im Pronukleusstadium eingefroren werden. Ihr Transfer ist nach Wiederauftauen, Kultur und abgeschlossener Verschmelzung ihrer Kerne in einem Spontanzyklus vier Tage nach dem LH-Anstieg ohne erneute Stimulation möglich (Kryo-ET/KET). Eizellen im Pronukleusstadium überstehen den Kryokonservierungsprozess besser als nicht imprägnierte Eizellen (7).

1.2.2 Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) und ihre Indikationen

Bei diesem Verfahren wird als Modifikation der konventionellen IVF-Behandlung zur Befruchtung ein isoliertes Spermatozoon mit Hilfe einer feinen Glaskapillare direkt in das Zytoplasma der Eizelle injiziert. So können Störungen der Fertilisation aufgrund von reduzierter Spermienqualität sowie von Spermien-Eizell-Interaktionsstörungen umgangen werden. Seit der ersten Geburt eines Kindes nach ICSI in Belgien 1992 hat sich diese Technik rasant weiterentwickelt und gilt als erfolgreichste, einzig effektive, aber auch sehr invasive Reproduktionsmethode für Paare mit schwerer andrologischer Sterilität (OAT III) oder wiederholt erfolglosen Versuchen einer konventionellen IVF-Behandlung (7, 129).

1.2.3 IVF/ICSI-ET: Ergebnisse

Seit 1982 werden von den deutschen Reproduktionsmedizin-Zentren Daten zur Qualitätssicherung und Beurteilung der Therapieergebnisse im Deutschen IVF-Register (DIR) gesammelt und dokumentiert (46). Die stetigen Fortschritte in der Methodik steigerten die Erfolgsraten der IVF/ICSI-Behandlung und haben sie zu einer weltweit verbreiteten und erfolgreichen Therapie bei Sterilität gemacht. Noch 1998, mit Beginn der vorliegenden Studie, lagen die Erfolgsraten der assistierten Reproduktion auf dem Niveau der natürlichen Schwangerschaftsrate von 25% (DIR 1998, Tab. 1.2). Dagegen liegt die derzeitige Schwangerschaftsrate nach IVF knapp unter 27% pro Embryotransfer (Tab. 1.2) (46). Die Geburtenrate ist definiert als Anzahl der Geburten bezogen auf die Anzahl der durchgeführten Transfere, für ihre Berechnung wird eine Mehrlingsgeburt als eine einzige Geburt gezählt (182). Die tatsächliche Geburtenrate ist durch das leicht erhöhte Risiko für eine Extrauterin gravidität und durch die Abortrate auf ca. 17% reduziert. Mit höheren Fertilisierungsraten als bei der konventionellen IVF und ähnlichen Implantationschancen werden durch ICSI Schwangerschaftsraten von über 27% pro Embryotransfer erzielt (Tab. 1.2) (46). Der Abfall der Schwangerschaftsraten mit dem Lebensalter der Frau verdeutlicht die Notwendigkeit einer frühen Diagnostik und Anwendung der für die Indikation effektivsten Therapie.

Rate (%)	Methode	1998	2002
Schwangerschaftsrate	IVF	25,88	26,84
	ICSI	26,20	27,21
	KET	15,96	17,67
Geburtenrate	IVF		17,49
	ICSI		19,79
	KET		10,28

Rate (%)	Alter	IVF (2002)	ICSI (2002)
Schwangerschaftsrate	<31. LJ	31,34	30,92
	31.-35.LJ	29,35	28,88
	36.-40. LJ	23,07	23,88
	>40. LJ	10,55	9,54

Tab. 1.2: Erfolgsraten nach assistierter Reproduktion, prospektiv und retrospektiv erfasste Daten (DIR 1998/2002, 46).

1.2.4 IVF/ICSI-ET: Ursachen für Misserfolge

Obwohl insbesondere die extrakorporalen Schritte einer IVF/ICSI-Behandlung wie die Stimulationsbehandlung der Ovarien, die transvaginale Follikelpunktion zur Eizellgewinnung, die Spermaaufbereitung, die Gametenkultivierung, die Fertilisierung, die Embryokultivierung, der Embryotransfer und die Kryokonservierung durch ständige Weiterentwicklung optimiert wurden, bleibt die Rate erfolgreich induzierter Schwangerschaften gering.

Auch unter natürlichen Bedingungen kann nicht jede Eizelle befruchtet werden und nicht jeder Embryo ein. Die natürliche Schwangerschaftsrate liegt bei nur 20 bis 25% pro Zyklus (45). Angesichts der physischen und psychischen Belastungen für alle Betroffenen sowie des Aufwandes und der Kosten für das Gesundheitssystem ernüchtern dabei die ähnlich niedrigen Erfolgsraten nach IVF/ICSI-Behandlung, obwohl durch die assistierte Reproduktion optimale Voraussetzungen geschaffen wurden. Als Ursache für einen IVF/ICSI-Misserfolg wird hauptsächlich ein Implantationsversagen nach dem Embryotransfer vermutet, das durch mindestens drei erfolglose IVF-Versuche definiert ist (63). Die Störung dieses komplexen, hormonell gesteuerten immunologischen Ereignisses führt zum frühen Verlust der Schwangerschaft.

1.3 Implantation

Die Implantation ist das entscheidende Stadium für die Entstehung einer Schwangerschaft, in dem der Embryo Kontakt zum Endometrium aufnimmt, sich dort einnistet und damit von der mütterlichen Versorgung abhängig wird. Die erfolgreiche Implantation hängt von drei wesentlichen Aspekten ab:

- 1) Die Entwicklung des Embryos zum aktiven Stadium der Blastozyste.
- 2) Die Differenzierung des Endometriums zum rezeptiven Stadium.
- 3) Die Koordination dieser Vorgänge durch die Kommunikation zwischen der Blastozyste und dem Endometrium (19, 163). Versagt diese Synchronisation, resultiert ein Ausbleiben der Implantation.

1.3.1 Implantationsvorgang

Der Implantationsvorgang gliedert sich in die Anlagerung (Apposition), die Anheftung (Adhäsion) und die Penetration (Invasion) des Embryos in das hormonell vorbereitete, rezeptive Endometrium und ist vergleichbar mit der Chemotaxis, Anheftung und Diapedese von Leukozyten durch die Gefäßwand oder mit der Gewebeanvasion von Tumorzellen (122, 145). Das Implantationsfenster als Zeitspanne vom Beginn bis zum Abschluss der Implantation reicht vom 6. bis zum 10. Tag nach Ovulation.

Bis zum Erreichen des definitiven Implantationsortes im Endometrium am 6. Tag p.o. entwickelt sich der Embryo zur Blastozyste. Diese besteht aus einer flüssigkeitsgefüllten Blastozystenhöhle, umgeben von einer äußeren Zellschicht (Trophoblast) und einer inneren Zellmasse (Embryoblast). Nach Abschluss der Blastozystenbildung schlüpft der Embryo unter dem Einfluss östrogenabhängig produzierter proteolytischer Enzyme aus der rigiden, nichtadhäsiven Zona pellucida, die ihn bislang umgeben hat (Hatching). Anschließend verzahnen sich die Mikrovilli im Bereich des basalen Trophoblasten locker mit den Mikroprotrusionen (Pinopodien) des endometrialen Epithels (Apposition). Die breitflächige Verklebung der Blastozyste mit dem Endometrium erfolgt über Kollagen und embryonales onkofetales Fibronectin aus den Trophoblastzellen (Adhäsion).

Im Anschluss wächst der Trophoblast invasiv in das endometriale Stroma, indem er das luminale Endometriumepithel und die Basalmembran durch proteolytische Enzyme auflöst und gleichzeitig eine Apoptose des luminalen Epithels stattfindet. Die Penetration löst die Dezidualisierung des endometrialen Stromas aus, das rasch

prolifert und sich differenziert (25). Die Dezidualisierung dient der Erhaltung des Embryos und der streng kontrollierten Begrenzung der Trophoblastinvasion (26). Mit der Invasion des Trophoblasten werden mütterliche Gefäße und Drüsen im Endometrium eröffnet und eine Vielfalt hämatogener Substrate sowie endometrialer Sekrete zur Ernährung des Embryos freigesetzt. Aus embryonalen und maternalen Anteilen bildet sich in der Dezidua die Plazenta aus. Bis zum 12. Tag p.o. ist der Embryo vollständig von Endometriumepithel überdeckt und in Dezidua eingebettet.

1.3.2 Implantationsversagen

Die menschliche Fortpflanzung ist ein ineffizienter Prozess. Die Mehrzahl der Eizellen (85-95%) geht nach der Befruchtung verloren (27). Diese Schwangerschaftsverluste erfolgen zu einem hohen Anteil vor der Implantation und basieren auf Embryos mit chromosomalen Anomalien und morphologischen Auffälligkeiten (27). Die verbleibenden Schwangerschaftsverluste sind normale Embryos, die während oder nach der Implantation verloren gehen (27, 154). Im Gegensatz zu den vielseitigen Einflüssen vor und während der Implantation sind mit dem Abschluss der Implantation konstante Bedingungen geschaffen. Dies spiegelt sich in dem steilen Abfall der Absterberate der Schwangerschaftsprodukte mit der Beendigung des Implantationsvorganges wider.

In der Reproduktionsmedizin wird die Anzahl der fetalen Schwangerschaftsprodukte bezogen auf die Anzahl der transferierten Embryos als Implantationsrate definiert (182). In einem natürlichen Zyklus des Menschen beträgt die Implantationsrate maximal 30% (111). Nach einer IVF-Behandlung bleibt bei 83-89% der transferierten Embryos die Implantation erfolglos, so dass diese heute als limitierender Faktor für die natürliche oder assistierte Einrichtung einer Schwangerschaft gilt (68, 77, 182). Die geringe Effizienz der Implantation wird auf embryonale Faktoren, auf eine Störung der endometrialen Rezeptivität, der Immunantwort oder der Kommunikation zwischen Embryo und Endometrium zurückgeführt (42). Bei diesen Vorgängen spielt LIF zusammen mit anderen Zytokinen eine wichtige Rolle.

1.3.2.1 Endometriale Rezeptivität

Endometriale Rezeptivität ist definiert als ein Stadium während der frühen Lutealphase (Tag 20 bis 24), in dem das Endometrium zur erfolgreichen Implantation der

Blastozyste fähig ist, während es für den Embryo im verbleibenden Zyklus oder nach ausbleibender Implantation eine refraktäre Umgebung darstellt (14).

Im Rahmen der endometrialen Rezeptivität kommt es zu histologisch nachweisbaren morphologischen Veränderungen im Endometrium wie Vaskularisierung und Ödembildung, Sekretion endometrialer Drüsen und Ausbildung von Pinopodien, die sich in gewisser Weise als prädiktive Marker für die Beurteilung der endometrialen Rezeptivität eignen (12, 19, 124). Für die eindeutige Beurteilung der endometrialen Rezeptivität gibt es bislang keine allgemein akzeptierten molekularen oder zellulären Parameter (12, 19, 136).

1.3.2.2 Immuntoleranz

Das Überleben des Embryos als allogenes Transplantat im mütterlichen Organismus wird durch immunologische Phänomene wie das Fehlen klassischer väterlicher MHC-Klasse-I-Antigene auf dem Trophoblasten als Angriffspunkte für die T-Zell-vermittelte mütterliche Immunantwort, sowie durch die Sekretion immunsuppressiver Zytokine immunkompetenter Zellen im Endometrium ermöglicht (51). Dabei ist die mütterliche Immunantwort auf der Ebene der materno-fetalen Grenzfläche nach einem Th2-Switch CD4-positiver T-Zellen auf die Produktion anti-inflammatorischer Th2-Zytokine ausgerichtet (133). Th2-Zytokine (z.B. LIF, IL-4, IL-6) unterstützen das Überleben und das Wachstum des Feten. Sie induzieren die Freisetzung von HCG aus dem Trophoblasten, welches die Produktion von Progesteron durch das Corpus luteum stimuliert, das zur Aufrechterhaltung der Schwangerschaft unerlässlich ist (27, 150). Progesteron wiederum fördert die Differenzierung von CD4-positiven T-Zellen in Th2-Zellen und deren Produktion von Th2-Zytokinen, während es die von Th1-Zytokinen reduziert (133).

Inflammatorische Th1-Zytokine (z.B. IL-1, TNF- β , IFN- γ) dagegen fördern unter anderem die zelluläre Abstoßungsreaktion eines allogenen Transplantats. Sie können durch Störungen der embryonalen Entwicklung und der Funktion des Trophoblasten die Schwangerschaft gefährden und zu Aborten führen (27). Th1-Zytokine sind in der Schwangerschaft insofern von Bedeutung, als sie die notwendige Infektabwehr im mütterlichen Reproduktionstrakt darstellen (51).

1.3.2.3 Steuerung der Implantation

An der Steuerung der Implantation sind eine Reihe embryonaler und uteriner Faktoren auf zellulärer, molekularer und genetischer Ebene gemeinsam beteiligt, deren diskrete Störung bereits zum Misserfolg des Vorganges führen kann, deren Bedeutung aber noch nicht endgültig geklärt ist (57, 68).

1.3.2.3.1 Hormonelle Regulation der Implantation

Hormonelle Einflüsse mit einem exakt abgestimmten Verhältnis von ovariell sezerniertem Östradiol und Progesteron bereiten das Endometrium auf die Implantation vor und synchronisieren dessen Differenzierung mit der Entwicklung des Embryos (181). Besteht ein Progesteronmangel, so wird das Endometrium nicht ausreichend transformiert und die Implantation verhindert. Obwohl Progesteron für die Entwicklung eines rezeptiven Endometriums essentiell ist, kann eine angemessene Antwort des Endometriums auch bei physiologischen Hormonspiegeln ausbleiben, was auf molekulare, noch überwiegend ungeklärte Defizite zurückgeführt wird (12).

Aber auch der präovulatorische Östradiolanstieg ist Voraussetzung für die Aktivierung der Blastozyste über die Stimulation der glandulären Sekretion und die Dezidualisierung des Endometriums unter der Progesteron-Dominanz der Lutealphase (122). Noch ist unklar, wie dem Embryo die Gegenwart des Östrogens signalisiert wird. Es wird vermutet, dass dies möglicherweise über LIF vermittelt wird, das nur unter einer östrogenen Überlagerung der Lutealphase von den endometrialen Drüsen gebildet wird. Hierfür sprechen LIF-Rezeptoren an der Oberfläche des Trophoblasten sowie die Tatsache, dass in LIF-defizienten Mäusen keine Implantation erfolgt (168).

Neben den Ovarialsteroiden spielt auch das vom Trophoblasten gebildete HCG eine Rolle bei der Implantationssteuerung. HCG beeinflusst die endometriale Aktivität zum einen indirekt durch seine luteotrope Wirkung über die vermehrte Freisetzung von Progesteron, zum anderen wirkt es direkt in parakriner Weise aufs Endometrium (68). Dabei moduliert es als eines der frühesten embryonalen Produkte Implantationsfaktoren wie LIF, M-CSF, IGFBP-1 und MMP-9.

1.3.2.3.2 Regulation der Implantation durch lokale Faktoren

Östradiol und Progesteron regulieren nach der Bindung an ihre nukleären Rezeptoren die Expression der spezifischen Gene von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen,

Wachstums-, Angiogenese- und Transkriptionsfaktoren, die als Effektoren der Steroidhormone schließlich die Implantation vermitteln, deren umfassenden Wechselwirkungen aber noch nicht ausreichend verstanden sind (12, 40, 57, 68, 98). Dabei wird die Expression dieser Faktoren nicht nur hormonell reguliert, sondern sie induzieren und hemmen sich auch gegenseitig in einem kaskadenartigen Prozess. Eine gestörte Implantation ist daher auch auf dem Boden einer mangelhaften Expression, Funktion oder Rezeptorbindung und Signaltransduktion jedes einzelnen dieser Faktoren vorstellbar.

1.4 Zytokine

1.4.1 Definition und Funktionen

Zytokine sind Botenstoffe, die von Zellen sezerniert werden und sowohl parakrine Signale an andere Zielzellen (interzellulär) als auch autokrine Signale auf dieselbe Zelle zurück (intrazellulär) darstellen. Strukturell handelt es sich um kleine, lösliche Polypeptide oder Glykoproteine mit einem Molekulargewicht zwischen 10.000 und 50.000d, die lokal und in der Regel vorübergehend freigesetzt werden und über eine kurze Entfernung bereits in kleinsten Konzentrationen wirken.

Zytokine wirken pleiotrop, das heißt ein spezifisches Zytokin hat vielfältige Auswirkungen auf verschiedene Zelltypen. Charakteristisch ist zudem ihre Redundanz, das heißt an einer spezifischen Zelle haben einige verschiedene Zytokine ähnliche, sich überlappende Funktionen. Die funktionelle Pleiotropie und Redundanz vieler Zytokine kann auf molekularer Ebene durch die Nutzung gemeinsamer Signaltransduktions-Untereinheiten in ihrem sonst spezifischen Rezeptor an der Zelloberfläche erklärt werden. Nach der Zytokinbindung wird eine für die Rezeptorklasse spezifische Signalübertragungskaskade in der Zelle in Gang gesetzt und die Wirkung des Zytokins vermittelt.

Die verschiedenen Zytokine bilden ein Netzwerk aus gegenseitiger synergistischer und antagonistischer Aktion. Sie regulieren hauptsächlich die Proliferation und Differenzierung von Zellen. Dabei agieren sie als Entzündungsmediatoren und Modulatoren der Immunantwort, Stimulatoren der Hämatopoese sowie in der Steuerung des Nerven- und Hormonsystems. In diesen Bereichen kamen sie in den letzten Jahren auch therapeutisch zum Einsatz (Interferone, koloniestimulierende Faktoren).

1.4.2 Zytokine und ihre Rolle bei der menschlichen Reproduktion

Bei der Kommunikation zwischen Endometrium und Embryo während des Implantationvorgangs spielen Zytokine eine entscheidende Rolle (57, 175). Sie werden vom Embryo selbst sowie im glandulären oder luminalen endometrialen Epithel oder im dezidualisierten Stroma, aber auch von endometrialen immunkompetenten Zellen wie Leukozyten produziert (143). Insbesondere der Invasionsvorgang des Trophoblasten ist durch uterine und trophoblastäre Zytokine und Wachstumsfaktoren wie LIF, TGF- β , EGF, TNF- α , IL-1, IGFBP-1 und IL-6 streng räumlich und zeitlich reguliert (17).

Die gezielte Ausschaltung von Zytokin- und Zytokinrezeptorgenen in sogenannten Knockout-Mäusen, die Verfügbarkeit rekombinanter Zytokin-Proteine und Zytokin-spezifischer Antikörper hat das Wissen über den Vorgang der Implantation um mehrere molekulare Details erweitert. Dabei wurde jedoch immer klarer, dass kein Zytokin allein dieses komplexe Ereignis steuert, sondern dass der Großteil der bekannten Moleküle redundant ist. Es bestehen Überlappungen und Interaktionen innerhalb des Zytokinnetzwerkes, die den Ausfall eines Zytokins kompensieren könnten. Mit Ausnahme von LIF und IL-11, die für die Implantation der Maus absolut essentiell sind, kann dieser Prozess in Abwesenheit der meisten Zytokine trotzdem und gegebenenfalls mit Einschränkungen der weiteren Embryonalentwicklung stattfinden (143). Solch redundante Mechanismen überraschen nicht bei einem Vorgang, der für das Fortbestehen einer Spezies essentiell ist.

Wie bei der Maus werden auch beim Menschen Zytokine, die am Prozess der Implantation beteiligt sind, hauptsächlich in der sekretorischen Phase insbesondere während des Implantationsfensters exprimiert (143). Sowohl das räumliche als auch das zeitliche, zyklisch variierende Expressionsmuster verschiedener Zytokine machen eine hormonelle Regulation neben der durch endometriale und embryonale Faktoren wahrscheinlich und sprechen für ihre Rolle als lokale Effektoren der Steroidhormone in der Vermittlung der Implantation (143, 163, 175).

In Tab. 1.3 sind Zytokine, die eine Rolle für die menschliche Reproduktion spielen, ihre Rezeptoren, ihr Expressionsmuster und ihre reproduktive Funktion dargestellt. Das Zytokin LIF, das LIF-Gen, der LIF-Rezeptor, die Funktionen LIFs im allgemeinen und bei der Fortpflanzung werden im folgenden gesondert dargestellt.

Zytokin/ Rezeptor	Zyklische Expression	Ursprung	Funktion	Knockout/Mangel
CSF-1 (M-CSF)	sekretorische Phase, 1. Trimenon (143)		Trophoblast: Proliferation, Differenzierung, HCG-Produktion, Regulation der Aktivität der proteolytischen Enzyme (142); Aktivierung des IGF-Systems, der MMP (68).	Habituelle Aborte bei niedrigen Serumspiegeln (83).
CSF-1-Rezeptor		Trophoblast, Dezidua (143) Präimplantations- Embryo (143)		
IL-1	proliferative Phase mittlere/späte Lutealphase (175) mittlere Lutealphase	Endometrium: Drüsen, luminales Epithel Embryo (158) Endometrium, Dezidua (158)	Endometrium: Kontrolle der Invasivität des Trophoblasten (94); Adhäsion der Blastozyste (98).	Implantationsversagen (98).
IL-1R Typ 1/2				
IL-6	Implantationsfenster (143)	Endometrium: Epithel, Stroma Trophoblast Endometrium: Epithel Embryo (143)	Trophoblast: Modulation der Proliferation, Differenzierung und Invasivität, HCG- Produktion, Aktivierung der MMP-2 und -9 (33).	Normale Fertilität (89).
IL-6R, gp130	zyklisch			
IL-11	später Zyklus (38)	Endometrium: glandu- läres Epithel, Dezidua	Stroma: Dezidualisierung (143).	
IL-11R	gesamter Zyklus	Endometrium: Epithel, Stroma		Infertilität (143)
IFN-gamma		T-Lymphozyten	Endometriales Epithel: Hemmung der Prolifera- tion, Expression von HLA-DR-Molekülen: Immuntoleranz (174).	Th1-Zytokin: Störung der Entwicklung von Embryo + Trophoblast: Abort (159).
TNF-alpha	sekretorische und proliferative Phase (175)	Endometrium: Epithel, Stroma Ovarien, Eileiter, Embryo (97)	Endometrium: Apoptose (176); Trophoblast: Proliferation (176).	Th1-Zytokin: Implantations- versagen, habituelle Aborte, Endometriose (27, 97)

Tab. 1.3: Zytokine, Rezeptoren, Expressionsmuster und reproduktive Funktion.

1.5 Leukaemia Inhibitory Factor (LIF)

1.5.1 LIF: Definition und Eigenschaften

Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) ist ein Zytokin mit unterschiedlichen Wirkungen in einer Vielzahl organischer Systeme, das erstmals 1987 durch Metcalf und seine Mitarbeiter als Differenzierungsfaktor myeloischer Leukämie-Zelllinien der Maus identifiziert wurde (49).

Das reife menschliche LIF-Protein ist ein Polypeptid-Einzelstrang aus 180 Aminosäuren, deren Sequenz zu 79% mit dem LIF-Protein der Maus übereinstimmt (114, 162). Im Anschluß an die Translation unterliegt das LIF-Protein einer umfangreichen Glykosylierung, deren Ausmaß vom jeweiligen Ursprungsgewebe abhängt und das Molekulargewicht (38 bis 67kd) sowie die Ladung, nicht aber die Funktion des Glykoproteins bestimmt (69, 72). Das menschliche Zytokin besitzt sechs Cysteinreste, deren Disulfidbindungen zusammen mit den letzten neun Aminosäuren des carboxyterminalen Endes für die biologische Aktivität des Proteins verantwortlich sind (49, 154).

LIF wird in einer Vielzahl von Zellen gebildet, hauptsächlich von aktivierten T-Lymphozyten, aber auch von Monozyten, Makrophagen, Megakaryozyten, Stromazellen des Knochenmarks, Fibroblasten, Osteoblasten, Myoblasten, Neuronen, Astrozyten, Adipozyten, Hepatozyten, embryonalen Zellen der Blastozyste, Epithel- und Stromazellen des Endometriums und des Eileiters, ovariellen Granulosa-, Theka- und Stromazellen sowie Zellen von Thymus, Lunge, Hypophyse, Myokard, Niere und Haut (72, 109, 154).

1.5.2 LIF-Gen

LIF ist durch ein einzelnes Gen kodiert, das beim Menschen mit einer Nukleotidsequenz von 7,6kb auf Chromosom 22q12 liegt (166, 172). Es besteht aus drei Exons, zwei Introns und einem ungewöhnlich langen 3'-Ende (3,2kb), welches nicht in eine Aminosäuresequenz abgelesen wird (166). Das Transkriptionsprodukt ist eine mRNA mit einer Länge von ungefähr 4,1kb (114).

Vergleicht man die LIF-Gen-Sequenzen von Maus und Mensch, so sind vor allem die kodierenden Regionen aber auch kurze Segmente innerhalb der nichtkodierenden Regionen hochgradig konserviert mit Homologien von 78 bis 94%, die auf eine mögliche regulatorische Rolle dieser Regionen hinweisen (59, 166). Eine jeweils

spezifische Regulation der LIF-Gen-Transkription und -Translation unter verschiedenen Bedingungen und bei unterschiedlichen Zelltypen bietet eine Erklärung für die große Variabilität der biologischen Wirkungen des Proteins (72, 166).

Die komplexe Organisation des LIF-Gens resultiert in der Expression dreier LIF-Transkripte und entsprechender LIF-Isoformen (61). LIF-T wird als intrazelluläres Protein nicht sezerniert und ist somit nicht durch ein ELISA-Kit detektierbar so wie LIF-M, das an der Extrazellulärmatrix gebunden bleibt. LIF-D ist das sezernierte lösliche LIF-Protein, das z.B. in uteriner Spülflüssigkeit nachgewiesen werden kann (97). Die LIF-Isoformen haben aufgrund ihrer unterschiedlichen Signaltransduktionswege verschiedene Funktionen (29, 61). Im Gegensatz zum extrazellulären LIF-Protein ist die intrazelluläre LIF-Aktivität unabhängig von einer Rezeptorvermittlung (61).

1.5.3 LIF und seine Funktionen: Pleiotropie

Die vielfältigen Wirkungen LIFs in unterschiedlichen Zellsystemen wurden zunächst von verschiedenen Arbeitsgruppen als Funktionen unterschiedlicher Faktoren gedeutet. Erst später wurde erkannt, dass es sich um die Funktionen eines einzigen Zytokins handelt. Dies spiegelt sich in der Vielzahl der Synonyme für LIF wider (Tab. 1.4) (70).

Synonym/Abkürzung	Biologische Aktivität
Leukaemia Inhibitory Factor/ LIF (49) Differentiation-Inducing-/ D-Factor (1)	Induktion der M1-Differenzierung
Differentiation-Inhibitory Activity/ DIA (162) Differentiation-Retarding Factor/ DRF (88)	Hemmung der Differenzierung embryonaler Stammzellen
Hepatocyte-Stimulating Factor/ HSF-III (11)	Induktion der Synthese akuter Phase-Proteine
Cholinergic Neuronal Differentiation Factor/ CNDF/CDF (191)	Induktion der cholinergen Nerven-Funktion
Melanocyte-Derived Lipoprotein-Lipase Inhibitor/ MLPLI (115)	Hemmung der Lipoprotein-Lipase
Human Interleukin for DA-1A myeloid Cells/ HILDA (114)	Stimulation der DA-1A-Proliferation

Tab. 1.4: LIF-Synonyme und Funktionen (nach Hilton 1991 (70)).

Die pleiotrope Natur LIFs mit Auswirkungen auf eine Vielzahl von Zellen ist in Tabelle 1.5 im Überblick dargestellt.

Zielzelle	Wirkung	Referenz
Hämatopoetische Vorläuferzellen		
- M1-Monozyt	Differenzierung zum Makrophagen	48, 69
- DA-1a myeloische Zelle	Proliferation	114
- Myeloblast	Proliferation	44
- Megakaryozyt	Proliferation und Differenzierung in Megakaryozyten: Produktion von Thrombozyten	188
Embryonale Stammzelle	Hemmung der Differenzierung und Erhaltung der Totipotenz	162, 189
Primordiale Keimzellen	Proliferation	103
Spermatozyten	Proliferation	147
Adipozyt	Hemmung der Lipoproteinlipase	
Hepatozyt	Produktion von Akute-Phase-Proteinen	11, 107
Neuron: autonom	Wechsel von adrenerger zu cholinergem Funktion; Überleben	191
motorisch/sensorisch	Überleben	119
Oligodendrozyten	Überleben	109
Knochen: Osteoblast	Proliferation: Knochenneubildung	34
Osteoklast	Proliferation: Kalziumfreisetzung	1
Kardiomyozyt	Proliferation, verminderte Apoptose	118
Mesenchymzellen	Differenzierung in renale Glomeruli und Tubuli	9
Endokrine Zellen:		
Adenohypophyse	Entwicklung, POMC-/ACTH-Produktion, Hemmung der Produktion von Prolaktin und Wachstumshormon	6 13
Ovar	Bildung von Primärfollikeln	121
Leydig-Zellen	Hemmung der Testosteronproduktion	105
Melanozyten, Keratinozyten	Proliferation	74, 76

Tab. 1.5: LIF und Funktionen (nach Hilton 1992, Metcalf 2003 (72, 109)).

In Abhängigkeit von der Zielzelle fördert oder hemmt LIF deren Differenzierung oder Proliferation (72). Der Differenzierungsvorgang von Zellen ist ein irreversibles Ereignis im Zellzyklus nach dem Alles-oder-nichts-Prinzip. Die Fähigkeit LIFs, diesen Vorgang

in Abhängigkeit von der Zielzelle zu fördern oder zu hemmen, spricht für die Aktivierung spezifischer nukleärer Transkriptionsfaktoren durch LIF, deren Wirkung über die zellspezifische Funktion LIFs entscheidet (108). LIF induziert die Differenzierung muriner myeloischer Zellen der M1-Linie zum Makrophagen und supprimiert dadurch deren klonale Vermehrung (69). Im Gegensatz dazu hemmt LIF die Differenzierung embryonaler Stammzellen und fördert deren Proliferation, wodurch deren Totipotenz erhalten bleibt (162, 189). Die Anzahl hämatopoetischer Stammzellen in Milz und Knochenmark war bei homozygot LIF-defizienten Mäusen stark vermindert, bei Heterozygotie lag sie zwischen der Anzahl der homozygoten und der Anzahl der Wildtyp-Mäuse, was einen Dosiseffekt von LIF andeutet (44). Exogenes LIF konnte den Mangel an Stammzellen ausgleichen.

Viele der Wirkungen LIFs wurden *in vitro* nachgewiesen, wobei LIF häufig nicht essentiell war, sondern zusammen mit anderen Faktoren wirkte (109). Bislang bleibt ungeklärt, weshalb der Körper ein Molekül produziert, das eine solche Vielzahl an zum Teil gegensätzlichen Wirkungen ausübt und dabei durch andere Moleküle und Wirkwege ersetzbar bleibt (109).

1.5.4 LIF-Rezeptor

Die pleiotrope Funktion LIFs basiert auf der Expression seines membrangebundenen Rezeptors durch eine große Zahl unterschiedlicher Zellen (21, 73, 109). Der transmembrane, heterodimere LIF-Rezeptor setzt sich aus einer LIF-spezifischen Einheit niedriger Affinität (LIFR, auch β -Kette, α -Kette oder gp190 genannt) und dem Konvertermolekül gp130 (gp130) zusammen (50). Erst nach der Bindung LIFs an seine spezifische Bindungseinheit LIFR wird der LIF-LIFR-Komplex durch die Assoziation mit gp130 zum Rezeptor hoher Affinität (50, 69). LIFR besteht extrazellulär aus zwei Hämatoetin-Domänen und einer Immunglobulin-ähnlichen Einheit, die vor allem für die LIF-Bindung verantwortlich ist (128). Eine zweite Bindungsstelle für den Liganden bilden drei extrazelluläre Fibronectin Typ III-Domänen (128).

1.5.4.1 LIF-Rezeptor und Signaltransduktion

Nach der Bildung des hochaffinen LIF-Rezeptorkomplexes werden über gp130 die mit dem Rezeptor assoziierten intrazellulären Tyrosinkinasen JAK1, JAK2 oder TYK2 aktiviert, welche die zytoplasmatischen Rezeptordomänen phosphorylieren und

aktivieren (6). Am Ende dieser Signaltransduktionskaskade kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 (Signal-Transducer und Aktivator der Transkription), der mit zytoplasmatischen Proteinen zu einem Komplex dimerisiert. Dieser wandert vom Zytoplasma in die Nuklei der Zielzelle, wo er über die Bindung spezifischer DNA-Sequenzen die Genexpression reguliert und die LIF-Wirkung vermittelt (26).

Daneben existieren noch andere Signaltransduktionswege des LIF-Rezeptors wie die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), die Proteinkinase C (PKC) oder die PI3-Kinase, die bestimmte Phosphatidylinositide (PI) modifiziert, wobei das endometriale luminale Epithel nur über den gp130-JAK-STAT-Signaltransduktionsweg auf eine LIF-Bindung reagiert (6, 26, 67).

1.5.4.2 LIF-Rezeptor: Basis für Pleiotropie und Redundanz verwandter Zytokine

LIF gehört zur Familie der IL-6-artigen-Zytokine, zu denen auch IL-6, IL-11, Oncostatin M (OSM), Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), Cardiotrophin-1 (CT-1) und das Cardiotrophin-like Cytokine (CTL) zählen (66, 67, 130). Es handelt sich dabei um eine Familie wichtiger Mediatoren der Immunantwort, insbesondere der Akuten-Phase-Antwort, sowie der Hämatopoese, der hepatischen und neuronalen Regeneration, der embryonalen Entwicklung und der Fertilität (67). Ihre pleiotropen Funktionen üben die strukturell ähnlichen IL-6-Zytokine durch die Bindung an die gemeinsame Rezeptoreinheit gp130 und ihre jeweils spezifische Bindungseinheit aus. Dies führt über die Signaltransduktion der JAK-STAT- oder MAPK-Kaskade zur Aktivierung von Zielgenen, die an der Differenzierung und Proliferation sowie der Apoptose der Zielzellen beteiligt sind (50, 67).

Einige der IL-6-Zytokine binden über Heterodimere aus gp130 und LIFR (LIF, CNTF, CT-1, CTL) oder aus gp130 und OSMR (OSM); IL-6 und IL-11 vermitteln ihre Signale über Homodimere aus gp130 und ihrer spezifischen Rezeptorkomponente (Abb.1.1) (67, 143, 145). Die Nutzung gemeinsamer Rezeptoreinheiten wiederum ist die Grundlage für die charakteristische funktionelle Redundanz dieser Zytokine, d.h. innerhalb ihrer Familie bestehen oft überlappende Wirkungen an einem Zelltyp, die in Abhängigkeit von den Zielzellen auch gegensätzlich sein können (72). Ein LIF-Mangel könnte also in vivo partiell durch einen oder mehrere Mitglieder dieser Zytokinfamilie kompensiert werden.

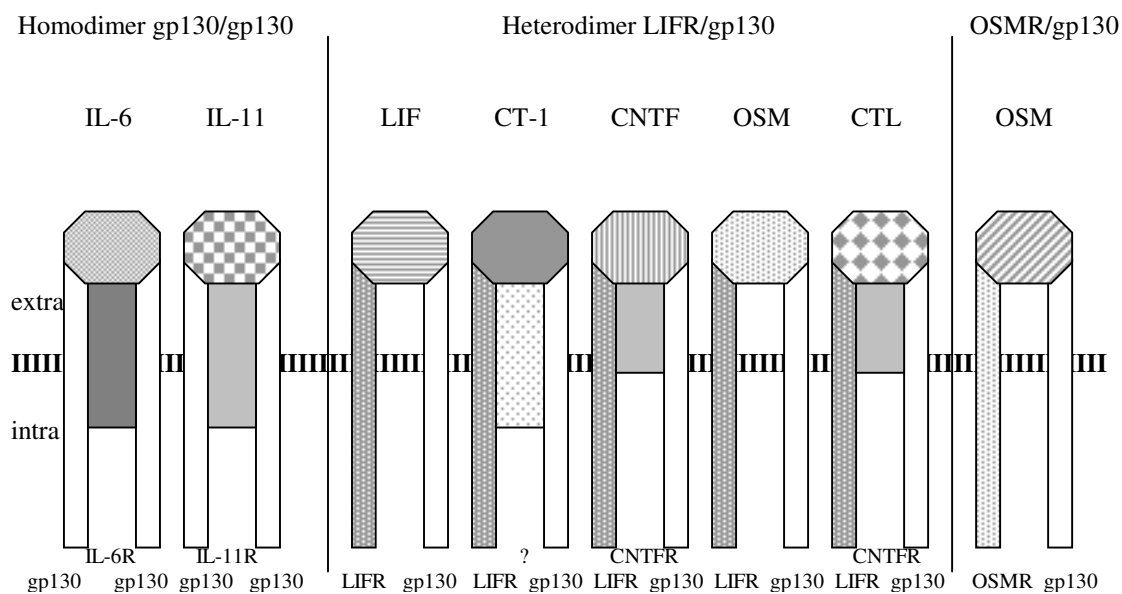


Abb.1.1: Rezeptorkomplexe der IL-6-Zytokine.

Die Rezeptorkomplexe der IL-6-Zytokine setzen sich aus unterschiedlichen Kombinationen der Rezeptoruntereinheiten gp130, LIFR und OSMR zusammen, wobei gp130 von allen Mitgliedern der Familie genutzt wird (67).

Allerdings sind die biologischen Effekte dieser verwandten Zytokine nicht exakt austauschbar, da sie in ihren Funktionen nicht völlig äquivalent sind (134). Dies erklärt sich durch Unterschiede der Signalübermittlungswege an einem Schritt jenseits der gp130-Bindung sowie durch die unterschiedliche Affinität, mit der sich einige der LIF-verwandten Zytokine die Bindungsstelle am Rezeptor teilen (135). Die Unterschiede in den Wirkungen der verschiedenen Zytokine basieren außerdem auf dem gewebeabhängigen Verteilungsmuster ihrer spezifischen Rezeptoreinheiten und der streng regulierten, gewebespezifischen Expression der Zytokine selbst (32, 109). Als einziges dieser verwandten Zytokine wird LIF in nachweisbaren Konzentrationen im Endometrium von fertilen Frauen exprimiert (32). Im Gegensatz zu LIF sind weder CNTF noch IL-6 essentiell für die Implantation, da defiziente Mäuse keine Einschränkung ihrer Entwicklung oder Fortpflanzung zeigten (89, 102).

1.5.5 LIF und seine Rolle bei der Fortpflanzung

Die Auswirkung LIFs auf die Proliferation und die Differenzierung von embryonalen Stammzellen, die von der inneren Zellmasse der Blastozyste abstammen, lassen eine entscheidende Rolle in der Steuerung der embryonalen Entwicklung und der Implantation vermuten (72, 108).

1.5.5.1 LIF im Tiermodell der Fortpflanzung

Die Bedeutung LIFs für die Fortpflanzung wurde hauptsächlich am Mausmodell studiert. Vier Tage nach der Paarung, um den Zeitpunkt der Implantation, konnte bei schwangeren Mäusen eine maximale Expression von LIF-mRNA und biologisch aktivem LIF-Protein in endometrialen Drüsen nachgewiesen werden (15). Die zeitliche Regulation der LIF-Expression war allerdings nicht von der Gegenwart eines Embryos abhängig, da auch pseudoschwangere Mäuse LIF exprimierten, so dass von einer mütterlichen Kontrolle der LIF-Expression ausgegangen werden kann. Pseudoschwangere Mäuse entstehen durch Paarung mit vasktomierten Männchen, bei der es nicht zur Befruchtung der Eizelle kommt. Gleichzeitig konnten auch in der Blastozyste LIF-mRNA, LIF-Protein und LIF-Rezeptorkomponenten nachgewiesen werden, die sie zur Interaktion mit dem endometrialen LIF befähigen (47).

Stewart und Mitarbeiter konnten bei der Maus zeigen, dass die vorübergehende maternale LIF-Expression in endometrialen Drüsen für die Implantation absolut essentiell ist, obwohl auch Hormone und andere Faktoren für die Implantation von Bedeutung sind (168). Im Gegensatz zu anderen Funktionen LIFs konnte diese Rolle nicht von verwandten Zytokinen wie z.B. OSM übernommen werden. Weibchen mit einer homozygoten Inaktivierung des LIF-Gens ($LIF^{-/-}$) waren lebensfähig und konnten nach der Paarung mit Wildtyp ($LIF^{+/+}$)- oder LIF-defizienten Männchen normale Embryos entwickeln, die aber nicht implantierten (168). Ein Implantationsversagen aufgrund embryonaler Defekte ist ausgeschlossen, da die lebensfähigen Blastozysten nach dem Transfer in pseudoschwangere $LIF^{+/+}$ -Mäuse implantierten. Außerdem scheint die Implantation nicht über die direkte Wirkung LIFs auf die Blastozyste induziert zu werden, da mit LIF vorinkubierte $LIF^{+/+}$ -Blastozysten nach dem Transfer in $LIF^{-/-}$ -Weibchen nicht implantierten, $LIF^{-/-}$ -Weibchen nach Paarung mit $LIF^{+/+}$ -Männchen nicht schwanger wurden und $LIF^{+/+}$ -Blastozysten nach dem Transfer in pseudoschwangere $LIF^{-/-}$ -Weibchen nicht implantierten (168).

