

Aus dem Institut für Humangenetik  
der Universität zu Lübeck  
Direktorin: Prof. Dr. med. Gillessen-Kaesbach

---

# **Entwicklung von Testsystemen für Einzelzellanalysen in der Präimplantations- bzw. Polkörperdiagnostik**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
-Aus der Sektion Medizin-

vorgelegt von  
**Karen Heitmann**  
aus Hildesheim

Lübeck (2013)

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Christine Zühlke
2. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2015

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 25.11.2015

Promotionskommission der Sektion Medizin

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Geschichte der Präimplantationsdiagnostik in Deutschland .....	1
1.2	Indikationen für eine Präimplantationsdiagnostik .....	2
1.2.1	Spezielle Indikationen .....	5
1.2.1.1	Indikation Chorea Huntington .....	5
1.2.1.2	Indikation Fragiles X-Syndrom .....	8
1.3	Biologische Grundlagen der PID .....	11
1.4	Molekulargenetische Grundlagen für den Aufbau einer PID .....	14
1.5	Aufgabenstellung.....	16
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.1	Materialien .....	17
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien .....	17
2.1.2	Geräte und Gebrauchsartikel .....	18
2.1.3	Puffer und Medien .....	19
2.1.4	Synthetische Oligonukleotide .....	20
2.1.5	Programme und Datenbanken.....	23
2.2	Familien und DNA-Proben .....	23
2.3	Methoden.....	26
2.3.1	Polymerasekettenreaktion.....	26
2.3.2	Primer-Design.....	31
2.3.3	Elektrophorese .....	32
2.3.3.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	32
2.3.3.2	Kapillarelektrophorese.....	33
2.3.4	Einzelzell-Isolation.....	34
2.3.4.1	Dichtegradientenzentrifugation.....	34
2.3.4.2	Durchflusszytometrie .....	36
2.3.5	Zelllyse.....	37
2.3.6	Spezielle Methoden .....	38
2.3.6.1	Aufbau von Testsystemen für die Einzelzellidiagnostik.....	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>40</b>
3.1	Etablierung eines Testsystem für die Erkrankung Chorea Huntington.....	40

3.1.1	Heraussuchen polymorpher Mikrosatelliten-Marker .....	40
3.1.2	Test auf Polymorphismus.....	41
3.1.3	Test auf Informativität .....	41
3.1.4	Nachweis des krankheitsverursachenden CAG-Repeats .....	46
3.1.5	Aufbau eines Multiplex-Seminested-Systems an genomischer DNA .....	47
3.1.6	Optimierung des Multiplex-Seminested-Systems an Einzelzellen.....	49
3.1.7	Bestimmung der Allele Dropout Rate .....	52
3.2	Etablierung eines Testsystems für die Erkrankung Fragiles X-Syndrom .....	55
3.2.1	Heraussuchen polymorpher Mikrosatelliten-Marker .....	55
3.2.2	Test auf Informativität .....	55
3.2.3	Aufbau eines Multiplex-Seminested-Systems an genomischer DNA .....	57
3.2.4	Optimierung des Multiplex-Seminested-Systems an Einzelzellen.....	57
3.2.5	Heraussuchen polymorpher Mikrosatelliten-Marker .....	58
3.2.6	Test auf Informativität .....	59
3.2.7	Aufbau eines Multiplex-Seminested-Systems an genomischer DNA .....	60
3.2.8	Optimierung des Multiplex-Seminested-Systems an Einzelzellen.....	61
3.2.9	Bestimmung der Allele Dropout Rate .....	63
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>66</b>
4.1	Aufbau eines Multiplex-Seminested-Systems mit Mikrosatelliten-Markern.....	67
4.2	Direkter Nachweis der Repeat-Expansion.....	70
4.3	Allele Dropout.....	72
4.4	Aktuelle Entwicklungen des Methodenspektrums bei der PID.....	74
4.5	Ethische Aspekte der PID.....	76
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>Anhänge.....</b>	<b>89</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	89
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	92
7.3	Tabellenverzeichnis .....	95
<b>8</b>	<b>Danksagungen .....</b>	<b>97</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>98</b>

## 1 Einleitung

Im Vergleich zu erworbenen Gesundheitsstörungen, wie z.B. Infektionen, tragen Menschen mit genetisch bedingten Krankheiten von Geburt an die Anlage für eine bestimmte Erkrankung. Diese kann bereits bei der Geburt wahrnehmbar sein oder sich erst im Laufe des Lebens manifestieren. Da die genetische Ursache für die Erkrankung schon im Embryonalstadium vorhanden ist, kann diese auch vor der Geburt mittels Pränataldiagnostik erkannt werden. Eine besonders frühe Form der Pränataldiagnostik ist die Präimplantationsdiagnostik (PID), die Inhalt dieser Dissertation ist und im Folgenden vorgestellt wird.

### 1.1 Geschichte der Präimplantationsdiagnostik in Deutschland

Bei der Präimplantationsdiagnostik werden *in vitro* gezeugte Embryonen noch vor dem Transfer in den Uterus der Mutter untersucht. Diese Art der Diagnostik wurde erstmals erfolgreich 1990 durchgeführt (Handyside et al., 1990; Verlinsky et al., 1990) und hat sich seither weltweit etabliert (z.B. Liu et al., 1994; Dreesen et al., 1998; Altarescue et al., 2009; Liebaers et al., 2010).

In Deutschland jedoch wurde die PID aufgrund der Annahme, dass ein Widerspruch zum Embryonenschutzgesetz (ESchG) bestehe, lange Zeit nicht angewandt (Schwinger et al., 2005). Die erneute Debatte um die Präimplantationsdiagnostik wurde 2006 von einem Berliner Gynäkologen ins Rollen gebracht. Der Arzt hatte in den Jahren 2005 und 2006 bei drei Paaren eine Präimplantationsdiagnostik durchgeführt und sich anschließend selbst angezeigt (Diedrich et al., 2011). Daraufhin galt es zu prüfen, ob der Arzt mit seinem Handeln gegen das ESchG verstoßen hatte. Das seinerzeit geltende ESchG war 1990 erlassen worden. Zu dem Zeitpunkt hatte die Etablierung der PID im Ausland gerade erst begonnen, deswegen wurde die PID im ESchG nicht erwähnt. Folglich verbietet das ESchG die PID nicht explizit. Allerdings stehen einige Passagen des Gesetzes nicht im Einklang mit der PID. So heißt es zum Beispiel in §1 Abs. (1) ESchG: „Mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe wird bestraft, wer [...] es unternimmt, eine Eizelle zu einem anderen Zweck künstlich zu befruchten, als eine Schwangerschaft der Frau herbeizuführen.“ Da nach einer PID die betroffenen Embryonen nicht eingepflanzt werden, wurden sie nicht zur Herbeiführung einer Schwangerschaft erzeugt. Man könnte somit die PID als einen Verstoß gegen jenen Absatz werten. Des Weiteren wurde

diskutiert, ob ein Widerspruch zu §2 Abs. (1) des ESchG bestehe, in dem das Verwenden eines Embryos „zu einem nicht seiner Erhaltung dienenden Zweck“ verboten wird. Da aber der Arzt die betroffenen Embryonen nicht gegen den Willen der Frau einpflanzen durfte und mit der PID im Ganzen eine Herbeiführung der Schwangerschaft bezweckte, wurde der Gynäkologe 2009 von dem Berliner Landgericht (Landgericht Berlin, 2009) und nach Revision der Staatsanwaltschaft im Juli 2010 auch vom Bundesgerichtshof (BGH) (Bundesgerichtshof, 2010) freigesprochen. Entscheidend hierbei war, dass der Arzt die PID nicht an totipotenten Zellen durchgeführt hatte. Als totipotent werden all diejenigen Zellen bezeichnet, die das Potential besitzen, sich zu eigenständigen Embryonen zu entwickeln. Diese Zellen unterliegen laut ESchG demselben Schutz wie der gesamte Embryo (§8 Abs. (1) ESchG). Dennoch löste das Urteil des BGH großes Erstaunen aus, da Jahrzehnte lang davon ausgegangen worden war, dass die PID einen Widerspruch zum ESchG darstelle und damit in Deutschland verboten sei. Es kam zur öffentlichen Diskussion und schließlich zur Debatte im Bundestag. Im Juli 2011 stimmte der Bundestag über drei Gesetzesentwürfe bezüglich der PID ab und entschied, die PID in Ausnahmefällen zuzulassen. Daraufhin kam es zu einer Ergänzung bezüglich der PID im Embryonenschutzgesetz. Eine PID ist nun grundsätzlich in Deutschland verboten, bei einem familiär erhöhten Risiko für eine schwere Erbkrankheit jedoch nicht rechtswidrig (vgl. §3a ESchG). Im Februar 2013 wurde eine Verordnung zur Regelung der Präimplantationsdiagnostik (Präimplantationsdiagnostikverordnung – PIDV) veröffentlicht, in der insbesondere die Anforderungen an PID-Zentren und die Ethikkommissionen beschrieben werden und damit das genaue Vorgehen bezüglich der PID in Deutschland geregelt wird. Die PIDV tritt am 1. Februar 2014 in Kraft.

## **1.2 Indikationen für eine Präimplantationsdiagnostik**

Die PID kann Paaren angeboten werden, die ein erhöhtes Risiko für eine bestimmte genetisch bedingte Erkrankung oder Chromosomenstörungen aufweisen. Sie ermöglicht ihnen, ein Kind ohne diese Erkrankung zu bekommen. Die Indikationen und Fragestellungen für eine PID können in drei Gruppen unterteilt werden: Monogene Erbkrankheiten, Ausschluss von Chromosomenaberrationen und die positive Selektion von Embryonen mit bestimmten erwünschten Merkmalen.

## Monogene Erbkrankheiten

Monogene Erbkrankheiten sind Erkrankungen, die durch eine Veränderung in genau einem Gen verursacht werden und von Generation zu Generation weitergegeben werden können. Die Weitergabe der Erkrankung folgt dabei in der Regel einem der im Folgenden dargestellten Erbgänge.

