

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Lübeck

Leitung: Prof. Dr. med. E. Herting

**Der Einfluss der Koagulopathien Faktor V-Leiden,
Prothrombin G20210A und Faktor XIII Val34Leu auf die
Implantation des menschlichen Embryos**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-aus der medizinischen Fakultät-
vorgelegt von**

**Ann-Kristin Junge
aus Kiel**

Lübeck 2006

1. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Wolfgang Göpel

2. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Michael Seyfarth

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2006

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 30.11.2006

**gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
Dekan der Medizinischen Fakultät**

**Der Einfluss der Koagulopathien Faktor V-Leiden,
Prothrombin G20210A und Faktor XIII Val3□Leu
auf die Implantation des menschlichen Embryos**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Die Mutationen	2
1.3	Fragestellung	4
2	Material und Methoden	5
2.1	Auswahl der Patientinnen	5
2.2	Fallzahlschätzung	6
2.3	Proben	7
2.4	Extraktion der DNA	7
2.5	Polymerasekettenreaktion	8
2.6	Restriktionsenzymverdau und Gelelektrophorese	10
2.6.1	FVL	13
2.6.2	Prothrombin G20210A	15
2.6.3	Faktor XIII Val34Leu	16
2.7	Multiplex-PCR	19
2.7.1	Allelspezifische PCR	19
2.7.2	Multiplex-PCR	19
2.8	Materialien	22
3	Ergebnisse.....	24
3.1	Allgemeines.....	24
3.2	Häufigkeit der Mutationsträger in unserem Kollektiv	24
3.3	Impantationsrate beim ersten Embryotransfer	25
3.4	Anzahl der nicht erfolgreichen IVF/ICSI-Zyklen.....	27
3.5	Analyse weiterer Einflussfaktoren auf die Implantation.....	28
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	29
4	Diskussion.....	30
4.1	Die Mutationen und der Implantationserfolg beim ersten Embryotransfer	30
4.1.1	Die prothrombotische FVL-Mutation.....	30
4.1.2	Die prothrombotische Prothrombin 20210A-Mutation	35
4.1.3	Die antithrombotische Faktor XIII Val34Leu-Mutation	38
4.2	Ziele und Probleme genetischer Assoziationsstudien und die Beurteilung des Studienmodells	42
4.3	Der klinische Bezug der Arbeit und therapeutische Perspektiven.....	45
4.3.1	IVF/ICSI	45
4.3.2	Genetische Einflüsse auf die Implantation des Embryo	48
4.3.3	Diagnostische und therapeutische Perspektiven.....	52
5	Zusammenfassung	55
6	Literaturverzeichnis	56
7	Anhang.....	69
7.1	Studieninformationen	69
7.1.1	Anschreiben	69
7.1.2	Aufklärungsbogen	70
7.1.3	Einverständniserklärung	71
7.2	PCR-Gele	71
7.2.1	FVL	71
7.2.2	Prothrombin 20210A.....	72
7.2.3	Faktor XIII Val34Leu	72
7.2.4	Multiplex-PCR	72
8	Danksagung.....	73

Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Die untersuchten Mutationen und die Funktion der betroffenen Gene im Gerinnungssystem..	3
Abbildung 2: Der Restriktionsenzymverdau mit Spaltungsstellen, entstehenden Fragmentlängen und die Bandendarstellung nach Durchführung der Gelelektrophorese und Silberfärbung bei der FVL-Mutation	14
Abbildung 3: Der Restriktionsenzymverdau mit Spaltungsstellen, entstehenden Fragmentlängen und die Bandendarstellung nach Durchführung der Gelelektrophorese und Silberfärbung bei der Prothrombin 20210A-Mutation	16
Abbildung 4: Exon 2 des Faktor XIII-Gens. Die codierende Sequenz umfasst die Basen 61-190. Primer sind beige hervorgehoben, die Mutation G/T an Position 103 der codierenden Sequenz wurde rot markiert. Die Schnittstelle des Restriktionsenzym ist unterstrichen.	16
Abbildung 5: Der Restriktionsenzymverdau mit Spaltungsstellen, entstehenden Fragmentlängen und die Bandendarstellung nach Durchführung der Gelelektrophorese und Silberfärbung bei der Faktor XIII 34Leu-Mutation.....	18
Abbildung 6: Der Restriktionsenzymverdau mit entstehenden Fragmentlängen und die Bandendarstellung nach Durchführung der Gelelektrophorese und Silberfärbung bei der Allelspezifischen Multiplex-PCR	21
Abbildung 7: Der Wirkmechanismus von Protein C. Das durch Thrombin/Thrombomodulin aktivierte Protein C spaltet die aktivierten Gerinnungsfaktoren V und VIII im Rahmen der Gerinnungsreaktion. APC=aktiviertes Protein C	30
Tabelle 1: PCR-Protokolle der von uns untersuchten Mutationen. Primer for=forward Primer, Primer rev=reverse Primer, dNTP=Desoxy nucleotidtriphosphate, Mg 2+=Magnesium, dH2O=destilliertes Wasser	9
Tabelle 2.: Verwendete Annealing-Temperaturen, Primersequenzen, entstehende Fragmentlängen und Literatur-Referenzen bei den untersuchten Mutationen. Primer for/rev= forward/reverse Primer, bp=Basenpaare	9
Tabelle 3: Restriktionsenzyme, Puffer, Inkubationszeiten und entstehende Fragmentlängen beim Restriktionsenzymverdau der untersuchten Mutationen. bp= Basenpaare.....	11
Tabelle 4: Zusammensetzung der Lösung zur Herstellung eines Polyacrylamidgels.....	12
Tabelle 5: PCR-Ansatz für die Multiplex-PCR. Pro for=Prothrombin forward, Pro rev=Prothrombin reverse, FVLfor=FVL forward, FVL rev=FVL reverse, MTHFR for=Methylentetrahydrofolatreduktase forward, MTHFR rev=Methylentetrahydrofolatreduktase reverse, MgCl= Magnesiumchlorid	20
Tabelle 6: Primersequenzen und Literaturreferenzen bei der Multiplex-PCR. Pro for=Prothrombin forward, Pro rev=Prothrombin reverse, FVL for= FVL forward, FVL rev=FVL reverse, MTHFR for= Methylentetrahydrofolatreduktase, MTHFR rev=Methylentetrahydrofolatreduktase.....	20
Tabelle 7: Anzahl und prozentualer Anteil der Anlageträger im untersuchten Kollektiv. M Wt=Mütter Wildtyp; M heter.=Mütter heterozygot, M homo.=Mütter homozygot, K Wt=Kinder Wildtyp, K heter.=Kinder heterozygot, K homo=Kinder homozygot, Prothrom.=Prothrombin	25
Tabelle 8: Der Implantationserfolg beim ersten Embryotransfer bei allen Mutter/Kind-Paaren. Pos=positiv, neg=negativ, Prothr=Prothrombin 20210A, FXIII=Faktor XIII34Leu, heter=heterozygot, homo=homozygot, *= Fischer's exact test	26
Tabelle 9: Die Implantationsrate beim ersten Embryotransfer in Abhängigkeit vom heterozygoten und homozygoten Trägerstatus der Faktor XIII 34Leu-Mutation. Neg=negativ, pos=positiv, M/K=Mutter/Kind, hetero=heterozygot, homo=homozygot, *=Fischer's exact test	27
Tabelle 10: Erfolgreiche Embryonentransfers bis zum Eintritt einer Schwangerschaft bei FVL-negativen und positiven Mutter/Kind-Paaren. Pos=positiv, neg=negativ	27
Tabelle 11: Zusammenhang zwischen FVL-Trägerstatus bzw. weiteren möglichen Variablen und der Schwangerschaftsrate nach dem ersten Embryotransfer. Angaben in n (%). Die Signifikanzen ergeben sich aus einer logistischen Regressionsanalyse. J=Jahre, G=Schwangerschaft, P=Geburt, M=Mutter, K=Kind.....	28
Tabelle 12: Die Implantation beeinflussende Molekülklassen. LIF=Leukämie inhibitor factor.....	49

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
APCR	Aktiviertes Protein C-Resistenz
Bp	Basenpaar
C	Cytidin
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphate
EGF	Epidermal growth factor
ET	Embryonentransfer
FVL	Faktor V Leiden
G	Guanin
HCG	Humanes Choriongonadotropin
heter	heterozygot
homo	homozygot
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IVF	In-Vitro-Fertilisation
Leu	Leucin
LIF	Leucocytosis inducing factor
Mg	Magnesium
MgCl	Magnesiumchlorid
MMP	Matrixmetallproteinase
MTHFR	Methylentetrahydrofolatreduktase
MUC	Epitheliales Mucin
neg	negativ
ns	nicht signifikant
PCR	Polymerasekettenreaktion
pos	positiv
Primer for	forward Primer
Primer rev	reverse Primer
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
SCID	Severe combined immune deficiency

T	Thymin
UKL	Universitätsklinikum Lübeck
Val	Valin
VLBW	Very low birth weight
VNTR	Variable Number Tandem Repeat Region

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Einleitung

Die Entwicklung der In-Vitro-Fertilisation (IVF) veranlasste zu umfangreichen Versuchen, die Implantationsrate durch verschiedene Modifikationen des Verfahrens zu steigern. Diese Bemühungen führten jedoch nur zu begrenzten Erfolgen. Auch heute noch liegt die Implantationsrate bei einer IVF bei 10-15%. Um wiederholte IVF-Zyklen zu vermeiden, werden deshalb pro Zyklus bis zu drei Embryonen transferiert. Kommt es dann zur Implantation von zwei oder gar allen drei Embryonen, so droht eine zu frühe Geburt der betroffenen Kinder mit allen Gefahren der Frühgeburtlichkeit. Verfahren zur Steigerung der Implantationsrate wären also ein sehr attraktiver Weg, einerseits die Zahl der zurückgesetzten Embryonen pro Zyklus zu reduzieren und damit das Risiko einer höhergradigen Mehrlingsgravidität zu minimieren, andererseits aber eine hohe Schwangerschaftsrate pro durchgeführten IVF-Zyklus zu erreichen.

Die Implantation des menschlichen Embryo wird durch eine Vielzahl von Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren beeinflusst. Da die Implantation bei Säugetieren große speziesabhängige Unterschiede aufweist, lassen sich Ergebnisse aus Tierversuchen nur in begrenztem Umfang auf die menschliche Implantation übertragen. Die beiden klassischen Möglichkeiten der Untersuchung eines biologischen Prozesses - in-vitro-Modell und Tierversuch - sind also aufgrund der Komplexität des Vorgangs und der großen speziesabhängigen Differenzen zum Studium der menschlichen Implantation wenig geeignet.

Mit einem anderen Ansatz wurde die vorliegende Studie durchgeführt. Mutationen, die die Implantation des Embryo positiv beeinflussen, müssen aufgrund der höheren Implantationsrate zu einem Selektionsvorteil für die Träger der Mutation führen. Frauen, bei denen es besonders leicht zur Implantation von befruchteten Eizellen kommt, und Embryonen, die sich besonders gut einnisten, sind also mögliche Träger von implantationsbegünstigenden Erbanlagen.

Normalerweise ist die Anzahl der erfolglosen Implantationsversuche vor Eintritt einer Schwangerschaft nicht bekannt. In IVF-Programmen sind diese Daten jedoch vollständig verfügbar. Führt eine mütterliche oder eine kindliche Mutation zu einer verbesserten

Implantation von befruchteten Eizellen, so erwarten wir bei dieser Frau eine geringe Anzahl von nicht implantierten Embryonen, bis es zum Eintritt einer Schwangerschaft kommt.

Mit Hilfe genetisch-epidemiologischer Studien kann ein Zusammenhang zwischen einer genetischen Variation der DNA und dem Auftreten einer klinischen Auswirkung (in diesem Fall das Eintreten einer Schwangerschaft) überprüft werden. Dafür werden in der vorliegenden Studie eine Gruppe von Patientinnen, bei denen es im Rahmen einer Intrazytoplasmatischen-Spermieninjektionsbehandlung (ICSI) bereits nach Durchführung eines einzigen Embryonentransfer zum Eintritt einer Schwangerschaft kam, einer Vergleichsgruppe gegenübergestellt, deren Behandlung erst nach mehr als einem Zyklus erfolgreich war. Die Patientinnen der Vergleichsgruppe hatten also weniger gut implantiert. Durch die Bestimmung des Trägerstatus dreier Mutationen mit bekanntem Einfluss auf das Gerinnungssystem konnte die Anzahl der Anlageträger in den beiden Kollektiven verglichen und damit der Einfluss der Mutationen auf den Implantationsvorgang abgeschätzt werden.

1.2 Die Mutationen

Bei den von uns untersuchten Mutationen handelt es sich um Punktmutationen der Gerinnungsfaktoren II, V, und XIII. Alle drei Mutationen sind häufig: Etwa 5-6% der europäischen Bevölkerung sind heterozygote Anlageträger für die Faktor V Leiden (FVL)-Mutation, 2-3% sind heterozygot für die Prothrombin G20210A-Mutation und bei etwa 45% der europäischen Bevölkerung wird ein homo- oder heterozygoter Genotyp für den Faktor XIII Val34Leu-Polymorphismus gefunden.

In Abbildung 1 werden die von uns untersuchten Mutationen im Rahmen der physiologischen Gerinnungskaskade dargestellt.

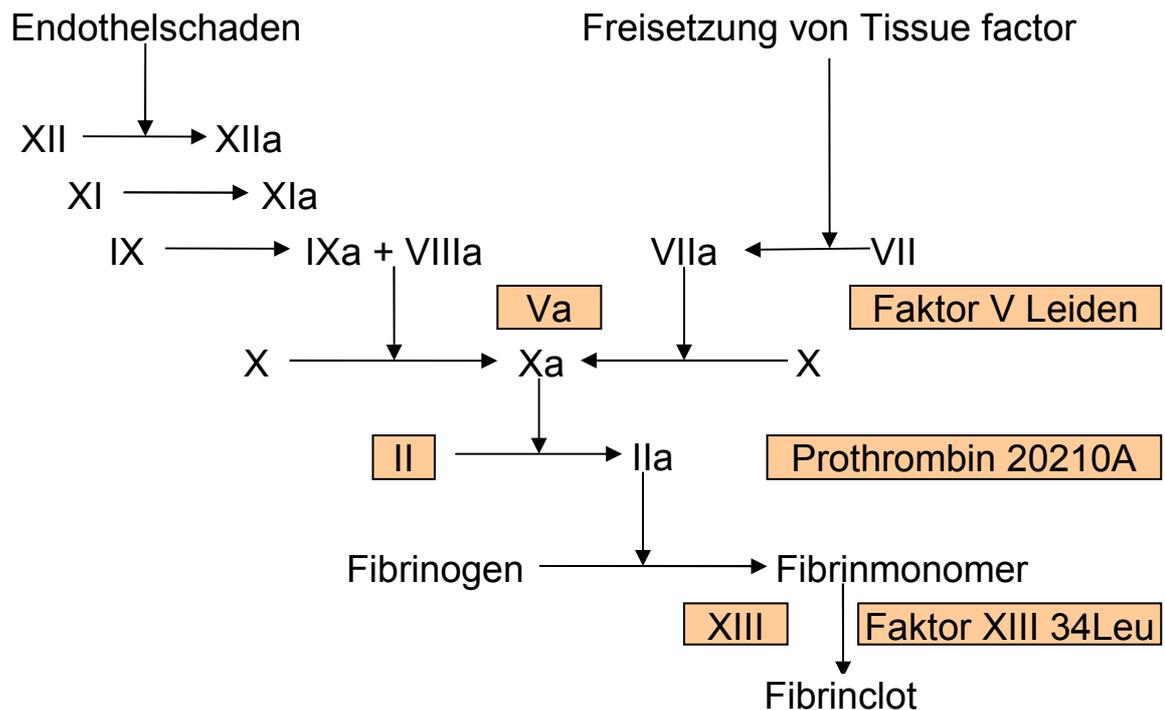


Abbildung 1: Die untersuchten Mutationen und die Funktion der betroffenen Genprodukte im Gerinnungssystem

Bei der FVL-Mutation handelt es sich um eine autosomal dominante Punktmutation, die zu der Synthese eines abnormen Faktor V-Proteins führt. Dieses veränderte Protein wird langsamer durch aktiviertes Protein C abgebaut (Aktiviertes Protein C-Resistenz, APCR) und zirkuliert demnach über einen längeren Zeitraum im Blutkreislauf (Bertina 1994). Da die gerinnungsfördernden Eigenschaften des Faktors durch die Mutation unbeeinflusst bleiben, kommt es zu einem hyperkoagulatorischen Zustand.

Prothrombin (Faktor II) stellt die Vorstufe des fibrinbildenden Thrombins dar. Die autosomal dominante Prothrombin G20210A-Mutation führt bei heterozygoten Anlageträgern zu leicht erhöhten Prothrombin-Spiegeln im Plasma (Poort 1996). Durch die Akkumulation des Gerinnungsfaktors wirkt diese Mutation ebenfalls prothrombotisch.

Der Gerinnungsfaktor XIII stabilisiert im Rahmen einer Gerinnungsreaktion den Fibrinclot. Bei Vorliegen der Faktor XIII Val34Leu-Mutation wird die Aktivierung des Faktors durch Thrombin beschleunigt. Gleichzeitig verringert sich jedoch die Stabilität des Fibrin-Thrombus, so dass Fibrinclots von homozygoten Anlageträgern eine deutlich feinere und fragilere Struktur aufweisen (Ariens 2000). Folge ist eine erhöhte Fibrinolyseempfindlichkeit des Blutgerinnsels und ein dadurch verursachter antithrombotischer Effekt mit erhöhter Blutungs- und erniedrigter Thromboseneigung der Anlageträger.

1.3 Fragestellung

Für die FVL-Mutation zeigte sich eine hohe Prävalenz sowohl bei Frauen mit rezidivierenden Aborten im ersten Trimenon (Ridker 1998) als auch bei Spontanaborten im dritten Trimenon (Dizon-Townson 1997b). In einer weiteren Studie wurde eine Häufung der FVL- und der Prothrombin 20210A-Mutation bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500g (Very low birth weight = VLBW) beschrieben (Göpel 1999). Wenn es sich aber bei den prothrombotischen Mutationen um einen Risikofaktor für Spontanaborte und Frühgeburtlichkeit handelt, so lässt sich der hohe genetische Erfolg dieser Mutationen nicht erklären. Im Gegenteil, sie müssten aufgrund des erhöhten Auftretens von Frühgeburtlichkeit und Aborten bei Anlageträgern längst "ausgestorben" sein. Die für die FVL-Mutation bislang diskutierten Selektionsvorteile einer leichten Thrombophilie, wie z.B. geringerer Blutverlust bei der Menstruation und Verletzungen (Rees 1995) und geringerer Blutverlust bei Geburt (Lindquist 1998), werden erst postnatal wirksam und bedingen, wenn überhaupt, nur einen relativ geringen Selektionsvorteil. Da Haplotypanalysen zeigen, dass die FVL-Mutation nur ein einziges Mal vor etwa 30000 Jahren entstanden ist (Zivelin 1997), muss es weitere Selektionsvorteile geben, die eine so weite Verbreitung der Mutation in der europäischen Bevölkerung ermöglichen.

Die Frage nach einem unbekanntem positiven Selektionsdruck wurde bereits im ersten Kommentar zur FVL-Mutation im Jahre 1994 gestellt:

"The high frequency of a single factor V mutation in diverse groups of people raises the question as to whether positive selection pressure is involved in maintaining it in the population. Perhaps a slight thrombotic tendency confers some advantage in fetal implantation" (Majerus 1994).

In der vorliegenden Arbeit überprüften wir diese Hypothese. Zusätzlich zur FVL-Mutation untersuchten wir die Prothrombin G20210A-Mutation, für die ähnliche klinische Effekte beschrieben wurden, und den Faktor XIII Val34Leu-Polymorphismus, der - im Gegensatz zur FVL-Mutation - mit antithrombotischen Effekten assoziiert wird. Wir untersuchten ein großes Kollektiv von Müttern und Kindern nach erfolgreicher IVF und ICSI und bestimmten die Implantationsrate der Embryonen in Abhängigkeit vom jeweiligen Trägerstatus von Mutter und Kind.

2 Material und Methoden

2.1 Auswahl der Patientinnen

Um die Frage zu beantworten, ob die beschriebenen Mutationen die Implantation des menschlichen Embryo begünstigen, wurde ein Kollektiv von Müttern und Kindern benötigt, bei denen die Anzahl der Fertilisationszyklen und die Anzahl der zurückgesetzten Embryonen bis zum Eintritt der Schwangerschaft genau bekannt ist. Diese Voraussetzung war durch die Teilnahme dieser Frauen an einer IVF/ICSI-Behandlung an der Frauenklinik des UKLs in dem Zeitraum von 1993-2000 und eine aufgrund dieser Sterilitätsbehandlung eingetretene Schwangerschaft erfüllt. Da die Patientinnen ausschließlich mit dem ICSI-Verfahren behandelt wurden, bei dem die Samenzelle direkt in die Eizelle injiziert wird, wurden alle genetischen Faktoren eliminiert, die einen Selektionsvorteil z.B. über eine verbesserte Imprägnation realisieren könnten. Der Schwangerschaftseintritt hing also fast ausschließlich von der erfolgreichen Implantation der Eizelle ab.

Für eine Probenentnahme angeschrieben wurden nur Frauen, bei denen es zu einer Lebendgeburt gekommen war, denn nur dies ermöglichte die Untersuchung sowohl mütterlicher als auch kindlicher Polymorphismen.

Mit Hilfe der stationären Akten wurden klinische Daten der teilnehmenden Patientinnen zusammengetragen und in einer Datei anonymisiert. Dabei galt es, all die Faktoren tabellarisch festzuhalten, die nach aktuellem Kenntnisstand die Implantationsrate bei einer ICSI- bzw. IVF-Behandlung beeinflussen (Templeton 1996). Dazu zählen:

- Alter der Mutter bei Behandlung
- Grund der Infertilität
- Zeitraum des unerfüllten Kinderwunsches
- Uterus-Fehlbildungen und Uterus Myomatosus
- Vorausgegangene Salpingektomie
- Vorausgegangene Schwangerschaften und Geburten

Bezüglich der einzelnen IVF/ICSI-Behandlungen wurde dokumentiert,

- Wann und wieviele Follikelpunktionen durchgeführt wurden
- Die Gesamtheit der bei diesen Punktionen gewonnenen Eizellen
- Wann und wie oft ein Embryonentransfer (ET) stattfand
- Wieviele Embryonen bei den einzelnen ETs zurückgesetzt wurden (1-3)
- Ob eine Implantation erfolgte

Durch die erhobenen Daten konnte beurteilt werden, ob die Patientinnen die Einschlusskriterien für die Studie erfüllen. Patientinnen mit Salpingektomie und/oder Uterus myomatosus in der Vorgeschichte wurden aus der Studie ausgeschlossen, da diese Konditionen die Implantation negativ beeinflussen. Also ergaben sich folgende Ein- bzw. Ausschlusskriterien:

Einschlusskriterien

- Schwangerschaftseintritt durch ICSI/IVF
- Lebendgeburt

Ausschlusskriterien

- Uterus myomatosus
- Z.n. Salpingektomie

Alle Frauen, die die Einschlusskriterien erfüllten (n=185), wurden angeschrieben und um eine schriftliche Einwilligung in die Studie und die Einsendung von je zwei Mundschleimhautabstrichen von Mutter und Kind gebeten. Wir erhielten Proben von insgesamt 113 Mutter/Kind-Paaren. Dies entspricht einem Rücklauf von 61%. Nach dem Ausschluss von 11 Patientinnen mit einem Uterus myomatosus und/oder einer Salpingektomie in der Vorgeschichte ergab sich ein Restkollektiv von 102 Mutter/Kind-Paaren.

