

Dissertation

**HOCHAUFLÖSENDE
POLKÖRPERANALYSE**

Mag. Julie WALDISPÜHL-GEIGL

Zur Erlangung
**des akademischen Doktoratsgrades
der Medizinischen Wissenschaft**

An der
**Medizinischen Universität Graz
Institut für Humangenetik**

Vorstand: Univ.-Prof. Dr.med. Michael Speicher

2011

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und mich auch sonst keiner unerlaubten Hilfsmittel bedient habe. Ich versichere ferner, dass ich diese Dissertation bisher weder im In- noch im Ausland in irgendeiner Form als wissenschaftliche Arbeit vorgelegt habe.

Graz am:

Unterschrift:

Für Felix und Jochen.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Einführung in die Thematik der assistierten Reproduktion	1
1.2	Demographische Entwicklung.....	2
1.3	IVF und ICSI als Methoden der assistierten Reproduktion	3
1.4	Assistierte Reproduktion und Gesetzeslage	5
1.5	Meiose und Mechanismen der mütterlichen Aneuploidien	5
1.6	Methoden zur Beurteilung von Eizelle, Embryo und Fetus	9
1.6.1	Mikroskopische Beurteilung der Eizelle im Vorkernstadium.....	9
1.6.2	Mikroskopische Beurteilung der Morphologie und Teilungsgeschwindigkeit des Embryos	9
1.6.3	Pränataldiagnostik	10
1.6.4	Präimplantationsdiagnostik (PID)	11
1.6.5	Polkörperdiagnostik (PKD).....	12
1.7	Techniken der Polkörperdiagnostik.....	14
1.7.1	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	14
1.7.2	Vergleichende Genomische Hybridisierung (CGH)	16
1.8	Polkörperdiagnostik bei Translokationen	19
1.9	Polkörperdiagnostik für monogene Erkrankungen	22
1.10	Zielsetzung der Arbeit	23
2	MATERIAL UND METHODEN	24
2.1	Zuweiser	24
2.2	Polkörperbiopsie.....	24
2.3	Amplifikation der Polkörper-DNA	25
2.3.1	Linker-Adapter PCR.....	25
2.3.2	Amplifikation mit WGA4 Kit („WGA4-Amplifikation“, Fa. Sigma-Aldrich)	27
2.4	Aufreinigung der amplifizierten DNA mit dem GenElute PCR Clean-Up Kit, Fa. Sigma-Aldrich	28

2.5	Konzentrationsbestimmung der amplifizierten und aufgereinigten DNA	28
2.6	Multiplex-PCR.....	28
2.7	Markierung der amplifizierten und aufgereinigten DNA	29
2.7.1	Bioprime Exo-Klenow-Markierung für die Chromosomen-CGH	30
2.7.2	Bioprime Exo-Klenow Markierung für die Array-CGH	30
2.7.3	Agilent Exo-Klenow Markierung für die Array-CGH	30
2.8	Aufreinigung der markierten DNA.....	31
2.8.1	Microcon YM-30 Säule für die Chromosomen-CGH, Fa. Millipore.....	31
2.8.2	Microcon YM-30 Säule für die Array-CGH, Fa. Millipore.....	31
2.8.3	Amicon 30 kDA Säule für die Array-CGH, Fa. Millipore	32
2.9	Konzentrationsbestimmung der markierten DNA	32
2.10	Vergleichende genomische Hybridisierung (Comparative Genomic Hybridization, CGH).....	33
2.10.1	Technik der Chromosomen CGH.....	33
2.10.2	Array-CGH.....	34
2.11	Laser-Mikrodissektion.....	39
2.12	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	40
2.13	Materialien	41
2.14	Kit.....	43
2.15	Geräte.....	43
2.16	Puffer, Lösungen.....	44
2.17	Verwendete Software, Datenbank, Internettools	44
3	ERGEBNISSE.....	45
3.1	Amplifikation der Polkörper	45
3.1.1	Mikrodissektion.....	45
3.1.2	Linker-Adapter PCR nach Mikrodissektion	46
3.1.3	Linker-Adapter PCR und Polkörper-CGH.....	48
3.1.4	Amplifikation mit der WGA4 Methode	49

3.1.5	WGA4 und Polkörper-CGH.....	52
3.2	Array-CGH von Polkörpern	56
3.2.1	Telomer Array	56
3.2.2	Telomer-Centromer Array	60
3.2.3	Custom made 8x15K Arrays.....	62
3.2.4	Auswertung von 44K und 60K Whole Genome Arrays	65
3.3	Arbeitsablauf Polkörper-Array.....	66
3.3.1	Verbesserung des Arbeitsablaufs	67
3.4	Klinische Polkörperdiagnostik und Patientinnenkollektiv	70
3.4.1	Altersgruppe der Patientinnen.....	70
3.4.2	Polkörperanalyse gesamt	71
3.4.3	Diagnostische Effizienz	72
3.5	Aneuploidiediagnostik	72
3.5.1	Analyse der Polkörper-Paare.....	72
3.5.2	Analyse der Polkörper-Pools	74
3.5.3	Analyse des 1. Polkörpers.....	74
3.5.4	Analyse des 2. Polkörpers.....	75
3.5.5	Verteilung der Chromosomenstörungen.....	75
3.5.6	Rescue-Mechanismus	77
3.6	Strukturelle numerische Veränderungen	79
3.6.1	Hochauflösende Polkörperdiagnostik bei balancierter Translokation.....	79
3.6.2	Hochauflösende Polkörperdiagnostik bei Robertsonscher Translokation.....	84
4	DISKUSSION	86
5	ZUSAMMENFASSUNG	94
6	LEBENS LAUF.....	105
6.1	Angaben zur Person.....	105
6.2	Ausbildung.....	105

1 EINLEITUNG

1.1 Einführung in die Thematik der assistierten Reproduktion

Die Zahl der Paare mit unerfülltem Kinderwunsch ist mittlerweile ein ernstzunehmendes Problem in unserer Gesellschaft geworden. Jedes 7. Paar weltweit bleibt ungewollt kinderlos. Die Gründe hierfür sind vielfältig und verteilen sich zu ca. 40% auf Störungen bei der Frau, und zu ca. 20% auf Störungen beim Mann, in etwa 25% der Fälle ist der Grund bei beiden Partnern zu suchen. Als Ursachen der weiblichen Infertilität können Störungen im endokrinologischen Bereich, z.B. im hypothalamisch-hypophysären Regelkreis oder auf Ovar-Ebene genannt werden. Organische Erkrankungen sowie Fehlbildungen der Gebärmutter, Ovarien, Tuben und der Vagina tragen ebenfalls ursächlich bei. Als häufigste hormonelle, funktionelle und organische Ursachen sind hier der Eileiterverschluss, die Endometriose, Myome und Gebärmutterfehlbildungen zu erwähnen (Breckwoldt und Keck, 2001). Nicht unberücksichtigt bleiben sollten psychische Gründe und extragenitale Veränderungen, die dementsprechender Abklärung bedürfen.

Die männliche Infertilität kann auf Störungen im hypothalamisch-hypophysären Regelkreis und primärer Schädigung der Hoden mit Beeinflussung der Spermienproduktion beruhen. Des Weiteren kommen Transportstörungen im Bereich des Samenwege (z.B. CBAVD bei Mukoviszidose), immunologische Sterilität in Form von Auto-Antikörpern gegen Spermatozoen, sowie psychische und extragenitale Ursachen in Frage (Breckwoldt und Keck, 2001).

Bei der idiopathischen Sterilität (15%) lassen sich trotz intensiver Untersuchungen, weder beim Mann noch bei der Frau, Erklärungen für die ungewollte Kinderlosigkeit finden. Eine problematische Partnerschaftsinteraktion, eine gestörte Samenzell-Eizell-Interaktion und Störungen in der Embryonalentwicklung können hierfür maßgebend sein. Ebenso wirken sich Umweltbelastungen, Stress, Rauchen und eine ungesunde Ernährung negativ auf die Fruchtbarkeit aus.

Zusätzlich spielt auch die gesellschaftliche Entwicklung eine maßgebliche Rolle. Durch die verbesserten Möglichkeiten der Antikonzeption entscheiden sich heutzutage viele Frauen erst für ihre berufliche Karriere, erst in höherem Alter steht die Familienplanung an (Griesinger *et al.*, 2004).

Angemerkt werden soll, dass die natürliche menschliche Reproduktion eine eher geringe Effektivität aufweist. Die Wahrscheinlichkeit auf natürlichem Wege schwanger zu werden, beträgt selbst unter optimaler Bedingungen nur ca. 18% pro Monatszyklus.

1.2 Demographische Entwicklung

Die beiden Abbildungen (1.1a und 1.1b), die aus dem Gesundheitsbericht der „Statistik Austria“ entnommen wurden, zeigen eindeutig, dass der Trend zu einer späteren Mutterschaft ungebrochen weitergeht und dadurch auch vermehrt mit altersbedingten Fruchtbarkeitsproblemen bzw. Störungen in der Verteilung des Erbmaterials zu rechnen ist.

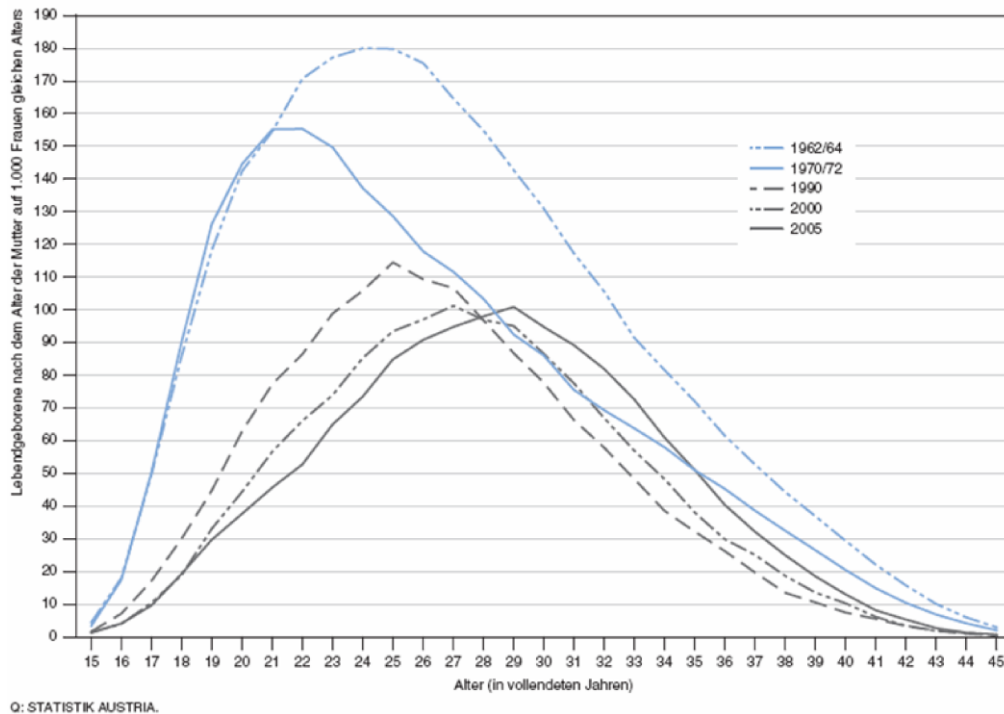
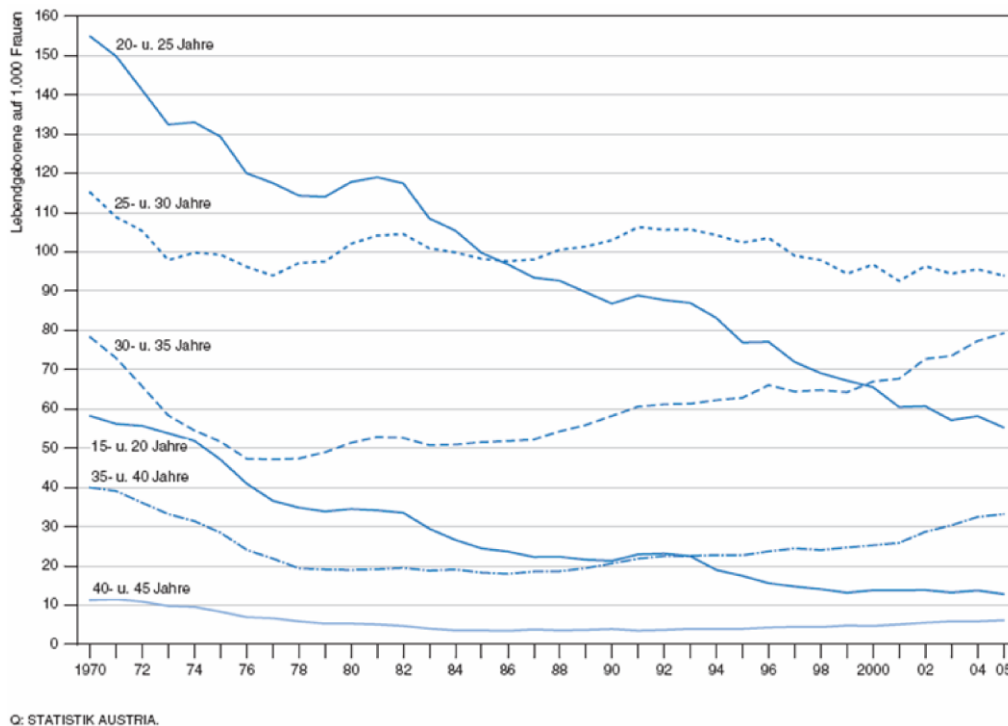


Abb. 1.1a und Abb. 1.1b Trend zu späterer Mutterschaft



1.3 IVF und ICSI als Methoden der assistierten Reproduktion

Die Aussichten für ein Paar, durch eine medizinische Behandlung ein Kind zu bekommen, hängt von der Schwere der Fertilitätsstörung, dem Alter der Frau und der Behandlungsmethode ab. Die derzeitigen Behandlungsmethoden variieren und können im Einzelfall von einer hormonellen Stimulation bis zur künstlichen Befruchtung reichen. Dennoch können mittlerweile ca. 50% aller Paare mit einem Sterilitätsproblem durch medizinische Maßnahmen geholfen werden.

Insbesondere der Fortschritt in den Methoden der assistierten Reproduktion, der In-Vitro-Fertilisation (IVF) und der intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI), hat in den letzten Jahren zu einer entscheidenden Erfolgsverbesserung beigetragen. Verbunden mit dem Einsatz der genetischen Diagnostik auf Basis der Präimplantations- oder Präfertilisationsdiagnostik, kann die Erfolgsrate der künstlichen Befruchtung gegebenenfalls weiter erhöht werden.

Die grundlegenden Ziele einer künstlichen Befruchtung sind zum einen die Steigerung von Schwangerschaftsraten und zum anderen die Reduktion von Fehlgeburten und Mehrlingsgeburten. Ursprünglich wurde die IVF mit nachfolgendem Embryotransfer für Patientinnen mit verschlossenen Eileitern entwickelt. Aktuell wird sie ebenfalls bei mittelschweren männlichen Fertilitätsstörungen, bei Endometriose und bei idiopathischer Sterilität eingesetzt.

Die Methode der IVF, der extrakorporalen Befruchtung (Vereinigung von Eizelle und Samenzelle im Reagenzglas), ist heute ein gesellschaftlich akzeptiertes Verfahren. Dabei wird nach Aufbereitung des Ejakulats die Insemination mit rund 50.000 Spermatozoen durchgeführt. Nach der Befruchtung beginnen sich die Zellen zu teilen und leiten damit die Embryonalentwicklung ein. Der Embryotransfer erfolgt nach einem definierten Zeitpunkt, die weitere Entwicklung in der Gebärmutter erfolgt wie auf natürlichem Weg.

Ein männlicher und weiblicher Vorkern bilden sich innerhalb von 16 bis 18 Stunden nach Penetration des Spermiums in die Eizelle. In diesem so genannten Vorkernstadium sind die mütterlichen und väterlichen Erbinformationen noch nicht verschmolzen, sie liegen getrennt voneinander vor. Von einer Zygote spricht man, wenn nach der Befruchtung der Eizelle durch eine Samenzelle, diese Vorkerne (mit je einem haploiden Chromosomensatz) miteinander zu einem diploiden Chromosomensatz verschmelzen. Die Zygote ist das Ausgangsstadium der gesamten Embryonalentwicklung. Als erfolgreiche Insemination wird das Vorhandensein zweier Vorkerne sowie der Polkörper definiert.

Mit Hilfe dieser Methode wurde am 25. Juli 1978 um 11.47 Uhr im Oldham General Hospital (Cambridge) ein 2,6-Kilo-Baby per Kaiserschnitt zur Welt gebracht – Louise Joy Brown. Der britische Forscher und Embryologe Robert Edwards, „Erfinder“ der künstlichen Befruchtung, erhielt hierfür im Jahre 2010, im Alter von 85 Jahren, den Medizin-Nobelpreis.

Seit 1992 wird die ICSI als Weiterentwicklung der IVF Methode beim Menschen angewandt, bei welcher eine einzige Samenzelle mit einer Mikroinjektionsnadel (Innendurchmesser ca. 7 µm) direkt ins Zytoplasma der Eizelle eingespritzt wird. Zur Mikroinjektion wird ein Invertmikroskop mit adaptierten Mikromanipulatoren verwendet (Montag *et al.*, 1997).

Weltweite Erfolge hat man mit der ICSI bei Männern mit Subfertilität bis hin zur Azoospermie erzielt. Die Vorgehensweise ist für das Paar identisch zur IVF Methode.

Die postnatale Entwicklung, wie auch das Fehlbildungsrisiko von Kindern nach assistierter Reproduktion, wurde bisher kritisch hinterfragt. Die Annahme eines erhöhten Risikos für Fehlbildungen in der Schwangerschaft und bei der Geburt nach IVF bzw. ICSI konnte bisher nicht eindeutig belegt werden (Schröder *et al.*, 2003). In diesem Zusammenhang wird auch das Beckwith-Wiedemann Syndrom genannt. Es gehört zu den Großwuchssyndromen mit pränatalem Beginn, als eine mögliche Ursache wird maternales Imprinting verantwortlich gemacht und evtl. im Kontext der künstlichen Befruchtung gesehen (Halliday *et al.*, 2004). Möglicherweise stehen beobachtete Auffälligkeiten nach IVF und ICSI aber eher im Zusammenhang mit sterilitätsassoziierten und genetischen Hintergrundrisiken der Kinderwunschpatienten (Schröder *et al.*, 2003).

Abbildung 1.2 zeigt das Vorgehen bei der ICSI, nach der Eizellpunktion wird ein Spermium mit der Mikroinjektionsnadel eingebracht, im Vorkernstadium sind beide Vorkerne deutlich zu erkennen.

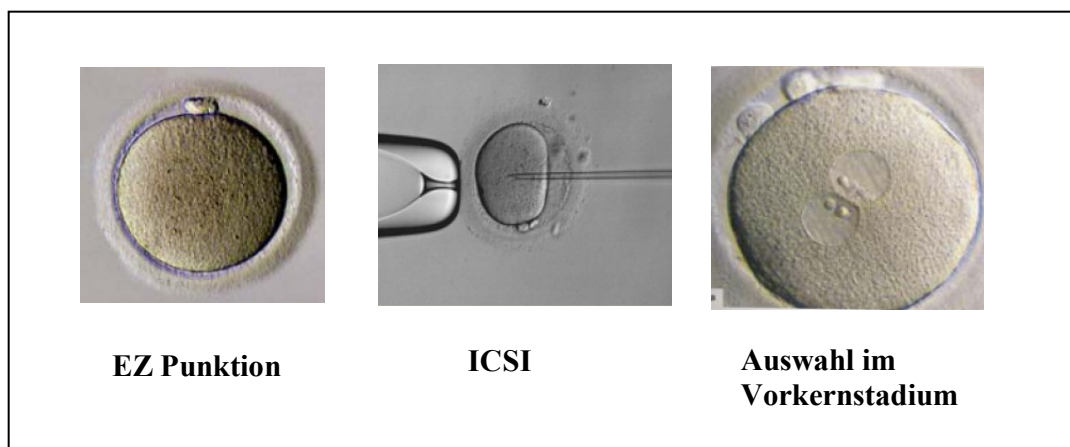


Abb. 1.2 Ablauf der ICSI

Im Jahre 2006 wurden in Österreich ca. 9000 IVF Zyklen durchgeführt. Der Anteil der Geburten, der auf eine assistierte Reproduktion zurückzuführen ist, liegt in Österreich bei ungefähr 1,5%. In Skandinavien z.B. wird eine liberale und fortschrittliche Familienpolitik betrieben, hier beläuft sich der Anteil auf bereits 7%, in Israel auf ca. 10%.

1.4 Assistierte Reproduktion und Gesetzeslage

Das deutsche Embryonenschutzgesetz (EschG), 1991 in Kraft getreten, regelt die künstliche Befruchtung und den Umgang mit menschlichen Embryonen. Das Gesetz hat zum Ziel, das menschliche Leben von Beginn an zu schützen.

In § 8 wird definiert, dass als Embryo im Sinne des Gesetzes bereits die befruchtete, entwicklungsfähige Eizelle angesehen wird. Entwicklungsfähig ist eine Eizelle innerhalb von 24 Stunden nach der Kernverschmelzung (§ 8 Abs. 1). Außerdem gilt jede Zelle, die man einem Embryo entnimmt, selber als Embryo, wenn sie sich selbst zu einem vollständigen Individuum entwickeln könnte (Totipotenz).

In § 1 wird aufgezählt, welche missbräuchlichen Anwendungen der Fortpflanzungsmedizin bestraft werden. Hierzu gehört beispielsweise die künstliche Befruchtung von Eizellen zu einem anderen Zweck, als eine Schwangerschaft herbeizuführen (§ 1 Abs. 1, Nr. 2).

Auch dürfen nicht mehr Eizellen befruchtet werden, als einer Frau in einem Zyklus übertragen werden können. Hiermit möchte der Gesetzgeber verhindern, dass höhergradige Mehrlingsschwangerschaften auftreten, die das Leben der Mutter und der Kinder gefährden würden. Die Zahl der Embryonen, die maximal übertragen werden dürfen, wird auf drei festgelegt (§ 1 Abs. 1 Nr. 3). Diese Regelung hat die Konsequenz, dass in Deutschland bei künstlichen Befruchtungen keine sog. „überzähligen Embryonen“ entstehen, da alle Embryonen auch immer eingepflanzt werden.

1.5 Meiose und Mechanismen der mütterlichen Aneuploidien

Fehler in der meiotischen Chromosomensegregation sind eine häufige Ursache für chromosomale Aneuploidien und Fehlgeburten. Es wird angenommen, dass 10-30% der Oozyten (bei Frauen über 40 Jahre mehr als 50-60%) aneuploid sind. Da das Erkennen dieser Störungen im Rahmen der Präimplantations- oder Präfertilisationsdiagnostik eine große Rolle spielt, soll kurz auf die Reifeteilungen eingegangen werden. In Abbildung 1.3 lässt sich deutlich erkennen, dass die Inzidenz einer Chromosomenfehlverteilung mit steigendem Alter der Frau zunimmt. Ein besonderer Anstieg der Aneuploidien ist ab dem 35. Lebensjahr zu verzeichnen. Für eine 35-jährige Frau besteht ein Risiko von 0,91% für das Auftreten von

autosomalen Trisomien (für Trisomie 21: 0,35%) und gonosomalen Aberrationen, während dieses Risiko bei einer 43-jährigen Frau mit 5,02% anzusetzen ist (für Trisomie 21: 3,24%; Praxiswissen Gynäkologie und Geburtshilfe, Thieme Verlag 2004).

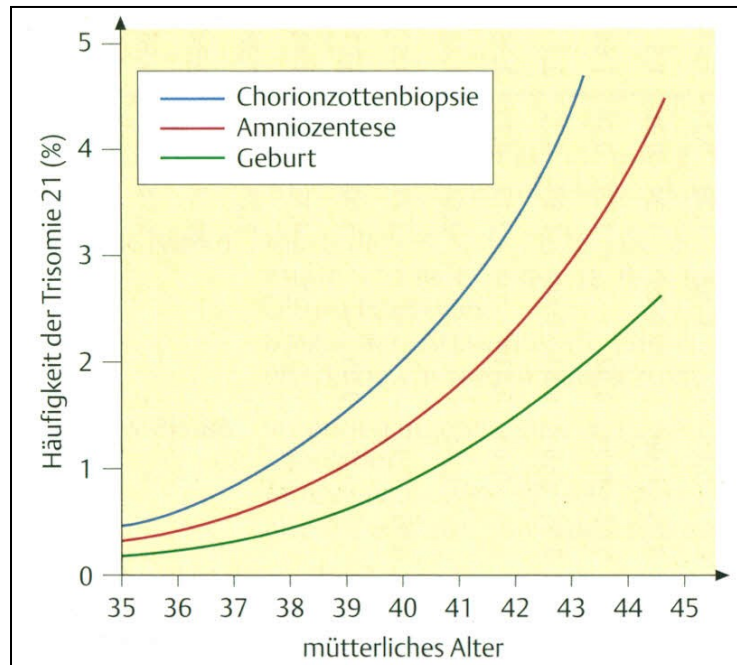


Abb. 1.3 Häufigkeit der Trisomie 21 zum Zeitpunkt der Chorionzottenbiopsie, Amniozentese und Geburt (aus: Taschenlehrbuch Humangenetik, Murken *et al.*, Thieme 2006)

Die Meiose ist eine spezielle Zellteilung, die nur in den reproduktiven Geweben stattfindet. Ziel der Meiose ist die Produktion haploider Gameten (Oozyten und Spermatozoen). Dies ist nötig, damit bei der Vereinigung der beiden Gameten eine Oozyte mit diploidem Chromosomensatz entsteht ($2n$). Ähnlich wie bei der Mitose erfolgt die DNA-Replikation während der S-Phase für die Erzeugung der Schwesterchromatiden. Während der 1. Reifeteilung, der eigentlichen Reduktionsteilung, werden die homologen Chromosomen über den synaptonemalen Komplex verbunden. In der Prophase I findet dann das meiotische crossing-over statt. In der Anaphase I ziehen die Spindelfasern die Chromosomen auseinander. Während sich bei der Mitose die Centromere der einzelnen Chromosomen teilen und die beiden Schwesterchromatiden auseinander gezogen werden, lösen sich bei der Meiose I die beiden homologen Chromosomen voneinander, die noch jeweils aus den beiden verknüpften Schwesterchromatiden bestehen. In der Meiose II werden dann die Schwesterchromatiden auseinander gezogen, so dass es am Ende der Meiose 4 Zellen gibt, die jeweils 23 Chromosomen mit einem einzigen Chromatid enthalten, Abbildung 1.4.

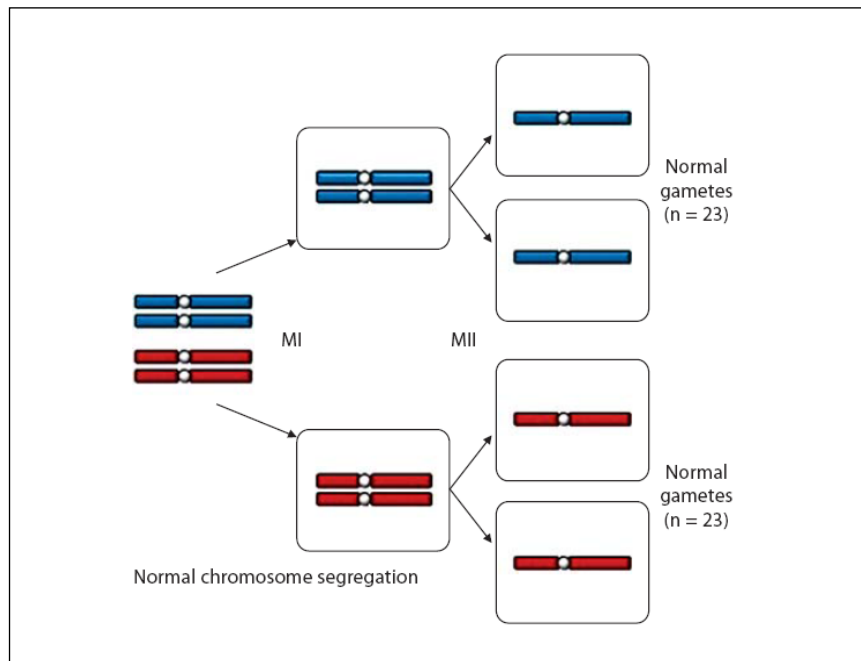


Abb. 1.4 Normale Chromosomensegregation während der Meiose (Fragouli *et al.*, 2011)

Im Gegensatz zur männlichen Meiose, die ein kontinuierlicher Prozess ist, sind Frauen mit einem kompletten Eizellensatz geboren. Bei der Bildung der Oozyten verharren die Eizellen ab der Embryonalperiode in der Prophase der Meiose I. Erst beim Eisprung wird die 1. Reifeteilung abgeschlossen, die 2. Reifeteilung wird begonnen und nach der Befruchtung beendet. Die lange Verweilzeit von bis zu 50 Jahren erklärt damit u.a. die kindlichen Chromosomenstörungen, die mit erhöhtem mütterlichen Alter assoziiert sind.

Chromosomenanomalien können während verschiedener Stadien der Oogenese entstehen: vor der Meiose, während der ersten mitotischen Teilung, während der Meiose I oder II. Untersuchungen bei Lebendgeborenen und an Abortmaterial haben gezeigt, dass bei der Trisomie 21 das zusätzliche Chromosom 21 meist von der Mutter stammt (90%) und dies zu 75% auf ein Non-Disjunction in der 1. Reifeteilung zurückzuführen ist. Für die Trisomie 16 werden zu fast 100% maternale Segregationsstörungen verantwortlich gemacht (Antonarakis *et al.*, 1993; Hassold *et al.*, 1995). Im Gegensatz zum Down Syndrom liegt bei der Trisomie 18 häufiger ein Non-Disjunction der 2. meiotischen Teilung bei der Mutter vor (Fisher *et al.*, 1995).

Beim Non-Disjunction von Chromosomen in der MI oder MII, werden die homologen Chromosomen nicht zu den entgegengesetzten Polen geführt, Abbildung 1.5., die entstandene Eizelle enthält ein zusätzliches Chromosom. Homologe Chromosomen haben ein höheres

Risiko für eine fehlerhafte Segregation, wenn sie nicht neu rekombiniert worden sind bzw. wenn nicht ausreichend Chiasmen gebildet worden sind, um eine fehlerfreie Segregation in die entgegengesetzten Pole zu ermöglichen (Delhanty, 2005; Hassold *et al.*, 2007). Abhängig vom Chromosom und der meiotischen Teilung kann die Positionierung der Chiasmen in Bezug auf das Zentromer (proximal/distal) auch zu einer fehlerhaften Segregation der homologen Chromosomen führen (Hassold *et al.*, 2007).

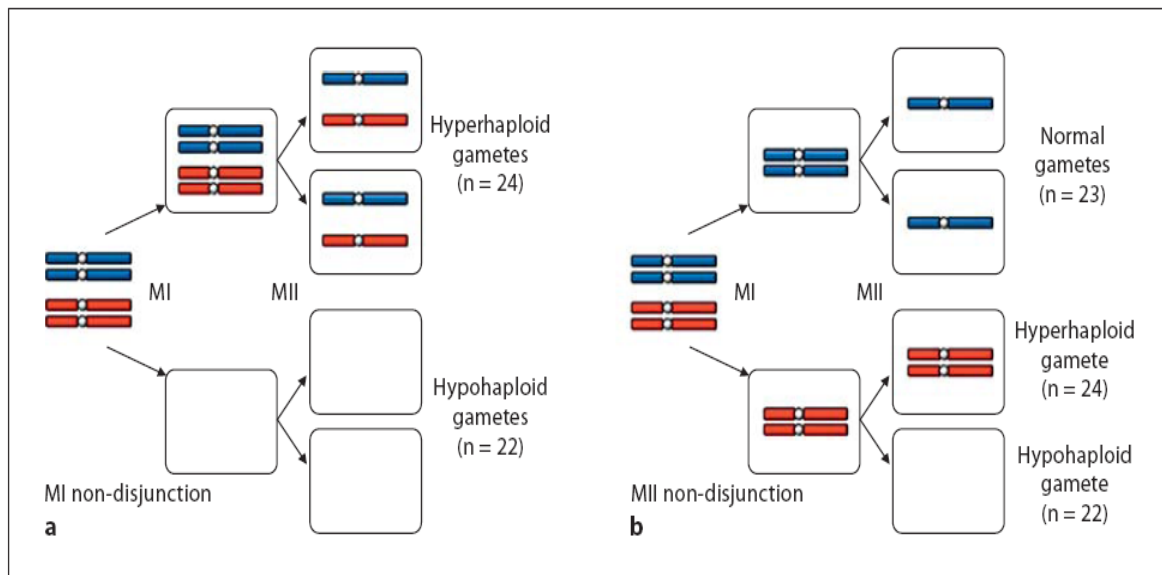


Abb. 1.5 Non-Disjunction in der Meiose I und II (Fragouli *et al.*, 2011)

Non-Disjunction kann während MI (a) und auch MII (b) erfolgen. Fehlerhafte Trennung von ganzen Chromosomen führt zur Bildung von Gameten mit Nullosonomie bzw. Disomie.

Ein weiterer Mechanismus, der zur mütterlichen Aneuploidie führt, wurde von Angell und Mitarbeitern (Angell, 1991; Angell *et al.*, 1994) vorgeschlagen. Nach vorzeitiger Teilung des Zentromers („predivision“) segregieren die Chromatiden zufällig und können möglicherweise in der Anaphase der MII zum gleichen Pol wandern. Abbildung 1.6 zeigt diesen Mechanismus.

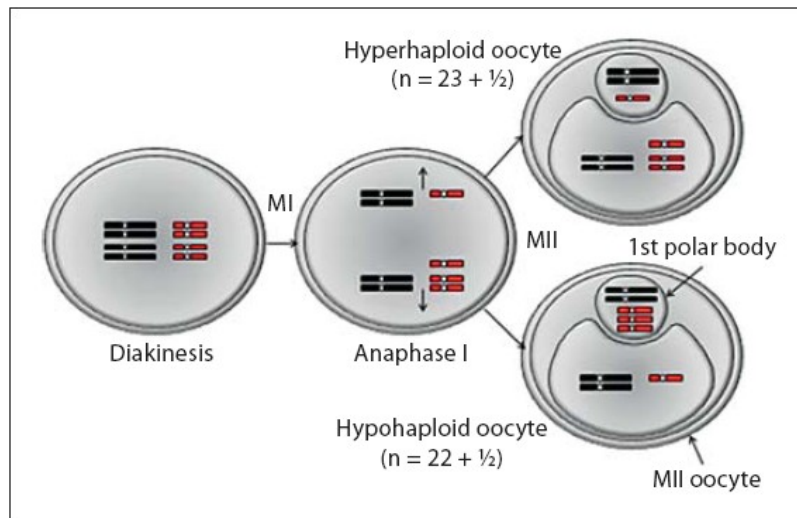


Abb. 1.6 Chromatid Predivision (Fragouli *et al.*, 2011)

Dieser Aneuploidie-verursachende Mechanismus kann während der MI erfolgen. Hierbei erfolgt die Trennung von einem Chromosom in seine Schwesterchromatiden vorzeitig. Diese werden anschließend nach dem Zufallsprinzip in der Anaphase I verteilt. Dies führt zu Keimzellen mit entweder einem zusätzlichen oder fehlenden Chromatid.

1.6 Methoden zur Beurteilung von Eizelle, Embryo und Fetus

1.6.1 Mikroskopische Beurteilung der Eizelle im Vorkernstadium

Mit Hilfe lichtmikroskopischer Untersuchungen lassen sich im Vorkernstadium anhand der Morphologie Aussagen zur Qualität der Eizelle treffen (Montag *et al.*, 2001).

Die prognostische Relevanz besteht in der erhöhten Wahrscheinlichkeit für eine unauffällige Embryonalentwicklung. Die morphologische Beurteilung erlaubt eine Auswahl als „ideal“ eingestufte Eizellen mit bestimmten Vorkernmustern und somit eine höhere Schwangerschaftsrate (Montag *et al.*, 2003). Aussagen zu eventuellen Chromosomenfehlverteilungen, wie Aneuploidien, können mit dieser Methode nicht getroffen werden.

1.6.2 Mikroskopische Beurteilung der Morphologie und Teilungsgeschwindigkeit des Embryos

Zur Beurteilung der Morphologie von Embryonen wird in manchen Kinderwunschzentren zusätzlich ein Punktesystem, ein sog. „Embryoscore“ genutzt, in das optische Kriterien einfließen. Die Symmetrie und die Intaktheit der zellulären Strukturen werden bewertet, ebenso die Teilungsrate (Montag *et al.*, 2003). Um die Schwangerschaftsrate zu erhöhen, werden Embryonen mit hohem Score transferiert.

1.6.3 Pränataldiagnostik

Mit Hilfe der Pränataldiagnostik können vom Zeitpunkt der Einnistung in die Gebärmutter bis zur Geburt kindliche Erkrankungen und Fehlbildungen festgestellt werden. Die Pränataldiagnostik bietet die Möglichkeit, Entwicklungsstörungen des Fetus zu erkennen, in einem begrenzten Rahmen zu therapieren bzw. sich frühzeitig gegen eine Austragung des Kindes zu entscheiden.

Im Rahmen der Pränataldiagnostik unterscheidet man „nicht-invasive“ von „invasiven“ Methoden.

1.6.3.1 Chorionzottenbiopsie (Mutterkuchenpunktion, chorionic villus sampling, CVS)

Eine Chorionzottenbiopsie wird in der Regel ab der 11. SSW durchgeführt. Beim fetalen Zottengewebe handelt es sich um zwei verschiedene Zellarten, mitotisch aktive Zytotrophoblasten und Fibroblasten. Diese Zellen liefern mit einer Direkt-Präparation (Zytotrophoblasten) bzw. Langzeitkultur (Fibroblasten) Ergebnisse zum chromosomalen Status. Das Risiko einer Fehlgeburt beträgt bei der CVS 0,5% bis 1%. Das Problem bei Chromosomenanalysen nach der Chorionzottenbiopsie sind evtl. Pseudomosaik durch spontan im extraembryonalen Gewebe entstandene Anomalien.

1.6.3.2 Amniozentese (Fruchtwasserpunktion, AC)

Ab der 15. SSW können fetale Zellen aus dem Fruchtwasser gewonnen werden. Nach ca. 2 Wochen stehen ausreichend Zellen für eine Chromosomenanalyse und DNA-Extraktion für molekulargenetische Untersuchungen zur Verfügung. Mit Hilfe eines FISH- oder PCR-basierten Schnelltests kann bereits innerhalb weniger Arbeitstage ein Ergebnis für die häufigsten numerischen Aberrationen (Chromosomen 21, 18, 13, aber auch X und Y) vorgelegt werden. Das Risiko einer Fehlgeburt beträgt ca. 0,5 %.

1.6.3.3 Chordozentese (Nabelschnurpunktion)

Ab der 20. SSW ist es möglich, fetales Blut zu untersuchen, hauptsächlich zur Abklärung kindlicher Infektionen bzw. unklarer zytogenetischer Befunde bei vorausgegangener Chorionzottenbiopsie oder Amniozentese. Die Komplikationsrate ist höher als bei der CVS und AC und wird mit ca. 2% angegeben.

