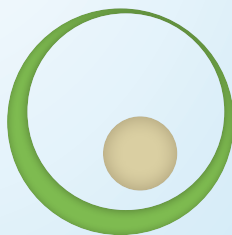


Perspektive Fertilität

# Milestones der weiblichen Keimzellenentwicklung und Fertilitätserhalt

U. Eichenlaub-Ritter und L. Wildt



Herausgeber:  
G. Griesinger  
P. M. Holterhus

## Impressum

Herausgeber: Prof. Dr. G. Griesinger, Prof. Dr. P.M. Holterhus

Copyright: Herausgeber, alle Rechte vorbehalten

Gesamtherstellung:

biomedpark Medien GmbH

Schneidmühlstr. 21, 69115 Heidelberg

Tel.: +49 (0) 6221 / 13 747 0

www.biomedpark.de

ISBN-Nr.: 978-3-9816544-0-0

1. Auflage, Heidelberg 2014

**Mit freundlicher Unterstützung von FERRING Arzneimittel GmbH. Auf die Inhalte und Gestaltung dieses Buches hat die FERRING Arzneimittel GmbH keinen Einfluss und trägt dafür keine Verantwortung.**

### **Wichtiger Hinweis:**

Die in diesem Buch aufgeführten Angaben zur Medikation wurden sorgfältig geprüft. Dennoch können Herausgeber, Autor und Verlag keine Gewähr für die Richtigkeit der Angaben übernehmen. In jedem Fall und insbesondere auch bei Abweichungen von den Empfehlungen erfolgen das therapeutische Vorgehen und auch die Verschreibung von Medikamenten in eigener Verantwortung des Arztes.

## Vorwort

Dem Ovar als Ursprungsort der weiblichen Fruchtbarkeit und der Sexualsteroiden ist der vorliegende Band der Buchreihe „Perspektive Fertilität“ gewidmet. Das ovarielle Zyklusgeschehen und die endokrine Steuerung durch Hypothalamus und Hypophyse sind jedem Kliniker gut vertraut. Weitaus schlechter werden hingegen noch die Mechanismen der frühen Keimzellanlage und die Steuerung der gonadotropinunabhängigen Phase der Follikelreifung verstanden. Der sukzessive Verlust an Primordialfollikeln über die Lebensspanne der Frau ist bekannt und die ovarielle Reserve ist näherungsweise bei jeder Frau in der Klinik quantifizierbar. Allein die Kenntnis der intra-ovariellen Mechanismen, welche die Follikelreifung und Atresie kontrollieren, würde es erlauben, neue Pharmakotherapien zur Verzögerung der ovariellen Erschöpfung und In-vitro-Systeme der Eizellreifung zu entwickeln. Wesentliche neue Erkenntnisse mit möglicherweise tiefgreifenden Implikationen für die weibliche Fruchtbarkeit und die menschliche Reproduktion schlechthin werden auch von einem besseren Verständnis gerade der frühen Keimzellbildung erwartet. Exemplarisch sei an dieser Stelle die Suche nach ovariellen Stammzellen genannt.

Der vorliegende Band spannt nun den Bogen von der primordialen Keimzelle bis hin zur klinischen Diagnostik der ovariellen Reserve und den Optionen des Fertilitätserhalts bei drohendem Verlust der Fruchtbarkeit. In Person von Frau Prof. Dr. rer. nat. Ursula Eichenlaub-Ritter (Universität Bielefeld) ist es gelungen, eine international anerkannte, herausragende Expertin für den Teil der biologischen Grundlagen als Autorin für dieses Buch zu gewinnen. Die international anerkannte Arbeitsgruppe unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Ludwig Wildt (Universität Innsbruck) hat einen langjährigen Schwerpunkt in der gynäkologisch-endokrinen Forschung und war somit prädestiniert, den Buchteil zu Störungen der ovariellen Reserve und Fertilitätserhalt zu gestalten.

Prof. Dr. med. Georg Griesinger

Prof. Dr. med. Paul Martin Holterhus

## Inhaltsverzeichnis

### Milestones der weiblichen Keimzellenentwicklung

Ursula Eichenlaub-Ritter

<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>1. Ursprung und Wanderung von primordialen Keimzellen und epigenetische Prozesse</b>	<b>8</b>
<b>2. Mitose, Oogonien und Prophase I der Meiose in primären Oozyten</b>	<b>10</b>
<b>3. Bildung von Follikeln und primordialem Follikelpool</b>	<b>16</b>
<b>4. Rekrutierung von primordialen Follikeln und Übergang vom ruhenden in den wachsenden Zustand (primäre Follikel)</b>	<b>17</b>
<b>5. Gonadotropin-beeinflusste und -abhängige Entwicklung des Follikels vom präantralen zum antralen Stadium und Akquisition der Reifungs- und Entwicklungskompetenz der Eizelle</b>	<b>22</b>
<b>6. Wiederaufnahme der Reifung, Spindelbildung und Chromosomenverteilung bis zur Metaphase II</b>	<b>28</b>
<b>7. Reifung, Spindelbildung und Chromosomentrennung</b>	<b>32</b>
<b>8. Abschluss der Meiose und Eizellbildung</b>	<b>38</b>
<b>9. Länge der Reproduktionszeit, Größe des Follikelpools und genetische und nicht genetische Determinanten der Oozytenqualität und Fertilität</b>	<b>39</b>
<b>Literatur</b>	<b>43</b>

# Schädigung der weiblichen Gonaden und Fertilitätserhalt

Stephanie C. Ziehr, Katharina Winkler, Ludwig Wildt

<b>1. Wodurch kann die weibliche Fruchtbarkeit geschädigt werden?</b>	<b>50</b>
1.1 Endogene Ursachen	50
1.1.1 Genetische Ursachen (X-chromosomale Defekte)	50
1.1.2 Genetische Ursachen (autosomal-chromosomale Defekte)	52
1.1.3 Autoimmunologische Ursachen	53
1.1.4 Viruserkrankungen	53
1.2 Exogene Ursachen	53
1.2.1 Chemotherapie	53
1.2.2 Strahlentherapie	55
<b>2. Gibt es Methoden, um Fertilität zu messen und/oder zu prognostizieren?</b>	<b>55</b>
2.1 Alter	55
2.2 Zyklusanamnese	55
2.3 Antraler Follikelcount (AFC)	56
2.4 Gonadotropine	57
2.5 Marker der ovariellen Reserve	57
<b>3. Fertilitätserhaltende Maßnahmen</b>	<b>59</b>
3.1 Transposition der Ovarien	59
3.2 Einsatz von GnRH-Analoga	60
3.3 Kryokonservierung von Embryonen	60
3.4 Kryokonservierung von reifen Oozyten	61
3.5 Kryokonservierung von Ovarialgewebe und Retransplantation	62
3.6 In-vitro-Maturation von Oozyten aus entnommenem Ovarikortex	63
3.7 Kombination von fertilitätserhaltenden Maßnahmen	64
<b>Literatur</b>	<b>65</b>

# Milestones der weiblichen Keimzellenentwicklung

Ursula Eichenlaub-Ritter

## Einleitung

Oozyten gehören mit zu den langlebigsten Zellen im weiblichen Organismus, denn sie können über Jahrzehnte im Ovar ruhen, bevor sie ovuliert werden. Die Entwicklung von Vorläuferkeimzellen (primordialen Keimzellen), die zunächst noch nicht sexuell differenziert sind, und des Ovars beim Menschen beginnt schon im Postimplantationsembryo und schreitet während der Schwangerschaft fort (Abb. 1A). Die zyklische Ovulation einer reifen, entwicklungsfähigen Oozyte beginnt erst mit der Pubertät (Abb. 1B). Vorher und während der ganzen fertilen Periode wird durch kontinuierliche Rekrutierung von primordialen Follikeln und Verlust von Follikeln durch Atresie der Pool verringert, bis nur noch etwa  $10^3$  Follikel am Ende der Reproduktionszeit im menschlichen Ovar vorhanden sind (Abb. 3), die nicht mehr reifen können. Zum Ende der Reproduktionszeit scheint dabei ein dramatischer Anstieg der Fehlverteilung von Chromosomen mit zum Verlust der Fertilität und dem Anstieg von Trisomien beizutragen (solide Linie in Abb. 3) [1, 2]. Demnach ist das Auftreten von Aneuploidien in Oozyte und Embryo einer der wichtigsten Faktoren für reduzierte Fertilität auf Grund von Störungen in der Oogenese.

Nach heutigem Wissensstand stammen alle bis zum Ende der Reproduktionszeit ovulierten Eizellen aus dem im Embryo angelegten Pool von primären Eizellen, die in primordialen Follikeln überleben (Abb. 1A; Milestones 1–3), in denen sie bis zu mehreren Jahrzehnten meiotisch arretiert sind. Erst nach Aktivierung der Follikel treten sie vom ruhenden in den wachsenden Zustand (Milestone 5), während der Follikulogenese nehmen sie erheblich im Volumen zu (Milestones 6–8; Abb. 1) und erreichen endlich kurz vor der Ovulation die Reifungs- und Entwicklungskompetenz (Milestone 8; Abb. 1). Erst dann kann die Reifung wieder aufgenommen und die Oozyte ovuliert und fertilisiert werden (Milestones 8–11).

Während die frühen Stadien der Follikulogenese mit Aktivierung der Follikulogenese nicht von der Ausschüttung gonadotroper Hormone abhängig sind (Abb. 1A), werden die Follikel ab dem präantralen Stadium Gonadotrop-an-sprechbar und exprimieren entsprechende Rezeptoren. Im antralen Stadium stellen Gonadotropine dann einen essentiellen Überlebensfaktor dar. Am Ende der Follikulogenese wird auf Grund hormoneller Signale durch die Ausschüttung von lutenisierendem Hormon (LH) und dadurch ausgelösten Signalkaskaden die Wiederaufnahme der Reifung der Eizelle und ihrer Entwicklung bis zur Metaphase der zweiten Reifeteilung eingeleitet, bis sie im muzifizierten Cumulus-Oozyten-Komplex (Cumulus-Oocyte-Complex; COC) in der Metaphase II (MII) bei der Ovulation in die Ampullen gelangt, wo die reife Eizelle erst nach der Befruchtung durch ein Spermium und Aktivierung die zweite Meiose abschließen kann (Abb. 1B). Dabei wird zunächst vor der Ovulation der erste und nach Befruchtung der zweite kleine Polkörper in einer asymmetrischen Cytokinese abgeschnürt. Nach der Befruchtung wandelt sich der haploide Chromosomensatz der Eizelle und der des Spermiums zum weiblichen und männlichen Vorkern um (Abb. 1B; Milestone 11), es findet eine erste zygotische S-Phase statt und die so entstandene Zygote kann sich weiter zum diploiden Präimplantationsembryo entwickeln. Dabei werden alle Genprodukte und Zellorganelle für die frühe Präimplantationsentwicklung wie z. B. die Mitochondrien von der Eizelle bereitgestellt [1] und Genprodukte und Organelle müssen sich durch Transkription, Translation und Bereitstellung von Metaboliten aus Granulosazellen während der Entwicklung der Eizelle vermehren (Abb. 1A). Das Spermium bringt einige RNAs, das paternale Chromatin und das Spermientriol/-centrosom zur Entwicklung der Zygote ein, während die meisten Genprodukte maternal bereitgestellt werden müssen, damit sich der Embryo bis zur vollen zygotischen Genaktivierung und darüber hinaus entwickeln kann. Die normale Prä- und Postimplantationsentwicklung ist demnach weitgehend von maternal vererbten Produkten und der geregelten Verteilung von Chromosomen in der Meiose in der Oogenese (Abb. 1B) (und in der Spermatogenese) und in den mitotischen Teilungen in der Embryonalentwicklung abhängig.

Im vorliegenden Beitrag sollen die Meilensteine der Eizellentwicklung (gekennzeichnet durch rote Pfeile in Abb. 1) und ihre Relevanz für die Fertilität, Entwicklungsfähigkeit und Gesundheit des Embryos kurz dargestellt werden.

## 1. Ursprung und Wanderung von primordialen Keimzellen und epigenetische Prozesse

Primordiale Keimzellen (englisch: Primordial Germ Cells, PGCs) sind die Vorläufer der Gonozyten. Zunächst als „epiblast embryonal stem cells“ (Epi ESC) bezeichnete Zellen, die dann zu PGCs werden, entstehen bereits im proximalen Teil des Dottersacks, dem proximalen Epiblasten kurz nach der Implantation des Embryos, beim Menschen etwa bis zur 16. Schwangerschaftswoche [3]. Sie wandern entlang des Darms zu den sich entwickelnden Gonadenanlagen, wobei offenbar Chemoattraktion eine Rolle spielt (Abb. 1A). Ein Teil dieser Translokation wird möglicherweise auch schon durch die laterale Faltung des Darms im Embryo bewirkt, die beim Menschen etwa in der fünften Woche der Schwangerschaft abgeschlossen ist [4]. Eine Reihe von konservierten Signalmolekülen und Wachstumsfaktoren wurden in den letzten Jahren vor allem im Mausmodell identifiziert, die an Entstehung und Wanderung der PGCs beteiligt sind. Zum Beispiel spielen Proteine aus der Familie der „Transforming Growth Factors B“ (TGFB), wie die Bone-Morphogenetic-Proteine 4 und 8 (BMP4, BMP8), aber auch sezernierte und Rezeptorproteine zum Beispiel cKIT- und KIT-Ligand und die Expression von Markern der PGCs wie Stella und BLIMP1 (**B**lymphocyte induced **m**aturation **p**rotein **1**, ein transkriptionaler Repressor, auch **PR domain zinc finger protein 1**, PRDM1, genannt) sowie PRDM14 (**PR domain zinc finger protein 14**), ein transkriptioneller Regulator, der die Spezifizierung zum somatischen Status verhindert [5, 6], und Solh1 (**S**permatogenesis and **O**ogenesis specific basic **H**elix-**L**oop-**H**elix protein **1**), eine Rolle, die die Genexpression beeinflussen. An der Keimzellspezifizierung ist unter anderem auch die Expression von OCT4 (**O**ctamer-binding transcription factor **4**; auch POU 5 class homeobox 1, POU5F1, genannt), einem Pluripotenzmarker, beteiligt.

Die Reprogrammierung des Genoms ist für die Keimzellbildung ein wichtiger Meilenstein in der Etablierung von Vorläuferkeimzellen (Milestone 1) [7]. Während der Spezifikation und Wanderung der PGCs erfolgt die Reprogrammierung nicht nur durch Veränderungen im Expressionsmuster, sondern auch durch Veränderungen in der globalen Modifikation von Chromatin (z.B. der Demethylierung von Cytosin in CpG Dinukleotiden). Dazu gehört z.B. die Reaktivierung des inaktivierten



zweiten X-Chromosoms in PGCs im weiblichen Geschlecht, wie auch in der Entfernung von Modifikationen an der DNA (Imprints), die vom Spermium und der Eizelle geschlechtsspezifisch bei der Fertilisation in die Zygote eingebracht und zunächst unverändert an alle Tochterzellen im Embryo weitergegeben werden (siehe [7, 8]). Diese Imprints müssen gelöscht werden, z.B. von DNA-Methylcytosin-Deoxygenase-Enzymen (Tet1/Tet2; Ten-eleven translocation 1/2 gene protein) [9, 10]. Vorhandene Modifikationen an der DNA der parentalen Imprints werden dann bei der anschließenden Replikation entfernt, bevor sie in der für die Eizelle spezifischen Weise bei der Oozytenbildung viel später (während des Oozytenwachstums, Milestone 6–8; Abb. 1a) wieder neu etabliert werden können. Störungen in diesen epigenetischen Modifikationen können zu Fehlentwicklungen und Pathologien wie dem Prader-Willi- oder Angelman-Syndrom führen und transgenerations-epigenetische Mutationen auslösen.

Das embryonale Ovar entsteht, wenn die PGCs die Gonadenanlagen erreichen, beim Menschen ungefähr 30 Tage nach der Befruchtung und in den folgenden Wochen in enger Verbindung mit dem Mesonephros. Die somatischen Zellen des embryonalen Ovars entstehen aus dem Mesonephros und dem Epithelium des Coeloms. Unter anderem scheinen Neuropeptide und andere Faktoren die mitotischen Teilungen von PGCs und von den mitotisch sich teilenden Vorläufern der Eizellen, den Oogonien, zu stimulieren und so die Bildung der Gonadenleiste zusammen mit morphogenetischen Prozessen, Bildung der intraovariellen Rete und Bildung von Pregranulosazellen zu fördern (Review in [4]). Die Einwanderung von PGCs erfolgt überwiegend in den frühen Stadien der Schwangerschaft und scheint bei der Geburt abgeschlossen zu sein. So konnten keine PGCs oder Oogonien zwei Jahre nach der Geburt im menschlichen Ovar mehr festgestellt werden, so dass die Anlage des Vorrats an PGCs und mitotisch sich teilenden Keimzellvorläufern während der embryonalen Entwicklung abgeschlossen zu sein scheint. Damit wird auch der Pool an Follikeln und Oozyten, die sich daraus entwickeln und mit der Meiose beginnen und sie nach der Ovulation abschließen können, begrenzt. Welche Bedeutung Stammzellen im Ovar für die physiologische Neubildung von Oozyten nach der Geburt haben, wird gegenwärtig kontrovers diskutiert [11, 12].

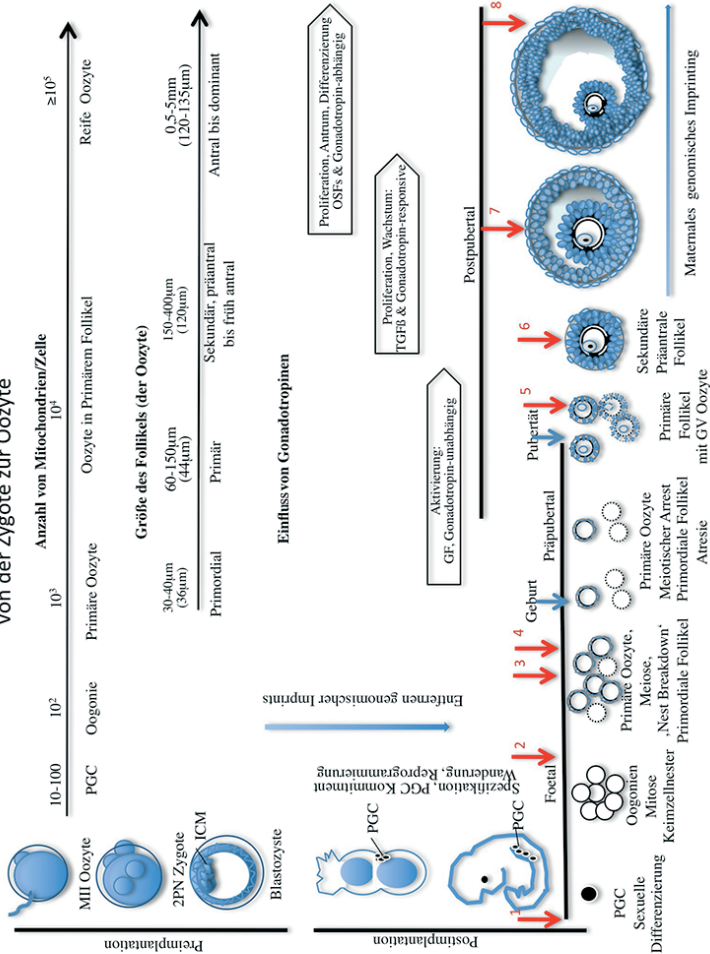
## 2. Mitose, Oogonien und Prophase I der Meiose in primären Oozyten

Wenn die PGCs die Genitalleiste im weiblichen Embryo erreicht haben, werden sie in Abwesenheit eines Y-Chromosoms und daher Abwesenheit der Expression des SRY-Gens auf dem Y-Chromosom in den somatischen Zellen dazu angeregt, sich geschlechtlich zu Oogonien zu differenzieren. Dabei spielt die Expression von *Rspo1*, *Wnt4* und *Foxl2* in somatischen Zellen der Gonadenanlage eine Rolle, die das Commitment zur Entwicklung der Oogonien auslösen (Milestone 2). Oogonien machen mitotische Teilungen durch und werden dann zu primären Oozyten, die unter dem Einfluss von Retinsäure und dem Stra8-Transkriptionsfaktor (Stimulated by Retinoic Acid 8) Meiose-spezifische Genprodukte synthetisieren [13, 14]. Unter anderem werden Proteine wie SYCP3 und SYCP1 (Synaptonemal complex proteins 1 und 3) gebildet, Komponenten des Synaptonemkomplexes (SYC; siehe unten; [15]). Proteine der Familie DAZ (deleted in azoospermia), DAZL (DAZ-like) und BOLL (auch Boule oder Boule-like genannt), die RNA-bindend sind und die Translation von keimzellspezifischen mRNAs induzieren, scheinen sequenziell für die frühe Oogenese, Meiose und später bei der Bildung der primordialen Follikel notwendig [16].