Bei **autosomal dominant** vererbten Erkrankungen führt bereits die Veränderung von einem der beiden Allele eines autosomalen Gens zur Merkmalsausprägung und damit zum klinischen Bild der Erkrankung. Folglich haben Nachkommen von Personen, die von einer autosomal dominant vererbten Erkrankung betroffen sind, ein 50 %iges Risiko, die Anlage zu erben und selbst zu erkranken. Beispiele für autosomal dominant vererbte Erkrankungen sind die Chorea Huntington, die in dieser Dissertation näher besprochen wird, die Myotone Dystrophie oder das Marfan-Syndrom. Wird eine Erkrankung **autosomal rezessiv** vererbt, so erkranken nur Personen, bei denen beide Allele eines Gens verändert sind (homozygote Anlageträger). Folglich muss die genetische Veränderung von beiden Elternteilen ererbt werden, damit es zur Krankheitsausprägung kommt. 50 % der gemeinsamen Nachkommen von zwei heterozygoten Anlageträgern sind ebenfalls Anlageträger, 25 % sind betroffen. Weitere 25 % tragen die Anlage nicht. Beispiele für diese Art der Vererbung sind die Cystische Fibrose oder die Hämochromatose. Des Weiteren können Erkrankungen **X-chromosomal** vererbt werden. Hierbei sind heterozygote Frauen oft nicht von der Erkrankung betroffen, können diese aber an ihre Nachkommen weitergeben (Konduktorinnen). Da Männer für das X-Chromosom hemizygot sind, erkranken sie immer dann, wenn sie das X-Chromosom mit der genetischen Veränderung erben. Alle Söhne von Männern mit einer X-chromosomal vererbten Erkrankung sind gesund, alle Töchter Konduktorinnen. 50 % der Söhne von Konduktorinnen sind betroffen, 50 % der Töchter sind ebenfalls Konduktorinnen. X-chromosomal werden z.B. das Fragile X-Syndrom, das in dieser Dissertation ausführlich behandelt wird, die Muskeldystrophie Duchenne sowie die Hämophilien A und B vererbt.

## Chromosomenaberrationen

Chromosomenaberrationen sind Chromosomenfehlverteilungen, die in numerische (Tri-, Monosomien) und strukturelle (Inversion, Deletion, Translokation) Störungen unterteilt werden. Chromosomale Translokationen können sowohl balanciert als auch unbalanciert

vorliegen. Träger balancierter Translokationen sind in der Regel unauffällig. Bei der Entstehung der Keimzellen kann es jedoch neben einem normalen und einem balancierten Karyotypen mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % zu unbalancierten Translokationen und damit zu partiellen Di- und Nullisomien kommen. Durch die Befruchtung entstehen dann partielle Tri- und Monosomien, die abhängig von der Translokation zu unterschiedlichen Entwicklungsstörungen führen können. Personen mit balancierten Translokationen kann eine PID angeboten werden (Munne et al., 1998).

Bei Paaren ohne erhöhtes genetisches Risiko kann, um numerische Chromosomenaberrationen wie Tri- und Monosomien zu vermeiden, im Zuge einer künstlichen Befruchtung ein Aneuploidiescreening durchgeführt werden (Munne et al., 1995). Hierbei ist es das Ziel, Aborte, die aufgrund der Chromosomenstörung entstehen, zu vermeiden und damit die Geburtenrate zu erhöhen. Da das Risiko für numerische Chromosomenaberrationen mit dem maternalen Alter steigt (Hassold et al., 1985), schien das Aneuploidiescreening insbesondere für diese Patientengruppe sinnvoll zu sein. Es wurde jedoch kürzlich von Mastenbroek et al. (2007) an Blastomeren sowie von Haaf et al. (2010) an Polkörpern gezeigt, dass die Geburtenrate durch ein Aneuploidiescreening mittels FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) nicht steigt. Von der ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) wurde 2007 die ESHRE PGS (Preimplantation Genetic Screening) Task Force gegründet, die den Nutzen von PGS an Polkörpern mittels Array-CGH (Comparative Genomic Hybridization) untersuchen soll. Erste Ergebnisse lassen einen positiven Effekt vermuten (Geraedts et al., 2011). Dennoch bedarf es zur Empfehlung des Screenings noch weiterer Studien.

### **Positive Selektion von Embryonen mit erwünschten Merkmalen**

Neben dem Krankheitsausschluss ist es technisch möglich und von daher auch denkbar, Embryonen mit bestimmten Merkmalen zu selektieren. Das bekannteste Beispiel der positiven Selektion bei der PID ist die Auswahl immunkompatibler Embryonen für erkrankte Geschwisterkinder. Durch die HLA-Typisierung können Embryonen selektiert werden, die nach ihrer Geburt als Stammzellspender für beispielsweise an Leukämie (Verlinsky et al., 2004) oder Fanconi Anämie (Verlinsky et al., 2001) erkrankte Geschwister in Frage kommen. Des Weiteren kann auch das Geschlecht des Kindes selektiert werden. Hierbei muss zwischen der Geschlechtswahl bei X-chromosomal vererbten Erkrankungen,

wie es bereits bei den ersten PIDs unternommen wurde (Handyside et al., 1990), und der Geschlechtswahl ohne medizinische Indikation differenziert werden. In den USA haben z.B. Gleicher et al. (2012) PIDs zur Geschlechtswahl ohne medizinische Indikation durchgeführt. Als Indikationen wurden hier stattdessen „family balancing“ oder psychische Erkrankungen der Mutter aufgeführt. Darüber hinaus können mittels PID auch spezielle Beeinträchtigungen (z.B. Taubheit) selektiert werden. In den USA boten 2006 3 % der Fertilisationskliniken, die PIDs durchführen, diese Art der positiven Selektion an (Baruch et al., 2008).

### **1.2.1 Spezielle Indikationen**

Im Institut für Humangenetik der Universität zu Lübeck gab es in den letzten Jahren einige Anfragen bezüglich der Präimplantationsdiagnostik bei monogenen Erbkrankheiten. Dazu zählen die Anfrage der Familie A bezüglich einer PID bei Chorea Huntington sowie die Anfrage der Familie B bezüglich einer PID bei Fragilem X-Syndrom. Diese Erkrankungen stellen mögliche Indikationen für eine PID dar. Da für beide Erkrankungen im Rahmen dieser Dissertation Testsysteme, die in der PID eingesetzt werden können, entwickelt werden sollten, werden diese beiden speziellen Indikationen im Folgenden näher besprochen.

#### **1.2.1.1 Indikation Chorea Huntington**

Die Chorea Huntington (engl: Huntington's Disease, kurz: HD) ist eine schwere neurodegenerative Erkrankung, deren Hauptsymptome choreatische Hyperkinesen und kognitive Veränderungen sind. Ausführlich beschrieben und charakterisiert wurde die Erkrankung von George Huntington (Huntington, 1872), von dem sie ihren Namen erhielt. Nachdem bereits 1983 die Lokalisation des Huntingtin Gens auf Chromosom 4 beschrieben worden war (Gusella et al., 1983), wurde zehn Jahre später als genetische Ursache die Expansion einer repetitiven CAG-Sequenz für die Erkrankung entdeckt (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Chorea Huntington tritt in der kaukasischen Bevölkerung mit einer Prävalenz von ca. 5-10:100.000 (Harper, 2002) auf. Männer und Frauen sind gleich häufig betroffen.

### **Klinik und Pathophysiologie der Chorea Huntington**

Das durchschnittliche Erkrankungsalter der Chorea Huntington liegt bei 30-50 Jahren, wobei eine Variabilität von 2-85 Jahren beschrieben wurde (Roos, 2010). Treten die ersten Symptome der Erkrankung bereits vor dem zwanzigsten Lebensjahr auf, so spricht man von der juvenilen Form der Chorea Huntington. Die Symptome der Erkrankung können in drei Bereiche unterteilt werden: psychische Veränderungen, neurologische Symptome (insbesondere Bewegungsstörungen) und Rückgang der intellektuellen Fähigkeiten. Noch vor Auftreten der motorischen Symptome kommt es oft schleichend zu psychischen Veränderungen, sodass der Krankheitsbeginn nicht genau bestimmt werden kann. Zu den psychischen Veränderungen zählen Reizbarkeit, Aggressivität, impulsives und enthemmtes Verhalten sowie Distanzminderung bis hin zu Persönlichkeitsveränderungen, die nicht selten eine Depression zur Folge haben. Die neurologischen Veränderungen fallen hauptsächlich durch choreatische Hyperkinesen, die durch ausladende, unwillkürliche und damit unkontrollierbare Bewegungen gekennzeichnet sind, auf. Hiervon sind überwiegend die Rumpfmuskulatur sowie die Arme und Beine im distalen Bereich betroffen. Auch die Gesichtsmuskulatur ist häufig überaktiv, was ein ständiges Grimassieren zur Folge hat. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kann ein Kontrollverlust der Zungen- und Schlundmuskulatur auftreten, was zu einer unverständlichen, abgehackten Sprache mit gelegentlich explosionsartigem Ausstoßen von Lauten und Problemen bei der Nahrungsaufnahme führt. Die Hyperkinese kann mit der Zeit in eine Hypo- bzw. Akinese übergehen. Diese Form der Bewegungsstörung steht bei der juvenilen Form oft von vornherein gegenüber der Hyperkinese im Vordergrund. Parallel nimmt auch die Gedächtnisfunktion ab, was fast immer in einer Demenz mit Desorientierung endet. Hierdurch ist das selbstständige Leben oft nicht mehr uneingeschränkt möglich. Die Lebenserwartung nach Krankheitsbeginn liegt bei durchschnittlich 17-20 Jahren, wobei die Haupttodesursache eine Pneumonie gefolgt vom Suizid ist (Roos, 2010).

Die pathophysiologischen Veränderungen bei der Chorea Huntington entsprechen einer Degeneration mehrerer Neuronengruppen in verschiedenen Bereichen des Gehirns. Am besten verstanden ist bisher die Neurodegeneration in den Basalganglien (Gutkunst et al., 2002). Die Basalganglien bestehen aus dem Striatum, Globus Pallidus internus und externus, dem Nucleus Subthalamicus sowie der Substantia nigra. Das Striatum erhält von

dem Kortex und dem Thalamus motorikfördernde Signale, die es über einen motorikfördernden und einen motorikhemmenden Weg an den Thalamus weiterleitet. Bei der Chorea Huntington kommt es auf Grund bestimmter neurochemischer Beschaffenheiten der verschiedenen Projektionsneurone insbesondere zu einem Ausfall des motorikhemmenden Wegs, was die choreatischen Hyperkinesen erklären könnte (Reiner et al., 1988; Gerfen, 1992; Gutekunst et al., 2002). Außerdem haben Reiner et al. (1988) gezeigt, dass im weiteren Verlauf der Erkrankung fast alle Projektionsneurone betroffen sind, was eine Erklärung für später auftretende Akinesen sein könnte.

### **Genetik der Chorea Huntington**

Die Chorea Huntington wird autosomal dominant vererbt. Kinder Betroffener sind mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % Anlageträger. Es liegt eine fast vollständige Penetranz vor, was bedeutet, dass Personen mit der entsprechenden Mutation fast zu 100 % an HD erkranken (Zühlke und Thies, 1996). Die Expressivität hingegen ist variabel, sodass Erkrankungsalter und Verlauf der Erkrankung nicht vorhersagbar sind.

Die molekulargenetische Ursache der Chorea Huntington besteht in einer Repeat-Expansion des Basentriplets CAG im *HTT*-Gen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 4 (4p16.3). Normalallele tragen 11-33 CAG-Repeats, wobei am häufigsten 17 und 21 Repeats vorkommen. Repeat-Längen von 34-39 Repeats werden als intermediäre Allele bezeichnet, die mit unvollständiger Penetranz assoziiert sind. Es ist also nicht vorhersagbar, ob diese Personen an der Chorea Huntington erkranken werden oder nicht (Zühlke und Thies, 1996). Bei HD-Patienten liegt eine Expansion auf mehr als 39 Repeats vor. Es besteht, insbesondere bei sehr großen Expansionen, eine negative Korrelation zwischen Repeat-Länge und Erkrankungsalter, das heißt je mehr CAG-Repeats vorhanden sind, desto früher manifestiert sich die Erkrankung (Andrew et al., 1993).