1.6.3.4 Nicht-invasives Verfahren: Combined Test

Der Combined-Test kann nur zwischen der 11. und 14. Schwangerschaftswoche durchgeführt werden. Dieser Test erfasst eine Korrelationen zwischen mütterlichen Messparametern und statistischem Risiko für fetale Chromosomanomalien, speziell Trisomie 21. Verwendet werden die sonografische Bestimmung der fetalen Nackentransparenz (NT) und weitere

Werte aus dem mütterlichen Blut (PAPP-A; β -HCG) zur Errechnung des individuellen Risikos. Bei erhöhtem Risiko (Score < 1: 300) kann dies als Entscheidungshilfe für die schwangere Frau bzgl. der Inanspruchnahme einer invasiven Pränataldiagnostik dienen.

1.6.4 Präimplantationsdiagnostik (PID)

Unter dem Begriff Präimplantationsdiagnostik (PID) wird eine genetische Untersuchung am Embryo vor dem Embryotransfer verstanden (Handyside *et al.*, 1990). Ein bis zwei Blastomeren im 8 bis 12 Zellstadium des Embryos werden entnommen und mit PCR-basierten Ansätzen, FISH- oder Array-Plattformen untersucht (Handyside *et al.*, 1990; Le Caignec *et al.*, 2006). Alternativ bietet sich die Entnahme von Zellen im Blastozystenstadium an (Veiga *et al.*, 1997). Bei dieser Variante wird die innere Zellmasse geschont, allerdings ist die praktische Umsetzung oftmals problematisch (Strowitzi, 2003). Für die PID gibt es mehrere Indikationen, wie ein erhöhtes Risiko für Aneuploidien, Translokationen, monogene oder maligne Erkrankungen. Die medizinisch indizierte Geschlechterwahl wird hauptsächlich bei X- chromosomal verursachten Erbkrankheiten durchgeführt (Handyside *et al.*, 1990).

Ein Vorteil der PID ist, dass Rückschlüsse auf die Störungen des paternalen Erbgutes sowie eventuelle Fehlvorgänge während der Meiose und Zygotenbildung möglich sind (Gianaroli *et al.*, 1997). Als ein Nachteil der PID ist zu werten, dass bereits im Embryostadium ein Eingriff erfolgt, dessen Konsequenzen für die weitere Entwicklung momentan noch nicht eindeutig abzuschätzen sind (Mastenbroek *et al.*, 2007; auch Stellungnahme: Cohen und Grifo, 2007; Munne *et al.*, 2007; Montag und van der Ven, 2007).

Prinzipiell war die PID bis zum Jahr 2011 in Deutschland, Irland, Österreich und in der Schweiz gesetzlich verboten. Nach dem Embryonenschutzgesetz ist in Deutschland die genetische Untersuchung von totipotenten Embryonalzellen (Zellen bis zum 8-Zell-Stadium) untersagt, eine Diagnostik an Zellen im pluripotenten Stadium, dem Blastozystenstadium, ist nach §1, I Nr.2 und §2, I Nr.2 des EschG rein rechtlich erlaubt. Die Unantastbarkeit der Menschenwürde, die im Deutschen Grundgesetz (§1 Absatz 1 Satz 2) verankert ist, stand hier lange Zeit im Mittelpunkt politischer Diskussionen.

In Deutschland ist die PID nun seit Juli 2011 künftig eingeschränkt erlaubt. Im Bundestag stimmten Abgeordnete in namentlicher Abstimmung für den Gesetzentwurf 17/5451, der den Gentest an Embryonen zulassen will, wenn Paare eine Veranlagung für eine schwerwiegende Erbkrankheit in sich tragen oder bei ihnen mit einer Tot- oder Fehlgeburt zu rechnen ist.

In Österreich wird die bisherige Gesetzeslage momentan beibehalten auch wenn hier die PID seit vielen Jahren Gegenstand vieler Debatten ist. 2004 legte die Bioethikkommission eine

Empfehlung vor, die sich für die Weiterführung der bestehenden Gesetzeslage ausspricht. Die Bioethikkommission hat die Aufgabe, den Bundeskanzler „in allen gesellschaftlichen, naturwissenschaftlichen und rechtlichen Fragen aus ethischer Sicht (zu beraten), die sich im Zusammenhang mit der Entwicklung der Wissenschaften auf dem Gebiet der Humanmedizin und Humanbiologie ergeben.“

Als Gründe werden genannt (Zitat aus dem „Bericht der Bioethikkommission beim Bundeskanzleramt (Präimplantationsdiagnostik)“, Juli 2004):

- (1) Die PID stellt Frühstadien menschlichen Lebens zur Disposition und verstößt damit gegen das Instrumentalisierungsverbot.
- (2) Die Entscheidungssituation in einem Schwangerschaftskonflikt ist mit der Entscheidungssituation im Falle einer PID nicht vergleichbar.
- (3) Eine Begrenzung der PID sowohl in Form einer Generalklausel als auch eines Indikationskatalogs ist, wie die analoge Erfahrung mit der PND zeigt, dem sachimmanenten Ausweitungsdruck nicht gewachsen.
- (4) Mit der Zulassung beider Formen der Begrenzung müsste der Gesetzgeber um der Rechtsgleichheit willen die extrakorporale Befruchtung allen Paaren zugänglich machen. Damit erhöhe sich das Folgeproblem der Kapazität und der Erhöhung finanzieller Leistungen durch die öffentliche Hand.
- (5) Mit der Zulassung der PID macht der Gesetzgeber Stigmatisierungen öffentlich, indem er die Verhinderung der Geburt von Menschen mit einer bestimmten genetischen Belastung für rechtmäßig erklärt.

1.6.5 Polkörperdiagnostik (PKD)

Die PKD wird zum indirekten Nachweis von numerischen und strukturellen Chromosomenstörungen in der menschlichen Eizelle eingesetzt. Eine Erfassung monogener Erkrankungsbilder ist technisch anspruchsvoll und bleibt momentan europaweit nur hochspezialisierten Zentren vorbehalten.

Die Technik der PKD im Rahmen einer assistierten Reproduktion wurde erstmals im Jahre 1990 von der Arbeitsgruppe um Yuri Verlinsky in Chicago vorgestellt und als „preconception genetic diagnosis“ formuliert (Verlinsky *et al.*, 1990). Die erste Geburt nach einer PKD in Deutschland wurde 2002 von der Bonner Universitätsklinik veröffentlicht (van der Ven *et al.*, 2002). Seit dieser Zeit wurden internationale Indikationen erarbeitet, wann eine PKD angeboten werden sollte. Kriterien sind der Nachweis von Kopienzahlveränderungen (Aneuploidien) bei rezidivierenden Spontanaborten, mehrere frustrane IVF-Versuche,

strukturelle Chromosomenstörungen (Translokationen), erhöhtes maternales Alter (über 35 Jahre) und monogene Erkrankungen. In Deutschland und Österreich wird die PKD mittlerweile in mehreren Zentren angeboten.

Etabliert wurde die PKD v.a. in Ländern, in denen die Präimplantationsdiagnostik verboten war, wie z.B. Deutschland, Österreich, Schweiz sowie Italien und stellt damit eine interessante Alternative zur PID dar. Um mit dem ESchG konform zu gehen, wird die PKD in Deutschland in einem engen Zeitfenster durchgeführt: nach der ICSI und vor dem Verschmelzen der Vorkerne (ca. 20-22 Stunden).

Die PKD wird als Sonderform der sog. „Präfertilisationsdiagnostik“ definiert. Die Präfertilisationsdiagnostik beschreibt eine Methode, Veränderungen in der Zygote zu erkennen, also Hinweise zu erhalten, ob und welche Zygote sich für einen Transfer eignet (Montag *et al.*, 2002). Damit ist die Untersuchung der Polkörper eine rechtlich vertretbare Untersuchung zum indirekten Nachweis der genomischen Integrität der Eizelle.

Die Diagnose erfolgt im Prinzip über den ersten und- nach Penetration des Spermiums- zweiten Polkörper. Beide Polkörper sind für die weitere Entwicklung des Embryos unerheblich (Montag *et al.*, 2002).

Das Prinzip der Polkörperentstehung soll anhand von Abbildung 1.7 erläutert werden.

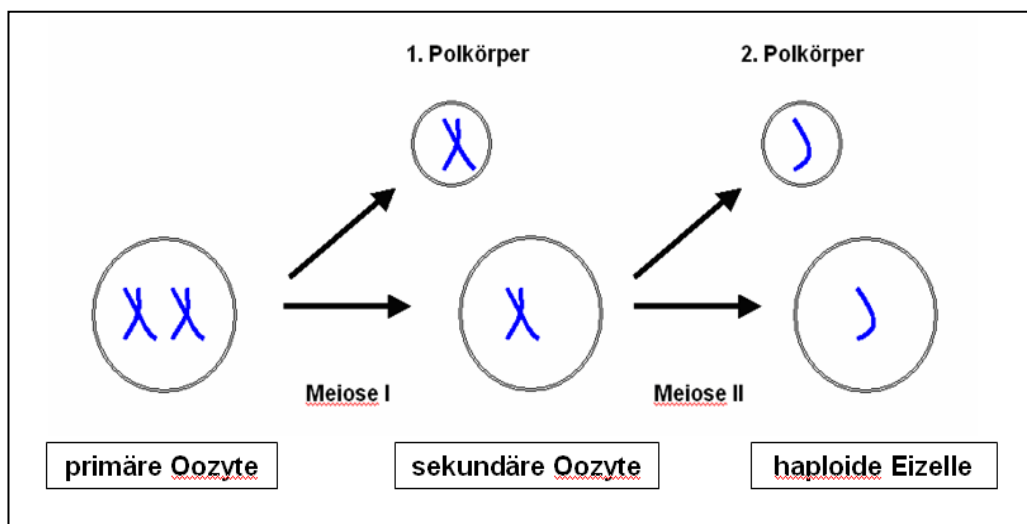


Abb. 1.7 Prinzip der Polkörperentstehung

Nach der ersten meiotischen Teilung entsteht aus der primären Oozyte eine sekundäre Oozyte und der sog. 1. Polkörper, der aus jeweils 23 Chromosomen mit je 2 Chromosomenfäden (Chromatiden), besteht. Aus der 2. meiotischen Teilung geht der 2. Polkörper hervor, in diesem Stadium haben Eizelle und 2. Polkörper jeweils 23 Chromosomen mit einem

Chromatid. Von daher ist der Chromosomenstatus der Polkörper ein „Spiegelbild“ der Chromosomen der Eizelle. Weist die Eizelle einen Verlust oder Zugewinn an Erbinformation auf, wird dies umgekehrt als Zugewinn bzw. Verlust im Polkörper reflektiert. Damit ist es möglich, chromosomal veränderte Eizellen, die nach Befruchtung eine Monosomie bzw. Trisomie aufweisen, von der Implantation auszuschließen. In diesen Fällen kann die PKD zur Verbesserung der Schwangerschafts- und Geburtenrate bzw. zur Minimierung der Abortrate führen (Verlinsky *et al.*, 1996, 1998; van der Ven *et al.*, 2008).

Laut Literatur treten 77,1% dieser Chromosomenfehlverteilungen in der Meiose I auf, 22,9% in der Meiose II (Verlinsky und Kuliev, 1996). Bei der Meiose II lassen sich häufiger Chromatidfehlverteilungen, als komplette Chromosomenfehlverteilungen finden (Chromatid/Chromosomenfehlerrate 9:1) (Kuliev *et al.*, 2003a).

Technisch wird die PKD meist im Rahmen einer ICSI durchgeführt. Unter partieller Eröffnung der Zona pellucida, die häufig mit einem Laserimpuls erfolgt, werden die beiden Polkörper mikromanipulatorisch entnommen und in geeignete Reaktionsgefäße oder auf Objektträger überführt. Bei der sog. „Two step biopsy“ erfolgt die Entfernung des ersten Polkörpers aus der unbefruchteten Eizelle, der zweite Polkörper wird aus der Zygote entnommen. Die „One step biopsy“ beschreibt die simultane Entfernung beider Polkörper aus der Zygote. Auf die bisher angewandten Methoden der Polkörperdiagnostik, die „Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung“ (FISH) und die „Vergleichende Genomische Hybridisierung“ (CGH), soll im nachfolgenden eingegangen werden.

1.7 Techniken der Polkörperdiagnostik

1.7.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde ab Ende der 1980er Jahre als Verbindung zwischen klassischer Zytogenetik und molekularbiologischen Technologien entwickelt. Sie bietet die Möglichkeit, Chromosomen und Chromosomensegmente mit höherer Auflösung - im Vergleich zur konventionellen Karyotypisierung - darzustellen. Mit der FISH können beispielsweise Deletionen mit einer Größe im Kilobasen-Bereich nachgewiesen werden. Ein großer Vorteil besteht darin, dass mit der FISH-Technik Chromosomen in allen Phasen des Zellzyklus erfasst werden können, Untersuchungen in der Metaphase, wie in der Interphase sind durchführbar.

Das Prinzip der FISH basiert darauf, dass fluoreszenzmarkierte einzelsträngige DNA-Sonden spezifisch an komplementäre Chromosomenabschnitte binden, was als „Hybridisierung“ bezeichnet wird und „in situ“, direkt auf dem Chromosomen- bzw. Zellkernpräparat, erfolgt.

Die fluoreszierenden chromosomalen Regionen werden mit Hilfe eines Mikroskops nachgewiesen, das mit spezifischen Filtern ausgerüstet ist.

Abbildung 1.8 zeigt die Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (Quelle: National Human Genome Research Institute, NHGRI).

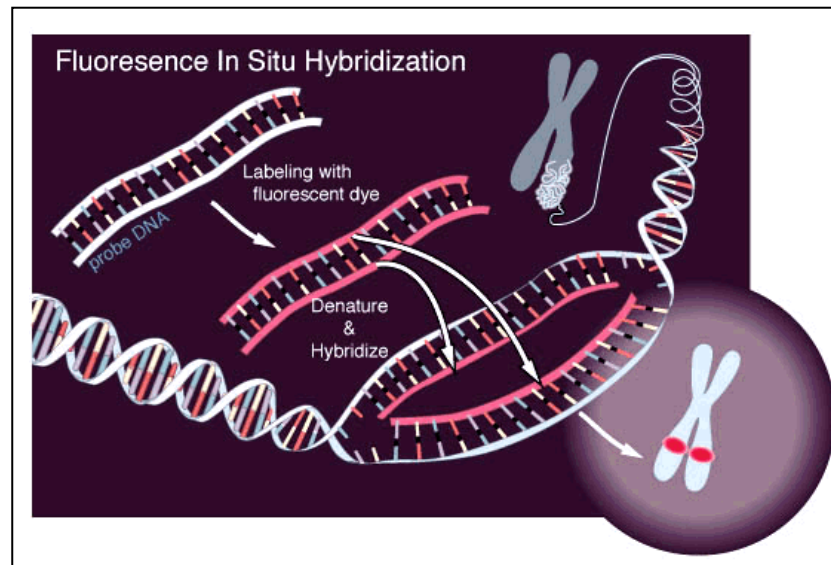


Abb. 1.8 Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Mittlerweile steht eine Vielzahl von kommerziellen Sonden und eine ganze Reihe von Fluorochromen zur Verfügung, womit das Potenzial der Chromosomendiagnostik erheblich verbessert werden konnte und sich die Möglichkeit eröffnete, mehrere genomische Abschnitte simultan zu untersuchen. Gerade dieser Ansatz spielte in der Polkörperdiagnostik eine wesentliche Rolle. Seit der Erstbeschreibung der PKD, war die Technik der FISH die Standardmethode zum Nachweis von numerischen und strukturellen Chromosomenveränderungen in Polkörpern. Es wurden FISH-Sonden gewählt, die die häufigsten Aneuploidien abdecken sollten. Dies sind Veränderungen der Chromosomen 13, 18 und 21, entsprechend den lebensfähigen Trisomien, sowie die Chromosomen 16 und 22, die nach Untersuchungen im Abortmaterial häufig numerische Veränderungen zeigen.

Ziel der Polkörperdiagnostik ist es, eine Aussage über möglichst viele genomische Regionen treffen zu können, um das Risiko von Chromosomenfehlverteilungen in der Eizelle sichtbar zu machen. Dieses Panel aus 5 Sonden zahlenmäßig zu erweitern ist nur bedingt möglich, da einerseits nur eine limitierte Anzahl von Fluoreszenzfiltern für Mikroskope zur Verfügung stehen, andererseits auch die Einführung zusätzlicher Artefakte bei der FISH diskutiert wurde. Die Durchführung einer zweiten Hybridisierung auf demselben Präparat ließ sich aufgrund der zeitlichen Vorgaben (innerhalb 20-22 Stunden) nur schwer in die Praxis umsetzen.

Schematisch ist eine FISH Untersuchung am 1. und 2. Polkörper in Abbildung 1.9 dargestellt. Für das Chromosom 21 zeigen sich im 1. Polkörper, entsprechend der Chromatidzahl, zwei grüne Signale, während im 2. Polkörper nur ein Signal detektiert wird. Chromosom 13 wird zeitgleich mit roten Signalen dargestellt. Insgesamt finden sich pro chromosomaler Region also drei Signale, Abweichungen von dieser Zahl lassen auf die numerische Veränderungen in der korrespondierenden Eizelle zurückschließen.

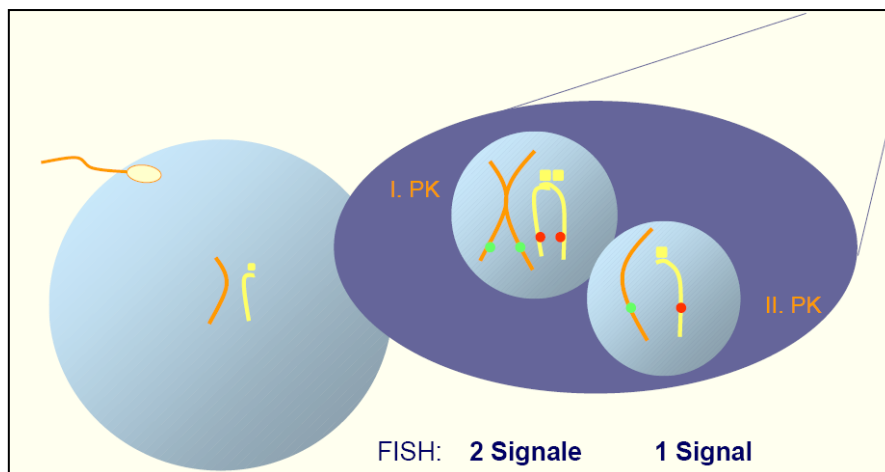


Abb. 1.9 Polkörper-FISH (nach T. Buchholz, Polkörperzentrum München-Planegg)

Zwar ist die Polkörperdiagnostik mit der FISH technisch ohne großen Aufwand zu betreiben, die Chromatiden sind, theoretisch, sichtbar und zu unterscheiden, doch gibt es essentielle Nachteile. Aufgrund der Sondenwahl und Auflösungsgrenzen, d.h. nur eine Auswahl von Chromosomen wird untersucht, besteht ein limitierter Informationsgewinn. Ferner ist die Polkörper-FISH häufig artefaktanfällig, die Reproduzierfähigkeit muss daher hinterfragt werden. Aufgrund dieser Limitationen wurde in den letzten Jahren zunehmend die Technik der Vergleichenden Genomischen Hybridisierung (CGH) favorisiert.

1.7.2 Vergleichende Genomische Hybridisierung (CGH)

Die vergleichende genomische Hybridisierung („comparative genomic hybridization“) ist ein etabliertes Verfahren, das die Identifizierung von chromosomalen Zugewinnen und/oder Verlusten innerhalb eines Genoms, in diesem Fall also das vollständige Genom der Polkörper, erlaubt. Damit kann die genaue Anzahl aller Chromosomen oder aller chromosomalen Regionen bestimmt werden.

Im Prinzip korrelieren nach einer Hybridisierung die Fluoreszenzintensitäten mit der Zahl der gebundenen Sondenfragmente. Mit geeigneten Fluoreszenzmikroskopen und

Auswertungssoftware lassen sich diese Intensitäten quantifizieren und erlauben einen Rückschluss, wo im (Polkörper-) Genom Verluste („losses“) oder Zugewinne („gains“) auftreten. Die Technik der CGH ist in Abbildung 1.10 dargestellt.

Man unterscheidet die Metaphasen-CGH und die Array-CGH. Die zu testende DNA wird bei beiden Verfahren mit einem Fluoreszenzfarbstoff (hier grün) markiert, während in die Referenz-DNA z.B. rot fluoreszierende Farbstoffe eingebaut werden. Bei der Metaphasen-CGH werden die beiden genomischen Sonden kompetitiv auf fixierte Metaphasen-Chromosomen hybridisiert. Bei der Array-CGH wird als Matrize ein Microarray verwendet, auf dem die genomische DNA nicht in Form von ganzen Chromosomen, sondern als definierte Fragmente (BACs oder Oligonukleotide), aufgebracht ist. Die Anzahl dieser Fragmente definiert das Auflösungsvermögen, mittlerweile lassen sich damit Veränderungen identifizieren, die kleiner als 100 kb sind.

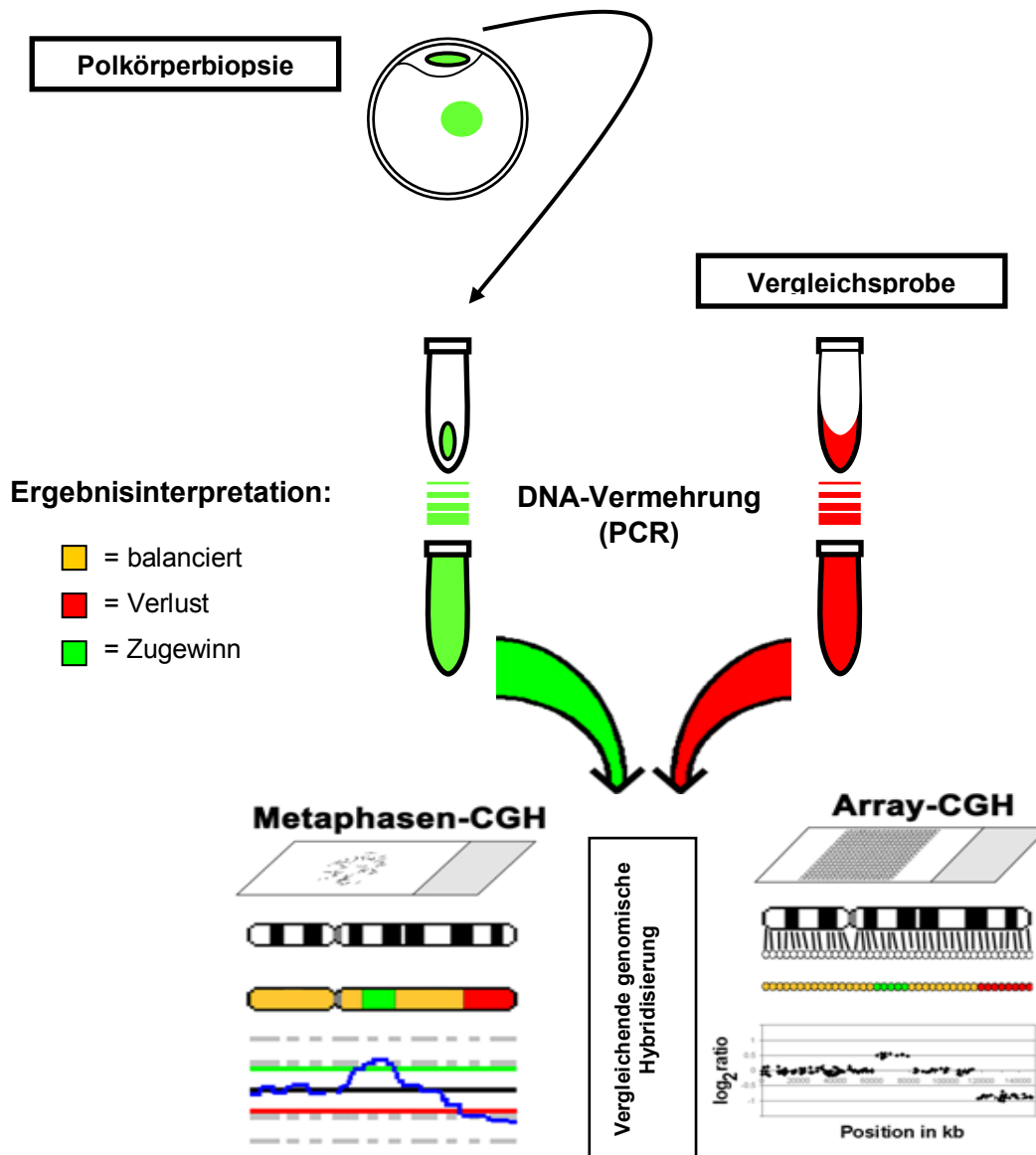


Abb. 1.10 Vergleichende Genomische Hybridisierung (CGH)

Für jedes Chromosom ist es entsprechend des CGH-Profiles möglich, Aussagen bzgl. Zugewinnen und Verlusten hinsichtlich des genomischen Materials zu treffen. Zur Interpretation, ob dieses Profil einen Zugewinn oder Verlust von Chromosomenmaterial zeigt, werden Schwellwerte verwendet, die neben jedem Chromosom mit einer roten (für Verlust) und grünen (Gewinn-) Linie angegeben sind. Die schwarze Linie zwischen der roten und grünen Linie entspricht einem balancierten Verhältnis, also keinem Verlust bzw. Gewinn. Wenn die blaue Linie die Schwellwerte für Gewinn bzw. Verlust überschreitet, liegt für die jeweilige chromosomale Region, bzw. für das Chromosom eine abweichende Anzahl vor. In diesem Fall ist davon auszugehen, dass die zugehörige Eizelle auch eine abweichende

Chromosomenzahl aufweist. Zeigen sich keine Auffälligkeiten, ist das CGH-Profil „balanciert“.

Bei dieser Methode handelt es sich nicht um eine Untersuchung des Embryos. Die Untersuchung der Polkörper lässt nur einen Rückschluss auf die Chromosomen des mütterlichen Anteils am Embryo zu. Aussagen zum väterlichen chromosomalen Anteil sind mit dieser Methode nicht möglich. Mit der CGH werden nur numerische, nicht aber balancierte Chromosomenumbauten erkannt. Die Untersuchung kann entweder auf Chromosomenpräparationen oder auf Arrays durchgeführt werden. Numerische Veränderungen, die kleiner als 10 Mb sind, liegen an der Auflösungsgrenze und können deshalb einer sicheren Identifizierung entgehen.

Die Polkörper-CGH weist gegenüber der Interphase-FISH-Untersuchung deutliche Vorteile auf, weil mit dem letztgenannten Verfahren nur die Kopienzahl weniger (in der Regel 5) Chromosomen bestimmt wird, während die Polkörper-CGH Informationen über die Anzahl aller 23 Chromosomen liefert. Ein Nachteil der CGH ist, dass balancierte Veränderungen nicht detektiert werden können.

Die Metaphasen-CGH wurde von einigen Autoren als Screening Methode postuliert, diese konnte sich bisher u.a. aufgrund der zeitintensiven Auswertung, bisher nicht durchsetzen (Wells, D. *et al.*, 2002). Viel mehr Hoffnung wird daher auf die Array-CGH gelegt, mit deren Hilfe reproduzierbare und schnellere Ergebnisse erzielt werden können (Le Caignec, C. *et al.* 2006). Ob die Array-CGH sich im Rahmen der Polkörperdiagnostik für eine „High-Throughput“ Analyse eignet soll u.a. in der vorliegenden Arbeit überprüft werden.

1.8 Polkörperdiagnostik bei Translokationen

Die Polkörperdiagnostik kann nicht nur bei numerischen, sondern auch bei strukturellen Chromosomenstörungen angewandt werden. Hierbei unterscheidet man zwei Haupttypen, die reziproken Translokationen und die Robertsonschen Translokationen.

Bei den reziproken Translokationen handelt es sich um den Austausch von chromosomalem Material zwischen zwei Chromosomen. Meistens sind hierbei autosomale Chromosomen involviert, gonosomale, sowie komplexe Translokationen können, wenn auch seltener, ebenfalls auftreten. Der Austausch von Chromosomenabschnitten ohne Verlust bzw. Zugewinn führt in der Regel zu einer normalen Entwicklung, Symptome können allerdings auftreten, wenn der Bruchpunkt die Integrität eines Gens zerstört. Träger reziproker Translokationen können aber auch Gameten mit unbalanciertem Chromosomensatz bilden und damit kausal für unerfüllten Kinderwunsch bzw. habituelle Aborte sein. V.a. in

Abhängigkeit von der Größe des translozierten Fragments und den an der Translokation beteiligten Chromosomen, können Kinder mit unbalanciertem Chromosomensatz Entwicklungsstörungen und Fehlbildungen unterschiedlicher Schweregrade aufweisen. Balancierte reziproke Translokationen sind häufig, die Inzidenz wird mit 1:500 angegeben.

Bei der Robertsonschen Translokation fusionieren zwei akrozentrische Chromosomen (Chromosomen 13, 14, 15, 21 oder 22), meist unter Bildung zweier Zentromere. Dies führt zu einer Reduktion der Chromosomenzahl auf 45. Da der Verlust der p-Arme der akrozentrischen Chromosomen kompensierbar ist, zählt die Robertsonsche Translokation zu den balancierten Translokationen. Die Häufigkeit wird mit 1:1000 angegeben, wobei Translokationen zwischen den Chromosomen 13 und 14 bzw. 14 und 21 für über 80% aller Robertsonschen Translokationen verantwortlich sind. Das Risiko eines Trägers einer Robertsonschen Translokation für die Geburt eines Kindes mit unbalanciertem Chromosomensatz hängt zum einen von den beteiligten Chromosomen, zum anderen vom Geschlecht des Überträgers ab. Ist z.B. der Vater Translokationsträger einer t(14q21q), beträgt das Risiko für ein Kind mit Down-Syndrom ca. 1%, besitzt die Mutter diese Aberration, wird ein Risiko von 10% angegeben.

Entscheidend für die Chromosomenzusammensetzung der Gameten ist die Verteilung der Chromosomen in den Reifeteilungen. Bei balanciert translozierten Chromosomen entstehen sog. Quadrivalente. Es können 16 mögliche Segregationen entstehen, wobei nur in der alternierenden Segregation ein normaler oder balancierter Karyotyp entsteht, Abbildung 1.11 gibt dies bildlich wieder. Die übrigen Verteilungen gehen mit einem Verlust bzw. Zugewinn von Chromosomenmaterial einher und führen nach der Befruchtung zu Embryonen mit unbalanciertem Erbgut. Insgesamt stellen die unbalancierten Chromosomenkonstellationen wohl 50% der Verteilungen dar, wobei die Segregationsstörung „Adjacent 1“ den Hauptanteil einnimmt, bei Eizellen und Embryonen weiblicher Translokationsträgerinnen stellt der 3:1 Modus die zweithäufigste Veränderung dar (Buchholz *et al.*, 2004).

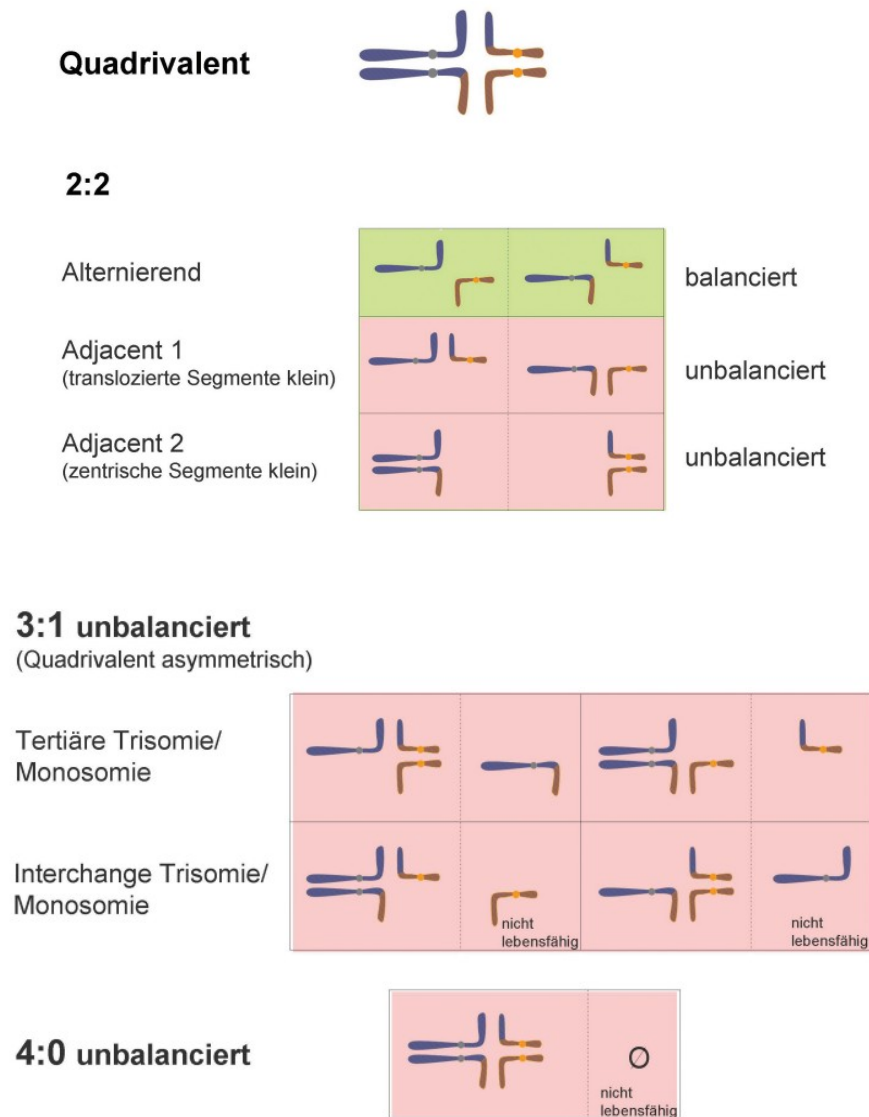


Abb. 1.11 Segregationsmöglichkeiten bei reziproken Translokationen (Buchholz *et al.*, Medizinische Genetik, 16, 2004, 416-421)

Bei der Robertsonschen Translokation bilden die homologen Chromosomen in der Prophase der Meiose I sog. Trivalente, ebenfalls mit den Möglichkeiten der alternierenden und Adjacent-Segregation. Bei der Adjacent-Segregation resultiert nach der Befruchtung daraus für die Nachkommen ein unbalancierter Karyotyp mit Trisomien bzw. Monosomien.

Von Munné *et al.* (Munné *et al.*, 2000) wurden Schwangerschaftsraten von 22% bei Frauen mit reziproken Translokationen (9 Fälle) nach Polkörperdiagnostik berichtet. Nach einer Polkörperdiagnostik wurden 6 von 10 Frauen mit einer Robertsonschen Translokation schwanger. Im Jahr 2002 fasste die ESHRE (European Society of Human Reproduction and

Embryology) die bis dahin vorliegenden Daten der Schwangerschaftsraten bei Translokationsträgerinnen erstmals zusammen. Für die reziproke Translokation wurde eine Schwangerschaftsrate von 23% (73 Fälle gesamt), für die Robertsonsche Translokation von 29% (38 Fälle gesamt) angegeben (Buchholz *et al.*, 2004).

Die Vermeidung einer Fehlgeburt kann für viele ratsuchenden Paare eine Alternative darstellen. Nach einer Polkörperdiagnostik wurde von Munné *et al.* eine Reduktion der Abortrate von 92% auf 13% im Rahmen einer Translokationsdiagnostik beschrieben (Munné *et al.*, 2000).

Festgehalten werden muss an dieser Stelle, dass die Zahlen und Erfahrungen zur Polkörperdiagnostik bei Translokationsträgern immer noch gering sind und vornehmlich auf Untersuchungen mit der FISH-Technik, unter oben angegebenen Limitationen, beruhen.

1.9 Polkörperdiagnostik für monogene Erkrankungen

Im Prinzip kann eine Polkörperdiagnostik für monogen bedingte Erkrankungen etabliert werden. Voraussetzung ist hierfür, dass entweder die Mutation oder das Wildtyp Allel bzw. die chromosomale Region in der Umgebung der Mutation einer solchen Untersuchung zur Verfügung steht. Abhängig davon wird eine direkte oder indirekte Diagnostik gewählt. Zum direkten Nachweis einer Mutation gibt es, in Abhängigkeit von der familiären Veränderung, verschiedene Verfahren, z.B. der direkte Nachweis einer Längendifferenz des fluoreszenzmarkierten PCR-Produktes einer kleineren Deletion oder Insertion (z.B. bei der Mukoviszidose) oder einer Repeatexpansion (z.B. bei der Chorea Huntington). Der indirekte Nachweis einer Mutation erfolgt über Heteroduplex-Banden, SSCP oder DHPLC (Hehr *et al.*, 2004). Möglich ist auch die sog. Mini-Sequenzierung, hierfür steht von der Firma Applied Biosystems ein SNaP Shot Kit zur Verfügung, der nach Optimierung eine Einzelzellanalyse erlaubt (Bermudez *et al.*, 2003). Bei monogenen Erkrankungen wird zunächst ein familienspezifisches Testsystem etabliert. Für die Diagnostik kommt der simultane Nachweis der Mutation mit jeweils zwei eng gekoppelten, für die Familie informativen, Markern zum Einsatz (kombinierte direkte und indirekte Diagnostik) (Hehr *et al.*, 2004). Da diese Techniken sehr zeit- und kostenintensiv sind, bleibt die Diagnostik monogener Erkrankungen bei Polkörpern bisher nur wenigen spezialisierten Laboren vorbehalten.

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Die Untersuchung der Polkörper als Surrogatmarker für die genomische Integrität der Eizelle ist ein viel versprechendes Verfahren, um im Rahmen der assistierten Reproduktion essentielle Informationen zu gewinnen. Mit diesen Untersuchungsergebnissen ist es möglich, numerisch und strukturell unbalancierte Eizellen von einem Transfer auszuschließen, um damit die Chance für eine erfolgreiche Befruchtung zu steigern bzw. das Risiko für einen Abort zu vermindern. Die bisherigen - und auch kontrovers diskutierten - Daten zum Nutzen der Polkörperuntersuchung stützen sich vornehmlich auf die FISH-Technik, auf deren Limitationen bereits eingegangen wurde. Erst seit kurzer Zeit werden Verfahren erarbeitet, die das Prinzip der CGH verwenden bzw. diese Technik auf Microarray Plattformen erweitern.

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Etablierung einer Methode zur hochauflösenden gesamt-genomischen Analyse von Polkörpern. In Zusammenarbeit mit österreichischen Kinderwunschzentren sollte anschließend dieses Protokolls für die Untersuchung von Polkörpern im Rahmen der assistierten Reproduktion angewandt werden.

Die Aufgabenstellung der Arbeit gliederte sich in mehrere Teilbereiche. Erstens mussten bestehende Verfahren zur Amplifikation von genomischer DNA aus Einzelzellen soweit getestet und optimiert werden, dass eine fehlerfreie Vervielfältigung des Genoms für eine weiterführende umfassende Untersuchung möglich wurde. Dazu musste zweitens eine geeignete Plattform ausgewählt werden, die im Wesentlichen auf der Technik der Vergleichenden Genomischen Hybridisierung beruhte. Hierfür wurde die Metaphasen-CGH mit unterschiedlichen „custom-made“ Microarrays verglichen und die Hybridisierungsbedingungen angepasst. Drittens sollte ein Protokoll erarbeitet werden, dass es ermöglichte, eine gesamt-genomische Hochdurchsatzanalyse für Polkörper anzubieten, die auch wirtschaftlich interessant ist. Ferner sollte die Technik dazu geeignet sein, numerische Veränderungen zu erkennen sowie bei strukturellen Chromosomenstörungen wie der reziproken Translokation und der Robertsonschen Translokation angewandt zu werden. Abschließend sollten die etablierten Techniken Frauen mit Kinderwunsch im Rahmen der IVF/ICSI angeboten und das Auftreten von numerischen und strukturellen Veränderungen beschrieben werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zuweiser

Die Methodenetablierung der hochauflösenden Polkörperanalyse erfolgte am Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz, hierzu liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz vor. Für die Polkörperdiagnostik wurde nach Aufklärung bei allen Frauen eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt.

