

**Diplomarbeit**

**Etablierung eines Verfahrens zur Diagnostik monogener  
Erkrankungen in der Reproduktionsmedizin**

eingereicht von

**Theresa Kluge**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Institut für Humangenetik**

unter der Anleitung von Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr.med. Jochen Bernd Geigl

Graz, am 24. August 2015

## *Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am 24.08.2015*

*Theresa Kluge eh.*

## **Danksagungen**

Ein großer Dank gilt Prof. Jochen Geigl für die kompetente Betreuung sowie geduldige Begleitung und freundliche Unterstützung während der Arbeit. Außerdem möchte ich mich bei Julie Waldispühl-Geigl bedanken, die mich mit viel guter Laune in die labortechnischen Methoden eingearbeitet hat.

Des Weiteren gilt mein Dank meinen Freunden Lucian, Bella, Anna und Jakob, die mich seit vielen Jahren begleiten, mir stets zur Seite stehen und mich auch hinsichtlich dieser Arbeit immer wieder motiviert haben.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern für ihre Toleranz, Ermutigung und Unterstützung danken.

## Zusammenfassung

Die Analyse der Polkörper ist für Kinderwunschaare, mit einer bekannten genetischen Vorbelastung der Mutter, eine vielversprechende Methode ein nicht-betroffenes Kind zu bekommen. Die Untersuchung des ersten und zweiten Polkörpers ermöglicht hierbei Rückschlüsse auf genomische Veränderungen der korrespondierenden Eizelle. Hiermit ist es jedoch nur möglich mütterliche Allele zu untersuchen.

In der Präimplantations- und Präfertilisationsdiagnostik ist die präzise Vervielfältigung des genetischen Materials die größte Herausforderung. Unentdeckte Kontaminationen oder Amplifikationsfehler, wie Allelic Dropout, können zu folgenschweren Fehldiagnosen führen. Ziel war es, ein präzises und sicheres Verfahren zur Vervielfältigung und Untersuchung des genetischen Materials von Polkörpern zu etablieren und einen Leitfaden für die Diagnostik monogener Erkrankungen in der Reproduktionsmedizin zu entwickeln. Hierfür wurden zunächst verschiedene Protokolle zur gesamt-genomischen oder sequenzspezifischen Amplifikation der DNA von Einzelzellen miteinander verglichen und die labortechnischen Methoden soweit optimiert, dass eine fehlerfreie Vervielfältigung der DNA für eine weiterführende Untersuchung möglich wurde. Durch direkte Sequenzierung der krankheitsspezifischen Region und indirekte Analyse mittels eng benachbarter informativer Marker wurden die Proben auf das Vorhandensein einer spezifischen monogenen Erkrankung sowie Lyse- und Amplifikationsfehler untersucht. Eine sequenzspezifische Amplifikation mittels Nested-PCR erzielte hierbei die besten Ergebnisse und überzeugte durch eine sichere Vervielfältigung und eine sehr gute Darstellung der Marker sowie der Nukleotid-Abfolge in der Sequenzierung.

Dieses erfolgsversprechende Protokoll wurde, in Zusammenarbeit mit einem Kinderwunschzentrum, bei den Polkörpern einer Patientin mit Ornithintranscarbamylase-Defekt angewandt. Um das mutationstragende Allel zu identifizieren, wurde zunächst ein familienspezifisches Testsystem entwickelt. Daraufhin wurden, nach hormoneller Stimulation der Patientin, 24 Eizellen gewonnen und mittels ICSI befruchtet. Die Analyse von 36 gewonnenen Polkörper ergab, dass zehn Eizellen erfolgreich befruchtet waren. Davon fanden sich bei zwei Proben jeweils ein erster Polkörper mit einem mutations-tragendem Allel und ein zweiter Polkörper mit Wildtyp-Profil. Die korrespondierenden Eizellen waren also mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit frei von der Mutation im *OTC*-Gen. Dies wurde der Patientin und dem behandelnden Kinderwunschzentrum mitgeteilt und die Eizellen dort transferiert.

## **Abstract**

Polar body analysis is a promising method for having healthy offspring in couples that wish to have children even though the mother is a known genetic carrier of a monogenic disorder. The examination of the first and second polar body enables to draw conclusions regarding genetic mutations in the corresponding oocyte. Still this method is limited to the examination of maternal alleles.

In preimplantation genetic diagnosis and prefertilisation diagnosis the precise amplification of genetic material poses the biggest challenge. Undiscovered contamination or fails in amplification like allele dropout can lead to fatal misdiagnosis.

Aim was to establish a precise and safe procedure for amplification and examination of genetic material and to develop a guideline for diagnostics of monogenic diseases in reproductive medicine. Firstly, different protocols for whole genome amplification or sequence specific amplification of single cells were compared and laboratory methods optimized so that false-free DNA amplification for further examination was possible. The samples were examined towards specific monogenic disorders as well as regarding to failures in lysis and amplification by sequencing of the disease-specific region and indirect analysis with closely linked informative markers. One sequence-specific amplification by Nested PCR achieved the best results and convinced through a safe amplification and a good presentation of the markers and the nucleotide sequence.

This promising protocol was used in collaboration with a fertility center in a patient with ornithine transcarbamylase deficiency. An individualized test system for the family was developed to identify the mutation carrying allele. After this, 24 oocytes were obtained under hormonal stimulation and fertilized via ICSI. The analysis of 36 obtained polar bodies showed ten successfully fertilized oocytes. Among these, in two samples the first polar body carrying the mutated allele and the second polar body with wild type profile was found. The corresponding oocytes were therefore highly likely to be free of mutation in the OTC gene. The patient and the fertilizing center were informed about the results and the oocytes were transferred.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagungen</b> .....	<b>ii</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iv</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>v</b>
<b>Glossar und Abkürzungen</b> .....	<b>x</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Einführung in die Thematik</i> .....	1
1.2 <i>Assistierte Reproduktion</i> .....	1
1.3 <i>Unerfüllter Kinderwunsch und Kinderwunschzentren</i> .....	2
1.4 <i>Gesetzeslage</i> .....	4
1.5 <i>Methoden zur Beurteilung von Eizelle, Embryo und Fetus</i> .....	5
1.5.1 <i>Pränataldiagnostik</i> .....	5
1.5.1.1 <i>Nicht-invasive Pränataldiagnostik</i> .....	5
1.5.1.1.1 <i>Ultraschall</i> .....	5
1.5.1.1.2 <i>Combined Test</i> .....	6
1.5.1.1.3 <i>Nicht-invasive pränatale Diagnostik (NIPD) - PraenaTest®</i> .....	6
1.5.1.2 <i>Invasive Pränataldiagnostik</i> .....	6
1.5.1.2.1 <i>Chorionzottenbiopsie / Plazentese</i> .....	7
1.5.1.2.2 <i>Amniozentese</i> .....	7
1.5.1.2.3 <i>Chordozentese</i> .....	7
1.5.2 <i>Präimplantationsdiagnostik</i> .....	7
1.5.3 <i>Präfertisationsdiagnostik</i> .....	8
1.6 <i>Meiose und Polkörperentstehung</i> .....	9
1.7 <i>Ablauf und Indikationen der Polkörperdiagnostik</i> .....	10
1.8 <i>Techniken und Einschränkungen der Polkörper- und Präimplantationsdiagnostik</i> .....	13

1.8.1	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zum Nachweis numerischer Chromosomenfehlverteilungen .....	13
1.8.2	Array CGH .....	15
1.8.3	PCR-basierende Methoden zur Diagnostik monogener Erkrankungen.....	16
1.8.4	SNP-Array und Karyomapping .....	18
1.8.5	Next Generation Sequencing (NGS) .....	19
1.9	<i>Zielsetzung der Arbeit</i> .....	19
1.10	<i>Beispiel für eine monogene Erkrankung: der Ornithintranscarbamylase-Defekt</i> .....	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
2.1	<i>Proben</i> .....	21
2.2	<i>Probengewinnung und -aufbereitung</i> .....	21
2.2.1	Isolierung mononukleärer Zellen aus heparinisiertem Vollblut .....	21
2.2.2	Anlage von Langzeitkulturen .....	22
2.2.3	DNA-Isolierung mittels QIAamp Blood Mini Kit .....	22
2.2.4	Einzelzellgewinnung .....	23
2.2.4.1	Manuelle Einzelzellgewinnung .....	23
2.2.4.2	Einzelzellgewinnung mit dem AVISO CellCelector.....	23
2.2.5	Polkörperbiopsie.....	24
2.3	<i>Kit-basierende Whole Genome Amplification</i> .....	24
2.3.1	GenomePlex WGA4 von Sigma-Aldrich .....	25
2.3.1.1	Lyse und Fragmentierung.....	25
2.3.1.2	Library .....	25
2.3.1.3	Amplifikation .....	26
2.3.2	GenomiPhi V2 von GE Healthcare .....	26
2.3.2.1	Lyse und Amplifikation mit ALB-Puffer .....	26
2.3.2.2	GenomiPhi V2 mit Trehalose.....	27
2.3.3	Aufreinigung der amplifizierten Proben.....	27

2.3.3.1	QIAamp DNA Micro Kit von QIAGEN .....	27
2.3.3.2	GenElute PCR Clean-up Kit von Sigma-Aldrich .....	27
2.3.4	Qualitätsbeurteilung .....	28
2.3.4.1	Konzentrationsbestimmung.....	28
2.3.4.2	Multiplex PCR.....	28
2.3.4.3	Gelelektrophorese.....	29
2.4	<i>Mikrosatelliten-Marker Analyse nach WGA</i> .....	30
2.4.1	Amplifikation mit fluoreszenzmarkierten Markern.....	30
2.4.2	Gelelektrophorese mit dem 3130 Genetic Analyzer.....	31
2.4.3	Auswertung.....	31
2.5	<i>Whole Genome Amplification für die Sequenzierung eines spezifischen Genbereichs</i> .....	31
2.5.1	GenomiPhi V2 mit ALB-Lyse.....	31
2.5.2	GenomiPhi V2 mit Proteinase K-Lyse .....	32
2.6	<i>Amplifikation einer spezifischer Genomregion (Nested PCR)</i> .....	32
2.6.1	Lyse .....	33
2.6.1.1	Lyse mit Tween, Triton und Proteinase K – Nested-Lyse 1 .....	33
2.6.1.2	Lyse mit Proteinase K – Nested-Lyse 2 .....	33
2.6.2	Amplifikation .....	33
2.6.2.1	Amplifikation mit 6 µl HotStar Taq Mastermix .....	
	– Nested-Amplifikation 1 .....	33
2.6.2.2	Amplifikation mit 6 µl HotStar Taq Mastermix und MgCl <sub>2</sub> .....	
	– Nested-Amplifikation 2.....	34
2.6.2.3	Amplifikation mit 10 µL HotStar Taq Mastermix und MgCl <sub>2</sub> .....	
	– Nested-Amplifikation 3.....	34
2.6.2.4	Amplifikation mit 30 µl HotStar Taq Mastermix und MgCl <sub>2</sub> .....	
	– Nested-Amplifikation 4.....	35
2.6.2.5	Amplifikation mit 30 µl HotStar Taq und nukleasefreiem Wasser .....	
	– Nested-Amplifikation 5.....	35

2.7	<i>Sequenzierung eines spezifischen DNA-Bereichs</i> .....	35
2.7.1	Nested PCR für die anschließende Sequenzierung.....	35
2.7.2	Sequenzierreaktion .....	36
2.7.2.1	Amplifikation .....	37
2.7.2.2	Aufreinigung .....	37
2.7.2.3	Sequenzierung .....	38
2.7.2.4	Auswertung .....	38
2.8	<i>Primer und Marker Etablierung für die Diagnostik einer Mutation im OTC-Gen</i> .. .....	38
2.8.1	Annealing-Temperatur der OTC-Marker.....	39
2.8.2	Markeranalyse und Sequenzierung von Einzelzellen.....	40
2.8.2.1	Gewinnung von Einzelzellen aus dem Vollblut .....	40
2.8.2.2	Lyse und Amplifikation.....	40
2.8.2.3	Mikrosatelliten-Markeranalyse .....	41
2.8.2.4	Sequenzierung .....	42
2.9	<i>Lagerung und Transport der Polkörper</i> .....	43
2.10	<i>Materialien</i> .....	43
2.11	<i>Kits</i> .....	45
2.12	<i>Geräte</i> .....	45
2.13	<i>Puffer und Lösungen</i> .....	46
2.14	<i>Primer</i> .....	47
2.14.1	CFTR-Primer .....	47
2.14.2	OTC-Primer .....	47
2.14.3	GADPH-Primer .....	48
2.15	<i>Verwendete Software</i> .....	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>49</b>
3.1	<i>Markeranalyse nach Whole Genome Amplification</i> .....	49
3.2	<i>Nested PCR und Sequenzierung nach WGA</i> .....	53

3.3	<i>Nested PCR, Markeranalyse und Sequenzierung nach sequenzspezifischer Amplifikation</i> .....	56
3.3.1	Sequenzspezifische Amplifikation .....	56
3.3.2	Mikrosatelliten-Markeranalyse.....	58
3.3.3	Sequenzierung .....	59
3.4	<i>Protokoll - Diagnostik monogener Erkrankungen in der PKD</i> .....	61
3.5	<i>Lagerungstest</i> .....	62
3.6	<i>Markeretablierung für eine Mutation im OTC-Gen</i> .....	62
3.6.1	Haplotypen der Proben .....	64
3.7	<i>Leitfaden zur Polkörperdiagnostik</i> .....	64
3.7.1	IVF-Zentrum.....	65
3.7.2	Humangenetisches Labor .....	65
3.8	<i>Ergebnisse der Polkörperdiagnostik</i> .....	66
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>68</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>75</b>

## Glossar und Abkürzungen

φ	Phi
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
°C	Grad Celsius
x g	relative Zentrifugalkraft
A	Adenosin
Abs.	Absatz
ADO	Allelic Dropout
Aqua bidest	Aqua bidestillata
ART	Assistierte Reproduktion
b	Basen
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CF	Cystische Fibrose
cfDNA	zellfreie DNA
cffDNA	zellfreie fetale DNA
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CYA	Cyclosporin A
ddATP	Didesoxyadenosin-Triphosphat
ddCTP	Dideoxycytidin-Triphosphat
ddGTP	Dideoxyguanosine-Triphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
ddTTP	Dideoxythymidin-Triphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Didesoxyribonukleinsäure
DTT	Dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eh	eigenhändig
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embryology
et al.	und andere
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

FKS	Fetales Kälberserum
FMedG	Fortpflanzungsmedizingesetz
FMedRÄG	Fortpflanzungsmedizinrechts-Änderungsgesetz
g	Gramm
G	Guanin
GADPH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSG	Gewebesicherheitsgesetz
GTG	Gentechnikgesetz
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
hCG	humanes Choriongonadotropin
ICSI	Intracytoplasmatische Spermieninjektion
IUI	Intrauterina Insemination
IVF	In-vitro Fertilitisation
k	Kilo
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Liter
m	Milli (10 <sup>-3</sup> )
m	Meter
M	Mol
m	Mutation
Mg	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
n	Anzahl
n	nano (10 <sup>-9</sup> )
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF	nukleasefrei
NGS	Next Generation Sequencing
NIPD	Nicht-invasive pränatale Diagnostik
nm	nanometer
o.g.	oben genannt
OD	Optische Dichte
OTC	Ornithintranscarbamlyase

PAPP-A	Pregnancy-associated plasma protein A
PBS	Phosphatgepufferte Salzsäure
PCO-Syndrom	Polyzystischen Ovar-Syndrom
PCR	Polymerasekettenreaktion
PID	Präimplantative Diagnostik
PGD	Preimplantation Genetic Diagnosis
PK	Polkörper
PKB	Polkörperbiopsie
PKD	Polkörperdiagnostik
PVP	Polyvinylpyrolidon
RCA	Rolling Circle Amplification
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
sec	Sekunden
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
sog.	sogenannt
SSW	Schwangerschaftswoche
STR	Single Nucleotide Repeats
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
WGA	Whole Genome Amplification
WGS	Whole Genome Sequencing
Wt	Wildtyp
Z	Zusatz
z.B.	zum Beispiel

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1-1</b> Prinzip der Polkörperdiagnostik bei monogenen Erkrankungen _____	10
<b>Abbildung 1-2</b> Verlauf einer Laser-assistierten Polkörperbiopsie _____	11
<b>Abbildung 1-3</b> Darstellung der häufigsten Indikationen für eine Präimplantationsdiagnostik bei vererbba- ren Krankheiten _____	13
<b>Abbildung 3-1</b> Multiplex PCR der GenomePlex WGA4-Amplifikation nach manueller Isolation	50
<b>Abbildung 3-2</b> Multiplex PCR der GenomiPhi V2-Amplifikation mit ALB-Puffer nach manueller Isolation _____	51
<b>Abbildung 3-3</b> Multiplex PCR der GenomePlex WGA4-Amplifikation nach Isolation mittels CellCelector _____	51
<b>Abbildung 3-4</b> Multiplex PCR der GenomiPhi V2-Amplifikation mit ALB-Puffer nach Isolation mittels CellCelector _____	51
<b>Abbildung 3-5</b> Multiplex PCR der GenomiPhi V2-Amplifikation mit Trehalose nach Isolation mittels Cell Celector _____	52
<b>Abbildung 3-6</b> Multiplex PCR nach GenomiPhi V2 Amplifikation mit ALB-Puffer _____	54
<b>Abbildung 3-7</b> Multiplex PCR nach Amplifikation mit GenomiPhi V2 und Proteinase K _____	54
<b>Abbildung 3-8</b> Sequenzierung nach WGA mit GenomiPhi V2 und ALB-Puffer _____	55
<b>Abbildung 3-9</b> Sequenzierung nach Amplifikation mit GenomiPhi V2 und Proteinase K _____	55
<b>Abbildung 3-10</b> Gelelektrophorese der Nested-Lyse 1 mit Nested-Amplifikation 1 _____	56
<b>Abbildung 3-11</b> Gelelektrophorese der Lyse 2 Amplifikation 4 _____	57
<b>Abbildung 3-12</b> Gelelektrophorese der Lyse 2 mit Amplifikation 4 und 5 _____	57
<b>Abbildung 3-13</b> Vergleichende Mikrosatelliten-Analyse der Nested-Amplifikationen 4 und 5 mit den OTC-Markern DXS 1049, DXS 8016 und DXS 1068 _____	58
<b>Abbildung 3-14</b> Sequenzierung nach Nested-Lyse 1 und Nested-Amplifikation 1 _____	60
<b>Abbildung 3-15</b> Sequenzierung nach Nested-Lyse 2 und Nested-Amplifikation 4 _____	60
<b>Abbildung 3-16</b> Haplotypen der Proben 1 bis 5 _____	64
<b>Abbildung 3-17</b> Haplotypen der Polkörper der befruchteten Eizellen _____	67

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 2-1</b> Temperaturverlauf der Library- Reaktion der WGA mit GenomePlex WGA4, Sigma-Aldrich _____	25
<b>Tabelle 2-2</b> Temperaturverlauf der Amplifikations- Reaktion der WGA mit GenomePlex WGA4, Sigma-Aldrich _____	26
<b>Tabelle 2-3</b> Temperaturverlauf der Multiplex- Amplifikation nach Van Beers _____	29
<b>Tabelle 2-4</b> Marker des ABI-Prism Linkage Mapping Sets 2.5 Panel 23 _____	30
<b>Tabelle 2-5</b> Temperaturverlauf der Amplifikation mit den Markern des ABI Prism Linkage Mapping Sets 2.5 _____	31
<b>Tabelle 2-6</b> Temperaturverlauf der Nested-Amplifikation 1 und 2 _____	34
<b>Tabelle 2-7</b> Temperaturverlauf der Nested-Amplifikation 3 _____	34
<b>Tabelle 2-8</b> Temperaturverlauf der Nested-Amplifikation 4 und 5 _____	35
<b>Tabelle 2-9</b> Temperatur der Nested-PCR im Rahmen der Sequenzierung _____	36
<b>Tabelle 2-10</b> Temperaturverlauf der Sequenzierreaktion _____	37
<b>Tabelle 2-11</b> Temperaturverlauf der Gradienten-PCR für die <i>OTC</i> -Primer und – Marker. X = Annealingtemperatur zwischen 50 – 64 °C. _____	40
<b>Tabelle 2-12</b> Temperaturverlauf der Nested-Lyse 2 _____	40
<b>Tabelle 2-13</b> Ansatz der Nested-Amplifikation 2 * je 0,2 µl jedes Markers (Forward und Reverse) _____	41
<b>Tabelle 2-14</b> Temperaturverlauf der Nested- Amplifikation mit <i>OTC</i> -Primer und -Markern _____	41
<b>Tabelle 2-15</b> Temperaturverlauf der Sequenzierreaktion _____	42
<b>Tabelle 2-16</b> <i>CFTR</i> -Primer Sequenzen _____	47
<b>Tabelle 2-17</b> <i>OTC</i> -Primer, Marker und SNPs _____	48
<b>Tabelle 2-18</b> <i>GADPH</i> -Primer Sequenzen _____	48
<b>Tabelle 3-1</b> Ergebnisse der Amplifikation und Markeranalyse nach einer Whole Genome Amplifikation _____	53
<b>Tabelle 3-2</b> Ergebnisse der Sequenzierung nach sequenzspezifischer Amplifikation _____	59
<b>Tabelle 3-3</b> Fragmentlängen der fünf Mikrosatelliten-Marker bei den untersuchten Proben _____	63
<b>Tabelle 3-4</b> Sequenzen der SNPs bei den Proben 1 bis 5 _____	63

# **1 Einleitung**

## **1.1 Einführung in die Thematik**

Der unerfüllte Kinderwunsch ist in den letzten Jahrzehnten zu einem zunehmenden Problem unserer Gesellschaft geworden. Neben vielfältigen Gründen biologischer, genetischer oder psychischer Natur spielt dabei auch die Entwicklung der Gesellschaft eine wichtige Rolle. Durch verbesserte Antikonzeption und durch den Wunsch vieler Frauen nach beruflicher Karriere wird teilweise erst im höheren Alter eine Familienplanung angestrebt. Dies führt nicht nur zu organischen Schwierigkeiten, sondern erhöht auch das Risiko von genetischen Fehlverteilungen. Darüber hinaus gibt es Paare, die zwar auf natürlichem Wege schwanger werden könnten, jedoch auf Grund einer genetischen Vorbelastung das Risiko einer Fehlgeburt oder die Geburt eines schwerkranken Kindes nicht eingehen wollen.

Die diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten der Reproduktionsmedizin haben sich in den letzten 35 Jahren so schnell und vielfältig weiterentwickelt, dass mittlerweile viele der Paare durch spezielle und zielgerichtete medizinische Untersuchungen und Behandlungen in der Erfüllung ihres Wunsches unterstützt werden können.

## **1.2 Assistierte Reproduktion**

Medizinische Verfahren, die zur Erfüllung eines Kinderwunsches durch die Geburt eines gesunden Kindes beitragen, werden unter dem Begriff „Assistierte Reproduktion“ (ART) zusammengefasst. Diese reichen von einer alleinigen hormonellen Stimulation bis hin zu einer künstlichen Befruchtung mit einer genetischen Analyse des Erbmaterials. Welche Methode dabei zur Anwendung kommt hängt von der Ursache des unerfüllten Kinderwunsches ab.

Bei der intrauterinen Insemination (IUI) wird, gegebenenfalls nach hormoneller Stimulation der Frau, unter Ultraschallkontrolle eine aufbereitete Probe der Samenflüssigkeit direkt in den Uterus injiziert. Diese Art der künstlichen Befruchtung soll bereits 1770 von John Harris zum ersten Mal durchgeführt worden sein.

Die In-vitro-Fertilisation (IVF) und die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) hingegen sind Verfahren der extrakorporalen Insemination. Die Verschmelzung von Eizelle und Spermium findet also nicht im weiblichen Körper, sondern in einer Petrischale statt. 1965 gelang Robert Edwards erstmals die in-vitro-Entwicklung von Eizellen über die Metaphase I zur Metaphase II sowie eine anschließende Befruchtung dieser [1, 2]. 1978

wurde durch die Arbeit von Edwards und Patrick Steptoe das erste Kind nach einer IVF geboren [2–4]. Für seine wissenschaftlichen Errungenschaften im Bereich der In-vitro-Fertilisation erhielt Robert Edwards 2010 den Nobelpreis für Medizin [3, 5].

Für die IVF werden die Eizellen nach hormoneller Stimulation unter Ultraschallsicht transvaginal entnommen und in einer Petrischale mit den aufbereiteten Spermien zusammengeführt. Die Insemination gilt als erfolgreich, wenn ein männlicher und ein weiblicher Vorkern sowie die beiden Polkörper vorliegen. Zu diesem Zeitpunkt (ca. 16-18 Stunden nach Penetration) sind die weibliche und die männliche Erbinformation noch voneinander getrennt. Mit Verschmelzung der beiden haploiden Chromosomensätze der Vorkerne zu einem diploiden Chromosomensatz entsteht die Zygote, mit deren Teilung die Embryonalentwicklung beginnt. Nach einem definierten Zeitpunkt, meist zwischen dem dritten und fünften Tag nach Insemination, wird der Embryo in die Gebärmutter eingesetzt. Im Unterschied zur IVF wird bei der ICSI ein ausgewähltes Spermium direkt in die Eizelle injiziert. Die Zona pellucida der Eizelle muss dabei nicht mehr selbstständig vom Spermium durchdrungen werden. Diese Methode wurde erstmals 1992 von der Arbeitsgruppe um Palermo vorgestellt [6]. Seitdem können auch Paare mit männlicher Subfertilität bis hin zur Azoospermie behandelt werden. Für eine genetische Untersuchung des Erbgutes des entstehenden Embryos muss die Befruchtung immer im Rahmen einer IVF oder ICSI durchgeführt werden.

Durch assistierte Reproduktion eingeleitete Schwangerschaften zeigen ein geringgradig erhöhtes Risiko für eine Schwangerschaftskomplikation oder eine Fehlbildung des Kindes. Neben einem erhöhten Abortrisiko wurden vor allem eine gesteigerte Anzahl an Frühgeburten und ein reduziertes Geburtsgewicht beobachtet [7]. Es wird jedoch diskutiert, dass diese Auffälligkeiten weniger mit der Behandlung, als mit der bestehenden Subfertilität und den genetischen Hintergrundrisiken der behandelten Paare zusammenhängen [7].

### **1.3 Unerfüllter Kinderwunsch und Kinderwunschzentren**

Nach der österreichischen IVF-Gesellschaft ist in Österreich jedes siebte Paar ungewollt kinderlos. In 40-50% der Fälle liegt die Ursache dafür bei der Frau, in 35-40% beim Mann und in 15% bei beiden Partnern [8]. Dabei müssen die Begriffe der Sterilität und Infertilität unterschieden werden. Kommt es trotz regelmäßigen, unverhüteten Geschlechtsverkehrs innerhalb eines Jahres nicht zu einer Schwangerschaft, spricht man von einer Sterilität.

Eine Infertilität liegt vor, wenn durch genetische Erkrankungen oder eine Uterusfehlbildung eine Frau nach erfolgreicher Konzeption nicht fähig ist, ein lebendes Kind auszutragen.

Weibliche Fertilitätsstörungen können endokrinologischer, organischer, psychischer oder genetischer Herkunft sein. Bei etwa einem Drittel der Frauen liegt die Kinderlosigkeit an einer Undurchlässigkeit oder einer Funktionsstörung der Eileiter. Auch eine Endometriose oder Störungen der Hypothalamus-Hypophysen-Achse, die eine Ovarialinsuffizienz bedingen können, führen häufig zu Sterilität oder Infertilität. In 15% sind die Ursachen extragenital, z.B. psychisch oder genetisch bedingt [9]. Durch den gesellschaftlichen Wandel sind Frauen zum Zeitpunkt des Kinderwunsches häufiger in einem erhöhten Alter, dies kann ebenfalls Ursache einer Infertilität sein [10].

Paare mit unerfülltem Kinderwunsch können sich in Österreich direkt an Kinderwunschzentren wenden oder werden von ihrer niedergelassenen Ärztin bzw. ihrem niedergelassenen Arzt dorthin übermittelt. In einem IVF-Zentrum werden diagnostische und therapeutische Maßnahmen organisiert, um die Gründe für die Kinderlosigkeit zu diagnostizieren und unter Berücksichtigung dieser eine assistierte Reproduktion zu planen.