### **PID bei Chorea Huntington**

Die Chorea Huntington ist eine letal verlaufende neurodegenerative Erkrankung, für die keine kurative Therapie zur Verfügung steht. Dieses Wissen, sowie die krankheitsbedingten Symptome stellen eine enorme psychosoziale Belastung für betroffene Familien dar. Viele Paare blieben in der Vergangenheit kinderlos, weil sie das Risiko, dass ihre Nachkommen ebenfalls betroffen sind, nicht auf sich nehmen wollten.

Heute kann Ratsuchenden aus molekulargenetischer (technischer) Sicht eine PID für diese Erkrankung angeboten werden. Wie groß die Not der Betroffenen ist, zeigt die Tatsache, dass Chorea Huntington europaweit die dritthäufigste monogene Erkrankung ist, für die bislang PIDs durchgeführt wurden (Harper et al., 2012).

Die Gesetzeslage zur PID bei Chorea Huntington ist in Deutschland nicht ganz eindeutig. Laut Gendiagnostikgesetz (GenDG) dürfen vorgeburtliche Untersuchungen auf Erkrankungen, die sich erst nach dem 18. Lebensjahr manifestieren, nicht durchgeführt werden (§15 Abs. (2) GenDG). Laut ESchG ist allerdings die Durchführung einer PID bei einem familiär erhöhten Risiko für das Auftreten einer schwerwiegenden Erbkrankheit nicht rechtswidrig (§3a Abs. (2) ESchG). Dabei definiert das Gesetz den Begriff „schwerwiegende Erbkrankheit“ nicht genauer und schließt damit auch spätmanifestierende Erkrankungen wie die Chorea Huntington nicht explizit aus. Somit widersprechen sich beide Gesetze in Bezug auf eine PID bei HD. Folglich kann momentan nicht abschließend geklärt werden, ob die Durchführung einer PID bei der Erkrankung Chorea Huntington in Deutschland rechtskonform ist oder nicht.

### **1.2.1.2 Indikation Fragiles X-Syndrom**

Das Fragile X-Syndrom (FraX, auch Martin-Bell Syndrom genannt) ist eine neuronale Entwicklungsstörung, die erstmals 1943 von Martin und Bell beschrieben wurde. Patienten mit FraX weisen spezielle Verhaltensauffälligkeiten, eine Intelligenzminderung und somatische Besonderheiten auf. Bereits 1969 wurden von Lubs zytogenetische Auffälligkeiten an den X-Chromosomen von am Martin-Bell-Syndrom erkrankten Personen beschrieben. Die molekulargenetische Ursache des Fragilen X-Syndroms wurde 1991 von Verkerk et al. entdeckt und liegt in einer Veränderung des *FMR1*-Gens (fragile X mental retardation 1-Gen). Dieses Gen enthält in Exon 1 ein Repeat des Basentriplets CGG, das bei betroffenen Personen expandiert ist. Das Fragile X-Syndrom ist mit einer Häufigkeit von 1:4000 bei Jungen und 1:6000 bei Mädchen (Steinbach und Gläser, 2009) nach der Trisomie 21 die zweithäufigste Ursache für eine mentale Retardierung.

### **Klinik und Pathophysiologie des Fragilen X-Syndroms**

Kinder mit Fragilem X-Syndrom fallen schon früh durch einen Entwicklungsrückstand auf. Insbesondere die Sprachentwicklung ist meistens stark verzögert. Kommt es schließlich

zum Erlernen der Sprache, so ist diese oft sehr schnell, repetitiv und unverständlich. Darüber hinaus ist auch die motorische Entwicklung (freies Sitzen, freies Laufen) verzögert. Mit steigendem Alter werden dann einige somatische und Verhaltensauffälligkeiten deutlich. Zu den somatischen Auffälligkeiten gehören ein langes Gesicht mit vorspringender Stirn und großem eckigen Kinn sowie ein hoher Gaumen und große Ohren. Bei Jungen liegt nach der Pubertät zusätzlich häufig eine Makroorchidie vor (Steinbach und Steinbach, 2006). Zu den Verhaltensauffälligkeiten zählen Hyperaktivität, Impulsivität, eine geringe Aufmerksamkeitsspanne und autistische Züge. Oft liegt eine soziale Angst und Kontaktscheu vor, was z.B. in der Vermeidung des direkten Blickkontakts deutlich wird. Außerdem besteht, wie bereits erwähnt, fast immer eine Intelligenzminderung, die von einer leichten Lernschwäche bis zu einer schweren mentalen Retardierung reichen kann (Steinbach und Gläser, 2009). Weitere denkbare Symptome bei Patienten mit dem Fragilen X-Syndrom sind Krampfanfälle, Schlaf- und Sehstörungen, Mitralklappenprolaps und eine Überstreckbarkeit der Gelenke.

Menschen mit einer *FMR1*-Prämutation weisen zwar in der Regel nicht die Klinik des Fragilen X-Syndroms auf, haben aber ein erhöhtes Risiko für bestimmte andere Erkrankungen. So besteht bei Frauen ein erhöhtes Risiko einer prämaternen Ovarialinsuffizienz (POI) (Allingham-Hawkins et al., 1999). Eine POI besteht bei Einstellung der Menstruation vor dem 40. Lebensjahr (Coulam et al., 1986). 13-26 % der Frauen mit *FMR1*-Prämutation erleiden eine POI (Wittenberger et al., 2007). Hierbei besteht allerdings kein linearer Zusammenhang zwischen Repeatlänge und Häufigkeit der POI (Wittenberger et al., 2007). Die POI kann die Erfolge einer PID auf Grund mangelnder Eizellen erheblich einschränken. Außerdem kann es bei Prämutationsträgern zu dem Fragilen-X assoziiertes Tremor/Ataxie Syndrom (FXTAS), einer spätmanifestierenden, neurodegenerativen Störung kommen. Hierbei treten Symptome wie Intentionstremor, Gangataxie, Demenz, periphere Neuropathie, Parkinsonismus, und Dysautonomie auf (Hagermann et al., 2001; Hagermann und Hagermann, 2004).

Pathophysiologisch führt die Expansion des CGG-Repeats zu einer aberranten Faltung des *FMR1*-Gens und in Folge dessen zu einer Methylierung des DNA-Abschnitts. Das *FMR1*-Gen wird nicht mehr transkribiert und es kommt zu einem Fehlen des *FMR1*-Proteins (FMRP) (Sutcliffe et al., 1992). FMRP wirkt als Repressor der polyribosomalen Translation. Dabei beeinflusst es unter anderem Polyribosomen an Synapsen mit metabotropen

Glutamatrezeptoren (mGluR), was eine dauerhaft erhöhte Antwort auf die Stimulation des mGluR auslöst (Bear et al., 2004). Eine Folge dieser erhöhten Antwort ist die verstärkte intrazelluläre Aufnahme von AMPA-Rezeptoren und damit eine Verringerung oberflächlicher AMPA-Rezeptoren (Nakamoto, 2007). Ein Mangel dieser Rezeptoren wiederum führt zu einer veränderten synaptischen Aktivität und somit zu einer verringerten Plastizität im Gehirn (Steinbach und Steinbach, 2006; Garber et al., 2008).

### Genetik des Fragilen X-Syndroms

In der Mehrzahl der Fälle des Fragilen X-Syndroms liegt eine Expansion des CGG-Repeats im *FMR1*-Gen auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Xq27.3) der Erkrankung zu Grunde. Die Zuordnung der Repeatlängen zu Phänotypen ist nicht ganz eindeutig und variiert in der Literatur. In der Normalbevölkerung liegt die Repeat-Anzahl zwischen 5 und 50 (49-58) (z.B. Fu et al., 1991; Snow et al., 1993; Nolin et al., 2003). Eine Repeat-Anzahl von 59 bis 200 wird als Prämutationsbereich bezeichnet (Fu et al., 1991; Snow et al., 1993). Bei Frauen mit Prämutation besteht neben den bereits beschriebenen möglichen Erkrankungen das Risiko, dass es bei der Entstehung der Eizellen zu einer Expansion des prämutierten Repeats kommt und somit die Nachkommen Träger einer Vollmutation (ab ca. 200 CGG-Repeats) sind. Die Größe des prämutierten Allels korreliert mit der Wahrscheinlichkeit der Expansion des Repeats. Das kürzeste nachgewiesene Repeat, das in einer Generation zur Vollmutation expandiert ist, hatte 59 Repeats (Nolin et al., 2003). Einen Überblick über die Wahrscheinlichkeit der Expansion zur Vollmutation in Abhängigkeit von der Anzahl der maternalen Repeats zeigt Tabelle 1.

**Tab. 1: Risiko der Expansion von maternalen prämutierten CGG-Repeats im *FMR1*-Gen zur Vollmutation bei Nachkommen (aus Steinbach und Gläser (2009))**

Länge des maternalen Repeats	Risiko der Expansion zur Vollmutation (%)
59-69	6
70-79	31
80-89	58
90-99	80
100-200	99

Männliche Träger einer Vollmutation sind in der Regel von der Entwicklungsstörung betroffen. Bei weiblichen Trägerinnen einer Vollmutation hängt die Ausprägung der Krankheit von der X-Inaktivierung ab. Da Frauen im Gegensatz zu Männern zwei X-Chromosomen besitzen, wird zum Ausgleich der Gendosis ein X-Chromosom inaktiviert. Dieses Ereignis geschieht rein zufällig. Folglich ist es auch dem Zufall überlassen, ob das X-Chromosom mit dem *FMR1*-Normalallel oder das mit der Repeat-Expansion im *FMR1*-Gen inaktiviert wird. In der Regel sind heterozygote Frauen, bei denen das X-Chromosom mit dem *FMR1*-Normalallel inaktiviert ist, stärker betroffen.

Neben der Repeat-Expansion wurde auch von wenigen Fällen berichtet, in denen Deletionen (Gedeon et al., 1992) oder Veränderungen im Promotorbereich des *FMR1*-Gens (Milà et al., 2000) zu dem klinischen Bild des Fragilen X-Syndroms führten.

### **PID bei Fragilem X-Syndrom**

Das Fragile X-Syndrom ist nach der Trisomie 21 die häufigste Ursache für eine genetisch bedingte mentale Retardierung. Die Erkrankung stellt für betroffene Familien eine große Belastung dar. Schwangeren aus einer betroffenen Familie, bei welchen eine Prä- oder Vollmutation im *FMR1*-Gen nachgewiesen wurde, wird in Deutschland schon seit Jahren eine Pränataldiagnostik angeboten (Steinbach und Gläser, 2009). Das Ergebnis der Pränataldiagnostik kann Grundlage für die Entscheidung über einen Schwangerschaftsabbruch sein.