Als österreichweite Zuweiser zur Polkörperdiagnostik fungierten drei Kinderwunschzentren.

2.2 Polkörperbiopsie

Die Entnahme der Polkörper erfolgt unter sterilen Bedingungen in den Laboren der Kinderwunschzentren. Vor der Polkörperbiopsie werden die Eizellen bei 37°C und 5- 6% CO₂ inkubiert. Die Petrischale für die Polkörperbiopsie wird mindestens 2 Stunden vorher vorbereitet. Auf die Petrischale werden 8 µl Polyvinylpyrrolidon (PVP), 3 µl „Flushing Buffer“ für jede Eizelle und 2 µl „Flushing Buffer“ für den korrespondierenden Polkörper genau positioniert (siehe Abb. 2.1). Dieser Flushing Buffer enthält nicht-essentielle Aminosäuren, die die Homöostase der Eizelle garantieren. Dann werden die Tropfen mit 3 ml Paraffin Öl überschichtet.

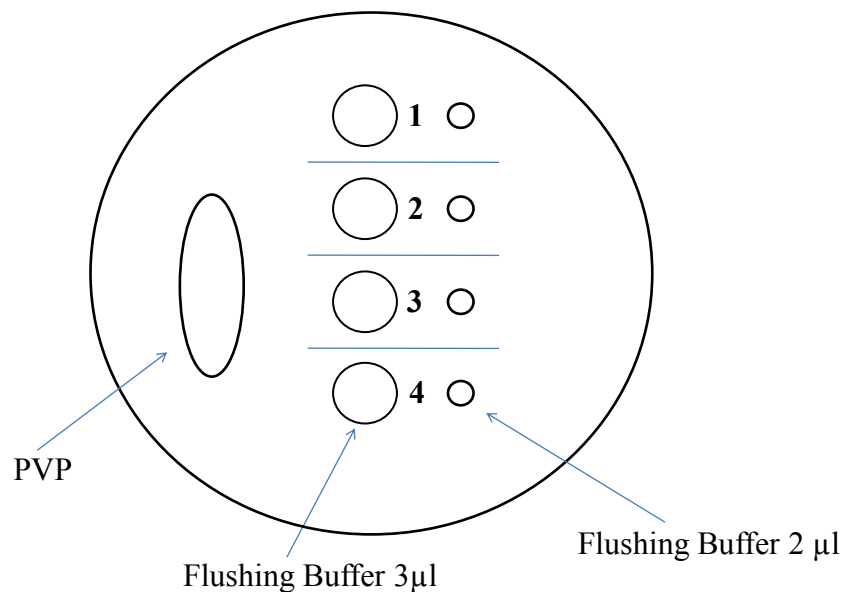


Abb. 2.1 Vorbereitung einer Petrischale für die Polkörperbiopsie

Für jeden zu analysierenden Polkörper wird ein 200 µl Eppendorf PCR Tube vorbereitet und mit 2 µl Proteinase K Mix (für die Linker-Adapter PCR) oder mit 4,5 µl nukleasefreiem Wasser (für die Amplifikation mit dem Sigma-Aldrich Kit #WGA4) steril befüllt. Die Tubes werden bei 4°C bis zur Biopsie gelagert. Wann die Polkörperpunktion erfolgt, hängt vom Reifegrad der Eizellen ab:

Wenn mehr als 50% der Eizellen reif sind (in Meiose II bzw. Spindelapparat nicht in Telophase), werden die Eizellen vor der zweizeitigen Polkörperbiopsie bzw. der ICSI 2 bis 4 Stunden inkubiert. Wenn sich weniger als 50% der Eizellen in der Meiose II oder in der Telophase befinden, werden die Eizellen für maximal 6 Stunden weiter inkubiert und dann erfolgen Polkörperbiopsie und ICSI.

Die Polkörperbiopsie selbst wird mittels eines Lasermikroskops durchgeführt, um die Zona pellucida in einem 30 µm eng umschriebenen Bereich innerhalb von 10 Millisekunden zu eröffnen (Montag *et al.*, 1998).

Nachdem die Eizelle in einen „Flushing Buffer“ Tropfen überführt worden ist (siehe Abb. 2.1), wird die Zona pellucida, nach optimaler Fixierung der Eizelle durch eine Haltepipette, mittels eines OCTAX-Laserstrahls (OCTAX-Laser Shot System), gezielt über dem Polkörper beschossen. Nach dem Eröffnen der Zona pellucida werden die Polkörper einzeln oder zusammen mit einer Biopsie-Pipette (prä-äquilibriert mit 15 µM PVP) entnommen. Der biopsierte Polkörper wird in seinem korrespondierenden „Flushing Buffer“ Tropfen vorsichtig überführt und mit einer 75 µm MidAtlantic Kapillare in einem Volumen von 1 µl in das vorbereitete Eppendorf Tube pipettiert.

Die Proben werden per Kurierdienst verschickt. Hierbei ist auf eine ausreichende Temperaturstabilität sowie auf einen schonenden Transport zu achten. Mit der Amplifikation der Polkörper sollte spätestens nach 36 h begonnen werden.

2.3 Amplifikation der Polkörper-DNA

Für die Amplifikation der Polkörper werden die Linker-Adapter PCR oder eine Kit-basierte Methode verwendet, die im Folgenden detailliert angeführt werden.

2.3.1 Linker-Adapter PCR

2 µl Proteinase K Mix (0,2 µl OnePhorAll plus Puffer, 0,13 µl Igepal 10%, 0,13 µl Tween 10%, 0,26 µl Proteinase K, 1,28 µl nukleasefreies Wasser) werden in ein 200 µl Eppendorf Tube vorgelegt, dazu wird der entsprechende Polkörper in einem Volumen von 1 µl pipettiert. Der Proteinase K Verdau der DNA erfolgt 10 Stunden bei 42°C, bei 80°C für 10 min wird das Enzym denaturiert.

Die Linker-Adapter PCR beruht auf einer DNA-Fragmentierung mit dem Restriktionsenzym *MseI* (Schnittstelle T!TAA), damit werden an den 5'-Enden TA-Überhänge generiert. Es werden 0,2 µl OnePhorAll plus Puffer, 0,2 µl *MseI* (50 U/µl) und 1,6 µl Wasser zu der PK verdauten Probe zugefügt. Nach 3 Stunden bei 37°C Enzym-Verdau wird das *MseI*-Enzym bei 65°C für 5 min inaktiviert. Die HPLC-gereinigten Oligonukleotide LIB1 und ddMse11 werden als Adapter für die durch den Verdau generierten Überhänge benutzt (Geigl und Speicher, 2007).

Folgende Primersequenzen werden hierfür verwendet:

LIB1: AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT
ddMse11: TAA CTG ACA G-ddC

Die Basenpaarung des Adapters wird mit 0,5 µl OnePhorAll plus Puffer, 0,5 µl LIB1 Primer (100 µM), 0,5 µl ddMse11 Primer (100 µM) und 1,5 µl Wasser durch langsames Abkühlen mittels eines PCR-Gradienten (65°C bis 15°C für je 1 min pro Temperaturschritt) vor der Ligation erzielt. Die vorbehandelten Adapter werden zusammen mit 5 U T4 DNA-Ligase und 0,01 mM ATP zum Produkt des *MseI*-Verdau gegeben und über Nacht bei 15°C ligiert. Nach der Ligation wird der Ansatz für die Amplifikation mit 3 µl Expand Long Template Puffer 1,2 µl dNTPs 10 mM, 35 µl Wasser und 1 µl Expand Long Template PolMix (3,5 U) aufgefüllt, anschließend folgt die PCR Amplifikation nach dem folgenden Programm.

1.	68°C	3 min
2.	94°C	40 sec
3.	57°C	30 sec
4.	68°C	1 min 30 sec + 1 sec/Zyklus
5.	zurück zu 2. 14 Zyklen	
6.	94°C	40 sec
7.	57°C-65°C	30 sec + 1°C/Zyklus
8.	68°C	1 min 45 sec + 1 sec/Zyklus
9.	zurück zu 6. 21 Zyklen	
10.	94°C	40 sec
11.	65°C	30 sec
12.	68°C	1 min 53 sec + 1 sec/Zyklus
13.	zurück zu 10. 21 Zyklen	
14.	68°C	3 min 40 sec
15.	4°C	for ever

Tab. 2.1 PCR-Programm für die Amplifikation mit der Linker-Adapter PCR

Das Amplifikat wird bei - 20°C gelagert.

2.3.2 Amplifikation mit WGA4 Kit („WGA4-Amplifikation“, Fa. Sigma-Aldrich)

Die Amplifikation der Polkörper erfolgt nach einer leicht modifizierten Methode, die wir auf Einzelzellbasis bereits publiziert haben (Geigl *et al.*, 2009).

Nach der Biopsie werden die Polkörper in ein Tube mit 4,5 µl nukleasefreiem Wasser überführt und innerhalb von 36 Stunden mit der GenomePlex Library Methode (Sigma-Aldrich Kit #WGA4) weiterverarbeitet.

Zunächst wird der Proteinase K Mix mit 32 µl 10 x Lyse- und Fragmentierungs- Puffer und 2 µl Proteinase K Lösung vorbereitet. 1 µl dieses PK Mixes wird mit 4,5 µl nukleasefreiem Wasser verdünnt und zum biopsierten Polkörper gegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 14800 x g, bei 4°C, für 7 min wird die Probe 1 Stunde bei 50°C verdaut, darauf 4 min bei 99°C fragmentiert und auf 4°C gekühlt. Für die Library Vorbereitung werden 2 µl 1 x Single Cell Library Buffer und 1 µl Library Stabilization Solution zugefügt, für 2 min bei 95°C denaturiert und auf 4°C gekühlt. Die Library erfolgt nach der Zugabe von 1 µl Library Preparation Enzyme, nach dem folgenden Programm:

1.	16°C	20 min
2.	24°C	20 min
3.	37°C	20 min
4.	75°C	5 min
5.	4°C	for ever

Tab. 2.2 Library Programm

Nach der Library wird die Probe für die Amplifikation mit 7,5 µl 10 x Amplification Mix, 1,5 µl Titanium *Taq* Polymerase und 51 µl nukleasefreiem Wasser aufgefüllt, anschließend folgt die PCR Amplifikation.

1.	95°C	3 min
2.	94°C	30 sec
3.	65°C	5 min
4.	zurück zu 2. (24 Zyklen)	
5.	4°C	for ever

Tab. 2.3 WGA4 Amplifikation

Das Amplifikat wird bei - 20°C gelagert.

2.4 Aufreinigung der amplifizierten DNA mit dem GenElute PCR Clean-Up Kit, Fa. Sigma-Aldrich

WGA4-amplifizierte Proben, sowie Produkte der Linker-Adapter PCR, deren DNA-Fragmente eine Größe zwischen 100 – 1000 bp aufweisen, werden mit dem PCR Clean-Up Kit aufgereinigt. Die Säule wird mit 500 µl Column Preparation Solution äquilibriert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 12000 x g für 30 sec wird der Überstand verworfen. Die DNA Probe wird mit dem 5-fachen Volumen der Binding Solution gemischt und auf die Säule geladen. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 16000 x g für 1 min wird der Überstand erneut verworfen. Dann folgt die Beladung der Säule mit 500 µl verdünnter Wash Solution und die Zentrifugation bei 16000 x g für 1 min. Der Überstand wird verworfen und die Säule wird bei 16000 x g für 2 min erneut zentrifugiert. 50 µl 1/10 Elution Lösung (die Elution Lösung des Kits wird mit nukleasefreiem Wasser 1 : 10 verdünnt) wird auf die Säule pipettiert, für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und in ein neues 1.5 ml Eppendorf Tube bei 16000 x g für 1 min eluiert. Die DNA Proben sind bereit für die Bestimmung der Konzentration.

2.5 Konzentrationbestimmung der amplifizierten und aufgereinigten DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgt mittels eines NanoDrop ND-1000 Spektralphotometers. Hierbei wird zunächst der Nullwert mit 1,5 µl Elutions-Puffer (1/10 EB Puffer) eingestellt, dann erfolgt die Vermessung der Probe selbst. Die Konzentration wird über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Zusätzlich wird die Absorption für Proteinreste bei 280 nm gemessen. Das Verhältnis OD260/OD280 sollte sich für eine reine DNA zwischen 1,8-2,0 befinden.

2.6 Multiplex-PCR

Die Multiplex-PCR, konzipiert, um die DNA-Qualität vor der Durchführung einer Array-CGH abschätzen zu können, wurde von van Beers *et al.* im Jahre 2006 erstmals beschrieben (van Beers *et al.*, 2006).

Für Einzelzellamplifikate erscheint diese PCR, neben der Konzentrationsbestimmung, hilfreich, um qualitative Aussagen zum Amplifikat angeben zu können. Hierfür werden vier

Primerpaare für das Gen *GAPDH* mit folgenden Sequenzen verwendet, (Metabion, 100µM Stock):

-100F gttccaatatgattccaccc
 -100R ctctggaagatggtgatgg
 -200F aggtggagcaggctagc
 -200R ttttgcggtggaatgtcct
 -300F aggtgagacattcttgctgg
 -300R tccactaaccagtcagcgtc
 -400F acagtccatgccatcactgc
 -400R gcttgacaaagtggctgtg

Mit den vier Primerpaaren wird ein Primermix hergestellt. Hierfür werden 8 µl pro Primer mit 136 µl H₂O in einem 1,5 ml Eppendorf Tube gemischt, um eine Primerkonzentration von 4 µM zu erhalten.

Die PCR wird mit 6 µl Hot Start Mix, 0,5 µl Primermix (4 µM), 4,5 µl nukleasefreiem Wasser und 1 µl Probe zusammengemischt und die PCR wird im Thermocycler mit dem folgenden Programm gestartet. Eine genomische Referenz-DNA (Promega) dient als Positivkontrolle und Wasser als Negativkontrolle.

1.	95°C	15 min
2.	94°C	1 min
3.	56°C	1 min
4.	72°C	1 min 30 sec
5.	zurück zu 2. (34 Zyklen)	
6.	72°C	7 min
7.	8°C	forever

Tab. 2.4 Multiplex-PCR Programm

Die PCR Proben werden auf einem 1,5 % Elektrophorese-Gel aufgetragen.

2.7 Markierung der amplifizierten und aufgereinigten DNA

Für die Chromosomen-CGH und die Array-CGH werden unterschiedliche Markierungsreaktionen zum Einbau von Antikörpern (indirekte Markierung) bzw. Fluorochromen (direkte Markierung) verwendet.

2.7.1 Bioprime Exo-Klenow-Markierung für die Chromosomen-CGH

Bei der Klenow-Markierung werden Nukleotidderivate in die DNA eingebaut. Referenz-DNA wird mit Biotin, Test-DNA (amplifizierte Polkörper-DNA in diesem Fall) mit Digoxigenin markiert. Zufalls-Oligonukleotid-Octamere binden an die denaturierte DNA und durch das Exo-Klenow-Fragment wird der DNA-Strang verlängert. Hierfür wurde der BioPrime-Array-CGH Genomic Labeling-System Kit (Fa. Invitrogen) verwendet. Die DNA Konzentration wird mittels Nanodrop ermittelt. 250-300 ng DNA werden in 6,5 µl nukleasefreiem Wasser, 15 µl 2,5 x konzentrierten Random-Primern und 11,25 µl 5 M Betain 10 min bei 100°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis für 5 min inkubiert. Danach werden 3,75 µl 10 x konzentrierte dCTP, 0,5 µl Digoxigenin oder Biotin und 0,5 µl Exo-Klenow Enzym zugegeben. Der Ansatz wird 2 Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend wird das Enzym 10 min bei 65°C inaktiviert.

2.7.2 Bioprime Exo-Klenow Markierung für die Array-CGH

Bei der Exo-Klenow-Markierung werden folgende fluoreszenz-markierte Nukleotidderivate in die DNA eingebaut: Cy3 für Referenz-DNA und Cy5 für die Test-DNA. Hierfür wird ebenfalls der BioPrime-Array-CGH Genomic Labeling-System Kit (Fa. Invitrogen) verwendet. Die DNA Konzentration wird mittels Nanodrop ermittelt. Wird auf eine Array Plattform mit 8 Feldern hybridisiert, werden 250 ng DNA in 10,5 µl nukleasefreiem Wasser und 10 µl 2,5 x konzentrierte Random Primer für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend sofort für 5 min auf Eis gestellt. Es werden 2,5 µl 10 x konzentrierte dCTPs, 1,5 µl Cy3 oder Cy5 und 0,5 µl Exo-Klenow Enzym zugegeben. Der Ansatz wird 2 Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend wird das Enzym 10 min bei 65°C inaktiviert. Wird auf eine Array Plattform mit 4 Feldern hybridisiert, werden 500 ng DNA in 21 µl nukleasefreiem Wasser und 20 µl 2,5 x konzentrierte Random Primer 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend für 5 min sofort auf Eis gestellt. Es werden 5 µl 10 x konzentrierte dCTPs, 3 µl Cy3 oder Cy5 und 1 µl Exo-Klenow-Enzym zugegeben. Der Ansatz wird 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend wird das Enzym 10 min bei 65°C inaktiviert.

2.7.3 Agilent Exo-Klenow Markierung für die Array-CGH

Hier erfolgt ebenfalls eine Exo-Klenow Markierung mit fluoreszenz-markierten Nukleotidderivaten: Cy3 für die Referenz-DNA und Cy5 für die Test-DNA. Hierfür wurde der Agilent Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit (Fa. Agilent) verwendet. Die DNA Konzentration wird mittels Nanodrop ermittelt. Wird auf eine Array Plattform mit 8 Feldern hybridisiert, werden 2 µg DNA in 13 µl nukleasefreiem Wasser und 2,5 µl Random Primer

für 3 min bei 95°C denaturiert und anschließend für 5 min sofort auf Eis gestellt. Es werden 5 µl 5 x konzentrierter Puffer, 2,5 µl 10 x konzentrierte dNTPs, 1,5 µl Cy3 oder Cy5 und 0,5 µl Exo-Klenow-Enzym zugegeben. Der Ansatz wird 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend wird das Enzym 10 min bei 65°C inaktiviert. Wird auf eine Array Plattform mit 4 Feldern hybridisiert, werden 2 µg DNA in 26 µl nukleasefreiem Wasser und 5 µl Random Primer 3 min bei 95°C denaturiert und anschließend für 5 min sofort auf Eis gestellt. Es werden 10 µl 5 x konzentrierter Puffer, 5 µl 10 x konzentrierte dNTPs, 3 µl Cy3 oder Cy5 und 1 µl Exo-Klenow-Enzym zugegeben. Der Ansatz wird 2 Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend wird das Enzym 10 min bei 65°C inaktiviert.

2.8 Aufreinigung der markierten DNA

Jeweils ein Doppelansatz markierter Referenz- bzw. Test-DNA wird über eine Säule von nicht-inkorporierten Nukleotiden gereinigt. Für die Chromosomen-CGH und Array-CGH unterscheidet sich hier das jeweilige Vorgehen.

2.8.1 Microcon YM-30 Säule für die Chromosomen-CGH, Fa. Millipore

Die indirekte Digoxigenin- oder Biotin- markierte Probe wird mit nukleasefreiem Wasser auf 300 µl eingestellt und auf die Microcon YM-30 Säule geladen. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 12000 x g für 5 min wird der Überstand verworfen. Die Säule wird mit 300 µl nukleasefreiem Wasser beladen und erneut bei 12000 x g für 5 min zentrifugiert. Die Säule wird gedreht, 100 µl nukleasefreies Wasser wird auf die Membran pipettiert, in ein neues 1,5 ml Eppendorf Tube gestellt und für 2 min bei 400 x g zentrifugiert. Die indirekte markierten Proben sind für die Chromosomen-CGH vorbereitet.

2.8.2 Microcon YM-30 Säule für die Array-CGH, Fa. Millipore

Die markierte Probe wird mit 1 x TE Puffer (pH 8,0) auf 480 µl eingestellt und auf die Microcon YM-30 Säule geladen. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 8000 x g für 10 min wird der Überstand verworfen. Die Säule wird mit 480 µl 1 x TE Puffer (pH 8,0) beladen und erneut bei 8000 x g für 14 bis 16 min zentrifugiert. Die Säule wird dann gedreht und in ein neues 1,5 ml Eppendorf Tube gestellt und für 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Die aufgereinigten Proben werden mit 1 x TE Puffer (pH 8,0) auf ein Gesamtvolumen von 10 µl (für eine Array Plattform mit 8 Hybridisierungsfeldern) bzw. auf 21 µl (für eine Array Plattform mit 4 Hybridisierungsfeldern) eingestellt. 1,5 µl dieser DNA-Probe werden mittels NanoDrop ND-1000-Spektralphotometer vermessen und somit die jeweilige DNA-Ausbeute (Yield) bzw. spezifische Aktivität berechnet.

Berechnung der Dye-Inkorporations-Rate:

$$\text{Yield } [\mu\text{g}] = \text{DNA-Konzentration } [\text{ng}/\mu\text{l}] * \text{Endvolumen}$$

$$\text{Spezifische Aktivität } [\text{pmol}/\mu\text{g}] = (\text{Dye } [\text{pmol}/\mu\text{l}] * \text{Endvolumen}) / \text{Yield}$$

2.8.3 Amicon 30 kDA Säule für die Array-CGH, Fa. Millipore

Die direkt-markierte Probe wird mit 1 x TE Puffer (pH 8,0) auf 480 μl eingestellt und auf die Amicon 30 kDA Säule geladen. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 14000 x g für 10 min wird der Überstand verworfen. Die Säule wird mit 480 μl 1 x TE Puffer (pH 8,0) beladen und erneut bei 14000 x g für 10 min zentrifugiert. Die Säule wird gedreht und in eine neue 1,5 ml Eppendorf Tube gestellt und für 1 min bei 1000 x g zentrifugiert. Die aufgereinigten Proben werden mit 1 x TE Puffer (pH 8,0) auf ein Gesamtvolumen von 10 μl (für eine Array Plattform mit 8 Hybridisierungsfeldern) bzw. 21 μl (für eine Array Plattform mit 4 Hybridisierungsfeldern), eventuell mittels dem „Concentrator plus“ von Eppendorf, eingestellt. 1,5 μl dieser DNA-Probe wird mittels NanoDrop ND-1000-Spektralphotometer vermessen und somit die jeweilige Ausbeute (Yield) bzw. spezifische Aktivität berechnet, siehe oben.

2.9 Konzentrationsbestimmung der markierten DNA

Die Einbaurrate von fluoreszenz-markierten Nukleotidderivaten in die DNA wird über die spezifische Aktivität bestimmt, die folgendermaßen definiert wird:

$$\text{Spez. Aktivität (pmol}/\mu\text{g}) = (\text{pmol}/\mu\text{l Farbe}) / (\mu\text{g}/\mu\text{l gDNA})$$

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wird die Absorption der Farbstoffe Cy3 (550 nm) und Cy5 (650 nm) mittels NanoDrop ND-1000-Spektralphotometer bestimmt. 1,5 μl dieser DNA-Probe wird mittels NanoDrop ND-1000-Spektralphotometer vermessen und somit die jeweilige DNA-Ausbeute (Yield) bzw. spezifische Aktivität berechnet.

Berechnung der Dye-Inkorporations-Rate:

$$\text{Yield } [\mu\text{g}] = \text{DNA-Konzentration } [\text{ng}/\mu\text{l}] * \text{Endvolumen}$$

$$\text{Spezifische Aktivität } [\text{pmol}/\mu\text{g}] = (\text{Dye } [\text{pmol}/\mu\text{l}] * \text{Endvolumen}) / \text{Yield}$$

Bei einer erfolgreichen Markierung sind lt. Angaben der Fa. Agilent Technologies folgende Werte zu erwarten:

Input gDNA (μg)	Yield (μg)	Specific Activity of Cyanine-3 Labeled Sample ($\text{pmol}/\mu\text{g}$)	Specific Activity of Cyanine-5 Labeled Sample ($\text{pmol}/\mu\text{g}$)
0.2 to 0.5*	2.5 to 3	15 to 25	15 to 20
0.5	5 to 7	25 to 40	20 to 35
3.0	7 to 10	35 to 55	25 to 40

* Half labeling reaction for 8x microarrays (half the amount of random primers, dye, enzyme and dNTPs)

Tab. 2.5 DNA-Ausbeute nach erfolgreicher Markierung

2.10 Vergleichende genomische Hybridisierung (Comparative Genomic Hybridization, CGH)

Die Vergleichende Genomische Hybridisierung (CGH) ist eine molekularzytogenetische Methode zum Nachweis gesamt-genomischer Imbalancen, Verlusten („loss“) oder Zugewinnen („gain“). Amplifizierte und markierte Polkörper-DNA wird entweder auf Chromosomen (Chromosomen-CGH) oder Arrays (Array-CGH) hybridisiert, beide Techniken sind nachfolgend beschrieben.

2.10.1 Technik der Chromosomen CGH

45 μl Test-DNA und 45 μl Referenz-DNA werden mit der Bioprime Exo-Klenow-Methode, wie oben beschrieben, markiert und zusammen mit 80 μl Cot-1 DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 5 μl Salmon DNA, 17,5 μl Na Acetat 3M (pH 5,2) und 481,25 μl EtOH (100%) über Nacht bei -20°C gefällt. Die Fällung wird am nächsten Tag für 45 min bei 14.000 rpm / 4°C abzentrifugiert.

Das DNA-Pellet wird danach mit 700 μl Ethanol 70% gewaschen, erneut für 10 min zentrifugiert, luftgetrocknet und in 7 μl 100% Formamid bei 42°C für 45 min unter schütteln gelöst. Mit 7 μl Master-Mix (Dextran Sulfat 30% in 4 x SSC, $M_r > 500.000$) wird weitere 30 min bei 42°C leicht geschüttelt, dann wird die DNA bei 78°C für 7 min denaturiert und die Cot-1 DNA 30 min bei 42°C mit den repetitiven Sequenzen der DNA prähybridisiert.

Parallel zur Behandlung der DNA-Probe wird ein Objektträger mit Lymphozyten-Metaphasen eines gesunden männlichen Spenders (hergestellt nach Speicher *et al.*, 1993) nach Äquilibration in 2 x SSC für 1 h bei 42°C mit 200 μl RNase A (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) verdaut und diese dann durch dreimaliges Waschen in 2 x SSC entfernt. Danach werden die Metaphasen mit 50 mg Pepsin in 100 ml 10 mM HCl (pH 2,0) bei 37°C für 1 min 45 sec bis 2 min verdaut. Der Verdau wird durch dreimaliges Waschen in PBS (à 5 min) gestoppt, der Objektträger in einer

aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70%, 90% und 100%) dehydriert und auf einer Heizplatte bei 37°C getrocknet. In einem Wasserbad werden 100 ml Formamid-Lösung (70 ml Formamid 100%, 10 ml 20 x SSC, 20 ml H₂O, eingestellt auf pH 7,5) auf 72°C erhitzt. Der Objektträger wird in dieser Lösung für 1 min 50 sec denaturiert, wobei die Zeit der Kondensation der Chromosomen und der Intensität des Pepsinverdaus anzupassen ist. Eine erneut durchgeführte aufsteigende Alkoholreihe bei 4°C trocknet die Objektträger, bevor die zu hybridisierende, vorbehandelte DNA-Probe aufgetragen wird. Das Hybridisierungsfeld wird durch ein Deckglas abgedeckt und mit Gummikleber (Fixogum) verschlossen. Die Hybridisierung der Probe erfolgt für 1-2 Nächte bei 37°C.

Nach der Hybridisierung wird der Objektträger dreimal in 4 x SSC + 0,2% Tween bei 42°C und 1 x SSC bei 60°C gewaschen. Nach einem kurzen Schritt in 4 x SSC + 0,2% Tween werden die unspezifischen Bindungsstellen für 30 min mit 1 ml 3%iger Block-Lösung (4 x SSC, BSA Fraktion V 3%) bei 37°C abgesättigt. Überschüssige Block-Lösung wird mit 4 x SSC + 0,2% Tween entfernt und der Objektträger mit 2 µl Anti-Digoxigenin-FITC und 1 µl Avidin-Cy 3.5 in 200 µl 1%iger Blocklösung (4 x SSC, BSA Fraktion V 1%) 50 min bei 42°C im Dunkeln gefärbt. Durch dreimaliges Waschen mit 4 x SSC + Tween 0,2% bei 42°C werden nicht gebundene Fluorochrome wieder entfernt. Anschließend wird die Chromosomenbänderung mit einer zweiminütigen DAPI Färbung (1 ml 4 x SSC + Tween 0,2%, 10 µg DAPI) sichtbar gemacht. Der Objektträger wird kurz mit destilliertem Wasser gewaschen, im Dunkeln getrocknet und mit Phenylendiamin-Lösung eingedeckelt.

Zur Auswertung der Chromosomen-CGH wird an einem Fluoreszenzmikroskop bei 10 geeigneten Metaphasen jeweils ein Bild mit den Fluoreszenzfiltern für DAPI, FITC und Cy3.5 aufgenommen. Die Chromosomen dieser Bilderserien können z.B. mit Hilfe der Software Leica-QCGH in ein Chromosomenschema sortiert werden. Die Software vergleicht nach Normalisierung die integrierte Fluoreszenzintensität der Kanäle, hier: FITC für Test-DNA und Cy 3.5 für Referenz-DNA. Das durchschnittliche Verhältnis aller ausgewerteten Metaphasen einer Hybridisierung wird grafisch in einem CGH-Profil dargestellt. Bei einem Fluoreszenzverhältnis von FITC zu Cy 3.5 über 1,25 liegt ein Gewinn, bei einem Verhältnis unter 0,75 ein Verlust des entsprechenden Chromosomenabschnitts vor.

2.10.2 Array-CGH

2.10.2.1 Hybridisierung auf Oligonukleotid-Arrays

Die Durchführung erfolgt mit Hilfe oligonukleotidbasierter Arrays für genomische DNA (Fa. Agilent Technologies, Protokoll Version 6.3, Oktober 2010). Das gesamte Genom ist auf

Objektträgern durch 60 bp lange Oligonukleotide repräsentiert („Agilent 60-mer SurePrint technology“). Durch die Anzahl der Proben auf dem Objektträger wird die Auflösung bestimmt, zum Beispiel bei einem 44K Microarray wird das Genom mit ca. 44.000 Oligonukleotiden abgedeckt, was einem mittleren Proben-Spacing von 43 kb entspricht, das Probendesign erfolgt mittels UCSC hg18 (NCBI Build 36), März 2006.

Die zu untersuchende Polkörper-DNA und Referenz-DNA werden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (siehe Labeling) und auf einen Objektträger mit synthetisch hergestellten Oligonukleotiden hybridisiert. Die Imbalancen können über Unterschiede in den Verhältnissen der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten bestimmt werden.

Neben handelsüblichen 4 x 44K-Arrays (# G4413A, Fa. Agilent Technologies) wurden von uns –ausschließlich für Polkörperuntersuchungen- spezielle Arrays konzipiert („custom made“) und von Agilent Technologies angefertigt.

Folgende custom made Arrays wurden hierfür verglichen:

1. Telomer-Arrays 44K

Diese wurden entwickelt, um, ausgehend vom 44K Array Basis-Design, die Telomerbereiche mit jeweils ca. 10 Mb vor dem physikalischen Ende abzubilden, weitere Regionen werden nicht beurteilt.

2. Telomer-Centromer-Arrays 44K

Ausgehend vom 44K Array Basis-Design wurden zusätzlich zum Telomerbereich die Centromer nahen Regionen mit insgesamt 43.102 Oligonukleotiden abgebildet, zusätzliche 2.118 Oligonukleotide dienen als interne Kontrolle.

3. CG- 8 x 15K Arrays

Beim Design dieser Arrays wurden besonders CG-reiche Regionen eliminiert. Ausgehend vom 44K Array Basis-Design, wurden hierfür ausschließlich 14.262 Oligonukleotide mit einem CG-Gehalt von 36.67% verwendet.

Für die Hybridisierung werden die markierte Test- und markierte Referenz- DNA zusammen mit 5 µl Cot-1 DNA, 11 µl Agilent 10 x Blocking Agent und 55 µl Agilent 2 x Hybridization Buffer (für eine Array Plattform mit 4 Hybridisierungsfeldern) bzw. mit 2 µl Cot-1 DNA, 4,5

µl Agilent 10 x Blocking Agent und 22,5 µl 2 x Hybridization Buffer (für eine Array Plattform mit 8 Hybridisierungsfeldern) gemischt. Die Probe wird nun bei 95°C 3 min denaturiert und anschließend bei 37°C 30 min inkubiert. 45 µl Hybridisierungsmix (für eine Array Plattform mit 8 Hybridisierungsfeldern) bzw. 100 µl Hybridisierungsmix (für eine Array Plattform mit 4 Hybridisierungsfeldern) werden jeweils auf ein 8 x- bzw. 4 x- Gasket-Slide Feld aufgetragen und mit dem Microarray in der Hybridisierungskammer verschlossen. Die Hybridisierung wird 16-24 Stunden bei 65°C im Hybridisierungsöfen durchgeführt.

2.10.2.2 Waschen des Microarray

Nach der Hybridisierung erfolgt der Waschvorgang. Der Microarray Objektträger wird 5 min bei Raumtemperatur mit Waschpuffer 1 (Oligo aCGH Wash Buffer 1), dann 1 min bei 37°C mit dem Waschpuffer 2 (Oligo aCGH Wash Buffer 2) und letztlich 1 min bei Raumtemperatur mit Acetonitril gewaschen. Der getrocknete Microarray wird in eine Scan-Kammer eingespannt und im Agilent Scanner mit Hilfe des Agilent Scan Control Programms gescannt.

2.10.2.3 Auswertung des Microarray

Die Fluoreszenzfarbstoffe werden mit zwei Lasern mit einer Emissionswellenlänge von 532 nm für Cy3 und von 633 nm für Cy5 angeregt. Die Fluorochrome absorbieren das Laserlicht und emittieren längerwelliges Licht. Die Lichtsignale erreichen durch spezifische Filter für Cy3 und Cy5 einen Photomultiplier und werden in elektronische Signale umgewandelt und digitalisiert. Eine Bilddatei wird erstellt und in das „Feature Extraction“ Datenextraktionsprogramm (Version 10.5.1.1) von Agilent geladen. Nach der Feature Extraction Analyse erscheint ein Fenster mit Angaben zur Qualitätskontrolle. Die Ergebnisse sind in einer Textdatei verfügbar, die mit einem eigenen Algorithmus für die Einzelzellanalyse ausgewertet werden kann, siehe unten. Zusätzlich wird ein Qualitätsbericht ('QC-Report') erstellt, der den Verlauf der Analyse und die Qualität des Arrays beschreibt,

2.10.2.4 Auswertung der Einzelzellhybridisierungen

Hochauflösende Analysen zeigen, dass geringe Mengen eingesetzter DNA im Rahmen einer gesamt-genomischen Amplifikation (whole genome amplification, WGA) nicht völlig fehlerfrei vervielfältigt werden. Diese stochastischen Amplifikationsartefakte werden gerade bei hochauflösenden Array Plattformen sichtbar. Wird mit üblichen CGH-Programmen, wie sie auf CGHweb erhältlich sind (<http://compbio.med.harvard.edu/CGHweb>; z. B. CBS, CGHseg, cghFLasso), ausgewertet, werden Kopienzahlveränderungen (CNVs) nicht erkannt

und/oder die Rate der falsch-positiven Zuordnungen im Sinne von Zugewinnen oder Verlusten ist zu hoch. Daher haben wir einen neuen Algorithmus spezifisch für die Auswertung von Einzelzellhybridisierungen erstellt, der folgende Ziele erreichen sollte (Geigl *et al.*, 2009):

- Identifikation kleiner CNVs ohne Interaktion des Users
- Unterscheidung zwischen echten CNVs und Artefakten
- Größenabschätzung der CNVs mittels Farbkodierung

Mit Hilfe des „Feature Extraction“ Datenextraktionsprogramm (Version 10.5.1.1) von Agilent wird eine .txt Datei erstellt und direkt in den Auswertealgorithmus geladen. Dieser wurde in „R“ erstellt (Version 2.7.0) (R Development Core Team 2008) und bietet die Möglichkeit, eine automatisierte Auswertung der Einzelzellhybridisierungen einzuleiten.

Bei CGH Auswertungen werden Ratio Werte von konsekutiven Datenpunkten oft kombiniert, wobei der Mittelwert dieser Punkte grafisch dargestellt und als „Fenster“ („window“) bezeichnet wird. Um die Positionsabhängigkeit des „Fensters“ zu umgehen, kalkuliert unser Algorithmus den mittleren Ratio Wert für jedes „Fenster“ und übernimmt ausschließlich die zentrale Position. Wird das „Fenster“ dann an eine andere Position bewegt, wird eine neue Kalkulation erstellt, nach mehreren Wiederholungen des Vorgangs entsteht ein vollständiges Profil. Genomische Verluste (1.85-fach über der SD) bzw. Zugewinne (2.75-fach unterhalb der SD) werden mittels farbigem Barcode dargestellt. Damit ist eine Identifikation von CNVs möglich, die ca. 500 kb (für 5-10 Zellen) bzw. < 3 Mb (für Einzelzellen) betragen.

Abb. 2.2 zeigt beispielhaft die Auswertung einer Array Hybridisierung genomischer DNA und einer Einzelzelle (Zelllinie 796P, Nierenzellkarzinom). Die Bereiche der Kopienzahlveränderungen in der genomischen DNA (Abb. 2.2 a) werden ebenfalls im Einzelzellprodukt identifiziert (Abb. 2.2 b). Auf Chromosom 1p ist in der genomischen DNA ein Verlust von ca. 30 Mb erkennbar, während auf Chromosom 1q ein Zugewinn von ca. 90 Mb sichtbar wird. Beide Veränderungen werden im Einzelzellprodukt als signifikant dargestellt.