Nach den Daten des IVF-Fonds wurden im Jahr 2014 5.261 Paare in den Vertragskrankenanstalten im Rahmen einer In-vitro-Fertilisation oder einer intrazytoplasmatischen Spermieninjektion behandelt (7.649). Diese führten zu 1.797 Schwangerschaften (Schwangerschaftsrate 30,9%) [11]. Die tatsächliche Baby-Take-Home-Rate betrug in öffentlichen Zentren 26% und in den privaten Zentren 29,8% [11]. Mit drei Behandlungsversuchen können etwa die Hälfte der Paare erfolgreich behandelt werden [12].

Am 1. Januar 2000 wurde im Rahmen des IVF-Fond-Gesetzes der IVF-Fond zur Finanzierung der In-vitro-Fertilisation eingerichtet. Bei Paaren mit einer durch Eileiterstörungen, Endometriose oder PCO-Syndrom verursachten Sterilität der Frau unter 40 Jahren oder Sterilität des Mannes unter 50 Jahren, übernimmt der Bund 70% der Behandlungskosten bei höchstens vier Behandlungszyklen. Werden Behandlungen unabhängig vom IVF-Fond durchgeführt, werden sie in den Berichten des österreichischen IVF-Registers nicht berücksichtigt. Es ist daher anzunehmen, dass die tatsächliche Zahl der IVF-Behandlungen höher ist.

## 1.4 Gesetzeslage

Die assistierte Reproduktion wird durch folgende Gesetze rechtlich geregelt:

1. Fortpflanzungsmedizingesetz (FMed)
2. Gentechnikgesetz (GTG)
3. Gewebesicherheitsgesetz (GSG)
4. IVF-Fond-Gesetz

Durch das vom Nationalrat und vom Bundesrat beschlossene Fortpflanzungsmedizinrechts-Änderungsgesetz 2015 (FMedRÄG 2015) [13] kam es rückwirkend zum 01.01.2015 neben einer Öffnung der medizinischen Reproduktion für in eingetragene Partnerschaften und Lebensgemeinschaften lebende Frauen auch zu einer Zulassung der Präimplantationsdiagnostik in Österreich.

Nach §9 des FMedG ist es erlaubt, entwicklungsfähige Zellen sowie Spermien und Eizellen „... nach dem Stand der medizinischen Wissenschaft und Erfahrung zur Herbeiführung einer Schwangerschaft oder zur Durchführung einer Präimplantationsdiagnostik nach §2a“ zu untersuchen und zu behandeln (§9, Absatz 2) [13]. Durch diese Änderung ist seit diesem Jahr bei besonderen Indikationen auch die genetische Untersuchung von Blastomeren nach Blastomerbiopsie, oder Trophoblasten nach Trophoctodermbiopsie möglich.

Nach §2a des FMedG ist eine Präimplantationsdiagnostik zulässig, wenn drei IVF-Versuche zu keiner Schwangerschaft führten, es zu habituellen Aborten kommt oder die genetische Konstitution mindestens eines Elternteils zu einem hohem Risiko für eine Fehlgeburt, eine Totgeburt oder die Geburt eines Kindes mit Erbkrankheit führt.

*„Eine Erbkrankheit im Sinn des Abs. 1 Z 3 liegt vor, wenn das Kind während der Schwangerschaft oder nach der Geburt derart erkrankt, dass*

- 1. es nur durch den ständigen Einsatz moderner Medizintechnik oder den fortdauernden Einsatz anderer, seine Lebensführung stark beeinträchtigender medizinischer oder pflegerischer Hilfsmittel am Leben erhalten werden kann oder*
- 2. schwerste Hirnschädigungen aufweist oder*
- 3. auf Dauer an nicht wirksam behandelbaren schwersten Schmerzen leiden wird und darüber hinaus keine kausale Behandlungsmöglichkeit besteht.“ (FMedG§2a)*

[13]

Kann eine Schwangerschaft und die Geburt eines Kindes ohne elterliche vererbare Krankheit durch eine Untersuchung vor der eigentlichen Befruchtung herbeigeführt werden, darf nur dieses Verfahren angewandt werden. Eine Präimplantationsdiagnostik ist in Österreich also nur erlaubt, wenn die Untersuchung der Keimzellen nicht ausreicht. Dies bedeutet, dass zum Ausschluss einer maternalen Erbkrankheit, sowie zur Beurteilung einer chromosomalen Anomalie weiterhin eine Polkörperdiagnostik durchgeführt werden müsste. Eine präimplantative Geschlechterbestimmung ist weiterhin nur bei geschlechtsspezifischen Erbkrankheiten zulässig.

Um die Entstehung überzähliger entwicklungsfähiger Zellen zu vermeiden und ein Schwangerschaftsrisiko durch eine Mehrlingsschwangerschaft zu verhindern, sollen nach §10 des FMedG bei einer IVF oder ICSI „...*nur so viele Eizellen befruchtet werden und in der Folge eingebracht werden, wie nach dem Stand der medizinischen Wissenschaft und Erfahrung innerhalb eines Zyklus für eine aussichtsreiche und zumutbare medizinisch unterstützte Fortpflanzung zumutbar sind.*“ (FMedG §10) [13]

## **1.5 Methoden zur Beurteilung von Eizelle, Embryo und Fetus**

### **1.5.1 Pränataldiagnostik**

Alle Untersuchungen die von der Einnistung des Embryos in die Gebärmutter bis zur Geburt durchgeführt werden, zählen zur Pränataldiagnostik. Sie dienen sowohl der Feststellung von Fehlentwicklungen und Erkrankungen des Kindes, als auch zur Planung des Geburtsvorganges. Es lassen sich nicht-invasive Untersuchungsmethoden wie Sonographie, Kardiographie und Testung des mütterlichen Blutes von den invasiven diagnostischen Verfahren wie der Chorionzottenbiopsie, der Fruchtwasserpunktion und der Nabelschnurpunktion unterscheiden.

#### *1.5.1.1 Nicht-invasive Pränataldiagnostik*

##### 1.5.1.1.1 Ultraschall

Im Rahmen der Schwangerschaftsvorsorge finden in der 9.-12. SSW, 19.-22. SSW und 29.-32. SSW routinemäßig Ultraschalluntersuchungen statt. Dies ermöglicht eine Beurteilung des embryonalen Wachstums, der Organe, der Fruchtwassermenge sowie eine Lagebeurteilung der Plazenta und des Embryos. Die Größe des Kindes, der Kopfumfang

und die Entwicklung der Organe geben Hinweise auf mögliche Fehlbildungen oder Entwicklungsstörungen.

Bei der Nackentransparenzmessung wird in der 12.-14 SSW mit einem ultrahochauflösendem Ultraschallgerät die Flüssigkeitsansammlung im Bereich des kindlichen Nackens gemessen. Eine Verstärkung kann hierbei auf eine Trisomie 21 hinweisen.

#### 1.5.1.1.2 Combined Test

Das Risiko für die Geburt eines Kindes mit Trisomie 21 wächst mit dem Lebensalter der Mutter. Durch Messung der Nackentransparenz, Bestimmung der Hormone PAPP-A und beta-hCG und dem mütterlichen Altersrisiko wird bei dem Combined-Test das Risiko berechnet, dass das ungeborene Kind unter Trisomie 21 leidet. Das Risiko wird dabei in Verhältniszahlen angegeben und bestimmt nur die Wahrscheinlichkeit. Er kann in der 11. bis 14. SSW durchgeführt werden, ist jedoch keine Routineuntersuchung. Ergibt der Combined-Test ein hohes Risiko für ein erkranktes Kind, wird eine Überprüfung des Testergebnisses mit einer invasiven Pränataldiagnostik empfohlen.

#### 1.5.1.1.3 Nicht-invasive pränatale Diagnostik (NIPD) - PraenaTest<sup>®</sup>

Im mütterlichen Blut zirkuliert zellfreie DNA (cfDNA), welche auch von abgestorbenen Zellen der Plazenta stammt. Wird von der Mutter mit einer Blutprobe zellfreie DNA gewonnen, sind davon ca. 10% fetales Erbmaterial (cffDNA). Diese kann mit der NIPD auf eine Aneuploidie untersucht werden. Dafür wird fetale und maternale zellfreie DNA aus dem Blutplasma der Mutter gewonnene, isoliert und sequenziert. Danach werden die Sequenzmengen für die jeweils untersuchten Chromosomen ausgewertet und darüber ein euploider oder aneuploider Chromosomenstatus nachgewiesen.

Die Untersuchung wird für die Chromosomen 13, 18 und 21 sowie gonosomale Aneuploidien angeboten.

#### *1.5.1.2 Invasive Pränataldiagnostik*

Da es sich bei den invasiven Untersuchungen um Eingriffe in die Fruchthöhle handelt, können sie in seltenen Fällen eine Fehlgeburt auslösen. Sie dürfen deswegen nur bei begründetem Verdacht auf ein bestehendes Gesundheitsrisiko der Mutter oder des Kindes durchgeführt werden.

#### 1.5.1.2.1 Chorionzottenbiopsie / Plazentese

Die Entnahme von Chorionzotten oder Plazentagewebe kann bereits in der 11. oder 12. Schwangerschaftswoche (SSW) vorgenommen werden und ist damit der früheste invasive Eingriff der pränatalen Diagnostik. Das Zottengewebe enthält Zytotrophoblasten und Fibroblasten. Durch Direkt-Präparation der Zytotrophoblasten sowie durch Langzeitkultur der Fibroblasten kann der chromosomale Status des Fetus ermittelt werden. Das Risiko einer Fehlgeburt beträgt bei dieser Untersuchung 0,5 bis 1%. Da im extraembryonalen Gewebe häufiger spontane Anomalien entstehen, kann es bei der Chorionzottenbiopsie zur Diagnostik von Pseudomosaiken kommen.

#### 1.5.1.2.2 Amniozentese

Durch die Entnahme von 10-20 ml Fruchtwasser können darin enthaltene embryonale Zellen untersucht werden. Nach der 16. SSW hat sich genug Fruchtwasser gebildet um eine risikoarme Untersuchung zu ermöglichen. Die gewonnenen Zellen werden für ca. zwei Wochen kultiviert. Anschließend kann eine Chromosomenanalyse oder eine spezifische molekulargenetische Untersuchung an dem Zellmaterial durchgeführt werden. Für die Amniozentese wird ein Fehlgeburtenrisiko von 0,5% angegeben.

#### 1.5.1.2.3 Chordonzentese

Bei der Nabelschnurpunktion werden dem Fetus 1-2 ml Blut am Ansatz der Nabelschnur entnommen. Diese Untersuchung wird vor allem bei Verdacht auf Infektionskrankheiten oder bei einem unklarem Befund nach einer Amniozentese oder einer Chorionzottenbiopsie durchgeführt. Darüber hinaus ist eine Verabreichung von Medikamenten auf diesem Wege möglich. Die Chordonzentese kann ab der 20. SSW durchgeführt werden. Das Risiko für eine Fehlgeburt liegt bei ca. 2%.

### **1.5.2 Präimplantationsdiagnostik**

Die Präimplantationsdiagnostik ermöglicht eine genetische Untersuchung des Embryos nach der Verschmelzung der Vorkerne, jedoch vor der Implantation in die Gebärmutter. Handyside stellte diese Untersuchung 1990 erstmals vor. Dabei werden ein bis zwei Blastomere von einem Embryo im 8- bis 10-Zellstadium am dritten Tag nach der Insemination entnommen [14]. In dieser Phase sind die Zellen teilweise noch totipotent, jede einzelne hat also die Möglichkeit sich zu einem Embryo zu entwickeln. Es muss dabei beachtet werden, dass das Entfernen eines Viertels der embryonalen Masse ein Risiko für die weitere Entwicklung des Embryos darstellt [15–17].

Die später etablierte Blastozysten- und Trophektodermbiopsie findet erst rund fünf Tage nach der Befruchtung statt [18, 19]. Zu diesem Zeitpunkt besteht der Embryo aus ca. 50 bis 80 pluripotenten Zellen, die sich zu Embryoblasten- oder Trophoblastenzellen differenziert haben. Da mehr Zellen entnommen werden können, hat dieses Verfahren eine höhere diagnostische Sicherheit. Durch die längere Kultivierung und die Schwierigkeiten bei der Entnahme der engverbundenen Zellen ist es aber technisch durchaus anspruchsvoll [20].

Die Präimplantationsdiagnostik kann zur Diagnostik von Aneuploidien, Translokationen, zur medizinisch indizierten Geschlechterwahl und zur Diagnostik von monogenen Erkrankungen genutzt werden. Da die molekulargenetische Untersuchung an embryonalen Zellen erfolgt, können genetische Störungen paternaler und maternaler Herkunft, sowie Fehlvorgänge während der Meiose und Zygotenbildung diagnostiziert werden.

Die Präimplantationsdiagnostik hat sich international als reproduktive Alternative bei Paaren mit einem hohem Risiko Erbkrankheiten zu übertragen und vor allem zur sonst teilweise üblichen Methode der „Schwangerschaft auf Probe“ etabliert.

### **1.5.3 Präfertilisationsdiagnostik**

Die Verschmelzung der Vorkerne ist definitionsgemäß der Zeitpunkt der Befruchtung. Bei der Präfertilisationsdiagnostik wird das Erbgut im Vorkernstadium auf Veränderungen untersucht. Dadurch kann im Rahmen einer IVF oder ICSI eine für den Transfer geeignete Zygote ausgesucht werden.

Die Polkörperdiagnostik ist ein Verfahren mit dem man indirekt die Eizelle auf strukturelle und numerische Chromosomenveränderungen sowie auf spezielle genetische Erkrankungen untersuchen kann. Es können dabei nur Erbkrankheiten ausgeschlossen werden, die über die Mutter weitergegeben werden. Da diese Diagnostik nicht an embryonalen Zellen durchgeführt wird, ist die Polkörperdiagnostik auch in Ländern möglich, in denen genetische Untersuchungen am Embryo verboten sind. Dies war bis zum Beginn des Jahres 2015 in Österreich der Fall. Die Polkörperdiagnostik war bis dahin in Österreich die einzige Möglichkeit, chromosomale Veränderungen und genetische Erkrankungen vor der Implantation des Embryos festzustellen und die Alternative zu einer „Schwangerschaft auf Probe“, welche eine enorme psychische Belastung für das Paar darstellt.

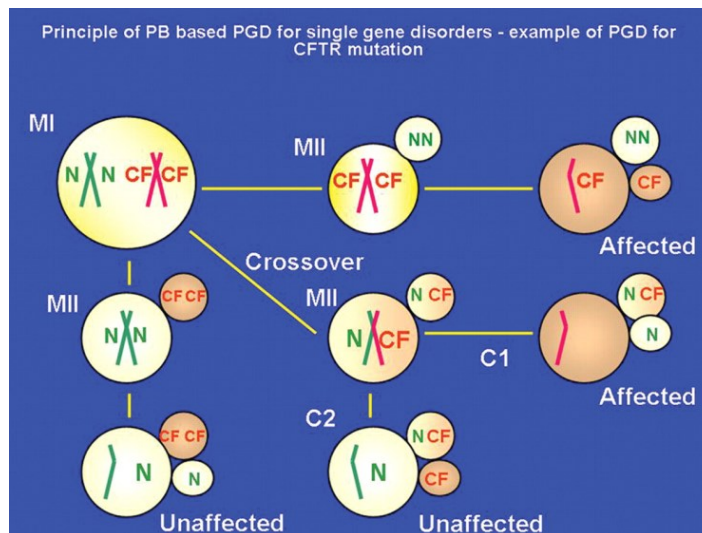
## **1.6 Meiose und Polkörperentstehung**

Die Meiose ist die spezielle Zellteilung der Geschlechtszellen, bei der aus den diploiden Keimzellen haploide Gameten (Oozyten und Spermatozoen) entstehen. Vor der ersten Reifeteilung werden in der S-Phase von jedem Chromosom zwei Schwesterchromatiden gebildet. Die Keimzelle enthält vor dem Beginn der Meiose somit den doppelten Chromosomensatz ( $4n$ ). In der ersten Reifeteilung lagern sich die homologen Chromosomen zunächst aneinander. Jedes Chromosomenpaar besteht zu diesem Zeitpunkt aus vier Chromatiden. Zwischen den Chromosomenpaaren kann es während dieser Phase zu einem Austausch von Chromatidabschnitten (Crossing-over) kommen. In der anschließenden Anaphase I werden die Chromosomen entlang der Spindelfasern voneinander getrennt und die verknüpften Schwesterchromatiden wandern zum jeweiligen Zellpol. Nach der Reduktionsteilung enthalten die zwei entstandenen Tochterzellen je einen Chromosomensatz mit jeweils zwei gepaarten Chromatiden pro Chromosom.

Es schließt sich direkt die zweite Reifeteilung an. Hierbei werden die Schwesterchromatiden jedes Chromosoms voneinander getrennt. Es entstehen Tochterzellen mit einem einfachen Chromosomensatz aus 23 einzelnen Chromatiden ( $1n$ ).

Die männliche Meiose ist ein lebenslang wiederkehrender Prozess, bei dem aus einer primären Spermatozyte vier gleichgroße Spermatozoen entstehen.

Bei der Frau werden die Oozyten schon während der Embryonalphase gebildet und verweilen im Stadium der Prophase I. Erst kurz vor der Ovulation, mit Anstieg des luteinisierenden Hormons, wird die erste Reifeteilung abgeschlossen [21]. Hierbei werden die Chromosomenpaare getrennt. Jeweils ein Chromosom verbleibt in der Eizelle, während der zweite Chromosomensatz ausgeschleust wird. Es entsteht der erste Polkörper, der in der weiteren Entwicklung degeneriert. Mit dem Eindringen des Spermiums in die Eizelle beginnt die zweite Reifeteilung der Oozyte. Die Schwesterchromatiden werden entlang der Spindelfasern getrennt. Ein Chromatidensatz verbleibt in der Eizelle, während der andere ausgeschleust wird und den zweiten Polkörper bildet. Auch dieser ist nur ein Nebenprodukt der Meiose und geht bei der weiteren Entwicklung zu Grunde. Die weibliche Meiose ist also eine asymmetrische Zellteilung bei der eine reife Eizelle mit 23 „Ein-Chromatid“-Chromosomen sowie zwei Polkörper entstehen. Der erste Polkörper besitzt 23 Chromosomen mit zwei Chromatiden, die bei korrekter Ausschleusung ident zum Chromosomensatz der sekundären Oozyte sind. Der zweite Polkörper verhält sich zur reifen Eizelle wie Bild zu Spiegelbild.



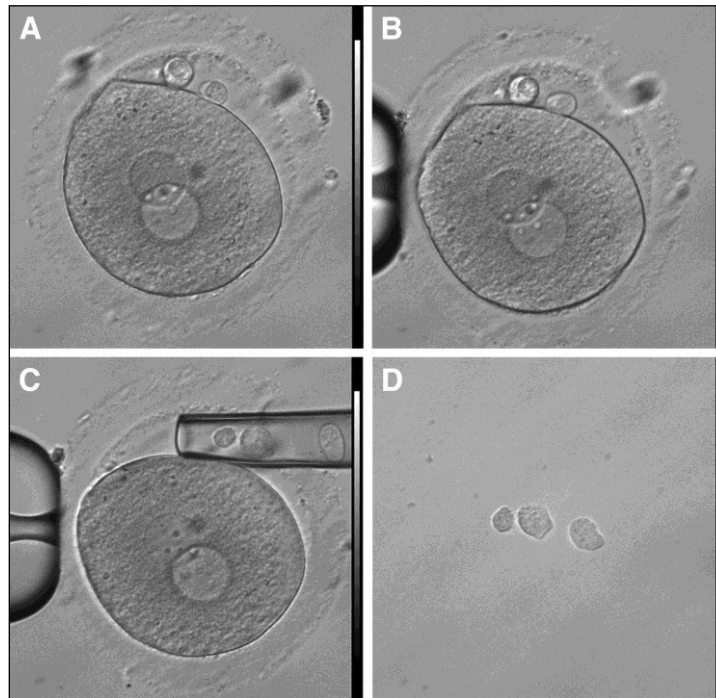
**Abbildung 1-1 Prinzip der Polkörperdiagnostik bei monogenen Erkrankungen am Beispiel der CFTR-Mutation**

nachgedruckt von Kuliev A, Rechitsky S. Polar body-based preimplantation genetic diagnosis for Mendelian disorders. *Molecular Human Reproduction*. 2011;17:275-285. [22] Die Oozyte ist heterozygot für eine Mutation im *CFTR*-Gen (MI). In der Meiose entstehen aus den diploiden Keimzellen haploide Gameten (MII). Ein Chromosom verbleibt in der Eizelle (große Kreise), der zweite Chromosomensatz wird mit dem ersten Polkörper (kleine Kreise) ausgeschleust. In der zweiten Reifeteilung werden die Schwesterchromatiden getrennt und es verbleibt jeweils ein Chromatidensatz in der Eizelle und der andere wird mit Bildung des zweiten Polkörpers (kleine Kreise) ausgeschleust. In der PKD kann durch Analyse der Polkörper auf das genetische Profil der Eizelle rückgeschlossen werden. Die Möglichkeiten der genetischen Verteilung sind dargestellt. N - normales Allel; CF –Mutationstragendes Allel (im *CFTR*-Gen); C1 und C2 sind die möglichen Nachkommen der heterozygoten Oozyte. Die dunklen Kreise stellen mutationstragende Eizellen und Polkörper dar. Beim Crossing-over (in der Mitte) kommt es zu einer Rekombination. Diese kann nur durch Analyse des ersten und zweiten Polkörpers identifiziert werden.

## **1.7 Ablauf und Indikationen der Polkörperdiagnostik**

Voraussetzung für jede Polkörperdiagnostik ist eine künstliche Befruchtung mittels In-vitro-Fertilisation oder intrazytoplasmatischer Spermieninjektion. Um die Wahrscheinlichkeit des Transfers eines geeigneten Embryos zu erhöhen, werden mehrere Eizellen inseminiert und untersucht. Für die gleichzeitige Reifung mehrerer Eizellen ist eine hormonelle Stimulation notwendig. Die reifen Eizellen werden nach einem hormonell eingeleiteten Eisprung mittels Follikelpunktion unter Ultraschallsicht gewonnen. Für eine präzise molekulargenetische Diagnostik bei einer bekannten monogenen Erkrankung wird die Befruchtung mittels ICSI durchgeführt. Dabei wird ein Spermium mittels einer Injektionsnadel unter Sicht eines Invertmikroskops direkt in die Eizelle eingeführt. Durch den Reiz der Insemination vollendet die Eizelle die zweite Reifeteilung. Die abgeschnürten Polkörper liegen unterhalb der Zona pellucida außerhalb des Zytoplasmas der Eizelle. Bei der Biopsie wird die Zona pellucida mechanisch oder laserassistent eröffnet und die Polkörper mittels einer Mikropipette entnommen. Für die meisten Fragestellungen empfiehlt sich eine Entnahme beider Polkörper. Diese kann getrennt voneinander oder

gemeinsam erfolgen. Für eine präzise Durchführung bedarf es einiger Erfahrung. Erfolgt die Polkörperbiopsie zu früh, besteht die Möglichkeit, dass der Spindelapparat noch Kontakt zu Chromosomen der Eizelle hat und somit Teile des Erbgutes mit hinausgezogen werden. Andererseits muss der Eingriff auch vor der Degeneration des ersten Polkörpers stattfinden. Anschließend werden die Polkörper in entsprechende Reagenzgefäße transferiert, lysiert und für die weiteren molekulargenetischen Untersuchungen aufbereitet.



**Abbildung 1-2 Verlauf einer Laser-assistierten Polkörperbiopsie** nachgedruckt von Montag M, Köster M, Strowitzki T, Toth B. Polar body biopsy. *Fertil. Steril.* 2013;100:603–7. [23]. Nach Anordnung der Eizelle und der beiden Polkörper in einer Bildebene (A), wird die Zona pellucida eröffnet (B). Zur Aspiration der Polkörper wird in die entstandene Öffnung eine stumpfe Biopsiekapillare eingeführt (C) und zur weiteren Analyse die Polkörper von der Eizelle separiert (D).

Die Polkörperdiagnostik ist ein interdisziplinäres Verfahren, das eine enge Zusammenarbeit der verschiedenen Zentren erfordert. Die Behandlung wird von Kinderwunschpaaren oft als psychisch sehr belastend empfunden. Eine ausführliche Beratung durch einen Reproduktionsmediziner und einen Humangenetiker ist daher vor Behandlungsbeginn dringend anzuraten.

Es gibt verschiedene Gründe, warum sich Paare für eine assistierte Reproduktion mit Polkörperdiagnostik entscheiden:

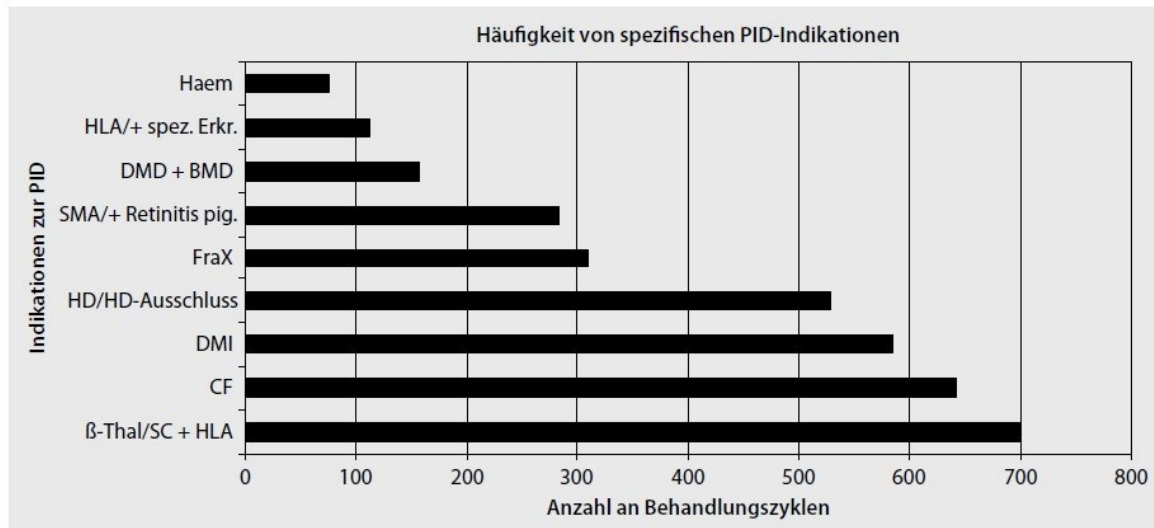
- Paare mit einem hohen Risiko ein Kind mit einem genetischen Defekt zu bekommen. Hierzu zählen familiär bekannte chromosomale Aberrationen und monogene Erkrankungen.
- Paare, die aus Fertilitätsgründen eine künstliche Befruchtung durchführen und ein erhöhtes genetisches Risiko haben. Bei diesen kann ein Aneuploidiescreening zur Verbesserung der Baby-Take-Home-Rate durchgeführt werden.

Der Chromosomenstatus des Polkörpers verhält sich wie ein Spiegelbild zur zugehörigen Eizelle. Ein Zugewinn oder Verlust des Erbmaterials der Eizelle stellt sich im Polkörper entgegengesetzt dar. Eine Monosomie des Polkörpers lässt dadurch auf eine Trisomie der Eizelle schließen. Eine solche Zygote kann dann von dem Transfer ausgeschlossen werden. Bei Frauen mit erhöhtem reproduktivem Alter (ab 35 Jahren) nimmt die Häufigkeit für numerische Chromosomenaberrationen zu [24–26]. Es zeigte sich zudem, dass Chromosomenveränderungen häufig die Ursache für Implantationsversagen oder Fehlgeburten sind [27]. Eine Analyse der Polkörper wird deswegen auch bei habituellen Aborten oder mehr als drei gescheiterten IVF-Zyklen eingesetzt. Da Aneuploidien in über 90% maternalen Ursprungs sind und es im Teilungs- und Blastozystenstadium häufig zu Mosaikbildungen kommt, ist die Polkörperdiagnostik in diesem Anwendungsgebiet der Präimplantationsdiagnostik mit Blastomerbiopsie überlegen [28, 29]. Zeigte sich bei der Biopsie von Blastomeren durch eine verringerte Implantationsrate keine Steigerung der Geburtenrate, soll die Auswahl einer Zygote im Rahmen der Polkörperdiagnostik zu einer höheren Baby-Take-Home-Rate führen [30].