Heutzutage kann Paaren mit einem erhöhten Risiko für ein an Fragilem X-Syndrom erkranktem Kind eine Präimplantationsdiagnostik angeboten werden.

### **1.3 Biologische Grundlagen der PID**

Voraussetzung für die Durchführung einer PID ist eine *in-vitro*-Fertilisation (IVF) mittels intracytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI). Dafür werden der Frau nach hormoneller Stimulation Eizellen entnommen, an welchen jeweils der erste Polkörper (entstanden bei der ersten meiotischen Reifeteilung) anhaftet. In die Eizellen wird je ein Spermium injiziert, was die Vollendung der zweiten meiotischen Reifeteilung der Eizelle und damit die Entstehung des zweiten Polkörpers induziert. Es bilden sich ein maternaler und ein paternaler Vorkern, die ca. 18-20 Stunden später zu der Zygote verschmelzen (Montag et al., 2004). Durch die sich anschließende Teilung der Zygote entstehen sogenannte

Blastomeren, die sich weiterhin teilen. Am dritten Tag besteht der Embryo bereits aus acht Blastomeren. Im weiteren Verlauf kommt es zur Ausbildung von Zellkontakten (Kompaktierung), bis am fünften Tag nach der Befruchtung die Blastozyste entsteht (Wong et al., 2010; Chason et al., 2011). Mit dem Übergang zur Blastozyste geht die Totipotenz der Zellen verloren. Es entsteht ein Embryoblast, der sich zum Embryo weiterentwickelt sowie ein Trophoblast, dessen Zellen sich lediglich zum embryonalen Teil der Plazenta entwickeln können. Sowohl die Polkörper als auch Blastomeren und Trophoblasten können entnommen und zur präimplantativen genetischen Diagnostik verwendet werden. Jedes Zellstadium hat für die Diagnostik Vor- und Nachteile, welche nachfolgend erläutert und in Tabelle 2 zusammengefasst werden.

### **Polkörperdiagnostik (PKD)**

Bei der ersten und zweiten meiotischen Reifeteilung der Eizelle entsteht jeweils ein Polkörper. Polkörper sind keine embryonalen Zellen. Sie werden bei der PKD vor der Befruchtung und damit vor der Entstehung des Embryos entnommen und untersucht. Somit war die PKD bis zur Änderung des Embryonenschutzgesetzes im Juli 2011 die einzige legale präimplantative Diagnostik in Deutschland. Laut Verlinsky et al. (1992) ist keine Funktion der Polkörper bekannt, sodass auch nach deren Entnahme keine Folgeschäden bei den Kindern zu beobachten sind (Strom et al., 2000). Da sich die Polkörper selbst nicht weiter zum Embryo entwickeln, ist die PKD eine indirekte Untersuchung, bei der Rückschlüsse auf das in der Eizelle verbliebene genetische Material gezogen werden müssen. Bei dieser Art der Diagnostik muss eine große Anzahl an Zellen untersucht werden, da sich nur ca. 17 % der ursprünglich entnommenen Eizellen zu nicht betroffenen, transferierbaren Embryonen weiterentwickeln (Vandervorst et al., 1998). Von daher sollten mindestens sechs, besser aber mehr als neun Eizellen für die Diagnostik zur Verfügung stehen (Vandervorst et al., 1998). Da pro Eizelle nur zwei Polkörper vorhanden sind, können bei Ausfällen in der Diagnostik keine Wiederholungen angeschlossen werden. Die entsprechenden Eizellen können dann nicht beurteilt werden. Vorteilhaft bei der PKD ist, dass das Zeitfenster bis zum Transfer der Embryonen am spätestens sechsten Tag (Thornhill et al., 2005) relativ groß ist, was genügend Zeit für die Diagnostik lässt. Des Weiteren müssen bei dieser Art der Diagnostik genetische Mosaiken nicht berücksichtigt werden, da diese erst während der mitotischen Teilungen des

Embryos, frühestens bei der ersten Furchungsteilung, entstehen (Munne et al., 1994). Die PKD kann nicht für paternal dominant vererbte Erkrankungen angewandt werden. Bei autosomal rezessiv vererbten Erkrankungen kommt es zum Verwerfen von mutationstragenden Eizellen, die sich durch Befruchtung mit einem wildtypalleltragenden Spermium zu gesunden Embryonen entwickelt hätten (Handyside et al., 1989; van der Ven et al., 2008; Griesinger et al., 2009).

### **PID an Blastomeren**

Die PID an Blastomeren ist im Gegensatz zu der PKD eine direkte Diagnostik. Die krankheitsverursachende Mutation wird also selbst oder mittels Kopplungsanalyse an embryonalen Zellen nachgewiesen. Diese Art der Präimplantationsdiagnostik ist weltweit am weitesten verbreitet. Die Anzahl der zu untersuchenden Embryonen ist etwas geringer als bei der PKD, da sich bis zum Tag der Diagnostik (Tag 3) nur ca. 53 % der entnommenen Eizellen weiter entwickeln und noch weniger (43 %) biopsierbar sind (Vandervorst et al., 1998; Schwinger et al., 2005). Das Vorgehen bei der Blastomerenbiopsie am dritten Tag nach IVF wird von der European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) wie folgt empfohlen. Am Morgen des dritten Tags wird die den Embryo umgebene Zona Pellucida mechanisch, chemisch oder mittels Laser eröffnet und anschließend werden Blastomeren per Aspiration entnommen (Thornhill et al., 2005). In Bezug auf die Anzahl der zu entnehmenden Blastomeren ist in der Literatur aktuell ein Umdenken zu beobachten. Während Sermon et al. (2002) noch argumentieren, zwei Blastomeren zu entnehmen, um Fehldiagnosen auszuschließen, haben de Vos et al. (2009) gezeigt, dass die Geburtenraten nach Entnahme nur einer Blastomere signifikant höher sind als nach der Entnahme von zwei Blastomeren. In jedem Fall ist zu beachten, dass auch hier sehr wenig DNA vorhanden ist und damit das Risiko besteht, dass auf Grund von Ausfällen während der Diagnostik evtl. keine Aussage zum Genotyp eines Embryos gemacht werden kann. Darüber hinaus ist es auch bei der PID an Blastomeren auf Grund der geringen DNA-Menge nicht möglich, bei unklaren Ergebnissen in der Diagnostik Wiederholungen anzuschließen. Bis zum Transfer der Embryonen sind zwei bis drei Tage Zeit.

### **PID an Trophoblasten**

Die PID an Trophoblasten ist wie die Untersuchung an Blastomeren eine direkte Diagnostik, die zu einem etwas späteren Zeitpunkt (Tag 5) stattfindet. Die Blastozyste besteht am fünften Tag aus ca. 50-200 Zellen, sodass es möglich ist, mehrere Trophoblasten (5-10) zu entnehmen. Dadurch steht eine größere Ausgangsmenge an DNA zur Verfügung, was wiederum zu weniger Ausfällen während der Diagnostik führt. Darüber hinaus können hier bei eventuellen Unsicherheiten in der Diagnostik Wiederholungen zur Ergebnissicherung angeschlossen werden. Folglich konnten Kokkali et al. (2007) nach Blastomeren-Biopsie bei 75,2 % und nach Blastozysten-Biopsie bei 94,3 % der Embryonen eine Diagnose bezüglich der untersuchten Erkrankung stellen. Da bei diesem Verfahren nur die Embryonen untersucht werden, die sich bis zur Blastozyste entwickelt haben, ist der Arbeitsaufwand geringer und die Wahrscheinlichkeit einer Weiterentwicklung der Embryonen höher (Kokkali et al., 2007; Chang et al., 2011). Andererseits ist die Biopsie technisch aufwändiger und das Zeitfenster relativ klein, da die Embryonen spätestens an Tag 6 transferiert werden sollten (Thornhill et al., 2005).

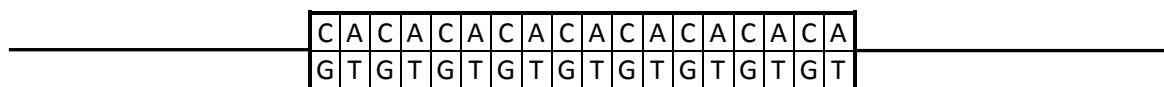
**Tab. 2: Diagnostik an Polkörpern, Blastomeren und Trophoblasten im Vergleich**

	<b>Eizelle</b>	<b>Blastomerstadium</b>	<b>Blastozyste</b>
<b>Zellen pro Embryo</b>	1-2 Polkörper	1-2 Blastomeren	5-10 Trophoblasten
<b>Zeitpunkt der Analyse</b>	Tag 1	Tag 3	Tag 5/6
<b>Anzahl der zu untersuchenden Individuen</b>	10-20 Eizellen	< 10 Blastomerstadien	< 10 Blastozysten
<b>Zeit bis zum Transfer</b>	5 Tage	3 Tage	1 Tag
<b>Art der Diagnostik</b>	indirekt	direkt	direkt
<b>Wiederholungen</b>	nicht möglich	nicht möglich	möglich

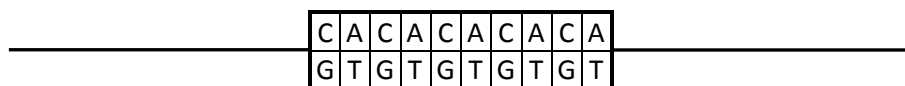
### **1.4 Molekulargenetische Grundlagen für den Aufbau einer PID**

Bei der PID und PKD stehen nur sehr wenige Zellen für die Analysen zur Verfügung. Folglich muss vor der Durchführung einer PID bzw. PKD ein sehr sicheres Verfahren zur Diagnostik der spezifischen Mutation etabliert werden. Der direkte Mutationsnachweis ist das sicherste Verfahren zur Diagnosestellung. Es ist jedoch nicht immer möglich, die genetische Veränderung selbst nachzuweisen. Deswegen ist es notwendig, die spezifische

Mutation zusätzlich indirekt durch eine Kopplungsanalyse mit Hilfe so genannter Mikrosatelliten-Marker, die in enger Nachbarschaft des mutierten Gens liegen, nachzuweisen. Mikrosatelliten-Marker sind repetitive DNA-Sequenzen (z.B. polyCA), die meist im nicht kodierenden Bereich des Genoms liegen. Sie können einem Polymorphismus unterliegen, das heißt, die Anzahl der Repeats kann in der Bevölkerung variieren. Folglich können auch die Repeat-Längen der beiden Allele einer einzelnen Person unterschiedlich sein (Heterozygotie). Ein Schema der Mikrosatelliten-Marker zeigt Abbildung 1.



a) DNA-Fragment mit 9 CA-Repeats



b) DNA-Fragment mit 5 CA-Repeats

**Abb. 1: Schema der Mikrosatelliten-Marker**

Polymorpher Mikrosatelliten-Marker mit einer das Repeat umspannenden DNA-Sequenz (——). Besteht die polymorphe Sequenz aus 9 CA-Repeats (a), so ist das DNA-Fragment länger als bei 5 CA-Repeats (b).