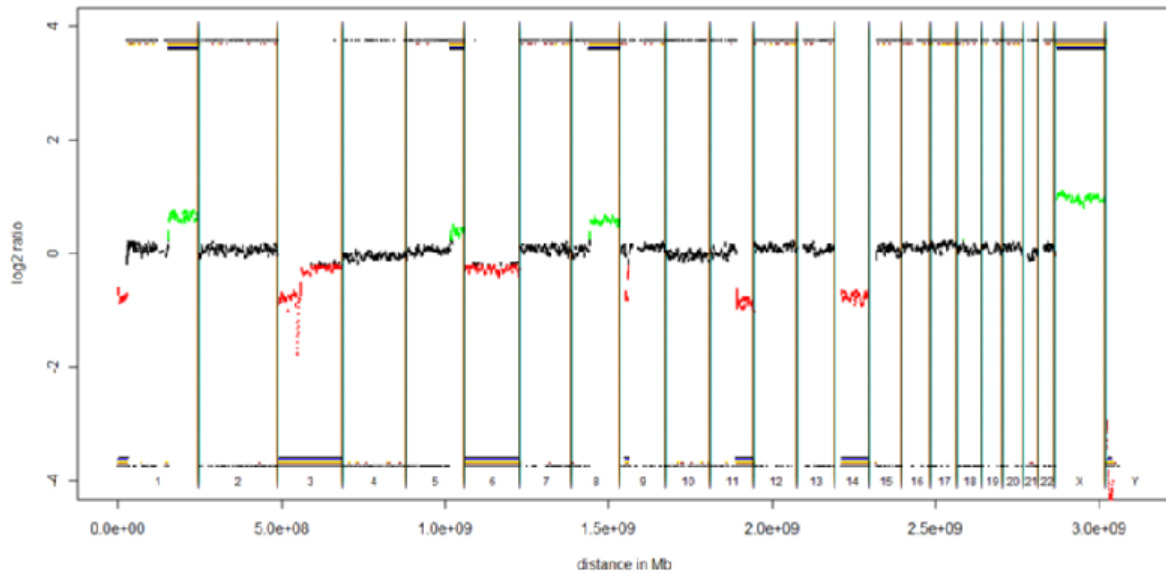


Abb. 2.2a Array-CGH Profil, genomische DNA einer Tumorzelllinie

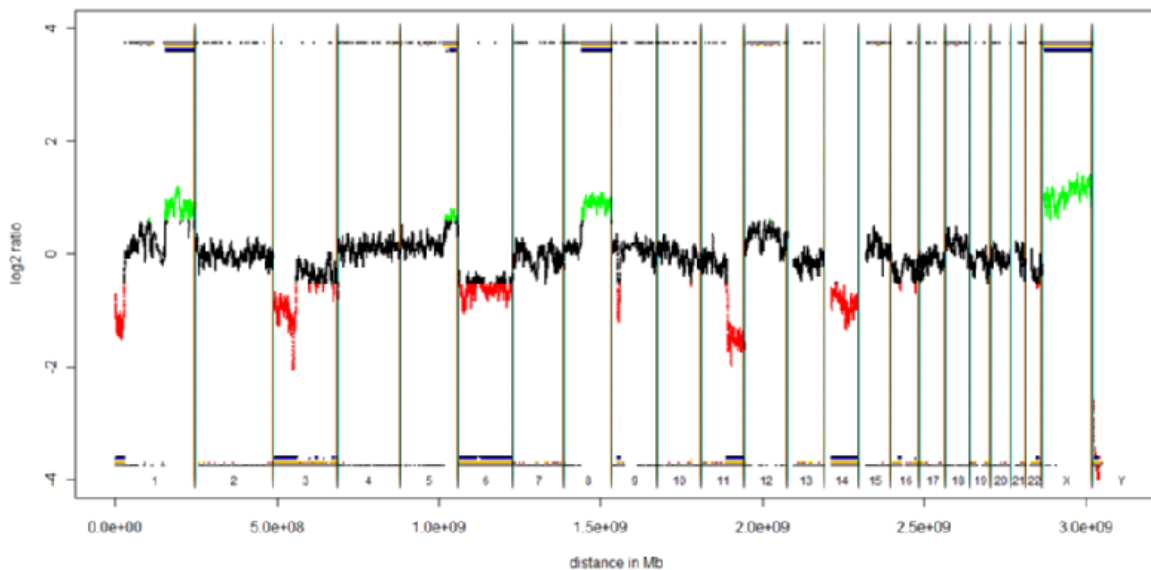


Abb. 2.2b Array-CGH Profil, Tumor-Einzelle

2.10.2.5 Array Stripping

DNA-Microarrays können für eine zweite Hybridisierung wieder verwendet werden, vorher müssen die Arrays mittels eines bestimmten Protokolls gewaschen, „gestrippt“, werden. Hierfür wird ein 2000 ml Becherglas mit Acetonitril gespült und luftgetrocknet. Der Becher wird mit 800 ml sterilem Wasser zum Kochen gebracht. Bereits hybridisierte Microarrays können vor dem Stripping im Dunkeln bei Raumtemperatur bis zu 24 Stunden gelagert werden. Diese werden dann für 1 min ins kochende Wasser gestellt, kurz luftgetrocknet und

darauf in eine Scan-Kammer eingespannt. Mit dem Agilent Scanner wird der Microarray mit Hilfe des Agilent Scan Control Programms gescannt. Die Analyse der Array-Bilddatei wird anschließend überprüft, ob das Stripping erfolgreich war. Kriterien sind hier im Agilent Feature Extraction folgende Werte: Red < 100; Green Value < 100. im Fall einer positiven Beurteilung, wird der Array für eine sofortige Hybridisierung wieder verwendet.

2.11 Laser-Mikrodissektion

Für die Zellisolierung im Rahmen der Linker-Adapter PCR wurde die Laser-Mikrodissektion verwendet. Eine Vielzahl von Herstellern bieten Systeme an, mit denen es ermöglicht wird, einzelne Zellen kontaminationsfrei zu isolieren, wie z.B. Olympus, Arcturus und Leica. Unsere Protokolle wurden für die PALM Microlaser Technologie (Fa. Zeiss) modifiziert und optimiert. Zellen in Suspension werden zunächst auf einen mit UV-Licht vorbehandelten Objektträger aufgebracht oder zentrifugiert, der mit einer Membran (hier PEN, poly-ethylen-naphthalat) überzogen ist und daraufhin luftgetrocknet. Werden andere Trägermembranen benutzt, müssen diese auf deren PCR-Kompatibilität überprüft werden. Im Prinzip wird bei der LMPC (laser microdissection and pressure catapulting) ein UV-A-Laser mit einer Wellenlänge von 334 nm verwendet, also fern der Absorptionsmaxima von RNA, DNA und Protein. Zunächst wird der Laser mittels der Parameter für Energie und Fokus auf eine Schnittbreite von weniger als 1 µm justiert. Anschließend wird das zu dissektierende Areal mit einem Durchmesser von ca. 60-100 µm kreisförmig umfahren und geschnitten, ein Sicherheitsabstand zur Zelle sollte berücksichtigt werden. Durch einen einzigen über die Software gesteuerten defokussierten Laserimpuls, kann die Zelle incl. Membran in den Deckel eines 200 µl Eppendorf Tubes katapultiert und abzentrifugiert werden und steht somit einer weitergehenden Amplifikation zur Verfügung.

2.12 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A	Adenin
α	anti
Abb	Abbildung
aCGH	Array comparative genomic hybridization
Bio	Biotin
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CGH	Comparative genomic hybridization (vergleichende genomische Hybridisierung)
Cy3	Cyanin 3
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
dd	dideoxy
Dig	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EtOH	Ethanol
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluorescein
G	Guanin
HCl	Salzsäure
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ EDTA	Dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PVP	Polyvinyl pyrrolidone
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat

SSC	Saline Sodiumcitrat
SE	Sodium EDTA
T	Thymin
TBE	Tris Borsäure EDTA Puffer
TE	Tris EDTA
U	Uracil

2.13 Materialien

α Dig-FITC	Roche
Acetonitril, EMPLURA	Sigma
Albumin from bovine serum	Sigma
Amicon Ultra-0,5 mL, 30K	Millipore
Ammoniumchlorid	Roth
ATP	Roche
Avidin-Cy3.5	Roche
Biopsy Pipette (15 μ m)	Microtech
Biotin-dCTP	Invitrogen
Biotin-dUTP	Roche
10 x aCGH Blocking Agent	Agilent Technologies
Borsäure	Merck
Chloroform	Roth
Culture oil	COOK
Cyclosporin A	Sigma
Cy-dyes dCTP	GE Healthcare
DAPI	Roche
Deckgläser	Roth
Dextran Sulfat	Sigma
Dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat	Roth
100bp DNA Ladder	Invitrogen
DNA Loading Dye	Fermentas
EDTA	Roth
10 x EDTA Puffer	Applied Biosystems
Ethanol absolute	Merck
Fetales Kälberserum	Böhringer

Ficoll Paque	Pharmacia
Fixo gum	Marabu
Gamete Buffer	COOK
Gasket-slides	Agilent Technologies
Glasküvetten	VWR
Gel Red Nucleic Acid Gel Stain	Biotium
Heringsperm-DNA	Invitrogen
Holding Pipette	Microtech
Hotstartaq Mastermix	Qiagen
Human Cot-1 DNA	Roche
Human Cot-1 DNA	Invitrogen
Human Genomic DNA, Male	Promega
2x Hi-RPM Hybridization Buffer	Agilent Technologies
Igepal	Sigma
Immersionsöl	Leica
Isoamylalkohol	Roth
Kaliumhydrogencarbonat	Roth
LE Agarose	Biozym
LiChrosolv Wasser	Merck
4 x 44K human Microarray	Agilent Technologies
8 x 15K custom made Microarray	Agilent Technologies
Microcon YM-30	Millipore
Microscope slides Super Frost	ROTH
<i>MseI</i> 50 U/ μ l	New England Biolabs
3M NaAc, pH 5,2	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Roth
Nuklease-freies Wasser	Promega
Oligo aCGH Wash Buffer1 und 2	Agilent Technologies
OnePhorAll Puffer	Amersham Biosciences
Primer	Microsynth
Safe-lock Tubes 1,5 ml PCR clean	Eppendorf
PCR Softtubes 0,2 ml	Biozym
PCR Tubes 0,2 ml, thin wall	Axygen

Pepsin	Roche
Petrischale standard	Falcon
Phenylendiamin	Merck
POP 6/ POP 7 Polymer	Applied Biosystems
Primer	Metabion
Proteinase K (Phenol Extraktion)	Amresco
Proteinase K	Roche
Polyvinyl pyrrolidone	COOK
Rapid Ligation Kit	Fermentas
RNase A	Qiagen
RPMI 1640 mit Hepes	Seromed
RPMI 1640	PAA
Salzsäure rauchend 37%	Merck
100 bp Sizestandard	Roche
Spritzenfilter 0,2µm	Nalgene
T4 DNA-Ligase	Roche
Titanium <i>Taq</i> polymerase	Clontech
Tris	Roth
Tween20	Sigma

2.14 Kit

BioPrime Array CGH Genomic Labeling Module	Invitrogen
Expand Long Template Kit	Roche
Genomic DNA enzymatic Labeling Kit	Agilent Technologies
GenElute PCR Clean-Up Kit	Sigma
GenomePlex Single Cell Whole Genome Amplifikation Kit	Sigma-Aldrich

2.15 Geräte

Concentrator plus	Eppendorf
Fluoreszenzmikroskop-DM RXA	Leica
Hybridisierungsofen	Shel Lab
Magnetrührer	Ikamag RCT
Microarray Scanner with Surescan High-Resolution Technology	Agilent Technologies
Objektträger-Streichtisch OTS40	Medite

OCTAX-Laser Shot System	OCTAX Microscience
PALM Laser Microscope LMPC	Zeiss
Thermocycler, DNA Engine	BioRad
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge, Galaxy Ministar	VWR
Schüttler 260 basic	IKA
UV-VIS Spectralphotometer, NanoDrop	PeqLab
Vakuumpumpe	Millipore
Vortexer	IKA
Wasserbad	Lauda, Julabo, GFL
Zentrifuge Fresco 21	Thermo Scientific

2.16 Puffer, Lösungen

ALB Puffer: 200 mM KOH, 50 mM DTT

Carbonate-bicarbonate Puffer: 0,42 g NaHCO₃, 10 ml H₂O; pH 9,6

3 M NaAc: 246,09 g Natrium Acetat auf einen 1 L auffüllen, mit Eisessig auf pH 5,2

Phenylendiamin Lösung: 22,5 ml Glycerol + 2,5 ml Phenylendiaminodihydrochlorid (PDDHC) Lösung (10 mg PDDHC/ ml in 1 x PBS; pH 8,0) mit 0,2 µm filtrieren

Phosphate Buffered Saline: 8,5 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl; pH 7,4

Saline Sodiumcitrat: 15 mM NaCitrat, 150 mM NaCl ; pH 7,4

10 x TE: 12,11 g Tris, 3,72 g Na₂EDTA pH 8,0

10 x Tris Borsäure EDTA Puffer: 162 g Tris, 27,50 g Borsäure, EDTA 9,31 g auf 1 L mit bidistilliertem Wasser

2.17 Verwendete Software, Datenbank, Internettools

Agilent Scan Control Program	Agilent Technologies
Feature Extraction	Agilent Technologies
QCGH	Leica Microsystems
QFISH	Leica Microsystems

3 3. ERGEBNISSE

3.1 Amplifikation der Polkörper

In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits Protokolle zur gesamt-genomischen Amplifikation von Einzelzellen etabliert. Die nachfolgende Analyse mit der Chromosomen-CGH und der Array-CGH wurde in wissenschaftlichen Journalen veröffentlicht (Geigl *et al.*, 2007; Geigl *et al.*, 2006; Geigl *et al.*, 2009).

Zunächst sollte geklärt werden, ob sich die Linker-Adapter PCR und die WGA4 Methode auch für Zellen mit einem haploiden Chromosomensatz, also Polkörpern, eignen.

3.1.1 Mikrodissektion

Nach der Entnahme aus der Eizelle, wurden die Polkörper in einer ersten Testphase auf Objektträgern für die Mikrodissektion aufgebracht, die mit einer 1 µm dünnen PEN Membran bespannt sind (Poly-ethylen-naphthalat). Nach Verdunsten der Transferflüssigkeit wird der Polkörper unter der LMPC- (Laser Microdissektion and Pressure Catapulting) Einheit aufgesucht. Eine beispielhafte Sequenz der Isolierung eines Polkörpers ist in Abb. 3.1 dargestellt. Zur besseren Visualisierung der Zelle wurde hier der Objektträger mit Giemsa gefärbt. Zunächst wird der Bereich, in dem die Laserdissektion erfolgen soll, markiert (blaue Linie), anschließend wird der Polkörper mit einem Laserstrahl umfahren, die Membran wird geschnitten und in ein Eppendorf Tube katapultiert. Das Loch in der Membran zeigt die erfolgte Dissektion.

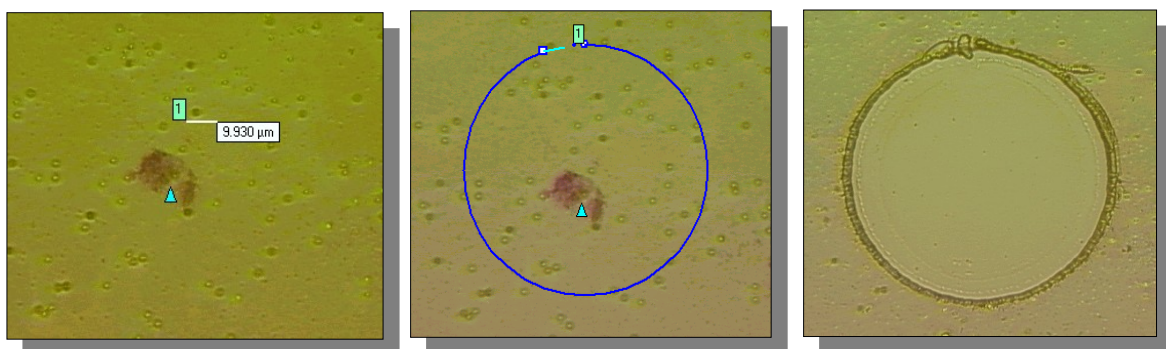


Abb. 3.1 Laser Microdissektion and Pressure Catapulting

Aus unseren Vorexperimenten an Einzelzellen war uns bewusst, dass ggf. eine vorherige Färbung die Vervielfältigung des Genoms negativ beeinflusst. Um daher nicht einen

zusätzlichen Faktor in die DNA-Amplifikation der Polkörper einzuführen, wurden sämtliche Analysen auf unfixierten und ungefärbten Präparaten durchgeführt.

Abb. 3.2 zeigt die Markierung des Areals auf Membranobjektträgern vor der Laserdissektion 4 verschiedener Polkörper.

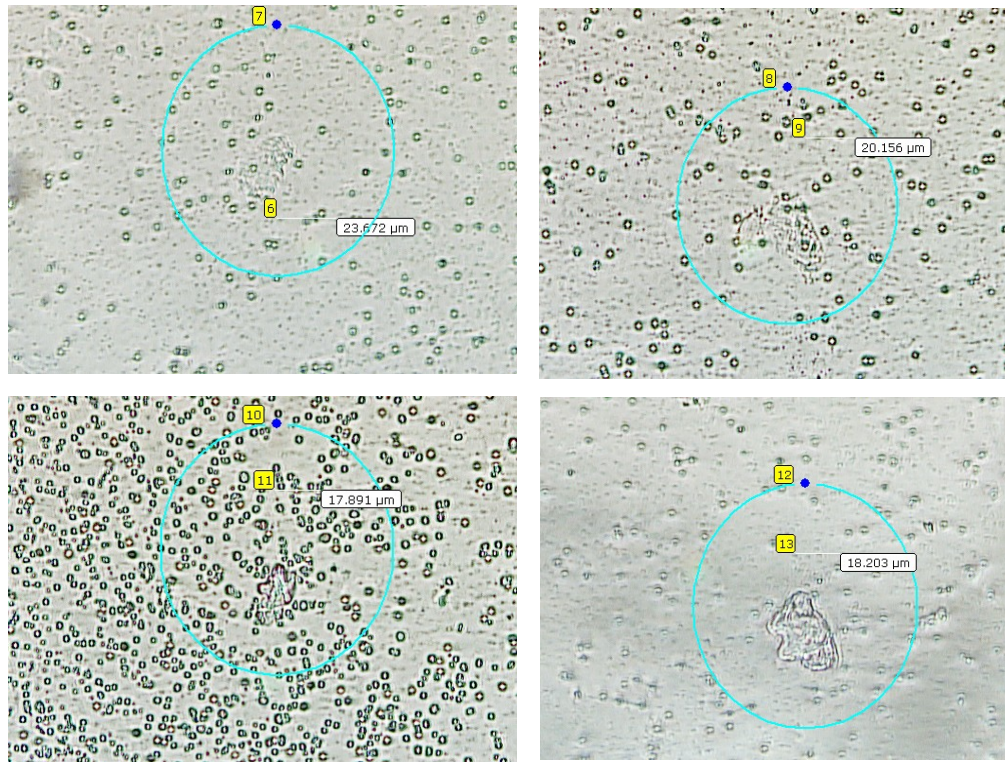


Abb. 3.2 Membranobjektträger mit Polkörpern

In dieser Abbildung sind die Limitationen dieses Ansatzes deutlich zu erkennen. Nach dem Eintrocknen des Puffers, bilden sich Salzkristalle, die das Auffinden der Zelle (Durchmesser ca. 20 µm) deutlich erschwert. Ein Waschschrift, z.B. mit 70% reinstem Ethanol, kann aufgrund des wertvollen Materials nur bedingt empfohlen werden. Ferner wird sich die Laserdissektion aufgrund mangelnder Verfügbarkeit und des technischen Anspruchs, den die Methode stellt, im Rahmen der Polkörperdiagnostik zu keiner Routinemethode entwickeln.

3.1.2 Linker-Adapter PCR nach Mikrodisektion

Die Linker-Adapter PCR beruht auf einer DNA-Fragmentierung mit dem Restriktionsenzym *MseI* (Schnittstelle T!TAA) und auf einer globalen genomischen Amplifikation, mit Hilfe der Oligonukleotide LIB1 und ddMse11, die als Adapter zur Vervielfältigung aller DNA Fragmente, unabhängig von deren Sequenz, eingesetzt werden.

Nach der Mikrodissektion wurden die Polkörper zunächst mit der Linker-Adapter PCR amplifiziert und aufgereinigt. Für 10 Proben sind die Konzentrationen nach der Amplifikation beispielhaft angegeben, Tabelle 3.1.

Proben	Konzentration (ng/μl)	Ratio 260/280	Ratio 260/230
<i>Patientin A</i>			
PK 1A	150.11	1.88	2.46
PK 1B	22.38	1.84	2.10
PK 2A	122.65	1.85	2.26
PK 2B	133.18	1.88	2.18
PK 3A	138.04	1.90	2.46
PK 3B	29.24	1.84	2.49
<i>Patientin B</i>			
PK 1A	147.88	1.88	2.42
PK 1B	6.72	1.38	1.10
PK 2A	135.00	1.85	2.31
PK 2B	90.63	1.85	2.40

Tab. 3.1 Konzentrationen nach der Linker-Adapter PCR

Die Konzentrationen liegen in einem Bereich zwischen 90 und 150 ng/μl, die Gesamtausbeute nach Amplifikation kann mit ca. 3,5 bis 7,5 μg angegeben werden. Diese Werte liegen in einem Bereich, der von uns auch bereits für diploide Zellen beschrieben werden konnte (Geigl *et al.*, 2007; Geigl *et al.*, 2006).

Da der Zeitbedarf bei einer Polkörperdiagnostik von großer Bedeutung ist, wurde die Linker-Adapter PCR diesbezüglich hinterfragt. Tabelle 3.2 gibt den zeitlichen Aufwand für die Amplifikation wider.

	Zeitbedarf		Zeitbedarf
Lyse und PK-Verdau	15 h	Lyse und PK-Verdau	15 h
<i>MseI</i> Verdau	3 h	<i>MseI</i> Verdau	3 h
Pre-annealing der Adapter		Pre-annealing der Adapter	
Ligation	12 h	Fast-Ligation	1 h
Primäre PCR	3 h	Primäre PCR	3 h
Gesamt	33 h	Gesamt	22 h

Tab. 3.2 Zeitbedarf Linker-Adapter PCR

Insgesamt ist für die Linker-Adapter PCR mit einer Gesamtzeit für die Amplifikation von ca. 33 Stunden zu kalkulieren. Es wurde daher versucht, dieses Protokoll zu verkürzen, ohne Qualitätseinbußen in Kauf nehmen zu müssen. Ansatzpunkt war der Ligationsschritt, der mit

Hilfe einer Rapid-Ligation um mehr als 10 Stunden verkürzt werden konnte. Dafür wurde ein Kit der Firma Fermentas (Rapid Ligation Kit) verwendet. Die Qualität war unverändert zum Standard-Protokoll, siehe unten. Dennoch ist für die gesamte Amplifikation ein Zeitbedarf von immer noch ca. 22 Stunden anzugeben.

3.1.3 Linker-Adapter PCR und Polkörper-CGH

Nach Amplifikation der Polkörper, wurde die DNA markiert und zusammen mit der Referenz-DNA auf normale Chromosomen eines männlichen Spenders hybridisiert. Die Qualitätsbeurteilung der CGH erfolgte zunächst auf Basis der Fluoreszenzintensitäten, die am Beispiel eines balancierten Polkörpers in Abb. 3.3 dargestellt sind. Die Polkörper-DNA (hier in der Metaphasen-Darstellung grün markiert, Abb. 3.3 links) zeigt eine intensive und hintergrundfreie Färbung, die, wie die Referenz-DNA (rot markiert, Abb. 3.3 rechts), ähnlich starke Signale aufweist.

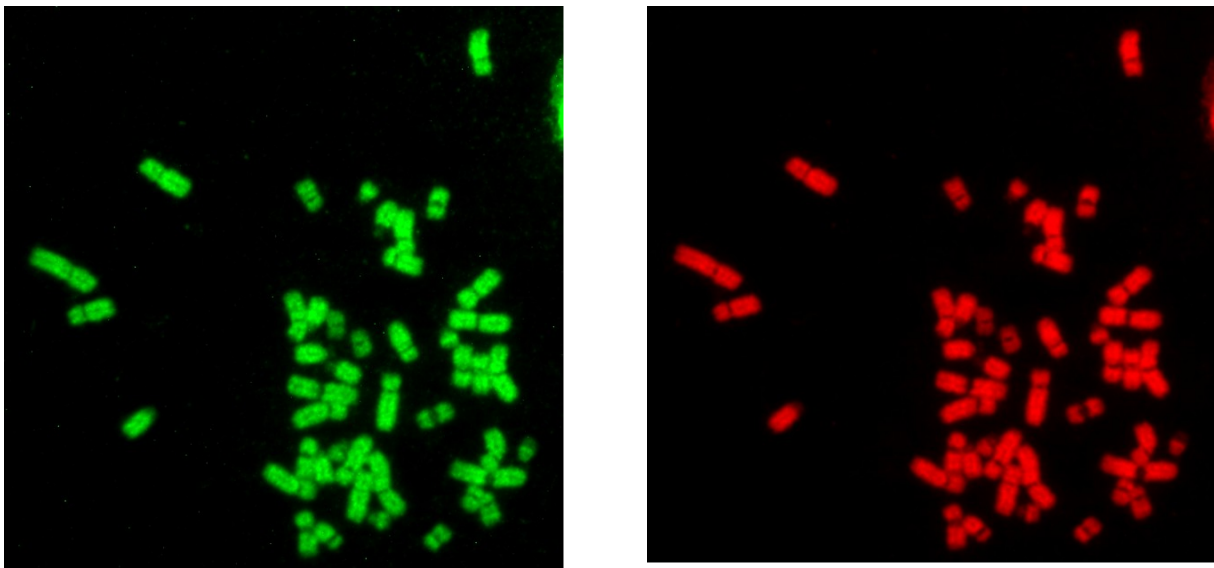


Abb. 3.3 Fluoreszenzintensitäten bei der Polkörper-CGH

Für jedes Chromosom ist es entsprechend des CGH-Profiles möglich, Aussagen bzgl. Zugewinnen und Verlusten hinsichtlich des genomischen Materials zu treffen. Zur Interpretation, ob dieses Profil einen Zugewinn oder Verlust von Chromosomenmaterial zeigt, werden Schwellwerte verwendet, die neben jedem Chromosom mit einer roten (für Verlust) und grünen (für Gewinn) Linie angegeben sind. Die schwarze Linie zwischen der roten und grünen Linie entspricht einem balancierten Verhältnis, also keinem Verlust bzw. Gewinn. Wenn die blaue Linie die Schwellwerte für Gewinn bzw. Verlust überschreitet, liegt für die

jeweilige chromosomale Region, bzw. für das Chromosom eine abweichende Anzahl vor. In diesem Fall ist davon auszugehen, dass die zugehörige Eizelle auch eine abweichende Chromosomenzahl aufweist. Zeigen sich keine Auffälligkeiten, ist das CGH-Profil „balanciert“.

Abb. 3.4 zeigt das CGH Profil eines unauffälligen Polkörperers, der mit der Linker-Adapter Methode amplifiziert wurde, links im Bild. Die blaue Linie bleibt bei den Chromosomen 1 bis 22 immer innerhalb des roten und grünen Schwellwertes. Der Polkörperer rechts in Abb. 3.4 weist dagegen Veränderungen auf, wie Verluste auf Chromosomen 2, 4, 14 und 21 sowie Zugewinne auf Chromosomen 7 und 10.

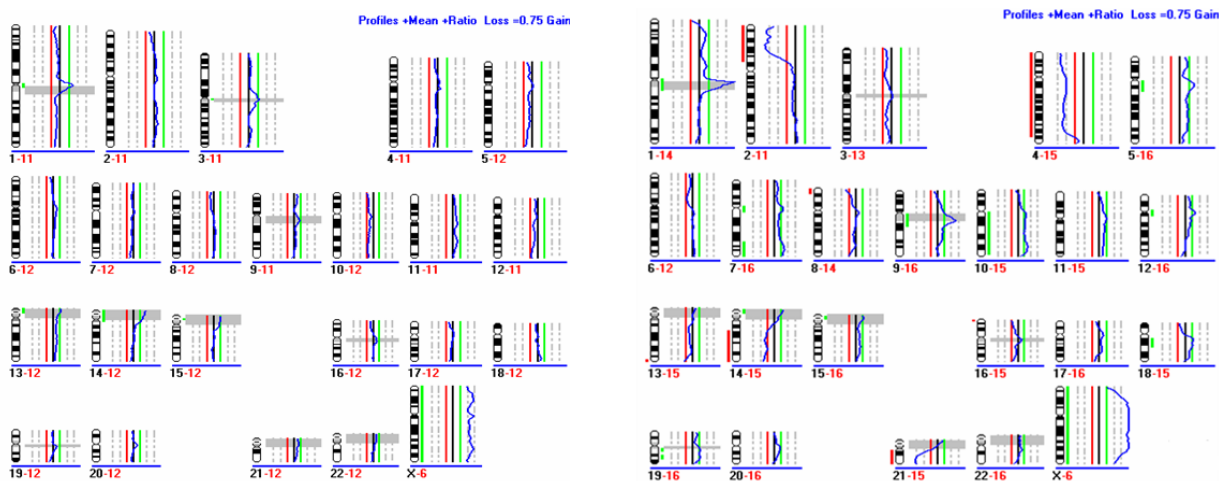


Abb. 3.4 Linker-Adapter PCR und Chromosomen-CGH

Im Prinzip ist es also möglich, die Linker-Adapter PCR für die Polkörperer-CGH zu verwenden. Aneuploidien können mit Hilfe der CGH erkannt werden, allerdings ist diese Methode sehr zeitintensiv und, aufgrund der vorgegebenen zeitlichen Limitationen, kaum für eine Routinediagnostik geeignet.

3.1.4 Amplifikation mit der WGA4 Methode

Mit dem „GenomePlex Single Cell Whole Genome Amplifikation Kit“ (WGA4, Fa. Sigma-Aldrich) wird die zu amplifizierende DNA zunächst zufällig fragmentiert (Größe zwischen 100 und 1000 bp), anschließend wird mit Universal Primern eine Library vorbereitet und amplifiziert. Der Zeitbedarf liegt mit ca. 5 Stunden in einem deutlich attraktiveren Bereich, verglichen mit der Linker-Adapter PCR, siehe Tabelle 3.3.

	Zeitbedarf
Lyse und Fragmentierung	1 h 15
Library	1 h 15
Amplifikation	2 h 30
Gesamt	5 h

Tabelle 3.3 Zeitbedarf der WGA4 Methode

Da sich die Laserdissektion als nicht praktikable Methode erwiesen hat, sollte im weiteren Ablauf eine Methodik bzw. Logistik etabliert werden, die Polkörper direkt im betreffenden Kinderwunschzentrum auf eine Amplifikation vorzubereiten. Ziel war es, die Polkörper direkt in ein Eppendorf Tube zu transferieren, das ein Medium enthält, das sowohl für einen Transport wie auch eine gesamt-genomische Amplifikation geeignet ist.

Die Vorbereitung der Eizelle für die ICSI erfolgt mit dem sog. „Flushing Buffer“. Es musste zunächst getestet werden, ob dieses Medium einen negativen Einfluss auf die Amplifikation der DNA hat. Als erstes wurde 100 pg weibliche genomische DNA in einem Tube amplifiziert, in das entweder Lyse-/Fragmentierungs- Puffer (aus dem Kit) oder nukleasefreies Wasser vorgelegt war. Zusätzlich wurde mit oder ohne „Flushing Buffer“ amplifiziert, siehe Tabelle 3.4.

Proben	Proben Ansatz
2a	4 µl PCR-Puffer 1 + 1 µl DNA
2b	4 µl PCR-Puffer 1 + 1µl „Flushing Buffer“
2c	3 µl PCR-Puffer 2 + 1 µl „Flushing Buffer“ +1 µl DNA
3a	4 µl nukleasefreies Wasser +1 µl DNA
3b	4 µl nukleasefreies Wasser +1 µl „Flushing Buffer“
3c	3 µl nukleasefreies Wasser +1 µl „Flushing Buffer“ +1 µl DNA

Tab. 3.4 Test des Mediums für die WGA4

Anschließend wurde die DNA aufgereinigt, vermessen und in eine Multiplex-PCR eingesetzt, siehe Tabelle 3.5 und Abb. 3.5

Proben	Konzentration (ng/μl)	Ratio 260/280
2a	183,1	1,92
2b	23,4	1,80
2c	177,0	1,95
3a	195,5	1,95
3b	7,8	1,93
3c	164,7	1,93

Tab. 3.5 Konzentrationen nach WGA4

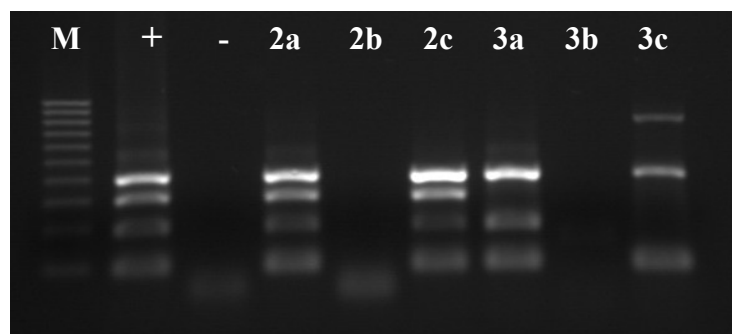


Abb. 3.5 Multiplex-PCR des WGA4 Amplifikats

Die Bestimmung der DNA Qualität nach Amplifikation von Einzelzellen für weitere Anwendungen, wie Chromosomen-CGH oder Array-CGH, kann mittels zweier Methoden beurteilt werden: einerseits wird die Konzentration der amplifizierten DNA nach der Aufreinigung des Amplifikat vermessen (Nanodrop), andererseits wird eine Multiplex-PCR durchgeführt. Die Multiplex-PCR erscheint für Einzelzellamplifikate hilfreich, um qualitative Aussagen zum Amplifikat angeben zu können. Hierfür werden vier Primerpaare für das Gen *GAPDH* für PCR Produkte der Größe 100 bp, 200 bp, 300 bp und 400 bp verwendet. Vier Banden sind bei einer guten DNA-Qualität ersichtlich, bei hoch genomischer DNA werden vier Banden erwartet.

Die Ergebnisse der Multiplex-PCR (Abb. 3.5) und der DNA Konzentrationsvermessung zeigen, dass der „Flushing Buffer“ evtl. einen leicht inhibierenden Einfluss auf die Amplifikation haben könnte. Mit nukleasefreiem Wasser wurden – auch nach Wiederholung des Experiments- stets tendenziell bessere Ergebnisse erzielt. Da sich nukleasefreies Wasser auch als optimales Transportmedium erwiesen hat, wurde den Zuweisern empfohlen, die Polkörper in 4,5 μl nukleasefreiem Wasser aufzunehmen.

Eine darauf folgende Analyse von 28 Polkörpern zeigte ausgezeichnete und stabile Resultate, DNA-Konzentrationen zwischen 150 und 240 ng/μl konnten erreicht werden, Tabelle 3.6. Amplifikationen, die eine geringere Konzentration als 50 ng/μl aufwiesen, wurden von einer weiteren Analyse ausgeschlossen.

Sample	Konzentration (ng/μl)	Ratio 260/280	Ratio 260/230	Analyse
<i>Patientin A</i>				
PK 1A	211.52	1.91	2.46	Ja
PK 1B	31.05	1.91	2.45	Nein
PK 2A	203.01	1.92	2.28	Ja
PK 2B	153.18	1.88	2.18	Ja
PK 3A	212.04	1.90	2.46	Ja
PK 3B	29.15	1.84	2.49	Nein
PK 4A	209.76	1.91	2.44	Ja
PK 4B	144.99	1.91	2.36	Ja
PK 5A	231.57	1.93	2.46	Ja
PK 5B	169.47	1.87	2.33	Ja
PK 6A	189.38	1.91	2.38	Ja
<i>Patientin B</i>				
PK 1A	241.54	1.92	2.42	Ja
PK 1B	171.34	1.89	2.34	Ja
PK 2A	223.98	1.88	2.31	Ja
PK 2B	209.78	1.90	2.38	Ja
PK 3A	219.06	1.92	2.37	Ja
PK 3B	31.73	1.76	2.06	Nein
PK 4A	190.99	1.90	2.34	Ja
PK 4B	156.93	1.90	2.37	Ja
PK 5A	66.24	1.85	2.24	Ja
PK 5B	186.71	1.90	2.37	Ja
PK 6A	29.53	1.75	1.97	Nein
PK 7A	212.35	1.90	2.35	Ja
PK 7B	211.00	1.92	2.37	Ja
PK 8A	215.00	1.89	2.26	Ja
PK 8B	71.17	1.88	2.03	Ja
PK 9A	221.58	1.91	2.36	Ja
PK 9B	20.81	1.81	1.99	Nein

Tab. 3.6 Konzentrationen von Polkörpern nach WGA4 Amplifikation

Im weiteren Verlauf unserer Untersuchungen zeigte sich, dass für eine routinemäßige Anwendung allein die Konzentrationsbestimmung der Polkörper-DNA ausreichend war, sofern eine Konzentration von über 50 ng/μl vorlag. Auf eine weitere Multiplex-PCR wurde aus Gründen des zeitlichen Ablaufs verzichtet.

3.1.5 WGA4 und Polkörper-CGH

Nach Amplifikation der Polkörper, wurde die DNA markiert und zusammen mit der Referenz-DNA auf normale Chromosomen eines männlichen Spenders hybridisiert.

Abbildung 3.6 zeigt das CGH-Karyogramm und zugehörige Profil eines balancierten 1. Polkörperers. Deutlich ist die homogene und intensive Hybridisierung zu erkennen. Es wurde gegen eine männliche Referenz-DNA hybridisiert, das sich als deutlichen Verlust des Y-Chromosoms und Zugewinn des X-Chromosoms repräsentiert.

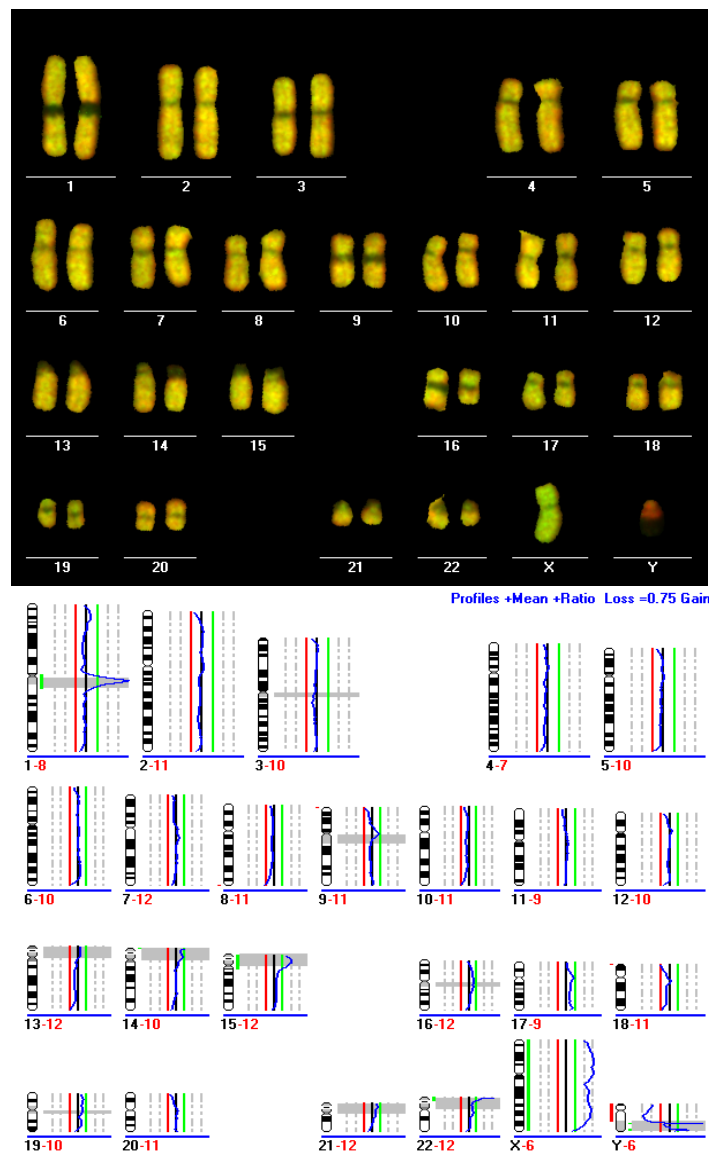


Abb. 3.6 Polkörper CGH nach WGA4 Amplifikation

Auch Aneuploidien von einzelnen ganzen Chromosomen können mit der WGA4 Amplifikation und nachfolgender Chromosomen-CGH dargestellt werden. In Abbildung 3.7 zeigt sich ein signifikanter Verlust des Chromosoms 22 in einem 1. Polkörper. Dieser ist bereits im CGH Karyogramm als rötliche Färbung zu erkennen.