Vielmehr scheint der komplette LIF-Ausfall die Vorbereitung des mütterlichen Endometriums auf die Implantation zu beeinträchtigen, d.h. es kommt vor allem auf die Wirkung LIFs direkt am Endometrium an. So konnte durch die intraperitoneale Injektion von LIF bei LIF-defizienten Mäusen eine Implantation erzielt werden (25). Ebenso fördert eine Behandlung von Mäusen, die zu erhöhten LIF-mRNA-

Konzentrationen im Uterus führt, die Implantation (177). In LIF-defizienten Weibchen wird die Embryoentwicklung im Stadium der Apposition am luminalen Epithel gehemmt, das Endometrium bleibt refraktär gegenüber der Blastozyste, eine Implantation bleibt aus (25). Im Gegensatz zu LIF-defizienten Mäusen sind LIFR-defiziente Mäuseembryos fähig zu implantieren, was ebenfalls darauf hinweist, dass LIF nicht über seine direkte Wirkung auf die Blastozyste die Implantation bewirkt (187). Gleichzeitig mit der maximalen LIF-Expression werden LIFR und gp130 im luminalen Epithel des Endometriums exprimiert, was eine autokrine Wirkung LIFs am luminalen Epithel als Grundlage für die Implantation wahrscheinlich macht (32, 186, 192). Auch für andere Tiere wird LIF eine Rolle bei der Implantation beigemessen. Bei Schweinen, Kaninchen und Rhesus-Affen konnte eine zyklusabhängige LIF-Produktion mit einem Konzentrationsanstieg und einer verstärkten Interaktion mit dem LIF-Rezeptor kurz vor der Implantation entdeckt werden (3, 192, 195).

1.5.5.2 LIF und menschliche Fortpflanzung

Über den Einfluss LIFs auf die menschliche Reproduktion ist nur wenig bekannt, einzelne Anhaltspunkte aber machen seine Bedeutung für die menschliche Fertilität wahrscheinlich. So besteht auch beim Menschen eine Abhängigkeit der LIF-Expression vom hormonellen Zyklus mit einem Maximum zum Zeitpunkt der Implantation, bei der LIF möglicherweise wie bei der Maus eine entscheidende Rolle spielt (4, 21, 32, 86, 120). Tab. 1.6 fasst bislang vorliegende Untersuchungen zusammen, die Hinweise für eine Rolle LIFs bei der menschlichen Reproduktion lieferten.

1.5.5.3 Endometriale LIF-Produktion

LIF wird beim Menschen vor allem durch das luminale Epithel sowie durch die Drüsen des Endometriums exprimiert und nach apikal ins Uteruslumen sezerniert (21, 32). Dagegen wird die LIF-spezifische Rezeptor-Einheit LIFR ausschließlich vom luminalen Epithel exprimiert, gp130 sowohl vom luminalen als auch vom glandulären Epithel (32). Keine der beiden Rezeptorkomponenten wird im Stroma exprimiert, die LIF-Bindung ist auf das luminale Epithel beschränkt (32). Dieses Expressionsmuster von LIF und seinem Rezeptor spricht dafür, dass LIF nicht direkt am Stroma sondern in auto- und parakriner Weise am luminalen Epithel wirkt.

LIF-Vorkommen und -Funktion	Referenz
LIF-Expression im Endometrium in Abhängigkeit vom Menstruationszyklus mit einem Maximum zum Zeitpunkt der Implantation (mittlere bis späte Lutealphase)	4, 21, 32, 35, 86, 93, 184
LIF-Expression: abhängig von mütterlichen Steroidhormonen und ihren Effektoren	4, 8, 53, 63, 86, 93, 133, 151
LIF-Rezeptor-Expression im Endometrium	32
LIF-Rezeptor-Expression durch Oozyte und Blastozyste vor der Implantation	21, 24, 41
LIF-Wirkung auf die Bildungsrate von Blastozysten	41, 80
Auto- und parakrine LIF-Wirkung am Endometrium	186
LIF-Wirkung auf die Differenzierung und Invasion des Trophoblasten	16, 120, 150, 155
LIF-Expression/-Produktion in Follikelflüssigkeit, Ovarialzellen und im Eileiter	5, 30, 85
LIF-Sekretion und -Rezeptor im Plazentagewebe	86, 150, 155
LIF-Sekretion durch Endometriumkulturen	35, 20, 62
LIF-Produktion und Nachweis in Uterus-Spülflüssigkeit	93

Tab. 1.6: LIF und Fortpflanzung beim Menschen (nach Senturk 1998, Lass 2001 (95, 154)).

LIF wird im Endometrium durch den gesamten Menstruationszyklus hindurch exprimiert mit relativ niedrigen Spiegeln während der proliferativen Phase. In der mittleren bis späten sekretorischen Phase kommt es zu einem massiven Konzentrationsanstieg im glandulären und luminalen Epithel mit einem Maximum zwischen Tag 19 und 25 (21, 23, 32). Auch in uteriner Spülflüssigkeit fand sich bei fertilen Frauen ein entsprechender Anstieg der LIF-Spiegel vom Tag 7 bis 12 nach dem LH-Anstieg (93). Erfolgt eine Implantation, kommt es danach zur Downregulation der glandulären LIF-Expression auf ein niedriges Niveau, während LIF gleichzeitig in dezidualen immunkompetenten Zellen besonders ausgeprägt exprimiert wird (86, 155). Die LIF-Rezeptorkomponenten LIFR und gp130 werden vom Endometrium durch den gesamten Zyklus hindurch mit einem Anstieg der gp130-Expression in der mittleren bis späten sekretorischen Phase exprimiert (32). Die LIF-Rezeptorkomponenten konnten

beim Menschen außerdem in allen embryonalen Stadien von der Oozyte bis zur Blastozyste nachgewiesen werden, was vermuten lässt, dass auch der Embryo ein Ziel des Zytokins ist (21, 24).

Die LIF-Expression wird durch mütterliche Signale aus dem uterinen Milieu wie Steroidhormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren gesteuert, scheint aber wie bei der Maus unabhängig von der Anwesenheit einer Blastozyste zu sein (15, 35, 62, 98, 151, 154, 168).

1.5.5.3.1 Hormonelle Regulation der endometrialen LIF-Expression

Die zyklusabhängige Expression von LIF-mRNA macht eine Regulation durch Steroidhormone wahrscheinlich. Diese hormonelle Regulation ist speziesspezifisch. So ist die LIF-Expression bei der Maus östradiolabhängig, beim Kaninchen und beim Rhesusaffen durch Progesteron kontrolliert (15, 25, 99, 139, 192, 195).

Das Maximum der LIF-Expression des Menschen in der Lutealphase und Versuche mit Progesteronantagonisten mit der Folge einer verminderten LIF-Expression am glandulären Epithel des Endometriums zum Zeitpunkt der eigentlichen Implantation machen ihre Abhängigkeit ebenfalls von Progesteron wahrscheinlich (53, 139).

Überraschend konnte kein direkter stimulatorischer Effekt von Östradiol oder Progesteron auf die LIF-mRNA-Expression endometrialer Zellen *in vitro* gezeigt werden (4, 93). *In vivo* regulieren die Steroidhormone möglicherweise die LIF-Expression indirekt über Faktoren, die in der Kultur fehlen. Wahrscheinlich induziert Progesteron das Th2-Zell-Übergewicht mit der Produktion von IL-4, welches wiederum direkt stromale T-Zellen zur LIF-Produktion stimuliert (63, 133). Andere Arbeitsgruppen halten die Expression von TGF β 2 für einen der ersten Schritte in einer vom Progesteron induzierten Kaskade, die zur endometrialen Rezeptivität führt und zu der auch LIF zählt (86, 139). TGF β 2 induziert die LIF-Expression in endometrialen Stromazellen, Progesteron alleine hat jedoch keine direkte Auswirkung auf die LIF-Expression (4, 93). Zudem fehlen dem Promotor des LIF-Gens auf Progesteron ansprechende Einheiten, an die der Progesteronrezeptor-Progesteron-Komplex binden könnte (8).

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die LIF-Produktion *in vivo* nicht der direkten Kontrolle des Progesterons unterliegt, sondern indirekt über die Progesteronwirkung auf die Genexpression endometrialer Faktoren vermittelt wird, die schließlich als Effektoren

des Progesterons dienen (8, 139). Zum einen könnte also eine hormonelle Funktionsstörung in der Lutealphase die Dysfunktion der LIF-Expression und damit des Implantationsvorganges bedingen. Zum anderen kann die endometriale Rezeptivität selbst unter normalen Spiegeln peripheren Progesterons eingeschränkt sein, wenn die Funktion der Progesteroneffektoren gestört ist (139).

1.5.5.3.2 Regulation der endometrialen LIF-Expression durch Zytokine

Derzeit wird angenommen, dass vom endometrialen Epithel und Embryo sezernierte Zytokine und Wachstumsfaktoren die LIF-Produktion im glandulären Epithel und in endometrialen Stromazellen stimulieren (4, 35, 175). Besonders Zytokine, die hauptsächlich in der sekretorischen Phase produziert werden, könnten als Mediatoren der Steroidhormone die LIF-Expression induzieren. Parallel zum LIF-Peak in der sekretorischen Phase bestehen erhöhte Spiegel von IL-1, welches in vitro die LIF-Expression endometrialer Stromazellen stark moduliert (4, 35). In Kulturen menschlicher endometrialer Stromazellen wird die Expression von LIF-mRNA und seinem Protein konzentrations- und zeitabhängig durch IL-1, TNF- α , EGF, PDGF und TGF- β induziert (4, 16). Eine Dysfunktion unter den lokal produzierten Zytokinen in der zweiten Zyklushälfte würde eine Störung der LIF-Produktion erklären (63).

Es fällt auf, dass LIF hauptsächlich von Th2-Zellen produziert wird und diese Produktion durch Th2-Zytokine wie IL-4 stimuliert, durch Th1-Stimuli (IL-12, IFN- γ) aber gehemmt wird (133). Das von Th2-Zellen sezernierte IL-4 kann die Entwicklung LIF-sezernierender T-Zellen und damit die erfolgreiche Implantation fördern und zusammen mit IL-10 die Entwicklung von Th1-Zellen und damit die Embryoabstoßung verhindern (133). Eine reduzierte Produktion von LIF, IL-4 und IL-10 fand sich in T-Zellen der Dezidua bei Frauen mit habituellen Aborten, konnte jedoch nicht im peripheren Blut nachgewiesen werden, so dass vor allem die lokale und nicht die systemische Produktion von LIF und anderen Th2-Zytokinen zur Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft beizutragen scheint (133).

1.5.5.4 LIF und embryonale Entwicklung

Seine inhibitorische Wirkung auf die Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen lässt eine direkte Wirkung LIFs auf die frühe Embryonalentwicklung in vivo vermuten. Blastozystenkulturen von Mäusen entwickelten in der Gegenwart von

LIF mehr Trophoblastengewebe, Embryokulturen von Mäusen und Schafen entwickelten sich unter Zugabe von LIF besser und erzielten nach dem anschließenden Transfer erhöhte Schwangerschaftsraten (47, 84). LIF steigerte auch die Bildungsrate und Qualität von Blastozysten menschlicher Embryokulturen, so dass von einer verbesserten Lebensfähigkeit der Embryos in vivo unter LIF-Einwirkung ausgegangen werden kann (41). Durch die Verwendung sequentieller Medien mit Zusatz von LIF, die an die wechselnden Bedürfnisse des sich entwickelnden Embryos angepasst sind, ist in den vergangenen Jahren die Kultur der befruchteten Eizellen bis ins Blastozystenstadium vereinfacht worden (41, 47). Dies ermöglichte den Embryotransfer im Blastozystenstadium, der eine Präimplantationsdiagnostik und Embryoselektion zulässt und zu verbesserten Implantationsraten geführt hat.

Die positive Wirkung LIFs auf die Blastozystenbildung deckt sich mit der Tatsache, dass die maximale LIF-Expression in endometrialen Drüsen mit dem Erreichen des Blastozystenstadiums zusammenfällt, und mit der Beobachtung, dass die Blastozyste als Zielgewebe LIFs den LIF-Rezeptor exprimiert (21, 24).

Dagegen konnte die Arbeitsgruppe um Jurisikova keine Verbesserung der Blastozystenbildungsraten durch Zugabe von LIF zu Embryokulturen herbeiführen (80). Diese kontroversen Ergebnisse bezüglich der Wirkung LIFs auf die Embryoentwicklung erfordern weitere Studien.

1.5.5.5 LIF und Implantation

Die zyklusabhängige Expression LIFs im Endometrium mit einem Maximum zum Zeitpunkt der Implantation legt seine Bedeutung für die Implantation der Blastozyste nahe. Auf welche Weise LIF beim Menschen die Implantation induziert, bleibt unklar. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass LIF aus dem luminalen und glandulären Epithel während der Implantation als auto- und parakrines Signal an seinen Rezeptor am endometrialen Epithel und embryonalen Gewebe bindet (25, 186). Im Gegensatz zur LIF-Expression durch den Maus-Embryo fand sich bei menschlichen Embryos keine Expression des LIF-Proteins, so dass allein das endometriale LIF die Implantation zu vermitteln scheint (28).

Neben der Sekretion nach apikal ins Uteruslumen wird LIF von den endometrialen Drüsen auch nach basal ins Stroma sezerniert (186). Die parakrine LIF-Wirkung am Stroma ist im Rahmen der Kontrolle der Trophoblastinvasion und der Plazentabildung

für die Implantation notwendig (16, 120, 155). Dort moduliert von endometrialen Leukozyten sezerniertes LIF direkt die Differenzierung des Trophoblasten, der durch die Expression von LIF-Rezeptorkomponenten ein Zielgewebe für LIF darstellt (87, 98, 120, 150, 155). Bei seiner Invasion ins mütterliche Endometrium kann sich der bisher undifferenzierte Zytotrophoblast in drei verschiedene Phänotypen differenzieren: in den villösen Synzytiotrophoblasten, der HCG produziert, in den junktionalen Trophoblasten, der oncofetales Fibronectin sezerniert und so den Embryo im Endometrium verankert, oder in den invasiven intermediären Trophoblasten, der mittels proteolytisch aktiver Enzyme die mütterlichen Arterien penetriert. In Trophoblastkulturen führte die Applikation von LIF zu verminderter Sekretion von HCG bei gleichzeitig vermehrt gebildetem oncofetalem Fibronectin (16, 120, 150). Vermutlich vermittelt LIF die Anheftung des Trophoblasten ans Endometrium am Beginn der Implantation, während es seine Invasivität und hormonelle Aktivität unterdrückt (16).

Die hauptsächliche Expression von LIF in der späten sekretorischen Zyklusphase lässt beim Menschen auch eine Bedeutung des Zytokins bei der Dezidualisierung vermuten. Die Expression von LIF, LIFR und gp130 in der Dezidua des ersten Trimenons und die Regulation der LIF-Expression durch deziduale Zytokine in vitro stützen diese Hypothese (151). Da LIFR-defiziente Mäuse nach erfolgreicher Implantation ein abnormes Wachstum und eine Fehlentwicklung der Plazenta zeigen, spielt LIF vermutlich auch eine Rolle bei der plazentaren Entwicklung (187). LIF kontrolliert als Angiogenese-hemmender Faktor die reguläre Gefäßentwicklung in der Plazenta, die von den komplexen Wechselwirkungen zwischen fördernden und hemmenden Faktoren der Angiogenese abhängt (131, 155).

Aus den in der Literatur vorliegenden Daten ergibt sich ein Modell der LIF-Wirkung in der menschlichen Fortpflanzung, in dem LIF direkt und indirekt in verschiedenen Stadien des Implantationsvorganges eingreift (Abb.1.2) (63). Die Blastozyste selbst spielt dabei eine aktive Rolle, indem sie LIF-Rezeptoren exprimiert, und tritt noch vor der Penetration in Wechselwirkung mit dem Endometrium (21). Vermutlich ist die Sekretion von IL-1 das erste Signal der Blastozyste an das Endometrium, das mit der Aktivierung einiger Zytokin-Gene die kaskadenartige Sekretion von Zytokinen aus dem Epithel auslöst, deren rezeptorvermittelte Wirkung das Endometrium für die Anheftung

der Blastozyste rezeptiv macht und ihre Penetration ins Endometrium einleitet (98, 145). So induziert IL-1 im Endometrium auch die lokale LIF-Produktion (158). LIF wiederum induziert die Bildung von Fibronectin durch den Trophoblasten als Grundlage für die Adhäsion des Embryos ans Endometrium (120). Außerdem reguliert LIF die aktive Proteinase-Produktion durch den Embryo, die zur Invasivität des Trophoblasten beiträgt (64). Zusammen mit anderen Th2-Zytokinen bewirkt LIF in überschießender Konzentration eine lokale pseudo-inflammatorische Reaktion, die zur Immuntoleranz des Embryos wichtig ist. Anhand dieses Modells erscheint es möglich, dass eine verminderte Fähigkeit des Endometriums zur LIF-Sekretion als Antwort auf embryonale Signale für ein Ausbleiben der Implantation verantwortlich ist (63).

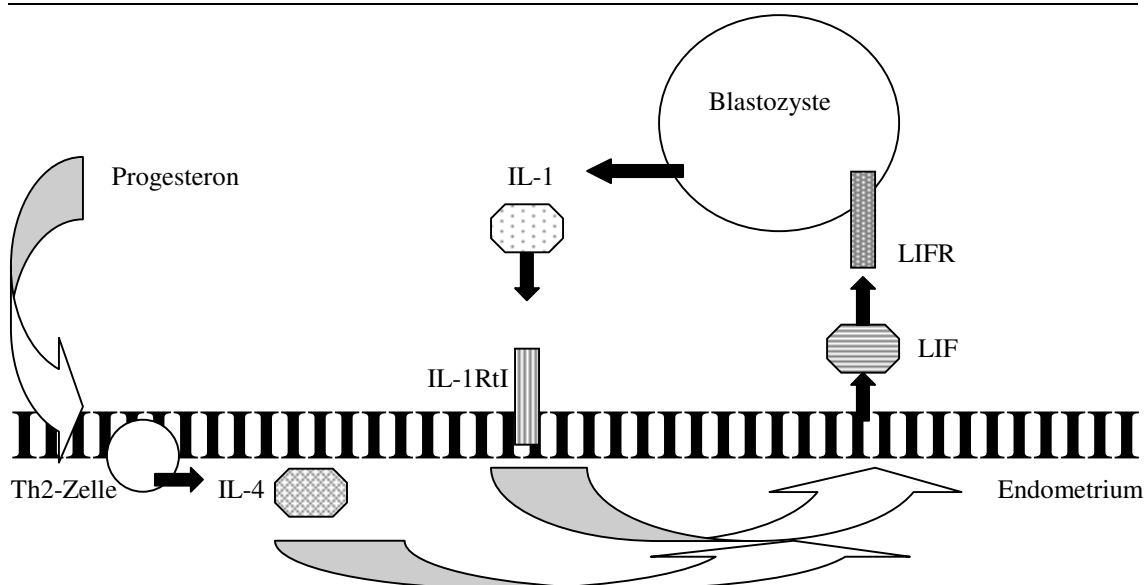


Abb.1.2: Interaktion zwischen Blastozyste und Endometrium bei der Implantation.

Die embryonale Sekretion von IL-1 induziert durch die Bindung an seinen Typ I Rezeptor (IL-1RtI) am endometrialen luminalen Epithel die Expression von LIF, welches an seine Rezeptoren an der Blastozyste bindet und ihre Adhäsion an das Endometrium induziert (98). Auch die progesteroninduzierte IL-4-Produktion durch Th2-Zellen stimuliert die Expression von LIF (68).

1.5.5.6 LIF und Implantationsversagen

Das Fehlen oder die Dysfunktion endometrialer Faktoren, die den Erfolg der Implantation bestimmen, könnte Ursache für idiopathische Infertilität einiger Frauen sowie für die niedrigen Erfolgsraten der assistierten Reproduktion sein.

So trägt möglicherweise eine gestörte LIF-Expression insbesondere während des Implantationsfensters zu menschlicher Infertilität bei. Bei idiopathisch infertilen Frauen

konnte zum natürlichen Zeitpunkt der Implantation in uteriner Spülflüssigkeit LIF-Protein nicht oder im Vergleich zu fertilen Frauen nur in reduzierter Menge nachgewiesen werden (93). Da bei Frauen mit idiopathischer Infertilität die Endometrium-Entwicklung gestört sein soll, könnte dies ein Grund für die reduzierte LIF-Konzentration sein oder umgekehrt der LIF-Mangel zur gestörten Entwicklung des Endometriums beigetragen haben. Zwischen dem Lavagematerial fertiler Frauen und Patientinnen mit habituellen Aborten, bei denen die Implantation ungestört erfolgt, zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Konzentration an LIF-Protein (93). Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass LIF ein wichtiger Implantationsfaktor ist und machen einen LIF-Mangel als Infertilitätsursache bei einem Teil der Frauen mit bislang „idiopathischer Infertilität“ wahrscheinlich.

Zudem produzieren Endometriumkulturen von Biopsien aus der Lutealphase idiopathisch infertiler Frauen signifikant weniger LIF als die fertiler Frauen (35, 63). Hambartsoumian und Mitarbeiter fanden eine Dysregulation der endometrialen LIF-Expression bei Frauen mit idiopathischer Infertilität, die bei infertilen Frauen mit wiederholtem Implantationsversagen nach IVF noch ausgeprägter war (63). Während der proliferativen Phase unterschied sich die LIF-Expression zwar nicht von der fertiler Frauen, zeigte aber große individuelle Schwankungen insbesondere in der Gruppe mit wiederholtem Implantationsversagen. Im Gegensatz zum Anstieg der LIF-Produktion in der sekretorischen Phase bei fertilen Frauen fehlte dieser bei idiopathisch infertilen Patientinnen, bei Frauen mit wiederholtem Implantationsversagen kam es sogar zum Abfall der Zytokinproduktion (63). In den meisten Kulturen explantierter Dezidua von Frauen mit wiederholtem Implantationsversagen nach IVF konnte eine erniedrigte LIF-Produktion nachgewiesen werden (20).

Als Ursache für die reduzierten LIF-Spiegel wird eine gestörte LIF-Expression auf dem Boden genetischer Defekte wie Polymorphismen und Mutationen auf DNA-Ebene vermutet. Diese genetische Prädisposition könnte bei den betroffenen Patientinnen mit anderen Infertilitätsursachen zusammen wirken. Giess und Mitarbeiter konnten 1999 eine signifikant erhöhte Mutationsrate im LIF-Gen infertiler Frauen nachweisen (55). Das Studienkollektiv bestand aus 75 Frauen mit Infertilität unterschiedlicher Ursachen wie Endometriose, polyzystischen Ovarien, Ovulationsstörungen, tubarer, andrologischer oder idiopathischer Sterilität. Hier fanden sie insgesamt drei

heterozygote Punktmutationen im LIF-Gen (Abb. 3.1, S.73). Die biologischen Auswirkungen dieser Mutationen auf die Expression oder die Aktivität des LIF-Proteins sind bislang unbekannt. Eine reduzierte Verfügbarkeit biologisch aktiven LIFs aufgrund einer heterozygoten Mutation könnte die Infertilität einer Gruppe von Frauen verursachen. Eine der Mutationen befand sich in der nicht-kodierenden Region von Exon 1 und zwei betrafen die kodierende Region von Exon 3. Die betroffenen Frauen waren idiopathisch infertil. Die Mutation in Exon 1 war eine C→A Transition an Position 715 des menschlichen LIF-Gens in der Nähe der regulatorischen Region des Startcodons (55). Bei den Mutationen im Exon 3 handelte es sich um zwei G→A Transitionen an den Positionen 3400 und 3424 des LIF-Gens, die zu einem Austausch von Valin zu Methionin an Position 64 des reifen LIF-Proteins bzw. von Alanin zu Threonin an Stelle 72 führen (55). Diese Regionen spielen in der Wechselwirkung mit dem LIF-Rezeptor eine wichtige Rolle (137). In der Kontrollgruppe von 206 fertilen Patientinnen fand sich ein Polymorphismus des LIF-Gens aus einer C→T Transition an Position 3235 im Intron zwischen Exon 2 und 3 ohne zu erwartende Auswirkungen auf die Proteinstruktur oder das Expressionsniveau (55).

1.6 Fragestellung und Ziele der Studie

Bislang liegen nur wenige Daten über die Bedeutung von Mutationen im LIF-Gen als mögliche Ursachen für eine Infertilität beim Menschen vor. Aus den oben dargestellten Zusammenhängen stellt sich die Frage, ob Mutationen im LIF-Gen zu einer Beeinträchtigung der Embryo-Implantation führen können. Möglicherweise führt eine mangelhafte Expression oder eine reduzierte biologische Aktivität des LIF-Proteins im Endometrium zum Implantationsversagen, das unter anderem für ungeklärte Kinderlosigkeit und wiederholtes Versagen einer IVF-Therapie verantwortlich gemacht wird (32, 35, 63, 93,168). Mit einem Mangel oder völligen Verlust von LIF fehlt ein wichtiger Baustein im komplexen Vorgang der Implantation.

Bei Frauen mit Infertilität unterschiedlicher Ursachen fand sich eine signifikant erhöhte Prävalenz biologisch relevanter Mutationen im LIF-Gen im Vergleich zur fertilen Kontrollgruppe (55). Aufgrund der angenommenen Rolle LIFs bei der Implantation lag die Vermutung nahe, dass in einer gezielt ausgewählten Gruppe von Patientinnen mit wiederholtem IVF-Versagen, dem vor allem ein Implantationsversagen zugrunde gelegt wird, vermehrt LIF-Gen-Mutationen vorkommen.

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die molekularbiologischen Analysen des LIF-Gens der Arbeitsgruppe um Giess an dieser spezifischen Patientinnengruppe fortgeführt, um die Prävalenz und die klinische Bedeutung bestimmter funktioneller LIF-Gen-Mutationen zu erfassen und einen Beitrag zum besseren Verständnis der Pathophysiologie des LIF-Mangels zu leisten (55). Mit dem Nachweis von Mutationen im LIF-Gen bei Frauen mit wiederholtem Versagen einer IVF/ICSI-Therapie sollte die Frage, ob dieses Zytokin auch für den menschlichen Implantationsvorgang eine essentielle Rolle spielt, weiter geklärt werden.

Der Nachweis einer Mutation im LIF-Gen hätte für die betroffenen Frauen möglicherweise entscheidende therapeutische Konsequenzen. Einerseits könnte mit dem Nachweis oder Ausschluss einer Mutation im LIF-Gen die Prognose eines IVF/ICSI-Behandlungsversuches beurteilt werden und diesen Patientinnen die dann wenig erfolgversprechende sowie für sie selbst und das Gesundheitssystem belastende Wiederholung der Behandlung erspart bleiben. Andererseits könnte den betroffenen Frauen in Zukunft möglicherweise eine Therapiealternative in Form einer LIF-Substitution angeboten werden. Bei LIF-defizienten Mäusen war durch die intraperitoneale Applikation von LIF eine Kompensation des LIF-Mangels möglich, so dass eine Implantation erfolgen konnte (168).

Zur Identifizierung dieser Gruppe von Infertilitätspatientinnen sollte in dieser Arbeit ein Screening-Verfahren erprobt werden, das eine schnelle Analyse von Mutationen im LIF-Gen erlaubt, und den enormen Arbeitsaufwand sowie die Kosten der direkten Sequenzierung des großen LIF-Gen vermeiden lässt. Als Screeningverfahren wurde die Single-strand conformation polymorphism (SSCP)-Analyse gewählt, mit der Mutationen schnell und einfach aufzufinden sind. Diese Methode ermöglicht zunächst die Selektion alterierter Regionen innerhalb des LIF-Gens, die dann einzeln durch eine spezifische Sequenzierung überprüft werden.

Anhand der Prävalenz von Mutationen im LIF-Gen bei den untersuchten Patientinnen mit wiederholtem Implantationsversagen sollte diskutiert werden, ob ein routinemäßiges Screening von IVF/ICSI-Patientinnen auf Mutationen im LIF-Gen sinnvoll ist, um prognostische Aussagen über das Behandlungsergebnis sowie Ansatzpunkte für eine therapeutische Intervention zu ermöglichen.

2. Patientinnen, Material und Methoden

Im ersten (klinischen) Teil der vorliegenden Arbeit wurden Frauen für die Patientinnen- und Kontrollgruppe rekrutiert und von diesen EDTA-Blutproben für die Extraktion genomischer DNA gesammelt. Im zweiten (experimentellen) Teil erfolgte der Versuch eines molekulargenetischen Nachweises von Mutationen im LIF-Gen mittels PCR-SSCP und nachfolgender DNA-Sequenzierung. Anschließend wurden die Häufigkeiten von Alterationen im LIF-Gen in Patientinnen- und Kontrollgruppe auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht.

2.1 Patientinnen und Kontrollgruppe

2.1.1 Einschlusskriterien und Charakteristika der Patientinnen

Für die Untersuchungen der vorliegenden Studie wurden 50 Patientinnen aus der Sprechstunde für Endokrinologie und Assistierte Reproduktionsmedizin der Universitäts-Frauenklinik Würzburg ausgewählt, deren Sterilitätsbehandlung bislang erfolglos verlief. Sie befanden sich dort von 09/98 bis 07/99 aufgrund unterschiedlicher Sterilitätsursachen in Behandlung.

Folgende Einschlusskriterien galten für die Patientinnen:

- Kinderwunsch seit mindestens zwei Jahren
- Mindestens dreimaliges Versagen einer IVF- und/oder ICSI-Behandlung (IVF/ICSI), wobei auch Kryoeibiotransfere (KET) in neuen, nicht stimulierten Spontanzyklen als Versuche zählten
- Ausschluss einer Schwangerschaft in der Vorgeschichte
- Ausschluss eines Aborts in der Vorgeschichte

Keine der beteiligten Patientinnen war bereits in die Patientinnengruppe der vorausgegangene Studie der Arbeitsgruppe um Giess eingeschlossen (55). Schwerere Grunderkrankungen wie chronische Krankheiten, Autoimmunerkrankungen oder Allergien lagen nicht vor. Die zur Ursachenklärung durchgeführte Sterilitätsdiagnostik umfasste bei den Patientinnen eine Zyklusanamnese, eine vaginale Ultraschalluntersuchung zur Untersuchung der Morphologie von Uterus und Ovarien, eine Tubenfunktionsprüfung (Hysterosalpingo-Kontrastsonographie/laparoskopische Chromopertubation) und eine Basishormonanalyse (Bestimmung von FSH, LH, Östradiol, Progesteron, Prolaktin, DHEAS, Testosteron, 17-OH-Progesteron,

Androstendion und TSH). Beim Partner erfolgte eine Ejakulatanalyse nach WHO-Kriterien mit der Bestimmung des pH-Wertes, der Spermienkonzentration, -motilität, und -morphologie (Tab. 2.1) (190).

Kriterium	Normwert
Volumen des Ejakulats	2,5 - 6,0ml
pH-Wert	7,0 - 7,8
Spermienkonzentration	≥20Mio./ml
Motilität	<20% Motilitätsverlust 2h nach Gewinnung: A: >20% schnell progressiv beweglich B: >20% langsam progressiv beweglich C: nicht progressiv beweglich D: unbeweglich
Morphologie	> 60% Normalformen

Tab. 2.1: Normwerte des Spermioграмms (nach WHO 1992 (190)).

Die IVF/ICSI-Behandlung war zuvor nach dem „Langen Protokoll“ erfolgt, beginnend mit der Suppression der körpereigenen hypophysären Gonadotropin-Sekretion mittels GnRH-Analoga (Triptorelin) bereits ab dem Tag 20 des Vorzyklus bis zur Follikelpunktion (197). Auf die anschließende Überstimulation der Ovarialfunktion mittels intramuskulär verabreichter Gonadotropine (HMG) folgte am Tag 12 die Induktion der Ovulation mit einer intramuskulären Injektion von 10.000IE HCG und die vaginalsonographisch gesteuerte Punktion der reifen Follikel am Tag 14. Nach der Insemination der Eizellen bzw. Mikroinjektion eines immobilisierten Spermiums in eine reife Eizelle und Fertilisation (Pronukleusstadium) wurde der Embryotransfer von maximal drei Zygoten nach zwei Tagen durchgeführt. Bei einigen Patientinnen erfolgte nach erfolglosem IVF/ICSI-ET-Versuch ein erneuter Embryotransfer mit aufgetauten, zuvor im Pronukleusstadium kryokonservierten überzähligen Zygoten im spontanen Zyklus (KET). Die anschließende Lutealphase wurde mittels intramuskulärer Injektion von 5000IE HCG am Transfertag und nach einer Woche sowie vaginal appliziertem Progesteron über 14 Tage unterstützt. 14 Tage nach dem Embryotransfer erfolgte die biochemische Schwangerschaftsbestimmung, eine erfolgreiche Schwangerschaft lag bei einem Wert des HCG im Serum von über 100U/l vor.

Tab. 2.2 gibt Eigenschaften des Patientinnenkollektivs wieder. Das mittlere Alter der betroffenen Frauen betrug $32,55 \pm 3,96$ Jahre (Median, Streubreite: 25-40 Jahre).

Eigenschaften	Median (Streubreite)
Alter (Jahre)	32,55 (25-40)
Kinderwunsch (Jahre)	5 (2-13)
Schwangerschaften/Aborte	keine
Erfolgreiche IVF/ICSI-Versuche (Anzahl)	5 (3-11)
davon KET (Anzahl)	1 (0-9)
Zyklus (Tage): regelmäßig (25-31), (n=33)	28 (25-30) - 29 (26-31)
unregelmäßig (<25, >31), (n=17)	28 (20-30) - 32 (24-60)

Tab. 2.2: Charakteristika der Patientinnen.

Der Kinderwunsch bestand bereits 5 Jahre (Streubreite: 2-13 Jahre). Durchschnittlich lagen fünf erfolgreiche IVF/ICSI-Versuche hinter den Patientinnen, davon war im Mittel ein Versuch ein KET im Spontanzyklus (Tab. 2.2). Für 13 Paare (26%) war es der dritte Versuch, für zehn (20%) der vierte, für zehn (20%) der fünfte, für neun (18%) der sechste. Bei jeweils zwei Paaren (4%) hatte sich nach dem siebten, achten, zehnten bzw. elften Behandlungsversuch noch keine Schwangerschaft ergeben.

Unter den 17 Patientinnen mit unregelmäßigem Menstruationszyklus zeigten sieben nur geringe Abweichungen von der normalen Zyklusdauer (25-4 Tage bis 31+4 Tage) bei unauffälliger Basishormonanalyse (Tab. 2.2). Die restlichen zehn Patientinnen dieser Gruppe wiesen zum Teil Zyklusabweichungen wie Oligo-/Amenorrhö sowie Metrorrhagien auf. Dabei bestanden vereinzelt hormonelle Störungen wie Hyperandrogenämie (n=4), Hyperprolaktinämie (Prolaktin>25ng/ml) (n=2) oder zentrale Ovarialinsuffizienz (n=1).

2.1.2 Einschlusskriterien der Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe bestand aus 105 gesunden, fertilen Frauen der Wochenbettstation der Universitäts-Frauenklinik Würzburg (Alter: Median $31,16 \pm 6,21$ Jahre, Streubreite 18-50 Jahre). Für eine Aufnahme in die Kontrollgruppe waren mindestens eine Lebendgeburt in der Vergangenheit Voraussetzung und ein Abort sowie eine Sterilitäts-

Behandlung in der Vorgeschichte auszuschließen. Ein Teil der Frauen war bereits in die Kontrollgruppe der Studie von Giess und Mitarbeitern eingeschlossen (n=75) (55).

2.1.3 Genehmigung der Studie und Einwilligungserklärung

Die gesetzliche Regelung verpflichtet Studien, die eine Analyse des menschlichen Genoms beinhalten, zur Prüfung auf die ethische und rechtliche Implikation der Versuche vor Studienbeginn. Die vorliegende Arbeit wurde durch die Ethik-Kommission der Julius-Maximilians-Universität Würzburg genehmigt. Alle Patientinnen und Kontrollprobandinnen gaben nach einem eingehenden Aufklärungsgespräch und nach dem Studium eines Informationsbogens ihre schriftliche Einwilligungserklärung über ihre Teilnahme an der Studie („Blutentnahme zu wissenschaftlichen Zwecken“ im Anhang, S.124).

2.1.4 Materialsammlung

Zur Untersuchung wurden jeder Probandin zwei Proben mit jeweils 10ml EDTA-Vollblut venös abgenommen. Die Blutentnahme fand bei den infertilen Patientinnen in den Räumlichkeiten der Sprechstunde für Endokrinologie und Assistierte Reproduktionsmedizin der Universitäts-Frauenklinik Würzburg im Rahmen eines regulären Vorstellungstermins statt. Bei den Kontrollprobandinnen erfolgte die Blutentnahme während ihres stationären Aufenthaltes postpartal auf der Wochenbett-Station der Universitäts-Frauenklinik Würzburg. Bis zur Weiterverarbeitung innerhalb von zwei Tagen nach der Entnahme wurden die Blutproben bei einer Temperatur von 6°C gelagert.

Nach der DNA-Isolation erfolgte die weitere Analyse jeweils nur mit der DNA einer der beiden Blutproben. Die DNA der zweiten Blutprobe jeder Probandin wurde asserviert, um bei Fehlern in der Labormethode und weitergehenden Fragestellungen darauf zurückgreifen zu können.

Zur Durchführung der Laborarbeiten dienten die Räumlichkeiten, Geräte, Materialien und Reagenzien des Forschungslabors für Neuroregeneration der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg („Reagenzien und Geräte“ im Anhang, S. 120).

2.2 Mutationsanalyse

Beide Gruppen wurden nach dem von Giess und Mitarbeitern veröffentlichten Protokoll auf funktionelle Mutationen in kodierenden und wichtigen regulatorischen Regionen des LIF-Gens untersucht (55). Nach der Isolierung genomischer DNA aus peripherem EDTA-Vollblut erfolgte die Amplifizierung der drei kodierenden Exons des LIF-Gens mittels PCR (Polymerase-Chain-Reaction). Daran schloss sich die Untersuchung der PCR-Produkte mittels SSCP (single-strand conformation polymorphism)-Analyse an. Zeigten sich in der Darstellung der DNA-Banden mittels Silberfärbung abnorme Muster, folgte die Laser-Fluoreszenz-Sequenzierung der entsprechenden Sequenzen zur Identifikation von Basenaustauschen.

2.2.1 Definitionen

2.2.1.1 Mutation

Ist ein Gen in einem umschriebenen Bereich verändert, spricht man von einer Punktmutation. Dabei ist die Substitution einer Base durch eine andere möglich sowie das Fehlen (Deletion) oder der Einbau (Insertion) einer oder mehrerer Basen in die Basensequenz. Der Basenaustausch ist die häufigste Mutationsart. Hierbei wird unterschieden zwischen einer Transition, dem Ersatz eines Purins (Adenin, Guanin) durch ein anderes oder eines Pyrimidins (Thymin, Uracil, Cytosin) durch ein anderes, und der Transversion, bei der ein Purin gegen ein Pyrimidin oder umgekehrt ausgetauscht wird. Eine Mutation kann spontan ohne erkennbare äußere Ursache auftreten oder exogen durch sogenannte Mutagene ausgelöst werden. Da Punktmutationen meist nur einen DNA-Strang betreffen, sind über verschiedene Mechanismen regelmäßig Reparaturen möglich, bei denen der komplementäre Strang als Matrize dient.

Die als Dreibasencode (Triplett) festgelegte Information der DNA-Sequenz wird über die Transkription (mRNA-Synthese) in die Synthese von Proteinen (Translation) umgesetzt. Die Veränderung der DNA-Sequenz durch eine Punktmutation verschiebt das Leseraster, so dass neue Basentriplets entstehen. Da für jede Aminosäure mehrere spezifische Triplett-Codons existieren, muss sich die Aminosäuresequenz des entsprechenden Genprodukts aufgrund einer Punktmutation nicht unbedingt verändern. Eine Mutation kann entweder außerhalb des kodierenden Bereichs im Intron liegen oder innerhalb des kodierenden Exons. Im Gegensatz zu Mutationen im Exon eines Gens

sind intronische Mutationen meist als Polymorphismen ohne pathogene Auswirkungen. Eine Ausnahme stellen Veränderungen des Spleißverhaltens oder der Genexpression als Folge einer im Intron lokalisierten Mutation dar. Mutationen, die keine Auswirkung auf die Proteinbiosynthese haben, werden als „stumm“ bezeichnet.

2.2.1.2 Polymorphismus

Die Nukleotidsequenz der menschlichen DNA ist bei verschiedenen Individuen nicht identisch. Kommt eine Nukleotidsequenz in mehreren unterschiedlichen Ausprägungen vor, bezeichnet man sie als polymorph. Von einem genetischen Polymorphismus spricht man, wenn es für ein Gen mehrere Zustandsformen (Allele) gibt, die entsprechende phänotypische Ausprägungen zeigen können. Punktmutationen außerhalb der kodierenden Bereiche des menschlichen Genoms, die die Aminosäuresequenz des Genprodukts nicht verändern, werden Sequenz-Polymorphismen genannt. Solche Einzelnukleotid-Polymorphismen kommen als individuelles Merkmal ungefähr alle paar hundert Basenpaare im menschlichen Genom vor. Die spezifische Kopplung von Polymorphismen und bestimmten Mutationen weist auf einen gemeinsamen Ursprung der Basenaustausche hin und wird daher in Kopplungsanalysen als Marker eines benachbarten Gens oder dessen Punktmutation verwendet.