Die Analyse der Polkörper kann bei Paaren mit bekannter erblicher Vorbelastung das Risiko eines Kindes mit dieser konkreten Fehlbildung oder das Risiko eines Abortes vermindern. Diese Paare könnten oftmals auch auf natürlichem Wege ein Kind zeugen, wollen aber eine künstliche Befruchtung mit einer molekulargenetischen Untersuchung, um die Erkrankung bei dem entstehenden Embryo auszuschließen. Eine Polkörperdiagnostik kann theoretisch bei allen bekannten monogenen Erkrankungen durchgeführt werden. Trägt ein analysierter 1. Polkörper in seinem Chromosomensatz die Mutation, lässt dies darauf schließen, dass die zugehörige Eizelle Träger des Wildtyp-Allels ist und somit hinsichtlich der untersuchten Erkrankung gesund ist.

Es sind theoretisch alle genetischen Erkrankungen mit bekanntem Mutationsort diagnostizierbar. Aus ethischen Gründen müssen hier aber Einschränkungen beachtet werden. Die am häufigsten diagnostizierten Erkrankungen sind  $\beta$ -Thalassämie, Cystische

Fibrose, myotone Dystrophie Typ I, Chorea Huntington und Fragiles X-Syndrom [20, 31]. Liegt das krankheitsverursachende Gen auf dem X-Chromosom kann eine medizinische Geschlechterwahl durchgeführt werden. Dies ist z.B. bei Hämophilie A und B oder bei Muskeldystrophie Typ Becker und Typ Duchene der Fall.



**Abbildung 1-3 Darstellung der häufigsten Indikationen für eine Präimplantationsdiagnostik bei vererbaren Krankheiten** nachgedruckt von Montag M, Toth B, Strowitzki T. Präimplantationsdiagnostik - PID: Präimplantative genetische Diagnostik (PGD) und präimplantatives genetisches Screening (PGS). Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2013;56:1670–8. [31] Erstellt nach Daten des ESHRE-PGD-Consortiums. *HLA* Screening auf humanes Leukozytenantigen, *CF* Cystische Fibrose, *DMI* Myotone Dystrophie Tyo I, *HD* Chorea Huntington, *FragX* Fragiles-X-Syndrom, *SMA* Spinale Muskelatrophie, *DMD* Duchene-Muskeldystrophie, *BMD* Becker-Muskeldystrophie, *Haem* Hämophilie.

Die Polkörperdiagnostik ist eine indirekte, gezielte Analyse des Erbmaterials auf eine spezifische Erkrankung. Sie gibt keine Aussage darüber, ob sich der Embryo zu einem gesunden Kind entwickelt, sondern nur, dass er von der analysierten Störung mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht betroffen ist.

## **1.8 Techniken und Einschränkungen der Polkörper- und Präimplantationsdiagnostik**

### **1.8.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zum Nachweis numerischer Chromosomenfehlverteilungen**

Für die Darstellung einzelner Chromosomen oder Chromosomenabschnitte können diese mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und mit einem speziell gefilterten Mikroskop betrachtet werden. Hybridisierung bezeichnet dabei das Binden der fluoreszenzmarkierten, einzelsträngigen DNA-Sonden an spezifische Chromosomenabschnitte. Die Untersuchung

ist in allen Zellzyklusphasen durchführbar. Durch die Bindung wird pro Chromatid ein Signal dargestellt. Diese werden unter dem Mikroskop gezählt. Bei der Blastomerdiagnostik müssten pro Farbstoff zwei Signale sichtbar sein, bei der Diagnostik des ersten und zweiten Polkörpers drei. Ein zusätzliches oder fehlendes Signal lässt auf den Verlust oder den Zugewinn von chromosomalem Material schließen.

Numerische Chromosomenfehlverteilungen (Aneuploidien) sind die Hauptursache für Implantationsversagen, embryonale Entwicklungsstörungen und Fehlgeburten [22, 24]. Dieses Wissen führte zu dem Gedanken, dass die Implantation von nachweislich euploiden Embryonen zu einem besseren Schwangerschafts-Outcome führt. Die Anwendung der PID zur Untersuchung auf Aneuploidien wird auch Präimplantation Genetic Screening (PGS) genannt und wurde schnell zu der meist angewandten Untersuchung der Präimplantations- und Präfertilisationsdiagnostik. Zunächst war die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) das Standardverfahren zum Nachweis von Aneuploidien. Die Anzahl der nachweisbaren Chromosomen ist jedoch durch die Zahl der vorhandenen Fluoreszenzfarbstoffe und durch die Filterausstattung der Mikroskope begrenzt. Eine Aneuploidie der Chromosomen 13, 18 oder 21 führt zu schwerwiegenden, aber häufig mit dem Leben zu vereinbarenden Fehlbildungen. In Untersuchungen von Abortmaterial fanden sich am häufigsten Aneuploidien der Chromosomen 16 und 22. Deswegen werden in einem Aneuploidiescreening mittels FISH-Technik Blastomere oder Polkörper vor allem auf einen Gewinn oder Verlust der Chromosomen 13, 16, 18, 21 und 22 untersucht. Die erwartete Steigerung der Lebendgeburtenrate durch ein solches Blastomerscreening konnte allerdings nicht bestätigt werden und war Gegenstand intensiver Diskussionen [17].

Da es bei Embryonen im Teilungsstadium häufig zur Mosaikbildung kommt und gezeigt wurde, dass eine Entfernung von ein oder zwei Blastomeren einen negativen Einfluss auf die Implantation und Entwicklung des Embryos haben [15, 16, 32], wurde zum Aneuploidiescreening eine Untersuchung der Polkörper empfohlen [29]. Weil numerische Chromosomenfehlverteilungen vor allem in der Meiose entstehen und in 90% mütterlichen Ursprung sind hat die Polkörperdiagnostik, in der nur maternales Erbgut untersucht wird, hierbei keine Nachteile gegenüber der Präimplantationsdiagnostik [25, 28, 33].

Des Weiteren muss beachtet werden, dass Aneuploidien in allen 24 Chromosomen möglich sind. Deswegen wurde diskutiert, ob numerische Veränderungen in anderen als den fünf häufig untersuchten Chromosomen zu Implantationsversagen oder zu einem Schwangerschaftsabbruch im ersten Trimenon führen. Eine Darstellung von mehr Chromosomen mittels FISH ist durch ein Abwaschen der ersten Marker und eine

Rehybridisierung des DNA-Materials mit neuen Markern zwar theoretisch möglich, führt aber häufig zu Hybridisierungsartefakten und Interpretationsschwierigkeiten. Dagegen ermöglicht eine Diagnostik mittels Array-CGH die gleichzeitige Darstellung von allen Chromosomen.

Durch die eingeschränkten diagnostischen Fähigkeiten der FISH gegenüber der Array-CGH wurde in den Guidelines der ESHRE 2011 bestimmt, dass eine Aneuploidie-Diagnostik mit FISH nicht mehr durchzuführen ist [34].

### **1.8.2 Array CGH**

Durch eine Amplifikation des gesamten Genoms (Whole Genome Amplification, WGA) und eine anschließende vergleichende Analyse der Embryo-DNA (Test-DNA) gegen eine euploide Referenz-DNA, kann eine genomweite Aneuploidiediagnostik und eine Analyse auf strukturelle Chromosomenveränderungen (Translokationen) ermöglicht werden. Die Test-DNA und die Referenz-DNA werden hierbei mit fluoreszenzmarkierten, einzelsträngigen DNA-Sonden unterschiedlicher Farbe (meist rot und grün) markiert und auf ein Raster immobilierter DNA-Fragmente (Oligonukleotide oder BAC-Klone auf einem Array) hybridisiert. Das Auflösungsvermögen wird durch die sog. Spacing bestimmt und kann bei extrem hochauflösenden Arrays (z.B. eine Million Datenpunkte) im unteren kb-Bereich liegen. Die Auswertung der Signalintensitäten erfolgt mittels einer Softwareanalyse, welche die Anteile der Test-DNA und Referenz-DNA in jedem Fragmentabschnitt darstellt. Zugewinne und Verluste im Embryogenom sind so gut zu identifizieren. Da die Array-CGH gegenüber der FISH-Technik nicht nur genauer, sondern auch schneller und das Ergebnis nicht von einem subjektiven Signalzählen abhängig ist, wird eine Aneuploidiediagnostik via FISH nicht mehr angewandt.

Die Array-CGH ist neben der gleichzeitigen Untersuchung aller Chromosomen auf Aneuploidien auch zum Nachweis unbalancierter Translokationen geeignet. Bei einer reziproken Translokation kommt es zum Austausch genetischen Materials zwischen zwei Chromosomen. Dies hat nur eine direkte Auswirkung auf die Entwicklung, wenn der Bruchpunkt in einem Gen liegt. Die Robertsonsche Translokation ist die Fusion zweier akrozentrischer Chromosomen (Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22). Dadurch kommt es zu einem verminderten Chromosomensatz von 45. Dies hat keine Auswirkung für die Betroffenen. Träger und Trägerinnen beider Translokationen können jedoch Gameten mit einem unbalancierten

Chromosomensatz bilden, was zu Infertilität, Implantationsversagen, Aborten oder der Geburt von Kindern mit einer schweren Fehlbildung führen kann.

Durch die Amplifikation des gesamten Genoms sind sowohl eine Wiederholung der Array-CGH sowie eine zusätzliche DNA-Analyse, z.B. auf monogene Erkrankungen durch andere Verfahren, möglich.

### **1.8.3 PCR-basierende Methoden zur Diagnostik monogener Erkrankungen**

Nahezu alle monogenen Erkrankungen mit bekanntem Mutationsort können in Blastomeren oder (die maternalen Anteile) in Polkörpern nachgewiesen werden. Nach der Polkörper- oder Blastomergewinnung wird die Zelle lysiert und die DNA vervielfältigt. Es kann entweder das gesamte Genom (Whole Genome Amplification, WGA) oder mittels spezifischer Primer, nur ein Chromosomenabschnitt von Interesse amplifiziert werden. Die Amplifikation beruht meist auf einer Polymerasekettenreaktion (PCR). Dabei binden sich je nach Verfahren kurze Primer mit zufälligen Sequenzen oder sequenzspezifische Primer (DNA-Fragmente) an den DNA Strang. Sie bilden den Startpunkt für die DNA-Polymerase, welche den ursprünglichen DNA-Strang abliest und einen korrespondierenden Strang bildet. Eine PCR-Reaktion verläuft immer in drei Schritten. Begonnen wird mit einer Denaturierung, nach der die doppelsträngige DNA in zwei Einzelsträngen vorliegt. Darauf folgt das Annealing, bei der sich die Primer an die DNA-Stränge anlagern. Und final die Amplifikation, bei der die DNA-Polymerase einen korrespondierenden DNA-Strang bildet. Diese Schritte werden mehrfach wiederholt, so dass nach einer PCR-Reaktion das Vielfache der eingesetzten DNA-Menge vorliegt.

Der Mutationsnachweis erfolgt nach der Vervielfältigung entweder direkt durch Sequenzierung der krankheitsspezifischen Region, oder indirekt durch gekoppelte Marker. Marker sind beliebige mendelsche Merkmale, mit deren Hilfe man die Weitergabe von Chromosomenabschnitten in einem Stammbaum verfolgen kann. Sie sollten ausreichend polymorph sein, also in vielen Sequenzvarianten in einer Population auftreten. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass die untersuchten Personen für diesen Marker heterozygot sind.

Es gibt verschiedene Arten von DNA-Polymorphismen. Single nucleotide repeats (STR) sind Dinukleotidwiederholungen, die sich in der Anzahl der Wiederholungen in den Individuen unterscheiden. Sie werden auch Mikrosatelliten genannt. Das menschliche Genom besteht zu mehr als 1% aus solchen repetitiven

Sequenzen, die jedoch häufig in nicht-kodierenden Bereichen liegen und somit dann zu keinem funktionellen Genprodukt führen. In einer PCR-Reaktion können STR-Marker amplifiziert werden, wodurch, wenn sich die Anzahl der Dinukleotidwiederholungen in den beiden Allelen unterscheidet, zwei Produkte mit unterschiedlicher Größe entstehen. Durch den hohen Polymorphismus der einzelnen STR-Loci sind sie sehr gut als genetische Marker, vor allem im Bereich der Abstammungsstudien einsetzbar.

Beim Single nucleotid polymorphism (SNP) kommt es nur zum Austausch einer einzigen Base. Sie können funktionell sein oder aber auf die Funktion des Gens keinen Einfluss haben. Bei einer chromosom- oder genomweiten Analyse zeigt jedes Individuum ein eigenes SNP-Muster, welches für Kopplungs- und Assoziationsstudien sehr interessant ist.

Jeder informative Marker, der in der direkten Umgebung zum Genlocus liegt, kann zum Ermitteln des Fehlens oder Vorhandesseins einer Mutation genutzt werden. Ein direkter Mutationsnachweis ist dabei nicht mehr nötig. Dabei ist es wichtig, dass der Marker informativ ist, das heißt beide Allele heterozygot für diesen Genabschnitt sind. In der Präimplantationsdiagnostik kann damit durch Unterschiede bei beiden Elternteilen auch die Allelherkunft im Embryo nachvollzogen werden. Um eine Rekombination auszuschließen, sollten mindestens zwei informative Marker verwendet werden, die möglichst nah an beiden Seiten der krankheitsspezifischen Mutation liegen. Vor der Durchführung einer Polkörperdiagnostik oder einer Präimplantationsdiagnostik müssen aufwendige Voruntersuchungen erfolgen und anhand der Partner und, wenn möglich, eines Indexpatienten und der Patienteltern ein familienspezifisches Testsystem etabliert werden, damit bekannt ist, auf welchem Allel die Mutation weitergegeben wird.

Unterschiedliche DNA-Veränderungen in einem Gen können zur gleichen Erkrankung führen. Um eine Mutation direkt nachzuweisen, müssen die Sequenzen der familienspezifischen Mutation und die Information des zugehörigen Wildtyp-Allels bekannt sein. Die Analyse kann z.B. über eine Längendifferenz eines PCR-Produktes durch eine Deletion, Insertion oder Repeatexpansion erfolgen oder mittels einer Minisequenzierung, bei der nur eine geringe Länge an Basenpaaren sequenziert wird.

Die präzise Vervielfältigung des genetischen Materials einer einzigen Zelle ist die höchste Herausforderung der Polkörper- und Präimplantationsdiagnostik. Das Probenmaterial kann durch zusätzliche Spermien, die an der Eizelle anhaften, durch Zellen des Laboranten oder durch Übertragung von vorherigen PCR-Produkten im Labor mit Fremd-DNA kontaminiert werden. Um die Gefahr zu minimieren wird eine künstliche Befruchtung im

Rahmen einer monogenetischen Diagnostik nur mittels ICSI durchgeführt. Weiters gibt das ESHRE PGD Consortium Guidelines für den korrekten Umgang mit Proben und für den Laborablauf heraus [34].

Ein weiteres Risiko der Einzelzellamplifikation ist die Vervielfältigung von nur einem Allel (allelic dropout, ADO). Dies kann entstehen, wenn einer der beiden eingesetzten Primer weniger effizient ist, durch eine ineffiziente Zelllyse oder durch degenerierte DNA [35]. Dadurch kann ein Embryo oder ein Polkörper/eine zugehörige Eizelle fälschlicherweise als homozygot erkrankt oder homozygot gesund bestimmt werden. Der Verlust eines Allels gilt als Hauptursache für Fehldiagnosen in der PID [36]. Meist kann ein ADO durch die Analyse gekoppelter Marker nachgewiesen werden. Es empfiehlt sich daher die Kombination eines direkten Mutationsnachweises mit einem indirekten durch gekoppelte Marker.

#### **1.8.4 SNP-Array und Karyomapping**

SNPs sind Sequenzvarianten, die auf dem Genom jedes Menschen unregelmäßig verteilt sind. Es handelt sich dabei um einen Austausch eines einzigen Basenpaares. Sehr häufig kommt es dabei zu einem Austausch von Cytosin zu Thymin. SNPs werden vererbt und so trägt jeder Mensch in seinem Genom ein individuelles SNP-Muster, das durch die Kombination der beiden elterlichen Erbanlagen entstand.

Standard SNP-Arrays ermöglichen die Erstellung eines Genotyps von 100.000 bis 500.000 SNPs, die in der Bevölkerung bekannt sind, in einer einzigen DNA-Probe. Dies ermöglicht eine Analyse auf das Vorhandensein genetischer Erkrankungen sowie eine Beurteilung der numerischen Chromosomenverteilung durch die Signale der SNP-Allele. Der Analyse geht eine Amplifikation der DNA mittels Whole Genome Amplification voraus.

Handyside publizierte 2010 ein auf SNP-Arrays basierendes Verfahren namens Karyomapping [38]. Es macht die aufwendige Etablierung familienspezifischer Nachweissysteme für monogene Erkrankungen nicht mehr nötig. Auf einem SNP-Mikroarray wird der Genotyp der Eltern für hunderttausende genomweit verteilte SNPs erstellt. Auf diese Weise kann für jedes elterliche Chromosom ein informatives Muster an SNP-Markern ermittelt werden. Dies ermöglicht bei den Nachkommen das Nachvollziehen der Herkunft jedes Chromosomenabschnitts. Ist ein krankheitsspezifischer Mutationsort einmal identifiziert, kann bestimmt werden, ob der elterliche DNA-Abschnitt, der zu einer Erkrankung führt, dem im Embryo vorhandenen DNA-Abschnitt entspricht. In diesem Fall würde auch der Embryo die Mutation tragen.

Neben der Zeitersparnis hat das Karyomapping den Vorteil, dass eine gleichzeitige Untersuchung auf mehrere genetische Mutationen möglich ist [39, 40]. Auch eine Aneuploidie- und Translokationsanalyse kann mit Einschränkungen erfolgen. Bislang ist diese Methode jedoch noch sehr teuer und wird nur in wenigen Zentren durchgeführt. Eine Kontamination kann durch das Auftreten von familienuntypischen SNP-Mustern festgestellt werden. Auch der Verlust eines Allels bei der anfänglichen Amplifikation (ADO) kann durch das Fehlen der Informationen des zweiten Chromosoms identifiziert werden.

### **1.8.5 Next Generation Sequencing (NGS)**

Die Methoden der Whole Genome Amplification und Sequenzierung haben in den letzten Jahren eine solche Präzision erreicht, dass es möglich geworden ist das gesamte Genom zu sequenzieren. Dadurch kann man in einem Experiment das Genom auf das gesamte Spektrum der genetischen Varianten untersuchen und vor allem auch de novo Mutationen nachweisen.

Für die Amplifikation wird meist eine PCR-basierende WGA verwendet, bei der das Genom zunächst in Fragmente (100-200 bp) unterteilt wird an denen dann zufälligen Primer binden. In den nun parallel beginnenden Amplifikationen findet durch sukzessive Zugabe von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden zeitgleich die Sequenzierung statt („Sequencing by Synthesis“) [35]. Die entstandenen Sequenzen werden mit einem Referenzgenom auf genetische Varianten verglichen.

Bislang wurden die Untersuchungen vor allem an mehr als einer Zelle durchgeführt. Unter Verwendung von 5-10 Zellen die mittels Trophektodermbiopsie gewonnen wurden konnten vielversprechenden Ergebnisse erzielt werden [41–43].

## **1.9 Zielsetzung der Arbeit**

Wenn bei Paaren mit Kinderwunsch eine genetische Vorbelastung der Mutter bekannt ist, kann durch eine spezifische Untersuchung der Polkörper das Risiko einer Schwangerschaft mit einem von dieser Krankheit schwer und lebensbedrohlich betroffenen Kind vermieden werden. Durch die Diagnostik der Polkörper auf diese monogene Erkrankung kann ein Rückschluss auf den Haplotyp der Eizelle getroffen werden und diese dann je nach genetischer Veranlagung eventuell vom Transfer ausgeschlossen werden.

Durch die geringe eingesetzte DNA-Menge eines Polkörpers, gilt es, die Schwierigkeiten einer fehlerhaften Lyse oder Amplifikation zu überwinden. Des Weiteren muss

gewährleistet sein, dass durch umfangreiche direkte und indirekte Analyse eventuell auftretende Kontaminationen oder Amplifikationsfehler sicher erkannt werden.

Das Ziel der vorliegenden Diplomarbeit ist es, eine labortechnische Methode zu etablieren mit welcher Polkörper auf monogene Erkrankungen untersucht werden können. Dieses Protokoll soll dann für die Untersuchung von Polkörpern in der Reproduktionsmedizin im Rahmen der Diagnostik angewandt werden können.

Die Aufgabenstellung der Arbeit gliedert sich in drei Teilbereiche.

1. Gesamt-genomische und sequenzspezifische Amplifikationsverfahren wurden miteinander verglichen und die Protokolle soweit optimiert, dass eine fehlerfreie Vervielfältigung der DNA für eine weiterführende Untersuchung möglich wurde.
2. Indirekte und direkte Analysemethoden wurden angewandt, um eine sichere Aussage über den Haplotypen von Einzelzellen zu gewährleisten.
3. Ein erfolgversprechendes Protokoll wurde, in Zusammenarbeit mit einem Kinderwunschzentrum, bei den Polkörpern einer Patientin mit Ornithintranscarbamylase-Defekt unter diagnostischen Bedingungen angewandt.

### **1.10 Beispiel für eine monogene Erkrankung: der Ornithintranscarbamylase-Defekt**

Wie bereits beschrieben, darf eine PID oder Präfertilisationsdiagnostik bei monogenen Erkrankungen nur unter sehr strikten gesetzlichen und ethischen Auflagen erfolgen. Die Bedeutung eines erblichen Stoffwechseldefekts, der sogar schon bei Neugeborenen und Kindern tödlich verlaufen kann, soll im Folgendem zusammengefasst werden:

Beim Ornithintranscarbamylase-Mangel (*OTC*-Mangel) handelt es sich um die am häufigsten auftretende Störung des Harnstoffzyklus. Diese wird durch eine Mutation im *OTC*-Gen ausgelöst, welches auf dem X-Chromosom (Genlocus Xp11.4) liegt, wobei hier über 300 verschiedene Mutationen bekannt sind [44].

Im Harnstoffzyklus wird zunächst aus freiem Ammoniak und Kohlestoffdioxid Carbamoylphosphat gebildet. Mit der Ornithintranscarbamylase wird die Carbamoylgruppe auf Ornithin übertragen und es entsteht Citrullin, welches über einen Citrullin-Ornithin-Antiport aus dem Mitochondrium in das Zytoplasma gebracht werden kann. Durch einen Mangel an Ornithintranscarbamylase ist die Citrullin-Synthese reduziert oder kommt ganz

zum Erliegen. Das überschüssige Carbamoylphosphat wird anschließend teilweise zu Orotsäure umgewandelt, welche mit dem Harn ausgeschieden wird.

Eine Mutation ohne Restaktivität des *OTCs* führt bei Jungen zu einer schweren Hyperammonämie, welche oftmals in den ersten Lebenstagen zum Tode führt. Bei Frauen ist der Phänotyp dagegen sehr variabel. Sie können vollkommen beschwerdefrei sein oder aber die Symptome reichen von Erbrechen, Atemstörungen, Muskelhypotonie oder psychomotorischer Retardierung bis hin zum hyperammonämischen Koma. Die Therapie basiert vor allem auf einer absoluten Einschränkung der Eiweißzufuhr. Darüber hinaus ist es möglich Arginin sowie die Ammoniakbinder Na-Benzoesäure und Na-Phenylbutyrat zu verabreichen. In lebensbedrohlichen Stoffwechsellagen ist es möglich, durch unspezifische Methoden wie Diurese und Dialyse die Ammoniakkonzentration im Blut zu senken. [45]

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Proben**

Bezüglich der Methodenetablierung liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz vor. In Zusammenarbeit mit österreichischen Kinderwunschzentren wurden für labortechnische Basisexperimente anonymisierte Polkörper und genomische DNA, entsprechend dem Studienprotokoll, verwendet. Ferner wurde die Amplifikationsverfahren an mononukleären Zellen von Proben ohne bekannte genetische Veränderung, mit einer  $\Delta F508$ -Mutation im *CFTR*-Gen oder mit bekannter Mutation im *OTC*-Gen verwendet. Nachdem ein diagnostisches Verfahren etabliert wurde, erfolgte die Laboruntersuchung an Polkörpern zum Ausschluss einer Mutation im *OTC*-Gen. Für die Polkörperdiagnostik wurde nach Aufklärung der Patientin eine schriftliche Einverständniserklärung gemäß dem Gentechnikgesetz eingeholt.

### **2.2 Probengewinnung und -aufbereitung**

#### **2.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus heparinisiertem Vollblut**

Für die Auftrennung des heparinisierten Vollbluts wird eine Trennlösung mit einer Dichte von 1,077 g/ml hergestellt. Da das Easycoll eine ursprüngliche Dichte von 1,124 g/ml besitzt, werden 60,5 ml Easycoll mit 39,5 ml PBS gemischt. Das heparinisierte Vollblut wird in einem 50 ml Greiner Tube mit PBS auf 35 ml verdünnt und danach vorsichtig in

einem 50 ml Greiner Tube über 15 ml Easycoll mit einer Dichte von 1.077 g/ml geschichtet. Beim anschließenden Zentrifugieren bei 400 x g (15-25 °C, Bremse 3 und Beschleunigung 3) für 30 Minuten schichten sich die im Blut enthaltenen Zellen je nach ihrer Dichte. Erythrozyten und Granulozyten haben eine größere Dichte als Easycoll und setzen sich unterhalb ab. Monozyten und Lymphozyten haben eine geringere Dichte als Easycoll und bilden einen Ring oberhalb der Trennlösung. Die Thrombozyten und das Plasma haben die geringste Dichte und bilden die oberste Schicht. Die mononukleären Zellen werden vorsichtig abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen und mit 350 x g bei 4 °C für 10 Minuten (Bremse 5, Beschleunigung 5) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in PBS resuspendiert.

### **2.2.2 Anlage von Langzeitkulturen**

Das heparinisierte Blut wird in gleichen Teilen mit PBS gemischt. Es werden 4 ml Ficoll in ein Plastikzentrifugen-Röhrchen gegeben und auf Zimmertemperatur vorgewärmt, danach wird das Ficoll langsam mit dem Blut-PBS-Gemisch überschichtet. In der Zentrifuge wird die Probe bei ausgeschalteter Bremse langsam beschleunigt und dann vorsichtig über 20 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird bis knapp über den Lymphozytenring abpipettiert. Im Anschluss wird der Lymphozytenring vorsichtig ohne Ficoll abgehoben und in 10 ml PBS pipettiert. Es wird für 10 Minuten zentrifugiert und der Waschvorgang mit PBS zweimal wiederholt. Das Lymphozytenpellet wird in 2 ml RPMI 1640 Herpes/20% FKS/1% ABS resuspendiert und die gleiche Menge Affenzellüberstand zugegeben. Die Probe wird bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert. Danach wird die Hälfte des Mediums einmal durch frische PBS-Lösung ersetzt und 3 Tropfen CYA [50 µg/ml] zugefügt.

Die Zellen müssen ungefähr nach einer Woche zum ersten Mal gefüttert werden. Dabei wird die Hälfte des Mediums durch frische PBS-Lösung ersetzt und in den ersten drei Wochen bei jedem Füttern CYA zugetropft. Die Kulturen werden zunächst stehend inkubiert. Ist das Nunc-Schrägtube zur Hälfte gefüllt wird weiter liegend kultiviert, ist es voll wird die Kultur in eine 50 ml Kulturflasche überführt. Bei guter Zellvermehrung kann das Medium auf RPMI 1640/10% FKS/1% ABS gewechselt werden.

### **2.2.3 DNA-Isolierung mittels QIAamp Blood Mini Kit**

Die Passagesäulen des QIAamp Blood Mini Kits enthalten Silikagel. Durch die besonders gut DNA-bindende Eigenschaft der Kieselerde kann aus einem Zelllysat der vorher

gewonnen mononukleären Zellen oder Zellen der Langzeitkultur genomische DNA extrahiert werden, während die weiteren Zellbestandteile die Säule passieren.

Dafür werden die Zellen 5 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das entstandene Zellpellet wird zur Lyse mit 200 µl PBS, 20 µl Proteinase K sowie 200 µl ALB Puffer gemischt und für 10 Minuten bei 56 °C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation werden 200 µl Ethanol (100%) hinzugegeben, die Probe gemischt, erneut zentrifugiert und auf eine QIAamp Mini Spinsäule überführt. Bei 6000 x g wird 1 Minute zentrifugiert und das Filtrat anschließend verworfen. Die Säule wird in ein neues 2 ml Collection Tube gestellt und nach dem Überschichten mit 500 µl AW1-Puffer erneut für 1 Minute bei 6000 x g zentrifugiert. Im Anschluss werden 500 µl AW2-Puffer über die Säule gegeben und diese für 1 Minute bei 20.000 x g zentrifugiert. Die Säule wird in ein neues Collection-Tube gestellt und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Schließlich wird die Säule in ein 1,5 ml Mikrozentrifugen-Tube gegeben, mit 50 µl nukleasefreiem Wasser überschichtet und nach fünfminütigen Inkubieren bei Raumtemperatur ein letztes Mal für 1 Minute bei 6000 x g zentrifugiert. Im Mikrozentrifugen-Tube findet sich nun die extrahierte genomische DNA der Zellen.

