



Medizinische Fakultät  
der  
Technischen Universität München

**Etablierung und Validierung eines familienspezifischen Testsystems für  
direkten und indirekten Gentest bei Präimplantationsdiagnostik (PID)**

Beray Kazak

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfende/-r der Dissertation: Priv.-Doz. Dr. Arne Pfeufer  
Prof. Dr. Julia Höfele

Die Dissertation wurde am 21.04.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.04.2021 angenommen.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>8</b>
<b>4</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>9</b>
4.1	<b>Präimplantationsdiagnostik (PID)</b>	<b>9</b>
4.1.1	Historischer Rückblick	9
4.1.2	Gesetzliche Regelung in Deutschland	10
4.1.3	Überblick internationale Regelung	11
4.1.4	Biologische Grundlagen	13
4.2	<b>Osteogenesis imperfecta</b>	<b>18</b>
4.3	<b>Ziel dieser Arbeit</b>	<b>19</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>20</b>
5.1	<b>Material</b>	<b>20</b>
5.1.1	Gewebeproben	20
5.1.2	Kontrollproben	20
5.1.3	Marker und zugehörige Primer	20
5.1.4	Reagenzien	23
5.1.5	Puffer, Lösungen und Mixe	24
5.1.6	Geräte und Software	26
5.2	<b>Methoden</b>	<b>27</b>
5.2.1	Familienstammbaum	27
5.2.2	Molekularbiologische Methoden	28
5.2.3	Direkter Gentest	34
5.2.4	Indirekter Gentest	43
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>49</b>
6.1	<b>Ergebnisse der Etablierung</b>	<b>49</b>
6.1.1	Direkter Gentest mit Minisequenzierung	49
6.1.2	Direkter Gentest mit Sanger-Sequenzierung	50
6.1.3	Indirekter Gentest mit Mikrosatelliten-Analyse	50
6.2	<b>Ergebnisse der Validierung</b>	<b>55</b>
6.2.1	Direkter Gentest mit Sanger-Sequenzierung	55

6.2.2	Indirekter Gentest mit Mikrosatelliten-Analyse.....	56
<b>7</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>58</b>
7.1	Erfolgreiche Anwendung des Testsystems .....	58
7.2	Technische Grenzen des Testsystems.....	60
7.2.1	Allele-Drop-Out in MDA oder PCR .....	60
7.2.2	Rekombination zwischen Markern.....	61
7.2.3	Nicht-informative Marker oder Mangel an Markern.....	61
7.2.4	Primer-Dimere.....	62
7.2.5	<i>De novo</i> -Sequenzvarianten.....	63
7.2.6	Minisequenzierung .....	63
7.3	Vom indirekten Gentest zum Karyomapping .....	63
7.4	Weitere Biopsie-Methoden in der PID und deren Aussagekraft über den genetischen Status des Embryo.....	65
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>67</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>74</b>
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	74
9.2	Tabellenverzeichnis .....	76
9.3	Danksagung .....	77

# 1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

17q21.32	Chromosom 17, Arm q, Stelle 21.32
A	Adenin (Base) bzw. Adenosin (Nukleosid = Base plus Pentose)
Abb.	Abbildung
ad.	addiere, z.B. ad. 1000 mL, bis auf 1000 mL Flüssigkeit auffüllen
ADO	Allele-Drop-Out (dt. Detektionsausfall eines Allels)
a. dest	aqua dest (destilliertes Wasser)
ASRM	American Society for Reproductive Medicine
ÄZM	Äußere Zellmasse (vgl. Trophektoderm)
BB	Blastomerbiopsie
BGH	Bundesgerichtshof
bp	Basenpaare (Nukleinsäuresequenzmaß)
BRD	Bundesrepublik Deutschland
BVerfG	Bundesverfassungsgericht
C	Cytosin (Base) bzw. Cytidin (Nukleosid)
c.2700delT	Benennung von DNA-Sequenzvarianten und Mutationen: „c“ für kodierende DNA, hier: Deletion der Base Thymin an der Position 2700 des Gens z.B. <i>COL1A1</i>
CE	Capillary Electrophoresis (dt. Kapillarelektrophorese)
CNV	copy number variation
<i>COL1A1</i>	Name eines Gens
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTPs	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
DNA	Desoxyribonucleic acid (dt. Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamin(o)tetraacetat
ESchG	Embryonenschutzgesetz
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embryology
<i>et al.</i>	<i>et alii/aliae/alia</i> (und andere)
F-Primer	„Forward-Primer“
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridization
g	Gramm
G	Guanin (Base) bzw. Guanosin (Nukleosid)

GenDG	Gesetz zur Regelung der Gendiagnostik
HCl	Salzsäure (Chlorwasserstoff)
het	heterozygot
hom	homozygot
ICSI	intracytoplasmatic sperm injection (dt. Intrazytoplasmatische Spermieninjektion)
IP	Indexpatient
IVF	<i>In-vitro</i> Fertilisation
IZM	Innere Zellmasse (vgl. Embryoblast)
JOE	2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein
kg	Kilogramm
L	Liter
mA	Milliampere (Maßeinheit der elektrischen Stromstärke)
Mb	Mega-Basenpaare (Nukleinsäuresequenzmaß)
MDA	Multiple Displacement Amplification
mg	Milligramm
Mg(2+)	Magnesium(2+)-Ion
Mix	Reagenzien-Mischlösung
mL	Milliliter
mM	millimolar (Konzentrationsmaß, mmol/L)
mmol	Millimol (Stoffmengenmaß)
MPS	massive parallel sequencing
MS	Mundschleimhaut
mU	Milliunit (Maßeinheit der Enzymaktivität)
mV	Millivolt (Maßeinheit der elektrischen Spannung)
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	„National Center for Biotechnology Information“
NGS	next generation sequencing
nm	Nanometer
OD260	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260nm
p.Ala901Leufs*207	Benennung von Protein-Sequenzvarianten: „p“ für ein Protein, hier: Aminosäure Alanin an der Position 901 des Proteins wird zu Leucin; Sequenzvariante führt zu einem Frameshift mit Stop-Codon an Position 207
PA	Preferential Amplification (dt. präferierte Amplifikation eines Allels)
PBS	Phosphate buffered saline (dt. Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (dt. Polymerase Kettenreaktion)

PGD	preimplantation genetic diagnosis (dt. Präimplantationsdiagnostik)
PGS	preimplantation genetic screening (dt. Präimplantationsscreening)
PGT-A	preimplantation genetic testing for aneuploidies
PGT-M	preimplantation genetic testing for monogenic diseases
PGT-SR	preimplantation genetic testing for structural rearrangements
pH	<i>Potentia Hydrogenii</i> („Potenz des Wasserstoffs“) – negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PID	Präimplantationsdiagnostik
PIDV	Verordnung zur Regelung der Präimplantationsdiagnostik
PräImpG	Gesetz zur Regelung der Präimplantationsdiagnostik
R-Primer	„Reverse-Primer“
rpm	rounds per minute (dt. Umdrehungen pro Minute)
RR-Mix	Ready-Reaction-Mix
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
seq / Seq	Sequenzierung/Sequenzier
SNP	single nucleotide polymorphism (dt. Einzelnukleotid-Polymorphismus)
STR	short tandem repeats (dt. kurze nacheinander auftretende Wiederholungen der DNA-Sequenz z.B. GTGTGTGTGTGTGTGT)
T	Thymin (Base) bzw. Thymidin (Nukleosid)
TAQ	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	Puffer, der TRIS, Borsäure und EDTA enthält
TE	Trophektoderm
TEB	Trophektodermbiopsie
TE-Puffer	Puffer, der TRIS und EDTA enthält
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
U	Unit (Maßeinheit der Enzymaktivität)
UCSC	University of California, Santa Cruz
UV	ultraviolett
var	Variante
WSZ	Wangenschleimhautzelle/n
WT, wt	Wildtyp
X	„fach“, z.B. 10X TBE-Puffer
µL	Mikroliter
µM	mikromolar (Konzentrationsmaß, µmol/L)
µmol	Mikromol (Stoffmengenmaß)

## 2 ZUSAMMENFASSUNG

Die Präimplantationsdiagnostik (PID) ermöglicht Paaren, in deren Familien eine schwere monogene Erkrankung aufgetreten ist, das Risiko für die Geburt eines Kindes, das von dieser Erkrankung betroffen ist, nahezu vollständig auszuschließen. Osteogenesis imperfecta (OI) Typ I ist eine monogene, autosomal-dominant vererbte Krankheit, die durch eine geringe Knochenmasse und eine erhöhte Anfälligkeit für Knochenfrakturen gekennzeichnet ist. In dieser Dissertation ist der männliche Partner (Indexpatient) in der untersuchten Familie, von OI betroffen. Er und seine Mutter sind heterozygot für eine klinisch relevante Sequenzveränderung im *COL1A1*-Gen. Bei ihm liegt ein überdurchschnittlich schwerer Phänotyp der OI vor. Er hat mit seiner Partnerin den Wunsch auf die Durchführung einer PID geäußert. Die Änderung des Embryonenschutzgesetzes im Jahr 2011 durch Einführung des §3a ermöglichte diese.

Der Schwerpunkt dieser Dissertation war es, zur Durchführung der PID bei diesem Paar ein familienspezifisches Testsystem für Trophektoderm-Biopsate auf der Basis der Qualitätsrichtlinien der Europäischen Gesellschaft für humane Reproduktion und Embryologie (ESHRE) zu erstellen und zu validieren. Zunächst wurde die familiäre genetische Variation aus Leukozyten-DNA des Indexpatienten und seiner Mutter durch Sequenzierung bestätigt und bei den unbetreffenen Familienmitgliedern ausgeschlossen. Anschließend erfolgte die Etablierung des direkten und indirekten Gentests mit einer für Einzelzellen geeigneten Methode. Der direkte Nachweis der krankheitsverursachenden genetischen Variation entspricht dem direkten Gentest, der Nachweis der mit der krankheitsverursachenden genetischen Variation auf demselben Haplotyp kosegregierenden Marker entspricht dem indirekten Gentest. Dieser Nachweis flankierender gekoppelter Marker zusätzlich zu der Krankheitsvariante dient dazu, beim methodisch anspruchsvollen Gentest aus Einzelzellen die Risiken sowohl eines Allel-Drop-Out als auch einer Kontamination zu minimieren. Der Nachweis der gesuchten klinisch relevanten Variation durch Sequenzierung und die Genotypisierung sechs gekoppelter Marker im Multiplex-PCR-Ansatz aus MDA-amplifizierter DNA von Wangenschleimhautzellen des Indexpatienten entsprach der Validierung auf Einzelzell-Ebene.

Das Ergebnis dieser Arbeit diente dem anschließenden Einsatz der PID bei nachfolgend gewonnenen Trophektoderm-Biopsaten aus 10 Blastozysten mit dem Ziel eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Geburt eines Kindes zu erreichen, das nicht von Osteogenesis imperfecta betroffen ist.

### 3 ABSTRACT

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) enables couples, whose families are affected by a monogenic disease, to almost exclude the probability of birth of an affected child. Osteogenesis imperfecta (OI) type I is a monogenic, autosomal dominant disease characterized by deficient bone mass resulting in susceptibility to bone fractures. Pathogenic variations in *COL1A1* gene result in OI type I.

In this thesis the male patient (indexpatient) is affected by a severe phenotype of OI type I. He and his mother carry a heterozygous pathogenic variation in *COL1A1*. He and his female partner requested a PGD-procedure. In 2011 paragraph §3a was implemented in the embryonic protection law that enabled PGD in Germany.

The objective of this thesis was to establish and validate a PGD assay compatible with the ESHRE guidelines (European Society for Human Reproduction and Embryology) for this specific couple. At first the familial pathogenic variation in *COL1A1* from leukocyte DNA was verified by sequencing the affected persons and ruled out in the non-affected family members. Subsequently a direct and indirect genetic test was established for single-cells. The direct genetic test confirms the pathogenic variation by sequencing. The indirect genetic test consists of the analysis of markers closely linked to the pathogenic variation on the same haplotype.

The detection of linked markers in addition to the pathogenic variation itself serves as a risk-minimization of ADO (allele drop-out) and contamination. The proof of pathogenic variation in the *COL1A1* gene by sequencing and six linked STR markers genotyped through Multiplex-PCR in the MDA-amplified DNA from buccal cells of the male patient corresponds to the analysis of trophoctoderm cells and therefore validates the PGD assay.

The results of this thesis enabled the use of PGD on trophoctoderm biopsies from ten blastocysts with the aim of reaching a high probability for the birth of a child not affected by Osteogenesis imperfecta.

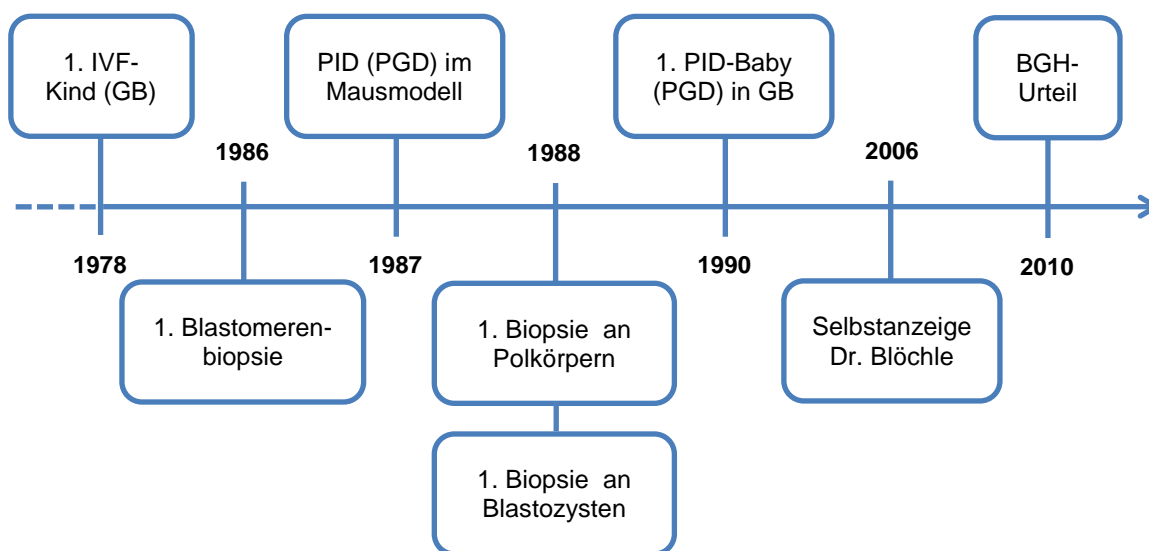


## 4 EINLEITUNG

### 4.1 Präimplantationsdiagnostik (PID)

#### 4.1.1 Historischer Rückblick

Eine neue Ära begann in der Reproduktionsmedizin als Louise Brown, das erste IVF-Kind (In-vitro Fertilisation), in England 1978 auf die Welt kam (Stephoe & Edwards, 1978). Von da an wurden zahlreiche Methoden in der Reproduktionsmedizin entwickelt (Franasiak & Scott, 2008) - (siehe auch Abbildung 1), die Kinderwunscha Paaren mit unterschiedlichen Zeugungsschwierigkeiten oder durch eine erbliche Störung belastet „gesunden“ Nachwuchs ermöglichen. Die Präimplantationsdiagnostik (PID, engl. Preimplantation genetic diagnosis – PGD) mit ihren verschiedenen Ansätzen ist eine dieser Möglichkeiten. Das erste Mal wurde 1990 von ihrer erfolgreichen Anwendung bei Menschen berichtet Handyside et al. (1990).



**Abbildung 1:** Wegemarken in der PID (PGD)-Historie

Fortan wurde die PID weltweit eingesetzt - so auch in Deutschland ohne dass eine klare gesetzliche Regelung hierzu vorlag. Bis der Berliner Reproduktionsmediziner Dr. Matthias Bloechle nach Durchführung einer PID (2005) ein Rechtsgutachten von der „auf das Embryonenschutzgesetz und seine Auslegung spezialisierten Hochschullehrerin“ Prof. Dr. Monika Frommel einholte. Aus diesem Gutachten ging für ihn kein Strafbarkeitsrisiko nach §§2 und 6 des bis dato bestehenden Embryonenschutzgesetzes (ESchG) hervor. Er führte in den Jahren 2005 und 2006 weitere PID-Verfahren durch.

Auf Anraten der Hochschullehrerin erstattete der Arzt jedoch Selbstanzeige bei der Staatsanwaltschaft Berlin Anfang 2006. Damit wollte er Klarheit über die deutsche Gesetzlage gewinnen und Rechtssicherheit sowohl für betroffene Paare, als auch für beteiligte Ärzte wie ihn herstellen. Es folgten ein vorläufiges Gerichtsurteil und weitere Verhandlungen bis die ganze Angelegenheit zum Bundesgerichtshof (BGH) getragen wurde. Der BGH fällte daraufhin im Sommer 2010 eine Entscheidung (BGH-Urteil vom 06. Juli 2010 – 5 StR 386/09). Dessen Urteil bestätigte, dass die PID mit der Untersuchung von Embryonen auf schwerwiegende genetische Erkrankungen nicht im Widerspruch zum Embryonenschutzgesetz steht und daraus kein Verbot abgeleitet werden kann. Insbesondere stellte der BGH fest, dass es ein Widerspruch an sich wäre, wenn ein belastender Schwangerschaftsabbruch nach §218a Abs. 2 StGB nicht untersagt wird, aber eine PID, die im Endeffekt unter weniger belastenden Umständen dasselbe Ziel verfolgt, bestraft werden soll. Das BGH-Urteil zwang letztendlich den deutschen Rechtsstaat nach langjährigen kontroversen Diskussionen, sich mit der Thematik endgültig auseinanderzusetzen und die PID gesetzlich zu regeln.

#### **4.1.2 Gesetzliche Regelung in Deutschland**

Dem Bundestag wurden infolge des BGH-Urteils Gesetzentwürfe vorgetragen. Der Entwurf von Flach et al (2011) wurde mit einigen Änderungen angenommen.

Die PID ist in Deutschland geregelt durch:

1. PräimpG = Änderung des ESchG durch Hinzufügung des §3a ESchG
2. Bundesweite PIDV (Präimplantationsdiagnostikverordnung)
3. Weitere Bestimmungen auf Länderebene

Das Embryonenschutzgesetz wurde um den §3a Ende 2011 erweitert, welcher die PID in Deutschland im Präimplantationsdiagnostikgesetz (PräimpG) regeln soll. Nach Inkrafttreten der Rechtsverordnung zur Regelung der PID (PIDV - Präimplantationsdiagnostikverordnung) am 01. Februar 2014 ist sie unter bestimmten Voraussetzungen und nach Einhaltung bestimmter Vorgaben zugelassen.

Zuerst muss jeder einzelne Fall schriftlich an die zuständige Ethikkommission vorgetragen und von dieser geprüft werden. Antragsberechtigt ist nur die Frau, von der die Eizelle stammt (§5 Abs. 1 PIDV). Dem Antrag muss jedoch immer eine ausführliche humangenetische, reproduktionsmedizinische und psychosoziale Aufklärung und Beratung vorausgehen (§3a Abs. 3 S. 1 ESchG). Bis Juli 2015 wurden insgesamt fünf interdisziplinär zusammengesetzte Ethikkommissionen in Deutschland für die PID eingerichtet – in Bayern März 2015 (Cullen, 2018). Nur nach deren Zustimmung darf eine PID an bestimmten lizenzierten Zentren durchgeführt werden (§3a Abs. 3 S. 2, 3

ESchG). Akzeptiert werden Fälle, in denen ein oder beide Partner eine Veranlagung für eine schwerwiegende monogene Erkrankung – nachgewiesen durch einen entsprechenden humangenetischen Befund – tragen und an deren Nachkommen weitergeben würden oder in Fällen, in denen eine Fehl- bzw. Totgeburt droht (§3a Abs. 2 ESchG). Da die Schwere einer monogenen Erkrankung kaum zu definieren ist, stellt sich die Frage: „Wann besteht eine Rechtfertigung für PID und wann nicht?“. Die gesetzliche Regelung vermeidet es bewusst, eine verbindliche Liste für PID-Indikationen (i.e. humangenetische Erkrankungen) zu formulieren. Somit soll jeder Fall weiterhin individuell durch die zuständigen Ethikkommissionen entschieden werden. Die Kosten müssen vom Kinderwunschpaar selbst getragen werden.

Nach deutscher Rechtsprechung ist eine PID nur an pluripotenten Trophektodermzellen erlaubt, da diese Zellen über keine Totipotenz mehr verfügen. Das bedeutet, dass sich diese Zellen zwar noch zu verschiedenen Gewebearten entwickeln können, jedoch nicht mehr zu einem vollständigen Individuum (§2 S. 3 PIDV). Sie nehmen z. B. an der Plazenta-Bildung teil und werden aus der äußeren Zellmasse (ÄZM, sog. Trophoblast) einer Blastozyste am Tag 5 nach Befruchtung entnommen. Demgegenüber können totipotente Zellen potentiell zu einem Embryo heranwachsen und stammen aus dem 6-8-Zell-Embryo (Blastomerbiopsie) ca. 3 Tage nach Befruchtung (§8 Abs. 1 ESchG; siehe Abbildung 2).

#### **4.1.3 Überblick internationale Regelung**

Weltweit sind die rechtlichen Regelungen und Bestimmungen für eine PID sehr heterogen. Von liberalen Bestimmungen über Listen zugelassener Indikationen reichen die Regelungen bis zu strikten Verboten der PID. Einen Überblick der gesetzlichen Regelungen und die Zulassung spezifischer Indikationen in ausgewählten Ländern wird in Tabelle 1 (Geffroy & Zerres, 2016) gegeben.

Großbritannien war das erste europäische Land, das über rechtliche Regulierungen zur PID (Human Fertilisation and Embryology Act) verfügte (1990). Viele europäische Länder folgten. In den USA beispielsweise gibt es bis heute keine Gesetze auf Bundesstaaten-Ebene zur Regelung der PID – Indikationsstellung und Durchführung der PID erfolgt unter der Selbstverantwortung der behandelnden Ärzte (Hennen & Sauter, 2004). Italien ist das einzige Land in Europa, das nach Inkrafttreten des Fortpflanzungsgesetzes 2003 ein generelles Verbot für die Durchführung einer PID ausgesprochen hat – dies gilt jedoch nur für den Sektor der öffentlichen Kliniken.

Anders als in Deutschland ist die Blastomer-Diagnostik (totipotente Zellen entnommen am Tag 3 nach der Befruchtung) z. B. in Ländern wie Großbritannien und Niederlande erlaubt und wird auch weltweit noch am häufigsten durchgeführt (Wegner, 2016).