2.2.2 Gewinnung genomischer DNA aus Leukozyten der EDTA-Blutproben

Zur Extraktion hochmolekularer genomischer DNA diente die Standardmethode zur Isolation von DNA aus kernhaltigen menschlichen Zellen nach Miller und Mitarbeitern, eine schnelle, sichere und kostengünstige Methode insbesondere für vereinzelt anfallende Blutproben (112). Bei diesem Verfahren werden Zellbestandteile mittels einer Proteinase lysiert und zelluläre Proteine einschließlich der DNA durch Dehydratation mit Hilfe einer gesättigten Kochsalz-Lösung ausgefällt. Für die vorliegende Studie wurden Leukozyten des peripheren Blutes zur DNA-Extraktion gewählt. Aus 10ml Blut sollten sich dabei in Abhängigkeit von der Leukozytenzahl ca. 300-800µg DNA isolieren lassen.

Zunächst wurden 10ml EDTA-Vollblut mit 30ml eisgekühltem Lysis-Puffer versetzt und zur Zell-Lyse unter wiederholtem Durchmischen für 15min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (1500rpm, 10min, 4°C) und Verwerfen des Überstandes folgte die Resuspension des entstandenen Pellets in 10ml eiskaltem Lysis-Puffer und die erneute

Zentrifugation. Das wieder entstandene, die kernhaltigen Zellen enthaltende Pellet wurde in einer Mischung aus 5ml SE-Puffer, 250µl SDS (20%) und 50µl Pronase E (10mg/ml) gelöst und zur Proteolyse über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Das anionische Detergens SDS und SE-Puffer unterstützen durch Denaturierung von Proteinen den Zellverdau durch die Pronase E (144).

Nach der Proteolyse wurde die Lösung mit 5ml SE-Puffer versetzt und im Wasserbad bei 55°C für 10min erwärmt. Nach Einpipettieren von 3ml gesättigtem NaCl (6M) und sofortigem Schütteln für 15-20s erfolgte die Zentrifugation (2500rpm, 20min, 25°C). Durch die Neutralisierung kommt es zur Ausfällung von Protein-SDS-Komplexen in Form eines Pellets und einer Schaumschicht. Die DNA bleibt in dem klaren Überstand in Lösung.

2.2.3 Alkoholische Fällung der DNA

Durch die Präzipitation mit Ethanol in der Gegenwart von Kationen (NaCl) kann DNA konzentriert werden (144). Der klare Überstand wurde möglichst schaumfrei abgegossen und mit zwei Volumina Ethanol (100%) gemischt, wodurch die DNA als Knäuel ausfiel. Das DNA-Knäuel wurde mit einer sterilen Pasteur-Pipette entnommen und zur Entfernung des Salzes in 1ml Ethanol (70%) gewaschen. Vorsichtig wurde der Ethanol-Überstand abpipettiert, restliches Ethanol verdunstete bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die Lösung der verbleibenden DNA in 500µl TE-Puffer. Die gelöste DNA (60µl) konnte so in Eppendorfreaktionsgefäßen bis zur weiteren Bearbeitung durch PCR und SSCP im Kühlschrank bei 6°C aufbewahrt bzw. bei -18°C tiefgekühlt werden.

2.2.4 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA

Die Reinheit der isolierten DNA, d.h. das Fehlen von Verunreinigungen wie Proteinen oder RNA, wurde photometrisch anhand der optischen Dichte (OD) überprüft. Dabei wurde die Extinktion der in TE-Puffer gelösten DNA bei einer Wellenlänge von 260nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, gemessen. Eine OD_{260} von 1 entspricht etwa 50µg/ml dsDNA oder 40µg/ml ssDNA und RNA (144). Aromatische Aminosäuren als Bestandteile von Proteinen haben ihr Absorptionsmaximum bei 280nm. Somit gibt der Quotient OD_{260}/OD_{280} Auskunft über den Grad der Reinheit der DNA-Proben. Für reine DNA sollte das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} zwischen 1,8-2,0

liegen (144). Bei höheren Werten liegt ein höherer RNA-Gehalt vor, während niedrigere Werte auf eine Proteinverunreinigung hinweisen. In den untersuchten DNA-Proben lag das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} im Bereich von 1,7-2,0.

2.2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation des LIF-Gens

2.2.5.1 PCR: Reaktionsprinzip

Mit der 1985 eingeführten Methode der Polymerasekettenreaktion (140) kann DNA aus einem spezifischen Genomabschnitt *in vitro* vervielfältigt und für zahlreiche molekularbiologische Analysemethoden insbesondere zur Mutationssuche verwendet werden. Aufgrund der enormen Sensitivität der PCR lassen sich bereits Spuren von Nucleinsäuren mit hoher Ausbeute amplifizieren.

Das Reaktionsprinzip der PCR ist aus der DNA-Replikation abgeleitet. Der ausgewählte DNA-Abschnitt (Zielsequenz) dient als Vorlage (Matrize) für seine enzymatische Amplifikation. Als Startmoleküle (Primer) für die DNA-Polymerase dienen synthetische einzelsträngige DNA-Oligonukleotide, deren Sequenzen komplementär zu den beiden Strängen der flankierenden Bereiche des zu amplifizierenden doppelsträngigen DNA-Abschnittes sind (Primerpaar aus sense- und antisense-Primer). Die hier verwendete Taq DNA-Polymerase ist eine gentechnisch hergestellte, thermostabile DNA-abhängige Polymerase, die ursprünglich aus dem extrem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde. Sie synthetisiert bei einem pH-Optimum von 7-8 und einem Temperatur-Optimum von 72-80°C DNA mit einer Polymerisationsgeschwindigkeit von 150 Nucleotiden/s.

Die gesamte Reaktion besteht aus drei Teilschritten von je 30 Sekunden bis 2 Minuten Dauer bei jeweils unterschiedlichen Temperaturen, die sich zyklisch wiederholen („thermal cycling“) (Abb. 2.1). Im ersten Schritt eines Zyklus, der Denaturierung (>90°C), wird der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen in Einzelstränge überführt. Anschließend wird der Reaktionsansatz auf eine für die Primer günstige Hybridisierungstemperatur (ca. 45-65°C) abgekühlt. So können sich die Primer an die komplementären 3'-Enden der einzelsträngigen DNA-Abschnitte zu kurzen doppelsträngigen Startstellen für die DNA-Polymerase binden (Annealing). Hohe Annealingtemperaturen erhöhen die Spezifität des PCR-Produktes, während bei niedrigen Temperaturen die Ausbeute vergrößert wird. Im dritten Schritt, der Polymerisation, liest die DNA-Polymerase die Matrize von 3' nach 5' ab und

synthetisiert aus den vier hinzugefügten Desoxy-Nukleotiden (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) den komplementären Strang von 5' nach 3' (72°C). So entstehen aus zwei DNA-Einzelsträngen zwei DNA-Doppelstränge, welche die Zielsequenz beinhalten.

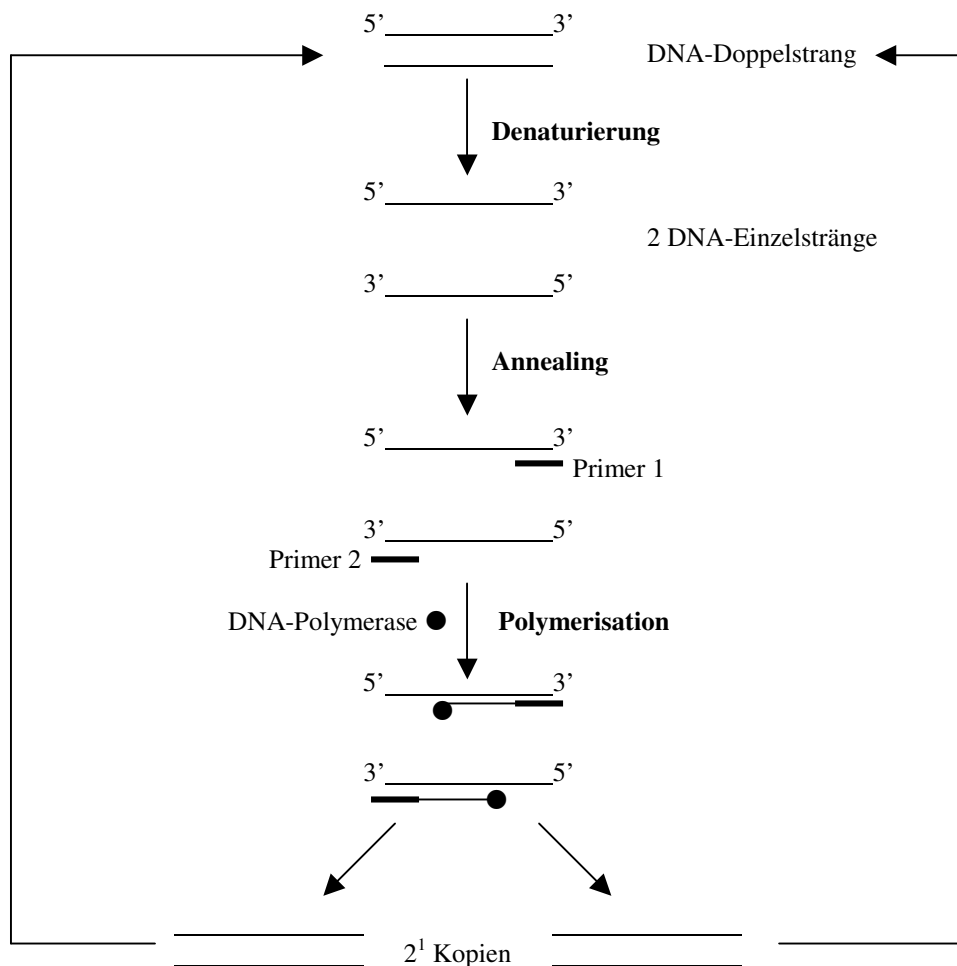


Abb. 2.1: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion.

Da die neu synthetisierten DNA-Stränge in den folgenden Zyklen als Matrizen für die Primer dienen, wächst die Anzahl der Zielsequenzen durch den wiederholten Reaktionsablauf exponentiell. Nach zwanzig Zyklen ergibt sich eine theoretische Anreicherung um den Faktor 10^6 , das heißt aus einem Molekül DNA können eine Million neuer identischer Moleküle (Kopien) entstehen. In der Praxis erhält man aber eine tatsächliche Amplifikationsrate von ungefähr 10^5 , da die Reaktionsbeuten nicht bei 100% liegen. Durch die Automatisierung des Verfahrens mittels moderner PCR-Geräte (Thermocycler) können in wenigen Stunden mehr als dreißig Zyklen ablaufen.

2.2.5.2 PCR: Auswahl der Primer

Neben den Reaktionsbedingungen ist die Wahl der Primer von entscheidender Bedeutung für den Erfolg einer PCR. Voraussetzungen für eine Primersequenz sind neben einer gleichmäßigen Basenverteilung das Fehlen sowohl von Palindromen (Rotationssymmetrie), um die Bildung intramolekularer Sekundärstrukturen zu verhindern, als auch von komplementären Bereichen in den beiden in einer Reaktion eingesetzten Primern. Ein typischer Primer ist 20-30 Nukleotide lang und weist einen G/C-Gehalt von ungefähr 50% auf. Diese Oligonukleotide sind zu kurz, um während der Polymerisation stabile Hybride zu bilden.

Zur Amplifikation des kodierenden LIF-Gen-Abschnitts wurden insgesamt fünf Primer-Paare verwendet, die in der Studie der Arbeitsgruppe Giess als Ergebnis einer Testreihe von Primer-Paaren optimale Amplifikationsbedingungen schafften (Tab. 2.3) (55). Sie begrenzen die drei Exons und Teile der Introns des LIF-Gens, um auch Mutationen im Bereich der Splicing-Regionen zu erfassen (166). Um für die nachfolgende SSCP-Analyse eine optimale Länge der DNA-Fragmente unter 300 Nukleotiden zu erzielen, wurde Exon 3 bei der Amplifikation durch drei Primer-Paare in drei Teilfragmente aufgetrennt, die sich in weiten Teilen überlappten (55). Die von den Primerpaaren flankierten DNA-Sequenzen entsprechen amplifizierten PCR-Produkten mit Moleküllängen von 143 (Exon 1), 268 (Exon 2), 284 (Exon 3a), 284 (Exon 3b) und 243 (Exon 3c) Basenpaaren.

Exon	Primer	Sequenz
Exon 1	A2 (sense)	5'-ACT GCC GGC ATC TGA GGT TTC CTC-3'
	B2 (antisense)	5'-GCT GCC AAG CGC CCC AAG TTG CCG-3'
Exon 2	A1 (sense)	5'-GCC ACC CTT TCC TGC CTT TCT AC-3'
	B1 (antisense)	5'-TCC CTG CCA TCT CCT GTC AGT ATC-3'
Exon 3	Set a: A1 (sense)	5'-ACA ATT CCA GAT GCT TAC AGG G-3'
	B1 (antisense)	5'-GCC AAG GTA CAC GAC TAT GC-3'
	Set b: C1 (sense)	5'-CCC AAC AAC CTG GAC AAG CTA TG-3'
	D1 (antisense)	5'-CCG TAG GTC ACG TCC ACA TG-3'
	Set c: E1 (sense)	5'-CCT CCA CAG CAA GCT CAA CG-3'
	F1 (antisense)	5'-CGG TTC ACA GCA CAC TTC AAG-3'

Tab. 2.3: Primer zur Amplifikation des LIF-Gens (nach Giess 1999 (55)).

Das Primer-Paar für Exon 1 flankiert die Nukleotide 671 bis 813, von denen 50 zu der nicht-kodierenden 5' Region, 19 zur das aminoternale Signalpeptid kodierenden Region und 74 zur nicht-kodierenden 3' Region des LIF-Gens zählen. Mit dem Primer-Paar für Exon 2 wird das Exon 2 selbst sowie die flankierenden 50 und 39 Nukleotiden der nicht-kodierenden 5'- bzw. 3'-Region amplifiziert (Nukleotide 2421 bis 2688). Das Exon 3 wurde durch drei Primer-Sets amplifiziert, welche insgesamt die Nukleotide 3200 bis 3782 umfassen. Davon besteht das PCR-Produkt von Set a aus 143 Nukleotiden der nicht-kodierenden 5'-Region und 141 Nukleotiden der kodierenden Sequenz des Exon 3 (Nukleotide 3200 bis 3483). Set b umfasst die Nukleotide 3367 bis 3650 der kodierenden Region, Set c die Nukleotide 3540 bis 3782 einschließlich der nicht-kodierenden 3'-Region.

Die Primer werden im Überschuss zum Reaktionsansatz hinzugegeben, um Primer-Matrizen-Hybride als Substrate für die Taq DNA-Polymerase zu bilden und eine Rehybridisierung der denaturierten DNA-Einzelstränge zu verhindern. Die Konzentration der Primer muss so gewählt werden, dass diese einerseits für die erforderliche Zykluszahl ausreichen, andererseits aber auch nicht ektop hybridisieren und unerwünschte Sequenzen amplifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden 40µl Primer-Stammlösung (100pmol/µl) mit 160µl Aqua dest. auf eine in Titrationsreihen ermittelte Konzentration von 20pmol/µl verdünnt und bis zur Anwendung im PCR-Reaktionsansatz auf Eis gelagert bzw. bei -18°C eingefroren (55).

2.2.5.3 PCR-Programm zur Amplifikation des LIF-Gens

Die einzelnen PCR-Komponenten wurden auf Eis zu einem Reaktionsansatz von 50µl gemischt, wobei die Taq DNA-Polymerase als letzte Komponente direkt vor Zugabe der DNA und Einsetzen in den Thermocycler hinzugefügt wurde, um eine Zerstörung des sehr empfindlichen Enzyms nach dem Auftauen zu verhindern (Tab. 2.4). In jedem PCR-Durchlauf wurde ein Reaktionsansatz ohne DNA-Matrize als negative Kontrolle mitgeführt, um Kontaminationen auszuschließen.

Reaktionsansatz (50 µl)	Komponenten
38,75µl	Aqua dest.
5µl	10 x PCR-Puffer
4µl	dNTP-Mix (2,5mM)
0,5µl	sense-Primer (20pmol/µl)
0,5µl	antisense-Primer (20pmol/µl)
0,25µl	Taq DNA-Polymerase (5U/µl)
1µl	DNA-Matrize (ca. 100ng)

Tab. 2.4: PCR-Reaktionsansatz für die LIF-Gen-Amplifikation (nach Giess 1999 (55)).

Die Reaktionsbedingungen des PCR-Programms sind Ergebnis von Versuchsreihen zur Optimierung von Temperaturprofilen und Zykluszahlen zur effektivsten Amplifikation des LIF-Gen-Abschnittes durch die Arbeitsgruppe um Giess (Tab. 2.5) (55). Nach der initialen Strangtrennung der DNA erfolgten 34 Amplifikationszyklen. Für das Primer-Set b des Exon 3 wurde eine niedrigere Annealingtemperatur gewählt. Die abschließende Polymerisation bei 72°C beendete das Programm.

	Anzahl der Zyklen	Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Dauer (s)
1. Stufe	1 Zyklus	Denaturierung	94	300
2. Stufe	34 Zyklen	Denaturierung	94	30
		Annealing	65/60	30
		Polymerisation	72	60
3. Stufe	1 Zyklus	Polymerisation	72	600
		Abkühlung	15	

Tab. 2.5: PCR-Programm zur Amplifikation des LIF-Gens (nach Giess 1999 (55)).

Die PCR-Produkte wurden bis zur Längenbestimmung mittels Agarosegel-Elektrophorese für eine Dauer von maximal zwei Tagen bei +6°C im Kühlschrank aufbewahrt, bei späterer Analyse bei -18°C eingefroren.

2.2.5.4 Gel-Elektrophorese von DNA

DNA-Fragmente können wie andere Makromoleküle mittels Gel-Elektrophorese anhand ihrer Länge aufgetrennt und identifiziert werden. Dabei wird die unterschiedlich schnelle Wanderung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld zwischen einer

Kathode und einer Anode in einer elektrisch neutralen Gelmatrix zu deren Trennung ausgenutzt. Als Gelmatrizes dienen Agarose, ein natürlich vorkommendes lineares Zuckerpolymer, oder Polyacrylamid. Unterschieden werden native, nicht-denaturierende Gele, in denen DNA-Doppelstränge erhalten bleiben, von denaturierenden Gelen, in denen es zur Strangtrennung kommt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte im Agarosegel. Im Gegensatz zur elektrophoretischen Trennung der DNA-Fragmente im Polyacrylamidgel unter nicht-denaturierenden Bedingungen bei der SSCP-Analyse kam bei der Sequenzierung denaturierendes Polyacrylamidgel zur Anwendung, das zusätzlich denaturierende Substanzen wie Harnstoff oder Formamid enthält, die eine Basenpaarung innerhalb der Nukleinsäuren verhindern. Diese Methode hängt somit nicht von der Basenfolge der DNA-Moleküle ab, kann aber bereits DNA-Einzelstränge auftrennen, die sich in ihrer Länge um ein einzelnes Nukleotid unterscheiden (144). Im Vergleich zu Agarosegelen bieten Polyacrylamidgele Vorteile wie eine deutlich bessere Auflösung von DNA-Molekülen mit nur geringen Längenunterschieden, die Auftrennung größerer DNA-Mengen und die Gewinnung extrem reiner DNA (144).

Die bei neutralem pH negativ geladenen DNA-Fragmente wandern bei der Elektrophorese zur Anode. Dies geschieht aufgrund des größeren Reibungswiderstandes umso langsamer, je größer die DNA-Fragmente sind. Zwischen der Wanderungsstrecke von DNA-Fragmenten und dem Logarithmus ihrer Größe (Anzahl der Basenpaare) besteht ein linearer Zusammenhang: die Wanderungsgeschwindigkeit ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molekülgröße (144). Somit ist es möglich, mittels eines DNA-Längenstandards, der DNA-Fragmente bekannter Größe enthält und parallel zu den PCR-Produkten auf das Gel aufgetragen wird, die Länge unbekannter Fragmente aus einer halblogarithmischen Auftragung zu ermitteln.

Das Wanderungsverhalten hängt außerdem von der Stromstärke des angelegten elektrischen Feldes, der dreidimensionalen Form der Moleküle sowie der Ionenstärke des Puffers, der Porengröße und der Temperatur der verwendeten Gelmatrix ab (144). Der Trennbereich der Matrizes kann durch unterschiedlichen Agarose- bzw. Polyacrylamidgehalt verändert werden. Dabei verschiebt sich der optimale Trennbereich bei höher konzentrierter Matrixsubstanz in Richtung kleinerer DNA-Moleküle (144). In der Abwesenheit von Ionen ist die elektrische Leitfähigkeit und

DNA-Wanderung minimal. Deshalb werden Elektrophorese-Puffer mit idealer Ionenstärke verwendet, die z.B. Tris-Acetat (TAE) enthalten (144).

Nach der Elektrophorese werden die aufgetrennten DNA-Moleküle durch Interkalationsfarbstoffe wie z.B. Ethidiumbromid als Banden im Gel dargestellt. Ethidiumbromid lagert sich mit seiner planaren Gruppe zwischen die Basen der DNA ein. Ultraviolettes Licht der Wellenlänge 254nm wird von der DNA absorbiert und auf den Farbstoff übertragen. Licht der Wellenlänge 302 bis 366nm wird von dem gebundenen Farbstoff selbst absorbiert. Diese Energie wird als rot-orange Fluoreszenz mit 590nm im sichtbaren Spektrum abgegeben. Da die Fluoreszenz des Komplexes aus Ethidiumbromid und DNA stärker als die des ungebundenen Farbstoffes ist, können kleine Mengen an DNA in der Gegenwart von Ethidiumbromid im Gel entdeckt werden (144).

2.2.5.5 Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte des LIF-Gens

Um die amplifizierten DNA-Fragmente des LIF-Gens mit Längen von 143 bis 284bp zu identifizieren, wurden die PCR-Produkte in für diese Größe optimalen 2%-igen Agarosegelen aufgetrennt.

Zur Herstellung des Agarosegels wurden 6g Agarose in 300ml 1xTAE-Puffer (Elektrophoresepuffer) aufgekocht und nach Abkühlung auf 60°C mit Ethidiumbromid versetzt (0,005%). Die flüssige Agarose wurde auf eine horizontale Gelkammer gegossen, Geltaschen bildeten sich durch Einsetzen eines Kunststoffkammes (Tab. 2.6).

Gelkammergröße (mm ²)	Gelmenge (ml)	Ethidiumbromid (µl)	Spannung (V)	Dauer (min)
40 x 70	25	1	60 - 80	30
80 x 70	150	7 - 8	110	30 - 45
140 x 140	250	12 - 13	< 140	45

Tab. 2.6: Reaktionsbedingungen der Agarosegel-Elektrophorese.

Nach Erstarren des Gels und Auffüllen der Gelelektrophoresekammer mit Elektrophoresepuffer (1xTAE-Puffer) konnte das Gel beladen werden. In die erste Geltasche einer Gelkammer wurden jeweils 4µl Längenstandard-Marker (PHI-X174 RF DNA/Hae III Fragments) aufgetragen. Dieser beinhaltet DNA-Fragmente des Plasmids

Φ X174 RF DNA in einer Konzentration von 0,5µg/µl, die durch Verdau mit der Restriktionsendonuklease Hae III entstanden sind. Die Fragment-Längen betragen 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 und 72bp und erscheinen als Bandenleiter am Gelrand. Der Längenstandard ist damit zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten der Längen 72 bis 1353bp geeignet.

Vor dem Auftragen von jeweils 10µl PCR-Probe in die Geltaschen wurde jede Probe mit ca. 1µl Gel-Ladepuffer gemischt. Der Einsatz von Gel-Ladepuffer hat den Vorteil, dass die Dichte der Proben erhöht wird und die DNA gleichmäßig in die Geltaschen sinkt. Durch die blaue Eigenfarbe kann die Beladung der Geltaschen kontrolliert werden. Aufgrund der bekannten Wanderungs-Geschwindigkeit der Farbstoffe (Bromphenolblau, Xylencyanol) im elektrischen Feld kann an deren Wanderungsstrecke auf die zurückgelegte DNA-Wanderungsstrecke geschlossen werden.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei Raumtemperatur abhängig von der Größe der Gelkammern bei 60 bis 140V (Tab. 2.6). Eine zu hohe Spannung vermindert eine wirksame Auftrennung der DNA-Fragmente (144). Nach Ablösen des Gels von der Elektrophoresekammer wurden die DNA-Banden unter UV-Licht der Wellenlänge 312nm dargestellt und fotografiert.

2.2.6 SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism)-Analyse

2.2.6.1 Theoretische Grundlagen der SSCP-Analyse

Eine schnelle und sensitive Möglichkeit des Mutationsnachweises ist die SSCP-Analyse, die erstmals 1989 zum Nachweis von Polymorphismen für familiäre Kopplungsanalysen im menschlichen Genom entwickelt wurde (127). Die Methode beruht auf dem Prinzip, dass die elektrophoretische Mobilität von DNA-Einzelsträngen nicht nur von ihrer Länge sondern auch von ihrer Sequenz und Sekundärstruktur abhängt.

Durch Denaturierung mittels kurzer Hitzeeinwirkung entstehen aus einem DNA-Doppelstrang zwei DNA-Einzelstränge. Diese einzelsträngige DNA formt bei der Elektrophorese unter nicht-denaturierenden Gelbedingungen durch Faltung eine Sekundärstruktur (Konformation), die auf der Paarung intramolekularer komplementärer Basen beruht und spezifisch für die Nukleotidsequenz eines DNA-Einzelstrangs ist (Abb. 2.2) (126). Die Sekundärstruktur der beiden Einzelstränge eines

Doppelstrang-DNA-Moleküls unterscheidet sich also, da deren Basenfolgen zwar komplementär aber nicht identisch sind. Außerdem hängt sie von weiteren Bedingungen wie der Temperatur der Elektrophorese, der Konzentration des Elektrophorese-Puffers, der Zusammensetzung und Konzentration des Elektrophorese-Gels und der Länge des DNA-Einzelstranges ab (126, 127). Die Gelporen behindern die Beweglichkeit der DNA-Einzelstränge entsprechend ihrer Sekundärstruktur und damit ihrer Größe, Ladung und Form unterschiedlich stark, was zur Auftrennung der Einzelstränge auf dem Gel führt.

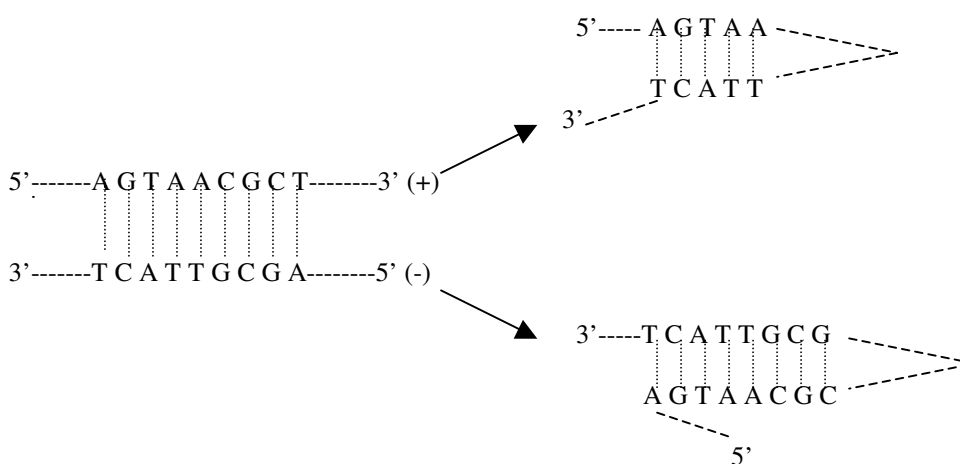


Abb. 2.2: Schematische Darstellung einer einzelsträngigen DNA-Molekül-Faltstruktur nach der Denaturierung des DNA-Doppelstranges (Sekundärstruktur).

Durch geeignete Faltung können Sequenzen innerhalb eines DNA-Einzelstranges, die zueinander komplementär sind, zu Basenpaaren zusammentreten. Aufgrund der unterschiedlichen Basenfolgen sind die zwei komplementären Einzelstränge eines DNA-Doppelstranges verschieden konfiguriert.

Entscheidend für die Auflösung bei der Trennung der Einzelstränge ist die Gelzusammensetzung. Die Porengröße eines Polyacrylamid-Gels wird durch die Länge der Polyacrylamidketten und den Grad ihrer Quervernetzungen beeinflusst. Der Anteil an Acrylamid-Monomeren im Gel bestimmt die Kettenlänge (%T). Die Quervernetzungen der Polyacrylamidketten entstehen durch Zugabe von Bisacrylamid und sind definiert als Verhältnis von Bisacrylamid zu Acrylamid x 100 (%C) (58). Als optimale Gelmatrix zur Auftrennung komplementärer DNA-Einzelstränge gilt ein Polyacrylamidgel mit einem niedrigen Anteil an Quervernetzungen, also Gele mit größeren Poren, die große Moleküle weniger bei der Wanderung im elektrischen Feld behindern (106). Beim Acrylamidanteil gilt eine höhere Konzentration als optimal für

die Auftrennung der Fragmente (58). Ein zusätzlicher Vorteil von Gelen mit höherer Acrylamidkonzentration und niedrigerem Grad an Quervernetzungen ist die verkürzte Elektrophoresezeit (58).

Bereits durch den Austausch einer Base im Rahmen einer Punktmutation bzw. durch eine Basendeletion oder -insertion erfolgt eine veränderte Faltung des DNA-Einzelstranges. Die neue Konformation des mutierten Stranges verändert dessen elektrophoretische Mobilität gegenüber dem normalen Strang und führt zu einem anders gearteten Laufverhalten des DNA-Einzelstranges im elektrischen Feld (123). Bei heterozygoten Mutationen entstehen aus dem punktmultierten und dem nicht mutierten DNA-Molekül somit vier verschiedene Einzelstrang-Konformationstypen mit vier unterschiedlichen Banden in der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (single-strand conformation polymorphism, SSCP) (Abb. 2.3) (126).

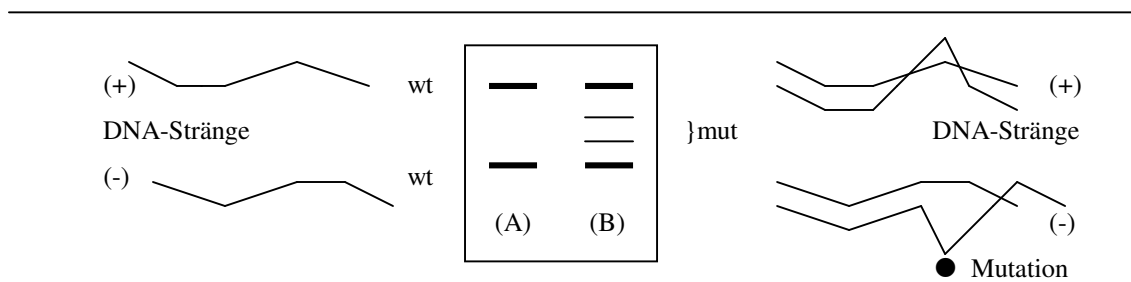


Abb. 2.3: SSCP-Analyse zur Detektion alterierter Gensequenzen auf einem Polyacrylamidgel.

(A) zeigt die Banden von zwei Einzelstrang-Konformationstypen eines nicht mutierten Genabschnittes (wildtyp=wt). (B) zeigt eine heterozygote Mutation des Genabschnittes mit den Banden von insgesamt vier Einzelstrang-Konformationstypen, da die Probe punktmutierte (mut) und nicht mutierte DNA-Moleküle des gleichen Genabschnittes enthält.

Die Gelauswertung ist standardisiert möglich, indem die Proben neben der Wildtyp-Probe nebeneinander auf ein Gel aufgetragen werden und vorher festgelegte Differenzen der Laufstrecke zwischen Wildtyp und Mutation bzw. Polymorphismus als positiv gewertet werden (58). Zur Identifizierung der Banden lässt man parallel dazu aus Plasmiden abgeleitete DNA-Standards für unterschiedliche Molekulargewichte auf dem Gel mitlaufen.

Die optische Erfassung des untersuchten DNA-Strangs als Bande im Elektrophoresegel erfolgte bislang über radioaktive Markierung, die lange Expositionszeiten am Röntgenshirm erforderte (126). Durch die schnellere und sicher reproduzierbare Anfärbung der Gele mittels Silberionen konnte die Auflösung selbst bei stark

verdünnten DNA-Proben verbessert werden (2, 39, 171). Mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid konnte der zeitliche Ablauf des Verfahrens weiter verkürzt werden, die Empfindlichkeit der Methode liegt jedoch deutlich unter der Sensitivität der Silberfärbung (148, 193).

Die SSCP-Analyse wird zur Mutationssuche mit der PCR-Technik kombiniert. Mittels PCR kann die DNA-Sequenz des interessierenden Genbereichs amplifiziert und gleichzeitig durch markierte Primer gekennzeichnet werden (141). Mit den PCR-Produkten erfolgt anschließend die SSCP-Analyse.

2.2.6.2 SSCP-Analyse der PCR-Produkte des LIF-Gens

Zur Anwendung kam ein industriell gefertigtes und bereits mit 36 Geltaschen versehenes 10%-iges natives Polyacrylamidgel mit 2% Quervernetzungen für die horizontale Elektrophorese (11cm Trennrichtung). Zur Detektion von einzelnen Basenaustauschen erbrachten Gele dieser Zusammensetzung die besten Ergebnisse (58, 65). Es eignet sich für die Auftrennung von DNA-Fragmenten der Länge 50-2000bp, das Auflösungsoptimum wird bei Fragmenten von 100-300bp erreicht. Mit einer Stärke von 0,65mm ist es auf einem Polyesterfilm polymerisiert, gewaschen und getrocknet. Vorteile industriell gefertigter, standardisierter Minigele liegen in dem geringen zeitlichen Aufwand der Gelvorbereitung und der Möglichkeit, bis zu 36 Proben gleichzeitig in einer Elektrophorese untersuchen zu können. Der Nachteil besteht darin, dass eine Optimierung der Mutationsdetektion durch die Gelstärke somit nicht mehr möglich ist.

Die Rehydrierung des Gels erfolgte in einer Lösung aus 35ml Gel-Puffer, 18µl TEMED und 28µl Enhancer. Durch das Hinzufügen von Enhancer erhält man schärfere Banden. Zur Entfernung überschüssiger Rehydrierungslösung wurde die Flüssigkeit durch mehrmaliges Bestreichen des Gels mit einem Filterpapierstreifen vorsichtig aufgenommen. Danach wurde das Gel luftblasenfrei auf die Teflonplatte der SSCP-Elektrophoresekammer gelegt, die zuvor zur besseren Kälteübertragung zwischen Platte und Gel mit einem Mineralölfilm bestrichen wurde. Zwei mit Elektrodenpuffer getränkte Elektrodenpapierstreifen wurden an den Längsenden des Gels aufgelegt und leicht an das Gel angedrückt.

Währenddessen wurden jeweils 4µl PCR-Produkt mit 8µl Formamid 95% gemischt. Formamid 95% enthält Xylencyanol und Bromphenol als Marker zur Darstellung der Banden auf dem Gel. Die so vorbereiteten PCR-Produkte wurden 5min lang bei 95°C denaturiert und rasch für 5min auf Eis abgekühlt. Dies führt zum Erstarren der DNA-Einzelstränge, was eine Rehybridisierung der beiden komplementären Einzelstränge verhindert und die Bildung ihrer Sekundärstruktur fördert. Jeweils 6µl der Proben wurden dann unter Raumbelüftung in die 36 Geltaschen aufgetragen.

Das Überladen des Gels mit PCR-Produkt führt zu abnormen Banden mit falsch positiven Ergebnissen (65). Durch die starke Verdünnung der Proben wurde dies in der vorliegenden Arbeit vermieden und durch Beimischung von Markern trotzdem die Detektierbarkeit der Proben ermöglicht. Zudem vermeidet die Verdünnung der Proben die Rehybridisierung der DNA-Einzelstränge, zu der diese vor der elektrophoretischen Auftrennung neigen, was wie die inkomplette Denaturierung der Doppelstrang-DNA vor der Elektrophorese zu falsch negativen Ergebnissen führt (65). Zum Anbringen der Spannung wurde eine Glasplatte mit zwei Drähten an den Enden auf die Elektrodenpapierstreifen gestellt. Die Glasplatte deckt das Gel komplett ab und schützt es so vor Sauerstoff, der die Polymerisation des Gels beeinträchtigt (144).

Exon	Temperatur (°C)	Spannung (V)	Stromstärke (mA)	Leistung (W)	Zeit (min)
Exon 1	8	110	16	6	20
	8	600	42	16	85
Exon 2	8	110	16	6	20
	8	600	42	16	135
Exon 3 Set a	8	110	16	6	20
	8	600	42	16	135
Set b	12	110	16	6	20
	12	600	42	16	120
Set c	12	110	16	6	20
	12	600	42	16	120

Tab. 2.7: SSCP-Elektrophoresebedingungen zur Analyse des LIF-Gens (55).

Die Elektrophorese erfolgte nach den in Tab. 2.7 dargestellten SSCP-Bedingungen für die entsprechenden Exons des LIF-Gens, bis die türkisfarbene Xylencyanol-Bande die

gegenüberliegende Seite (Anode) des Gels erreicht hatte. Die gleichmäßige Temperierung sowie der regelrechte Ablauf des jeweiligen SSCP-Programmes wurden durch das Kühlsystem der Elektrophoresekammer gewährleistet.

2.2.6.3 Silberimprägnierung zur Darstellung der DNA-Banden

Zur Darstellung der DNA-Banden wurde das Gel mit einer standardisierten Silber-Imprägniermethode gefärbt (10). Dafür kam das für 0,65mm dicke Gele modifizierte Protokoll eines Silver-staining-Kits (ETC Corp.) zur Anwendung. Die entsprechenden Reaktionslösungen wurden unmittelbar vor ihrem Gebrauch hergestellt.

Bei der Methode handelt es sich um eine photochemisch abgeleitete Reaktion, in der Silberionen an Basen von Nukleinsäuren binden und unter alkalischen Bedingungen selektiv durch Formaldehyd zu metallischem Silber reduziert werden (10).

Nach der Elektrophorese wurde das Gel gereinigt und in 250ml 50°C warmer Fixierlösung für 30min fixiert. Nach gründlicher Spülung in Aqua dest. erfolgte anschließend die Versilberung des Gels unter Schütteln in 200ml Silberlösung 0,1% für 30min. Die Verwendung von Formaldehyd in der Silberlösung verbessert sowohl die Sensitivität als auch den Kontrast der Banden (10).

Danach wurde das Gel gründlich mit Wasser ab gespült und in 200ml Entwicklerflüssigkeit getaucht. Thiosulfat in der Entwicklerflüssigkeit bindet unlösliche Silbersalze und entfernt somit Silberionen von der Geloberfläche, was unspezifische Anfärbungen des Gelhintergrundes verhindert (10). Nach ca. 10min Schütteln wurden Banden sichtbar. Um den Gelhintergrund nicht zu dunkel zu färben, wurde der Vorgang bei der gewünschten Farbintensität der Banden mit 250ml Stopp-Lösung beendet. Das Glycin in der Stopp-Lösung verbessert die Auflösung der einzelnen Banden, indem es den Hintergrund der Silberfärbung abschwächt (171). Unter Schütteln in dieser Lösung dunkelten die Banden noch ca. 10min nach. Um die Banden zu fixieren, musste das Gel nach Entfernung aus der Stopp-Lösung in 250ml Glycerol 10% für 10min imprägniert werden. Über Nacht wurde das Gel getrocknet und konnte dann in Folien aufbewahrt werden. Ein Verblässen der Gele tritt selbst nach Jahren nicht auf, wenn letzte Spuren von Thiosulfat vor dem Trocknen sorgfältig ausgewaschen werden (10).

Beim Auftreten auffälliger Bandenmuster wurden die entsprechenden DNA-Fragmente erneut mittels PCR amplifiziert und in der SSCP-Analyse untersucht, um die Spezifität der ersten Reaktion zu überprüfen und methodische Fehler auszuschließen.