Zur Generierung haploider Gameten müssen die Chromosomen nach der meiotischen S-Phase in zwei Teilungsschritten (Miose I und II) getrennt werden (Milestone 8–11; Abb. 1B). Die Prophase I der ersten Reifeteilung beginnt schon im embryonalen Ovar zwischen der 8. bis 13. Woche der Schwangerschaft (Abb. 1B; Milestone 3). Danach findet erst ab der Pubertät die Wiederaufnahme der Rei-

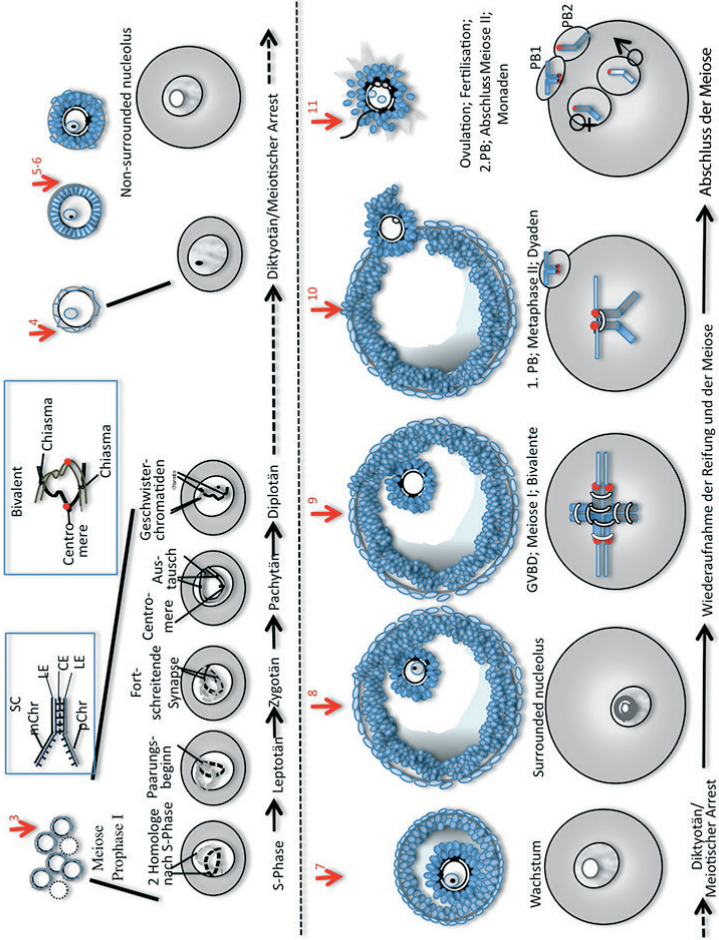
**Abb. 1** Milestones in der Entwicklung der Oozyte: von der Zygote bis zur primären Oozyte (A) und in der Meiose bis zur Fertilisation (B). Die Milestones sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. 1. Entwicklung von primordialen Keimzellen und sexuelle Differenzierung. 2. Oogoniale Mitosen und Bildung primärer Oozyten. 3. Nester von Oogonien, Nestbreakdown und Prophase I der Meiose in primären Oozyten. 4. Bildung primordialer Follikel und Eintritt in meiotischen Arrest. 5. Rekrutierung primordialer Follikel und Entwicklung zu primären Follikeln. 6. Proliferation der Granulosazellen und Beginn des Oozytenwachstums in den sekundären Follikel. 7. Antrumbildung, Differenzierung in Cumulus und murale Granulosazellen, Wachstum und Differenzierung bis zum großen Graaf'schen Follikel. 8. Erreichen der vollen Kernreifungs- und Entwicklungskompetenz der Oozyte, transkriptionelles Silencing und Bildung des surrounded Nucleolus (SN)/Wiederaufnahme der Reifung. 9. Auflösung der Kernmembran (GVBD), Spindelbildung und Chromosomenanordnung und Trennung in der ersten Meiose. 10. Abschnürung des 1. Polkörpers (PB1) und Entwicklung bis zum Metaphase-II-Arrest, Ovulation im Cumulus-Oozyten-Komplex. 11. Abschluss der Meiose II, Abschnürung des 2. Polkörpers (PB2) und Bildung eines männlichen und weiblichen Vorkerns, je mit haploiden Chromosomensatz. Für weitere Erläuterungen siehe Text. (S-Phase bis Diplotän; Abb. modifiziert aus [17])

# Von der Zygote zur Oozyte



A

# MILESTONES IN DER MEIOSE



fung in schon voll ausgewachsenen Eizellen statt (Milestone 8–10), die dann später nach der Ovulation und Fertilisation die Meiose II beenden können (Milestone 11), so dass zunächst die ursprünglich väterlichen und mütterlichen Chromosomen voneinander getrennt werden (Reduktionsteilung) und dann Chromatidentrennung (Äquationsteilung) zum haploiden Satz stattfindet [17]. Somit besitzt die Einzellzygote nach der Befruchtung je einen haploiden Chromosomensatz (jeweils eine Chromatide eines jeden Chromosoms) im weiblichen und männlichen Pronukleus. Der erste Polkörper besitzt je zwei Geschwisterchromatide eines jeden Chromosoms aus dem weiblichen Genom, der zweite Polkörper ist haploid und sollte nur je eine Chromatide eines jeden Homologs enthalten (Abb. 1B, Milestone 11) [17]. Eine Untersuchung der chromosomalen Konstitution bei der Polkörperdiagnostik, z.B. mittels „array comparative genomic hybridisation“ (aCGH), kann demnach zur Entdeckung von Fehlverteilung der Chromosomen in der weiblichen Meiose eingesetzt werden, indem die relative Menge an Chromatin eines jeden Chromosoms bestimmt wird (z.B. [18–20]).

Für eine geregelte Trennung der homologen ursprünglich väterlichen und mütterlichen Chromosomen in der ersten Meiose ist es aber essentiell, dass sie physikalisch miteinander durch Chiasmata verbunden sind, was für die bipolare Ausrichtung in der Meiosespindel wichtig ist. Dabei müssen die beiden Geschwisterchromatiden in jedem Homolog miteinander verbunden bleiben und gemeinsam zu einem Pol wandern (Milestone 9, Abb. 1B; siehe auch unten; Referenzen in: [17]). Die frühen Schritte der Rekombination, die zur Entstehung der Chiasmata führen, finden schon im embryonalen Ovar statt, indem in den primären Eizellen bereits eine Paarung der Homologen und ein intrachromosomaler Austausch zwischen homologen Regionen der jeweils väterlichen bzw. mütterlichen Chromosomen in der Prophase der ersten Reifeteilung stattfindet (Milestone 3, Abb. 1B). Dies führt einmal zu einer Neukombination von ursprünglich mütterlichen und väterlichen Genmerkmalen/Allelen auf einem Chromosom, das später in die Keimzelle und Zygote gelangt, ist aber auch für die Ausbildung von Chiasmata verantwortlich, die zusammen mit Kohäsionsproteinen zwischen Geschwisterchromatiden die physikalische Verbindung der Homologen in den sogenannten Bivalenten in den reifen Eizellen kurz vor der Ovulation sicherstellt [17] (Milestone 3 und 9, Abb.1B; siehe unten). Alle der ursprünglich mütterlich oder väterlich eingebrachten homologen Chromosomen müssen deshalb über mindestens einen genetischen Aus-

tausch miteinander verbunden sein, um eine geregelte Verteilung in der Meiose sicherzustellen und das Risiko für Chromosomenfehlverteilung und Aneuploidie zu vermeiden (Abb. 1B; Milestone 9) [17]. Diese Prozesse von Kondensation, Paarung, Beginn und Abschluss der Rekombination und DNA-Reparatur sind hochkonserviert in Eukaryoten und werden durch entsprechende meiotische Enzyme katalysiert und kontrolliert, z.B. *SPO11*, das an DNA-Doppelstrangbruch und -Reparatur beteiligt ist, sowie *RAD51* und *DMC1*, die für die Rekombination essentiell sind (z.B. [21]). Mutationen und Einfluss von Noxen, die zu Störungen in der Expression führen, können deshalb an Sub- oder Infertilität beteiligt sein (diskutiert in [12]). Weiterhin können heterozygote balancierte Chromosomentranslokationen wie z.B. Inversionen, aber auch kleine Deletionen oder Robertson'sche Translokationen, die den Phenotyp und die Genexpression in somatischen Zellen nicht verändern, sowie konstitutionelle Chromosomenaberrationen wie z.B. X-Monosomie im Turner-Syndrom zu meiotischem Arrest in der Eizellentwicklung führen. Solche Konstitutionen können Störungen in der Paarung und Rekombination der homologen Chromosomen verursachen, die auf Grund von Kontrollpunkten (Checkpoints) zum Block und Zelltod führen und damit die Anlage nur weniger Follikel erlauben. Abgesehen davon verursachen sie ein Risiko von Chromosomenfehlverteilung bei überlebenden Eizellen, was auf das Vorhandensein von nicht rekombinanten (a-chiasmatischen) Chromosomen (Univalenten) oder Multivalenten und ungewöhnlichem Austausch zurückzuführen ist (Referenzen in: [17]). Reduktion in der Menge an primären Oozyten und primordialen Follikeln können entsprechend zur vorzeitigen Entleerung des Ovars (premature ovarian insufficiency, POI) beitragen [22].

Die ersten Schritte der Meiose, in denen Paarung und Rekombination stattfinden, werden nach den mitotischen Teilungen der Oogonien in den sich differenzierenden primären Oozyten etwa im 3. Monat der Schwangerschaft eingeleitet und sind etwa im 7. Monat der Schwangerschaft in allen Eizellen abgeschlossen (Abb. 1B, Milestones 2–4), wenn die Eizellen das Diplotän-Stadium erreicht haben (Abb. 1B), wobei die Prophase I der Meiose nicht in allen Oozyten zeitgleich und synchron begonnen und abgeschlossen wird. Nach der Replikation und S-Phase beginnen sich die Chromosomen zunächst zu kondensieren (Leptotän-Stadium, Abb. 1B), wobei Kondensin- und Kohäsinproteinkomplexe mit beteiligt sind, die unter anderem die Geschwisterchromatiden nach der S-Phase zusammenhalten. Es bildet sich an der ganzen Länge der parentalen Chromosomen ein lateraler Pro-

teinkomplex aus (lateral Element, LE, blaues Inset 1; Abb. 1B), in dem bestimmte Meiose-spezifische Proteine angereichert sind (z.B. **Synaptonemal Complex Protein 3**, SYCP3). Im nächsten Stadium beginnen sich die homologen Chromosomen entlang der lateralen Achse zu paaren und es bildet sich ein sogenanntes zentrales Element aus (central Element, CE), das ebenfalls Meiose-spezifische Proteine enthält (z.B. SYCP1) und mit transversalen Fasern mit den lateralen Elementen der homologen Chromosomen verbunden ist (Zygotän-Stadium, Abb. 1B). Später kommt es zur vollständigen Paarung der Homologen von einem zum anderen Ende der Homologen innerhalb des Kerns (Pachytän-Stadium), wobei zumindest zeitweise die Telomere (Chromosomenenden) an einer Stelle der Kernmembran angeheftet sind (sogenanntes Bouquetstadium), was wahrscheinlich die Paarung vom Ende der homologen Chromosomen in reißverschlussartiger Form erleichtert (Abb. 1B) [17]. Die Proteinstruktur, die die beiden Homologen verbindet und zwei laterale und ein zentrales Element enthält, der sogenannte Synaptonemkomplex (auch synaptonemaler Komplex genannt, SC), eine tripartite Struktur mit zwei lateralen und einem zentralem Element (blaue Box 1, Abb. 1B), stabilisiert die Paarung und fördert den genetischen Austausch zwischen homologen Bereichen der väterlichen und mütterlichen Chromosomen. Entlang der Achse des SCs findet man elektronendichte Proteinaggregate, die sogenannten Rekombinationsknötchen (recombination nodules), die angereichert mit Proteinen für DNA-Rekombination, Austausch und DNA-Reparatur sind und Stellen von Austausch markieren (z.B. in MLH1-Immunfluoreszenz; [23]). Die Bereiche im Chromosom, an denen genetischer Austausch präferenziell stattfindet, werden als „hot spots“ bezeichnet und sind durch eine besondere Chromatinstruktur charakterisiert und hochkonserviert. Nachdem der genetische Austausch und die DNA-Reparaturprozesse im Pachytän abgeschlossen sind, weichen die Homologen auseinander und der Synaptonemkomplex wird aufgelöst (Diplotän-Stadium; blaue Box 2 mit Bivalent; Abb. 1B).

Untersuchungen am Tiermodell legen nahe, dass es Kontrollpunkte (Checkpoints) in der früheren und späteren Prophase der Meiose I gibt, die dazu führen, dass Störungen in der Paarung und der Reparatur von DNA-Brüchen zum Zelltod führen können [24] und damit den Oozyten- und Follikelvorrat begrenzen. Störungen in der Paarung und DNA-Reparatur auf Grund von Mutationen oder genotoxischer Exposition können deshalb wie primäre Aneuploidien in Oogonien/Oozyten (z.B. im Ullrich-Turner-Syndrom) auch zur vorzeitigen Entleerung des Ovars, so-

genannter „premature ovarian failure“ (POF) bzw. „premature ovarian insufficiency“ (POI), wie auch zu hohem Risiko für Fehlverteilung von Chromosomen in der späteren Meiose beitragen [22]. Aus dem Mausmodell gibt es Hinweise, dass der Checkpoint, der zum Arrest nach Störungen in Rekombination und DNA-Reparatur führt, im weiblichen Geschlecht wesentlich permissiver ist als in der männlichen Meiose, so dass es nicht zum massiven Verlust von meiotisch arretierten primären Oozyten und Atresie von primordialen Follikeln kommen muss, aber Fehlverteilung von Chromosomen auf Grund früher meiotischer Störungen und Veränderungen in der Rekombination zu Aneuploidie und Infertilität führen [25].

Nachdem am Ende der Paarung und des genetischen Austausches die Homologen auseinanderweichen, besteht normalerweise am Ende dieser frühen Prophase der ersten Meiose im embryonalen Ovar jedes gepaarte, rekombinierte Chromosomenpaar aus zwei Homologen mit jeweils zwei Chromatiden (Bivalent), die nur an den Stellen, an denen Rekombination stattgefunden hat, über die Überkreuzung der Chromatiden zusammengehalten werden (Chiasmata; blaue Box 2, Abb. 1B). Dabei verhindert der Zusammenhalt der Chromatiden in jedem Homolog, dass sich die beiden ursprünglich väterlichen und mütterlichen Chromosomen voneinander lösen können.

Während im männlichen Geschlecht die Meiose im Hoden ab der Pubertät kontinuierlich verläuft, werden die primären Eizellen in der Oogenese nach dem Diplotän meiotisch arretiert (Abb. 1; Milestones 5–8) und verharren mit intaktem Kern (Keimbläschen, englisch: germinal vesicle, GV) mit weitgehend dekondensiertem Chromatin im Diktyotänstadium. Ab etwa Monat sieben der Schwangerschaft werden die letzten Eizellen im embryonalen Ovar im Diktyotän arretiert, wobei die Eizellen mit GV in der Interphase verharren, bis sie nach Wachstum und Erreichen der vollen meiotischen und Entwicklungskompetenz in der geschlechtsreifen Frau die Meiose wieder aufnehmen können (Abb. 1B, Milestone 8). Während die Fähigkeit zur Wiederaufnahme der Meiose graduell in den wachsenden Oozyten zunimmt, wird die volle Entwicklungskompetenz erst später erreicht, wenn die Eizelle nicht nur die Meiose bis zur Metaphase II der Reifeteilung bis zur Ovulation durchlaufen kann, sondern auch nach der Befruchtung und Aktivierung durch Spermien eingebrachte Faktoren die Meiose abschließen kann, das Spermienchromatin remodelliert, wobei sich ein männlicher und weiblicher Vorkern bilden und die Eizelle alle Faktoren für die frühe Embryonalentwicklung bis zur vollen zygotischen Gen-



aktivierung benötigt sind, bereitstellt. Unter anderem enthalten die PGC nur eine geringe Anzahl von Mitochondrien (ca. 10–100), deren Zahl sich in den primären Oozyten schon auf etwa  $10^3$  erhöht und in einer reifen, entwicklungsfähigen Eizelle etwa  $1\text{--}6 \times 10^5$  Mitochondrien beträgt (Abb. 1A). Mitochondrien besitzen dann wenig Cristae und eine dichte Matrix [26]. Während der Follikulogenese nehmen die Größe des Follikels auf Grund von Proliferation und Differenzierung der Granulosazellen sowie Antrumbildung zu und der Durchmesser und das Volumen der Oozyte erhöht sich erheblich auf Grund von Oozytenwachstum durch selbst synthetisierte und von Cumuluszellen bereitgestellte Genprodukte (Abb. 1A).

### 3. Bildung von Follikeln und primordiales Follikelpool

Die Oogonien und primären Oozyten, die mit der Meiose beginnen, befinden sich in Clustern, sogenannten „germ cell cysts“ oder „germ cell nests“, und sind durch Aggregation und klonale Teilungen miteinander eng verbunden. Zur Follikelbildung müssen sie sich vereinzeln und von Prägranulosazellen umschlossen werden. Viele der primären Oozyten, die die Meiose im embryonalen Ovar durchlaufen, werden aber atretisch und sterben. Es ist unbekannt, ob es sich dabei um Selektionsprozesse handelt oder nur eine kleine Anzahl der ursprünglich vorhandenen Oogonien zur Meiose und Follikelbildung determiniert ist (Referenzen in: [27]). Nur die Eizellen, die Prägranulosazellen im Ovar rekrutieren und sich zu primordialen Follikeln entwickeln können, überleben. So wird geschätzt, dass sich die Anzahl von etwa 6–7 Millionen Eizellen im Ovar zur Mitte der Schwangerschaft auf etwa 1 Million bis 500 000 Follikel zur Geburt verringert und nur etwa 300 000 beim Beginn der Pubertät noch vorhanden sind (also mehr als 90% aller ursprünglich angelegten Follikel und Oozyten sterben). Die Bildung der primordialen Follikel, die im Menschen aus einer primären Oozyte und ca. 30 flachen Granulosazellen bestehen, setzt schon im 4. Monat der Schwangerschaft ein, wobei die meisten Follikel arretiert sind, aber einige schon mit dem Wachstum beginnen, dann aber atretisch werden und sterben (Milestone 5, Abb. 1A). Nach der Geburt werden kontinuierlich einige der primordialen Follikel angeregt, von der ruhenden in eine wachsende Phase überzugehen, können sich aber nicht bis zum antralen Follikel vor der Pubertät und Ausschüttung gonadotroper Hormone entwickeln und sterben (Referen-

zen in: [28]). Die Aktivierung von primordialen Follikeln ist dabei ein nicht umkehrbarer Prozess. So sinkt der Vorrat an primordialen Follikeln weiter, bis die pulsatile, zyklische Bildung von lutenisierendem und follikelstimulierendem Hormon (LH und FSH) als Überlebensfaktoren beginnt und sich dann ab der Pubertät die ersten Follikel vom primordialen zum primären, sekundären und großen antralen Stadium weiterentwickeln (Milestones 5 folgende; Abb. 1).

#### 4. Rekrutierung von primordialen Follikeln und Übergang vom ruhenden in den wachsenden Zustand (primäre Follikel)

Beim Übergang vom ruhenden zum wachsenden Stadium des Follikels finden morphogenetische Veränderungen statt, wobei aus den flachen Granulosazellen, die die kleine (etwa 35 µm Durchmesser große) Eizelle umgeben, durch Teilungen und Veränderungen in der Zellorganisation größere prismatische, polare Granulosazellen mit epitheliales Aussehen entstehen. Die eigentliche Anregung des Wachstums wird durch Signaltransduktionsprozesse, die eine Reihe von Wachstumsfaktoren positiv steuern, und von inhibitorischen Faktoren bestimmt, die bisher nur teilweise bekannt sind.

So scheint der von Prägranulosazellen produzierte LIF (**L**eucemia **I**nhibitory **F**actor) über autokrine und parakrine Wege in den Granulosazellen Signaltransduktionswege einzuschalten, die zur Expression von KIT-Ligand in Granulosazellen führen, was mit dem Rezeptor am Oolemma in den Oozyten interagieren kann und deren Genexpression beeinflusst (Abb. 2A).

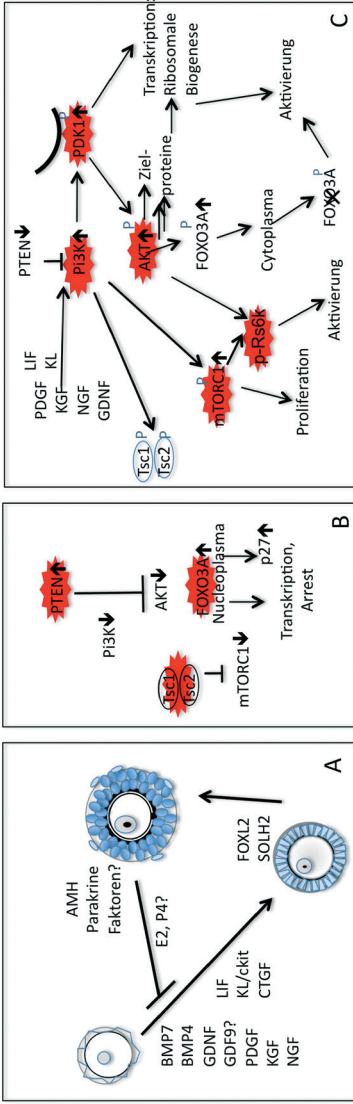
Bei der Aktivierung/Rekrutierung von primordialen Follikeln scheinen keine Gonadotropine beteiligt. Mausmodelle und Untersuchungen an menschlichen Follikeln legen nahe, dass an dem Arrest im primordialen Zustand zwei Faktoren maßgeblich beteiligt sind: FOXO3A-Transkriptionsfaktor (gehört zur O-Subklasse von „forkhead family“-Transkriptionsfaktoren) und PTEN (**p**hosphatase and **t**ensin homolog), einem negativen Regulator des Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)-Pathways (Abb. 2B). Letztere Kinase kann durch Stimulation durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden und die PDK1-Kinase und AKT-Proteinkinase über ihre Rekrutierung an die Zellmembran aktivieren [29]. Aktivierte AKT-Kinase hat viele Targets

und kann so ihrerseits Phosphorylierung von FOXO3A bewirken. Kommt es zur Inaktivierung von PTEN, Aktivierung von AKT und Phosphorylierung von FOXO3A, so wird FOXO3A aus dem Kern in das Cytoplasma der Oozyte entlassen und degradiert und die Follikelrekrutierung eingeleitet (Abb. 2C). AKT-Signaltransduktion wird von der PDK1 (**pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme1**) aktiviert, was die Translation und ribosomale Biogenese in den Eizellen stimuliert. Weiterhin wird in der AKT-Signalkaskade auch mTOR aktiviert (**mechanistic Target Of Rapamycin**). Im ruhenden Follikel ist mTORC1 durch Tsc1/Tsc2-Komplex (**Tuberous sclerosis complex 1/2**) inhibiert (Referenzen in: [30]). Der Knockout von Tsc1 in Mausoozyten führt so zur Aktivierung und zu frühzeitigem Verlust aller Follikel, POI und Sterilität [13]. Die mTORC1-Serin/Threonin-Protein-Kinase wirkt über Phosphorylierung der p70S6-Kinase auf die Genexpression, die die Zellproliferation, das Zellwachstum und die Zellzyklusprogression durch Wachstumsfaktoren stimuliert (Abb. 3C). Konstitutive aktive FOXO3A reduziert die Expression von BMP15 und Connexinen, die für parakrine Interaktionen im wachsenden Follikel notwendig sind [32] (siehe unten).

Verschiedene polyzyklische Aromaten, wie polyzyklische aromatische Hydrocarbon-7,12-dimethylbenz-[a]Anthracene (DMBA) und toxische Substanzen wie 3-Methylcholanthrene (3MC) aus Zigarettenrauch können so z.B. Überaktivierung von Pi3K und TORC1 und damit vorzeitigem Verlust von primordialen Follikeln im Tiermodell auslösen [33].

Andere Mitglieder der Forkhead-Transkriptionsfaktoren, wie FOXL2, scheinen für das Überleben der Granulosazellen essentiell und Mutationen im FOXL2-Gen führen zum syndromischen POI [34] und dem autosomal-dominantem Blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus Syndrom (BPES) Typ 1 (Referenzen in: [22]), abgesehen von anderen Entwicklungsstörungen. Weiterhin scheint das Produkt des NOBOX-Gens in Oozyten an der Bildung und Aktivierung von primordialen Follikeln beteiligt zu sein und ist für das weitere Überleben der Follikel essentiell. So konnten in einer Untersuchung bei über 6% aller Patientinnen mit idiopathischem POI Mutationen im NOBOX-Gen gefunden werden [35]. NOBOX ist ein Transkriptionsfaktor, der u.a. die Expression des Wachstumsfaktors GDF9 reguliert, der eine zentrale Rolle in der Interaktion zwischen Oozyten und den sie umgebenden somatischen Zellen spielt (siehe unten). Weiterhin gibt es eine Reihe von Hinweisen dafür, dass unter anderem die KITL/KIT-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion

## Arrest und Rekrutierung von primordiales Follikeln



**Abb. 2** Arrest und Rekrutierung von primordiales Follikeln und Beginn des Oozytenwachstums. (A) Faktoren, die Rekrutierung und Arrest beeinflussen. (B) PTEN und FOXO3A in der Regulation von Signalkaskaden und Block in der Entwicklung. (C) Wachstumsfaktoren und Stimulation von Phosphoinositol-3-Kinase, AKT und mTORC 1 in der Stimulation zum Eintritt in die Transition vom ruhenden zum wachsenden Follikel. Erhöhte oder reduzierte Aktivitäten sind durch Pfeile nach oben bzw. unten und Phosphorylierung durch blaues P angedeutet. Für weitere Erklärungen siehe Text.

den AKT-Proteinkinase-Pathway mitinduziert, aber dies scheint vor allem auch für das Überleben und nicht so sehr für die Aktivierung des Follikels von Bedeutung. Weitere Wachstumsfaktoren, die die Aktivierung möglicherweise über Anschalten des PI3K-Signaltransduktionswegs stimulieren, sind z.B. PDGF (**P**latelet **D**erived **G**rowth **F**actor), KGF (**K**eratinocyte **G**rowth **F**actor), NGF (**N**erve **G**rowth **F**actor) und der GDNF (glial-derived-growth-factor) (Abb. 2A). Weiterhin scheinen Bone-morphogenetische Proteine wie BMP4 und BMP7 aus Vorläufer-Theka- und den Granulosazellen an der Transition teilzunehmen (Referenzen in: [28]).