2.2 Fallzahlschätzung

Die Fragestellung der vorliegenden Studie wurde bisher nicht untersucht. Eine Fallzahlschätzung wurde bezüglich der FVL-Mutation durchgeführt, da für diese Mutation (im Gegensatz zur Prothrombin- und Faktor XIII-Mutation) eine Assoziation mit Frühgeburtlichkeit und rezidivierenden Aborten in mehreren Studien bestätigt wurde und die FVL-Mutation eine vergleichsweise hohe Prävalenz in der europäischen Bevölkerung aufweist. In Anlehnung an errechnete odds ratios der FVL-Mutation bezüglich eines erhöhten Risikos für eine tiefe Bein- und Beckenvenenthrombose und für rezidivierende Aborte wurde von einer Verbesserung der Implantation um den Faktor 2,5 ausgegangen. Daraus errechnete sich eine notwendige Fallzahl von 100 Mutter/Kind-Paaren (für α -Fehler<0,05; β -Fehler<0,2). Da in Lübeck seit 1993 bereits über 200 Geburten nach IVF/ICSI-Behandlungen eingetreten waren, entschlossen wir uns zu einer historischen Kohortenstudie.

2.3 Proben

Die Entnahme der Mundschleimhautabstriche erfolgte mit Abstrichröhrchen ohne Medium (Hain Diagnostika, Nehren, Deutschland). Um Kontrollbestimmungen zu ermöglichen, wurden je zwei Röhrchen für jeden Probanden (Mütter und Kinder) verschickt. Ein Aufklärungsbogen, eine Anleitung zur Entnahme der Mundschleimhautabstriche und eine zu unterschreibende Einverständniserklärung waren beigelegt (siehe Anhang S.68-70). Die Abstriche wurden durch 6-10maliges festes Rollen entlang der Wangenschleimhaut entnommen und mit Namen und Geburtsdatum beschriftet an das Labor der Kinderklinik geschickt. Bis zur Extraktion der DNA wurden die Proben tiefgekühlt aufbewahrt.

2.4 Extraktion der DNA

Die Extraktion der DNA aus Mundschleimhautabstrichen wurde mit dem \square IAamp DNA Mini Kit (\square iagen GmbH, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Diesem System liegt das Prinzip der Adsorptions-Chromatographie zugrunde. Nach der Inaktivierung sämtlicher Proteinkomponenten mit Hilfe einer Protease wird das Lysat auf eine Säule gebracht, bei deren Durchlaufen die Adsorption der DNA an eine Membran erfolgt. Dabei verhindern die Ionenkonzentration und der pH-Wert der Probe die Anheftung weiterer Kontaminationsprodukte. Das anschließende Waschen der Säule mit Hilfe zweier verschiedener Puffer unter Zentrifugation führt zu einer zusätzlichen Optimierung der DNA-Reinheit, ohne die DNA-Bindung an die Silikatmatrix-Membran zu beeinflussen. Die Eluierung der DNA durch Aufbringen von AE Puffer und Zentrifugation für 1,5 min liefert in einem letzten Schritt das für die PCR verwendbare DNA-Isolat. Durch dieses Extraktionsverfahren erhielten wir von jedem Probanden zwei voneinander unabhängig extrahierte DNA-Proben.

Folgendes Arbeitsprotokoll wurde verwendet:

1. Abbrechen des Watteträgers in ein 2ml Reaktionsgefäß
2. Zugabe von 400 μ l PBS
3. Zugabe von 20 μ l \square iagen Proteinase, Vortex
4. 10min Inkubation bei 56°C
5. Zugabe von 400 μ l Ethanol, Vortex
6. Aufbringen von 600 μ l der Lösung auf eine \square iamp-Säule mit 2ml Auffanggefäß
7. 1min Zentrifugation bei 8000rpm. Nach den einzelnen Zentrifugationsschritten wird die Säule jeweils in ein neues Auffanggefäß gestellt, die gebrauchten Auffanggefäße werden verworfen.

8. Aufbringen der verbliebenen Lösung auf die Säule
9. 1min Zentrifugation bei 8000rpm
10. Aufbringen von 500µl Buffer AWI auf die Säule
11. 1min Zentrifugation bei 8000rpm
12. Aufbringen von 500µl Buffer AWII auf die Säule
13. 3min Zentrifugation bei 13000rpm
14. Die Säule wird nun in ein verschließbares 1,5ml Reaktionsgefäß gestellt
15. Aufbringen von 200µl Buffer AE auf die Säule
16. 1min Inkubation bei Raumtemperatur
17. 1 Minute Zentrifugation bei 8000rpm.

2.5 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ermöglicht die gezielte Amplifikation einer spezifischen Sequenz eines DNA-Doppelstranges.

Dieser wird zunächst durch Erhöhung der Temperatur auf etwa 90°C denaturiert. Danach wird das Gemisch auf die sogenannte Annealing-Temperatur abgekühlt. Bei dieser Temperatur lagern sich zwei aus ca.15-25 Basen bestehende Oligonucleotide (Primer), deren Sequenz das zu amplifizierende Fragment flankiert, an die DNA-Einzelstränge an. Durch den Zusatz einer hitzestabilen DNA-Polymerase werden die beiden amplifizierten Einzelstränge nun zum jeweiligen Doppelstrang komplementiert. Anschließend wiederholt sich der Reaktionszyklus, welcher aus

1. Denaturierung des Doppelstranges
2. Hybridisierung der Primer
3. Synthese der neuen DNA-Stränge besteht.

Werden diese Zyklen mehrfach wiederholt, so ergibt sich eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA-Moleküle. Die Spezifität des DNA-Fragmentes wird durch die Sequenz der zugesetzten Primer erzielt.

Da sich die Vorgehensweise bei den verschiedenen Mutationen lediglich bezüglich der Programm-Wahl und den verwendeten Zusätzen unterscheidet, soll an dieser Stelle auf eine getrennte Darstellung der einzelnen Mutationen verzichtet werden. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die in den einzelnen Ansätzen verwendeten Mengen an Puffer, Polymerasen, Primermengen, dNTPs und weitere Zusätze. Tabelle 2 zeigt die jeweils gewählte Annealing-Temperatur, entstehende Fragmentlängen und Literatur-Referenzen. Das von uns verwendete Thermocycler-Standardprogramm besteht aus einem initialen Denaturierungsschritt (92°C für 30sek), der entsprechenden Annealingphase (siehe Tabelle 2) und einem abschließenden Elongationsschritt (72°C für 60sek). Diese Schritte werden jeweils in 33 Zyklen wiederholt.

	FVL	Prothrombin- G20210A	Faktor XIII Val34Leu
Primer for	20 pmol	5 pmol	20 pmol/μl
Primer rev	20 pmol	5 pmol	20 pmol/μl
dNTPs	5 nmol	5 nmol	5 nmol
Puffer	2,0/ 8,4- Puffer	Platinum	Platinum
Mg ²⁺	-	30 nmol	30 nmol
Polymerase	AmpliTaq 0,5IE	Platinum 0,5IE	Platinum 0,5IE
DNA	~1 ng	~1 ng	~1 ng
dH ₂ O	ad 20 μl	ad 25 μl	ad 25 μl

Tabelle 1: PCR-Protokolle der von uns untersuchten Mutationen. Primer for=forward Primer, Primer rev=reverse Primer, dNTP=Desoxynucleotidtriphosphate, Mg²⁺=Magnesium, dH₂O=destilliertes Wasser

	FVL	Prothrombin- G20210A	Faktor XIII Val34Leu
Annealing- Temperatur	58°C für 45sek	63°C für 30sek	60°C für 60sek
PCR- Fragment	223 bp	350 bp	192 bp
Primer for/rev	ACCCACAGAAAT GATGCCCCAG/ TGCCCCATTATTT AGCCAGGAG	TCTAGAAACAG TTGCCTGGC/ ATAGCACTGGG AGCATTGAAGC	CATGCCTTTTCTGTT GTCTTCACCTTGCAG GTTGA/ CGCCCCGGGGCACA
Literatur- Referenz	Ridker 1995	Poort 1996	Kangsadalampai 1998

Tabelle 2.: Verwendete Annealing-Temperaturen, Primersequenzen, entstehende Fragmentlängen und Literatur-Referenzen bei den untersuchten Mutationen. Primer for/rev= forward/reverse Primer, bp=Basenpaare

2.6 Restriktionsverdau und Gelelektrophorese

Der Restriktionsenzymverdau führt in einem weiteren Schritt zur Erkennung von Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP).

Die dafür verwendeten Restriktionsendonukleasen zeichnen sich durch ihre hohe Spaltungsspezifität aus, da sie doppelsträngige DNA an spezifischen Sequenzen spalten. Diese Spaltungsstellen bestehen aus wenigstens vier Basen und liegen in meist palindromischer Struktur vor, d.h. die Basensequenz in den beiden Einzelsträngen ist, jeweils vom 5'-Ende her gelesen, identisch. Die Restriktionsendonukleasen werden ausschließlich von Bakterien hergestellt und bilden für diese einen Schutzmechanismus gegen das Eindringen von Fremd-DNA. Während die bakterielle DNA nämlich durch Anheftung von Methylgruppen modifiziert und dadurch geschützt ist, kommt es bei Vorliegen einer ungeschützten Fremd-DNA zur Spaltung.

Dieses Prinzip liegt der RFLP-Analyse zugrunde, bei der das amplifizierte DNA-Stück mit einem bestimmten Restriktionsenzym verdaut wird. Die entstehenden Abbauprodukte werden in einem Polyacrylamid-Gel getrennt, so dass das Bandenmuster eines solchen Gels Aufschluss über die Basenpaar-Länge der gespaltenen Fragmente gibt. Stellt sich ein abweichendes Bandenmuster dar, kann dies zurückgeführt werden auf:

- Mutationen des Gens, die in den Erkennungsregionen für das Restriktionsenzym liegen, welches dann nicht mehr schneiden kann
- Mutationen des Gens in einer Region, die zu einer Schnittstelle wird, so dass das Enzym zusätzlich schneiden kann.

Der Verlust oder das zusätzliche Auftreten einer Bande im Rahmen einer RFLP-Analyse lässt also Rückschlüsse auf veränderte Abbauprodukte bei der Endonukleasenspaltung und damit auf das Vorliegen einer Mutation zu.

Die Restriktionsenzyme werden nach Möglichkeit so gewählt, dass das DNA-Fragment nur dann geschnitten wird, wenn die Mutation vorhanden ist, d.h. in diesem Fall muss die Mutation Teil der Schnittstelle des Restriktionsenzym sein. Ebenfalls möglich ist die Verwendung eines Enzyms, das lediglich bei Vorliegen des Wildtyps seine Schnittsequenz erkennt. In beiden Fällen können die Enzyme also direkt zwischen dem Wildtyp und der Mutation differenzieren. Sind solche Endonukleasen nicht bekannt - wie es in der vorliegenden Studie bei der Prothrombin 20210A- und der Faktor XIII 34Leu-Mutation der Fall ist -, werden Primer verwendet, die in unmittelbarer Nähe der Mutation enden, und deren 3'-Ende (mit Ausnahme der letzten Base) so modifiziert ist, dass ein

Restriktionsenzym diese Sequenz zusammen mit der Punktmutation nun von der Wildtyp-Sequenz unterscheiden und schneiden kann (siehe 2.6.3).

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die von uns verwendeten Restriktionsenzyme, Puffer und die entstehenden Fragmentlängen nach Verdau des Wildtyps bzw. der Mutation. Die Proben wurden dabei für die angegebene Zeit bei 37 °C inkubiert.

	FVL	Prothrombin- G20210A	Faktor XIII Val34Leu
Restriktionsenzym	Mnl1 10,4µl/Probe	Hind III 0,25µl/Probe	Dde I 0,2µl/Probe
Puffer	10x NEB2/ 100x BSA	10x NEB2	1x NEB3
Inkubationszeit	3h	3h	2h
Fragmente ohne/mit Mutation (bp)	37+82+104/ 82+141	350/ 329+21	192/ 162+30

Tabelle 3: Restriktionsenzyme, Puffer, Inkubationszeiten und entstehende Fragmentlängen beim Restriktionsenzymverdau der untersuchten Mutationen. bp= Basenpaare

Die Restriktionsfragmente werden durch Gelelektrophorese getrennt. Bei diesem Verfahren wird die enzymverdaute DNA auf ein Gel aufgebracht und in einer Pufferlösung (konstanter pH) einem elektrischen Feld ausgesetzt. In Abhängigkeit von der Molekülgröße wandern die DNA-Bruchstücke auf dem Träger mit verschiedener Geschwindigkeit, so dass nach Anfärbung des Gels ein Bandenmuster entsteht.

Agrund der geringen DNA-Konzentration in den Proben aus Mundschleimhautabstrichen wurde bei der elektrophoretischen Trennung der Fragmente und der Anfärbung der DNA eine sensitive Methode benötigt. Es wurden deshalb Polyacrylamidgele mit anschließender Silberfärbung verwendet. Folgende Gellösung wurde für die Herstellung des Gels verwendet (Tabelle 4):

Zusatz	Menge
Glycerin 100%	0,90ml
10x TBE (Puffer)	1,79ml
Polyacrylamid	3,58ml
Ammoniumpersulfat 10%	0,12ml
TEMED	8,40µl
Aqua bidest	11,60ml

Tabelle 4: Zusammensetzung der Lösung zur Herstellung eines Polyacrylamidgels

Zur mechanischen Stützung wird das Gel auf eine Trägerfolie (GelBond PAG-Film) aufpolymerisiert. Diese Folie wird zwischen eine glatte Glasplatte und eine Glasplatte mit aufgebrachten Gießschablonen für die Gelvertiefungen (Probeslots) gebracht. Nach Einbringen der Lösung in die Gießkassette polymerisiert das Gel bei Raumtemperatur für ca. 30min und kann dann durch vorsichtiges Abheben der Glasplatten aus der Schablone entfernt werden. Für die sich anschließende Elektrophorese wird das Gel auf einen mit 70%igem Ethanol beschichteten Kühlblock gelegt. Die Probeslots weisen dabei zur Kathode, die negativ geladene DNA wandert im Gel in Richtung Anode. In die Probeslots werden jeweils 5µl der Proben pipettiert. Das Auftragen einer Negativ- und einer Positiv-Kontrolle gibt bei der Befundinterpretation Aufschluss über eine evtl. Kontamination der Proben und über den fehlerfreien Ablauf der Polymerasekettenreaktion und des Restriktionsenzymverdaus. Die Banden eines 100 bp-Ladders ermöglichen die Zuordnung der Proben-Banden zu einer Fragment-Länge.

Die notwendige Konstanz des pH-Wertes wird durch Einbringen einer zehnprozentigen 10xTBE-Pufferlösung in die Puffertanks der Multiphorkammer gewährleistet. Zusätzlich werden mehrere Schichten eines in Pufferlösung getränkten Elektrodenbrückenpapiers auf die anodische und kathodische Längsseite des Gels aufgelegt. Wir verwendeten eine Spannung von 600Volt bei einer Stromstärke von 50mA. Die Elektrophoresedauer betrug bei den von uns untersuchten Fragmenten etwa eine Stunde. Danach wurden die Banden durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

Folgende Arbeitsschritte wurden für die Gelfärbung durchgeführt:

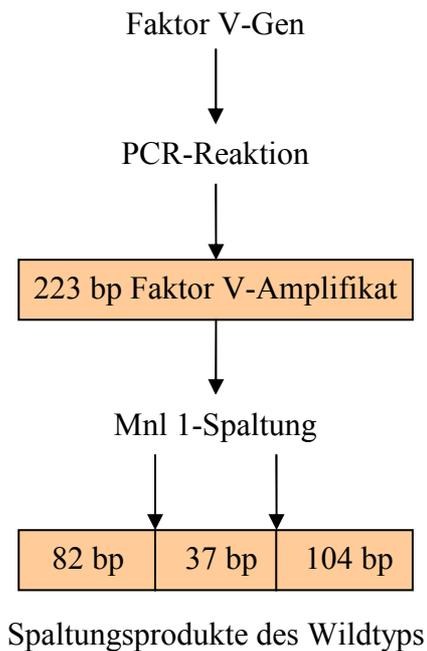
1. Ethanol 10% für 10min
2. Salpetersäure 1% für 3min
3. Aqua bidest für 1min
4. Silbernitrat 99,4% für 35min
5. Aqua dest für 2min
6. Entwickler nach Sicht
7. Essigsäure 10% für 5sek
8. EDTA für 10min
9. Aqua bidest für 5min
10. Glycerin 30% für 5min

Im Anschluss an die Silberfärbung wird das Gel in Klarsichtfolie eingeschweisst, beschriftet und interpretiert. In den folgenden Kapiteln werden die Abläufe der Enzymspaltung und der anschließenden Bandeninterpretation hinsichtlich der einzelnen Mutationen verdeutlicht. Beispiele einzelner Gele finden sich im Anhang S.70-71.

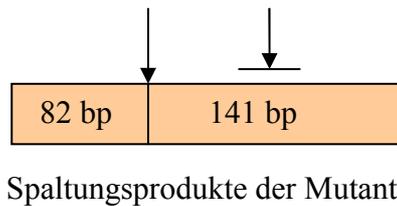
2.6.1 FVL

Für die Identifikation der FVL-Mutation wurde das Restriktionsenzym MnlI verwendet. Dieses Enzym erkennt in dem amplifizierten Genabschnitt seine Schnittsequenz an zwei verschiedenen Stellen, wobei die zweite Spaltungsstelle an das Vorliegen der Wildtyp-Sequenz gebunden ist. Bei Mutationsträgern dagegen kommt es zu einer Blockierung der zweiten Spaltungsstelle des MnlI-Enzyms und es stellt sich im Rahmen der Gelelektrophorese bei heterozygoten Anlageträgern eine zusätzliche Bande mit der Fragmentlänge 141bp dar. Bei Vorliegen einer Homozygotie für das mutierte Gen entfällt die 104bp-Bande, da keines der beiden Allele an der zweiten Schnittstelle gespalten wird.

Restriktionsenzymverdau



Bei Vorliegen der FVL-Mutation kommt es zum Verlust der zweiten Spaltungsstelle



Gelelektrophorese

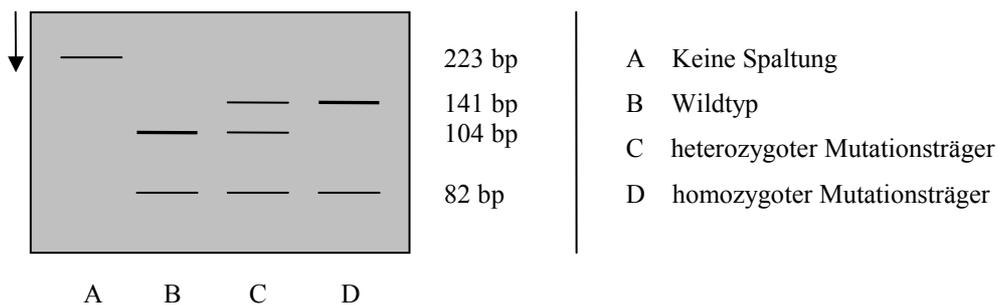
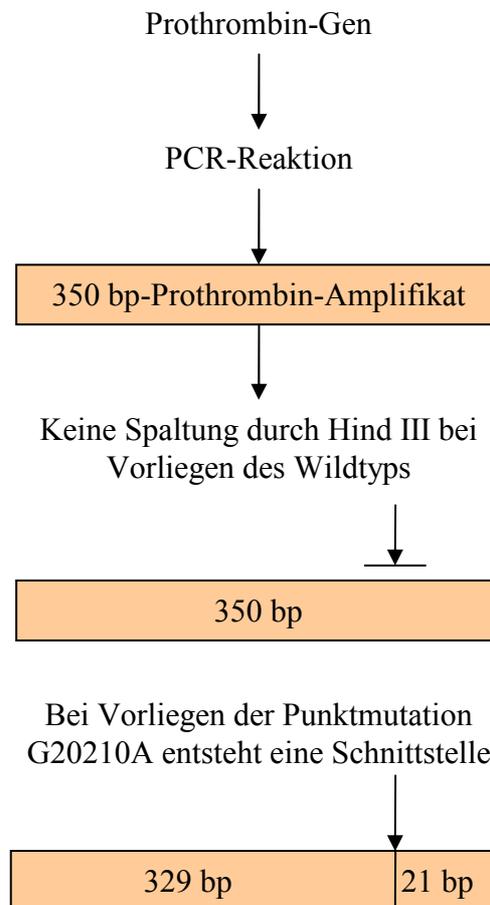


Abbildung 2: Der Restriktionsenzymverdau mit Spaltungsstellen, entstehenden Fragmentlängen und die Bandendarstellung nach Durchführung der Gelelektrophorese und Silberfärbung bei der FVL-Mutation

2.6.2 Prothrombin G20210A

Wie bereits unter 1.4.1 beschrieben wurde, ist derzeit kein Restriktionsenzym bekannt, das die modifizierte Prothrombin-Sequenz vom Wildtyp differenzieren und schneiden kann. Dieses Problem wird gelöst, indem die PCR mit einem Primer durchgeführt wird, der in unmittelbarer Nähe der Punktmutation endet und dabei genetisch so modifiziert ist, dass das amplifizierte Fragment nun zusammen mit der Punktmutation eine Erkennungssequenz für ein bekanntes Restriktionsenzym trägt. Die Spaltung des 350bp-Fragmentes ist also an das Vorliegen der Mutation gebunden und heterozygote Mutationsträger weisen im Rahmen einer elektrophoretischen Trennung eine zusätzliche Bande mit einer Fragmentlänge von 322bp auf. Entfällt die 350bp-Bande, so lässt dies auf einen homozygoten Trägerstatus schließen. Eine genaue molekulargenetische Darstellung der Verwendung solcher mutagener Primer erfolgt am Beispiel der Faktor XIII 34Leu-Mutation unter 2.6.3.

Restriktionsenzymverdau



Gelelektrophorese

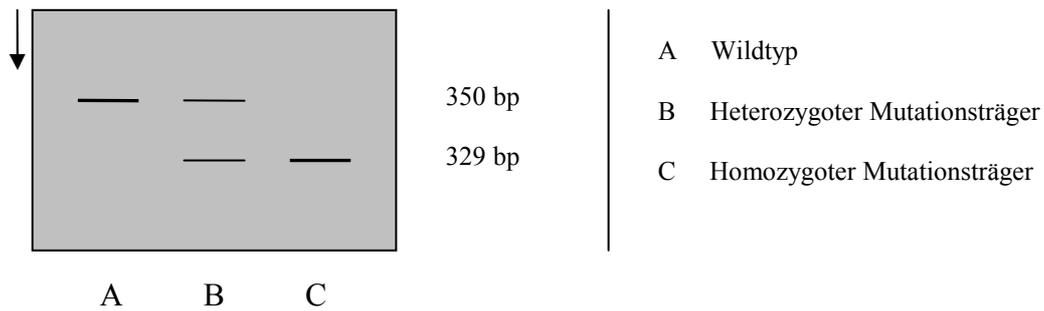


Abbildung 3: Der Restriktionsenzymverdau mit Spaltungsstellen, entstehenden Fragmentlängen und die Bandendarstellung nach Durchführung der Gelelektrophorese und Silberfärbung bei der Prothrombin 20210A-Mutation

2.6.3 Faktor XIII Val34Leu

Auch zum Nachweis der Faktor XIII-Mutation muss auf einen genetisch veränderten Primer zurückgegriffen werden. Am Beispiel dieser Mutation soll das molekular-genetische Prinzip einer solchen Methode verdeutlicht werden.

Abbildung 4 zeigt die Sequenz des Exons 2 des Faktor XIII-Gens (GenBank Accession Nr.: M21987 J 03834, Ichinose 1988):

```

1   ACATGCCTTT TCTGTTGTCT TC TTTTTTTTT TTTTTTCTGA
41  AGGACCTTGT AAAGTCAAAA ATGTCAGAAA CTCCAGGAC
81  CGCCTTTGGA GGCAGAAGAG CAGTTCCACC CAATAACTCT
121 AATGCAGCGG AAGATGACCT GCCCACAGTG GAGCTTCAGG
161 GCGTGGTGCC CCGGGGCGTCAACCTGCAAG GTATGAGCAT
201 ACCCCCCTTC CCCACCACTC TGGGTCCAG
  
```

Abbildung 4: Exon 2 des Faktor XIII-Gens. Die codierende Sequenz umfasst die Basen 61-190. Primer sind beige hervorgehoben, die Mutation G/T an Position 103 der codierenden Sequenz wurde rot markiert. Die Schnittstelle des Restriktionsenzym ist unterstrichen.