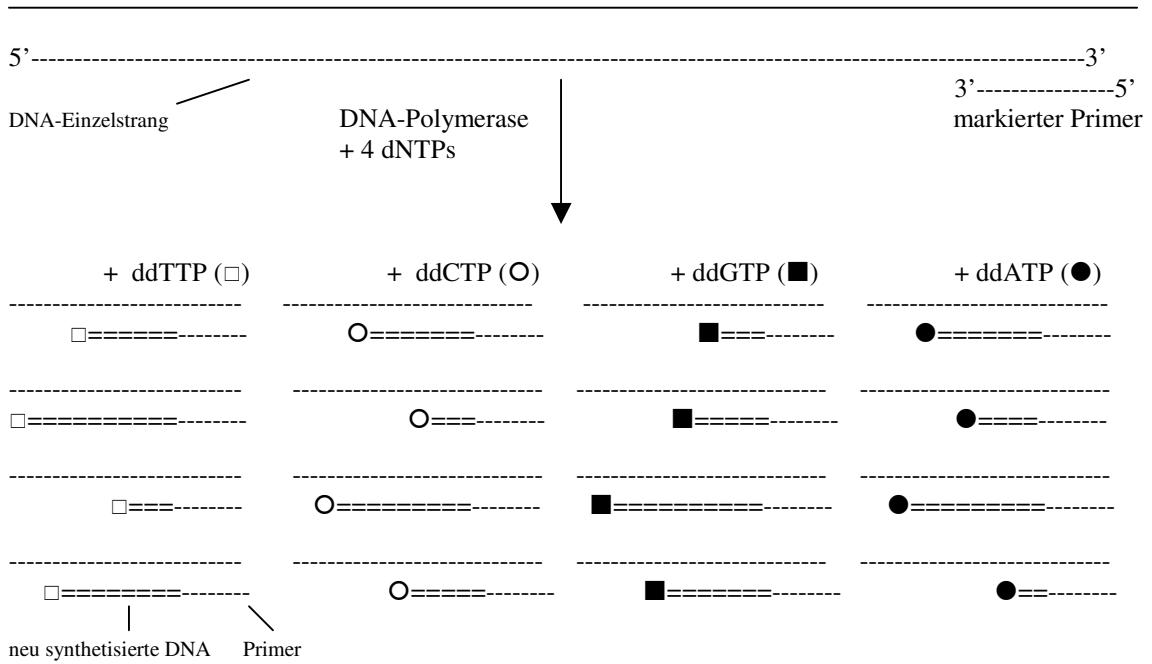
2.2.7 DNA-Sequenzierung zur Identifizierung auffälliger SSCP-Banden

2.2.7.1 Grundlagen der Sequenzierung

Mit dem Nachweis abnormer Banden in der SSCP-Analyse kann noch keine Aussage über Art und Position der entsprechenden Sequenzänderung gemacht werden. Dies erfordert eine anschließende Sequenzierung der entsprechenden DNA-Fragmente zur Identifizierung und Bestätigung einer Mutation oder eines Polymorphismus. Mit der DNA-Sequenzierung wird die Abfolge der Nukleotide eines DNA-Stranges bestimmt.

In dieser Arbeit kam das kontrollierte enzymatische Kettenabbruch-Verfahren nach Sanger für die DNA-Sequenzierung zur Anwendung (Abb. 2.4) (146). Dabei wird zunächst mittels PCR durch eine DNA-Polymerase aus den vier Desoxy-Nukleotiden (dNTP) eine zum untersuchenden DNA-Abschnitt (Einzelstrang) komplementäre Kette synthetisiert. Beim Einbau der zusätzlich im Reaktionsgemisch enthaltenen 2',3'-Dideoxy-Nukleotidanaloga (ddNTP) wird aufgrund der ihnen fehlenden 3'-Hydroxylgruppe eine weitere Kettenverlängerung unmöglich. Es folgt ein Kettenabbruch spezifisch an der Stelle, wo die entsprechende Base (ddNTP) eingebaut wurde. Werden vier verschiedene Mischungen aus DNA-Matrize, Primern, den vier dNTPs (dTTP, dATP, dCTP, dGTP) und jeweils einer der Basen als ddNTP getrennt voneinander mit einer DNA-Polymerase inkubiert, entstehen unterschiedlich lange Oligonukleotid-Fragmente mit demselben durch den Primer definierten 5'-Ende und unterschiedlichen, selektiv bei G, A, T oder C terminierten 3'-Enden mit den entsprechenden ddNTP-Resten. Die unterschiedlichen Längen der Abbruchfragmente werden durch das Verhältnis von dNTPs und ddNTPs in der Lösung bestimmt.

Nach Hitzedenaturierung der Fragmente erfolgt die elektrophoretische Auftrennung nach der Größe auf denaturierendem Polyacrylamidgel. Durch die radioaktive Markierung zeigt sich anhand der Bandenabfolge in der Autoradiographie des Gels bei jedem Reaktionsansatz die Verteilung der jeweiligen Base innerhalb der DNA-Sequenz. Die DNA-Sequenz selbst kann durch die gemeinsame Elektrophorese der vier parallel aufgetragenen Reaktionsansätze abgelesen werden. Auf diese Weise können mit einem einzigen Primer Sequenzen von 15 bis 300 Nukleotiden bestimmt werden (146). Mit automatisierten „Sequencern“ konnte die Sequenzierung großer Probenmengen zur Mutationssuche ermöglicht werden, die aber nach wie vor zeitlich aufwendig und teuer ist.



Die neu synthetisierten Doppelstränge werden terminiert, wenn ein ddNTP anstelle eines normalen dNTPs eingebaut wird.

Denaturierung und Trennung der markierten DNA-Fragmente mittels Gel-Elektrophorese:

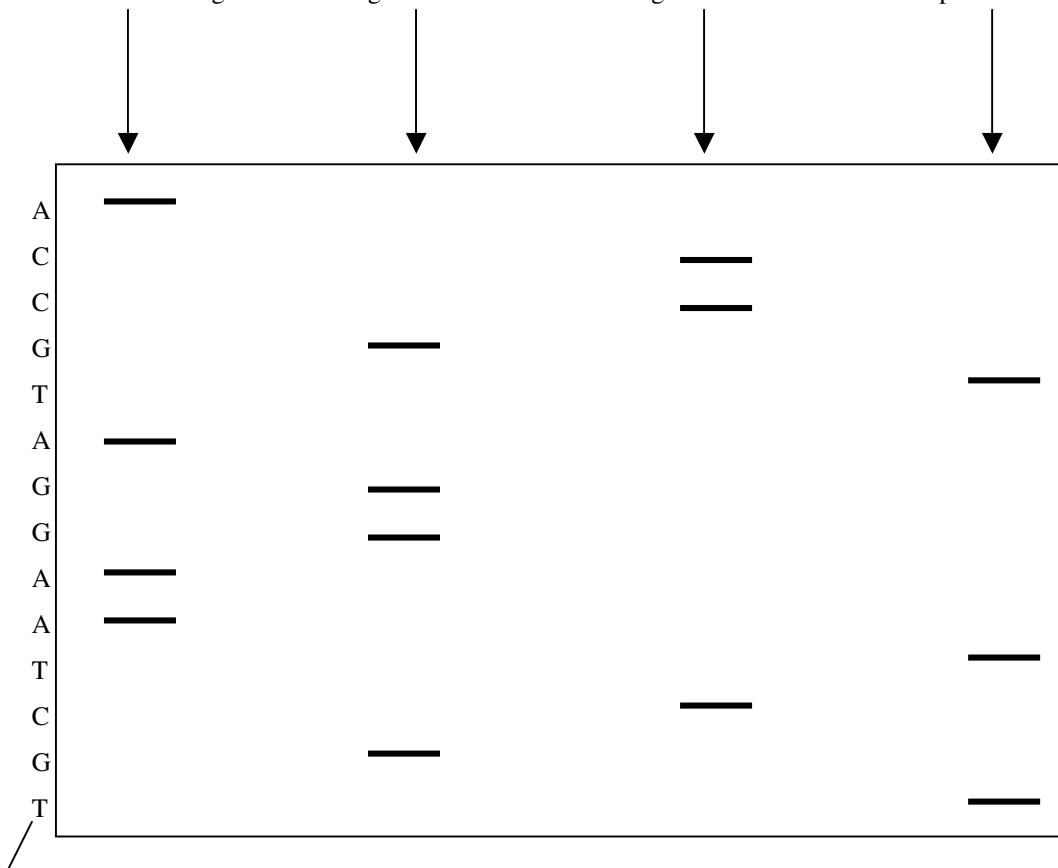


Abb. 2.4: Prinzip der Sequenzierung nach dem Kettenabbruchverfahren (nach Sanger 1977 (146)). Erläuterungen im Text.

2.2.7.2 Gewinnung gereinigter DNA

Zur Sequenzierung wird reine DNA benötigt. Die nach der PCR noch im Überfluss vorhandenen, nicht markierten Oligonukleotidprimer können mit den markierten Primern der Kettenabbruchreaktion um Bindungsstellen an der DNA-Matrize konkurrieren oder DNA-Stränge ohne Markierung bilden und müssen daher zuvor durch Gelelektrophorese und Zentrifugation entfernt werden. Auch alle Nukleotide der PCR, die in der Kettenabbruchreaktion als Substrate dienen könnten, werden so beseitigt.

Die DNA-Fragmente mit auffälligem Laufverhalten in der SSCP-Analyse wurden daher dem Herstellerprotokoll entsprechend als gereinigte DNA unter Verwendung von Reagenzien der Firma QIAGEN direkt aus Agarosegel extrahiert (QIAquick Spin Handbook 07/97). Hierfür wurde das zu untersuchende DNA-Fragment (30µl PCR-Produkt mit 5µl Ladepuffer) nach der erneuten Amplifikation mittels PCR und Gelelektrophorese als Bande mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und das erhaltene Gelstück gewogen (100mg Gel~100µl). Durch Inkubation mit QG-Puffer im Verhältnis 3:1 für 10min bei 50°C erfolgte die vollständige Lösung des Gels. Nach Kontrolle des pH-Wertes über den Farbindikator des Puffers wurde die Probe in eine QIAquick-Säule gefüllt, an deren Membran die DNA nur bei $\text{pH} \leq 7,5$ ausreichend adsorbiert wird. Die Bindung an die Membran wurde durch Zentrifugieren der QIAquick-Säule in einem Sammelröhrchen unterstützt, das Filtrat wurde verworfen. Alle Zentrifugationsschritte der DNA-Extraktion erfolgten für 1min mit 14000rpm in einer Tisch-Mikrozentrifuge. Es schlossen sich die Waschung der QIAquick-Säule mit 0,75ml PE-Puffer unter Zentrifugation, erneutes Verwerfen des Filtrats und wiederholtes Zentrifugieren der QIAquick-Säule an. Aus dieser wurde anschließend in einem sauberen 1,5ml-Röhrchen mittels 40µl EB-Puffer (elution buffer) und Zentrifugation die DNA herausgelöst. Die effektivste Elution wird bei pH 7,0 bis 8,5 erreicht. Die Menge x (ng/µl) der extrahierten DNA wurde photometrisch bestimmt und nach folgender Formel berechnet: $x = \text{OD}_{260} \times 50 \times 25$.

2.2.7.3 Sequenzierung der LIF-Gen-Abschnitte

Die automatische Visualisierung der DNA-Sequenz erfolgte in dieser Arbeit mittels Laser-Fluoreszenz-Sequenzierung. Hier wird vor der PCR an Stelle der radioaktiven Markierung jeweils ein für den Kettenabbruch im Reaktionsansatz spezifischer Marker

kovalent an den Primer gebunden, der bei unterschiedlichen Wellenlängen fluoresziert (z.B. blau für Adenin). Die PCR und Kettenabbruchreaktion an den gereinigten DNA-Abschnitten erfolgte mit der AmpliTaq[®] DNA Polymerase und einem fluoreszenzmarkierten Terminator Kit. Das Temperaturoptimum der Taq DNA Polymerase von 70 bis 75°C verhindert die Bildung stabiler Sekundärstrukturen der zu sequenzierenden DNA-Einzelstränge, die sie bei 37°C einnehmen würden (144).

Anschließend wurden die vier Reaktionsansätze vereinigt und gemeinsam der Elektrophorese im zylindrischen, denaturierenden 5,5%-igen Polyacrylamidgel unterworfen. Die aufgetrennten DNA-Banden lassen sich an ihrer Fluoreszenz bei unterschiedlicher Wellenlänge mittels Laser erkennen, wenn sie das Gel verlassen. Aus der Sequenz der Farben ergibt sich direkt die Basensequenz. Eindeutige Vorteile der Methode sind der Verzicht auf Radioaktivität und die einfach zu realisierende Automatisierung.

2.2.8 DNA-Datenbank

Zur Lokalisation und Identifizierung des Basenaustausches als Mutation oder Polymorphismus wurden die erhaltenen DNA-Sequenzen der drei Exons mit den von der GenBank veröffentlichten DNA-Sequenzen des LIF-Gens verglichen (Eingangsnummer M63420). Die in dieser Arbeit angegebenen Nukleotidpositionen beziehen sich auf die Angaben der GenBank.

2.3 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SSPS 9.0 für Windows unter Anwendung deskriptiver und nichtparametrischer Verfahren.

Zur Prüfung der Normalverteilung des Alters von Patientinnen- und Kontrollgruppe kam der Kolmogorov-Smirnov-Test zu Anwendung. Weil das Alter in beiden Gruppen nicht normalverteilt war, erfolgte seine Angabe in Medianwerten. Der Altersvergleich beider Gruppen wurde mit dem nichtparametrischen U-Test nach Mann und Whitney berechnet, für den im Gegensatz zum t-Test keine Normalverteilung vorliegen muss.

Um statistisch signifikante Unterschiede in den Häufigkeiten von Alterationen im LIF-Gen beider Gruppen festzustellen, wurden die Ergebnisse der Patientinnengruppe und der Kontrollgruppe mit dem Chi-Quadrat-Test gegenübergestellt.

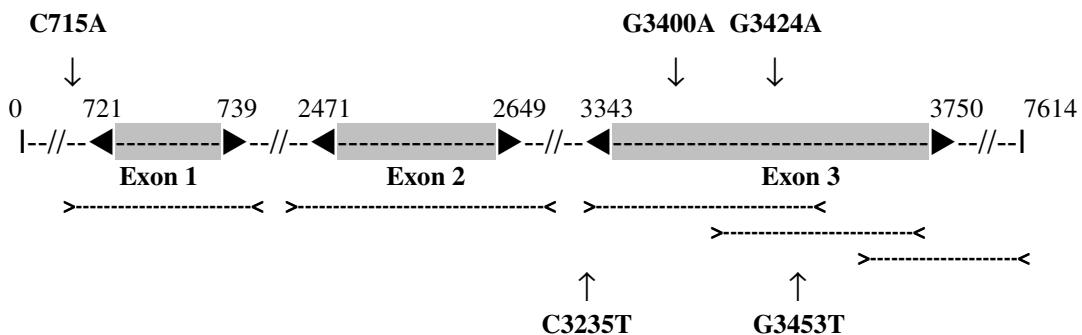
Für alle Tests galt ein p-Wert von $\leq 0,05$ als signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit).

3. Ergebnisse

Dem Zytokin LIF wird eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Implantation zugeschrieben. Daher erfolgte in dieser Arbeit die Untersuchung der vollständigen LIF-Gensequenz auf Mutationen mittels PCR, SSCP-Analyse und DNA-Sequenzierung bei einer spezifisch eingegrenzten Patientinnengruppe mit mehrfachem Versagen einer IVF/ICSI-Behandlung, dem hauptsächlich ein Misserfolg der Implantation zugrundegelegt wird. Eine Mutation im LIF-Gen konnte weder in der Patientinnen- noch in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Unter den Frauen mit mehrfachem IVF/ICSI-Versagen wies eine Patientin einen Basenaustausch im Exon 3 des LIF-Gens auf, der nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führte und somit einen Polymorphismus darstellt. Auch in der Kontrollgruppe konnte bei einer Probandin in einem Basenaustausch im Intron zwischen Exon 2 und Exon 3 außerhalb der kodierenden Regionen des LIF-Gens ein Polymorphismus nachgewiesen werden.

Abb. 3.1 zeigt die Lokalisation der Alterationen im LIF-Gen, die in der vorliegenden Arbeit gefunden wurden, sowie die Mutationen im LIF-Gen, die von Giess und Mitarbeitern in einem Kollektiv von 75 Frauen mit Infertilität unterschiedlicher Ursachen entdeckt wurden (55).

Mutationen



Polymorphismen

Abb. 3.1: Lokalisation der Alterationen im LIF-Gen.

Oben: von Giess et al. identifizierte Mutationen (55). Unten: Polymorphismen aus Patientinnen- und Kontrollgruppe der vorliegenden Studie. Die entsprechenden PCR-Fragmente sind in gestrichelten Linien zwischen Pfeilen (Primerpaare) dargestellt.

3.1 Patientinnen: Diagnosen

Tab. 3.1 gibt einen Überblick über die Verteilung der Ergebnisse der Sterilitätsdiagnostik der Patientinnengruppe, die Indikation zur IVF/ICSI-Behandlung waren, sowie über gleichzeitig bestehende Nebendiagnosen.

Sterilität	Anzahl gesamt (n = 50)	Ohne Neben- diagnose	Endo- metriose	Hyper- andro- genämie	Hyper- prolaktin- ämie	Uterusfehl- bildung, Myom
Idiopathisch	4	2	1	1	0	0
Tubar	3	1	1	1	0	0
Andrologisch	34	26	0	2	3	3
Tubar und Andrologisch	9	4	3	0	0	2

Tab. 3.1: Verteilung der Indikationen zur IVF/ICSI-Behandlung und Nebendiagnosen.

Es dominierte die Anzahl an primär gesunden Frauen, deren Partner eine andrologische Sterilität aufwies (n=34), aber auch Patientinnen mit tubarer Sterilität (n=3), tubarer kombiniert mit andrologischer Sterilität (n=9) und idiopathischer Sterilität (n=4) zählten zur Studiengruppe. Entsprechend kam bei den untersuchten Frauen überwiegend eine IVF-Behandlung mit der Modifikation der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) zur Anwendung (n=47). Insgesamt drei Patientinnen erhielten wiederholt lediglich eine konventionelle IVF-Behandlung ohne Modifikation. Dabei handelte es sich um eine Patientin mit tubarer Sterilität und zwei Patientinnen mit tubarer und andrologischer Sterilität, die in einer geringgradigen Asthenoteratozoospermie bestand. Zur Gruppe der idiopathischen Sterilität zählten drei Patientinnen mit ursprünglich andrologischer Sterilität der Partner. Diese wiesen eine Azoospermie auf, die eine Fertilisierung mit homologem Sperma nicht ermöglichte. Da in diesen Fällen heterologes Kryosperma von einwandfreier Qualität verwendet wurde, muss bei erfolglosen IVF-Versuchen von einer idiopathischen Sterilität der betroffenen Patientinnen ausgegangen werden.

Eine tubare Sterilität lag bei beidseitigem (n=2) oder einseitigem Tubenverschluß (n=4), bei einseitigem Tubenverschluß nach Adnexektomie der Gegenseite (n=3) oder bei erheblich eingeschränkter Tubendurchgängigkeit infolge von Adhäsionen (n=3) vor.

Nach den Richtlinien der Bundesärztekammer stellt auch eine Tubeninsuffizienz eine Indikation zur IVF-Behandlung dar. Bei sechs Patientinnen war die tubare Sterilität durch Adnexitiden bedingt, in drei Fällen konnte ihre Ursache nicht eruiert werden. Weitere Ursachen waren Uterusfehlbildungen (n=2) oder Endometriose (n=1).

Die Verteilung der pathologischen SpermioGrammbefunde der Partner innerhalb der Gruppe von Paaren mit andrologischer Sterilität findet sich in Tab. 3.2.

SpermioGrammbefunde	Andrologische Sterilität (n = 34)	Andrologische und tubare Sterilität (n = 9)
Azoospermie	3	0
Kryptozoospermie (<1 Mio. Spermatozoen/ml)	3	0
Asthenozoospermie	0	1
Asthenoteratozoospermie	4	4
OAT-Syndrom (<20Mio. Spermien/ml)	24	4
davon schwer (<5Mio. Spermien/ml)	20	3

Tab. 3.2: Andrologische Sterilität als Indikation zur IVF/ICSI-Behandlung (n = 43).

Bei 21 Partnern der 43 Paare mit andrologischer Sterilität blieb die Ursache der Spermienpathologie ungeklärt. Bei den übrigen Partnern war sie verursacht durch Vorerkrankungen wie Mumpsorchitis (n=5), Hodentumor mit Operation/Chemotherapie/Radiatio (n=2), entzündliche Erkrankungen der Samenwege (n=3), Maldescensus testis (n=3), Varikozele (n=1) oder Operation einer Inguinalhernie (n=2). Bei einzelnen Partnern bestand eine Azoospermie beim Vorliegen einer heterozygoten $\Delta F508$ -Mutation des CFTR-Gens (n=1) bzw. einer Samenleiteraplasie (n=1), eine Hyperprolaktinämie mit hypogonadotropem Hypogonadismus (n=1), eine Spermien-Eizell-Interaktionsstörung (n=1), eine Spermatogenesestörung beim Vorliegen einer Robertson-Translokation (n=1) oder eine kongenitale Hodenhypoplasie (n=1).

Bei allen drei Partnern mit Azoospermie sowie einem Partner mit OAT-Syndrom wurden die Spermien mikrochirurgisch direkt aus dem Hoden gewonnen und zur Fertilisierung verwendet (MESA=mikrochirurgische epididymale Spermienaspiration, TESE=testikuläre Spermienextraktion).

3.2 Mutationsanalyse des LIF-Gens: Ergebnisse

3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Das 7600 Basenpaare umfassende LIF-Gen wurde durch PCR mit fünf Primer-Paaren amplifiziert, welche die drei Exons und Teile der Introns des LIF-Gens begrenzen. Dabei wurden zur Amplifikation des Exon 3 drei Primerpaare verwendet. Dies ergab drei sich überlappende PCR-Fragmente in optimaler Länge für die nachfolgende SSCP-Analyse (55).

Die erhaltenen PCR-Fragmente wiesen folgende Längen auf:

Exon 1: 143bp; Exon 2: 268bp; Exon 3: 284bp, 284bp, 243bp (Abb.3.1).

Abb. 3.2 zeigt die Auftrennung der einzelnen Fragmentlängen anhand der Agarosegel-Elektrophorese im Anschluß an die PCR. Ließen sich PCR-Produkte nicht im Agarosegel darstellen oder zeigten sie in der nachfolgenden SSCP-Analyse Auffälligkeiten, wurde die PCR mit diesen Fragmenten wiederholt.

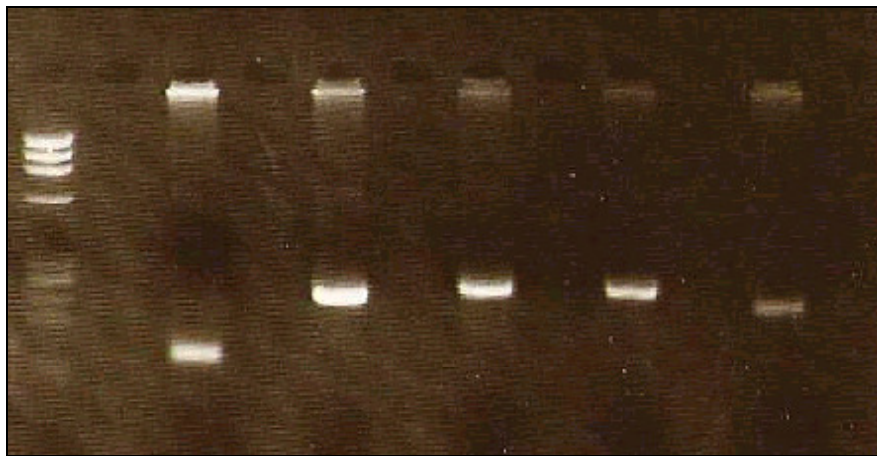


Abb. 3.2: Agarosegel: Auftrennung der PCR-Fragmente nach der Größe.

Von links nach rechts: Längenstandard-Marker, Exon 1 (143bp), Exon 2 (268bp), Exon 3 Set a (284bp), Exon 3 Set b (284bp), Exon 3 Set c (243bp).

3.2.2 SSCP-Analyse

Die PCR-Produkte aller Patientinnen und Kontrollen wurden mittels SSCP-Analyse auf das Vorliegen von Basenaustauschen überprüft. Abb. 3.3 zeigt Ausschnitte eines versilberten Polyacrylamidgels mit dem jeweils charakteristischen Bandenmuster in der SSCP-Analyse von je sechs PCR-Fragmenten, die mit Primerpaaren für Exon 2 und Exon 3 Set a und b amplifiziert worden waren. In diesen Ausschnitten zeigt kein Fragment ein abweichendes Laufverhalten. Die Wanderrichtung der Fragmente auf dem Polyacrylamidgel verläuft in der Abbildung von oben nach unten.

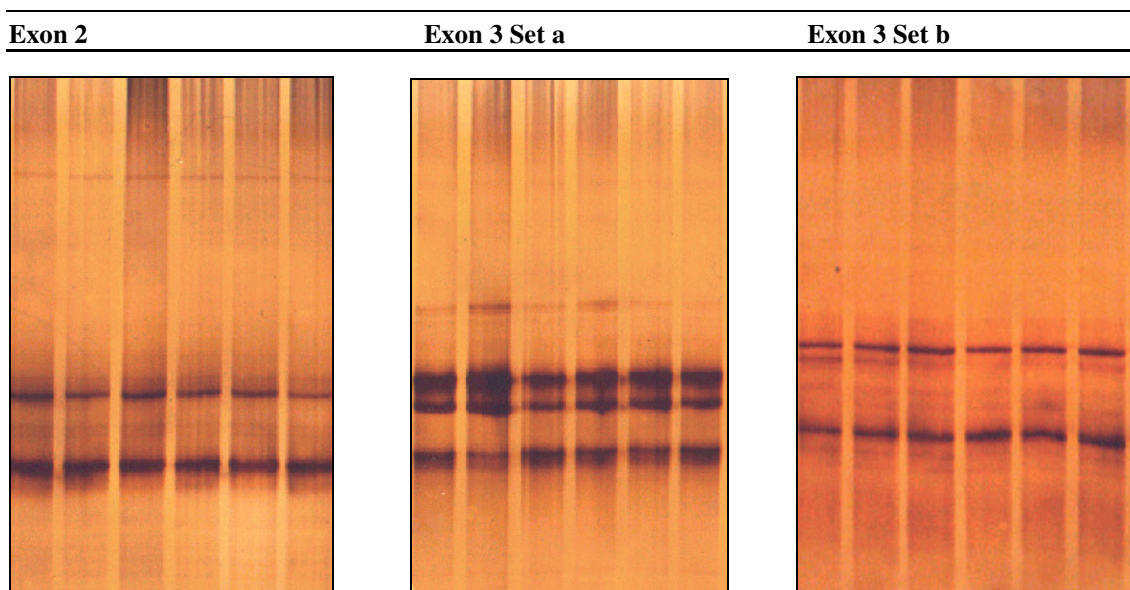


Abb. 3.3: SSCP-Gel der mittels Primer-Paaren für Exon 2, Exon 3 Set a und Exon 3 Set b amplifizierten PCR-Fragmente: unauffällige Banden mit charakteristischem Muster.

Zunächst wiesen insgesamt zehn Proben ein auffälliges Laufverhalten auf (sechs der Patientinnengruppe, vier der Kontrollgruppe), das von dem oben dargestellten Bandenmuster jeweils abwich. Mit diesen Fragmenten wurden zum Ausschluss von Kontaminationen und Artefakten im ersten PCR-SSCP-Lauf sowohl PCR als auch SSCP-Analysen wiederholt durchgeführt, die noch in drei Proben (zwei der Patientinnengruppe, eine der Kontrollgruppe) reproduzierbar abweichende Banden zeigten. In keinem der SSCP-Durchläufe traten abnorme Banden des Fragments 143bp des Exon 1 und des Fragments 243bp des Exon 3 (Set c) auf.

Abb. 3.4 zeigt in Exon 2 bei einer Patientinnenprobe ein von den übrigen Proben abweichendes Bandenmuster (Pfeil A), welches sich in der wiederholten PCR-SSCP-Analyse und anschließenden Sequenzierung jedoch nicht bestätigte. Möglicherweise handelt es sich bei der zusätzlichen unscharfen Bande um ein Artefakt.

Das abweichende Laufverhalten des Fragments von Exon 3 Set a mit einer im Vergleich zu den anderen Proben schwächer ausgeprägten zweiten Bande (Pfeil B) ließ sich wiederum reproduzieren und ergab in der Sequenzierung den Polymorphismus G3453T (Abb. 3.4). Das deutlich veränderte Bandenmuster des mit Pfeil C markierten Fragments ließ sich weder in der Wiederholung der PCR-SSCP-Analyse noch in der Sequenzierung bestätigen.

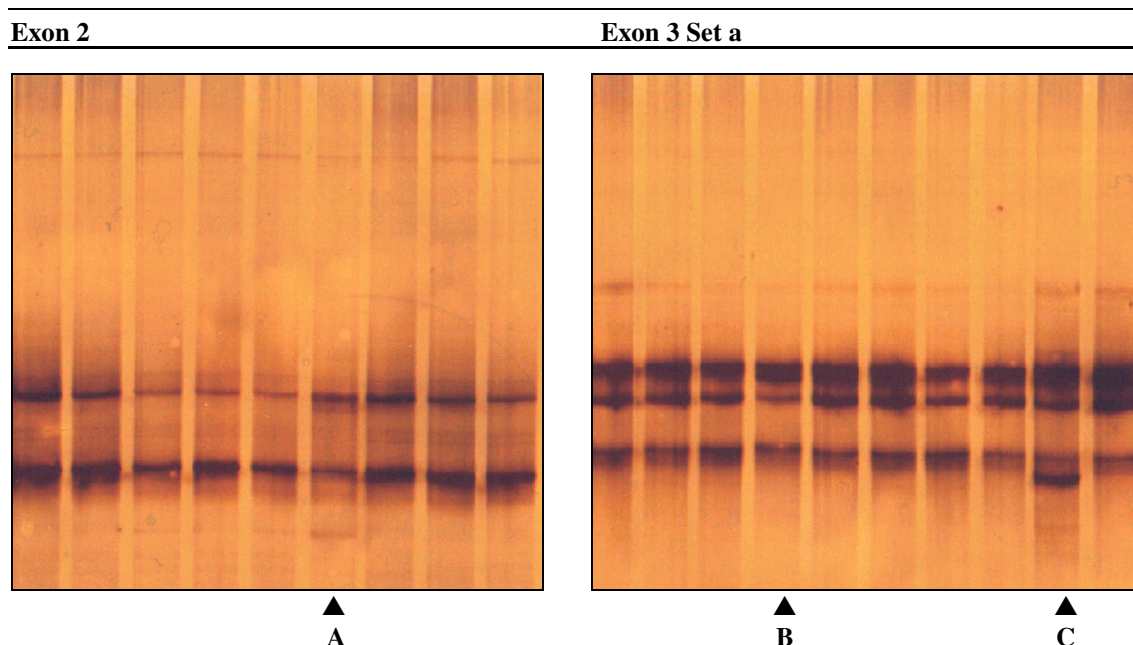


Abb. 3.4: SSCP-Gel der mittels Primer-Paaren für Exon 2 und Exon 3 Set a amplifizierten PCR-Fragmente (Ausschnitt): abnormes Bandenmuster bei Pfeil A, B und C.

In Abb. 3.5 zeigt Pfeil A ein abnormes Bandenmuster des PCR-Fragments einer Patientin, welches in der Wiederholung der PCR-SSCP-Analyse nicht reproduzierbar war. Die auffälligen Banden bei Pfeil B ließen sich reproduzieren und stellten in der anschließenden Sequenzierung ebenfalls den Polymorphismus G3453T bei derselben Patientin dar, deren Fragment bereits in Exon 3 Set a auffiel (Abb. 3.5). Dies ist durch die sich teilweise überlappenden DNA-Sequenzen zu erklären, die durch die Aufteilung des Exon 3 mittels Primern bei der Amplifikation entstanden, und beweist die hohe Sensitivität der SSCP-Methode.

Exon 3 Set b

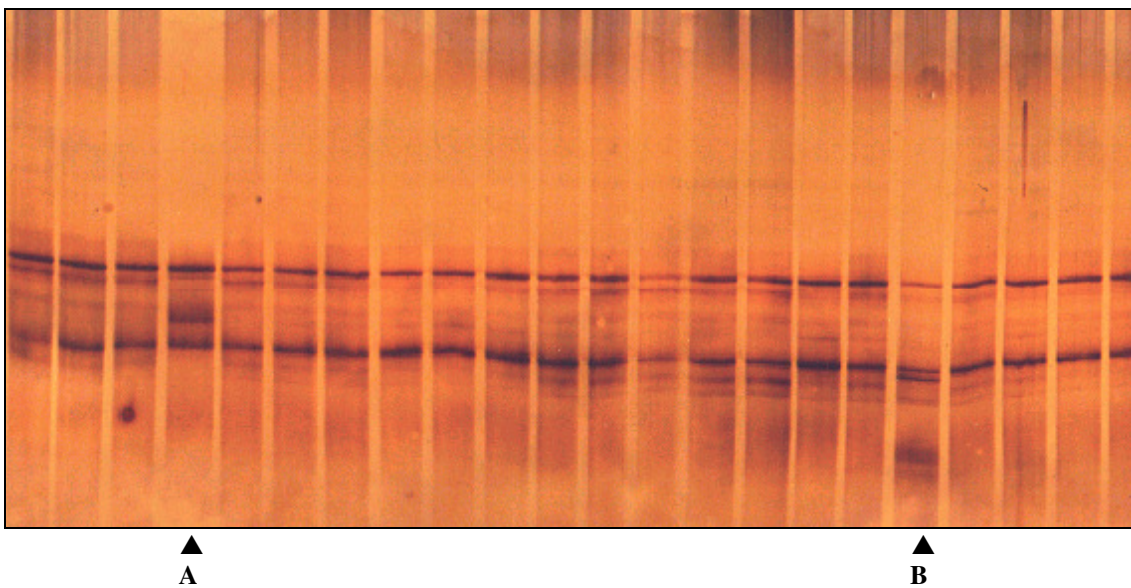


Abb. 3.5: SSCP-Gel der mittels Primer-Paar für Exon 3 Set b amplifizierten PCR-Fragmente (Ausschnitt): abnormes Bandenmuster bei Pfeil A und B.

Die SSCP-Analyse des in der Kontrollgruppe nachgewiesenen Polymorphismus ist hier nicht dargestellt.

3.2.3 Sequenzierung

Alle zehn PCR-Produkte mit abnormem Laufverhalten in der initialen SSCP-Analyse wurden im Anschluß sequenziert. Lediglich die drei Fragmente mit reproduzierbar abweichenden SSCP-Banden zeigten in der Sequenzierung genetische Veränderungen. Unter den nicht reproduzierbar auffälligen Fragmenten bestätigte sich mittels Sequenzierung kein Basenaustausch.

3.2.3.1 Nachweis des LIF-Gen-Polymorphismus G3453T bei einer Patientin

Die direkte Sequenzierung der PCR-Produkte mit auffälligem Laufverhalten in der SSCP-Analyse ergab bei einer Patientin einen heterozygoten Basenaustausch an der Position 3453 des Exon 3. Es handelte sich dabei um eine Transversion, anstatt der Base Thymin konnte die Base Guanin nachgewiesen werden (Abb. 3.6). Dadurch kommt es jedoch nicht zu einem Austausch der Aminosäure Valin an Position 81 der Aminosäuresequenz des LIF-Gens, so dass die Basensubstitution keine funktionelle Relevanz für das LIF-Protein hat. Es handelt sich folglich um einen Polymorphismus.

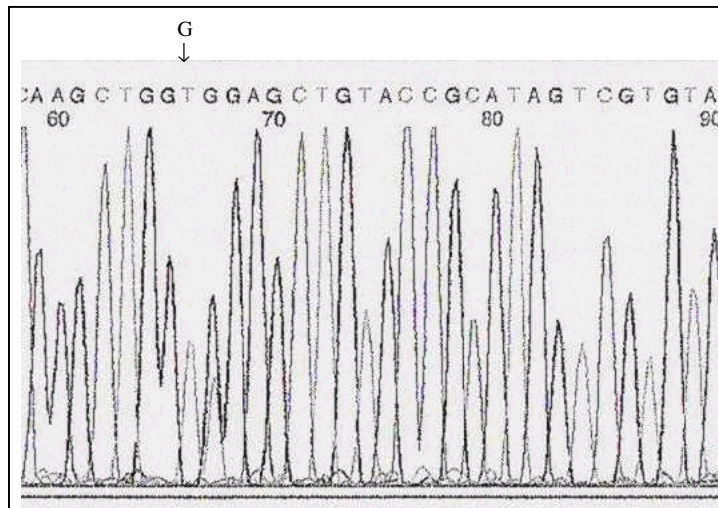


Abb. 3.6: DNA-Sequenzierung mit Nachweis eines Basenaustausches von Guanin zu Thymin an Position 3453 in Exon 3 als Polymorphismus bei einer Patientin.

Die betroffene Patientin wies einen regelmäßigen Menstruationszyklus (25 bis 27 Tage) und eine unauffällige Infertilitätsdiagnostik auf. Im Spermogramm ihres Partners als heterozygoter Träger einer $\Delta F508$ -Mutation des CFTR-Gens zeigte sich eine Azoospermie. Ein Kinderwunsch bestand bereits seit fünf Jahren. Mittels

Spermiensextraktion (TESE) konnte bei tubulärer Hodenatrophie mit mäßiggradiger Spermatogenesestörung homologes Kryosperma gewonnen werden. Mit der Indikation andrologische Sterilität führten vier IVF-Versuche in der Modifikation der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion jedoch nicht zu einer Schwangerschaft bei der 28 Jahre alten Patientin. Ein fünfter IVF/ICSI-Versuch nach Einschluss in die Studie war schließlich mit einer Drillingsschwangerschaft erfolgreich.

3.2.3.2 Nachweis des LIF-Gen-Polymorphismus C3235T in der Kontrollgruppe

Die Sequenzierung des zuvor in der SSCP-Analyse auffälligen DNA-Fragments der Kontrollgruppe wies bei einer 26 Jahre alten Probandin eine heterozygote Transition C→T an Position 3235 nach (Abb. 3.7). Diese liegt im Bereich des Introns zwischen Exon 2 und 3 und hat keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz oder die Expressionsaktivität des LIF-Proteins. Auch hier handelt es sich um einen Polymorphismus ohne klinische Relevanz.

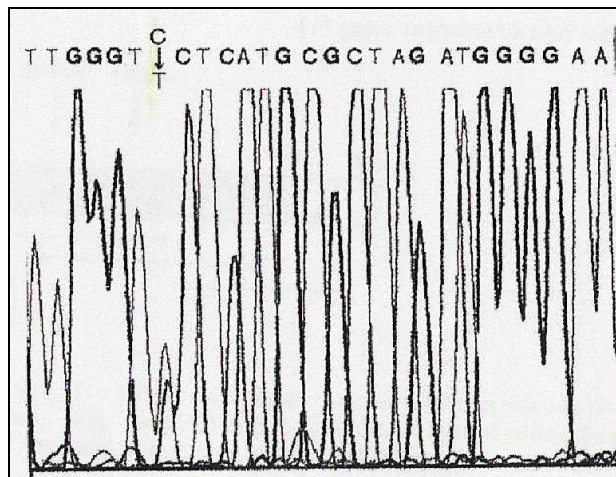


Abb. 3.7: DNA-Sequenzierung mit Nachweis eines Basenaustausches von Cytosin zu Thymin an der Stelle 3235 zwischen Exon 2 und 3 als Polymorphismus bei einer Kontrollprobandin.

3.2.3.3 Kein Nachweis von Mutationen im LIF-Gen

Bei den restlichen PCR-Produkten, die in der initialen SSCP-Analyse aufgefallen waren, konnten in der Sequenzierung keine Mutationen oder Polymorphismen nachgewiesen werden. Möglicherweise wurden bestimmte Basenaustausche nicht detektiert, obwohl eine Punktmutation vorlag. Zum anderen handelte es sich bei

manchen zusätzlichen Banden in der SSCP-Analyse um Artefakte, die sich nicht reproduzieren ließen und folglich auch in der Sequenzierung unauffällig waren.

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Tab. 3.3 zeigt die in Patientinnen- und Kontrollgruppe nachgewiesenen Veränderungen im LIF-Gen. Polymorphismen, die weder die Funktion noch die Expression des LIF-Proteins beeinträchtigen, traten sowohl in der Patientinnen- als auch in der Kontrollgruppe auf. Das Vorkommen von LIF-Gen-Mutationen bei Frauen mit wiederholtem Implantationsversagen bei einer IVF/ICSI-Behandlung konnte in dieser Arbeit bei einer untersuchten Patientinnenzahl von n=50 nicht nachgewiesen werden.

	Patientinnen mit IVF/ICSI-Versagen (n=50)	Fertile Kontrollgruppe (n=105)
Frauen mit Mutation	0	0
Frauen mit Polymorphismus	1	1
Alter (Jahre)	28	26
Frequenz der LIF-Gen-Alteration	1/50	1/105
Region	Exon 3	Intron 2 (Exon2/3)
Position	3453	3235
Transversion/Transition	G zu T	C zu T
Allelie	heterozygot	heterozygot
Funktionelle Relevanz für LIF	keine	keine
Schwangerschaft	nein (nach Studienabschluss Drillings-Schwangerschaft)	ja

Tab. 3.3 Zusammenfassung der aufgefundenen LIF-Gen-Alterationen.

3.4 Statistische Auswertung

Die Patientinnen- und Kontrollgruppe unterschieden sich signifikant in ihrem Alter (U-Test nach Mann und Whitney, $p < 0,05$), das nicht normalverteilt war (Kolmogorov-Smirnov-Test, $p < 0,05$).

In der Häufigkeit, mit der LIF-Gen-Polymorphismen unter den Patientinnen mit wiederholtem IVF/ICSI-Versagen auftreten, ließ sich kein signifikanter Unterschied zu der Frequenz bei der fertilen Kontrollgruppe feststellen (Chi-Quadrat-Test, $p > 0,05$).