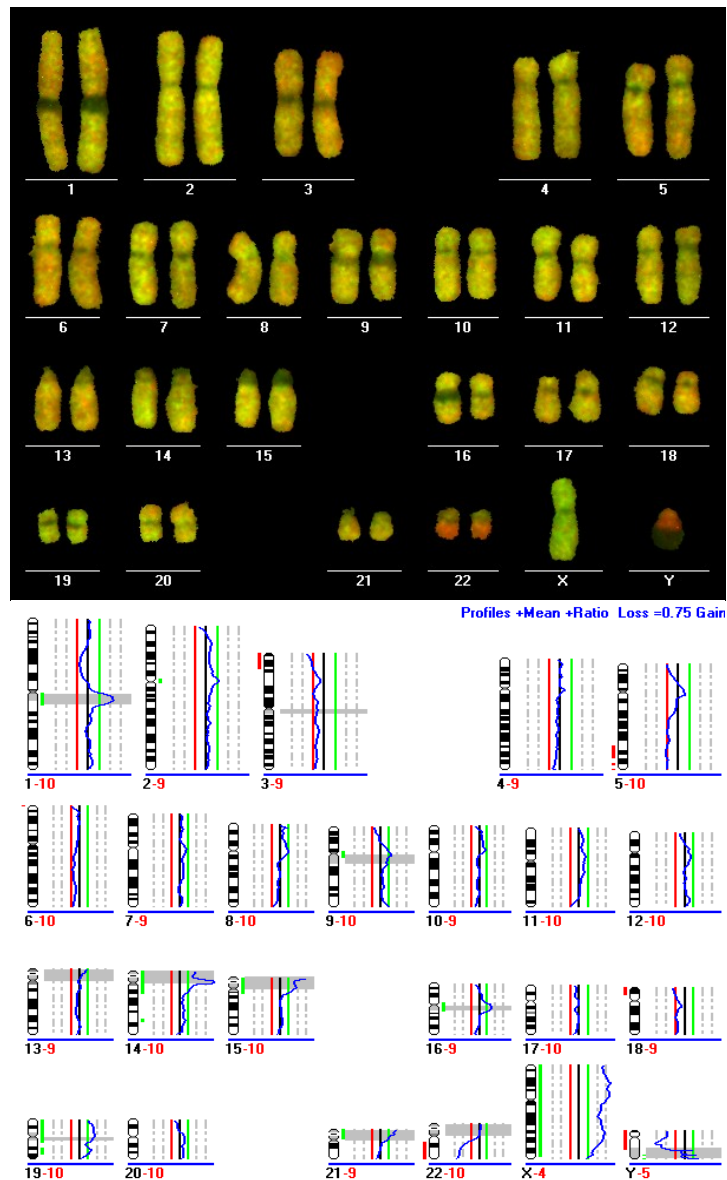


Abb. 3.7 Polkörper CGH nach WGA4 Amplifikation

Beobachtet werden in einzelnen Polkörpern auch multiple Chromosomenveränderungen, die als sog. „Levelsprünge“ bezeichnet werden sollen. Bereits im CGH Karyogramm stellen sich die Fluoreszenzfärbungen als sechs Abstufungen, von dunkelrot bis hellgrün dar, wie aus Abbildung 3.8, der CGH eines 1. Polkörpers, hervorgeht. Dies deutet nicht auf einen Artefakt hin, da zum einen balancierte Chromosomen gefunden werden (z.B. Chromosomen 13, 14, 15, 17, 18, 20, 22), zum anderen dies dem Verlust/Zugewinn einzelner oder beider Chromatiden im Polkörper entsprechen kann.

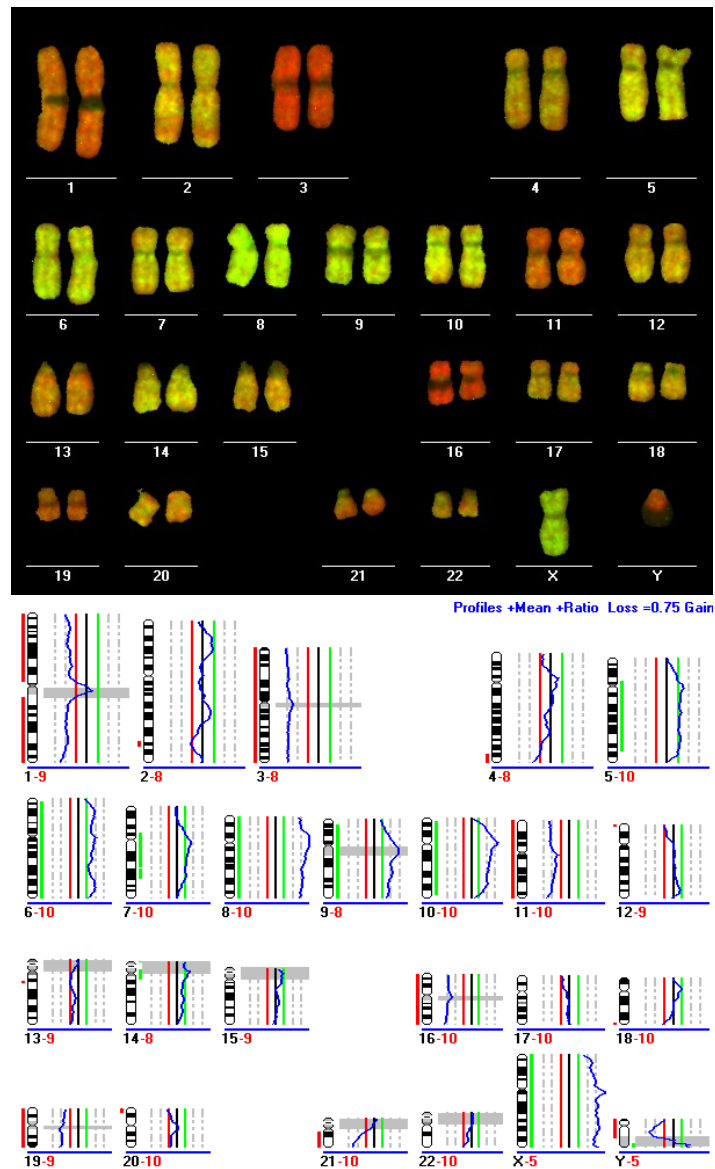


Abb. 3.8 Polkörper CGH nach WGA4 Amplifikation

Die WGA4 Methode ist daher eine robuste und schnelle Möglichkeit, die DNA von Polkörpern zu amplifizieren. Insgesamt kann nach ca. 5 Stunden mit einer DNA Ausbeute von mehreren μg gerechnet werden. In Kombination mit der Chromosomen-CGH bietet dieser Ansatz die Möglichkeit, numerische (und strukturelle, siehe unten) Chromosomenstörungen zu erkennen. Für einen High-Throughput Ansatz ist diese Kombination aufgrund der Limitationen der Chromosomen-CGH nicht geeignet. Daher wurde in den folgenden Experimenten die Chromosomen-CGH verlassen und WGA4 Amplifikate auf Array-CGH Plattformen getestet.

3.2 Array-CGH von Polkörpern

Die WGA4 Amplifikate wurden zunächst auf 44K Arrays (Agilent Human CGH Microarrays 4x44K) hybridisiert, unter Bedingungen, die bereits von uns für Einzelzellen angegeben wurden (Geigl JB *et al.*, 2007; Geigl JB *et al.*, 2006). Zusätzlich sollten andere Plattformen eingeführt werden, v.a. im Hinblick auf eine Hochdurchsatzanalyse.

Die Hybridisierung eines normalen Polkörpers auf einem 44K Array soll in Abb. 3.9 beispielhaft wiedergegeben werden. Mit Polkörperamplifikaten konnte immer ein aussagekräftiges und reproduzierbares Ergebnis erzielt werden.

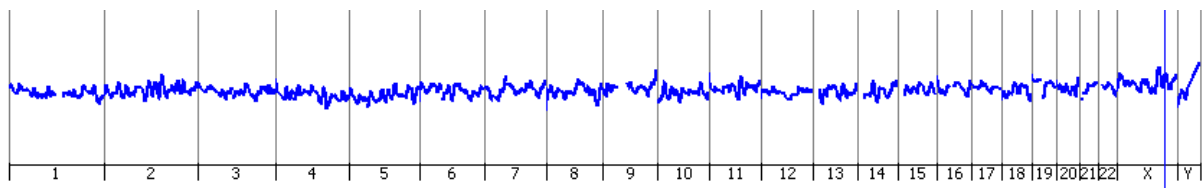


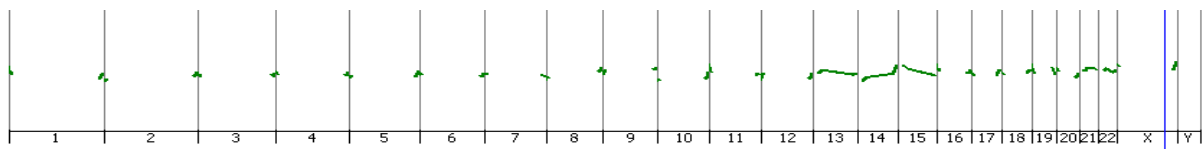
Abb. 3.9 Array-CGH Profil eines balancierten Polkörpers (44K Array)

3.2.1 Telomer Array

Diese wurden entwickelt, um, ausgehend vom 44K Array Basis-Design, die Telomerbereiche mit jeweils ca. 10 Mb vor dem physikalischen Ende abzudecken. Ziel war es, große Aneuploidien zu erkennen, weitere Regionen sollten nicht beurteilt werden.

Der Telomer Array (44K Auflösung) stellte sich technisch als robustes System dar, die Auswertung hinsichtlich Zugewinnen und Verlusten war relativ unproblematisch. Abb. 3.10 stellt die Profile eines balancierten 1. Polkörpers auf einem Telomer Array und einem konventionellen 44K Array gegenüber. Mit Hilfe des Telomer Arrays kann zu vorliegender Probe eine eindeutige Aussage getroffen werden.

Telomer Array



44K Whole Genome Array

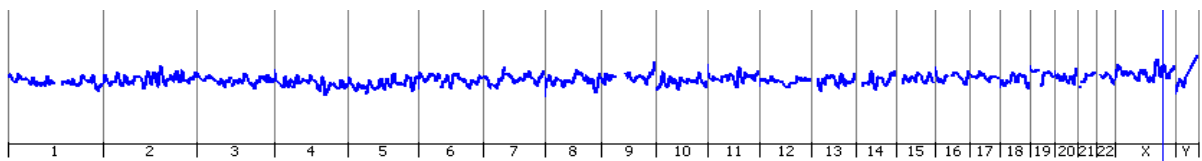


Abb. 3.10 Vergleich Telomer und 44K Array (balancierter Polkörper)

Software-basiert ist es möglich, alle Bereiche zu vergrößern, um eindeutige Beurteilungen des Profils eines einzelnen Chromosoms vornehmen zu können. Beispielhaft soll dies für die oben dargestellte Hybridisierung eines balancierten 1. Polkörpers für die Chromosomen 3 und 17 erfolgen, Abb. 3.11 und 3.12. Die grüne Profillinie (jeweils oben) zeigt die Ratio der Telomerbereiche, die blaue Linie das Gesamtprofil des Whole Genome Arrays.

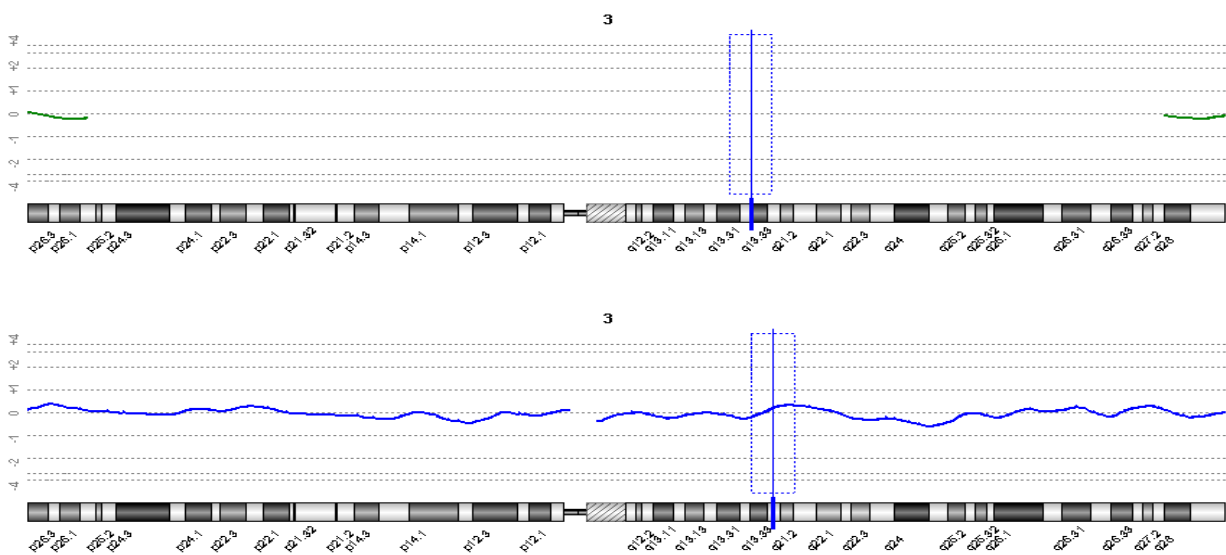


Abb. 3.11 Array-Profil: Chromosom 3 auf Telomer und 44K Array (balancierter Polkörper)

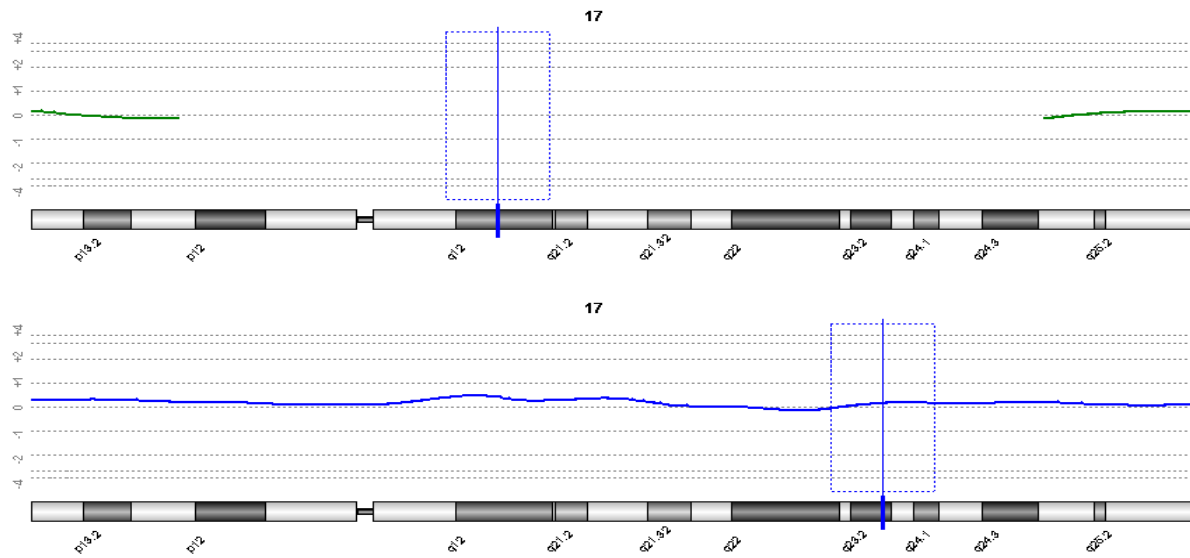


Abb. 3.12 Array-Profil Chromosom 17 auf Telomer und 44K Array (balancierter Polkörper)

Bis zu welchem Grad es möglich ist, numerische und strukturelle Veränderungen anzugeben, sollte mit unbalancierten Proben erfolgen. Ein Polkörper, der eine fehlerhafte Segregation im Rahmen einer balancierten Translokation (46,XX,t(2;4)(p16;q35)), aufweist (siehe unten), wurde auf einen Telomer und 44K-Whole Genome Array hybridisiert. Die Übersichtsprofile sind in Abb. 3.13 gezeigt, oben jeweils Profil des Telomer Arrays.

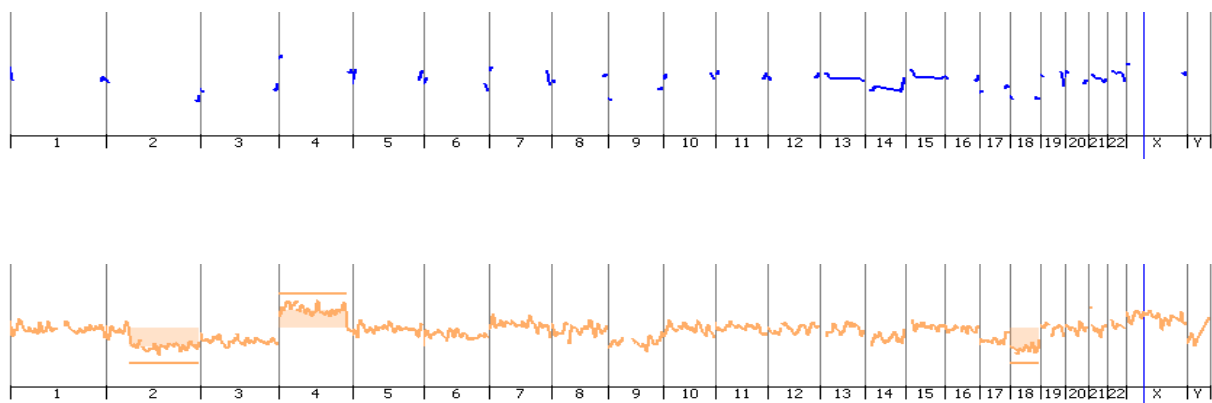


Abb. 3.13 Gesamt-Profil auf Telomer und 44K Array (unbalancierter Polkörper)

Die Vergrößerung von Chromosom 2 ist in Abb. 3.14 für jeweils den Telomer und Whole Genome Array angegeben. Der rote Pfeil im Telomerprofil deutet auf einen Verlust hin, der weiße Pfeil zeigt die balancierte Region. Der auffällige Bereich im 44K Array ist orange markiert.

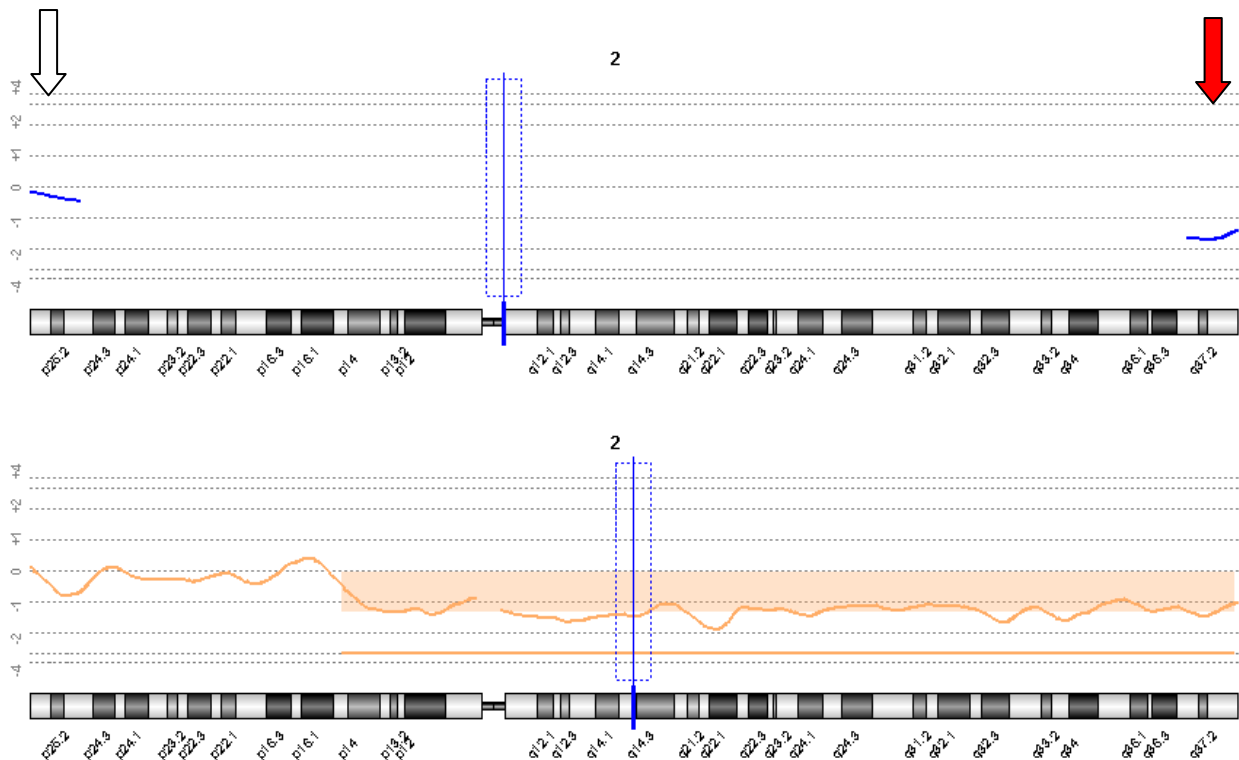


Abb. 3.14 Array-Profil: Chromosom 2 auf Telomer und 44K Array (unbalancierter Polkörper)

Die Vergrößerung von Chromosom 4 ist in Abb. 3.15 für jeweils den Telomer und 44K-Whole Genome Array angegeben. Der grüne Pfeil im Telomerprofil deutet auf einen Zugewinn hin, der weiße Pfeil zeigt die balancierte Region. Der auffällige Bereich im 44K Array ist orange markiert.

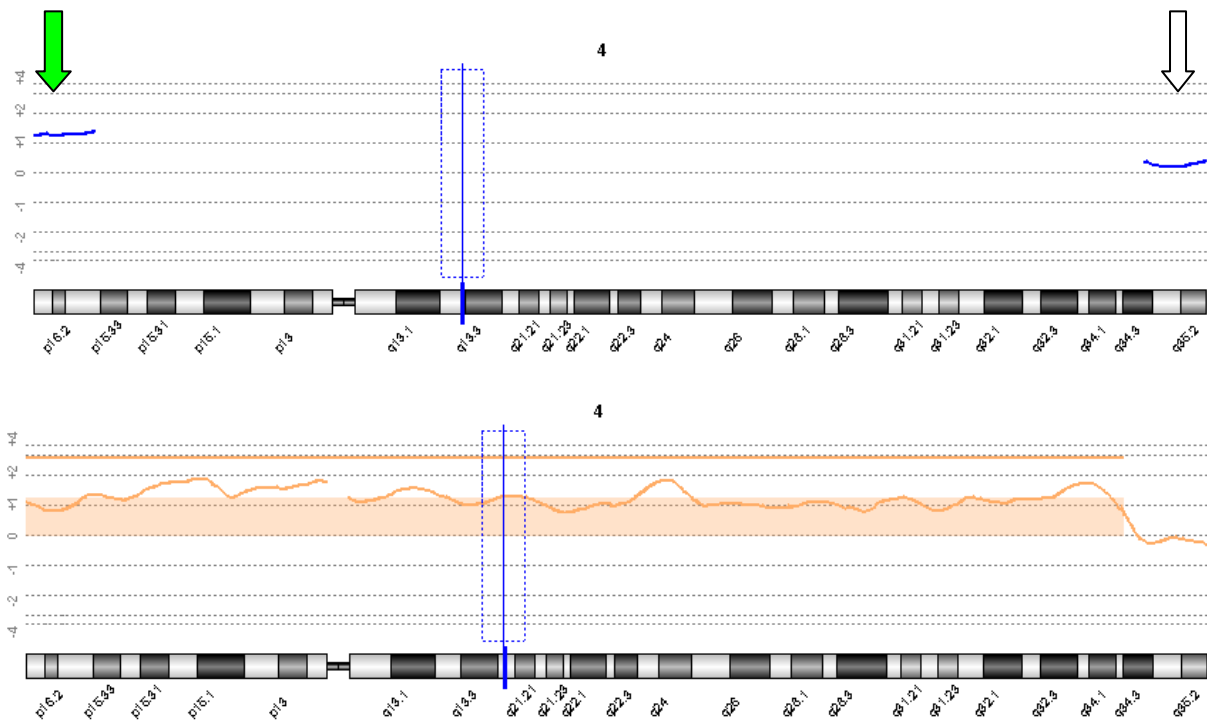


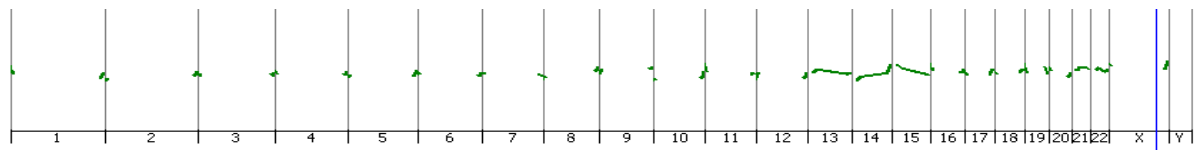
Abb. 3.15 Array-Profil: Chromosom 4 auf Telomer und 44K Array (unbalancierter Polkörper)

Wie an diesem Beispiel gut ersichtlich, können Chromosomenstörungen nur erkannt werden, wenn sie die Telomer-Bereiche mit betreffen, eine Situation, die nicht bei allen numerischen bzw. gerade strukturellen Veränderungen eintritt. Um eine höhere Sicherheit bei der Auswertung zu erhalten, wurde eine neue Array-Plattform entwickelt, die um die Centromerbereiche erweitert wurde.

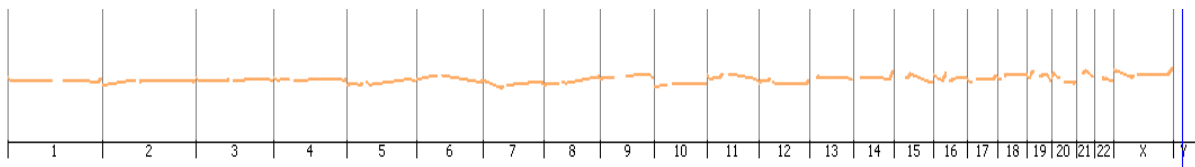
3.2.2 Telomer-Centromer Array

Der Telomer-Centromer Array (44K Auflösung) stellte sich technisch wie der Telomer Array als robustes System dar, die Auswertung hinsichtlich Zugewinnen und Verlusten war unproblematisch. Abb. 3.16 stellt die Profile eines balancierten 1. Polkörpers auf einem Telomer Array, einem Telomer-Centromer Array und einem konventionellen 44K Array gegenüber. Die Profillinie des Telomer-Centromer Arrays wird von der Auswerte-Software für jedes Chromosom als durchgezogene Linie dargestellt (hier orange).

Telomer-Array



Telomer-Centromer Array



44K Whole Genome Array

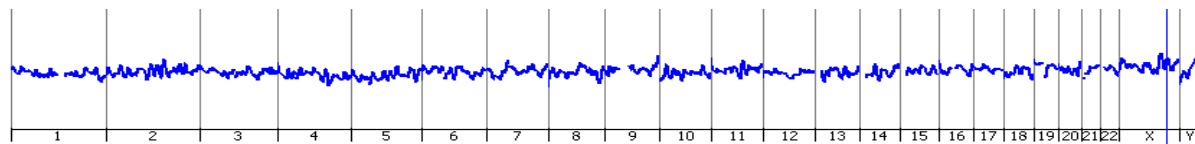


Abb. 3.16 Vergleich Telomer, Telomer-Centromer und 44K Array (balancierter Polkörper)

Ein weiterer Polkörper, der eine fehlerhafte Segregation im Rahmen einer balancierten Translokation (46,XX,t(2;4)(p16;q35)), aufweist (siehe unten), wurde auf einen Telomer und einen Telomer-Centromer Array hybridisiert. Die Übersichtsprofile und Vergrößerungen für Chromosom 2 sind in Abb. 3.17a und b gezeigt. In Abb. 3.17a weist der rote Pfeil auf die chromosomale Region hin, die verloren gegangen ist (die hybridisierten Oligonukleotide sind als grüne Punktwolke dargestellt), während der weiße Pfeil auf eine balancierte Region hindeutet (ausgeglichenes Verhältnis zwischen hybridisierten rot und grün dargestellten Oligonukleotiden). Die Auflösung kann mit einem Telomer-Centromer Array naturgemäß etwas erhöht werden, dies bringt eine zusätzliche Sicherheit bei der Auswertung ein.

Insgesamt kann mit den Telomer-Centromer Arrays eine Diagnostik von numerischen und – unter Limitationen- strukturellen Chromosomenstörungen erfolgen. Wie oben bereits erwähnt, sollte mit diesen beiden Plattformen vornehmlich auf numerische Veränderungen fokussiert werden. Um nun eine universelle Plattform zu verwenden, die v.a. für Hochdurchsatzanalysen geeignet ist, sowie um eine höhere Auflösung zu erzielen, sollte vom bestehenden 4x44K Design auf eine 8x15K Plattform gewechselt werden. Damit ist es möglich, 8 Proben gleichzeitig zu hybridisieren und nachfolgend auszuwerten.

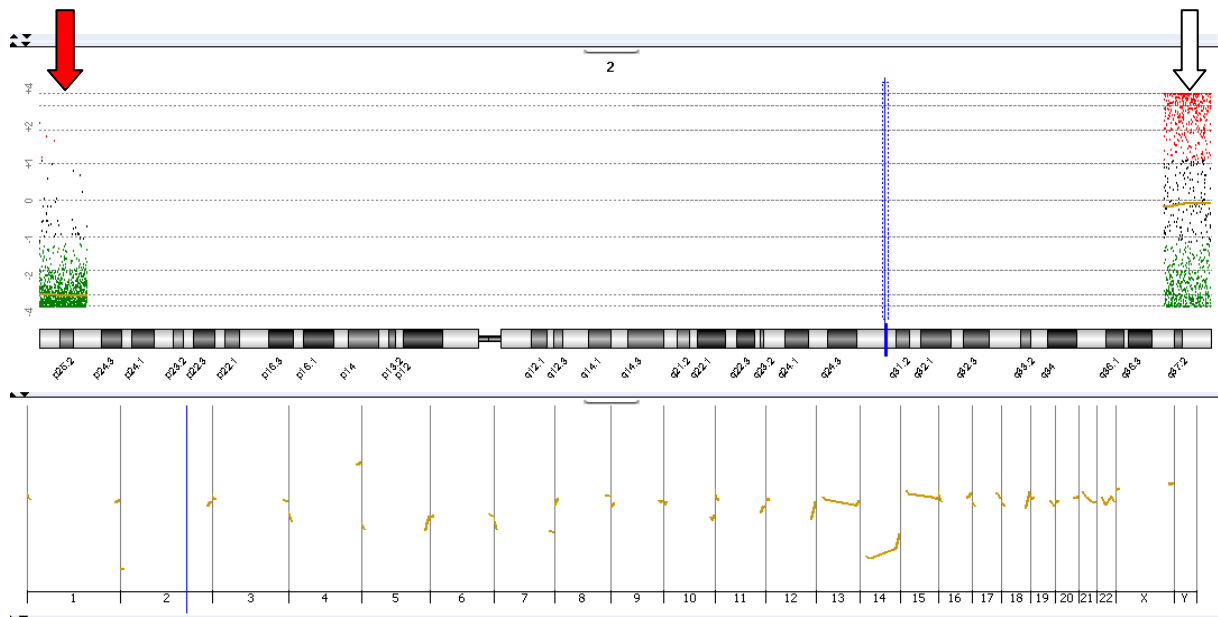


Abb. 3.17a Darstellung von Chromosom 2 und Übersichtsprüfung eines Telomer Arrays (unbalancierter Polkörper)

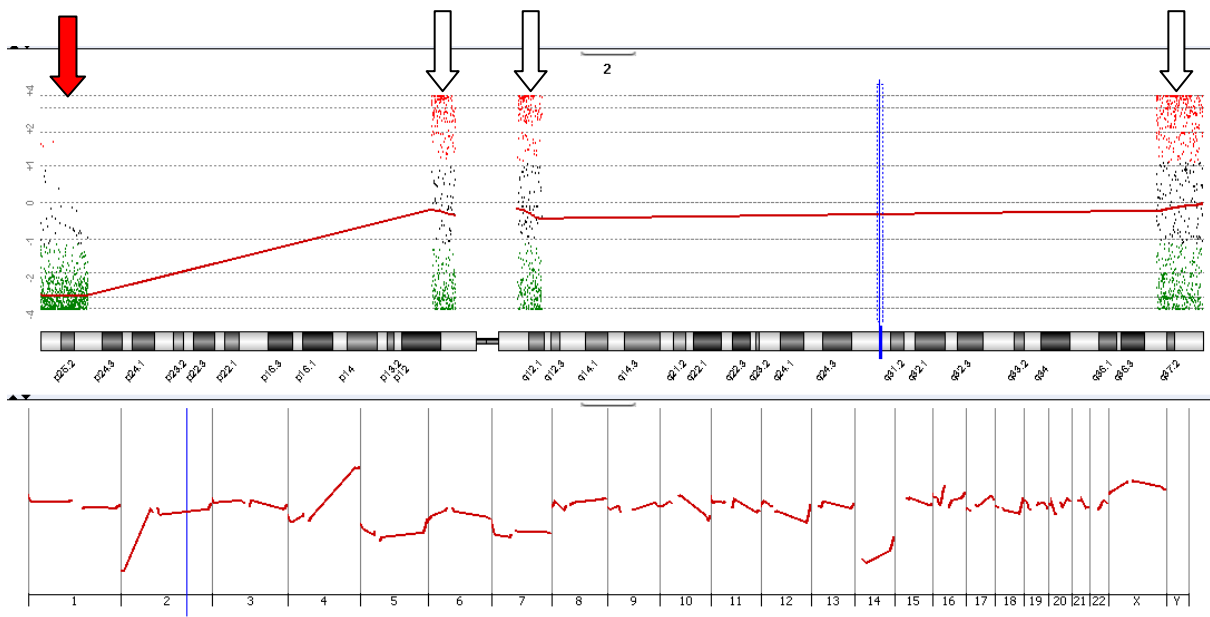


Abb. 3.17b Darstellung von Chromosom 2 und Übersichtsprüfung eines Telomer-Centromer Arrays (unbalancierter Polkörper)

3.2.3 Custom made 8x15K Arrays

Von der Amplifikation von Einzelzellen ist bekannt, dass gerade CG-reiche Regionen bzgl. einer Artefakteinführung anfällig sind. Bei den bisherigen Plattformen konnten wir dies mit der Chromosomen-CGH nur bedingt beim Chromosom 19 beobachten, das oftmals eine Tendenz zu einem genomischen Gewinn zeigte. Um diesem Bias vorzubeugen, wurde ein

neuer, ausschließlich für die Polkörperdiagnostik verwendeter, 8x15K Array entwickelt. Beim Design dieser Arrays wurden besonders CG-reiche Regionen eliminiert. Ausgehend vom 44K Array Basis-Design, wurden hierfür ausschließlich 14.262 Oligonukleotide mit einem CG-Gehalt von 36.67% verwendet.

Ferner wurde eine Änderung im Auswertemodus vorgenommen. Die bestehenden Array-CGH Programme sind für Einzelzellanalysen nur bedingt geeignet, gerade in der Polkörperdiagnostik ist eine subjektive Beurteilung der Auswertungen nicht tragbar. Daher wurde unsererseits eine Modifikation des bestehenden Auswertealgorithmus für Einzelzellen (Geigl *et al.*, 2009) vorgenommen und an den custom made 8x15K Polkörper-Array adaptiert. Abbildung 3.18 zeigt ein Beispiel für die Hybridisierung eines balancierten 1. Polkörpers auf einem custom made 8x15 Array. Bei der Interpretation wird v.a Wert auf die farbliche Zusammensetzung und Größe des Barcode-Musters gelegt. Damit kann die Größe der Veränderung abgeschätzt, sowie ein artifizielles Muster von echten Veränderungen unterschieden werden.

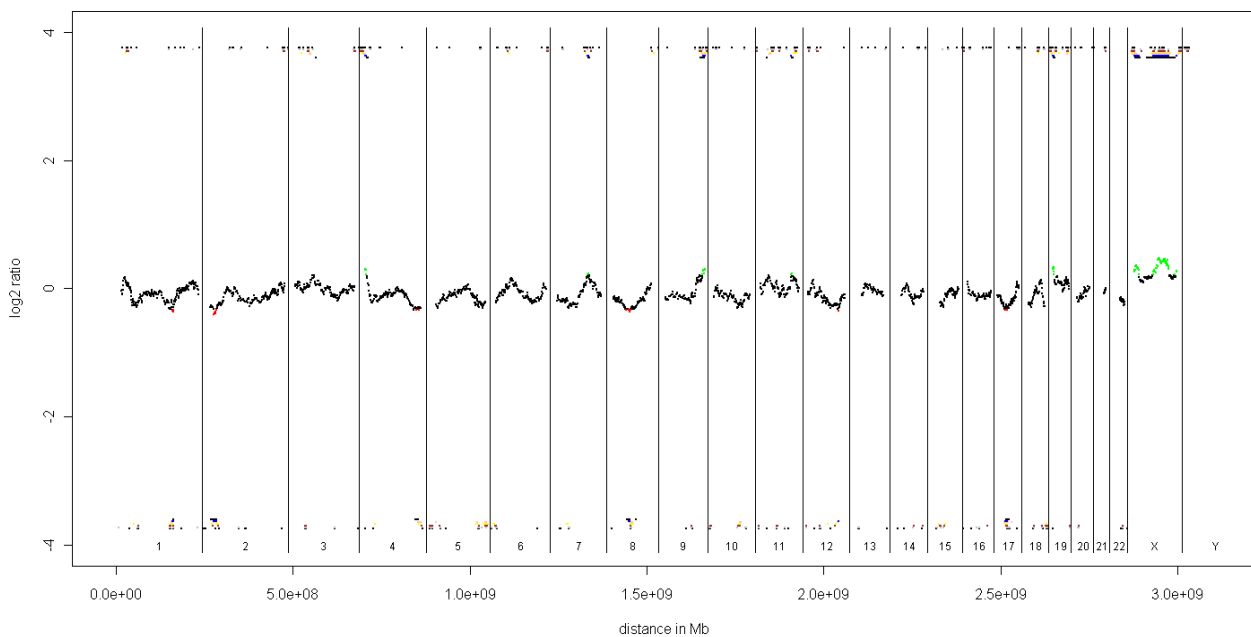


Abb. 3.18 Balancierter Polkörper auf 8x15K Plattform

Abbildung 3.19 zeigt ein weiteres Beispiel für die Hybridisierung eines 1. Polkörpers auf einem custom made 8x15K Array. Hier sind mehrere komplette Verluste ganzer Chromosomen zu erkennen, Chromosomen 4, 20, 21 und 22, zu erkennen an der roten Markierung der Profillinie, sowie v.a. aufgrund des Barcode-Musters. Die übrigen Autosomen weisen ein unauffälliges Profil auf.