## **2.2.4 Einzelzellgewinnung**

### *2.2.4.1 Manuelle Einzelzellgewinnung*

Die mononukleären Zellen werden unter Mikroskop-Sicht mittels einer 10 µl Pipette in je 1 µL PBS einzeln in 200 µl Eppendorf-PCR-Tubes überführt. Je nach Protokoll werden bestimmte Mengen nukleasefreies Wasser zugefügt.

### *2.2.4.2 Einzelzellgewinnung mit dem AVISO CellSelector*

Der CellSelector ermöglicht einen automatisierten Transfer einer Einzelzelle aus einer Zellkolonie in ein vorbestimmtes PCR-Tube.

Dafür werden mononukleäre Zellen wie oben beschrieben gewonnen, mit PBS gewaschen und in eine 4-Well-Kammer gegeben. Mittels des integrierten Mikroskops wird die Zellkolonie analysiert, eine Einzelzelle ausgesucht und diese markiert. Der CellSelector pipettiert diese dann automatisch mit 0,8 µl PBS und überführt sie in den Deckel eines vorher zugewiesenen 200 µl Tubes.

In die Deckel der Tubes wird vor der Isolation je nach weiterem Lyseprotokoll eine bestimmte Menge an nukleasefreiem Wasser vorgelegt.

### **2.2.5 Polkörperbiopsie**

Die Polkörperentnahme erfolgt je nach Reifegrad der Eizelle fünf bis maximal zwölf Stunden nach der Spermieninjektion in den Laboren der Kinderwunschzentren. Vor der Biopsie der Polkörper werden die Eizellen bei 37 °C und unter 5-6% CO<sub>2</sub> inkubiert. Es werden Petrischalen und 200 µl Eppendorf PCR Tubes vorbereitet. In den Eppendorf Tubes werden die Polkörper nach Entnahme transportiert und lysiert. Dafür werden je nach verwendeten Lyseverfahren vorgegebene Mengen an nukleasefreiem Wasser, Proteinase K oder einer anderen Lyselösung vorgelegt.

In den Petrischalen erfolgt die Polkörperbiopsie. Dafür werden 8 µl Polyvinylpyrrolidon (PVP) sowie 3 µl Flushing Buffer für die Eizelle und je 2 µl Flushing-Buffer für die zugehörigen Polkörper an beschriebenen Positionen aufgetragen. Diese Tropfen werden mit 3 ml Paraffinöl überschichtet. Die Eizelle wird nach Überführung in einen Flushing Buffer Tropfen mit einer Haltepipette fixiert und die Zona pellucida mit einem OCTAX-Laserstrahl gezielt über den Polkörpern beschossen. Über die entstandene 30 µm große Öffnung können die Polkörper mit einer Biopsie-Pipette abgesaugt werden. Sie werden neben die zugehörige Eizelle in einem eigenen Flushing Buffer Tropfen platziert und mit einer 75 µm MidAtlantic Kapillare in eines der vorbereiteten Eppendorf-PCR-Tubes überführt.

Die Proben werden für mindestens 24 Stunden bei -20 °C eingefroren und danach mittels Kurierdienst auf Kühl-Akkus möglichst schonend verschickt.

### **2.3 Kit-basierende Whole Genome Amplification**

Bei der Einzelzelldiagnostik sind die eingesetzten DNA-Mengen sehr gering. Eine Vervielfältigung ist daher vor der Untersuchung zwingend notwendig. Diese sollte so umfassend sein, dass mehrere Analyseverfahren und eventuell zukünftige Studien an der Probe durchgeführt werden können. Dabei ist es sehr wichtig, dass genaue Kopien der ursprünglich eingesetzten DNA-Stränge entstehen.

Mit der Whole Genome Amplification (WGA) ist es möglich das gesamte Genom zu vervielfältigen. Dabei gilt es vor allem die Schwierigkeit zu überwinden, dass einige Teilbereiche weniger amplifiziert werden als andere, da dies, vor allem im Falle eines Amplifikationsausfalls bestimmter Sequenzen zu einem falschen Ergebnis führen kann.

### 2.3.1 GenomePlex WGA4 von Sigma-Aldrich

Die GenomePlex-Reaktion basiert auf einer Polymerasekettenreaktion. Um das gesamte Genom zu vervielfältigen, wird der DNA-Strang zunächst in zufällige Fragmente mit einer Länge von etwa 400 bp geteilt. Danach binden Random Hexamer Primer an die Fragmente und die Amplifikation beginnt. Durch das vielfache Wiederholen der Amplifikationszyklen ist nach Abschluss der Reaktion das 500-1000fache der eingesetzten DNA-Menge entstanden.

Die Amplifikation erfolgt bei der PCR nach GenomePlex also in drei Schritten. Die Fragmentierung der genomischen DNA, die Bildung einer Library durch Anheften der Primer und die Amplifikation der Library.

#### 2.3.1.1 Lyse und Fragmentierung

Zu der in PBS vorliegenden Einzelzelle werden 3,5 µl nukleasefreies Wasser hinzugefügt. Für die Lyse und Fragmentierung wird ein Proteinase K-Mix, bestehend aus 2 µl Proteinase K-Lösung und 32 µl Fragmentierungspuffer, hergestellt. Von diesem wird 1 µl mit 45 µl nukleasefreiem Wasser gemischt und zur Einzelzelle gegeben. Die Probe wird bei 50 °C für 1 Stunde verdaut und anschließend bei 99 °C für 4 Minuten fragmentiert. Im Anschluss erfolgt eine Kühlung auf Eis.

#### 2.3.1.2 Library

Zu jeder Probe werden 2 µl Single Cell Preparation Buffer und 1 µl Library Stabilisation Solutions hinzugegeben, gemixt, für 2 Minuten im Thermocycler bei 95 °C denaturiert und auf Eis gekühlt. Danach wird für die Erstellung der Library 1 µl Library Preparation Enzyme hinzugefügt und nachstehendes Programm durchlaufen:

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

**Tabelle 2-1 Temperaturverlauf der Library-Reaktion der WGA mit GenomePlex WGA4, Sigma-Aldrich**

### 2.3.1.3 Amplifikation

Die Proben werden zentrifugiert und mit 7,5 µl 10 x Amplification Mix, 1,5 µl Titanium Taq-Polymerase und 51 µl nukleasefreiem Wasser versetzt. Anschließend erfolgt eine PCR-Reaktion nach folgendem Programm:

1.	95 °C	3 min
2.	94 °C	30 sec
3.	65 °C	5 min
4.	Zurück zu 2. (24 Zyklen)	
5.	4 °C	∞

**Tabelle 2-2 Temperaturverlauf der Amplifikations-Reaktion der WGA mit GenomePlex WGA4, Sigma-Aldrich**

Die anschließende Aufreinigung wird mittels Gen Elute PCR Clean Up Kit von Sigma Aldrich durchgeführt.

### 2.3.2 GenomiPhi V2 von GE Healthcare

Bei der Whole Genome Amplifikation mit dem GenomiPhi V2 Kit wird eine Rolling Circle Amplifikation (RCA) mittels einer  $\phi$ 29-Polymerase durchgeführt. Hierbei handelt es sich nicht um eine klassische PCR-Reaktion. Nach einer anfänglichen Denaturierung bei 65 °C für 10 Minuten findet eine isothermale Amplifikationsreaktion bei 30 °C für einen Zeitraum von 2 Stunden statt. Die vielen Zyklen des Annealing, der Amplifikation und Denaturierung einer PCR-Reaktion entfallen.

Random Hexamere Primer binden sich genomweit an die einzelsträngige DNA und bilden Startpunkte für die Replikation mittels der  $\phi$ 29-Polymerase. Trifft diese beim „Abschreiben“ des DNA-Stranges auf den nächsten vor ihr liegenden Primer schiebt sie sich unter den entstanden Strang und hebt diesen von der Matrize ab. An den gelösten Strang können sich erneut Primer binden und eine nächste Replikation beginnt. Die Reaktion wird durch eine finale Erwärmung auf 65 °C für 10 Minuten beendet.

#### 2.3.2.1 Lyse und Amplifikation mit ALB-Puffer

Zu der in 1 µl PBS pipettierten Einzelzelle werden zur Lyse 1,5 µl ALB-Puffer (bestehend aus Kaliumhydroxid [200 mM] und Dithiothreitol [50 mM]) zugegeben. Danach wird die Probe bei -20 °C für mindestens 30 Minuten gefroren.

Die Denaturierung erfolgt bei 65°C für 10 Minuten. Anschließend werden 9 µl Sample Buffer, 9 µl Reaction Buffer und 1 µl Enzyme Mix zur Probe gegeben und durch Short Spin miteinander vermischt. Die Amplifikationsreaktion wird bei 30 °C für zwei Stunden durchgeführt. Die Inaktivierung erfolgt bei 65 °C für 10 Minuten. Danach wird die Probe bei 4 °C gekühlt.

Das Amplifikat wird mit dem QIAamp Micro Kit aufgereinigt.

### *2.3.2.2 GenomiPhi V2 mit Trehalose*

In einer Versuchsreihe werden nach dem Protokoll von Pan *et al.* zu der GenomiPhi V2 Amplifikationsreaktion zusätzlich 2 µl Trehalose [2mM] zu den nach Herstellerprotokoll üblichen 9 µL Sample Buffer, 9 µL Reaction Buffer und 1 µL Enzyme Mix hinzugefügt [46]. Der oben beschriebene Temperaturablauf ändert sich nicht.

## **2.3.3 Aufreinigung der amplifizierten Proben**

### *2.3.3.1 QIAamp DNA Micro Kit von QIAGEN*

Nach der Vervielfältigung mit GenomiPhi V2 wird das Amplifikationsprodukt mit nukleasefreiem Wasser auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und in ein Mikrozentrifugen-Tube überführt. Es werden 10 µl AW1 Buffer und 250 µl AW2 Buffer hinzugefügt. Die Probe wird gevortext, auf eine QIAamp MiniElute Säule gegeben und bei 6.000 x g 1 Minute zentrifugiert. Das Eluat wird verworfen und die Säule in ein neues Collection-Tube gestellt. Nach Hinzufügen von 500 µl AW2 Buffer wird die Probe bei 6.000 x g 1 Minute zentrifugiert. Wieder wird das Eluat verworfen und die Säule in ein neues Collection-Tube gestellt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 20.000 x g für 3 Minuten wird das Eluat verworfen und die Säule in ein 1,5 ml Mikrozentrifugen-Tube gestellt. Es werden 30 µl nukleasefreies Wasser auf die Säule gegeben und die Probe für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wird bei 20.000 x g für 1 Minute eluiert und die Konzentration kann bestimmt werden.

### *2.3.3.2 GenElute PCR Clean-up Kit von Sigma-Aldrich*

Die mit GenomePlex WGA4 amplifizierten Proben werden mittels GenElute PCR Clean Up Kit aufgereinigt. Die Silikagel-Säule wird mit 500 µl Column Preparation Solution äquilibriert. Nach einer Zentrifugation bei 12.000 x g für 30 Sekunden wird das Eluat verworfen. Das Amplifikationsprodukt wird mit dem 5-fachen Volumen der Binding Solution gemischt und auf die Säule geladen. Nach Zentrifugation

bei 16.000 x g wird der Überstand verworfen. Auf die Säule werden 50 µl verdünnter Wash Solution gegeben. Es wird für 1 Minute bei 16.000 x g zentrifugiert, das Eluat verworfen und noch einmal bei gleicher Beschleunigung für 2 Minuten zentrifugiert. Die Elution Lösung wird mit nukleasefreiem Wasser 1:10 verdünnt. 50 µl der verdünnten Lösung werden auf die Säule pipettiert. Nach einer Minute Inkubation bei Raumtemperatur wird durch einminütige Zentrifugation bei 16.000 x g in ein neues 1,5 ml Eppendorf Tube eluiert. Nun kann die Konzentration der Proben bestimmt werden.

## **2.3.4 Qualitätsbeurteilung**

### *2.3.4.1 Konzentrationsbestimmung*

Für weitere Analysemethoden und um die Amplifikationsreaktion zu kontrollieren, ist eine exakte Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäure nötig. Dabei nutzt man die Absorptionseigenschaften von DNA für UV-Licht. DNA absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm. Bei 50 ng/µl DNA-Konzentration entspricht die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $OD_{260}$ ) 1. Durch das zusätzliche Vermessen bei 280 nm lassen sich Verunreinigungen z.B. durch Proteine feststellen. Der Quotient aus  $OD_{260}$  nm und  $OD_{280}$  nm sollte bei einer sauberen DNA-Probe bei 1,8 liegen.

Die Konzentrationsmessung erfolgt mit einem Nanodrop 1000 Spektralphotometer. Nach Einstellung des Nullwertes mit 1,5 µl Elution Lösung wird die Probe vermessen. Dafür wird 1,5 µl der Probe direkt auf das Photometer gegeben. Danach wird die Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

### *2.3.4.2 Multiplex PCR*

Van Beers *et al.* veröffentlichte 2006 eine Methode um die Qualität von geringen DNA-Mengen zu beurteilen [47]. Dabei werden DNA-Fragmente mit einer Länge von 100, 200, 300 und 400 bp amplifiziert und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. (Durchführung der Gelelektrophorese siehe Abschnitt 2.3.4.3.) Bei der Amplifikation von Einzelzellen mit WGA ist eine Fragmentlängenbestimmung vor einer weiteren Analyse von Vorteil und wird deswegen nach jeder gesamtgenomischen Amplifikation durchgeführt.

Es werden vier Primerpaare des GAPDH-Gens mit folgenden Sequenzen verwendet (Metabion, 100 µM Stock).

„Primer 100 bp“	<b>100 F:</b>	5'-GTT CCA ATA TGA TTC CAC CC-3'
	<b>100 R:</b>	5'-CTC CTG GAA GAT GGT GAT GG-3'
“Primer 200 bp”	<b>200 F:</b>	5'-AGG TGG AGC GAG GCT AGC-3'
	<b>200 R:</b>	5'-TTT TGC GGT GGA AAT GTC CT-3'
„Primer 300 bp“	<b>300 F:</b>	5'-AGG TGA GAC ATT CTT GCT GG-3'
	<b>300 R:</b>	5'-TCC ACT AAC CAG TCA GCG TC-3'
“Primer 400 bp”	<b>400 F:</b>	5'-ACA GTC CAT GCC ATC ACT GC-3'
	<b>400 R:</b>	5'-GCT TGA CAA AGT GGT CGT TG-3'

Dafür werden jeweils 0,5 µl der Probe mit 6 µl Hot Star-Taq Mastermix, 0,5 µl Primer Mix [4 µM] und 4,5 µl nukleasefreiem Wasser gemischt und nach folgendem Programm amplifiziert:

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	∞

**Tabelle 2-3 Temperaturverlauf der Multiplex-Amplifikation**

Das Reaktionsprodukt wird auf ein 1,5% Agarosegel aufgetragen und beurteilt.

#### 2.3.4.3 Gelelektrophorese

Zur weiteren Überprüfung einer erfolgreichen Amplifikation wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wird die DNA nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Dichte des Agarosegels wird an die zu erwartenden DNA-Fragmentlänge angepasst. Bei der Kontrolle der Multiplex PCR wurde ein 1,5% Agarosegel verwendet, bei der Überprüfung nach Nested-PCR ein 1% Agarosegel.

Für ein 1% Agarosegel werden 0,9 g LE Agarose in 90 ml 1x TBE gelöst, in der Mikrowelle aufgeköcht, danach kurz abgekühlt, 9 µl GelRed NucleicAcid Stain hinzugeben und in einen Geltrog mit Zahnkamm gegossen. Das Gel muss danach für etwa 20 Minuten auspolymerisieren.

3 µl des PCR-Produktes werden mit 3 µl Loading Buffer auf das Gel appliziert. Als Größenstandard werden seitlich davon 10 µl eines 100 Base Pair Ladders aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgt bei 130 Volt für 40 Minuten. Im Anschluss wird das Gel auf einen UV Transilluminator (260 nm) aufgelegt und fotografiert.

## 2.4 Mikrosatelliten-Marker Analyse nach WGA

Bei der Etablierung des Verfahrens erfolgte zunächst eine Analyse der gereinigten WGA-Proben mit dem Panel 23 des ABI-Prism Linkage Mapping Set. Dieses enthält 14 fluoreszenzmarkierte Marker, welche auf den Chromosomen 17 und 18 verteilt sind. Nachfolgende sind die Primer mit der zugehörigen Fluoreszenz aufgelistet.

Marker	Fluoreszenz	Marker	Fluoreszenz	Marker	Fluoreszenz
D18 S70	FAM	D17 5831	VIC	D18 S1102	NED
D18 S949	FAM	D17 S1857	VIC	D17 S737	NED
D18 S478	FAM	D17 S739	VIC	D18 361	NED
D17 S1854	FAM	D17 51868	VIC	D17 S849	NED
		D17 S798	VIC	D18 S462	NED

Tabelle 2-4 Marker des ABI-Prism Linkage Mapping Sets 2.5 Panel 23

Die Markeranalyse mit dieser großen Anzahl an fluoreszenzmarkierten Mikrosatelliten-Markern dient vor allem der Überprüfung ob und welche Whole Genome Amplification für eine Analyse im Rahmen der Polkörperdiagnostik geeignet ist oder ob es durch den Einsatz zufälliger Primer bei der Amplifikation zu Fehlern oder Allelic Dropout kam.

### 2.4.1 Amplifikation mit fluoreszenzmarkierten Markern

Es werden 9 µl True Allele PCR Premix, 4 µl nukleasefreies Wasser und 1 µl Primer Mix [5 µM] in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube pipettiert und gevortext. Anschließend wird 1 µl DNA [50 ng/µl] der gereinigten Probe hinzugefügt und im Thermocycler folgendes Programm durchlaufen:

1.	95 °C	12 min.
2.	94 °C	15 sec.
3.	55 °C	15 sec.
4.	72 °C	30 sec.
5.	Zurück zu 2. (10 Zyklen)	
6.	89 °C	15 sec.
7.	55 °C	15 sec.
8.	72 °C	30 sec.
9.	Zurück zu 6. (20 Zyklen)	
10.	72 °C	10 min.
11.	4 °C	∞

**Tabelle 2-5 Temperaturverlauf der Amplifikation mit den Markern des ABI Prism Linkage Mapping Sets 2.5**

Das PCR-Produkt sollte bei -20 °C gelagert werden.

## **2.4.2 Gelelektrophorese mit dem 3130 Genetic Analyzer**

Um die Länge der amplifizierten Mikrosatelliten-Marker beurteilen zu können, wird der Reaktion ein Größenstandard zugegeben. Dieser wird aus 970 µl Formamide HiDi und 30 µl Gene Scan 500 Liz vorgemischt. Von diesem Standard werden 10 µl in jedes Well vorgelegt. Im Anschluss werden jeweils 0,5 µl des fluoreszenzmarkierten PCR-Produktes hinzugefügt. Dabei ist darauf zu achten, dass sich danach keine Luftblasen im Well befinden. Die Proben werden 4 Minuten bei 95 °C denaturiert und danach sofort auf Eis gekühlt. Die Probenplatte wird in den Genetic Analyzer geladen. Nachdem auf ausreichend Puffer und Gel kontrolliert wurde, kann der Durchlauf mit einer Injektionszeit von 15 oder 30 Sekunden gestartet werden.

## **2.4.3 Auswertung**

Die Auswertung der Markeranalyse erfolgt mit der Peak Scanner Software v1.0 von Applied Biosystem.

## **2.5 Whole Genome Amplification für die Sequenzierung eines spezifischen Genbereichs**

### **2.5.1 GenomiPhi V2 mit ALB-Lyse**

Die Lyse und Amplifikation der Zellen wird wie oben beschrieben durchgeführt. Nach der Vervielfältigung erfolgt die Aufreinigung mit dem QIAamp Micro Kit sowie eine

Überprüfung der Amplifikationsprodukte mit Gelelektrophorese nach der oben beschriebenen Multiplex-PCR nach Van Beers (Abschnitt 2.3.4.2).

### **2.5.2 GenomiPhi V2 mit Proteinase K-Lyse**

Die Einzelzellen werden mit 5 µl NF-H<sub>2</sub>O gewonnen, bei 14.800 x g für 7 Minuten zentrifugiert und bei -20 °C bis zum nächsten Tag aufbewahrt. Zur Zelllyse werden von dem GenomiPhi V2 Kit 9 µl Sample Buffer und 1 µl Proteinase K [Endkonzentration 1,07 AU/ml] zur Probe gegeben und diese für 15 Minuten bei 50 °C erwärmt und anschließend für 15 Minuten bei 70 °C inaktiviert. Die Probe wird danach für 2 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die lysierte und denaturierte Probe wird mit 9 µl Reaction Buffer und 1 µl Enzyme Mix versetzt, für 2,5 Stunden bei 30 °C amplifiziert. Durch ein finales Erhitzen auf 65 °C für 10 Minuten wird der Enzym-Mix inaktiviert.

Das Amplifikationsprodukt wird wie oben beschrieben mit dem QIAamp Micro Kit aufgereinigt und die Qualität der Amplifikate mit der Multiplex PCR und anschließender Gelelektrophorese kontrolliert.

### **2.6 Amplifikation einer spezifischer Genomregion (Nested PCR)**

Durch eine Amplifikation der Einzelzell-DNA mit zielgerichteten Primern ist es möglich nur diese spezifische Region der DNA zu vervielfältigen. Damit dabei nicht zu viele Nebenprodukte entstehen, sollten die Primer mindestens 17 Nukleotide lang sein. Sie werden paarweise eingesetzt, wobei eine ähnliche Annealingtemperatur der eingesetzten Primer für eine effiziente PCR wichtig ist. Bei einer Nested PCR finden zwei PCRs hintereinander statt. Durch eine erste PCR wird die DNA-Region von Interesse vervielfältigt. Das Amplifikat dient dann einer anschließenden PCR, mit Primern die in der vorher amplifizierten Region liegen, als Matrize. Der gewünschte Sequenzbereich wird dadurch mit einer sehr hohen Spezifität vervielfältigt.

Der Vergleich der verschiedenen Lyse- und Amplifikationsverfahren für eine spezifische Genregion sowie die Etablierung der nachfolgend beschriebenen Sequenzierreaktion erfolgte zunächst an mononukleären Zellen mit bekannter ΔF508-Mutation im *CFTR*-Gen sowie an Zellen ohne bekannte Mutation. Dafür wurden folgende Primer genutzt:

„Innere CF-Primer“: f\_CF10: 5'-TCC TGA GCG TGA TTT GAT AA-3'  
r\_GCCF10: 5'-ATT TGG GTA GTG TGA AGG G-3'

„Äußere CF-Primer“: F10i-5: 5'-GCA GAG TAC CTG AAA CAG GA-3'  
R10i-3: 5'-CAT TCA CAG TAG CTT ACC CA-3'

Es wurden verschiedene Lyse- und Amplifikationsprotokolle miteinander kombiniert.

## 2.6.1 Lyse

### 2.6.1.1 Lyse mit Tween, Triton und Proteinase K – Nested-Lyse 1

Nachdem die Einzelzelle mittels CellCelector in 5 µl nukleasefreiem Wasser gewonnen wurde, fügt man wie von Kuliev *et al.* beschrieben 0,5 µl 1% Tween 20, 0,5 µl 1% Triton 100 und 0,1 µl Proteinase K [10mg/ml] in den Deckel des PCR-Tubes [22]. Der Deckel wird verschlossen und die Probe bei 14.800 x g für 7 Minuten zentrifugiert. Durch eine anschließende Beschichtung mit VaporLock soll eine Kontamination verhindert werden. Die Probe wird bei 45 °C für 15 Minuten inkubiert und danach für 20 Minuten auf 96 °C erhitzt, um die Proteinase K zu inaktivieren.

### 2.6.1.2 Lyse mit Proteinase K – Nested-Lyse 2

Die Einzelzelle wird wie von Vrettou *et al.* beschrieben mit 10 µl nukleasefreiem Wasser gewonnen, bei 14.800 x g für 7 Minuten zentrifugiert, mit Vapor Lock beschichtet und bei -20 °C für mindestens 30 Minuten gelagert [48]. Danach werden zum Aufschluss der Zellwände und Abbau der Proteine 5 µl Proteinase K [150 µg/ml] zu der Probe hinzugefügt. Zur Aktivierung der Proteinase K wird die Probe im Thermocycler für 1 Stunde bei 37 °C gehalten, anschließend für 10 Minuten auf 65 °C erwärmt bis die Proteinase K durch ein zehnminütiges Erhitzen auf 95 °C wieder inaktiviert wird.

## 2.6.2 Amplifikation

### 2.6.2.1 Amplifikation mit 6 µl HotStar Taq Mastermix – Nested-Amplifikation 1

Nach der Lyse werden zu der Probe jeweils 6 µl HotStar Taq Mastermix und 2 µl Primer (Forward-Primer [3 µM], Reverse-Primer [3 µM]) gegeben. Die Amplifikation erfolgt nach folgendem Programm:

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	∞

**Tabelle 2-6 Temperaturverlauf der  
Nested-Amplifikation 1 und 2**

Die Reaktionsprodukte werden zur Kontrolle der Amplifikation auf 1% Agarosegel aufgetragen.

#### *2.6.2.2 Amplifikation mit 6 µl HotStar Taq Mastermix und MgCl<sub>2</sub>*

##### *– Nested-Amplifikation 2*

Da Magnesium-Ionen die Prozessivität der Taq-Polymerase steigern können werden zu dem in Abschnitt 2.6.2.1 beschriebenen Reaktionsansatz 3 µl MgCl<sub>2</sub> [25mM] hinzugefügt. Die weiteren Reagenzienmengen und der Temperaturablauf der Amplifikationsreaktion bleiben unverändert.

#### *2.6.2.3 Amplifikation mit 10 µL HotStar Taq Mastermix und MgCl<sub>2</sub>*

##### *– Nested-Amplifikation 3*

Zu der lysierten Einzelzelle werden 10 µl HotStar Taq Mastermix, 1 µl MgCl<sub>2</sub> [25mM] und 0,5 µl Primer (Forward [33µM] und Reverse [33µM]) hinzugefügt. Im Thermocycler wird das untenstehende Temperaturprogramm durchlaufen.

1.	95 °C	15 min.
2.	95 °C	45 sec.
3.	54 °C	30 sec.
4.	72 °C	45 sec.
5.	Zurück zu 2. (35 Zyklen)	
6.	72 °C	10 min.
7.	4 °C	∞

**Tabelle 2-7 Temperaturverlauf der Nested-Amplifikation 3**

#### 2.6.2.4 Amplifikation mit 30 µl HotStar Taq Mastermix und MgCl<sub>2</sub>

##### – Nested-Amplifikation 4

Zu der Probe werden nach der Lyse 30 µl HotStar Taq Mastermix, 0,5 µl Forward-Primer [100 µM], 0,5 µl Reverse-Primer [100 µM] und 3 µl MgCl<sub>2</sub> [25 mM] hinzugefügt. Danach erfolgt eine Amplifikation mit nachfolgendem Temperaturverlauf:

1.	95 °C	15 min
2.	95 °C	30 sec
3.	54 °C	40 sec
4.	72 °C	30 sec
5.	Zurück zu 2. (18 Zyklen)	
6.	96 °C	30 sec
7.	54 °C	20 sec
8.	72 °C	30 sec
9.	Zurück zu 6. (18 Zyklen)	

**Tabelle 2-8 Temperaturverlauf der  
Nested-Amplifikation 4 und 5**

Nach der Amplifikation wurde die Qualität durch eine Gelelektrophorese auf 1% Agarosegel beurteilt.

#### 2.6.2.5 Amplifikation mit 30 µl HotStar Taq und nukleasefreiem Wasser

##### – Nested-Amplifikation 5

Es werden zu der in Abschnitt 2.6.2.4 beschriebenen Reaktion statt MgCl<sub>2</sub> 3 µl nukleasefreies Wasser zugefügt. Die weiteren Reagenzien, deren Mengen und der Temperaturverlauf der PCR-Reaktion verhalten sich wie oben beschrieben.