An Position 163 des publizierten Fragments ist das rot gekennzeichnete Guanin bei Mutationsträgern durch ein Thymin ersetzt. Dies führt zu einem Austausch von Valin gegen Leucin an Position 34 der Aminosäurekette der α -Untereinheit von Faktor XIII. Zum Nachweis der Mutation wird zunächst mit den oben gekennzeichneten Primern FXIIIforward 5'CAT GCC TTT TCT GTT GTC TTC3' und FXIIIreverse 5'TAC CTT GCA GGT TGA CGC CCC GGG GCA CTA3' ein 192 Basenpaare langes Fragment amplifiziert.

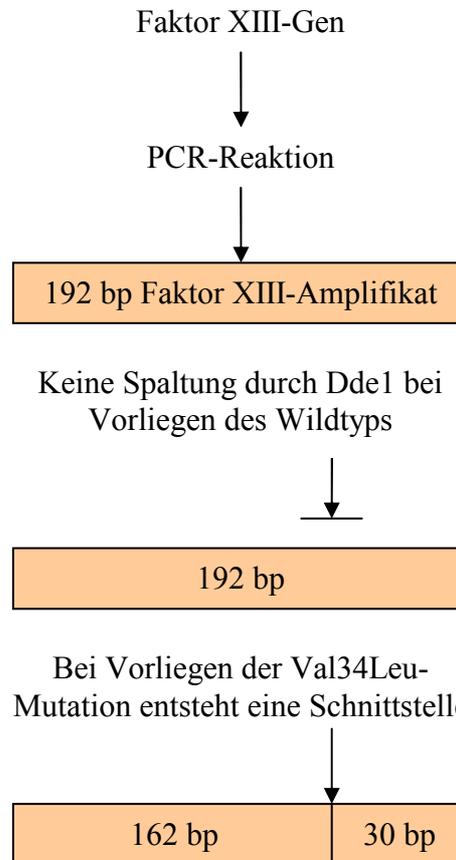
Da reverse Primer dabei invers und komplementär zur eigentlichen Sequenz sind, bindet der verwendete Primer an der Stelle 5' **TAG** TGC CCC GGG GCG TCA ACC TGC AAG GTA3' (entspricht den Basen 164-193 in Abbildung 6). Da der G⇒T-Austausch an Position 163 keine Schnittstelle eines Restriktionsenzym beeinflusst, wurde am 3'-Ende des reverse Primer ein mit der Originalsequenz nicht übereinstimmendes Thymidin eingesetzt, dessen komplementäre Base das Adenin ist (beide Basen sind beige hinterlegt). Nach dem zweiten Amplifikationsschritt entsteht dadurch ein an der Position 165 der Originalsequenz mutiertes Fragment mit der Sequenz:

5'-**GCC**TAGTGCC CCGGGGCGTC AACCTGCAAG GTA-3'

Durch diese Modifikation kann das Restriktionsenzym DdeI mit der Schnittstelle CTNAG (N steht für eine beliebige Base) das Fragment schneiden, wenn an Position 163 ein Thymidin statt ein Guanin (d.h. die Faktor XIII 34Leu-Mutation) vorliegt. Es konnte also durch die gezielte Veränderung einer Base in unmittelbarer Nähe der Mutation eine Erkennungssequenz für ein Enzym bei Vorliegen der Mutation geschaffen werden. Eine solche Modifikation darf jedoch nicht an das Ende eines Primers gesetzt werden, da für die Bindung und Elongation der Taq-Polymerase das Vorliegen eines direkt komplementären Basenpaars am 3'-Ende notwendig ist.

Bei homozygoten Trägern der Faktor XIII 34Leu-Mutation wird das 192bp lange Fragment vollständig in ein 162bp und ein 30bp langes Fragment zerschnitten. Bei Vorliegen eines Val/Leu-Allels treten diese Banden zusätzlich zur 192bp-Bande auf, da nur ein Teil der amplifizierten Fragmente gespalten wird. Der Restriktionsenzymverdau und die Gelelektrophorese nach der Amplifikation des veränderten PCR-Produktes sind in Abbildung 5 dargestellt:

Restriktionsenzymverdau



Gelelektrophorese

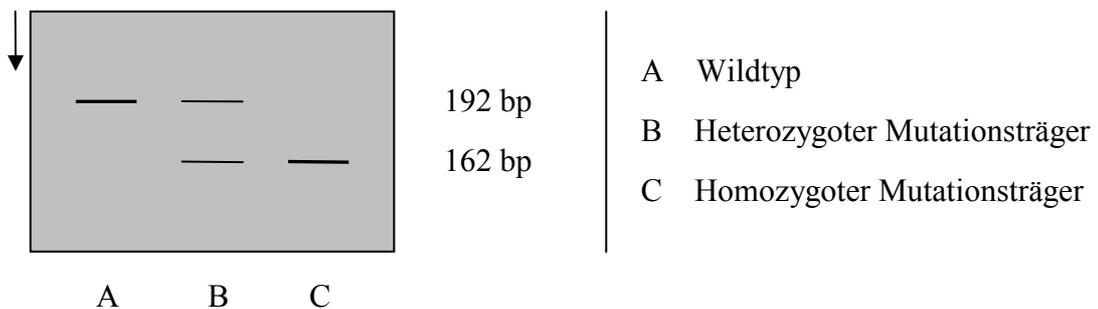


Abbildung 5: Der Restriktionsenzymverdau mit Spaltungsstellen, entstehenden Fragmentlängen und die Bandendarstellung nach Durchführung der Gelelektrophorese und Silberfärbung bei der Faktor XIII 34Leu-Mutation

2.7 Multiplex-PCR

2.7.1 Allelspezifische PCR

Die Taq-Polymerase kann nur dann die Elongation, d.h. die Verknüpfung des zu amplifizierenden Fragmentes vollziehen, wenn am 3'-Ende des Primers bereits ein komplementäres Basenpaar vorliegt. Diesen Umstand kann man ebenfalls für den Nachweis von Punktmutationen nutzen. Bei dieser Methode wird der Primer so gewählt, dass sein 3'-Ende der interessierenden Punktmutation komplementär ist. Dadurch kommt es nur dann zur Bindung des Primers und zur anschließenden Amplifikation, wenn die Mutation vorliegt. Im Anschluss an die Amplifikation wird kein Restriktionsenzymverdau benötigt, da die Fragmentbildung ja bereits selektiv an das Vorliegen der Mutation gebunden ist. Diese Methode wird als Allelspezifische PCR bezeichnet.

2.7.2 Multiplex-PCR

Mit einer Multiplex-Allelspezifischen PCR, also einer PCR, die die gleichzeitige Identifikation mehrerer Polymorphismen ermöglicht, gelang es im Rahmen einer Studie im Jahre 1999, die Mutationen Prothrombin G20210A und FVL zusammen mit der ebenfalls prothrombotischen Mutation Methylentetrahydrofolat-Reductase (MTHFR) C677T darzustellen (Hessner 1999). Diese Untersuchung wurde mit DNA-Proben durchgeführt, die aus peripher entnommenem Blut gewonnen wurden und die eine wesentlich höhere DNA-Konzentration aufweisen als die von uns verwendeten Mundschleimhautabstriche. In Anlehnung an diese und zwei weitere Arbeiten (Frosst 1995, Poort 1997) gelang es uns, ein ähnliches Verfahren auch mit Proben geringerer DNA-Konzentration zu etablieren. Durch Modifikation der Primerzusammensetzung und -konzentration und Verwendung eines sensiblen Polyacrylamidgels konnten allelspezifische Banden für die Prothrombin 20210A-Mutation und die FVL-Mutation dargestellt werden. Die PCR wurde mit einer Annealing-Temperatur von 61°C und insgesamt 29 Zyklen durchgeführt. Der einwandfreie Ablauf der PCR wurde durch die gleichzeitige Darstellung einer allelspezifischen MTHFR-Bande (die also in jedem Fall bei der elektrophoretischen Trennung erscheint) kontrolliert.

Tabelle 5 und 6 informieren über die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes, die verwendeten Primersequenzen und Literaturreferenzen.

Zutaten	Pro Probe
Primer Pro for multi (5pmol)	0,5µl
Primer Pro rev multi (5pmol)	0,5µl
Primer FVL for multi (20pmol)	0,5µl
Primer FVL rev multi (20pmol)	0,5µl
Primer MTHFR for multi (1,5pmol)	0,5µl
Primer MTHFR rev multi (1,5pmol)	0,5µl
10x PCR-Puffer	2,5µl
MgCl	0,6µl
dNTP-Mix	0,5µl
Platinum Taq DNA-Polymerase	0,2µl
Aqua bidest	12,2µl
DNA genomisch	1,0µl
Gesamt	20µl

Tabelle 5: PCR-Ansatz für die Multiplex-PCR. Pro for=Prothrombin forward, Pro rev=Prothrombin reverse, FVLfor=FVL forward, FVL rev=FVL reverse, MTHFR for=Methylentetrahydrofolatreduktase forward, MTHFR rev=Methylentetrahydrofolatreduktase reverse, MgCl= Magnesiumchlorid

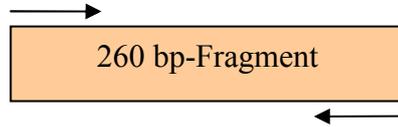
Primer	Nukleotidsequenz	Literatur-Referenz
Pro for multi	5'-TCCGCTGAAGAAGTGGATA-3'	Poort 1997
Pro rev multi	5'-CACTGGGAGCATTGAGGCAT-3'	
FVL for multi	5'-ACAATTTTCAATATATTTTCTTTCA GGCAG-3'	Hessner 1999
FVL rev multi	5'-TTCAAGGACAAAATACCTGTATTC CAT-3'	
MTHFR for multi	5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'	Frosst 1995
MTHFR rev multi	5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'	

Tabelle 6: Primersequenzen und Literaturreferenzen bei der Multiplex-PCR. Pro for=Prothrombin forward, Pro rev=Prothrombin reverse, FVL for=FVL forward, FVL rev=FVL reverse, MTHFR for=Methylentetrahydrofolatreduktase forward, MTHFR rev=Methylentetrahydrofolatreduktase reverse

Durch die Verwendung allelspezifischer Primer entfällt ein anschließender Restriktionsenzymverdau. Es ergeben sich folgende Amplifikate:

FVL-Mutation

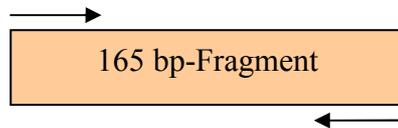
FVL for multi bindet mutationsunabhängig



FVL rev multi bindet bei Vorliegen der Mutation

Prothrombin 20210A

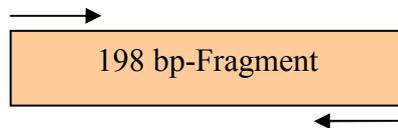
Pro for multi bindet mutationsunabhängig



Pro rev multi bindet bei Vorliegen der Mutation

Kontrollbande MTHFR

MTHFR for multi bindet mutationsunabhängig



MTHFR rev multi bindet mutationsunabhängig

Gelelektrophorese

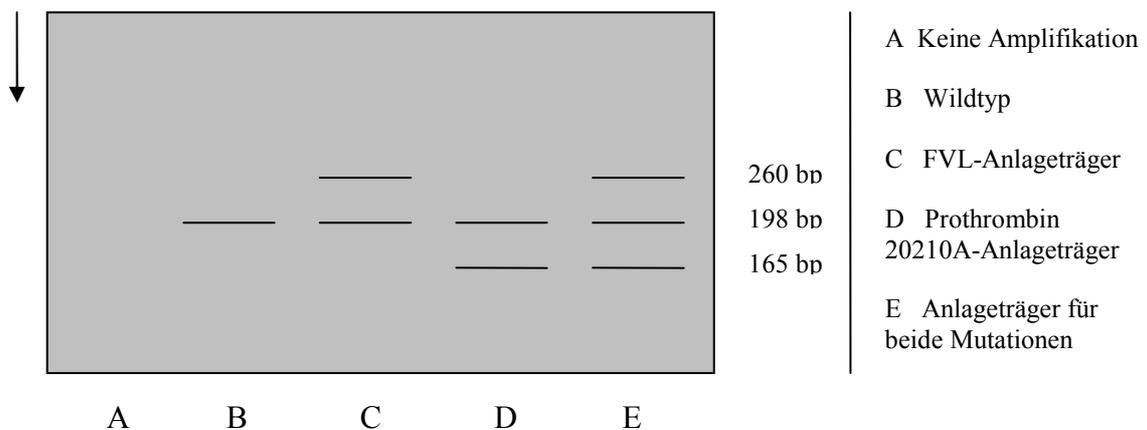


Abbildung 6: Der Restriktionsenzymverdau mit entstehenden Fragmentlängen und die Bandendarstellung nach Durchführung der Gelelektrophorese und Silberfärbung bei der Allelspezifischen Multiplex-PCR

Aufgrund der individuellen Entnahme der Mundschleimhautabstriche ergaben sich stark schwankende DNA-Konzentrationen der einzelnen Proben. Dies ist bei einer Allelspezifischen PCR problematisch, da geringe DNA-Mengen zu einem falsch negativen Ergebnis führen können. Aus diesem Grund sahen wir für die vorliegende Studie von einer alleinigen Untersuchung der Proben durch die Multiplex-PCR ab und führten für jede Probe eine zusätzliche PCR mit anschließendem Restriktionsenzymverdau durch. Dabei fanden sich für die Proben, die aufgrund ausreichender DNA-Mengen zu Ergebnissen mit beiden Verfahren geführt hatten, eine Übereinstimmung der Resultate.

Ein Gel der Multiplex-PCR mit sowohl guten Ergebnissen als auch mit unzureichenden DNA-Mengen findet sich im Anhang S. 71.

2.8 Materialien

Puffer

1x TE-Puffer	1,12g 0,1M Tris (Merck), 0,29g/1 0,01M EDTA (Roth) in 1l Aqua bid.
10xTBE-Puffer	436g Tris (Base, Sigma), 223g Borsäure (pH 8,3, Roth), 37,2g EDTA (Roth) in 4 Liter Aqua bidest
10x PCR Puffer	200mM Tris HCl (pH 8,4), 500mM KCl, Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
2,0/8,4-PCR-Puffer	500 µl 1M KCl, 200 µl 1M Tris (pH 8,4), 50 µl BSA (10mg/ml), 10 µl 2M MgCl ₂ , 240 µl Aqua bid.
10xNEB2-Puffer	New England BioLabs, Schwalbach-Taunus
1x NEB-Puffer 3	New England BioLabs, Schwalbach-Taunus
Ampli-Taq-PCR-Puffer	Perkin Elmer, Zaventem, Belgien

Primer

FVL for/rev	MWG Biotech AG, Ebersberg
Prothrombin for/rev	MWG Biotech AG, Ebersberg
Faktor XIII for/rev	MWG Biotech AG, Ebersberg
Pro for/rev multi	Eurogentec, Köln
FVL for/rev multi	MWG Biotech AG, Ebersberg
MTHFR for/rev multi	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe

Enzyme

AmpliTaq-DNA-Polymerase	Perkin Elmer, Zaventem, Belgien
Platinum Taq DNA-Polymerase	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Mnl 1	New England Biolabs Schwalbach-Taunus
Hind III	England Biolabs Schwalbach-Taunus
Dde I	England BioLabs Schwalbach-Taunus

Weitere Chemikalien

dNTP-Mix 10mM	Hybaid, USA
100 bp-Ladder I	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
100x BSA 10 mg	New England Biolabs, Schwalbach-Taunus
MgCl 50mM	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Glycerin 100%	Merck, Darmstadt
Polyacrylamid	30% Acrylamidstammlösung mit 0,8% Bisacrylamid, Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumperoxidisulfat 10%	Roth GmbH, Karlsruhe
TEMED	Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol 10%	Merck, Darmstadt
Salpetersäure 1%	Roth GmbH, Karlsruhe
Silbernitrat 2%	Caesar & Loretz GmbH, Hilden
Entwickler	29,6 g/l Natriumcarbonat (Riedel-de Haen, Seetze), 540 µl 37% Formaldehyd (Roth GmbH, Karlsruhe)
Essigsäure 10%	Merck, Darmstadt
EDTA 50mM	Roth GmbH, Karlsruhe
Glycerin 30%	Merck Darmstadt
Benzinum DAB	Fishar GmbH&Co KG, Saarbrücken
□Iamp DNA Mini Kit	□iagen, Hilden

Geräte

Thermocycler PTC-200	Biozym GmbH, Oldenburg
Wärmeblock Dri-Block 2A	Techne, Cambridge, England
Gel Bond PAG film	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Glasplatten (124x258mm)	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Multiphor II- Elektrophoresekammer	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Stromversorger PowerPAC3000	BIO-RAD, California, USA
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf GmbH, Hamburg
Laborschüttler IKA-Vibro-FIX	Janke & Kunkel, Staufen
Elektrodenbrückenpapier (104x253mm)	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeines

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob die FVL-, die Prothrombin 20210A- und/oder die Faktor XIII34Leu-Mutation zu einer veränderten Implantationsrate des Embryo führt. Da unklar ist, ob dabei die kindliche oder mütterliche Mutation den entscheidenden Einfluss auf die Implantation nimmt, wurden für die statistischen Auswertungen alle Mutter/Kind-Paare, bei denen die Mutter oder das Kind eine Mutation (heterozygot oder homozygot) trägt, als positiv für die entsprechende Mutation gewertet. Durch dieses Verfahren wird zwar unter Umständen eine bestehende Assoziation in einer Subgruppe nicht erfasst, es werden aber andererseits multiple Testungen vermieden.

Alle für die Statistik wichtigen Datensätze über die medizinische Vorgeschichte, die IVF/ICSI-Behandlung und den Schwangerschaftsverlauf der beteiligten Patientinnen (siehe 2.1) wurden aus den Akten der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe erhoben. Nach Anonymisierung dieser Daten und der Proben wurde mit der Untersuchung der DNA-Proben begonnen. Da die im Methodenteil beschriebene Multiplex-PCR keine konstanten Ergebnisse bei Wiederholungsuntersuchungen zeigte, führten wir alle Genotypisierungen mittels PCR und RFLP durch.

3.2 Häufigkeit der Mutationsträger in unserem Kollektiv

Der Trägerstatus der FVL- und Prothrombin-Mutation konnte bei allen 102 Müttern (100%), die Faktor XIII-Mutation bei 100 von 102 Müttern (98%) nachgewiesen werden. In der Gruppe der Kinder (und bei einer in der Regel etwas niedrigeren DNA-Konzentration der Proben) konnte der FVL-Status bei 129 (96%), der Prothrombin-Status bei 127 (95%) und der Faktor XIII-Status bei 128 (96%) von insgesamt 134 Proben bestimmt werden.

In Tabelle 7 sind die Anzahl und der jeweils prozentuale Anteil der Mutationsträger am bestimmbareren Gesamtkollektiv angegeben. Dabei wurde eine Unterteilung in homozygote und heterozygote Anlageträger vorgenommen.

	Mütter n=102			Kinder n=134		
	M Wt n(%)	M heter n(%)	M homo n(%)	K Wt n(%)	K heter n(%)	K homo n(%)
FVL	96(94)	6(6)	0(0)	122(95)	7(5)	0(0)
Prothrombin G20210A	99(97)	3(3)	0(0)	122(96)	5(4)	0(0)
Faktor XIII Val34Leu	40(39)	52(51)	10(10)	53(41)	69(54)	6(5)

Tabelle 7: Anzahl und prozentualer Anteil der Anlageträger im untersuchten Kollektiv. M Wt=Mütter Wildtyp; M heter=Mütter heterozygot, M homo=Mütter homozygot, K Wt=Kinder Wildtyp, K heter=Kinder heterozygot, K homo=Kinder homozygot

Insgesamt 10 Mutter/Kind-Paare waren heterozygot für die FVL-Mutation. In 4 Fällen trug nur die Mutter die Mutation, in weiteren 4 Fällen nur das Kind.

Eine geringere Prävalenz fand sich für die Prothrombin 20210A-Mutation. Von den 6 positiven Mutter/Kind-Paaren waren in 2 Fällen nur die Mutter und in 3 Fällen nur das Kind betroffen. Weder für die FVL-Mutation noch für die Prothrombin-Mutation fanden sich homozygote Anlageträger.

Die Faktor XIII-Mutation konnte bei 75 Mutter/Kind-Paaren nachgewiesen werden. Von allen Anlageträgern waren jeweils 52 Mütter und 69 Kinder hetero- bzw. 10 Mütter und 6 Kinder homozygot.

3.3 Impantationsrate beim ersten Embryotransfer

Primäres Outcomekriterium für den Gruppenvergleich zwischen Mutation-negativen und -positiven Mutter/Kind-Paaren war der Erfolg des ersten IVF/ICSI-Zyklus, denn nur dieser Zyklus wurde von allen Patientinnen durchlaufen (bei erfolgreicher Implantation waren keine weiteren Zyklen notwendig).

Zusätzlich zeigen kürzlich veröffentlichte Daten einen signifikant niedrigeren Implantationserfolg bei Frauen, die mehrere IVF-Zyklus durchlaufen (Shapiro 2001). Tabelle 8 zeigt die Erfolgsraten des ersten Embryotransfers bei allen Mutationsträgern unseres Kollektivs.

	1. Transfer erfolgreich n (%)	1. Transfer nicht erfolgreich n (%)	P*(2-seitig)
Alle Mutter/Kind- Paare (n=102)	54 (53)	48 (47)	
FVL-pos (n=10)	9 (90)	1 (10)	0,018
FVL-neg (n=92)	45 (49)	47 (51)	
Prothr-pos (n=6)	3 (50)	3 (50)	ns
Prothr-neg (n=96)	51 (53)	45 (47)	
F XIII pos (heter oder homo, n=75)	43 (57)	32 (43)	ns
F XIII-neg (n=27)	11 (41)	16 (69)	

Tabelle 8: Der Implantationserfolg beim ersten Embryotransfer bei allen Mutter/Kind-Paaren. Pos=positiv, neg=negativ, Prothr=Prothrombin 20210A, FXIII=Faktor XIII34Leu, heter=heterozygot, homo=homozygot, *= Fischer's exact test, ns=nicht signifikant

Die Implantationsrate im ersten Transferzyklus bei FVL-positiven Mutter/Kind-Paaren beträgt 90%, d.h. bei 9 von 10 Frauen kam es nach dem ersten IVF/ICSI-Zyklus zur Geburt eines Kindes. Bei FVL-negativen Mutter/Kind-Paaren kam es nur bei 49% der Mütter zur Geburt eines Kindes nach dem ersten IVF/ICSI-Zyklus ($p=0,018$, Fischer's exact test). Dies bedeutet, dass Anlageträger der FVL-Mutation mit einer signifikant höheren Wahrscheinlichkeit einen Embryo implantieren als Träger des Wildtyp-Allels.

Im Gegensatz zur FVL-Mutation zeigt der Vergleich der Implantationsrate 20210A-positiver und -negativer Mutter/Kind-Paare keinen signifikanten Unterschied. Die Daten weisen auf nahezu identische Erfolgsraten bei beiden Kollektiven hin.

Ähnliches ergibt der Vergleich von Faktor XIII 34Leu-positiven und -negativen Mutter/Kind-Paaren, bei dem ebenfalls kein signifikanter Einfluss der Mutation auf die Implantationsrate nachweisbar ist. Auch eine Unterteilung in hetero- und homozygote Anlageträger zeigt keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Mutation und der Implantationsrate (Tabelle 9).

	34Leu-neg M/K-Paare (n=27)	34Leu-pos heter M/K-Paare (n=61)	34Leu-pos homo M/K-Paare (n=14)	P*
1. Transfer erfolgreich n (%)	11(41)	34(56)	9(64)	ns

Tabelle 9: Die Implantationsrate beim ersten Embryotransfer in Abhängigkeit vom heterozygoten und homozygoten Trägerstatus der Faktor XIII 34Leu-Mutation. Neg=negativ, pos=positiv, M/K=Mutter/Kind, heter=heterozygot, homo=homozygot, *=Fischer's exact test, ns=nicht signifikant

3.4 Anzahl der nicht erfolgreichen IVF/ICSI-Zyklen

Sekundäres Outcomekriterium ist die Anzahl der nicht erfolgreichen IVF/ICSI-Zyklen in beiden Gruppen. Tabelle 10 zeigt die Verteilung der nicht erfolgreichen Zyklen in Abhängigkeit von dem FVL-Trägerstatus des Mutter/Kind-Paares. Auf Grundlage dieser Daten lassen sich signifikante Ergebnisse für die Mittlere Anzahl erfolgloser Embryotransfers bis zum Eintritt einer Schwangerschaft und für die mittleren Ränge der FVL-Mutation berechnen. Auf die Darstellung der Prothrombin G20210A- und der Faktor XIII 34Leu-Mutation wird in den Nichtparametrischen Tests aufgrund der fehlenden Assoziation der Mutationen mit dem primären Outcomekriterium verzichtet. Die mittlere Anzahl der erfolglosen Embryotransfers beträgt in der FVL-negativen Gruppe 1 (Range 0-8) und in der FVL-positiven Gruppe 0 (Range 0-2). Im Rangsummentest nach Mann-Whitney unterscheiden sich beide Gruppen signifikant (p=0,02).