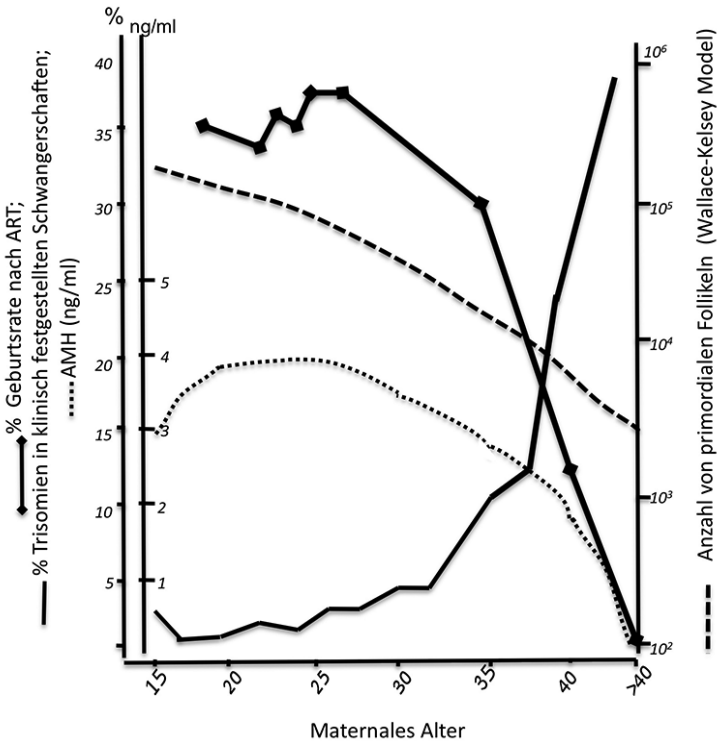
In vivo können inhibitorische Faktoren (AMH, PTEN, FOXO3A) und aktivierende Prozesse über Ruhen oder Wachsen der primordialen Follikel und deren Überleben entscheiden. Wahrscheinlich wird über eine Rückkopplung von Faktoren, die von wachsenden Follikeln gebildet werden, wie z.B. dem **Anti-Müller'schen Hormon** (AMH), die Aktivierung von Follikeln begrenzt, so dass im relativen Gleichgewicht von ruhenden und wachsenden Follikeln mit AMH-Ausschüttung stets nur eine begrenzte Anzahl von primordialen Follikeln in den wachsenden Pool eintreten, während die Mehrzahl weiter arretiert bleibt. AMH ist vor allem bei fortgeschrittenem Alter der Frau deshalb ein Marker für wachsende Follikel und für die Größe des Follikelpools (Abb. 3) [12, 36].

Die Dynamik der Follikelaktivierung ist für den Erhalt der Fertilität und Cryopreservierung von ovariellem Gewebe von besonderer Bedeutung, da nicht nur Gefrierschäden an Follikeln, sondern auch eine verminderte Ausschüttung inhibitorischer Faktoren aus vorhandenen, wachsenden Follikeln, die bei der Cryokonservierung sterben, zu Wellen von Aktivierung im Transplantat führen können. Damit kann es zur relativ raschen Abnahme der Zahl von ruhenden primordialen Follikeln mit primären Oozyten im Gewebe kommen. Umgekehrt kann die Stimulation der Aktivierung zur synchronen Entwicklung der primordialen Follikel in Follikelkultur genutzt werden, was dann eine weitere Kultivierung bis zum antralen Stadium und Gewinnung reifer Eizellen aus In-vitro-Kultur verbessern könnte [37].

Gleichzeitig ist die Expression von FIGLA (**F**actor in the **G**erm-**L**ine **alpha**) in Oozyten für die Bildung der Zona-Proteine und einiger maternaler Proteine der NALP-Familie, wie etwa MATER, für Überleben und Entwicklung der primordialen/primären Follikel essentiell. MATER wurde zunächst als maternaler Faktor identifiziert, der für die Präimplantationsentwicklung wichtig ist (maternales effect Gen, MEG), was bei Fehlen einen Arrest in der Entwicklung auslöst [38]. Transkriptom-

analysen menschlicher Oozyten aus primordialen und frühen primären Follikeln bestätigen das Vorhandensein von entsprechenden, erwarteten Transkripten, z. B. sind mRNAs von Pluripotenzfaktoren wie Oct4 (**O**ctamer-binding transcription factor **4**/POU5F1) und DPP2A (**D**evelopmental **P**luripotency gene **2A**), von Transkriptionsfaktoren wie NOBOX, SOLH1, SOLH2 und FIGLA sowie von verschiedenen maternalen Effekt-Genen wie MATER und Zar1 (**Z**ygote **a**rrest-like) vorhan-

### Follikelpool, Geburtenrate, Trisomien und AMH



**Abb. 3** Maternal-altersbedingte Veränderungen im Follikelpool [36], Prozent Geburtsrate nach ART [113], Trisomien im Embryo und Spontanaborten [2] und Veränderungen in der mittleren Konzentration von AMH. Weitere Erklärungen im Text. (Log-unjustiertes validiertes AMH-Modell; modifiziert nach [36, 12])

den, darüber hinaus aber auch mRNAs für mitochondriale Proteine wie ATPase6, das die mitochondriale DNA vor Schäden schützt [39]. In den primären Oozyten der primordialen/frühen primären Eizellen ist die Anzahl von Mitochondrien auf etwa  $10^4$  erhöht (Abb. 1A), die weitgehend metabolisch inaktiv sind (Referenzen in: [63]). Dies kann die Oozyte vor im Stoffwechsel auftretenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) schützen. Die Eizelle muss nicht alle Metabolite selbst synthetisieren, obwohl sie relativ transkriptionell aktiv ist und kann energiereiche Substrate und Metabolite wie ATP von den sie umgebenden Granulosazellen über Zellfortläufer, Gap Junctions und Transporter bekommen (Abb. 4). Der Pool an Mitochondrien kann deshalb relativ inaktiv sein, bis die Eizelle die Reifung wieder aufnimmt (Milestone 8; Abb. 1B) und der Kontakt zu den Cumuluszellen dann weitgehend durch die Muzifizierung der Cumuluszellen und Schließen von Gap Junctions unterbrochen ist [26]. Demnach ist die bidirektionale Kommunikation essentiell für die Eizellqualität und für das Überleben und die Entwicklungsfähigkeit der Oozyte und des Embryos nach der Befruchtung und Aktivierung (siehe unten).

Epidemiologische Studien beim Menschen wie auch in Tierversuchen weisen darauf hin, dass genotoxische Exposition und Störungen in der frühen Oogenese und Follikulogenese in utero zu moderatem oder ausgeprägtem Verlust von primordialen Follikeln und einer Reduktion der Fekundabilität führen können, wie etwa Rauchen (z.B. [40]) oder Einfluss von polyzyklischen Wasserstoffen während der Schwangerschaft und während der frühen Stadien der Laktation (z.B. [41]). Weiterhin scheint auch die lokale Steroidhomeostase für die Bildung und Regulation von Follikeln im Foetus wichtig (z.B. [42–44]) und kann demnach empfindlich durch Störungen von sogenannten „Endocrine Disrupting Chemicals“ (EDCs) aus der Umwelt Überleben und Qualität von Follikeln und Oozyten beeinträchtigen (z.B. Umweltgifte aus Insektiziden, Fungiziden, Herbiziden, Weichmachern etc. [45–47]). So können niedrige Konzentrationen von Bisphenol A, einem EDC, das u.a. bei Alterung und Depolymerisation von Plastik und Epoxid-Harzen freigesetzt wird und estrogenische Wirkung besitzt, zu epigenetischen Veränderungen in Eizellen führen (z.B. [48]). In BPA-behandelten nicht humanen Primaten wurden einige subtile Veränderungen in der Prophase I der Meiose sowie auch das Auftreten von multiplen Eizellen in Follikeln beobachtet, die z.B. zu Änderungen in der Rekombination, Prädisposition zu Aneuploidie und epigenetischen Mutationen bzw. zu Verlust von Follikeln und reduzierter Fertilität beitragen könnten [49].

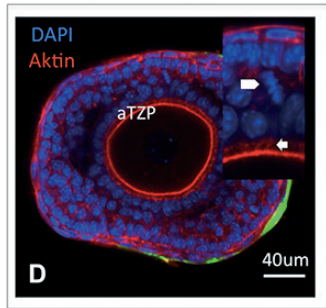
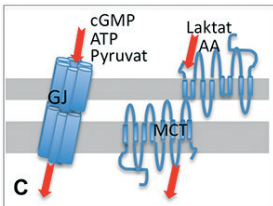
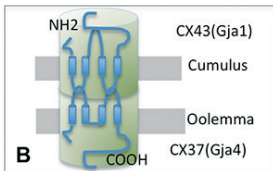
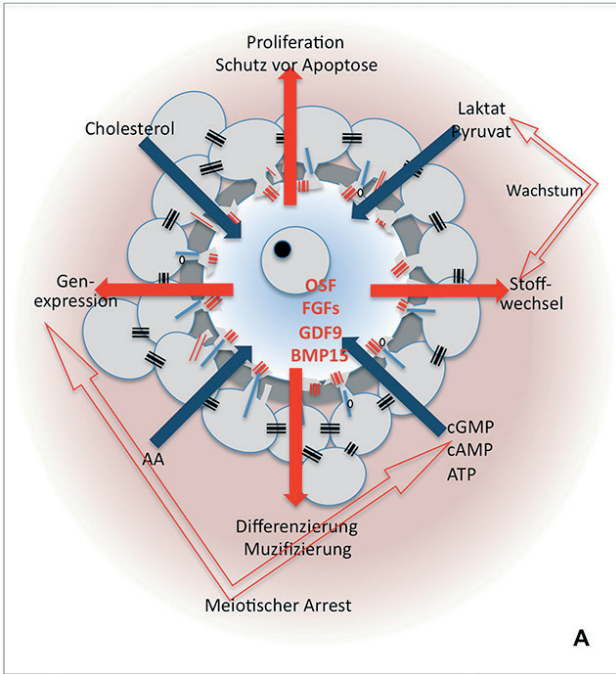
## 5. Gonadotropin-beeinflusste und -abhängige Entwicklung des Follikels vom präantralen zum antralen Stadium und Akquisition der Reifungs- und Entwicklungskompetenz der Eizelle

Bei der Entwicklung der Follikel werden auf Grund morphologischer Kriterien ruhende primordiale Follikel mit flachen Granulosazellen, die die kleine Eizelle umschließen und außen von einer Basalmembran abgeschlossen sind, von intermediären, transitorischen und primären Follikeln unterschieden, die einige oder ausschließlich kuboidale Granulosazellen besitzen, die durch Wachstum und mitotische Teilungen der Granulosazellen gekennzeichnet sind. Die Bildung von primären Follikeln und weitere Teilungsaktivität der Granulosazellen und Entwicklung zu sekundären, präantralen Follikeln ist zunächst nicht abhängig von gonadotropen Hormonen, aber es wurden inzwischen eine Reihe von Wachstumsfaktoren identifiziert, die von der Eizelle selbst gebildet werden und zur weiteren Entwicklung des Follikels über das präantrale Stadium hinaus essentiell sind. So scheinen Störungen in der Expression von Mitgliedern der Transforming-Growth-Factor- $\beta$ -Familie wie GDF9 (**G**rowth **D**ifferentiation **F**actor **9**) und BMP15 (**B**one **M**orphogenetic **P**rotein **15**) zum Block in der Entwicklung des Follikels zu führen (z.B. [50]). Obwohl Oozytenwachstum möglich ist, treten sekretorische Veränderungen in Eizellen auf [51] und GDF9-Knockout in Mäusen resultiert auch in Störungen in

**Abb. 4** Meilensteine in der Regulation der bidirektionalen Kommunikation und in Wachstum und Erreichen der vollen Entwicklungskompetenz in der Eizelle. (A) Regulation von Aktivitäten in Cumulus und somatischen Zellen durch bidirektionale Kommunikation und Oozyten-sezernierte Faktoren (OSF, FGFs, GDF9, BMP15; rote Pfeile) bzw. Metabolite und Nukleotide aus Cumuluszellen, die Eizellwachstum, meiotischen Arrest und Stoffwechsellaktivität und Genexpression in der Oozyte beeinflussen (blaue Pfeile). Schwarze kurze tripartite Balken symbolisieren Gap Junctions aus Connexin-43-Kanälen zwischen Cumuluszellen, rote heterologe Connexin 43/Connexin 37 Gap Junctions zwischen Oocyte und Cumuluszellen. Blaue Linien in TZP symbolisieren Mikrotubuli in tubulinreichen tTZPs, rote Aktin in aTZPs. Der Gradient von OSFs ist angedeutet (hellrot im Hintergrund). (B) Bausteine der aus Connexinen bestehenden Untereinheiten mit je 4 Transmembrandurchgängen der Connexine 43 (CX43) in der Cumuluszellmembran und der Connexine 37 (CX37) im Oolemma (graue Balken). (C) Geöffneter Kanal mit je 6 Untereinheiten aus Connexinen in den zwei korrespondierenden Hemikomplexen in Oozyte und Cumulus und Austausch von Metaboliten wie cGMP, ATP und Pyruvat etc. über Gap Junctions (GJ) bzw. Monocarboxylattransporter (MCTs) in Oozyten. (D) Konfokale Mikroskopie eines präantralen Follikels der Maus mit Phalloidin-rot gefärbten Aktinfilamenten im kortikalen Ooplasma und in aktinreichen transzonal Projections (aTZP; inset: weißer Pfeil), die die Zona pellucida durchspannen, zwischen Oozyte und Cumulus. Das Chromatin ist blau mit DAPI gefärbt. Im Inset ist eine Metaphaseplatte einer sich teilenden Granulosazelle zu sehen (weiße Pfeilspitze). Weitere Erläuterungen im Text. (Abb. D wurde freundlicherweise von Martyna Heiligentag, Gentechnologie, Universität Bielefeld, zur Verfügung gestellt. Elemente aus Abb. B und C wurden aus [63] modifiziert.)



Milestones in der Regulation der bidirektionalen Kommunikation



der Rekrutierung von Thekazellen [52]. Die kritische Rolle von BMP15 in der Follikulogenese und weiblichen Fertilität wurde u. a. durch Auftreten einer Mutation in einem BMP15-Allel bei Patientinnen mit hypergonadotroper Ovarialinsuffizienz bestätigt [53]. Zusammen scheinen vor allem GDF9- und BMP15-Heterodimere kooperativ Steroidsynthese und Zellproliferation und Differenzierung der Granulosazellen zu regeln, wie erst kürzlich in experimentellen Studien beschrieben wurde [54] (Abb. 4A).

Die Expression von Faktoren wie LIF aus Granulosazellen und Wachstumsfaktoren wie Kit L (SCF), das an den c-kit-Rezeptor am Oolemma bindet, bFGF (**b**asic **F**ibroblast **G**rowth **F**actor) aus der Oozyte und KGF (**K**eratinocyte **G**rowth **F**actor) aus den kuboidalen Granulosazellen der primären Follikel signalisiert das Rekrutment von Thekazellen aus dem Stroma, während aus Oozyten stammende Faktoren (Oocyte-secreted factors, OSFs) wie GDF9, BMP15 und Mitglieder der FGF-Familie (**F**ibroblast **G**rowth **F**actors) mit zur Proliferation der Granulosazellen und Thekazellen im sekundären Follikel anregen (Referenzen in: 28]). KL stimuliert im antralen Follikel die Activinexpression, was positiv die Sekretion von FSH stimuliert, während Inhibin und Follistatin die FSH-Sekretion negativ regulieren und über Bindung an Activin dessen Funktion neutralisieren können (Referenzen in: [55]). Der Insulin-like **G**rowth **F**actor (IGF)-I reguliert ähnlich wie Activin die Expression des FSH-Rezeptors in den Granulosazellen. GDF9 aus Oozyten unterdrückt die Expression von LH-Rezeptoren in benachbarten Granulosazellen und trägt über einen Chemogradienten mit dazu bei, dass eine Differenzierung der Granulosazellen in die äußeren muralen Granulosazellen und benachbarten, inneren Cumulusgranulosazellen stattfindet (Abb. 4). Die Expression der OSFs und das Wachstum der Oozyte sind deshalb wichtige Meilensteine in der Entwicklung, die über Follikel- und Oozytenqualität mit entscheiden.

Die Schritte der Entwicklung vom präantralen zum antralen und großen Graaf'schen Follikel hängen demnach eng mit einer Reihe von Signalprozessen ab, wobei die Oozyte zentral über die OSFs die Genexpression beeinflusst und an der Proliferation und Differenzierung der Granulosazellen in die äußeren muralen Granulosazellen und die inneren die Eizelle umgebenden Cumulusgranulosazellen und der Bildung des Antrum beteiligt ist. Das Follikel geht dabei von einem FSH-responsiven Zustand in einen FSH-abhängigen Entwicklungszustand über. FSH kontrolliert das Follikelwachstum und die Proliferation, was in der Granulosazell-

ausschüttung von Inhibin und Oestradiol-17 $\beta$  in dominanten Follikeln resultiert, wobei die Bildung von Androgen der Thekazellen Vorstufen für die Synthese von Oestrogen in den Granulosazellen liefert. Durch die Rückkopplung mit Granulosa- und Thekazell-sekretierten Faktoren wird zudem die Expression in der Oozyte beeinflusst. Die somatischen Zellen produzieren in Zusammenwirken mit der Oozyte negative und positive Faktoren wie etwa BMPs, Inhibine und Activine, die die Ausschüttung von Gonadotropen und die Expression von Rezeptoren wachstumsspezifisch regulieren und über Anregung der Steroidogenese das Expressionsmuster im Follikel steuern (Referenzen in: [28, 55]).

Vor allem nach Beginn der Antrumbildung findet die Vaskularisierung des Thekalayers und die steroidogene Aktivierung der Thekazellen, Estradiolbildung und weitere Differenzierung und Wachstum der Eizelle und des Follikels statt (Review in: [56]). Während der letzten Stadien der Follikulogenese nimmt die Proliferation von Granulosazellen ab. In monoovulatorischen Spezies wie dem Menschen kann im normalen Zyklus nur ein Follikel, das eine kritische Menge an FSH-Rezeptoren exprimiert, überleben und wird dominant und mehr LH-empfindlich, während die anderen großen antralen Follikel atretisch werden. Atresie wird durch apoptotischen Zelltod von Granulosazellen eingeleitet, der zunächst als der Zelltod der Thekazellen und muralen Granulosazellen vor dem der Oozyte auftritt. Atresie und Apoptose in den Granulosazellen wird durch FSH und Insulin-like-growth-factor-I (IGF-I)-vermittelte Signaltransduktion, Aktivierung von Phosphoinositol-3-kinase und AKT, der Phosphorylierung von FOXO-Transkriptionsfaktor sowie durch Oestradiol verhindert (Referenzen in: [57]), so dass es nicht zur Expression proapoptotischer Gene kommt, während Defizienz von FSH-Rezeptor, IGF-I und Oestrogen zur Aktivierung von Caspasen und Ausschüttung proapoptotischer Faktoren (z. B. Bid, Bax, Cytochrom C) aus Mitochondrien führen [57].

Es würde den Rahmen dieses Überblicks sprengen, alle Signaltransduktionskaskaden und Wechselwirkungen im Einzelnen während der fortschreitenden Differenzierung und des Wachstums des Follikels und zu den verschiedenen sukzessiven Stadien des Oozytenwachstums und der Follikulogenese aufzuführen, die an der Entwicklung der Eizelle stadienspezifisch mitbeteiligt sind bzw. über bidirektionale Interaktion zwischen Oozyte und somatischem Kompartiment und neuroregulärer Steuerung reguliert werden (zur Übersicht siehe [56, 58, 59]). Abbildung 4 gibt einen Eindruck der multiplen Interaktionen zwischen dem Cu-

muluszellkompartiment und der Eizelle und einigen Faktoren, die essentiell die Follikulogenese und Oogenese in der Interaktion zwischen Oozyte und somatischen Zellen vor allem in späten antralen Follikeln steuern. Dabei spielen die gonadotropen Hormone, FSH und LH von der präantralen bis zum antralen Stadium eine Rolle als Überlebensfaktoren und sind danach für die Steuerung der Steroidogenese und Proliferation von Theka- und Granulosazellen essentiell (Abb. 1A). Die Eizelle nimmt gleichzeitig im Volumen zu und erreicht zunächst die Fähigkeit zur Wiederaufnahme der Reifung, z.B. wenn sie nicht mehr durch inhibitorische Faktoren aus den somatischen Zellen des Follikels und aus der Follikelflüssigkeit arretiert wird (siehe unten). Obwohl sich solche nicht voll ausgewachsenen Oozyten aus antralen Follikeln bis zur Metaphase II entwickeln können und einen ersten Polkörper abschnüren, haben sie nur eine geringe Entwicklungsfähigkeit nach der Befruchtung bis zur Blastozyste und darüber hinaus. Erst in den letzten Stadien der Follikulogenese und Oogenese wird die volle Entwicklungskapazität erreicht (siehe unten). Dabei nimmt die menschliche Oozyte während des Wachstums nicht nur im Durchmesser erheblich zu (Abb. 1A), auch das Volumen des Follikels wird um  $>9 \times 10^7$  größer bei der Entwicklung vom primordialen zum großen antralen Graaf'schen Follikel [60] und die Eizelle zeigt ein zunehmendes Entwicklungspotential während Kindheit und Adoleszenz [61]. Die gesamte Entwicklung vom primordialen zum Graaf'schen Follikel nimmt beim Menschen und anderen Mammaliern wie beim Schaf und Rind etwa 6–9 Monate in Anspruch, wobei die präantralen Stadien den längsten Zeitraum einnehmen. Dabei müssen während des Wachstums Organelle wie Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum und kortikale Granula erheblich in der Anzahl zunehmen, um eine entwicklungsfähige Oozyte zu generieren und RNAs und Proteine, vor allem solche, die maternale essentielle Funktion in der frühen Embryonalentwicklung haben (maternal effect genes/proteins), in ausreichender Menge gebildet werden [62].

Während die frühen Stadien noch weitgehend von Glykolyse und aerobem Metabolismus abhängen, wird der Stoffwechsel ab dem frühen antralen Stadium zunehmend anaerob und hängt vom glykolytischen Glukosemetabolismus ab. Oozyten sind fakultative anerobe Zellen. Pyruvat und Glukose sind die wichtigsten Energielieferanten und ihre Aufnahme in die Eizelle ist maximal während der Wiederaufnahme der Reifung vor der Ovulation. Glukose wird im Follikel über den Tri-carbonsäure-Zyklus (TCA) und über den Pentosephosphat-Pathway metabolisiert.