## 2.7 Sequenzierung eines spezifischen DNA-Bereichs

### 2.7.1 Nested PCR für die anschließende Sequenzierung

Für die weiteren Sequenzanalysen und um eine größere Produktmenge der gewünschten DNA-Region zu erhalten, wird eine erneute PCR mit spezifischen Primern durchgeführt. Die Etablierung des Verfahrens wurde wie oben beschrieben an Zellen mit bekannter Mutation im *CFTR*-Gen sowie Zellen ohne bekannte Mutation durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Abschnitt 2.6 aufgelistet.

In einem PCR-Tube werden 6 µl HotStar Taq Mastermix, 3,5 µl nukleasefreies Wasser, 2 µl Primer (Forward und Reverse [3 µM]) und 0,5 µl des Amplifikats vorsichtig gemischt und im Thermocycler bei folgendem Programm amplifiziert:

1.	95 °C	15 min.
2.	95 °C	45 sec.
3.	50 °C	30 sec.
4.	72 °C	45 sec.
5.	Zurück zu 2. (35 Zyklen)	
6.	72 °C	10 min.
7.	4 °C	∞

**Tabelle 2-9 Temperatur der Nested-PCR  
im Rahmen der Sequenzierung**

Die Reaktionsprodukte können zur Qualitätsbeurteilung auf 1% Agarosegel aufgetragen werden.

### 2.7.2 Sequenzierreaktion

Bei der Sequenzierung wird die Nukleotidabfolge der DNA bestimmt. Dafür werden Primer zugeführt, die an eine bekannte DNA-Sequenz binden. Sie bilden so den Startpunkt für eine Replikation durch eine DNA-Polymerase. Im Unterschied zu einer reinen Vervielfältigungs-PCR werden der Probe zum Teil fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTPs) aller vier Basen (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP) zugefügt. Da sie keine 3'-Hydroxygruppe besitzen, ist danach eine weitere DNA-Verlängerung durch die DNA-Polymerase nicht mehr möglich. Ihr Einbau führt damit zu einem Abbruch der Strangsynthese. Durch Auftrennung der Kettenabbruchprodukte mittels Kapillarelektrophorese und Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe mit einem Laser, können die basenspezifischen Fluoreszenzsignale von dem Sequenziergerät detektiert werden. Das Ablesen der Basenabfolge und der Vergleich mit der in der allgemeinen Population üblichen Nukleotidsequenz ermöglichen es (krankheitsverursachende) Abweichungen direkt nachzuweisen.

SNPs sind Änderungen eines einzigen Nukleotids der DNA-Sequenz. Durch Sequenzierung bekannter SNPs in der Umgebung des Gens von Interesse kann ein spezifischer Haplotyp eines Individuums erstellt werden. Durch weitere Analyse der

Angehörigen kann dann das mutationstragende Allel identifiziert werden. Darüber lässt sich der Vererbungsgang nachvollziehen, außerdem sind Amplifikationsfehler, Rekombination oder Allelic Dropout erkennbar und es ermöglicht die Aussage ob eine Zelle von der Mutation betroffen ist oder nicht.

### 2.7.2.1 Amplifikation

Für die Sequenzierung werden die Produkte der Nested-PCR mit genspezifischen Primern (und SNP-Markern) erneut amplifiziert. Diese werden so ausgewählt, dass sie in dem Bereich des durch die erste PCR entstanden Amplifikats liegen. Die Reaktionen von Forward- und Reverse-Primern werden getrennt angesetzt.

In einem PCR-Tube werden 6,8 µl nukleasefreies Wasser, 1,4 µl ABI Sequenzierpuffer, 0,5 µl BigDyeTerm und 0,3 µl Primer [10 µM] mit 1 µl Probe vorsichtig gemischt und mit nachstehendem Temperaturprogramm amplifiziert.

1.	96 °C	30 sec
2.	50 °C	15 sec
3.	60 °C	4 min
4.	Zurück zu 1. (25 Zyklen)	
5.	8 °C	∞

**Tabelle 2-10 Temperaturverlauf der Sequenzierreaktion**

Die Proben können nach Beendigung der Sequenzierreaktion bis zu einer Woche bei -20 °C aufbewahrt werden.

### 2.7.2.2 Aufreinigung

Die Produkte der Sequenzierreaktion werden mit Sephadex aufgereinigt. Dafür wird eine Lösung aus 4,31 g Sephadex G-50 Superfein und 50 ml LiChrosolv Wasser hergestellt und für 15 Minuten ruhen gelassen. Die Centri-Sep8-Strips werden mit der Sephadex-Gebrauchslösung bis zur Markierung aufgefüllt und bei 750 x g für 2 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Eluats wird erneut zentrifugiert. Damit das Gel schräg verläuft, ist es wichtig, dass sich die Säulen immer in die gleiche Richtung drehen. Die Säulen werden auf einen neuen Strip gegeben und die 1:1 mit nukleasefreiem Wasser verdünnten Proben oberhalb des Gels aufgetragen. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt bei 750 x g für 2 Minuten sind die Proben aufgereinigt und können auf die Sequenzierplatte aufgetragen werden.

### 2.7.2.3 Sequenzierung

Die Proben werden mit dem ABI 3130 Sequenziergerät analysiert. Nachdem das Gerät auf genügend Gel und Puffer kontrolliert wurde, wird die Probenplatte in den Genetic Analyzer geladen und der Durchlauf mit einer Injektionszeit von 15 oder 30 Sekunden gestartet.

### 2.7.2.4 Auswertung

Mit dem Chromas Lite v2.1.1. Software von Technelysium können die Nukleotidsequenzen angesehen und mit den in den Datenbanken publizierten Originalsequenzen verglichen werden.

## 2.8 Primer und Marker Etablierung für die Diagnostik einer Mutation im OTC-Gen

Nach dem Vergleich der verschiedenen Lyse- und Amplifikationsverfahren wird das Protokoll für die Mutation im *OTC*-Gen angepasst. Um eine sichere Aussage über das Vorhandensein der Mutation sowie eine Kontrolle auf Rekombination, ADO und Kontamination zu gewährleisten, wird sowohl eine indirekte Analyse mit Markern als auch eine direkte Sequenzierung durchgeführt.

Zunächst werden informative Marker für die Zelle mit bekannter Mutation im *OTC*-Gen gesucht und mittels Gradienten-PCR die passenden Annealing-Temperaturen für die Primer und Marker ermittelt.

Es werden folgende Primer, Marker und SNPs verwendet:

<b>Otc_E3v1</b>	Otc_E3v1_f:	5'-ACC ACA CCT GGC CTA AAT TC-3'
	Otc_E3v1_r:	5'-ACT GGG TTA CCC CTC CAA AG-3'
<b>Otc_E3v2</b>	Otc_E3v2_f:	5'-TTT GGG GGT AGT TAT TAC TTA TTT TC-3'
	Otc_E2v2_r:	5'-TCC AAA GTC TTC ACC TTC AAT C-3'
<b>DXS1069</b>	DXS1069_f:	5'-AGC CTA ACC CAC ATA ACA GC-3'
	DXS1069_r:	5'-GTT TCT AGC TAC TAT ATT CAC CTT GGT CTT G-3'
<b>DXS8090</b>	DXS8090_f:	5'-GGG TGA AAT TCC ATC ACA AA-3'
	DXS8090_r:	5'-ACA AAT GCA GAT GTA CAA AAA ATA-3'
<b>DXS8016</b>	DXS8016_f:	5'-TCA AGC AAC CCA GTC CC-3'
	DXS8016_r:	5'-GTT TCT TTT TAG AAG CCA CCA TTC CC-3'

<b>DXS1068</b>	DXS1068_f:	5'-CCT CTA AAG CAT AGG GTC CA-3'
	DXS1068_r:	5'-GTT TCT CCC ATC TGA GAA CAC GCT G-3'
<b>DXS1049</b>	DXS1049_f:	5'-CGA GAT GGT GCT ACT ACA CG-3'
	DXS1049_r:	5'-GTT TCT CAT CAA GCT AAA ACT CGG TG-3'
<b>DXS1069</b>	DXS1069_f:	5'-AGC CTA ACC CAC ATA ACA GC-3'
	DXS1069_r:	5'-GTT TCT AGC TAC TAT ATT CAC CTT GGT CTT G-3'
<b>“SNP 1 Out”</b>	SNP1_out_F:	5'-CAC CAG CAA AAC ACT TCA CAT T-3'
	SNP1_out_R:	5'-GGG AAG TGA AAA ATA GTA AAA CTG A-3'
<b>“SNP 1 In”</b>	SNP1_in_F:	5'-AAA GAA TTA TGA CAG TTT ACC AAA ACA-3'
	SNP1_in_R:	5'-ATT TAA AAC ATT AGA AGC ATT GAG AA-3'
<b>“SNP 2 Out”</b>	SNP2_out_F:	5'-TGA TGT TTC TCA AAT TCC TTG AA-3'
	SNP2_out_R:	5'-GAA GGC ACG GCA GCT TAA T-3'
<b>“SNP 2 In”</b>	SNP2_in_F:	5'-ACA GAG GGA GTG GGG TTT TC-3'
	SNP2_in_R:	5'-TTC ACA GTT GGG GCA GAT TT-3'

Danach werden Einzelzellen von Angehörigen auf die Marker untersucht. Dies ermöglicht die Identifizierung des mutationstragenden Allels und eine Darstellung des Vererbungsgangs.

### **2.8.1 Annealing-Temperatur der *OTC*-Marker**

Es wird eine Gradienten PCR durchgeführt, um die Annealing-Temperatur mit der höchsten Amplifikationseffizienz zu finden. Dabei wird genomische DNA eingesetzt und die Reaktion nach der in Abschnitt 2.7.1 beschriebenen Amplifikationsverfahren durchgeführt. Da die optimale Annealing-Temperatur noch gefunden werden muss, wird diese variiert.

1.	95 °C	15 min
2.	95 °C	30 sec
3.	X	40 sec
4.	72 °C	30 sec
5.	Zurück zu 2. (18 Zyklen)	
6.	96 °C	30 sec
7.	X	20 sec
8.	72 °C	30 sec
9.	Zurück zu 6. (18 Zyklen)	

**Tabelle 2-11 Temperaturverlauf der Gradienten-PCR für die *OTC*-Primer und – Marker.**

X = Annealingtemperatur zwischen 50 – 64 °C.

Für jeden Marker führt man jeweils eine Reaktion mit einer Temperatur von 50 °C, 52 °C, 54 °C, 56 °C, 58 °C, 60 °C, 62 °C und 64 °C durch (=X). Die Auswertung der Reaktionsprodukte erfolgt mit Gelelektrophorese.

## 2.8.2 Markeranalyse und Sequenzierung von Einzelzellen

### 2.8.2.1 Gewinnung von Einzelzellen aus dem Vollblut

Die mononukleären Zellen werden wie oben beschrieben aus heparinisiertem Vollblut gewonnen und mittels CellCelector isoliert. Es werden 10 µl nukleasefreies Wasser zugegeben, die Proben für 5 Minuten bei 14.800 x g zentrifugiert und bei -20 °C für 30 Minuten aufbewahrt.

### 2.8.2.2 Lyse und Amplifikation

Zur Lyse werden zu der Zelle 5 µl Proteinase K [150 µg/ml] zugefügt und die Probe mit 40 µl Vapor Lock überschichtet. Im Thermocycler wird folgendes Programm durchlaufen:

1.	37 °C	1 h
2.	65 °C	10 min
3.	95 °C	95 min
4.	4 °C	∞

**Tabelle 2-12 Temperaturverlauf der Nested-Lyse 2**

Nach der Lyse werden 10 Proben wie bei der in Abschnitt 2.6.2.4 beschriebenen Nested-Amplifikation 4 amplifiziert. Der Reaktionsansatz wird jedoch an den veränderten Gennachweis angepasst. So erfolgt die PCR mit den Primern der *OTC*-Region

(OTC\_E3v1f [100 µM] und OTC\_E3v1fr [100 µM]) sowie den vorher beschriebenen Markern [100 µM].

15,0 µl	Lysat
30,0 µl	HotStar Taq Mix
3,0 µl	MgCl <sub>2</sub> [25mM][25 mM]
0,5 µl	Primer 1 Forward
0,5 µl	Primer 1 Reverse
0,2 µl	Marker Forward*
0,2 µl	Marker Reverse*

**Tabelle 2-13 Ansatz der Nested-Amplifikation 2**

\* je 0,2 µl jedes Markers (Forward und Reverse)

Bei weiteren 10 Proben werden statt des MgCl<sub>2</sub> [25mM] 3 µl nukleasefreies Wasser hinzugefügt (Nested-Amplifikation 5). Die weiteren zugesetzten Primer, Marker und die Taq-Polymerase verändern sich nicht. Nach Ermittlung der Annealingtemperatur wurde der Temperaturverlauf angepasst.

1.	95 °C	15 min
2.	95 °C	30 sec
3.	54 °C	40 sec
4.	72 °C	30 sec
5.	Zurück zu 2. (18 Zyklen)	
6.	96 °C	30 sec
7.	54 °C	20 sec
8.	72 °C	30 sec
9.	Zurück zu 6. (18 Zyklen)	

**Tabelle 2-14 Temperaturverlauf der Nested-Amplifikation mit *OTC*-Primer und -Markern**

Die beiden Reaktionen werden nach der PCR durch gelelektrophoretische Auftrennung miteinander verglichen.

### 2.8.2.3 Mikrosatelliten-Markeranalyse

Repetitive DNA-Sequenzen können im Rahmen der STR-Marker-Analyse zur Untersuchung der DNA genutzt werden. Aus der Datenbank werden bekannte

Polymorphismen in naher Umgebung der Region von Interesse herausgesucht und diese in einer PCR-Reaktion mit fluoreszenzmarkierten Markern markiert. Danach werden die Fluoreszenzfarbstoff-markierten Fragmente der eingesetzten DNA mittels Genetic Analyzer 3130 analysiert. Durch Längenunterschiede der Fragmente kann ein heterozygoter oder homozygoter Allelstatus sowie Amplifikationsfehler festgestellt werden.

Zu 1,5 µl der amplifizierten Probe werden 9 µl HotStar Taq Mastermix, 5,25 µl nukleasefreies Wasser und 3 µl fluoreszenzmarkierte Primer [3 µM] hinzugefügt. Für die PCR-Reaktion wird das in Tabelle 2-14 dargestellte Programm verwendet. Nach der Amplifikation können 5 µl des entstandenen Amplifikats zur Kontrolle auf Agarosegel aufgetragen werden.

Zur Darstellung des Markers werden zur Probe 10 µl LIZ hinzugefügt und die Proben mit einer Injektionszeit von 15 oder 30 Sekunden im Genetic Analyzer analysiert. Die Auswertung erfolgt mit der Peak Scanner Software v1.0.

#### 2.8.2.4 Sequenzierung

Es wird zunächst eine Nested-PCR mit den inneren Primern der *OTC*-Gen-Region durchgeführt. Dafür werden 6 µl HotStar Taq, 3,5 µl nukleasefreies Wasser, 2 µl Primer OTC\_E3v2 f/r [3 µM] und mit 0,5 µl des Amplifikationsprodukt von Abschnitt 2.8.2.2. in einem PCR-Tube vorsichtig gemischt und nach dem in Tabelle 2-14 beschriebenen Temperaturablauf amplifiziert.

Zur weiteren Sequenzierung der Genregion und der vorher bestimmten SNP-Marker werden zu 1 µl Probe, 0,5 µl BigDye, 1,4 µl ABI Sequenzierpuffer, 6,8 µl nukleasefreies Wasser und jeweils 0,3 µl Primer [10 µM] und SNP-Primer [10 µM] hinzugefügt. Die Reaktionen für Forward und Reverse Primer werden dabei getrennt voneinander angesetzt. Im Thermocycler wird das nachfolgend beschriebene Temperaturprogramm durchlaufen.

1.	96 °C	30 sec
2.	50 °C	15 sec
3.	60 °C	4 min
4.	Zurück zu 1. (25 Zyklen)	
5.	8 °C	∞

**Tabelle 2-15 Temperaturverlauf der Sequenzierreaktion**

Danach werden die Proben mit Sephadex aufgereinigt und auf eine Sequenzierplatte übertragen.

Die anschließende Kapillarelektrophorese erfolgt mit dem Genetic Analyzer 3130. Im Anschluss kann die Nukleotidsequenz mit der Chromas Lite Software v2.1.1 ausgewertet werden.

## **2.9 Lagerung und Transport der Polkörper**

Um einen erfolgreichen Transport der gewonnenen Polkörper von den Kinderwunschzentren ins Labor zu gewährleisten, werden zunächst an mononukleären Einzelzellen eines gesunden Spenders verschiedene Kühl- und Lagerungstests durchgeführt.

Die Einzelzellen werden mit dem CellCelector gewonnen und in ein Tube mit 10 µl nukleasefreiem Wasser überführt.

1. Versuchsreihe: 8 Einzelzellen werden bei -20 °C für eine Woche eingefroren und danach lysiert und amplifiziert.
2. Versuchsreihe: 8 Einzelzellen werden für drei Stunden bei 4 °C gelagert und danach über Nacht bei -20 °C eingefroren und am nächsten Tag lysiert und direkt amplifiziert.
3. Versuchsreihe: 8 Einzelzellen werden direkt nach der Gewinnung bei -20 °C über Nacht gelagert und am nächsten Tag lysiert. Nach der Lyse werden die Zellen für 4 Stunden bei 4 °C im Thermocycler aufbewahrt und erst dann amplifiziert.

Es wird die Nested-Lyse 2 (2.6.1.2), die Nested-Amplifikation 5 (2.6.2.5) und die Nested PCR für die Sequenzierung (2.7.1) wie oben beschrieben durchgeführt. Der Vergleich der Amplifikationsergebnisse findet mit Gelelektrophorese auf 1% Agarosegel statt.

## **2.10 Materialien**

10 x EDTA Puffer	Applied Biosystems
100 bp DNA Ladder	Fermentas
100 bp Sizestandard	Biozym
5 x Sequenzierpuffer	Applied Biosystems
AmpliTax Gold 360 Master Mix	Applied Biosystems
Aqua bidest	Akadia Chemie

BigDye Terminator v 3.1	Applied Biosystems
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat (DTT) [50mM]	Roth
Dinatriumhydrogenphosphatdihydrogenat	Merck
Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat	Merck
Easycoll	Biochrom
EDTA	Roth
Ethanol absolute [100%]	Merck
FBS Superior	PAA
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA
Ficoll Plaque	Pharmacia
Gel Red Nucleic Acid Gel Stain 10.000 x in Wasser	Biotium
Glasküvetten	VWR
Glycerin [87%]	Roth
GS 500 LIZ Standard	Applied Biosystems
HIDI Formamide	Applied Biosystems
HotStar Taq Mastermix	Qiagen
Human Genomic DNA, Male	Promega
Human Genomix DNA, Female	Promega
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogencarbonat	Roth
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid [200mM]	Sigma-Aldrich
LE Agarose	Biozym
LiChrosolv Wasser	Merck
Lymphocyte Separation Medium LSM 1077 (Ficoll)	PAA
Magnesiumchlorid [25 mM]	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Roth
Nukleasefreies Wasser	Promega
Nukleasefreies Wasser	Qiagen
Nukleasefreies Wasser	Promega

PBS	Gibco
PCR Softtubes 0,2 ml	Biozym
PCR Eppendorf-Tubes 0,2 ml	Eppendorf
Penicillin-Streptomycin	PAA
Pepsin	Roche
Phenylendiamin	Merck
Polyvinylpyrrolidone	COOK
POP 7 Polymer	Applied Biosystems
Primer	Microsynth
Proteinase K	Roche
RPMI 1640 /Herpes	PAA
Tube 1,5 ml Safe lock PCR clean	Eppendorf
Sanimmun Ciclosporin (CYA) [50 µg/ml]	Sandoz
Sephadex G50 Superfine	VWR
Titanium Taq Polymerase	Clontech
Trehalose [2 mM]	Sigma-Aldrich
Tris	Roth
Triton 100 [1%]	Sigma
Tween 20 [1%]	Sigma
Vapor Lock	Qiagen

## 2.11 Kits

ABI Prism Linkage Mapping Set	4330150	Applied Biosystem
Gen Elute PCR Clean-Up Kit	NA1020	Qiagen
GenomePlex WGA 4	WGA 4	Sigma Aldrich
GenomiPhi V2	25-6600-31	GE Healthcare
QIAamp Blood Mini Kit	51106	Qiagen
QIAamp DNA Micro Kit	56304	Qiagen

## 2.12 Geräte

Arbeitsplatz Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation	PeqLab
Brutschrank	Binder

CellCelector	AVISO
Eismaschine	Manitowoc
Eppendorf Tube 1,5 ml	Eppendorf
Gefrierschrank	Liebherr
Genetic Analyzer 3130xl	ABI Prism
Greiner-Tubes	Falcon
Inkubator	Binder
Kühlschrank	Liebherr
Kulturflasche	Falcon
Mikroskop	Leitz Labovert
Nunc-Schrägflasche	Nunc
Pipette	Gibson
Spitzen	Bio Pionte
	Biozym
Thermocycler	BioRad
	Eppendorf
Tischzentrifuge	VWR MiniStar Galaxy
UV-VIS Spectralphotometer NanoDrop 1000	Thermo Scientific
Vortexer MS 3 Basic	IKA
MS 2 Minishaker	IKA
Zentrifuge Allegra X-12 R Centrifuge	Beckmann Coutter
Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Scientific

### **2.13 Puffer und Lösungen**

10 x PBS: 2000 ml Aqua bidest, 160 g NaCl, 4 g KCl, 4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und  
27,4 g Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat zugefügt

1 x PBS: 100 ml 10 x PBS und 900 ml Aqua bidest

10 x TE: 12,11 g Tris, 3,72 g Na<sub>2</sub>EDTA pH 8,0

10 x Tris Borsäure EDTA Buffer (10 x TBE): 162,00 g Tris, 27,50 g Borsäure,  
9,31 g EDTA auf 1000 ml

1 x TBE: 200 ml 10 x TBE, 1800 ml Aqua bidest

100 bp Sizestandard: 10 µl Quantitas DNA Marker 100 bp – 1 kb, 10 µl 5 x Ladepuffer,  
80 µl LiChrosolv Wasser

ALB-Puffer: 200 mM KOH, 50 mM DTT

RPMI 1640 mit Herpes/ 20%FKS/ 1%ABM: 80 ml RPMI 1640 mit Herpes, 20 ml fetales Kälberserum, 1 ml Penicilin-Streptomycin gemischt.

RPMI 1640/10%FKS/1%ABM: 90 ml RPMI 1640, 10 ml fetalen Kälberserum, 1 ml Penicilin-Streptomycin

Loading Buffer: 50 mg Bromphenolblau, 17,24 ml Glycerin 87%, 242,20 mg EDTA auf 50 ml

## 2.14 Primer

### 2.14.1 *CFTR*-Primer

Primer	Forward/Reverse	Nukleotidsequenz
„Innere CF-Primer“	f_CF10	5'-TCC TGA GCG TGA TTT GAT AA-3'
	r_GCCF10	5'-ATT TGG GTA GTG TGA AGG G-3'
„Äußere CF-Primer“	F10i-5	5'-GCA GAG TAC CTG AAA CAG GA-3'
	R10i-3	5'-CAT TCA CAG TAG CTT ACC CA-3'

Tabelle 2-16 *CFTR*-Primer Sequenzen

### 2.14.2 *OTC*-Primer

Primer	Forward/ Reverse	Sequenz
<b>Otc_E3v1</b>	Otc_E3v1_f:	5'-ACC ACA CCT GGC CTA AAT TC-3'
	Otc_E3v1_r:	5'-ACT GGG TTA CCC CTC CAA AG-3'
<b>Otc_E3v2</b>	Otc_E3v2_f:	5'-TTT GGG GGT AGT TAT TAC TTA TTT TC-3'
	Otc_E2v2_r:	5'-TCC AAA GTC TTC ACC TTC AAT C-3'
<b>DXS1069</b>	DXS1069_f:	5'-AGC CTA ACC CAC ATA ACA GC-3'
	DXS1069_r:	5'-GTT TCT AGC TAC TAT ATT CAC CTT GGT CTT G-3'
<b>DXS8090</b>	DXS8090_f:	5'-GGG TGA AAT TCC ATC ACA AA-3'
	DXS8090_r:	5'-ACA AAT GCA GAT GTA CAA AAA ATA-3'
<b>DXS8016</b>	DXS8016_f:	5'-TCA AGC AAC CCA GTC CC-3'
	DXS8016_r:	5'-GTT TCT TTT TAG AAG CCA CCA TTC CC-3'
<b>DXS1068</b>	DXS1068_f:	5'-CCT CTA AAG CAT AGG GTC CA-3'

	DXS1068_r:	5'-GTT TCT CCC ATC TGA GAA CAC GCT G-3'
<b>DXS1049</b>	DXS1049_f:	5'-CGA GAT GGT GCT ACT ACA CG-3'
	DXS1049_r:	5'-GTT TCT CAT CAA GCT AAA ACT CGG TG-3'
<b>DXS1069</b>	DXS1069_f:	5'-AGC CTA ACC CAC ATA ACA GC-3'
	DXS1069_r:	5'-GTT TCT AGC TAC TAT ATT CAC CTT GGT CTT G-3'
<b>“SNP 1 Out”</b>	SNP1_out_F:	5'-CAC CAG CAA AAC ACT TCA CAT T-3'
	SNP1_out_R:	5'-GGG AAG TGA AAA ATA GTA AAA CTG A-3'
<b>“SNP 1 In”</b>	SNP1_in_F:	5'-AAA GAA TTA TGA CAG TTT ACC AAA ACA-3'
	SNP1_in_R:	5'-ATT TAA AAC ATT AGA AGC ATT GAG AA-3'
<b>“SNP 2 Out”</b>	SNP2_out_F:	5'-TGA TGT TTC TCA AAT TCC TTG AA-3'
	SNP2_out_R:	5'-GAA GGC ACG GCA GCT TAA T-3'
<b>“SNP 2 In”</b>	SNP2_in_F:	5'-ACA GAG GGA GTG GGG TTT TC-3'
	SNP2_in_R:	5'-TTC ACA GTT GGG GCA GAT TT-3'

Tabelle 2-17 *OTC*-Primer, Marker und SNPs

### 2.14.3 *GADPH*-Primer

Primer	Forward/	Sequenz
	Reverse	
„Primer 100 bp“	100 F	5'-GTT CCA ATA TGA TTC CAC CC-3'
	100 R	5'-CTC CTG GAA GAT GGT GAT GG-3'
“Primer 200 bp”	200 F	5'-AGG TGG AGC GAG GCT AGC-3'
	200 R	5'-TTT TGC GGT GGA AAT GTC CT-3'
„Primer 300 bp“	300 F	5'-AGG TGA GAC ATT CTT GCT GG-3'
	300 R	5'-TCC ACT AAC CAG TCA GCG TC-3'
“Primer 400 bp”	400 F	5'-ACA GTC CAT GCC ATC ACT GC-3'
	400 R	5'-GCT TGA CAA AGT GGT CGT TG-3'

Tabelle 2-18 *GADPH*-Primer Sequenzen

## 2.15 Verwendete Software

Chromas Lite Software v2.1.1

Technelysium

SeqScape

Applied Biosystem

Peak Scanner v1.0

Applied Biosystem

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Markeranalyse nach Whole Genome Amplification

In den Verfahren der Whole Genome Amplification gilt der Anspruch das gesamte genomische Material der Zelle gleichmäßig und fehlerfrei zu vervielfältigen. Dies geschieht durch Bindung von zufälligen Primern an die DNA, wodurch theoretisch das gesamte genomische Material gleichermaßen amplifiziert wird.

In einem ersten Arbeitsschritt wurden diploide Einzelzellen mit den Kits GenomePlex WGA4 von Sigma-Aldrich und GenomiPhi V2 von GE Healthcare (mit ALB-Puffer), sowie nach dem Protokoll von Pan *et al.* amplifiziert und die Qualität der DNA beurteilt [46]. Die Einzelzellen wurden dabei entweder manuell oder mittels des CellCelectors gewonnen.