3.5 Folgedaten

Nach Einschluss der Patientinnen in die Studie wurden bis Ende des Jahres 2000 Folgedaten über ihre weiteren Behandlungsversuche und -ergebnisse der assistierten Reproduktion erhoben. Tab. 3.4 gibt einen Überblick über die Schwangerschaften, die als Ergebnis dieser Versuche oder auch spontan im Verlauf eingetretenen sind. Diese wurden mittels positivem HCG-Test oder sonographischem Nachweis einer Fruchthöhle diagnostiziert. Dabei handelt es sich um 14 intakte Schwangerschaften, von denen vier bis zum Abschluss der Folgedatenerhebung zur Geburt gesunder Kinder führte. Sechs Schwangerschaften endeten in einem Abort in der Frühschwangerschaft, einer der Aborte war durch eine chromosomale Anomalie (Trisomie 13) induziert. Durchschnittlich führte der fünfte IVF/ICSI-Versuch zu einer Schwangerschaft, die Spontanschwangerschaften sowie erfolgreichen IUI-Behandlungen ausgenommen. Bei insgesamt sechs Frauen handelte es sich dabei um einen Kryoembryotransfer. Zwei Kryoembryotransfere endeten in einem Abort in der Frühschwangerschaft. Aussagen über die jeweils transferierte Anzahl von Embryos können nicht gemacht werden.

In der Untergruppe von Frauen mit andrologischer Sterilität des Partners traten im Verlauf insgesamt 16 Schwangerschaften auf, davon vier Aborte. Dabei kam es durch die reproduktionsmedizinische Behandlung unter den Paaren mit Azoospermie des Partners ($n=3$) bei zwei Paaren sowie bei dem Paar mit Asthenozoospermie ($n=1$) zu einer Schwangerschaft. Unter den Paaren mit Asthenoteratozoospermie der Partner ($n=8$) traten zwei Schwangerschaften ein, davon eine spontan ohne IVF/ICSI-Behandlung. Die assistierte Reproduktion bei den Paaren mit OAT-Syndrom des Partners ($n=28$) war in 11 Fällen erfolgreich. Die Partnerinnen der von einer Kryptozoospermie betroffenen Männer ($n=3$) wurden unter der Behandlung wiederholt nicht schwanger.

Indikation (n=50)	Pat. mit SS (n=18)	Schwangerschaften (n=20)	Erfolgreicher IVF/ICSI-Versuch bzw. andere Therapie	Vorausgegangene Therapie-Versuche
Idiopathische Sterilität (n=4)	2	1 (induzierter Abort)	6. het. IUI 7.	6 IVF, 1 het. GIFT, 5 het. IUI 7 IUI, 6 IVF
Tubare Sterilität (n=3)	2	1 (Frühabort) 1	4. Spontan-SS	3 IVF 4 IVF
Andrologische Sterilität (n=34)	10	2 (Frühabort/Gemini) 1 1 (Drillinge) 1 1 1 1 (Frühabort) 1 2 (Frühabort/ SS) 1	4. bzw. 5. 4. 5. 4. 4. 15. het. IUI 6. 2. het. IUI 4. bzw. 5. Spontan-SS	3 bzw. 4 IVF 3 IVF 4 IVF 3 IVF 3 IVF 8 IUI, 6 het. IUI, 10 IVF 3 IUI, 5 IVF 10 IVF, 1 het. IUI 3 bzw. 4 IVF 6 IVF
Tubare und andrologische Sterilität (n=9)	4	1 (Frühabort) 1 1 (Gemini) 1	6. 4. 4. 5.	5 IVF 3 IVF 3 IVF 4 IVF

Tab. 3.4: Nach Einschluss in die Studie eingetretene Schwangerschaften (SS) nach >3 IVF/ICSI-Versuchen. (het.=heterolog)

4. Diskussion

Obwohl die Bedeutung des Zytokins Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) für die Reproduktion der Maus schon 1992 beschrieben wurde, ist seine Rolle in der menschlichen Fortpflanzung insbesondere in der Regulation des Implantationsvorganges bislang nicht endgültig aufgeklärt (168). Am Mausmodell konnte gezeigt werden, dass beim Vorliegen funktioneller LIF-Gen-Mutationen eine Implantation nicht erfolgt und eine Schwangerschaft nicht ausgetragen werden kann (168). Beim Menschen liegen ebenfalls Hinweise dafür vor, dass ein LIF-Mangel negative Auswirkungen auf die Reproduktion hat. Einleitend wurden bereits einige Studienergebnisse dargelegt, die bestätigten, dass LIF im Fortpflanzungsprozess des Menschen, insbesondere beim Implantationsvorgang eine entscheidende Rolle spielt (Tab. 1.9) (154).

Die genetischen Grundlagen für einen Mangel an LIF beim Menschen sind jedoch bislang nicht ausreichend untersucht. Giess und Mitarbeiter konnten 1999 eine signifikant erhöhte Mutationsrate im LIF-Gen infertiler Frauen nachweisen (55). Dafür hatten sie bereits eine Methode veröffentlicht, die ein rasches Screening auf Veränderungen im LIF-Gen ermöglicht (55).

Ziel dieser Arbeit war zum einen die Untersuchung der Prävalenz funktioneller Mutationen im LIF-Gen bei Frauen mit wiederholtem IVF/ICSI-Versagen (Patientinnengruppe), um die der erfolglosen Behandlung zugrundeliegende Störung der Implantation auf einen möglichen LIF-Mangel zurückzuführen. Zum anderen sollte überprüft werden, ob ein gezieltes Screening auf LIF-Gen-Mutationen als sinnvoller diagnostischer Parameter zur Beurteilung der Erfolgchancen einer IVF/ICSI-Behandlung einerseits und zur Abklärung eines IVF/ICSI-Versagens andererseits herangezogen werden könnte.

Der Versuch eines molekulargenetischen Nachweises von Mutationen im LIF-Gen in der Patientinnengruppe und in der Kontrollgruppe fertiler Frauen mittels PCR-SSCP und nachfolgender DNA-Sequenzierung konnte die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Giess nicht bestätigen, da sich keine funktionelle Mutation im LIF-Gen der ausgewählten Patientinnen mit wiederholtem Implantationsversagen nachweisen ließ.

In der Diskussion werden folgende methodischen (1.-2.) und inhaltlichen (3.-4.) Fragestellungen erörtert:

1. Wie beeinflusste die Auswahl der Patientinnen das Ergebnis der hier vorliegenden Arbeit? Wie hoch waren ihre Chancen auf eine erfolgreiche Implantation? Standen Einschränkungen des Implantationspotentials auf dem Boden ihrer Sterilitätsdiagnose, der zusätzlich vorliegenden fertilitätsmindernden Faktoren, ihres Alters oder der IVF/ICSI-Prozedur selbst an Stelle eines möglichen LIF-Mangels im Vordergrund?
2. War die PCR-SSCP-Analyse als Methode geeignet, entsprechende Mutationen im LIF-Gen aufzufinden? Reichten ihre Sensitivität und Spezifität zur Detektion von LIF-Gen-Mutationen bei den untersuchten Frauen aus?
3. Welche Bedeutung hat LIF für die menschliche Implantation und wie kommt es überhaupt zu einem Mangel an LIF? Hat eine heterozygote Mutation im LIF-Gen auch einen Mangel an funktionellem LIF-Protein zur Folge? Können neben Mutationen im LIF-Gen auch eine Dysregulation des Zytokinnetzwerkes, hormonelle Stimulatoren im Rahmen der Sterilitätsbehandlung und Störungen der Signaltransduktion auf Rezeptorebene zu mangelnder Expression oder reduzierter biologischer Aktivität des LIF-Proteins führen? Können andere Implantationsfaktoren, die in einer großen Vielfalt existierten, einen LIF-Mangel kompensieren?
4. Welchen klinischen Nutzen bietet der Nachweis einer LIF-Gen-Mutation bei der Diagnostik und der Therapie der Sterilität? Stehen therapeutische Möglichkeiten zur Verfügung, den Implantationsvorgang im Rahmen der Reproduktionsmedizin zu kontrollieren und zu steuern?

4.1 Patientinnenauswahl und Implantationspotential

In den molekularbiologischen Untersuchungen des Patientinnenkollektivs dieser Arbeit konnten weder homo- noch heterozygote Mutationen im LIF-Gen nachgewiesen werden, obwohl durch die Auswahl der Patientinnen vor allem solche mit wiederholt erfolgloser Implantation rekrutiert wurden, um das Vorliegen einer LIF-Gen-Mutation wahrscheinlicher zu machen. Ob die Einschlusskriterien der vorliegenden Studie dies gewährleisten, soll im Folgenden diskutiert werden.

Faktoren wie zurückliegende, mehrfach erfolglose IVF/ICSI-Versuche (≥ 3), schwere andrologische Sterilität und fortgeschrittenes Alter (≥ 36 Jahre) der behandelten Frau sind bereits prognostisch ungünstig für den Therapieerfolg einer IVF/ICSI-Behandlung

(54). Diese Faktoren lagen bei 13 Patientinnen dieser Arbeit vor, das entspricht 26% aller in die Studie eingeschlossener Patientinnen. Möglicherweise standen bei ihnen diese Faktoren als Ursache für das Implantationsversagen an Stelle eines LIF-Mangels im Vordergrund.

4.1.1 Sterilitätsdiagnose und Implantationspotential

Die Art der Sterilitätsursache kann das Ergebnis einer IVF/ICSI-Behandlung signifikant beeinflussen und macht auch einen Einfluss auf das Implantationspotential wahrscheinlich (179). Die Sterilitätsursachen innerhalb der Patientinnengruppe verteilten sich folgendermaßen (Tab. 4.1): 6% der Frauen litten an einer tubaren Sterilität, bei 68% lag eine andrologische Sterilität des Partners vor, bei 18% tubare und andrologische Ursachen in Kombination und bei 8% war die Kinderlosigkeit ungeklärt.

Sterilität	Anzahl gesamt (n=50)	Ohne Neben- diagnose	Endo- metriose	Hyper- andro- genämie	Hyper- prolaktin- ämie	Uterusfehl- bildung, Myom
Tubar	3 (6%)	1	1	1	0	0
Andrologisch	34 (68%)	26	0	2	3	3
Tubar und andrologisch	9 (18%)	4	3	0	0	2
Idiopathisch	4 (8%)	2	1	1	0	0

Tab. 4.1: Verteilung der Indikationen zur IVF/ICSI-Behandlung und Nebendiagnosen.

Obwohl für die ICSI-Behandlung theoretisch nur ein einziges Spermium pro Eizelle benötigt wird, führt eine reduzierte Spermaqualität, insbesondere die gestörte Morphologie und Motilität, zum deutlichen Absinken der Fertilisationsrate. Die Entwicklung des Embryos nach erfolgter Fertilisation aber ist nicht beeinträchtigt und wird hauptsächlich durch die Oozytenqualität und durch reproduktive Schritte nach der Fertilisation determiniert (197). Da in der vorliegenden Arbeit bei den Patientinnen mit andrologischer Sterilität des Partners die Befruchtung und Weiterentwicklung der Zygoten mit Erfolg abliefen, standen mit großer Wahrscheinlichkeit nicht männliche Infertilitätsfaktoren als Ursache für die Misserfolge der ICSI-Behandlung im Vordergrund, sondern Störungen der nachfolgenden Implantation. Diese Störung

wiederum könnte deshalb auch bei Paaren mit andrologischer Sterilität im Zusammenhang mit den vermuteten Mutationen im LIF-Gen der behandelten Frau stehen. Allerdings gibt es Hinweise, die einen Einfluss der Spermaqualität auf das Implantationspotential des Embryos und auf die Implantations- und Schwangerschaftsraten auch nach einer ICSI-Behandlung durchaus wahrscheinlich machen (37).

Bei Paaren mit andrologischer Sterilität, insbesondere bei Partnern mit schwerem OAT-Syndrom und Implantationsversagen, wurde eine signifikant höhere Inzidenz an Aneuploidie der Keimzell-Chromosomen als bei Partnern mit Normozoospermie gefunden, ohne dass der Karyotyp im peripheren Blut verändert war (138). Dies lässt einen Zusammenhang zwischen Spermienaneuploidie und Implantationsversagen nach ICSI vermuten. Bei insgesamt 53% aller Patientinnen der vorliegenden Studie mit andrologischer Subfertilität wies der Partner ein schweres OAT-Syndrom auf (n=23).

Der große Anteil von Patientinnen mit andrologischer Sterilität in der vorliegenden Arbeit bietet in diesem Zusammenhang eine Erklärung für die wiederholt erfolglose IVF/-ICSI-Behandlung und könnte anstelle einer gestörten Implantation durch LIF-Mangel im Vordergrund stehen. Strengere Einschlusskriterien für die Patientinnengruppe mit Beschränkung auf die Indikationen tubare und idiopathische Sterilität wären möglicherweise repräsentativer für eine Population mit Mutationen im LIF-Gen gewesen. Allerdings kam es bei acht Patientinnen, deren Partner an einem schweren OAT-Syndrom litten, zu einer Schwangerschaft. Das spricht zum einen für den fehlenden Einfluss männlicher Sterilitätsfaktoren auf die Implantation, zum anderen für die hohe Erfolgsrate einer ICSI-Behandlung. Dennoch waren bei den untersuchten Patientinnen durchschnittlich fünf IVF/ICSI-Behandlungsversuche erfolglos, obwohl überwiegend eine IVF-Behandlung mit der Modifikation der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion durchgeführt wurde.

4.1.2 Zusätzliche Sterilitätsfaktoren und Implantationspotential

Das Vorliegen weiterer weiblicher Sterilitätsfaktoren wie Endometriose, Hyperandrogenämie, Hyperprolaktinämie oder Uterusfehlbildungen neben den typischen IVF/ICSI-Indikationen führte nicht zum Ausschluss aus der Studiengruppe (Tab 4.1). Durch Addition oder Potenzierung der fertilitätsmindernden Faktoren kann sich die Wahrscheinlichkeit für den Eintritt einer Schwangerschaft, insbesondere für

eine erfolgreiche Implantation, auch unter reproduktiver Behandlung weiter vermindern. Bei den ausgewählten Patientinnen wäre somit nicht ein LIF-Mangel die wahrscheinlichste Ursache für den Misserfolg der Therapie.

Bei 17 Patientinnen fanden sich bis zum Behandlungsbeginn Zyklusstörungen. Eine Dysregulation des menstruellen Zyklus hat eine gestörte Differenzierung des Endometriums zur Folge und kann durch fehlendes Erreichen der endometrialen Rezeptivität auch das Implantationsfenster stören. Reduzierte Implantationsraten nach IVF bei Frauen mit Hyperandrogenämie wurden auf den Mangel an embryotrophen LIF zurückgeführt (96). Ein LIF-Mangel hätte also durchaus bei den von einer Hyperandrogenämie betroffenen Frauen (n=4) dieser Studie nachgewiesen werden können, allerdings nicht unbedingt auf dem Boden einer Mutation im LIF-Gen.

Insgesamt vier Patientinnen litten zusätzlich an einer Endometriose (n=5). Sowohl über die Pathogenese der Endometriose als auch über die Mechanismen, die zur Infertilität führen, und über IVF-Ergebnisse bei Endometriose-Patientinnen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Zum einen führte eine Dysfunktion des Endometriums und damit seine veränderte Rezeptivität in einigen Studien zum Implantationsversagen bei Endometriose-Patientinnen, zum anderen wurden eine eingeschränkte Embryoqualität als auch folliculäre Faktoren ursächlich gesehen (153). Vermutlich führt eine Dysregulation der Genexpression während des Implantationsfensters bei Endometriose zur implantationsrefraktären Umgebung (81). Dabei handelt es sich um Gene, welche die Embryo-Adhäsion, die Immunantwort, die Rezeptivität und die Apoptose des Endometriums betreffen (153, 81). Die peritoneale Flüssigkeit scheint bei Endometriose durch ihre veränderte Zytokinkonzentrationen und embryotoxische Faktoren der Embryoentwicklung um die Implantationsphase zu schaden (153). Auch hier wäre eine reduzierte LIF-Expression denkbar, die aber nicht auf einer Mutation seines Gens basiert.

Im Hinblick auf die dargestellten Daten muss davon ausgegangen werden, dass die obengenannten Nebendiagnosen der untersuchten Frauen ihre Implantationschancen bei einer IVF/ICSI-Behandlung möglicherweise auch vermittelt über einen Mangel an LIF negativ beeinflussen und anstelle der vermuteten LIF-Gen-Mutationen im Vordergrund standen.

Beim Partner der einzigen von einem Polymorphismus im LIF-Gen betroffenen Patientin lag eine heterozygote CFTR-Genmutation mit der Folge einer obstruktiven Azoospermie vor. Die Mutation an sich könnte einen weiteren Infertilitätsfaktor mit negativen Auswirkungen auf die Embryoqualität und die Implantation darstellen. Bislang fand sich aber keine Einschränkung der ICSI-Ergebnisse bei männlichen Partnern mit Mutationen im CFTR-Gen (132). Auch für die Verwendung von Kryosperma nach Gewinnung über TESE bei obstruktiver Azoospermie gibt es positive Daten bezüglich Implantations- und Schwangerschaftsraten (56).

4.1.3 Alter der Patientinnen und Partner und Implantationspotential

Möglicherweise war das Implantationspotential der untersuchten Patientinnen bereits durch deren Alter negativ beeinflusst, was eine Mutation im LIF-Gen als Ursache für die erfolglose Implantation in den Hintergrund rücken ließe.

Patientinnen- und Kontrollgruppe sind zwar vom Altersdurchschnitt, nicht aber in der Weite der Altersstreuung vergleichbar. Insgesamt war in der Patientinnengruppe der Anteil der Frauen, die 35 Jahre oder älter waren (32%), deutlich höher als in der Kontrollgruppe (22%). Ab diesem Alter, mit dem sich viele Frauen erstmals zur Diagnostik vorstellen, sinken die Implantationsraten nach IVF/ICSI-Behandlung kontinuierlich ab (78, 164). Primär scheinen Faktoren der alternden Oozyten mit Fehlern in der Meiose und der Folge chromosomaler Anomalien beim Embryo, weniger ein Verlust der endometrialen Rezeptivität den Implantationserfolg zu determinieren, was Therapieerfolge mit verbesserten Implantationsraten durch Eizellspende und Präimplantationsdiagnostik zur Selektion von Embryos mit normalem Chromosomensatz verdeutlichen (54, 117, 149).

Über das Alter der Partner der Patientinnen konnten retrospektiv keine Angaben gemacht werden. Weltweit nimmt die Spermienqualität neben der altersbedingten Reduktion der Spermienmotilität über die Jahre stetig ab, wie Carlsen und Mitarbeiter 1992 in einer Metaanalyse von Studien der vorausgegangenen 50 Jahre zeigten (18). Allerdings wird dieses Phänomen der abnehmenden männliche Fertilität seither in der Literatur kontrovers diskutiert (116, 173). Die Arbeitsgruppe um De la Rochebrochard analysierte alle in der Literatur vorliegenden Daten zum Einfluss des väterlichen Alters auf die Reproduktion und kam zu dem Schluss, dass auch männliches Alter über 40 Jahre ein Risiko für natürliches und assistiertes Reproduktionsversagen darstellt (36).

Als Ursachen werden das höhere Risiko genetischer Anomalien bei den Kindern, Veränderungen der Spermiogenese, Mutationen männlicher Keimzellen aufgrund weniger effektiver DNA-Reparaturmechanismen und reduzierte Spermaqualität mit zunehmendem männlichen Alter gesehen. Bei weiblichem Alter über 35 Jahre und männlichem Alter über 40 Jahre potenziert sich der negative Effekt, so dass die Berücksichtigung des Alters der Partner in dieser Studie zur Beurteilung der Implantationschancen sinnvoll gewesen wäre (36).

4.1.4 Patientinnenauswahl und LIF-Gen-Mutationen

Hambartsoumian und Mitarbeiter definierten mehrfaches Implantationsversagen als Misserfolg von mindestens fünf IVF-Versuchen und fanden in der betroffenen Gruppe ein signifikant höheres Vorkommen einer gestörten LIF-Expression (63). So bestand eine zu erwartende Wahrscheinlichkeit, in dieser Studie in einem Patientenkollektiv mit mindestens dreimaligem, im Durchschnitt fünfmaligem IVF/ICSI-Versagen, LIF-Gen-Mutationen aufzufinden.

Gerade bei Patientinnen mit idiopathischer Sterilität werden Störungen der Implantation als Hauptursache ihrer Sterilität angenommen. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten aber bei diesen Patientinnen keine Mutationen im LIF-Gen nachweisen. Allerdings war die Anzahl der betroffenen Frauen (n=4) nicht repräsentativ. Zudem wiesen zwei der Patientinnen Nebendiagnosen auf (Tab. 4.1), die verbleibenden zwei Frauen erhielten Donor-Kryosperma zur Fertilisierung. Beide Umstände stellen potentiell einschränkende Faktoren für eine erfolgreiche IVF/ICSI-Therapie dar und könnten hier im Vordergrund stehen.

In einer Gruppe idiopathisch steriler Frauen konnte zuvor nur eine heterozygote Mutation im LIF-Gen (G3400A in Exon 3) nachgewiesen werden, die Auswirkung auf die Aminosäuresequenz des LIF-Proteins hat (167, 170). Ihre klinische Bedeutung erschien allerdings gering, da sich die Mutationsrate in der untersuchten Gruppe nicht signifikant von der einer fertilen Kontrollgruppe unterschied. Außerdem wurde die von der Mutation betroffene Patientin unter einer Stimulationsbehandlung schwanger, so dass die veränderte Aminosäuresequenz keine negative Auswirkung auf die Bioverfügbarkeit oder die Funktion des LIF-Proteins und damit auf das Implantationspotential zu haben scheint.

Einerseits ließen sich durch eine strikte Eingrenzung der Patientinnengruppe auf Frauen mit idiopathischer Sterilität und wiederholtem IVF/ICSI-Versagen ohne jegliche weitere Sterilitätsfaktoren womöglich LIF-Gen-Mutationen überhaupt und in höherer Frequenz nachweisen. Andererseits unterstreicht das negative Ergebnis dieser Arbeit die Tatsache, dass LIF beim Implantationsvorgang zwar eine wesentliche Rolle spielt, sein Gelingen aber nicht allein vom Vorhandensein und von der Funktion des Zytokins abhängt. Sollte eine Mutation im LIF-Gen vorliegen, wäre insbesondere bei einer heterozygoten Mutation eine Kompensation der verminderten LIF-Expression im Rahmen der ovariellen Stimulationsbehandlung mit der Folge einer Anregung der LIF-Expression durch die der steroidinduzierten Zytokinkaskade vorstellbar.

Mit der Anzahl der in die Studie eingeschlossenen Patientinnen (n=50) musste eine Kompromisslösung zwischen einer realisierbaren Fallzahl aus dem Gesamtkollektiv eines Zentrums für Reproduktionsmedizin und der Wahrscheinlichkeit für das Auffinden einer Mutation gefunden werden. Bei einer angenommenen Häufigkeit spontaner Neumutationen von 1:10.000 erscheint die Fallzahl von 50 Patientinnen zu niedrig, so dass dies vermutlich zum fehlenden Auffinden entsprechender Mutationen im LIF-Gen beigetragen hat.

4.1.5 IVF/ICSI-Behandlung und Implantationspotential

Implantationsversagen ist der den Erfolg der assistierten Reproduktion limitierende Faktor. Nur 11-17% der in vitro gewachsenen Embryos implantieren erfolgreich (77, 182). Allerdings können auch Aspekte der Behandlung selbst ihren Erfolg einschränken. In der Gegenüberstellung der Implantationsraten nach konventioneller IVF und nach ICSI zeigte sich eine beeinträchtigte Embryo-Entwicklung nach Mikroinjektionstechniken. Dies erklärt sich unter anderem durch die Entfernung von Cumulus oophorus und Zona pellucida, die sonst die Oocyte vor toxischen Stoffen aus dem Kulturmedium und Sauerstoffradikalen schützen, die gerade aus Spermien schlechter Qualität vermehrt freigesetzt werden (77). Zusätzlich fällt bei den mikroinvasiven Techniken die Spermiselektion auf der Ebene der Zona pellucida als natürliche Barriere der Konzeption weg, so dass auch genetisch ungeeignete Spermien zur Fertilisierung führen können und möglicherweise genetische Veränderungen des Partners weitergegeben werden, die ihn eigentlich unfähig zur Fortpflanzung machen (77). Dies spiegelt sich in der erhöhten Rate chromosomaler Anomalien bei Geburten

nach ICSI im Vergleich zur Normalpopulation wider und könnte auch ein Störfaktor für die Implantation darstellen (161).

4.1.5.1 Stimulationsbehandlung und Implantationspotential

Der Einfluss supraphysiologischer Östradiolspiegel im Rahmen der ovariellen Stimulationsbehandlung auf die Embryoqualität und die Implantation wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Sie sollen sich auf der einen Seite negativ, auf der anderen Seite gar nicht auf die endometriale Rezeptivität auswirken (52, 181). Diese ist neben der Abhängigkeit von Progesteron auch durch Östradiolspiegel innerhalb eines engen Bereiches determiniert. Darunterliegende Spiegel verlängern die Periode der endometrialen Rezeptivität, höhere Konzentrationen verkürzen sie (100). Patienten mit hohen Östradiolspiegeln zum Zeitpunkt der Ovulationsinduktion hatten zwar mehrere Embryos guter Qualität, aber niedrigere Implantationsraten als Patientinnen mit normaler Antwort auf die Stimulationsbehandlung (181). Dagegen verbesserten sich die Implantationsraten bei einer reduzierten Anzahl reifender Follikel und damit reduzierter Östradiolkonzentration. Dies belegt den negativen Einfluss abnorm hoher Östradiolkonzentrationen auf die endometriale Rezeptivität (181).

Weiterhin stellt sich die Frage, ob der Vorteil des „langen Protokolls“ für die ovarielle Stimulationsbehandlung nicht einen Nachteil für den Implantationsvorgang darstellt. LH wirkt neben den bekannten Effekten an den Ovarien auch direkt am Endometrium, indem es in der Lutealphase die Proliferation des Endometriums fortsetzt und es so auf die Implantation vorbereitet (180). Die zur Downregulation der Hypophyse angewandten GnRH-Agonisten erzielen niedrige endogene LH-Spiegel auch in der Lutealphase, die sowohl über die fehlenden ovariellen Steroidhormone als auch über die fehlende direkte LH-Wirkung das Implantationspotential verschlechtern (180). Möglicherweise fehlt hier über den deutlichen Abfall des Progesterons eine entscheidende Phase zur Vorbereitung des Endometriums auf die Implantation. Durch die mittzyklische HCG-Injektion, welches neben seinem luteotropen Effekt ebenfalls über LH-Rezeptoren direkt am Endometrium wirkt, kann aber die endometriale Rezeptivität trotz niedriger endogener LH-Spiegel hergestellt werden (180). Zudem ist eine Stützung der Lutealphase mittels HCG und Progesteron insbesondere in Zyklen mit GnRH-Agonisten-Behandlung zur Verbesserung des Implantationspotentials erforderlich (178). Diese Voraussetzungen waren in der vorliegenden Studie gegeben.

4.1.5.2 Embryotransfer und Implantationspotential

Van der Elst und Mitarbeiter konnten retrospektiv zeigen, dass die Implantationsrate nach Transfer von Embryos, die in Zyklen mit GnRH-Agonisten-Behandlung gesammelt wurden, höher war als nach Stimulation ohne GnRH-Agonisten (182). Sie gehen von einer besseren Embryo-Qualität unter GnRH-Agonisten-Behandlung aus. Dagegen war die Implantationsrate für kryokonservierte Embryos, die in Zyklen mit GnRH-Agonisten-Behandlung gewonnen und in Spontanzyklen transferiert wurden, deutlich erniedrigt, was durch eine reduzierte Embryoqualität bedingt sein muss, da die endometriale Rezeptivität beim Kryo-Embryotransfer im Spontanzyklus nicht durch den GnRH-Agonisten beeinträchtigt werden konnte. Da es vor dem Einfrieren keinen signifikanten Qualitätsunterschied der Embryos beider Gruppen gab, entstehen möglicherweise bei der ovariellen Stimulation nach hypophysärer Suppression Oozyten, die nach der Befruchtung dem Stress des Einfrierens weniger standhalten (182).

Einen weiteren Erklärungsansatz für eine schlechte Implantationsrate bietet auch der Zeitpunkt des Embryotransfers im 4-8-Zellstadium wie in Deutschland üblich. Mehrere Studienergebnisse belegen insbesondere nach wiederholtem Versagen der reproduktiven Therapie eine Steigerung der Implantations- und Schwangerschaftsraten durch die morphologische Beurteilung der Embryos zum Zeitpunkt der Pronuklei und des Embryotransfers mit der Selektion der Embryos mit hohem Implantationspotential (152, 179). Im Rahmen des Embryotransfers aber sind Traumatisierungen des Embryos und Veränderungen des intrauterinen Milieus möglich, welche die weitere Entwicklung des Embryos als auch die Implantation beeinträchtigen können, jedoch in der morphologischen Beurteilung vor dem Embryotransfer nicht erkannt werden. Möglicherweise sind die Implantations-Misserfolge der Studienpatientinnen Folge einer gestörten Embryoentwicklung, die sich erst in höheren Entwicklungsstadien nach dem Embryotransfer im 4-8-Zellstadium manifestiert hat.

Der Transfer im Blastozystenstadium (Tag 5) würde eine Reihe von Vorteilen bieten. Durch die verbesserte Synchronisation der Entwicklung von Embryo und Endometrium und die Möglichkeit, über die verlängerte Kulturzeit gezielt Embryos besserer morphologischer Qualität für den Transfer auszuwählen und diesen nur mit einem Embryo durchzuführen, konnten gerade bei Frauen mit wiederholtem Implantationsversagen durch den Transfer von Blastozysten die Implantationsraten

gesteigert und dabei das Risiko für Mehrlingsschwangerschaften reduziert werden (82). Auch die genetische Präimplantationsdiagnostik mit der Möglichkeit der Embryo-Selektion würde im Blastozystenstadium erleichtert werden, da das menschliche Genom erst im 4-8-Zellstadium aktiviert wird (41). Allerdings gelten diese Vorteile nicht für alle Infertilitätspatienten, da Faktoren wie das Alter der Patientinnen, die Eigenschaften der gewonnenen Eizellen, die Anwendung der Mikroinjektion, die Kulturbedingungen, die Verwendung von Kryoembryos oder auch endogene Faktoren des Embryos selbst seine Fähigkeit, sich bis ins Blastozystenstadium zu entwickeln, beeinflussen. Simon und Mitarbeiter fanden bei Patientinnen nach mehrfachem IVF-Versagen keine höheren Implantationsraten nach Blastozystentransfer im Vergleich zum Embryotransfer am Tag 2 (160). Damit sahen sie sich in der Vorstellung bestätigt, dass multiples IVF-Versagen hauptsächlich auf ein geschädigtes Endometrium zurückzuführen ist.

4.1.5.3 Kryokonservierung und Implantationspotential

Bei den Studienpatientinnen entsprach durchschnittlich ein Versuch der künstlichen Befruchtung einem Kryo-Embryotransfer (KET). Da dieser im Spontanzklus stattfand, könnte eine ungenügende hormonelle Vorbereitung des Endometriums mit gestörter Rezeptivität insbesondere bei Patientinnen mit Zyklusstörungen zu einem Implantationsversagen und damit erfolgloser Behandlung geführt haben. Immerhin fanden bei zehn von 17 Frauen mit zugrundeliegenden Zyklusstörungen KET-Versuche statt. Bei fünf Frauen kam es zur Schwangerschaft infolge eines KET-Versuches, das entspricht 25% aller insgesamt im Studienverlauf eingetretenen Schwangerschaften. Die aktuelle Literatur gibt positive Daten bezüglich der Ergebnisse nach KET wieder. Die Dauer der Kryokonservierung, die Fertilisationsmethode (Insemination versus Mikroinjektion) sowie die Durchführung des Transfers in einem spontanen Zyklus (versus hormonell gestützt) hatten keinen negativen Einfluss auf die Implantationsraten (101, 125). Die Implantationsraten unter Verwendung von im Pronukleusstadium eingefrorenen Embryos waren sogar höher als beim Einsatz später kryokonservierter Embryos (125). Eine Erklärung für erfolglose KET-Versuche bei Studienpatientinnen nach erfolglosen IVF/ICSI-Zyklen bietet die Beobachtung, dass kryokonservierte Embryos, die aus erfolgreichen IVF/ICSI-Zyklen stammen und für weitere Versuche verwendet werden, eine doppelt so hohe Implantations- und Schwangerschaftsrate erreichen als Embryos aus erfolglosen Zyklen (43).

4.1.5.4 Anzahl der IVF/ICSI-Versuche und Implantationspotential

Bei einer IVF/ICSI-Behandlung bestehen für einen Embryotransfer derzeit etwa 27% Chancen für das Eintreten einer Schwangerschaft (46). Damit ist wie im natürlichen Reproduktionsprozess ein mehrfaches Wiederholen in der Regel Voraussetzung für das Erzielen einer Schwangerschaft. Bei drei IVF/ICSI-Versuchen, wie sie in den Einschlusskriterien für die Patientinnen gefordert wurden, erhöht sich die Möglichkeit auf 61,1% ($\sum_n 0,73^{(n-1)} \times 0,27$), die kumulativen Schwangerschaftsraten nach durchschnittlich fünf Behandlungszyklen in dieser Arbeit liegen sogar bei 79,3%, wie es die Folgedaten in der Patientinnengruppe mit dem Eintreten einer Schwangerschaft nach durchschnittlich fünf Behandlungsversuchen bestätigen. Für einen erneut ausbleibenden Erfolg der Therapie sind daher am wenigsten methodische Fehler der Technik verantwortlich. Allerdings wurde beobachtet, dass es bei einer IVF/ICSI-Behandlung unabhängig vom Alter der Frau nach vier erfolglosen Embryotransferen zu einem deutlichen Abfall der Schwangerschaftswahrscheinlichkeit kommt (7).

4.2 PCR-SSCP-Analyse zur Detektion von Mutationen im LIF-Gen

Giess und Mitarbeiter konnten bei infertilen Frauen insgesamt drei heterozygote Mutationen im LIF-Gen nachweisen, so dass die von ihnen erprobte Methode der PCR-SSCP-Analyse als geeignet gelten muss, entsprechende Gen-Alterationen zu entdecken, obwohl in der vorliegenden Arbeit keine Mutationen aufzufinden waren (55). Im Folgenden wird der Frage nachgegangen, ob diese Screening-Methode dem aktuellen Stand der Mutationsanalyse entspricht und geeignet ist, alle Mutationen im LIF-Gen, also auch noch nicht bekannte, als solche zu erkennen.

4.2.1 PCR als Amplifikations-Methode

Die Anwendung der PCR hat eine Vielzahl von Methoden der Molekulardiagnostik vereinfacht. Ein Vorteil der Methode ist, dass die zu amplifizierende Zielsequenz nicht bekannt sein muss, da zu ihrer Amplifikation die Kenntnis ihrer flankierenden Sequenzen ausreicht. Ein weiterer Vorteil ist die hohe Spezifität der PCR. Nur die Bereiche zwischen den flankierenden Primern werden amplifiziert, so dass selbst kleinste Gene eines größeren Genoms einzeln erfasst und die Längen der amplifizierten Fragmente bestimmt werden können.

Ein Nachteil der PCR-Methode ist der gelegentlich fehlerhafte Nulkeotid-Einbau durch die Taq-Polymerase, der allerdings kein Problem darstellt, wenn die Produkte einer PCR wie in der vorliegenden Studie als Matrizen für eine anschließende Sequenzierung verwendet werden (141).

Die hohe Sensitivität der PCR macht sie besonders empfindlich für Kontaminationen mit DNA-Spuren, die als Matrizen dienen könnten. Durch das Arbeiten unter möglichst sterilen Bedingungen mit autoklavierten Reagenzien und Gefäßen, die Verwendung kleiner Mengen von Reagenzien, das Mitführen einer Negativkontrolle (Reaktionsansatz ohne genomische DNA) sowie durch die Bearbeitung geringer Probenzahlen mit verkürzter Prozessierungszeit wurde in dieser Studie eine Kontamination mit der Folge falsch positiver Ergebnisse weitgehend vermieden.

Sind Erkrankungen monogen, können die ursächlichen Mutationen mittels PCR-Technik identifiziert werden. Verursachen viele verschiedene Mutationen einen gemeinsamen Phänotyp, sind zur Mutationssuche weiter differenzierte Detektionsmethoden wie SSCP, RFLP (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus) oder Sequenzierung erforderlich, um die heterogenen Mutationen vom Wildtyp und voneinander zu unterscheiden (171).

4.2.2 Methoden der Mutationsanalyse

Da der Nachweis genetischer Veränderungen als Ursache für eine große Anzahl von Erkrankungen oft von prognostischer und therapeutischer Bedeutung ist, stehen mittlerweile eine große Anzahl von molekularbiologischen Methoden zum Screening der DNA auf noch unbekannte sowie bereits beschriebene Mutationen zur Verfügung, die eine Alternative zum wiederholten und ausgedehnten Sequenzieren ganzer Populationen darstellen (31, 196). Diese Methoden beruhen auf dem gemeinsamen Prinzip, die veränderten physikalischen oder chemischen Eigenschaften der mutierten DNA in der Elektrophorese zur Unterscheidung vom Wildtyp auszunutzen. Ausgangspunkt ist jeweils ein Fragment des zu untersuchenden Gens, welches aus genomischer DNA mittels PCR amplifiziert wird. Unterschiede bestehen in der Detektionsrate, der maximalen Länge des zu untersuchenden Fragments, der Reproduzierbarkeit sowie im zeitlichen, technischen und finanziellen Aufwand der Methoden, der meist sehr groß ist. Dies macht sie als klinische Routine-Methoden ungeeignet.

Hier bieten die RFLP- und die SSCP-Methode optimale Voraussetzungen und finden als günstige und einfache Screening-Methoden auf Mutationen in genetisch heterogenen Populationen Einsatz. Die RFLP-Methode basiert auf dem Prinzip, dass ein Basensaustausch in einer DNA-Sequenz eine neue Schnittstelle für ein spezifisches Restriktionsenzym darstellt, das so die Punktmutation detektiert. Allerdings weist die RFLP-Methode bei großer Spezifität nur eine geringe Sensitivität auf, so dass sie weniger zur Detektion von unbekanntem Mutationen als zu Kopplungsanalysen mit Polymorphismen und zur Analyse von Genen mit bekannten Mutationsprädispositionsstellen (hot spots) Anwendung findet (196). Die SSCP-Analyse hat gegenüber der RFLP-Methode den Vorteil, dass sie Polymorphismen und Punktmutationen an einer Vielzahl von Positionen innerhalb von DNA-Fragmenten erkennen kann und erschien daher als Screening-Methode zum Auffinden von Mutationen im LIF-Gen geeignet (127).

4.2.3 PCR-SSCP-Analyse als Screening-Methode

Ziel der Arbeit war es, zu überprüfen, ob ein gezieltes Screening auf LIF-Gen-Mutationen als sinnvoller Parameter bei der Abklärung von Ursachen für Sterilität und Implantationsversagen eingesetzt werden könnte. Voraussetzung für eine Diskussion über den Stellenwert des Mutationsnachweises in der Sterilitätsdiagnostik und -therapie ist eine kritische Auseinandersetzung mit den Grenzen und Möglichkeiten der gewählten Methodik.

Ein Screeningverfahren ist definiert als zeit- und kostengünstiger Suchtest z.B. zur Identifizierung gefährdender Stoffe (Karzinogene), zur möglichst frühen Erfassung eines klinisch noch symptomfreien Krankheitsstadiums (Krebsvorsorgeuntersuchungen) oder zur Frühdiagnose gut therapierbarer, unerkannt aber schwer verlaufender Erkrankungen (Neugeborenen-Screening) (Psyhyrembel, Klinisches Wörterbuch, 257. Aufl.). Es sollte gleichzeitig eine hohe Detektionsrate (Sensitivität) und Reproduzierbarkeit aufweisen und durch die Möglichkeit einer Automatisierung schnell und einfach auf große Probenmengen anwendbar sein. Auf den Kontext der vorliegenden Studie bezogen, sollte ein Screening auf LIF-Gen-Mutationen erfolgen, um einerseits bei Frauen mit wiederholtem IVF/ICSI-Versagen eine Ursache für diesen Misserfolg zu finden, andererseits aber auch in Zukunft diese Frauen mit zu erwartender schlechter Prognose noch vor einer eventuellen reproduktiven Behandlung zu

identifizieren. Wenn das IVF/ICSI-Versagen eindeutig auf einen LIF-Mangel verursacht durch eine Mutation zurückgeführt werden kann, hätte dies für die betroffenen Frauen die weitreichende Konsequenz, bei ihnen entweder den technischen und finanziellen Aufwand einer reproduktiven Behandlung zu vermeiden, d.h. eine IVF/ICSI-Behandlung erst gar nicht als Therapieoption anzubieten, oder aber den LIF-Mangel möglicherweise therapeutisch zu beheben.