Die Oxidation von Pyruvat durch den TCA-Pathway ist essentiell für die Oogenese und der wichtigste Energielieferant für die Kernreifung und cytoplasmatische Reifung für hohe Entwicklungskompetenz in den Eizellen, während die Oozyte nur eine eingeschränkte Kapazität zur Aufnahme und Metabolisierung von Glukose besitzt (Referenzen in: [60]). Vor allem während der späten Wachstumsphase ist die Oozyte abhängig von mitochondrialer ATP-Produktion und sie stimuliert durch „Oocyte secreted factors“ wie GDF9 und BMP15 (OSFs) die Expression von Transportern und glycolytischer Aktivität im Cumulus, der dann u.a. Pyruvat und Laktat bildet, was über Gap Junctions bzw. Monocarboxylattransporter in die Eizelle gelangen kann (Abb. 4B). Es besteht auch eine stadienspezifische metabolische Kopplung zwischen Oozyte und Cumulus, die die Aufnahme und den Transfer einiger Aminosäuren in Cumulus und Oozyte regelt. In der Maus wurde gezeigt, dass Gradienten von OSFs kooperativ mit Steroiden, Gonadotropinen und Insulin die steroidogene Aktivität und den differenzierungsspezifischen Metabolismus der somatischen Zellen in ihrer Umgebung steuern (Abb. 4A).

Obwohl die Oozyte während der Entwicklung vom präantralen zum antralen und später zum großen Graaf'schen Follikel zentral die Expression und Entwicklung im Follikel steuert, produzieren die Granulosazellen ihrerseits essentielle Metabolite für das Oozytenwachstum und sind für das Erreichen der meiotischen und Entwicklungskompetenz für die Eizelle von großer Bedeutung (Abb. 4). Dabei spielt die Kooperation über Gap Junctions aus Connexinproteinen eine zentrale Rolle. Die Granulosazellen besitzen Gap Junctions, die einmal den Stoffaustausch zwischen den somatischen Zellen im Follikel ermöglichen. Gleichzeitig sind sie über Zellausläufer, die die Zona pellucida durchspannen oder in der Zona pellucida verankert sind, den sogenannten „Transzonal Projections“ (TZPs), mit der Eizelle verbunden, so dass direkt über Gap Junctions an TZPs Stoffaustausch stattfinden kann oder die Aufnahme von sekretierten Faktoren mittels spezifischer Transporter in die Eizelle erleichtert wird (Abb. 4). Dabei nimmt die Anzahl von Gap Junctions mit zunehmender Entwicklung des Follikels, insbesondere beim Übergang vom präantralen zum antralen Stadium zu. Die TZPs sind entweder reich an Aktin (aTZPs) oder Tubulin und Mikrotubuli (mtTZPs). Vor allem tTZPs ragen durch die Zona bis zum Oolemma oder in die Eizelle und erleichtern den direkten Kontakt und Austausch von Metaboliten und Signalen (Referenzen in: [63]). Heterologe Gap Junctions aus Connexonen, einem Hexamer von Connexin 37 in Hemikanä-

len der Eizelle und Connexin 43 in Hemikanälen in den Cumuluszellen, bilden Gap Junctions, durch die Metabolite wie ATP, cAMP, cGMP, Pyruvat und andere Moleküle direkt vom Cumulus in die Eizelle gelangen können (Abb. 4B,C). Sezernierte Proteine aus Vesikeln können ausgeschüttet und an Rezeptoren an angrenzende Zellmembranen gebunden oder über Pinozytose aufgenommen werden. Monocarboxylattransporter vermitteln den Austausch von Laktat und Aminosäuren. Die aktinreichen TZP verankern die Cumuluszellen an der Zona oder am Oolemma und sind reich an Zonula adherens. Die Cumulusgranulosazellen stellen ein funktionelles Synzytium dar, da sie u.a. über homologe Connexin-43-Kanäle miteinander verbunden sind und miteinander kommunizieren. Wird die Bildung von Connexin 43, das den Stoffaustausch zwischen benachbarten Granulosazellen vermittelt, im Knockout-Mausmodell gestört, so verbleibt das Follikel im präantralen Stadium. Beim Knockdown von Connexin 37, das heterologe Gap Junctions zwischen Oozyte und Granulosazelle vermittelt, können keine ausgewachsenen Eizellen und Graaf'schen Follikel gebildet werden. Die Oozyte selbst steuert nicht nur den Stoffaustausch und Metabolismus, sondern auch die Expression von Inhibitoren in Granulosazellen, die die Oozyte an der spontanen Wiederaufnahme der Reifung hindern (siehe unten) und damit die Koordination der Reifung mit der zyklischen Ausschüttung von LH vor der Ovulation sicherstellen.

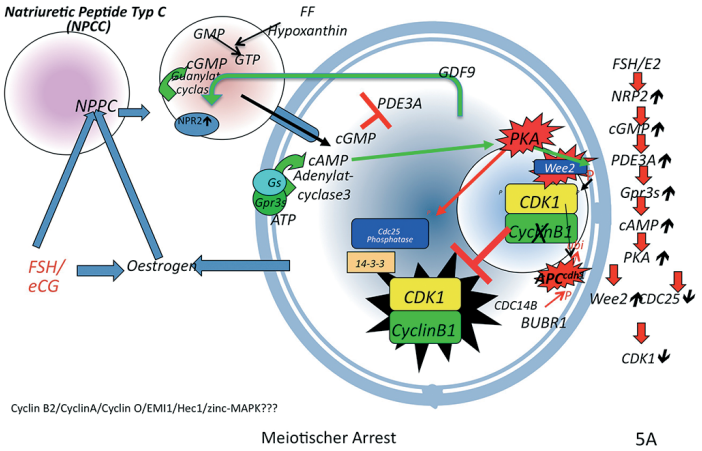
## 6. Wiederaufnahme der Reifung, Spindelbildung und Chromosomenverteilung bis zur Metaphase II

Erst wenn die Oozyte voll entwickelt ist und erheblich in Umfang und Volumen zugenommen hat, erreicht sie zunächst die Fähigkeit zur Wiederaufnahme der Reifung. Erst nach vollem Wachstum und Anreicherung von maternalen Faktoren, die für die frühe Embryonalentwicklung vor der Aktivierung der zygotischen Genexpression essentiell sind, erreicht sie auch die volle Entwicklungskompetenz. Studien in Eizellen verschiedener Spezies, einschließlich dem Menschen [64], haben gezeigt, dass die Eizelle dann in einen transkriptionell inaktiven Zustand eintritt, der sich morphologisch durch Anreicherung von kondensiertem Chromatin um den Nukleolus erkennen lässt (surrounded nucleolus, SN-Zustand; Abb. 1B), im Gegensatz zu entwicklungsdefizienten Oozyten, die einen mit NSN (non-surrounded

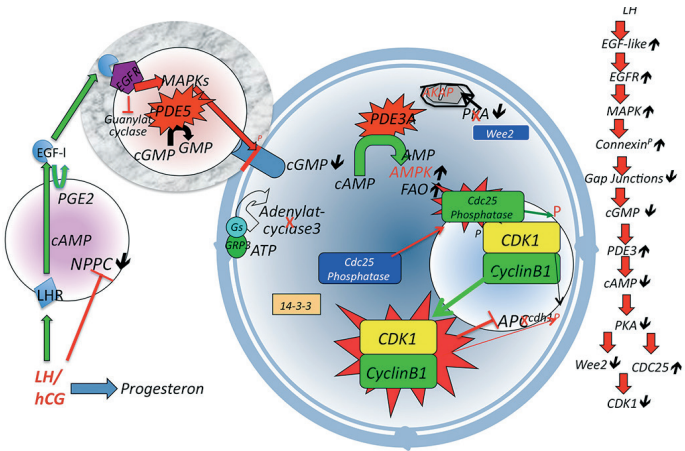
nucleolus) besitzen und ein verändertes Expressionsmuster aufweisen, wie bei der Maus gezeigt (Abb. 1B) (z.B. [65, 66]).

Vor LH-Ausschüttung verharrt die Eizelle in der Interphase und dem Dikytotän der Meiose und kann nicht in die meiotische M-Phase eintreten. Das wird durch redundante inhibitorische Mechanismen bewirkt. In der Eizelle ist konstitutiv ein orphan G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GRP3/GRP12) aktiv (Abb. 5A), der zur Aktivität von zyklischer Adenylatzyklase beiträgt, die aus ATP cAMP generiert (Referenzen in: [67, 68]). Gleichzeitig kann ATP, cAMP und cGMP aus Cumuluszellen über Zellausläufer, die „Transzonal Projections“ (TZPs), und Gap Junctions aus Connexinproteinen direkt in die Oozyte gelangen (Abb. 2A); cGMP inhibiert die Phosphodiesterase 3A (PDE3A) in der Eizelle und verhindert damit, dass aus cAMP AMP gebildet wird [69]. Der hohe cAMP-Spiegel in der Oozyte führt zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA), die ihrerseits die Wee2-Protein-Kinase (auch Wee1B genannt) über Phosphorylierung aktiviert (Abb. 5A). Letztere kann eine inhibitorische Phosphorylierung an der katalytischen Untereinheit, der CDK1-Kinase (**C**yclin-**D**ependent protein **K**inase **1**), des MPF (maturation promoting factors), des Masterregulators in der Progression von der G2-Phase zur M-Phase, bewirken. CDK1 verbleibt im Kern, die Cyclin-B1-Konzentration ist gering und CDK1 kann deshalb nicht aktiv werden, um die M-Phase einzuleiten. Außerdem wird eine CDC25A-Phosphatase über PKA phosphoryliert, bleibt im Zytoplasma an ein 14-3-3-Protein gebunden und kann somit nicht die inhibitorische Phosphorylierung am CDK1 aufheben [70, 71]. Ein Enzymkomplex, der die Ubiquitylierung von Cyclin B1, der regulatorischen Untereinheit des MPF, bewirkt, ist aktiv: der sogenannte „Anaphase Promoting Factor C“ (APC/C) mit dem Cdh1-Protein als Koaktivator, das die Substrate von APC/C<sup>cdh1</sup> z.B. Cyclin B1 erkennt. Die Ubiquitylierung führt zum Abbau von Cyclin B1 durch das Proteasom, so dass die Konzentration dieser regulatorischen Untereinheit des MPF gering bleibt und nicht genügend MPF für den Eintritt in die M-Phase vorhanden ist (Referenzen in: [72]).

In den letzten Jahren wurden darüber hinaus im Mausmodell weitere konservierte Schlüsselkomponenten im meiotischen Arrest in Oozyten im antralen Follikel identifiziert. FSH und Oestrogen regen die Bildung des Natriuretic-Peptids Typ C (NPPC oder **C**-type **N**atriuretic **P**eptide, CNP) in muralen Granulosazellen an und der Oozyten-produzierte Faktor GDF9 stimuliert die Bildung von Rezeptoren an den Cumuluszellen (NRP2) sowie eines Enzyms, Inositol Monophosphat Dehydro-



Cyclin B2/CyclinA/Cyclin O/EMI1/Hec1/Hec1-zinc-MAPK???



**Abb. 5** Milestones in Zellzyklusregulation in Eizellen während des meiotischen Arrests (A) und bei der Wiederaufnahme der Meiose (B). Links sind murale und Cumulusgranulosazelle schematisch dargestellt, rechts die von der Zona umgebene Oozyte. Rechts außen sind die wichtigsten Schritte in Aktivierung (schwarzer Pfeil nach oben) bzw. niedriger Aktivität (schwarzer Pfeil nach unten) dargestellt. Weitere Erklärung im Text. (modifiziert nach: [67, 69, 73, 114])



genase (IMPDH), was zur Synthese von GTP beiträgt (Abb. 5A) [73]. Hypoxanthin in Follikelflüssigkeit (in der Maus) wird über Bildung von Inosin und Inosinemonophosphat zum Substrat für die IMPDH- und GTP-Produktion und trägt damit zum Arrest bei, indem viel GTP zu Bildung von cGMP zur Verfügung steht (Abb. 5A). Die Sekretion von NPPC führt über Bindung an den Rezeptor auf Granulosazellen zur Stimulation einer Guanylatcylase in den Cumuluszellen, die GTP zu cGMP umwandelt und damit den cGMP-Spiegel im Cumulus erhöht. cGMP gelangt über die TZPs und Gap Junctions in die Oozyte, wo es die PDE3A inhibiert, die damit nicht cAMP in der Eizelle zu AMP abbauen kann. Somit bleibt der cAMP-Spiegel hoch und die Oozyte kann nicht in die M-Phase eintreten (Abb. 5A) (Referenzen in: [68]).

Die Initiation der Wiederaufnahme der Reifung in der Eizelle wird indirekt erst durch die Ausschüttung von LH ausgelöst (Abb. 5B). Oozyten besitzen keinen LH-Rezeptor und unterdrücken durch GDF9 die Expression von LHR in den Cumuluszellen in Form eines Gradienten während der antralen Follikulogenese (Abb. 2B). Jedoch kann LH an den LH-Rezeptor in Theka- und muralen Granulosazellen binden und dadurch Signaltransduktionswege induzieren, die einmal zur Bildung von EGF-ähnlichen (**E**pidermal **G**rowth **F**actor-like, EGF-I) Proteinen führen, Epregrulin, Amphiregulin und Betaregulin. Die Induktion von Prostaglandin E2 durch EGF-Rezeptor-vermittelte Stimulation der Genexpression fördert in einem Feedback die Bildung von EGF-I Protein, das an den EGF-Rezeptor (EGFR) an den Cumuluszellen binden kann (Abb. 5B). Die Aktivierung von Kinasen (MAPKs) und Signalkaskaden in den Cumuluszellen führt zur Aktivierung einer Phosphodiesterase PDE5, die cGMP zu GMP umwandelt (Referenzen in: [68]). Gleichzeitig führt die Phosphorylierung von Connexinprotein zur Schließung von Gap Junctions (Referenzen in: [63]), primär zwischen benachbarten Cumuluszellen. Zusammen mit der progressiven Verschleimung von Cumuluszellen führt das allmählich zum Verlust des Kontakts zwischen benachbarten Cumuluszellen und zwischen Cumulus- und Eizelle über TZPs. Somit sinkt cGMP in den Eizellen, die PDE3A wird nicht mehr inhibiert und aktiv und wandelt cAMP in AMP um. Die PKA wird zu den Mitochondrien transportiert und bindet dort an A-Kinase-bindende Proteine (AKAP), was zur Inaktivierung führt (Abb. 5B) [68]. Die WEE2-Kinase wird nicht mehr aktivierend durch PKA phosphoryliert und CDC25-Phosphatase wird aktiv, gelangt in den Kern und kann die inhibitorische Phosphorylierung von CDK1 aufheben. Wird einmal eine kleine Menge an CDK1/CyclinB1, also MPF aktiviert, so kann der nun aktive MPF das Cdh1-Protein am APC/C<sup>cdh1</sup> phosphorylieren und damit allmählich zu des-

sen Degradation durch das Proteasom beitragen. Die Inaktivierung des APC/C<sup>cdh1</sup> wird induziert und damit Cyclin B1 nicht mehr degradiert, so dass der Anstieg in MPF-Aktivität weiter gefördert wird (Abb. 5B). Über Feedbackmechanismen und Autophosphorylierung steigt die MPF-Aktivität weiter und damit tritt die Eizelle vom G2-Stadium in die erste meiotische M-Phase ein (Referenzen in: [72]).

Bisher ist nicht im Einzelnen geklärt, welche Rolle in Arrest und Wiederaufnahme der Reifung andere Cycline (Cyclin B2, Cyclin O und Cyclin A) und ein Faktor des Centromers (HEC1) haben (z.B. [75–77], siehe Abbildung 5A unten, Faktoren mit ungeklärter Funktion mit Fragezeichen gekennzeichnet). Dagegen wurde in letzter Zeit klar, dass die Zink-Homeostase in der Regulation von Inhibitoren eines Faktors, der APC/C<sup>cdh1</sup> regulieren kann (EMI1), einen Einfluss hat und damit ein Anstieg von Zink im Ooplasma mit zum Eintritt in die Reifung beiträgt. Zumindest im Mausmodell führt Zink-Defizienz entsprechend zum Verlust der Fertilität im weiblichen Geschlecht (Referenzen in: [30]). Es scheint demnach, dass es redundante Mechanismen gibt, die den Arrest der Eizelle im unreifen Follikel sicherstellen und auch an der Wiederaufnahme der Reifung beteiligt sind. So scheint z.B. in der Mausoozyte die Bildung von AMP durch PDE3A zur Aktivierung von AMP-Kinase zu führen, die den Fettstoffwechsel aktiviert. Inhibition der AMP-Kinase kann die Reifung verhindern und ihre Stimulation selbst in Anwesenheit von Inhibitoren der PDE3A (z.B. Cilostamid) die Reifung induzieren [78]. Diese Befunde zeigen die enge Verflechtung der Signalkaskaden und Mechanismen in der Eizelle und in der Oozyten-Cumulusinteraktion und die Relevanz des Metabolismus in der Homeostase in der Eizelle, die entscheidend die Eizellqualität beeinflussen kann (Referenzen in: [79, 80]). Störungen im Metabolismus z.B. bei Fettleibigkeit, Diabetes etc. können nicht nur zu verminderter Eizellqualität auf Grund von Störungen im Wachstum und Erwerben der meiotischen und Entwicklungskompetenz führen, sondern auch die Reifung von Oozyten beeinträchtigen.

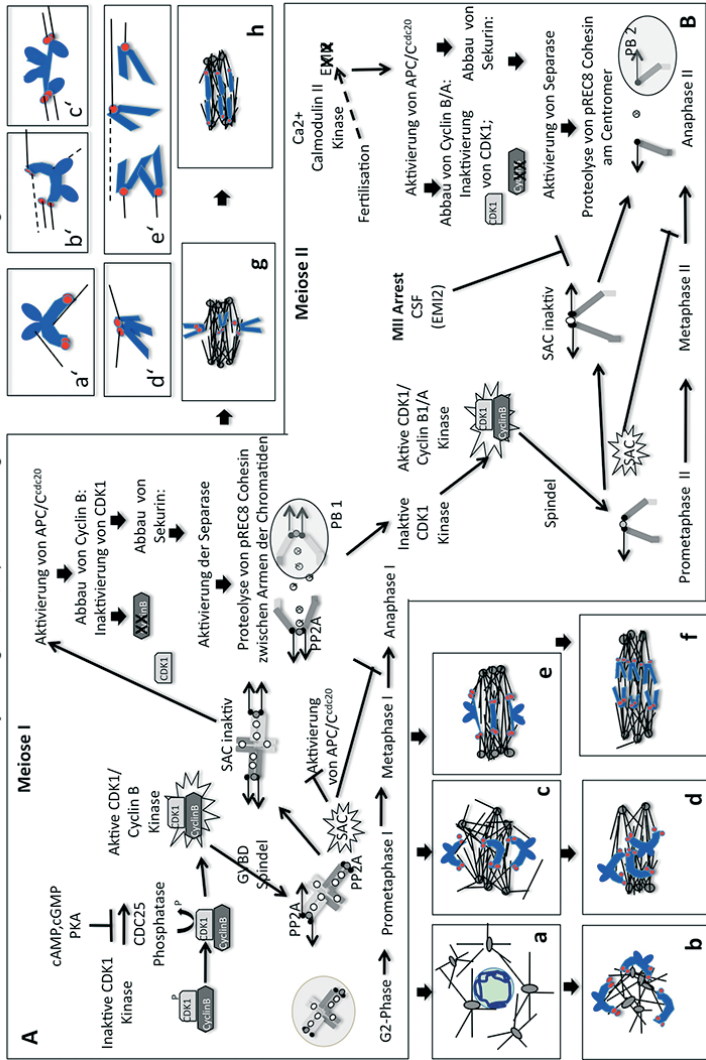
## 7. Reifung, Spindelbildung und Chromosomentrennung

Nach der Wiederaufnahme der Reifung führt die Aktivierung von MPF zur Kondensation des Chromatins, Auflösung der Kernmembran und Spindelbildung (Abb. 6A). Die Vorgänge während Spindelbildung und Chromosomentrennung sind am

besten in der *in vitro* reifenden Mausoozyte untersucht (z.B. [81]) und obwohl es einige Unterschiede zwischen den Spezies gibt, sind sie offenbar weitgehend in Mammaliern konserviert. Zunächst werden in der Mausoozyte noch vor Auflösung der Kernmembran (GVBD) viele Astern aus Mikrotubuli gebildet, die an nicht centriol-haltigen Centrosomen mit Mikrotubulus organisierendem Material, sogenannten MTOCs, angeheftet sind (Abb. 6A). Nach GVBD ordnen sich dann die bivalenten Chromosomen mit ihrer langen Achse parallel zu einem zentralen Ball aus Astern mit ihren Centromeren nach innen in Form eines Balls außen an, ein Stadium, das als „circular bivalent“ bezeichnet wird (Abb. 6B) [81]. Oozyten besitzen keine Paare von Centriolen, die an den Spindelpolen von somatischen Zellen zusammen mit perizentriolärem Material auftreten und zur Fokussierung der Spindelpole beitragen. Stattdessen besitzen Oozyten multiple Mikrotubulus-organisierende Zentren (MTOCs), die mit perizentriolärem Material angereichert sind, z.B. mit Perizentrin und gamma-Tubulin, das für die Initiation von Tubulinpolymerisation und Bildung der Spindelmikrotubuli wichtig ist (Referenzen in: [1, 82]). Entsprechend gibt es in Oozyten nicht schon zwei kleine Halbspindeln vor Kernmembranauflösung, die nach deren Auflösung ein bipolares Gerüst für die Spindelbildung und Chromosomenanheftung bereitstellen. Vielmehr müssen sich eine Vielzahl von MTOCs allmählich an den Spindelpolen anreichern und eine bipolare Spindel bilden, die relativ flache Pole besitzt und ohne viele astrale Mikrotubuli ist, die von den Spindelpolen wegragen (sogenannte „barrel-shaped, unastral bipolar spindle“) (Abb. 6a-h).