Anzahl der erfolglosen Embryotransfers	FVL-pos Mutter/Kind-Paare	FVL-neg Mutter/Kind-Paare
0	9	45
1		21
2	1	14
3		6
4		1
5		4
8		1

Tabelle 10: Erfolgreiche Embryonentransfers bis zum Eintritt einer Schwangerschaft bei FVL-negativen und -positiven Mutter/Kind-Paaren. Pos=positiv, neg=negativ

3.5 Analyse weiterer Einflussfaktoren auf die Implantation

Um auszuschließen, dass der positive Effekt der FVL-Mutation auf die Implantation durch eine ungleiche Verteilung anderer Einflussfaktoren auf die beiden Gruppen bedingt ist, führten wir eine Multivarianzanalyse durch. Neben dem FVL-Trägerstatus der Mutter/Kind-Paare wurden in Anlehnung an die Templeton-Studie (Templeton 1996, s. auch 2.1) folgende Einflussfaktoren als unabhängige Variablen berücksichtigt:

- Grund der Infertilität (männlich/ weiblich)
- Alter der Mutter bei Geburt (<33 Jahre/ ≥33 Jahre)
- Anzahl der zurückgesetzten Embryonen (1 vs. 2 oder 3)
- Vorausgegangene Schwangerschaften und/oder Geburten (ja/nein)

Untersuchungen ergaben vergleichbare Implantationsraten bei Frauen mit zwei oder drei transferierten Embryonen (Ozturk 2002), so dass in der Regressionsanalyse lediglich der Transfer eines einzelnen Embryo als signifikanter Einflussfaktor berücksichtigt wird. Aufgrund unvollständiger Angaben über das Körpergewicht bzw. die Größe der Patientinnen zum Zeitpunkt der Behandlung und die Dauer des unerfüllten Kinderwunsches, wurde von einer Auswertung dieser Einflussfaktoren abgesehen. Abhängige Variable bei der Berechnung war die Geburt eines Kindes nach dem ersten Embryotransfer. Tabelle 11 zeigt das Ergebnis der logistischen Regressionsanalyse.

Unabhängige Variable	Erster Embryotransfer erfolgreich (n=54)	Erster Embryotransfer nicht erfolgreich (n=48)	P
Androgene Infertilität	27 (50%)	25 (52%)	0,824
Transfer von 1 Embryo	1 (2%)	2 (4%)	0,843
Alter der Mutter <33 J	31 (57%)	19 (40%)	0,526
Vorausgegangene G	8 (15%)	11 (23%)	0,714
Vorausgegangene P	6 (12%)	3 (6%)	0,632
M oder K FVL-positiv	9 (17%)	1 (2%)	0,040

Tabelle 11: Zusammenhang zwischen FVL-Trägerstatus bzw. weiteren möglichen Variablen und der Schwangerschaftsrate nach dem ersten Embryotransfer. Angaben in n (%). Die Signifikanzen ergeben sich aus einer logistischen Regressionsanalyse. J=Jahre, G=Schwangerschaft, P=Geburt, M=Mutter, K=Kind

Die Multivarianzanalyse bestätigt die Resultate des einfachen Gruppenvergleichs. Während keiner der anderen berücksichtigten unabhängigen Variablen einen signifikanten

Einfluss auf die Implantationsrate nimmt, bleibt die FVL-Mutation ein signifikanter Prädiktor für eine erfolgreiche Implantation nach dem ersten IVF/ICSI-Zyklus.

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen eine signifikant erhöhte Implantationsrate bei Anlageträgern der FVL-Mutation. Mütter oder Kinder, die Träger dieser Mutation sind, implantieren mit einer 1,84fach höheren Wahrscheinlichkeit im Rahmen des ersten Embryotransfers als Träger des Wildtyp-Allels ($p=0,018$ Fischer's exact test). Gleichzeitig liegt bei FVL-positiven Mutter/Kind-Paaren eine signifikant niedrigere mittlere Anzahl erfolgloser Embryonentransfers bis zum Eintritt einer Schwangerschaft vor (0 vs 1, $p= 0,02$, Mann Whitney Rangsummentest). Diese Daten werden in der Multivarianzanalyse bestätigt, da unter der Einbeziehung einer Vielzahl möglicher unabhängiger Variablen der signifikante Einfluss der FVL-Mutation bestehen bleibt.

Für die Prothrombin-Mutation ergeben sich annähernd gleiche Schwangerschaftsraten nach dem ersten Embryotransfer bei Anlageträgern und Nicht-Trägern (50% vs 53%). Ein Einfluss auf die Implantationsrate lässt sich demnach nicht aus den Ergebnissen ableiten.

Auch für die Faktor XIII 34Leu-Mutation lässt sich weder im einfachen Vergleich von Trägern und Nicht-Trägern noch in einer getrennten Betrachtung hetero- und homozygoter Anlageträger eine signifikanter Beeinflussung der Implantationsrate nachweisen.

4 Diskussion

4.1 Die Mutationen der Gerinnungsfaktoren und der Implantationserfolg beim ersten Embryotransfer

4.1.1 Die prothrombotische FVL-Mutation

Bei der FVL-Mutation handelt es sich um eine autosomal dominante Punktmutation des Gerinnungsfaktors V, die zu einer pathologischen Persistenz von aktiviertem Faktor V und damit zu einem hyperkoagulatorischen Zustand führt.

Neben den prokoagulatorischen Blutgerinnungsfaktoren enthält das Blut Inhibitoren, die der Vermeidung eines überschießenden oder generalisierenden Gerinnungsprozesses dienen. Einen wichtigen Bestandteil dieses Schutzsystems stellt das Protein C dar, welches als inaktives Proenzym in der Leber synthetisiert wird und in dieser Form im Blut zirkuliert. Die Überführung in die aktive Form (Aktiviertes Protein C, APC) wird über die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin, einem endothelständigem Rezeptorprotein, reguliert. APC besitzt in Gegenwart des Cofaktors S proteolytische Aktivität und reduziert über die Spaltung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa das Ausmaß der Gerinnungsreaktion. Bei diesem Vorgang handelt es sich also um einen intravasalen Schutzmechanismus, bei dem Thrombin eine Schlüsselstellung einnimmt, indem es zum einen die Gerinnungskaskade aktiviert, zum anderen aber einen wirksamen antikoagulatorischen Begleitmechanismus in Gang setzt (siehe Abb. 9).

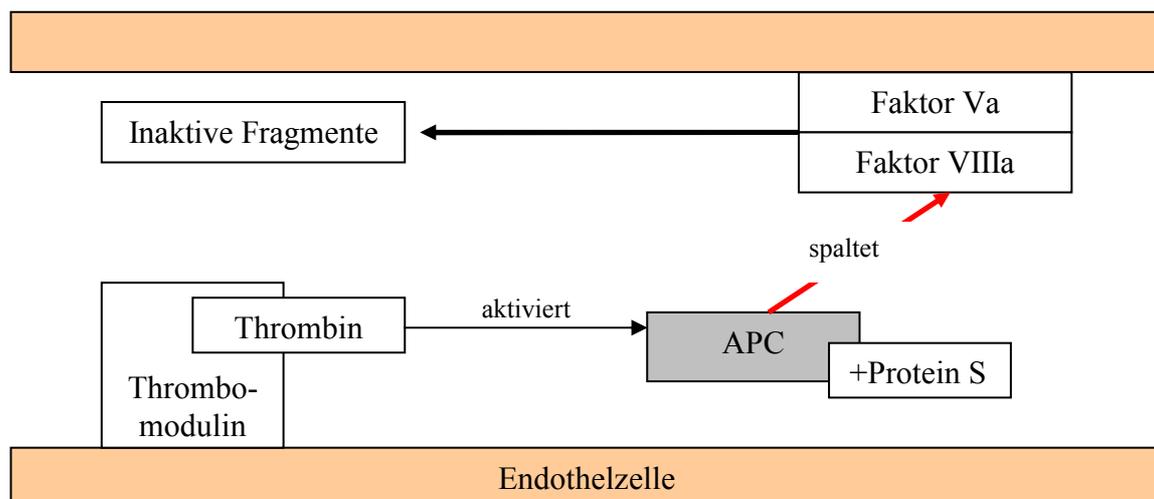


Abbildung 7: Der Wirkmechanismus von Protein C. Das durch Thrombin/Thrombomodulin aktivierte Protein C spaltet die aktivierten Gerinnungsfaktoren V und VIII im Rahmen der Gerinnungsreaktion. APC=aktiviertes Protein C

Die FVL-Mutation basiert auf einem Austausch der Base Guanin durch Adenin in der Nukleotidposition 1691 im Gen des Gerinnungsfaktors V. Dies führt zu der Synthese eines abnormen Faktor V-Proteins, das in Position 506 anstelle von Arginin nun Glutamin aufweist (Bertina 1994). Da Arginin an einer der Spaltungsstellen für APC liegt, wird die Spaltung und die dadurch vermittelte Inaktivierung des Faktors verhindert. Aufgrund der durch die Mutation unbeeinflussten prokoagulatorischen Wirkung des Faktors gerät die Balance zwischen pro- und antikoagulatorischen Mechanismen zugunsten gerinnungsfördernder Reaktionen aus dem Gleichgewicht (Majerus 1994, Bertina 1994). Dies bedingt eine gesteigerte Thrombinbildung und führt zur Hyperkoagulabilität des Hämostasesystems (Koster 1993).

Dieser pathophysiologischer Mechanismus war jedoch noch unklar, als im Jahre 1993 erstmalig von einer im Patientenplasma messbaren Resistenz des Faktor V gegen das aktivierte Protein C berichtet wurde (Dahlbäck 1993). In weiteren Untersuchungen fiel auf, dass diese Resistenz (APCR) signifikant häufiger bei Patienten zu finden war, die erstmalig oder wiederholt an thromboembolischen Ereignissen erkrankt waren (Koster 1993, Svensson und Dahlbäck 1994). Wenig später wurde die FVL-Mutation als Ursache für die APCR beschrieben und der oben genannte Mechanismus für die Erklärung einer erhöhten Thromboseneigung der Anlageträger herangezogen (Bertina 1994, Zöller und Dahlbäck 1994).

In den folgenden Jahren wurde die Assoziation der FVL-Mutation mit venösen Thrombosen mehrfach bestätigt (Gandrille 1995, Rosendaal 1995, Ridker 1995, Leroyer 1997). Heute gilt die FVL-Mutation mit einer Heterozygotenhäufigkeit von 5-6% in der europäischen Bevölkerung als der häufigste genetische Risikofaktor thromboembolischer Ereignisse (Rees 1995) und wird mit einem zwei- bis dreifach erhöhten Risiko für tiefe Beckenvenenthrombosen assoziiert (Middeldorp 2001).

Sehr bald nach der Beschreibung der FVL-Mutation durch Bertina im Jahre 1994 wurde über eine weitere klinische Auswirkung der FVL-Mutation berichtet. Es erschienen erste Studien, in denen eine Häufung prothrombotischer Mutationen in Kollektiven von Frauen mit Schwangerschaftskomplikationen (Präeklampsie) und Aborten nachgewiesen wurde (Dizon-Townson 1996, Dizon-Townson 1997b, Grandone 1997a, Grandone 1997b). Während die Assoziation der Mutation mit Schwangerschaftsgestosen in den Folgejahren mehrfach in Frage gestellt wurde (de Groot 1999, Morrison 2002, d'Elia 2002), bestätigte

sich der Einfluss der Mutation auf die Entstehung von Aborten durch weitere Ergebnisse. Dabei zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der FVL-Mutation und sowohl einmaligen Aborten (Kupfermanc 1999; Lindquist 1999; Martinelli 2000) als auch habituellen Aborten (Kutteh 1999; Foka 2000; Rai 2001).

Weitere Erkenntnisse konnten durch eine getrennte Betrachtung von Frühaborten (1. Trimenon) und Spätaborten (2. und 3. Trimenon) gewonnen werden. Bei der Untersuchung von Frühaborten liegen bis zum heutigen Zeitpunkt widersprüchliche Ergebnisse vor. Zunächst wurde in vielen Studien keine Prävalenzerhöhung der Mutation gefunden (Balasch 1997, Dizon-Townson 1997a, Kutteh 1999, Rai 2001). In einigen jüngeren Studien konnte jedoch bei Mutationsträgern eine erhöhte Rate an Aborten im ersten (Reznikoff-Etievan 2001) bzw. im ersten und zweiten Trimenon (□ounis 2000, Foka 2000, Sarig 2002) nachgewiesen werden. In letzteren Untersuchungen zeigen die Ergebnisse jedoch, dass das Abortrisiko vor allem im zweiten Trimenon (also zu einem späteren Zeitpunkt der Schwangerschaft) erhöht ist. Dies wird in einer weiteren Studie bestätigt (Roqué 2004). Im folgenden Jahr wurde bei FVL-Trägern sogar eine signifikant geringere Abortrate im ersten Trimenon nachgewiesen (van Dunné 2005).

Bei der Untersuchung von Spätaborten ergaben sich bereits in den frühen Studien eindeutigere Ergebnisse. Mehrfach bestätigte sich eine Assoziation zwischen der FVL-Mutation und Aborten im zweiten und dritten Trimenon (Rai 1996b, Meinardi 1999, Kutteh 1999, Martinelli 2000, Alonso 2002, Many 2002). Eine im Jahre 2003 durchgeführte Meta-Analyse von insgesamt 31 Studien betont erneut die (im Vergleich zu Frühaborten) ausgeprägte Assoziation der Mutation mit Fehlgeburten im zweiten und dritten Trimenon (Rey 2003).

Als eine mögliche Erklärung für die Häufung von Aborten bei FVL-Anlageträgern wird die durch die Thrombophilie bedingte Neigung zu Plazentainfarkten diskutiert. Mehrfach wurde ein Zusammenhang zwischen FVL-positiven Müttern bzw. Kindern und plazentalen Thrombosen bestätigt (Rai 1996a, Brenner 1997, Grandone 1997b, Martinelli 2000). Bei Feten mit einem Infarktareal von mehr als 10% der Plazenta ergab sich sogar eine zehnmal höhere Mutationsfrequenz als in der Normalbevölkerung (Dizon-Townson 1997b). Einschränkend muss gesagt werden, dass in jüngeren Studien weder eine mütterliche noch eine fetale Thrombophilie mit einer erhöhten Rate an plazentalen

Thrombosen in Verbindung gebracht werden konnte (Mousa 2000, Ariel 2004), so dass dieser Zusammenhang noch nicht eindeutig geklärt ist.

Die Erkenntnis, dass die FVL- Mutation mit einer erhöhten Rate an Aborten assoziiert ist, veranlasste zu einer Untersuchung der Häufigkeit von prothrombotischen Mutationen bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht <1500 Gramm (Very Low Birth Weight, VLBW), also Kindern, die in der Regel gegen Ende des zweiten, bzw. am Beginn des dritten Schwangerschaftstrimenon geboren werden. Während die Prävalenz der FVL- Mutation bei Reifgeborenen im erwarteten Bereich von 5% lag, wurde bei VLBW-Frühgeborenen die FVL-Mutation etwa doppelt so häufig nachgewiesen (Göpel 1999). In einer weiteren multizentrischen Studie konnte anschliessend gezeigt werden, dass dabei die mütterliche Mutation der entscheidende Risikofaktor für eine zu frühe Geburt ist. Wenn nur das Kind Anlageträger ist (das mutierte Allel also vom Vater kommt), findet sich kein Unterschied in der Häufigkeit zwischen Früh- und Reifgeborenen (Göpel 2002b).

Wenden wir uns nun den Ergebnissen der vorliegenden Studie zu. Diese zeigen, dass bei Müttern und Embryonen, die Träger der FVL-Mutation sind, die Implantationsrate im Rahmen des ersten Embryotransfers signifikant erhöht ist.

Dieses Ergebnis lässt sich mit den genannten Studien zur Abortrate bei Anlageträgern vereinbaren, in denen wiederholt nachgewiesen wurde, dass die Mutation die Entstehung von Spätaborten fördert. Im Gegensatz dazu konnte ein Zusammenhang mit Fehlgeburten im ersten Trimenon – wenn überhaupt – nur in geringerer Ausprägung nachgewiesen werden. Betrachtet man nun die Pathogenese von Aborten in den verschiedenen Phasen der Schwangerschaft, so liegt den Frühaborten in erster Linie eine unzureichende Implantation zugrunde, während ein relevanter Anteil der Spätaborte durch Plazentainfarkte verursacht werden (Greer 1999). Vorausgesetzt, die Infarktentstehung wird durch eine Thrombophilie der Mutter oder des Kindes gefördert, ist in erster Linie eine erhöhte Abortrate im zweiten und dritten Trimenon zu erwarten. Diese Überlegung deckt sich also mit den vorliegenden Ergebnissen. Die Frühaborte hingegen werden durch die Verbesserung der Embryoimplantation bei Anlageträgern minimiert, wie auch in einer kürzlich veröffentlichten Studie diskutiert wurde (van Danné 2005). Ein Restrisiko für thromboembolische Ereignisse auch zu einem frühen Zeitpunkt der Schwangerschaft bleibt jedoch bestehen und erklärt (neben der erhöhten Implantationsrate bei

Anlageträgern), dass der relative Anteil an Frühaborten bei FVL-Trägern nicht unter dem der Normalbevölkerung liegt.

Die FVL-Mutation ist also ein Risikofaktor für venöse Thrombosen, Aborte und Frühgeburtlichkeit. Gleichzeitig liefern Haplotyp-Analysen Hinweise für ein erstmaliges Auftreten der FVL-Mutation vor 21000 bis 34000 Jahren (Zivelin 1997). Die Erkenntnis, dass die Mutation sich über einen derart langen Zeitraum durchsetzen konnte und die trotz der evolutionären Nachteile hohe Frequenz in der Bevölkerung werfen die Frage nach einem positiven Selektionsdruck auf. Dieser wurde bislang im Bezug auf die Thrombophilie und der damit zusammenhängenden reduzierten Blutungsneigung diskutiert. Dabei wurde ein geringerer Blutverlust bei Verletzungen und Menstruation (Rees 1995) und eine geringere Sterberate während der Geburt (Lindquist 1998) als ausschlaggebende evolutionäre Faktoren vorgeschlagen. Da die Auswirkungen der geringeren Blutungsneigung bei Verletzung, Menstruation und Geburt jedoch erst postnatal wirksam werden, können die Risiken der Frühgeburtlichkeit und Aborte durch diese Effekte genetisch nicht ausgeglichen werden. Im Gegenteil, die Mutation müsste nach den vorliegenden Daten längst ausgestorben sein.

Eine mögliche Erklärung für den hohen genetischen Erfolg der Mutation in der Bevölkerung liefern die Ergebnisse der vorliegenden Studie. Trotz der hohen Abortrate und der Frühgeburtlichkeit bei Anlageträgern könnte der genetische Selektionsvorteil einer verbesserten Implantation die Verbreitung und Erhaltung des Polymorphismus sichern.

Die gesteigerte Implantationsrate bei FVL-Trägern wirft die Frage nach einer pathophysiologischen Grundlage für diesen Effekt auf. Bereits in einem frühen Kommentar zur Mutation wurde die Hypothese aufgestellt, dass die gesteigerte Blutgerinnung bei Anlageträgern eine bessere Fixierung der Frühschwangerschaft mit sich bringt (Majerus 1994). Diese Hypothese wurde im Jahre 1999 durch eine klinische Studie gestützt, in der Patientinnen, deren Embryonen im Rahmen einer IVF-Behandlung mit Fibrinkleber umhüllt wurden, signifikant besser implantierten als die Vergleichsgruppe (Bar-Hava 1999). Auch unsere Daten zur FVL-Mutation weisen auf einen solchen Zusammenhang hin. Problematisch sind jedoch die Ergebnisse zur Prothrombin- und Faktor XIII-Mutation, durch die weder eine gesteigerte Implantationsrate bei Trägern der prothrombotischen Prothrombin-Mutation, noch eine verringerte Implantationsrate bei Trägern der antithrombotischen Faktor XIII-Mutation nachgewiesen werden konnte.

Mögliche Erklärungsansätze für die fehlende Signifikanz der Ergebnisse werden in den entsprechenden Kapiteln diskutiert, eine endgültige Aussage über den Zusammenhang der Blutgerinnung mit der Embryoimplantation ist jedoch zur Zeit nicht zu treffen.

4.1.2 Die prothrombotische Prothrombin 20210A-Mutation

Die autosomal dominante G20210A Mutation des Prothrombin-Gens bedingt bei heterozygoten Anlageträgern eine erhöhte Prothrombin-Konzentration im Plasma und führt dadurch zu einer Hyperkoagulabilität des Gerinnungssystems.

Prothrombin wird Vitamin K-abhängig in der Leber synthetisiert und stellt eine Vorstufe der Peptidase Thrombin dar. Im Rahmen einer Gerinnungsreaktion kommt es zur proteolytischen Umwandlung von Prothrombin in Thrombin durch den Prothrombinaktivator. Thrombin schließlich spielt eine zentrale Rolle bei der Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin. Zusätzlich initiiert Prothrombin die Aggregation der Blutplättchen.

Das Prothrombin-Gen setzt sich aus 14 Exons zusammen und weist eine 5`- und eine 3`-untranslated (UT)-Region auf (Degen 1987). Letztere spielt vermutlich eine Rolle bei der Regulation der Gen-Expression und stellt den veränderten Gen-Bereich bei Vorliegen der G20210A-Punktmutation dar. Diese Mutation wurde erstmalig im Jahre 1996 beschrieben, als ein gehäuft auftretender Austausch von Guanin durch Adenin in der Nukleotidposition 20210 des Prothrombingens nachgewiesen werden konnte (Poort 1996). Der G20210A-Polymorphismus hat in der europäischen Bevölkerung eine Prävalenz von 2-3% (Rosendaal 1998) und wird mit einer erhöhten Prothrombinkonzentration im Plasma assoziiert (Poort 1996). Diese pathophysiologische Auswirkung wurde in weiteren Arbeiten bestätigt (Ferraresi 1997, Makris 1997, Smiles 2002).

Ein erhöhter Prothrombinspiegel im Plasma und die damit zusammenhängende vermehrte Bildung von Thrombin liefert die Grundlage für eine gesteigerte Koagulabilität des Gerinnungssystems. So wurde die Prothrombin 20210A-Mutation im Jahre 1996 gehäuft bei Patienten mit einer erstmaligen tiefen Beckenvenenthrombose gefunden (Poort 1996). Diese Assoziation der Mutation mit venösen Thrombosen wurde in vielen weiteren Studien bestätigt (Brown 1997, Corral 1997, Margaglione 1998, Hessner 1999, Bank 2004). Dabei wurde durch Souto et al. dargestellt, dass die Prothrombin-Mutation vorwiegend ein wiederholtes Auftreten venöser Thrombosen und weniger eine erstmalige

Episode fördert (Souto 1998). Hierzu widersprüchliche Ergebnisse ergab eine Studie aus dem Folgejahr, in der bei Mutationsträger kein erhöhtes Risiko eines Thromboserezidivs nachgewiesen werden konnte (Lindmaker 1999).