**Tabelle 1:** Internationale PID-Regelung – ein Ländervergleich modifiziert nach (Geffroy et al., 2016)

Land	Zulassung	seit	monogene Erkrankung	Aneuploidie-screening	HLA-Typisierung
<b>Länder mit Verbot</b>					
Italien	Nein	2003	-	-	-
<b>Länder ohne gesetzliche Regelung/Zulassung</b>					
China	fehlt	-	Ja	Ja	Ja
Irland	fehlt	-	-	-	-
Luxemburg	fehlt	-	-	-	-
USA	fehlt	-	Ja	Ja	Ja
<b>Länder mit gesetzlicher Regelung/Zulassung</b>					
Australien/Vic.	Ja	2008	Ja	Ja	Ja
Belgien	Ja	1993	Ja	Ja	Ja
Dänemark	Ja	1997	Ja	Ja	Ja
Deutschland	Ja	2014	Ja	Ja	Nein
Frankreich	Ja	1994	Ja	Nein	Ja
Griechenland	Ja	2005	Ja	Ja	Ja
Großbritannien	Ja	1990	Ja	Ja	Ja
Niederlande	Ja	1995	Ja	Ja	Nein
Norwegen	Ja	2004	Ja	-	Ja
Österreich	Ja	2015	Nein	Ja	Nein
Portugal	Ja	2006	Ja	Ja	Ja
Schweden	Ja	1995	Ja	-	Ja
Schweiz	Ja	2016	Ja	Ja	-
Spanien	Ja	2006	Ja	-	Ja
Tschechien	Ja	2006	Ja	Ja	Ja
Türkei	Ja	2003	Ja	Ja	-

“ - “ = wird nicht durchgeführt / keine expliziten Angaben dazu

#### 4.1.4 Biologische Grundlagen

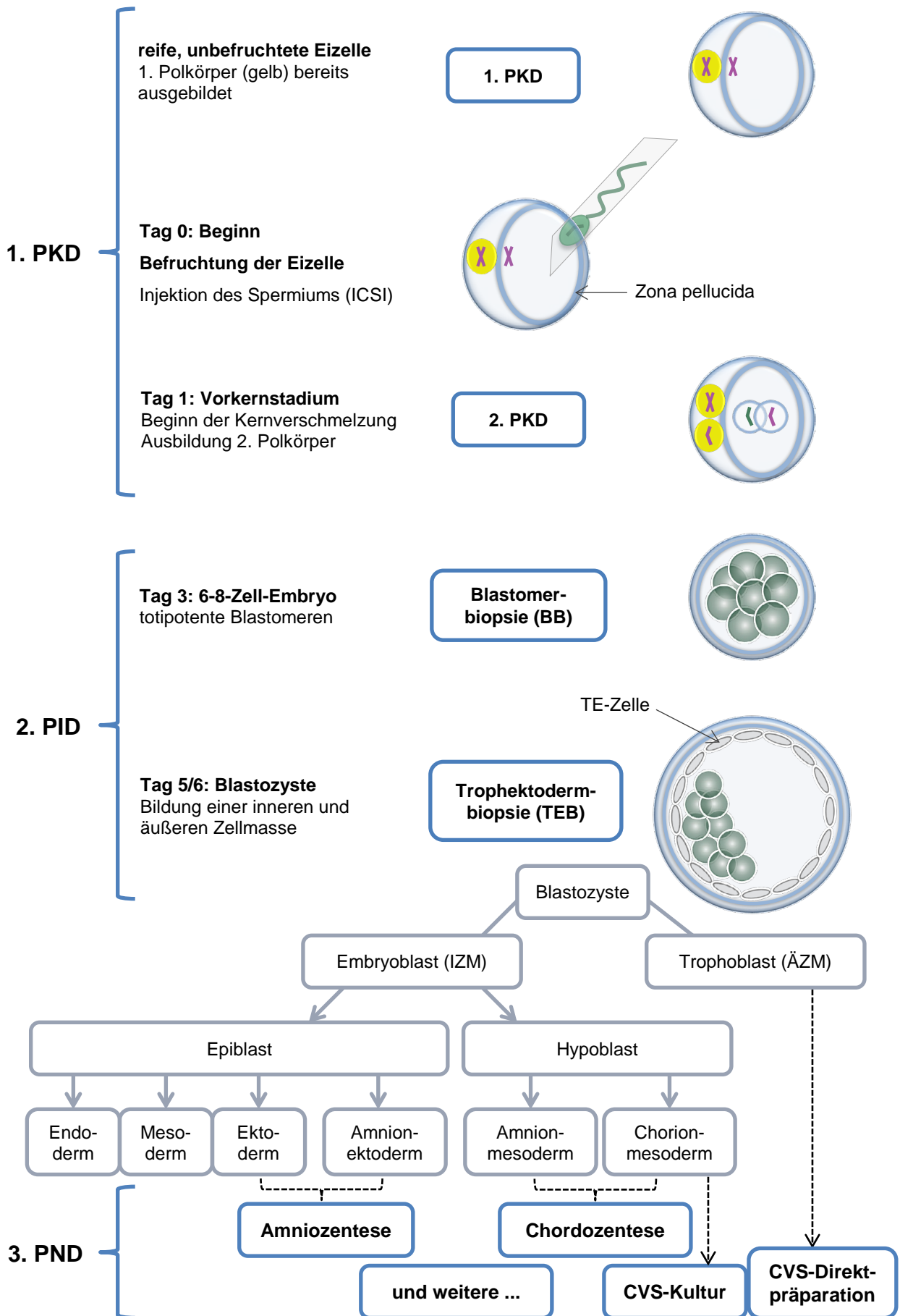
Es bestehen zahlreiche Diagnostikmöglichkeiten in den verschiedenen Stadien der Embryonalentwicklung für Erkrankungen monogenen wie auch chromosomalen Ursprungs, die sich grob in drei Gruppen aufteilen lassen (siehe hierzu Abbildung 2):

1. Polkörperdiagnostik (PKD) am 1. und 2. Polkörper
2. Präimplantationsdiagnostik (PID)
  - a. Blastomer-Biopsie (BB)
  - b. Trophektoderm-Biopsie (TEB)
3. Pränataldiagnostik (PND)
  - a. invasiv
    - i. Amniozentese (AC, Fruchtwasseruntersuchung)
    - ii. Chorionzottenbiopsie (CVS; Direktpräparation oder Kultur)
    - iii. Chordozentese (Nabelschnurblutuntersuchung)
  - b. nicht-invasiv

Die Polkörperdiagnostik wird auch oft zur Präimplantationsdiagnostik zugeordnet (Verlinsky & Kuliev, 1996). Beide finden vor Eintritt einer Schwangerschaft statt. Die PKD erfordert in Deutschland im Gegensatz zur PID keine Zustimmung der Ethikkommission. Um dem ESchG jedoch gerecht zu werden, muss die Diagnostik an beiden Polkörpern noch vor Verschmelzung des Eizellkerns und des Spermienkerns abgeschlossen sein (§8 Abs. 1 & 2 ESchG), was der vollständigen Befruchtung der Eizelle entspricht und ca. 24 Stunden nach ICSI eintritt. Der erste Polkörper, der nach der ersten meiotischen Teilung entstanden ist, kann bereits von den reifen, unbefruchteten Eizellen gewonnen und auf die gefragte genetische Veränderung untersucht werden. Diese Methode erfordert eine intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI). Hier wird, wie der Name bereits andeutet, ein einzelnes Spermium in das Zytoplasma einer reifen Eizelle injiziert (Joris et al., 1998; Van Steirteghem et al., 1993). Nach der Injektion bildet sich der zweite Polkörper, der gleichermaßen untersucht wird (Verlinsky et al., 1997). Bei der PKD findet lediglich eine Auslese von befruchteten Eizellen statt, bevor man die Entstehung eines Embryos zulässt.

In der Präimplantationsdiagnostik untersucht man eine oder mehrere künstlich erzeugte Embryonen vor (prä) der Einpflanzung (Implantation) in den Uterus auf bestimmte krankheitsrelevante Erbveränderungen (Thornhill et al., 2005).

Die Pränataldiagnostik erfolgt in weit fortgeschrittenen Stadien der Embryonalentwicklung und nach Eintritt einer Schwangerschaft. Sie wird bei betroffenen Kinderwunschaaren, die solch eine Diagnostik in Anspruch nehmen, als „Schwangerschaft auf Probe“ verstanden.



**Abbildung 2:** Entwicklung der Embryonalgewebe, die sich zur PKD, PID und PND eignen

Die PID dient zur Erkennung von monogenen (Einzelgenerkrankung) und/oder zytogenetischen (chromosomale Störung) krankheitsrelevanten Veränderungen in künstlich erzeugten Embryonen vor einer Übertragung in die Gebärmutter. Im deutschsprachigen Raum werden die Begriffe "pathogen" durch "krankheitsassoziiert/krankheitsrelevant" und "Mutation" immer mehr ersetzt durch "genetische Variante/Veränderung klinischer Relevanz". In dieser Arbeit wird vorwiegend die neue Nomenklatur verwendet. Außerdem wird im englischsprachigen Raum die PID begrifflich zusätzlich unterteilt in "PGD" (Preimplantation Genetic Diagnosis) für monogene PIDs und "PGS" (Preimplantation Genetic Screening) für PIDs mit numerischen oder strukturellen Chromosomenaberrationen (Chromosomenanomalien). Diese Nomenklatur wird jedoch immer mehr durch eine Neue abgelöst. "PGD" wird nun zu "PGT-M" (Preimplantation Genetic Testing for Monogenic/single gene defects) und "PGS" wird zu den zwei Gruppen "PGT-A" (Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidies) und "PGT-SR" (Preimplantation Genetic Testing for chromosomal Structural Rearrangements). (Zegers-Hochschild et al., 2017)

Im Falle einer Chromosomenanomalie kann nach dem positiven Ethikvotum mit einer hormonellen Ovar-Stimulierung der Frau begonnen werden. Auf reproduktionsmedizinischer Seite (siehe Abbildung 3, Punkt 3) eines PID-Zentrums wird die Frau nach erfolgreicher Stimulation punktiert, um reife Eizellen zu gewinnen. Die gewonnenen Eizellen werden durch eine intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) in einem Reagenzglas (in vitro) befruchtet und können bis Tag 3 (6-8-Zellstadium) kultiviert werden. In diesem Stadium kann eine Blastomerbiopsie zur Diagnostik entnommen werden. In Deutschland wird bis zum Blastozysten-Stadium (ca. Tag 5/6 nach ICSI) weiterkultiviert. Die Blastozyste setzt sich aus einer inneren (Embryoblast), sowie äußeren (Trophoblast/-ektoderm) Zellmasse und der Blastocoelflüssigkeit im Inneren zusammen. Es werden wenige Trophektodermzellen (= TE-Zellen) entnommen und an das zuständige humangenetische Zentrum für die anschließende PID weitergeleitet (siehe Abbildung 3, Punkt 4). In der Zwischenzeit erfolgt eine Kryokonservierung mittels Vitrifikation der biopsierten Blastozysten (Chang et al., 2013; Harton et al., 2011c). Nur unbetroffene Blastozysten werden nach abgeschlossener PID zum Transfer weiterempfohlen.

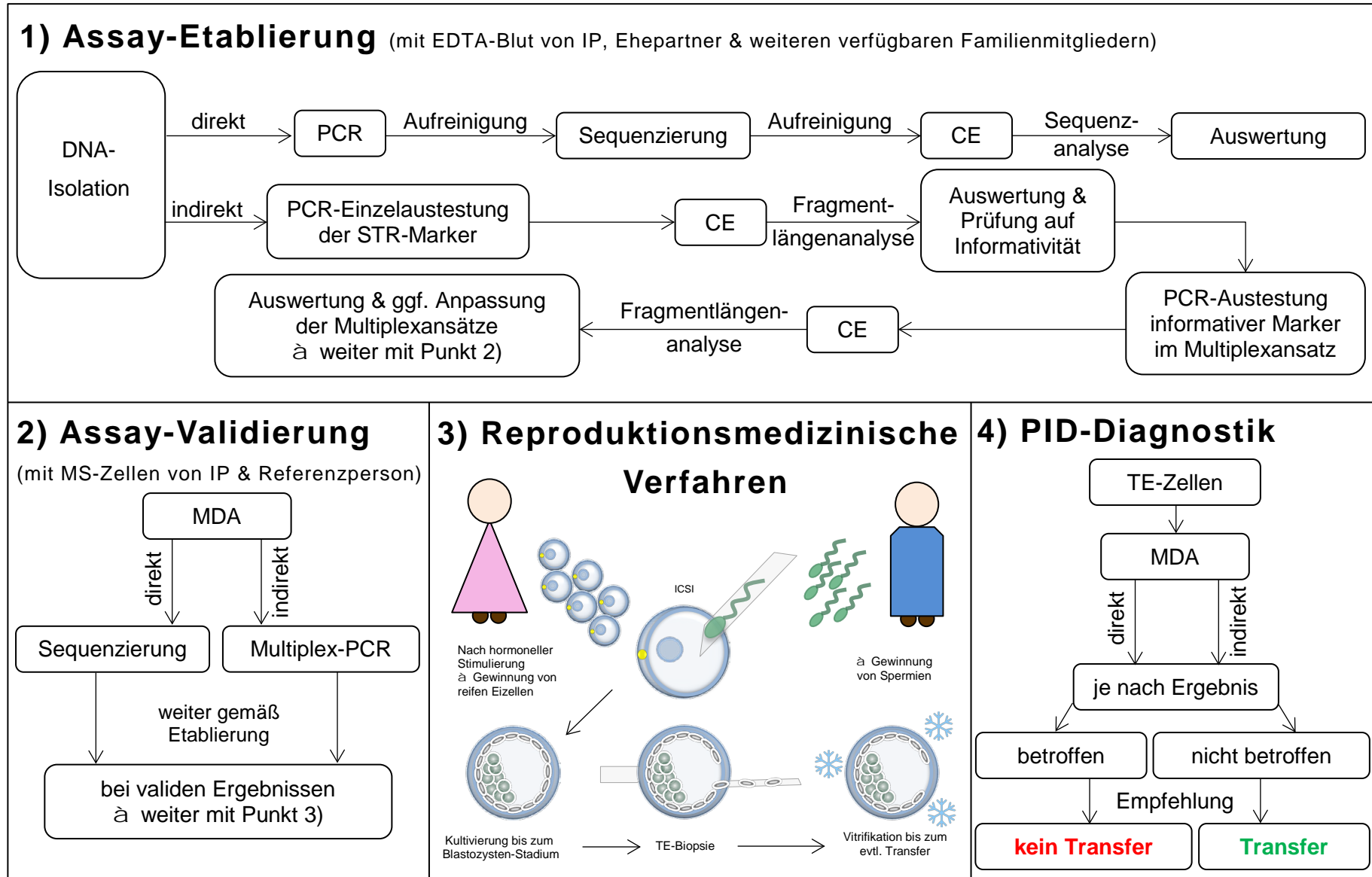
Bei strukturellen oder numerischen Chromosomenstörungen findet in der PID eine Array-CGH (*engl.* microarray-Comparative Genomic Hybridization) (Wells et al., 2008) oder auch immer mehr ein NGS bzw. MPS (*engl.* next generation sequencing bzw. massive parallel sequencing) Anwendung (Hehr et al., 2016). Bei der Array-CGH wird durch ein mikroarray-basiertes Verfahren mithilfe der Hybridisierung die amplifizierte embryonale DNA mit einer Kontroll-DNA verglichen. Beim NGS erfolgt eine quantitative Auswertung

von Kopienzahl-Veränderungen (CNV-Analyse: *engl.* copy number variation) (Geraedts & Sermon, 2016). In der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) binden fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden an Chromosomenabschnitte und machen z.B. dadurch deren Anzahl (Aneuploidie-Diagnostik) sichtbar (Harton et al., 2011b). Die FISH wurde jedoch durch die beiden erstgenannten Verfahren weitgehend abgelöst.

Im Gegensatz zu Chromosomenanomalien muss bei monogenen Erkrankungen noch vor Stimulierung der Frau die Erstellung eines Testsystems, abgestimmt auf die zu untersuchende Familie, und dessen Validierung an Einzelzellen erfolgen (siehe Abbildung 3, Punkt 1 und 2). Die Validierung des Testsystems ist ein wichtiger Schritt, dadurch kann man die Eignung des Testsystems für die Einzelzelldiagnostik gewährleisten. Erst wenn dieses spezifische Testsystem steht – also valide und reproduzierbar ist, kann mit der hormonellen Stimulierung begonnen und mit der eigentlichen PID fortgefahren werden. Bei monogener PID werden zwei Verfahren parallel angewendet, der „direkte“ und der „indirekte“ Gentest. Beim direkten Gentest wird die krankheitsassoziierte, genetische Veränderung selbst nachgewiesen oder ausgeschlossen. Eine Analyse gekoppelter Marker auf Familienebene mit spezifischen Markern (Mikrosatelliten = STR-Marker), die sich im Gen oder in der unmittelbaren Umgebung der Sequenzvariante befinden, stellt den indirekten Gentest dar (J. Dreesen et al., 2014; Harton et al., 2011a). Durch den parallelen Ansatz der beiden Testverfahren möchte man die diagnostische Sicherheit bei einer monogenen PID weitestgehend erhöhen, da verschiedene Fehlerquellen hierbei auftreten können (Harton et al., 2011a). Dazu zählen vor allem das methodisch bedingt, unvermeidbare Allele-Drop-Out (ADO) und dessen weniger ausgeprägte Variante, die Preferential Amplification (PA, *dt.* präferierte Amplifikation) (Wilton et al., 2009).

Jede menschliche Zelle besitzt einen doppelten (diploiden) Chromosomensatz, d.h. jedes der Chromosomen ist in zweifacher Kopie vorhanden – damit liegen alle Erbinformationen in zwei Varianten vor, den so genannten Allelen, von denen Eines von der Mutter und das Andere vom Vater stammt (Ausnahme: Geschlechtschromosomen → hier nur einfacher (haploider) Chromosomensatz). Das ADO stellt eine Sonderherausforderung für die PID dar. Da während der DNA-Vervielfältigung (Amplifizierung) einzelner Zellen die Primer an eins der zwei Allelen weniger gut oder überhaupt nicht binden (siehe Kapitel 5.2.2.3), wird bei der PA ein Allel bevorzugt amplifiziert – beim ADO eine der zwei Allelen gar nicht und somit nicht detektiert. Beide können zu Missinterpretationen in der Analyse führen (Näheres siehe Kapitel 7.2.1).





**Abbildung 3:** Workflow einer monogenen PID (autosomal-dominanter Erbgang) nach positivem Ethikvotum

Abkürzungen: CE (Kapillarelektrophorese), IP (Indexpatient = betroffen), MS (Mundschleimhaut), MDA (Multiple Displacement Amplification), TE (Trophektoderm)

## 4.2 Osteogenesis imperfecta

Die in dieser Arbeit beschriebene Familie ist von der monogenen Erkrankung Osteogenesis imperfecta (OI) vom Typ I betroffen.

Osteogenesis imperfecta bezeichnet eine molekulare und klinisch heterogene Gruppe genetisch bedingter Erkrankungen mit vorwiegend erhöhter Knochenbrüchigkeit. Diese resultiert aus einer herabgesetzten Knochenstabilität infolge einer verminderten Synthese (Osteopenie) oder einer Ansammlung von pathologisch verändertem Kollagen Typ 1, dem Hauptstrukturprotein im Knochengewebe. Im allgemeinen Sprachgebrauch wird die Osteogenesis imperfecta auch „Glasknochenkrankheit“ genannt, da Betroffene schon bei geringen Knochenbelastungen zu Frakturen neigen. Die Frakturen sind sogar intrauterin oder während der Geburt möglich, so können Träger dieser monogenen Erkrankung bereits kleinwüchsig auf die Welt kommen. Im Laufe ihres Lebens können sie auch mehr als hundert Knochenbrüche erleiden mit der Folge von späteren Knochendeformitäten. (Byers & Steiner, 1992; J. Marini & Smith, 2000; Sillence et al., 1979b; Willing et al., 1992)

Aktuell sind sechzehn (I-XVI) verschiedene Formen beschrieben, die sich hinsichtlich Lokus der Genvariante, Erbgang sowie Schwere der Erkrankung unterscheiden (genotypische Heterogenität). (Forlino & Marini, 2016; J. C. Marini et al., 2017)

In ca. 90% aller Fälle wird die Osteogenesis imperfecta autosomal-dominant vererbt. Meist finden sich dominant negative Veränderungen in den Genen *COL1A1* oder *COL1A2*, die jeweils für die Ketten Pro-alpha-1 und Pro-alpha-2 des Kollagen Typ 1-Proteins kodieren. Osteogenesis imperfecta Typ I gehört zu dieser autosomal-dominanten Gruppe und ist meist eine milde bis moderate Form der Erkrankung. (Gajko-Galicka, 2002)

Aufgrund variabler Expressivität kann sich jedoch der Phänotyp zwischen zwei Individuen (intra-/inter-familiär) mit der gleichen Genvariante sehr unterschiedlich ausprägen (phänotypische Variabilität). Dies bedeutet, dass bei zwei Familienmitgliedern, der Eine gar nicht oder nur mild betroffen ist und beim Anderen die klinische Symptomatik der monogenen Erkrankung viel schwerer wiegt – obwohl beide exakt dieselbe Genvariante tragen. (Lobo, 2008; Sillence et al., 1979a)

Dieses Phänomen trifft auf die hier zu untersuchende Familie zu, bei der die Mutter des Indexpatienten keine auffällige Symptomatik hat, ihr Sohn (Indexpatient) jedoch schwer betroffen ist.

### **4.3 Ziel dieser Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war es, ein Testsystem zu etablieren, das spezifisch für eine Familie mit der monogenen Erkrankung Osteogenesis imperfecta Typ I bei Präimplantationsdiagnostik (PID) eingesetzt werden kann. Anschließend sollte das Testsystem auf Einzelzellebene validiert werden. Die PID soll dieser Familie die Geburt eines Kindes ermöglichen, welches nicht von Osteogenesis imperfecta Typ I aufgrund der familiär bekannten autosomal dominanten Variante im *COL1A1*-Gen betroffen ist.

## 5 MATERIAL UND METHODEN

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Gewebeproben

- EDTA-Blut

Für die Etablierung des Testsystems wurden Blutproben des Indexpatienten, seiner Ehefrau und seinen Eltern entnommen. Die Extraktion der DNA aus Leukozyten erfolgte nach Standard mit Maxwell®-16-System (Promega) (siehe auch Kapitel 5.2.2.1), welche den Ausgangspunkt für die Etablierung des Testsystems darstellt.

- Wangenschleimhautzellen

Für die Validierung des Testsystems bei PID auf Einzelzell-Ebene bedarf es einer gewissen Nachahmung/Imitation der TE (Trophektoderm)-Zellen (Thornhill et al., 2005). Dafür wurden Wangenschleimhautzellen (WSZ) vom Indexpatienten per Schleimhauttupfer entnommen und in 5 mL 1X PBS (pH 7.2) resuspendiert. Unter einer Sterilwerkbank wurden mithilfe eines Mikroskops 8 bis 12 Zellen in 4 µL Puffer in 20 Einzelproben mit der Pipette abgesaugt, in 0,2 mL Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert. Die später durch Lyse gewonnene DNA aus den Schleimhautzellen und deren Vervielfältigung gemäß der Multiple Displacement Amplification-(MDA)-Methode (Qiagen) (siehe auch Kapitel 5.2.2.2), stellt den Ausgangspunkt für die Validierung des Testsystems dar.

#### 5.1.2 Kontrollproben

Als Negativkontrollen für die verschiedenen Methoden wurden destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) und 1X PBS (pH 7.2), sowie Wangenschleimhautzellen einer Referenz-Person als Einzelzell-Kontrolle für die Validierung des Testsystems verwendet. Die Referenzperson hat ihre schriftliche Einwilligung zur Verwendung ihrer Wangenschleimhautzellen gegeben.

#### 5.1.3 Marker und zugehörige Primer

Für die Analyse der STR-Marker (Mikrosatelliten) wurde die UCSC-Datenbank ([www.genome.ucsc.edu](http://www.genome.ucsc.edu) - „UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly“) verwendet.

Bei der Suche nach geeigneten STR-Markern wurden folgende Kriterien berücksichtigt:

- Marker dürfen nur bis maximal 1 Mb (Mega-Basenpaare) von der Sequenzvariante entfernt sein
- Marker-Eigenschaften: die STR-Marker untereinander sollen mindestens 30 bp voneinander entfernt sein. Wenn dies nicht der Fall ist, müssen die Forward-Primer (F-Primer), die für die Detektion der Marker eingesetzt werden, mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sein.

Für das Design der Primer (Oligonukleotide) wurde die UCSC-Datenbank ([www.genome.ucsc.edu](http://www.genome.ucsc.edu)) und NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) dem humanen Genom entsprechend für die Gensequenzen verwendet.

Bei der Auswahl von Primern wurden folgende Kriterien berücksichtigt:

- Forward- und Reverse-Primer sollten sich nicht miteinander paaren können (Bildung von Primer-Dimeren) und nicht zur Bildung von „Haarnadeln“ (hairpins) neigen - dies wurde durch das *IDT-Programm* (=website-tool - <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) getestet und weitestgehend vermieden;
- Primer dürfen nur ein Target amplifizieren
- Primer-Design mit Programm *Primer3Plus* (=website-tool - <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>)
- Primer-Eigenschaften: Länge (20-27bp), Schmelztemperatur (ca. 70°C), GC-Gehalt (mind. 40%, max. 80%)

Die eingesetzten Primer (Oligonukleotide) wurden von der Firma metabion international AG (Martinsried, Deutschland) bezogen und bei -20°C gelagert. Alle Forward-Primer sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff für die Detektion markiert. Je nach Erfordernis wurden die Fluoreszenzfarbstoffe FAM (6-Carboxy-Fluorescein) und JOE (2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein) verwendet, um PCR-Produkte mit gleichen bzw. ähnlichen Größen im Multiplex-PCR-Ansatz für Fragmentanalysen (siehe auch Kapitel 5.2.4) differenzieren zu können.

In den folgenden zwei Tabellen sind alle verwendeten Primer aufgelistet mit folgender Erklärung für die Verwendungen bei der Detektion der Sequenzvariante im *COL1A1*-Gen.