Entsprechend bilden sich im Ooplasma schon vor Kernmembranauflösung an den MTOCs multiple Astern aus Mikrotubuli aus, die sich danach zentral als großes Mikrotubulusgeflecht aus vielen Astern im Zellinneren anreichern, wobei die Chromosomen außen auf diesem Ball von Spindelfasern liegen. Auf Grund bisher ungeklärter Prozesse ordnen sich dann aber allmählich die Astern um, so dass zunächst eine kurze bipolare Struktur entsteht, auf der sich die Chromosomen in Form eines hohlen Rings außen in einer Ebene anordnen (Abb. 6c). Zumindest in Oozyten der Maus, in denen die Spindelbildung mittels hochauflösender konfokaler Mikroskopie von lebenden *in vitro* reifenden Eizellen kontinuierlich untersucht wurde [81], nehmen die Centromere der Homologen in den bivalenten Chromosomen erst danach Kontakt mit den Mikrotubuli der zentralen Spindel auf, werden verankert und gelangen auch in den inneren Bereich der Spindel während der Prometaphase I (Abb. 5d,e). Dabei können überwiegend zunächst Anheftungen, die nicht nur monopolar

# Milestones in Zellzyklusregulation, Spindelbildung und Chromosomentrennung



**Abb. 6** Milestones in der Regulation des Zellzyklus und der Chromosomentrennung in der Meiose I (A) und Meiose II (B) und in der Spindelbildung (a-h) und in der Chromosomenanheftung (a-e) während der Oozytenreifung. Chromosomen: blau; Centromere: rot; in a-ha'-e'. Weitere Erklärung im Text. (modifiziert nach [1,7])

sind, auftreten (Abb. 6a'b'), so dass von dem Centromer eines homologen Chromosoms oder seiner beiden Chromatiden eine bipolare statt monopolare Anheftung zu Mikrotubuli von beiden Spindelhälften gefunden wurden (als amphitel bzw. merotel bezeichnet Abb. 6b') [81]. In einer verhältnismäßig langen Prometaphase I oszillieren die Bivalente anschließend zwischen den Polen hin und her, es kann zur Umkehrung in der Orientierung an Spindelpolen oder zu rein monopolen Anheftungen und Wanderung hin und her kommen, bis in der Metaphase I ein stabilerer Zustand erreicht wird, in dem die Bivalente normalerweise in der Mitte der Spindel, am Spindeläquator eingeordnet sind (Abb. 5e,c'). Dabei sind die eng miteinander verbundenen Centromere der Geschwisterchromatiden eines Homologen an dem einen Spindelpol angeheftet (sogenannte synthele Orientierung; Abb. 5c'; Abb. 1B) und die des anderen Homologs zum entgegengesetzten Spindelpol ausgerichtet. Die Homologen eines jeden Bivalents stehen in der späten Metaphase I unter Spannung, da sie mit Chiasmata physikalisch miteinander verbunden sind. Entsprechend liegt das erste proximale Chiasma in der Spindelmitte (Abb. 6e,c'). Die Arme des mehr distalen Chromosoms jenseits des ersten Chiasmata sind relativ kondensiert, da sie nicht unter Zugspannung stehen, während die proximalen Arme der Homologen vom ersten Chiasma an bis zum Centromer gestreckt sind und ihre Centromere je nach Lage des ersten Chiasmata mehr oder weniger weit von der Spindelmitte entfernt symmetrisch angeordnet sind (Abb. 6c').

Kommt es zu Störungen, die die Spindelbildung, die Anheftung, vor allem aber die Anordnung der Chromosomen beeinträchtigen, kann es zur Fehlverteilung der Chromosomen und Aneuploidie kommen. Zum Beispiel können Störungen in der Rekombination zwischen Homologen im embryonalen Ovar zum Auftreten von Univalenten führen, die zwei Chromatiden besitzen, aber nicht über Chiasmata mit dem entsprechenden homologen Chromosom verbunden sind. Dann gibt es ein hohes Risiko für eine zufallsgemäße Anheftung und Wanderung beider Homologen zu nur einem Pol. Darüber hinaus besteht ein Risiko, dass sich die beiden Chromatiden des Univalents an gegenüberliegende Pole statt nur einen Pol anheften und dann in der ersten statt in der zweiten Meiose voneinander getrennt werden (Referenzen in: [1]). Selbst wenn dieses bei beiden Univalenten auftritt und der erste Polkörper und die Oocyte dann jeweils zwei Chromatiden eines jeden Chromosoms besitzen, ist die Gefahr groß, dass die beiden Chromatiden dann in der zweiten Meiose zufallsgemäß nur zu einem Pol wandern und dass damit ein

Fehler in der Verteilung von Chromosomen und Aneuploidie in den Eizellen und im Embryo auftritt. Selbst wenn Chiasmata vorhanden sind, aber die Kohäsion zwischen den Chromatidenarmen oder sogar Centromeren verloren geht, kann dies zum Auftreten funktioneller Univalente oder Chromatiden in der ersten Reifeteilung kommen und damit zum Risiko für Fehlverteilung führen, da Kohäsionskomplexe nur einmal in der frühen Prophase I gebildet und während des langen Arrests im Diktyotänstadium offenbar nicht mehr erneuert werden können [83, 84]. Multivalente, die auf Grund von Rekombinationsprozessen zwischen Chromosomen mit balancierten reziproken Translokationen oder Robertson'schen Translokationen auftreten, führen auch zu erhöhtem Risiko für Chromosomenfehlverteilung, wenn sie die korrekte Orientierung und Trennung homologer Chromosomen stören [17]. Ungewöhnliche Anheftungen, z.B. von dem Centromer eines Chromosoms an beide Spindelpole, die gehäuft in der Prometaphase I der Meiose in der Oogenese auftreten, müssen über Mikrotubulus depolymerisierende Enzyme depolymerisiert werden (Abb. 6b,e') (z.B. [85, 86]). Kommt es zu Störungen in Expression und Regulation dieser Prozesse oder tritt die Eizelle zu früh in die Anaphase I ein, bevor solche Anheftungen aufgelöst werden, so besteht ein Risiko für gestörte Wanderung (Chromosome Lagging, Abb. 6e'), Fehlverteilung, Mikronukleusbildung und Aneuploidie (Referenzen in: [1]).

Der Eintritt in die Anaphase der ersten Reifeteilung wird einmal durch die Inaktivierung des MPF über die Degradation seiner regulatorischen Untereinheit, Cyclin B1, ausgelöst (Abb. 6A). Dabei führt die Aktivierung des APC/Cs mit dem Kofaktor Cdc20 (APC/C<sup>cdc20</sup>) zur Polyubiquitinylierung von Cyclin B1 und dessen Degradation (Abb. 6A). Ein anderes Target der APC/C<sup>cdc20</sup>-Ubiquitin-Ligase ist ein Sekurinprotein, das vor Eintritt in die Meiose im Komplex mit Separase, einer Protease, auftritt. Die Komplexbildung mit Sekurin hält Separase im inaktiven Zustand. Wird Sekurin nach Eintritt in die Anaphase I über APC/C<sup>cdc20</sup>-Komplex polyubiquiniert und degradiert, wird Separase freigesetzt und aktiv und kann phosphorylierte Kohäsionsproteine (Rec8, als kleine Ringe in Abb. 6A sichtbar) zwischen den Armen der Chromatiden in den homologen Chromosomen proteolytisch spalten. Das führt zum Öffnen von Kohäsionsringkomplexen, die die Geschwisterchromatiden zusammenhalten (siehe Abb. 1B), so dass sich die Chromosomenarme voneinander lösen können (Abb. 6A). Damit kommt es zur Auflösung der Chiasmata und Homologe können sich voneinander trennen (Abb. 6A rechts), wobei je ein Homo-

log mit beiden Chromatiden in den ersten Polkörper gelangt (PB1) und eines in der Oozyte verbleibt. Es ist aber essentiell, dass die Kohäsionsproteine am Centromer der Chromatiden in der ersten Meiose nicht phosphoryliert sind und sie deshalb nicht von Separase gespalten werden, so dass der Kontakt zwischen Centromeren erhalten bleibt. An den Centromeren sind Proteine wie Shugoshin angereichert, die zur Rekrutierung von Phosphatasen (PP2A) führen, die eine Phosphorylierung von Rec8-Protein in Kohäsionskomplexen am Centromer (dunkle Kreise in Abb. 6A) verhindern. Die Centromere der beiden Geschwisterchromatiden können sich dann in der zweiten meiotischen Metaphase in der Spindelmitte anordnen und an entgegengesetzte Pole anheften, so dass die Chromatiden in der Meiose II – ähnlich wie in der Mitose – am Spindeläquator angeordnet sind (Abb. 6d',g) und die Chromatiden in der Anaphase II nach Aktivierung von APC/ $C^{cdc20}$  voneinander getrennt werden (Abb. 6B) (Referenzen in: [1]).

Normalerweise wird die erste Anaphase der Meiose erst eingeleitet, wenn alle Chromosomen angeheftet sind, also dann auch normalerweise stabil am Spindeläquator angeordnet sind. Der sogenannte „Spindle Assembly Checkpoint“ (SAC) stellt sicher, dass dieser Zustand erreicht wird, bevor die Anaphase eintritt (Abb. 6A,B). Er wird durch ein komplexes Netzwerk aus Komponenten am Centromer aus Motorproteinen, Kinasen und Strukturproteinen vermittelt, das Sensoren für die Sättigung des Centromers mit Spindelfasern besitzt. Fehlt die Anheftung, wie in Abb. 6A in der späten Prometaphase I angedeutet, kommt es zur Bildung und Freisetzung von Proteinen mit einer spezifischen Konformation (Mad2; Review in [87]), was zur Bildung eines inhibitorischen Komplexes, des „Mitotic Checkpoint Complexes“ (MCC), führt, der an  $cdc20$  bindet und damit die Aktivierung von APC/ $C^{cdc20}$  verhindert. Ein solcher SAC wurde in somatischen Zellen, Spermatozyten und Oozyten gefunden, aber er scheint in Oozyten relativ permissiv, verglichen mit anderen Zelltypen, möglicherweise auf Grund des Volumens der Oozyte, die die Verteilung und Komplexbildung im MCC beeinträchtigen könnte (Referenzen in: [1]). Da außerdem nicht die Lokalisation und Art der Anheftung, sondern nur die Sättigung (und Zugspannung) in der späten Metaphase I detektiert werden, könnten auch Probleme bei der Auflösung irregulärer merotelischer Anheftungen (Anheftung zu beiden Spindelpolen, die nicht durch Mikrotubulus-Depolymerasen aufgelöst wurden, wie in Abb. 6b' gestrichelt gezeichnet) mit zur besonderen Anfälligkeit für Chromosomenfehlverteilung in der menschlichen Eizelle, insbeson-

dere in gealterten Oozyten führen (diskutiert in: [1, 86]). Gegenwärtig wird auch postuliert, dass es zu einem Verlust von Chromosomenkohäsion während des langen Zeitraums des meiotischen Arrests im Diktyotänstadium kommt [83, 84]. Da diese Kohäsionsproteine nicht neu gebildet und ersetzt werden [84], kann der Verlust während des jahrzehntelangen Verharrens in der G<sub>2</sub>-Phase zur vorzeitigen Auflösung der Chiasmata und Prädisposition von Fehlverteilung von Chromosomen/Homologen bzw. Chromatiden beitragen [83] und zufallsgemäße Anheftung und Trennung begünstigen. Darüber hinaus legen mehrere Untersuchungen des Transkriptoms von gealterten Oozyten nahe, dass Genprodukte des SAC, der Spindelbildung, der Regulation von dynamischen Prozessen der Mikrotubuluspolymerisation und der Mikrotubulus-Motorproteine sowie solche Transkripte, die die Aktivität von Mitochondrien beeinflussen, verändert sind, was zum hohen Risiko für Fehlverteilung von Chromosomen in Oogenese und früher Embryonalentwicklung beitragen kann [1, 88–92]). Da nach der Wiederaufnahme der Reifung die Genexpression über sequenzielle und hochregulierte Rekrutierung von gespeicherter mRNA in Eizellen bis zur zygotischen Genaktivierung reguliert wird, können auch Störungen in der stadienspezifischen Speicherung, Polyadenylierung und Degradation von mRNAs, die für Metabolismus, Spindelbildung und frühe Embryonalentwicklung essentiell notwendig sind, zu verminderter Eizellqualität und reduziertem Entwicklungspotential führen.

## 8. Abschluss der Meiose und Eizellbildung

Die Meiose in Eizellen wird erst beendet, wenn Fertilisation und Aktivierung eintreten. Die Eizelle verharrt bis dahin in der Metaphase II der Meiose, obwohl sie eingeordnete und angeheftete Chromosomen besitzt, was normalerweise in anderen Zellen den SAC inaktiviert und zum Eintritt in die Anaphase führt (Abb. 6B). Eizellen enthalten aber Proteine des sogenannten „Cytostatic Factors“ (CSF), was man durch Injektion von Ooplasma in somatische Zellen und Blastomeren nachweisen konnte, die zum M-Phase-Block führen. Die Natur des CSF ist erst in den letzten Jahren in Mammalieroozyten weiter aufgeklärt worden. In den Oozyten wird dabei ein Protein synthetisiert, EMI2 (**E**arly **M**itotic **I**nhibitor **2**), das an den APC/*C<sup>cdc20</sup>* bindet, ihn inaktiv hält und damit die Ubiquitylierung und Degradation von Pro-



teinen wie Cyclin B1 und Sekurin verhindert oder zumindest herabsetzt. Die Aktivität von EMI2 scheint dabei von der Bindung an Zink abhängig. Die Freisetzung von Calcium nach der Fertilisation führt zur Aktivierung einer Calcium-Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMKII), die EMI2 phosphoryliert, einer Bindung von Zink an EMI2-Cofaktoren, und deren Ausschüttung bewirkt (Referenzen in: [30]), was damit die Inaktivierung und Degradation von EMI2 durch das Proteasom auslöst (Abb. 6B). Da APC/C<sup>cdc20</sup> aktiv wird, kann es Cyclin B1 und Cyclin A2 ubiquitinylieren, was zur Degradation führt, und damit die Inaktivierung des MPF und Chromatidentrennung bewirkt [75]. Sekurin wird degradiert, Separase freigesetzt und die in der zweiten Meiose phosphorylierten Kohäsionsproteine (Rec8) am Centromer der Geschwisterchromatiden proteolysiert, was die Trennung der Chromatiden auslöst (Abb. 6B, rechts unten). Die Eizelle geht in die Anaphase II, der zweite Polkörper wird abgeschnürt und das haploide Genom der Oozyte wird am Ende der Meiose II im weiblichen Vorkern dekondensiert, während das Chromatin des Spermiums dekomplexiert und von einer neuen Kernmembran im männlichen Pro-nukleus umgeben wird (Referenzen in: [1]).

## **9. Länge der Reproduktionszeit, Größe des Follikelpools und genetische und nicht genetische Determinanten der Oozytenqualität und Fertilität**

Störung im Erreichen der Milestones zu allen Stadien der Oozytenbildung können weitreichende Folgen für Qualität und Entwicklungspotential der Eizellen und Fertilität und Gesundheit des Embryos und der Nachkommen haben. Mutationen und Veränderungen, die zu einer Verringerung der PGCs oder ihrer Reprogrammierung führen, können nicht nur die Größe des Oozyten- und Follikelpools beeinträchtigen, sondern auch zu kongenitalen Pathologien beitragen, wenn sie die epigenetische Regulation der Genexpression beeinträchtigen. Störungen in der Prophase I der Meiose auf Grund von Mutationen oder Einflüssen durch Umweltfaktoren können nicht nur zum irreversiblen Arrest oder Apoptose und Atresie führen, sondern auch zu Prädisposition zur Aneuploidie oder POI und möglicherweise auch zum Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) beitragen. Störungen in Rekrutierung und Erhalt von primordiales Follikeln sind kritisch, da sie vor allem den Vorrat, aber auch

die hormonelle Homeostase beeinträchtigen können und damit POI und vorzeitige Alterung auf Grund des physiologischen Alters und Entleerungsgrades des Ovars mit sich bringen (Referenzen in: [93]). Chemotherapie kann so nicht nur wachsende Follikel und Oozyten direkt schädigen [94], sondern auch durch Störungen und apoptotischen Zelltod im somatischen Kompartiment den Erhalt der Oozyten beeinträchtigen [93]. Zum Erhalt der Fertilität können Oozyten, Embryonen oder ovarielles Gewebe cryopreserviert werden. Die ovarielle Unterdrückung durch Gonadotropin-Releasing-Hormon-Analoga (GnRHa) wird kontrovers diskutiert. Cryopreservierung von Ovargewebe ist gegenwärtig die einzige Option zum Fertilitätserhalt bei Einsatz einer aggressiven Chemotherapie bei präpubertalen Patientinnen [95].

Weiterhin können auf Grund von Störungen z.B. durch altersbedingt auftretende Anreicherung toxischer Metabolite (z.B. ROS, reaktive Carbonylmetabolite und Bildung von „advanced glycation end products“, AGEs) [95, 96], Mutationen und Funktionsstörungen in Mitochondrien, Zellorganellen, Membranen und Genexpression und Proteindegradation irreversible Schäden in Eizellen akkumuliert werden, die nicht nur später bei der Wiederaufnahme der Reifung Störungen in der Spindelbildung, der Zellzyklusregulation und der Chromosomenverteilung auslösen, sondern auch die Entwicklungsfähigkeit des Embryos vermindern. Schädigungen der Mitochondrien durch ROS, Lipidoxidation und Änderungen im Redoxpotential können Transkription und Spindelbildung beeinträchtigen, wenn lokal (z.B. in der Spindel) nicht ausreichend ATP für Motorproteine und Enzymaktivität vorhanden sind [1, 26]. Da während des Wachstums auch das maternale Imprinting stattfindet, können Störungen, z.B. durch genotoxische und endokrin wirkende Substanzen oder Kryopreservierung und Kultur zu Epimutationen beitragen, die erst im Embryo, Foetus oder den adulten Nachkommen die monoallele Genexpression geprägter Gene beeinträchtigen und das Risiko für epigenetisch bedingte Erkrankungen erhöhen.

Neben Altern und Verringerung des Follikelpools [98] und veränderter hormoneller Homeostase (diskutiert in: [1]) kann auch eine Veränderung in der hormonellen Homeostase auf Grund von metabolischen Pathologien, Lebensstil und Umweltgiften neben dem chronologischen Altern der primordialen Follikel und Oozyten die Interaktionen zwischen dem somatischem Kompartiment, der hormonellen Steuerung und der Eizelle beeinträchtigen [99], so dass es zu Ver-

änderungen in der Genexpression, Anreicherung maternaler Faktoren und Beeinträchtigung in der Funktion von Zellorganellen kommen kann, die ebenfalls die Reifung und Qualität der Oozyten reduzieren und damit zu niedrigen Schwangerschaftsraten nach spontaner wie auch In-vitro-Fertilisation führen. Die Follikel von Primaten produzieren angiogene Wachstumsfaktoren (z.B. [100]). Unzureichende Vaskularisierung kann vor allem die späten Phasen der Oozytenentwicklung und das Wachstum beeinflussen, da Sauerstoff für die Steroidogenese und den Stoffwechsel im somatischen Kompartiment wie in der Oozyte die Reifungs- und Entwicklungsfähigkeit beeinträchtigen kann, weil im großen Follikel Sauerstoff nur über Diffusion bis zu dem Cumulus-Oozyten-Komplex gelangt. Letztlich ist die Eizelle vor allem bei der Wiederaufnahme der Reifung während der Spindelbildung und der Chromosomentrennung anfällig für Veränderungen in Temperatur, metabolischer Insuffizienz und Noxen, die auf Zellzyklus, Chromatin, Spindelbildung und Genexpression wirken [1, 101].

Die Alterung des Ovars ist ein multifaktorieller Prozess, der sowohl von genetischen, physiologischen und Umweltfaktoren beeinflusst wird und zur dramatischen Zunahme an Chromosomenfehlverteilung z.B. auf Grund vorzeitiger Chromatidentrennung [19] und verminderter Entwicklungskompetenz und hormoneller Stimulierbarkeit führt [98]. Im Tiermodell kann kalorienreduzierte Kost zu einer Verbesserung der Oozytenqualität in alternden Müttern und zur Reduktion in der Rekrutierung von primordiales Follikeln führen [102, 103], während Fettleibigkeit zur Reduktion der Oozytenqualität und Sub- oder Infertilität beiträgt (Referenzen in: [80]). Ob und wodurch Altersprozesse, die zum Verlust von Kohäsinsproteinen und vorzeitiger Trennung von Chromatiden führen und damit die Oozyte prädisponieren für Aneuploidien, induziert oder verhindert werden können, ist gegenwärtig nicht bekannt. Die Vitrifikation reifer Metaphase-II-Oozyten könnte eine Option zur Vermeidung von Altersschäden darstellen und damit die Möglichkeit für Schwangerschaft in weiter fortgeschrittenem biologischen Alter erhöhen, wenn der Pool an primordiales Follikeln schon begrenzt ist, eine Analyse der Unbedenklichkeit der Technik und eine kritische Bewertung von Chancen, Risiken und ethischen und sozialen Implikationen sind jedoch nötig.

Gerade im Hinblick auf das Auftreten von Epimutationen durch Stimulation, Fertilisation und Embryokultur in der assistierten Reproduktionsmedizin sind immer noch Fragen offen, um das Risiko abzuschätzen und zu minimieren bzw. pa-

tientenintrinsische Risikofaktoren (z.B. genetische/physiologische Faktoren) zu identifizieren und entsprechende Optionen für die Beratung und Behandlung zur Verbesserung der Oozytenqualität und den Erhalt der Fertilität zu eröffnen. Im Sinn der Barker-Hypothese (Referenzen in: [105, 106]) sollten Frauen über den Einfluss des Lebensstils auf Oozytenqualität, Auftreten chronischer Erkrankungen der Kinder und möglicherweise auch Fertilität in der nächsten Generation informiert sein, da adverse metabolische Bedingungen zu allen Zeiten der Oogenese und Embryonalentwicklung auf das Entwicklungspotential und die Gesundheit einwirken können. Erst kürzlich haben Untersuchungen gezeigt, dass Störungen im intrafollikulären Milieu, wie etwa beim Polycystic Ovary Syndrom (PCOS) an Veränderungen im Genexpressionsmuster beteiligt sein können, zum Beispiel in der Abundanz von mRNAs von maternalen Genen und von Genen, die in Spindeldynamik, Chromosomenanordnung und SAC eine Rolle spielen [107]. Störungen in der Expression von Wachstumsfaktoren und Oestrogenrezeptor-Signalkaskaden in Cumuluszellen von reifen Metaphase-II-Oozyten von Patienten mit PCOS weisen auf die Deregulation in der Interaktion zwischen dem somatischen Kompartiment und der Oozyte bei der Pathologie dieser Störung hin [108].

Oozyten in vitro aus Stammzellen zu generieren oder reife Oozyten aus In-vitro-Kultur zu erhalten, sind Ansätze zum Erhalt der Fertilität, die gegenwärtig zumindest in Tiermodellen vielversprechend erscheinen [107]. Sie sind aber noch in einem frühen experimentellen Stadium und können primär für die Gewinnung neuer Erkenntnisse für die Therapie eingesetzt werden (diskutiert in: [110]). Die Gewinnung und Vermehrung von Stammzellen aus dem Ovar und die Generierung von Oozyten nach Kultur und Transplantation wurden von Maus und Mensch beschrieben, aber die Effizienz der Technik und vor allem die Gesundheit und Entwicklungsfähigkeit der Eizellen ist gegenwärtig nicht bekannt (z.B. [111]). Die Generierung von patientenspezifischen Stammzellen über Kernttransfer und Reprogrammierung des Genoms der somatischen Zellen zu pluripotenten humanen Stammzellen nach Transfer in Oozyten eröffnet neue Therapieansätze für verschiedenste Erkrankungen, wirft aber auch viele ethische und rechtliche Fragen auf [112].