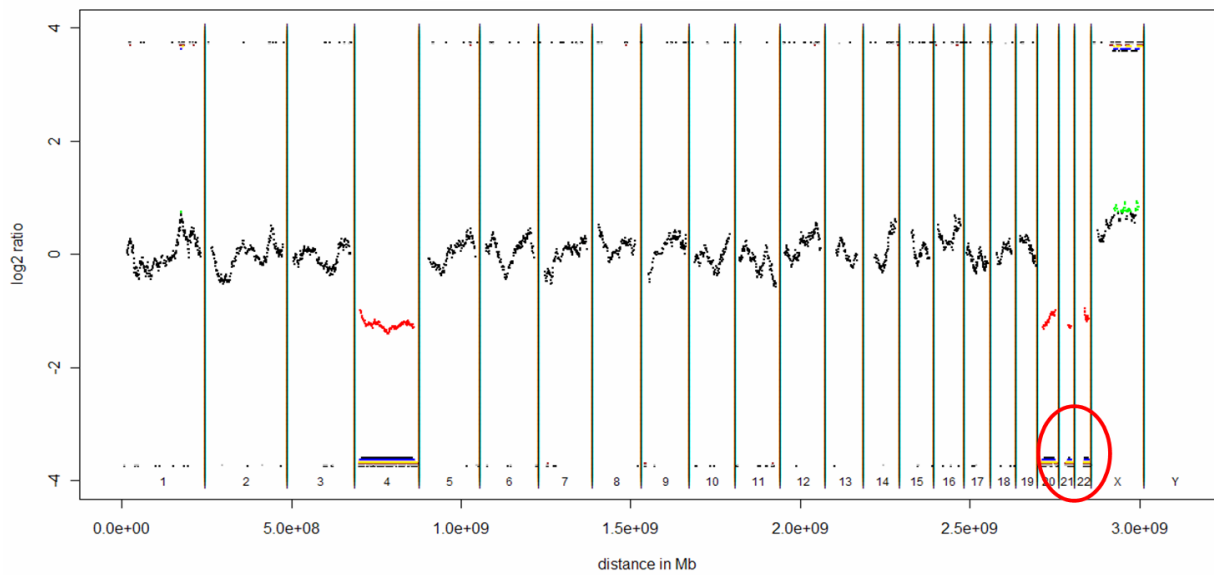


Abb. 3.19 Unbalancierter Polkörper auf 8x15K Plattform mit einigen Aneuploidien

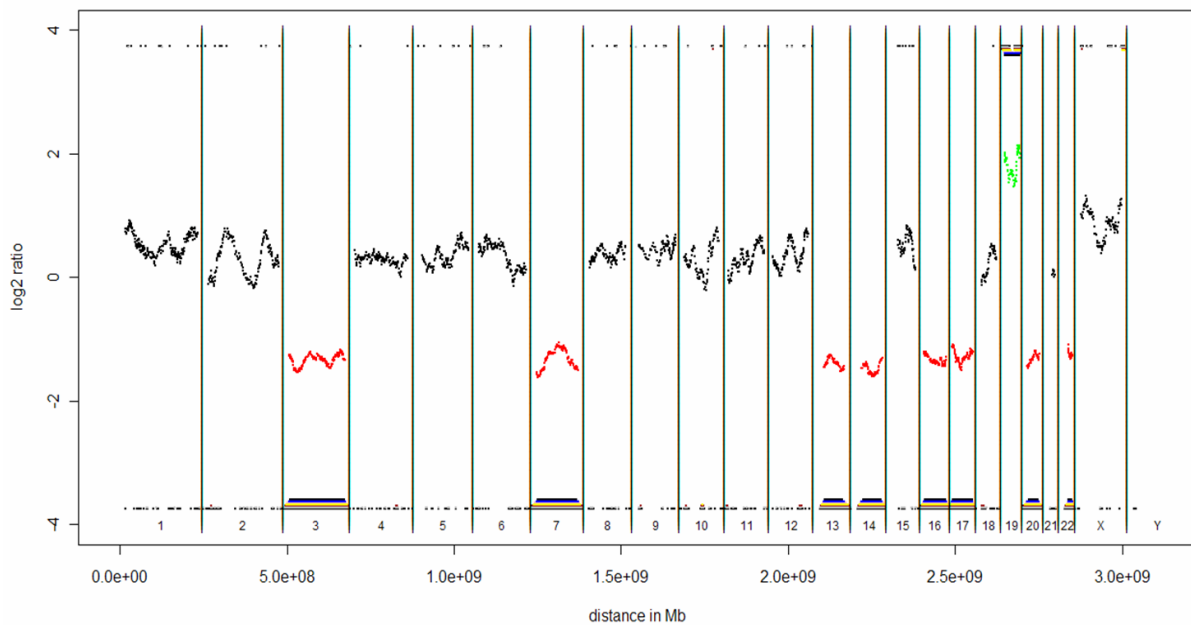


Abb. 3.20 Unbalancierter Polkörper auf 8x15K Plattform mit zahlreichen Aneuploidien

Abbildung 3.20 zeigt ein zusätzliches Beispiel für die Hybridisierung eines 1. Polkörpers auf einem custom made 8x15K Array. Hier sind multiple komplette Verluste ganzer Chromosomen offensichtlich (Chromosomen 3, 7, 13, 14, 16, 17, 20 und 22), zu erkennen an der roten Markierung der Profillinie, sowie v.a. aufgrund des Barcode-Musters. Ein deutlicher Gain von Chromosom 19 ist ferner sichtbar.

3.2.4 Auswertung von 44K und 60K Whole Genome Arrays

Der für die 15K Arrays adaptierte Auswerte-Algorithmus kann auch für höher auflösende Plattformen verwendet werden.

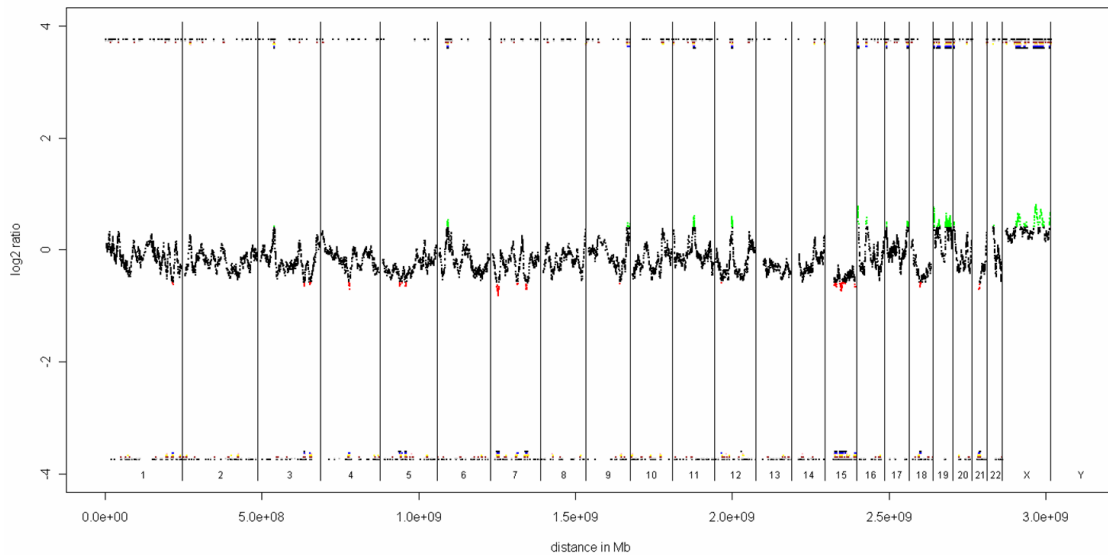


Abb. 3.21 **Balanciertes Profil eines Polkörpers auf einem 4x44K Array**

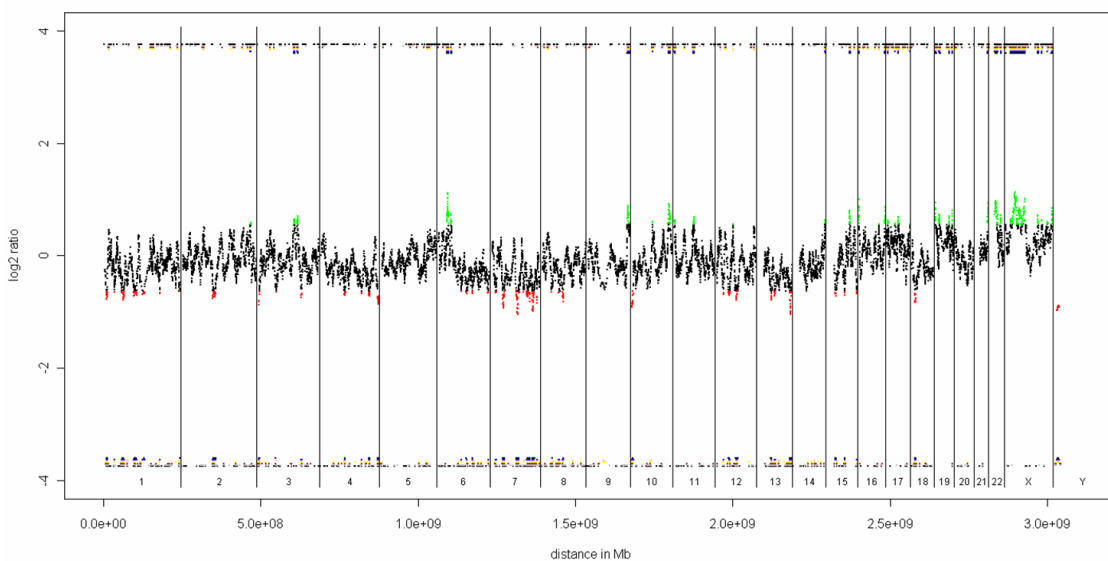


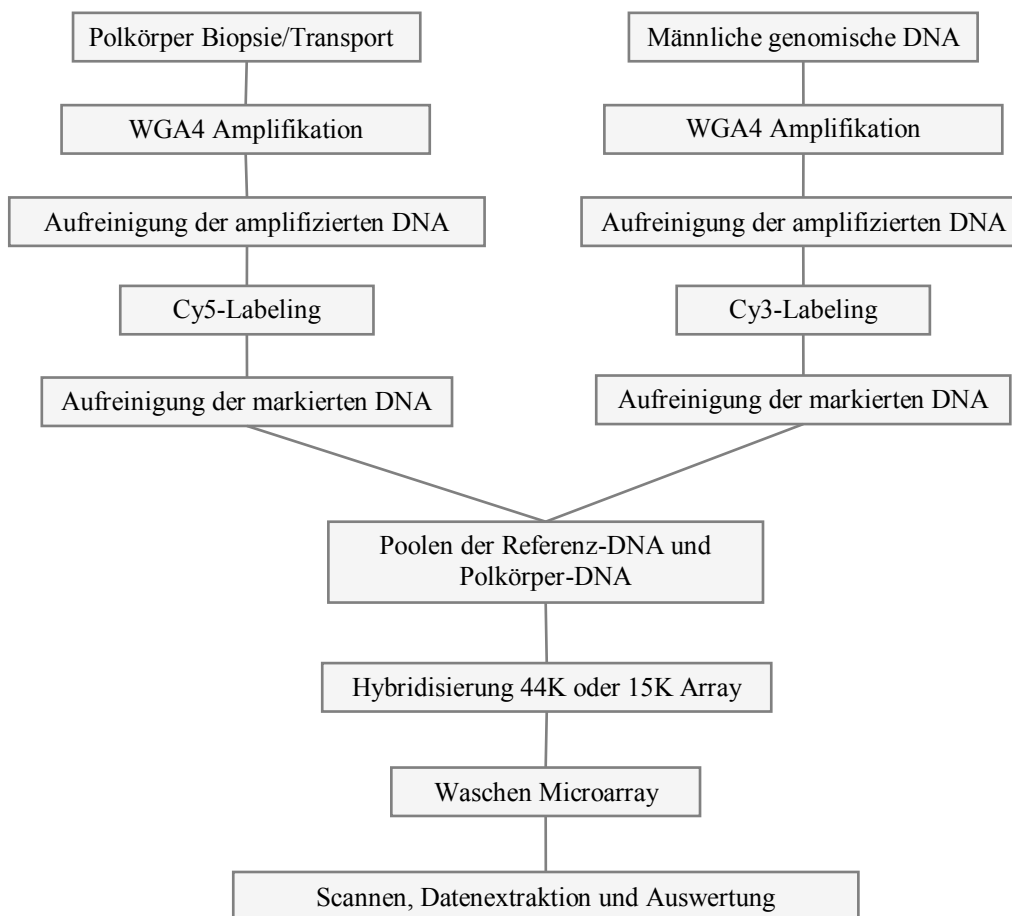
Abb. 3.22 **Balanciertes Profil eines Polkörpers auf einem 8x60K Array**

Das balancierte Profil für einen 1. Polkörper ist jeweils in Abb. 3.21 (44K Array) und Abb. 3.22 (60K Array) angegeben. Zwar ist es möglich, auf höher auflösende Arrays als 44K zu hybridisieren, ein zusätzlicher Informationsgewinn, der in der Diagnostik eine Rolle spielt, stellt sich allerdings kaum ein. Für unsere Zwecke wurden daher alle Polkörper im weiteren

Verlauf bzw. im diagnostischen Ansatz entweder auf eine 8x15K oder eine 4x44K Plattform hybridisiert.

3.3 Arbeitsablauf Polkörper-Array

Zusammenfassend kann das bisher erarbeitete Protokoll zur Durchführung einer Array-CGH von Polkörpern mit folgendem Flussdiagramm zusammengefasst werden, Tabelle 3.7.



Tab. 3.7 Ablauf der Polkörper-CGH

Der zeitliche Aufwand bis zur vollständigen Auswertung kann wie folgt angegeben werden.

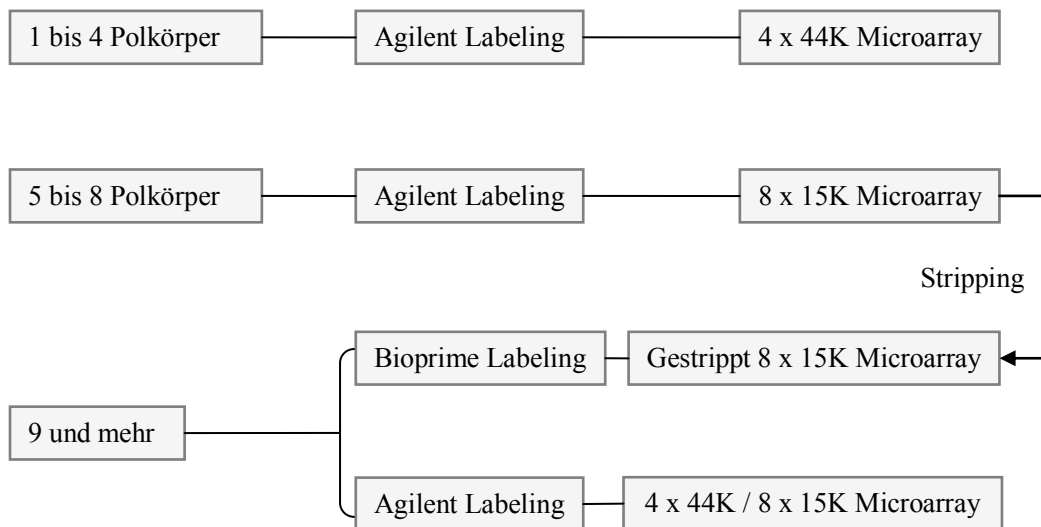
WGA4 Amplifikation/Aufreinigung/Labeling	ca. 8-9 Stunden
Hybridisierung auf Arrays	ca. 15-24 Stunden
Waschen, Scannen, Auswertung	ca. 1-2 Stunden

Diese zeitlichen Angaben können je nach zu bearbeitender Probenzahl variieren. Eine Verkürzung des Protokolls ist in erster Linie bei der Array Hybridisierung möglich, aufgrund der Transferzeiten in Österreich wurden aber keine Bestrebungen unternommen, diese deutlich zu verringern.

3.3.1 Verbesserung des Arbeitsablaufs

Vielmehr wurde im Rahmen der Verbesserung des Arbeitsablaufes darauf Wert gelegt, höhere Probenzahlen auch unter wirtschaftlich interessanten Gesichtspunkten abzuarbeiten. Eine mögliche Strategie ist es, bereits hybridisierte Arrays wieder zu verwenden, dies wird als „Stripping“ bezeichnet. Nach unserer Erfahrung können nur Arrays wieder verwendet werden, die max. 36 Stunden zuvor hybridisiert worden sind. Nach dem Waschen der Signale mittels einem definierten Protokoll, müssen diese „gestrippten“ Arrays innerhalb von 30 min. re-hybridisiert werden. Meist können nicht alle Felder des „gestrippten“ Arrays wieder verwendet werden, da sich Farbschlieren bilden können. Nach dem Scannen des „gestrippten“ Arrays wird entschieden, welche Felder für eine Re-Hybridisierung verwendet werden können. Dies trifft meist für ca. 50-60% der Felder zu.

Abhängig von der Probenzahl, können unterschiedliche Ansätze bzgl. Array-Auflösung, Stripping und Labeling verwendet werden. Werden 4 und weniger Proben bearbeitet, wird mit dem Agilent-Labeling markiert und auf einen 44K Array hybridisiert. Eine Polkörperanalyse von 5 bis 8 Proben erfolgt nach Agilent-Labeling auf einem 8x15K Array. Werden mehr als 9 Proben analysiert, erfolgt ein Stripping dieses Arrays, wobei sich eine Markierung mit entweder Bioprime- oder Agilent-Labeling bewährt hat. Folgendes Diagramm zum Ablauf kann daher erstellt werden, Tabelle 3.8.



Tab. 3.8 Arbeitsablauf bei mehreren Proben unter Berücksichtigung der Wirtschaftlichkeit

Ferner sollte eine weitere v.a. wirtschaftliche Überlegung getestet werden:

Werden 1. und 2. Polkörper im Rahmen der Polkörperpunktion in verschiedene Tubes überführt, wäre es möglich, beide Polkörper getrennt zu amplifizieren, diese DNA daraufhin zu poolen und gemeinsam auf einen Array zu hybridisieren. Dies könnte eine interessante Strategie darstellen, wenn eine Vielzahl von Proben zu bearbeiten sind. Haltbar ist dieser Ansatz allerdings nur, wenn alle Veränderungen, die im 1. und 2. Polkörper gefunden wurden auch im Pool reproduzierbar erkannt werden können. Dies wurde an mehreren Proben getestet, exemplarisch ist dies in den Abbildungen 3.23, 3.24 und 3.25 wider gegeben.

Abbildung 3.23 zeigt das Profil eines 1. Polkörpers nach Hybridisierung auf einem 8x15K Array. Es zeigt sich ein signifikanter Zugewinn von Chromosom 19, sowie ein Verlust von Chromosom 21. Abbildung 3.24 gibt das Array Profil des 2. Polkörpers wider. Deutlich ist ein Zugewinn von Chromosom 8 und Chromosom 21 erkennbar. Bzgl. des Chromosoms 21 ist in diesem Fall also die korrespondierende Eizelle balanciert, insgesamt, aufgrund der Veränderungen von Chromosomen 19 und 8, allerdings aneuploid. Werden die amplifizierten DNAs der beiden Polkörper nun auf einen 15K Array gemeinsam hybridisiert, stellt sich Chromosom 21 als unauffällig dar, ein Zugewinn von Chromosom 19 ist erkennbar. Grenzwertig signifikant ist der Zugewinn von Chromosom 8. Insgesamt kann nach unseren bisherigen Ergebnissen festgehalten werden, dass ein Poolen von amplifizierter Polkörper-DNA, eine Interpretation erschweren könnte und sich derzeit als nicht praktikabel erweist.

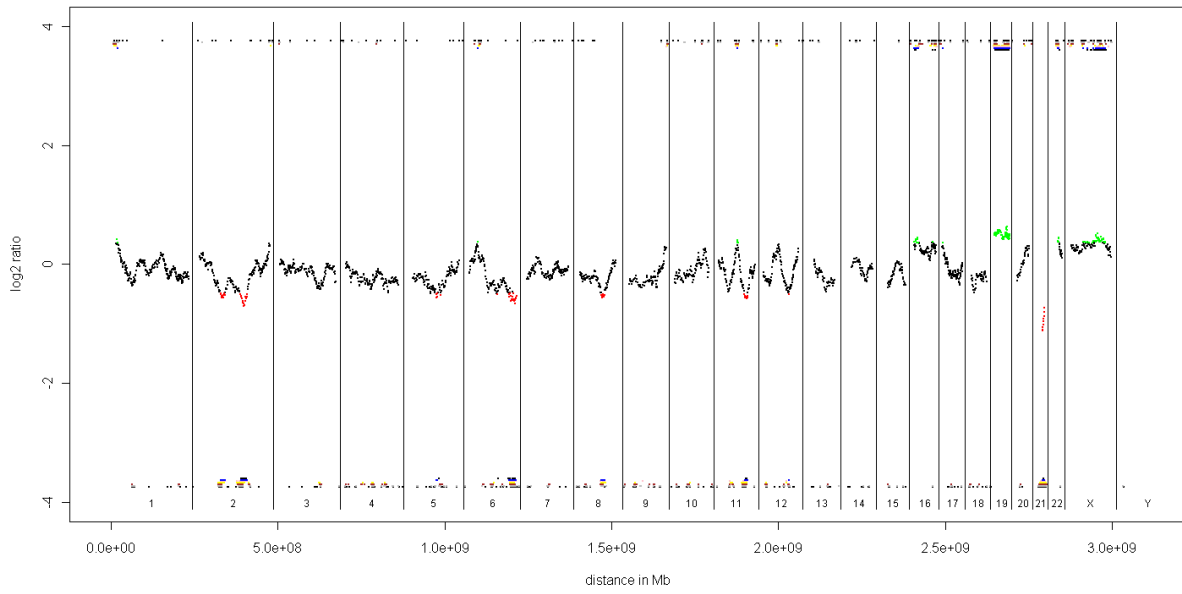


Abb. 3.23 Profil eines 1. Polkörpers auf einem custom made 8x15K Array

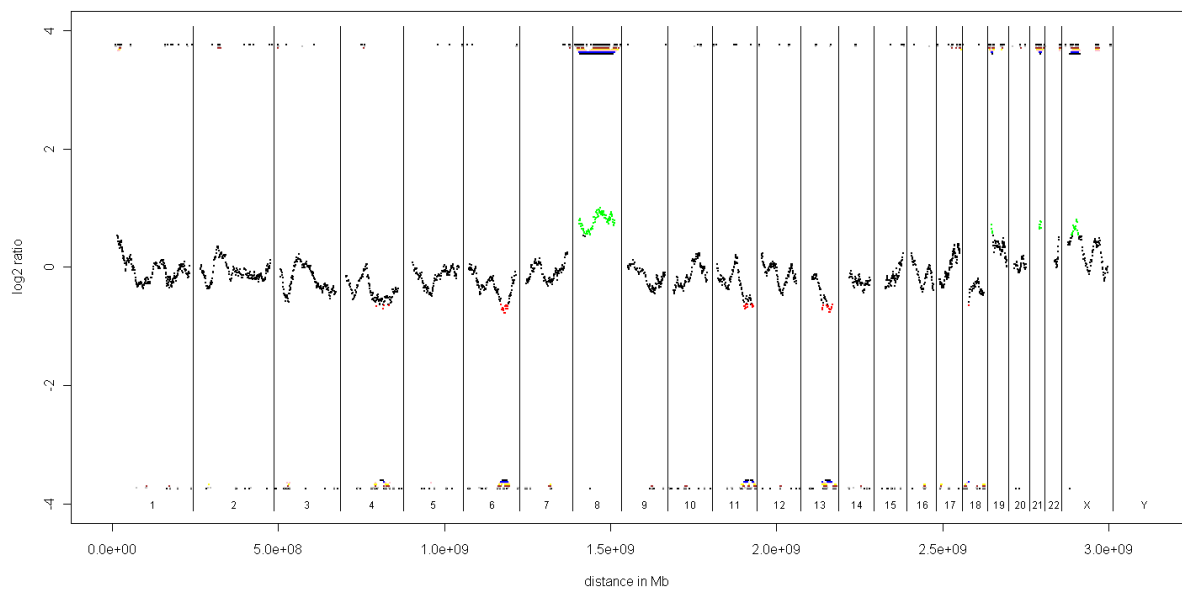


Abb. 3.24 Profil eines 2. Polkörpers auf einem custom made 15K Array

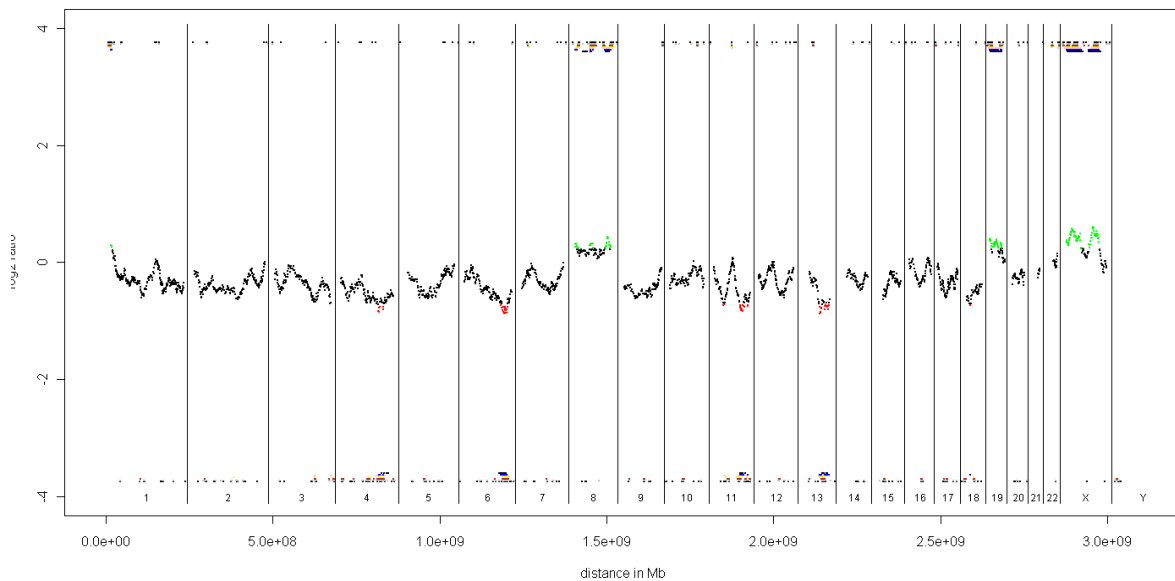


Abb. 3.25 Profil der Polkörper nach getrennter Amplifikation

3.4 Klinische Polkörperdiagnostik und Patientinnenkollektiv

Nach Etablierung der Methode erfolgte, in Kooperation mit drei österreichischen Kinderwunschzentren, eine hochauflösende Polkörperdiagnostik bei insgesamt 128 Frauen. Der Zeitraum, in dem die Diagnostik durchgeführt wurde, erstreckte sich von Dezember 2008 bis Juni 2011. Insgesamt wurden 705 Proben amplifiziert, bei 526 Proben (entsprechend 75%, Aufschlüsselung der Proben siehe unten) konnte erfolgreich eine Diagnostik abgeschlossen werden. Hier sei angemerkt, dass diese Zahl die Proben aller Zuweiser wider gibt, deren Logistik und Technik erst im Laufe des Untersuchungszeitraums aufgebaut und entsprechend angepasst wurde. Eine detaillierte und aussagekräftigere Angabe zur Effizienz des gesamten Ablaufs ist weiter unten zu entnehmen.

3.4.1 Altersgruppe der Patientinnen

Tabelle 3.9 gibt die Zahl der Patientinnen, eingeteilt in 5 verschiedene Altersgruppen, wider. 46 Frauen waren zum Zeitpunkt der Diagnose zwischen 40 und 44 Jahre alt und stellen mit 39% die dominierende Gruppe dar.

Altersgruppe [Jahre]	Anzahl Patientinnen n	Anzahl Patientinnen in [%]
25-29	6	4.7
30-34	14	10.9
35-39	46	35.9
40-44	50	39.1
>45	12	9.4
Gesamt	128	100

Tab. 3.9 Zahlenmäßige Altersverteilung

46 Frauen, entsprechend 36%, bei denen eine Polkörperdiagnostik eingeleitet wurde, waren im Alter zwischen 35 und 39 Jahren. Die beiden großen Kollektive sind in Abbildung 3.26 deutlich zu erkennen. Die Altersspanne war 28 bis 50 Jahre.

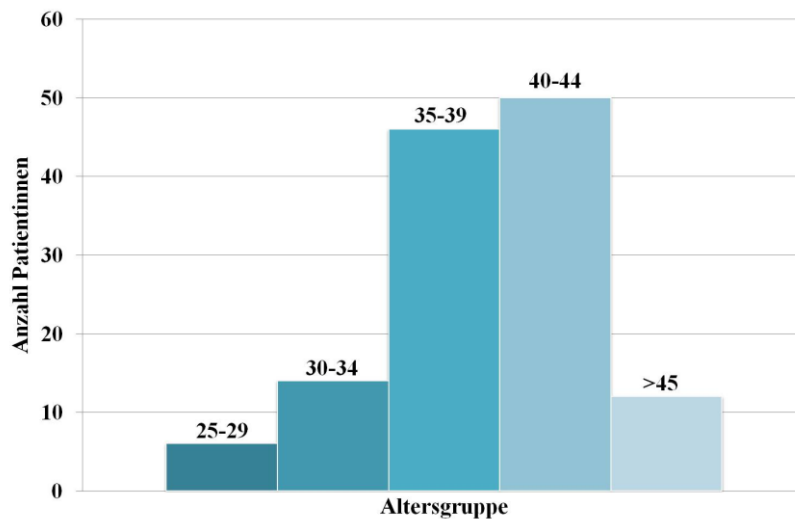


Abb. 3.26 Grafische Altersverteilung

3.4.2 Polkörperanalyse gesamt

Die erhaltenen Proben konnten im Prinzip in drei Gruppen eingeteilt werden.

1. bei einer Patientin konnten aus einer Eizelle beide Polkörper, 1. und 2. Polkörper entnommen werden. Damit ist eine vollständige Aussage zur korrespondierenden Eizelle möglich. Diese Gruppe wird als Polkörper-Paar bezeichnet, siehe Abbildung 3.27.
2. bei einer Patientin konnte technisch bedingt nur ein Polkörper entnommen werden, 1. oder 2. Polkörper.
3. bei einer Patientin konnten im Rahmen der Polkörperpunktion die beiden Polkörper technisch nicht getrennt werden. Beide Polkörper, 1. Polkörper und 2. Polkörper wurden gemeinsam in ein Eppendorf Tube überführt und unsererseits anschließend amplifiziert. Diese Gruppe wird als Polkörper-Pool bezeichnet.

Insgesamt erhielten wir 85 Polkörper-Paare (170 Polkörper Proben), 201 Polkörper, die entweder 1. oder 2. Polkörper waren, sowie 155 Polkörper-Pools. Die grafische Verteilung geht aus Abbildung 3.27 hervor.

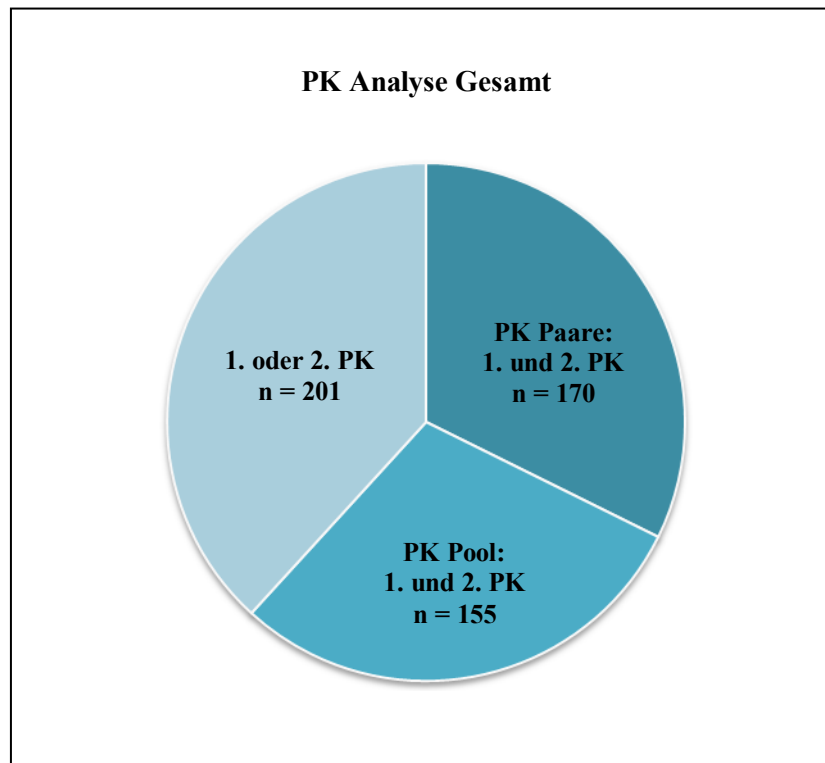


Abb. 3.27 Grafische Aufteilung aller Polkörper

3.4.3 Diagnostische Effizienz

Beispielhaft soll die Effizienz der etablierten Methode für einen Zuweiser angegeben werden, mit dem wir bereits bei der Etablierung der Methode kooperiert haben. In dieser Zeit war es für beide Seiten möglich, Technik und Logistik frühzeitig zu erlernen, um damit den Patientinnen ein robustes diagnostisches System anzubieten.

Insgesamt erhielten wir zwischen 2008 und 2011 476 Proben, von denen 424 erfolgreich amplifiziert und hochauflösend genomisch untersucht werden konnten. Dies entspricht 89% aller zugewiesenen Proben. Diese Angaben zum diagnostischen Erfolg treffen mittlerweile auf die übrigen Zuweiser ebenfalls zu und liegen in einem vergleichbaren Bereich.

3.5 Aneuploidiediagnostik

3.5.1 Analyse der Polkörper-Paare

Die 85 Polkörper-Paare (also jeweils der 1. und 2. Polkörper) entstammen 45 Patientinnen. Die altersmäßige Zuordnung ist Tabelle 3.10 zu entnehmen. Bei 33 Frauen im Alter zwischen 39 und 44 Jahren konnten in insgesamt 54 Polkörper-Paaren nur 10 balancierte Paare

identifiziert werden. Bei 6 Frauen, die zwischen 30 und 34 Jahre alt waren, waren dies hingegen 58% bei 12 untersuchten Polkörper-Paaren.

Altersgruppe (Jahre)	Patientinnen Anzahl (n)	Balancierte PK-Paare (n)	Balancierte PK-Paare [%]
25-29	3	2 von 10	20
30-34	6	7 von 12	58
35-39	16	5 von 27	18
40-44	17	5 von 27	18
> 45	3	0 von 9	0

Tab. 3.10 Altersverteilung bei balancierten Polkörper-Paaren

Die Mittelwerte sind in Tabelle 3.11 zu finden, 77% der untersuchten Polkörper-Paare wiesen insgesamt Aneuploidien auf, bei 23% waren die Paare balanciert.

Altersmittelwert (Jahre)	Analysierte PK- Paare (n)	Balancierte PK- Paare (n)	Balancierte PK- Paare [%]	Aneuploide PK- Paare [%]
38,4	85	20	22	78

Tab. 3.11 Mittelwerte bei balancierten Polkörper-Paaren

In Tabelle 3.12 wird die Verteilung der Aneuploidien auf 1. Polkörper und 2. Polkörper angegeben. Insgesamt finden sich Aneuploidien zu 20% ausschließlich im 1. Polkörper, zu 12% nur im 2. Polkörper. Bei 85 untersuchten Paaren lassen sich in 46% Chromosomenstörungen in beiden Polkörpern erkennen.

Alter (Jahre)	1.PK	1.PK	2.PK	2.PK	1.und 2. PK	1. und 2.PK
	Aneuploid (n)	Aneuploid [%]	Aneuploid (n)	Aneuploid [%]	Aneuploid (n)	Aneuploid [%]
25-29	5	50	1	10	4	20
30-34	0	0	0	0	10	42
35-39	9	33	5	19	16	30
40-44	3	11	4	15	30	56
> 45	0	0	0	0	18	100
Gesamt	17	20	10	12	78	46

Tab. 3.12 Aneuploidie Verteilung in Polkörper-Paaren

3.5.2 Analyse der Polkörper-Pools

Die 155 Polkörper-Pools entstammen 63 Patientinnen. Die altersmäßige Zuordnung und genaue Verteilung ist Tabelle 3.13 zu entnehmen. 45 von 155 dieser Polkörper-Pools waren genomisch balanciert, während 110 Proben, entsprechend 71%, Aneuploidien aufwiesen. Das beste Ergebnis mit 37% balancierter Pools fand sich in der Altersgruppe der 30-34-jährigen Frauen, hier konnten zudem 19 Pools analysiert werden. Insgesamt ist diese Beobachtung bemerkenswert, da also 63% der Pools in diesem jungen Kollektiv bereits Veränderungen aufweisen.

Alter (Jahre)	Patientinnen (n)	Balancierte	Balancierte	Aneuploide	Aneuploide
		PK-Pools (n)	PK-Pools [%]	PK-Pools (n)	PK-Pools [%]
25-29	1	1 von 3	33	2 von 3	67
30-34	4	7 von 19	37	12 von 19	63
35-39	27	19 von 75	25	56 von 75	75
40-44	26	16 von 51	31	35 von 51	69
> 45	5	2 von 7	29	5 von 7	71
Gesamt	63	45 von 155	29	110	71

Tab. 3.13 Aneuploidie Verteilung in Polkörper-Pools

3.5.3 Analyse des 1. Polkörpers

Bei 74 Patientinnen wurde die Analyse des 1. Polkörpers durchgeführt. 41 der 165 untersuchten 1. Polkörper waren balanciert, entsprechend 25%. 124 der 1. Polkörper wiesen unbalancierte Veränderungen auf, Tabelle 3.14.

Alter (Jahre)	Patientinnen (n)	Balancierte	Balancierte	Aneuploide	Aneuploide
		PK-Pools (n)	PK-Pools [%]	PK-Pools (n)	PK-Pools [%]
25-29	1	1 von 2	50	1 von 2	50
30-34	7	6 von 15	40	9 von 15	60
35-39	24	18 von 72	25	54 von 72	75
40-44	29	11 von 58	19	47 von 58	81
> 45	13	5 von 18	28	13 von 18	72
Gesamt	74	41 von 165	25	124 von 165	75

Tab. 3.14 Aneuploidie Verteilung im 1. Polkörper

3.5.4 Analyse des 2. Polkörpers

Bei wenigen Patientinnen (n=19) wurde ausschließlich die Analyse des zweiten Polkörpers durchgeführt. 4 der 22 untersuchten 2. Polkörper waren balanciert, entsprechend 18%. 10 der 2. Polkörper wiesen unbalancierte Veränderungen auf, Tabelle 3.15.

Alter (Jahre)	Pat. Anzahl (n)	gesamt PK (n)	Balancierte PK (n)	Aneuploide PK (n)
30 - 34	1	1	1	0
35 - 39	7	8	3	5
40 - 44	9	9	0	9
> 45	2	4	0	4
Gesamt	19	22	4	18

Tab. 3.15 Aneuploidie Verteilung im 2. Polkörper

3.5.5 Verteilung der Chromosomenstörungen

Abbildungen 3.28 und 3.29 zeigen für alle Polkörper-Paare, welche Chromosomen im jeweils 1. oder 2. Polkörper einen genomischen Verlust oder Zugewinn zeigten. Auf der y-Achse ist jeweils die Anzahl der beobachteten Fälle aufgetragen.