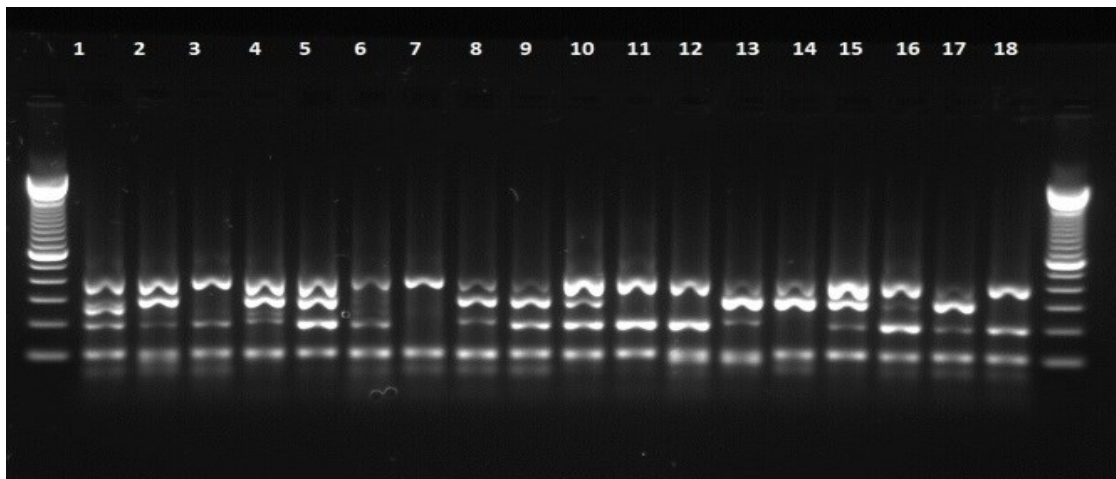
Bei der GenomePlex WGA4 Amplifikation wird der DNA-Strang zunächst in zufällige Fragmente mit einer Länge von etwa 400 bp unterteilt. Nach Bindung von Random Hexamer Primern beginnt eine Polymerasekettenreaktion. Die Vervielfältigung mit GenomiPhi V2 ist dagegen eine isothermale Reaktion bei der keine Fragmentierung der DNA erfolgen muss. Das Amplifikationsprotokoll nach der Arbeitsgruppe um Pan sieht vor zu der GenomiPhi V2 Reaktion 2 µl Trehalose [2 mM] hinzuzufügen. Dies soll die Produktion von Template unabhängigen DNA-Produkten verringern [46].

Die Qualitätsbeurteilung erfolgte zunächst durch Messung der DNA-Konzentration nach Amplifikation und Aufreinigung der Proben. Hierfür wurde das Nanodrop 1000 Spektralphotometer verwendet, welches bei einer Wellenlänge von 260 nm die optische Dichte der Probe misst. Eine DNA-Konzentration von 50 ng/µl entspricht einer optischen Dichte von 1. Anhand des Verhältnisses bei 260 nm zu 280 nm kann die Probe zudem auf Verunreinigungen durch Proteine und Zellbestandteile beurteilt werden. Es wurden die Konzentrationen und die 260/280 nm-Ratio für die Proben in einer Konzentrationstabelle im Anhang nach Amplifikationsverfahren und Selektionsart zusammengefasst. Die Amplifikation der Einzelzellen nach Isolation via CellCelector war in allen Testläufen bei jedem Verfahren besser, als nach manueller Gewinnung. Durch die Amplifikation mit GenomePlex WGA4 konnte die höchste DNA-Konzentration erreicht werden. Diese liegt hier im Durchschnitt (bei Isolation mit CellCelector) bei 305,26 ng/µl, während bei der Amplifikation mit GenomiPhi V2 und ALB-Puffer (CellCelector-Isolation) nur eine durchschnittliche Konzentration von 69,13 ng/µl und bei dem Zusatz

von Trehalose 69,04 ng/μl (CellCelector-Isolation) erreicht werden konnten. Bei der manuellen Einzelzellgewinnung waren die Konzentrationen bei beiden Verfahren geringer. Bei der GenomiPhi V2-Amplifikation mit ALB-Puffer konnte hier nur eine durchschnittliche Konzentration von 33,78 ng/μl erreicht werden, bei der Amplifikation mit GenomePlex WGA 4 eine durchschnittliche Konzentration von 214,75 ng/μl. Für die weiteren Analysen werden Proben ab einer Konzentration von 50 ng/μl verwendet.

Darüber hinaus wurde der qualitative Amplifikationserfolg durch eine Multiplex-PCR nach dem Protokoll von Van Beers *et al.* [47] überprüft und verglichen. Dabei werden Primer für das *GAPDH*-Gen für PCR Produkte mit einer Größe von 100 bp, 200 bp, 300 bp und 400 bp verwendet. Bei einer guten DNA-Qualität sind vier Banden differenzierbar. Bei der Multiplex-PCR wurden bei allen drei Amplifikationsverfahren die Banden bei Isolation mit dem CellCelector deutlich voneinander getrennt dargestellt. Das sauberste Bild zeigte sich bei der Amplifikation mit dem GenomiPhi-Kit und Trehalose nach Pan *et al.* Auch in einer durchgeführten Array-GCH konnten bei diesem Amplifikationsverfahren die qualitativ besten Ergebnisse erreicht werden. Die WGA mit GenomiPhi V2 und ALB-Puffer nach manueller Isolation führte dagegen zu dem schlechtesten Amplifikationserfolg.

In der gelelektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate zeigte sich insgesamt, dass die händische Einzelzellgewinnung einer Isolation mit CellCelector unterlegen ist.



**Abbildung 3-1 Multiplex PCR der GenomePlex WGA4-Amplifikation nach manueller Isolation**

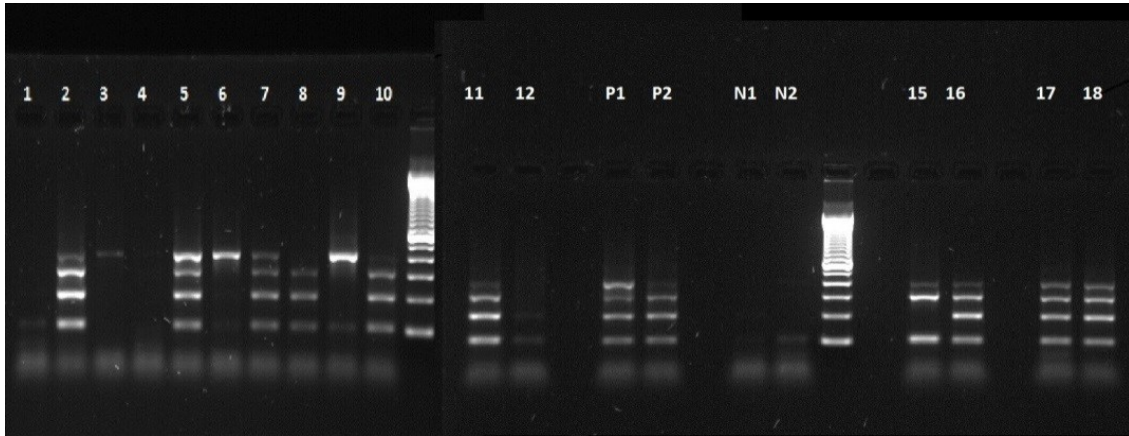


Abbildung 3-2 Multiplex PCR der GenomiPhi V2-Amplifikation mit ALB-Puffer nach manueller Isolation

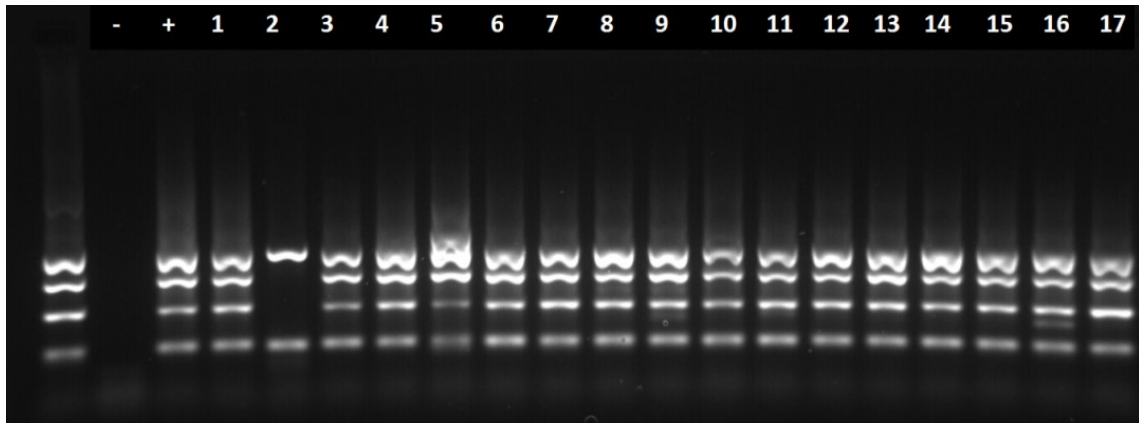


Abbildung 3-3 Multiplex PCR der GenomePlex WGA4-Amplifikation nach Isolation mittels CellCelector

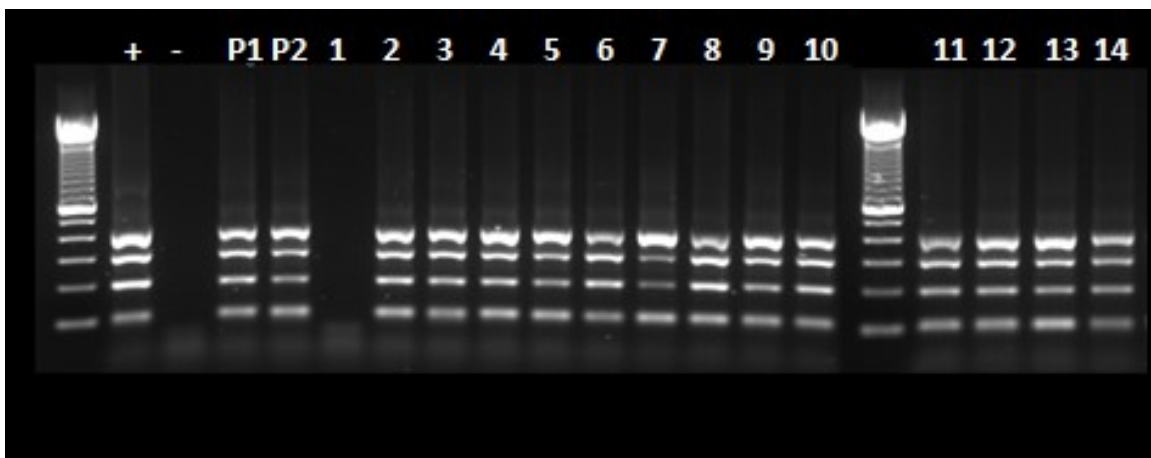
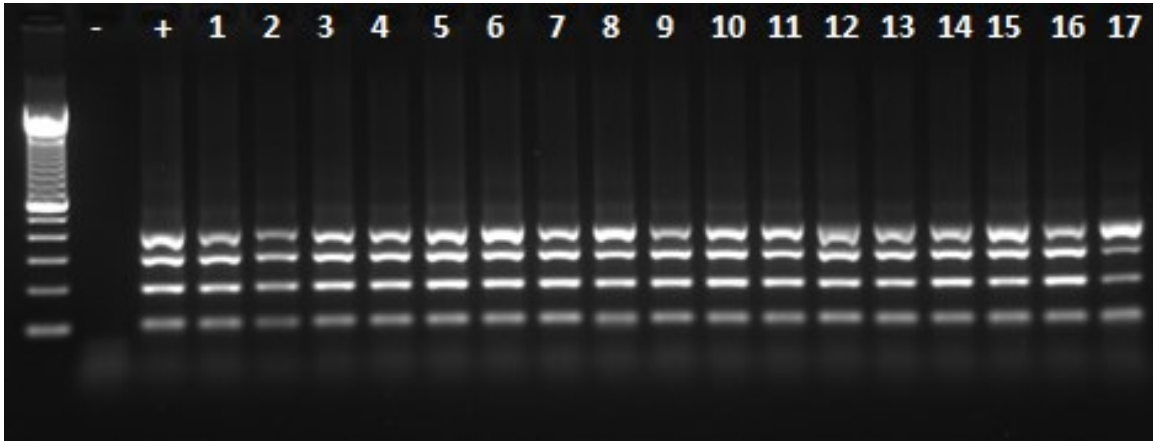


Abbildung 3-4 Multiplex PCR der GenomiPhi V2-Amplifikation mit ALB-Puffer nach Isolation mittels CellCelector



**Abbildung 3-5 Multiplex PCR der GenomiPhi V2-Amplifikation mit Trehalose nach Isolation mittels Cell Celector**

An erfolgreichen Amplifikaten wurden nach der Aufreinigung eine Markeranalyse mit dem ABI-Prism Linkage Mapping Set 2.5 durchgeführt. Das verwendete Panel 23 des Sets enthält 14 fluoreszenzmarkierte Mikrosatelliten-Marker. Diese binden sich in einer Polymerasekettenreaktion an bestimmte repetitive DNA-Sequenzen der Chromosomen 17 und 18. Dadurch kann eine vollständige Vervielfältigung dieser DNA-Regionen beurteilt werden. Die Verfahren wurden auf Anzahl der dargestellten Marker und eventuelles Vorhandensein von Allelic Dropout (fehlende Amplifikation eines Allels) miteinander verglichen.

Durch eine Zellgewinnung mit dem CellCelector konnten, im Vergleich zu der manuellen Isolation, bei allen Verfahren auch qualitativ deutlich bessere Amplifikationserfolge verzeichnet werden. Die Markerdarstellung war bei diesen Amplifikaten wesentlich erfolgreicher. Dabei erwies sich die Amplifikation mit GenomiPhi V2 und ALB-Puffer als das einzige Verfahren ohne Allelic Dropout, bei einer Isolation der Einzelzellen mittels CellCelector.

Amplifikationsmethode	Gewinnung	Einzelzellen (n)	Erfolgreich amplifizierte Proben (n)	Sequenzierte Proben	Dargestellte Marker	ADO
<b>GenomiPhi V2 mit ALB-Puffer</b>	Manuell	10	4/10 *	1	3/14	3
	Cell	20	17/20	1	13/14	0
	Celelector			2	13/14	0
	3			12/14	0	
<b>GenomiPhi V2 mit Trehalose</b>	Cell	16	16/16	1	14/14	2
	Celelector			2	12/14	0
				3	14/14	2
<b>GenomePlex WGA4</b>	Manuell	20	11/20 *	1	5/14	2
	Cell	19	15/16	1	11/14	0
	Celelector			2	14/14	1
	3			14/14	0	

**Tabelle 3-1 Ergebnisse der Amplifikation und Markeranalyse nach einer Whole Genome Amplifikation.** Es werden die verschiedenen WGA-Verfahren je nach Art der Einzelzellisolierung auf die Anzahl der erfolgreich amplifizierten Proben und die Anzahl der dargestellten Marker des ABI Prism Linkage Mapping Sets 2.5, Panel 23 und ADO miteinander verglichen.

\* schlechte Zellqualität

### **3.2 Nested PCR und Sequenzierung nach WGA**

In einem weiteren Untersuchungsaufbau wurde der Erfolg einer sequenzspezifischen Nested-PCR und anschließende Sequenzierung nach einer gesamtgenomischen Amplifikation untersucht. Dies erfolgte an Einzelzellen mit einer  $\Delta F508$ -Mutation des *CFTR*-Gens. Die Isolation der Einzelzellen wurde mit dem CellCelector durchgeführt.

Die Lyse und Amplifikation wurde zum einem nach GenomiPhi V2 mit ALB-Puffer, und zum anderem mit Reagenzien des GenomiPhi V2 Kits und Proteinase K durchgeführt. Über die oben beschriebene Multiplex-PCR mit anschließender Gelelektrophorese auf 1,5% Agarosegel wurde die Qualität beurteilt. Vor allem die Amplifikation nach GenomiPhi V2 und Proteinase K konnte hierbei durch qualitativ und quantitativ gute Ergebnisse überzeugen.

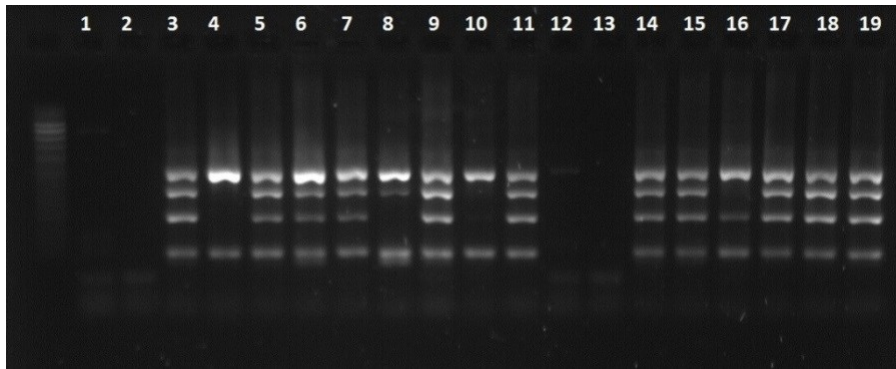


Abbildung 3-6 Multiplex PCR nach GenomiPhi V2 Amplifikation mit ALB-Puffer

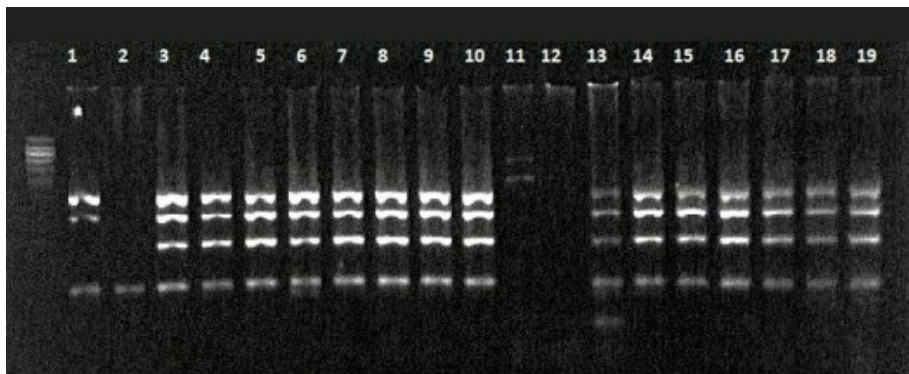


Abbildung 3-7 Multiplex PCR nach Amplifikation mit GenomiPhi V2 und Proteinase K

Erfolgreiche Amplifikate wurden nach der in Abschnitt 2.7.1 beschriebenen Reaktion mit sequenzspezifischen Primern amplifiziert und gute Reaktionsprodukte wie in Abschnitt 2.7.2 beschrieben sequenziert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Chromas Lite Software v2.1.1.

Dabei zeigte sich bei beiden Versuchsreihen eine mittlere Qualität der Sequenzierprodukte (teilweise keine eindeutige Darstellung der Picks). Darüber hinaus kam es bei beiden Protokollen zu Allelic Dropout.

Alle eingesetzten Zellen waren für die  $\Delta F508$ -Mutation im *CFTR*-Gen heterozygot. Dies bedeutet, dass an der Position 508 durch eine Deletion von drei Nukleotiden die Aminosäure Phenylalanin fehlt. Da diese Mutation nur bei einem Allel auftritt, kommt es bei der Sequenzierung nach der Mutation zu einem Shift. Fehlt dieser Shift, bedeutet dies, dass die Zelle homozygot in diesem Sequenzbereich ist, es also bei der Amplifikation zu einem Allelic Dropout kam.

Sechs Proben wurden mit GenomiPhi V2 und ALB-Puffer sequenziert, davon war eine von ADO betroffen. Bei der Amplifikation mit Reagenzien des GenomiPhi V2 Kits und Proteinase K wurden 15 Proben sequenziert. Hier kam es bei zwei Proben zu einem ADO. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst.

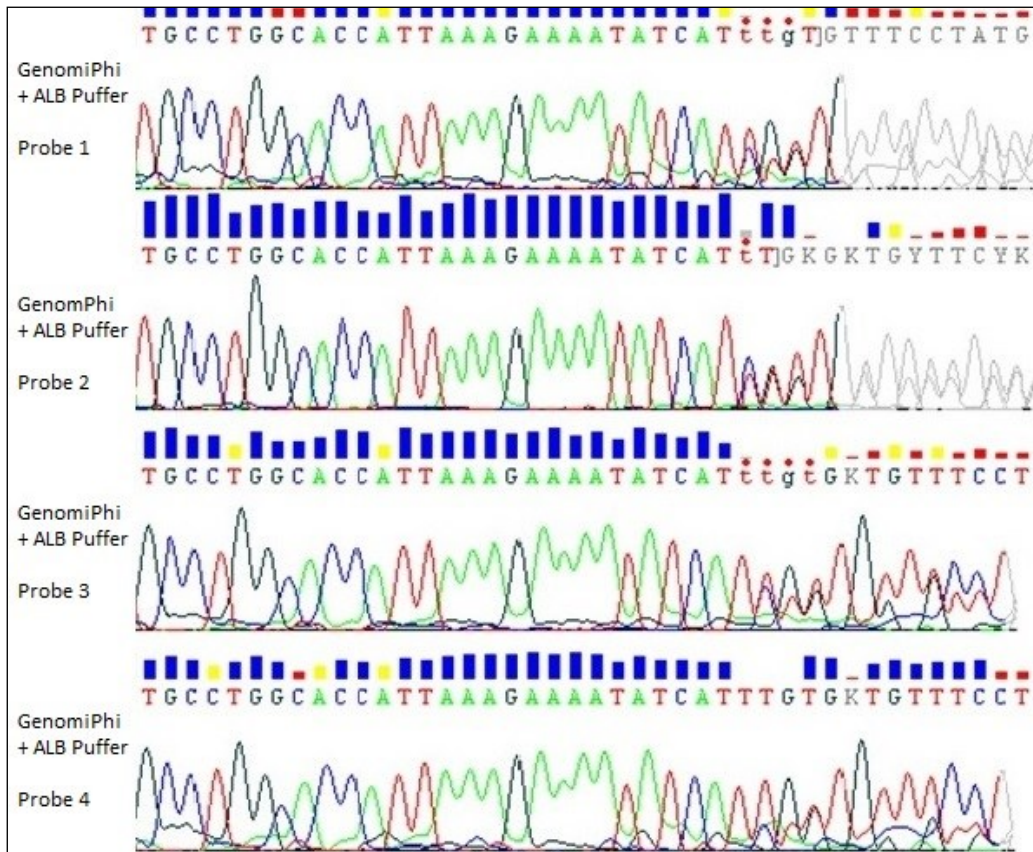


Abbildung 3-8 Sequenzierung nach WGA mit GenomiPhi V2 und ALB-Puffer

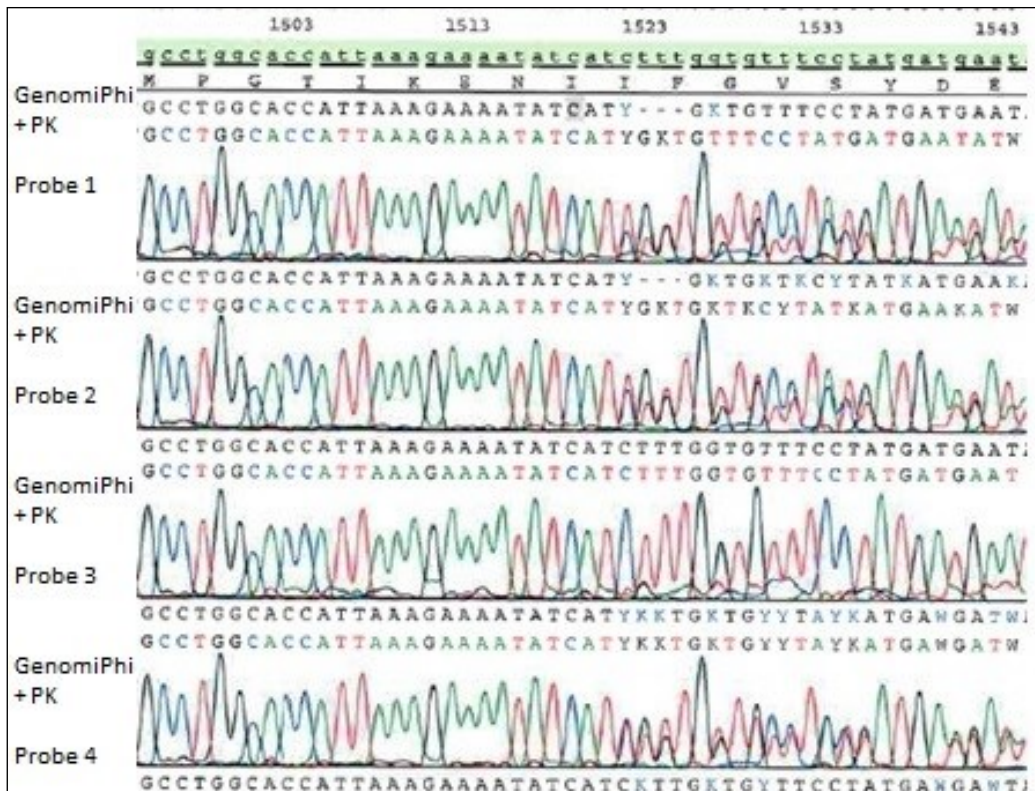


Abbildung 3-9 Sequenzierung nach Amplifikation mit GenomiPhi V2 und Proteinase K

### **3.3 Nested PCR, Markeranalyse und Sequenzierung nach sequenzspezifischer Amplifikation**

#### **3.3.1 Sequenzspezifische Amplifikation**

In einer nächsten Untersuchung wurde nicht mehr zu Beginn das gesamte Genom der Einzelzelle vervielfältigt, sondern direkt die Genregion von Interesse. Es ist dadurch zu erwarten, dass es bei dem spezifischen Genprodukt zu weniger Amplifikationsfehlern kommt. Um die bestmögliche Vervielfältigung einer spezifischen genomischen Region zu finden, wurden verschiedene Lyse- und Amplifikationsverfahren miteinander kombiniert. Der Amplifikationserfolg wurde zunächst mit Gelelektrophorese überprüft.

Für die verschiedenen Versuchsreihen wurden diploide Einzelzellen mit einer  $\Delta F508$ -Mutation im *CFTR*-Gen mit dem CellCelector gewonnen und je nach weiterem Protokoll in ein Tube mit 5 oder 10  $\mu\text{l}$  nukleasefreiem Wasser überführt. Zwei Versuchsreihen wurden mit der genomischen DNA von Promega durchgeführt. Die Lyse der Einzelzellen erfolgte, wie oben beschrieben, entweder mit der Nested-Lyse 1 (Tween, Triton, Proteinase K) oder Nested-Lyse 2 (Proteinase K). Je nach Versuchsreihe wurden die lysierten Zellen danach mit einem der oben genannten Amplifikationsverfahren vervielfältigt. Dabei wurde die Nested-Lyse 1 jeweils mit den Nested-Amplifikation 1, -2, -3 oder -4 kombiniert und die Nested-Lyse 2 zunächst nur mit der Amplifikation 4.

Es zeigten sich bei der Vervielfältigungsreaktion nach Nested-Lyse 1 insgesamt sehr schlechte Ergebnisse. Amplifikate konnten nur in der Versuchsreihe der Kombination aus Nested-Lyse 1 und Nested-Amplifikation 1 (6  $\mu\text{l}$  HotStar und 2  $\mu\text{l}$  Primern: 9 Amplifikationsprodukte mit überwiegend wenig DNA-Menge bei 14 Proben) festgestellt werden.

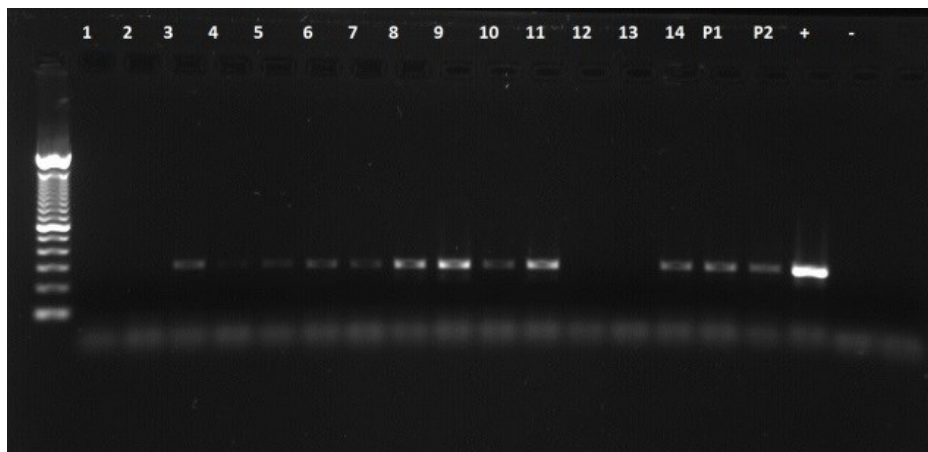


Abbildung 3-10 Gelelektrophorese der Nested-Lyse 1 mit Nested-Amplifikation 1

Nach dem Protokoll von Vrettou *et al.* wurde die Nested-Lyse 2 und die Nested-Amplifikation 4 durchgeführt. Die Kombination überzeugte dabei in der Qualitätskontrolle mittels Gelelektrophorese durch gute Ergebnisse. Es wurden 16 von 20 Zellen amplifiziert, wobei deutliche Banden in der Gelelektrophorese auch auf eine ausreichende Produktmenge schließen lassen.