## Literatur

1. **Eichenlaub-Ritter U, Gosden R.** Cellular origin of age-related aneuploidy in mammalian oocytes. In: *Biology and Pathology of the Oocyte.* (A Trounson, R Gosden, U Eichenlaub-Ritter eds.) Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2013, pp81-98.
2. **Hassold T, Hunt P.** To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet.* 2001;2(4):280-91.
3. **Gkoutela S, Li Z, Vincent JJ, Zhang KX, Chen A, Pellegrini M, Clark AT.** The ontogeny of cKIT+ human primordial germ cells proves to be a resource for human germ line reprogramming, imprint erasure and in vitro differentiation. *Nat Cell Biol.* 2013;15(1):113-22.
4. **Byskov AG, Andersen CY.** Ontogeny of the mammalian ovary. In: *Biology and Pathology of the Oocyte.* (A Trounson, R Gosden, U Eichenlaub-Ritter eds.) Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2013, pp12-23.
5. **Hayashi K, de Sousa Lopes SM, Surani MA.** Germ cell specification in mice. *Science.* 2007;316(5823):394-6.
6. **Nakaki F, Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Yabuta Y, Saitou M.** Induction of mouse germ-cell fate by transcription factors in vitro. *Nature.* 2013;501(7466):222-6.
7. **Saitou M, Kagiwada S, Kurimoto K.** Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development.* 2012;139(1):15-31.
8. **Leitch HG, Tang WW, Surani MA.** Primordial germ-cell development and epigenetic reprogramming in mammals. *Curr Top Dev Biol.* 2013;104:149-87.
9. **Yamaguchi S, Hong K, Liu R, Shen L, Inoue A, Diep D, Zhang K, Zhang Y.** Tet1 controls meiosis by regulating meiotic gene expression. *Nature.* 2012;492(7429):443-7.
10. **Hackett JA, Sengupta R, Zyllicz JJ, Murakami K, Lee C, Down TA, Surani MA.** Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. *Science.* 2013;339(6118):448-52.
11. **Zhang H, Adhikari D, Zheng W, Liu K.** Combating ovarian aging depends on the use of existing ovarian follicles, not on putative oogonial stem cells. *Reproduction.* 2013;146(6):R229-33.
12. **Nelson SM, Telfer EE, Anderson RA.** The ageing ovary and uterus: new biological insights. *Hum Reprod Update.* 2013;19(1):67-83.
13. **Childs AJ, Cowan G, Kinnell HL, Anderson RA, Saunders PT.** Retinoic Acid signalling and the control of meiotic entry in the human fetal gonad. *PLoS One.* 2011;6(6):e20249.
14. **Feng CW, Bowles J, Koopman P.** Control of mammalian germ cell entry into meiosis. *Mol Cell Endocrinol.* 2013 Sep 27;pii: S0303-7207(13)00424-3.
15. **Tease C, Hartshorne G, Hultén M.** Altered patterns of meiotic recombination in human fetal oocytes with asynapsis and/or synaptonemal complex fragmentation at pachytene. *Reprod Biomed Online.* 2006;13(1):88-95.
16. **Kee K, Angeles VT, Flores M, Nguyen HN, Reijo Pera RA.** Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature.* 2009;462(7270):222-5.
17. **Eichenlaub U.** Meiosis: how to get a good start in life. In: *Textbook Human Reproductive Genetics.* (K Sermon, S Viville, eds.) Cambridge Univ. Press, Cambridge, in press.
18. **Geraedts J, Montag M, Magli MC, Repping S, Handyside A, Staessen C, Harper J, Schmutzler A, Collins J, Goossens V, van der Ven H, Vesela K, Gianaroli L.** Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results. *Hum Reprod.* 2011;26(11):3173-80.
19. **Handyside AH, Montag M, Magli MC, Repping S, Harper J, Schmutzler A, Vesela K, Gianaroli L, Geraedts J.** Multiple meiotic errors caused by predivision of chromatids in women of advanced maternal age undergoing in vitro fertilisation. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(7):742-7.

20. **Christopikou D, Tsorva E, Economou K, Shelley P, Davies S, Mastrominas M, Handyside AH.** Polar body analysis by array comparative genomic hybridization accurately predicts aneuploidies of maternal meiotic origin in cleavage stage embryos of women of advanced maternal age. *Hum Reprod.* 2013;28(5):1426-34.
21. **Jørgensen A, Nielsen JE, Jensen MB, Græm N, Rajpert-De Meyts E.** Analysis of meiosis regulators in human gonads: a sexually dimorphic spatio-temporal expression pattern suggests involvement of DMRT1 in meiotic entry. *Mol Hum Reprod.* 2012;18(11):523-34.
22. **Persani L, Sherman S, Nelson L.** Genetic basis for primary ovarian insufficiency. In: *Biology and Pathology of the Oocyte.* (A Trounson, R Gosden, U Eichenlaub-Ritter eds.) Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2013, pp 394-408.
23. **Cheng EY, Hunt PA, Naluai-Cecchini TA, Fligner CL, Fujimoto VY, Pasternack TL, Schwartz JM, Steinauer JE, Woodruff TJ, Cherry SM, Hansen TA, Vallente RU, Broman KW, Hassold TJ.** Meiotic recombination in human oocytes. *PLoS Genet.* 2009;5(9):e1000661.
24. **Daniel K, Lange J, Hached K, Fu J, Anastassiadis K, Roig I, Cooke HJ, Stewart AF, Wassmann K, Jasin M, Keeney S, Tóth A.** Meiotic homologue alignment and its quality surveillance are controlled by mouse *HORMAD1*. *Nat Cell Biol.* 2011;13(5):599-610.
25. **Kogo H, Tsutsumi M, Ohye T, Inagaki H, Abe T, Kurahashi H.** *HORMAD1*-dependent checkpoint/surveillance mechanism eliminates asynaptic oocytes. *Genes Cells.* 2012;17(6):439-54.
26. **Eichenlaub-Ritter U, Wiczorek M, Lüke S, Seidel T.** Age related changes in mitochondrial function and new approaches to study redox regulation in mammalian oocytes in response to age or maturation conditions. *Mitochondrion.* 2011;11(5):783-96.
27. **Pepling M.** Follicle formation and oocyte death. In: *Biology and Pathology of the Oocyte.* (A Trounson, R Gosden, U Eichenlaub-Ritter eds.) Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2013, pp 38-49.
28. **Gougeon A.** The early stages of follicular growth. In: *Biology and Pathology of the Oocyte.* (A Trounson, R Gosden, U Eichenlaub-Ritter eds.) Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2013, pp50-61.
29. **Cecconi S, Mauro A, Cellini V, Patacchiola F.** The role of Akt signalling in the mammalian ovary. *Int J Dev Biol.* 2012;56(10-12):809-17.
30. **Sobinoff AP, Sutherland JM, McLaughlin EA.** Intracellular signalling during female gametogenesis. *Mol Hum Reprod.* 2013;19(5):265-78.
31. **Adhikari D, Zheng W, Shen Y, Gorre N, Hamalainen T et al.** *Tsc/mTORC1* signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Human molecular genetics.* 2010;19:397-410.
32. **Liu L, Rajareddy S, Reddy P, Du C, Jagarlamudi K, Shen Y, Gunnarsson D, Selstam G, Boman K, Liu K.** Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of *Foxo3a*. *Development.* 2007;134(1):199-209.
33. **Sobinoff AP, Nixon B, Roman SD, McLaughlin EA.** Staying Alive: PI3K Pathway Promotes Primordial Follicle Activation and Survival in Response to 3MC-Induced Ovotoxicity. *Toxicol Sci* 2012;128:258-271.
34. **Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S et al.** The putative forkhead transcription factor *FOXL2* is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet.* 2001;27:159-166.
35. **Bouilly J, Bachelot A, Broutin I, Touraine P, Binart N.** Novel *NOBOX* loss-of-function mutations account for 6.2% of cases in a large primary ovarian insufficiency cohort. *Hum Mutat.* 2011;32(10):1108-13.
36. **Kelsey TW, Anderson RA, Wright P, Nelson SM, Wallace WH.** Data-driven assessment of the human ovarian reserve. *Mol Hum Reprod.* 2012;18(2):79-87.
37. **Adhikari D, Gorre N, Risal S, Zhao Z, Zhang H, Shen Y, Liu K.** The safe use of a *PTEN* inhibitor for the activation of dormant mouse primordial follicles and generation of fertilizable eggs. *PLoS One.* 2012;7(6):e39034.

38. **Tong ZB, Gold L, Pfeifer KE, Dorward H, Lee E, Bondy CA, Dean J, Nelson LM.** Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nat Genet.* 2000;26(3):267-8.
39. **Markholt S, Grøndahl ML, Ernst EH, Andersen CY, Ernst E, Lykke-Hartmann K.** Global gene analysis of oocytes from early stages in human folliculogenesis shows high expression of novel genes in reproduction. *Mol Hum Reprod.* 2012;18(2):96-110.
40. **Ye X, Skjaerven R, Basso O, Baird DD, Eggesbo M, Uicab LA, Haug K, Longnecker MP.** In utero exposure to tobacco smoke and subsequent reduced fertility in females. *Hum Reprod* 2010;25:2901-2906.
41. **Juriscova A, Taniuchi A, Li H, Shang Y, Antenos M, Detmar J, Xu J, Matikainen T, Benito Hernandez A, Nunez G et al.** Maternal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons diminishes murine ovarian reserve via induction of Harakiri. *J Clin Invest.* 2007;117:3971-3978.
42. **Pepe GJ, Billiar RB, Albrecht ED.** Regulation of baboon fetal ovarian folliculogenesis by estrogen. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;247:41-46.
43. **Yang MY, Fortune JE.** The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. *Biol Reprod.* 2008;78:1153-1161.
44. **Fowler PA, Anderson RA, Saunders PT, Kinnell H, Mason JI, Evans DB, Bhattacharya S, Flannigan S, Franks S, Monteiro A, O'Shaughnessy PJ.** Development of steroid signaling pathways during primordial follicle formation in the human fetal ovary. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(6):1754-62.
45. **Crain DA, Janssen SJ, Edwards TM, Heindel J, Ho SM, Hunt P, Iguchi T, Juul A, McLachlan JA, Schwartz J, Skakkebaek N, Soto AM, Swan S, Walker C, Woodruff TK, Woodruff TJ, Giudice LC, Guillette LJ Jr.** Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing. *Fertil Steril.* 2008;90(4):911-40.
46. **Ito Y, Ito T, Karasawa S, Enomoto T, Nashimoto A, Hase Y, Sakamoto S, Mimori T, Matsu-moto Y, Yamaguchi Y, Handa H.** Identification of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) as a novel target of bisphenol A. *PLoS One.* 2012;7(12):e50481
47. **Susiarjo M, Hassold TJ, Freeman E, Hunt PA.** Bisphenol A exposure in utero disrupts early ooge-nesis in the mouse. *PLoS Genet.* 2007;3(1):e5.
48. **Trapphoff T, Heiligentag M, El Hajj N, Haaf T, Eichenlaub-Ritter U.** Chronic exposure to a low concentration of bisphenol A during follicle culture affects the epigenetic status of germinal vesicles and metaphase II oocytes. *Fertil Steril.* 2013 Sep 10 (im Druck).
49. **Hunt PA, Lawson C, Gieske M, Murdoch B, Smith H, Marre A, Hassold T, VandeVoort CA.** Bisphenol A alters early oogenesis and follicle formation in the fetal ovary of the rhesus monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(43):17525-30.
50. **Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM.** Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature.* 1996;383(6600):531-535.
51. **Carabatsos MJ, Sellitto C, Goodenough DA, Albertini DF.** Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Dev Biol.* 2000;226(2):167-79
52. **Elvin JA, Yan C, Matzuk MM.** Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone syn-thesis in granulosa cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(18):10288-93.
53. **Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L.** Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet.* 2004;75(1):106-111.
54. **Peng J, Li Q, Wigglesworth K, Rangarajan A, Kattamuri C, Peterson RT, Eppig JJ, Thompson TB, Matzuk MM.** Growth differentiation factor 9:bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(8):E776-85.

55. **Knight PG, Satchell L, Glister C.** Intra-ovarian roles of activins and inhibins. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;359(1-2):53-65.
56. **Palma GA, Argañaraz ME, Barrera AD, Rodler D, Mutto AA, Sinowatz F.** Biology and biotechnology of follicle development. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:938138.
57. **Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S.** Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *J Reprod Dev.* 2012;58(1):44-50.
58. **Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM.** The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev.* 2009;30(6):624-712.
59. **Zuccotti M, Merico V, Cecconi S, Redi CA, Garagna S.** What does it take to make a developmentally competent mammalian egg? *Hum Reprod Update.* 2011;17(4):525-40.
60. **Picton HM, Hemmings KE.** Metabolism of the follicle and oocyte in vivo and in vitro. In: *Biology and Pathology of the Oocyte.* (A Trounson, R Gosden, U Eichenlaub-Ritter eds.) Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2013, pp200-211.
61. **Anderson RA, McLaughlin M, Wallace WH, Albertini DF, Telfer EE.** The immature human ovary shows loss of abnormal follicles and increasing follicle developmental competence through childhood and adolescence. *Hum Reprod.* 2013 Oct 17.
62. **Matzuk MM, Burns KH.** Genetics of mammalian reproduction: modeling the end of the germline. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:503-28.
63. **Eichenlaub-Ritter U, Plancha C.** Structural basis for oocyte-granulosa cell interactions. In: *Biology and Pathology of the Oocyte.* (A Trounson, R Gosden, U Eichenlaub-Ritter eds.) Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2013, pp81-98.
64. **Vanhoutte L, De Sutter P, Nogueira D, Gerris J, Dhont M, Van der Elst J.** Nuclear and cytoplasmic maturation of in vitro matured human oocytes after temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor. *Hum Reprod.* 2007;22(5):1239-46.
65. **Monti M, Zanoni M, Calligaro A, Ko MS, Mauri P, Redi CA.** Developmental arrest and mouse antral not-surrounded nucleolus oocytes. *Biol Reprod.* 2013;88(1):2.
66. **Ma JY, Li M, Luo YB, Song S, Tian D, Yang J, Zhang B, Hou Y, Schatten H, Liu Z, Sun QY.** Maternal factors required for oocyte developmental competence in mice: transcriptome analysis of non-surrounded nucleolus (NSN) and surrounded nucleolus (SN) oocytes. *Cell Cycle.* 2013a;12(12):1928-38.
67. **Zhang M, Xia G.** Hormonal control of mammalian oocyte meiosis at diplotene stage. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(8):1279-88.
68. **Conti M.** Hormones and growth factors in the regulation of oocyte maturation. In: *Biology and Pathology of the Oocyte.* (A Trounson, R Gosden, U Eichenlaub-Ritter eds.) Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2013, pp109-118.
69. **Vaccari S, Weeks JL 2nd, Hsieh M, Menniti FS, Conti M.** Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod.* 2009;81(3):595-604.
70. **Pirino G, Wescott MP, Donovan PJ.** Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell Cycle.* 2009;8(4):665-70.
71. **Oh JS, Han SJ, Conti M.** Wee1B, Myt1, and Cdc25 function in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption. *J Cell Biol.* 2010;188(2):199-207.
72. **Homer H.** Getting into and out of oocyte maturation. In: *Biology and Pathology of the Oocyte.* (A Trounson, R Gosden, U Eichenlaub-Ritter eds.) Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2013, pp119-141.
73. **Wigglesworth K, Lee KB, O'Brien MJ, Peng J, Matzuk MM, Eppig JJ.** Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(39):E3723-9.
74. **Newhall KJ, Criniti AR, Cheah CS, Smith KC, Kafer KE, Burkart AD, McKnight GS.** Dynamic anchoring of PKA is essential during oocyte maturation. *Curr Biol.* 2006;16(3):321-7.



75. **Touati SA, Cladière D, Lister LM, Leontiou I, Chambon JP, Rattani A, Böttger F, Stemmann O, Nasmyth K, Herbert M, Wassmann K.** Cyclin A2 is required for sister chromatid segregation, but not separate control, in mouse oocyte meiosis. *Cell Rep.* 2012;2(5):1077-87.
76. **Ma JY, Ou-Yang YC, Luo YB, Wang ZB, Hou Y, Han ZM, Liu Z, Schatten H, Sun QY.** Cyclin O regulates germinal vesicle breakdown in mouse oocytes. *Biol Reprod.* 2013b;88(5):110.
77. **Gui L, Homer H.** Hec1-dependent cyclin B2 stabilization regulates the G2-M transition and early prometaphase in mouse oocytes. *Dev Cell.* 2013;25(1):43-54.
78. **Valsangkar D, Downs SM.** A requirement for fatty acid oxidation in the hormone-induced meiotic maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod.* 2013;89(2):43.
79. **Grindler NM, Moley KH.** Maternal obesity, infertility and mitochondrial dysfunction: potential mechanisms emerging from mouse model systems. *Mol Hum Reprod.* 2013;19(8):486-94.
80. **Robker R., Norman RJ.** Obesity and oocyte quality. In: *Biology and Pathology of the Oocyte.* (A Trounson, R Gosden, U Eichenlaub-Ritter eds.) Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2013, pp362-370.
81. **Kitajima TS, Ohsumi M, Ellenberg J.** Complete kinetochore tracking reveals error-prone homologous chromosome biorientation in mammalian oocytes. *Cell.* 2011;146(4):568-81.
82. **Eichenlaub-Ritter U.** Oocyte ageing and its cellular basis. *Int J Dev Biol.* 2012;56(10-12):841-52.
83. **Duncan FE, Hornick JE, Lampson MA, Schultz RM, Shea LD, Woodruff TK.** Chromosome cohesion decreases in human eggs with advanced maternal age. *Aging Cell.* 2012;11(6):1121-4.
84. **Tachibana-Konwalski K, Godwin J, van der Weyden L, Champion L, Kudo NR, Adams DJ, Nasmyth K.** Rec8-containing cohesin maintains bivalents without turnover during the growing phase of mouse oocytes. *Genes Dev.* 2010;24(22):2505-16.
85. **Vogt E, Sanhaji M, Klein W, Seidel T, Wordeman L, Eichenlaub-Ritter U.** MCAK is present at centromeres, midspindle and chiasmata and involved in silencing of the spindle assembly checkpoint in mammalian oocytes. *Mol Hum Reprod.* 2010;16(9):665-84.
86. **Eichenlaub-Ritter U, Staubach N, Trapphoff T.** Chromosomal and cytoplasmic context determines predisposition to maternal age-related aneuploidy: brief overview and update on MCAK in mammalian oocytes. *Biochem Soc Trans.* 2010;38(6):1681-6.
87. **Lara-Gonzalez P, Westhorpe FG, Taylor SS.** The spindle assembly checkpoint. *Curr Biol.* 2012;22(22):R966-80.
88. **Hamatani T, Falco G, Carter MG, Akutsu H, Stagg CA, Sharov AA, Dudekula DB, VanBuren V, Ko MS.** Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Hum Mol Genet.* 2004;13(19):2263-78.
89. **Steuerwald NM, Bermúdez MG, Wells D, Munné S, Cohen J.** Maternal age-related differential global expression profiles observed in human oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2007;14(6):700-8.
90. **Jones GM, Cram DS.** Gene expression in human oocytes. In: *Biology and Pathology of the Oocyte.* (A Trounson, R Gosden, U Eichenlaub-Ritter eds.) Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2013, pp285-305.
91. **Grøndahl ML, Yding Andersen C, Bogstad J, Nielsen FC, Meinertz H, Borup R.** Gene expression profiles of single human mature oocytes in relation to age. *Hum Reprod.* 2010;25(4):957-68.
92. **Fragouli E, Bianchi V, Patrizio P, Obradors A, Huang Z, Borini A, Delhanty JD, Wells D.** Transcriptomic profiling of human oocytes: association of meiotic aneuploidy and altered oocyte gene expression. *Mol Hum Reprod.* 2010;16(8):570-82.
93. **Morgan S, Anderson RA, Gourley C, Wallace WH, Spears N.** How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Hum Reprod Update.* 2012;18(5):525-35.
94. **Meirow D, Biederman H, Anderson RA, Wallace WH.** Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction. *Clin Obstet Gynecol.* 2010;53(4):727-39.
95. **Donnez J, Dolmans MM.** Fertility preservation in women. *Nat Rev Endocrinol.* 2013 Oct 29.
96. **Tatone C, Amicarelli F, Carbone MC, Monteleone P, Caserta D, Marci R, Artini PG, Piomboni P, Focarelli R.** Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Hum Reprod Update.* 2008;14(2):131-42.

97. **Tatone C, Heizenrieder T, Di Emidio G, Treffon P, Amicarelli F, Seidel T, Eichenlaub-Ritter U.** Evidence that carbonyl stress by methylglyoxal exposure induces DNA damage and spindle aberrations, affects mitochondrial integrity in mammalian oocytes and contributes to oocyte ageing. *Hum Reprod.* 2011;26(7):1843-59.
98. **Broekmans F, Dolleman M.** Relative contribution of advanced age and reduced follicle pool size on reproductive success. In: *Biology and Pathology of the Oocyte.* (A Trounson, R Gosden, U Eichenlaub-Ritter eds.) Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2013, pp318-329.
99. **Fleming TP, Velazquez MA, Eckert JJ, Lucas ES, Watkins AJ.** Nutrition of females during the peri-conceptual period and effects on foetal programming and health of offspring. *Anim Reprod Sci.* 2012;130(3-4):193-7.
100. **Fisher TE, Moiskness TA, Villeda A, Zelinski MB, Stouffer RL, Xu J.** Vascular endothelial growth factor and angiopoietin production by primate follicles during culture is a function of growth rate, gonadotrophin exposure and oxygen milieu. *Hum Reprod.* 2013 Sep 17. [Epub ahead of print]
101. **Pacchierotti F, Eichenlaub-Ritter U.** Environmental hazard in the aetiology of somatic and germ cell aneuploidy. *Cytogenet Genome Res.* 2011;133(2-4):254-68.
102. **Selesniemi K, Lee HJ, Muhlhauer A, Tilly JL.** Prevention of maternal aging-associated oocyte aneuploidy and meiotic spindle defects in mice by dietary and genetic strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(30):12319-24.
103. **Luo LL, Chen XC, Fu YC, Xu JJ, Li L, Lin XH, Xiang YF, Zhang XM.** The effects of caloric restriction and a high-fat diet on ovarian lifespan and the expression of SIRT1 and SIRT6 proteins in rats. *Aging Clin Exp Res.* 2012;24(2):125-33.
104. **Pantassri T, Norman RJ.** The effects of being overweight and obese on female reproduction: a review. *Gynecol Endocrinol.* 2014;30(2):90-4.
105. **de Boo HA, Harding JE.** The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2006;46(1):4-14.
106. **Vrachnis N, Antonakopoulos N, Iliodromiti Z, Dafopoulos K, Siristatidis C, Pappa KI, Deligeoroglou E, Vitoratos N.** Impact of maternal diabetes on epigenetic modifications leading to diseases in the offspring. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:538474.
107. **Assou S, Anahory T, Pantesco V, Le Carrour T, Pellestor F, Klein B, Reyftmann L, Dechaud H, De Vos J, Hamamah S.** The human cumulus-oocyte complex gene-expression profile. *Hum Reprod.* 2006;21(7):1705-19.
108. **Haouzi D, Assou S, Monzo C, Vincens C, Dechaud H, Hamamah S.** Altered gene expression profile in cumulus cells of mature MII oocytes from patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2012;27(12):3523-30.
109. **Hayashi K, Saitou M.** Generation of eggs from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* 2013 Aug;8(8):1513-24.
110. **Yin H, Gosden R.** In vitro growth and differentiation of oocytes. In: *Biology and Pathology of the Oocyte.* (A Trounson, R Gosden, U Eichenlaub-Ritter eds.) Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2013, pp187-199.
111. **White YA, Woods DC, Takai Y, Ishihara O, Seki H, Tilly JL.** Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat Med.* 2012;18(3):413-21.
112. **Tachibana M, Amato P, Sparman M, Gutierrez NM, Tippner-Hedges R, Ma H, Kang E, Fulati A, Lee HS, Sritanaudomchai H, Masterson K, Larson J, Eaton D, Sadler-Fredd K, Battaglia D, Lee D, Wu D, Jensen J, Patton P, Gokhale S, Stouffer RL, Wolf D, Mitalipov S.** Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell.* 2013;153(6):1228-38.
113. **Alvaggi C, Humaidan P, Howles CM, Tredway D, Hillier SG.** Biological versus chronological ovarian age: implications for assisted reproductive technology. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009;22;7:101.
114. **Ben-Ami I, Freimann S, Armon L, Dantes A, Strassburger D, Friedler S, Raziel A, Seger R, Ron-El R, Amsterdam A.** PGE2 up-regulates EGF-like growth factor biosynthesis in human granulosa cells: new insights into the coordination between PGE2 and LH in ovulation. *Mol Hum Reprod.* 2006;12(10):593-9.