Als Methode zur Identifikation von Punktmutationen im LIF-Gen wurde für diese Arbeit die SSCP-Analyse von PCR-Produkten (PCR-SSCP) gewählt. Sie findet bei mittlerer Spezifität, geringem methodischem Aufwand und einfacher Handhabung eine breite Anwendung als schnelle, kostengünstige und effiziente Screeningmethode auf bekannte und unbekannte Mutationen in großen Genen wie Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, auf familiäre Polymorphismen in Gen-Kopplungsstudien bestimmter Erkrankungen oder zur Diagnose und Pränataldiagnostik genetisch bedingter Erkrankungen und zur HLA-Genotypisierung (2, 31, 113, 156, 196).

4.2.4 Sensitivität der PCR-SSCP-Analyse

Untersuchungen der Sensitivität der SSCP-Analyse ergaben kontroverse Ergebnisse mit sehr unterschiedlichen Detektionsraten für Mutationen von 30 bis über 90%, die sich durch unterschiedliche Ausgangsbedingungen erklären (79). Die Sensitivität der Methode wird entscheidend durch die Länge des zu analysierenden DNA-Fragments, die Bedingungen der Elektrophorese und die Sequenzeigenschaften des DNA-Fragments bestimmt. Ob diese Voraussetzungen in der vorliegenden Studie gegeben waren, um mit der PCR-SSCP-Analyse alle Trägerinnen einer LIF-Gen-Mutation auch als solche zu erkennen, wird im Folgenden diskutiert.

4.2.4.1 Fragmentlänge und Sensitivität der PCR-SSCP-Analyse

Die Anwendung der SSCP-Analyse beschränkt sich auf relativ kurze DNA-Stränge mit einer Länge von 150 bis 200 bp (65, 148). Außerhalb dieses Bereiches nimmt die Sensitivität der Methode stark ab, neben zu langen Fragmenten besteht also auch eine Längen-Begrenzung für kürzere Fragmente (156). In einer Metaanalyse durch Hayashi und Yandell wurden 90% aller Mutationen in Fragmenten von weniger als 200 bp Länge gefunden, bei einer Fragmentlänge von bis zu 300-350 bp dagegen sank die Detektionsrate auf ungefähr 80% ab (65). Vermutlich wirkt sich ein einzelner

Basenaustausch in einem langen Fragment weniger stark auf die Gesamt-Konformation aus als in einem kurzen Fragment (65, 156). Zudem wandern kürzere Fragmente im elektrischen Feld schneller als längere und trennen sich so besser auf (171). Die Unfähigkeit besonders kleiner DNA-Fragmente, stabile Sekundärstrukturen zu bilden, erklärt die ebenfalls niedrige Sensitivität der SSCP-Methode im unteren Längenbereich von Fragmenten (156).

Um Fragmente entsprechender Länge zu erhalten, wird der SSCP-Analyse eine PCR mit passenden Primern oder ein zusätzlicher Verdau durch ein Restriktionsenzym vorgeschaltet. Bei Genabschnitten großer Länge stellt dieser Umstand einen großen zeitlichen Aufwand und damit den limitierenden Faktor der Methode dar. In dieser Arbeit wurde zur Optimierung der Fragmentlänge das Exon 3 mittels PCR-Primer in drei Teilfragmente mit Längen von 284bp, 284bp und 243bp aufgetrennt, die sich in weiten Teilen überlappten. Auch die Fragmente von Exon 1 (143bp) und Exon 2 (268bp) erfüllten die Anforderungen für eine hohe Sensitivität.

4.2.4.2 Elektrophoresebedingungen und Sensitivität der PCR-SSCP-Analyse

Neben der Länge des zu untersuchenden DNA-Fragments haben auch Umgebungsparameter mit direkter Auswirkung auf die DNA-Konformation wie Temperatur, Konzentration des Elektrophoresepuffers, pH-Wert und Vorhandensein denaturierender Substanzen im Gel sowie Geleigenschaften, welche die elektrophoretische Mobilität beeinflussen, Auswirkungen auf die Effektivität, mit der die Mutationen detektiert werden (58, 126, 127, 148, 165). Da eine Modifikation dieser Faktoren die Sensitivität verändern kann, wird die SSCP-Analyse eines DNA-Fragments bis zur Optimierung meist unter unterschiedlichen Elektrophoresebedingungen durchgeführt (65). So können Fragmente mit fast identischer Sequenz aufgetrennt und nahezu alle Sequenzvariationen detektiert werden. In einer Studie der Arbeitsgruppe von Jordanova waren falsch negative Ergebnisse solche Veränderungen, die erst entweder nach Verkürzung der Fragmente durch Restriktionsverdau, durch veränderte SSCP-Bedingungen oder durch andere Methoden der Mutationsanalyse entdeckt wurden (79). Da in der vorliegenden Arbeit die Elektrophoresebedingungen entsprechend der Optimierung durch die Arbeitsgruppe Giess auch bei wiederholtem Durchlauf unverändert blieben und keine Kontrolle durch eine Alternativmethode stattfand, ist nicht auszuschließen, dass Mutationen im LIF-Gen

unentdeckt blieben (55). Lediglich die Fragmente mit auffälligen SSCP-Banden wurden zur Identifizierung der Mutation bzw. des Polymorphismus anschließend sequenziert. Ein Nachteil der SSCP-Analyse ist die fehlende Vorhersagbarkeit über die zu erwartende Konformationsänderung eines mutierten DNA-Strangs und folglich über sein Verhalten in der Elektrophorese (65). Manche Sequenzänderungen beeinflussen die elektrophoretische Mobilität nicht. Diese Fragmente wandern mit der Wildtypsequenz mit und werden nicht als Mutation erkannt (126). Kompliziert wird dieses Problem durch die Tatsache, dass für einen DNA-Strang abhängig von den Elektrophoresebedingungen häufig mehr als eine stabile Konformation existieren. Die zusätzlichen Konformationstypen wandern dann im elektrischen Feld als optisch schwer aufzulösende Bande neben der des Wildtyps oder sogar zusammen mit der Wildtypbande und erfordern zur Vermeidung falsch negativer Ergebnisse eine Optimierung der Elektrophorese durch andere Bedingungen (65). Temperaturdifferenzen zwischen den Elektrophoreseplatten z.B. ermöglichen das gleichzeitige Auftreten verschiedener Konformationen oder Übergangszustände eines Einzelstranges (65). Durch die Verwendung einer Elektrophorese-Einheit mit Kühlsystem wurde in der vorliegenden Arbeit eine gleichmäßige Verteilung der Umgebungstemperatur gesichert und versucht, ein Übersehen von Mutationen zu verhindern.

4.2.4.3 Sequenzeigenschaften und Sensitivität der PCR-SSCP-Analyse

Die Sensitivität der SSCP-Analyse ist zusätzlich von der Sequenz des untersuchten DNA-Fragments abhängig (196). Da purinreiche Abschnitte empfindlicher auf Veränderungen im Gel reagieren und eine größere Vielfalt in ihrer elektrophoretischen Mobilität zeigen, finden sich vor allem bei ihnen hohe Detektionsraten (58, 156). Dagegen sind DNA-Abschnitte mit einem höheren Anteil an den Basen Cytosin und Guanin wie die in dieser Arbeit untersuchten Abschnitte des LIF-Gens durch deren stärkere Bindung stabiler (166). Zu einer detektierbaren Konformationsänderung durch eine Mutation kommt es in den stabilen DNA-Abschnitten häufig erst durch aufwendige und teure Optimierung der Laufparameter, die zudem die Kenntnis der spezifischen Mutation voraussetzt (196). Die exakte Einstellung der Laufparameter wie z.B. die Umgebungstemperatur ist damit für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

unverzichtbar, was mit der hier verwendeten Elektrophorese-Einheit gewährleistet wurde (65).

Jordanova und Mitarbeiter erreichten mittels optimierter SSCP-Analyse eine hohe Detektionsrate von 84% für unbekannte Mutationen in DNA-Strängen bis zu 500 bp Länge (79). Hier lag die Sensitivität für Baseninsertionen bzw. -deletionen (90%) über der eines Basenaustausches (81%) mit 88% für Transitionen und 73% für Transversionen. In der vorangegangenen Studie der Arbeitsgruppe Giess handelte es sich bei allen nachgewiesenen Mutationen um Basensubstitutionen (55). Allerdings sind die Fähigkeiten einer SSCP-Analyse häufig dadurch begrenzt, dass sie nicht zwischen unterschiedlichen Basensubstitutionen an derselben Nukleotid-Position unterscheiden kann (156).

Theoretisch können auch Faktoren wie die Position oder die Art einer Mutation innerhalb eines Fragments für die Sensitivität der SSCP-Methode eine Rolle spielen, da sie alle die Sekundärstruktur eines DNA-Moleküls beeinflussen (156). Da das Laufverhalten von DNA-Einzelsträngen auch von den flankierenden Sequenzen abhängt, kann durch Auswahl der Primer oder durch die Anwendung unterschiedlicher Restriktionsenzyme eine Änderung der elektrophoretischen Mobilität hervorgerufen und die Wahrscheinlichkeit der Detektion verbessert werden (156). Vermutlich sind nur manche benachbarten Sequenzen fähig, sich mit der mutationsbeinhaltenden Region zu paaren und eine entsprechend veränderte Sekundärstruktur zu bilden.

4.2.5 Spezifität der PCR-SSCP-Analyse

Die mäßige Spezifität der SSCP-Methode wird auf die hohe Anzahl von Polymorphismen und funktionell nicht relevanten Mutationen in bestimmten Genen zurückgeführt, die als Basenaustausch mit veränderter Sekundärstruktur ebenfalls abweichende Banden darstellen. Um die zugrundeliegende Alteration des DNA-Abschnittes zu identifizieren, muss jede Probe mit einer auffälligen SSCP-Bande anschließend sequenziert werden. Die Kombination von SSCP und Direktsequenzierung bedeutet gerade beim Vorkommen vieler Polymorphismen einen großen zeitlichen und finanziellen Aufwand. Da sich im Gegensatz zur SSCP-Analyse bereits mit der alleinigen Direktsequenzierung die funktionelle Konsequenz eines Basenaustausches abschätzen lässt, bleibt die Sequenzierung die Methode der Wahl für nicht bekannte Mutationen mit breiter Verteilung über den kodierenden Bereich hinweg (196). Zudem

besteht bei unbekanntem Mutationen der Nachteil, dass die Elektrophoresebedingungen nicht gezielt abgestimmt werden können, was auch in dieser Arbeit zum Übersehen eventuell tatsächlich vorhandener Mutationen im LIF-Gen geführt haben könnte.

Auch in der vorliegenden Studie erwies sich die Spezifität der SSCP-Analyse als unzureichend. Beim ersten PCR-SSCP-Lauf zeigten Sequenzen trotz fehlender Basensubstitution ein auffälliges Laufverhalten. Erst die Wiederholung der PCR-SSCP-Analyse konnte nur noch Fragmente nachweisen, deren Sequenzänderung sich in der anschließenden Sequenzierung bestätigte.

4.2.6 PCR-SSCP: Methode der Wahl zum Nachweis von LIF-Gen-Mutationen?

Vergleicht man die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen, erzielt die PCR-SSCP-Analyse bis auf wenige methodisch begründete Ausnahmen in den unterschiedlichsten Gen-Sequenzen eine hohe Sensitivität in der Detektion von Mutationen und Polymorphismen (65). Entscheidend für den Erfolg war jeweils die Optimierung der methodischen Bedingungen über eine längere Vorlaufphase. Generell wurden mindestens zwei unterschiedliche Versuchsansätze erprobt.

Alternative Modifikationen wie die RNA-SSCP oder eine Kombination mit anderen Methoden der Mutationsanalyse bieten zwar im Vergleich zur einfachen PCR-SSCP eine Sensitivität von bis zu 100%, sind jedoch durch zusätzliche methodische Schritte immer zeitaufwendiger und komplizierter als die SSCP-Methode und als generelle Methode zum Screening auf Mutationen nicht geeignet (31, 65, 91, 148).

Die SSCP-Analyse ist nicht zum Nachweis der Mutationsart oder ihrer Lokalisation geeignet. Unter optimierten Voraussetzungen stellt die PCR-SSCP-Analyse selbst für spezifische Fragestellungen gegenüber anderen Untersuchungsmethoden eine effektive und kostengünstige Methode dar, mit geringem zeitlichen Aufwand und einer Sensitivität von ungefähr 80% erste Hinweise auf unterschiedliche Mutationen großer Gene zu gewinnen (31). Analysiert man parallel Fragmente mit bekannten Mutationen, können Aussagen zu der vorliegenden genetischen Veränderung gemacht werden (90). Aus einer großen Menge von Proben kann somit innerhalb eines Tages eine kleine Auswahl auffälliger Fragmente getroffen werden, auf die sich zur genaueren Identifizierung des zugrunde liegenden Basenaustausches die aufwendigere Sequenzierung beschränkt. Dies ermöglicht eine effektive und zuverlässige Ökonomisierung der diagnostischen Abläufe bei hohem Probendurchsatz, indem es die

aufwendige Sequenzierungsarbeit aller kodierenden Regionen großer Gene erspart (91, 113). Zudem benötigt die Methode keine speziellen Chemikalien und ist schnell zu erlernen. Sowohl im Bereich der Erforschung als auch in der klinischen Routinediagnostik genetisch bedingter Erkrankungen bietet sie sich langfristig als Screeningmethode an.

Um eine Aussage über die Empfindlichkeit der hier angewandten SSCP-Analyse machen zu können, wäre eine zusätzliche Durchführung des Verfahrens an Fragmenten mit bereits bekannten LIF-Gen-Mutationen erforderlich gewesen. Mit einer vorausgegangenen Sequenzierung hätte die SSCP-Analyse so als Screening-Verfahren überprüft werden können. Mögliche Mängel in der Methodik, die zum Übersehen bekannter Basenaustausche führten, hätten anschließend eliminiert werden können. So ist es möglich, dass in dieser Arbeit auch Mutationen im LIF-Gen unentdeckt blieben.

4.3 Ursachen von LIF-Mangel und Implantationsversagen

Wie eingangs beschrieben, kann ein Mangel an LIF-Protein mit erfolgloser Implantation in spontanen und stimulierten Zyklen in Verbindung gebracht werden. Die Ergebnisse dieser Studie sowie andere Daten machen aber wahrscheinlich, dass ein LIF-Mangel neben genetischen Defekten auch auf anderen Ursachen basieren kann. Neben defekten Regulationsmechanismen der LIF-Produktion (hormonell, Zytokinnetzwerk) insbesondere im Rahmen der IVF/ICSI-Therapie sind Funktionsstörungen im LIF-Rezeptor und in der Signalübertragung sowie noch unbekannte Faktoren aus der komplexen Steuerung des Implantationsvorganges als Ursachen eines LIF-Mangels vorstellbar und werden im Folgenden diskutiert. So könnte man zwischen einem quantitativen, absoluten Mangel an LIF-Protein und einem funktionellen LIF-Mangel in Form einer gestörten Funktion des Zytokins oder seines Rezeptors unterscheiden.

4.3.1 LIF-Gen-Mutationen und LIF-Mangel

Die Analyse der Patientinnenproben ergab weder einen homo- noch einen heterozygoten Strukturdefekt im LIF-Gen, der einen Aminosäureaustausch an funktionell bedeutender Stelle des LIF-Proteins zur Folge hatte. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Giess und Mitarbeitern, die drei heterozygote Punktmutationen im LIF-Gen bei 74 infertilen Patientinnen unterschiedlicher Ursache fanden (Abb. 3.1) (55). Die Mutationsstellen liegen zum einen in der Nähe der

regulatorischen Region des Startcodons im LIF-Gen und können Auswirkung auf das Expressionsniveau des LIF-Proteins haben, zum anderen korrespondieren sie mit Regionen des LIF-Proteins, die eine wichtige Rolle in der Wechselwirkung mit dem LIF-Rezeptor spielen und daher die biologische Aktivität des LIF-Proteins und die Kinetik der Zytokin-Rezeptor-Wechselwirkung einschränken können (55).

Bislang fehlen biochemischen Analysen von uterinen LIF-Konzentration oder Untersuchungen der Funktion des aktiven Zytokins LIF bei Frauen mit nachgewiesener LIF-Gen-Mutation. Von homozygoten Defekten wird wie bei der Maus erwartet, dass die Betroffenen unfähig zur Reproduktion sind (168). Heterozygote Mutationen mit einem intakten Allel des LIF-Gens könnten z.B. das Expressionsniveau von LIF-mRNA reduzieren und die Bioverfügbarkeit des LIF-Proteins im Uterus vermindern. Andererseits könnten diese Verluste durch das funktionstüchtige Allel insbesondere unter den Bedingungen einer ovariellen Stimulationsbehandlung kompensiert werden, so dass die uterine LIF-Konzentration für eine erfolgreich ablaufende Implantation ausreichen würde. Dafür spricht die erfolgreiche Schwangerschaft bei einer betroffenen Frau aus der bei der Arbeitsgruppe Giess untersuchten Population, deren Eintreten durch das Vorliegen einer heterozygoten Mutation nicht gestört wurde (55). Dies schließt allerdings nicht aus, dass Frauen mit heterozygoten LIF-Gen-Mutationen unter physiologischen Bedingungen reduzierte Implantationschancen haben. Möglicherweise besteht bei heterozygoten Mutationen eine Dosisabhängigkeit des Implantationserfolges mit einer für die Implantation erforderlichen Schwellendosis der uterinen LIF-Konzentration. Weitere Untersuchungen zu Genotyp-Phänotyp-Zusammenhängen beim Menschen insbesondere zwischen der Lokalisation einer Mutation im LIF-Gen und ihrer Auswirkung auf die Aktivität des LIF-Proteins und die Ausprägung der Fertilitätsstörung stehen noch aus.

Dank der DNA-Reparaturmechanismen beträgt die Spontanmutationsrate menschlicher Zellen nur 1,4 Mutationen pro 10^{10} Basenpaare pro Zellgeneration. Die Rate an LIF-Gen-Mutationen im Studienkollektiv von Giess und Mitarbeitern lag damit darüber, so dass es sich um vererbte Mutationen handeln muss (55). Dies zeigt ebenfalls, dass eine heterozygote LIF-Mutation die Fortpflanzung nicht vollkommen verhindert, sondern allenfalls erschwert. Homozygote Mutationen im LIF-Gen wurden bislang beim Menschen nicht beschrieben. Es ist möglich, dass in der kleinen Anzahl von

untersuchten Menschen homozygote LIF-Gen-Mutationen entweder nicht vorkamen, oder die Untersuchungsmethoden unzureichend waren, vorhandene Mutationen aufzufinden.

Bei der Suche nach LIF-Gen-Mutationen blieb unberücksichtigt, dass die Transkription und Translation des komplexen LIF-Gens in drei Isoformen des LIF-Proteins resultiert. Vermutlich spielen sie jeweils spezifische Rollen bei der Reproduktion oder es kommt auf ein ausgewogenes Verhältnis aller drei Isoformen an, so dass eine spezifische Mutation mit Auswirkungen auf eine der LIF-Isoformen die Fertilität in unterschiedlichem Maße beeinträchtigen würde. Eine gezielte Mutationssuche in den für eine Isoform spezifischen DNA-Sequenzen könnte möglicherweise eine höhere Anzahl von Mutationen bei infertilen Frauen aufdecken.

4.3.2 IVF/ICSI-Behandlung und LIF-Mangel

4.3.2.1 Gestörte hormonelle Regulation der LIF-Expression bei IVF/ICSI

Die zyklusabhängige Expression von LIF macht eine Regulation durch Steroidhormone über deren Effektoren wahrscheinlich und lässt eine Beeinflussung im Rahmen der ovariellen Stimulationsbehandlung bei einer IVF/ICSI-Therapie erwarten. Eine verminderte Expression von LIF fand sich in endometrialen Proben von Frauen, die ein GnRH-Analogon oder Progesteron erhalten hatten, so dass ein LIF-Mangel infolge der Stimulationsbehandlung eine Rolle beim Implantationsversagen der IVF-Behandlung spielen könnte (4). Eventuell hat die suppressive Therapie im Rahmen der ovariellen Stimulationsbehandlung eines IVF-Zyklus über diesen Mechanismus negativen Einfluss auf die Implantation.

4.3.2.2 Defekte im Zytokin-Netzwerk bei Infertilität und IVF/ICSI

LIF-defiziente Mäusen sind abgesehen von ihrer Infertilität trotz der ausgefallenen vielfältigen Funktionen LIFs normal lebensfähig. Möglicherweise wird ein Mangel an LIF durch die Funktion anderer Faktoren kompensiert, die alle mehr oder weniger Bedeutung für das Gelingen der Implantation und den erfolgreichen Ablauf anderer physiologischer Vorgänge haben. Von den Zytokinen, die gp130 als Signaltransduktionseinheit nutzen, sind IL-6, IL-11 und LIF an der Implantation beteiligt (143). Die gemeinsame Verwendung eines Rezeptors durch eine Vielzahl von

Zytokinen liefert möglicherweise die Erklärung dafür, dass sich eine Deletion des gp130-Gens im Gegensatz zur Deletion des LIF-Gens embryonal auswirkt (194).

Während des Implantationsfensters wird vermehrt lösliches gp130 (sgp130) durch proteolytische Abspaltung von der membrangebundenen Form sezerniert, das die Funktionen der gesamten IL-6-Zytofinkfamilie antagonisiert (157). Dagegen wiesen idiopathisch infertile Frauen eine signifikant erniedrigte Sekretion von sgp130 in diesem Zeitraum auf (157). Möglicherweise ist bei ihnen der Implantationsvorgang durch die verminderte Antagonisierung und damit überschießende Wirkung einiger an der Implantation beteiligten Zytokine gestört.

Vermutlich handelt es sich um ein redundantes System, in dem verschiedene Faktoren mit sich überschneidenden Funktionen an einer Vielzahl von Zellen wirken (109). Arici und Mitarbeiter sehen im Netzwerk der unterschiedlichen Faktoren der Implantationsregulation ein fehlersicheres System aus sich ergänzenden und ersetzenden Agonisten, das die vollständige Abhängigkeit der Implantation allein von der Funktion eines einzelnen Genprodukts vermeidet (4). Eine Funktion auszuwählen und isoliert als einzige Wirkung eines einzelnen Faktors zu untersuchen, führt wahrscheinlich zu der falschen Vermutung, sie sei essentiell.

Allerdings wäre ein LIF-Mangel auf dem Boden einer ungenügenden Steuerung der LIF-Expression durch Defekte in diesem Zytokin-Netzwerk denkbar. Da die Zytokine Effektoren der Steroidwirkung sind, kann man sich gerade unter den Voraussetzungen der Stimulationsbehandlung im Rahmen einer IVF/ICSI-Therapie eine Dysregulation ihrer Wechselwirkungen vorstellen. Ein verlängerter Stresszustand, wie er bei einer IVF-Behandlung entstehen kann, bewirkt über neuro-immunologische Mechanismen eine erhöhte Anzahl aktivierter T-Zellen im peripheren Blut sowie ein Ungleichgewicht zwischen den verschiedenen Zytokinen und führt zu reduzierten Implantationsraten bei Frauen in der IVF-Behandlung (48).

4.3.3 LIF-Rezeptor-/Signaltransduktionsstörungen und LIF-Mangel

Neben dem Mangel an LIF-Protein selbst stellt auch ein Verlust der Rezeptorfunktion eine reduzierte LIF-Wirkung dar. LIFR-defiziente Mäuse sind nach Geburt nicht lebensfähig (187). Gp130-defiziente Mäuse sterben bereits intrauterin vermutlich aufgrund ihres Verlustes eines viel weiteren Spektrums an Zytokininteraktionen, die diese Rezeptoreinheit vermittelt (98, 187, 194).

Über die Regulationsmechanismen der LIF-Rezeptorexpression ist fast nichts bekannt, weder über die Signale, welche die Synthese an sich induzieren, noch über die Faktoren, die bestimmen, ob membrangebundene oder lösliche Rezeptoren in welchen Konzentrationen gebildet werden, so dass eine Vielfalt von Störfaktoren der LIF-Wirkung über den Weg der Rezeptorexpression vorstellbar ist (109).

Auch über eine Störung der Signaltransduktion ist eine reduzierte LIF-Funktion denkbar. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 im Rahmen der LIF-Signaltransduktion im luminalen Epithel fällt bei der Maus mit dem Beginn der endometrialen Rezeptivität zusammen (26). Mutationen, welche die STAT3-Aktivierung beeinträchtigen, führen phänotypisch zu lebensfähigen Mäusen mit Infertilität bei den Weibchen aufgrund eines Implantationsversagens (26). Diese Mäuse sind von LIF-defizienten Weibchen nicht zu unterscheiden, so dass die Aktivierung von STAT3 im luminalen Epithel die entscheidende Voraussetzung für die Implantation darstellt (26).

Um bei einem Protein mit derart vielfältiger Wirkung eine Überstimulation zu verhindern und die Auswirkungen zu begrenzen, existieren Mechanismen, die die Zytokin-vermittelte Signaltransduktion negativ regulieren (67). Eine mangelnde Funktion dieser Kontrollfaktoren könnte eine Ursache für eine überschießende systemische LIF-Wirkung darstellen, eine mangelnde Hemmung dieser Steuerung würde wiederum eine reduzierte LIF-Funktion erklären. Proteinphosphatasen z.B. hemmen das Schlüsselereignis der Signaltransduktion, die Phosphorylierung. Als negative Modulatoren der STAT3-Aktivität existieren auch intrazelluläre Faktoren wie die Suppressoren der Zytokinaktivität (SOCS-Proteine) und Proteininhibitoren des aktivierten STAT (PIAS-Proteine), die unerwünschte LIF-Wirkungen hemmen. Die Expression von SOCS-Proteinen wird durch IL-6, IL-11, LIF und OSM gesteigert, und führt über die Hemmung der JAK-Phosphorylierung zur Hemmung der STAT-vermittelten Signaltransduktion, so dass sie als klassische feedback-Inhibitoren bezeichnet werden können. Die Familie der PIAS hemmt z.B. die DNA-Bindung des aktivierten STAT1 und damit die STAT1-vermittelte Geninduktion.

Die als negative Regulatoren der STAT3-Aktivität bekannten Steroidhormone wirken so, dass Östradiol alleine die Ansprechbarkeit des Rezeptors auf LIF unterdrückt, diese Hemmung der STAT3-Phosphorylierung jedoch durch Progesteron aufgehoben wird

(26). Die Expression der SOCS-Proteine wiederum wird durch Zytokine und Hormone gewebeabhängig reguliert (6). Eine Störung dieser Mechanismen durch die ovarielle Stimulation im Rahmen einer IVF/ICSI-Behandlung ist durchaus vorstellbar.

4.4 Klinische Bedeutung von LIF und Konsequenz für die IVF/ICSI-Behandlung

Ein besseres Verständnis der für die endometriale Rezeptivität verantwortlichen molekularen Mechanismen könnte helfen, die „letzte großen Barriere der Reproduktionsbiologie“, das Implantationsversagen, durch therapeutische Intervention zu überwinden (163). Über die Beeinflussung der am Implantationsvorgang beteiligten Zytokine könnten eine optimale Synchronisation der endometrialen Rezeptivität und des Embryotransfers erreicht und die Erfolgsraten der Reproduktionsmedizin verbessert oder die Bereitstellung eines optimalen uterinen Milieus für eine Spontanschwangerschaft sichergestellt werden (143). Dies kann z.B. durch direkten Gentransfer in das Endometrium erreicht werden, welcher die Expression und Funktion spezifischer Gene im Endometrium reguliert und deren Genprodukte, die Zytokine, als Ziele zur Manipulation des Reproduktionsvorganges nutzt (22).

Der Nachweis einiger am Implantationsvorgang beteiligten Faktoren als Biomarker der endometrialen Rezeptivität könnte zur Einschätzung der endometrialen Funktion infertiler Frauen zum Zeitpunkt der Implantation in spontanen oder stimulierten Zyklen sowie als prognostische Parameter für das Eintreten einer Schwangerschaft wertvoll sein (98). Daraus verspricht man sich außerdem Fortschritte in der Synchronisation von Embryotransfer und endometrialer Differenzierung bei der assistierten Reproduktion. Das Ergebnis wären verbesserte Schwangerschaftsraten und die Möglichkeit des Einzel-Embryotransfers zum idealen Zeitpunkt des rezeptiven Endometriums, ohne dass sich die Schwangerschaftschancen reduzierten, gleichzeitig aber mit vermindertem Risiko von Mehrlingsschwangerschaften und den verbundenen geburtshilflichen und neonatalen Komplikationen.

Ein idealer biologischer Marker für die endometriale Rezeptivität sollte im Endometrium in der Nähe des Implantationsortes vorkommen, während des Implantationsfensters erscheinen und außerhalb dieser Phase fehlen. Allerdings konnte bislang für keinen der für die endometriale Rezeptivität bedeutsamen biochemischen Marker ein klinischer Nutzen bewiesen werden (40, 98).

Der klinische Stellenwert LIFs in der Sterilitätsdiagnostik und -therapie ist noch offen. Bei der Maus konnte gezeigt werden, dass eine exogene Zufuhr von LIF die Implantation bei LIF-defizienten Mäusen induzieren kann (44, 168). Die Substitution von LIF könnte eine therapeutische Option bei sterilen Frauen darstellen, die von einem LIF-Mangel betroffen sind. Zudem könnte es als Marker der endometrialen Rezeptivität diagnostische Anwendung bei der assistierten Reproduktion finden. Neben den direkt beim Menschen eingesetzten therapeutischen und diagnostischen Möglichkeiten bietet sich darüberhinaus die Anwendung LIFs zur Verbesserung der Embryokultur in der IVF/ICSI-Behandlung als embryoprotektives Agens an (41, 47).

4.4.1 Therapeutische Anwendung des LIF-Proteins

Über die Expression durch *E. coli* konnte rekombinantes humanes LIF (rhLIF) produziert werden, das in wässriger Lösung zur subkutanen Applikation für den klinischen Gebrauch am Menschen geeignet wäre und in klinischer Erprobung ist (95). Die Anwendung LIFs als therapeutischen Wirkstoff (AM424) ist umstritten, da aufgrund seiner pleiotropen Funktion unerwünschte systemische Wirkungen erwartet werden (92). Zudem ist die Halbwertszeit von rhLIF mit 3 bis 5 Minuten sehr kurz, so dass hohe Dosen erforderlich sind (71). Die Tatsache, dass LIF in verschiedenen Geweben und im Kreislauf der Maus unter physiologischen Bedingungen nicht nachweisbar ist, nach intravenöser Injektion und bei exzessiv hohen LIF-Konzentrationen aber zu schädigenden Wirkungen führt und sehr schnell aus dem Kreislauf eliminiert wird, lässt darauf schließen, dass die LIF-Expression streng kontrolliert wird und es eher lokal als systemisch wirkt (73, 107). Mäuse, die sehr hohen LIF-Konzentrationen ausgesetzt waren, entwickelten ein Syndrom aus Kachexie mit Fettgewebsverlust, Osteosklerose, Verdrängung der Hämatopoese aus dem Knochenmark, Hyperexzitabilität infolge der Hyperkalzämie, Kalzifizierung von Leber, Herz und Muskelgewebe, Pankreatitis, Gonadeninsuffizienz, und Aktivierung der Akuten-Phase-Antwort (107). Vermutlich verhindert die streng lokalisierte LIF-Expression unerwünschte Wirkungen dieses pleiotropen Zytokins an anderer Stelle. In einer Phase-II-Studie zur Behandlung der Amyotrophen Lateralsklerose mit rhLIF (AM424) konnte mittlerweile seine relativ geringe Toxizität nachgewiesen gezeigt werden (92).

Eine Phase-I-Studie mit rhLIF (Emfilermin) zur Untersuchung seiner Sicherheit, Pharmakokinetik und biologischen Auswirkungen existiert bei Patienten mit fortgeschrittener Krebserkrankung unter Chemotherapie (60). Positive Auswirkungen waren eine schnellere Erholung der Hämatopoese nach Chemotherapie. Unerwünschte Wirkungen wie eine autonome Dysfunktion mit Impotenz und episodischer Hypotension sowie ein Rigor limitierten eine Dosissteigerung (60).

LIF kann bei Mäusen die voll entwickelte Plazenta nicht passieren, weshalb es vermutlich bei einer systemischen Anwendung gar nicht an den Wirkort Endometrium und Blastozyste gelangt (71). Nach intraperitonealer Injektion akkumuliert es in hohen Konzentrationen in Leber, Pankreas, Milz und Lunge, nicht aber im Uterus, so dass intrauterine Injektionen vermutlich effektiver sind (71). Die in der Einleitung beschriebenen Experimente der Arbeitsgruppe um Stewart konnten bei Mäusen keinen direkten Einfluss von in utero injiziertem LIF auf die Implantation nachweisen (168). Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit könnte die LIF-Konzentration nach einer einmaligen Injektion für die Induktion einer Implantation zu gering sein. Dagegen konnten nach der kontinuierlichen Zufuhr von rekombinantem LIF über eine Peritonealpumpe histologisch Implantationsstellen bei LIF-defizienten Weibchen nach Paarung mit LIF-defizienten Männchen nachgewiesen werden (168). Ausgehend von den Ergebnissen der Untersuchungen von Stewart und Mitarbeitern könnte die lokale Zufuhr von LIF in der frühen bis späten sekretorischen Phase bei infertilen Frauen mit Implantationsversagen nach IVF, bei denen eine verminderte LIF-Produktion durch das Endometrium nachgewiesen wurde, die Chancen für eine erfolgreiche Implantation verbessern (168, 186). Mittels Injektion von LIF-Gen-DNA-Liposom-Komplexen ins Uteruslumen gelang bereits der LIF-Genstransfer auf Maus-Endometrium in vivo (75). Dessen Auswirkung auf das Implantationspotential muss noch untersucht werden.

Bei einem dem Mangel an LIF-Wirkung zugrundeliegenden Defekt in der LIF-Rezeptorfunktion wäre die therapeutische Anwendung LIFs allerdings sinnlos, so dass zuvor Untersuchungen zur Lokalisation der ursächlichen Störung erfolgen müssten. Die klinische Anwendung LIFs bei Frauen mit wiederholtem Implantationsversagen sollte jedoch mit großer Zurückhaltung erfolgen, solange die genauen Funktionen und die Bedeutung dieses Zytokins für die menschliche Reproduktion noch nicht vollständig aufgeklärt sind.

4.4.2 Diagnostische Anwendung des LIF-Proteins

Sollte eine therapeutische Anwendung LIFs nicht realisierbar sein, so kann das Zytokin doch von diagnostischem Nutzen sein, der entscheidend zur Verbesserung der Erfolgsraten der IVF/ICSI-Behandlung beiträgt. Die über ELISA gemessene LIF-Konzentration in uteriner Spülflüssigkeit könnte ein prognostisches Kriterium zur Abschätzung des zu erwartenden Implantationserfolges einer assistierten Reproduktionstechnik werden und zur Identifizierung nicht rezepativer Endometrien vor der Behandlung dienen, da sie bei Frauen mit Infertilität und erfolgloser Implantation deutlich erniedrigt nachgewiesen wurde (93, 110). Die schmerzfreie Gewinnung der Spülflüssigkeit verhindert eine Störung des Zytokinnetzwerkes durch eine schmerzinduzierte Zytokinproduktion. Eine Messung des Serum-LIF-Spiegels wäre als diagnostisches Instrument nutzlos, da zwischen den LIF-Konzentrationen im Uterus und im Serum keine Korrelation besteht (110).

Ledee-Bataille und Mitarbeiter dagegen fanden eine niedrige LIF-Konzentration in uteriner Spülflüssigkeit aus der späten Lutealphase bei Frauen unter IVF-Behandlung als prognostisch günstigen Hinweis auf eine folgende erfolgreiche Implantation (97). Der Implantationsprozess kann mit einer entzündungsartigen Reaktion verglichen werden, die allerdings physiologisch reguliert abläuft und schnell wieder unterdrückt wird (27, 97). Eine zu starke Entzündungsreaktion im uterinen Lumen kann das Überleben des Embryos und die Implantation gefährden und die Schwangerschaftsraten bei IVF reduzieren. Da die LIF-Produktion auch durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF induziert wird, ist eine erhöhte LIF-Konzentration in uteriner Flüssigkeit ein Hinweis auf solch eine überschießende Entzündungsreaktion und erklärt die Beobachtungen, wonach hohe LIF-Spiegel in uterinen Spülflüssigkeiten mit Infertilität assoziiert waren (97).

Diese völlig gegensätzlichen Untersuchungsergebnisse über die Konsequenz der uterinen LIF-Konzentration für die Implantationsprognose werden zum einen auf die Unterschiede in den Methoden der uterinen Spülung, zum anderen aber auf die verschiedenen Methoden des Proteinnachweises zurückgeführt (93, 97). Zusätzlich erklärt der Einfluss des Glykosylierungsgrades des LIF-Proteins auf seine quantitative Nachweisbarkeit durch ein ELISA-Kit die kontroversen Ergebnisse über uterine LIF-Konzentrationen und ihre Bedeutung, da unterschiedliche Assays zur Anwendung

kamen (93, 97). Auch kann der ELISA nicht zwischen den verschiedenen LIF-Isoformen unterscheiden, von denen zudem nicht alle in das uterine Sekret sezerniert werden und somit nicht in der Spülflüssigkeit nachzuweisen sind (61, 97). Diese Beobachtung deutet das diagnostische Problem des klinisch zuverlässig anwendbaren Nachweises einer suffizienten oder insuffizienten LIF-Produktion in utero an.

4.5 Schlussfolgerung

Obwohl die Arbeitsgruppe Giess bei nichtselektionierten Patientinnen mit Infertilität heterozygote LIF-Gen-Mutationen mit vermutlich negativen Auswirkungen auf die Expression und Bioverfügbarkeit des LIF-Proteins im Endometrium und damit auf den Implantationsvorgang signifikant häufiger als bei fertilen Kontrollprobandinnen fanden, konnte in der vorliegenden Arbeit keine Relation zwischen dem Auftreten von LIF-Gen-Mutationen zumindest in den beschriebenen Lokalisationen und dem Versagen der Implantation im Rahmen einer IVF/ICSI-Behandlung festgestellt werden. Bereits in der Studie von Giess und Mitarbeitern wurde klar, dass die klinische Bedeutung bestimmter heterozygoter LIF-Gen-Mutationen für den Implantationsvorgang nicht essentiell ist, da die Entstehung einer Schwangerschaft nicht immer gestört wurde. Vermutlich wird die heterozygote Mutation durch das funktionierende zweite Allel des LIF-Gens kompensiert und die resultierenden uterinen LIF-Proteinkonzentrationen reichen für eine Implantation unter den Bedingungen der ovariellen Stimulationsbehandlung aus. Zusätzlich könnte ein LIF-Mangel mit Implantationsversagen auf zahlreichen anderen Ursachen wie einer gestörten Funktion des LIF-Rezeptors, der Signaltransduktion oder regulatorische Defekte im Zytokinnetzwerk beruhen. Es ist unwahrscheinlich, dass der in der vorliegenden Studie entdeckte Polymorphismus eine Ursache für wiederholtes IVF/ICSI-Versagen aufgrund erfolgloser Implantation darstellt.

Diese Tatsache deutet darauf hin, dass neben dem LIF-Gen auch die Alteration anderer Gene für ein Implantationsversagen von Bedeutung sind und LIF in ausreichender und zyklischer Sekretion für die menschliche Implantation zwar einen von vielen wesentlichen am Implantationsvorgang beteiligten Faktoren darstellt, aber keine Schlüsselrolle für dessen physiologischen und pathologischen Ablauf spielt. Von Mutationen können Gene anderer Zytokine, die an der Steuerung der Implantation beteiligt sind, betroffen sein. LIF weist strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten mit anderen Zytokinen auf, die an denselben Rezeptorkomplex binden können, so dass auch

von ihnen eine Beteiligung am Implantationsvorgang angenommen werden kann (50, 66). Andere Zytokine könnten die für die Implantation entscheidende Funktion LIFs ersetzen (4). Eine alleinige Abhängigkeit der Implantation von dem Vorhandensein LIFs ist bereits durch den Nachweis der Pleiotropie und überlappenden Funktionen aller beteiligten Zytokine unwahrscheinlich. Somit handelt es sich um ein abgesichertes System, das die Fortpflanzung nicht von der Funktion eines einzelnen Genprodukts abhängig macht. Aber auch hormonelle und andere Funktionsstörungen können diese kritische Phase der menschlichen Reproduktion beeinträchtigen. Es liegt eine Fülle von Arbeiten vor, die Bausteine des komplexen Implantationsvorganges und seiner Regulation aufdecken und beweisen, dass es sich um einen multifaktoriellen Prozess handelt, in dem LIF vermutlich nur eine Teilfunktion hat. Das Überleben jeder Spezies ist an stabile Reproduktionsmechanismen gebunden. Zur Sicherung der Nachkommenschaft muss sich daher gerade der essentielle Vorgang der Implantation auf mehrere alternative, redundante Mechanismen stützen.

Ein anderer Grund für das fehlende Auffinden von LIF-Gen-Mutationen könnte auch in der Möglichkeit bestehen, dass für das Implantationsversagen der untersuchten Frauen mit fehlendem IVF/ICSI-Erfolg andere Funktionsstörungen ursächlich sind. Hierfür bieten sich einige Ansatzpunkte wie der Einfluss der jeweiligen Sterilitätsursache, des Alters der Patientinnen sowie der Behandlungsprozedur selbst auf den Implantationsvorgang.