**Tabelle 2:** Mikrosatelliten mit zugehörigen Primer-Sequenzen und erwarteter PCR-Produkt-Größenbereich

STR-Marker	Forward Primer	Reverse Primer
STR1	5'- <b>JOE</b> -CTGGGTCTGAAGGTCTCTCCTA-3'	5'-GAGGTGGGACAGTAATGGACAC-3'
STR2	5'- <b>FAM</b> -CCTTCCAAAAGTCTGAGCCTAGAA-3'	5'-GTGCTCCTTCTCCAGGATTG-3'
D17S588	5'- <b>JOE</b> -GTATATCTGCATGCCTGTGAGG-3'	5'-AGTAACACAGAGGTGCTGATGC-3'
D17S1319	5'- <b>FAM</b> -ATTGCTCCAGTCACCATTCTT-3'	5'-GTTTGGGAACTGGACTGTGATA-3'
STR5	5'- <b>FAM</b> -AGGCTGGGGAAGTACTTTA-3'	5'-CACCTTGGACTCCTCACAGATA-3'
D17S1869	5'- <b>FAM</b> -CTTCCTTAGGCCATGTGTGATT-3'	5'-AGACTAGAGCTCTGGGGGAGTC-3'
STR7	5'- <b>FAM</b> -TTAAGGGACCAGGTTTCCTAGA-3'	5'-CTTGCACTTCTGAGCCTTTTG-3'
STR8	5'- <b>JOE</b> -AGGGACCAGGTTTCCTAGAGAG-3'	5'-CTTGCAGGAACACATACTGGAA-3'

**Tabelle 3:** Primer-Sequenzen zur Detektion der gesuchten Sequenzvariante im *COL1A1*-Gen

Primer Name	Forward Primer	Reverse Primer	Produktgröße [bp]
PID-COL1A1-Mini-1	5'-CCTATCCTCATCCAGGGAAATG-3'	---	294/295
PID-COL1A1-Mini-2	5'-TTGCCGCCTTCTTTGCCAGC-3' (komplementär)	---	20/21 + x (Farbstoff)
COL1A1-F	5'-AGTATCACCCGCCTCTCTGTT-3'	---	597
COL1A1-R	---	5'-GGAGTACCAGGAGCACCTTT-3'	294/295 & 597

*PID-COL1A1-Mini-1 = Forward-Primer für Minisequenzier-PCR*

*PID-COL1A1-Mini-2 = Primer für Minisequenzierung (Detektions-Primer)*

*COL1A1-F = Forward-Primer für PCR und Sanger-Sequenzierung*

*COL1A1-R = Reverse-Primer für PCR und Sanger-Sequenzierung wie auch Minisequenzier-PCR*

### 5.1.4 Reagenzien

Die für diese Arbeit verwendeten Reagenzien sowie deren Hersteller sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 4:** Reagenzien

Reagenz	Hersteller
1X PBS (pH 7.2)	Life Technologies Europe BV/Thermo Fisher Scientific, Bleiswijk, Niederlande
25% HCl (Salzsäure)	Merck, Darmstadt, BRD
3730 Buffer (10X) with EDTA	Applied Biosystems, Warrington, UK
Agarose Type II, Medium EEO	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Agencourt® CleanSEQ®	Beckman Coulter, CA, USA
Agencourt® AMPure® XP	Beckman Coulter, CA, USA
BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (RR-Mix, 5X Sequencing Buffer, pGEM Control DNA, M13 (-21) Primer)	Applied Biosystems, Warrington, UK
Borsäure	Merck, Darmstadt, BRD
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
destilliertes Wasser (dH <sub>2</sub> O) / aqua dest	Aqua dest-Anlage (Labor intern)
dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	metabion GmbH, Planegg/Steinkirchen, BRD
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
GeneScan™ – 120LIZ™ Size Standard	Applied Biosystems, Warrington, UK
GeneScan™ – 500 ROX™ Size Standard	Applied Biosystems, Warrington, UK
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems, Warrington, UK
Illustra™ ExoProStar™ 1-Step	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, BRD

**Tabelle 4:** Reagenzien (Fortsetzung)

Reagenz	Hersteller
Maxwell®-16-LEV Blood DNA Kit (Proteinase K (PK) Solution, Lysis Buffer, Elution Buffer)	Promega, Madison/WI, USA
mi-100bp Marker (DNA ladder 100-1500bp; gebrauchsfertig)	metabion, Martinsried, BRD
Midori Green DNA Stain	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, BRD
Multiplex PCR Plus Kit (2x Multiplex PCR Master Mix, 5x Q Solution, RNase free water)	Qiagen Inc., Hilden, BRD
REPLI-g Single Cell Kit (DTT, Buffer DLB, dH2O sc, REPLI-g sc Reaction Buffer, REPLI-g sc DNA Polymerase, Stop Solution)	Qiagen Inc., Hilden, BRD
SNaPshot® Multiplex Kit (RR-Mix, Control Primer Mix, Control Template)	Applied Biosystems, Warrington, UK
Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Trizma® Base	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Water (DNase, RNase – None detected)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD

### 5.1.5 Puffer, Lösungen und Mixe

Die für diese Arbeit verwendeten Puffer, Lösungen und Mixe sowie deren Zusammensetzung sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.



**Tabelle 5:** Puffer, Lösungen und Mixe

<b>Puffer, Lösung, Mix</b>	<b>Zusammensetzung</b>
10X TBE-Puffer	216 g Trizma®Base 110 g Borsäure 18,6 g EDTA ad. 2000 mL dH <sub>2</sub> O
1X TBE-Puffer	1 : 10 Verdünnung 100 mL 10X TBE-Puffer + 900 mL dH <sub>2</sub> O
1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0)	60,5 g Trizma®Base ad. 450 mL dH <sub>2</sub> O pH 8,0 mit 25%iger HCl ad. 500 mL dH <sub>2</sub> O
10 mM Tris-HCl-Puffer	100 µL 1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) ad. 10 mL dH <sub>2</sub> O
Saccharose-Blaumarker (6%)	20 g Saccharose (40%) wenige Krümel Xylencyanol wenige Krümel Bromphenolblau ad. 50 mL dH <sub>2</sub> O
Formamid-Standard-Mix	240 µL HiDi™Formamide 15 µL GeneScan™500 ROX
dNTP-Mix (10 mM „each“)	600 µL dH <sub>2</sub> O steril 100 µL dATP (100mM) 100 µL dCTP (100mM) 100 µL dGTP (100mM) 100 µL dTTP (100mM)
Primer-Lösungen (je 50µM Stocklösung)	je nach Angabe des Etiketts ad. xx µL Tris-HCl-Puffer (10mM)

*Der 1 M Tris-HCl-Puffer wird im Zwischenschritt mit 25%iger HCl-Lösung auf pH 8,0 eingestellt, auf 500 mL dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und anschließend autoklaviert. Aus den Stocklösungen der Primer wurden Aliquots von 20 µL hergestellt, um im Laufe das Risiko einer Kontamination zu verringern. Alle Primer-Lösungen wurden lichtgeschützt bei -20°C aufbewahrt.*

### 5.1.6 Geräte und Software

Die für diese Arbeit verwendeten Geräte und Software sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 6:** Geräte und Software

<b>Gerät/Software</b>	<b>Modell/Version</b>	<b>Hersteller</b>
Biomek® Span-8	NXP <sup>P</sup> Multichannel	Beckman Coulter Inc.
BioDocAnalyze System	BDAdigital	Analytik Jena / Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Elektrophorese-Kammer mit Spannungsquelle & Zubehör	Bio-Rad, PowerPac Basic™ Power Supply	BioRad Laboratories, Hercules, USA
4er-Kapillar-Elektrophorese- Gerät	3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems / Hitachi
16er-Kapillar-Elektrophorese- Gerät	3730xl-96 DNA Analyzer	Applied Biosystems / Hitachi1
Mikrowelle	-	Panasonic, Hamburg, Deutschland
variable Pipetten (0,5 µL bis 10 µL; 10 µL bis 100 µL; 100 µL bis 200 µL; 100 µL bis 1000 µL)	-	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland & Gilson, Inc. Middleton, WI, USA
8er-Tube-Zentrifuge (Stripe)	Rotilabo®-Zentr. Butterfly- Rotor	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Plattenzentrifuge	eppendorf Centrifuge 5804	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sterilwerkbank	PCR UV <sup>3</sup> HEPA Cabinet & Workstation	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Thermocycler	FlexCycler	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Tischzentrifuge	Minispin	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex	Minishaker MS 2	IKA-Works INC., Wilmington, USA
BioDocAnalyze Analyse- Software	2.2	Analytik Jena / Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
GeneMapper® Software	3.2.1	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Sequence Pilot Software	4.1.2	JSI medical systems Corp., NY, USA

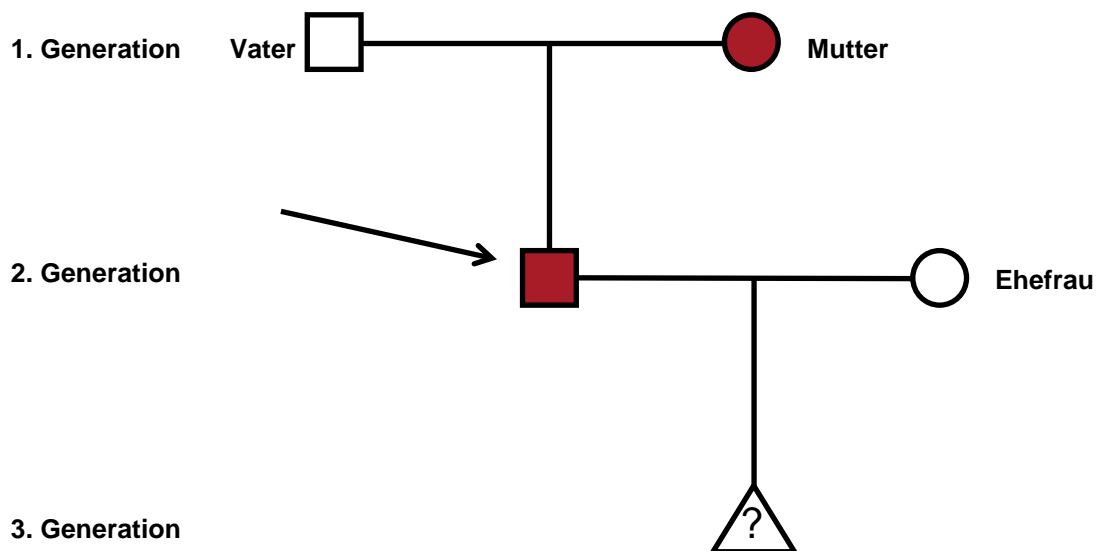
## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Familienstammbaum

Von der Osteogenesis imperfecta Typ I (autosomal-dominant) sind in der hier untersuchten Familie der männliche Partner (potentielle Vater/Indexpatient, s. Pfeil) und seine Mutter betroffen.

Der Indexpatient erlitt seine erste Oberschenkelfraktur im Alter von sechs Monaten. Durch weitere Frakturen wurde er bereits in der Kindheit Rollstuhl-pflichtig. Die im Jahr 2010 durchgeführte molekulargenetische Analyse ergab eine heterozygot (nur ein Allel betreffend) vererbte Deletion der Base Thymidin an der Position 2700 im Exon 39 (c.2700delT), welche zu einer Frameshift-Variante mit Stopcodon p.(Ala901Leufs\*207) im COL1A1-Gen auf Chromosom 17 Arm q21.32 führt. Dieselbe Sequenzveränderung wurde daraufhin auch bei seiner Mutter nachgewiesen. Sie ist jedoch milder von der Osteogenesis imperfecta betroffen (siehe Kapitel 4.2: variable Expressivität).

Gen	COL1A1
Chromosom	17q21.32
Sequenzvariante	<b>c.2700delT, p.(Ala901Leufs*207)</b>



**Abbildung 4:** Familienstammbaum über zwei Generationen und potentielle dritte Generation

Indexpatient (mit Pfeil gekennzeichnet), □ männlich, ○ weiblich, rote Füllfarbe: von der Sequenzvariante betroffene Individuen, ohne Füllfarbe: nicht-betroffene Individuen, △ zu testender Embryo bzw. zu testende Trophektoderm-Zelle/n (gewonnen an Tag 5/6 nach ICSI).

## **5.2.2 Molekularbiologische Methoden**

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden bei dieser Arbeit während der Etablierungs- und Validierungsphase, sowie bei der finalen Diagnostik an Einzelzellen besondere Maßnahmen ergriffen. Einzelzellen und Reagenzien wurden in getrennten Räumen und unter getrennten Steril-Werkbänken bearbeitet, die sowohl vor als auch nach der Bearbeitung mit Alkohol gereinigt und mit UV-Licht für mind. 30 min abgestrahlt wurden. Mundschutz, Haube und Schutzanzug wurden beim Arbeiten mit Einzelzellen getragen. Dabei wurde stets auf die Einhaltung der Qualitätsrichtlinien geachtet, die von der European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) ausgegeben wurden. (Harton et al., 2011a)

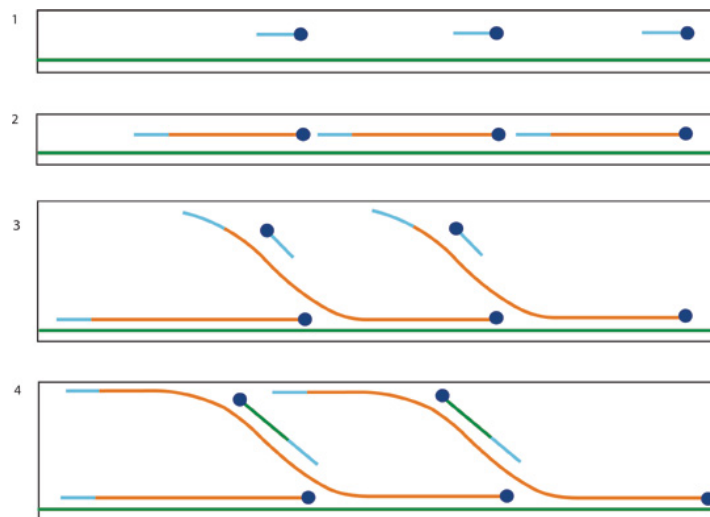
### **5.2.2.1 DNA-Extraktion**

Die DNA-Extraktion aus EDTA-Blutproben erfolgte mit dem Maxwell®-16-System der Firma Promega, welches auf dem Prinzip der Magnetic-Bead-Technologie basiert (Alderton et al., 1992; WO/1991/012079 A1, 1991). Hier wird zu Beginn das EDTA-Blut mittels Protease und einem speziellen Lysis-Puffer (Maxwell®-16-LEV Blood DNA Kit von Promega) vorbehandelt, wodurch genomische DNA aus den kernhaltigen Zellen (Leukozyten) frei wird. Diese wird dann an paramagnetische Partikel, sog. MagnaCel™ Partikel gebunden, welche eine bewegliche Festphase bilden. Diese Partikel bieten eine höhere Bindungskapazität und erbringen ein reineres Eluat durch die Nutzung Zellulose-gestützter Bindung von Nukleinsäuren im Gegensatz zur klassischen silikatischen DNA-Aufreinigung. Es schließt sich eine Reihe von Waschschritten mit Wasch-Puffer (Maxwell®-16-LEV Blood DNA Kit von Promega) an, um Zellreste und Reagenzien zu entfernen. Während dieses gesamten Aufreinigungsprozesses bleibt die genomische DNA an diesen Partikeln gebunden. Am Ende wird die gereinigte DNA mit einem Elutions-Puffer (Maxwell®-16-LEV Blood DNA Kit von Promega) in Lösung gebracht und über Nacht bei Raumtemperatur gut gemischt. Am nächsten Tag kann die Quantität und Reinheit der gewonnenen DNA durch das Verhältnis der OD260 und OD280 mittels eines Spektrophotometers (NanoDrop) bestimmt werden, das bei einer guten Präzipitation reproduzierbar im Bereich 1,7 bis 1,9 liegen sollte. Die extrahierte und gemessene DNA wurde für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

### 5.2.2.2 MDA-Methode

Die Multiple Displacement Amplification (MDA) dient zur Amplifizierung der gesamten genomischen DNA von einer oder sehr weniger Zellen, um ausreichend DNA-Material für anschließende Analysen zu gewinnen. Eine DNA-Konzentrationsbestimmung vor genetischen Analysen ist dabei nicht mehr notwendig (Lasken & Egholm, 2003).

Diese Art der DNA-Vervielfältigung eignet sich sowohl für Wangenschleimhautzellen (Hosono et al., 2003) wie auch für Einzelzellen embryonalen Ursprungs bei Anwendung einer PID (Handyside et al., 2004; Hellani et al., 2005). Die MDA-Methode generiert längere DNA-Fragmente (bis zu ca. 100 kb) mit geringerer Fehlerrate im Gegensatz zu einer PCR-basierten Amplifikation (Schock et al., 2005) und beruht auf einem isothermalen Reaktionsprinzip (Dean et al., 2002). Sie wird schematisch in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Multiple Displacement Amplification (Spits et al., 2006)

(1) Primer (hellblaue Linie) binden an die denaturierte DNA (grüne Linie) an mehreren Stellen und werden bei 30°C durch die Phi29-Polymerase (dunkelblauer Punkt) (2) elongiert bis bereits neusynthetisierte voraus liegende DNA (orange Linie) erreicht wird; (3) das Enzym setzt trotzdem die Elongation fort indem es den neusynthetisierten Strang verdrängt, der wiederum als Matrize für eine erneute Anlagerung von Primern und (4) deren Elongation dient. Es entstehen neue komplementäre DNA-Stränge und es ergibt sich am Ende eine viel-verzweigte Struktur.

Das REPLI-g Single Cell Kit der Firma Qiagen wurde nach Angaben des Herstellers für die MDA von Wangenschleimhautzellen des Indexpatienten verwendet. Als Negativkontrolle wurde 4 µL 1X PBS (pH 7.2) mitgeführt. Zur DNA-Gewinnung erfolgte zuerst eine Lyse der Einzelzellen mit dem Mix „Buffer D2“ (siehe Tabelle 7).

**Tabelle 7:** Herstellung des Buffer D2

Substanz	Menge
DTT	0,25 µL
Buffer DLB	2,75 µL

Herstellung des „Buffer D2“ für Lyse. 3 µL Buffer D2 wird zu den Einzelzellen dazu gegeben und im Thermocycler bei 65°C für 10 Minuten inkubiert.

Nach Lyse wurden die Proben auf einen Kühlblock gestellt und 3 µL einer Stop Solution (REPLI-g Single Cell Kit) dazu gegeben, um eine weitere Lyse-Reaktion zu unterbinden.

**Tabelle 8:** Herstellung des MDA-Mastermixes

Substanz	Menge
dH2O sc	9 µL
REPLI-g sc Reaction Buffer	29 µL
REPLI-g sc DNA Polymerase	2 µL

Herstellung des MDA-Mastermixes erfolgte auf Kühlblöcken in Eis, um die temperaturempfindliche Polymerase zu schonen. Es werden 40 µL des Mixes zu den Proben (10 µL) gegeben (Endvolumen 50 µL).

Im Anschluss wurde die MDA mit Hilfe des folgenden Programmes durchgeführt.

**Tabelle 9:** MDA-Programm „MDA-MDA“

Temperatur [°C]	Zeit
30	8 Stunden
65	3 Minuten
4	unendlich

Die gewonnenen MDA-DNA-Proben wurden jeweils 1:10 verdünnt und stellen den Ausgangspunkt für diese Arbeit dar. Anhand der Mikrosatelliten-/Fragmentlängenanalyse kann überprüft werden, ob die MDA funktioniert hat und ob Kontaminationen eingeschleppt wurden.

### 5.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Syntheseverfahren, welches einen kurzen, Abschnitt des DNA-Stranges durch zyklische Wiederholung mit Hilfe eines Enzyms namens DNA-Polymerase exponentiell vervielfältigt. Hier wird nur ein genau definierter DNA-Abschnitt durch Verwendung zweier spezifischer Primer (Forward- und Reverse-Primer) vermehrt. Die beiden Primer dienen als Startpunkt der DNA-Polymerase und grenzen den zu vermehrenden DNA-Abschnitt ein. Dabei kann der DNA-Strang aus einer kodierenden oder nicht kodierenden Sequenz stammen. (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1985)

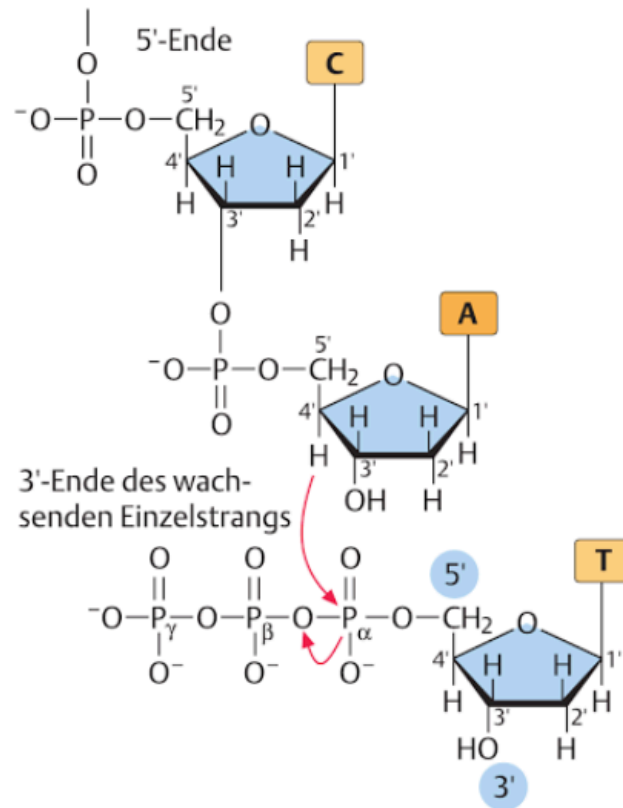
Folgende Bestandteile werden für die PCR benötigt:

- DNA (Patient) / dH<sub>2</sub>O (Negativkontrolle)
- Zwei Primer (Forward- und Reverse-Primer = Oligonukleotide, die spezifisch an komplementäre Bereiche der Ziel-DNA binden können)
- DNA-Polymerase (hitzebeständig, z.B. Taq-Polymerase)
- dNTPs (Bausteine für die zu synthetisierende DNA)
- Mg<sup>2+</sup>-Ionen (Optimierung der Funktion der DNA-Polymerase)
- Pufferlösungen (Stabilisierung der chemischen Umgebung)

Die Amplifizierung läuft in drei Schritten ab. Im ersten Schritt erfolgt bei 94-98°C die Denaturierung der DNA. Hierbei werden die Wasserstoff-Brückenbindungen der doppelsträngigen DNA gelöst. Im zweiten Schritt erfolgt das *Annealing* bei 50-65°C. Dabei werden die Forward-Primer an den sense-DNA-Einzelstrang (5'-3'-Richtung) und die Reverse-Primer an den antisense-DNA-Einzelstrang (3'-5'-Richtung) angelagert. Im letzten Schritt findet die Elongation der Primer und die Bildung des PCR-Produkts bei 72°C statt. Bei diesem Schritt synthetisiert die thermostabile DNA-Polymerase den komplementären DNA-Strang durch Einbau von dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) in 5'-3'-Richtung. Durch die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-OH-Ende des neuen DNA-Stranges und dem alpha-Phosphat am 5'-Ende des anzuhängenden dNTPs (siehe Abbildung 6) unter Abspaltung eines Diphosphats entsteht die komplementäre DNA-Kette.

Da diese Schritte unterschiedliche Temperaturen erfordern, erfolgt die PCR in einem Thermocycler, in dem ein Programm von aufeinanderfolgenden Temperaturschritten in sich wiederholenden Zyklen (20 bis 40) abläuft. Bei jedem Zyklus wird die DNA verdoppelt und es kommt zur exponentiellen Vermehrung der DNA, zumal auch die gebildeten PCR-Produkte parallel als Ausgangsmaterial für folgende Zyklen dienen. In

der Regel haben PCR-Produkte eine definierte Größe, die anschließend mittels Gelelektrophorese beurteilt werden können.



**Abbildung 6:** DNA-Kettenverlängerung durch Verbindung von dNTPs (Janning & Knust, 2004)

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt der Kettenverlängerung durch die DNA-Polymerase. Hierbei werden unter Abspaltung eines Diphosphates das 3'-OH-Ende des wachsenden Komplementärstrangs mit dem Phosphat am 5'-C-Ende des neu angehängten dNTPs verbunden.

Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Mastermixe und deren Herstellung auf Kühlblöcken in Eis sind in Tabelle 10 und Tabelle 11 beschrieben. Diese stellen die Basis für anschließende Analysen dar (siehe Kapitel 5.2.3.1, 5.2.3.2 und 5.2.4.2).

**Tabelle 10:** Herstellung des PCR-Mastermixes für Sanger-Sequenzierung oder Minisequenzierung

Substanz	Menge
2x Multiplex PCR Master Mix (Kit)	12,5 µL
RNAse free water (Kit)	10,5 µL
Primer-F (5 µM)	0,5 µL
Primer-R (5 µM)	0,5 µL

Zur DNA-Probe (1 µL) werden 24 µL des Mixes dazu gegeben (Endvolumen 25 µL).



**Tabelle 11:** Herstellung des PCR-Mixes für Fragmentlängen-Analyse im Multiplex-Ansatz

Substanz	Menge
2x Multiplex PCR Master Mix (Kit)	6,25 µL
RNAse free water (Kit)	4,5 µL
entsprechender Primer-Mix	1,25 µL

Zur DNA-Probe (1 µL) werden 12 µL des PCR-Mixes dazu gegeben (Endvolumen 13 µL).

Die verschiedenen Primer-Mixe sind nach Tabelle 12 hergestellt worden. Für die Multiplex-Ansatz-Austestungen siehe Kapitel 5.2.4.2.

**Tabelle 12:** Beispiel für die Herstellung eines Primer-Mixes für Fragmentlängen-Analyse im Multiplex-Ansatz

PCR-Primer	Endkonzentration	Menge
STR1-Primer -F	2 µM	2 µL
STR1-Primer -R	2 µM	2 µL
STR7-Primer -F	2 µM	2 µL
STR7-Primer -R	2 µM	2 µL
STR8-Primer -F	2 µM	2 µL
STR8-Primer -R	2 µM	2 µL

Jeder PCR-Primer hat eine Anfangskonzentration von 50 µM (Stocklösung). Es werden 38 µL von 10mM Tris-HCl (pH8,0) dem Primer-Mix dazu gegeben (Endvolumen 50 µL).

Das in dieser Arbeit durchgeführte PCR-Programm „PID59\_28“ erfolgte für alle PCR-Reaktionen nach dem in Tabelle 13 beschriebenen Protokoll.

**Tabelle 13:** PCR-Programm „PID59\_28“

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5 Minuten	-
Denaturierung	95	30 Sekunden	30
Annealing	59	90 Sekunden	
Elongation	72	30 Sekunden	
Finale Elongation	68	30 Minuten	-

Die Lagerung der vervielfältigten DNA erfolgte bei 20°C.