Durch Amplifikation und anschließende Fragmentlängenbestimmung lässt sich die Länge beider Allele eines Mikrosatelliten-Markers einer Person feststellen. Unter Zuhilfenahme des Stammbaums des ratsuchenden Paares mit Kinderwunsch lässt sich erarbeiten, welches Allel der Mikrosatelliten-Marker auf demselben Chromosom liegt wie das mutierte Gen (s. Abb. 2). Bei der Untersuchung der embryonalen Zellen kann man also durch eine Längenbestimmung der Mikrosatelliten-Marker Rückschlüsse darauf ziehen, ob das vorliegende Chromosom die Mutation trägt oder nicht.

	Mutter des Ratsuchenden		Vater des Ratsuchenden	
Marker A	124 bp	122 bp	126 bp	124 bp
Gen	Wildtyp	Wildtyp	Mutation	Wildtyp
Marker B	176 bp	176 bp	174 bp	178 bp
	Ratsuchender			
Marker A	122 bp	126 bp		
Gen	Wildtyp	Mutation		
Marker B	176 bp	174 bp		

**Abb. 2: Prinzip der Kopplungsanalyse**

Schematische Darstellung eines fiktiven Gens mit zwei flankierenden Mikrosatelliten-Markern (Marker A und B) in einer Familie.  : wildtypalleltragender Haplotyp;  : mutationstragender Haplotyp

## 1.5 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Dissertation sollten für zwei Familien, in denen die monogenen Erbkrankheiten Chorea Huntington bzw. Fragiles X-Syndrom vorkommen, Testsysteme entwickelt werden, mit welchen die entsprechende Erkrankung an einzelnen Lymphozyten der ratsuchenden Ehepaare sicher nachgewiesen bzw. ausgeschlossen werden kann.

Dazu sollten verschiedene, das jeweilige Gen flankierende Mikrosatelliten-Marker gefunden und auf Informativität in den Familien getestet werden. Anschließend sollte für jede Familie ein Multiplex-Seminested-PCR-System, in welchem vier informative Mikrosatelliten-Marker gleichzeitig amplifiziert werden können, aufgebaut werden. Bei der Familie mit Chorea Huntington sollte zusätzlich das krankheitsverursachende CAG-Repeat nachgewiesen und in das Multiplex-Seminested-PCR-System integriert werden. Daraufhin sollten die PCR-Systeme zur Validierung an einzelnen Lymphozyten der ratsuchenden Ehepaare getestet und die Allele Dropout Raten berechnet werden.

Die Testsysteme sollen später für eine PID bzw. PKD zur Verfügung stehen.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

**Tab. 3: Chemikalien und Reagenzien**

Produkt	Hersteller
10 x PCR-Puffer mit MgCl <sub>2</sub>	MP Biomedicals, Qiagen
10 x PCR Puffer ohne MgCl <sub>2</sub>	MP Biomedicals
100 bp DNA-Ladder	Invitrogen
Aqua dest.	Zentralapotheke
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Serva
BSA	Biochrome
DMSO	Roth
dNTPs Mix	Qbiogen
EDTA	Serva
Ethidiumbromid 10 mg/dl	Roth
Ficoll® 400	GE Healthcare
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems®
HPLC-Wasser	Merck
Illustra™ Sephadex™ G-50	GE Healthcare
LSM 1077	PAA
MgCl <sub>2</sub>	Qiagen
Multiplex PCR Mastermix 2 x	Qiagen
PBS (Dulbecco's)	PAA
Proteinase K	Serva, PeqLab
GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard	Applied Biosystems®
StarPure Agarose	StarLab
Taq-Polymerase	Qiagen
Titriplex III	Merck
Tris	MP Biomedicals, Serva
Xylencyanol	Serva

## 2.1.2 Geräte und Gebrauchsartikel

**Tab. 4: Geräte und Gebrauchsartikel**

Gerät/Gebrauchsartikel	Hersteller
Agarosegel-Kammer	Amersham Bioscience, OWL, PEQLAB
Agarosegel-Kämme, 25 Well, 1,0 mm	PEQLAB
Agarosegel-Spacer, 1,5 mm	PEQLAB
Agarosegel-Träger	Amersham Bioscience, OWL, PEQLAB
Column Loader, 45 µl	Millipore
Eismaschine	ZIEGRA
Filterpapier	Macherey-Nagel
Filterplatte	Millipore
Gefrierschränke	Liebherr, Zanussi
Glasflasche, 500 ml	Schott Duran
Hemocytometer	Digital Bio
Kühlschränke	Siemens
Magnetrührer	IKA®
Mikroskop	Zeiss
Mikrowelle	Hitachi
Mikrotiterplatte	Sarstedt, Millipore
Minishaker	IKA®
MoFlow XDP High Speed Cell Sorter	Beckman Coulter
PCR-Cooler	Eppendorf
PCR-Deckelkette	Thermo Scientific
PCR-Platten, 96 Well	Thermo Scientific
Pipetten, 0,1-1000 µl	Eppendorf, Finn, Gilson
Pipettenspitzen, 0,1-1000 µl	Eppendorf, Finn, Gilson
Reaktionsgefäße, 0,2-2,0 µl	Eppendorf
Sequenziergerät, 3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems®
Sequenzierplatte, 96 Well	Applied Biosystems®
Sequenzierplatten-Septe	Applied Biosystems®
Spannungsgeber	Pharmacia
Thermocycler	Eppendorf, Applied Biosystems®

UV-Kontaktlampe	Vetter
Waage	Sartorius
Zentrifugen	Heraeus Instruments, Eppendorf, PEQLAB
Zentrifugenrahmen	Millipore
Zentrifugenröhrchen, 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One

### 2.1.3 Puffer und Medien

**Tab. 5: Puffer und Medien**

Agarose-Gel, 2 %	4,4 g Agarose 220 ml 1 x TBE-Puffer 5,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/dl)
Einfriermedium	900 µl BSA 900 µl RPMI 1640 Medium mit 10 % DMSO
FACS-Puffer	50 ml Waschpuffer 50 µl BSA
Ficoll Ladebuffer, 3 x	8 ml 2,5 x TBE-Puffer 8 ml 20 % Ficoll 400 2 ml 0,1 % Bromphenolblau 2 ml 0,1 % Xylencyanol
Längenstandard für Agarose-Gelelektrophorese	10 µl 100 bp DNA Ladder 140 µl 3 x Ficoll 50 µl HPLC
Low TE-Puffer	0,1 ml 1 M Tris-Puffer 2 ml 0,5 M EDTA Auf 100 ml mit HPLC-Wasser auffüllen
Lysepuffer (5 mM Tris)	0,5 ml 1 M Tris Ultra Pure 99,5 ml HPLC-Wasser

TBE-Puffer, 5 x	215 g Tris 110 g Borsäure 14,8 g Titriplex III auf 4000 ml mit Aqua dest. auffüllen
TBE-Puffer, 1 x	800 ml 5 x TBE-Puffer auf 4000 ml mit Aqua dest. auffüllen
Waschpuffer	500 ml PBS 1 ml 0,5 M EDTA

### 2.1.4 Synthetische Oligonukleotide

**Tab. 6: Primer für das CAG-Repeat im HTT-Gen (4p16.3) und flankierende Mikrosatelliten-Marker sowie deren Fragmentlänge und repetitive DNA-Sequenz**

Primernamen	Primersequenz 5' → 3'	Primerlänge (in bp)	Fragmentlänge (in bp)	repetitive Sequenz der Mikrosatelliten
HD-Pf1 HD-Pf2-6FAM HD-Pr HD-Pr-6FAM	agtagcaggaacaggcatg caccatgctggccagcct gtagagggtgagtgagccga gtagagggtgagtgagccga	19 18 20 20	MP: 318 N: 229	AT
HD-Of1 HD-Of2-6FAM HD-Or HD-Or-6FAM	catccagcagctgtgatgaga cacatggagtgaccagacatt gtgagctgagatcgtgccact gtgagctgagatcgtgccact	21 21 21 21	MP: 280 N: 180	TAT
D4S127f1 D4S127f2-6FAM D4S127r D4S127r-6FAM	ctgttcacacttctccggttc ctgacctctgtttgcaatcca ctctgaagaggtggttcgcca ctctgaagaggtggttcgcca	21 21 21 21	MP: 282 N: 216	GT (+2xAT)
HD-Nf1 HD-Nf2-6FAM HD-Nr HD-Nr-6FAM	ggtgcactggagagggactt ggttgtagggctaaatgagac ggctacaagagcgaactccat ggctacaagagcgaactccat	20 21 22 22	MP: 406 N: 356	AC
HD-Lf1 HD-Lf2-6FAM HD-Lr HD-Lr-6FAM	cctctaacaatgcgagagctt catgcattgaaaatgacgatt ttctgcatttcgtgactcatc ttctgcatttcgtgactcatc	21 21 21 21	MP: 324 N: 286	CA
HD-Kf1 HD-Kf2-6FAM HD-Kr HD-Kr-6FAM	ccaaagtttagaggtcagaaaga cagtttgaccatgaggtgaga cgagatcctgtcactgtactc cgagatcctgtcactgtactc	22 21 21 21	MP: 260 N: 159	TG

Hu-4	atggcgaccctggaaaagctgatgaa	26	Hu3-Hu4:	CAG-Repeat
HDW-1-6FAM	atgaaggccttcgagtcctcaagtccttc	30	164	
HDW-3	ggcgggtggcggctgtgtctgctgctgctgc	30	W1-W3: 104	
Hu-3	ggcggctgaggaagctgagga	21	Hu4-W3:	
Hu-3-HEX	ggcggctgaggaagctgagga	21	143	
HD-Af1	aggattgcctgaggccaga	19	MP: 345	CA
HD-Af2-6FAM	gattatgccactacacta	18	N: 165	
HD-Ar	gtggtattgtcaaagtgat	19		
HD-Ar-6FAM	gtggtattgtcaaagtgat	19		
D4S3034f	gttcctagatgtggaattgct	21	MP: 315	GA
D4S3034f-6FAM	gttcctagatgtggaattgct	21	N: 246	
D4S3034r2-6FAM	ctgccaataaactgggtgaa	20		
D4S3034r1	gaaagctagctctgggacca	20		
HD-Cf1	ctggctatgagctccagtaca	21	MP: 220	TTCC
HD-Cf2-6FAM	ctgatcttagaaagaaagtat	21	N: 157	
HD-Cr1	attccagcccgagggaca	18		
HD-Cr1-6FAM	attccagcccgagggaca	18		
HD-Cf1	ctggctatgagctccagtaca	21	MP: 282	TTCC
HD-Cf2-6FAM	ctgatcttagaaagaaagtat	21	N: 219	
HD-Cr2	gcacgagaatcactgacact	21		
HD-Cr2-6FAM	gcacgagaatcactgacact	21		
D4S412f	cagtctctcatagttgtgctc	21	MP: 332	GT
D4S412f-6FAM	cagtctctcatagttgtgctc	21	N: 286	
D4S412r2-6FAM	cactggaagcaccaatcta	20		
D4S412r1	gaagtctgtatcctgtgtcca	21		