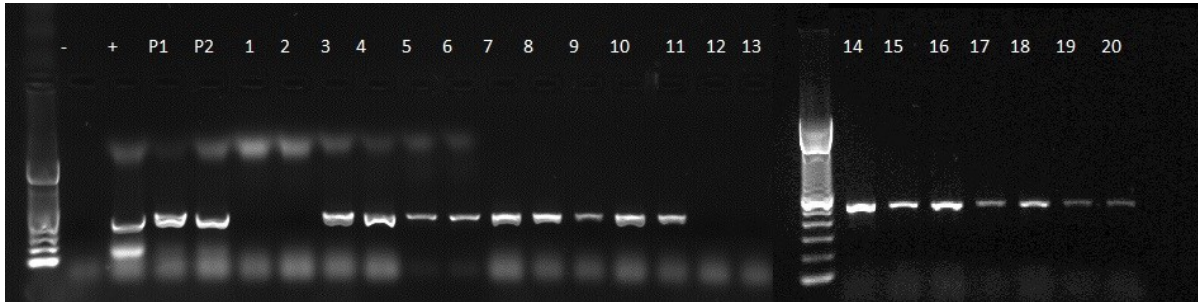


Abbildung 3-11 Gelelektrophorese der Lyse 2 Amplifikation 4

An diploiden Einzelzellen eines gesunden anonymisierten Spenders wurden für einen weiteren Vergleich zwei Testreihen durchgeführt. Hierbei wurden alle Zellen mittels CellCelector gewonnen, in Tubes mit 10 µl nukleasefreiem Wasser überführt und nach dem Protokoll der Nested-Lyse 2 lysiert. Im Anschluss wurde zum einen die Amplifikation 4 durchgeführt, und zum anderen die Amplifikation 5, bei der MgCl<sub>2</sub> [25mM] durch nukleasefreies Wasser ersetzt ist. Die Amplifikate wurden auf Agarosegel aufgetragen und nach Elektrophorese ausgewertet. Bei beiden Varianten konnten alle Reaktionsansätze erfolgreich amplifiziert werden.

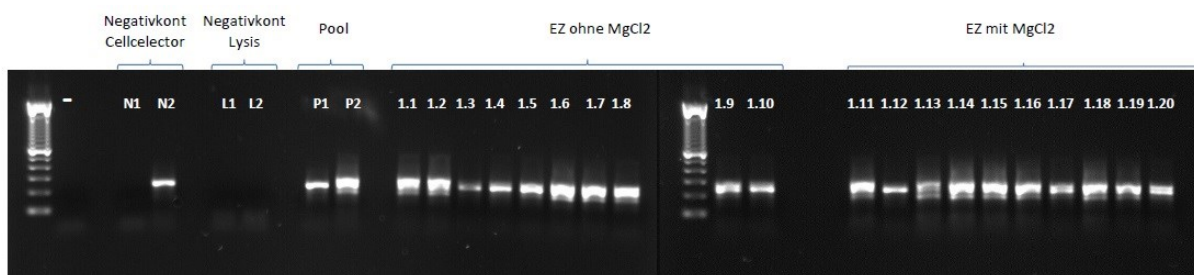


Abbildung 3-12 Gelelektrophorese der Lyse 2 mit Amplifikation 4 und 5

### 3.3.2 Mikrosatelliten-Markeranalyse

In einer anschließenden Markeranalyse, nach Protokoll des Abschnitts 2.8.2, wurden jeweils die 10 amplifizierten Proben untersucht. Es kam bei keiner der Proben zu einem ADO und es zeigten sich auch in der Darstellung der Marker keine Qualitätsunterschiede zwischen den beiden Amplifikationen.

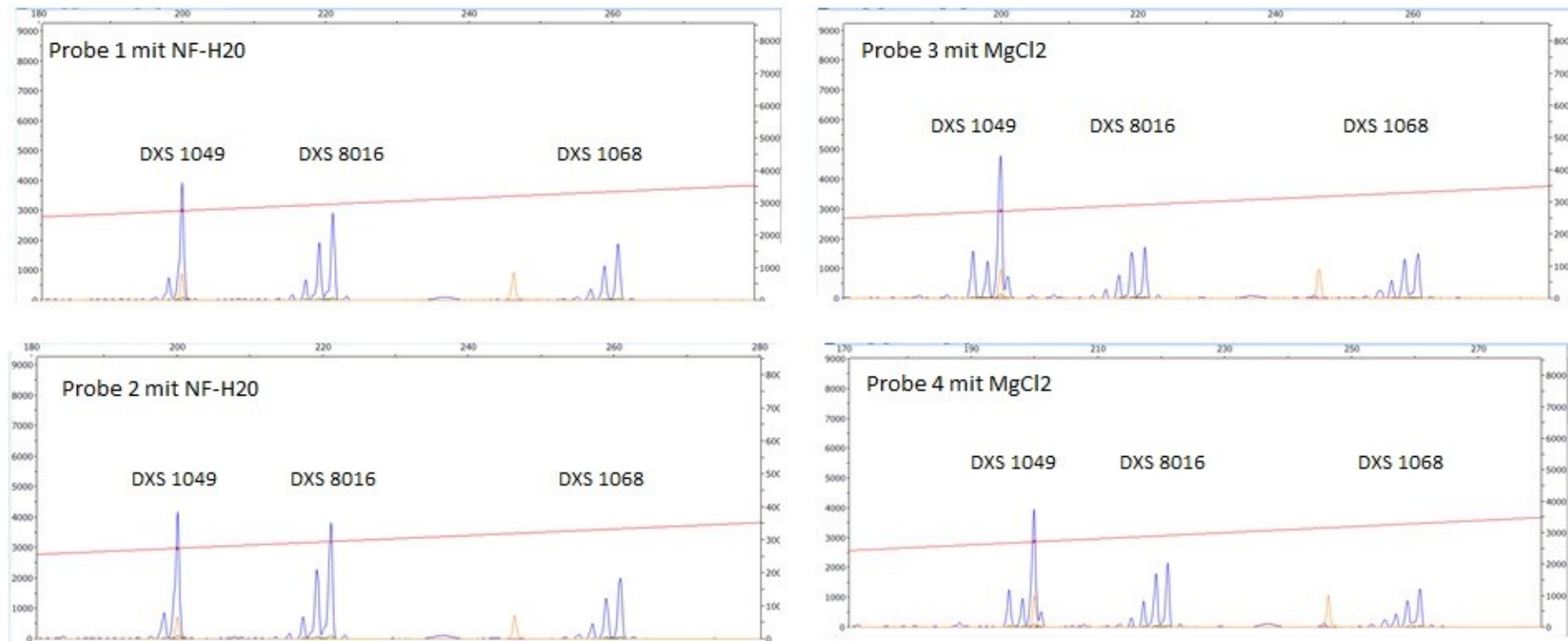


Abbildung 3-13 Vergleichende Mikrosatelliten-Analyse der Nested-Amplifikationen 4 und 5 mit den OTC-Markern DXS 1049, DXS 8016 und DXS 1068

### 3.3.3 Sequenzierung

In Vorbereitung für die Sequenzierung wurde mit den erfolgreichen Amplifikaten der sequenzspezifischen Amplifikationen eine Nested-PCR, wie in Abschnitt 2.7.1 beschrieben, durchgeführt, die Qualität erneut gelelektrophoretisch kontrolliert und die Produkte, wie in Abschnitt 2.7.1 beschrieben, für die Sequenzierung einer Amplifikation mit genspezifischen Markern zugeführt. Nach der Aufreinigung erfolgte die Analyse mit dem ABI 3130 Sequenziergerät. Der Sequenziererfolg wurde mit dem Programm Chromas Lite 2.1.1 ausgewertet.

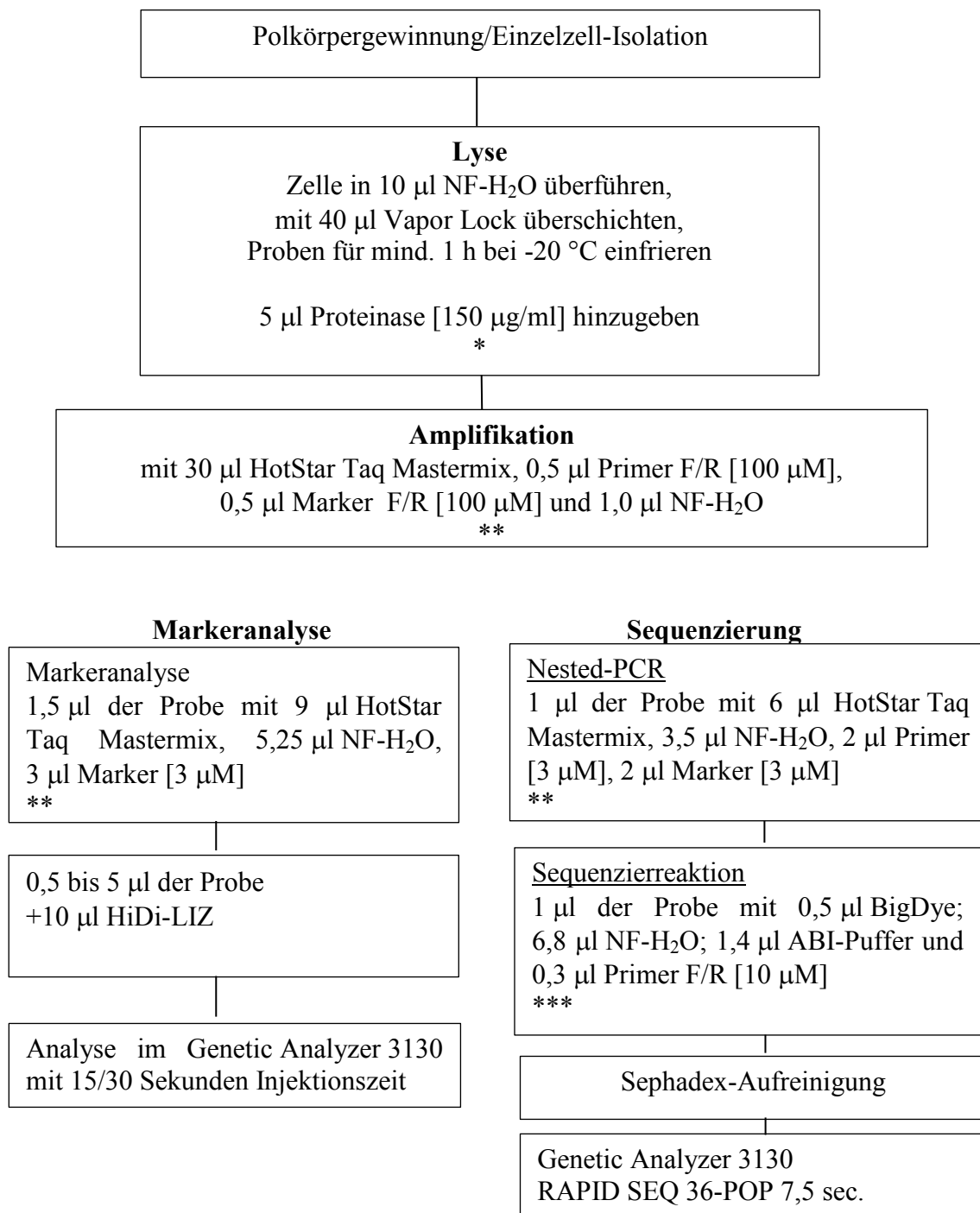
In Tabelle 3.2. sind die Ergebnisse der verschiedenen Versuchsreihen dargestellt. Die Amplifikation nach dem Protokoll der Nested-Amplifikation 4 mit voran gegangener Nested-Lyse 2 erzielte sowohl in der Anzahl der erfolgreich amplifizierten Proben, als auch bei der Sequenzierung die besten Ergebnisse. Im Gegensatz zu den anderen Verfahren konnte bei diesem Protokoll kein Allelic Dropout beobachtet werden. Auch war in der Sequenzierung die Baseline am ruhigsten und die Sequenzier-Peaks regelrecht dargestellt.

Lyse- verfahren	Amplifikations- verfahren	Erfolgreich amplifizierte Proben (n)	Sequenzierte Proben (n)	ADO (n)	Qualität
	<i>GenomiPhi V2 mit ALB-Puffer</i>	16/22	6	1	Mittel
	<i>GenomiPhi V2 mit Lyse durch Proteinase K</i>	15/19	15	2	Mittel
<i>Nested-Lyse 1</i>	<i>Nested- Amplifikation 1</i>	9/14	9	0	Schlecht
	<i>Nested- Amplifikation 2</i>	0/5		Keine Sequenzierung	
	<i>Nested- Amplifikation 3</i>	0/21		Keine Sequenzierung	
	<i>Nested- Amplifikation 4</i>	0/21		Keine Sequenzierung	
<i>Nested-Lyse 2</i>	<i>Nested- Amplifikation 4</i>	16/20	15/16	0	Gut
	<i>Nested- Amplifikation 4</i>	10/10	10	0	Gut
	<i>Nested- Amplifikation 5</i>	10/10	10	0	Gut

**Tabelle 3-2 Ergebnisse der Sequenzierung nach sequenzspezifischer Amplifikation**



### 3.4 Protokoll - Diagnostik monogener Erkrankungen in der PKD



\* Lyse Programm:  
37 °C; 1 h 00  
65 °C; 10 min  
95 °C; 10 min  
4 °C; ∞

\*\*Amplifikations-  
Programm:  
95 °C; 15 min  
96 °C; 30 sec  
54 °C; 40 sec } 18 Zyklen  
72 °C; 30 sec  
96 °C; 30 sec  
54 °C; 20 sec } 18 Zyklen  
72 °C; 30 sec

\*\*\* Sequenzierreaktion-  
Programm  
96 °C; 30 sec  
50 °C; 15 sec 25 } Zyklen  
60 °C; 4 min  
8 °C; ∞

### **3.5 Lagerungstest**

Um einen optimalen Umgang mit den gewonnenen Polkörpern zu gewährleisten, wurden an diploiden Einzelzellen verschiedene Kühl- und Lagerungstests durchgeführt. Es wurden drei Versuchsreihen mit jeweils acht Einzelzellen angelegt. Die erste Versuchsreihe wurde direkt nach der Gewinnung für eine Woche bei -20 °C gelagert und erst danach lysiert und amplifiziert. Die zweite Versuchsreihe wurde nach der Gewinnung für drei Stunden bei 4 °C und danach über Nacht bei -20 °C gelagert. Die Lyse und Amplifikation erfolgten am nächsten Tag. In einer dritten Versuchsreihe wurden die Einzelzellen direkt bei -20 °C bis zum nächsten Tag aufbewahrt, dann lysiert und vor der Amplifikation für 4 Stunden bei 4 °C im Thermocycler gehalten.

Die Amplifikationserfolge wurden mit einer Gelelektrophorese auf 1% Agarosegel miteinander verglichen. Es konnten mit der Versuchsreihe 1 und 3 sehr gute Amplifikationserfolge erzielt werden (8/8 Zellen amplifiziert und mit klaren Banden dargestellt). In der zweiten Versuchsreihe wurden dagegen nur 6 Zellen amplifiziert und die Banden zeigten sich weniger deutlich. Da die Variante 3 besser umsetzbar ist als die Variante 1 wird den IVF-Zentren empfohlen die Polkörper nach der Gewinnung und Überführung in ein Tube für mindestens eine Stunde bei -20 °C einzufrieren. Der nachfolgende Versand an das humangenetische Labor kann dann auf Kühl-Akkus erfolgen.

### **3.6 Markeretablierung für eine Mutation im *OTC*-Gen**

Vor einer Präimplantations- bzw. Polkörperdiagnostik auf eine spezifische Mutation ist es wichtig, ein familienspezifisches Testsystem zu entwickeln. Dies sollte zur sicheren Darstellung und zum Ausschluss von Rekombinationen mehrere informative Marker in naher Umgebung des krankheitsassoziierten Gens enthalten.

Für die verwendeten Primer und mutationsnahen Marker wurden zunächst mit Gradienten-PCR die optimale Annealingtemperatur und mit Verdünnungstabellen die beste Reagenzien-Konzentration etabliert.

Danach wurde untersucht, für welche Marker die Patientin (Probe 1) heterozygot ist. Um das mutationstragende Allel zu identifizieren und den Vererbungsgang unter den Angehörigen (Proben 2 bis 5) nachzuvollziehen, müssen die Zellen der Probe 1 für die verwendeten Marker heterozygot sein (informative Marker). Dadurch ist zudem eine Überprüfung auf Amplifikationsfehler, wie Allelic Dropout, oder auf eine Rekombination möglich.



### 3.6.1 Haplotypen der Proben

Mit den Untersuchungsergebnissen der Markeranalysen und direkten Sequenzierung wurden für die untersuchten Zellen Haplotypen erstellt. Damit ist das mutationstragende Allel zu identifizieren und dessen Marker-Profil kann erstellt werden.

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5
<b>DXS 1049</b>	200/198	200/202	198	198	198
<b>DXS 8090</b>	156/172	156/172	172	172	172
<b>SNP 1</b>	G/A	?/A	G	<u>G</u>	A
<b>SNP 1</b>	A/T	?/T	A	<u>A</u>	T
<b>SNP 1</b>	./+C	?/+C	.	.	+C
<b>SNP 2</b>	C/T	C/T	C	<u>C</u>	T
<b>OTC-Mutation: c217-1G&gt;A</b>	wt/m	?/m	wt	<u>wt</u>	m
<b>DXS 1068</b>	261/259	254/259	261	261	259

Abbildung 3-16 Haplotypen der Proben 1 bis 5

An den Haplotypen der Proben 4 und 5 zeigte sich eine Rekombination. So haben bei beiden Proben die Mikrosatelliten-Marker DXS 1049 und DXS 8090 die gleiche Länge (DXS1049: 198; DXS8090: 172), obwohl der direkte Mutations-Nachweis sowie die anderen Marker zeigen, dass die Probe 5 das Allel mit Mutation und die Probe 4 das Wildtyp-Allel trägt. Diese Marker wurden daraufhin bei der anschließenden Polkörperdiagnostik zur weiteren Analyse nicht mehr verwendet.

Es ergibt sich folgendes Marker-Profil des mutationstragenden Allels:

**SNP 1:** Pos.: 38 220 916: A  
 Pos.: 38 220 923 T  
 Pos.: 38 220 980 + C  
**SNP 2:** Pos.: 38 222 570 T  
**DXS 1068:** 259

Bei der anschließenden Polkörperdiagnostik werden der 1. und der 2. Polkörper nun auf dieses Marker-Profil untersucht. Dies ermöglicht den Rückschluss, ob die zugehörige Eizelle die Mutation oder das Wildtyp-Allel trägt.

### 3.7 Leitfaden zur Polkörperdiagnostik

Nach der Etablierung der familienspezifischen Marker in Nähe der *OTC*-Mutation schließt sich die Diagnostik der Polkörper an. Hierfür lässt sich nach Zusammentragen der verschiedenen Laborergebnisse folgender Leitfaden für das polkörperentnehmende IVF-Zentrum und die anschließende Polkörperuntersuchung im humangenetischen Labor

erstellen. Das Protokoll ist in diesem Falle an die Untersuchung auf die *OTC*-Mutation angepasst und enthält deswegen die *OTC* spezifischen Primer und Marker sowie die angepassten Konzentrationen. Die allgemeinen Angaben können aus dem Flussdiagramm (3.4) entnommen werden.

### **3.7.1 IVF-Zentrum**

Verbrauchsmaterialien:

- 200 µl Maximum Recovery Tubes, VWR
- Steriles, nukleasefreies Wasser, Promega
- Steriles Vapor Lock, Qiagen

In die 200 µl Tubes werden 40 µl Vapor Lock vorgelegt. Danach wird der gewonnene Polkörper mit 10 µl NF-H<sub>2</sub>O in das vorbereitete Tube unter die Vapor Lock-Schicht gegeben und für 10 Sekunden zentrifugiert. Dabei ist die einzelne Überführung jedes Polkörpers in ein Tube sowie eine korrekte Bezeichnung der Polkörper unabdingbar, da eine Diagnostik sonst nicht möglich ist oder im schlimmsten Falle die Ergebnisse falsch interpretiert werden.

Die Probe wird für mindestens 1 Stunde bei -20 °C gefroren. Der anschließende Transport in das humangenetische Labor kann dann mit Kühl-Akkus erfolgen.

### **3.7.2 Humangenetisches Labor**

Zu der Probe werden 5 µl Proteinase K [150 µg/ml] zugefügt und im Thermocycler folgendes Lyse-Programm durchlaufen: 37 °C für 1 Stunde, 65 °C für 10 Minuten und 95 °C für 10 Minuten. Danach wird die Probe bei einer Temperatur von 4 °C gehalten.

Es wird eine sequenzspezifische Amplifikation durchgeführt. Dafür werden zu der lysierten Probe 30 µl HotStar Taq Mastermix, 0,5 µl Primer *OTC\_E3v1 F/R* [100 µM], 0,5 µl *DXS1068 F/R* [100 µM], 0,5 µl *SNP 1\_out F/R* [100 µM], 0,5 µl *SNP2\_out F/R* [100 µM] und 1 µl NF-H<sub>2</sub>O zugegeben und folgendes Temperaturprogramm durchlaufen:

95 °C; 15 min	
96 °C; 30 sec	} 18 Zyklen
54 °C; 40 sec	
72 °C; 30 sec	
96 °C; 30 sec	
54 °C; 20 sec	} 18 Zyklen
72 °C; 30 sec	

Zur Markeranalyse werden zu 1,5 µl des Amplifikats 9 µl HotStar Taq Mastermix, 5,25 µl NF-H<sub>2</sub>O und 3 µl Primer (DXS1069 F+R [3µM]). Im Thermocycler wird erneut das oben beschriebene Programm durchgeführt. Danach werden 0,5 µl bis 5,0 µl der Probe mit 10 µl LIZ auf ein Well aufgetragen und mit 15 oder 30 Sekunden Injektionszeit im Genetic Analyzer 3130 untersucht.

Für die Sequenzierung des OTC-Gens und die Analyse der SNP-Marker wird mit den Amplifikaten eine erneute Nested-PCR mit den inneren Primer durchgeführt. Zu 1 µl Amplifikat werden 6 µl HotStar Taq Mastermix, 3,5 µl NF-H<sub>2</sub>O und 2 µl jedes Primers und SNPs zugegeben (OTC-E3v2 F+R, SNP1\_in F+R, SNP2\_in F+R [je 3 µM]). Die Reaktion findet bei den oben genannten Temperaturen statt. Im Anschluss werden für die Sequenzierreaktion 0,5 µl BigDye, 6,8 µl NF-H<sub>2</sub>O, 1,4 µl ABI Puffer und 0,3 µl der gerade genannten Primer [10 µM] hinzugegeben. Die Probe wird im Thermocycler für 30 Sekunden auf 96 °C erhitzt, dann für 15 Sekunden auf 50 °C abgekühlt und danach für 4 Minuten auf 60 °C gehalten. Dieser Zyklus wird 25mal wiederholt. Danach wird die Probe bei einer Temperatur von 8 °C gehalten. Die zum zweiten Mal amplifizierte Proben werden mit Sephadex aufgereinigt und die Proben danach auf die Sequenzierplatte geladen. Die Sequenzierung erfolgt mit dem Programm: RAPID SEQ 36 – POP 7.5. Die Nukleotidsequenzen können danach mit der Chromas Lite Software v2.1.1 von Technelysium ausgewertet werden.

### **3.8 Ergebnisse der Polkörperdiagnostik**

Nach hormoneller Stimulation der Patientin wurden im behandelnden IVF-Zentrum 24 Eizellen gewonnen und mittels ICSI befruchtet. Es schloss sich, wie oben beschrieben, die Entnahme des ersten und zweiten Polkörpers an. Es konnten 36 Polkörper gewonnen werden, diese wurden wie im Protokoll angegeben im IVF-Zentrum behandelt und danach

gekühlt an das Institut für Humangenetik geschickt. Hier wurden 24 Polkörper erfolgreich amplifiziert und sequenziert.

Zehn Eizellen waren befruchtet, davon konnte bei einer Probe keine Analyse durchgeführt werden. Bei drei weiteren Proben wurde eine Kontamination festgestellt. Diese wurde durch die vielfältige Markeranalyse sicher erkannt. Eindeutige Untersuchungsergebnisse konnten nach der Analyse der Polkörper für fünf Eizellen erstellt werden. Bei drei Eizellen ergab die Untersuchung, dass der erste Polkörper das Wildtyp-Allel und der zweite Polkörper die Mutation trägt. Diese Konstellation lässt darauf schließen, dass die dazugehörigen Eizellen von der Mutation betroffen sind. Bei zwei weiteren Proben fanden sich ein erster Polkörper mit Mutations-tragendem Allel und ein zweiter Polkörper mit Wildtyp-Profil. Diese korrespondierenden Eizellen waren mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit frei von der Mutation im *OTC*-Gen, dies konnte der Patientin und dem Kinderwunschzentrum mitgeteilt werden.

	4A 4B		5A 5B		6A	11A	13A 13B		18A 18B		19A 19B		21A	22A 22B	
	Polkörper	G	A	?	G	G/A	A	G?	G	G	.?	A?	G	A	G
A		T	?	A	T?	T	.?	A	A	T	T?	A	T	A	?
.		+C	?	.	+C?	+C	+C?	.	.	+C	+C	.	+C	.	?
?		?	?	C	?	C?	T	C	C	T	?	?	C	C	?
?		m	m	Wt	Wt/m	Wt (het?)	Wt/m	Wt	Wt	?	?	?	m/Wt	Wt?	?
?		259	259	?	?	259?	259?	?	259	?	?	261	?	261	259?
Eizelle	# 4		# 5		# 6	# 11	# 13		# 18		# 19		# 21	# 22	
	Mutationsträger		Wildtypträger		Kontamination	Kontamination	Mutationsträger		Mutationsträger		Wildtypträger		Kontamination	Mutationsträger	

Abbildung 3-17 Haplotypen der Polkörper der befruchteten Eizellen. Durch eine Kontamination kann bei den Eizellen 6, 11 und 21 keine Aussage getroffen werden. Die korrespondierenden Eizellen 4, 13, 18 und 22 tragen die Mutation. Die korrespondierenden Eizellen 5 und 19 tragen mit hoher Wahrscheinlichkeit das Wildtyp-Allel.

Leider konnte durch den Transfer der beiden befruchteten Eizellen ohne Mutation im *OTC*-Gen keine Schwangerschaft herbeigeführt werden. Es wurden weitere Behandlungs- und Untersuchungszyklen geplant.

## 4 Diskussion

Durch die herausragende Forschungsleistung von Robert Edwards und Patrick Steptoe wurde am 25. Juli 1978 Louise Joy Brown, das erste Kind das mit In-vitro-Fertilisation gezeugt wurde, auf die Welt gebracht [2–4]. Die IVF entwickelte sich daraufhin schnell zu einer willkommenen Alternative für Paare, die unter Unfruchtbarkeit litten. Die Auswahl der Embryonen erfolgte zunächst nur mikroskopisch, durch Beurteilung der Eizelle im Vorkernstadium [49, 50] oder der Morphologie und Teilungsgeschwindigkeit des Embryos [49]. Die IVF für eine genetische Untersuchung eines Embryos vor der Implantation zu nutzen, wurde erstmals vor 25 Jahren von Handyside *et al.* [14] vorgestellt. Zeitgleich veröffentlichte auch Verlinsky *et al.* die erste Polkörperdiagnostik [51]. Dabei sollten die Untersuchungen zunächst Paaren helfen, welche ein hohes Risiko haben, eine spezifische monogene Erkrankung weiterzugeben, ein nicht-betroffenes Kind bekommen zu können und die Zahl von induzierten Schwangerschaftsabbrüchen nach pränataler Diagnostik reduzieren.