#### **5.2.2.4 DNA-Agarosegelelektrophorese**

Um PCR-Produkte für anschließende Sequenzierungs-Analysen, deren erwartete Größe und die Funktion der Primer nachweisen zu können, wurde eine Agarosegelelektrophorese nach Standard durchgeführt (Aaij & Borst, 1972). Für die Herstellung des 2%-Agarosegels wurden 6 g Agarose in 300 mL 1XTBE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle so lange erhitzt bis eine klare Flüssigkeit ohne Schlieren vorlag. Die handwarme Lösung wurde mit 6 µL Midori Green (DNA Farbstoff) versetzt und in eine Kammer mit dazugehörigen Kämmen luftblasenfrei gegossen. Das Gel konnte nach ungefähr einer Stunde für die Elektrophorese verwendet werden. Dazu wurden 5 µL von jedem PCR-Produkt mit 2 µL Blaumarker versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei 130V in einer Kammer mit 1XTBE als Laufpuffer für ca. 50 Minuten. Die Interkalation des Farbstoffes Midori Green zwischen die doppelsträngige DNA führt bei UV-Licht-Bestrahlung bei einer Wellenlänge von 312 nm zu einem Fluoreszenzsignal. Hier wurde das Geldokumentationssystem von BioDoc Analyze verwendet. Durch die UV-Transillumination des Agarosegels konnten die Größen der sichtbaren DNA-Banden im direkten Vergleich mit dem 5 µL mitgeführten DNA-Längenstandard mi-100bp (gebrauchsfertig) bestimmt und anschließend als Foto festgehalten werden.

### **5.2.3 Direkter Gentest**

#### **5.2.3.1 DNA-Sequenzierung nach Sanger**

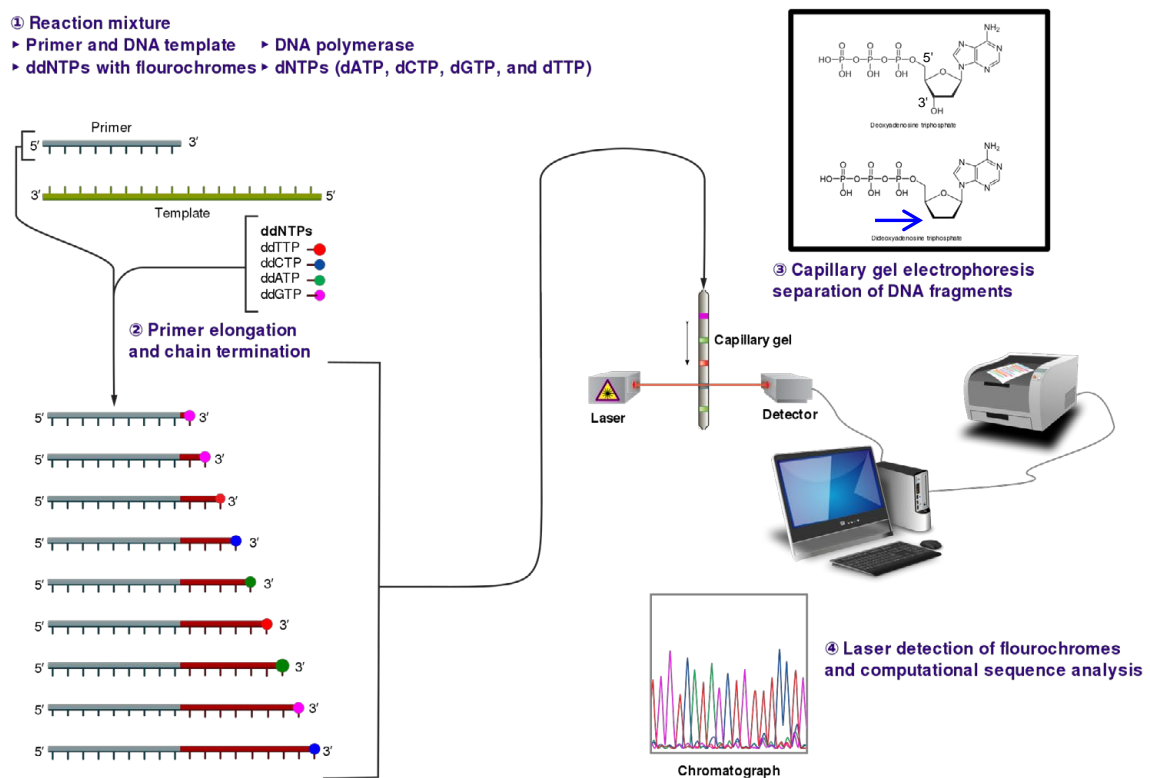
Die Sequenzierung ist eine Methode zur Bestimmung der Basensequenz eines DNA-Abschnittes und dient als Basis dem direkten Nachweis von Veränderungen im genetischen Code. 1977 wurden zeitgleich zwei Sequenzier-Verfahren veröffentlicht: eine chemische Methode von Maxam & Gilbert (1977) und eine enzymatische Methode von Frederick Sanger und seinen Kollegen, die sog. Didesoxy-Methode (Sanger et al., 1977). Gilbert, Sanger und ein weiterer Wissenschaftler erhielten 1980 für ihre Errungenschaften den Nobelpreis für Chemie (Media, 2014). Anfang der 90er wurde die ursprüngliche Methode nach Sanger immer weiterentwickelt. Die enzymatische Sequenzier-Methode wird auch als „Kettenabbruch-Methode“ bezeichnet und wurde weltweit als Standard eingeführt.

Heute sind für das Sequenzieren nach Sanger folgende Komponenten notwendig:

- DNA-Template (Einzelstrang durch Hitze-Denaturierung)

- DNA-Primer in 5'-3'-Richtung, die spezifisch an komplementäre Bereiche der Ziel-DNA binden
- DNA-Polymerase
- dNTP-Mix (Desoxyribonucleosidtriphosphate: dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
- ddNTP-Mix (Dideoxyribonucleosidtriphosphat: ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP), je nach ddNTP mit einem bestimmten Fluoreszenzfarbstoff markiert
- Puffer zur Stabilisierung der chemischen Umgebung

Der Ablauf der Kettenabbruch-Reaktion wird schematisch in Abbildung 7, Punkt (2) dargestellt.



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der DNA-Sequenzierung nach Sanger und molekulare Darstellung eines dNTPs & ddNTPs (Estevezj, 2012)

(1) Im Reaktionsmix sind enthalten: sequenzspezifischer Primer (hellgrau), Template-DNA (moosgrün), eine thermostabile DNA-Polymerase, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und ddNTPs mit Fluoreszenzfarbstoffen versehen (ddATP-> grüner Punkt, ddCTP-> blauer Punkt, ddGTP-> rosa Punkt, ddTTP-> roter Punkt);

(2) Sequenzierungsreaktion: Anlagerung der Primer an die denaturierte DNA, Elongation der Primer durch Einbau von dNTPs mittels der DNA-Polymerase (dunkelrot) und Abbruch der Nukleotid-Kette bei zufälligem Einbau von einem ddNTP -> Entstehung unterschiedlich langer DNA-Fragmente;

(3) nach Aufreinigung des Sequenzierungsprodukts Anschluss an die Kapillarelektrophorese mit Auftrennung der einzelnen DNA-Fragmente;

(4) Detektion des Fluoreszenzsignals nach Laser-Bestrahlung und Übersetzung der elektronischen Signale in ein optisches Diagramm (Chromatograph) mit anschließender Sequenz-Analyse durch ein Software-Programm am PC.

(Kasten rechts oben) Darstellung eines Desoxyadenosintriphosphats (dATP; oben) im Vergleich zu einem Dideoxyadenosintriphosphats (ddATP; unten): es fehlt eine OH-Gruppe am 3'-Ende des Nukleotids (blauer Pfeil), dadurch kann die DNA-Polymerase das ddNTP nicht mehr mit der 5'-Phosphatgruppe eines weiteren dNTPs verbinden und die Kettenverlängerung bricht ab.

Bei der Sequenzierreaktion bindet der sequenzspezifische Primer (nur in 5'-3'-Richtung) an den komplementären DNA-Strang (Primer-Annealing) und wird durch eine thermostabile DNA-Polymerase stromaufwärts verlängert. Die Elongation findet so lange durch Einbau von nicht-markierten dNTPs statt (2'-Desoxyribonukleosidtriphosphate: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), bis zufallsbedingt und abhängig von der komplementären Base ein bestimmtes ddNTP eingebaut wird. Die ddNTPs (Didesoxyribonukleosidtriphosphate: ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) sind jeweils unterschiedlich fluoreszenzfarbstoff-markiert. Aufgrund ihrer chemischen Struktur (Fehlen einer OH-Gruppe am 3'-Ende, siehe Abbildung 7 rechts oben) kann die Polymerase kein weiteres dNTP mehr an die bisher erzeugte Kette hängen und die Synthese bricht ab. Dieser Kettenabbruch findet also zufallsbedingt an unterschiedlichen Positionen der DNA statt und somit entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente (siehe Abbildung 7, Punkt (3)). (Sanger et al., 1992)

Nach Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte (siehe Kapitel 5.2.3.3) werden die Proben elektrokinetisch in die Kapillaren des Kapillarelektrophorese-Gerätes injiziert. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern der Größe nach geordnet zur positiven Elektrode, wobei größere Fragmente langsamer wandern als Kleinere. An einem Detektionsfenster werden durch einen Laser die Farbstoffmoleküle, gebunden an den terminalen ddTNPs der unterschiedlich langen Fragmente, angeregt und produzieren dadurch Fluoreszenzsignale. Diese Signale werden durch optische und elektronische Apparate detektiert und in einen sog. Chromatographen umgewandelt, was als ein Diagramm mit farbigen Peaks, die den jeweiligen endständigen ddNTPs entsprechen, dargestellt wird (siehe Abbildung 7, Punkt (4)).

Anschließend ist eine Analyse der erzeugten Sequenzen mit Hilfe einer Sequenzanalyse-Software erforderlich, da sonst jede gewonnene Sequenz-Information ohne diagnostischen Wert bleibt. Die Software kann durch Vergleich zwischen Patienten-Sequenz und Referenz-Sequenz Veränderungen detektieren. Die Referenz-Sequenzen sind sog. Wildtyp-Sequenzen, die von einer Gen-Datenbank für jeden zugänglich aus dem Internet heruntergeladen werden können.

In dieser Arbeit wurden Reagenzien aus dem BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Fa. Applied Biosystems) für die Herstellung des Sequenzier-Reaktionsgemisches verwendet (siehe **Tabelle 14**).

**Tabelle 14:** Herstellung des Sequenzier-Mixes

Substanz	Menge
Big Dye Terminator v1.1 RR-Mix (Kit)	0,3 µL
5X Sequencing Buffer (Kit)	2,0 µL
Sequenzier-Primer (1,25 µM)	2,0 µL
dH <sub>2</sub> O	4,2 µL

Zum aufgereinigten (siehe Kapitel 5.2.3.3) PCR-Produkt (2 µL) werden 8 µL des Mixes dazu gegeben (Endvolumen 10 µL).

Die Sequenzierung erfolgte nach einem Cycle-Sequencing-Protokoll (siehe Tabelle 15). Hierbei werden die Schritte der Primer-Anlagerung (Annealing) und Primer-Verlängerung (Elongation) in mehreren Zyklen wiederholt und dadurch wird weniger Ausgangs-DNA benötigt als bei klassischen Sequenzierungsreaktionen bzw. anders ausgedrückt mehr Sequenzierungs-Produkt gewonnen.

**Tabelle 15:** Sequenzier-Programm „SeqTB“

Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl Zyklen
95	1 Minuten	-
95	10 Sekunden	25
55	10 Sekunden	
60	150 Sekunden	
10	unendlich	-

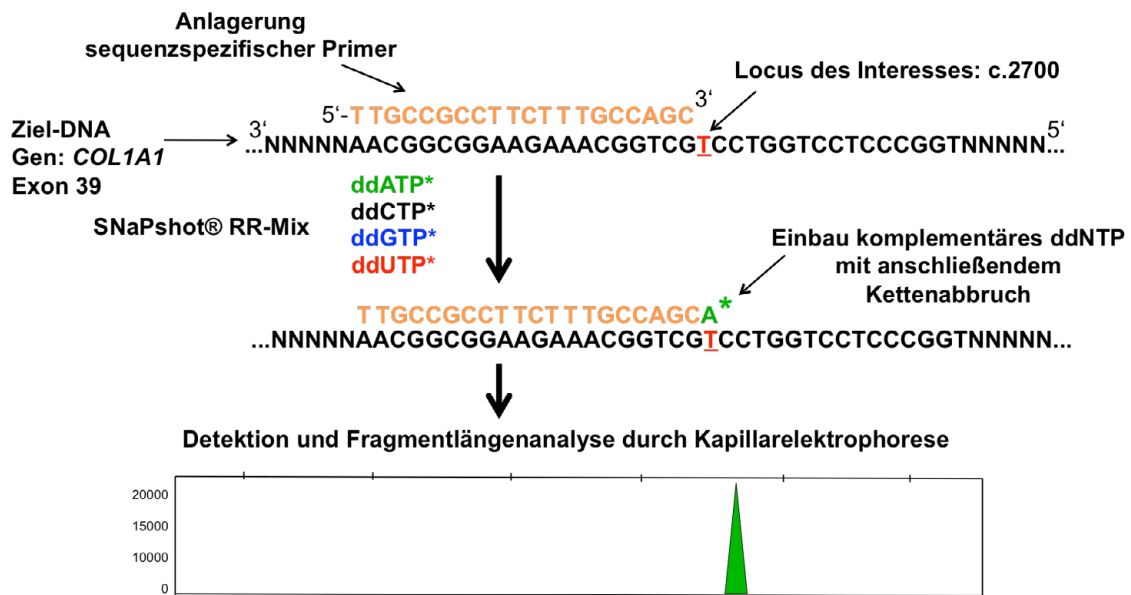
Hier wird zuerst bei 95°C das PCR-Produkt denaturiert, daraufhin erfolgt die Primer-Anlagerung (Annealing) bei 55°C und deren Verlängerung (Elongation) bei 60°C. Der gesamte Prozess wird für insgesamt 25 Zyklen wiederholt und anschließend für eine möglichst kurze Lagerung auf 10°C runtergekühlt.

Nach der Sequenzierreaktion erfolgte die Aufreinigung (siehe Kapitel 5.2.3.3) mit anschließender Kapillargelelektrophorese und Detektion durch den Sequencer 3730xl-96 DNA Analyzer der Fa. Applied Biosystems. Die DNA-Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe der kommerziellen Software *Sequence Pilot* (JSI medical systems GmbH). Die Referenz-Sequenzen stammen aus der Datenbank *Ensembl* ([www.ensembl.org/index.html](http://www.ensembl.org/index.html)).

### **5.2.3.2 Minisequenzierung/Single-Basen-Extension (SBE)**

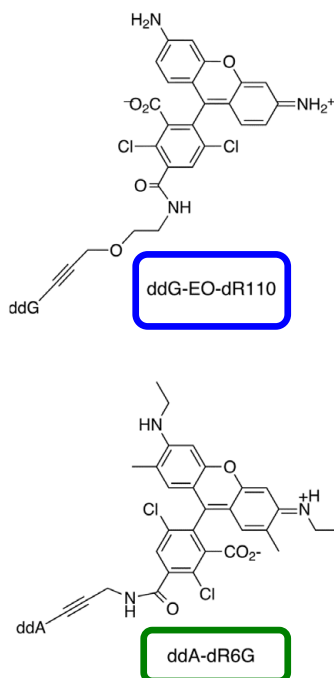
Die Minisequenzierung ist eine alternative Methode zur klassischen Sequenzierung nach Sanger für die PID von monogen-vererbten Erkrankungen (Fiorentino et al., 2003) und sehr gut für den Nachweis einer Punktvariante geeignet (Pastinen et al., 1996).

Bei dieser Technik wird ein sequenzspezifischer Primer nach Anlagerung an die denaturierte Ziel-DNA nur um eine Base bzw. ein Nukleotid (ddNTP) verlängert. Hierbei endet der gebundene Primer exakt eine Base vor der zu untersuchenden Punktvariante. In diesem Reaktionsansatz werden im Gegensatz zur Sanger-Sequenzierung keine dNTPs, sondern nur ddNTPs verwendet. Nach Einbau des komplementären, fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotidtriphosphats wird analog zur klassischen Sequenzierreaktion nach Sanger (siehe Kapitel 5.2.3.1) die Kette abgebrochen (siehe Abbildung 8). Da nur eine Verlängerung um ein Nukleotid stromaufwärts des Primers stattfindet, wird die Methode auch Single-Basen-Extensions-Technik (SBE-Technik) oder auch Primer-Extensions-Technik genannt (Sokolov, 1990). Somit erhält man nach Kettenabbruch immer gleich lange Fragmente. Danach wird das Produkt aufgereinigt und für eine kapillarelektrophoretische Analyse vorbereitet. Dabei wird der Probe ein Größenstandard und Formamid hinzugefügt und es folgt ein Denaturierungsschritt bei hoher Temperatur. Das Formamid hat den Zweck, dass die Fragmente dauerhaft als Einzelstrang für die elektrophoretische Auftrennung und Analyse vorliegen. Die erhaltenen Farbausschläge im Elektropherogramm zeigen, ob eine Sequenzvariante in dem zu untersuchenden Gen-Abschnitt vorhanden ist und lassen auch zwischen einem homozygoten Wildtyp, einem homozygoten Variantenträger oder einem heterozygoten Variantenträger unterscheiden. Beim Heterozygoten würden zwei unterschiedliche Farbausschläge im Elektropherogramm auftreten (siehe Beispiel in Abbildung 10 rechts unten).



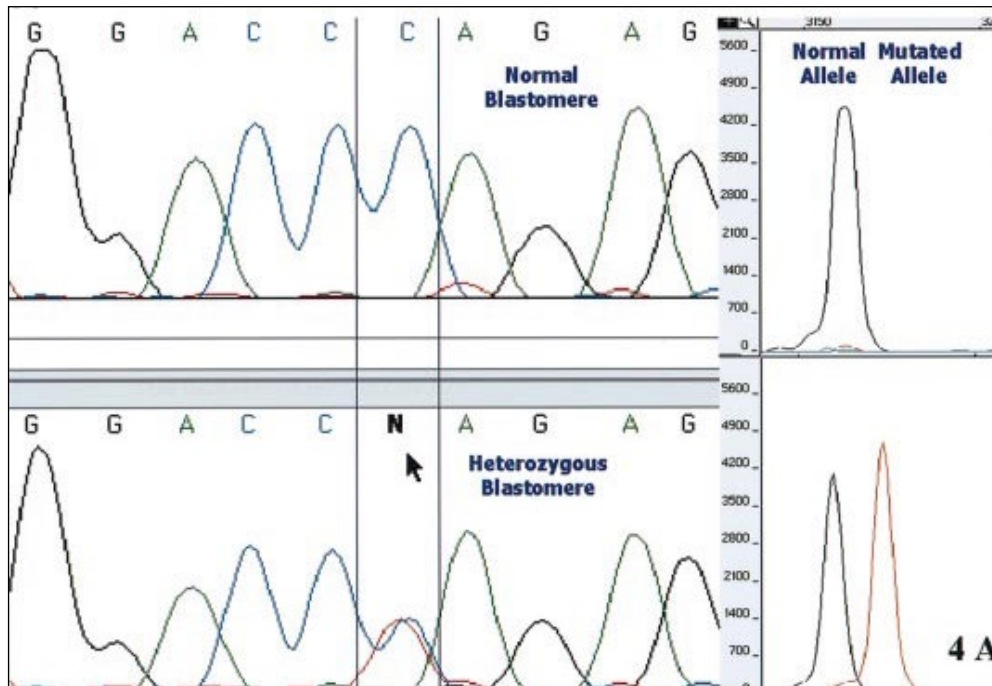
**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der Minisequenzierung (modifiziert übernommen aus ABI Multiplex Protokoll/Thermo Fisher Scientific)

Die Abbildung zeigt den schematischen Ablauf einer Minisequenzier-Reaktion. Nach der Denaturierung des DNA-Doppelstranges erfolgt die Anlagerung eines sequenzspezifischen Primers an die Ziel-DNA. Die DNA-Polymerase baut komplementär zu der zu analysierenden Position (T) am 3'-Ende des angelagerten Primers ein fluoreszenzmarkiertes ddNTP (A\*) ein. Anschließend folgt aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe am ddNTP ein Kettenabbruch. Die Detektion des Signals sowie eine Auftrennung der Fragmentlänge entsprechend erfolgt durch ein Kapillarelektrophoresegerät mit Analysefunktion. Das Elektropherogramm zeigt einen grünen Farbausschlag, das der Base A entspricht und auf beiden Allelen vorhanden ist (homozygoter Wildtyp).



Die Abbildung zeigt die chemische Struktur des bei Laserbestrahlung blau-fluoreszierenden Farbstoffes dR110 angehängt an dem ddNTP mit der Base G (oben) und grün-fluoreszierenden Farbstoffes dR6G angehängt an dem ddNTP mit der Base A (unten). Die Fluoreszenzfarbstoffe sind insgesamt größer als die ddNTPs (hier nicht zu sehen).

**Abbildung 9:** Strukturformeln der Fluoreszenzfarbstoffe dR110 und dR6G mit jeweils angehängtem ddNTP (Bestandteile des RR-Mix aus SNaPshot® Multiplex Kit, ABI)



**Abbildung 10:** Vergleichende Darstellung klassischer Sequenzierung nach Sanger (links) und Minisequenzierung (rechts) (Fiorentino et al., 2003)

Im Bild links oben ist die Basensequenz einer Probe nach Sanger-Sequenzierung dargestellt, die an der zu untersuchenden DNA-Position (hier die Base C blau -> homozygoter Wildtyp) keine Sequenzvariante aufweist; in der Probe darunter (links unten) weist die Basensequenz an der gesuchten Position eine Punktvariante mit einem heterozygoten Muster auf (Basen C in blau und T in rot sind vorhanden -> heterozygoter Variantenträger). Im Vergleich dazu wird im Bild rechts die gleiche Probe wie links davon aber nach Minisequenzierung dargestellt. Oben rechts sieht man nur einen Farbausschlag für die Base C (hier schwarz), wohingegen sich analog zur Sanger-Sequenzierung links zwei verschiedenfarbige Ausschläge (C hier schwarz und T hier rot) befinden, die auf einen heterozygoten Variantenträger schließen lassen.

In dieser Arbeit wurden Reagenzien aus dem *SNaPshot® Multiplex Kit* (Fa. Applied Biosystems) für die Herstellung des Minisequenzier-Reaktionsgemisches verwendet.

**Tabelle 16:** Herstellung des Minisequenzier-Mixes

Substanz	Menge
RR-Mix (SNaPshot® Multiplex Kit)	5,0 µL
PID-COL1A1-Mini-2-Primer (1 µM)	1,0 µL
dH2O	1,0 µL

Zum aufgereinigten (siehe Kapitel 5.2.3.3) PCR-Produkt (4 µL) werden 7 µL des Mixes dazu gegeben (Endvolumen 11 µL).



Das in dieser Arbeit durchgeführte Sequenzier-Programm „MiniSEQ“ erfolgte nach dem in Tabelle 17 beschriebenen Protokoll.

**Tabelle 17:** Sequenzier-Programm „MiniSEQ“

Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl Zyklen
96	10 Sekunden	25
50	10 Sekunden	
60	30 Sekunden	
20	unendlich	-

Nach der Minisequenzierreaktion erfolgte die Aufreinigung (siehe Kapitel 5.2.3.3) und anschließende Vermischung mit dem Längenstandard GS120LIZ und Formamid.

**Tabelle 18:** Herstellung des Formamid-Standard-Mix

Substanz	Menge
HiDi-Formamid	9,5 µL
GS120LIZ	0,5 µL
dH <sub>2</sub> O	1,0 µL

*Zum aufgereinigten (siehe Kapitel 5.2.3.3) Minisequenzier-Produkt (1 µL) werden 10 µL des Mixes dazu gegeben (Endvolumen 11 µL) und 3 Minuten bei 94°C in einem Thermocycler denaturiert. Direkt im Anschluss wird das Reaktionsgefäß sofort für mind. 5 Minuten auf Eis gestellt.*

Nach Denaturierung und Kühlung erfolgte die Kapillargelelektrophorese und Laser-Detektion durch den 3730xl-96 DNA Analyzer der Fa. Applied Biosystems. Die Auswertung der DNA-Fragmentanalyse erfolgte mit Hilfe der GeneMapper® Software Version 3.2.1 (Applied Biosystems).

### 5.2.3.3 Aufreinigung von PCR- und Sequenzierungsprodukten

Um eine Sequenzierreaktion durchführen zu können, müssen störende Elemente (wie z.B. nicht-eingebaute Nukleotide und nicht-gebundene Primer) der vorangegangenen PCR-Reaktion entfernt werden. Dasselbe gilt vor der Kapillarelektrophorese von Sequenzierungsprodukten. Die Aufreinigung der PCR- und Sequenzierungsprodukte erfolgte durch die Magnetic-Bead-Technologie. PCR- oder Sequenzierungsprodukte binden an Magnetic-Beads, die durch einen Magneten immobilisiert werden. Nicht-eingebaute Nukleotide, überschüssige Reagenzien und nicht-gebundene Primer werden durch Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgt die Elution der PCR- oder Sequenzierungsprodukte von den Magnetic-Beads. Hierfür wurden das Gerät Biomek NX<sup>P</sup> von Beckman Coulter und die dazugehörigen Reagenzien Agencourt® AMPure® XP für PCR-Produkte und Agencourt® CleanSEQ® für Sequenzierungsprodukte verwendet und nach Standardprotokoll durchgeführt.