**Prof. Dr. Ursula Eichenlaub-Ritter**

Universität Bielefeld

Fakultät für Biologie Gentechnologie/Mikrobiologie

33501 Bielefeld

Tel: +49 (0)521/106 48 32 69 07

Fax: +49 (0)521/106 60 15

E-Mail: [EIRi@uni-bielefeld.de](mailto:EIRi@uni-bielefeld.de)

# Schädigung der weiblichen Gonaden und Fertilitätserhalt

Stephanie C. Ziehr, Katharina Winkler, Ludwig Wildt

## 1. Wodurch kann die weibliche Fruchtbarkeit geschädigt werden?

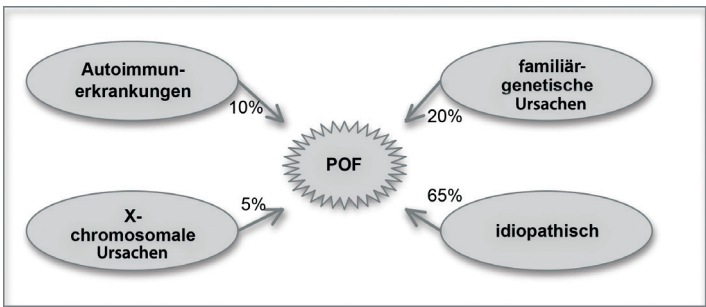
Die Schädigung der weiblichen Gonadenfunktion kann durch endogene und exogene Ursachen bedingt sein. Wenngleich nicht selten der Grund für die eingeschränkte Ovarfunktion ungeklärt bleibt (Abb. 1), werden im Folgenden mögliche Ursachen der prämaturnen (vorzeitigen) Ovarialinsuffizienz (POI, premature ovarian failure POF) ausführlich dargestellt. Eine Übersicht zeigt Tabelle 1, Seite 50.

### 1.1 Endogene Ursachen

#### 1.1.1 Genetische Ursachen (X-chromosomale Defekte)

##### Ullrich-Turner-Syndrom (UTS)

Das Ullrich-Turner-Syndrom ist einer der häufigsten genetischen Defekte des Menschen mit einer Prävalenz von 1:2 500 Lebendgeburten. Bei Frauen mit Ullrich-Turner-Syndrom liegt ein 45,  $\mu$ XO-Karyotyp vor. Sie haben ursprünglich einen



**Abb. 1** Übersicht der Ursachen einer prämaturnen Ovarialinsuffizienz (POF). (modifiziert nach Shelling [1])

<b>Anlagestörung</b>	Gonadenagenesie	<b>Resistenz</b>	Resistant Ovary Syndrome LH/FSH-Rezeptor-Mutationen LH/FSH-Mutationen
<b>Chromosomale Störungen</b>	XO-Gonadendysgenese XX-Gonadendysgenese XY-Gonadendysgenese gemischte Gonadendysgenese 45X/46XY-Mosaik Fragile-X-Prämutation	<b>Enzymdefekte</b>	17alpha-Hydroxylase-Mangel 17-20-Lyase-Mangel
<b>Autoimmunerkrankungen</b>	Polyglanduläres Autoimmunsyndrom Typ I Polyglanduläres Autoimmunsyndrom Typ II Autoantikörper Autoimmunoophoritis	<b>Infektionen</b>	Mumps-Oophoritis Virusinfekte
<b>Stoffwechselerkrankungen</b>	Galaktosämie	<b>Noxen</b>	Chemotherapie Strahlentherapie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

**Tab. 1** Übersicht der Ursachen einer prämaturnen Ovarialinsuffizienz (POF)

regelrechten, altersentsprechenden ovariellen Follikelpool, welcher jedoch rapide der Atresie zugeführt wird und daher schon vor dem Eintritt in die Pubertät erschöpft ist. Klinisch fallen diese Patientinnen durch ein Ausbleiben der Pubertätsentwicklung, eine primäre Amenorrhoe und multiple morphologische Veränderungen auf.

Im Falle eines Mosaiks 45,X/46,XX ist der Eintritt in die Pubertät regelrecht möglich, auch die Menarche kann spontan und der Zyklus regelrecht verlaufen, jedoch erschöpft sich auch hier der Follikelpool nicht selten verfrüht [2]. Spontan eingetretene Schwangerschaften sind vor allem bei Vorliegen von Mosaiken möglich.

### Fragiles X-Syndrom

Veränderungen des FMR1-Gens auf dem Chromosom Xq27 sind verantwortlich für das Fragile X-Syndrom. In Abhängigkeit von der Anzahl der Repeats des FMR1-Gens kann es zu unterschiedlichen klinischen Ausprägungen kommen: Weniger als 40 Repeats werden als Normalbefund angesehen. Über 200 Repeats entsprechen einer Vollmutation und führen bei männlichen Nachkommen zum Fragilen X-Syndrom mit schwerer mentaler Retardierung. Repeats zwischen 40 und 200 entsprechen einer Prämutation, welche bei weiblichen Nachkommen 10 x häufiger mit einer prämaturnen Ovarialinsuffizienz vergesellschaftet ist [3, 4].

Die Prävalenz einer FMR1-Prämutation liegt bei sporadisch entstandener prämaturer Ovarialinsuffizienz bei 2–5%, bei positiver Familienanamnese (mindestens ein Familienmitglied mit vorzeitiger Menopause unter 40 Jahren) bei 12–14% [5]. Aus diesem Grund gilt die Empfehlung, bei allen Patientinnen mit einer prämaturen Ovarialinsuffizienz bzw. Hinweiszeichen auf eine ovarielle Erschöpfung (z.B. FSH-Erhöhungen vor dem 40. Lebensjahr) eine genetische Untersuchung auf eine FMR1-Prämutation durchzuführen [6].

### 1.1.2 Genetische Ursachen (autosomal-chromosomale Defekte)

#### Galaktosämie

Die Galaktosämie ist eine sehr seltene Stoffwechselerkrankung, die durch einen Enzymdefekt der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase hervorgerufen wird. Wenngleich der Pathomechanismus der ovariellen Schädigung noch unklar ist, geht man von toxischen Effekten der Galaktosemetaboliten aus, die in über 80% zu einer prämaturen Ovarialinsuffizienz führen [7].

#### BMP15-Mutationen

Das Protein BMP15 (bone morphogenic protein 15) gehört der TGF-Familie an und reguliert die Ovulation und Follikulogenese. Eine Mutation in diesem Protein ist mit einem reduzierten Granulosazellwachstum assoziiert und kann in seltenen Fällen ursächlich für eine prämatüre Ovarialinsuffizienz sein [8].

#### Mutationen im FSH-Rezeptor

Mutationen im FSH-Rezeptor-Gen sind äußerst selten. Sie bedingen, dass FSH entweder nicht am Rezeptor gebunden werden kann oder eine Aktivierung der Signaltransduktion unterbleibt. Die Folge ist die fehlende Induktion der Aromatase und damit das Ausbleiben der Aromatisierung von Androgenen zu Östrogenen. Klinisch zeigt sich dies in einem Östrogenmangel im peripheren Blut. Inwiefern diese Mutation die Eizellzahl und -qualität beeinflusst, ist unklar [9]. Dennoch scheint der antrale Follikelcount dieser Patientinnen regelrecht zu sein, wenngleich die Stimulierbarkeit der Follikel hin zum sprungreifen Follikel aufgrund des Rezeptordefektes nicht möglich ist.

### 1.1.3 Autoimmunologische Ursachen

Eine Autoimmunoophoritis tritt in 10% der Fälle auf. Sie zeigt sich häufig in Verbindung mit anderen Autoimmunerkrankungen im Sinne eines Polyglandulären Autoimmunsyndroms Typ I (mukocutane Candidiasis, Hypoparathyreoidismus, Nebennierenrindeninsuffizienz) oder Typ II (Nebennierenrindeninsuffizienz, M. Hashimoto, Diabetes mellitus Typ I, Vitiligo, Alopezie). Es besteht möglicherweise eine Assoziation der prämaternen Ovarialinsuffizienz mit einer Myasthenia gravis [10]. Ursächlich wird vor allem bei gleichzeitiger Beeinträchtigung der Nebennieren von einer vermehrten Lymphozyteninfiltration in die Thekazellen ausgegangen, so dass eine Immunsuppression einen möglichen Therapieansatz darstellen könnte [11]. Das isolierte Auftreten antiovarieller Antikörper ist beschrieben, kann aber nur in den seltensten Fällen nachgewiesen werden.

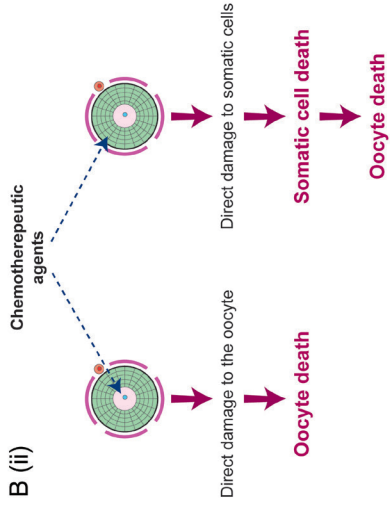
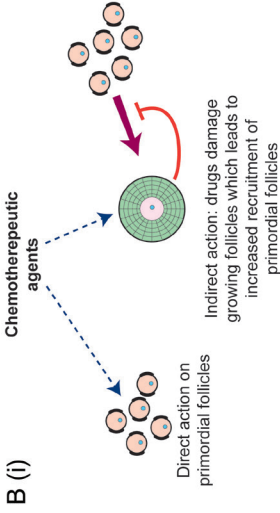
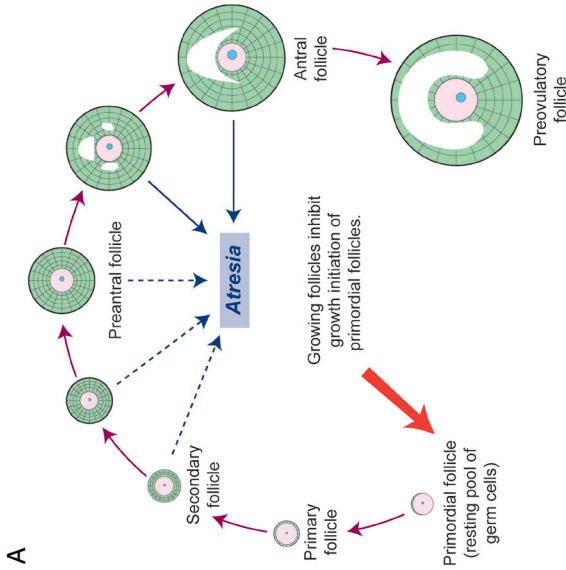
### 1.1.4 Viruserkrankungen

Obgleich der Zusammenhang einer Mumpsinfektion beim Mann mit einer Orchitis und daraus resultierender Störung der Hodenfunktion gesichert ist, ist dies bei der infektiös bedingten Oophoritis unklar. Eine akute Oophoritis ist schwer zu diagnostizieren und verläuft häufig klinisch inapparent. Aus diesem Grund ist der Nachweis der Genese einer prämaternen Ovarialinsuffizienz durch die Oophoritis nur schwer möglich [12]. Dennoch sollten Virusinfektionen wie Mumps oder Cytomegalie als Differentialdiagnose der prämaternen Ovarialinsuffizienz bedacht werden.

## 1.2 Exogene Ursachen

### 1.2.1 Chemotherapie

Chemotherapeutika können je nach ihrer Substanzklasse sehr unterschiedliche Auswirkungen auf die Ovarfunktion haben. Eine Übersicht über das Risiko der Ovarschädigung gibt Tabelle 2. Alkylantien wie Cyclophosphamid wird hier ein hohes gonadotoxisches Potential zugesprochen. Die Folge ist sowohl eine direkte Schädigung der Eizellen der sich in Entwicklung befindlichen Follikel als auch eine indirekte Schädigung des Primordialfollikelpools durch Beeinflussung der Vaskularisation des ovariellen Stromas (Abb. 2B(i)). Dies führt zu einer verstärkten Initiierung des Follikelwachstums aus dem Follikelpool und damit zu einem „burn out“ der ovariellen Reserve [13, 14].



**Abb. 2** (Legende siehe S. 57 unten)



Hohes Risiko	Mittleres Risiko	Geringes Risiko
Cyclophosphamid	Cisplatin	Vincristin
Ifosfamid	Carboplatin	Methotrexat
Chlormethin	Doxorubicin	Dactinomycin
Busulfan		Bleomycin
Melphalan		Mercaptopurin
Procarbazine		Vinblastin
Chloambucil		

**Tab. 2** Einteilung der chemotherapeutischen Substanzen nach dem Risiko für eine Ovarschädigung. (modifiziert nach Wallace et al. [15])

### 1.2.2 Strahlentherapie

Durch eine Ganzkörper-, abdominale oder pelvine Bestrahlung kann es zu einer direkten Schädigung des weiblichen Genitale kommen. Die Effekte sind dosis- und altersabhängig (Tab. 3). Sowohl die Ovarien als auch der Uterus sind davon betroffen. Neben der direkten Schädigung der Eizellen ( $LD_{50}$  ist bei 2Gy) kommt es zudem zu einer Veränderung der uterinen Gefäße, einer Volumenverkleinerung des Uterus und dann schließlich zu einem deutlich höheren Risiko für Aborte und Frühgeburten nach erfolgreicher Therapie [15].

Gray	Auswirkung
< 2,0	$LD_{50}$
20,3	POF (Geburt)
18,4	POF (ca. 10 Jahre)
16,5	POF (ca. 20 Jahre)
14,3	POF (ca. 30 Jahre)

**Tab. 3** Auswirkung der Strahlendosis auf die Ovarfunktion je nach Alter bei der Bestrahlung.  $LD_{50}$ : Letaldosis, um die Hälfte der Oozyten zu schädigen, POF: Prämatüre Ovarialinsuffizienz. (modifiziert nach Wallace et al. [15])

**Abb. 2** Gonadotoxische Wirkung der Chemotherapeutika am Ovar. A: Humane Follikulogenese. B: Potentielle Angriffsstellen der Chemotherapeutika am Ovar. B(i): Wirkung der Chemotherapeutika am Follikel: direkte Schädigung der Primordialfollikel oder indirekte Schädigung der wachsenden Follikel durch verstärkte Wachstumsinitiation anderer Primordialfollikel. B(ii): Wirkung der Chemotherapeutika an der Eizelle: direkt oder indirekt durch Schädigung der somatischen Zellen in der Umgebung. (nach Morgan et al. [13])

## 2. Gibt es Methoden, um Fertilität zu messen und/oder zu prognostizieren?

### 2.1 Alter

Das Alter einer Frau gilt als bester prognostischer Faktor der Fruchtbarkeit bzw. der Wahrscheinlichkeit des Eintritts einer Lebendgeburt. Ebenso kann das Alter der Mutter bei Eintritt der Menopause einen prognostischen Faktor bei der Abschätzung der „reproduktiven Lebensspanne“ der Tochter darstellen.

### 2.2 Zyklusanamnese

Klinisch erlaubt die Zyklusanamnese eine orientierende Einschätzung der Ovarialfunktion und damit der Fruchtbarkeit. So kann eine Ovarialinsuffizienz in unterschiedlicher Intensität vorliegen, welche sich im Ausmaß der Zyklusstörung äußert (Pathophysiologisches Kontinuum, Abb. 3) [16].

### 2.3 Antraler Follikelcount (AFC)

Die Antralfollikelzahl kann mittels Vaginalsonographie bestimmt werden. Hierbei werden Follikel mit einer Größe von 2 bis 10 mm Durchmesser beider Ovarien in der frühen Follikelphase (2.-4. Zyklustag) gezählt [17]. Einen AFC  $\leq 10$  findet man bei Patientinnen mit reduzierter ovarieller Reserve [18].

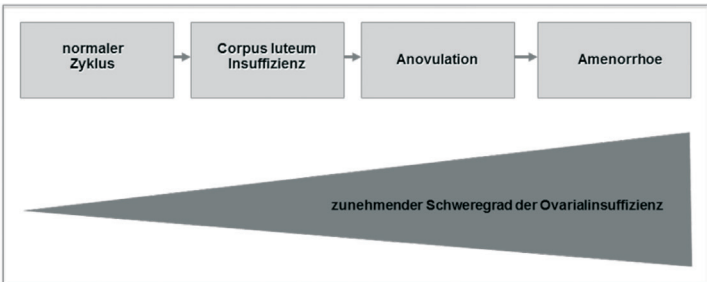
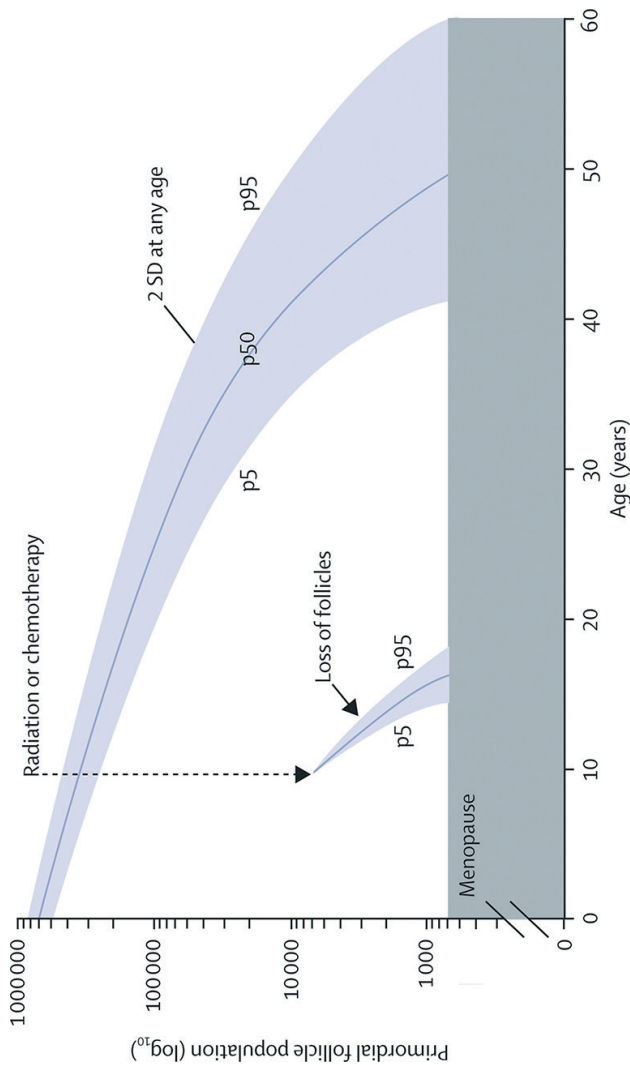


Abb. 3 Pathophysiologisches Kontinuum der Ovarialinsuffizienz.



**Abb. 4** Follikelreserve im Lauf des Lebens. Abfall des Primordialfollikelpools und Verlust der Follikel nach Chemo- oder Strahlentherapie. p5; 5. Perzentile, p50 Median, p95 95. Perzentile, SD = Standardabweichung. (nach DeVos et al. [20])

Kritisch anzumerken ist, dass die Bestimmung des AFC sowohl zyklusabhängig als auch stark untersucherabhängig ist. Der AFC scheint eine gute Vorhersage für die ovarielle Reserve und Ansprechbarkeit bei ovarieller Stimulation zu sein, sagt jedoch wenig über die Eizellqualität, Befruchtungswahrscheinlichkeit und das Schwangerschaftsoutcome aus [18, 19].

## 2.4 Gonadotropine

Im Rahmen der endokrinologischen Diagnostik bedient man sich der Gonadotropine FSH und LH sowie des Östrogens, um einen Einblick in das Zyklusgeschehen und die Ovarialaktivität der Frau zu bekommen. Ein Hormonstatus in der frühen Follikelphase (3. bis 5. Zyklustag) erlaubt eine orientierende Einschätzung der Ovarfunktion.

Dem follikelstimulierenden Hormon (FSH) kommt hier die größte Bedeutung zu. FSH-Konzentrationen  $< 10$  IU/l im Serum werden als normal angesehen. FSH-Konzentrationen  $> 20$  IU/l gehen üblicherweise mit erhöhtem Alter bzw. einer ovariellen Erschöpfung und somit mit einer deutlich eingeschränkten Fruchtbarkeit einher [17]. Dennoch ist hier wichtig anzumerken, dass aus einer einmaligen Bestimmung keine generelle Aussage getroffen werden kann. Zwei Blutentnahmen mit konkordant hohen Messwerten im Abstand von 3 bis 6 Monaten sind obligat, um den Verdacht auf eine ovarielle Erschöpfung zu erhärten.

Zeigt sich gleichzeitig zur FSH-Elevation eine niedrige Östradiol-Konzentration ( $< 50$  pg/ml) ist eine prämatüre Ovarialinsuffizienz sehr wahrscheinlich und die Fertilität damit eingeschränkt. Ist die Östradiol-Konzentration in der frühen Follikelphase bereits  $> 80$  pg/ml, spricht man von einer akzelerierten Follikelreifung, welche in der Prämenopause typisch ist und daher als Zeichen einer sich entwickelnden reduzierten ovariellen Reserve gilt [21].

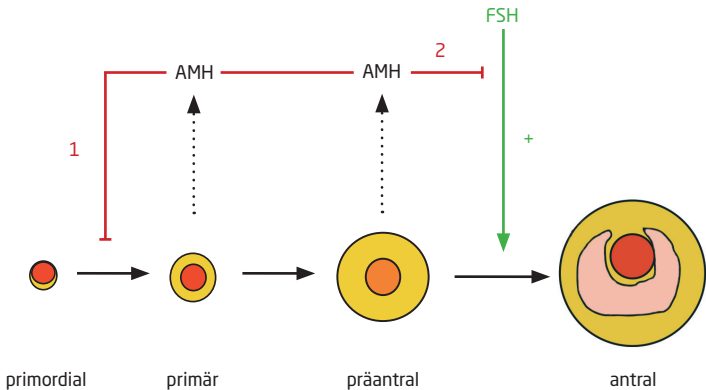
## 2.5 Marker der ovariellen Reserve

### Anti-Müller-Hormon (AMH)

Das Anti-Müller-Hormon gehört der TGF-beta-Familie an und wird von den Granulosazellen der primären und präantralen Follikel ( $< 8$  mm) exprimiert. Ab einer Follikelgröße  $> 8$  mm wird AMH nicht mehr sezerniert; der Follikel ist dann FSH-abhängig. AMH inhibiert die Follikelrekrutierung aus dem ruhenden Primordialfollikelpool und inhibiert das FSH-abhängige Wachstum und die Selektion präantraler und antraler Follikel (Abb. 5) [22].