Die Tatsache, dass Thrombin eine Rolle bei der Plättchenaggregation und der Endotheliumaktivierung spielt, warf die Frage nach einer Assoziation zwischen der Prothrombin-Mutation und der Entwicklung von Myokardinfarkten (also arteriellen Gefäßverschlüssen) auf. Rosendaal et al. konnten zeigen, dass die Mutation nur in Kombination mit anderen Risikofaktoren zu einer signifikanten Erhöhung des Infarkttrisikos führt (Rosendaal 1997). So steigt das im Verhältnis zu der nichtrauchenden Bevölkerung neunfach höhere Herzinfarkttrisiko bei Rauchern durch die Mutation auf ein 43faches Risiko an. Zählen Frauen mit metabolischen Risikofaktoren zu den Anlageträgern, so erhöht sich durch die Mutation das Herzinfarkttrisiko auf das etwa siebenfache. Eine direkte Assoziation zwischen der Prothrombin-Mutation und koronaren Ereignissen konnte jedoch weder in dieser noch in zahlreichen weiteren Studien nachgewiesen werden (Ferraresi 1997, Corral 1997, Ridker 1999, Smiles 2002, Atherosclerosis thrombosis and vascular biology Italian Study Group 2003).

Bezüglich der Bedeutung der Prothrombin-Mutation für die Entstehung von Aborten liegen bisher nur wenige Daten vor. Eine Prävalenzerhöhung sowohl bei Früh- als auch bei Spätaborten ergab eine im Jahre 2000 veröffentlichte Studie (Foka 2000). Diese Ergebnisse knüpfen an die Aussage einer früheren Veröffentlichung an, in der eine erhöhte Mutationsrate in einem Patientenkollektiv mit Aborten beschrieben wurde, das Ergebnis jedoch keine Signifikanz erreichte (Brenner 1999). In einer selektiven Betrachtung von Spätaborten (Martinelli 2000), Frühaborten (Reznikoff-Etievan 2001) und in einer Arbeit ohne Angaben über das Gestationsalter (Souza 1999) wurde der Zusammenhang zwischen der Mutation und Fehlgeburten erneut bestätigt. Gegensätzlich hierzu sind jedoch die Ergebnisse aus zwei Studien, bei denen sogar teilweise in der abortfreien Kontrollgruppe höhere Prävalenzen der Mutation gefunden wurden (Kutteh 1999, Carp 2002). Schließlich wurde im Jahre 2003 eine Meta-Analyse durchgeführt, die eine signifikante Bedeutung der Mutation für die Entstehung von sowohl rezidivierenden Frühaborten (bis zur 13 SSW) als auch von Fehlgeburten im 2. Trimenon beschreibt (Rey 2003).

Die genannten Daten weisen also überwiegend darauf hin, dass die Prothrombinmutation zur Abortentstehung beiträgt. Insgesamt basiert die Problematik der Bewertung jedoch auf

den geringen Fallzahlen der bislang durchgeführten Untersuchungen. Die Ergebnisse einer Studie, in der Patientinnen mit Fehlgeburten hinsichtlich mehrerer prothrombotischer Parameter untersucht wurden, weisen darauf hin, dass die Prothrombin-Mutation nur dann eine Rolle bei der Abortentstehung spielt, wenn sie mit zusätzlichen Risikofaktoren kombiniert ist (Sarig 2002). Es bleibt abzuwarten, ob Untersuchungen an größeren Kollektiven eindeutigere Ergebnisse bezüglich der isolierten Bedeutung des Polymorphismus liefern.

In Anlehnung an die Ergebnisse zur Abortentstehung wurde die Prävalenz der Prothrombin-Mutation auch in einem Kollektiv von Frühgeborenen <1500g untersucht. Während die Prävalenz bei den Reifgeborenen im erwarteten Bereich lag (1,9%), konnte bei den unreifen Säuglingen eine um den Faktor 3,3 erhöhte Mutationsfrequenz nachgewiesen werden (Göpel 1999). Dieses Ergebnis zeigt also, dass es sich bei der Prothrombin-Mutation (wie auch bei der FVL-Mutation) um einen Risikofaktor für Frühgeburtlichkeit handelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die Prothrombin 20210A-Mutation ähnliche klinische Effekte beschrieben wurden wie für die FVL-Mutation. Verschiedene Studien weisen auf ein erhöhtes venöses und arterielles Thromboserisiko bei Anlageträgern hin und etliche Daten stützen die Annahme, dass es sich bei dem 20210A-Polymorphismus um einen Risikofaktor für Frühgeburtlichkeit und Aborte handelt. Trotz dieser Risiken für Anlageträger wurde ein möglicher evolutionärer Vorteil, der die Erhaltung der Mutation in der Bevölkerung erklären könnte, niemals diskutiert.

Um die Ausgangshypothese, dass die Implantation möglicherweise durch eine gesteigerte Gerinnbarkeit des Blutes gefördert wird, zu stützen, wäre bei Anlageträgern der Prothrombin-Mutation (wie auch bei FVL-Trägern) eine erhöhte Implantationsrate beim ersten Embryotransfer zu erwarten gewesen. In der vorliegenden Studie erreichten die Ergebnisse zur Prothrombin-Mutation jedoch keine statistische Signifikanz, Anlageträger und Nicht-Träger der Mutation implantierten im Rahmen des ersten Embryotransfers annähernd gleich gut (50%vs53%). Die Ergebnisse stehen also im Widerspruch zu der genannten Hypothese.

Diese Tatsache erschwert die Interpretation der Daten zur FVL-Mutation (s. 4.1.1). Andererseits sollten mögliche Fehlerquellen bei den Ergebnissen zur Prothrombin-Mutation beachtet werden. Dabei ist von Bedeutung, dass viele Studienergebnisse zur Prothrombin-Mutation widersprüchlich sind und die klinische Relevanz der Mutation

oftmals erst im Zusammenwirken mit weiteren Risikofaktoren in Erscheinung tritt (Rosendaal 1997, Sarig 2002). Insbesondere der Einfluss der Mutation auf Aborte - also genau die klinische Auswirkung der FVL-Mutation, welche zu der Fragestellung der vorliegenden Studie Anlass gab – wurde widersprüchlich bewertet (Foka 2000, Martinelli 2000, Kutteh 1999, Carp 2002).

Desweiteren lässt die relativ niedrige Prävalenz der Prothrombin-Mutation auf einen im Vergleich zur FVL-Mutation geringeren genetischen Erfolg schließen. Während nämlich die hohe Mutationsfrequenz, die eindeutigen Risiken und die Haplotyp-Analysen der FVL-Mutation zu einer über Jahre anhaltenden Diskussion über mögliche evolutionäre Vorteile der Mutation führte, wurde eine solche Frage bei der im Verhältnis niedrigen Prävalenz und den nur fraglichen Nachteilen für Trägern der Prothrombin-Mutation bisher nicht aufgeworfen.

Ein Nachteil der vorliegenden Studie besteht in der geringen Anzahl untersuchter Familien. Dadurch fallen beide genannten Umstände, nämlich sowohl die niedrige Prävalenz als auch die geringe prothrombotische Potenz der Mutation, bei der statistischen Auswertung ins Gewicht. Wenn ein möglicher Einfluss der Mutation auf die Implantation ähnlich schwach ausgeprägt ist wie die bisher untersuchten klinischen Effekte, ist es denkbar, dass bei einer Anzahl von insgesamt sechs Anlageträgern im Kollektiv ein solcher Zusammenhang nicht erfasst wurde. Die Wahrscheinlichkeit eines falsch-negativen Ergebnisses bei der Prothrombin-Mutation ist also nicht auszuschließen und eine Überprüfung der Fragestellung an einem größeren Kollektiv sinnvoll.

4.1.3 Die antithrombotische Faktor XIII Val34Leu-Mutation

Die Faktor XIII Val34Leu-Mutation führt zu einer reduzierten Stabilität des retrahierten Fibrinclots und damit zu einem antikoagulatorischen Zustand mit gesteigerter Blutungs- und verminderter Thromboseneigung des Gerinnungssystems.

Bei dem Blutgerinnungsfaktor XIII handelt es sich um eine Protransglutaminase, die als Proenzym im Zytosol der Thrombozyten und im Plasma zu finden ist und die durch Thrombin in Gegenwart von Ca^{2+} aktiviert wird. Der aktivierte Faktor (XIIIa) wirkt fibrinstabilisierend, indem er die Ausbildung kovalenter Querverbindungen zwischen den einzelnen Fibrinmonomeren induziert. Diese Retraktion des zunächst noch lockeren

dreidimensionalen Maschenwerks führt zu einer endgültigen mechanischen Stabilität und hohen Fibrinolyseresistenz des Thrombus.

Der Val34Leu-Polymorphismus basiert auf einer Punktmutation des Exon 2 im Faktor XIII-Gen. Der daraus resultierende Valin-Leucin-Aminosäureaustausch an Position 34 in der α -Untereinheit des Faktor XIII befindet sich nahe der Thrombin-Aktivierungsstelle (Mikkola 1994) und führt zu einer beschleunigten Aktivierung des Gerinnungsfaktors durch Thrombin (Kangsadalampai 1998). Dabei reduziert sich jedoch die Stabilität des retrahierten Fibrin-Thrombus, so dass homozygote Anlageträgern eine deutlich feinere und fragilere Struktur des Fibrinnetzwerkes aufweisen (Ariens 2000, Lim 2003). Folge ist eine höhere Fibrinolyseempfindlichkeit, die zum einen vor Thrombosierungen schützt, zum anderen jedoch ein erhöhtes Blutungsrisiko mit sich bringt.

Fast die Hälfte der caucasischen Bevölkerung weist einen hetero- oder homozygoten Genotyp für die Faktor XIII-Val34Leu-Mutation auf (Attie-Castro 2000). Bei diesen Anlageträgern wurde in einigen Studien über ein herabgesetztes Risiko für venöse Thrombosen berichtet (Catto 1999, Franco 1999, Renner 2000). Gegensätzliche Ergebnisse liefern zwei Untersuchungen von Patienten, die sowohl Träger der Faktor XIII- als auch der FVL-Mutation sind. Im Vergleich zu alleinigen Trägern der FVL-Mutation war bei Vorliegen beider Polymorphismen weder ein erniedrigtes Thromboserisiko (Franco 2000a) noch ein späterer Zeitpunkt der Manifestation einer Thrombose nachweisbar (Morange 2001). Durch diese Ergebnisse wurde die klinische Signifikanz der Faktor XIII-Mutation bezüglich eines antithrombotischen Effekts also in Frage gestellt. Weitere Untersuchungen, in denen der zuvor beschriebene protektive Effekt für venöse Thrombosen weder bei homo- noch bei heterozygoten Anlageträgern nachweisbar war, schürten diese Diskussion zusätzlich (Rosendaal 1999, Corral 2000, Margaglione 2000, Balogh 2000). Schließlich wurde in einer Meta-Analyse im Jahre 2000 lediglich ein schwacher antithrombotischer Effekt der Mutation nachgewiesen (Alhenc-Gelas 2000).

Ähnlich widersprüchliche Ergebnisse ergeben sich bezüglich der Einflussnahme der Mutation auf die Entstehung arterieller Gefäßverschlüsse. Zunächst zeigte sich, dass das 34Leu-Allel signifikant seltener bei Herzinfarktpatienten als in einem gesunden Vergleichskollektiv zu finden ist (Kohler 1998) und dass die Anzahl der Anlageträger bei Patienten mit einem manifesten Infarkt noch geringer ist als bei Patienten, die an bisher infarktfreier Angina pectoris leiden (Gemmati 2001). Weitere Studien bestätigen diesen

protektiven Effekt der Mutation (Wartiovaara 1999, Franco 2000b, Reiner 2002). Gegenteiliges zeigen jedoch zwei Arbeiten aus dem Jahre 2000 (Canavy 2000, Corral 2000) und zwei kürzlich veröffentlichte Studien (Aleksic 2002, Roldán 2003).

Sowohl bezüglich der Entstehung von venösen als auch von arteriellen Gefäßverschlüssen ist die Bedeutung der Mutation also nicht abschließend geklärt.

Über eine weitere klinische Auswirkung des Faktor XIII-Polymorphismus wurde im Jahre 1998 erstmalig berichtet. Bei Patienten mit primärer Hirnblutung wurde eine signifikante Häufung der Mutation nachgewiesen (Catto 1998, Gemmati 2001), während bei Patienten mit einem ischämischen Hirninfarkt das 34Leu-Allel seltener als in Vergleichskollektiven gefunden wurde (Elbaz 2000). Weniger eindeutige Ergebnisse lieferte eine Untersuchung von jungen Frauen (<45 Jahre), die eine intracerebrale Blutung erlitten hatten (Reiner 2001). Gänzlich in Frage gestellt wurde die Assoziation schliesslich durch eine Studie, in der keine erhöhte Mutationsfrequenz bei Patienten mit spontaner Hirnblutung gefunden wurde (Corral 2001).

Die Auswirkungen des Polymorphismus bezüglich cerebraler Ereignisse bei Erwachsenen wurde an einem Kollektiv von fast 500 VLBW-Säuglingen überprüft. Es zeigte sich, dass Säuglinge, die hetero- oder homozygote Träger des mutierten Leu-Allels sind, signifikant seltener an cerebralen Infarkt ereignissen (IVH Grad IV und PVL) erkranken und dass Anlageträger eine um den Faktor 1,5 erhöhte Rate an reinen Blutungsereignissen (IVH Grad I-III) aufweisen (Göpel 2002). Letzterer Unterschied erreichte keine Signifikanz, doch waren beide Effekte bei Vorliegen des homozygoten Genotyps stärker ausgeprägt.

Ein möglicher Einfluss der Faktor XIII 34Leu-Mutation auf die Abort- und Frühgeburtenrate bei Anlageträgern wurde bisher nicht ausreichend untersucht. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass das Faktor XIII-Protein für die Sicherung der Frühschwangerschaft und die einwandtfreie Ausbildung der Plazenta von Bedeutung ist. Bei Frauen, die an einer angeborenen Faktor XIII-Defizienz leiden, wurden gehäuft Aborte und eine insuffiziente Plazentaentwicklung beobachtet (Asahina 2000). Eine direkte Assoziation der Mutation mit habituellen Aborten wurde erstmalig in zwei kürzlich veröffentlichten Studien überprüft. Zum einen ergab sich eine erhöhte Abortrate bei homozygoten Anlageträgern (Dossenbach-Glaninger 2003), zum anderen wurde kein Prävalenzunterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen (Barbosa 2004).

Tendenziell zeigten sich bei der letzteren Untersuchung sogar eine (nichtsignifikant) höhere Mutationsfrequenz in der gesunden Kontrollgruppe.

Die genannten Daten zeigen, dass die klinische Bedeutung der Faktor XIII34Leu-Mutation hinsichtlich aller bisher diskutierten Auswirkungen (venöse und arterielle Gefäßverschlüsse, cerebrale Blutungs- und Infarktereignisse, Aborte und Frühgeburtlichkeit) noch nicht ausreichend geklärt ist. Dennoch legen die pathophysiologischen und statistischen Untersuchungen eine antithrombotische Wirkungsweise der Mutation nahe. Dieser zur FVL-Mutation gegensätzliche Effekt der Faktor XIII34Leu-Mutation veranlasste uns zur Untersuchung der Mutation mit der Hypothese, dass die Faktor XIII-Mutation – im Gegensatz zur FVL- und Prothrombin-Mutation - zu einer Verschlechterung der Implantation führt.

Bezüglich dieser Fragestellung liegen keine signifikanten Ergebnisse vor. Dies ändert sich auch nicht durch eine getrennte Betrachtung homo- und heterozygoter Mutter/Kind-Paare. Es ist zur Zeit also nicht möglich, einen Zusammenhang zwischen der Faktor XIII 34Leu-Mutation und der Embryoimplantation zu beschreiben.

Auch bei dieser Mutation muss bei der Beurteilung der Ergebnisse der im Vergleich zur FVL-Mutation geringe Kenntnisstand über die tatsächliche klinische Relevanz in Betracht gezogen werden. So handelt es sich bei den Daten zur Faktor XIII-Mutation überwiegend um jüngere Veröffentlichungen, die nur unzureichend an großen Kollektiven überprüft wurden. Gleichzeitig konnten in vielen Studien die zuvor beschriebenen Assoziationen nicht bestätigt werden.

Auch für die Faktor XIII-Mutation ist es also denkbar, dass ein geringer Effekt der Mutation auf die Implantation in dem Kollektiv der vorliegenden Arbeit nicht erfasst wurde. Ursächlich ist jedoch bei der Faktor XIII 34Leu-Mutation weniger die niedrige Prävalenz der Mutation im Kollektiv (die ja bei der Prothrombin 20210A-Mutation problematisch ist) als vielmehr die möglicherweise geringe antithrombotische Potenz der Mutation, die darüber hinaus noch von dem absoluten Fibrinogenspiegel im Blut abhängig ist (Lim 2003).

4.2 Ziele und Probleme genetischer Assoziationsstudien und die Beurteilung des Studienmodells

Genetisch-epidemiologische Assoziationsstudien überprüfen einen Zusammenhang zwischen einer genetischen Variation der DNA und dem Auftreten einer Erkrankung. Meist handelt es sich dabei um Fall-Kontroll-Studien, bei denen eine Patientengruppe mit einer bestimmten Erkrankung einer gesunden Kontrollgruppe gegenübergestellt wird. Wenn die genetische Variation in der Gruppe der Patienten signifikant häufiger vorliegt als in der Kontrollgruppe, hat die Mutation möglicherweise einen Einfluss auf die Erkrankung.

Liegt einer Erkrankung ein monogener Vererbungsmodus mit vollständiger Penetranz zugrunde, tragen alle Erkrankten, aber kein Gesunder die entsprechende DNA-Variation. Doch auch ein weniger stark ausgeprägter Zusammenhang zwischen einer Mutation und einer Erkrankung sind mit Hilfe von genetischen Assoziationsstudien nachzuweisen. Aus diesem Grund eignet sich ein solches Studienmodell besonders für die Untersuchung von multifaktoriellen Erkrankungen, bei denen eine bestimmte Mutation lediglich als Risikofaktor wirkt und demnach zwar gehäuft aber nicht ausschließlich in der Patientengruppe zu finden ist.

Eine große Gefahr genetischer Assoziationsstudien sind falsch-positive Ergebnisse, d.h. es wird ein statistischer Zusammenhang vermutet, der jedoch einer kritischen Überprüfung nicht standhält. Solche falsch-positiven Ergebnisse werden wahrscheinlicher bei einer unzureichenden Gruppengröße, multiplen Tests, einer nicht ausreichend korrelierten Kontrollgruppe, einer fehlenden Wiederholung der Untersuchung an einem zweiten Kontroll-Kollektiv, einer unzureichenden Kontrolle möglicher Confounder-Variablen und einer nicht ausreichenden Begründung der Ausgangshypothese (Cardon 2001, Gambaro 2000).

Anhand einiger der genannten Ziele und Probleme genetischer Assoziationsstudien lässt sich das Studienmodell der vorliegenden Arbeit überprüfen. Ein wesentlicher limitierender Faktor ist dabei die geringe Anzahl untersuchter Familien (n=102). Dieser Umstand kann insbesondere bezüglich der Prothrombin-Mutation, die von den untersuchten Mutationen die geringste Prävalenz in der Bevölkerung hat und eine relativ geringe prothrombotische Potenz aufweist, zu einem falschen Ergebnis führen. Wäre

andererseits das Patientinnenkollektiv unter Einbeziehung weiterer IVF/ICSI-Zentren erweitert worden, wäre das technische Verfahren der IVF/ICSI-Behandlung nicht mehr einheitlich gewesen und dadurch die Vergleichbarkeit der Erfolgsrate beim ersten Embryotransfer eingeschränkt gewesen. Zusätzlich hätte die unterschiedliche Art der Dokumentation von Patientendaten in den einzelnen Behandlungszentren die Erhebung der Einflussfaktoren für die Multivarianzanalyse erschwert. Hinsichtlich der wachsenden Zahl an Sterilitätspatientinnen und des einfachen und minimalinvasiven Studienmodells wäre jedoch in Zukunft die Überprüfung der Ergebnisse an größeren Kollektiven eines IVF/ICSI-Zentrums wünschenswert.

Zusätzlich ist es bei genetischen Assoziationsstudien wichtig, die Confounder-Variablen zu berücksichtigen. Unter Confounder versteht man in der Epidemiologie verdeckte Größen, welche die Ergebnisse von Erhebungen verfälschen und die Vergleichbarkeit von Gruppen beeinträchtigen. Diese möglichen Einflüsse sind auch in der vorliegenden Arbeit von großer Bedeutung. Es ist nämlich zu erwarten, dass die Confounder, welche die Implantation negativ beeinflussen (höheres Alter, keine vorausgehenden Schwangerschaften, Erkrankung der Reproduktionsorgane) in dem untersuchten Kollektiv von Sterilitätspatientinnen überrepräsentiert sind.

Um den Einfluss bekannter Störgrößen zu berücksichtigen, kann eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt werden. Mit diesem Testverfahren wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob das signifikante Ergebnis zur FVL-Mutation durch eine ungleiche Verteilung anderer Confounder auf die beiden Gruppen bedingt ist. Es zeigte sich, dass keine der unabhängigen Variablen im untersuchten Kollektiv die Implantationsrate beeinflusst, während für die FVL-Mutation der signifikante Zusammenhang mit einer verbesserten Implantation bestehen bleibt (s. 3.5).

Wie wichtig es ist, für eine bestimmte Fragestellung das richtige Studienmodell zu wählen und eventuelle Confounder-Variablen mit dem beschriebenen Testverfahren zu kontrollieren, wird anhand der Kritik einer dänischen Arbeitsgruppe an der vorliegenden Studie deutlich. Juul et al. bestimmten bei über 9000 Patienten den FVL-Trägerstatus und assoziierten diesen mit der durchschnittlichen Anzahl von Kindern dieser Patienten. Dabei ergab sich eine nahezu identische durchschnittliche Kinderzahl bei heterozygoten Mutationsträgern, homozygoten Mutationsträger und Trägern des Wildtyp-Allels (Juul 2002). Die Arbeitsgruppe folgerte, dass ihre Ergebnisse den in der vorliegenden Arbeit

nachgewiesenen positiven Selektionsdruck für die FVL-Mutation widerlegen, diskutierte aber einschränkend, dass die Kinderzahl in der dänischen Bevölkerung maßgeblich von der Familienplanung durch Verhütungsmethoden beeinflusst ist.

Genau diese Einschränkung stellt dar, dass das Studienmodell der dänischen Arbeitsgruppe mit dem der vorliegenden Arbeit nicht vergleichbar ist und für die Klärung der Fragestellung nicht herangezogen werden sollte. Problematisch ist, dass das Outcomekriterium von Juul et al. (Anzahl der Kinder) in erster Linie von der individuellen Familienplanung und nicht von genetischen Vorteilen abhängig ist. Die Ergebnisse sind also aufgrund der mangelnden Berücksichtigung dieses Einflusses nicht aussagekräftig. Dies wird zusätzlich durch die Tatsache bestätigt, dass sich auch in der vorliegenden Studie die absolute Kinderzahl zwischen Anlageträgern und Trägern des Wildtyp-Allels nicht unterscheidet (Göpel 2002a).

Eine besondere Stärke der vorliegenden Arbeit liegt also in der Wahl des Studienmodells. Während die Frage nach einer verbesserten Implantation an Kollektiven der Normalbevölkerung aufgrund der Geburten-Regulation nicht zu testen ist, liefert das hier verwendete Patientenkollektiv die nötigen Voraussetzungen für eine Überprüfung der Fragestellung: Ein bestehender Kinderwunsch, eine standardisierte IVF/ICSI-Behandlungsmethode, die genaue Dokumentation aller Embryotransfer-Zyklen und die Verfügbarkeit zusätzlicher klinischer Daten für die logistische Regressionsanalyse.

4.3 Der klinische Bezug der Arbeit und therapeutische Perspektiven

4.3.1 IVF/ICSI

Im Jahre 1978 wurde erstmals über die Geburt eines Kindes berichtet, welches außerhalb des Mutterleibes in vitro gezeugt worden war. Seitdem wurde dieses Verfahren von zahlreichen Arbeitsgruppen in aller Welt übernommen und verbessert. So hat sich inzwischen eine kombinierte GnRH Agonisten/Gonadotropin-Behandlung zur ovariellen Stimulationstherapie durchgesetzt, die eine weitgehende Synchronisierung der Follikelreifung induziert. Durch eine anschließende HCG-Gabe zur Ovulationsauslösung ist die Gewinnung zahlreicher Follikel durch einmalige transvaginale Punktion und Aspiration unter Ultraschallkontrolle möglich. Die Befruchtung erfolgt bei der In-Vitro-Fertilisation (IVF) einige Stunden später nach einer Vorinkubation der Eizellen durch die Zugabe von Spermien, die vom Seminalplasma getrennt und in einem Kulturmedium gleichfalls inkubiert und kapazitiert wurden.