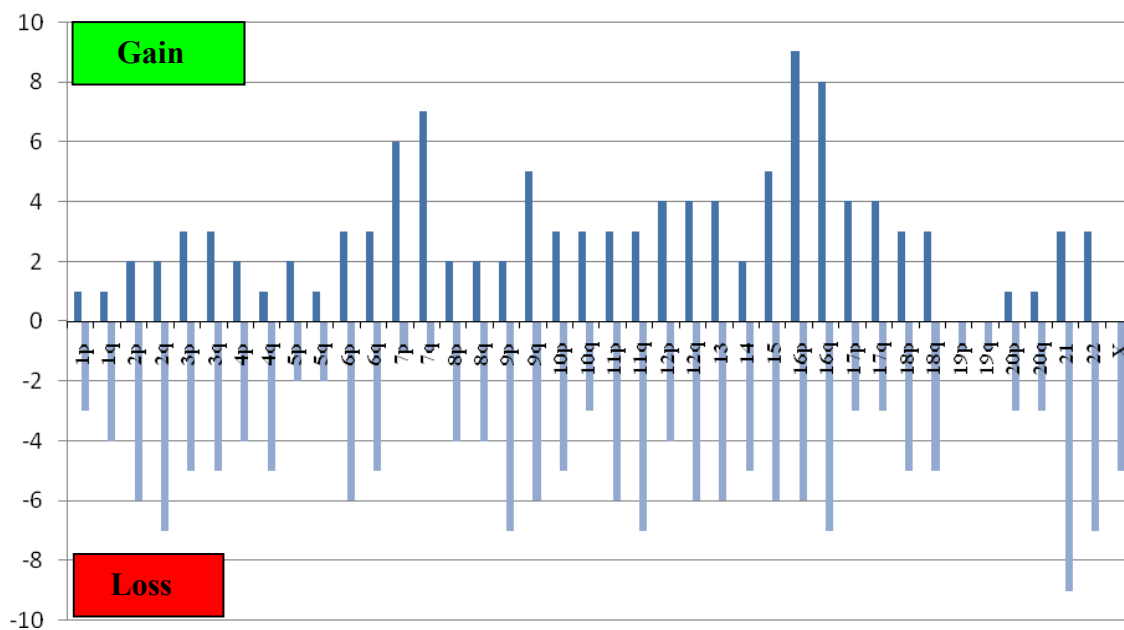


Abb. 3.28 Chromosomenstörungen im 1. Polkörper

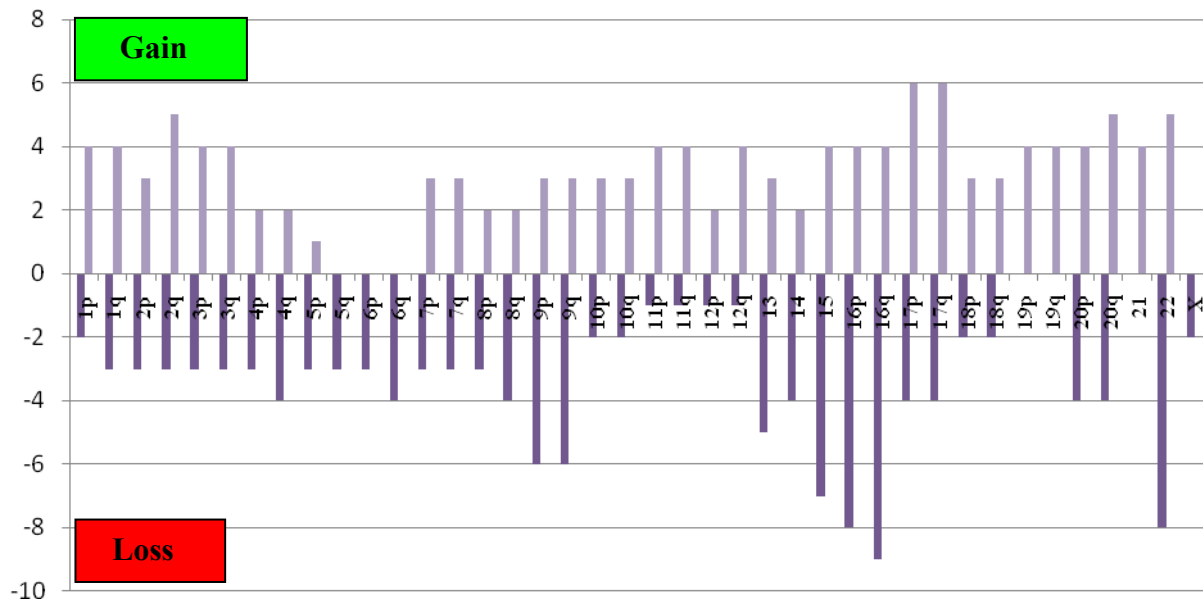


Abb. 3.29 Chromosomenstörungen im 2. Polkörper

Im 1. Polkörper weisen die Chromosomen 7, 9q, 16 häufig (>5 beobachtete Fälle) einen Zugewinn auf, während Chromosomen 2, 6, 9, 11, 12q, 13, 15, 16, 21 und 22 oftmals (>5 beobachtete Fälle) verloren sind.

Im 2. Polkörper weist Chromosom 17 häufig (>5 beobachtete Fälle) einen Zugewinn auf, während Chromosomen 9, 15, 16 und 22 oftmals (>5 beobachtete Fälle) verloren sind. In keinem Fall konnte (bei Polkörper-Paaren) im 2. Polkörper ein Verlust von Chromosom 21 beobachtet werden.

Abbildungen 3.30 zeigt für alle Polkörper-Pools, welche Chromosomen einen genomischen Verlust oder Zugewinn zeigten. Auf der y-Achse ist jeweils die Anzahl der beobachteten Fälle aufgetragen. Häufig (>5 beobachtete Fälle) zeigt sich ein Zugewinn von Chromosom 9, 14, 16 und 21. In mehr als 10 Fällen wurden Verluste der Chromosomen 2p, 4, 8p, 13, 18 und 21 beobachtet.

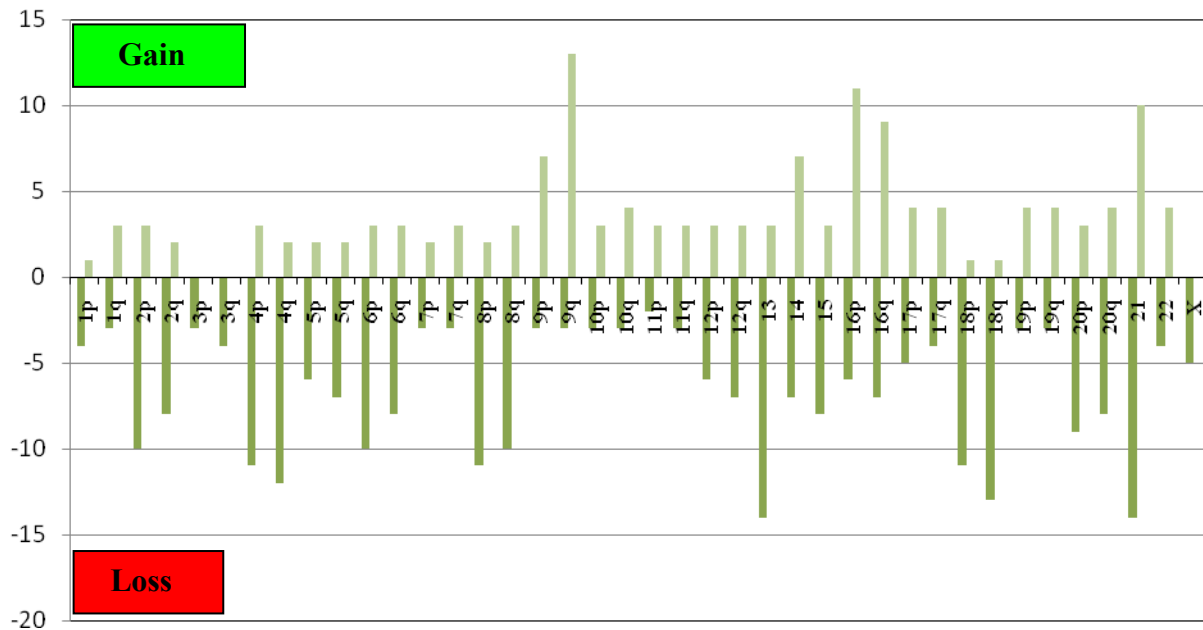


Abb. 3.30 Chromosomenstörungen in Polkörper-Pools

3.5.6 Rescue-Mechanismus

Bei 60 Polkörper-Paaren, entsprechend 120 Polkörpern, sollte nun dargestellt werden, wie oft komplementäre Veränderungen bei einem Chromosom auftreten. Dies bedeutet, welche Chromosomen im 1. oder 2. Polkörper verloren oder zugewonnen waren und im korrespondierenden Polkörper ein spiegelbildliches Profil zeigten, also für dieses Chromosom balanciert waren.

19 Polkörper-Paare zeigten solche komplementären Veränderungen, entsprechend 32% aller Polkörper-Paare, die chromosomal auffällig waren, siehe Abbildung 3.31. 17 dieser 19 Paare wiesen zusätzliche Chromosomenstörungen auf, d.h. insgesamt war das genomische Profil unbalanciert. 2 von 19 Paaren waren nach diesem „Rescue“ als balanciert einzustufen, dies betraf in einem Fall Chromosom 2, im anderen Fall Chromosom 21.

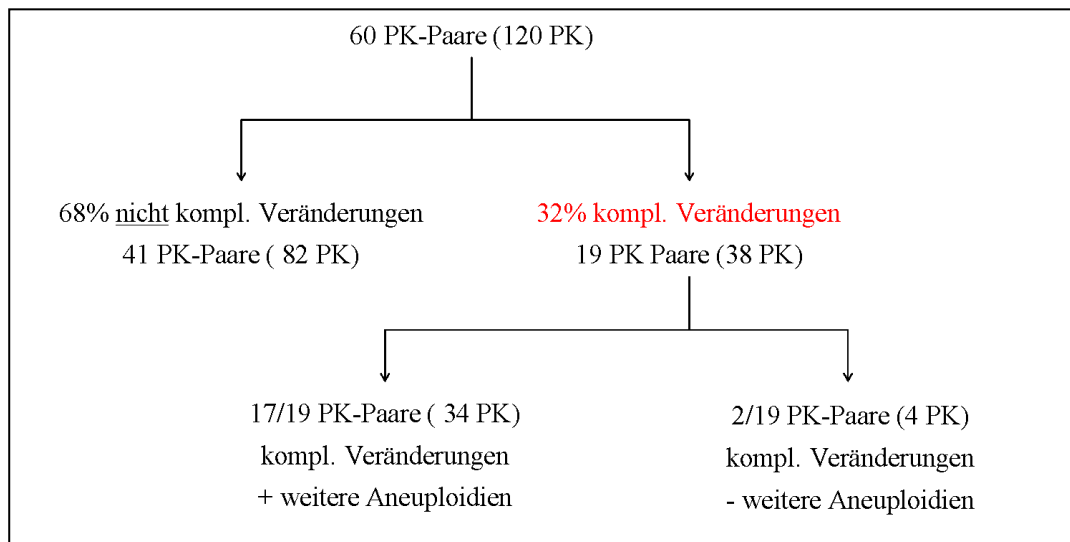


Abb. 3.31 Überblick komplementäre Veränderungen

Tabelle 3.16 gibt an, welche Chromosomen am häufigsten von diesen komplementären Veränderungen betroffen waren. Für einzelne Chromosomen waren dies Chromosom 13, 15 und 21, gefolgt von Chromosomen 16 und 22, die also v.a. einem solchen Rescue-Mechanismus unterliegen.

Chromosom	Kompl. Veränderung Anzahl
1q	1
2	1
2q	1
3	1
9p	2
9q	2
10	1
11	1
13	4
15	4
16	3
17	1
18	1
20	2
21	4
22	3

Tab. 3.16 Komplementäre Veränderungen, beteiligte Chromosomen

3.6 Strukturelle numerische Veränderungen

Ferner sollte das vorliegende Protokoll auf strukturellen numerischen Veränderungen getestet werden. Dies erfolgte an Polkörpern von Frauen mit einer balancierten reziproken Translokation sowie einer Robertsonschen Translokation.

3.6.1 Hochauflösende Polkörperdiagnostik bei balancierter Translokation

14 erste Polkörper einer Patientin mit einer de novo aufgetretenen balancierten reziproken Translokation [46,XX,t(2;4)(p16;q35)] wurden amplifiziert. 12 Amplifikate konnten für eine weitere Diagnostik verwendet werden, wobei alle Proben zunächst mit einer Chromosomen-CGH analysiert wurden. Wie oben bereits beschrieben, sind aufgrund der Translokation 16 mögliche meiotische Segregationen möglich, die zu distinkten chromosomalen Aneuploidien unter Beteiligung der Chromosomen 2 und 4 führen. Mit Hilfe der Chromosomen-CGH war es möglich, in 10 von 12 Fällen diese strukturellen Veränderungen zu erkennen und ihrem Segregationsmodus zuzuordnen. Lediglich 1 Polkörper dieser 12 untersuchten Proben zeigte ein balanciertes Profil.

Ein Adjacent-1 Segregationsmuster, das aus der Kombination eines der(2) und einem normalen Chromosom 4 oder eines normalen Chromosoms 2 und einem der(4) resultiert, wurde in 2 Fällen beobachtet. Als Beispiel ist in Abbildung 3.32 das CGH-Karyogramm und –Profil eines Polkörpers mit einer Adjacent-2 Segregationsstörung gezeigt, die in zwei Zellen beobachtet werden konnte. Die vorliegende Veränderung kam durch eine Kombination eines normalen Chromosom 4 und dem der(4) zustande.

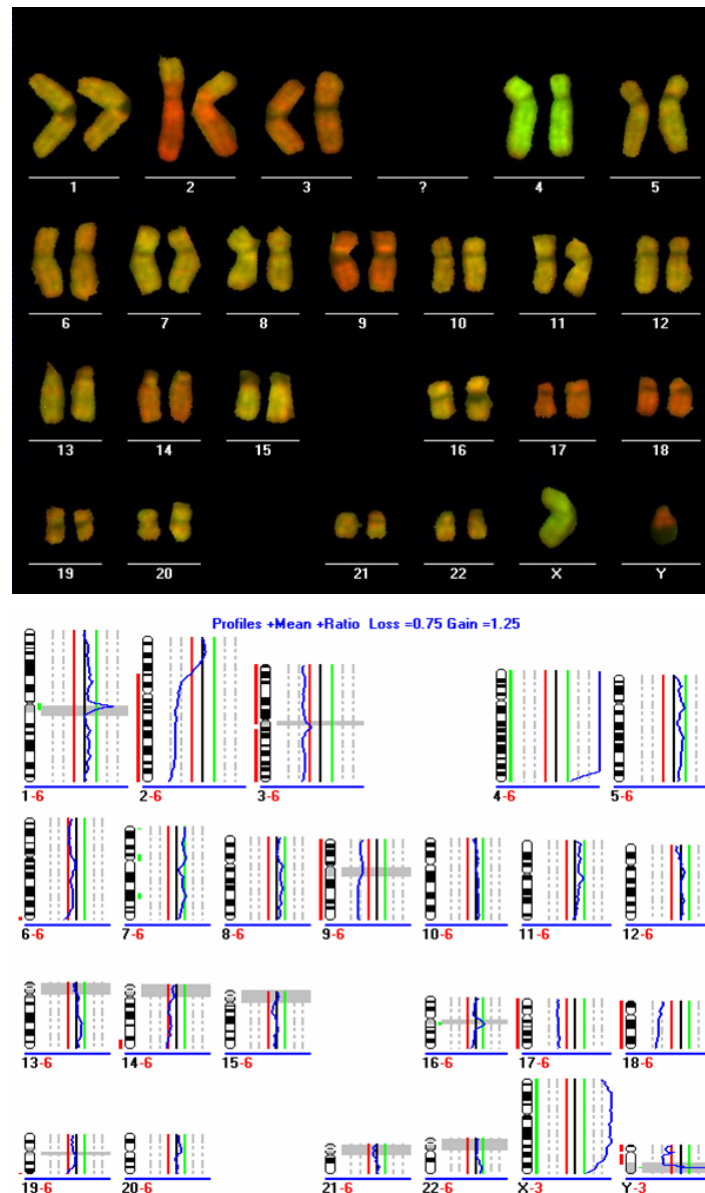


Abb. 3.32 **Adjacent-2 Segregationsstörung bei t(2;4)(p16;q35)**

Bei einer 3:1 Veränderung segregieren entweder die beiden normalen Chromosomen im Quadrivalent zusätzlich ein Translokationschromosom. Dies resultiert dann in einer tertiären Trisomie. Wenn zwei Translokationschromosomen und ein normales Chromosom segregieren, spricht man von einer Interchange Trisomie. Eine tertiäre Monosomie oder Interchange Monosomie beschreibt den Fall, wenn nur ein Chromosom (normal oder derivativ) weitergegeben wurde. Abbildung 3.33 zeigt eine solche 3:1 Segregationsstörung im Sinne einer tertiären Monosomie, hier wurde nur das der(2) weitergegeben. Einem Polkörper konnte aufgrund seines Profils ein 4:0 Segregationsmuster zugewiesen werden, hier war eine vollständige Überrepräsentation der Chromosomen 2 und 4 erkennbar.

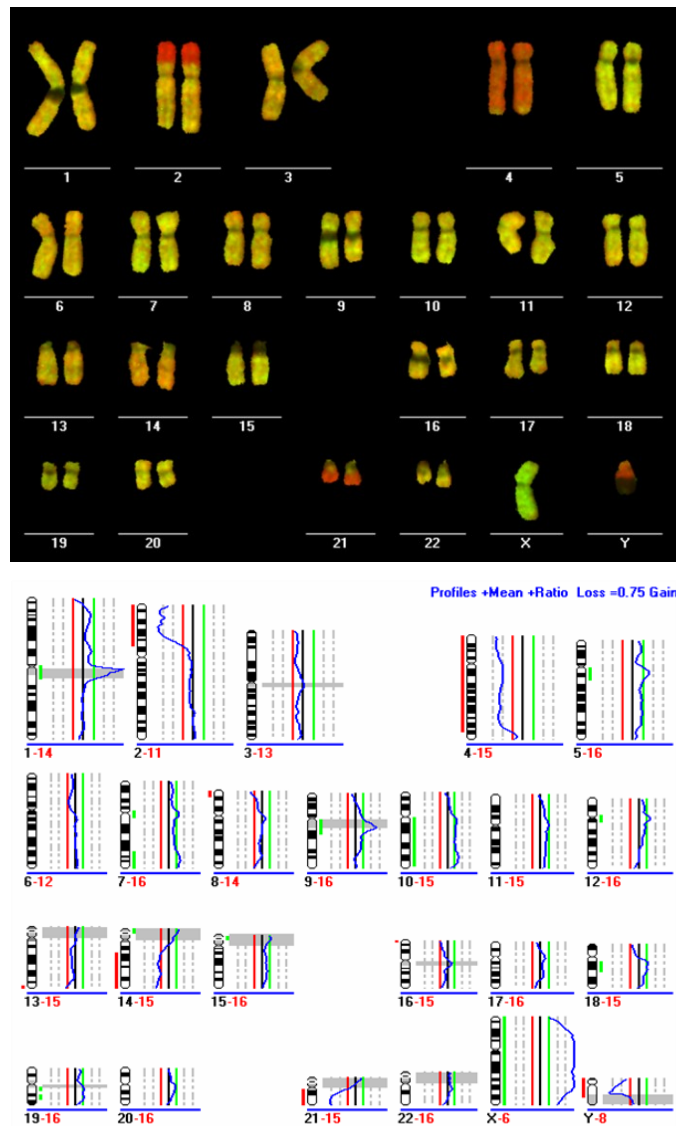


Abb. 3.33 Tertiäre Monosomie, Segregationsstörung bei $t(2;4)(p16;q35)$

Das Translokationsfragment auf Chromosom 2 (pter→2p16.1) umfasst ca. 55 Mb und war mit der Chromosomen-CGH immer deutlich erkennbar. Das Fragment auf Chromosom 4 hingegen (4q35→4qter), ist mit einer Größe von ca. 10 Mb deutlich kleiner und konnte gerade im Bereich 4q in einigen Fällen nur schwer erkannt werden. Damit kann, ähnlich einer internen Kontrolle, die Auflösungsgrenze der Chromosomen-CGH im Rahmen der Polkörperdiagnostik abgeschätzt werden, die damit über 10 Mb und deutlich unter 50 Mb liegen muss.

Abbildung 3.34 zeigt das Array-CGH Profil (44K Plattform) derselben Zelle mit Adjacent-2 Segregationsstörung, die oben für die Chromosomen-CGH dargestellt wurde. Deutlich sind die Veränderungen auf den Chromosomen 2 und 4 erkennbar.

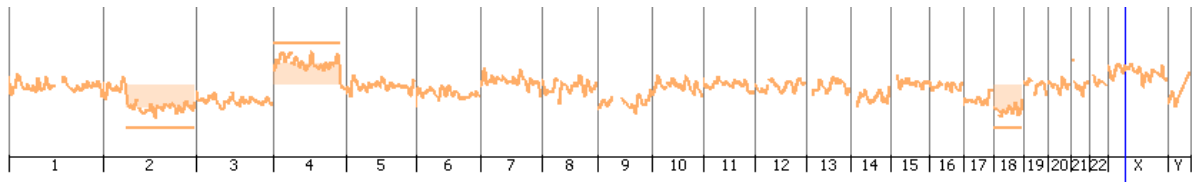


Abb. 3.34 Array-CGH Profil eines Polkörperers mit Adjacent-2 Segregationsstörung bei $t(2;4)$

Abbildung 3.35 stellt in der Vergrößerung die Chromosomen 2 (oben) und 4 (unten) dieser Array-CGH dar, die Bruchpunkte können genau kartiert werden und zeigen den deutlichen Auflösungsgewinn als Vorteil dieser Technik.

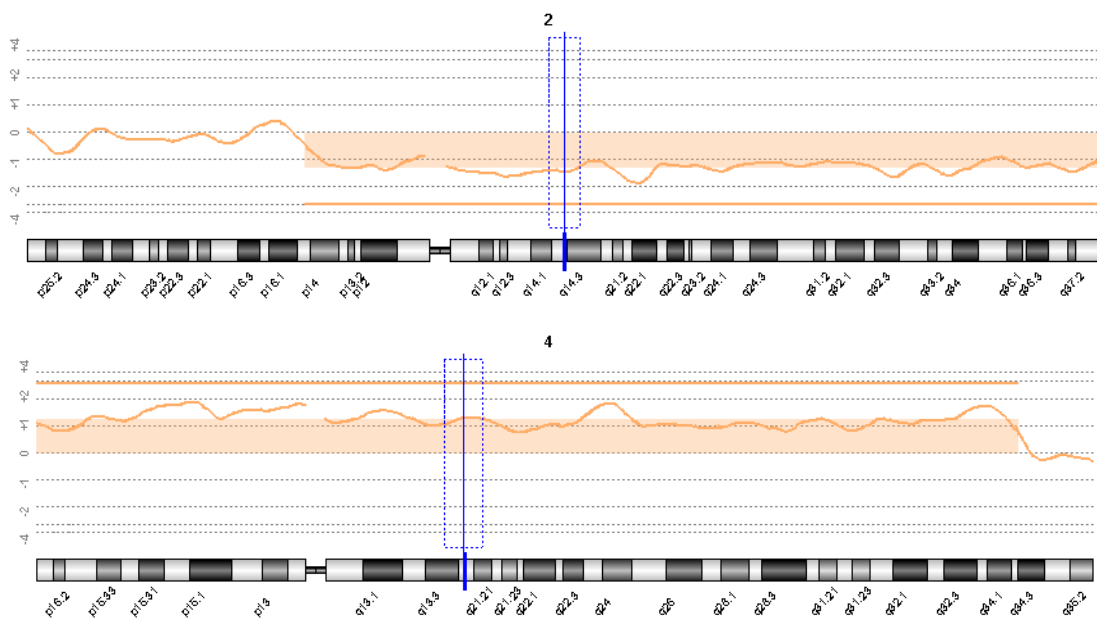


Abb. 3.35 Array-CGH Profil der Chromosomen 2 und 4 einer Zelle mit Adjacent-2 Segregationsstörung bei $t(2;4)$

Dieser zusätzliche Informationsgewinn durch die verbesserte Auflösung soll mit Hilfe der Abbildung 3.36 veranschaulicht werden. Mit der Array CGH (Agilent 44K Plattform) wird bei einem Polkörperer ein Zugewinn auf Chromosom 4q deutlich sichtbar (rechts im Bild), der mit der konventionellen Chromosomen-CGH so nicht darstellbar ist (links). Mit Hilfe der Array-CGH war es nun möglich, alle Profile bzw. Zellen eindeutig einem Segregationsmodus zuzuordnen.

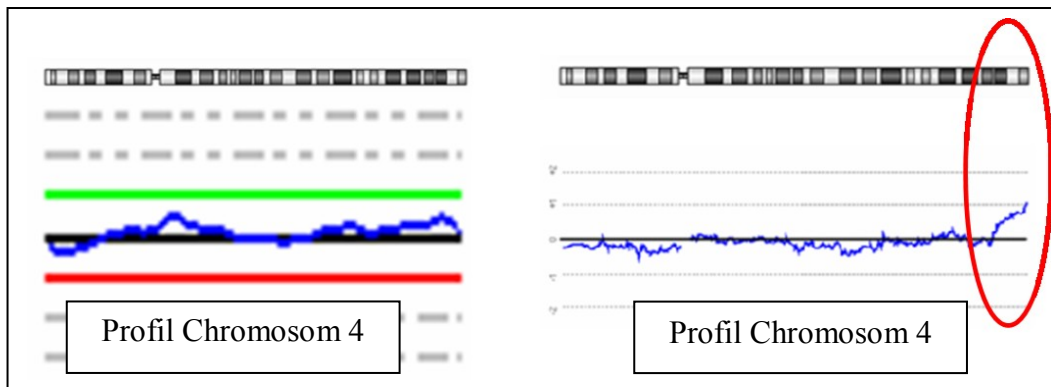


Abb. 3.36 Darstellung Chromosom 4 Profil eines Polkörper mit Chromosomen-CGH und Array-CGH bei t(2;4)

Mit der Array-CGH konnten zudem Chromosomenveränderungen erkannt werden, die nicht ganze Chromosomen betraf, sondern sich als „segmental“ (terminal oder interstitiell) darstellten. In den untersuchten 12 Polkörpern wurden 55 Aneuploidien festgestellt, davon 69% als loss/gain ganzer Chromosomen bzw. 31% als segmentale Aneuploidien.

Beispielhaft sei dies in Abbildung 3.37 dargestellt. Links ist im Array-Profil ein Verlust der distalen 15q Region sichtbar, während in einem anderen Polkörper ein Verlust der fast kompletten 18p Region deutlich wird.

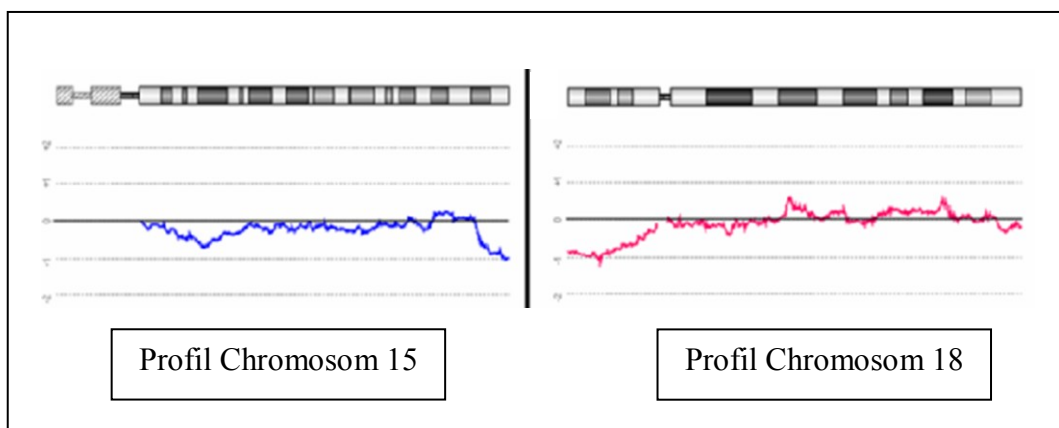


Abb. 3.37 Darstellung Chromosom 15 und 18 Profil eines Polkörper mit Array-CGH bei t(2;4)

Im oben genannten Zeitraum wurden insgesamt 46 Polkörper-Paare von 4 Patientinnen mit balancierter Translokation untersucht. 89% dieser Zellen wiesen Segregationsstörungen auf, die zu einer unbalancierten Situation führten, Tabelle 3.17.

Translokation	Polkörper-Paare (n)	Segregationsstörungen (n)
46,XX,t(2;4)(p16;q35)	12	11
46,XX,t(3;15)(q28;q25)	16	14
46XX,t(3;15)(q26.2;p11.2)	6	5
46,XX,t(5;13)(q31;q13)	12	11
Gesamt	46	41

Tab. 3.17 Zusammenfassung der Segregationsstörungen bei Translokationen

3.6.2 Hochauflösende Polkörperdiagnostik bei Robertsonscher Translokation

Bei einer Trägerin mit Robertsonscher Translokation (46,XX,rob(13;14)(q10;q10)) wurde zweimalig eine Polkörperdiagnostik vorgenommen. Beim ersten Versuch wurden 10 Polkörper-Paare amplifiziert, bei allen konnte eine Array-CGH eingeleitet werden. Von diesen 10 Paaren zeigten 3 eine fehlerhafte Verteilung im Sinne einer Adjacent-Segregation (30%), insgesamt konnten 2 Paare als genomisch balanciert eingestuft werden.

Beim zweiten Versuch wurden 9 Polkörper-Paare amplifiziert, eine Array Diagnostik war bei allen 9 Paaren möglich. Hier wiesen 3 dieser 9 Paare (33%) eine Adjacent-Segregation auf. 4 Polkörper-Paare waren hier als genomisch balanciert zu werten. Hier lag also eine alternierende Segregation vor, weitere Aneuploidien konnten nicht nachgewiesen werden. Im Vergleich zu balancierten Translokationen scheinen bei der Robertsonschen Translokation fehlerhafte Segregationen seltener aufzutreten.

Die hochauflösende Array-CGH Analyse dieser Polkörper wurde auf einer 8x15K Plattform durchgeführt. Abbildung 3.38 zeigt das Profil eines Polkörpers bei der oben beschriebenen Robertsonschen Translokation. Deutlich ist der genomische Verlust des Chromosoms 13 zu erkennen.

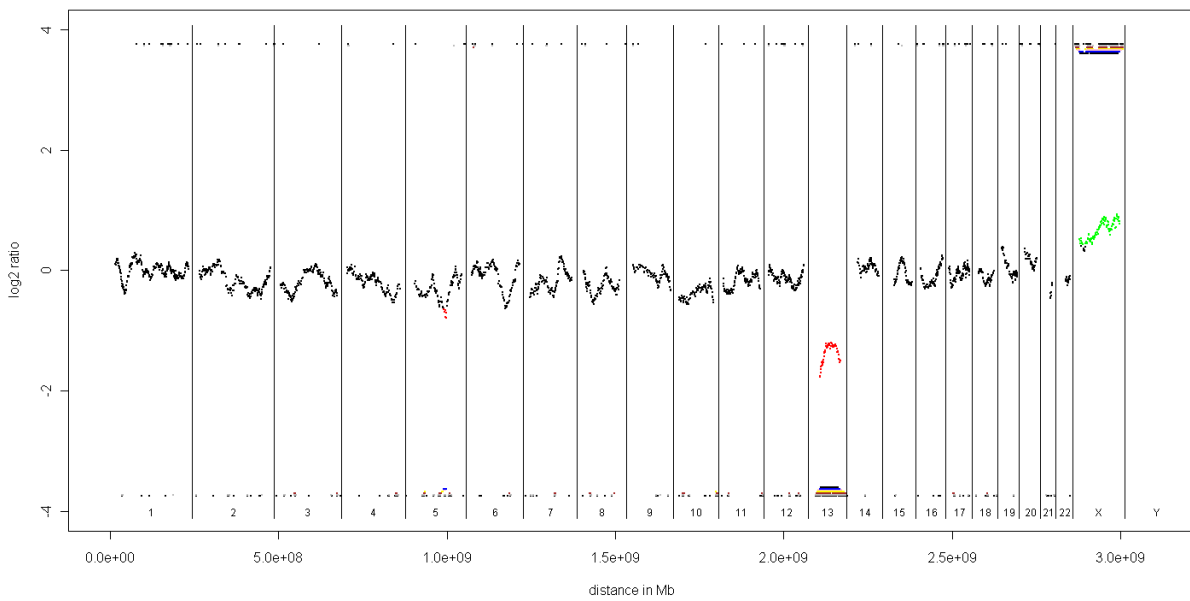


Abb. 3.38 Array-CGH Profil einer Adjacent-Segregation bei rob(13;14)

In Abbildung 3.39 ist das Profil eines Polkörperchers bei der oben beschriebenen Robertsonischen Translokation dargestellt, hier ist der genomische Zugewinn des Chromosoms 14 zu erkennen.

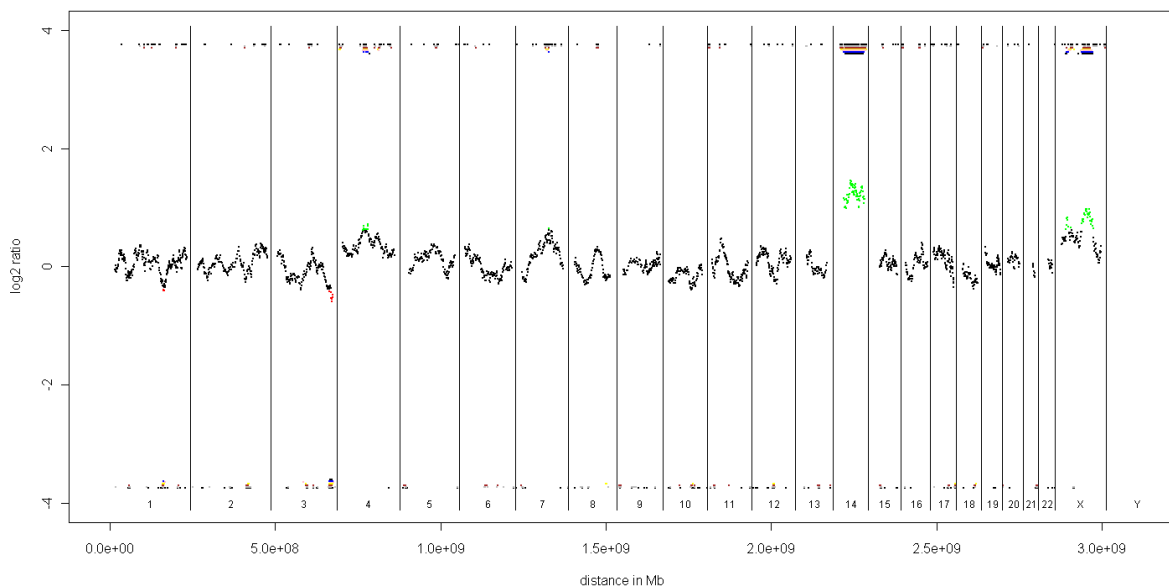


Abb. 3.39 Array-CGH Profil einer Adjacent-Segregation bei rob(13;14)

4 DISKUSSION

Mit Hilfe der IVF Methode wurde am 25. Juli 1978 um 11.47 Uhr im Oldham General Hospital (Cambridge) ein 2,6-Kilo-Baby per Kaiserschnitt zur Welt gebracht – Louise Joy Brown. Der britische Forscher und Embryologe Robert Edwards, „Erfinder“ der künstlichen Befruchtung, erhielt hierfür im Jahre 2010, im Alter von 85 Jahren, den Medizin-Nobelpreis. Diese Verleihung unterstreicht die zunehmende Bedeutung der künstlichen Befruchtung, die sie in den letzten Jahren erfahren hat. Aufgrund des ungebrochenen gesellschaftlichen Trends zu einer späteren Mutterschaft ist zukünftig vermehrt mit altersbedingten Fruchtbarkeitsproblemen bzw. Störungen in der Verteilung des Erbmaterials zu rechnen. Für Kinderwunschpaare, die ein erhöhtes genetisches Risiko aufweisen, wäre für die Reduktion dieses Risikos im Rahmen einer künstlichen Befruchtung eine weitere Diagnostik wünschenswert. Eine solche Diagnostik sollte technisch reproduzierbar durchführbar, mit ethischen und rechtlichen Vorstellungen konform und natürlich finanziell planbar sein und keine zusätzliche soziale Hürde für Familien unterer Einkommenschichten darstellen. Als Richtwert für die Finanzierung wurde ein durchschnittliches Monatseinkommen herangezogen. Gerade hier setzt die thematische Zielsetzung der vorliegenden Arbeit an. Es sollte ein Protokoll zur gesamt-genomischen Amplifikation von Polkörper-DNA etabliert werden, das es erlaubt, eine hochauflösende Diagnostik von möglichen genomischen Zugewinnen und Verlusten, die während der weiblichen Gametogenese entstehen, durchzuführen. Es sollte eine geeignete Plattform evaluiert werden, mit deren Hilfe es möglich ist, auch Hochdurchsatz-Analysen durchführen zu können. Nach Etablierung eines robusten Protokolls, sollte die Untersuchung von Polkörpern bei Frauen im Rahmen der assistierten Reproduktion erfolgen, um damit auftretende numerische und strukturelle Chromosomenstörungen erfassen zu können.

Aufgrund der gesetzlichen Vorgabe ist in Österreich, wie auch in Deutschland, Italien und der Schweiz, eine Präfertilisationsdiagnostik im Sinne einer Polkörperdiagnostik möglich. Die Entnahme sowie die Analyse der beiden Polkörper erlaubt -als Surrogat-Marker- den Nachweis der genetischen Konstitution der korrespondierenden Eizelle. Im Gegensatz dazu, werden bei der Präimplantationsdiagnostik (PID) einzelne Blastomere entnommen und es wird, quasi mit einer direkten Diagnostik, auf die genetische Konstitution des Embryos rückgeschlossen. Damit sollen vornehmlich numerische chromosomale Aberrationen, unbalancierte strukturelle Chromosomenstörungen, wie z.B. adjacent segregierte

Translokationen und monogene Erkrankungen mit schicksalhafter Verlauf verfolgt werden. Ziel dieser Techniken ist es, vornehmlich die Erfolgsraten bei der assistierten Reproduktion und bei monogenen Erkrankungen zu steigern, indem betroffene Eizellen von einem Transfer ausgeschlossen werden. Die Präimplantationsdiagnostik ist, international gesehen, die bevorzugte Methode, da sowohl der maternale als auch der paternale Anteil des Embryos untersucht werden kann. Allerdings muss sowohl diese Technik als auch der Nutzen der Präimplantationsdiagnostik kritisch diskutiert werden. Die Studie von Mastenbroek *et al.* (Mastenbroek *et al.*, 2007) hat eine lebhaft Diskussion über die Bedeutung der Aneuploidie-Testung im Rahmen der Präimplantationsdiagnostik entfacht. Hier wurde eine Blastomeruntersuchung mit der FISH-Technik bei 408 Frauen (836 IVF-Zyklen) vorgenommen. Die Präimplantationsdiagnostik reduzierte hier signifikant die Raten der Lebendgeburten nach In-Vitro-Fertilisation bei Frauen mit erhöhtem mütterlichen Alter. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Munné (Munné *et al.*, 2005) eine Steigerung der Baby take-home-rate. Nach wie vor ist es unklar, ob die Präimplantationsdiagnostik einen hohen Stellenwert in der Aneuploidie-Testung einnimmt. Als Problem der Blastomerbiopsie wurde eine Unsicherheit in der Diagnostik durch das Auftreten von embryonalen Mosaiken erkannt. Le Caignec (Le Caignec *et al.*, 2006) zeigte komplexe Muster von chromosomalen Imbalancen in sechs individuellen Blastomeren. Unter diesen Störungen wurde eine Monosomie 21 in vier Blastomeren erkannt, während die anderen Zellen ein unauffälliges Muster für das Chromosom 21 zeigten. Ferner wird diskutiert, ob die Entnahme von einzelnen Blastomeren den Embryo in seiner weiteren Entwicklungsfähigkeit und/oder Implantation beeinträchtigt, also dieser in der Lage ist, überhaupt den Verlust der Blastomeren auszugleichen. Seit Juli 2011 ist durch eine Gesetzesänderung die Präimplantationsdiagnostik in Deutschland, unter gewissen Voraussetzungen, erlaubt. Ob dies zum Nutzen der Kinderwunschaare ist, muss an dieser Stelle kritisch hinterfragt werden.