Die PCR-SSCP-Analyse spielt als Screening-Methode zur Detektion von Mutationen im Rahmen von Diagnostik, Therapie und Prognose vieler genetisch bedingter Erkrankungen eine zentrale Rolle und ist zum Nachweis von Mutationen im LIF-Gen geeignet. Für das generelle Screening infertiler Frauen mit mehrfachem IVF/ICSI-Versagen auf LIF-Gen-Mutationen erscheint sie allerdings zum derzeitigen Zeitpunkt aufgrund der niedrigen Prävalenz von Mutationen im LIF-Gen im Zusammenhang mit Implantationsversagen auch unter Berücksichtigung des Zeit- und Kostenaufwandes und der niedrigen Spezifität in Relation zu den noch fehlenden therapeutischen Konsequenzen nicht sinnvoll. Sollte eine LIF-Substitution in Zukunft möglich werden, wäre das Screening eine zweckmäßig Methode zur Identifikation jener infertilen Frauen, die aufgrund ihrer LIF-Gen-Mutation von der Substitution des LIF-Proteins profitieren könnten.

5. Zusammenfassung

Der Vorgang der Implantation gilt als entscheidende Phase für die erfolgreiche Entstehung einer Schwangerschaft. Das Implantationsversagen stellt die häufigste Ursache für den Misserfolg der menschlichen Reproduktion dar und spielt wahrscheinlich eine bedeutende Rolle bei wiederholt erfolgloser assistierter Reproduktion (IVF/ICSI und ET). Als Ursache für eine erfolglose Implantation werden zu einem Drittel embryonale Defekte, zu zwei Dritteln eine inadäquate endometriale Rezeptivität oder eine gestörte Kommunikation zwischen Embryo und Endometrium verantwortlich gemacht. Als Grundlage werden genetische Veränderungen vermutet.

Die hormonell eingeleitete Regulation der Implantation beinhaltet eine komplexe Folge von Signalen zwischen Embryo und Endometrium, deren regelrechter Ablauf für die erfolgreiche Einrichtung einer Schwangerschaft entscheidend ist. Eine Fülle von Faktoren wie Zytokine und Wachstumsfaktoren spielen hier eine bedeutende Rolle. Unter diesen Mediatoren ist auch Leukaemia Inhibitory Factor (LIF), ein Glykoprotein mit einer Vielzahl von Funktionen in verschiedenen Organsystemen, am Implantationsvorgang beteiligt. Dafür sprechen Ergebnisse aus Tierversuchen und die Auswirkungen des Zytokins in Abhängigkeit von der Zielzelle auf deren Proliferation und Differenzierung, Vorgänge, die sich auch bei der Entwicklung und Implantation der Blastozyste abspielen. Bei weiblichen Mäusen mit einer homozygoten Inaktivierung des LIF-Gens bleibt nach erfolgreicher Befruchtung ihrer Oozyten die Implantation aus, obwohl ihre Blastozysten lebensfähig sind. Die mütterliche LIF-Produktion ist also essentiell für eine erfolgreiche Schwangerschaft bei Mäusen.

Für die Beteiligung LIFs an der Kontrolle des Implantationsvorgangs auch beim Menschen gibt es eine Reihe von Hinweisen. Das LIF-Protein wird im menschlichen Endometrium zyklusabhängig mit einem Maximum zum Zeitpunkt der Implantation produziert. Menschliche Blastozysten exprimieren zum Zeitpunkt der Implantation mRNA für LIF-Rezeptoren, so dass sie als Ziel der Zytokinwirkung gelten.

Ein Mangel an LIF könnte im Zusammenhang mit einigen Formen von Infertilität stehen. In uteriner Spülflüssigkeit idiopathisch infertiler Frauen wurden reduzierte LIF-Konzentrationen nachgewiesen, endometriale Zellen infertiler Frauen, insbesondere von Frauen mit wiederholtem Implantationsversagen, sezernierten signifikant weniger LIF als die fertiler Frauen. Als Grundlage diese Veränderungen werden Mutationen im LIF-

Gen vermutet, die zu reduzierter endometrialer Produktion oder verminderter biologischer Aktivität des Zytokins führen und eine gestörte Implantation der Blastozyste im menschlichen Endometrium zur Folge haben. Im Vorfeld konnte bereits eine signifikant erhöhte Prävalenz von heterozygoten Mutationen in kodierenden Regionen des menschlichen LIF-Gens in einer Population von Frauen mit unterschiedlichen Infertilitätsursachen nachgewiesen werden (55).

Bislang liegen nur unzureichende Daten zur Prävalenz von Mutationen im LIF-Gen als mögliche Ursache für ein Implantationsversagen vor. Ihre klinische Bedeutung für die Therapie bei Frauen mit wiederholtem Implantationsversagen im Rahmen einer IVF/ICSI-Behandlung ist noch unklar. Der Nachweis von Mutationen im LIF-Gen könnte einerseits diagnostisch zur Beurteilung der endometrialen Rezeptivität und der Prognose eines IVF/ICSI-Behandlungsversuches genutzt werden. Andererseits hätte der Nachweis eines LIF-Mangels auf dem Boden einer LIF-Gen-Mutation auch therapeutische Konsequenzen, wenn in Zukunft die Substitution LIFs möglich wäre.

Ziel dieser Arbeit war es, die Häufigkeit und Art der Mutationen im LIF-Gen bei Frauen mit wiederholt erfolgloser IVF/ICSI-Behandlung zu untersuchen, um ihre Bedeutung für das Implantationsversagen bei der assistierten Reproduktion beurteilen zu können, und zu prüfen, ob der Einsatz eines geeigneten Screeningverfahrens auf LIF-Gen-Mutationen bei diesen Patientinnen sinnvoll erscheint.

Mit Hilfe des von Giess und Mitarbeitern entwickelten Verfahrens wurden 50 Patientinnen mit wiederholtem IVF/ICSI-Versagen und 105 fertile Frauen als Kontrollgruppe auf das Vorliegen von Mutationen in kodierenden und regulatorischen Abschnitten des LIF-Gens untersucht (55). Zum Screening auf Basensubstitutionen im LIF-Gen dienten die standardisierte DNA-Extraktion, deren Amplifikation durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) und die Single-Strand Conformation Polymorphism-Analyse (SSCP). Zeigte sich bei der SSCP-Analyse ein abnormes Laufverhalten in den Elektrophoresebanden, erfolgte anschließend die Sequenzierung des DNA-Abschnittes zur Bestätigung und Identifizierung der genetischen Alteration als Mutation oder Polymorphismus.

Eine Patientin wies im Exon 3 des LIF-Gens eine heterozygote Transversion (G3453T) auf, welche die Struktur und Funktion des LIF-Proteins jedoch nicht beeinflusst, so dass es sich nicht um eine Mutation, sondern um einen funktionell unbedeutenden

Polymorphismus handelt. In einem Fall der Kontrollgruppe fand sich ebenfalls ein Polymorphismus ohne Auswirkung auf die Aminosäuresequenz des LIF-Proteins, eine Transition (C3235T) im Intron zwischen Exon 2 und 3. Mutationen mit Auswirkungen auf das Expressionsniveau oder die Bioaktivität LIFs konnten nicht aufgedeckt werden. Im Gegensatz zur erhöhten Prävalenz biologisch relevanter LIF-Gen-Mutationen in einem Kollektiv von Frauen mit Infertilität unterschiedlicher Ursache ist die Mutationsrate bei Frauen mit wiederholtem Implantationsversagen nach IVF/ICSI-Therapie demnach sehr niedrig und gegenüber fertilen Frauen nicht signifikant erhöht. Damit stehen die Resultate dieser Arbeit im Einklang mit Ergebnissen früherer Studien, wonach LIF beim Menschen zwar eine wichtige Teilfunktion bei der Steuerung des komplexen Implantationsvorganges einnimmt, aber nicht essentiell für seinen Erfolg ist. Aufgrund der niedrigen Prävalenz funktioneller Mutationen im LIF-Gen bei Frauen mit wiederholtem Implantationsversagen nach einer IFV/ICSI-Behandlung erscheint ein Screening der betroffenen Patientinnen als Routinemaßnahme zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken nicht gerechtfertigt.

6. Literaturverzeichnis

1. Abe E, Tanaka H, Ishimi Y, Migama C, Hayashi T, Nagasawa H, Tomida M, Yamaguchi Y, Hozumi M, Suda T: Differentiation-inducing factor purified from conditioned medium of mitogen-treated spleen cell cultures stimulates bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83: 5958-5962
2. Ainsworth PJ, Surh LC, Coulter-Mackie MB: Diagnostic single strand conformational polymorphism (SSCP): a simplified non-radioisotopic method as applied to a Tay-Sachs B1 variant. *Nucl Acids Res*. 1991; 19: 405-406
3. Anegon I, Cuturi MC, Godard A, Moreau M, Terqui M, Martinat-Botte F, Soulillou JP: Presence of leukaemia inhibitory factor and interleukin 6 in porcine uterine secretions prior to conceptus attachment. *Cytokine*. 1994; 6: 493-499
4. Arici A, Engin O, Attar E, Olive DL: Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995; 80: 1908-1915
5. Arici A, Oral E, Bahtiyar O, Engin O, Seli E, Jones EE: Leukaemia inhibitory factor expression in human follicular fluid and ovarian cells. *Hum Reprod*. 1997; 12: 1233-1239
6. Auernhammer CJ, Melmed S: Leukemia-inhibitory factor-neuroimmune modulator of endocrine function. *Endocr Rev*. 2000; 21: 313-345
7. Bachmann KD, Beier HM, Diedrich K, Engel W, Hepp H, Honecker M, Nieschlag E, Reiter J, Schill WB, Weidner W, Wollersheim U, Wuermeling HB, Felberbaum R, Hutzler D: Richtlinien zur Durchführung der assistierten Reproduktion. *Dtsch Arztebl*. 1998; 95: A3166-3171
8. Bamberger AM, Jenatschke S, Erdman I, Schulte HM: Progesterin dependent stimulation of the human leukemia inhibitory factor promoter in SKUT-1B uterine tumor cells. *J Reprod Immunol*. 1997; 33: 189-201
9. Barasch J, Yang J, Ware CB, Taga T, Yoshida K, Erdjument-Bromia H, Tempst P, Parravicini E, Malach S, Aranoff T, Oliver JA: Mesenchymal to epithelial conversion in rat metanephros is induced by LIF. *Cell*. 1999; 99: 377-386
10. Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM: Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 1991; 196:80-83
11. Baumann H, Wong GG: Hepatocyte-stimulating factor III shares structural and functional identity with leukemia-inhibitory factor. *J Immunol*. 1989; 143: 1163-1167
12. Beier HM, Beier-Hellwig K, Sterzik K: The implantation receptive luteal phase of the endometrium. On the current status of molecular and cell biology research. *Zentralbl Gynakol*. 2001; 123: 319-127
13. Ben-Shlomo A, Miklovsy I, Ren SG, Yong WH, Heaney AP, Culler MD, Melmed S: Leukemia inhibitory factor regulates prolactin secretion in prolactinoma and lactotroph cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88: 858-863

14. Bergh PA, Navot D: The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation.
Fertil Steril. 1992; 58: 537-542
15. Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL: Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation.
Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88: 11408-11412
16. Bischof P, Haenggeli L, Campana A: Effect of leukaemia inhibitory factor on human cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway.
Am J Reprod Immunol. 1995; 34: 225-230
17. Bischof P: Endocrine, paracrine and autocrine regulation of trophoblastic metalloproteinases.
Early Pregnancy. 2001; 5: 30-31
18. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE: Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years.
BMJ. 1992; 305: 609-613
19. Cavagna M, Mantese JC: Biomarkers of endometrial receptivity – a review.
Placenta. 2003; 24: S39-247
20. Chaouat G, Menu E, Delage G, Moreau JF, Khrishnan L, Hui L, Meh AA, Martal J, Raghupathy R, Lelaidier C, et al.: Immune-endocrine interactions in early pregnancy.
Hum Reprod. 1995; 10 Suppl 2: 55-59
21. Charnock-Jones DS, Sharkey A, Fenwick P, Smith SK: Leukaemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at this time.
J Reprod Fertil. 1994; 101: 421-426
22. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Jagers DC, Yoo HJ, Heap RB, Smith SK: In-vivo gene transfer to the uterine endometrium.
Hum Reprod. 1997; 12: 17-20
23. Chen DB, Hilsenrath R, Yang ZM, Le SP, Kim SR, Chuong CJ, Poindexter III AN, Harper MJK: Leukaemia inhibitory factor in human endometrium during the menstrual cycle: cellular origin and action on production of glandular epithelial cell prostaglandin in vitro.
Hum Reprod. 1995; 10: 911-918
24. Chen HF, Shew JY, Ho HN, Hsu WL, Yang YS: Expression of leukemia inhibitory factor and its receptor in preimplantation embryos.
Fertil Steril. 1999; 72: 713-719
25. Chen JR, Cheng JG, Shatzer T, Sewell L, Hernandez L, Stewart CL: Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis.
Endocrinology. 2000; 141: 4365-4372
26. Cheng JG, Chen JR, Hernandez L, Alvord WG, Stewart CL: Dual control of LIF expression and LIF receptor function regulate Stat3 activation at the onset of uterine receptivity and embryo implantation.
PNAS. 2001; 98: 8680-8685
27. Clark DA: Is there any evidence for immunologically mediated or immunologically modifiable early pregnancy failure?
J Assist Reprod. Genet. 2003; 20: 63-72

28. Conquet F, Brulet P: Developmental expression of myeloid leukemia inhibitory factor gene in preimplantation blastocysts and in extraembryonic tissue of mouse embryos. *Mol Cell Biol.* 1990; 10: 3801-3805
29. Conquet F, Peyrieras N, Tiret L, Brulet P: Inhibited gastrulation in mouse embryos overexpressing the leukemia inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89: 8195-8199
30. Coskun S, Uzumcu M, Jaroudi K, Hollanders JMG, Parhar RS, Al-Sedairy ST: Presence of leukemia inhibitory factor and interleukin-12 in human follicular fluid during follicular growth. *Am J Reprod Immunol.* 1998; 40: 13-18
31. Cotton RGH: Current methods of mutation detection. *Mutat Res.* 1993; 285: 125-144
32. Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey BA, Stewart CL: Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 3115-3120
33. Das C, Kumar VS, Gupta S, Kumar S: Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells. *J Reprod Immunol.* 2002; 53: 257-268
34. Dazai S, Akita S, Hirano A, Rashid MA, Naito S, Akino K, Fujii T: Leukemia inhibitory factor enhances bone formation in calvarial bone defect. *J Craniofac Surg.* 2000; 11: 513-520
35. Delage G, Moreau JF, Taupin JL, Freitas S, Hambartsoumian E, Olivennes F, Fanchin R, Letur-Konirsch H, Frydman R, Chaouat G: In-vitro endometrial secretion of human interleukin for DA cells/leukaemia inhibitory factor by explant cultures from fertile and infertile women. *Hum Reprod.* 1995; 10: 2483-2488
36. De la Rochebrochard E, McElreavey K, Thonneau P: Paternal age over 40 years: The “amber light” in the reproductive life of men? *J Androl.* 2003; 24: 459-465
37. De Vos A, Van De Velde H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A: Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2003; 79: 42-48
38. Dimitriadis E, Salamonsen LA, Robb L: Expression of interleukin-11 during the human menstrual cycle: coincidence with stromal cell decidualization and relationship to leukaemia inhibitory factor and prolactin. *Mol Hum Reprod.* 2000; 6: 907-914
39. Dockhorn-Dworniczak B, Dworniczak B, Brommelkamp L, Bulles J, Horst J, Bocker WW: Non-isotopic detection of single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP): a rapid and sensitive technique in diagnosis of phenylketonuria. *Nucl Acids Res.* 1991; 19: 2500
40. Dominguez F, Remohi J, Pellicer A, Simon C: Human endometrial receptivity: a genomic approach. *Reprod Biomed Online.* 2003; 6: 332-338
41. Dunglison GF, Barlow DH, Sargent IL: Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium. *Hum Reprod.* 1996; 11: 191-196

42. Edwards RG: Implantation, interception and contraception.
Hum Reprod. 1994; 9: 985-995
43. El-Toukhy T, Khalaf Y, Al-Darazi K, O'Mahony F, Wharf E, Taylor A, Braude P: Cryo-thawed embryos obtained from conception cycles have double the implantation and pregnancy potential of those from unsuccessful cycles.
Hum Reprod. 2003; 18: 1313-1318
44. Escary JL, Perraeu J, Dumenil D, Ezine S, Brulet P: Leukaemia inhibitory factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells and thymocyte stimulation.
Nature. 1993; 363: 361-364
45. Evers JL: Female subfertility.
Lancet. 2002; 360: 151-159
46. Felberbaum RE, Küpker W, Diedrich K: Methoden der assistierten Reproduktion werden sicherer.
Dtsch Arztebl. 2004; 101: A95-100
47. Fry RC, Batt PA, Fairclough RJ, Parr RA: Human leukemia inhibitory factor improves the viability of cultured ovine embryos.
Biol Reprod. 1992; 46: 470-474
48. Gallinelli A, Roncaglia R, Matteo ML, Ciaccio I, Volpe A, Facchinetti F: Immunological changes and stress are associated with different implantation rates in patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer.
Fertil Steril. 2001; 76: 85-91
49. Gearing DP, Gough NM, King JA, Hilton DJ, Nicola NA, Simpson RJ, Nice EC, Kelso A, Metcalf D: Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF).
EMBO J. 1987; 6: 3995-4002
50. Gearing DP, Comeau MR, Friend DJ, Gimpel SD, Thut CJ, McGourty J, Brasher KK, King JA, Gillis S, Mosley B, Ziegler SF, Cosman D: The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor.
Science. 1992; 255: 1434-1437
51. Geis K, Dietl J: Die Rolle der Zytokine an der fetomaternalen Grenze.
Zentralbl Gynakol. 2001; 123: 609-618
52. Gelety TJ, Buyalos RP: The influence of supraphysiologic estradiol levels on human nidation.
J Assist Reprod Genet. 1995; 12: 406-412
53. Gemzell-Danielsson KG, Swahn ML, Bygdeman M: The effect of various doses of mifepristone on endometrial leukaemia inhibitory factor expression in the midluteal phase - an immunohistochemical study.
Human Reprod. 1997; 12: 1293-1297
54. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munne S: Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed.
Fertil Steril. 1999; 72: 837-844
55. Giess R, Tanasescu I, Steck T, Sendtner M: Leukaemia inhibitory factor gene mutations in infertile women.
Mol Hum Reprod. 1999; 5: 581-586

56. Gil-Salom M, Romero J, Rubio C, Ruiz A, Remohi J, Pellicer A: Intracytoplasmatic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa.
Mol Cell Endocrinol. 2000; 169: 15-19
57. Giudice LC: Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine.
Fertil Steril. 1994; 61: 1-17
58. Glavac D, Dean M: Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations.
Hum Mutat. 1993; 2: 404-414
59. Gough NM, Gearing DP, King JA, Willson TA, Hilton DJ, Nicola NA, Metcalf D: Molecular cloning and expression of the human homologue of the murine gene encoding myeloid leukemia-inhibitory factor.
Proc Natl Acad Sci USA. 1988; 85: 2623-2627
60. Gunawardana DH, Basser RL, Davis ID, Cebon J, Mitchell P, Underhill C, Kilpatrick TJ, Reardon K, Green MD, Bardy P, Amor P, Crump D, Ng S, Nation RL, Begley CG: A phase I study of recombinant human leukemia inhibitory factor in patients with advanced cancer.
Clin Cancer Res. 2003; 9: 2056-2065
61. Haines BP, Voyle RB, Rathjen PD: Intracellular and extracellular leukemia inhibitory factor proteins have different cellular activities that are mediated by distinct protein motifs.
Mol Biol Cell. 2000; 11: 1369-1383
62. Hambartsoumian E: Leukemia inhibitory factor (LIF) production by human decidua and its relationship with pregnancy hormones.
Gynecol Endocrinol. 1998; 12: 17-22
63. Hambartsoumian E: Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation.
Am J Reprod Immunol. 1998; 39: 137-143
64. Harvey MB, Leco KJ, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Edwards DR, Schultz GA: Roles of growth factors during peri-implantation development.
Mol Hum Reprod. 1995; 10: 712-718
65. Hayashi K, Yandell DW: How sensitive is PCR-SSCP?
Hum Mutat. 1993; 3: 338-346
66. Heath JK: Cytokines. Can there be life without LIF?
Nature. 1992; 359: 17
67. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F: Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation.
Biochem J. 2003; 374: 1-20
68. Herrler A, von Rango U, Beier HM: Embryo-maternal signalling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation.
Reprod Biomed Online. 2003; 6: 244-256
69. Hilton DJ, Nicola NA, Metcalf D: Specific binding of murine leukemia inhibitory factor to normal and leukemic monocytic cells.
Proc Natl Acad Sci USA. 1988; 85: 5971-5975
70. Hilton DJ, Gough NM: Leukemia inhibitory factor: a biological perspective.
J Cell Biochem. 1991; 46: 21-26

71. Hilton DJ, Nicola NA, Waring PM, Metcalf D: Clearance and fate of leukemia-inhibitory factor (LIF) after injection into mice.
J Cell Physiol. 1991; 148: 430-439
72. Hilton DJ: LIF: lots of interesting functions.
Trends Biochem Sci. 1992; 17: 72-76
73. Hilton DJ, Nicola NA, Metcalf D: Distribution and binding properties of receptors for leukaemia inhibitory factor.
Ciba Found Symp. 1992; 167: 227-239
74. Hirobe T: Role of leukemia inhibitory factor in the regulation of the proliferation and differentiation of neonatal mouse epidermal melanocytes in culture.
J Cell Physiol. 2002; 192: 315-326
75. Hsieh YY, Lin CS, Sun YL, Chang CC, Tsai HD, Wu JC: In vivo gene transfer of leukemia inhibitory factor (LIF) into mouse endometrium.
J Assist Reprod Genet. 2002; 19: 79-83
76. Hu J, Ono S, Katayama H, Imai T, Shimizu N, Nakagawa H: Leukemia inhibitory factor induces epidermal hyperplasia in patients with amyotrophic lateral sclerosis.
J Invest Dermatol. 2000; 115: 486-492
77. Imoedemhe DA, Sigue AB, Pacpaco EL, Olazo AB, Luciano EC: A comparative analysis of embryos derived from routine in-vitro fertilization and subzonal microinsemination.
Hum Reprod. 1995; 10: 2970-2975
78. Jansen RP: The effect of female age on the likelihood of a live birth from one in-vitro fertilisation treatment.
Med J Aust. 2003; 178: 258-261
79. Jordanova A, Kalaydjieva L, Savov A, Claustres M, Schwarz M, Estivill X, Angelicheva D, Haworth A, Casals T, Kremensky I: SSCP analysis: a blind sensitivity trial.
Hum Mutat. 1997; 10: 65-70
80. Jurisicova A, Ben-Chetrit A, Varmuza SL, Casper RF: Recombinant human leukemia inhibitory factor does not enhance in vitro human blastocyst formation.
Fertil Steril. 1995; 64: 999-1002
81. Kao LC, Germeyer A, Tulac S, Lobo S, Yang JP, Taylor RN, Osteen K, Lessey BA, Giudice LC: Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility.
Endocrinology. 2003; 144: 2870-2881
82. Karaki RZ, Samarraie SS, Younis NA, Lahloub TM, Ibrahim MH: Blastocyst culture and transfer: a step toward improved in vitro fertilization outcome.
Fertil Steril. 2002; 77: 114-118
83. Katano K, Matsumoto Y, Ogasawara M, Aoyama T, Ozaki Y, Kajiura S, Aoki K: Low serum M-CSF levels are associated with unexplained recurrent abortion.
Am J Reprod Immunol. 1997; 38: 1-5
84. Kauma SW, Matt DW: Coculture cells that express leukemia inhibitory factor (LIF) enhance mouse blastocyst development in vitro.
J Assist Reprod Genet. 1995; 12: 153-156

85. Keltz MD, Attar E, Buradagunta S, Olive DL, Kliman HJ, Arici A: Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in the human fallopian tube. *Am J Obstet Gynecol.* 1996; 175: 1611-1619
86. Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Inoue T, Horie K, Nakayama H, Fujita J, Mori T: Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta. *Biol Reprod.* 1994; 50: 882-887
87. Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Narukawa S, Higuchi T, Kaneko Y, Mori T, Fujita J: Expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) receptor in human placenta: A possible role for LIF in the growth and differentiation of trophoblasts. *Hum Reprod.* 1995; 10:1907-1911
88. Koopman P, Cotton RG: A factor produced by feeder cells which inhibits embryonal carcinoma cell differentiation. Characterization and partial purification. *Exp Cell Res.* 1984; 154: 233-242
89. Kopf M, Baumann H, Feer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Kohler G: Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature.* 1994; 368: 339-342
90. Korn SH, Moerkerk PTM, de Goeij AFPM: K-ras point mutations in routinely processed tissues: Non-radioactive screening by single strand conformational polymorphism analysis. *J Clin Pathol.* 1993; 46: 621-623
91. Kourkine IV, Hestekin CN, Buchholz BA, Barron AE: High-throughput, high-sensitivity genetic mutation detection by tandem single-strand conformation polymorphism/heteroduplex analysis capillary array electrophoresis. *Anal Chem.* 2002; 74: 2565-2572
92. Kurek JB, Radford AJ, Crump DE, Bower JJ, Feeny SJ, Austin L, Byrne E: LIF (AM424), a promising growth factor for the treatment of ALS. *J Neurol Sci.* 1998; 160 Suppl. 1: S106-113
93. Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, Dunphy BC, Li TC, Zhang X: The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: Presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum Reprod.* 1997; 12: 569-574
94. Lala PK, Graham CH: Mechanisms of trophoblast invasiveness and their control: The role of proteases and protease inhibitors. *Cancer Metast Rev.* 1990; 9: 369-379
95. Lass A, Weiser W, Munafo A, Loumaye E: Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Fertil Steril.* 2001; 76: 1091-1096
96. Ledee-Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin JL, Dubanchet S, Taieb J, Moreau JF, Chaouat G: Follicular fluid concentration of leukaemia inhibitory factor is decreased among women with polycystic ovarian syndrome during assisted reproduction cycles. *Hum Reprod.* 2001; 16: 2073-2078
97. Ledee-Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin JL, Dubanchet S, Frydman R, Chaouat G: Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Hum Reprod.* 2002; 17: 213-218
98. Lindhard A, Bentin-Ley U, Ravn V, Islin H, Hviid T, Rex S, Bangsboll S, Sorensen S: Biochemical evaluation of endometrial function at the time of implantation. *Fertil Steril.* 2002; 78: 221-233

99. Liu CQ, Yuan Y, Wang ZX: Effects of leukaemia inhibitory factor on endometrial receptivity and its hormonal regulation in rabbits.
Cell Biol Intern. 2001; 25: 1029-1032
100. Ma WG, Song H, Das SK, Paria BC, Dey SK: Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation.
Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100: 2963-2968
101. Machtinger R, Dor J, Levron J, Mashiach S, Levran D, Seidmann DS: The effect of prolonged cryopreservation on embryo survival.
Gynecol Endocrinol. 2002; 16: 293-298
102. Masu Y, Wolf E, Holtmann B, Sendtner M, Brem G, Thoenen H: Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration.
Nature. 1993; 365: 27-32
103. Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, Nishikawa S, Williams D, Zsebo K, Hogan BL: Effect of Steel factor and leukaemia inhibitor factor on murine primordial germ cells in culture.
Nature. 1991; 353: 750-752
104. Matzuk MM, Lamb DJ: Genetic dissection of mammalian fertility pathways.
Nat Cell Biol. 2002; 4 Suppl.: s41-49
105. Mauduit C, Goddard I, Besset V, Tabone E, Rey C, Gasnier F, Dacheux F, Benahmed M: Leukemia inhibitory factor antagonizes gonadotropin induced-testosterone synthesis in cultured porcine leydig cells: sites of action.
Endocrinology. 2001; 142: 2509-2520
106. Maxam AM, Gilbert W: Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical cleavages.
Methods Enzymol. 1980; 65: 499-560
107. Metcalf D, Gearing DP: Fatal syndrome in mice engrafted with cells producing high levels of the leukemia inhibitory factor.
Proc Natl Acad Sci USA. 1989; 86: 5948-5952
108. Metcalf D: Leukemia inhibitory factor – a puzzling polyfunctional regulator.
Growth Fact. 1992; 7: 169-173
109. Metcalf D: The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor.
Stem Cells. 2003; 21: 5-14
110. Mikolajczyk M, Skrzypczak J, Szymanowski K, Wirstlein P: The assesment of LIF in uterine flushing – a possible new diagnostic tool in states of impaired fertility.
Reprod Biol. 2003; 3: 259-270
111. Miller JF, Williamson E, Glue J, Gordon J, Gordon YB, Grudzinskas JG, Sykes A: Fetal losses of implantation. A prospective study.
Lancet. 1980; 2: 554-556
112. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.
Nucl Acids Res. 1988; 16:1215
113. Mitterski B, Kruger R, Wintermeyer P, Epplen JT: PCR/SSCP detects reliably and efficiently DNA sequence variations an large scale screening projects.
Comb Chem High Throughput Screen. 2000; 3: 211-218

114. Moreau JF, Donaldson DD, Bennett F, Witek-Giannotti J, Clark SC, Wong GG: Leukaemia inhibitory factor is identical to the myeloid growth factor human interleukin for DA cells. *Nature*. 1988; 336: 690-692
115. Mori M, Yamaguchi K, Abe K: Purification of lipoprotein lipase-inhibiting protein produced by a melanoma cell line associated with cancer cachexia. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 160: 1085-1092
116. Multigner L, Oliva A: Secular variations in sperm quality: fact or science fiction? *Cad Saude Publica*. 2002; 18: 403-412
117. Munne S: Preimplantation genetic diagnosis of numerical and structural chromosome abnormalities. *Reprod Biomed Online*. 2002; 4: 183-196
118. Murata M, Fukuda K, Ishida H, Miyoshi S, Koura T, Kodama H, Nakazawa HK, Ogawa S: Leukemia inhibitory factor, a potent cardiac hypertrophic cytokine, enhances L-type Ca^{2+} current and $[Ca^{2+}]_i$ transient in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 1999; 31: 237-245
119. Murphy M, Reid K, Hilton DJ, Bartlett PF: Generation of sensory neurons is stimulated by leukemia inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 3498-3501
120. Nachtigall MJ, Kliman HJ, Feinberg RF, Olive DL, Engin O, Arici A: The effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on trophoblast differentiation: a potential role in human implantation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81: 801-806
121. Nilsson EE, Kezele P, Skinner MK: Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol Cell Endocrinol*. 2002; 188: 65-73
122. Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ: Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med*. 2001; 345: 1400-1408
123. Noumi T, Mosher ME, Natori S, Futai M, Kanazawa H: A phenylalanine for serine substitution in the β subunit of escherichia coli F_1 -ATPase affects dependence of its activity on divalent cations. *J Biol Chem*. 1984; 259: 10071-10075
124. Noyes RW, Hertig AT, Rock J: Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol*. 1975; 122: 262-263
125. Oehninger S, Mayer J, Muasher S: Impact of different clinical variables on pregnancy outcome following embryo cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol*. 2000; 169: 73-77
126. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*. 1989; 5: 874-879
127. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86: 2766-2770
128. Owczarek CM, Layton MJ, Robb LG, Nicola NA, Begley CG: Molecular basis of the soluble and membrane-bound forms of the murine leukemia inhibitory factor receptor-chain. Expression in normal, gestating, and leukemia inhibitory factor nullizygous mice. *J Biol Chem*. 1996; 271: 5495-5504

129. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte.
Lancet. 1992; 340: 17-18
130. Pennica D, Shaw KJ, Swanson TA, Moore MW, Shelton DL, Zioncheck KA, Rosenthal A, Taga T, Paoni NF, Wood WI: Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex.
J Biol Chem. 1995; 270: 10915-10922
131. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R: Leukaemia inhibitory factor (LIF) inhibits angiogenesis in vitro.
J Cell Sci. 1995; 108: 73-83
132. Phillipson GT, Petrucco OM, Matthews CD: Congenital bilateral absence of the vas deferens, cystic fibrosis mutation analysis and intracytoplasmic sperm injection.
Hum Reprod. 2000; 15: 431-435
133. Piccinni MP, Maggi E, Romagnani S: Role of hormone-controlled T-cell cytokines in the maintenance of pregnancy.
Biochem Soc Trans. 2000; 28: 212-215
134. Piquet-Pellorce C, Grey L, Mereau A, Heath JK: Are LIF and related cytokines functionally equivalent?
Exp Cell Res. 1994; 213: 340-347
135. Plun-Favreau H, Perret D, Diveu C, Froger J, Chevalier S, Lelievre E, Gascan H, Chabbert M: Leukemia inhibitory factor (LIF), cardiotrophin-1, and oncostatin M share structural binding determinants in the immunoglobulin-like domain of LIF receptor.
J Biol Chem. 2003; 278: 27169-27179
136. Reese J, Das SK, Paria BC, Lim H, Song H, Matsumoto H, Knudtson KL, DuBois RN, Dey SK: Global gene expression analysis to identify molecular markers of uterine receptivity and embryo implantation.
J Biol Chem. 2001; 276: 44137-44145
137. Robinson RC, Grey LM, Staunton D, Vankelecom H, Vernallis AB, Moreau JF, Stuart DI, Heath JK, Jones EY: The crystal structure and biological function of leukemia inhibitory factor: implications for receptor binding.
Cell. 1994; 77:1101-1116
138. Rubio C, Gil-Salom M, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Minguez Y, Remohi J, Pellicer A: Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome.
Hum Reprod. 2001; 16: 2084-2092
139. Sachdeva G, Patil V, Katkam RR, Manjramkar DD, Kholkute SD, Puri CP: Expression profiles of endometrial leukemia inhibitory factor, transforming growth factor β 2 (TGF β 2), and TGF β 2 Receptor in infertile bonnet monkeys.
Biol Reprod. 2001; 65: 1-8
140. Saiki RK, Sharf SJ, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.
Science. 1985; 230: 1350-1354
141. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Sharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science. 1988; 239: 487-491

142. Saito S, Saito M, Enomoto M, Ito A, Motoyoshi K, Nakagawa T, Ichijo M: Human macrophage colony-stimulating factor induces the differentiation of trophoblast. *Growth Factors*. 1993; 9: 11-19
143. Salamonsen LA, Dimitriadis E, Robb L: Cytokines in implantation. *Semin Reprod Med*. 2000 ; 18: 299-310
144. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Commonly used techniques in molecular cloning. In: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; E.3-E.14, 5.50, 6.3-6.21, 6.36-6.38, 6.49, 13.3-13.15, 13.42, 14.2-14.22, 18.47
145. Sanchez-Cuenca J, Martin JC, Pellicer A, Simon C: Cytokine pleiotropy and redundancy – gp130 cytokines in human implantation. *Trends Immun Today*. 1999; 20: 57-59
146. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977; 74: 5463-5467
147. Sariola H: The neurotrophic factors in non-neuronal tissues. *Cell Mol Life Sci*. 2001; 58: 1061-1066
148. Sarkar G, Yoon HS, Sommer SS: Screening for mutations by RNA single stranded conformation polymorphism (rSSCP): comparison with DNA-SSCP. *Nucl Acids Res*. 1992; 20: 871-878
149. Sauer MV, Paulsen RJ, Ary BA, Lobo RA: Three hundred cycles of oocyte donation at the University of Southern California: assessing the effect of age and infertility diagnosis on pregnancy and implantation rates. *J Assist Reprod Genet*. 1994; 11: 92-96
150. Sawai K, Matsuzaki N, Kameda T, Hashimoto K, Okada T, Shimoya K, Nobunaga T, Taga T, Kishimoto T, Saji F: Leukemia inhibitory factor produced at the fetomaternal interface stimulates chorionic gonadotropin production: its possible implication during pregnancy, including implantation period. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995; 80: 1449-1456
151. Sawai K, Matsuzaki N, Okada T, Shimoya K, Koyama M, Azuma C, Saji F, Murata Y: Human decidual cell biosynthesis of leukemia inhibitory factor: regulation by decidual cytokines and steroid hormones. *Biol Reprod*. 1997; 56: 1274-1280
152. Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B: The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod*. 2000; 15: 2394-2403
153. Selam B, Arici A: Implantation defect in endometriosis: endometrium and peritoneal fluid. *J Reprod Fertil*. 2000; suppl. 55: 121-128
154. Senturk LM, Arici A: Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Am J Reprod Immunol*. 1998; 39: 144-151
155. Sharkey AM, King A, Clark DE, Burrows TD, Jokhi PP, Charnock-Jones DS, Loke YW, Smith SK: Localization of leukemia inhibitory factor and its receptor in human placenta throughout pregnancy. *Biol Reprod*. 1999; 60: 355-364

156. Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM: The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*. 1993; 16: 325-332
157. Sherwin JR, Smith SK, Wilson A, Sharkey AM: Soluble gp130 is up-regulated in the implantation window and shows altered secretion in patients with primary unexplained infertility. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87: 3953-3960
158. Simon C, Frances A, Piquette GN, el Danasouri I, Zurawski G, Dang W, Polan ML: Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrinology*. 1994; 134: 521-528
159. Simon C, Moreno C, Remohi J, Pellicer A: Cytokines and embryo implantation. *J Reprod Immunol*. 1998; 39: 117-131
160. Simon C, Pellicer A: Blastocyst transfer for couples with multiple IVF failures? *Fertil Steril*. 2000; 73: 872
161. Simpson JL, Lamb DJ: Genetic effects of intracytoplasmic sperm injection. *Semin Reprod Med*. 2001; 19: 239-249
162. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D: Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*. 1988; 336: 688-690
163. Smith SK, Charnock-Jones DS, Sharkey AM: The role of leukaemia inhibitory factor and interleukin-6 in human reproduction. *Hum Reprod*. 1998; 13Suppl3: 237-243
164. Spandorfer SD, Chung PH, Kligman I, Liu HC, Davis OK, Rosenwaks Z: An analysis of the effect of age on implantation rates. *J Assist Reprod Genet*. 2000; 17: 303-306
165. Spinardi L, Mazars R, Theillet C: Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucl Acids Res*. 1991; 19: 4009-4011
166. Stahl J, Gearing DP, Willson TA, Brown MA, King JA, Gough NM: Structural organization of the genes for murine and human leukemia inhibitory factor. Evolutionary conservation of coding and non-coding regions. *J Biol Chem*. 1990; 265: 8833-8841
167. Steck T, Giess R, Suetterlin MW, Bolland M, Wiest S, Poehls UG, Dietl J: Leukaemia inhibitory factor (LIF) gene mutations in women with unexplained infertility and recurrent failure of implantation after IVF and embryo transfer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004; 112: 69-73
168. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ: Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature*. 1992; 359: 76-79
169. Streptoe PC, Edwards RG: Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 1978; 2: 366
170. Suetterlin MW, Bolland M, Giess R, Sendtner M, Dietl J, Steck T: Leukaemia inhibitory factor (LIF) gene mutations in unexplained infertility. *Abstract Book 1, ESHRE 17th Annual Meeting*, 2001; 16: 187

171. Sugano K, Kyogoku A, Fukayama N, Ohkura H, Shimosato Y, Sekiya T, Hayashi K: Rapid and simple detection of c-Ki-ras2 gene codon 12 mutations by nonradioisotopic single-strand conformation polymorphism analysis.
Lab Investig. 1993; 68: 361-366
172. Sutherland GR, Baker E, Hyland VJ, Callen DF, Stahl J, Gough NM: The gene for human leukemia inhibitory factor (LIF) maps to 22q12.
Leukemia. 1989; 3: 9-13
173. Swan SH, Elkin EP, Fenster L: The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996.
Environ Health Perspect. 2000; 108: 961-966
174. Tabibzadeh SS, Satyaswaroop PG, Rao PN: Antiproliferative effect of interferon-gamma in human endometrial epithelial cells in vitro: potential local growth modulatory role in endometrium.
J Clin Endocrinol Metab. 1988; 67: 131-138
175. Tabibzadeh SS, Sun XZ: Cytokine expression in human endometrium throughout the menstrual cycle.
Hum Reprod. 1992; 7: 1214-1221
176. Tabibzadeh SS, Zupi E, Babaknia A, Liu R, Marconi D, Romanini C: Site and menstrual cycle-dependent expression of proteins of the tumour necrosis factor (TNF) receptor family, and BCL-2 oncoprotein and phase-specific production of TNF alpha in human endometrium.
Hum Reprod. 1995; 10: 277-286
177. Takabatake K, Fujiwara H, Goto Y, Nakayama T, Higuchi T, Fujita J, Maeda M, Mori T: Splenocytes in early pregnancy promote embryo implantation by regulating endometrial differentiation in mice.
Hum Reprod. 1997; 12: 2102-2107
178. Tavaniotou A, Smitz J, Bourgain C, Devroey P: Ovulation induction disrupts luteal phase function.
Ann NY Acad Sci. 2001; 943: 55-63
179. Terriou P, Sapin C, Giorgetti E, Hans E, Spach JL, Roulier R: Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age.
Fertil Steril. 2001; 75: 525-531
180. Tesarik J, Hazout A, Mendoza C: Luteinizing hormone affects uterine receptivity independently of ovarian function.
Reprod Biomed Online. 2003; 7: 59-64
181. Valbuena D, Jasper M, Remohi J, Pellicer A, Simon C: Ovarian stimulation and endometrial receptivity.
Hum Reprod. 1999; 14: 107-111
182. Van der Elst J, Van den Abbeel E, Camus M, Smitz J, Devroey P, Van Steirteghem A: Long-term evaluation of implantation of fresh and cryopreserved human embryos following ovarian stimulation with buserelin acetate-human menopausal gonadotrophin (HMG) or clomophene citrate-HMG.
Hum Reprod. 1996; 11: 2097-2106
183. Vayena E, Rowe PJ, Griffin PD: Medical, ethical and social aspects of assisted reproduction.
In: Vayena E, Rowe PJ, Griffin PD (Ed.): Current practices and controversies in assisted reproduction. Report of a WHO-Meeting, Genf, 2001
184. Vogiagis D, Marsh MM, Fry RC, Salamonsen LA: Leukaemia inhibitory factor in human endometrium throughout the menstrual cycle.
J Endocrinol. 1996; 148: 95-102