Inzwischen ist es gelungen mittels eines Mikromanipulators Eizellen mit einem einzelnen isolierten Spermatozoon zu befruchten. Durch die direkte Injektion der Samenzelle in das Zytoplasma der Eizelle entfallen sämtliche Barrieren der Imprägnation. Mit dieser als Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) bekannten Methode lassen sich Schwangerschaften auch bei hochgradigen Störungen der Spermio-genese in bezug auf Zahl, Motilität und Morphologie der Spermien erreichen (Küpker 1996).

Der Embryonentransfer (ET) wird im 4-8-Zell-Stadium durchgeführt. Dabei werden mit einem Plastikkatheter maximal drei Embryonen transzervikal in das Cavum uteri plaziert. Da die Gelbkörperfunktion durch die ovarielle Stimulationstherapie gestört ist, wird eine ausreichend lange Lutealphase durch Gabe von HCG oder Gestagenen gesichert.

Trotz Verbesserung der Behandlungsmethoden hat sich die Befruchtungsrate der IVF nicht wesentlich geändert. Pro transferiertem Embryo kann unter optimalen Voraussetzungen eine Implantationsrate von 12-13% erwartet werden (Scholtes 1996). Dies bedeutet, dass die Chance für eine Schwangerschaft pro Embryo immer noch hinter der natürlichen Implantationsrate von ca. 22% zurücksteht (Roberts 1975). Durch den Transfer von drei Embryonen pro Zyklus konnte die Schwangerschaftsrate nach IVF bzw. ICSI auf ca. 25-30% pro Transfer gesteigert werden. Etwa 15% dieser Schwangerschaften

enden in einem Frühabort (Diedrich 2000). Gleichzeitig mit der Implantationsrate steigt bei dem Transfer mehrerer Embryonen jedoch auch das Risiko einer höhergradigen Mehrlingsschwangerschaft. Im nationalen IVF-Register der BRD fand sich im Jahre 1996 eine Zwillingshäufigkeit von 24,5% nach IVF und 27,4% nach ICSI (Felberbaum 1997). Die Drillingrate wird mit 4-6% angegeben. Dies bedeutet im Vergleich zur natürlichen Drillingrate eine Erhöhung um das 300fache. Ähnliche Angaben zu Mehrlingsschwangerschaften nach IVF sind einer großen retrospektiven Kohortenstudie in Schweden zu entnehmen (Bergh 1999), doch finden sich in vielen ausländischen Statistiken sogar noch höhere Inzidenzen. Während in Deutschland nämlich im Embryonenschutzgesetz von 1990 geregelt ist, dass maximal 3 Embryonen pro Transfer zurückgesetzt werden dürfen, fehlt eine solche gesetzliche Richtlinie in vielen anderen Ländern. So entstammen in England fast 50% der nach IVF geborenen Kinder einer multiplen Schwangerschaft (Human Fertilisation and Embryology Authority 1998) und ein Jahresbericht von 1995 in den USA und Kanada zeigt, dass 37% der Geburten nach IVF Mehrlingsgeburten waren, wobei es sich bei 7% um Drillings- oder noch höhergradige Mehrlinge handelte (Society for Assisted Reproductive Technology and the American Society for Reproductive Medicine 1998). Offen bleibt bezüglich letzterer Daten, inwieweit durchgeführte Embryonenreduktionen die Zahlen der höhergradigen Mehrlingsgeburten sogar noch verkleinert haben.

Aufgrund der hohen gesundheitlichen Risiken für Mutter und Kinder muss eine solche Mehrlingsschwangerschaft als eine sehr ernste Komplikation der jeweiligen Sterilitätsbehandlung angesehen werden. Trotz verbesserter pränataler Überwachungsmethoden werden derartige Risikoschwangerschaften mit einer für Zwillinge fünffach und für Drillings- siebenfach höheren perinatalen Mortalität assoziiert (Office of National Statistics Series DH3 1997). In Kenntnis der schlechten Überlebensrate werden „Embryonenreduktionen“ durchgeführt. Unter Embryonenreduktion oder Embryozyd wird das Abtöten einzelner Embryonen meist durch intrakardiale Kaliumchlorid-Injektion verstanden. Hierbei wird zwischen einem nach Pränataldiagnose „selektiven“ Embryozyd eines erkrankten Mehrlings und dem „unselektiven“ Abtöten eines nach medizinisch-technischen Gesichtspunkten am besten erreichbaren gesunden Embryos unterschieden. Insbesondere letzteres Verfahren muss sowohl aufgrund der damit verbundenen Komplikationen wie frühzeitige Wehen, Infektionen und Aborte als auch aufgrund der ethisch-moralischen Aspekte eines solchen Eingriffes, bei dem intrauterines gesundes

Leben gegen das gesunder Geschwister in die Güterabwegung tritt, sehr kritisch bewertet werden.

Um die Notwendigkeit eines solchen Vorgehens bereits im Vorfeld zu vermeiden, konzentriert sich die Forschung auf die Verbesserung der Behandlungsmethode. Ziel ist es, ein optimales Verhältnis zwischen kalkulierbaren Risiken und Behandlungserfolg herzustellen. Eine 1996 veröffentlichte Studie liefert ein Model für die individuelle Risikoberechnung bei IVF (Templeton 1996), die in der vorliegenden Arbeit als Grundlage für die Multivarianzanalyse diente. Wie schon in früheren Untersuchungen gezeigt worden war (Tan 1992, Roseboom 1995), ergaben die statistischen Auswertungen eine erhöhte Geburtenrate bei Frauen jüngeren Alters mit den besten Ergebnissen in der Altersgruppe von 25 bis 30 Jahren. Der Behandlung vorausgegangene Schwangerschaften und Geburten sowie eine kurze Dauer der Infertilität beeinflussen die Behandlungsergebnisse ebenfalls positiv. Demgegenüber sinkt die Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaft mit steigender Anzahl von Behandlungszyklen. Diese Erkenntnisse machen eine individuelle Abschätzung der Erfolgsaussichten einer IVF-Behandlung möglich und können als Richtlinie zur Festlegung des Vorgehens z.B. im Bezug auf Dauer der hormonellen Stimulation und Anzahl der zurückgesetzten Embryonen dienen. Eine im Jahre 2000 veröffentlichte externe Validierung des oben genannten Templeton Models bestätigt die Möglichkeit, zwischen Patientinnen mit sehr hohen und sehr niedrigen Erfolgswahrscheinlichkeiten zu unterscheiden. Widerlegt wurde eine prognostische Aussagekraft jedoch bei weniger klar gewichteten Vorbedingungen (Smeenk 2000).

Neben dieser Abstimmung der Therapie auf die individuellen Vorbedingungen einer Patientin beschäftigen sich etliche Studie mit der Optimierung der medikamentösen und labortechnischen Behandlungsmethoden. Stimulationstherapeutika mit bestmöglicher Unterstützung der Lutealphase und eine bestimmte Zusammensetzung des Kulturmediums ergeben höhere Implantationsraten (Bauer 1998, Ludwig 2004). Auch der Zeitpunkt des Embryonentransfers und damit das Entwicklungsstadium des Embryos beeinflussen die Erfolgsrate (Gardner 1998, Schoolcraft 1999). Weitere Studien konnten Zusammenhänge zwischen der Embryomorphologie und dem Implantationserfolg herstellen. Dabei wurde beobachtet, dass der Transfer von zwei "qualitativ guten" Embryonen mit einer deutlichen Risikominderung für Drillingsschwangerschaften einhergeht, die Schwangerschaftsraten

aber mit denen nach einem Transfer von drei Embryonen annähernd identisch sind (Staessen 1993, Vauthier-Brouzes 1994). Eine Analyse von mehr als 44000 IVF-Zyklen im Jahre 1998 (Templeton 1998) und eine jüngere Studie (Ozturk 2002) bestätigen diese Ergebnisse. Weitere Veröffentlichungen zeigen sogar akzeptable Schwangerschaftsraten nach Transferzyklen mit einem einzigen Embryo (Gerris 1999, Vilska 1999, Hazekamp 2000, Martikainen 2001, van Montfoort 2005).

Es wurden also umfangreiche Versuche unternommen, die IVF-Behandlung so zu optimieren, dass die verbesserten Implantationsraten eine Reduktion der transferierten Embryonen pro Zyklus zulassen. Dennoch führten diese Bemühungen nur zu begrenzten Erfolgen. Obwohl der Transfer von zwei Embryonen in Studien Erfolg gezeigt hat und insbesondere bei Patientinnen <35 Jahre empfohlen wird, stellt dieses Vorgehen nach wie vor eine Seltenheit im klinischen Alltag dar. Ein Grund dafür ist sicherlich, dass die zahlreichen prädiktiven Faktoren wie Alter, vorrausgegangene Schwangerschaften, Embryonenmorphologie, Sterilitätsgrund und -zeitraum etc. bei vielen Sterilitätspatientinnen weniger eindeutig gewichtet sind als es für eine realistische Einschätzung der Erfolgsaussichten einer Sterilitätsbehandlung nötig wäre (Smeenk 2000). Dies zusammen mit dem Wunsch der Patientinnen nach möglichst wenigen Behandlungszyklen und dem auf Behandlungszentren lastenden Druck, hohe "baby-take-home"-Raten vorzuweisen, führt dazu, dass der Transfer einer geringeren Anzahl von Embryonen bei der Minderheit der Patientinnen in Erwägung gezogen wird.

Im Hinblick auf die schwerwiegenden Nebenwirkungen von Mehrlingsschwangerschaften und den unselektiven Embryoizid, der sowohl die Eltern als auch den Arzt mit schwer lösbaren emotionalen und ethischen Konflikten konfrontiert, ist es ein zentrales Anliegen der Fortpflanzungsmedizin, die assistierte Reproduktion so zu verbessern, dass sie soweit wie möglich der natürlichen Fortpflanzung entspricht. Dies könnte dazu führen, dass der Transfer eines einzigen Embryo pro Zyklus in den klinischen Alltag Einzug hält. Die Grundlage für eine solche Entwicklung stellt ein durch Forschung wachsendes Verständnis für die Vorgänge bei der Implantation dar.

4.3.2 Genetische Einflüsse auf die Implantation des Embryo

Mit der Implantation der Blastozyste wird die Präimplantationsphase beendet und die morphologische Grundlage zur Plazenta- und Schwangerschaftsausbildung geschaffen.

Unter physiologischen Bedingungen kommt es in 20-30% aller Befruchtungen zu einer Schwangerschaft. Lediglich 2/3 der durch einen steigenden HCG-Spiegel im Blut nachgewiesenen Schwangerschaften erreichen die klinische Phase, die sich durch den sonographischen Nachweis embryonaler Herzaktivität auszeichnet.

Für einen komplikationsfreien Ablauf der Implantation sind zum einen embryonale Faktoren von Bedeutung, zum anderen muss eine para- und endokrine Steuerung der physiologischen Transformation des Endometriums gelingen. Bei der Erforschung der Grundlagen der Implantation, der geringen Implantationsraten und der relativ hohen Abortraten ist es also notwendig, sowohl die embryonalen als auch die endometrialen Vorgänge zu erfassen.

Viele Studien konnten zeigen, dass die Implantationsphase von verschiedensten Hormonen, Zytokinen und Oberflächenstrukturen gesteuert wird. Da für die vorliegende Arbeit in erster Linie genetische Steuerungsmechanismen der Implantation von Interesse sind, wird in Tabelle 12 lediglich ein Überblick über die Molekülklassen gegeben, welche die Implantation auf molekularer Ebene mitgestalten.

Molekülklasse	Wirkung	Literatur
Steroidhormone	Endokrine Regulation der endometriellen Rezeptivität	Bagchi 1999 Norwitz 2001
Zytokine (LIF, Interleukin1-Familie, HB-EGF u.a.)	Parakrine Steuerung der Implantation	Kauma 2000 Lass 2001
Endometrielle Integrine	Adhäsionsmoleküle	Lessey 2002
Muko- und Glykoproteine (MUC1)	Adhäsionsbarrieren, Lokales Fehlen von MUC1 am Ort der Implantation	Carson 1998 Aplin 2001
Matrixmetalloproteinasen (MMP), MMP-Inhibitor	Proteolytische Enzyme Einfluss auf die Invasionsphase	Whiteside 2001
Trophinin, Tastin, Bystin	Einfluss auf die Attachment-Phase	Aoki 2000
Pinopodien	Oberflächenstrukturen, Einfluss auf die Nidation	Bentin-Ley 1999 Nikas 2000
Leptin	Sterilität bei leptindefizienten Mäusen Regulation des Interleukin-1-Systems	Gonzalez 2000

Tabelle 12: Die Implantation beeinflussende Molekülklassen. LIF=Leukämie inhibitor factor, MUC=endotheliales Mucin.

Ein neuer Forschungsansatz ergab sich durch die Anwendung molekulargenetischer Techniken, die den Nachweis der Aktivität verschiedener Gene in embryonalem und

mütterlichem Gewebe in unterschiedlichen Phasen der Implantation ermöglichen. In Abhängigkeit von der Ausprägung der Genexpression konnte also die Einflussnahme bestimmter Molekülklassen auf die jeweilige Implantationsphase abgeschätzt werden.

Dabei galt es zunächst zu klären, ab welchem Entwicklungsstadium der Embryo durch eigene Genexpression die Implantation mitzugestalten vermag. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass die Translation embryonaler mRNA, d.h. die Expression individueller embryonaler Gene, mit Erreichen des 8-Zell-Stadiums einsetzt (Braude 1988, Krüssel 1997). Zwar nimmt der sich entwickelnde Keim weiterhin Peptide und Proteine aus den ihn umgebenden mütterlichen Sekreten auf, produziert und sezerniert aber gleichzeitig eigene Strukturproteine, Oberflächenantigene und andere Moleküle, die als embryonale Signale Bedeutung für den Implantationsvorgang haben (Beier 1992). Diese Erkenntnis wurde in späteren Studien durch den Nachweis der Genexpression der wichtigsten Komponenten des Interleukin 1-Systems und des LIF-Rezeptors in Präimplantationsembryonen bestätigt (Krüssel 1997, De Los Santos 1996, Van Eijk 1996).

Durch die molekulargenetischen Untersuchungen gerieten einige Molekülklassen zunehmend ins Zentrum des Interesses. Zunächst konnte anhand der Matrixmetalloproteinasen (MMPs), die als proteolytische Enzyme an der embryonalen Invasionsphase beteiligt sind (Birkedal-Hansen 1991, Whiteside 2001), eine Veränderung der Genexpression durch Mediatoren nachgewiesen werden. Es zeigte sich nämlich, dass der durch die MMPs vermittelte Invasionsprozess des Embryo dann verstärkt wird, wenn es zu einer Aktivitätserhöhung des Enzyms "92-kDa-Kollagenase" kommt (Strickland 1992). Im Gegensatz dazu wird die Embryo-invasion begrenzt, wenn eine Antagonisierung dieses Enzyms durch seine natürlichen Inhibitoren (TIMPs) vorgenommen wird (Librach 1991). Da in späteren Untersuchungen nachgewiesen wurde, dass das IL1-System eine Aktivitätssteigerung der entsprechenden Kollagenase und eine Down-Regulation der TIMP-Expression hervorruft, ist von einer indirekten Beeinflussung der MMP-Wirkung durch IL1 auszugehen (Huang 1997).

Gleichzeitig wurden zum Beispiel durch die globale Untersuchung hunderter endometrieller Gene einzelne für die Implantation wichtige Gene entdeckt, deren Proteinprodukt noch gar nicht bekannt war (Reese 2001). Entscheidend hierbei ist also, dass nicht durch die gesteigerte Konzentration des entsprechenden Genproduktes (z.B. die

Moleküle der Tabelle 15), sondern durch den primären Nachweis einer erhöhten genetischen Expression während der Implantation ein Einfluss des entsprechenden Gens nachgewiesen wurde. Ein Beispiel hierfür sind die HOX-Gene, welche Funktionen bei der Embryonalentwicklung und, insbesondere Hoxa10 und 11, bei der Ausbildung der endometriellen Rezeptivität übernehmen (Daftary 2000, Taylor 2000). Mäuse, die Träger einer Null-Mutation dieser Gene sind, zeigen ein Unvermögen, zu implantieren (Daftary 2001b) und durch die gezielte Veränderung der mütterlichen HOX-Expression wird die Implantationsrate beeinflusst (Bagot 2000).

Die Erkenntnis, dass einzelne Gene einen solch großen Einfluss auf den Implantationserfolg nehmen können, veranlasste eine Arbeitsgruppe dazu, Sterilitätspatientinnen hinsichtlich des hochpolymorphen MUC1-Gens zu untersuchen. Während bei Mäusen das MUC1-Molekül als Adhäsionsbarriere identifiziert wurde und beobachtet werden konnte, dass eine endometrielle Down-Regulation des Moleküls direkt nach der Ovulation stattfindet, ist die Bedeutung dieses Glykoproteins für die menschliche Implantation noch nicht vollständig geklärt (Aplin 1998, Aplin 2001). Gesichert ist, dass das humane MUC1-Gen - im Gegensatz zur Maus - eine hohe genetische Variabilität aufweist, die auf einer Genregion (variable number tandem repeat region (VNTR)) basiert, die zwischen 20 und 125 Sequenzwiederholungen (repeats) aufweist (Carson 1998). In Abhängigkeit von der Genlänge, d.h. von der Anzahl der repeats, findet sich in dem MUC1-Glykoprotein eine variierende Dichte an O-glykosilierten Seitenketten (Carson 1998). Als Horne et al. eine Gruppe von Frauen mit unklarer Sterilität hinsichtlich des MUC1-Gens untersuchten, fanden sie bei den Patientinnen eine signifikant kürzere mittlere Allelgröße als in der fertilen Vergleichsgruppe (Horne 2001). Anlageträger dieses Polymorphismus implantieren also - eventuell aufgrund der Verminderung der O-Glykosilierungen im MUC1-Protein - schlechter als Träger einer high-repeated Gensequenz.

Bei der molekulargenetischen Untersuchung der Implantation handelt es sich um einen sehr neuen Forschungsansatz, so dass insbesondere in den letzten Jahren zahlreiche Veröffentlichungen zu neuen, die Implantation beeinflussenden Genen und genregulierenden Mechanismen erschienen sind. Die hier beispielhaft genannten Studien zeigen, dass sowohl embryonale als auch mütterliche Gene an der Steuerung des Implantationsvorganges beteiligt sind. Desweiteren wird deutlich, dass die Veränderung

der Genaktivität, entweder durch para- und endokrin wirkende Substanzen, durch An- und Abschalten mütterlicher und embryonaler Gene oder durch das Vorliegen eines genetischen Polymorphismus, eine Beeinflussung der Implantationsrate oder sogar eine Infertilität hervorrufen kann.

4.3.3 Diagnostische und therapeutische Perspektiven

Die Identifikation eines Polymorphismus, der die Erfolgsrate bei der Embryoimplantation beeinflusst, bietet viele klinische Vorteile. Sind nämlich genetische Variationen bekannt, die zur Infertilität oder Sterilität führen, könnte die Diagnostik bei Sterilitätspatientinnen erweitert werden. Insbesondere bei unklarer, also idiopathischer Sterilität erscheint ein Screeningverfahren bezüglich häufiger genetischer Polymorphismen mit z.B. negativem Einfluss auf die Implantation sinnvoll. Wird mit Hilfe eines solchen Vorgehens das Vorliegen einer Mutation, deren physiologische Auswirkung bekannt ist, nachgewiesen, könnte eine auf die entsprechende Auswirkung der Mutation abgestimmte individuelle Therapie durchgeführt werden.

Hierbei wäre die lokale, endometrielle Applikation von Medikamenten ein denkbarer therapeutischer Ansatz. Durch die Gabe von beispielsweise gerinnungsfördernden Substanzen könnten mögliche auf die Implantation negativ wirkende Effekte eines antithrombotischen Polymorphismus ausgeglichen werden. Andererseits liefern auch implantationsbegünstigende Mutationen Ansätze für eine therapeutische Intervention. In diesem Fall wäre es sinnvoll z.B. bei Frauen, die Träger des Wildtyp-Allels sind, die physiologische Auswirkung des Polymorphismus medikamentös zu induzieren. Sowohl bei Anlageträgern als auch bei Mutation-negativen Patientinnen wäre also eine Steigerung der Erfolgsrate bei IVF/ICSI durch eine erweiterte medikamentöse Therapie denkbar. Zusätzlich könnte die Therapie zur Unterstützung einer natürlichen Konzeption eingesetzt werden.

Ein deutlich invasiverer und risikoreicherer Therapieansatz ist die Gentherapie, bei der (meist mit Hilfe viraler Vektoren) genetisches Material in das Zielgewebe integriert wird. Über einen klinischen Durchbruch bezüglich eines solchen Verfahrens wurde im Jahre 2000 berichtet, als eine französische Arbeitsgruppe mit Hilfe von Retroviren eine Gentherapie bei insgesamt zehn Kindern mit severe combined immune deficiency (SCID), einer tödlichen angeborenen Immunschwäche, durchführten (Cavazzana-Calvo 2000). Die

Euphorie über die anfänglichen Therapieerfolge bei neun Patienten wurde gedämpft, als zwei der behandelten Patienten eine leukämieähnliche Blutbildveränderung entwickelten. Genetische Analysen der mutierten Blutzellen weisen darauf hin, dass durch die Insertion des Genabschnittes das Onkogen LMO2 aktiviert wurde (Hacein-Bey-Abina 2003).

Seither wird eine kontroverse Diskussion über den Nutzen und die Risiken einer Gentherapie geführt. Die klinischen Erfolge verdeutlichen jedoch trotz der entstandenen Komplikationen, welches großes therapeutisches Potential in einer solchen Behandlungsmethode steckt

Um die genannten Risiken einer Gentherapie zu minimieren, ist es wünschenswert, die genetische Manipulation zeitlich und örtlich einzuschränken, also lediglich eine temporäre Expression des transferierten Gens im interessierenden Zielgewebe zu induzieren. Dies kann durch die Verwendung von Adenoviren als Vektoren sichergestellt werden, welche das genetische Material in den episomalen Bereich der Zelle und nicht in das Genom selbst integrieren (Daftary und Taylor 2003). Eine solche genetische Information geht in der Regel im Rahmen der nächsten Zellteilung verloren, so dass immunogene und mutagene Risiken reduziert werden.

Mit Hilfe eines solchen Vorgehens konnte ein gezielter genetischer Transfer bestimmter Gene in den menschlichen Uterus durchgeführt werden (Daftary 2001a, Hsieh 2002). Dabei erreichte die Expression des Gens am dritten Tag nach Transfer ihren Höhepunkt (Hsieh 2002). Sollte es in Zukunft also möglich sein, Polymorphismen als eindeutige Risikofaktoren für eine Infertilität zu identifizieren, wäre ein Therapieansatz durch eine lokale und temporäre Beeinflussung der Genexpression im Endometrium denkbar. Im Vergleich zur systemischen Gentherapie (die ja ebenfalls bereits klinische Anwendung findet), ist von deutlich geringeren Therapierisiken auszugehen.

Abschliessend lässt sich sagen, dass die Zahl unfruchtbarer Paare in den vergangenen Jahren zugenommen hat und auf 12-15% aller Paare mit bestehendem Kinderwunsch geschätzt wird. Dabei ist die Ursache für die Sterilität in 40-50% bei der Frau und in 35-40% beim Mann zu suchen. Bei 10-15% bleibt die Ursache der Sterilität ungeklärt, so dass von einer idiopathischen Sterilität gesprochen werden muss (Felberbaum 1996). Für ein besseres Verständnis der Implantation (und damit auch der Ursachen einer Sterilität) werden deshalb zahlreiche Studien durchgeführt, die - aufgrund der Komplexität des Vorgangs - häufig kostenaufwendig sind und die Verwendung von Versuchstieren

notwendig machen. Letzterer Ansatz ist nicht nur aufgrund der ethischen Fragwürdigkeit sondern auch wegen der schlechten Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Implantationsvorgang kritisch zu bewerten.

Wenn das Verständnis für die Einflüsse genetischer Polymorphismen auf die Implantation wächst, könnte dies – wie beschrieben - die Infertilitätsdiagnostik bei idiopathischer Sterilität erweitern und die neuen Erkenntnisse könnten Ansätze für neue Behandlungskonzepte liefern.