MP: Multiplex-PCR; N: Seminested-PCR

**Tab. 7: Primer für das FMR1-Gen (Xq27.3) flankierende Mikrosatelliten-Marker sowie deren Fragmentlänge und repetitive DNA-Sequenz**

Primernamen	Primersequenz 5' → 3'	Primerlänge (in bp)	Fragmentlänge (in bp)	repetitive Sequenz der Mikrosatelliten
FMR1_6743f	agtgtgccattgatgacacg	21	MP: 391	AC
FMR1_6743r-6F	ctcatgatggtacattttcatgc	23	N: 170	
FMR1_6743r2	caaacatattggctcctgctc	20		
FMR1_6765f	accaaaagtgagcagagtagc	21	190 bp	AC
FMR1_6765r	gagctccagtgtgacatgcat	21		
FMR1_6782f	agtggcacaattcgcaattgc	21	182 bp	AC
FMR1_6782r	atccaggtcgctgcaaagct	21		
FMR1_6787f	agccatgcaacaaactggcac	21	MP: 218 bp N: 142 bp	TA
FMR1_6787fN-6F	gagatttcagagacttgatcta	22		
FMR1_6787r	ggagttacaagggtgtcactg	21		
FMR1_6787r-6F	ggagttacaagggtgtcactg	21		

FMR1_6811f FMR1_6811r	cagctgctatgtgccaggaat catcatcatctgcgataactcct	21 22	152 bp	AC
FMR1_7005f-6F FMR1_7005r FMR1_7005f2 FMR1_7005rN-6F FMR1_7005r2	atgtgactgctccggaagttg tgatcatgccactgactcca gaaccagatgtgactgctcc gatagctcaagctcaggagtt taggtgcagtggtatgtgcct	21 21 21 21 21	1.: 176 bp MP: 278bp N: 223 bp	TG
FMR1_7174f FMR1_7174r-6F FMR1_7174r2	aggtgaccttcttaccaggctc tctccctactggacctctg gtgagtggcaccggttcgtg	21 19 20	MP: 236bp N: 167bp	GT
FMR1_7202f FMR1_7202r	gcctttactggccaatagcag cagggtcacagagcttgatac	21 21	212 bp	AC
FMR1_7217f FMR1_7217f-6F FMR1_7217fN-6F FMR1_7217r	tcatggccttcctaaggat tcatggccttcctaaggat taggaatatatggaatagtct gactgggcattaagagtcaca	21 21 21 21	MP: 257bp N: 185 bp	CA
FMR1_7224f FMR1_7224r	tgtcctccaagttcatacatgctc agcactagtacacaatagccag	23 21	201 bp	TA
DXS998f1 DXS998r2 DXS998r1	tggtatctcatcagacatcacagc ggtattaagatcattcatataacctc tcttaatgaactttgcattgatcc	24 25 24	MP: 223bp N: 142bp	CA
DXS548f1 DXS548f2 DXS548r	ccaggtgattctcatgatcaaag gtacattagagtacctgtgggtgc agagcttcactatgcaatggaatc	23 24 24	MP: 274bp N: 197bp	GT
FraXAC1f1 FRAXAC1f2 FRAXAC1r	tggagacttcaacacctctctgtc ctgaacatccttatcgatcaacttg catgatgagagtcacttgaagctg	24 25 24	MP: 252bp N:180bp	GT
DXS1215f1 DXS1215f2 DXS115r	tagcagatgtgtaagcttgggcaaaa aaacattaaacctctctcatcctc taagattgttcttctgccacccttc	26 24 26	MP: 239bp N:216bp	CA
DXS6687f1 DXS6687f2-6F DXS6687r2 DXS6687r1	aggtaccatttgtgtggaggctctg ctgaatgtaccacattcaggcttc aggcaaaagtctcagtgagtgtgtg cgaaatgtgctgcagtgtagttacc	25 24 26 26	MP: 324bp N: 250bp	CA

MP: Multiplex-PCR; N: Seminested-PCR

## 2.1.5 Programme und Datenbanken

**Tab. 8: Programme und Datenbanken**

Programm/ Datenbank	Hersteller
BioDocAnalyze 1.0	Biometra
Ensemble	<a href="http://www.ensemble.org">www.ensemble.org</a>
Gene Mapper	Applied Biosystems
OMIM	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim">www.ncbi.nlm.nih.gov/omim</a>
SeqWorks	Sven Opitz
SNPCheck3	<a href="http://ngri.manchester.ac.uk/SNPCheckV3/snpcheck.htm">ngri.manchester.ac.uk/SNPCheckV3/snpcheck.htm</a>
UCSC Genome Browser	<a href="http://genome.ucsc.edu">genome.ucsc.edu</a>

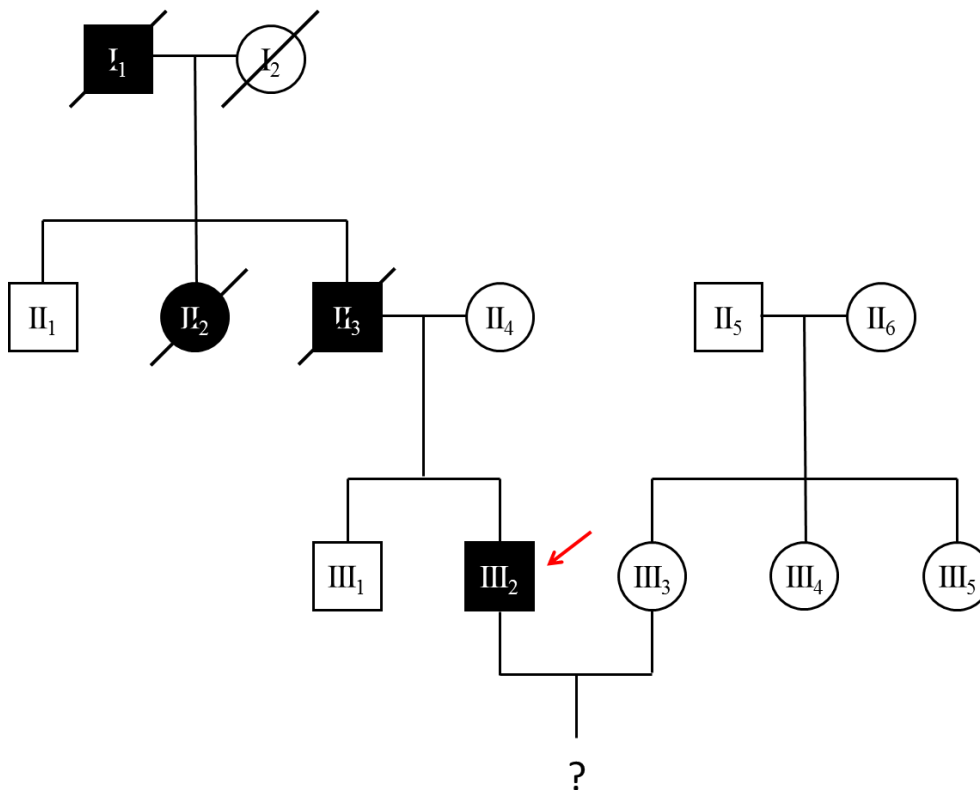
## 2.2 Familien und DNA-Proben

Für die Etablierung von zwei Testsystemen wurden im Rahmen dieser Dissertation DNA-Proben von sieben Personen aus zwei verschiedenen Familien verwendet. Die Personen haben sich als Ratsuchende in dem Institut für Humangenetik der Universität zu Lübeck vorgestellt. Sie äußerten den Wunsch nach einer PID, da in der Familie die Erbkrankheit Chorea Huntington bzw. Fragiles X-Syndrom bekannt ist. Beide Fälle wurden dem Klinischen Ethikkomitee der Universität zu Lübeck vorgestellt und von diesem befürwortet. Die Ethikanträge sind unter den Aktenzeichen 11-011K vom 24. November 2011 („Präimplantationsdiagnostik bei Fragilem X-Syndrom“) und 12-002K vom 15. März 2012 („Präimplantationsdiagnostik bei den Eheleuten [...] (Chorea Huntington)“) zu finden. Die Blutentnahmen und die DNA-Extraktion aus dem Vollblut erfolgten durch Mitarbeiter des Instituts.

### Familie A mit Chorea Huntington

In der Familie A kommt die Erbkrankheit Chorea Huntington vor. Den Stammbaum der Familie zeigt Abbildung 3. Der Ratsuchende (III<sub>2</sub>) hat bisher keine Symptome der Chorea Huntington entwickelt. Aufgrund der Erkrankung seines Vaters (II<sub>3</sub>), seiner Tante (II<sub>2</sub>) und seines Großvaters (I<sub>1</sub>) hat er sich jedoch einer prädiktiven Testung unterzogen. Er trägt ein *HTT*-Normal-Allel (18 CAG-Repeats) sowie ein expandiertes *HTT*-Allel (44 CAG-Repeat). Damit ist er Anlageträger für die Erkrankung Chorea Huntington und wird im Laufe seines

Lebens Symptome entwickeln. Er kann das expandierte *HTT*-Allel mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % an seine Nachkommen weiter vererben.



**Abb. 3: Stammbaum der Familie A mit Chorea Huntington**

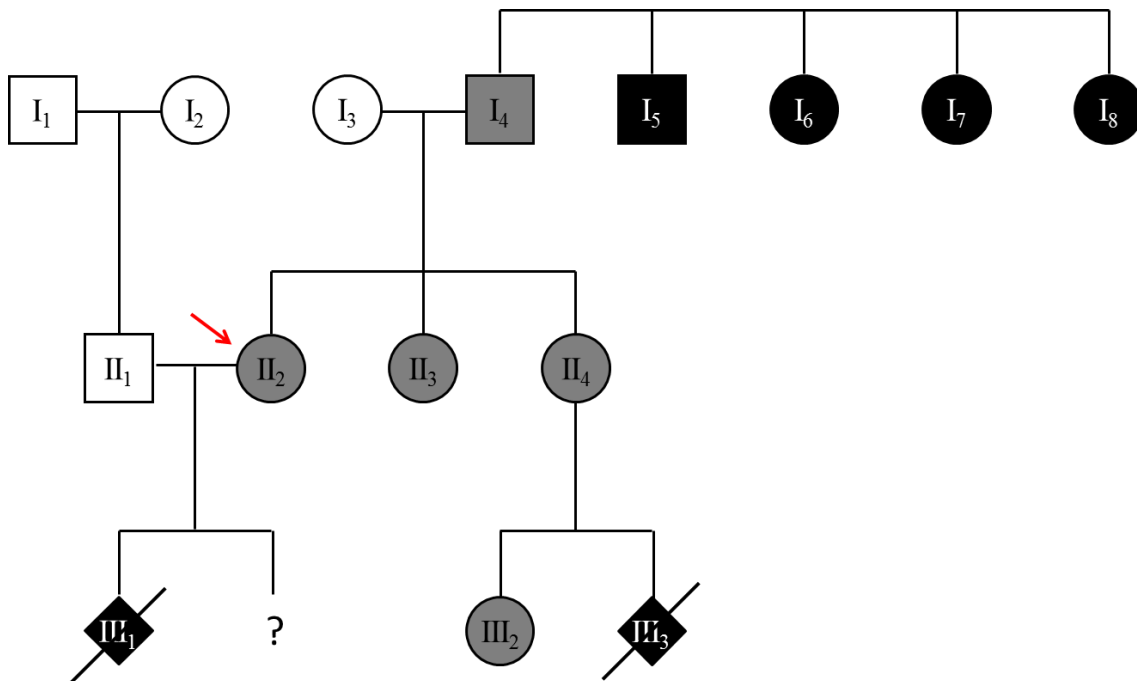
○: nicht betroffene weibliche Person; ●: betroffene weibliche Person; □: nicht betroffene männliche Person; ■: betroffene männliche Person; /: verstorbene Person; ↗: Ratsuchender; ?: mögliche Nachkommen des Ratsuchenden und seiner Ehefrau