Allein für die Minisequenzierung wurde eine enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte mit Illustra™ ExoProStar™ 1-Step (GE Healthcare, Life Sciences) gewählt. Hierbei werden durch Zugabe von Enzymen (Exonuklease-I und Shrimp-Alkaline-Phosphatase) überschüssige Primer degradiert und nicht-eingebaute Nukleotide dephosphoryliert. Durch die Dephosphorylierung ist eine weitere Bindung der Nukleotide nicht mehr möglich. Eine anschließende Inaktivierung der Enzyme erfolgt thermisch bei einer hohen Temperatur.

Die enzymatische PCR-Aufreinigungsreaktion erfolgte in einem Thermocycler nach dem in Tabelle 19 beschriebenen Programm.

**Tabelle 19:** Programm „USB“

Temperatur [°C]	Zeit
37	15 Minuten
80	15 Minuten
20	unendlich

## **5.2.4 Indirekter Gentest**

### **5.2.4.1 Analyse gekoppelter Marker und ihre Historie**

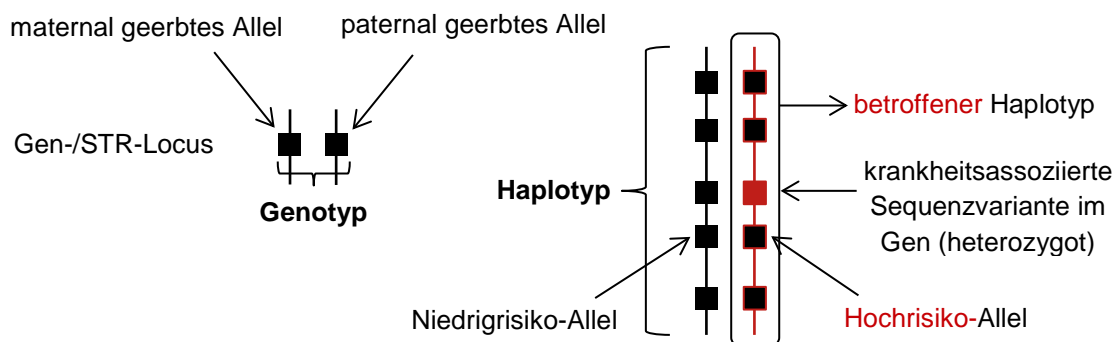
Aufgrund gewisser Risiken in der Einzelzell-PCR, bedient man sich in der PID einer zusätzlichen Strategie – dem indirekten Gentest. Dieser Test nutzt das Prinzip der genetischen Kopplung. Analysen gekoppelter Marker hat man sich bereits in der Forensik („genetischer Fingerabdruck“) und bei Abstammungsanalysen z.B. Frage nach der Vaterschaft zu Nutze gemacht. Zunehmend gewannen die Analysen gekoppelter Marker auch für die Diagnostik von monogenen Erkrankungen an Bedeutung, als ein direkter Gentest durch die Sequenzierung nach Sanger noch nicht möglich oder routinemäßig zu teuer war. Außerdem konnte man mithilfe von Analysen gekoppelter Marker krankheits-disponierende, jedoch bis dato unbekannte Gene regional zuordnen und identifizieren wie z.B. das BRCA1-Gen für den familiären Brustkrebs (Hall et al., 1990), indem man den genetischen Abstand zu einem bekannten Gen oder einer bekannten Gensequenz bestimmt und große, komplexe Stammbaumanalysen (Segregationsanalysen) durchgeführt hat.

Gene werden häufig gemeinsam (gekoppelt) vererbt, wenn sie auf dem gleichen Chromosom liegen (Morgan, 1910). Dieses Phänomen trifft vor allem auf Genorte (Gen-Loci) zu, die sehr dicht nebeneinander liegen und dadurch eine Trennung in der Meiose durch Crossing-over-Ereignisse (Rekombinationsvorgang) statistisch gesehen nicht möglich bzw. höchst unwahrscheinlich ist.

### **5.2.4.2 Geno-/Haplotypisierung (Phasenbestimmung) der Familie**

Genetische Marker (Mikrosatelliten), die an die spezifische Sequenzveränderung im Gen „gekoppelt“ sind, können im Falle eines ADO im direkten Gentest, als indirekter Nachweis in der PID dienen (J. C. Dreesen et al., 2000; Moutou et al., 2002). Somit wird nicht die krankheitsassoziierte Sequenzvariante selbst nachgewiesen, sondern die genetischen Marker (Mikrosatelliten), die an das betreffende Gen unmittelbar angrenzen. Die Ergebnisse der Marker-Analyse werden mit dem Gen-Lokus des Interesses jeder Person kombiniert. Somit kann in dieser Familie abgeleitet werden, auf welchem elterlichen Chromosom die Sequenzvariante liegt (Phasenbestimmung) und zusammen weitervererbt wird. Durch diese Art der Diagnostik kann auf das Vorhandensein oder Fehlen der Sequenzvariante beim Embryo geschlossen werden. Beim indirekten Gentest sind somit nur Wahrscheinlichkeitsaussagen möglich, deren Genauigkeit insbesondere von der Entfernung zwischen dem prädisponierenden Gen und Marker abhängt.

Da Menschen einen doppelten Chromosomensatz in jeder Zelle (Ausnahme Keimzellen) besitzen, können auf beiden homologen Chromosomen am betreffenden Genlocus entweder zwei unterschiedliche Allele (Ausprägungsform) eines Gens/Markers (heterozygot) vorhanden sein oder aber zwei identische Allele des betreffenden Gens/Markers (homozygot). Die zwei Allele eines Gen-/STR-Locus auf den beiden homologen Chromosomen bezeichnet man als Genotyp. Die gemeinsam vererbten, eng gekoppelten Loci auf einem Allel bilden den Haplotyp (Abkürzung von „haploider Genotyp“). In der PID wird der von der klinisch relevanten Sequenzvariante „betroffene Haplotyp“ (Hochrisiko-Haplotyp) bestimmt, der nicht weitervererbt werden soll. (siehe Abbildung 11)



**Abbildung 11:** Genotyp und Haplotyp

Mikrosatelliten sind 2 – 6 bp lange sich lückenlos, bis zu 100fach wiederholende Sequenzen – deshalb auch short tandem repeats (STR) genannt – und treten überall im Genom (intra- wie auch extragenisch) verstreut auf (Edwards et al., 1991; Litt & Luty, 1989). Die Wiederholungen des Sequenzmotivs an einem Mikrosatelliten/(STR)-Locus sind in ihrer Anzahl innerhalb der Bevölkerung hoch variabel (polymorph) (Huang et al., 1991; Weber & May, 1989). Daher ergibt die Analyse eines STR-Locus für jedes Individuum ein charakteristisches “Muster“. Folgende Darstellung soll als Veranschaulichung dienen.

Beispiel am STR-Locus D15S128:

**Person A:** Allele 1 (CACACA...CA)<sub>32</sub> und Allele 2 (CACACA...CA)<sub>50</sub>

à 32 und 50 Wiederholungen

**Person B:** Allele 1 (CACACA...CA)<sub>40</sub> und Allele 2 (CACACA...CA)<sub>48</sub>

à 40 und 48 Wiederholungen

Dies ist wichtig, damit zuerst einmal beide Allele einer Person genau differenziert werden können. Idealerweise sollten die potentiellen Eltern für die ausgewählten Marker jeweils vier verschiedene Allele aufweisen (voll-informative Marker). In Abhängigkeit von der zu

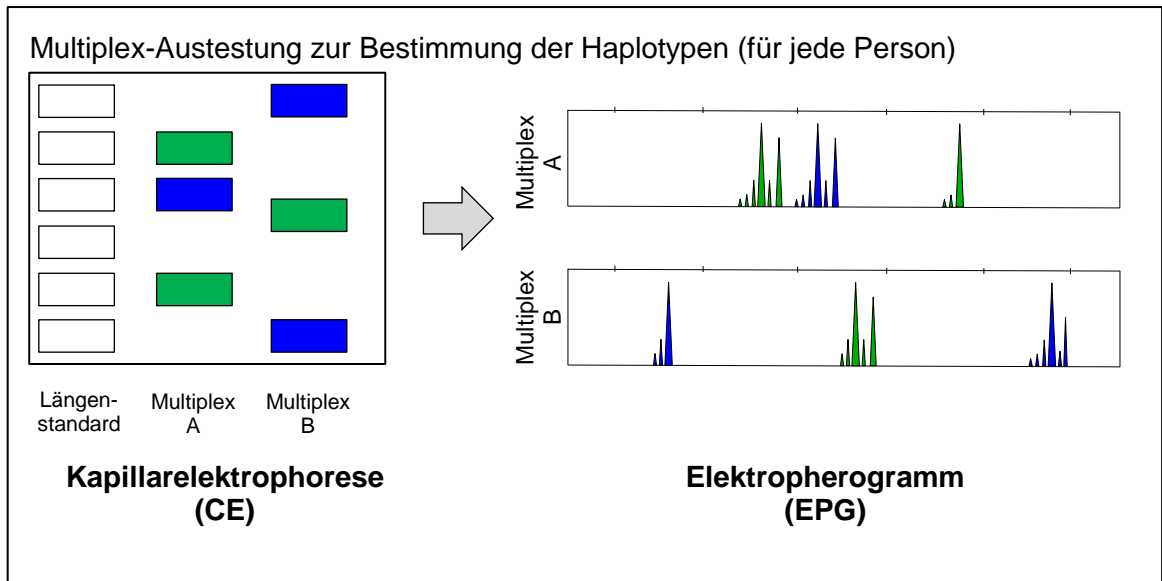
untersuchenden Familie sind diese optimalen Bedingungen jedoch nicht immer zu erzielen. Es ist möglich, dass genau an einem STR-Marker-Lokus die Wiederholungen beider Allele einer Person gleich lang und somit an dieser Stelle nicht diskriminierbar sind. Auch ist es möglich, dass sich zwei verschiedene Allelen eines Partners einer Allele oder beiden Allelen des anderen Partners gleichen. Diese STR-Marker werden dann als "nicht-informativ" bzw. "bedingt-informativ" bezeichnet, da man die Herkunft der vererbten Allele nicht sicher bestimmen kann.

Es erfolgt zunächst eine Phasenbestimmung betroffener und nicht-betroffener Familienmitglieder mit EDTA-Blutproben (Etablierung) und alle Mikrosatellitenmarker werden einzeln auf ihre Funktionsfähigkeit und deren Informationsgehalt geprüft, um das Vererbungsmuster in der Familie (Familienanamnese) zu bestimmen. Die ESHRE-Guidelines empfehlen mindestens je zwei informative STR-Marker proximal und distal der Sequenzvariante nicht weiter entfernt als ca. 1 Mb, zu analysieren, um das Risiko für Crossing-over-Ereignisse möglichst zu minimieren. (Harton et al., 2011a)

STR-Marker können einzeln analysiert werden, jedoch hat sich in der Einzelzell-Analyse der PID der PCR-Ansatz von mehreren Markern (Multiplex-PCR-Ansatz) unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen bewährt (J. C. Dreesen et al., 2000; Moutou et al., 2002).

Für die STR-Marker-Analyse kommt eine Fragmentlängenanalyse durch kapillarelektrophoretische Auftrennung zur Anwendung. Mit fluoreszenzmarkierten Primern wird pro STR-Marker eine PCR (siehe Kapitel 5.2.2.3) durchgeführt. Das PCR-Produkt wird dann verdünnt und für eine kapillarelektrophoretische Analyse vorbereitet. Dabei wird der Probe ein Größenstandard und Formamid hinzugefügt und es folgt ein Denaturierungsschritt bei hoher Temperatur mit anschließender Kapillarelektrophorese (CE). Die erhaltenen Farbausschläge im Elektropherogramm (EPG) zeigen mit Vergleich zum Längenstandard die Größe der PCR-Produkte bzw. die Länge der Fragmente. Hierbei können technisch bedingt die Fragment-Längen variieren, wenn unterschiedliche Sequenzier-Geräte oder ein Sequenzier-Gerät nach einer Wartung verwendet werden. Die Analyse erfolgt mit Hilfe eines Fragment-Auswerteprogramms. In der Regel wird der höchste Peak angewählt und als Allel benannt. Bei einer homozygoten Konstellation wird ein dominierender Peak erwartet, bei einer heterozygoten Konstellation zwei dominierende Peaks, wobei der kürzere Peak im Idealfall höher ist als der längere Peak. Eine schematische Darstellung wird in Abbildung 12 gegeben.

Zu jedem STR-Marker können die Anzahl der Wiederholungen des Basenpaarmotivs auf beiden Allelen in Form von zwei Zahlen angegeben werden. Dies ist jedoch nur eine triviale Benennung. In dieser Arbeit wurden pro Marker zwei Zahlen angegeben, die für die Größen der PCR-Produkte (Fragmente) stehen.



**Abbildung 12:** Detektion und Fragmentlängenanalyse durch Kapillarelektrophorese (CE)

In dieser Arbeit wurden insgesamt acht Mikrosatelliten (alle extragenisch = außerhalb des betreffenden Gens liegend) als Marker ausgewählt, davon vier proximal und vier distal des betreffenden Gens *COL1A1*. Zunächst waren dies sieben Marker und anschließend noch ein weiterer Marker (siehe Tabelle 2: STR1, STR2, D17S588, D17S1319, STR5, D17S1869, STR7 und STR8), die einzeln und in verschiedenen Multiplex-Ansätzen mittels PCR und anschließender Fragmentlängenanalyse ausgetestet wurden.

**Tabelle 20:** Verwendete Mikrosatelliten-/STR-Marker und ihre Entfernung zur Sequenzvariante

STR-Marker	Entfernung zur Sequenzvariante im <i>COL1A1</i> -Gen [Mb]
STR1	0,109040
STR2	0,061021
D17S588	0,051372
D17S1319	0,020173
c.2700delT	0
STR5	0,113312
D17S1869	0,272304
STR7	0,374572
STR8	0,381051

Nicht-informative STR-Marker nach der Einzel-Austestung (in Tabelle 20 grau hinterlegt) kamen in der Multiplex-Austestung nicht zum Einsatz. Informative und bedingt-informative STR-Marker wurden in je drei Primerpaaren im Multiplex-PCR-Ansatz (Triplex-PCR) kombiniert. Die Forward-Primer sind jeweils mit einem Fluoreszenzfarbstoff (siehe Tabelle 2) markiert. Die folgende Tabelle 21 und Tabelle 22 geben eine Übersicht der Multiplexaustestungen.

**Tabelle 21:** Austestungen der "Multiplex-Ansätze A und B" – Version 1

<b>Multiplex-Ansatz</b>	<b>STR-Marker</b>	<b>erwarteter Farbausschlag</b>	<b>erwartete Fragmentgröße[bp]</b>
A	D17S588	grün	154
	STR5	blau	165
	STR1	grün	223
B	STR7	blau	121
	STR8	grün	212
	D17S1869	blau	330

**Tabelle 22:** Austestungen der "Multiplex-Ansätze A und B" – Version 2

<b>Multiplex-Ansatz</b>	<b>STR-Marker</b>	<b>erwarteter Farbausschlag</b>	<b>erwartete Fragmentgröße [bp]</b>
A	D17S588	grün	154
	STR5	blau	165
	STR8	grün	212
B	STR7	blau	121
	STR1	grün	223
	D17S1869	blau	330

Nach der PCR-Reaktion (siehe Kapitel 5.2.2.3, Tabelle 11 und Tabelle 13) erfolgte eine 1:10-Verdünnung (2 µL + 18 µL) des PCR-Produkts und die anschließende Vermischung mit dem Längenstandard GS500Rox und Formamid.

**Tabelle 23:** Herstellung des Formamid-Standard-Mix

Substanz	Menge
HiDi-Formamid	24 µL
GS500Rox	1,5 µL

Zum verdünnten PCR-Produkt (1 µL) werden 12 µL des Mixes dazu gegeben (Endvolumen 13 µL) und 3 Minuten bei 94°C in einem Thermocycler denaturiert. Direkt im Anschluss wird das Reaktionsgefäß sofort für mind. 5 Minuten auf Eis gestellt.

Nach Denaturierung und Kühlung erfolgte die Kapillargelelektrophorese und Laser-Detektion durch den 3730xl-96 DNA Analyzer (16-Kapillar) oder 3130 Genetic Analyzer (4-Kapillar) der Fa. Applied Biosystems. Die Auswertung der DNA-Fragmentanalyse erfolgte mit Hilfe der GeneMapper® Software Version 3.2.1 (Applied Biosystems).

Zur Beurteilung und Abgrenzung von Allele-Drop-Out (ADO) und Preferential Amplification (PA) wurden die minimalen bzw. maximalen Peakhöhen (Intensität) festgelegt:

Minimale Peakhöhe: >150 bei heterozygoten- und >300 bei homozygoten Peaks

Maximale Peakhöhe: <6000

Als ADO wird das Fehlen eines von zwei erwarteten Peaks bezeichnet. Als PA wird bezeichnet, wenn das Verhältnis kürzerer Peak zu längerem Peak die Hälfte der Höhe des längeren Peaks beträgt (Verhältnis 1:2 der Höhe des längeren Peaks). Mit kürzerem bzw. längerem Peak ist die Fragmentlänge der PCR-Produkte gemeint.

Waren die Peakhöhen zu niedrig bzw. zu hoch, musste die Fragmentanalyse mit mehr PCR-Produkt- bzw. weniger PCR-Produkt-Mengen wiederholt werden. Führten die Maßnahmen nicht zu einem befriedigenden Ergebnis, musste der komplette Ansatz ab der PCR ggf. mit variierenden DNA-Template-Mengen oder einer Umstellung (andere Primerpaar-Kombination) der Multiplexe wiederholt werden.

Die nachgewiesenen Allele des Indexpatienten wurden mit den elterlichen Allelen und den Allelen der Ehefrau verglichen. Es wurden die Haplotypen ermittelt, die jeweils mit und ohne die Deletion im *COL1A1*-Gen kosegregieren (betroffener und nicht betroffener Haplotyp) (siehe Kapitel 6.1.3 Abbildung 21).

Zur Validierung des gesamten Testsystems auf Einzelzell-Ebene wurden die Multiplex-Analysen noch mit Wangenschleimhautzellen (WSZ) des Indexpatienten und mit Wangenschleimhautzellen einer Referenzperson durchgeführt. Die Ergebnisse der Fragmentanalyse des Indexpatienten wurden mit den Ergebnissen der Etablierung verglichen.



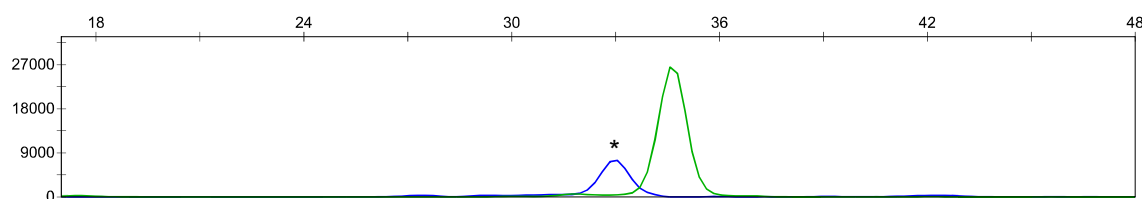
## 6 ERGEBNISSE

### 6.1 Ergebnisse der Etablierung

Für die Etablierung des Testsystems wurden im ersten Schritt EDTA-Blutproben des Indexpatienten, seiner Ehefrau und seiner Eltern auf die genetische Sequenzveränderung c.2700delT, p.(Ala901Leufs\*207) im Exon 39 des *COL1A1*-Gens untersucht (direkter Gentest). Parallel dazu erfolgte eine Genotypisierung flankierender gekoppelter Marker in den genannten Personen sowie die Identifizierung des betroffenen Haplotypen (indirekter Gentest).

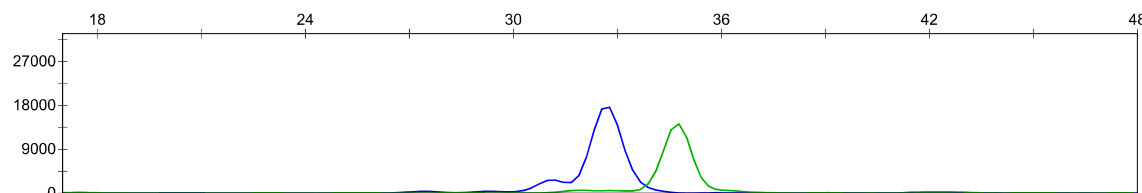
#### 6.1.1 Direkter Gentest mit Minisequenzierung

Für den direkten Gentest wurde zunächst eine Minisequenzierung gemäß Kapitel 5.2.3.2 durchgeführt. In Abbildung 13 und Abbildung 14 sind repräsentative Ergebnisse für einen homozygoten Wildtyp und einen heterozygoten Variantenträger dargestellt.



**Abbildung 13:** Elektropherogramm der Minisequenzierung vom Vater des Indexpatienten als Negativkontrolle (homozygot Wildtyp)

\* unspezifischer Peak, wird in Kapitel 7.2.4 näher erläutert



**Abbildung 14:** Elektropherogramm der Minisequenzierung vom Indexpatienten (heterozygot)

Kontaminationen konnten in der Negativkontrolle nicht festgestellt werden.

### 6.1.2 Direkter Gentest mit Sanger-Sequenzierung

Nachdem eine Unterscheidung zwischen homozygotem Wildtyp und heterozygotem Variantenträger durch die Minisequenzierung nicht möglich war, kam eine klassische Sequenzierung nach Sanger zum Einsatz. In Abbildung 15 und Abbildung 16 sind repräsentative Ergebnisse für einen homozygoten Wildtyp und einen heterozygoten Variantenträger dargestellt.

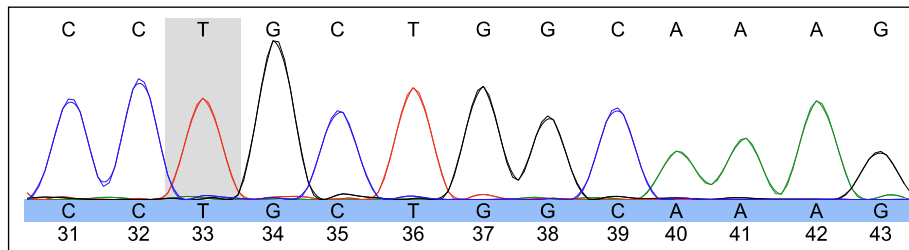


Abbildung 15: Chromatograph der Ehefrau des Indexpatienten mit homozygoter Wildtyp-Konstellation

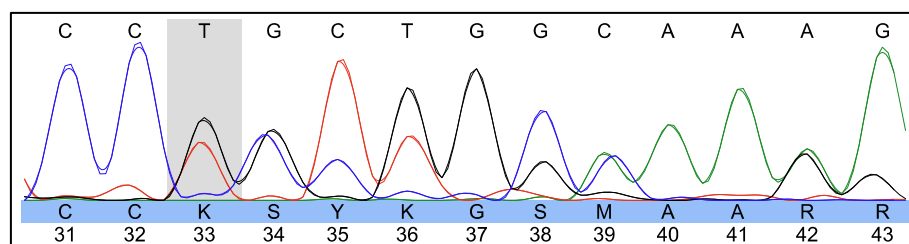


Abbildung 16: Chromatograph des Indexpatienten mit heterozygoter Sequenzvariante *COL1A1* c.2700delT  
Die Sequenzveränderung c.2700delT im *COL1A1*-Gen konnte beim Indexpatienten und seiner Mutter bestätigt werden.

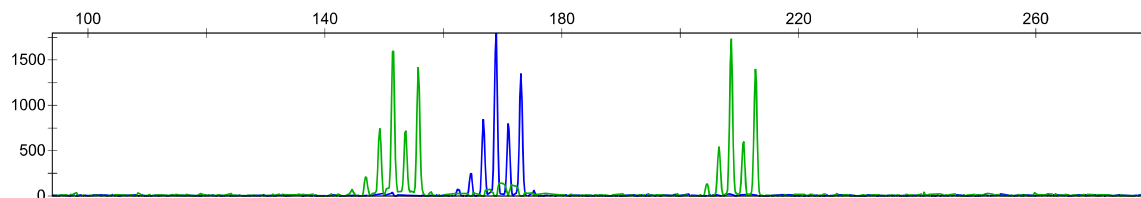
### 6.1.3 Indirekter Gentest mit Mikrosatelliten-Analyse

Für den indirekten Gentest wurde eine Genotypisierung flankierender gekoppelter Marker mittels Mikrosatelliten-Analyse gemäß Kapitel 5.2.4.2 durchgeführt. Von den initial untersuchten STR-Markern konnten vier STR-Marker als „bedingt-informativ“ sowie ein STR-Marker als „informativ“ identifiziert werden. Zwei STR-Marker waren „nicht-informativ“, da der Indexpatient bei beiden Markern je zwei gleiche Allelen aufwies und somit eine Unterscheidung des Hochrisiko-Allels nicht möglich wäre beim Embryo.

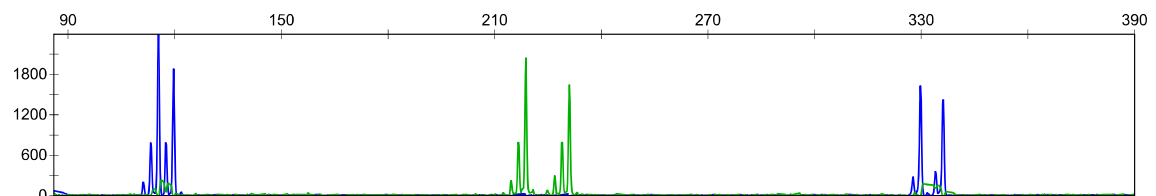
Darauffolgend wurde noch ein zusätzlicher STR-Marker getestet und als "informativ" identifiziert. Die Allele, die in dieser Familie vorkommen, sind mit Aussage über ihre Informativität und deren Entfernung zur Sequenvariante c.2700delT im *COL1A1*-Gen in Tabelle 24 dargestellt.