Als Alternative zur Diagnostik mütterlich bedingter numerischer und struktureller Chromosomenstörungen bietet sich daher die Polkörperbiopsie an. Die beiden Polkörper entstehen im Rahmen der meiotischen Teilung und sind für die weitere Entwicklung der Eizelle bzw. des Embryos ohne Bedeutung. Die Polkörperdiagnostik hat sich in Deutschland und in Österreich, vor allem aufgrund der bisher limitierten Gesetzeslage, in reproduktionsmedizinisch und genetisch tätigen Zentren etabliert und wurde vornehmlich mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) im Rahmen der pränatalen Aneuploidie-Diagnostik eingesetzt. Die FISH-Technik weist aber deutliche Nachteile auf. Die

Aussagekraft bezüglich der Anzahl der zu untersuchenden Chromosomen ist sehr stark eingeschränkt, beruhend auf der Anzahl von Fluoreszenz-Farben bzw. Chromosomensonden. Unterschiedliche Protokolle versuchten mehrere Hybridisierungsrounden eines Präparates durchzuführen, um damit die Analyse von normalerweise fünf untersuchten Chromosomen, auf zumindest das Doppelte zu steigern. Einerseits bedeutet dies aber einen zusätzlichen Zeitfaktor, der gerade in Deutschland mit 20 bis 22 Stunden eine große Bedeutung hat. Andererseits nimmt mit jeder Hybridisierungsrunde auch die Sichtbarkeit der FISH-Proben ab, wodurch eine robuste Auswertung zusätzlich erschwert wird (Munné, 2009). Die Evaluierung der FISH-Signale kann sich infolge des unspezifischen Hintergrundes bzw. mangelnder Hybridisierungseffizienz als schwierig, wenn nicht gar unmöglich, gestalten. Aufgrund der Zellpräparation können Polkörper nicht selten zu einer fragmentierten Morphologie führen und zudem die Auswertung negativ beeinflussen. Durch die zweidimensionale Betrachtung der Zellen im Mikroskop kann ferner eine methodisch bedingte falsche Bewertung der Signale nicht ausgeschlossen werden.

Es liegt daher nahe, Protokolle zu etablieren, die diese Limitationen umgehen können. In der vorliegenden Arbeit testeten wir zunächst zwei Methoden zur Amplifikation von einzelnen Zellen, die Linker-Adapter PCR und die WGA4-Amplifikation. Beide Methoden sind in unserer Arbeitsgruppe zur Vervielfältigung des Genoms von (vor allem) Tumorzellen etabliert und veröffentlicht worden. Die Anwendbarkeit dieser Techniken auf haploiden Zellen, also Polkörpern, wurde bisher noch nicht umfassend getestet. Bei der Linker-Adapter-PCR (Geigl *et al.*, 2007) wird zunächst die DNA mit einem Restriktionsenzym *MseI* geschnitten und anschließend mit Hilfe der Oligonukleotide Lib1 und ddMSE11 global amplifiziert. Die Oligonukleotide dienen hierbei als Adapter zur Vervielfältigung aller DNA-Fragmente, unabhängig von deren Sequenz. Die Polkörper, die wir zum Test der Linker-Adapter-PCR erhielten, wurden mit Hilfe der Laserdissektion isoliert. Die erhaltenen DNA-Konzentrationen nach der Polkörperamplifikation waren zwischen 90 und 150 ng/ μ l in einem Bereich, der bisher von uns auch für diploide Zellen angegeben werden konnte (Geigl *et al.*, 2007). Insgesamt ist bei der Linker-Adapter-PCR mit einem Zeitbedarf von ca. 33 Stunden zu kalkulieren. Dieser resultiert aus einem Lyse- und ProteinaseK-Verdauenschritt von 15 Stunden, sowie einer Ligation über Nacht. Wir haben daher versucht, die Gesamtzeit der Linker-Adapter-PCR zu verkürzen, indem eine sogenannte Rapid-Ligation eingeführt wurde, was den Arbeitsablauf um 10 Stunden auf nunmehr ca. 22 Gesamtstunden verkürzte. Dennoch bleibt die Linker-Adapter PCR eine Technik, die, aufgrund ihrer Komplexität, nicht für eine

Hochdurchsatzanalyse in Frage kommt. Dennoch wurde getestet, inwieweit die Produkte der Linker-Adapter PCR eine gesamtgenomische Darstellung mit Hilfe der Metaphasen-CGH geeignet ist. Hierbei wurden die Polkörperamplifikate zusammen mit der Referenz-DNA auf normale Chromosomen eines männlichen Spenders hybridisiert. Die Fluoreszenz-Intensitäten, die zunächst gemessen werden konnten, zeigten eine homogene und intensive Färbung der Fluorochrome. Die CGH-Profile der Polkörper waren eindeutig auswertbar, es zeigten sich sowohl balancierte wie auch unbalancierte Resultate. Trotz dieser insgesamt sehr ermutigenden Ergebnisse, waren wir von einer Hochdurchsatz-Polkörperanalyse noch weit entfernt. Für die Erstellung eines Chromosomen-CGH-Profiles müssen mehrere Metaphasen karyotypisiert werden, was einen zusätzlichen Arbeitsaufwand bedeutet. Ferner ist die Qualität des Hybridisierungsergebnisses abhängig von den Metaphasenpräparaten des Spenders, was also einen zusätzlichen Unsicherheitsfaktor bedeutet. Daher wurde die Technik der Linker-Adapter PCR verlassen und eine weitere Amplifikationsmethode getestet, die wir bereits für diploide Zellen etabliert hatten. Mit einem Zeitbedarf von ca. 4,5 bis 5 Stunden liegt die sogenannte WGA4-Methode in einem deutlich attraktiveren Bereich, verglichen mit der Linker-Adapter PCR. Da sich zudem die Laserdissektion als wenig praktikable Methode für die Zellisolierung erwiesen hat, sollte auch hier eine Änderung erfolgen. Es wurden mehrere Ansätze getestet, die zu untersuchenden Polkörper direkt bei den betreffenden Kinderwunschzentren für eine Amplifikation vorzubereiten. Eizellen werden vor der Polkörperpunktion in einem sogenannten Flushing-Puffer gewaschen, der gemäß unseren Ergebnissen einen leicht inhibierenden Effekt auf die gesamtgenomische Amplifikation der Polkörper ausübte. Wir legten daher nukleasefreies Wasser als Medium vor, in das der Polkörper pipettiert werden kann und auch für einen Transport in unser Labor geeignet war. Mit Hilfe der WGA4-Methode konnten wir reproduzierbare Amplifikationen erhalten, DNA-Konzentrationen zwischen 150 und 250 ng/ μ l können für einen Polkörper als Ausgangsmaterial erwarten werden. Die Bestimmung der DNA-Qualität mit der Multiplex-PCR erbrachte nur einen limitierten Informationszugewinn. Aufgrund unserer später folgenden Erfahrungen mit der Array-CGH konnten Amplifikate mit einer Konzentration von unter 50 ng/ μ l konsequent von einer weiterführenden Diagnostik ausgeschlossen werden. Für die Polkörperuntersuchung ist daher die Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop eine für die Diagnostik ausreichende Methode. Konsequenterweise wurden Polkörper, die mit der WGA4-Methode amplifiziert wurden, mit der Metaphasen-CGH getestet. Auch hier zeigten sich intensive Färbungen der Fluorochrome und deutliche Hybridisierungssignale, mit denen es möglich war, eindeutige CGH-Profile zu erhalten. Aufgrund der oben beschriebenen

Nachteile der Chromosomen-CGH wurde diese Plattform allerdings verlassen und für die weiterführenden Untersuchungen eine höher auflösende Technik, die Array-CGH, gewählt. Zunächst wurden WGA4-Amplifikate auf einer 44K-Plattform getestet. Die Hybridisierungsergebnisse waren unter Einzelzellbedingungen (Figler *et al.*, 2007) eindeutig. Wir entwickelten anschließend Custom made Arrays mit der Absicht, eine hochauflösende Plattform ausschließlich für die Aneuploidie-Diagnostik zu generieren. Die zunächst eingeführten Arrays, der Telomer-Array und der Telomer-Centromer-Array, waren technisch für die Hybridisierung von Polkörpern sehr gut geeignet. Die Telomer- und/oder Centromerbereiche waren in den meisten Fällen ausreichend beurteilbar, dennoch bestand, gerade für strukturelle Veränderungen, ein erhöhtes Risiko, vorliegende Störungen unerkannt zu lassen. Es wurde daher ein zusätzlicher Array mit einer Auflösung von 15K eingeführt. Da GC-reichere Regionen bei der Amplifikation von Einzelzellen artefaktanfällig sein können, eliminierten wir beim Design dieser Arrays besonders GC-reiche Regionen. Unter weiterer Verbesserung unseres etablierten Algorithmus für Einzelzellen (Geigl *et al.*, 2009) konnten diese Arrays nun ausgewertet werden. Mit Hilfe eines Barcode-Musters konnte die Größe der betreffenden Veränderung abgeschätzt und von Artefakten eindeutig getrennt werden. Mit dieser Hybridisierung von WGA-amplifizierter Polkörper-DNA auf 15K-Arrays konnte ein stabiles Protokoll etabliert werden. Für Testzwecke wurden Polkörper zudem auf höher auflösende Plattformen hybridisiert, was einen kaum erheblichen Informationsgewinn brachte. Die Frage ist zudem, ob höher auflösende Plattformen im Bereich einer Polkörperdiagnostik überhaupt gewählt werden sollten. Werden z.B. Mikrodeletionen erkannt, sollte auch geklärt sein bzw. abgeschätzt werden können, welche Konsequenzen dies im weiteren Verlauf der Schwangerschaft oder für das Kind birgt.

Weiterhin erarbeiteten wir einen Algorithmus für die Bearbeitung von mehreren Proben. Mit Hilfe des sog. „Array-Strippings“ ist es möglich, bereits hybridisierte Arrays wieder zu verwenden, ohne merkliche Qualitätseinbußen. Dies hat vor allem, gerade im Rahmen der Hochdurchsatzanalyse, bedeutende Konsequenzen, da Reagenzien und Verbrauchsmaterialien deutlich eingespart werden können. Nachdem dieses Protokoll nun auf seine Stabilität und Reproduzierbarkeit an mehreren Testpolkörpern überprüft worden ist, konnte eine klinische Polkörperdiagnostik eingeleitet werden.

Insgesamt wurden 526 Proben von 128 Patientinnen untersucht. Die meisten Patientinnen entstammten der Altersgruppe zwischen 35 und 39 Jahren (46 Patientinnen) und 40 bis 44 Jahren (50 Patientinnen). Für Frauen über 40 Jahre sind Aneuploidieraten der Eizellen von

über 60% beschrieben (Murken *et al.*, Taschenlehrbuch Humangenetik). Daher erwarteten wir bei der Untersuchung der Polkörper dieses Patientenkollektivs bereits zahlreiche Aneuploidien. Bei 33 Frauen im Alter zwischen 39 und 44 Jahren konnten in insgesamt 54 Polkörperpaaren nur 10 balancierte Paare identifiziert werden. Bei sechs Frauen, die zwischen 30 und 34 Jahren alt waren, waren dies 58 %, bei 12 untersuchten Polkörperpaaren. Bei drei Frauen im Alter von über 45 Jahren konnten in keinem Fall balancierte Polkörperpaare gefunden werden. Einschränkend sei zu bemerken, dass hier insgesamt nur neun Paare untersucht werden konnten. Von den insgesamt analysierten 85 Polkörperpaaren wiesen 78% Aneuploidien auf. Aufgeteilt auf ersten und zweiten Polkörper, lässt sich dies wie folgt zusammenfassen:

Bei 85 untersuchten Polkörperpaaren lassen sich zu 20% Aneuploidien im ersten Polkörper, zu 12% Aneuploidien im zweiten Polkörper und zu immerhin 46% Aneuploidien in beiden Polkörpern erkennen. Bei 74 Patientinnen konnte die Analyse des ersten Polkörpers durchgeführt werden, 25%, entsprechend 41 von insgesamt 165 untersuchten Polkörpern, wiesen ein balanciertes Profil auf, 75% dagegen waren unbalanciert. 2004 berichteten Gutiérrez-Mateo *et al.* (Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2004) von einer Inzidenz für Aneuploidien bei Oozyten von 48%. Hier wurden mit der CGH die 1. Polkörper von 25 Eizellen untersucht. In einer weiteren Untersuchung dieser Gruppe wurde mit einer kombinierten FISH- und CGH-Analyse 54 Oozyten von 36 Frauen untersucht und eine Aneuploidie-Frequenz von 57% angegeben. Sher *et al.* (2007) belegten, dass diese Rate der Aneuploidien bei Frauen mit einem mittleren Alter von 27 Jahren sogar signifikant höher, nämlich bei 65%, ist. Hier wurden erster Polkörper, zweiter Polkörper und Blastomere mit der CGH untersucht. Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass das Auftreten der Aneuploidien in beiden Reifeteilungen sogar noch höher angesetzt werden kann, was wir einerseits auf die verbesserte Auflösung der Diagnostik zurückführen. Andererseits unterliegen diese Angaben auch einem Bias, da bei unseren Patientinnen, da es sich nicht um eine klinische Studie handelte, keine standardisierten Kriterien bzgl. Ein- und Ausschluss definiert wurden.

Sher *et al.* (2007) beschrieben, dass bei den Aneuploidien hauptsächlich die Chromosomen 4, 5, 16 und 22 beteiligt sind. Daher stellten wir uns die Frage, welche Veränderungen in unserem Kollektiv maßgeblich waren. Im ersten Polkörper zeigten sich häufig Zugewinne der Chromosomen 7, 9 und 16, wobei besonders Verluste der Chromosomen 2, 6, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 21 und 22 zu beobachten waren. Im zweiten Polkörper weist Chromosom 17 häufig einen Zugewinn auf, während Chromosomen 9, 15, 16 und 22 oftmals verloren sind. Wird z.B. eine FISH-Diagnostik durchgeführt, kann damit also ein Großteil der aufgetretenen

Aneuploidien nicht erkannt werden. Sher et al. (2007) gehen an, dass mit einer FISH-Technik allein, 50% der autosomalen Monosomien und 83% der Trisomien im 1. Polkörper nicht erkannt werden.

Für die Polkörperdiagnostik sollte gemäß den internationalen Empfehlungen (Montag *et al.*, 2009) immer der erste und zweite Polkörper untersucht werden, um einen zusätzlichen Informationsgewinn bezüglich eines Rescue-Mechanismus zu erhalten. In unserem Kollektiv zeigt sich dieser Mechanismus als gering ausgeprägt. Bei 60 Polkörperpaaren stellten sich diese komplementären Veränderungen nur in 32% dar. Betroffen von einem solchen Rescue waren vornehmlich Chromosom 13, 15 und Chromosom 21, gefolgt von Chromosom 16 und Chromosom 22.

Ferner sollte in vorliegender Arbeit überprüft werden, ob sich unser Protokoll zur hochauflösenden Polkörperdiagnostik auch für strukturelle Chromosomenveränderung eignet. Bei einer Patientin mit einer Translokation, die die Chromosomen 2 und 4 einschloss, wurden 12 erste Polkörper, zunächst mit der Chromosomen-CGH, untersucht. Bis auf zwei Fälle konnte mit der Chromosomen-CGH der fehlerhafte Segregationsmodus bestimmt werden. Das Translokationsfragment auf Chromosom 2 umfasste ca. 55 Mb und war mit der Chromosomen-CGH immer deutlich erkennbar, das Fragment auf Chromosom 4 umspannte eine Größe von ca. 10 Mb. Dieses Fragment auf 4q konnte in einigen Fällen nur bedingt erkannt werden, daher muss für die Chromosomen-CGH im Rahmen der Polkörperdiagnostik eine Auflösung von deutlich mehr als 10 Mb angegeben werden. Die Auflösungsgrenze für die konventionelle Chromosomen-CGH wurde zwischen 10 und 12 Mb definiert (Bentz *et al.*, 1998) und bisher nie für ein haploides Genom bestimmt. Mit Hilfe der Array-CGH war es möglich, alle Polkörper, bis auf einen, der balanciert war, einem fehlerhaften Segregationsmodus im Sinne einer Adjacent-Segregation zuzuordnen. Alle Segregationsmuster werden erkannt, auch diejenigen treten auf, die mit dem Leben unvereinbar sind. So wurde z.B. eine 4:0 Segregation in einem Polkörper nachgewiesen. Weiterhin bedeutend war der Nachweis von segmentalen Störungen. Insgesamt wurden aufgrund der verbesserten Auflösung der Array-CGH interstitielle und terminale Chromosomenveränderungen nachgewiesen. In insgesamt 55 Aneuploidien konnten 31% als segmentale Aneuploidien definiert werden. Dies ist ein Ergebnis, das so in dieser Form bisher noch nicht beschrieben ist und im Wesentlichen auf die deutlich verbesserte Auflösung zurückzuführen ist. Das vorliegende Protokoll zur Untersuchung der Polkörper wurde auch zweimalig bei einer Patientin mit Robertsonscher Translokation getestet, auch hier zeigten sich eindeutige Segregationsstörungen. Auffallend war ein Unterschied betreffend der

Ergebnisse bei balancierten Translokationen und der Robertsonschen Translokation. 89% der untersuchten Polkörperpaare wiesen Segregationsstörungen auf, während eine Adjacent-Segregation bei der Robertsonschen Translokation nur in 33% der untersuchten Polkörperpaare nachgewiesen werden konnte. Fehlerhafte Segregationen scheinen bei der Robertsonschen Translokation seltener aufzutreten, dies sollte aber in einem größeren Patientenkollektiv weiter untersucht werden.

Die klinischen Daten, wie Angaben zu Vorerkrankungen und erfolgreichen Schwangerschaften bzw. Geburten, sollen in dieser vorliegenden Arbeit zunächst unberücksichtigt bleiben, da vornehmlich Wert auf die Methodenetablierung und die Anwendungsmöglichkeiten der hochauflösenden Polkörperuntersuchung gelegt wurden. Die Korrelation dieser Ergebnisse mit den klinischen Daten erfolgt derzeit in Kooperation mit den zuweisenden Kinderwunschzentren und wird weiteren Aufschluss bzgl. des prinzipiellen Stellenwertes der Polkörperdiagnostik geben.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Polkörperanalyse bietet im Rahmen der in-vitro Fertilisation (IVF) oder intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) einen attraktiven Ansatz für die Untersuchung von strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen. Ziel ist es, hiermit Chromosomenveränderungen im 1. und 2. Polkörper darzustellen, um Rückschlüsse auf die genomischen Veränderungen in der korrespondierenden Eizelle ziehen und diese von einem Transfer ausschließen zu können. Die bisherigen Daten zum klinischen Nutzen der Polkörperanalyse wurden lange Zeit sehr kontrovers diskutiert. Die Ergebnisse beruhten allerdings vornehmlich auf der FISH-Technik, die, aufgrund methodischer Limitationen, für eine umfassende Darstellung des Polkörper-Genoms nicht mehr geeignet erscheint. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, ein stabiles und reproduzierbares Protokoll zur gesamtgenomischen Amplifikation der Polkörper-DNA zu erstellen und das Erbgut der Polkörper hochauflösend darzustellen.

Zunächst wurde erfolgreich eine Amplifikationsmethode für das Genom von haploiden Zellen adaptiert, die es erlaubt, in weniger als 5 Stunden hochqualitative DNA zu erhalten, die für nachfolgende Analysen, wie die Vergleichende Genomische Hybridisierung, ausreichend ist. Es zeigte sich, dass die besten Hybridisierungsergebnisse, die zusätzlich für Einzelzellbedingungen adaptiert wurden, mit einer selbst entwickelten hochauflösenden 15K Array Plattform sowie mit einem 44K Array ausgeführt werden konnten. Einen spezifisch für Einzelzellhybridisierungen entwickelten Auswertalgorithmus stimmten wir auf diese Plattformen ab, um eine standardisierbare Dateninterpretation zu gewährleisten. Ferner etablierten wir eine Vorgehensweise, bereits verwendete Arrays erneut hybridisieren zu können, um eine Hochdurchsatzanalyse von Polkörpern zu ermöglichen. Mit dieser Technik der Polkörperanalyse war es nun möglich, eine umfassende Aneuploidiediagnostik mit einer bisher nie da gewesenen genomischen Auflösung durchzuführen. In unserem Patientenkollektiv zeigten sich zum größten Teil unbalancierte Zellen (78% der Polkörper-Paare), die vornehmlich aus Aneuploidien von 1. und 2. Polkörper resultierten (46%), im Sinne von Störungen in beiden meiotischen Reifeteilungen. Die genomischen Verluste betreffen multiple Chromosomen und betonen damit die Notwendigkeit zur Abkehr von der FISH-Technik zugunsten höher auflösender Plattformen. Mit Hilfe dieses Protokolls war es uns ferner möglich, strukturelle Aberrationen in Polkörpern von Patientinnen mit balancierten Translokationen sowie Robertsonischer Translokation zu erkennen und die fehlerhaften Segregationsmodi eindeutig zuzuordnen. Aufgrund der hochauflösenden Plattformen konnten

zudem segmentale Veränderungen im Genom von Polkörpern erkannt und beschrieben werden. Ziel der Arbeit war die Etablierung eines stabilen Protokolls für die hochauflösende Polkörper-Untersuchung, was hiermit erreicht wurde. Unbeantwortet bleibt aber immer noch die Frage nach dem prinzipiellen klinischen Nutzen der Präfertilisationstechnik. Daher wird es eine interessante zukünftige Herausforderung sein, eine klinische Studie auf Basis der Polkörper Array-CGH unter standardisierten Bedingungen auf den Weg zu bringen.

ABSTRACT

Within the framework of in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) polar body analysis provides an attractive approach for the investigation of structural and numerical chromosomal aberrations. This analysis aims at illustrating chromosomal changes in the 1st and 2nd polar body in order to draw conclusions about the genomic alterations in the corresponding oocyte and to exclude it from a transfer. The data available for clinical use have been discussed very controversially over a long period of time. However, the results had mainly been based on the FISH technique, which does not seem to be appropriate for a comprehensive description of the polar body genome due to methodical limitations. Thus, the aim of this paper was to establish a solid and reproducible protocol for whole genome amplification of the polar body DNA and to present the polar body genome in a high resolution manner.

First, an amplification method was successfully adapted to the genome of haploid cells, which provides high-quality DNA within less than 5 hours. This method is sufficient for subsequent analyses such as comparative genomic hybridization. The best hybridization results, which were additionally adapted to single cell conditions, could be obtained by using a custom made high resolution 15K array platform, as well as a 44K array. An algorithm especially developed for single cell hybridization was adjusted to these platforms to guarantee a data interpretation that can be standardized. In addition, we established an approach which enables to re-hybridize already used arrays again in order to provide high throughput analysis of polar bodies. With this technique of polar body analysis it was now possible to perform a comprehensive aneuploidy diagnostics with an unprecedented genomic resolution. Among our group of patients there were largely unbalanced cells (78% of the polar body pairs) resulting mainly from aneuploidies in the 1st and 2nd polar body (46%) in terms of dysfunction in both meiotic divisions. The genomic losses affect multiple chromosomes and thus emphasize the necessity to abandon FISH technique in favour of platforms with a higher resolution. Moreover, with the help of this protocol we managed to identify structural aberrations in polar bodies from patients with balanced translocations as well as Robertson translocation and to assign clearly the different segregation modes. In addition, the high resolution platforms allowed us to recognize and describe segmental changes in the genome of polar bodies. Consequently, the aim of this paper, the establishment of a solid protocol for the analysis of high resolution polar bodies, was achieved. Yet the question of the principle clinical benefit of the prefertilization technique remains unsolved. Thus, it will be an

interesting challenge for the future to establish a clinical study based on polar body array-CGH under standardized conditions.

LITERATURVERZEICHNIS

Angell, R. R., 1991, Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man, *Human genetics*, vol. 86, no. 4, p. 383-387.

Angell, R. R., J. Xian, J. Keith, W. Ledger, and D. T. Baird, 1994, First meiotic division abnormalities in human oocytes: mechanism of trisomy formation, *Cytogenetics and cell genetics*, vol. 65, no. 3, p. 194-202.

Antonarakis, S. E., D. Avramopoulos, J. L. Blouin, C. C. Talbot Jr, and A. A. Schinzel, 1993, Mitotic errors in somatic cells cause trisomy 21 in about 4.5% of cases and are not associated with advanced maternal age, *Nature genetics*, vol. 3, no. 2, p. 146-150.

Bentz, M., A. Plesch, S. Stilgenbauer, H. Dohner, and P. Lichter, 1998, Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization, *Genes, chromosomes & cancer*, vol. 21, no. 2, p. 172-175.

Bermudez, M. G., W. Piyamongkol, S. Tomaz, E. Dudman, J. K. Sherlock, and D. Wells, 2003, Single-cell sequencing and mini-sequencing for preimplantation genetic diagnosis, *Prenatal diagnosis*, vol. 23, no. 8, p. 669-677.

Breckwolt, M. and C. Keck, 2001, *Störungen der Fruchtbarkeit*, Thieme Verlag, p. 78-82.

Buchholz, 2004, *Medizinische Genetik*, , vol. 16.

Cohen, J. and J. A. Grifo, 2007, Multicentre trial of preimplantation genetic screening reported in the *New England Journal of Medicine*: an in-depth look at the findings, *Reproductive biomedicine online*, vol. 15, no. 4, p. 365-366.

Delhanty, J. D., 2005, Mechanisms of aneuploidy induction in human oogenesis and early embryogenesis, *Cytogenetic and genome research*, vol. 111, no. 3-4, p. 237-244.

Fiegler, H., J. B. Geigl, S. Langer, D. Rigler, K. Porter, K. Unger, N. P. Carter, and M. R. Speicher, 2007, High resolution array-CGH analysis of single cells, *Nucleic acids research*, vol. 35, no. 3, p. e15.

Fisher, J. M., J. F. Harvey, N. E. Morton, and P. A. Jacobs, 1995, Trisomy 18: studies of the parent and cell division of origin and the effect of aberrant recombination on nondisjunction, *American Journal of Human Genetics*, vol. 56, no. 3, p. 669-675.

Fragouli, E., D. Wells, and J. D. Delhanty, 2011, Chromosome abnormalities in the human oocyte, *Cytogenetic and genome research*, vol. 133, no. 2-4, p. 107-118.

Geigl, J. B., S. Uhrig, and M. R. Speicher, 2006, Multiplex-fluorescence in situ hybridization for chromosome karyotyping, *Nature protocols*, vol. 1, no. 3, p. 1172-1184.

Geigl, J. B. and M. R. Speicher, 2007, Single-cell isolation from cell suspensions and whole genome amplification from single cells to provide templates for CGH analysis, *Nature protocols*, vol. 2, no. 12, p. 3173-3184.

Geigl, J. B., A. C. Obenauf, J. Waldispuehl-Geigl, E. M. Hoffmann, M. Auer, M. Hormann, M. Fischer, Z. Trajanoski, M. A. Schenk, L. O. Baumbusch et al, 2009, Identification of small gains and losses in single cells after whole genome amplification on tiling oligo arrays, *Nucleic acids research*, vol. 37, no. 15, p. e105.

Gianaroli, L., S. Munne, M. C. Magli, and A. P. Ferraretti, 1997, Preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy and male infertility, *International journal of andrology*, vol. 20 Suppl 3, p. 31-34.

Griesinger, G., K. Dafopoulos, A. Schultze-Mosgau, R. Felberbaum, and K. Diedrich, 2004, What is the most relevant standard of success in assisted reproduction? Is BESST (birth emphasizing a successful singleton at term) truly the best? *Human reproduction* (Oxford, England), vol. 19, no. 6, p. 1239-1241.

Gutierrez-Mateo, C., J. Benet, D. Wells, P. Colls, M. G. Bermudez, J. F. Sanchez-Garcia, J. Egozcue, J. Navarro, and S. Munne, 2004, Aneuploidy study of human oocytes first polar body comparative genomic hybridization and metaphase II fluorescence in situ hybridization analysis, *Human reproduction* (Oxford, England), vol. 19, no. 12, p. 2859-2868.

Halliday, J., K. Oke, S. Breheny, E. Algar, and D. J Amor, 2004, Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study, *American Journal of Human Genetics*, vol. 75, no. 3, p. 526-528.

Handyside, A. H., E. H. Kontogianni, K. Hardy, and R. M. Winston, 1990, Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification, *Nature*, vol. 344, no. 6268, p. 768-770.

Hassold, T., M. Merrill, K. Adkins, S. Freeman, and S. Sherman, 1995, Recombination and maternal age-dependent nondisjunction: molecular studies of trisomy 16, *American Journal of Human Genetics*, vol. 57, no. 4, p. 867-874.

Hassold, T., H. Hall, and P. Hunt, 2007, The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going, *Human molecular genetics*, vol. 16 Spec No. 2, p. R203-8.

Hehr, 2004, *Medizinische Genetik*, vol. 16.

Kolzem B., 2009, Auswirkungen der Polkörperdiagnostik auf die nachfolgende Kryokonservierung im Vorkernstadium: Korrelation der Ergebnisse bei verschiedenen Kryokonservierungsmethoden, Medizinischen Fakultät, Bonn, Dissertation.

Le Caignec, C., C. Spits, K. Sermon, M. De Rycke, B. Thienpont, S. Debrock, C. Staessen, Y. Moreau, J. P. Fryns, A. Van Steirteghem et al, 2006, Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH, *Nucleic acids research*, vol. 34, no. 9, p. e68.

Mastenbroek, S., M. Twisk, J. van Echten-Arends, B. Sikkema-Raddatz, J. C. Korevaar, H. R. Verhoeve, N. E. Vogel, E. G. Arts, J. W. de Vries, P. M. Bossuyt et al, 2007, In vitro fertilization with preimplantation genetic screening, *The New England journal of medicine*, vol. 357, no. 1, p. 9-17.

Montag, M., K. van der Ven, S. Ved, A. Schmutzler, G. Prietl, D. Krebs, B. Peschka, G. Schwanitz, P. Albers, G. Haidl et al, 1997, Success of intracytoplasmic sperm injection in couples with male and/or female chromosome aberrations, *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 12, no. 12, p. 2635-2640.

Montag, M., K. van der Ven, G. Delacretaz, K. Rink, and H. van der Ven, 1998, Laser-assisted microdissection of the zona pellucida facilitates polar body biopsy, *Fertility and sterility*, vol. 69, no. 3, p. 539-542.

Montag, M., H. van der Ven, and German Pronuclear Morphology Study Group, 2001, Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo

culture and transfer: results of a prospective multicentre study, *Human reproduction* (Oxford, England), vol. 16, no. 11, p. 2384-2389.

Montag, M., K. van der Ven, and H. van der Ven, 2002, Erste klinische Erfahrungen mit der Polkörperdiagnostik in Deutschland, *J Fertil Reprod*, no. 4, p. 7-12.

Montag, M., K. van der Ven, and H. van der Ven, 2003, From the oocyte to the blastocyst, *Andrologia*, vol. 35, no. 3, p. 174-175.

Montag, M. and H. van der Ven, 2007, Preimplantation Genetic Screening als Altersindikation in der IVF-Therapie für Patientinnen im Alter von 35 Jahren und darüber. Stellungnahme Mastenbroek, *J Reprod Med Endokrinol*, no. 3, p. 145-147.

Munne, S., M. Sandalinas, T. Escudero, J. Fung, L. Gianaroli, and J. Cohen, 2000, Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations, *Fertility and sterility*, vol. 73, no. 6, p. 1209-1218.

Munne, S., S. Chen, J. Fischer, P. Colls, X. Zheng, J. Stevens, T. Escudero, M. Oter, B. Schoolcraft, J. L. Simpson et al, 2005, Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages, *Fertility and sterility*, vol. 84, no. 2, p. 331-335.

Munne, S., L. Gianaroli, I. Tur-Kaspa, C. Magli, M. Sandalinas, J. Grifo, D. Cram, S. Kahraman, Y. Verlinsky, and J. L. Simpson, 2007, Substandard application of preimplantation genetic screening may interfere with its clinical success, *Fertility and sterility*, vol. 88, no. 4, p. 781-784.

Munné S (2009) Preimplantation genetic diagnosis for infertility (preimplantation genetic screening). In: Harper J (Hrsg) *Preimplantation Genetic Diagnosis* 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, S 203-209

Murken et al, *Humangenetik*, Taschenlehrbuch, Thieme Verlag.

Praxiswissen Gynäkologie und Geburtshilfe, 2004, Thieme Verlag.

Schröder AK, Diedrich K, Ludwig M., 2003, *Wie geht es Kindern nach assistierter Reproduktion*, Gynäkologische Endokrinologie.

Sher, G., L. Keskinetepe, M. Keskinetepe, M. Ginsburg, G. Maassarani, T. Yakut, V. Baltaci, D. Kotze, and E. Unsal, 2007, Oocyte karyotyping by comparative genomic hybridization [correction of hybridization] provides a highly reliable method for selecting "competent" embryos, markedly improving in vitro fertilization outcome: a multiphase study, *Fertility and sterility*, vol. 87, no. 5, p. 1033-1040.

Sher, G., L. Keskinetepe, M. Keskinetepe, G. Maassarani, D. Tortoriello, and S. Brody, 2009, Genetic analysis of human embryos by metaphase comparative genomic hybridization (mCGH) improves efficiency of IVF by increasing embryo implantation rate and reducing multiple pregnancies and spontaneous miscarriages, *Fertility and sterility*, vol. 92, no. 6, p. 1886-1894.

Speicher, M. R., S. du Manoir, E. Schrock, H. Holtgreve-Grez, B. Schoell, C. Lengauer, T. Cremer, and T. Ried, 1993, Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA-amplification, *Human molecular genetics*, vol. 2, no. 11, p. 1907-1914.

Strowitzki, T., 2003, Reproductive medicine after menopause, *Andrologia*, vol. 35, no. 3, p. 183-184.

van Beers, E. H., S. A. Jooisse, M. J. Ligtenberg, R. Fles, F. B. Hogervorst, S. Verhoef, and P. M. Nederlof, 2006, A multiplex PCR predictor for aCGH success of FFPE samples, *British journal of cancer*, vol. 94, no. 2, p. 333-337.

van der Ven, H., M. Montag, and K. van der Ven, 2002, Performance of in vitro fertilization in Germany, *Zeitschrift für arztliche Fortbildung und Qualitätssicherung*, vol. 96, no. 6-7, p. 369-374.

Veiga, A., M. Sandalinas, M. Benkhalifa, M. Boada, M. Carrera, J. Santalo, P. N. Barri, and Y. Menezo, 1997, Laser blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis in the human, *Zygote* (Cambridge, England), vol. 5, no. 4, p. 351-354.

Verlinsky, Y., N. Ginsberg, A. Lifchez, J. Valle, J. Moise, and C. M. Strom, 1990, Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis, *Human reproduction* (Oxford, England), vol. 5, no. 7, p. 826-829.

Wells, D., T. Escudero, B. Levy, K. Hirschhorn, J. D. Delhanty, and S. Munne, 2002, First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy, *Fertility and sterility*, vol. 78, no. 3, p. 543-549.

DANKSSAGUNG

Herrn Univ.-Prof. Dr.med. Michael Speicher danke ich für die Vergabe des Themas und seine stets kompetente Betreuung meiner Arbeit. Ganz herzlichen Dank für seine fortwährend geduldige Begleitung, freundliche Unterstützung und den mir gewährten Freiraum bei der Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank Ida Tieber, Maria Langer-Winter, Eva-Maria Hoffman, Martina Auer und Sabine Uhrig für ihre „offene Ohren“ und ihre Hilfe. Ohne sie wären viele Dinge unmöglich (und auch nicht so lustig) gewesen.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für die tolle Zeit und die kollegiale Zusammenarbeit.

Auch möchte ich einen großen Dank allen Patientinnen aussprechen, die mit ihrer Einwilligung zur Verwendung ihrer Proben diese Dissertation ermöglichten, sowie den engagierten Zuweisern, insbesondere Herrn Dr. Michael Schenk aus Dobl und Herrn Dr. Josef Zech aus Innsbruck, die mir die Proben zur Verfügung gestellt haben.

Bei meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, Anne Waldispühl-Di Carlo, möchte ich mich ganz besonders für die unschätzbaren Unterstützungen bedanken.

Und nicht zuletzt -und vor allem - Jochen und Felix: Danke!

6 LEBENS LAUF

6.1 Angaben zur Person

NAME: Waldispühl-Geigl, Mag.
VORMNAME: Julie
GEBURTSDATUM: 27. März 1977
GEBURTSORT: Nizza, Frankreich

6.2 Ausbildung

Seit Oktober 2007 Dissertation am Institut für Humangenetik, Titel: „Hochauflösende Polkörperanalyse“, Medizinische Universität Graz, Vorstand: Univ.-Prof. Dr.med. Michael R. Speicher

2006 -2007 Angestellte am Institut für Humangenetik Medizinische Universität Graz, Vorstand: Univ.-Prof. Dr.med. Michael R. Speicher

2001-2005 Dissertantin am Institut für Immunologie, Ludwig Maximilian Universität München, Betreuer: Univ.-Prof. Dr. Christoph Klein, Thema: Etablierung einer Methode zur Identifikation von Methylierungsmustern in einzelnen bzw. wenigen disseminierten Tumorzellen

2000-2001 Diplôme d'études approfondies (D.E.A) de Pharmacologie et Biologie Cellulaires et Moléculaires, Université de Nice Sophia-Antipolis (U.N.S.A, Frankreich)
(Zelluläre und Molekulare Pharmakologie und Biologie)
Betreuerin: Univ.-Prof. Dr. Joanna Kubar, Thema: Biochemische Charakterisierung und Wirkung der zellulären Aktivierung des Protein 12K von *Leishmania infantum*

1999-2000 Maîtrise de Biologie cellulaire et Physiologie (B.C.P) (U.N.S.A, Frankreich) (Zelluläre Biologie und Physiologie)

- 1998-1999 Licence B.C.P (U.N.S.A, Frankreich) (Zelluläre Biologie und Physiologie)
- 1995-1997 Diplôme d'Etudes Universitaires Générales (D.E.U.G) Sciences de la Vie (U.N.S.A, Frankreich)
- 1994-1995 Naturwissenschaftliches Abitur, Nizza, Frankreich