In der Familie der Ehefrau des Ratsuchenden (III<sub>3</sub>) ist keine Chorea Huntington bekannt. Die prädiktive Testung der Ehefrau zeigte zwei *HTT*-Normal-Allele (17 und 20 CAG-Repeats). Das Ehepaar (III<sub>2</sub> und III<sub>3</sub>) fragte nach einer PID. Für unsere Analysen standen Blutproben der Personen III<sub>2</sub> (D320-12), III<sub>3</sub> (D319-12) und II<sub>4</sub> (D426-12) zur Verfügung. Da der Vater des Ratsuchenden (II<sub>3</sub>) leider verstorben ist, stand von ihm keine DNA zur Verfügung.

### Familie B mit Fragilem X-Syndrom

In der Familie B kommt die Erkrankung Fragiles X-Syndrom vor. Der Stammbaum der Familie ist in Abbildung 4 zu sehen. Die Ratsuchende (II<sub>2</sub>) ist (wie ihre beiden Schwestern (II<sub>3</sub> und II<sub>4</sub>)) Trägerin einer Prämutation im *FMR1*-Gen (70 Repeats). Der Vater der Ratsuchenden (I<sub>4</sub>) trägt ein CGG-Repeat im Grenzbereich zwischen Prämutation und Vollmutation (210 Repeats). Seine vier Geschwister (I<sub>4-8</sub>) tragen alle eine Vollmutation.

Das ratsuchende Ehepaar ( $\text{II}_1$  und  $\text{II}_2$ ) hat bereits einen Schwangerschaftsabbruch hinter sich. Der Embryo ( $\text{III}_1$ ) wurde mittels Pränataldiagnostik untersucht und wies eine Vollmutation im Bereich von 300 bis 630 CGG-Repeats im *FMR1*-Gen auf. Nun fragt das Ehepaar nach einer PID. Zur Etablierung eines Testsystems für das Fragile X-Syndrom standen Blutproben der Personen  $\text{I}_3$  (D820-11),  $\text{I}_4$  (D821-11),  $\text{II}_1$  (D90-12) und  $\text{II}_2$  (D89-12) zur Verfügung.



**Abb. 4: Stammbaum der Familie B mit Fragilem X-Syndrom**

○: nicht betroffene weibliche Person; ●: betroffene weibliche Person; □: nicht betroffene männliche Person; ■: betroffene männliche Person; ◐: Prämutationsträgerin; ◑: Prämutatonsträger; ◆: Geschlecht unbekannt, betroffen; /: verstorbene Person; ↗: Ratsuchende; ?: mögliche Nachkommen der Ratsuchenden und ihres Ehemanns

### Weitere DNA-Proben

Zusätzlich wurden von dem Institut für Humangenetik der Universität zu Lübeck vier anonymisierte Kontroll-DNAs (D903-10, D904-10, D241-11, D279-12) für diese Dissertation zur Verfügung gestellt.

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Polymerasekettenreaktion

#### Prinzip

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur exponentiellen Amplifikation definierter DNA-Abschnitte. Das Verfahren beruht auf der Eigenschaft einer DNA-Polymerase, DNA zu duplizieren. Es kann in drei Schritte, die sich zyklisch wiederholen, unterteilt werden: Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation. Im ersten Schritt wird der DNA-Doppelstrang durch thermische Denaturierung bei ca. 95 °C in seine beiden komplementären Einzelstränge getrennt. Danach kommt es zur Anlagerung (Annealing) von Primern an die DNA-Einzelstränge. Primer sind DNA-Oligonukleotide (ca. 18-30 bp), die komplementär zu einer DNA-Sequenz 5'- bzw. 3'-wärts des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts sind. Man benötigt für einen zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt zwei Primer, welche auf je einem der komplementären Einzelstränge das zu amplifizierende Stück begrenzen. Damit die entstehenden DNA-Fragmente bei der Kapillarelektrophorese (s. 2.3.3) detektiert werden können, wird in der Regel je einer der beiden Primer an dem 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. In dieser Dissertation wurden die Fluoreszenzfarbstoffe 6-Carboxy-Fluorescein (6-FAM) und Hexachloro-6-Carboxy-Fluorescein (HEX) verwendet. Die Temperatur des Annealings sollte in etwa der Schmelztemperatur der Primer entsprechen. Somit ist sie abhängig von der Basensequenz der Primer. Im Allgemeinen kann man sagen, dass die Temperatur mit der Höhe des GC-Gehalts steigt und für gewöhnlich in einem Bereich von 45-65 °C liegt. Der letzte Schritt der PCR ist die Elongation. Hierbei nutzt die thermostabile *Taq*-Polymerase das freie 3'-OH-Ende der Primer als Startpunkt und synthetisiert von hier aus den jeweiligen Gegenstrang bei einer Temperatur von 72 °C. In der Regel liegt nach ca. 30 Wiederholungen dieser drei Schritte genügend Material für die weiteren Analysen vor. Daraufhin folgt eine verlängerte Inkubationszeit bei 72 °C, bei der noch nicht komplett synthetisierte DNA-Abschnitte vervollständigt werden sollen.

#### Einfache PCR der Mikrosatelliten-Marker

Die PCRs zur Amplifikation der Mikrosatelliten-Marker an genomischer DNA wurden jeweils an einem Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt. Die Zusammensetzung der Ansätze zeigt Tabelle 9. In der Regel wurde das in Tabelle 10 dargestellte PCR-Programm

mit einer Annealing-Temperatur von 55 °C durchgeführt. Marker HD-P, HD-O und HD-N wurden abweichend davon auf eine Annealing-Temperatur von 60 °C eingestellt.

**Tab. 9: Zusammensetzung der PCR-Ansätze zur Amplifikation der Mikrosatelliten-Marker**

Ingredienz	Konzentration	Volumen in $\mu\text{l}$
genom. DNA	50 ng/ $\mu\text{l}$	1,0
HPLC-Wasser	-	18,9
Puffer	10 x	2,5
dNTPs	Je 10 nM	0,5
Primer forward	10 pmol/ $\mu\text{l}$	1
Primer reverse	10 pmol/ $\mu\text{l}$	1
Taq-Polymerase	5 U/ $\mu\text{l}$	0,1
$\Sigma$		25

**Tab. 10: PCR-Programm zur Amplifikation der Mikrosatelliten-Marker**

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
Initialisierung	95 °C	5 min
Denaturierung	95 °C	30 s
Annealing	55 °C	30 s
Elongation	72 °C	30 s
Elongation	72 °C	7 min
Lagerung	4 °C	$\infty$

### Multiplex-PCR

Bei der PID steht in der Regel nur sehr wenig Zellmaterial zur Verfügung. Folglich ist es notwendig, ein System zu entwickeln, in dem mehrere DNA-Abschnitte in einem Reaktionsansatz amplifiziert werden können – eine sogenannte Multiplex-PCR. Bei der Multiplex-PCR werden mehrere Primerpaare in einen Reaktionsansatz gegeben, sodass in diesem einen Ansatz verschiedene DNA-Abschnitte (Mikrosatelliten-Marker) amplifiziert werden können (s. Abb. 5a). Hierbei ist darauf zu achten, dass sich die zu amplifizierenden Fragmente nicht überschneiden, da es sonst zu unspezifischen PCR-Produkten durch ungewollte Primerkombinationen kommen kann. Desweiteren ist hier besonders wichtig, dass keine komplementären Sequenzen zwischen den verwendeten Primern vorliegen, die zu einer Dimerbildung führen könnten. In Folge dessen stünden die Primer für die gewollte Reaktion nicht mehr zur Verfügung.

In dieser Dissertation wurden bei der Multiplex-PCR ausschließlich unmarkierte Primer verwendet. Die folgenden Tabellen zeigen die bei der Standard-Multiplex-PCR verwendeten Reagenzien für genomische DNA (Tab. 11) und für Einzelzellen (Tab. 12) sowie das Standard-PCR-Programm (Tab. 13).

**Tab. 11: Zusammensetzung der Multiplex-PCR an genomischer DNA**

Ingredienz	Konzentration	Volumen in $\mu\text{l}$
genom. DNA	50 ng/ $\mu\text{l}$	1,0
HPLC-Wasser	-	9,5
Mastermix	2 x	12,5
Primer-Mix	2 pmol/ $\mu\text{l}$ je Primer	2,0
$\Sigma$		25,0

**Tab. 12: Zusammensetzung der Multiplex-PCR an Einzelzellen**

Ingredienz	Konzentration	Volumen in $\mu\text{l}$
lysierte Zellprobe	-	13,0
Mastermix	2 x	15,0
Primer-Mix	2 pmol/ $\mu\text{l}$ je Primer	2,0
$\Sigma$		30,0

**Tab. 13: PCR-Programm der Multiplex-PCR**

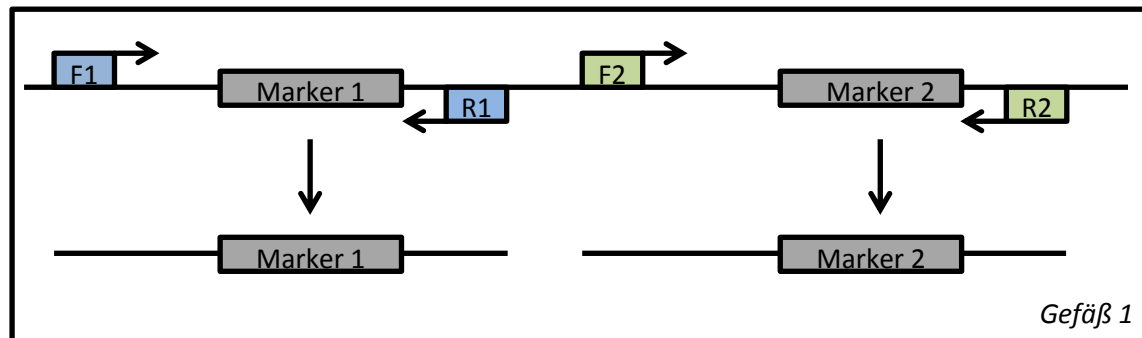
PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
Initialisierung	95 °C	7 min
Denaturierung	95 °C	60 s
Annealing	60 °C	90 s
Elongation	72 °C	90 s
Denaturierung	95 °C	30 s
Annealing	60 °C	90 s
Elongation	72 °C	90 s
Elongation	72 °C	7 min
Lagerung	4 °C	$\infty$