Im Anschluss wurden informative und bedingt-informative Mikrosatelliten-Marker in verschiedenen Multiplex-PCR-Ansätzen getestet (siehe Kapitel 5.2.4.2, Tabelle 21 und Tabelle 22).

In Abbildung 17 und Abbildung 18 sind repräsentative Ergebnisse für die Multiplex-Ansätze A und B der Version 2 (siehe Tabelle 22) mit je drei Mikrosatellitenmarkern des Indexpatienten dargestellt. Die Ergebnisse der Genotypisierung sind in Tabelle 24 und die Identifizierung des betroffenen Haplotypen sind in Abbildung 21 dargestellt.



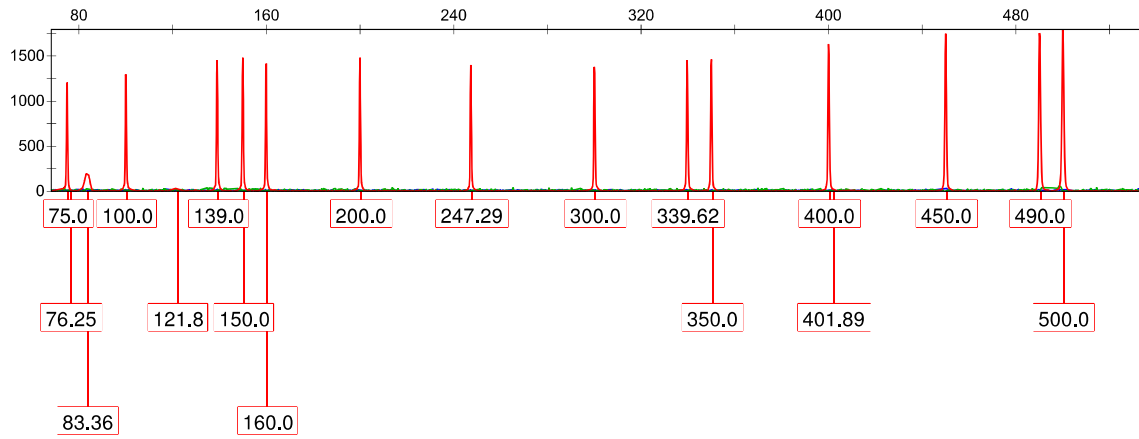
**Abbildung 17:** Elektropherogramm der Fragmentanalyse vom Multiplex-Ansatz A des Indexpatienten



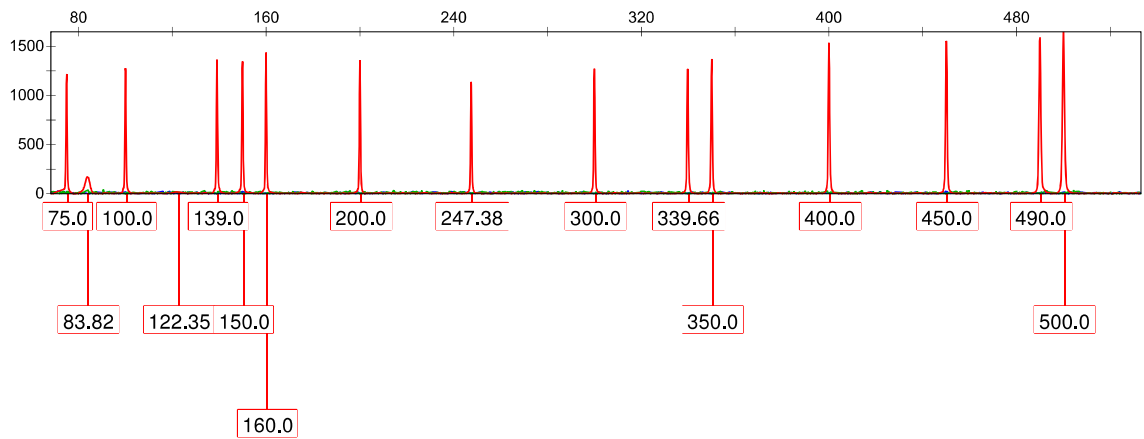
**Abbildung 18:** Elektropherogramm der Fragmentanalyse vom Multiplex-Ansatz B des Indexpatienten

In der Mikrosatelliten-Analyse der EDTA-Blutproben (Etablierung des indirekten Gentests) konnten keine Allele-Drop-Outs (ADOs) festgestellt werden.

Die Negativ-Kontrollen der beiden Multiplex-Ansätze A und B sind in der Abbildung 19 und Abbildung 20 mit dem Längenstandard GS500Rox dargestellt. Kontaminationen konnten in den Negativ-Kontrollen nicht festgestellt werden.



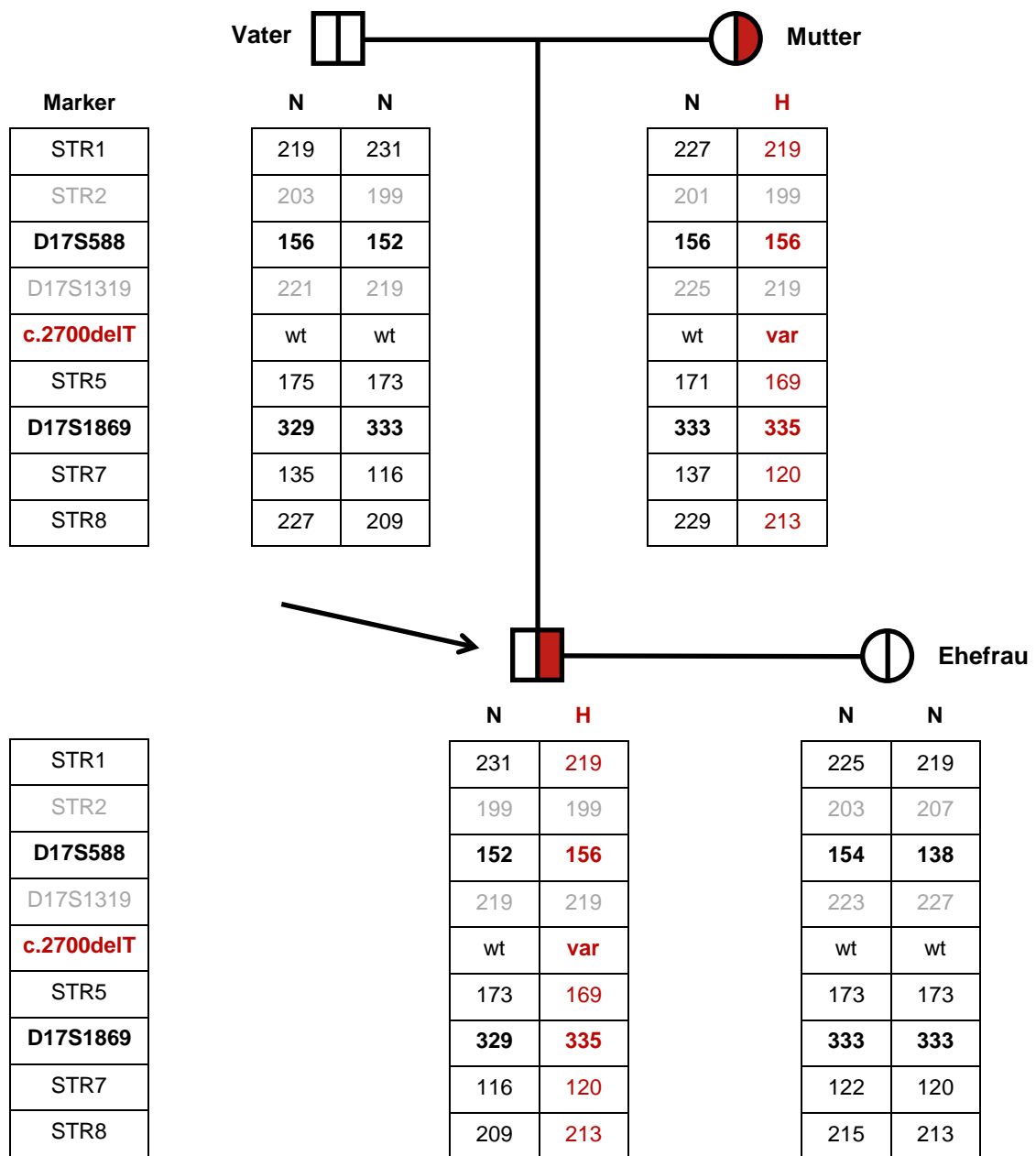
**Abbildung 19:** Elektropherogramm der Negativ-Kontrollen-Fragmentanalyse vom Multiplex-Ansatz A



**Abbildung 20:** Elektropherogramm der Negativ-Kontrollen-Fragmentanalyse vom Multiplex-Ansatz B

**Tabelle 24:** Genotypisierung mittels Mikrosatelliten-Analyse in der Familie und Bestimmung der Informativität der STR-Marker

STR-Marker	Entfernung zur Sequenzvariante c.2700delT im COL1A1-Gen [Mb]	Relative Lokation zur Sequenzvariante c.2700delT	Vater	Mutter	Indexpatient	Ehefrau	Informativität der STR-Marker
STR1	0,109040	upstream	219/231	219/227	219/231	219/225	bedingt-informativ
STR2	0,061021	upstream	199/203	199/201	<b>199/199</b>	203/207	<b>nicht-informativ</b>
D17S588	0,051372	upstream	152/156	156/156	<b>152/156</b>	<b>138/154</b>	<b>informativ</b>
D17S1319	0,020173	upstream	219/221	219/225	<b>219/219</b>	223/227	<b>nicht-informativ</b>
STR5	0,113312	downstream	173/175	169/171	169/173	173/173	bedingt-informativ
D17S1869	0,272304	downstream	329/333	333/335	<b>329/335</b>	<b>333/333</b>	<b>informativ</b>
STR7	0,374572	downstream	116/135	120/137	116/120	120/122	bedingt-informativ
STR8	0,381051	downstream	209/227	213/229	209/213	213/215	bedingt-informativ



**Legendenschlüssel (autosomal-dominanter Erbgang)**

###	bedingt-informatives Allel	<b>H</b>	Hochrisiko-Haplotyp
###	nicht-informatives Allel	<b>N</b>	Niedrigrisiko-Haplotyp
###	informatives Allel	wt	Wildtyp
###	Hochrisiko-Allel	<b>var</b>	Sequenzvariante

**Abbildung 21:** Haplotypisierung der Familie mit bekannter heterozygoter Sequenzvariante *COL1A1* c.2700delT

In dieser Abbildung ist der Familienstammbaum mit Indexpatient (mit Pfeil gekennzeichnet), seinen Eltern und seiner Ehefrau dargestellt; rote Füllfarbe: von der Sequenzvariante betroffene Individuen (heterozygot), ohne rote Füllfarbe: nicht-betroffene Individuen.

## 6.2 Ergebnisse der Validierung

Für die Validierung des Testsystems wurden im zweiten Schritt achtzehn Einzelzell-Proben (Wangenschleimhautzellen, WSZ) des Indexpatienten auf die Osteogenesis imperfecta-assoziierte Sequenzveränderung c.2700delT, p.(Ala901Leufs\*207) im Exon 39 des *COL1A1*-Gens untersucht (direkter Gentest).

Ergänzend wurde an fünfzehn Einzelzell-Proben eine Mikrosatelliten-Analyse durchgeführt (indirekter Gentest). Zusätzlich erfolgte eine Mikrosatelliten-Analyse an fünf Einzelzell-Proben (Wangenschleimhautzellen) einer Kontrollperson als Einzelzell-Kontrolle.

### 6.2.1 Direkter Gentest mit Sanger-Sequenzierung

Für den direkten Gentest wurde eine klassische Sequenzierung nach Sanger gemäß Kapitel 5.2.3.1 durchgeführt. In Abbildung 22 ist ein repräsentatives Ergebnis einer Einzelzell-Probe für die heterozygote Sequenzvariante *COL1A1* c.2700delT des Indexpatienten dargestellt. In der Sequenzierung konnten fünfzehn der achtzehn Einzelzell-Proben amplifiziert werden. Von den fünfzehn Proben konnten in Vier die heterozygote Sequenzvariante c.2700delT und ebenso in Vier die Wildtypsequenz nicht nachgewiesen werden, was auf einen technisch bedingten Allele-Drop-Out (ADO) zurückgeführt werden kann. Das ADO wird in Kapitel 7.2.1 näher erläutert. Abbildung 23 und Abbildung 24 zeigen repräsentative Allele-Drop-Outs jeweils einer Einzelzell-Probe des Indexpatienten.

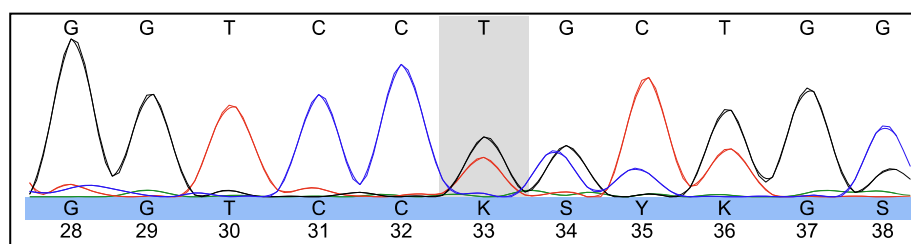


Abbildung 22: Chromatograph mit heterozygoter Sequenzvariante *COL1A1* c.2700delT (Indexpatient)

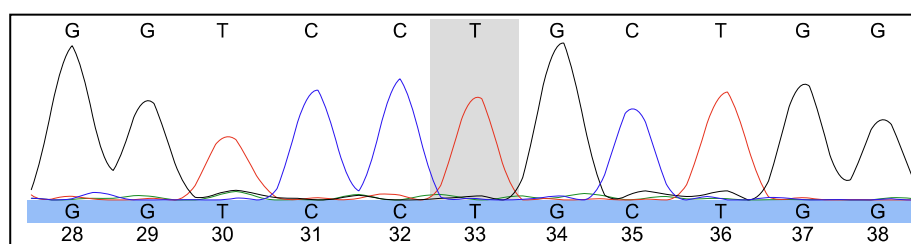


Abbildung 23: Chromatograph mit ADO der Sequenzvariante *COL1A1* c.2700delT (Indexpatient)

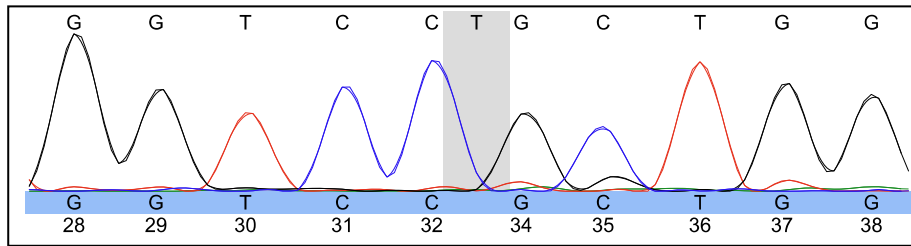


Abbildung 24: Chromatograph mit ADO der Wildtypsequenz (Indexpatient)

### 6.2.2 Indirekter Gentest mit Mikrosatelliten-Analyse

Für den indirekten Gentest wurde eine Mikrosatelliten-Analyse gemäß Kapitel 5.2.4.2 durchgeführt. In Abbildung 25, Abbildung 26 und Abbildung 27 sind repräsentative Ergebnisse für den Multiplex-Ansatz A (MPA) der Version 2 (siehe Tabelle 22) mit je drei Mikrosatellitenmarkern des Indexpatienten dargestellt. Die Ergebnisse der Analyse für den Indexpatienten sowie der Kontrollperson sind in Tabelle 25 dargestellt.

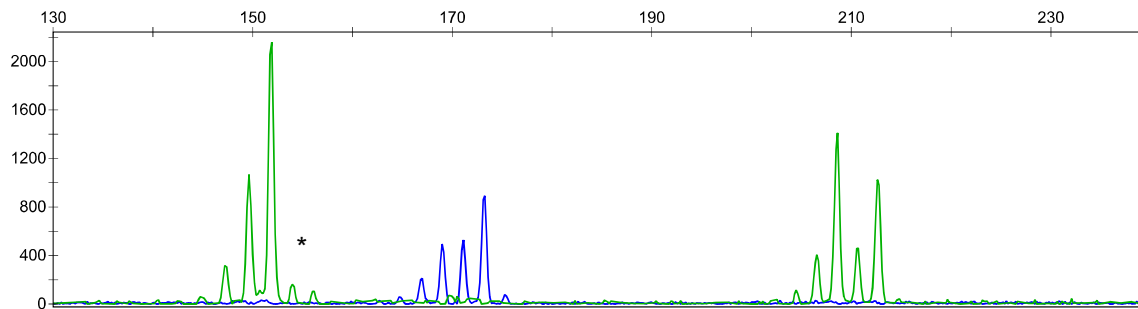
In der Einzelzell-Analyse (Wangenschleimhautzellen/WSZ) des indirekten Gentests beider Personen (Indexpatient und Kontrollperson) konnten in den Negativkontrollen keine Kontaminationen, jedoch mehrere Allele-Drop-Outs (siehe folgende beispielhafte Abbildungen mit \* gekennzeichnet) und komplette Analyseausfälle beim Indexpatienten festgestellt werden (siehe Abbildung 27).

Tabelle 25: Mikrosatelliten-Analyse des Indexpatienten und der Kontrollperson mit zugehörigen ADO-Raten

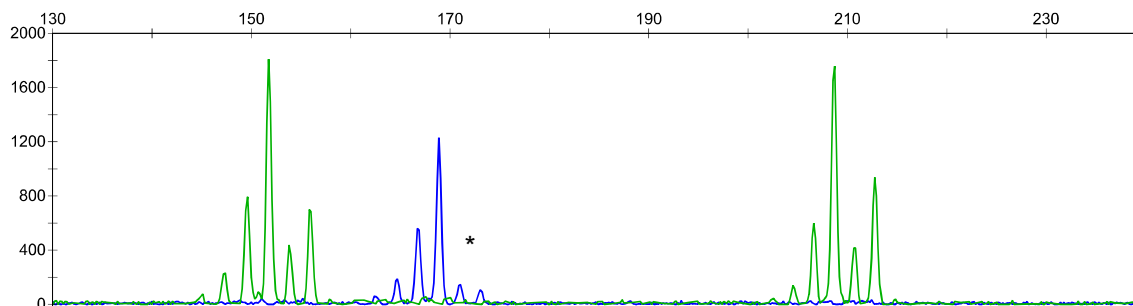
Haplotyp	Indexpatient					Kontrollperson				
	N	H	Zellen	davon ADO	ADO-Rate (%)			Zellen	davon ADO	ADO-Rate (%)
STR1	231	219	15	3	10,0	219	225	5	0	0,0
D17S588	152	156	15	3	10,7	156	156	5	*	*
STR5	173	169	15	9	30,0	163	171	5	0	0,0
D17S1869	329	335	15	2	6,7	334	334	5	0	0,0
STR7	116	120	15	3	10,0	118	122	5	*	*
STR8	209	213	15	4	13,3	211	215	5	0	0,0

\* = da homozygot in diesem Allel → ADO und ADO-Rate nicht beurteilbar

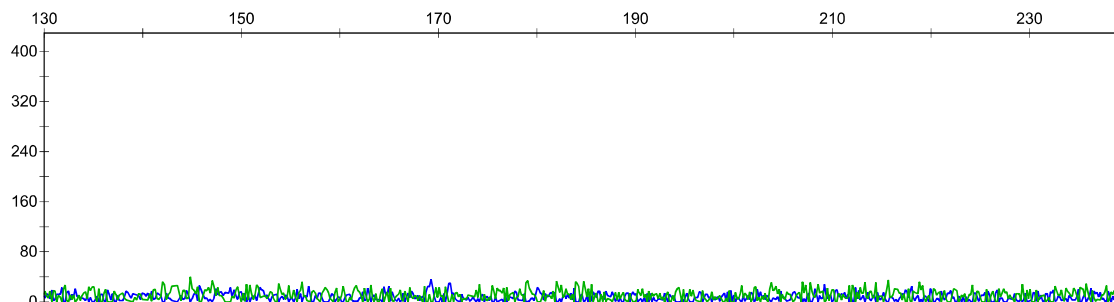




**Abbildung 25:** Elektropherogramm der Fragmentanalyse vom MPA des Indexpatienten (WSZ1)



**Abbildung 26:** Elektropherogramm der Fragmentanalyse vom MPA des Indexpatienten (WSZ2)



**Abbildung 27:** Kompletter Analyseausfall der Fragmentanalyse vom MPA des Indexpatienten (WSZ3)

Da die Ergebnisse der Etablierung (DNA aus EDTA-Blut) und Validierung (DNA aus Wangenschleimhaut-Zellen) für den Indexpatienten übereinstimmen, wurde das direkte und indirekte Testsystem zur klinischen Anwendung an TE-Zellen in dieser Familie freigegeben.

Die Ergebnisse dieser Dissertation waren Bestandteil der Poster-Präsentation auf dem 2. CoGEN-Kongress in Barcelona September 2016.

## 7 DISKUSSION

### 7.1 Erfolgreiche Anwendung des Testsystems

Die Herausforderung bei Anwendung einer PID besteht vor allem darin, dass jeweils nur wenige Trophektodermzellen für die genetische Analyse zur Verfügung stehen. Das heißt, das Untersuchungsergebnis kann nicht an einer zweiten Probe überprüft werden. Dies stellt sehr hohe Anforderungen an die Untersuchungsmethoden, da hohe Risiken für Kontaminationen und Analyseausfälle (z.B. durch Allele-Drop-Out, ADO) bestehen, wobei das ADO eine Sonderherausforderung darstellt (siehe auch Kapitel 5.2.4.2 und 7.2.1). (Moutou et al., 2002)

Aus diesem Grund muss ein PID-Assay robust, zuverlässig und reproduzierbar sein (J. Dreesen et al., 2014). Dabei haben ein akkurates Arbeiten, sowie eine hohe Qualität der Diagnostik höchste Priorität. Die European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) hat 2010 eine Leitlinie veröffentlicht. In dieser Leitlinie wird die Durchführung der PID durch einen kombinierten direkten und indirekten Gentest empfohlen. Durch Kombination beider Verfahren (direkte und indirekte Gendiagnostik) gemäß der ESHRE-Guidelines lässt sich die diagnostische Sicherheit und Erfolgswahrscheinlichkeit der PID maximal erhöhen. Für monogene Erkrankungen wurden in der PID bisher vorwiegend Testsysteme eingesetzt, die auf der Analyse flankierender gekoppelter Marker basieren (indirekte Gendiagnostik). Der direkte Nachweis der familienspezifischen, krankheitsrelevanten Sequenzveränderung im Gen erhöht zwar den technischen Aufwand im Rahmen der PID-Testetablierung, gilt jedoch in Kombination mit dem indirekten Nachweis nach wie vor als Goldstandard. (Harton et al., 2011a) Neu überarbeitete ESHRE-Guidelines für die PID werden im Jahr 2020 erwartet. Diese Arbeit hat die ESHRE-Leitlinien berücksichtigt und ermöglichte eine PID-Diagnostik bei nachfolgend zehn gewonnenen Blastozysten (siehe Tabelle 26). Die Hälfte dieser Blastozysten konnte von der Sequenvariante c.2700delT im *COL1A1*-Gen als unbetroffen identifiziert werden. Diese von der klinisch relevanten Krankheitsvariante nicht-betroffenen Blastozysten wurden anschließend zusätzlich auf Aneuploidien und andere chromosomale Aberrationen mittels 24sure Microarray von Illumina untersucht, um die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Schwangerschaft zu erhöhen. Das Paar verließ sich auf die PID und das Aneuploidie-Screening und verzichtete in der Folge auf eine zusätzliche anschließende Pränataldiagnostik.

Aus dem ersten Transfer einer variantenfreien und euploiden Blastozyste resultierte keine Schwangerschaft. Der zweite Transfer einer variantenfreien und euploiden Blastozyste führte zur Schwangerschaft und am 16.08.2015 zur Geburt eines gesunden Kindes.

Bei Blastozysten Nr. 01 und 04 wurden mit Zustimmung des Paares eine Re-Biopsie und eine Re-Analyse durchgeführt. Dabei konnten die primären Ergebnisse bestätigt werden.

**Tabelle 26:** Re-Analyse von nicht-transferierten betroffenen Blastozysten

Blastozyst-Biopsien	PID	Aneuploidie-Testung	Transfer	Schwangerschaft	Re-Analyse
01	x				bestätigt
02	à	x			-
03	à	à	à	x	-
04	x				bestätigt
05	à	à	à	à	-
06	à	à	Pause		-
07	x				-
08	à	x			-
09	x				-
10	x				-

In dieser Tabelle kennzeichnet in der Spalte „PID“ ein rotes Kreuz einen von der Sequenzvariante betroffenen Blastozysten und ein grüner Pfeil bedeutet einer von der Sequenzvariante unbetreffenen (variantenfreien) Blastozysten. In der Spalte „Aneuploidie-Testung“ bedeutet ein rotes Kreuz der Nachweis einer Aneuploidie, sowie ein grüner Pfeil kein Nachweis einer Aneuploidie. In der Spalte „Transfer“ kennzeichnet ein grüner Pfeil einen stattgefundenen Transfer. In der Spalte „Schwangerschaft“ kennzeichnet ein rotes Kreuz keine resultierende Schwangerschaft, ein grüner Pfeil eine resultierende Schwangerschaft.