185. Vogiagis D, Salamonsen LA, Sandeman RM, Squires TJ, Butt AR, Fry RC: Effect of immunisation against leukaemia inhibitory factor on the establishment of pregnancy in sheep. *Reprod Nutr Dev.* 1997; 37: 459-468
186. Vogiagis D, Salamonsen LA: The role of leukaemia inhibitory factor in the establishment of pregnancy. *J Endocrinol.* 1999; 160: 181-190
187. Ware CB, Horowitz MC, Renshaw BR, Hunt JS, Liggitt D, Koblar SA, Gliniak BC, McKenna HJ, Papayannopoulou T, Thoma B, Cheng L, Donovan PJ, Peschon JJ, Bartlett PF, Willis CR, Wright BD, Carpenter MK, Davidson BL, Gearing DP: Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development.* 1995; 121: 1283-1299
188. Waring P, Wall D, Dauer R, Parkin D, Metcalf D: The effects of leukaemia inhibitory factor on platelet function. *Br J Haematol.* 1993; 83: 80-87
189. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM: Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature.* 1988; 336: 684-687
190. WHO/World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1992.
191. Yamamori T, Fukada K, Aebersold R, Korsching S, Fann MJ, Patterson PH: The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor. *Science.* 1989; 246: 1412-1416
192. Yang ZM, Chen DB, Le SP, Harper MJK: Differential hormonal regulation of leukemia inhibitory factor (LIF) in rabbit and mouse uterus. *Mol Reprod Dev.* 1996; 43: 470-476
193. Yap EPH, McGee JO: Nonisotopic SSCP detection in PCR products by ethidium bromide staining. *Trends Genet.* 1992; 8: 49
194. Yoshida K, Taga T, Saito M, Suematsu S, Kumanogoh A, Tanaka T, Fujiwara H, Hirata M, Yamagami T, Nakahata T, Hirabayashi T, Yoneda Y, Tanaka K, Wang WZ, Mori C, Shiota K, Yoshida N, Kishimoto T: Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 407-411
195. Yue ZP, Yang ZM, Wei P, Li SJ, Wang HB, Tan JH, Harper MJ: Leukemia inhibitory factor, leukemia inhibitory factor receptor, and glycoprotein 130 in rhesus monkey uterus during menstrual cycle and early pregnancy. *Biol Reprod.* 2000; 63: 508-512
196. Ziemssen F, Schnepf R, Pfeiffer A: Single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis in detection of point mutations: a technique and its limitations in the diagnostics of maturity onset diabetes in the young. *Med Klin.* 2001; 96: 515-520
197. Zollner U, Zollner KP, Dietl J, Steck T: Semen sample collection in medium enhances the implantation rate following ICSI in patients with severe oligoasthenoteratozoospermia. *Hum Reprod.* 2001; 16: 1110-1114

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
%C	Anteil an Quervernetzungen eines Gels
ca.	circa
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CNDF/CDF	Cholinergic Neuronal Differentiation Factor
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CSF	Colony Stimulating Factor
CT-1	Cardiotrophin-1
CTL	Cardiotrophin-like Cytokine
d	Dalton
dATP, ddATP	Desoxy-, Didesoxy-Adenosintriphosphat
dCTP, ddCTP	Desoxy-, Didesoxy-Cytidintriphosphat
dest.	destilliert
dGTP, ddGTP	Desoxy-, Didesoxy-Guanosintriphosphat
d.h.	das heißt
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DIA	Differentiation Inhibiting Activity
DIR	Deutsches IVF-Register
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP, ddNTP	Desoxy-, Didesoxy-Ribonukleosidtriphosphat
DRF	Differentiation Retarding Factor
ds	Doppelstrang
dTTP, ddTTP	Desoxy-, Didesoxy-Thymidintriphosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EGF	Epidermal Growth Factor
EIFT	Embryo intrafallopian transfer
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
ET	Embryotransfer
et al.	et alii
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
G	Guanin
GIFT	Gamete intrafallopian transfer
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
gp	Glykoprotein
HCG	Humanes Choriongonadotropin
het.	heterolog
HLA	Human leukocyte antigen
HILDA	Human Interleukin for DA Cells
HMG	Human-Menopausen-Gonadotropin
HSF-III	Hepatocyte-Stimulating Factor III
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IFN	Interferon
IGFBP	Insulin-like growth factor binding protein
IL	Interleukin
IUI	Intrauterine Insemination
IVF	In-vitro-Fertilisation
JAK	Januskinase
kb	Kilobasen
kd	Kilodalton
KET	Kryo-Embryotransfer
LH	Luteinisierendes Hormon
LIF	Leukaemia Inhibitory Factor
LIFR	LIF-Rezeptoreinheit niedriger Affinität
LJ	Lebensjahr
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
M-CSF	Monocyte-Macrophage CSF (CSF-1)

MESA	Microchirurgische epididymale Spermienaspiration
MHC	major histocompatibility complex
MLPLI	Melanocyte-derived Lipoprotein-Lipase Inhibitor
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	“messenger” RNA
mut	mutiert
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
OAT	Oligo-Asthenio-Teratozoospermie
OD	Optische Dichte
OH	Hydroxylgruppe
OSM	Oncostatin M
p	probability (Irrtumswahrscheinlichkeit)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	platelet-derived growth factor
pH	Wasserstoffionenkonzentration
PIAS	Protein inhibitors of activated STAT
PKC	Proteinkinase C
p.o.	post ovulationem
POMC	Proopiomelanocortin
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
rh	recombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
sgp130	soluble gp130
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
ss	single strand (Einzelstrang)
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism
STAT	Signal transducer and activator of transcription
T	Thymin
%T	Polyacrylamidanteil eines Gels

Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris/EDTA
TEMED	N´N´N´N´Tetramethylethylendiamin
TESE	Testikuläre Spermienextraktion
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSH	Thyreoideastimulierendes Hormon
TYK	Tyrosinkinase
UV	ultraviolettes Licht
WHO	World Health Organization
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZIFT	Zygote intrafallopian transfer

7.2 Reagenzien und Geräte

7.2.1 Hersteller

Amersham Pharmacia Biotech (Braunschweig)
Boehringer (Mannheim)
Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Eppendorf (Hamburg)
ETC (Elektrophorese-Technik) Corp. (Kirchentellinsfurt)
Gibco BRL[®], Life Technologies (Paisley, Schottland)
INTAS[®]
ISMATEC SA, Labortechnik-Analytik (Glattbrugg, Schweiz)
J.T. Baker (Griesheim)
Merck (Darmstadt)
Mitsubishi Electric Corp. (Japan)
MWG-Biotech AG (Ebersberg)
Perkin Elmer (Foster City, CA, USA)
Polaroid Corp. (USA)
QIAGEN (Hilden)
Sigma-Aldrich Vertriebs GmbH (Deisenhofen)

7.2.2 Geräte

BioPhotometer (Eppendorf)
Elektrophorese-Kammern: 140x140mm², 80x70mm², 40x70mm² (Amersham Pharmacia)
Heizblock: Liebisch Metallblockthermostate Thermobil[®] (ISMATEC SA)
Kühlgerät: MultiTempII (Amersham Pharmacia)
Polaroidfilm, Polaroidkamera: Typ 667 Schwarzweiß (Polaroid Corp.)
Sequenzierautomat: Perkin Elmer 373 A DNA Sequencer
Spannungsgeräte: LKB GPS 200/400 (Amersham Pharmacia)
SSCP-Elektrophoresekammer: MultiphorII Elektrophorese-Kammer (Amersham Pharmacia)
SSCP-Spannungsgerät: Electrophoresis Power Supply-EPS 3500XL (Amersham Pharmacia)
Thermocycler: Perkin Elmer *GeneAmp* PCR System 2400

UV-Bildschirm: UV-Systeme 312nm (INTAS®)

Video Copy Processor: Model P90E (Mitsubishi Electric Corp.)

7.2.3 Gefäße, Pipetten, Elektrophoresematerial

Eppendorf-Reaktionsgefäße

Elektrodenpapier (ETC Corp.)

Filterpapierstreifen: Drying Card (ETC Corp.)

Mikroliter-Pipetten: Eppendorf Varipette®

Polyacrylamidgel: CleanGel DNA-HP 10%T, 2%C, 0,65mm, 36S (ETC Corp.)

QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)

7.2.4 Reagenzien

7.2.4.1 DNA-Isolation

Ethanol (100%, 70%) (J.T. Baker)

Natriumchlorid 6M (Sigma)

Natriumdodecylsulfat (SDS) 20% (Sigma)

Lysis-Puffer: autoklaviert (Sigma) (Miller 1988)

8,29g Ammoniumchlorid (NH₄Cl) 155mM

1,00g Kaliumhydrogencarbonat (KHCO₃) 10mM

0,034g Na₂EDTA 0,1mM

Aqua dest. ad 1l (Merck), pH = 7,4 (HCl/NaOH)

Pronase E (10mg/ml in H₂O) (Sigma)

SE-Puffer: autoklaviert (Sigma)

4,39g Natriumchlorid (NaCl) 75mM

8,41g Na₂EDTA 25mM

Aqua dest. ad 1l (Merck), pH = 8,0 (NaOH)

TE-Puffer: autoklaviert (Sigma)

1,2114g Tris/HCl (pH 8,0) 10mM

0,3722g EDTA 1mM

Aqua dest. ad 1l (Merck), pH = 7,6 od. 8,0

7.2.4.2 PCR

PCR-Puffer: 10xPCR-Puffer (Perkin Elmer): enthält 15mM MgCl₂

(Amersham Pharmacia)

dNTPs: 2,5mM (2´Deoxynukleoside 5´Triphosphate: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

(Perkin Elmer)

Primer-Sets (MWG Biotech)

AmpliTaq[®] DNA Polymerase (Perkin Elmer)

Agarose (Gibco BRL)

TAE-Puffer:

Stammlösung: 50xTAE-Puffer:

484g Tris-Aminomethan pH 10,3 (Merck)

114,2ml Essigsäure 100% (Roth)

200ml EDTA 0,5M (Sigma)

pH = 8,0

1xTAE-Puffer: 40ml Stammlösung + 2l Aqua dest.

(entspricht 0,04M TAE, 0,001M EDTA)

Ethidiumbromid 1% (Merck)

Ladepuffer (Gibco BRL):

10mM Tris-HCl (pH 7,4)

5mM NaCl

0,1mM EDTA

Längenstandard-Marker PHI-X174 RF DNA/Hae III Fragments 0,5µg/µl (Gibco BRL)

7.2.4.3 SSCP

Gel-Puffer: DNA Disc Gel Buffer, pH 8,5 (ETC Corp.)

SSCP-Enhancer: Additive for DELECT and DNA-Disc Buffer (ETC Corp.)

TEMED (N´,N´,N´,N´-Tetramethylethylendiamin (C₆H₁₆N₂) 116,21g/mol (Merck)

Mineralöl (Sigma)

Elektrodenpuffer: DNA Disc Buffer (ETC Corp.)

Formamid 95% (Sigma), 25ml bestehend aus:

23,75ml Formamid 100%

1,25ml Xylencyanol

10mg Bromphenolblau

Fixierlösung:

150ml Ethanol (15%) (J.T. Baker)

50ml Essigsäure (5%) (Roth)

800ml Aqua dest. (Merck)

Silberlösung 0,1% (Bassam 1991):

2ml Silbernitrat (AgNO_3) (10%) (Merck)

200 μl Formaldehyd (37%) (Merck)

200ml Aqua dest. (Merck)

Entwickler (Bassam 1991)

5g Natriumcarbonat (Na_2CO_3) (2,5%) (Merck)

200 μl Formaldehyd (37%) (Merck)

200 μl Natriumthiosulfat (2%) (Merck)

200ml Aqua dest. (Merck)

Stopp-Lösung:

5g Glycin (2%) (Sigma)

1,25g EDTA (0,5%) (Sigma)

250ml Aqua dest. (Merck)

Glycerol 10% (Merck)

7.2.4.4 Sequenzierung

QG-Puffer (QIAGEN)

QIAquick-Säule (QIAGEN)

EB-Puffer: 10mM Tris-Cl, pH 8,5 (QIAGEN)

PE-Puffer (QIAGEN)

AmpliTa[®]q DNA Polymerase (Perkin Elmer)

dNTPs: 2,5mM (2' Deoxynukleoside 5'Triphosphate: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

(Perkin Elmer)

Terminator Kit (Perkin Elmer)

7.3 Patientenaufklärung und -einwilligung

Universitäts-Frauenklinik Würzburg
- Arbeitsgruppe Fortpflanzungsmedizin -

Blutentnahme zu wissenschaftlichen Zwecken

Patientenaufklärung und -einwilligung

Sehr geehrte Patientin!

Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß genetische Störungen (Defekte der Erbanlagen) für eine ungewollte Kinderlosigkeit verantwortlich sein können. Wir wollen im Rahmen einer Studie an kinderlosen Paaren Gene (Erbsubstanz), die bei der Einnistung der befruchteten Eizelle beteiligt sind, analysieren. Die gewonnenen Erkenntnisse können zu einem besseren Verständnis der Gründe für das Ausbleiben einer Schwangerschaft beitragen, was die Grundlage für jede Behandlung ist. Die Analyse der Erbsubstanz hat wahrscheinlich zum jetzigen Zeitpunkt für Sie selbst keinen unmittelbaren Nutzen, kann aber möglicherweise in Zukunft der Gesamtheit aller betroffenen Paare helfen.

Die Auswertung der Erbsubstanz erfolgt in verschlüsselter Form, so daß die Anforderungen des persönlichen Datenschutzes für wissenschaftliche Fragestellungen erfüllt werden. Eine Weitergabe personengebundener Daten an Dritte ist daher nicht möglich. Zur Durchführung der geplanten Analyse werden im Rahmen der routinemäßigen Blutentnahme 20 ml Blut (diese Menge entspricht etwa 4 Eßlöffeln) benötigt.

Selbstverständlich ist Ihre Bereitschaft zur Blutentnahme für diese Studie freiwillig und hat keinen Einfluß auf Ihre geplante Behandlung. Wenn Sie sich entschließen, nicht an der Studie teilzunehmen, so hat das für Sie keine Nachteile. Die im Rahmen der Untersuchung gewonnenen genetischen Informationen bleiben für Ihre Kinderwunschbehandlung unberücksichtigt.

Erklärung. Ich erkläre, daß ich dieses Informationsblatt gelesen und verstanden habe und meine Fragen zufriedenstellend beantwortet wurden. Ich bin damit einverstanden, daß bei mir 20 ml Blut für die genannten wissenschaftlichen Untersuchungen entnommen werden.

Würzburg, den

.....
Unterschrift Patientin

.....
Unterschrift Arzt/Ärztin

7.4 Embryonenschutzgesetz

<p>Gesetz zum Schutz von Embryonen (Embryonenschutzgesetz – ESchG) vom 13. Dezember 1990</p> <p>§ 1 Missbräuchliche Anwendung von Fortpflanzungstechniken</p> <p>(1) Mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe wird bestraft, wer</p> <ol style="list-style-type: none"> auf eine Frau eine fremde unbefruchtete Eizelle überträgt, es unternimmt, eine Eizelle zu einem anderen Zweck künstlich zu befruchten, als eine Schwangerschaft der Frau herbeizuführen, von der die Eizelle stammt, es unternimmt, innerhalb eines Zyklus mehr als drei Embryonen auf eine Frau zu übertragen, es unternimmt, durch intratubaren Gametotransfer innerhalb eines Zyklus mehr als drei Eizellen zu befruchten, es unternimmt, mehr Eizellen einer Frau zu fruchten, als ihr innerhalb eines Zyklus übertragen werden sollen, einer Frau einen Embryo vor Abschluss seiner Eintragung in der Gebärmutter einträgt, um diesen auf eine andere Frau zu übertragen oder ihn für einen nicht seiner Erhaltung dienenden Zweck zu verwenden, oder es unternimmt, bei einer Frau, welche bereit ist, ihr Kind nach der Geburt frühzeitig auf Dauer zu überlassen (Ersatzmutter), eine künstliche Befruchtung durchzuführen oder auf sie einen menschlichen Embryo zu übertragen. <p>(2) Ebenso wird bestraft, wer</p> <ol style="list-style-type: none"> künstlich bewirkt, daß eine menschliche Spermazelle in eine menschliche Eizelle eindringt, oder eine menschliche Spermazelle in eine menschliche Eizelle künstlich verbringt, <p>ohne eine Schwangerschaft der Frau herbeizuführen zu wollen, von der die Eizelle stammt.</p> <p>(3) Nicht bestraft werden:</p> <ol style="list-style-type: none"> in den Fällen des Absatzes 1 Nr. 1, 2 und 6 die Frau, von der die Eizelle oder der Embryo stammt, sowie die Frau, auf die die Eizelle überträgt wird oder der Embryo übertragen werden soll, und in den Fällen des Absatzes 1 Nr. 7 die Ersatzmutter sowie die Person, die das Kind auf Dauer herziehen will. <p>(4) In den Fällen des Absatzes 1 Nr. 6 und des Absatzes 2 ist der Versuch strafbar.</p>	<p>welchen Voraussetzungen zu teilen und zu einem Individuum zu entwickeln vermag.</p> <p>(2) In den ersten vierundzwanzig Stunden nach der Kernverschmelzung gilt die befruchtete menschliche Eizelle als entwicklungsfähig, es sei denn, daß schon vor Ablauf dieses Zeitraums festgestellt wird, daß sich diese nicht über das Einzellstadium hinaus zu entwickeln vermag.</p> <p>(3) Keimbahnzellen im Sinne dieses Gesetzes sind alle Zellen, die in einer Zelllinie von der befruchteten Eizelle bis zu den Ei- und Spermatoziden des aus ihr hervorgegangenen Menschen führen, ferne die Eizelle vom Einbringen oder Einbringen der Samen zelle an bis zu der mit ihr Kernverschmelzung abgeschlossenen Befruchtung.</p> <p>§ 9 Arztvorbehalt</p> <p>Nur ein Arzt darf vornehmen:</p> <ol style="list-style-type: none"> die künstliche Befruchtung, die Übertragung eines menschlichen Embryos auf eine Frau, die Konservierung eines menschlichen Embryos sowie einer menschlichen Eizelle, in die bereits eine menschliche Spermazelle eingebracht oder künstlich eingebracht worden ist. 	<p>§ 10 Freiwillige Mitwirkung</p> <p>Niemand ist verpflichtet, Maßnahmen der in § 9 bezeichneten Art vorzunehmen oder an ihnen mitzuwirken.</p> <p>§ 11 Verstoß gegen den Arztvorbehalt</p> <p>(1) Wer ohne Arzt zu sein,</p> <ol style="list-style-type: none"> entgegen § 9 Nr. 1 eine künstliche Befruchtung vornimmt, oder entgegen § 9 Nr. 2 einen menschlichen Embryo auf eine Frau einträgt, <p>wird mit Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder mit Geldstrafe bestraft.</p> <p>(2) Nicht bestraft werden im Fall des § 9 Nr. 1 die Frau, die eine künstliche Insemination bei sich vornimmt, und der Mann, dessen Samen zu einer künstlichen Insemination verwendet wird.</p>	<p>§ 12 Bußgeldvorschriften</p> <p>(1) Ordnungswidrig handelt, wer, ohne Arzt zu sein, entgegen § 9 Nr. 3 einen menschlichen Embryo oder eine dort bezeichnete menschliche Eizelle konserviert.</p> <p>(2) Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße bis zu fünftausend Deutsche Mark geahndet werden.</p> <p>§ 13 Inkrafttreten</p> <p>Dieses Gesetz tritt am 1. Januar 1991 in Kraft.</p>
<p>zelle, wenn ausgeschlossen ist, daß diese zur Befruchtung verwendet wird.</p> <p>2. eine sonstige Veränderung der Erbinformation einer somatischen Körperzelle, Keimbahnzelle, die einer toten Leibesfrucht, einem Menschen oder einem Verstorbene entnommen worden ist, wenn ausgeschlossen ist, daß</p> <ol style="list-style-type: none"> diese auf einen Embryo, Fetus oder Menschen übertragen wird, oder aus ihr eine Keimzelle entsteht, sowie <p>3. Injektionen, stabiler, ultracorticosteroidale oder andere Behandlungen, mit denen eine Veränderung der Erbinformation von Keimbahnzellen nicht beabsichtigt ist.</p> <p>§ 5 Klonen</p> <p>(1) Wer künstlich bewirkt, daß ein menschlicher Embryo mit der gleichen Erbinformation wie ein anderer Embryo, ein Fetus, ein Mensch oder ein Verstorbener entsteht, wird mit Freiheitsstrafe bis zu fünf Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.</p> <p>(2) Ebenso wird bestraft, wer einen in Absatz 1 bezeichneten Embryo auf eine Frau überträgt.</p> <p>(3) Der Versuch ist strafbar.</p> <p>§ 7 Chimären- und Hybridbildung</p> <p>(1) Wer es unternimmt,</p> <ol style="list-style-type: none"> Embryonen mit unterschiedlichen Erbinformationen unter Verwendung mindestens eines menschlichen Embryos zu einem Zellverband zu vereinigen, mit einem menschlichen Embryo eine Zelle zu verbinden, die eine andere Erbinformation als die Zellen des Embryos enthält und sich mit diesem weiter zu differenzieren vermag, oder durch Befruchtung einer menschlichen Eizelle mit dem Samen eines Tieres oder durch Befruchtung einer menschlichen Eizelle mit dem Samen eines Menschen einen differenzierungsfähigen Embryo zu erzeugen, <p>wird mit Freiheitsstrafe bis zu fünf Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.</p> <p>(2) Ebenso wird bestraft, wer es unternimmt,</p> <ol style="list-style-type: none"> einen durch eine Handlung nach Absatz 1 entstandenen Embryo auf eine Frau oder ein Tier <p>zu übertragen, oder</p> <ol style="list-style-type: none"> einen menschlichen Embryo auf ein Tier zu übertragen. <p>§ 8 Begriffsbestimmung</p> <p>(1) Als Embryo im Sinne dieses Gesetzes gilt bereits die befruchtete, entwicklungsfähige menschliche Eizelle vom Zeitpunkt der Kernverschmelzung an, ferner jede einem Embryo entnommene totipotente Zelle, die sich bei Vorliegen der dafür erforderlichen</p>	<p>zelle, wenn ausgeschlossen ist, daß diese zur Befruchtung verwendet wird.</p> <p>2. eine sonstige Veränderung der Erbinformation einer somatischen Körperzelle, Keimbahnzelle, die einer toten Leibesfrucht, einem Menschen oder einem Verstorbene entnommen worden ist, wenn ausgeschlossen ist, daß</p> <ol style="list-style-type: none"> diese auf einen Embryo, Fetus oder Menschen übertragen wird, oder aus ihr eine Keimzelle entsteht, sowie <p>3. Injektionen, stabiler, ultracorticosteroidale oder andere Behandlungen, mit denen eine Veränderung der Erbinformation von Keimbahnzellen nicht beabsichtigt ist.</p> <p>§ 5 Klonen</p> <p>(1) Wer künstlich bewirkt, daß ein menschlicher Embryo mit der gleichen Erbinformation wie ein anderer Embryo, ein Fetus, ein Mensch oder ein Verstorbener entsteht, wird mit Freiheitsstrafe bis zu fünf Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.</p> <p>(2) Ebenso wird bestraft, wer einen in Absatz 1 bezeichneten Embryo auf eine Frau überträgt.</p> <p>(3) Der Versuch ist strafbar.</p> <p>§ 7 Chimären- und Hybridbildung</p> <p>(1) Wer es unternimmt,</p> <ol style="list-style-type: none"> Embryonen mit unterschiedlichen Erbinformationen unter Verwendung mindestens eines menschlichen Embryos zu einem Zellverband zu vereinigen, mit einem menschlichen Embryo eine Zelle zu verbinden, die eine andere Erbinformation als die Zellen des Embryos enthält und sich mit diesem weiter zu differenzieren vermag, oder durch Befruchtung einer menschlichen Eizelle mit dem Samen eines Tieres oder durch Befruchtung einer menschlichen Eizelle mit dem Samen eines Menschen einen differenzierungsfähigen Embryo zu erzeugen, <p>wird mit Freiheitsstrafe bis zu fünf Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.</p> <p>(2) Ebenso wird bestraft, wer es unternimmt,</p> <ol style="list-style-type: none"> einen durch eine Handlung nach Absatz 1 entstandenen Embryo auf eine Frau oder ein Tier <p>zu übertragen, oder</p> <ol style="list-style-type: none"> einen menschlichen Embryo auf ein Tier zu übertragen. <p>§ 8 Begriffsbestimmung</p> <p>(1) Als Embryo im Sinne dieses Gesetzes gilt bereits die befruchtete, entwicklungsfähige menschliche Eizelle vom Zeitpunkt der Kernverschmelzung an, ferner jede einem Embryo entnommene totipotente Zelle, die sich bei Vorliegen der dafür erforderlichen</p>	<p>zelle, wenn ausgeschlossen ist, daß diese zur Befruchtung verwendet wird.</p> <p>2. eine sonstige Veränderung der Erbinformation einer somatischen Körperzelle, Keimbahnzelle, die einer toten Leibesfrucht, einem Menschen oder einem Verstorbene entnommen worden ist, wenn ausgeschlossen ist, daß</p> <ol style="list-style-type: none"> diese auf einen Embryo, Fetus oder Menschen übertragen wird, oder aus ihr eine Keimzelle entsteht, sowie <p>3. Injektionen, stabiler, ultracorticosteroidale oder andere Behandlungen, mit denen eine Veränderung der Erbinformation von Keimbahnzellen nicht beabsichtigt ist.</p> <p>§ 5 Klonen</p> <p>(1) Wer künstlich bewirkt, daß ein menschlicher Embryo mit der gleichen Erbinformation wie ein anderer Embryo, ein Fetus, ein Mensch oder ein Verstorbener entsteht, wird mit Freiheitsstrafe bis zu fünf Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.</p> <p>(2) Ebenso wird bestraft, wer einen in Absatz 1 bezeichneten Embryo auf eine Frau überträgt.</p> <p>(3) Der Versuch ist strafbar.</p> <p>§ 7 Chimären- und Hybridbildung</p> <p>(1) Wer es unternimmt,</p> <ol style="list-style-type: none"> Embryonen mit unterschiedlichen Erbinformationen unter Verwendung mindestens eines menschlichen Embryos zu einem Zellverband zu vereinigen, mit einem menschlichen Embryo eine Zelle zu verbinden, die eine andere Erbinformation als die Zellen des Embryos enthält und sich mit diesem weiter zu differenzieren vermag, oder durch Befruchtung einer menschlichen Eizelle mit dem Samen eines Tieres oder durch Befruchtung einer menschlichen Eizelle mit dem Samen eines Menschen einen differenzierungsfähigen Embryo zu erzeugen, <p>wird mit Freiheitsstrafe bis zu fünf Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.</p> <p>(2) Ebenso wird bestraft, wer es unternimmt,</p> <ol style="list-style-type: none"> einen durch eine Handlung nach Absatz 1 entstandenen Embryo auf eine Frau oder ein Tier <p>zu übertragen, oder</p> <ol style="list-style-type: none"> einen menschlichen Embryo auf ein Tier zu übertragen. <p>§ 8 Begriffsbestimmung</p> <p>(1) Als Embryo im Sinne dieses Gesetzes gilt bereits die befruchtete, entwicklungsfähige menschliche Eizelle vom Zeitpunkt der Kernverschmelzung an, ferner jede einem Embryo entnommene totipotente Zelle, die sich bei Vorliegen der dafür erforderlichen</p>	<p>§ 12 Bußgeldvorschriften</p> <p>(1) Ordnungswidrig handelt, wer, ohne Arzt zu sein, entgegen § 9 Nr. 3 einen menschlichen Embryo oder eine dort bezeichnete menschliche Eizelle konserviert.</p> <p>(2) Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße bis zu fünftausend Deutsche Mark geahndet werden.</p> <p>§ 13 Inkrafttreten</p> <p>Dieses Gesetz tritt am 1. Januar 1991 in Kraft.</p>
<p>Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.</p> <p>(2) Pluripotenz wird festgestellt, wer zu einem anderen Zweck wirkt, daß sich ein menschlicher Embryo extrahiert weiterentwickelt.</p> <p>(3) Der Versuch ist strafbar.</p> <p>§ 3 Verbotene Geschlechtswahl</p> <p>Wer es unternimmt, eine menschliche Eizelle mit einer Spermazelle künstlich zu befruchten, die nach dem in ihr enthaltenen Geschlechtschromosom ausgewählt worden ist, wird mit Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder mit Geldstrafe bestraft. Dies gilt nicht, wenn die Auswahl der Spermazelle durch einen Arzt dazu dient, das Kind vor der Eintragung in einer Mikeldystrophie vom Typ Duchenne oder einer ähnlich schwerwiegenden Geschlechtsbedingten Erbkrankheit zu bewahren, und die dem Kind drohende Erkrankung von der nach Landesrecht zuständigen Stelle als entsprechend schwerwiegend anerkannt worden ist.</p> <p>§ 4 Eineimächtige Befruchtung, eigenmächtige Embryoübertragung und künstliche Befruchtung nach dem Tode</p> <p>(1) Mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe wird bestraft, wer</p> <ol style="list-style-type: none"> es unternimmt, eine Eizelle künstlich zu befruchten, ohne daß die Frau, deren Eizelle befruchtet wird, und der Mann, dessen Spermazelle für die Befruchtung verwendet wird, eingewilligt haben, es unternimmt, auf eine Frau ohne deren Einwilligung einen Embryo zu übertragen, oder wissenschaftlich eine Eizelle mit dem Samen eines Mannes nach dessen Tode künstlich befruchtet. <p>(2) Nicht bestraft wird im Fall des Absatzes 1 Nr. 3 die Frau, bei der die künstliche Befruchtung vorgenommen wird.</p>	<p>Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.</p> <p>(2) Pluripotenz wird festgestellt, wer zu einem anderen Zweck wirkt, daß sich ein menschlicher Embryo extrahiert weiterentwickelt.</p> <p>(3) Der Versuch ist strafbar.</p> <p>§ 3 Verbotene Geschlechtswahl</p> <p>Wer es unternimmt, eine menschliche Eizelle mit einer Spermazelle künstlich zu befruchten, die nach dem in ihr enthaltenen Geschlechtschromosom ausgewählt worden ist, wird mit Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder mit Geldstrafe bestraft. Dies gilt nicht, wenn die Auswahl der Spermazelle durch einen Arzt dazu dient, das Kind vor der Eintragung in einer Mikeldystrophie vom Typ Duchenne oder einer ähnlich schwerwiegenden Geschlechtsbedingten Erbkrankheit zu bewahren, und die dem Kind drohende Erkrankung von der nach Landesrecht zuständigen Stelle als entsprechend schwerwiegend anerkannt worden ist.</p> <p>§ 4 Eineimächtige Befruchtung, eigenmächtige Embryoübertragung und künstliche Befruchtung nach dem Tode</p> <p>(1) Mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe wird bestraft, wer</p> <ol style="list-style-type: none"> es unternimmt, eine Eizelle künstlich zu befruchten, ohne daß die Frau, deren Eizelle befruchtet wird, und der Mann, dessen Spermazelle für die Befruchtung verwendet wird, eingewilligt haben, es unternimmt, auf eine Frau ohne deren Einwilligung einen Embryo zu übertragen, oder wissenschaftlich eine Eizelle mit dem Samen eines Mannes nach dessen Tode künstlich befruchtet. <p>(2) Nicht bestraft wird im Fall des Absatzes 1 Nr. 3 die Frau, bei der die künstliche Befruchtung vorgenommen wird.</p>	<p>§ 5 Künstliche Veränderung menschlicher Keimbahnzellen</p> <p>(1) Wer die Erbinformation einer menschlichen Keimbahnzelle künstlich verändert, wird mit Freiheitsstrafe bis zu fünf Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.</p> <p>(2) Ebenso wird bestraft, wer eine menschliche Keimbahnzelle mit künstlich veränderter Erbinformation zur Befruchtung verwendet.</p> <p>(3) Der Versuch ist strafbar.</p> <p>(4) Absatz 1 findet keine Anwendung auf</p> <ol style="list-style-type: none"> eine künstliche Veränderung der Erbinformation einer außerhalb des Körpers befindlichen Keimbahnzelle, 	<p>§ 5 Künstliche Veränderung menschlicher Keimbahnzellen</p> <p>(1) Wer die Erbinformation einer menschlichen Keimbahnzelle künstlich verändert, wird mit Freiheitsstrafe bis zu fünf Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.</p> <p>(2) Ebenso wird bestraft, wer eine menschliche Keimbahnzelle mit künstlich veränderter Erbinformation zur Befruchtung verwendet.</p> <p>(3) Der Versuch ist strafbar.</p> <p>(4) Absatz 1 findet keine Anwendung auf</p> <ol style="list-style-type: none"> eine künstliche Veränderung der Erbinformation einer außerhalb des Körpers befindlichen Keimbahnzelle,
<p>§ 1 Missbräuchliche Anwendung von Fortpflanzungstechniken</p> <p>(1) Mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe wird bestraft, wer</p> <ol style="list-style-type: none"> auf eine Frau eine fremde unbefruchtete Eizelle überträgt, es unternimmt, eine Eizelle zu einem anderen Zweck künstlich zu befruchten, als eine Schwangerschaft der Frau herbeizuführen, von der die Eizelle stammt, es unternimmt, innerhalb eines Zyklus mehr als drei Embryonen auf eine Frau zu übertragen, es unternimmt, durch intratubaren Gametotransfer innerhalb eines Zyklus mehr als drei Eizellen zu befruchten, es unternimmt, mehr Eizellen einer Frau zu fruchten, als ihr innerhalb eines Zyklus übertragen werden sollen, einer Frau einen Embryo vor Abschluss seiner Eintragung in der Gebärmutter einträgt, um diesen auf eine andere Frau zu übertragen oder ihn für einen nicht seiner Erhaltung dienenden Zweck zu verwenden, oder es unternimmt, bei einer Frau, welche bereit ist, ihr Kind nach der Geburt frühzeitig auf Dauer zu überlassen (Ersatzmutter), eine künstliche Befruchtung durchzuführen oder auf sie einen menschlichen Embryo zu übertragen. <p>(2) Ebenso wird bestraft, wer</p> <ol style="list-style-type: none"> künstlich bewirkt, daß eine menschliche Spermazelle in eine menschliche Eizelle eindringt, oder eine menschliche Spermazelle in eine menschliche Eizelle künstlich verbringt, <p>ohne eine Schwangerschaft der Frau herbeizuführen zu wollen, von der die Eizelle stammt.</p> <p>(3) Nicht bestraft werden:</p> <ol style="list-style-type: none"> in den Fällen des Absatzes 1 Nr. 1, 2 und 6 die Frau, von der die Eizelle oder der Embryo stammt, sowie die Frau, auf die die Eizelle überträgt wird oder der Embryo übertragen werden soll, und in den Fällen des Absatzes 1 Nr. 7 die Ersatzmutter sowie die Person, die das Kind auf Dauer herziehen will. <p>(4) In den Fällen des Absatzes 1 Nr. 6 und des Absatzes 2 ist der Versuch strafbar.</p>	<p>§ 1 Missbräuchliche Anwendung von Fortpflanzungstechniken</p> <p>(1) Mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe wird bestraft, wer</p> <ol style="list-style-type: none"> auf eine Frau eine fremde unbefruchtete Eizelle überträgt, es unternimmt, eine Eizelle zu einem anderen Zweck künstlich zu befruchten, als eine Schwangerschaft der Frau herbeizuführen, von der die Eizelle stammt, es unternimmt, innerhalb eines Zyklus mehr als drei Embryonen auf eine Frau zu übertragen, es unternimmt, durch intratubaren Gametotransfer innerhalb eines Zyklus mehr als drei Eizellen zu befruchten, es unternimmt, mehr Eizellen einer Frau zu fruchten, als ihr innerhalb eines Zyklus übertragen werden sollen, einer Frau einen Embryo vor Abschluss seiner Eintragung in der Gebärmutter einträgt, um diesen auf eine andere Frau zu übertragen oder ihn für einen nicht seiner Erhaltung dienenden Zweck zu verwenden, oder es unternimmt, bei einer Frau, welche bereit ist, ihr Kind nach der Geburt frühzeitig auf Dauer zu überlassen (Ersatzmutter), eine künstliche Befruchtung durchzuführen oder auf sie einen menschlichen Embryo zu übertragen. <p>(2) Ebenso wird bestraft, wer</p> <ol style="list-style-type: none"> künstlich bewirkt, daß eine menschliche Spermazelle in eine menschliche Eizelle eindringt, oder eine menschliche Spermazelle in eine menschliche Eizelle künstlich verbringt, <p>ohne eine Schwangerschaft der Frau herbeizuführen zu wollen, von der die Eizelle stammt.</p> <p>(3) Nicht bestraft werden:</p> <ol style="list-style-type: none"> in den Fällen des Absatzes 1 Nr. 1, 2 und 6 die Frau, von der die Eizelle oder der Embryo stammt, sowie die Frau, auf die die Eizelle überträgt wird oder der Embryo übertragen werden soll, und in den Fällen des Absatzes 1 Nr. 7 die Ersatzmutter sowie die Person, die das Kind auf Dauer herziehen will. <p>(4) In den Fällen des Absatzes 1 Nr. 6 und des Absatzes 2 ist der Versuch strafbar.</p>	<p>§ 2 Missbräuchliche Verwendung menschlicher Embryonen</p> <p>(1) Wer einen extrakorporal erzeugten oder einer Frau vor Abschluss seiner Eintragung in der Gebärmutter entnommenen menschlichen Embryo veräußert oder zu einem nicht seiner Erhaltung dienenden Zweck abgibt, obwohl infel verwendet, wird mit</p>	<p>§ 2 Missbräuchliche Verwendung menschlicher Embryonen</p> <p>(1) Wer einen extrakorporal erzeugten oder einer Frau vor Abschluss seiner Eintragung in der Gebärmutter entnommenen menschlichen Embryo veräußert oder zu einem nicht seiner Erhaltung dienenden Zweck abgibt, obwohl infel verwendet, wird mit</p>

DANKSAGUNG

In erster Linie möchte ich Herrn Professor Dr. med. T. Steck, meinem Doktorvater, für die Überlassung des Themas und seine freundliche Betreuung danken.

Herrn Professor Dr. med. M. Sendtner danke ich für die Bereitstellung des Laborplatzes im Forschungslabor für Neuroregeneration der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg. Herzlicher Dank gilt besonders Herrn Privatdozent Dr. med. R. Giess und Frau D. Waffler für die umfassende Einarbeitung in die molekularbiologischen Methoden und die zahlreichen Hilfestellungen bei den Laborarbeiten. Die Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. M. Bolland während des klinisch-experimentellen Teils der Arbeit habe ich sehr geschätzt, wofür ihr mein Dank gilt.

Herrn Professor Dr. med. H. Höhn danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Meinen Dank möchte ich auch den Schwestern und ÄrztInnen der Sprechstunde für Gynäkologische Endokrinologie und Assistierte Reproduktionsmedizin der Universitäts-Frauenklinik Würzburg aussprechen, die durch ihre freundliche Aufnahme und Zusammenarbeit, ihre Hilfe in praktischen Belangen und auf vielfältige andere Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die freundliche Unterstützung bei der Literatursuche bedanke ich mich herzlich bei Frau E. Böhm, Frau Dr. med. M. Bolland und Herrn O. Weinert.

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin Julia für ihre wertvollen Anregungen und die kritische Korrektur des Textes sowie meinen Eltern, ohne deren gemeinsame Unterstützung und ständigen Ansporn diese Arbeit nicht zu einem Abschluss gekommen wäre.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Stephanie Wiest
Geburtsdatum	06.02.1975
Geburtsort	Ehingen/Donau
Familienstand	ledig
Eltern	Wilhelm Wiest, Ingenieur (Elektrotechnik), Sieglinde Wiest, geb. Brugger, Sekretärin/Hausfrau

Schulbildung

1981 - 1985	Grundschule in Munderkingen
1985 - 1994	Gymnasium in Ehingen/Donau Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium

1994 - 2001	Humanmedizin an der Universität Würzburg
09/1996	Ärztliche Vorprüfung
08/1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2000 - 2001	Praktisches Jahr (Wahlfach Pädiatrie)
11/2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Auslandsaufenthalte

09 - 10/1997	Famulatur im Fach Gynäkologie und Geburtshilfe, Holy-Spirit-Hospital, Bombay, Indien
05 - 08/2000	Chirurgie-Tertial des Praktischen Jahres, Haukeland University Hospital, Bergen, Norwegen

Ärztliche Tätigkeit

01/2002 - 02/2004	Ärztin im Praktikum und anschließend Assistenzärztin, Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
Seit 02/2004	Assistenzärztin, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Städtisches Krankenhaus Kiel

Kiel, im Dezember 2004