Diese therapeutischen Methoden sind mit vielen Risiken behaftet und längst nicht ausreichend erforscht. Mit den hier aufgeführten Gedankenansätzen soll jedoch gezeigt werden, dass in der Erforschung genetischer Wirkungsweisen ein großes Potential steckt. Wird dieses auch bezüglich der Embryoimplantation genutzt, könnte die Implantationsrate bei IVF/ICSI gesteigert werden. Letzlich könnte dies dazu führen, dass der Transfer von nur einem Embryo bei der IVF/ICSI-Behandlung in den klinischen Alltag Einzug hält und die Durchführung von Embryonenreduktionen überflüssig wird.

5 Zusammenfassung

Hintergrund: Die Faktor V Leiden-Mutation stellt einen Risikofaktor für venöse Thrombosen, Aborte und Frühgeburtlichkeit dar. Trotz dieser Nachteile sind 5-6% der europäischen Bevölkerung Träger der Mutation. In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob sich der hohe genetische Erfolg der Mutation durch eine bessere Embryoimplantation bei Anlageträgern erklären lässt. Zusätzlich wurden die ebenfalls prothrombotische Prothrombin20210A- und die antithrombotische Faktor XIII34Leu-Mutation untersucht.

Methode: Es wurden die DNA-Proben von Sterilitätspatientinnen analysiert, bei denen es nach einer in-vitro-Fertilisationsbehandlung zu einer Lebendgeburt gekommen war. Der Trägerstatus der drei Mutationen wurde durch Polymerasekettenreaktion und Restriktionsenzymverdau ermittelt. In Kenntnis der genauen Anzahl transferierter Embryonen bis zum Eintritt einer Schwangerschaft konnte der Implantationserfolg von Mutationsträgern und Nicht-Trägern verglichen werden und dadurch der Einfluss der jeweiligen Mutation auf den Implantationserfolg abgeschätzt werden.

Ergebnisse: Bei Trägern der Faktor V Leiden-Mutation wurde eine signifikant höhere Implantationsrate nachgewiesen als bei Trägern des Wildtyp-Allels (90% vs 47%, $p=0,018$). Im Gegensatz dazu sind die Prothrombin20210A- und die Faktor XIII34Leu-Mutation nicht mit einer veränderten Implantationsfrequenz assoziiert.

Diskussion: Es ist denkbar, dass die Thrombophilie bei Faktor V Leiden-Trägern zu einer besseren Fixierung des Embryos an der Uterusschleimhaut führt und dadurch ein positiver Selektionsdruck entsteht, der die hohe Prävalenz der Mutation in der Bevölkerung erklärt. Dass bei Trägern der Prothrombin20210A- und Faktor XIII34Leu-Mutation keine Assoziation zwischen der Blutgerinnung und der Implantationsrate nachweisbar ist, lässt sich möglicherweise mit einer geringeren pro- bzw. antithrombotischen Potenz dieser Mutationen erklären. Sollten sich unsere Ergebnisse in weiteren Studien bestätigen, ist eine Steigerung der Implantationsrate durch gerinnungsmodulierende Medikamente denkbar. Dies würde eine Reduktion der Anzahl transferierter Embryonen bei einer IVF/ICSI-Therapie ermöglichen und somit die Gefahr einer Mehrlingsschwangerschaft senken.

6 Literaturverzeichnis

Aleksic N, Ahn C, Wang □W, Juneja H, Folsom AR, Boerwinkle E, Wu KK. Factor XIII Val34Leu polymorphism does not predict risk of coronary heart disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:348-52.

Alhenc-Gelas M, Reny JL, Aubry ML, Aiach M, Emmerich J. The factor XIII Val34Leu mutation and the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2000; 84:1117-8.

Alonso A, Soto I, Urgelles M, et al. Acquired and inherited thrombophilia in women with unexplained fetal losses. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:1337-42.

Aoki R und Fukuda MN. Recent molecular approaches to elucidate the mechanism of embryo implantation: trophinin, bystin, and tasin as molecules involved in the initial attachment of blastocysts to the uterus in humans. *Semin Reprod Med* 2000; 18(3):265-71.

Aplin JD, Hey NA, Graham RA. Human endometrial MUC1 carries keratan sulfate: characteristic glycoforms in the luminal epithelium at receptivity. *Glycobiology* 1998; 8:269-76.

Aplin JD, Meseguer M, Simon C, Ortiz ME, Croxatto H, Jones CJ. MUC1, glycans and the cell-surface barrier to embryo-implantation. *Biochem Soc Trans* 2001; 29(2):153-6.

Ariel I, Anteby E, Hamani □, Redline RW. Placental pathology in fetal thrombophilia. *Hum Path* 2004; 35:729-33.

Ariens RAS, Philippou H, Nagaswami C, Weisel JW, Lane DA, Grant PJ. The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure. *Blood* 2000; 96(3):988-95.

Asahina T, Kobayashi T, Okada □, Goto J, Terao T. Maternal blood coagulation factor XIII is associated with the development of cytotrophoblastic shell. *Placenta* 2000; 21(4):388-93.

Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology Italian Study Group. No evidence of association between prothrombotic gene polymorphisms and the development of acute myocardial infarction at a young age. *Circulation* 2003; 107:1117-1128.

Attie-Castro FA, Zago MA, Lavinha J, Elion J, Rodriguez-Delfin L, Guerreiro JF, Franco RF. Ethnic heterogeneity of the factor XIII Val34Leu polymorphism. *Thromb Haemost* 2000; 84:601-03.

Bagchi IC, Kumar S. Steroid-regulated molecular markers of implantation. *Semin Reprod Endocrinol* 1999; 17(3):235-40.

Bagot CN, Troy PJ, Taylor HS. Alteration of maternal HOXA10 expression by in vivo gene transfection affects implantation. *Gene Ther* 2000; 7:1378-84.

Balasz J, Reverter JC, Fabregues F, Tassies D, Rafel M, Creus M, et al. First-trimester repeated abortion is not associated with activated protein C resistance. *Hum Reprod* 1997; 12:1094-7.

Balogh I, Szoke G, Karpati L, Wartiovaara U, Katona E, Komaromi I, Haramura G, Pfliegler G, Mikkola H, Muszbek H. Val34Leu polymorphism of plasma factor XIII: biochemistry and epidemiology in familial thrombophilia. *Blood* 2000; 96:2479-86.

Bank I; Libourel EJ, Middeldorp S, van Pampus ECM, Koopman MMW, Hamulyak K, Prins MH, van der Meer H, Büller HR. Prothrombin 20210A Mutation. A mild risk factor for venous thromboembolism but not for arterial thrombotic disease and pregnancy-related complications in a family study. *Arch Intern Med* 2004; 164:1932-37.

Barbosa HC, Carvalho EC, Barini R, Siqueira LH, Costa DS, Annichino-Bizzacchi JM. Tyr204Phe and Val34Leu polymorphisms in two brazilian ethnic groups and in patients with recurrent miscarriages. *Fertil Steril* 2004; 82(5):1455-7.

Bar-Hava I, Krissi H, Ashkenazi J, Orvieto R, Shelev M, Ben-Rafael Z. Fibrin glue improves pregnancy rates in women of advanced reproductive age and in patients in whom in vitro fertilization attempts repeatedly fail. *Fertil Steril* 1999; 71:821-24.

Bauer O, Küpker W, Neulen J. In-vitro-Fertilisationsbedingungen, In-vitro-Kultur von frühen Furchungsstadien und deren Assesment zur Verbesserung der Implantationsrate. *Der Gynäkologe* 1998; 31:316-24.

Beier HM. Die molekulare Biologie der Befruchtungskaskade und der beginnenden Embryonalentwicklung. *Annals Anatomy* 1992; 174:491-508.

Bentin-Ley U, Sjögren A, Sörensen S, Nilsson L, Hamberger L, Larson JF, Horn T. Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation in vitro. *Hum Reprod* 1999; 14:515-520.

Bergh T, Ericson A, Hillensjö T, Nygren KG, Wennerholm UB. Deliveries and children born after in-vitro fertilisation in Sweden 1982-95: a retrospective cohort study. *Lancet* 1999; 354:1579-85.

Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T; Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369:64-67.

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, De Carlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991; 4:197-250

Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight cell-stages of preimplantation development. *Nature* 1988; 332:459-461.

Brenner B, Mandel H, Lanir N, □ounis J, Rothbart H. Activated protein C resistance can be associated with recurrent fetal loss. *Br J Haemat* 1997; 97:551-554.

Brenner B, Sarig G, Weiner Z, ρounis J, Blumenfeld Z, Lanir N. Thrombophilic polymorphisms are common in women with fetal loss without apparent cause. *Thromb Haemost* 1999; 82:6-9.

Brown K, Luddington R, Williamson D, Baker P, Baglin T. Risk of venous thromboembolism associated with a G to A transition at position 20210 in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene. *Br J Haematol* 1997; 98:907-909.

Canavy I, Henry M, Morange PE, Tiret L, Poirier O, Ebagosti A, Bory M and Juhan-Vague I. Genetic polymorphisms and coronary artery disease in the south of France. *Thromb Haemost* 2000; 83:212-216.

Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nature Rev Genet* 2001; 2:91-9.

Carp H, Salomon O, Seidman D, Dardik R, Rosenberg N, Inbal A. Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 2002; 17(6):1633-7.

Carson DD, De Souza MM, Regisford EG. Mucin and proteoglycan functions in embryo implantation. *Bioessays* 1998; 20(7):577-83.

Catto AJ, Kohler HP, Bannan S, Stickland M, Carter A, Grant PJ. Factor XIII Val34Leu, a novel association with primary intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1998; 29:813-6.

Catto AJ, Kohler HP, Coore J, Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with venous thrombosis. *Blood* 1999; 93(3):906-8.

Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000; 288:669-72.

Corral J, Gonzalez-Conejero R, Iniesta JA, Rivea J, Martinez C, Vicente V. The FXIII Val34Leu polymorphism in venous and arterial thromboembolism. *Haematologica* 2000; 85:293-7.

Corral J, Gonzalez-Conejero R, Lozano ML, Rivera J, Heras I, Vicente V. The venous thrombosis risk factor 20210A allele of the prothrombin gene is not a major risk factor for arterial thrombotic disease. *Br J Haematol* 1997; 99:304-7.

Corral J, Iniesta JA, Gonzalez-Conejero R, Villalon M, Vicente V. Polymorphisms of clotting factors modify the risk for primary intracranial hemorrhage. *Blood* 2001; 98(9):2875.

Daftary GS und Taylor HS. Efficient liposome-mediated gene transfection and expression in the intact human uterus. *Hum Gene Ther* 2001a; 12:2121-7.

Daftary GS und Taylor HS. Implantation in the human: the role of HOX-genes. *Semin Reprod Med* 2000; 18(3):311-20.

Daftary GS und Taylor HS. Molecular markers of implantation: clinical implications. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2001b; 13(3):269-74.

Daftary GS und Taylor HS. Reproductive tract gene transfer. *Fertil Steril* 2003; 80:475-84.

Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1004-8.

De Groot CJ, Bloemenkamp KW, Duvekor EJ, Helmerhorst FM, Bertina RM, van der Meer F, et al. Preeclampsia and genetic risk factors for thrombosis: a case-control study. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181:975-80.

De los Santos MJ, Mercader A, Frances A, Portoles E, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Role of endometrial factors in regulating secretion of components of the immunoreactive human embryonic interleukin-1 system during embryonic development. *Biol Reprod* 1996; 54:563-74.

Degen SJF, Davie EW. Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry* 1987; 26:6165.

D'Elia AV, Driul L, Giacomello R, Colaone R, Fabbro D, Di Leonardo C, Florio P, Petraglia F, Marchesoni D, Damante G. Frequency of factor V, prothrombin and methylenetetrahydrofolate reductase gene variants in preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 2002; 53(2):84-7.

Diedrich K. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 2000; Springer Verlag, ISBN 3540652582: S 119.

Dizon-Townson DS, Kinney S, Branch DW, Ward K. The factor V mutation is not a common cause of recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol* 1997a; 34(3):217-23.

Dizon-Townson DS, Meline L, Nelson LM, Varner M, Ward K. Fetal carriers of the factor V Leiden mutation are prone to miscarriage and placental infarction. *Am J Obstet Gynecol* 1997b; 177:402-05.

Dizon-Townson DS, Nelson LM, Easton K, Ward K. The factor V Leiden mutation may predispose women to severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 902-5.

Dossenbach-Glaninger A, van Trotsenburg M, Oberkanins C, Moritz A, Krugluger W, Huber J, Hopmeier P. Plasminogen activator inhibitor 1 4G/5G polymorphism and coagulation factor XIII Val34Leu polymorphism: impaired fibrinolysis and early pregnancy loss. *Clin Chem* 2003; 49(7):1081-6.

Elbaz A, Poirier O, Canaple S, Chedru F, Cambien F, Amarenco P. The association between the Val34Leu polymorphism in the factor XIII gene and brain infarction. *Blood* 2000; 95:586-91.

Felberbaum R und Dahnke W. D.I.R.- Deutsches IVF-Register: Ergebnisse der Datenerhebung für das Jahr 1996. *Fertilität* 1997; 13:99

Ferraresi P, Marchetti G, Legnani C, et al. The heterozygous 20210 G/A prothrombin genotype is associated with early venous thrombosis in inherited thrombophilias and is not increased in frequency in artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:2418-22.

Foka ZJ, Lambropoulos AF, Saravelos H, et al. Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolatereductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod* 2000; 2:458-62.

Franco RF, Middeldorp S, Meinardi JR, van Pampus ECM, Reitsma PH. Factor XIII Val34Leu and the risk of venous thromboembolism in factor V Leiden carriers. *Br J Haematol* 2000a; 111:118-21.

Franco RF, Pazin-Filho AP, Tavella MH, Simoes MV, Marin-Neto JA, Zago MA. Factor XIII Val34Leu and the risk of myocardial infarction. *Haematologica* 2000b; 85:67-71.

Franco RF, Reitsma PH, Lourenco D, Maffei FH, Morelli V, Tavella MH, Araujo AG, Piccinato CE, Zago MA. Factor XIII Val34Leu is a genetic factor involved in the etiology of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1999;81:676-9.

Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolat reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-3

Gambaro G, Anglani F, D'Angelo A. Association studies of genetic polymorphisms and complex disease. *Lancet* 2000; 355:308-11.

Gandrille S, Greengard JS, Alhenc-Gelas M, Juhan-Vague I, Abgrall JF, Jude B, et al. Incidence of activated protein C resistance caused by the Arg506Gln mutation in factor V in 113 unrelated symptomatic protein C-deficient patients. The French Network on the behalf of INSERM. *Blood* 1995; 86:219-24

Gardner DK, Schoolkraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998; 13:3434-40.

Gemmati D, Serino ML, Ongaro A, Tognazzo S, Moratelli S, Resca R, Moretti M, Scapoli GL. A common mutation in the gene for coagulation factor XIII-A (Val34Leu): a risk for primary intracerebral hemorrhage is protective against atherothrombotic diseases. *Am J Hematol* 2001; 67(3):183-8.

Gerris J, De Neubourg D, Mangelschots K, et al. Prevention of twin pregnancies after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection based on strict embryo criteria: a prospective randomized clinical trial. *Hum Reprod* 1999; 14:2581-7.

Gonzalez RR, Simon C, Caballero-Campo P, Norman R, Chardonnens D, Devoto L, Bischof P. Leptin and reproduction. *Hum Reprod Update* 2000; 6(3):290-300.

Göpel W, Kattner E, Seidenberg J, Kohlmann T, Segerer H, Möller J, Genetic Factors in Neonatology Study Group. The effect of the Val34Leu polymorphism in the factor XIII gene in infants with a birth weight below 1500g. *J Pediatr* 2002; 140(6):688-92.

Göpel W, Kim D, Gortner L. Prothrombotic mutations as a risk factor for preterm birth. *Lancet* 1999; 353:1411-2.

Göpel W, Ludwig M, Kohlmann T, Diedrich K, Möller J. Author's reply. *Lancet* 2002a; 359: 894.

Göpel W: Genetische Risikofaktoren für Frühgeburtlichkeit und schwere Erkrankungen des Frühgeborenen. Habilitationsschrift 2002b.

Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, d'Addeda M, Capucci G, Vecchione G et al. Factor V Leiden is associated with repeated and recurrent unexplained fetal losses. *Thromb Haemost* 1997a; 77:822-4.

Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, et al. Factor V Leiden C>T MTHFR polymorphism and genetic susceptibility to preeclampsia. *Thromb Haemost* 1997b; 77:1052-4.

Greer IA. Thrombosis in pregnancy: maternal and fetal issues. *Lancet* 1999; 353:1258-65.

Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval JL, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A. A serious adverse event after successful gene therapy for x-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003; 3:255-6.

Hazekamp J, Bergh C, Wennerhold U-B, et al. Avoiding multiple pregnancies in ART: considerations of new strategies. *Hum Reprod* 2000; 15:1217-9.

Hessner MJ, Luhm RA, Pearson SL, Endean DJ, Friedman KD, Montgomery RR. Prevalence of prothrombin G20210A, factor V G1691A (Leiden), and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T in seven different populations determined by multiplex allele-specific PCR. *Thromb Haemost* 1999; 81:733-8.

Horne AW, White JO, Margara RA, Williams R, Winston RML, Lalani E. MUC1: a genetic susceptibility to infertility? *Lancet* 2001; 357:1336-7.

Hsieh □□, Lin CS, Sun □L, Chang CC, Tsai HD, Wu JC. In vivo gene transfer of leukemia inhibitory factor (LIF) into mouse endometrium. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19:79-83.

Huang H□, Wen □, Irvine JC, Krüssel JS, Soong □K, Polan ML. Cytokine mediated regulation of TIMP-1, TIMP-3 and 92-kDa type IV collagenase messenger RNA expression in human endometrial stroma cells. 53rd Annual Meeting of the ASMR, Cincinnati, OH, October 18-22, 1997.

Human Fertilisation and Embryology Authority, seventh annual report. London: Stationery Office, 1998.

Ichinose A, Davie EW. Characterization of the gene for the a subunit of human factor XIII, (plasma transglutaminase), a blood coagulation factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:5829-33.

Juul K, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Factor V Leiden: relation to fertility? *Lancet* 2002; 359: 894.

Kangsadalampai S and Board PG. The Val34Leu polymorphism in the A subunit of coagulation factor XIII contributes to the large normal range in activity and demonstrates that the activation peptide plays a role in catalytic activity. *Blood* 1998; 92:2766-70.

Kauma SW. Cytokines in implantation. *J Reprod Fertil Suppl* 2000; 55:31-42.

Kohler HP, Stickland MH, Ossei-Gerning N, Carter A, Mikkola H, Grant PJ. Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1998; 79:8-13.

Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briet E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor antioagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 1993; 342:1503-06.

Krüssel JS, Simon C, Rubio MC et al. Expression of of interleukin-1 (IL-1) system messenger ribonucleid acids (mRNAs) in single blastomeres from human preimplantation embryos. 53rd Annual Meeting of the ASRM, Cincinnati, OH, October 18-22; 1997

Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999;340:9-13.

Küpker W, Fornara P, Al-Hasani S, Diedrich K. Die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) – Assistierte Fertilisierung bei schwerer männlicher Subfertilität. *Der Gynäkologe* 1996; 29:453-63.

Kutteh WH, Park VM, Deitcher SR. Hypercoagulable state mutation analysis in white patients with early first-trimester recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 1999; 71:1048-53.

Lass A, Weiser W, Munafo A, Loumaye E. Leukaemia Inhibitory factor in human reproduction. *Fertil Steril* 2001; 76(6):1091-6.

Leroyer C, Mercier B, Escoffre M, Ferec C, Mottier D. Factor V Leiden prevalence in venous thromboembolism patients. *Chest* 1997;111:1603-6.

Lessey BA. Adhesion molecules and implantation. *J Reprod Immunol* 2002; 55(1-2):101-12.

Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML et al. 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol* 1991; 113:437-49.

Lim BCB, Ariens RAS, Carter AM, Weisel JW, Grant PJ. Genetic regulation of fibrin structure and function: complex gene-environment interactions may modulate vascular risk. *Lancet* 2003;361:1424-31.

Lindmarker P, Schulman S, Sten-Linder M, Wiman B, Egberg N, Johnsson H. DURAC Trial Study Group. Duration of Anticoagulation. The risk of recurrent venous thromboembolism in carriers and non-carriers of the G1691A allele in the coagulation factor V gene and the G20210A allele in the prothrombin gene. *Thromb Haemost* 1999; 81:684-9.

Lindquist PG, Svensson PJ, Dahlbäck B, Marsal K. Factor V \square 506 mutation (activated protein C resistance) associated with reduced intrapartum blood-loss - a possible evolutionary selection mechanism. *Thromb Haemost* 1998; 79:69-73.

Lindquist PG, Svensson PJ, Marsaal K, Grennert L, Luterkort M, Dahlbäck B. Activated protein C resistance (FV: \square 506) and pregnancy. *Thromb Haemost* 1999;81:532-37.

Ludwig M, Nitz B. Optimierung der Erfolgsaussichten in einem IVF-Programm. *Zentralbl Gynakol* 2004;126:368-72.

Majerus PW. Bad blood by mutation. *Nature* 1994; 369:14-15.

Makris M, Preston FE, Beauchamp NJ, et al. Co-inheritance of the 20210A allele of the protrombin gene increases the risk of thrombosis in subjects with familial thrombophilia. *Thromb Haemost* 1997; 78:1426-29.

Many A, Elad R, \square aron \square , Eldor A, Lessing JB, Kupferminc MJ. Third-trimester unexplained intrauterine fetal death is associated with inherited thrombophilia. *Obstet Gynecol* 2002;99:684-87.

Margaglione M, Bossone A, Brancaccio V, Ciampa A, Di Minno G. Factor XIII Val34Leu polymorphism and risk of deep vein thrombosis. *Thromb Haemost* 2000; 84:1118-9.

Margaglione M, BrancaccioV, Giuliani N, et al. Increased risk for venous thrombosis in carriers of the prothrombin G \rightarrow A 20210 gene variant. *Ann Intern Med* 1998; 129:89-93.

Martikainen H, Tiitinen A, Tomás C, Tapanainen J, Orava M, Tuomivaara L, Vilska S, Hydén-Granskog C, Hovatta O and the Finnish ET Group. One versus two embryo transfer after IVF and ICSI. *Hum Reprod* 2001; 16(9):1900-3.

Martinelli I, Taioli E, Cetin I, Marinoni A, Gerosa S, Villa MV, Bozzo M, Mannucci MD. Mutations in coagulation factors in women with unexplained late fetal loss. *N Engl J Med* 2000; 343:1015-8.

Meinardi JR, Middeldorp S, de Kam PJ, Koopman MMW, van Pampus ECM, Hamulyak K, Prins MH, Büller HR, van der Meer J. Increased risk for fetal loss in carriers of the factor V Leiden mutation. *Ann Intern Med* 1999; 130:736-9.

Middeldorp S, Meinardi JR, Koopman MMW, van Pampus ECM, Hamulyak K, van der Meer J, Prins MH, Büller HR. A prospective study of asymptomatic carriers of the factor V Leiden mutation to determine the incidence of venous thromboembolism. *Ann Intern Med* 2001; 135:322-7.

Mikkola H, Syrjälä M, Rasi V, Vathera E, Hamalainen E, Peltonen L, Palotie A. Deficiency in the α -subunit of coagulation factor XIII: two novel point mutations demonstrate different effects on transcript levels. *Blood* 1994; 84:517-25.

Morange PE, Henry M, Brunet D, Aillaud MF, Juhan-Vague I. Factor XIII V34L is not an additional genetic risk factor for venous thrombosis in factor V Leiden carriers. *Blood* 2001; 97:1894-6.

Morrison ER, Miedzybrodzka ZH, Campbell DM, Haites NE, Wilson BJ, Watson MS, Greaves M, Vickers MA. Prothrombotic genotypes are not associated with pre-eclampsia and gestational hypertension: results from a large population-based study and systematic review. *Thromb Haemost* 2002; 87(5):779-85.

Mousa HA, Alfirevič Z. Do placental lesions reflect thrombophilia state in women with adverse pregnancy outcome? *Hum Reprod* 2000; 15:1830-33.