## 7.2 Technische Grenzen des Testsystems

In den nachfolgenden Kapiteln werden die technischen Grenzen und die Aussagekraft der angewendeten Methoden diskutiert. Diese Grenzen sind die Gründe, warum eine PID die Wahrscheinlichkeit des Auftretens der familiären Erkrankung bei dem in Frage stehenden Kind nur stark absenken, aber nie vollständig ausschließen kann.

### 7.2.1 Allele-Drop-Out in MDA oder PCR

Bei der DNA-Amplifikation von Einzelzellen können besondere Fehlerquellen auftreten. Diese stellen insbesondere das methodisch unvermeidbare Allele-Drop-Out (ADO) sowie dessen Sonderform die Preferential Amplification (PA, dt. präferierte Amplifikation eines Allels) dar. Zudem können auch komplette Amplifikationsausfälle auftreten. (Wilton et al., 2009)

Beim ADO wird eines der beiden Allele während der PCR nicht amplifiziert und demzufolge nicht detektiert. Hierdurch kann in der Diagnostik fälschlicherweise ein homozygoter Wildtyp Allel-Träger angenommen werden, obwohl möglicherweise ein heterozygoter varianter Allel-Träger vorliegt. (Ray & Handyside, 1996)

Gerade bei autosomal-dominanten Erkrankungen wie z.B. Osteogenesis imperfecta stellt das ADO ein hohes Risiko für eine Fehldiagnose dar. Wenn nur die familiär bekannte Sequenzvariante analysiert wird, führt ein ADO bei einem heterozygoten Embryo zu einer Fehldiagnose beim direkten Gentest (Harper et al., 2002).

Daher ist eine zusätzliche indirekte Analyse von gekoppelten Markern als Ergänzung zum direkten Nachweis der Sequenzvariante notwendig (Thornhill & Snow, 2002). Die Kombination beider Verfahren gilt bis dato als Goldstandard monogener PID (Harton et al., 2011a). Sollten aufgrund eines ADO die Ergebnisse der direkten und indirekten Analytik nicht übereinstimmen, müssen alle Analyte einzeln betrachtet werden. Ein ADO bei einem einzelnen Mikrosatelliten gefährdet nicht die Aussagekraft der gesamten Analyse. Falls beim direkten Nachweis ein Verdacht auf ADO besteht, die Mikrosatelliten-Analyse jedoch eindeutige Ergebnisse liefert, können die Mikrosatelliten als alleiniger indirekter Nachweis der Variante dienen. Eine Verbesserung der ADO-Raten kann erzielt werden durch neue Primer-Designs in Kombination mit einer Erhöhung der Denaturierungstemperatur (Alsmadi et al., 2009; Ray et al., 1996). Das ADO-Phänomen stellt weltweit nach wie vor ein technisches Problem der Methode dar. Laut Literaturangaben kann in der Einzelzelldiagnostik die Wahrscheinlichkeit für einen technisch-bedingten ADO bis zu 25% betragen. Die Anzahl der in dieser Arbeit beobachteten ADOs liegt im akzeptablen Rahmen (Harton et al., 2011a).

### **7.2.2 Rekombination zwischen Markern**

Beim indirekten Gentest mittels Mikrosatelliten-Analyse muss neben dem Allele-Drop-Out die Rekombination als weitere Fehlerquelle betrachtet werden. Die Rekombination beschreibt das „Entkoppeln“ zweier Loci (z.B. Gene oder Marker) durch meiotische Crossing-over Ereignisse, die auf dem gleichen Chromosom liegen.

Eine Rekombination wird nur selten zwei Loci trennen, die auf einem Chromosom dicht beieinander liegen. Deshalb werden Gruppen von Allelen, die auf demselben kurzen Chromosomenabschnitt liegen, eher zusammen als Block (Haplotyp) an die nächste Generation weitergegeben. Je weiter die beiden Loci auf einem Chromosomen voneinander liegen, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie durch eine Rekombination voneinander getrennt werden.

Statistisch gesehen, ist eine Rekombination höchst unwahrscheinlich, wenn zwei Mikrosatelliten in einer Entfernung von kleiner gleich 1 Mb liegen. Die Rekombinationswahrscheinlichkeit pro Meiose innerhalb 1 Mega-Basenpaare beträgt ca. 1 % entsprechend 1 centiMorgan. Mit dieser Wahrscheinlichkeit wird zwischen den beiden Markern eine Rekombination auftreten. Um diese Fehlerquelle zu minimieren, wurden Mikrosatellitenmarker in Multiplex-PCR-Ansätzen analysiert. Je drei Marker flankieren die Sequenzvariante c.2700delT des *COL1A1*-Gens in einer Entfernung von max. 0,38 Mb.

Der Einsatz von Multiplex-PCR-Ansätzen in der Einzelzell-Analyse der PID unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen dient als interne Kontrolle für Allele-Drop-Outs des Krankheitsallels sowie für Kontaminationen und Rekombinationen (Rechitsky et al., 1998; Wu et al., 1993). Der indirekte Gentest kann aber immer nur Wahrscheinlichkeitsaussagen liefern und sollte daher wenn möglich in Kombination mit einem direkten Gentest erfolgen. (Harton et al., 2011a)

### **7.2.3 Nicht-informative Marker oder Mangel an Markern**

Bei der Analyse gekoppelter Marker werden für beide Partner informative STR-Marker möglichst auf beiden Seiten der klinisch-relevanten Sequenzvariante und in möglichst geringem Abstand gesucht, wobei voll-informative Marker (alle 4 Allele beider Partner diskriminierbar) vorzuziehen sind. In Abhängigkeit von der familiären Konstellation sind diese optimalen Bedingungen jedoch nicht immer zu erreichen. Zum einen ist es möglich, überhaupt keine oder nicht genügend brauchbare Marker in der Nähe der Sequenzvariante zu finden. Oder aber die verwendeten Marker sind in der Anzahl ausreichend, jedoch nicht informativ genug. Dies trifft häufig auf konsanguine Familien zu, da ihre Allele von gemeinsamen Vorfahren stammen. Bei diesen Familien kann eine

PID trotzdem möglich sein, nur ADO-Ereignisse werden nicht in jedem Fall erkannt. Dies muss in der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

### 7.2.4 Primer-Dimere

In der Etablierungsphase wurden geeignete Multiplex-PCR-Ansätze erstellt. Von den amplifizierten STR-Markern im Multiplex-Ansatz B (Version 1) konnten nicht die notwendigen Intensitäten erreicht werden. STR-Marker 8 zeigte eine zu niedrige Intensität. Optimierungsversuche durch Änderung der Primer-Konzentrationen brachten keine Verbesserung. Hier wird eine Bildung von Primer-Dimeren während der Multiplex-PCR vermutet.

Primer-Dimere können auftreten, wenn neben der spezifischen Bindungsfähigkeit an die Ziel-DNA-Struktur, diese untereinander aufgrund ihrer komplementären Sequenz auch eine unspezifische Bindung eingehen können. Somit sind für die Ziel-DNA selbst während der PCR nicht genug Primer vorhanden, was sich auf die PCR-Produktkonzentration und damit auch auf die Peak-Intensität auswirkt. (Rychlik, 1995)

Abbildung 28 zeigt ein Beispiel für Primer-Dimer-Kombinationsmöglichkeiten der STR8- und D17S1869-Primer in der Multiplex-B-PCR der Etablierungsphase. Mögliche Primer-Dimere wurden durch das *IDT-Programm* (website-tool - <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) analysiert. Es erfolgte eine erfolgreiche Umstellung der Multiplex-A- und Multiplex-B-PCR (siehe Tabelle 21 und Tabelle 22).

Primary Sequence			
5' -	CTTCCTTAGGCCAIGTGTGATT -3'	Delta G	-4.67 kcal/mole
		Base Pairs	3
Secondary Sequence			
5' -	AGGGACCAGGTTTCCTAGAGAG -3'	5'	CTTCCTTAGGCCAIGTGTGATT
			::
		3'	GAGAGATCCTTTGGACCAGGGA
Maximum Delta G -40.72 kcal/mole			
Delta G	-5.63 kcal/mole	Delta G	-4.64 kcal/mole
Base Pairs	4	Base Pairs	3
5'	CTTCCTTAGGCCAIGTGTGATT	5'	CTTCCTTAGGCCAIGTGTGATT
::	::		:
3'	GAGAGATCCTTTGGACCAGGGA	3'	GAGAGATCCTTTGGACCAGGGA
Delta G	-4.67 kcal/mole	Delta G	-3.07 kcal/mole
Base Pairs	3	Base Pairs	2
5'	CTTCCTTAGGCCAIGTGTGATT	5'	CTTCCTTAGGCCAIGTGTGATT
:		:	:::    :
3'	GAGAGATCCTTTGGACCAGGGA	3'	GAGAGATCCTTTGGACCAGGGA

Abbildung 28: Mögliche Primer-Dimere bei den zwei Forward-Primern der Marker STR-8 und D17S1869

### **7.2.5 De novo-Sequenzvarianten**

Weitere genetische Ursachen für eine Osteogenesis imperfecta, wie eine mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit unabhängig neu aufgetretene Sequenzveränderung im *COL1A1*-Gen oder in anderen Genen wurden nicht untersucht. In dieser Arbeit wurde nur die familiär bekannte Sequenzvariante c.2700delT im *COL1A1*-Gen untersucht. Während oder nach der Meiose sich ereignende *de novo*-Sequenzvarianten werden in dieser spezifischen PID-Diagnostik nicht berücksichtigt (Rechitsky et al., 2011).

### **7.2.6 Minisequenzierung**

Die Minisequenzierung konnte bei dieser Familie aus technischen Gründen nicht erfolgreich etabliert werden. Das Auftreten eines unspezifischen Peaks (siehe Abbildung 13, Stern) zeigt, dass die Analyse nicht regelrecht funktioniert. Eine mögliche Fehlerquelle kann z. B. die nicht optimale Aufreinigung der PCR-Produkte sein, was zu einer inkompletten Entfernung von PCR-Reagenzien wie PCR-Primer oder dNTPs führt. Da die Minisequenzierung eine Primer-basierte Methode ist, können verbleibende Primer in der Primer-Extensions-Technik störende Signale abgeben. (Fiorentino et al., 2003)

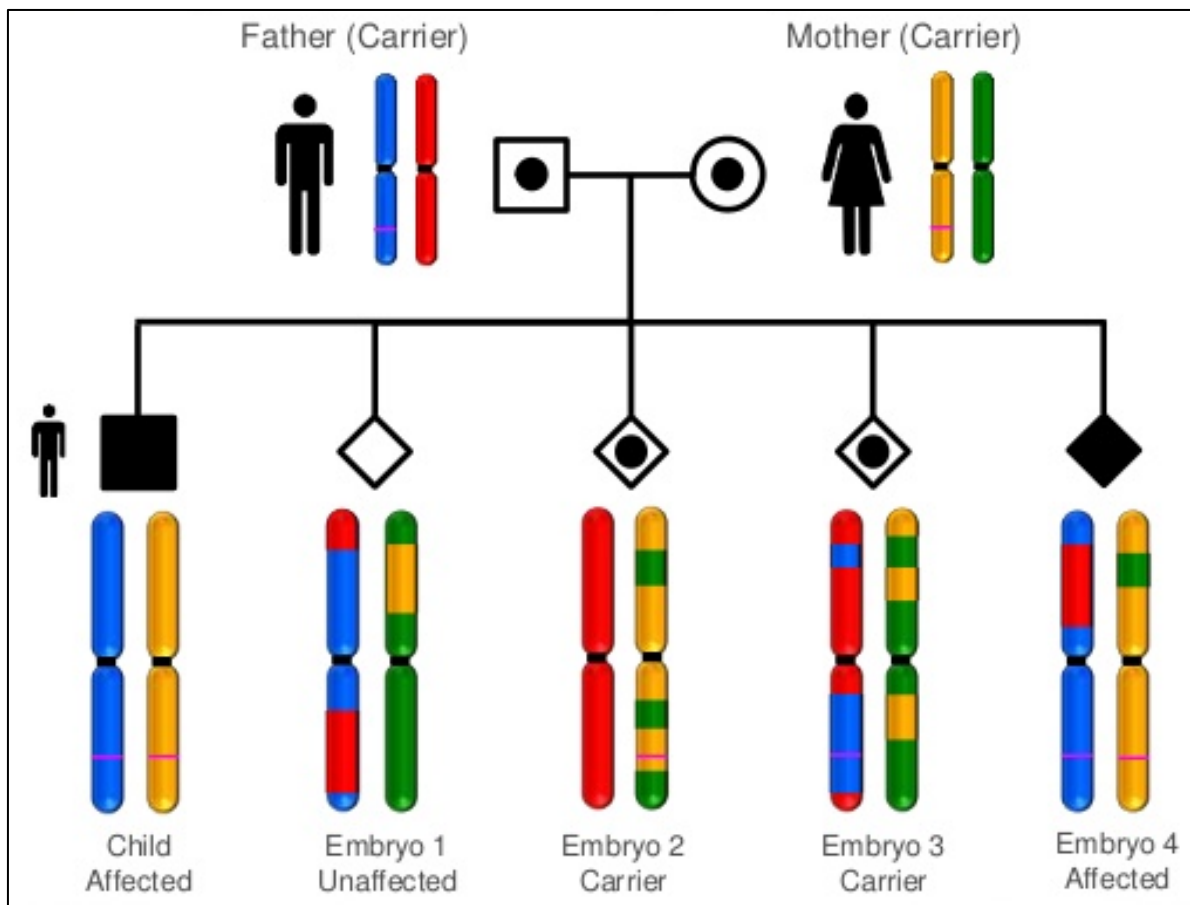
Infolge unspezifischer, nicht-interpretierbarer Ergebnisse und wenig Spielraum in der Adjustierung der Minisequenzier-Methode wurde als alternative Methode die klassische Sequenzierung nach Sanger angeschlossen. Nach erfolgreichem Nachweis der Sequenzvariante in der Etablierungsphase, wurde die Sanger-Sequenzierung an Wangenschleimhautzellen des Indexpatienten validiert.

## **7.3 Vom indirekten Gentest zum Karyomapping**

Durch neue Methoden für die PID-Routine wie z.B. das „high density SNP genotyping“ - auch „Karyomapping“ (Handyside et al., 2010) bezeichnet - werden für die Etablierung und Durchführung einer PID nur noch wenige Tage bis Wochen statt mehrerer Monate benötigt. Ein entscheidender Vorteil dieser Methode ist, dass sie universell bei fast allen Fragestellungen ohne eine zeitaufwändige Validierung eines familienspezifischen Testsystems verwendet werden kann. (Handyside, 2015)

Das Karyomapping verfolgt das Prinzip eines genomweiten indirekten Gentests wie bei einer Mikrosatelliten-Analyse. Beim Karyomapping werden eine große Anzahl an bekannten genomweiten SNPs (*engl. single nucleotide polymorphisms*) anstatt weniger regionsspezifischer STRs genotypisiert (Thornhill et al., 2015). Daher können mittels Karyomapping neben den monogenen Fragestellungen auch gleichzeitig meiotische chromosomale Imbalancen nachgewiesen werden (Kubicek et al., 2019). SNPs stellen

im humanen Genom die häufigste genetische Variabilität dar (85% aller Marker) und kommen im Schnitt alle 100 Basen vor (Fiorentino et al., 2003).



**Abbildung 29:** Beispiel für Karyomapping in einer Familie mit einer autosomal-rezessiven monogenen Erkrankung (Illumina©)

In Abbildung 29 wird das Prinzip der Karyomapping-Methode veranschaulicht. In diesem Beispiel sind Mutter und Vater heterozygote gesunde Anlageträger. Beide Eltern geben die Sequenzvariante mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% an ihre Nachkommen weiter. Nach autosomal-rezessiven Erbgängen ist jeder vierte Nachkomme homozygot für die Sequenzvariante und somit von der Erkrankung betroffen. Mittels Karyomapping wurden Biopsate aus vier Embryonen (Blasozysten) analysiert und die nachgewiesenen Haplotypen mit der Referenz-Person (hier betroffenes Kind) verglichen.

Embryo Nr. 1 ist Wildtyp, Embryonen Nr. 2 und 3 sind heterozygote Anlageträger wie die Eltern. Bei Embryo Nr. 4 wurde eine Homozygotie für den betroffenen Haplotyp nachgewiesen. Die Embryonen Nr. 1, 2 und 3 sind nicht von der Erkrankung betroffen und können damit zum Embryo-Transfer empfohlen werden.



Durch die Verwendung von SNP-Arrays mit derzeit ca. 300.000 beinhalteten SNPs, die alle relevanten Genregionen abdecken, reduziert sich der Aufwand um ein Vielfaches. Bisherige Erfahrungen und Ergebnisse zeigen, dass Karyomapping ein robustes, akkurates und zuverlässiges Testverfahren für die monogene PID darstellt und bereits weltweit für die Routine-Diagnostik eingesetzt wird. (Ben-Nagi et al., 2017; Konstantinidis et al., 2015; Natesan et al., 2014)

Zusammenfassend ist zu sagen:

- a) Der direkte Gentest bietet bei erfolgreicher Anwendung eine hohe Aussagesicherheit, ist jedoch störanfällig.
- b) Der klassische indirekte Gentest ist weniger störanfällig, muss aber individuell für jede Familie neu etabliert werden. Die Identifizierung und Analyse von informativen gekoppelten STR-Markern ist zeit-, labor-, sowie kostenintensiv (Harper et al., 2002).
- c) Karyomapping verfolgt das Prinzip eines indirekten Gentests – jedoch in standardisierter Form mittels genomweiter SNP-Arrays, die den zeitlichen Aufwand erheblich reduzieren.

Dennoch gibt es Fälle, in denen Karyomapping nicht funktioniert bzw. nicht als alleinige Methode ausreicht. Hierzu zählt ein quantitativer Mangel an SNPs in der Nähe der klinisch-relevanten Sequenzvariante. Dies trifft zum Beispiel auf Gene zu, die sich in der Nähe der Chromosomenenden befinden. Auch ein Mangel an informativen SNPs limitiert die Methode. (Konstantinidis et al., 2015)

#### **7.4 Weitere Biopsie-Methoden in der PID und deren Aussagekraft über den genetischen Status des Embryo**

Die Gewinnung von Polkörpern und Blastomierzellen (siehe 4.1.4) sind neben der Trophektodermibiopsie die bisher am häufigsten eingesetzten Biopsie-Methoden in der PID. Beide Methoden haben jedoch signifikante Nachteile.

Die Polkörperdiagnostik (PKD) bietet nur Rückschlüsse auf die genetische Ausstattung der weiblichen Eizelle, da nur diese Zelle während der ersten und zweiten meiotischen Teilung Polkörper ausbildet. Hier wird keine Information über die genetische Konstellation des Spermiums gewonnen. Daher ist diese Methode bei väterlich-vererbten autosomal-dominanten Erkrankungen nicht verwendbar. (Harton et al., 2011c) Ein Allele-Drop-Out kann auch bei der PKD auftreten und zu diagnostischen Problemen führen (Rechitsky et al., 1998). Außerdem werden bei der PKD Rekombinationen durch Crossing-over-Ereignisse während der meiotischen Teilung, die zu Fehldiagnosen

führen können, nicht berücksichtigt. Sie erlaubt auch keine sichere Aussage über chromosomale Fehlverteilungen bzw. strukturelle Chromosomenanomalien, insbesondere wenn, wie so häufig nur der 1. Polkörper gewonnen werden kann (Delhanty, 2011). Allerdings kann die PKD am 2. Polkörper bei mütterlich vererbter Genveränderung eine zusätzliche Hilfestellung geben, wenn bei einer monogenen PID ohne verfügbares DNA-Material weiterer Familienmitglieder die Aussagekraft des direkten und indirekten Gentests nicht ausreichen (Altarescu et al., 2009; Rechitsky et al., 2011).

Die Blastomerenbiopsie kann laut Literaturangaben die embryonale Entwicklung und das Implantationspotential stark negativ beeinträchtigen im Vergleich zur Trophektodermbiopsie (Scott et al., 2013). Daher wird weltweit die Trophektodermbiopsie in der PID-Analytik bevorzugt und insbesondere in den letzten Jahren auch am häufigsten durchgeführt. Das Risiko für einen ADO ist auch bei Blastomerenbiopsie bekannt (Rechitsky et al., 1998).

Neben den genannten Zellbiopsien wurde in unterschiedlichen Forschungsgruppen international an neuen Biopsie-Methoden gearbeitet, die bisher ausschließlich in der Aneuploidie-Testung angewendet wurden. Als Beispiel sei die Gewinnung von Blastocoel-Flüssigkeit (BCF) (siehe 4.1.4) erwähnt, die eine weniger invasive Biopsie-Methode darstellt (Palini et al., 2013). Aufgrund von diskordanten Ergebnissen im Vergleich zwischen BCF-Biopsien und TE-Biopsien, sowie unzureichenden Daten, ist diese Methode bisher keine Alternative zu den oben genannten Biopsie-Methoden (Lu et al., 2016).

Auch die Gewinnung von zellfreier DNA aus dem Kulturmedium von herangezüchteten Embryonen (Assou et al., 2014) ist eine nicht-invasive Methode, die aufgrund der bisher zu geringen Datenlage und ebenfalls diskordanten Ergebnissen keine hohe Evidenz für die PID zeigte. Kontaminationen z.B. durch maternale DNA (aus Cumuluszellen) oder Fremd-DNA (Laborpersonal) stellen weiterhin eine mögliche Fehlerquelle bei der Interpretation der Testergebnisse dar (Vera-Rodriguez et al., 2018). Bevor diese Methode eine Alternative für die Routine-PID darstellt, bedarf es weiterer Studien (Milachich, 2014).