Da Aneuploidien die Hauptursache für Implantationsversagen, Entwicklungsstörungen des Embryos und Schwangerschaftsverlust sind [16], wurde die Präimplantations- und Präfertilisationsdiagnostik in der weiteren Entwicklung vermehrt bei Paaren eingesetzt, bei denen keine genetische Erkrankung bekannt ist, die aber mit höherer Wahrscheinlichkeit dazu neigen, numerische Chromosomenfehlbildungen zu entwickeln. Dafür sind vor allem Unfruchtbarkeit, wiederholte Schwangerschaftsverluste, IVF-Versagen oder eine Aneuploidie in einer vorherigen Schwangerschaft auffällig [52]. Mit dem Screening der Chromosomen der Eizelle oder des Embryos vor der Implantation sollen der IVF-Erfolg und das Schwangerschafts-Outcome erhöht werden. Dies gelang erst durch den Einsatz der Analyse aller Chromosomen mittels der Array-CGH [29, 53]. Dadurch wird auch eine Untersuchung auf strukturelle Chromosomenveränderungen ermöglicht [54, 55]. Hierzu wurde am Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz ein Verfahren etabliert [54, 56], welches seitdem erfolgreich die Polkörperdiagnostik mit Array-CGH anbietet.

Die vorliegende Arbeit verfolgt das Ziel auch für Paare mit bekannter monogener Erkrankung eine Untersuchung auf spezifische Mutationen, im Rahmen einer Polkörperdiagnostik am Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz anzubieten zu können. Dafür sollte ein Protokoll zur Lyse und Amplifikation von

Polkörper-DNA etabliert werden, welche eine direkte Analyse des betroffenen Gens durch Sequenzierung sowie eine indirekte Untersuchung durch STR- und SNP-Marker ermöglicht. Da Allelic Dropout und andere Amplifikationsfehler die häufigste Ursache einer Fehldiagnose bei der PID von monogenen Erkrankungen sind [36], sollten verschiedene Lyse- und Amplifikationsmethoden verglichen werden. Eine Kontamination oder aufgetretene Amplifikationsfehler sollten darüber hinaus sicher durch angewandte indirekte Analyse nachgewiesen werden. Nach der Etablierung eines robusten Protokolls, sollte die Möglichkeit bestehen, dieses im diagnostischen Bereich, also bei der Untersuchung von monogenen Veränderungen in Polkörpern, anzuwenden. Beispielhaft wird dieser Ansatz bei einer Mutation im *OTC*-Gen gezeigt.

Es wurden zunächst, teilweise in unserem Institut etablierte, Whole Genome Amplifikationen für eine beginnende Vervielfältigung des gesamten Genoms mit direkten sequenzspezifischen Amplifikationen durch Nested-PCR miteinander verglichen [57, 58]. Hierbei zeigten sich bei der MDA-WGA mit einem leicht veränderten Reaktionsprotokoll des GenomiPhi V2 Kits (GenomiPhi mit ALB-Puffer) akzeptable Ergebnisse, jedoch kam es einmal zum ADO. Ein Verfahren der sequenzspezifischen Nested-Amplifikation überzeugte durch sehr gute Amplifikations- und Sequenziererergebnisse. Darüber hinaus wurde kein ADO beobachtet. Generell konnten aufgetretene Amplifikationsfehler und Kontaminationen durch die Verwendung von STR-Markern sicher nachgewiesen werden.

Danach wurde, für die Fragestellung einer *OTC*-Mutation, ein spezifisches Testsystem zur Detektion des mutationstragenden Allels mittels informativen STR- und SNP-Markern entwickelt. Dies erwies sich als sehr arbeits- und zeitintensiv.

Das entstandene Protokoll wurde für die Polkörperdiagnostik einer Patientin mit bekannter monogener Erkrankung angewandt. Hierfür wurden, nach Hormonstimulation der Patientin, in dem Labor eines IVF-Zentrums 24 Eizellen gewonnen und mit ICSI befruchtet. Mittels Laserdissektion wurden anschließend 36 Polkörper isoliert, nach herausgegebenem Protokoll behandelt und an unser Institut versandt. Im Institut für Humangenetik wurden 24 Polkörper erfolgreich amplifiziert und sequenziert. Es zeigte sich, dass zehn zugehörige Eizellen befruchtet waren. Von fünf Eizellen konnten sichere Untersuchungsergebnisse erzielt werden. Dabei ergab die Analyse der Polkörper, dass drei der korrespondierenden Eizellen die Mutation tragen mussten. Bei zwei weiteren ließen die Ergebnisse der Diagnostik des ersten und zweiten Polkörpers darauf schließen, dass die zugehörigen Eizellen frei von Mutation waren. Die Eizellen wurden der Patientin transferiert, es entwickelte sich jedoch keine Schwangerschaft.

Die European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) veröffentlichte 2015 die Daten der 2010 in 62 europäischen Zentren stattgefundenen PID-Untersuchungen und wertete diese nach Art der Diagnostik und Schwangerschafts-Outcome (bis Oktober 2011) aus [59]. Hierbei ergab sich, mit Zusammenführung der erhobenen Daten der ausgewerteten Behandlungen von 1997 bis 2011 [60–62], dass in den zum Konsortium gehörenden Zentren insgesamt 45.163 Zyklen einer kombinierten ART mit PID durchgeführt wurden. Dabei wurden 327.310 Eizellen erfolgreich befruchtet. 262.486 Proben konnten mit den verschiedenen Analysemethoden FISH, PCR, Array-CGH oder Kombinationen dieser untersucht werden. Die Untersuchungsergebnisse führten zu 32.420 transferierten Embryonen. In 11.713 Fällen führte dieser Transfer zu einem Anstieg des beta-hCG Spiegels und in 9.253 konnte ein Herzschlag dokumentiert werden. Die klinische Schwangerschaftsrate liegt damit für die Jahre 1997 bis 2009 bei 20 % pro stattgefundenen PID-Zyklus und für das Jahr 2010 bei 22 %. 2011 wurden in Europa bei 5732 durchgeführten Behandlungszyklen 997 Kinder nach ART mit PID geboren. Dies ist ein Geburten-Outcome von 17 % pro Behandlungszyklus.

Da in unserem Institut nur ein Behandlungszyklus durchgeführt wurde, ist dieser mit den europäischen Ergebnissen kaum vergleichbar und liefert keine statistisch auswertbaren Ergebnisse. Die Befruchtung wurde in dem von uns dokumentierten Behandlungszyklus in einem externen IVF-Zentrum durchgeführt. Die Befruchtungsrate erscheint hierbei im europäischen Vergleich etwas geringer zu sein (10 befruchtete unter 24 gewonnenen Eizellen im Vergleich zu 327.310 befruchteten von 453.797 gewonnenen Eizellen der Daten des ESHRE Konsortium) [59–62]. Der Implantationserfolg lässt sich bei nur zwei transferierten befruchteten Eizellen nicht statistisch auswerten. Das Schwangerschafts-Outcome liegt jedoch wie oben beschrieben, auch nach den Ergebnissen der ESHRE nur bei 22%. Implantations- und Schwangerschaftsversagen können sehr vielfältige Ursachen haben. Es sei angemerkt, dass auch in der natürlichen menschlichen Reproduktion die Wahrscheinlichkeit schwanger zu werden nur bei 18% pro Monatszyklus liegt [56].

Auf Grund der gesetzlichen Vorgabe war zum Zeitpunkt der Verfahrensetablierung und der Polkörperuntersuchung der Patientin nur eine indirekte Untersuchung der Eizelle im Rahmen einer Polkörperdiagnostik zulässig. Mit dem 2015 beschlossenen Fortpflanzungsmedizinrechts-Änderungsgesetz (FMedRÄG 2015) ist seit dem 01.01.2015 auch eine Präimplantationsdiagnostik in Österreich, wenn auch unter sehr strikten

Bedingungen, erlaubt. Diese ermöglicht nun auch eine Untersuchung von Blastomeren nach Blastomerbiopsie im 6-8 Zellstadium oder von Trophoblasten nach Trophoctodermbiopsie am fünften Tag nach Befruchtung. Eine Anpassung des hier etablierten Polkörper-Protokolls sollte kurzfristig ohne Schwierigkeiten für diese Zellentitäten möglich sein. Die Änderungen des Gesetzes ermöglichen nicht mehr nur eine Untersuchung des maternalen Erbgutes, sondern die Erfassung der genetischen Konstitution des nach künstlicher Befruchtung entstandenen Embryos. In Österreich besteht dafür eine Indikation, wenn drei stattgefundene IVF-Zyklen zu keiner Schwangerschaft führten, habituelle Aborte beschrieben sind oder mindestens ein Elternteil ein hohes Risiko trägt, eine genetische Konstitution zu übertragen, die zu Fehl- oder Totgeburt oder der Geburt eines Kindes mit einer Erbkrankheit führt. Hierbei sei anzumerken, dass im derzeit gültigen Gesetz von einer Erbkrankheit gesprochen wird, die während der Schwangerschaft oder nach der Geburt zu einer schwerwiegenden Erkrankung führt, die den ständigen Einsatz moderner Medizintechnik oder medizinischer Hilfsmittel, schwere Hirnschädigungen aufweist oder das Kind dauerhaft an schweren Schmerzen leiden lässt, wobei eine kausale Behandlung nicht möglich ist [13]. Die Bezeichnung „nach der Geburt“ sei dabei kritisch zu betrachten, da sie nicht den Zeitpunkt des Auftretens von ersten Symptomen definiert. So ist nach diesem Gesetz eine PID nicht nur z.B. bei einer Cystischen Fibrose zulässig, bei der das betroffene Kind von Geburt an unter schweren Einschränkungen leidet oder wie in dem Fall der beschriebenen Patientin mit einer Mutation im *OTC*-Gen, die durch den darauffolgenden Mangel an Ornithintranscarbamylase zu so schwerwiegenden Harnstoffwechselstörungen führt, dass betroffene Jungen meist schon in den ersten Lebensstagen versterben, sondern auch beispielsweise bei Chorea Huntington, eine genetische Erkrankung, bei der es durch über 40 Wiederholungen des CAG-Triplets im kurzen Arm des Chromosom 4 (Genlocus p16.3) zu schwerwiegenden neurodegenerativen Symptomen kommt. Ein Phänotyp manifestiert sich, je nach Schwere der Mutation, erst mit fortgeschrittenem Lebensalter (z.B. auch über dem 40. Lebensjahr). Eine Präimplantationsdiagnostik auf diese Erkrankung ist im Prinzip technisch möglich [63]. Eine Anwendung der PID für Erkrankungen, die erst im späteren Lebensalter auftreten ist jedoch ethisch zu hinterfragen. Es wäre wünschenswert, das vorliegende Gesetz um spezifische Indikationen zu ergänzen.

In vielen Ländern ist die Präimplantationsdiagnostik bereits seit Jahren erlaubt und auch für weitere Indikationen zugelassen. Durch den rasanten technischen Fortschritt wurden

die Verfahren der Whole Genome Amplification derart weiter entwickelt, dass es möglich geworden ist, die genetische Konstitution des gesamten Embryo-Genoms zu erfassen und eine gleichzeitige Untersuchung auf mehrere Mutationen und chromosomale Veränderungen zu ermöglichen. Für Polkörper war in Österreich bislang ein Screening aller 24 Chromosomen auf Aneuploidien und unbalancierte Translokationen über Array-CGH möglich.

Durch die Verwendung von SNP-Arrays können Proben auf bekannte monogene Erkrankung durch die Erstellung eines Genotyps untersucht werden. Ein Panel von Markern wird hierbei für alle Träger einer monogenen Erkrankung eingesetzt. Die zeitaufwendige Erstellung eines mutationsspezifischen Testsystems entfällt somit. Gleichzeitig können Kopienzahlveränderungen durch die Anzahl der SNPs an den einzelnen Loci bis zu einem gewissen Grad nachgewiesen werden. Die Untersuchung auf monogene Erkrankungen kann hier mit einem Screening auf numerische oder strukturelle Chromosomenveränderungen verbunden werden. Beim sog. Karyomapping werden SNP-Haplotypen der vier elterlichen Chromosomen erstellt und dann eine Embryozelle auf informative SNP-Marker untersucht. Dies ermöglicht die Darstellung des Vererbungsgangs, die Identifizierung von mutationstragenden Allelen und Rekombinationen, ohne dass eine wochenlange Etablierung eines familienspezifischen Testsystems erfolgen muss.

Durch die fortlaufenden Weiterentwicklungen und geringer werdenden Kosten im Bereich des Next Generation Sequencing (NGS) ist es seit wenigen Jahren möglich, mehrere Abschnitte des Genoms oder das gesamte Genom (Whole Genome Sequencing, WGS) sehr geringer Zellzahlen zu sequenzieren. Dies findet auch in der Präimplantationsdiagnostik seine Anwendung. Mit der WGS ist es neben dem Nachweis mehrerer elterlicher Mutationen auch die Detektion von de novo Mutationen möglich [43, 64–66].

Die neuen Techniken der SNP-Array und des NGS liefern eine neue Vielzahl an Informationen. Insbesondere das WGS birgt die Herausforderung, die Vielzahl nachgewiesener Sequenzvarianten richtig zu interpretieren, und somit könnte die Methode zunächst anfälliger für falsch-negative aber auch falsch-positive Befunde sein [67]. Außerdem sind die gefundenen Informationen eventuell für die ursprüngliche Fragestellung eines Paares, welches sich „nur“ eine erfolgreiche Schwangerschaft oder den Ausschluss einer spezifischen Erkrankung wünscht, nicht relevant. Es stellt sich die Frage,

wie man damit umgeht, wenn die Untersuchungen weitere Erkrankungen des Kindes aufzeigen oder Informationen über nicht-krankheitsbezogene Eigenschaften des zukünftigen Kindes geben. Die vorher dargestellten Daten des ESHRE-Consortium zeigten, dass die Zahl der transferierten Eizellen in Bezug auf die gewonnenen Eizellen auch schon unter den bis 2010 angewandten Verfahren der Analyse auf eine monogene Erkrankung und/oder Aneuploidie- oder Translokationsdiagnostik gering war. So ist anzunehmen, dass durch die zusätzlichen Informationen noch mehr Eizellen von einem Transfer ausgeschlossen werden.

Es werden immer mehr SNP-Muster gefunden, die mit einer Prädisposition für Erkrankungen, wie beispielsweise Diabetes mellitus Typ 2 oder nicht-krankheitsbezogenen Eigenschaften, wie z.B. Haar- und Augenfarbe in Zusammenhang stehen und es ermöglichen, eine Untersuchung des zukünftigen Kindes darauf durchzuführen [68–70]. Ein Einsatz der Präimplantationsdiagnostik auf Prädisposition für Erkrankungen des höheren Lebensalters, Krankheiten mit Therapiemöglichkeiten oder nicht-krankheitsbezogene Eigenschaften ist allerdings ethisch und moralisch abzulehnen. Es würde nicht nur eine Diskriminierung von Individuen und Perfektionierung der Gesellschaft schaffen, sondern auch viele Jahre gesunden Kindern das Recht auf Leben untersagen und das Recht auf Nichtwissen des zukünftigen Kindes untergraben.

Viele Paare die eine IVF anstreben sind oft durch schwierige Zeiten der Infertilität gegangen, und einige von ihnen haben Erfahrungen mit Fehlgeburten, nicht erfolgreichen IVF-Zyklen, induzierten Schwangerschaftsabbruch gemacht oder die Geburt eines schwerkranken Kindes erlitten. Für die meisten Paare drehen sich die relevanten Informationen nur um die Gesundheit des zukünftigen Kindes. Sie müssen aber über die Komplexität der Behandlung und die möglichen Ergebnisse sowie das weitere Verfahren genau informiert werden. Dabei ist es für viele nicht möglich, die genetischen Hintergründe und Techniken im Detail zu verstehen und es fällt oft schwer die Zahlen von erfolgreichen IVF-Behandlungen und die Einschränkungen der PID auf sich zu beziehen. Kinderwunsch-Paare müssen von fachärztlich-genetischer Seite adäquate Informationen erhalten und es muss verständlich dargestellt werden, dass ein Ausschluss einer spezifischen monogenen Erkrankung oder einer Chromosomenfehlverteilung bei einer Polkörper- oder Präimplantationsdiagnostik nicht gleichbedeutend mit der Geburt eines gesunden Kindes ist. Dennoch sollte das etablierte und hier vorgestellte Protokoll in

diesem viel diskutierten und hochrelevanten medizinischen Bereich eine Hilfestellung bieten können.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Diedrich K, Ludwig M, Griesinger G. Hrsg. Reproduktionsmedizin. Historischer Abriss zur Reproduktionsmedizin. Berlin: Springer; 2013.
2. Brinsden PR. Thirty years of IVF: the legacy of Patrick Steptoe and Robert Edwards. *Hum Fertil (Camb)*. 2009;12:137–43.
3. Kirby T. Robert Edwards: Nobel Prize for father of in-vitro fertilisation. *The Lancet*. 2010;376:1293.
4. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the preimplantation of an human embryo. *The Lancet*. 1978;312:366.
5. van Steirteghem A. Celebrating ICSI's twentieth anniversary and the birth of more than 2.5 million children--the 'how, why, when and where'. *Hum. Reprod*. 2012;27:1–2.
6. Palermo G. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet*. 1992;340:17–8.
7. Diedrich K, Banz-Jansen C, Ludwig AK. Schwangerschaftsrisiken und Outcome der Kinder nach ART. *J. Reproduktionsmed. Endokrinol*. 2011;8,108-111
8. Breckwoldt M, Kaufmann M, Pfeleiderer A. Hrsg. Gynäkologie und Geburtshilfe: 5.Aufl. Störungen der Fruchtbarkeit. Stuttgart u.a.: Thieme; 2008.
9. Stauber M, Weyerstahl T. Hrsg. Gynäkologie und Geburtshilfe: 3. Aufl. Sterilität und Infertilität. Stuttgart: Thieme; 2007.
10. Griesinger G, Dafopoulos K, Schultze-Mosgau A, Felberbaum R, Diedrich K. What is the most relevant standard of success in assisted reproduction? Is BESST (birth emphasizing a successful singleton at term) truly the best? *Hum. Reprod*. 2004;19:1239–41.
11. Kern R. Gesundheit Österreich GmbH. IVF-Jahresbericht 2014.
12. Österreichische IVF Gesellschaft: Medizinisch-Wissenschaftliche Informationen. <http://www.ivf-gesellschaft.at/index.php?id=31>. Accessed 16 Aug 2015.
13. RIS - Gesamte Rechtsvorschrift für Fortpflanzungsmedizingesetz - Bundesrecht konsolidiert, Fassung vom 17.08.2015. <https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=10003046>. Accessed 17 Aug 2015.

14. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*. 1990;344:768–70.
15. Cohen J, Wells D, Munné S. Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates. *Fertil. Steril*. 2007;87:496–503.
16. Goossens V, Rycke M de, Vos A de, Staessen C, Michiels A, Verpoest W, et al. Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Hum. Reprod*. 2008;23:481–92.
17. Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med*. 2007;357:9–17.
18. Veiga A, Sandalinas M, Benkhalifa M, Boada M, Carrera M, Santaló J, et al. Laser blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis in the human. *Zygote*. 1997;5.
19. McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, de Boer, Kylie A, Jansen, Robert P S. Pregnancies and live births after trophoctoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertil. Steril*. 2005;84:1628–36. d
20. Montag M, Toth B, Strowitzki T. Polkörper- und Präimplantationsdiagnostik. p. 269–86.
21. Cahill DJ, Wardle PG, Harlow CR, Hull M. Onset of the preovulatory luteinizing hormone surge: diurnal timing and critical follicular prerequisites. *Fertil. Steril*. 1998;70:56–9.
22. Kuliev A, Rechitsky S. Polar body-based preimplantation genetic diagnosis for Mendelian disorders. *Molecular Human Reproduction*. 2011;17:275–85.
23. Montag M, Köster M, Strowitzki T, Toth B. Polar body biopsy. *Fertil. Steril*. 2013;100:603–7.
24. Dailey T, Dale B, Cohen J, Munné S. Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes. *American Journal of Human Genetics*. 1996;59:176–84.
25. Nicolaidis P, Petersen MB. Origin and mechanisms of non-disjunction In human autosomal trisomies. *Human reproduction*. 1998;13:313–9.
26. Hassold T, Hall H, Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum. Mol. Genet*. 2007;16 Spec No. 2:R203-8.

27. Hodes-Wertz B, Grifo J, Ghadir S, Kaplan B, Laskin CA, Glassner M, et al. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. *Fertil. Steril.* 2012;98:675–80.
28. van der Ven, Katrin, Montag M, van der Ven, Hans. Polar body diagnosis - a step in the right direction? *Dtsch Arztebl Int.* 2008;105:190–6.
29. Geraedts J, Collins J, Gianaroli L, Goossens V, Handyside A, Harper J, et al. What next for preimplantation genetic screening? A polar body approach! *Hum. Reprod.* 2010;25:575–7.
30. Feichtinger M, Stopp T, Göbl C, Feichtinger E, Vaccari E, Mädler U, et al. Increasing live birth rate by preimplantation genetic screening of pooled polar bodies using array comparative genomic hybridization. *PLOS ONE.* 2015;10:e0128317.
31. Montag M, Toth B, Strowitzki T. Präimplantationsdiagnostik - PID: Präimplantative genetische Diagnostik (PGD) und präimplantatives genetisches Screening (PGS). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2013;56:1670–8.
32. Baart EB, Martini E, van den Berg, I, Macklon NS, Galjaard RH, Fauser, B C J M, et al. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum. Reprod.* 2006;21:223–33.
33. Rabinowitz M, Ryan A, Gemelos G, Hill M, Baner J, Cinnioglu C, et al. Origins and rates of aneuploidy in human blastomeres. *Fertil. Steril.* 2012;97:395–401.
34. Harton GL, Magli MC, Lundin K, Montag M, Lemmen J, Harper JC. ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group--best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Hum. Reprod.* 2011;26:41–6.
35. Stern HJ. Preimplantation Genetic Diagnosis: Prenatal Testing for Embryos Finally Achieving Its Potential. *J Clin Med.* 2014;3:280–309.
36. Rechitsky S. Reliability of preimplantation diagnosis for single gene disorders. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2001;183:S65–S68.
37. Van der Aa, Niels, Zamani Esteki M, Vermeesch JR, Voet T. Preimplantation genetic diagnosis guided by single-cell genomics. *Genome Med.* 2013;5:71.
38. Handyside AH. PGD and aneuploidy screening for 24 chromosomes by genome-wide SNP analysis: seeing the wood and the trees. *Reprod. Biomed. Online.* 2011;23:686–91.

39. Natesan SA, Bladon AJ, Coskun S, Qubbaj W, Prates R, Munne S, et al. Genome-wide karyomapping accurately identifies the inheritance of single-gene defects in human preimplantation embryos in vitro. *Genet Med*. 2014;16:838–45.
40. Konstantinidis M, Prates R, Goodall N, Fischer J, Tecson V, Lemma T, et al. Live births following Karyomapping of human blastocysts: experience from clinical application of the method. *Reprod. Biomed. Online*. 2015.
41. Treff NR, Forman EJ, Scott RT. Next-generation sequencing for preimplantation genetic diagnosis. *Fertil. Steril*. 2013;99:e17-8. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.02.034.
42. Chow JF, Yeung WS, Lee VC, Lau EY, Ho PC, Ng EH. Experience of more than 100 preimplantation genetic diagnosis cycles for monogenetic diseases using whole genome amplification and linkage analysis in a single centre. *Hong Kong Med J*. 2015;21:299–303.
43. Tan Y, Yin X, Zhang S, Jiang H, Tan K, Li J, et al. Clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis and screening using next generation sequencing. *Gigascience*. 2014;3:30.
44. Caldovic L, Abdikarim I, Narain S, Tuchman M, Morizono H. Genotype-Phenotype Correlations in Ornithine Transcarbamylase Deficiency: A Mutation Update. *J Genet Genomics*. 2015;42:181–94.
45. Hoffmann GF, Lentze MJ, Spranger P, Zepp F, Hrsg. *Pädiatrie: Grundlagen und Praxis*. 4. Aufl. 2014. Berlin: Springer Berlin; 2014.
46. Pan X, Urban AE, Palejev D, Schulz V, Grubert F, Hu Y, et al. A procedure for highly specific, sensitive, and unbiased whole-genome amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008;105:15499–504.
47. van Beers, E H, Joosse SA, Ligtenberg MJ, Fles R, Hogervorst, F B L, Verhoef S, et al. A multiplex PCR predictor for aCGH success of FFPE samples. *Br. J. Cancer*. 2006;94:333–7.
48. Vrettou C, Traeger-Synodinos J, Tzetis M, Palmer G, Sofocleous C, Kanavakis E. Real-time PCR for single-cell genotyping in sickle cell and thalassemia syndromes as a rapid, accurate, reliable, and widely applicable protocol for preimplantation genetic diagnosis. *Hum. Mutat*. 2004;23:513–21.
49. Montag M, van der Ven, K, van der Ven H. From the oocyte to the blastocyst. *Andrologia*. 2003;35:174–5.
50. Montag M, van der Ven H, German Pronuclear Morphology Study Group. Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo culture

- and transfer: results of a prospective multicentre study. *Human reproduction*;2001:2384–9.
51. Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM. Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum. Reprod.* 1990;5:826–9.
  52. Harper JC, Harton G. The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening; 2010.
  53. Magli MC, Montag M, Köster M, Muzi L, Geraedts J, Collins J, et al. Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part II: technical aspects. *Hum. Reprod.* 2011;26:3181–5.
  54. Geigl JB, Obenauf AC, Waldispuehl-Geigl J, Hoffmann EM, Auer M, Hörmann M, et al. Identification of small gains and losses in single cells after whole genome amplification on tiling oligo arrays. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:e105.
  55. Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S, Biricik A, Kokkali G, Rienzi L, et al. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. *Hum. Reprod.* 2011;26:1925–35.
  56. Waldispuehl-Geigl J. Hochauflösende Polkörperanalyse [Dissertation]. Institut für Humangenetik. Medizinische Universität Graz; 2011
  57. Fiegler H, Geigl JB, Langer S, Rigler D, Porter K, Unger K, et al. High resolution array-CGH analysis of single cells. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:e15.
  58. Geigl JB, Obenauf AC, Waldispuehl-Geigl J, Hoffmann EM, Auer M, Hörmann M, et al. Identification of small gains and losses in single cells after whole genome amplification on tiling oligo arrays. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:e105.
  59. Rycke M de, Belva F, Goossens V, Moutou C, SenGupta SB, Traeger-Synodinos J, et al. ESHRE PGD Consortium data collection XIII: cycles from January to December 2010 with pregnancy follow-up to October 2011†. *Hum. Reprod.* 2015;30:1763–89.
  60. Harper JC, Wilton L, Traeger-Synodinos J, Goossens V, Moutou C, SenGupta SB, et al. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. *Hum. Reprod. Update.* 2012;18:234–47.
  61. Goossens V, Traeger-Synodinos J, Coonen E, Rycke M de, Moutou C, Pehlivan T, et al. ESHRE PGD Consortium data collection XI: cycles from January to December 2008 with pregnancy follow-up to October 2009. *Hum. Reprod.* 2012;27:1887–911.
  62. Moutou C, Goossens V, Coonen E, Rycke M de, Kokkali G, Renwick P, et al. ESHRE PGD Consortium data collection XII: cycles from January to December 2009 with pregnancy follow-up to October 2010. *Hum. Reprod.* 2014;29:880–903.

63. de Die-Smulders, C E M, de Wert, G M W R, Liebaers I, Tibben A, Evers-Kiebooms G. Reproductive options for prospective parents in families with Huntington's disease: clinical, psychological and ethical reflections. *Hum. Reprod. Update.* 2013;19:304–15.
64. Peters BA, Kermani BG, Alferov O, Agarwal MR, McElwain MA, Gulbahce N, et al. Detection and phasing of single base de novo mutations in biopsies from human in vitro fertilized embryos by advanced whole-genome sequencing. *Genome Res.* 2015;25:426–34.
65. Mertes F, Elsharawy A, Sauer S, van Helvoort, Joop M L M, van der Zaag, P J, Franke A, et al. Targeted enrichment of genomic DNA regions for next-generation sequencing. *Brief Funct Genomics.* 2011;10:374–86.
66. Lu S, Zong C, Fan W, Yang M, Li J, Chapman AR, et al. Probing meiotic recombination and aneuploidy of single sperm cells by whole-genome sequencing. *Science.* 2012;338:1627–30.
67. Kohane IS, Hsing M, Kong SW. Taxonomizing, sizing, and overcoming the incidentalome. *Genet Med.* 2012;14:399–404.
68. Lyssenko V, Jonsson A, Almgren P, Pulizzi N, Isomaa B, Tuomi T, et al. Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008;359:2220–32.
69. Brezina PR, Benner A, Rechitsky S, Kuliev A, Pomerantseva E, Pauling D, et al. Single-gene testing combined with single nucleotide polymorphism microarray preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy: a novel approach in optimizing pregnancy outcome. *Fertil. Steril.* 2011;95:1786.e5-8.
70. Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN, Helgason A, Rafnar T, Magnusson KP, et al. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nat Genet.* 2007;39:1443–52.