Physiologisch fällt AMH mit zunehmendem Alter ab und ist perimenopausal nicht mehr nachweisbar. AMH-Konzentrationen  $< 0,5 \text{ ng/ml}$  sprechen für eine deutlich reduzierte ovarielle Reserve, während AMH-Konzentrationen  $> 3,0 \text{ ng/ml}$  häufig mit einem polycystischen Ovarsyndrom assoziiert sind und im Fall einer ovariellen Stimulation ein größeres Risiko für ein Überstimulationssyndrom mit sich bringen [23]. Dennoch muss angemerkt werden, dass bis heute keine international akzeptierten Cut-off's für AMH existieren.

Untersuchungen von Wang et al. konnten zeigen, dass AMH, gemessen bei Frauen unter 35 Jahren, keine Vorhersagekraft bzgl. der Lebendgeburtswahrscheinlichkeit nach IVF hat [24]. Daten zur Vorhersage des Eintritts einer Schwangerschaft durch Spontankonzeption fehlen gegenwärtig. Daher ist dieser Parameter kritisch und stets im Kontext der anderen klinischen Parameter zu interpretieren.



**Abb. 5** Modell der AMH-Sekretion am Ovar. AMH wird von den wachsenden primären und präantralen Follikeln gebildet. Es inhibiert das Follikelrecruitment aus dem ruhenden Primordialfollikelpool (1). AMH inhibiert das FSH-abhängige Wachstum und die Selektion präantraler und antraler Follikel (2). (nach Visser et al. [22])

### 3. Fertilitätserhaltende Maßnahmen

Die Maßnahmen zur Fertilitätsprotektion bei der Frau lassen sich in medikamentöse und invasive sowie in etablierte und experimentelle Methoden (Tab. 4) unterteilen. Für die individuelle Beratung der Patientin spielen neben deren Grunderkrankung und der geplanten Therapie die aktuelle Lebenssituation und der Zeitrahmen bis zum Start der gonadotoxischen Therapie eine entscheidende Rolle. Auf die einzelnen Maßnahmen der Fertilitätsprotektion soll nun im Folgenden kurz eingegangen werden.

<b>Etablierte Methoden</b>
Transposition der Ovarien Kryokonservierung von Embryonen Kryokonservierung von Oozyten
<b>Experimentelle Methoden</b>
Kryokonservierung von Ovarialgewebe In-Vitro-Maturation von Oozyten In-Vitro-Kultur von Ovarialgewebe
<b>Möglicherweise effektive Methode</b>
GnRH-Analoga-Therapie

**Tab. 4** Aktuelle Optionen der Fertilitätsprotektion entsprechend der Einschätzung der American Society for Reproductive Medicine (ASRM) [25].

#### 3.1 Transposition der Ovarien

Die chirurgische Transposition der Ovarien ermöglicht die Verlagerung der Ovarien vor einer geplanten pelvinen Bestrahlung aus dem Strahlenfeld. Hierbei werden die Eierstöcke meist an der Vasa ovarica gestielt nach kranial und lateral an der Beckenwand fixiert und für eine spätere Rückverfolgung mit Klammern markiert. Diese Möglichkeit wird seit vielen Jahrzehnten effektiv eingesetzt und führt zu einer deutlichen Reduktion der Strahlenbelastung am Ovar, so dass anschließend in den meisten Fällen eine normale ovarielle Hormonproduktion aufrechterhalten bleibt. Für eine später gewünschte Schwangerschaft stellt die Loslösung des Ovars aus seiner tuboovariellen Einheit jedoch ein Problem dar. Eine Rückverlagerung der Ovarien in die Fossa ovarica nach erfolgter Therapie kann diskutiert werden [26].

### 3.2 Einsatz von GnRH-Analoga

Agonistische GnRH-Analoga wirken an der Hypophyse und blockieren mittels Downregulation der GnRH-Rezeptoren die Sekretion der Gonadotropine (FSH, LH) aus dem Hypophysenvorderlappen. Dies führt zu einer Ruhigstellung der Ovarien, hormonell der präpubertären Phase entsprechend. Konsekutiv geht man davon aus, dass es damit zu einer geringeren Schädigung durch die gonadotoxischen Substanzen am Ovar kommt [26]. Auch wenn bis heute der Nutzen der GnRH-Analoga kontrovers diskutiert wird, deutet eine Metaanalyse von Kim et al. einen Vorteil für die Verwendung der GnRH-Analoga unter laufender Chemotherapie im Hinblick auf die spätere Ovarfunktion an [27]. Der Beginn der Applikation der GnRH-Analoga kann zyklusunabhängig erfolgen.

### 3.3 Kryokonservierung von Embryonen

Die Kryokonservierung von Embryonen nach erfolgter künstlicher Befruchtung stellt bisher die einzige langjährig etablierte Methode der Fertilitätsprotektion bei jungen Krebspatientinnen dar. Das Überleben der kryokonservierten Embryonen nach Auftauen ist mit bis zu 90% als sehr gut anzusehen und auch die Lebendgeburtenrate von 28% pro transferiertem kryokonserviertem Embryo insinuiert eine reale Chance für die spätere Realisierung der Familienplanung. Mehrere Studien konnten keine höhere Rate an Fehlbildungen bei Kindern nach Kryokonservierung von Embryonen feststellen [26].

Für die Kryokonservierung von Embryonen ist zuvor eine ovarielle Stimulation mit Gonadotropinen notwendig. Nach der In-vitro-Fertilisation (IVF) können die so entstandenen Embryonen dann für später kryokonserviert werden. Diese Behandlung erfordert ein etwa zweiwöchiges Intervall, so dass diese Möglichkeit



**Abb. 6** In-vitro-Fertilisation. A: Intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI). B: Blastozyste. (eigenes Archiv)

ausschließlich Patientinnen angeboten werden kann, bei welchen ein umgehender Start der onkologischen Therapie nicht erforderlich ist. Die Zyklusphase für den Beginn der Stimulationstherapie spielt unter diesen Umständen keine Rolle, da gezeigt werden konnte, dass sich die Qualität der Eizellen nach Stimulation in der Lutealphase nicht von der in der Follikelphase unterscheidet [26]. Die Durchführung einer IVF mit dem Ziel der Kryokonservierung von Embryonen setzt zudem eine Partnerschaft voraus, da im deutschsprachigen Raum eine solche Behandlung ausschließlich bei Ehepaaren oder Paaren in eheähnlicher Lebensgemeinschaft durchgeführt werden darf.

Besondere Erwähnung sollten hier noch Patientinnen mit einem Mammakarzinom finden. Aufgrund der häufig hormonsensiblen Tumore wird eine ovarielle Stimulation nicht selten als kontraindiziert angesehen. Dem entgegen kann jedoch mit den optimierten Stimulationsprotokollen unter Einsatz von Aromatasehemmern, z.B. Letrozol, die Östrogenkonzentration während der Stimulation gering gehalten werden [28]. Nebenwirkungen wie ein ovarielles Überstimulationssyndrom treten – vor allem bei der Ovulationsauslösung mit GnRH-Agonisten – so gut wie nie auf. Eine Substitution der Lutealphase ist nicht notwendig.

### 3.4 Kryokonservierung von reifen Oozyten

Besteht keine feste Partnerschaft, kann auch eine Kryokonservierung von unbefruchteten, reifen Metaphase-II-Oozyten angeboten werden. Jedoch sind reife Oozyten im Gegensatz zu Embryonen anfälliger für Schädigungen durch den Einfrier- und/oder Auftauvorgang. Bis heute konnte keine erhöhte Komplikationsrate im Hinblick auf Fehlgeburten oder Fehlbildungen nach Kryokonservierung von reifen

Oozyten festgestellt werden [29]. Ähnlich der Kryokonservierung von Embryonen ist für die Gewinnung der reifen Oozyten ebenfalls eine ovarielle Stimulation über 10 bis 14 Tage notwendig. Für präpubertäre Mädchen stellt diese Maßnahme keine Option dar, jedoch möglicherweise für Mädchen in der Adoleszenz [26].

Zunehmend in den Fokus des Interesses gerät die Kryokonservierung von



**Abb. 7** Reife Metaphase-II-Oozyte.  
(eigenes Archiv)



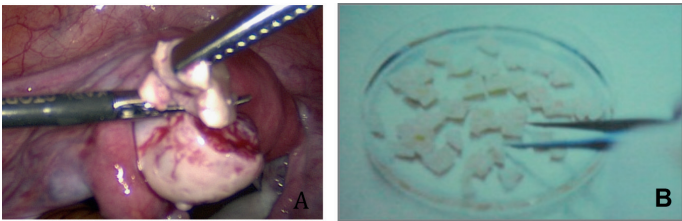
reifen Oozyten im Rahmen des Social Freezings. Hintergrund ist die Sicherung der Fertilität in jungem Alter, um so der physiologischen Abnahme des Follikelpools im Laufe der reproduktiven Phase entgegenzuwirken.

### 3.5 Kryokonservierung von Ovarialgewebe und Retransplantation

Die Kryokonservierung von Ovarialgewebe ist eine vielversprechende, wenn auch noch experimentelle Option der Fertilitätsprotektion für junge Krebspatientinnen. Diese Maßnahme erlaubt einen umgehenden Start der onkologischen Therapie und benötigt keine vorherige ovarielle Stimulation. Entgegen der Kryokonservierung von Embryonen oder Oozyten ist die Kryokonservierung von Ovarialgewebe mit anschließender Retransplantation die einzige Möglichkeit für präpubertäre Mädchen und Frauen mit hoch aggressiven Tumoren, bei denen eine schnelle Initiierung der Chemotherapie entscheidend ist [26].

Die Entfernung des Ovarialgewebes erfolgt mittels operativer Laparoskopie, meist in einem ambulanten Setting. Üblicherweise wird die Hälfte eines Ovars für die spätere Kryokonservierung entfernt (Abb. 8A). Ist von einer sicheren Schädigung der Ovarialfunktion, wie beispielsweise nach pelviner Bestrahlung, auszugehen, ist die Entfernung eines ganzen Ovars zu erwägen.

Der Ovarkortex enthält eine Vielzahl an Primordialfollikeln. Durch die Kryokonservierung dieser kortikalen Ovarstücke (Abb. 8B) gilt es, die ovarielle Reserve für die Patientin zu erhalten. Schäden durch den Einfrier- und/oder Auftauvorgang sind möglich, ihr Ausmaß scheint jedoch eher variabel zu sein.



**Abb. 8** Kryokonservierung von Ovarialgewebe.  
A: Operative Laparoskopie mit Ovarteilresektion.  
B: Präparation des Gewebes für die Kryokonservierung.  
(eigenes Archiv)

Sollte nach Abschluss der onkologischen Therapie eine prämatüre Ovarialinsuffizienz vorliegen, besteht die Möglichkeit, eine Retransplantation des zuvor kryokonservierten Gewebes vorzunehmen. Dabei kann das Gewebe entweder orthotop an das Ovar oder in eine Peritonealtasche der Fossa ovarica transplantiert werden oder heterotop beispielsweise subkutan. Nach beiden Vorgehensweisen wurde von einer Hormonproduktion berichtet, wenngleich die Oozytenreifung von einem bestimmten Umfeld („Ovarnische“) zu profitieren scheint. Bis heute sind weltweit 24 Lebendgeburten nach Retransplantation von Ovarialgewebe publiziert. Bei allen Patientinnen wurde eine orthotope Retransplantation vorgenommen [30].

Ein Risiko dieser Maßnahme ist die Rückübertragung von Tumorzellen. Speziell betrifft dies systemische Erkrankungen wie Leukämie, aber auch Tumore mit dem Risiko der Ovarialmetastasierung wie Mammakarzinom und gastrointestinale Tumore [26]. In diesen Fällen kann die Kryokonservierung von Ovarialgewebe unter der Voraussetzung, dass in absehbarer Zeit In-vitro-Kulturverfahren für die Ex-vivo-Reifung der Follikel etabliert werden können, empfohlen werden.

### **3.6 In-vitro-Maturation von Oozyten aus entnommenem Ovarkortex**

An zunehmender Bedeutung gewinnt die In-vitro-Maturation (IVM) unreifer Oozyten mit anschließender Kryokonservierung. Hierbei handelt es sich jedoch noch um eine rein experimentelle Methode, die in Kombination mit der Kryokonservierung von Ovarialgewebe und anderen Verfahren der Fertilitätsprotektion angeboten werden kann. Die unreifen Oozyten lösen sich bei der Präparation selbst aus dem ovariellen Kortex oder können, sofern Follikel sichtbar sind, aus dem Kortex abpunktiert werden. Die Patientinnen benötigen für die IVM keine oder wenn nur eine milde ovarielle Stimulation und der Zeitraum zwischen Oozytengewinnung und Beginn der onkologischen Therapie ist mit 5 bis 7 Tagen wesentlich kürzer. Zudem stellt diese Methode der Fertilitätsprotektion eine der wenigen Möglichkeiten dar, die bei jungen Mädchen vor Eintritt der Menarche angeboten werden könnte.

Die Lebendgeburtenrate nach Kryokonservierung von *in vitro* maturierten unreifen Oozyten liegt unter der der Kryokonservierung von reifen Oozyten. Sie wird mit etwa der Hälfte der Lebendgeburtenrate nach klassischer IVF angegeben. Bisher konnten keine höheren Risiken für die Schwangerschaft und Kindesentwicklung nach IVM festgestellt werden [31].

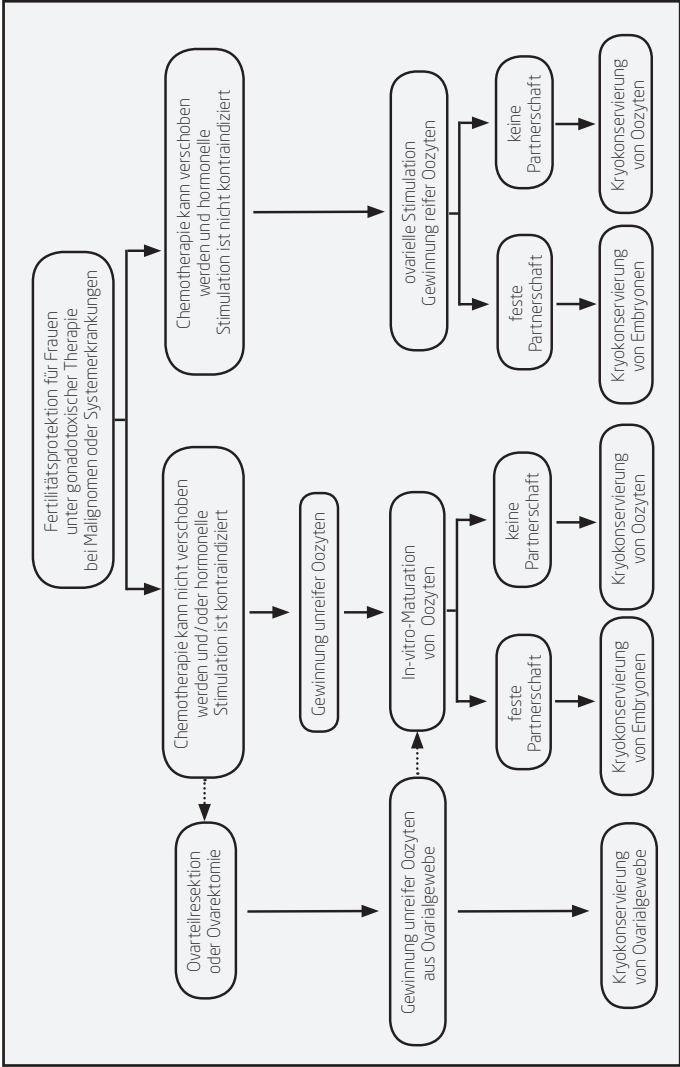
### 3.7 Kombination von fertilitätserhaltenden Maßnahmen

Aufgrund der Vielfalt an Grunderkrankungen, Prognosen und sozialen Faktoren, die in die Beratung mit einfließen, ist ein standardisiertes Vorgehen nicht umsetzbar. Es empfiehlt sich daher unter Berücksichtigung der individuellen Situation, eine Kombination der oben erwähnten Optionen zum Fertilitätserhalt einzusetzen, um eine höhere Effektivität zu erreichen.

Die Gabe von GnRH-Analoga lässt sich – außer bei hormonabhängigen Tumoren – unproblematisch mit der Entnahme von Ovarialgewebe und der hormonellen Stimulation kombinieren. Sollte man eine hormonelle Stimulation und die Kryokonservierung von Ovarialgewebe planen, hat zunächst die Gewebeentnahme und im Anschluss die hormonelle Stimulation zu erfolgen, da andernfalls möglicherweise höhere Risiken für den operativen Eingriff bestehen.

Im Falle einer Ovarialgewebeentnahme zur anschließenden Kryokonservierung bietet sich die Kombination mit der In-vitro-Maturation von unreifen Oozyten an.

Eine Übersicht über die Kombinationsmöglichkeiten der Fertilitätsprotektion zeigt der folgende Algorithmus, wie er auch in Innsbruck angewendet wird (Abb. 9).

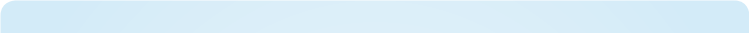


**Abb. 9** Algorithmus der Fertilitätsprotektion. (modifiziert nach Chian et al. [31])

## Literatur

1. **Shelling AN.** Premature ovarian failure. *Reproduction*. 2010 Nov;140(5):633-41.
2. **Hovatta O.** Ovarian function and in vitro fertilization (IVF) in Turner syndrome. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2012 May;9(2):713-7.
3. **Bodega B, Bione S, Dalprà L, Toniolo D, Ornaghi F, Vegetti W et al.** Influence of intermedial and uninterrupted FMR1 CGG expansions in premature ovarian failure manifestation. *Hum Reprod*. 2006 Apr;21(4):952-7.
4. **Bretherick KL, Fluker MR, Robinson WP.** FMR1 repeat sizes in the gray zone and high end of the normal range are associated with premature ovarian failure. *Hum Genet*. 2005 Aug;117(4):376-82.
5. **Sherman SL.** Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 2000;97(3):189-94.
6. **American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics.** ACOG committee opinion. No. 338: Screening for fragile X syndrome. *Obstet Gynecol*. 2006 Jun;107(6):1483-5.
7. **Spencer JB, Badik JR, Ryan EL, Gleason TJ, Broadaway KA, Epstein MP et al.** Modifiers of ovarian function in girls and women with classic galactosemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Jul;98(7):E1257-65.
8. **Di Pasquale E, Rossetti R, Marozzi A, Bodega B, Borgato S, Cavallo L et al.** Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 May;91(5):1976-9.
9. **Aittomäki K, Lucena JL, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J et al.** Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell*. 1995 Sep 22;82(6):959-68.
10. **Li Y, Xiao B, Xiao L, Zhang N, Yang H.** Myasthenia gravis accompanied by premature ovarian failure and aggravation by estrogen. *Intern Med*. 2010;49(6):611-3.
11. **Hoek A, Schoemaker J, Drexhage HA.** Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. *Endocr Rev*. 1997 Feb;18(1):107-34.
12. **Morrison JC, Givens JR, Wiser WL, Fish SA.** Mumps oophoritis: a cause of premature menopause. *Fertil Steril*. 1975 Jul;26(7):655-9.
13. **Morgan S, Anderson RA, Gourley C, Wallace WH, Spears N.** How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Hum Reprod Update*. 2012 Sep;18(5):525-35.
14. **Meirow D, Biederman H, Anderson RA, Wallace WHB.** Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction. *Clin Obstet Gynecol*. 2010 Dec;53(4):727-39.
15. **Wallace WHB, Anderson RA, Irvine DS.** Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncol*. 2005 Apr;6(4):209-18.
16. **Leyendecker G, Wildt L, Plotz EJ.** Hypothalamic ovarian insufficiency. *Gynakologe*. 1981 Jun;14(2):84-103.
17. **Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB.** A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update*. 2006 Nov;12(6):685-718.
18. **Hsu A, Arny M, Knee AB, Bell C, Cook E, Novak AL et al.** Antral follicle count in clinical practice: analyzing clinical relevance. *Fertil Steril*. 2011 Feb;95(2):474-9.
19. **Broekmans FJM, de Ziegler D, Howles CM, Gougeon A, Trew G, Olivennes F.** The antral follicle count: practical recommendations for better standardization. *Fertil Steril*. 2010 Aug;94(3):1044-51.
20. **De Vos M, Devroey P, Fauser BCJM.** Primary ovarian insufficiency. *Lancet*. 2010 Sep 11;376(9744):911-21.
21. **Smotrich DB, Widra EA, Gindoff PR, Levy MJ, Hall JL, Stillman RJ.** Prognostic value of day 3 estradiol on in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 1995 Dec;64(6):1136-40.

22. **Visser JA, de Jong FH, Laven JSE, Themmen APN.** Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction*. 2006 Jan;131(1):1-9.
23. **Gnoth C, Schuring AN, Friol K, Tigges J, Mallmann P, Godehardt E.** Relevance of anti-Müllerian hormone measurement in a routine IVF program. *Hum Reprod*. 2008 Jun;23(6):1359-65.
24. **Wang JG, Douglas NC, Nakhuda GS, Choi JM, Park SJ, Thornton MH et al.** The association between anti-Müllerian hormone and IVF pregnancy outcomes is influenced by age. *Reprod Biomed Online*. 2010 Dec;21(6):757-61.
25. **Ethics Committee of American Society for Reproductive Medicine.** Fertility preservation and reproduction in patients facing gonadotoxic therapies: a committee opinion. *Fertility and sterility*. 2013, pp. 1224-31.
26. **Salama M, Winkler K, Murach KF, Seeber B, Ziehr SC, Wildt L.** Female fertility loss and preservation: threats and opportunities. *Ann Oncol*. 2012 Nov 6;24(3):598-608.
27. **Kim SS, Lee JR, Jee BC, Suh CS, Kim SH, Ting A et al.** Use of hormonal protection for chemotherapy-induced gonadotoxicity. *Clin Obstet Gynecol*. 2010 Dec;53(4):740-52.
28. **Azim AA, Costantini-Ferrando M, Oktay K.** Safety of fertility preservation by ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins in patients with breast cancer: a prospective controlled study. *J Clin Oncol*. 2008 Jun 1;26(16):2630-5.
29. **Levine J, Canada A, Stern CJ.** Fertility preservation in adolescents and young adults with cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Nov 10;28(32):4831-41.
30. **Donnez J, Dolmans M-M.** Fertility preservation in women. *Nat Rev Endocrinol*. 2013 Dec;9(12):735-49.
31. **Chian R-C, Huang JYJ, Gilbert L, Son W-Y, Holzer H, Cui SJ et al.** Obstetric outcomes following vitrification of in vitro and in vivo matured oocytes. *Fertil Steril*. 2009 Jun;91(6):2391-8.



**Univ.-Prof. Dr. Ludwig Wildt**

Direktor der Univ.-Klinik f. gyn. Endokrinologie

u. Reproduktionsmedizin

Anichstr. 35

A-6020 Innsbruck

Tel: +43 (0) 512 504 232 76

Fax: +43 (0) 512 504 232 77

E-Mail: [Ludwig.Wildt@i-med.ac.at](mailto:Ludwig.Wildt@i-med.ac.at)

**ISBN 978-3-9816544-0-0**