Nikas G. Endometrial receptivity: changes in cell-surface morphology. *Semin Reprod Med* 2000; 18(3):229-35.

Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 2001; 345(19):1400-08.

Office of National Statistics Series DH3, no. 30. London: Stationery Office, 1997.

Ozturk O und Templeton A. In-vitro fertilisation and risk of multiple pregnancy. *Lancet* 2002; 359:232.

Poort SR, Bertina RM, Vos HL. Rapid detection of the prothrombin 20210A variation by allele specific PCR. *Thromb Haemost* 1997;78:1157-8.

Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88:3698-703.

Rai R, Shlebak A, Cohen H, Backos M, Holmes Z, Marriott K, Regan L. Factor V Leiden and acquired activated protein C resistance among 1000 women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2001; 16(5):961-15.

Rai RS, Regan L, Chitolie A, Donald JG, Cohen H. Placental thrombosis and second trimester miscarriage in association with activated protein C resistance. *Br J Obstet Gynecol* 1996a; 103: 842-44.

Rai RS, Regan L, Hadley E, Dave M, Cohen H. Second-trimester pregnancy loss is associated with activated protein C resistance. *Br J Haemat* 1996b; 92:489-490.

Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; 346:1133-34.

Reese J, Das SK, Bibhash CP, Lim H, Song H, Matsumoto H, Knudtson KL, Du Bois RN und Dey SK. Global gene expression analysis to identify molecular markers of uterine receptivity and embryo implantation. *J Biol Chem* 2001; 276 (47):44137-45.

Reiner AP, Frank MB, Schwartz SM, Linenberger ML, Longstreth WT Jr, Teramura G, Rosendaal FR, Psaty BM und Siscovick DS. Coagulation factor XIII polymorphisms and the risk of myocardial infarction and ischaemic stroke in young women. *Br J Haematol* 2002; 116:376-82.

Reiner AP, Schwartz SM, Frank MB, Longstreth WT, Hindorff LA, Teramura G, Rosendaal FR, Gaur LK, Psaty BM, Siscovick DS. Polymorphisms of coagulation factor XIII subunit A and risk of nonfatal hemorrhagic stroke in young white women. *Stroke* 2001; 32:2580-87.

Renner W, Köppel H, Hoffmann C, Schallmoser K, Stanger O, Toplak H, Wascher TC, Pilger E. Prothrombin G20210A, factor V Leiden, and factor XIII Val34Leu: common mutations of blood coagulation factors and deep vein thrombosis in Austria. *Thromb Res* 2000;99:35-39.

Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *The Lancet* 2003; 361:901-8.

Reznikoff-Etievan MF, Cayol V, Carbonne B, Robert A, Coulet F, Milliez J. Factor V Leiden and G20210A prothrombin mutations are risk factors for very early recurrent miscarriage. *Br J Obstet Gynecol* 2001; 108(12): 1251-54.

Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis in apparently healthy man. *N Engl J Med* 1995; 332:912-17.

Ridker PM, Hennekens CH, Miletich JP. G20210A mutation in prothrombin gene and risk of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis in a large cohort of US men. *Circulation* 1999; 99:999-1004.

Ridker PM, Miletich JP, Buring JE, Ariyo AA, Price DT, Manson JE, Hill JA. Factor V Leiden mutation as a risk factor for recurrent pregnancy loss. *Ann Intern Med* 1998; 128(12):1000-03.

Roberts CJ und Lowe CR. Where have all the conceptions gone? *Lancet* 1975; 1:498-500.

Roldán V, Corral J, Marín F, Rivera J, Pineda J, González-Conejero R, Sogorb F, Vicente V. Role of factor XIII Val 34Leu polymorphism in patients <45 years of age with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2003; 91:1242-45.

Roqué H, Paidas MJ, Funai EF, Kuczynski E, Lockwood CJ. Maternal thrombophilias are not associated with early pregnancy loss. *Thromb Haemost* 2004;91:290-5.

Roseboom TJ, Wermeiden JPW, Schoute E, Lens JW, Schats R. The probability of pregnancy after embryo transfer is affected by the age of the patients, cause of infertility,

number of embryos transferred and the average morphology score, as revealed by multiple logistic regression analysis. *Hum Reprod* 1995; 10:3035-41.

Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, et al. Geographic distribution of the 20210G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 1998; 79:706-08.

Rosendaal FR, Grant PJ, Ariens RAS, Poort SR, Bertina RM. Faktor XIII Val34Leu, factor XIII antigen and activity levels and risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; 82:508-09.

Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of Thrombosis in Patients Homozygous for Factor V Leiden (Activated Protein C resistance). *Blood* 1995; 85:1504-08.

Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Psaty BM, Raghunathan TE, Vos HL. A common prothrombin variant (20210 G to A) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1997; 90:1747-50.

Sarig G, ρounis JS, Hoffman R, Lanir N, Blumenfeld Z, Brenner B. Thrombophilia is common in women with idiopathic pregnancy loss and is associated with late pregnancy wastage. *Fertil Steril* 2002; 77(2):342-47.

Scholtes MCW und Zeilmakers GH. A prospective, randomized study of embryo transfer results after 3 or 5 days of embryo culture in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996; 65:1245-48.

Schoolcraft WB, Gardner DK, Lane M, Schlenker T, Hamilton F, Meldrum DR. Blastocyst culture and transfer: analysis of results and parameters affecting outcome in two in vitro fertilization programs. *Fertil Steril* 1999; 72:604-09.

Shapiro BS, Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST. Dramatic declines in implantation and pregnancy rates in patients who undergo repeated cycles of in vitro fertilization with blastocyst transfer after one or more failed attempts. *Fertil Steril* 2001;76(3):538-42.

Smeenk MJM, Stolwijk AM, Kremer JAM und Braat DDM. External validation of the Templeton model for predicting success after IVF. *Hum Reprod* 2000; 15:1065-68.

Smiles AM, Jenny NS, Tang Z, Arnold A, Cushman M, Tracy RP. No association of plasma prothrombin concentration or the G20210A mutation with incident cardiovascular disease: results from the cardiocascular health study. *Thromb Haemost* 2002;87(4):614-21.

Society for Assisted Reproductive Technology and the American Society for Reproductive Medicine (SART/ASRM). Assisted reproductive technology in the United States and Canada: 1995 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril* 1998; 69:389-98.

Souto JC, Coll I, Llobet D, et al. The prothrombin 20210A allele is the most prevalent genetic risk factor for venous thromboembolism in the Spanish population. *Thromb Haemost*. 1998; 80:366-69.

Souza SS, Ferriani RA, Pontes AG, Zago MA, Franco RF. Factor V Leiden and factor II G20210A mutations in patients with recurrent abortion. *Hum Reprod* 1999; 10:2448-50.

Staessen C, Janssenswillen C, van den Abbeel E, Devroey P, van Steirteghem AC. Avoidance of triplet pregnancies by elective transfer of two good quality embryos. *Hum Reprod* 1993; 8:1650-53.

Strickland S und Richards WG. Invasion of the trophoblast. *Cell* 1992; 71:355-57.

Svensson PJ und Dahlbäck B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 1994; 330:517-22.

Tan SL, Royston P, Campbell S, et al. Cumulative conception and livebirth rates after in-vitro fertilisation. *Lancet* 1992; 339:1390-94.

Taylor HS. The role of HOX genes in human implantation. *Hum Reprod Update* 2000; 6(1):75-9.

Templeton A und Morris JK. Reducing the risk of multiple births by transfer of two embryos after in vitro fertilization. *N Engl J Med* 1998; 339:573-77.

Templeton A, Morris JK, Parslow W. Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment. *Lancet* 1996; 348:1402-06.

Van Dunné FM, Doggen CJM, Heemskerk M, Rosendaal FR, Helmerhorst FM. Factor V Leiden mutation and miscarriage in women with venous thrombosis. *Hum Reprod* 2005; 20(3):802-6.

Van Eijk MJT, Mandelbaum J, Salat-Baroux J, Belaisch-Allart J, Plachot M, Junca AM, Mummery CL. Expression of leukaemia inhibitory factor receptor subunits LIFR β and gp130 in human oocytes and preimplantation embryos. *Mol Hum Reprod* 1996; 2:355-60.

Van Montfoot AP, Dumoulin JC, Land JA et al. Elective single embryo transfer policy in the first three IVF/ICSI treatment cycles. *Hum Reprod* 2005; 20(2):433-6.

Vauthier-Brouzes D, Lefebvre G, Lesourd S, Gonzales J, Darbois □. How many embryos should be transferred in in vitro fertilization? A prospective randomized study. *Fertil Steril* 1994; 62:339-42.

Vilksa S, Tiitinen A, Hyden-Granskog C und Hovatta O. Elective transfer of one embryo results in an acceptable pregnancy rate and eliminates the risk of multiple birth. *Hum Reprod* 1999; 14:2392-95.

Wartiovaara U, Perola M, Mikkola H, Tottermann K, Savolainen V, Penttila A, Grant PJ, Tikkanen MJ, Vartiainen E, Karhunen PJ, Peltonen L, Palotie A. Association of FXIII Val34Leu with decreased risk of myocardial infarction in Finnish males. *Atherosclerosis* 1999; 142:295-300.

Whiteside EJ, Jackson MM, Herington AC, Edwards DR, Harvey MB. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 are key regulators of extracellular matrix degradation by mouse embryos. *Biol Reprod* 2001; 64(5):1331-7.

□ounis JS, Brenner B, Ohel G, Tal J, Lanir N, Ben-Ami M. Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation can be associated with first- as well as second- trimester recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 2000;43(1): 31-5.

Zivelin A, Griffin JH, Xu X, Pabinger I, Samama M, Conard J, Brenner B, Eldor A, Selisohn U. A single genetic origin for a common Caucasian risk factor for venous thrombosis. *Blood* 1997; 89:397-402.

Zöller B und Dahlbäck B. Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. *Lancet* 1994; 343:1536-38.

7 Anhang

7.1 Studieninformationen

7.1.1 Anschreiben



Medizinische
Universität zu Lübeck

Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe • Direktor: Univ. Prof. Dr. med. K. Diedrich
Klinik für Pädiatrie • Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. K. Kruse

Medizinische Universität zu Lübeck • Ratzeburger Allee 160 • D-23538 Lübeck

Absender:
Dr. med W. Göpel

Telefon:(0451)5000 Vermittlung

Durchwahl: (0451) 500 2959

Telefax: (0451) 5002590

Datum:

unsere Klinik arbeitet intensiv an der Verbesserung der in-vitro-Fertilisation. Neuste Forschungsergebnisse machen es wahrscheinlich, daß die Rate der erfolgreichen in-vitro-Fertilisationen auch von mütterlichen bzw. kindlichen Erbanlagen abhängt. Zur Erforschung dieser Zusammenhänge benötigen wir Eltern/Kind Paare, bei denen eine in-vitro-Fertilisation bereits erfolgreich war. Wir möchten Sie deshalb bitten an der im beiliegenden Aufklärungsbogen beschriebenen Studie teilzunehmen. Langfristiges Ziel unserer Untersuchung ist die Entwicklung von Medikamenten, die eine leichtere Einnistung der Eizelle begünstigen, um so in Zukunft die Rate der erfolgreichen in-vitro-Fertilisationen zu steigern.

Wir benötigen für unsere Untersuchungen jeweils zwei Mundschleimhautabstriche von Ihnen und Ihrem Kind/Kindern. In den Anlagen finden Sie eine Anleitung zur Entnahme von Mundschleimhautabstrichen und die entsprechenden Abstrichtupfer. Nachuntersuchungen fallen nicht an. Falls Sie an unserer Untersuchung nicht teilnehmen möchten, senden Sie bitte einfach die unbenutzten Abstrichtupfer mit dem beiliegenden frankierten Rückumschlag zurück an unser Labor.

Wenn Sie zu der Studie noch Fragen haben, so wenden Sie sich bitte an den die Studie betreuenden Arzt Herrn Dr. W. Göpel, Tel.: (0451) 500 2959.

Prof. Dr. K. Diedrich
Klinik für Frauenheilkunde

Prof. Dr. J. Möller
Klinik für Kinderheilkunde

7.1.2 Aufklärungsbogen

Aufklärungsbogen zur Studie

Die Erfolgsrate von in-vitro-Fertilisationen liegt bei etwa 20%, d.h. im Durchschnitt führt nur jeder fünfte Versuch zu einer erfolgreichen Schwangerschaft. Den Anteil der erfolgreichen IVF-Zyklen zu erhöhen ist Gegenstand intensiver Forschung. In letzter Zeit mehren sich nun Hinweise darauf, daß bestimmte genetische Polymorphismen, (das sind kleine Veränderungen der Erbsubstanz, die bei jedem Menschen vorkommen und keinen Krankheitswert besitzen), zu einem leichteren Sich-Einnisten der befruchteten Eizelle in die Gebärmutter führen. Sollte sich diese Vermutung bestätigen, so hätte das große Bedeutung für die zukünftige Forschung, denn über die genauen Mechanismen, welche die Einnistung der Eizelle begünstigen ist leider nur sehr wenig bekannt. Zur Überprüfung unserer Vermutung benötigen wir Ihre Unterstützung. Bitte nehmen Sie bei sich selbst und Ihrem Kind/Kindern jeweils zwei Mundschleimhautabstriche ab und schicken sie zusammen mit der beiliegenden Einverständniserklärung zurück an unser Labor (ein adressierter Freiumschlag liegt bei). Die Proben werden in unserem Labor auf Polymorphismen untersucht, die möglicherweise einen Einfluß auf die Einnistung der Eizelle haben. An dem Material werden keine anderen genetischen Untersuchungen durchgeführt. Sollten wir bei den Familien unter Ihnen, bei denen es rasch zu einer Einnistung der Eizellen gekommen ist, besonders häufig die von uns untersuchten Polymorphismen finden, so wäre unsere Vermutung bestätigt. Vielleicht gelingt es dann in Zukunft, diese genetische Eigenart medikamentös nachzuahmen und so die Rate der erfolgreichen in-vitro-Fertilisationen zu steigern. Da wir diese Studie aus Datenschutzgründen anonymisiert durchführen (d.h. ihre Namen werden durch verschlüsselte Nummern ersetzt), können wir Ihnen leider keine personenbezogenen Untersuchungsergebnisse mitteilen. Für Ihre Mitarbeit bereits im Voraus vielen Dank.

Prof. Diedrich (Frauenklinik)

Prof. Möller (Kinderklinik)

7.1.3 Einverständniserklärung

Einverständniserklärung

Frau _____ geb.: ____ ____ ____
Vorname Nachname

Herr _____ geb.: ____ ____ ____
Vorname Nachname

Kind/er _____ geb.: ____ ____ ____
Vorname/n

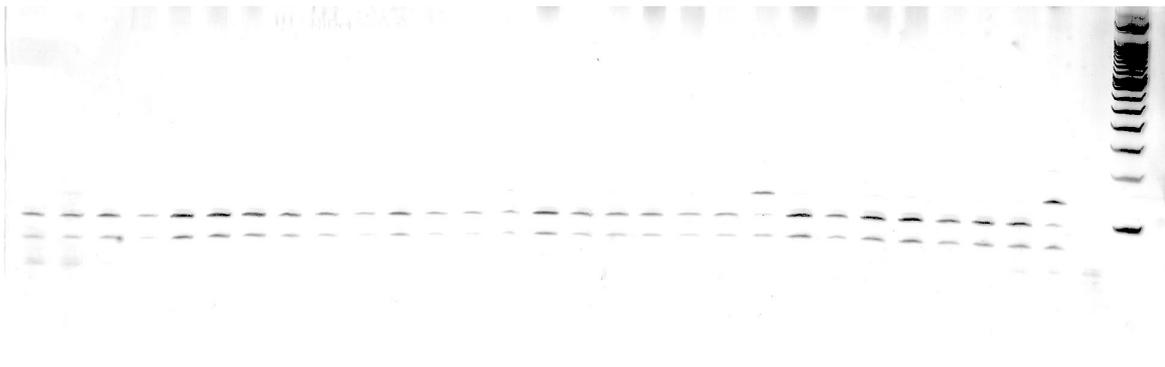
Hiermit erkläre ich mich / wir uns mit der Untersuchung meiner/unsere Mundschleimhautprobe/n und der meiner/unsere Kinder auf genetische Polymorphismen einverstanden. Mir/uns ist bekannt, daß die Untersuchung anonymisiert durchgeführt wird, und daß aus diesem Grund eine Ergebnismitteilung nicht möglich ist.

Datum

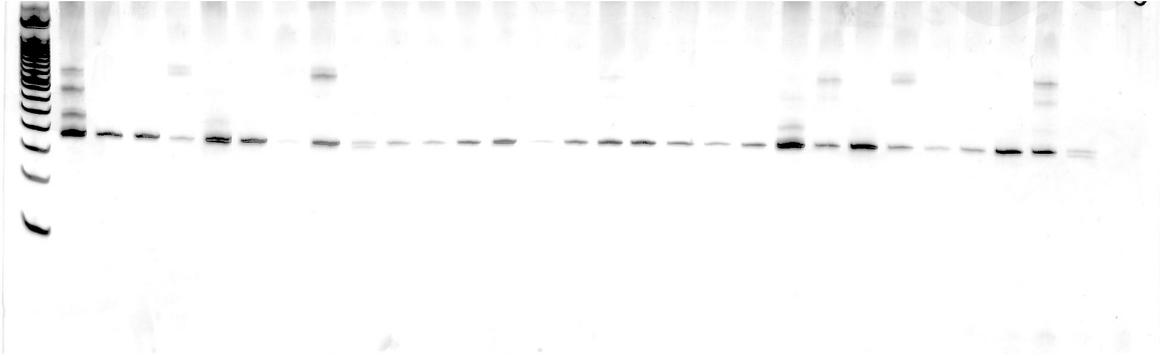
Unterschrift/en

7.2 PCR-Gele

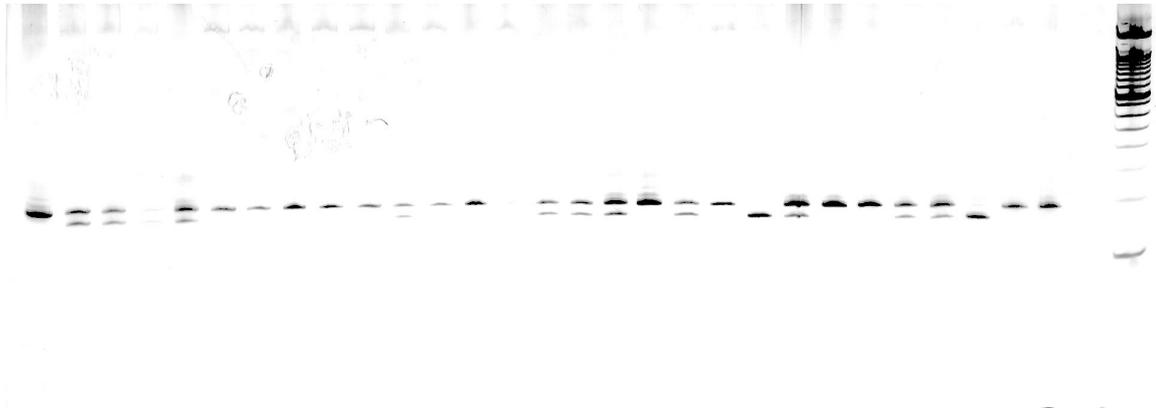
7.2.1 FVL



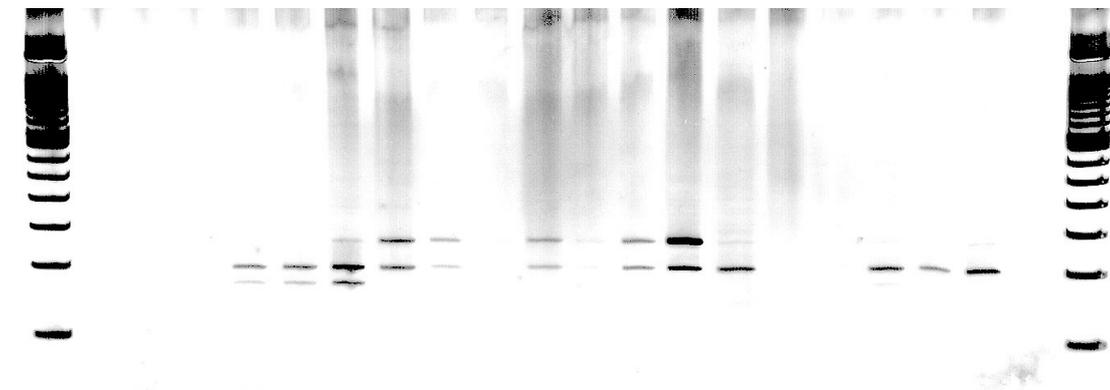
7.2.2 Prothrombin 20210A



7.2.3 Faktor XIII Val34Leu



7.2.4 Multiplex-PCR



8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Betreuer Herrn Priv. Doz. Dr. Wolfgang Göpel danken. Seine optimistische, kluge und humorvolle Einstellung zur Arbeit hat mich sehr beeindruckt. Die darüber hinaus interessierte und wohlwollende persönliche Betreuung führte dazu, dass ich mich mit meinen Fragen und Sorgen jederzeit an ihn wenden konnte. Durch diese Kombination konnte ich die Doktorarbeit letztlich als einen angenehmen Kontrast zum ansonsten recht unpersönlichen und starren Studienalltag wahrnehmen.

In diesem Zusammenhang gilt mein Dank ebenfalls den technischen Assistentinnen Frau Ritva Schröder und Frau Lynn Ellenberg, die mir bei den labortechnischen Abläufen hilfreich zur Seite standen und die mir zusätzlich die Wartezeiten durch Gespräche über weitere wichtige Dinge im Leben verkürzten.

Eine Voraussetzung für das Gelingen der Arbeit war die Einsicht in die klinischen Daten der IVF/ICSI-Patientinnen. Für die unkomplizierte Zusammenarbeit möchte ich mich stellvertretend bei Herrn Prof. Dr. Klaus Diedrich und Herrn Priv. Doz. Dr. Michael Ludwig bedanken.

Schließlich kommen wir zu den unverzichtbaren „Computerspezialisten“, die das Auswerten und Schreiben der vorliegenden Arbeit erst möglich machten. Bei der Erstellung einer Datenbank und der genauen Dokumentation der Ergebnisse standen mir hilfreich Frau Ilse Dickau und Frau Birgit Roenspiess zur Seite. Vielen Dank dafür. Nach Fertigstellung der Arbeit gelang es meinem Kollegen Sebastian Dries und meinem Bruder Stephan Junge schließlich, das Geschriebene noch nachträglich in ein übersichtliches und angemessenes Format zu überführen. Vielen Dank für diesen Einsatz, denn mein Kampf mit den Formatvorlagen schien immer aussichtsloser.

Abschließend möchte ich an dieser Stelle meinen Eltern Frau Helga Junge und Herrn Wolfgang Junge danken, die mir durch ihre Unterstützung das Medizinstudium ermöglichten.

Lebenslauf

Name, Vorname: Junge, Ann-Kristin

Geburtsdatum: 19.10.1975

Geburtsort: Kiel

Familie: Vater: Prof. Dr. Wolfgang Junge, geb. 06.09.1942
Mutter: Helga Junge, geb. 06.08.1944
Bruder: Stephan Junge, geb. 02.05.1973

1981-1985 Grundschule Strande

1986-1995 Kieler Gelehrten-Schule, Humanistisches Gymnasium

1992-1993 Wellington College, Berkshire/England

06/1995 Abitur, Note: 1,8

1995-1996 Studium der Philosophie/Germanistik, Philipps-Universität Marburg

1996-2003 Studium der Humanmedizin, Medizinische Universität zu Lübeck

03/1999 Ärztliche Vorprüfung

03/2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

03/2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

04/2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote: Sehr gut

04/2002-03/2003 Praktisches Jahr

1. Pädiatrie, Universitätsklinikum Lübeck
2. Chirurgie, Queen-Elizabeth-Hospital, London
3. Innere Medizin, Universitätsklinikum Lübeck

07/2003-10/2004 Ärztin im Praktikum, Innere Medizin, Allgemeines Krankenhaus Eilbek, Hamburg

10/2004 Approbation

Seit 10/2004 Assistenzärztin, Innere Medizin, Allgemeines Krankenhaus Eilbek, Hamburg