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Aaij, C., & Borst, P. (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta*, 269(2), 192-200.
- Alderton, R. P., Eccleston, L. M., Howe, R. P., Read, C. A., Reeve, M. A., & Beck, S. (1992). Magnetic bead purification of M13 DNA sequencing templates. *Anal Biochem*, 201(1), 166-169.
- Alsmadi, O., Alkayal, F., Monies, D., & Meyer, B. F. (2009). Specific and complete human genome amplification with improved yield achieved by phi29 DNA polymerase and a novel primer at elevated temperature. *BMC Res Notes*, 2, 48. doi:10.1186/1756-0500-2-48
- Altarescu, G., Eldar-Geva, T., Varshower, I., Brooks, B., Haran, E. Z., Margalioth, E. J., Levy-Lahad, E., & Renbaum, P. (2009). Real-time reverse linkage using polar body analysis for preimplantation genetic diagnosis in female carriers of de novo mutations. *Hum Reprod*, 24(12), 3225-3229. doi:10.1093/humrep/dep293
- Assou, S., Ait-Ahmed, O., El Messaoudi, S., Thierry, A. R., & Hamamah, S. (2014). Non-invasive pre-implantation genetic diagnosis of X-linked disorders. *Med Hypotheses*, 83(4), 506-508. doi:10.1016/j.mehy.2014.08.019
- Ben-Nagi, J., Wells, D., Doye, K., Loutradi, K., Exeter, H., Drew, E., Alfarawati, S., Naja, R., & Serhal, P. (2017). Karyomapping: a single centre's experience from application of methodology to ongoing pregnancy and live-birth rates. *Reprod Biomed Online*, 35(3), 264-271. doi:10.1016/j.rbmo.2017.06.004
- Byers, P. H., & Steiner, R. D. (1992). Osteogenesis imperfecta. *Annu Rev Med*, 43, 269-282. doi:10.1146/annurev.me.43.020192.001413
- Chang, L. J., Huang, C. C., Tsai, Y. Y., Hung, C. C., Fang, M. Y., Lin, Y. C., Su, Y. N., Chen, S. U., & Yang, Y. S. (2013). Blastocyst biopsy and vitrification are effective for preimplantation genetic diagnosis of monogenic diseases. *Hum Reprod*, 28(5), 1435-1444. doi:10.1093/humrep/det048
- Cullen, P. (2018). Rechtliches zur Präimplantationsdiagnostik (PID) / Gendiagnostik. Retrieved from <https://aerzte-fuer-das-leben.de/fachinformationen/pid-gendiagnostik/rechtliches/>
- Dean, F. B., Hosono, S., Fang, L., Wu, X., Faruqi, A. F., Bray-Ward, P., Sun, Z., Zong, Q., Du, Y., Du, J., Driscoll, M., Song, W., Kingsmore, S. F., Egholm, M., & Lasken, R. S. (2002). Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(8), 5261-5266. doi:10.1073/pnas.082089499
- Delhanty, J. D. (2011). Is the polar body approach best for pre-implantation genetic screening? *Placenta*, 32 Suppl 3, S268-270. doi:10.1016/j.placenta.2011.06.028
- Dreesen, J., Destouni, A., Kourlaba, G., Degn, B., Mette, W. C., Carvalho, F., Moutou, C., Sengupta, S., Dhanjal, S., Renwick, P., Davies, S., Kanavakis, E., Harton, G., & Traeger-Synodinos, J. (2014). Evaluation of PCR-based preimplantation

genetic diagnosis applied to monogenic diseases: a collaborative ESHRE PGD consortium study. *Eur J Hum Genet*, 22(8), 1012-1018.  
doi:10.1038/ejhg.2013.277

- Dreesen, J. C., Jacobs, L. J., Bras, M., Herbergs, J., Dumoulin, J. C., Geraedts, J. P., Evers, J. L., & Smeets, H. J. (2000). Multiplex PCR of polymorphic markers flanking the CFTR gene; a general approach for preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis. *Mol Hum Reprod*, 6(5), 391-396.
- Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H. A., & Caskey, C. T. (1991). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet*, 49(4), 746-756.
- Estevezj. (2012). Sanger-sequencing. In Sanger-sequencing.svg (Ed.), (19:55 ed., Vol. 673 x 463 pixels (2.67 MB)). <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sanger-sequencing.svg>.
- Fiorentino, F., Magli, M. C., Podini, D., Ferraretti, A. P., Nuccitelli, A., Vitale, N., Baldi, M., & Gianaroli, L. (2003). The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. *Mol Hum Reprod*, 9(7), 399-410.
- Flach, U., Hintze, P., Reimann, C., Sitte, P., Montag, J., Lanfermann, H., Bulmahn, E., Kretschmer, M., Heil, H., Aschenberg-Dugnus, C., Reiche, K., Volkmer, M., Rawert, M., Ackermann, J., Arndt-Brauer, I., Arnold, R., Bahr, D., Barnett, D., Bartels, H.-P., Bartol, S. r., al, e., & Zypries, B. (2011). *Entwurf eines Gesetzes zur Regelung der Präimplantationsdiagnostik (Präimplantationsdiagnostikgesetz – PräimpG)*. Deutscher Bundestag, Drucksache 17/5451, 17. Wahlperiode.
- Forlino, A., & Marini, J. C. (2016). Osteogenesis imperfecta. *Lancet*, 387(10028), 1657-1671. doi:10.1016/S0140-6736(15)00728-X
- Franasiak, J., & Scott, R. T. J. (2008). A brief history of preimplantation genetic diagnosis and preimplantation genetic screening. *History of PGD and PGS*. Retrieved from [https://ivf-worldwide.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=744&Itemid=463](https://ivf-worldwide.com/index.php?option=com_content&view=article&id=744&Itemid=463)
- Gajko-Galicka, A. (2002). Mutations in type I collagen genes resulting in osteogenesis imperfecta in humans. *Acta Biochim Pol*, 49(2), 433-441.
- Geffroy, S., & Zerres, K. (2016). Präimplantationsdiagnostik im Europavergleich. *medizinische genetik*, 28(3), 320-325. doi:10.1007/s11825-016-0106-2
- Geraedts, J., & Sermon, K. (2016). Preimplantation genetic screening 2.0: the theory. *Mol Hum Reprod*, 22(8), 839-844. doi:10.1093/molehr/gaw033
- Hall, J. M., Lee, M. K., Newman, B., Morrow, J. E., Anderson, L. A., Huey, B., & King, M. C. (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, 250(4988), 1684-1689.
- Handyside, A. H. (2015). Live births following karyomapping - a "key" milestone in the development of preimplantation genetic diagnosis. *Reprod Biomed Online*, 31(3), 307-308. doi:10.1016/j.rbmo.2015.07.003

- Handyside, A. H., Harton, G. L., Mariani, B., Thornhill, A. R., Affara, N., Shaw, M. A., & Griffin, D. K. (2010). Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *J Med Genet*, *47*(10), 651-658. doi:10.1136/jmg.2009.069971
- Handyside, A. H., Kontogianni, E. H., Hardy, K., & Winston, R. M. (1990). Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*, *344*(6268), 768-770. doi:10.1038/344768a0
- Handyside, A. H., Robinson, M. D., Simpson, R. J., Omar, M. B., Shaw, M. A., Grudzinkas, J. G., & Rutherford, A. (2004). Isothermal whole genome amplification from single and small numbers of cells: a new era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease. *Mol Hum Reprod*, *10*(10), 767-772. doi:10.1093/molehr/gah101
- Harper, J. C., Wells, D., Piyamongkol, W., Abou-Sleiman, P., Apeessos, A., Ioulianos, A., Davis, M., Doshi, A., Serhal, P., Ranieri, M., Rodeck, C., & Delhanty, J. D. (2002). Preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders: experience with five single gene disorders. *Prenat Diagn*, *22*(6), 525-533. doi:10.1002/pd.394
- Harton, G. L., De Rycke, M., Fiorentino, F., Moutou, C., SenGupta, S., Traeger-Synodinos, J., Harper, J. C., European Society for Human, R., & Embryology, P. G. D. C. (2011a). ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD. *Hum Reprod*, *26*(1), 33-40. doi:10.1093/humrep/deq231
- Harton, G. L., Harper, J. C., Coonen, E., Pehlivan, T., Vesela, K., Wilton, L., European Society for Human, R., & Embryology, P. G. D. C. (2011b). ESHRE PGD consortium best practice guidelines for fluorescence in situ hybridization-based PGD. *Hum Reprod*, *26*(1), 25-32. doi:10.1093/humrep/deq230
- Harton, G. L., Magli, M. C., Lundin, K., Montag, M., Lemmen, J., Harper, J. C., European Society for Human, R., & Embryology, P. G. D. C. E. S. I. G. (2011c). 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*, *26*(1), 41-46. doi:10.1093/humrep/deq265
- Hehr, A., Paulmann, B., Eichhammer, L., Gassner, C., Seifert, B., & Hehr, U. (2016). Präimplantationsdiagnostik – methodische Aspekte. *medizinische genetik*, *28*(3), 332-341. doi:10.1007/s11825-016-0103-5
- Hellani, A., Coskun, S., Tbakhi, A., & Al-Hassan, S. (2005). Clinical application of multiple displacement amplification in preimplantation genetic diagnosis. *Reprod Biomed Online*, *10*(3), 376-380.
- Hennen, L., & Sauter, A. (2004). *Bericht des Ausschusses für Bildung, Forschung und Technikfolgenabschätzung (17. Ausschuss) gemäß § 56a der Geschäftsordnung Technikfolgenabschätzung hier: Sachstandsbericht Präimplantationsdiagnostik - Praxis und rechtliche Regulierung in sieben ausgewählten Ländern*. Deutscher Bundestag, Bundestagsdrucksache 15/3500.
- Hosono, S., Faruqi, A. F., Dean, F. B., Du, Y., Sun, Z., Wu, X., Du, J., Kingsmore, S. F., Egholm, M., & Lasken, R. S. (2003). Unbiased whole-genome amplification directly from clinical samples. *Genome Res*, *13*(5), 954-964. doi:10.1101/gr.816903

- Huang, T. H., Hejtmancik, J. F., Edwards, A., Pettigrew, A. L., Herrera, C. A., Hammond, H. A., Caskey, C. T., Zoghbi, H. Y., & Ledbetter, D. H. (1991). Linkage of the gene for an X-linked mental retardation disorder to a hypervariable (AGAT)<sub>n</sub> repeat motif within the human hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) locus (Xq26). *Am J Hum Genet*, *49*(6), 1312-1319.
- Janning, W., & Knust, E. (2004). *Genetik: Allgemeine Genetik - Molekulare Genetik - Entwicklungs-genetik*. (1. Auflage), 140(1): Georg Thieme Verlag.
- Joris, H., Nagy, Z., Van de Velde, H., De Vos, A., & Van Steirteghem, A. (1998). Intracytoplasmic sperm injection: laboratory set-up and injection procedure. *Hum Reprod*, *13 Suppl 1*, 76-86.
- Konstantinidis, M., Prates, R., Goodall, N. N., Fischer, J., Tecson, V., Lemma, T., Chu, B., Jordan, A., Armenti, E., Wells, D., & Munne, S. (2015). Live births following Karyomapping of human blastocysts: experience from clinical application of the method. *Reprod Biomed Online*, *31*(3), 394-403. doi:10.1016/j.rbmo.2015.05.018
- Kubicek, D., Hornak, M., Horak, J., Navratil, R., Tauwinklova, G., Rubes, J., & Vesela, K. (2019). Incidence and origin of meiotic whole and segmental chromosomal aneuploidies detected by karyomapping. *Reprod Biomed Online*, *38*(3), 330-339. doi:10.1016/j.rbmo.2018.11.023
- Lasken, R. S., & Egholm, M. (2003). Whole genome amplification: abundant supplies of DNA from precious samples or clinical specimens. *Trends Biotechnol*, *21*(12), 531-535. doi:10.1016/j.tibtech.2003.09.010
- Litt, M., & Luty, J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet*, *44*(3), 397-401.
- Lobo, I. (2008). Same genetic mutation, different genetic disease phenotype. *Nature Education*, *1* (1), 64.
- Lu, L., Lv, B., Huang, K., Xue, Z., Zhu, X., & Fan, G. (2016). Recent advances in preimplantation genetic diagnosis and screening. *J Assist Reprod Genet*, *33*(9), 1129-1134. doi:10.1007/s10815-016-0750-0
- Marini, J., & Smith, S. M. (2000). Osteogenesis Imperfecta. In L. J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K. R. Feingold, A. Grossman, J. M. Hershman, C. Koch, M. Korbonits, R. McLachlan, M. New, J. Purnell, R. Rebar, F. Singer, & A. Vinik (Eds.), *Endotext*. South Dartmouth (MA).
- Marini, J. C., Forlino, A., Bachinger, H. P., Bishop, N. J., Byers, P. H., Paepe, A., Fassier, F., Fratzi-Zelman, N., Kozloff, K. M., Krakow, D., Montpetit, K., & Semler, O. (2017). Osteogenesis imperfecta. *Nat Rev Dis Primers*, *3*, 17052. doi:10.1038/nrdp.2017.52
- Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *74*(2), 560-564.
- Media, N. (2014). "The Nobel Prize in Chemistry 1980". Retrieved from [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1980/](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1980/)

- Milachich, T. (2014). New advances of preimplantation and prenatal genetic screening and noninvasive testing as a potential predictor of health status of babies. *Biomed Res Int*, 2014, 306505. doi:10.1155/2014/306505
- Morgan, T. H. (1910). Sex Limited Inheritance in Drosophila. *Science*, 32(812), 120-122. doi:10.1126/science.32.812.120
- Moutou, C., Gardes, N., & Viville, S. (2002). Multiplex PCR combining deltaF508 mutation and intragenic microsatellites of the CFTR gene for pre-implantation genetic diagnosis (PGD) of cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet*, 10(4), 231-238. doi:10.1038/sj.ejhg.5200794
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-273.
- Natesan, S. A., Bladon, A. J., Coskun, S., Qubbaj, W., Prates, R., Munne, S., Coonen, E., Dreesen, J. C., Stevens, S. J., Paulussen, A. D., Stock-Myer, S. E., Wilton, L. J., Jaroudi, S., Wells, D., Brown, A. P., & Handyside, A. H. (2014). Genome-wide karyomapping accurately identifies the inheritance of single-gene defects in human preimplantation embryos in vitro. *Genet Med*, 16(11), 838-845. doi:10.1038/gim.2014.45
- Palini, S., Galluzzi, L., De Stefani, S., Bianchi, M., Wells, D., Magnani, M., & Bulletti, C. (2013). Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reprod Biomed Online*, 26(6), 603-610. doi:10.1016/j.rbmo.2013.02.012
- Pastinen, T., Partanen, J., & Syvanen, A. C. (1996). Multiplex, fluorescent, solid-phase minisequencing for efficient screening of DNA sequence variation. *Clin Chem*, 42(9), 1391-1397.
- Ray, P. F., & Handyside, A. H. (1996). Increasing the denaturation temperature during the first cycles of amplification reduces allele dropout from single cells for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod*, 2(3), 213-218.
- Rechitsky, S., Pomerantseva, E., Pakhalchuk, T., Pauling, D., Verlinsky, O., & Kuliev, A. (2011). First systematic experience of preimplantation genetic diagnosis for de-novo mutations. *Reprod Biomed Online*, 22(4), 350-361. doi:10.1016/j.rbmo.2011.01.005
- Rechitsky, S., Strom, C., Verlinsky, O., Amet, T., Ivakhnenko, V., Kukharenko, V., Kuliev, A., & Verlinsky, Y. (1998). Allele dropout in polar bodies and blastomeres. *J Assist Reprod Genet*, 15(5), 253-257.
- Reeve, M. A. (1991). Method to isolate macromolecules using magnetically attractable beads which do not specifically bind the macromolecules. Retrieved from <https://www.google.com/patents/WO1991012079A1?cl=en>
- Rychlik, W. (1995). Selection of primers for polymerase chain reaction. *Mol Biotechnol*, 3(2), 129-134. doi:10.1007/BF02789108
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354.

- Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, C. A., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M., & Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*, 265(5596), 687-695.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1992). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology*, 24, 104-108.
- Schock, G., Gildehaus, N., Lubenow, H., Löffert, D., Korfhage, C., & QIAGEN GmbH, H. (2005). Unbegrenzte DNA-Analysen durch Multiple Displacement Amplification. *BIOspektrum*, 11. Jahrgang, 781-782.
- Scott, R. T., Jr., Upham, K. M., Forman, E. J., Zhao, T., & Treff, N. R. (2013). Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertil Steril*, 100(3), 624-630. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.04.039
- Sillence, D. O., Rimoin, D. L., & Danks, D. M. (1979a). Clinical variability in osteogenesis imperfecta-variable expressivity or genetic heterogeneity. *Birth Defects Orig Artic Ser*, 15(5B), 113-129.
- Sillence, D. O., Senn, A., & Danks, D. M. (1979b). Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *J Med Genet*, 16(2), 101-116.
- Sokolov, B. P. (1990). Primer extension technique for the detection of single nucleotide in genomic DNA. *Nucleic Acids Res*, 18(12), 3671.
- Spits, C., Le Caignec, C., De Rycke, M., Van Haute, L., Van Steirteghem, A., Liebaers, I., & Sermon, K. (2006). *Whole-genome multiple displacement amplification from single cells* (Vol. 1).
- Stephoe, P. C., & Edwards, R. G. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 2(8085), 366.
- Thornhill, A. R., deDie-Smulders, C. E., Geraedts, J. P., Harper, J. C., Harton, G. L., Lavery, S. A., Moutou, C., Robinson, M. D., Schmutzler, A. G., Scriven, P. N., Sermon, K. D., Wilton, L., & Consortium, E. P. (2005). ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Hum Reprod*, 20(1), 35-48. doi:10.1093/humrep/deh579
- Thornhill, A. R., Handyside, A. H., Ottolini, C., Natesan, S. A., Taylor, J., Sage, K., Harton, G., Cliffe, K., Affara, N., Konstantinidis, M., Wells, D., & Griffin, D. K. (2015). Karyomapping-a comprehensive means of simultaneous monogenic and cytogenetic PGD: comparison with standard approaches in real time for Marfan syndrome. *J Assist Reprod Genet*, 32(3), 347-356. doi:10.1007/s10815-014-0405-y
- Thornhill, A. R., & Snow, K. (2002). Molecular diagnostics in preimplantation genetic diagnosis. *J Mol Diagn*, 4(1), 11-29. doi:10.1016/S1525-1578(10)60676-9
- Van Steirteghem, A. C., Nagy, Z., Joris, H., Liu, J., Staessen, C., Smits, J., Wisanto, A., & Devroey, P. (1993). High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 8(7), 1061-1066.



- Vera-Rodriguez, M., Diez-Juan, A., Jimenez-Almazan, J., Martinez, S., Navarro, R., Peinado, V., Mercader, A., Meseguer, M., Blesa, D., Moreno, I., Valbuena, D., Rubio, C., & Simon, C. (2018). Origin and composition of cell-free DNA in spent medium from human embryo culture during preimplantation development. *Hum Reprod*, 33(4), 745-756. doi:10.1093/humrep/dey028
- Verlinsky, Y., & Kuliev, A. (1996). Preimplantation polar body diagnosis. *Biochem Mol Med*, 58(1), 13-17.
- Verlinsky, Y., Rechitsky, S., Cieslak, J., Ivakhnenko, V., Wolf, G., Lifchez, A., Kaplan, B., Moise, J., Walle, J., White, M., Ginsberg, N., Strom, C., & Kuliev, A. (1997). Preimplantation diagnosis of single gene disorders by two-step oocyte genetic analysis using first and second polar body. *Biochem Mol Med*, 62(2), 182-187.
- Weber, J. L., & May, P. E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*, 44(3), 388-396.
- Wegner, R., Trimborn, M., Stumm, M., et al. (2016). *Humangenetische Grundlagen für Gynäkologen. Fachgebundene genetische Beratung im Überblick*. Berlin, Boston: De Gruyter.
- Wells, D., Alfarawati, S., & Fragouli, E. (2008). Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Mol Hum Reprod*, 14(12), 703-710. doi:10.1093/molehr/gan062
- Willing, M. C., Pruchno, C. J., Atkinson, M., & Byers, P. H. (1992). Osteogenesis imperfecta type I is commonly due to a COL1A1 null allele of type I collagen. *Am J Hum Genet*, 51(3), 508-515.
- Wilton, L., Thornhill, A., Traeger-Synodinos, J., Sermon, K. D., & Harper, J. C. (2009). The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD. *Hum Reprod*, 24(5), 1221-1228. doi:10.1093/humrep/den488
- Wu, R., Cuppens, H., Buyse, I., Decorte, R., Marynen, P., Gordts, S., & Cassiman, J. J. (1993). Co-amplification of the cystic fibrosis delta F508 mutation with the HLA DQA1 sequence in single cell PCR: implications for improved assessment of polar bodies and blastomeres in preimplantation diagnosis. *Prenat Diagn*, 13(12), 1111-1122.
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I. D., Simpson, J. L., & van der Poel, S. (2017). The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Hum Reprod*, 32(9), 1786-1801. doi:10.1093/humrep/dex234

## 9 ANHANG

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wegemarken in der PID (PGD)-Historie .....	9
Abbildung 2: Entwicklung der Embryonalgewebe, die sich zur PKD, PID und PND eignen .....	14
Abbildung 3: Workflow einer monogenen PID (autosomal-dominanter Erbgang) nach positivem Ethikvotum .....	17
Abbildung 4: Familienstammbaum über zwei Generationen und potentielle dritte Generation .....	27
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Multiple Displacement Amplification (Spits et al., 2006) .....	29
Abbildung 6: DNA-Kettenverlängerung durch Verbindung von dNTPs (Janning & Knust, 2004).....	32
Abbildung 7: Schematische Darstellung der DNA-Sequenzierung nach Sanger und molekulare Darstellung eines dNTPs & ddNTPs (Estevezj, 2012) .....	35
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Minisequenzierung (modifiziert übernommen aus ABI Multiplex Protokoll/Thermo Fisher Scientific).....	39
Abbildung 9: Strukturformeln der Fluoreszenzfarbstoffe dR110 und dR6G mit jeweils angehängtem ddNTP (Bestandteile des RR-Mix aus SNaPshot® Multiplex Kit, ABI) .....	39
Abbildung 10: Vergleichende Darstellung klassischer Sequenzierung nach Sanger (links) und Minisequenzierung (rechts) (Fiorentino et al., 2003) .....	40
Abbildung 11: Genotyp und Haplotyp .....	44
Abbildung 12: Detektion und Fragmentlängenanalyse durch Kapillarelektrophorese (CE) .....	46
Abbildung 13: Elektropherogramm der Minisequenzierung vom Vater des Indexpatienten als Negativkontrolle (homozygot Wildtyp) .....	49
Abbildung 14: Elektropherogramm der Minisequenzierung vom Indexpatienten (heterozygot) .....	49
Abbildung 15: Chromatograph der Ehefrau des Indexpatienten mit homozygoter Wildtyp- Konstellation .....	50
Abbildung 16: Chromatograph des Indexpatienten mit heterozygoter Sequenzvariante <i>COL1A1</i> c.2700delT .....	50

Abbildung 17: Elektropherogramm der Fragmentanalyse vom Multiplex-Ansatz A des Indexpatienten.....	51
Abbildung 18: Elektropherogramm der Fragmentanalyse vom Multiplex-Ansatz B des Indexpatienten.....	51
Abbildung 19: Elektropherogramm der Negativ-Kontrollen-Fragmentanalyse vom Multiplex-Ansatz A .....	52
Abbildung 20: Elektropherogramm der Negativ-Kontrollen-Fragmentanalyse vom Multiplex-Ansatz B .....	52
Abbildung 21: Haplotypisierung der Familie mit bekannter heterozygoter Sequenzvariante <i>COL1A1</i> c.2700delT .....	54
Abbildung 22: Chromatograph mit heterozygoter Sequenzvariante <i>COL1A1</i> c.2700delT (Indexpatient) .....	55
Abbildung 23: Chromatograph mit ADO der Sequenzvariante <i>COL1A1</i> c.2700delT (Indexpatient) .....	55
Abbildung 24: Chromatograph mit ADO der Wildtypsequenz (Indexpatient).....	56
Abbildung 25: Elektropherogramm der Fragmentanalyse vom MPA des Indexpatienten (WSZ1).....	57
Abbildung 26: Elektropherogramm der Fragmentanalyse vom MPA des Indexpatienten (WSZ2).....	57
Abbildung 27: Kompletter Analyseausfall der Fragmentanalyse vom MPA des Indexpatienten (WSZ3) .....	57
Abbildung 28: Mögliche Primer-Dimere bei den zwei Forward-Primern der Marker STR-8 und D17S1869 .....	62
Abbildung 29: Beispiel für Karyomapping in einer Familie mit einer autosomal-rezessiven monogenen Erkrankung (Illumina©).....	64

## 9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Internationale PID-Regelung – ein Ländervergleich modifiziert nach (Geffroy et al., 2016) .....	12
Tabelle 2: Mikrosatelliten mit zugehörigen Primer-Sequenzen und erwarteter PCR-Produkt-Größenbereich .....	22
Tabelle 3: Primer-Sequenzen zur Detektion der gesuchten Sequenzvariante im <i>COL1A1</i> -Gen .....	22
Tabelle 4: Reagenzien .....	23
Tabelle 5: Puffer, Lösungen und Mixe .....	25
Tabelle 6: Geräte und Software .....	26
Tabelle 7: Herstellung des Buffer D2 .....	30
Tabelle 8: Herstellung des MDA-Mastermixes .....	30
Tabelle 9: MDA-Programm „MDA-MDA“ .....	30
Tabelle 10: Herstellung des PCR-Mastermixes für Sanger-Sequenzierung oder Minisequenzierung .....	32
Tabelle 11: Herstellung des PCR-Mixes für Fragmentlängen-Analyse im Multiplex-Ansatz .....	33
Tabelle 12: Beispiel für die Herstellung eines Primer-Mixes für Fragmentlängen-Analyse im Multiplex-Ansatz .....	33
Tabelle 13: PCR-Programm „PID59_28“ .....	33
Tabelle 14: Herstellung des Sequenzier-Mixes .....	37
Tabelle 15: Sequenzier-Programm „SeqTB“ .....	37
Tabelle 16: Herstellung des Minisequenzier-Mixes .....	40
Tabelle 17: Sequenzier-Programm „MiniSEQ“ .....	41
Tabelle 18: Herstellung des Formamid-Standard-Mix .....	41
Tabelle 19: Programm „USB“ .....	42
Tabelle 20: Verwendete Mikrosatelliten-/STR-Marker und ihre Entfernung zur Sequenzvariante .....	46
Tabelle 21: Austestungen der „Multiplex-Ansätze A und B“ – Version 1 .....	47
Tabelle 22: Austestungen der „Multiplex-Ansätze A und B“ – Version 2 .....	47
Tabelle 23: Herstellung des Formamid-Standard-Mix .....	48
Tabelle 24: Genotypisierung mittels Mikrosatelliten-Analyse in der Familie und Bestimmung der Informativität der STR-Marker .....	53
Tabelle 25: Mikrosatelliten-Analyse des Indexpatienten und der Kontrollperson mit zugehörigen ADO-Raten .....	56
Tabelle 26: Re-Analyse von nicht-transferierten betroffenen Blastozysten .....	59

### 9.3 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich recht herzlich bei Herrn PD Dr. med. Arne S. Pfeufer und Frau Dr. med. Dr. rer. nat. Claudia Nevinny-Stickel-Hinzpeter für die Promotionsmöglichkeit bedanken. Ohne deren Einsatz und Dr. Nevinny-Stickel-Hinzpeters moralische wie auch finanzielle Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Sie ermöglichte meine Teilnahme an zwei Kongressen, durch die ich wertvolle Informationen für diese Arbeit sammeln konnte.

Ein großer Dank gilt Frau Dr. phil. Päivi Forsblom M.Sc. Genetik, die meine Arbeit zum größten Teil betreute. Ihr unermüdlicher Einsatz, ihre Gesprächsbereitschaft und Motivationsarbeit waren mir während der ganzen Zeit eine große Hilfe. Außerdem danke ich Frau Dr. rer. nat. Stefanie Bug-Tönnies, die mich in die Thematik der Arbeit einführte.

Ein besonderer Dank gilt auch Daniela Streidl (geb. Strohmayer). Sie hatte stets ein offenes Ohr für alle Fragen im Labor und unterstützte mich mit ihrem Wissen und ihrer praktischen Erfahrung. Des Weiteren möchte ich mich bei allen beteiligten Mitarbeitern aus der Molekulargenetik und Array-CGH des MVZ Humane Genetik für ihre Hilfsbereitschaft und die stets angenehme Atmosphäre bedanken.

Ein herzliches Dankeschön all denen, die hier nicht erwähnt sind und die dennoch einen Teil zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Nicht zuletzt gilt mein innigster Dank meiner Familie: insbesondere meinen Schwestern Seran und Lale, die immer für mich da waren, mich unermüdlich unterstützt und stets an mich geglaubt haben.