### Seminested-PCR

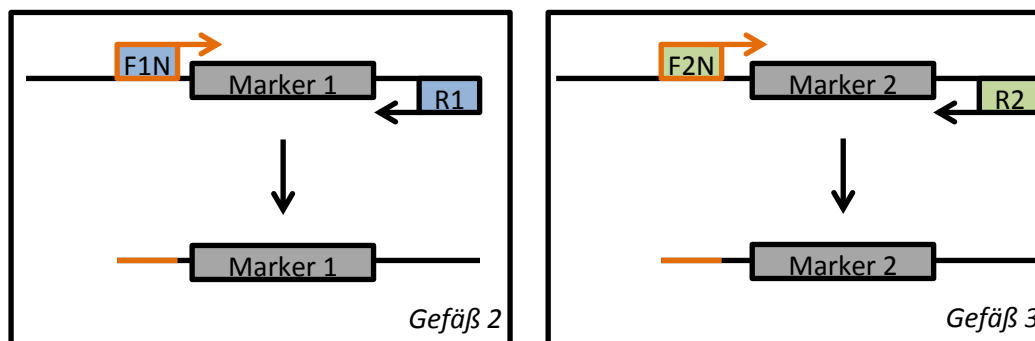
Ziel der Seminested-PCR ist es, nur noch genau eines der in der Multiplex-PCR voramplifizierten DNA-Fragmente weiter zu amplifizieren. In jeder Seminested-PCR wird nur ein Primerpaar eingesetzt, sodass nur eines der voramplifizierten DNA-Fragmente als Matrize dient. Dabei wird jeweils einer der beiden Primer ein Stück nach innen gelegt und

6-FAM markiert, sodass die in der Seminested-PCR entstehenden DNA-Fragmente etwas kleiner sind als die Multiplex-PCR-Produkte und durch die Markierung bei den folgenden Analysen detektiert werden können (s. Abb. 5). Die Anzahl der durchzuführenden Seminested-PCRs entspricht der Anzahl der in der Multiplex-PCR verwendeten Primerpaare.

a) Multiplex-PCR



b) Seminested-PCR



**Abb. 5: Schematische Darstellung von a) Multiplex- und b) Seminested-PCR**

—: DNA-Doppelstrang auf dem zwei exemplarische Marker (Marker 1 und 2) lokalisiert sind; F1, R1, F2, R2: forward-/ reverse-Primer zur Amplifikation der Marker 1/2; F1N, F2N: nach innen gelegte forward-Primer für die Seminested-PCR; →, ←: Syntheserichtung bei der Amplifikation ausgehend von den Primern; ↓: PCR; orange: 6-FAM-Markierung der forward Primer für die Seminested-PCR bzw. der entstehenden DNA-Fragmente

Die Seminested-PCRs wurden nach dem Programm zur Amplifikation der Mikrosatelliten-Marker (s. Tab. 10) durchgeführt. Auch die Zusammensetzung der Reaktionsansätze glich im Prinzip dem in Tabelle 9 beschriebenen Ansatz. Allerdings wurde hier anstelle von genomischer DNA 1 µl Multiplex-PCR-Produkt eingesetzt. Bei den Versuchen an genomischer DNA wurde das Multiplex-PCR-Produkt in der Regel 1:10 bis 1:500 verdünnt, bevor es in der Seminested-PCR eingesetzt wurde. Bei den Versuchen an Einzelzellen wurde das Multiplex-PCR-Produkt unverdünnt in der Seminested-PCR eingesetzt.

### PCR zur Amplifikation des CAG-Repeats im *HTT*-Gen

Zur Amplifikation des CAG-Repeats im *Huntingtin*-Gen wurden die PCR-Protokolle nach Warner et al. (1993) und Riess et al. (1993) verwendet. Hierbei wurden die PCR-Bedingungen, die die Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik der Universität zu Lübeck in der Routinediagnostik verwenden, übernommen. Diese sind für die Methode nach Warner et al. (1993) in Tabelle 14 und 15 sowie für die Methode nach Riess et al. (1993) in Tabelle 16 und 17 dargestellt. Für die PCR nach Warner et al. (1993) wurden die Primer HDW-1-6FAM und HDW-3, für die PCR nach Riess et al. (1993) die Primer Hu-4 und Hu-3-HEX verwendet. Die Lokalisation dieser vier Primer um das CAG-Repeat zeigt Abbildung 6. Bei der Amplifikation des CAG-Repeats im Multiplex-Seminested-Set wurden erst die Primer Hu-4 und HDW-3, daraufhin Hu-4 und Hu-3 in der Multiplex-PCR sowie die Primer HDW-1-6FAM und HD-W3 in der Seminested-PCR verwendet. Die Multiplex-PCR wurde entsprechend der in Tabelle 11 bis 13 beschriebenen Protokolle durchgeführt. Für die Seminested-PCR wurden die PCR-Bedingungen nach Warner et al. (1993) verwendet.



**Abb. 6: Lokalisation der Primer nach Riess et al. (1993) und Warner et al. (1993)**

—: DNA-Doppelstrang; grün hinterlegt: Primer nach Riess et al. (1993); blau hinterlegt: Primer nach Warner et al. (1993); orange: fluoreszenzmarkierte Primer

**Tab. 14: Zusammensetzung der Reaktionsansätze nach Warner et al. (1993)**

Ingredienz	Konzentration	Volumen in $\mu\text{l}$
genom. DNA	50 ng/ $\mu\text{l}$	2,0
HPLC-Wasser	-	15,4
Puffer	10 x	2,5
DMSO	100 %	2,5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0,5
dNTPs	Je 10 mM	1
HD-W1-6FAM	10 pmol/ $\mu\text{l}$	0,5
HD-W3	10 pmol/ $\mu\text{l}$	0,5
Taq-Polymerase	5 U/ $\mu\text{l}$	0,1
$\Sigma$		25,0

**Tab. 15: PCR-Programm für die PCR nach Warner et al. (1993)**

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
Initialisierung	95 °C	5 min
Denaturierung	95 °C	45 s
Annealing	70 °C	45 s
Elongation	72 °C	45 s
Elongation	72 °C	7 min
Lagerung	4 °C	∞

**Tab. 16: Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die PCR nach Riess et al. (1993)**

Ingredienz	Konzentration	Volumen in $\mu\text{l}$
genom. DNA	50 ng/ $\mu\text{l}$	2,0
HPLC-Wasser	-	15,9
Puffer	10 x	2,5
DMSO	100 %	3
dNTPs	Je 10 mM	0,5
Hu-3-HEX	10 pmol/ $\mu\text{l}$	0,5
Hu-4	10 pmol/ $\mu\text{l}$	0,5
Taq-Polymerase	5 U/ $\mu\text{l}$	0,1
$\Sigma$		25,0

**Tab. 17: PCR-Programm für die PCR nach Riess et al. (1993)**

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
Initialisierung	95 °C	5 min
Denaturierung	95 °C	30 s
Annealing	54 °C	30 s
Elongation	72 °C	60 s
Elongation	72 °C	7 min
Lagerung	4 °C	∞

### 2.3.2 Primer-Design

Für die PCR wurden geeignete Nukleinsäuresequenzen zur Herstellung von Oligonukleotiden, die später als Primer verwendet werden sollten, ausgewählt. Aus einer Gendatenbank wurden die zu amplifizierenden Sequenzen herausgesucht. 3'- und 5'-wärts davon wurden die Primer gelegt. Sie sollten eine Länge von 18-30 bp haben. Außerdem wurde darauf geachtet, dass möglichst einmalige Sequenzen ohne repetitive Sequenzen oder Poly-A/T/G/C-Bereiche ausgewählt wurden. Des Weiteren wurden ein GC-Gehalt von 40-60 % und eine Annealing-Temperatur von 55-65 °C angestrebt. Die

Annealing-Temperatur lässt sich einfach durch die Wallace-Regel abschätzen. Hierbei werden pro GC-Bindung 3 °C und pro A-T-Bindung 2 °C berechnet. Nach Möglichkeit sollten die Annealing-Temperaturen aller Primer relativ ähnlich sein und keine komplementären Sequenzen zwischen verschiedenen Primern vorliegen, da in der Multiplex-PCR alle Primer in einem Reaktionsansatz unter identischen Bedingungen funktionieren müssen. Alle Primer wurden mit dem Programm „SNPCheck3“ auf Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) sowie auf die Anzahl der Bindemöglichkeiten im Genom untersucht. Es wurde versucht, die SNPs sowie die Bindemöglichkeiten so niedrig wie möglich zu halten.

### 2.3.3 Elektrophorese

#### Prinzip

Die Elektrophorese ist eine einfache und schnelle Methode, um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen. Für jede Elektrophorese wird ein Trägermedium benötigt, in dem die einzelnen DNA-Fragmente getrennt werden können. Das Trägermedium wird in eine Pufferlösung gegeben und bildet ein molekulares Netz, durch welches die DNA-Fragmente im elektrischen Feld wandern. Die elektrophoretische Mobilität der zu trennenden Fragmente hängt von deren Größe und Ladung ab. Da DNA durch zahlreiche Phosphatgruppen negativ geladen ist, wandern alle DNA-Fragmente zur Anode. Die kürzeren Fragmente wandern jedoch schneller durch das molekulare Netz als die längeren, sodass es zu einer Auftrennung nach der Länge der DNA-Fragmente kommt.

#### 2.3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese wurden zunächst 2 %ige Agarose-Gele hergestellt. Es wurden 4,4 g Agarose in 220 ml 1 x TBE-Puffer gegeben und in der Mikrowelle ca. 4 Minuten erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Daraufhin wurde das Gemisch im Eisbad auf ca. 60 °C abgekühlt und mit 5 Tropfen (ca. 5,5 µl) Ethidiumbromid (10 mg/dl) versetzt. Das flüssige Gel wurde dann in eine Gelkammer mit 28er Kämmen zur Konstruktion der Slots gegossen. Nach ca. 30 Minuten war das Gel erkaltet und erstarrt. Dann wurden 4 µl der PCR-Produkte mit je 4 µl 3 x Ficoll-Ladepuffer gemischt. Das Agarose-Gel wurde in eine mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Gelkammer gegeben und die Gemische aus PCR-Produkt und Ficoll in die Slots pipettiert. In jeweils einen Slot

einer jeden Reihe wurde 4 µl 100 bp DNA-Ladder pipettiert, um die PCR-Produkte später bezüglich ihrer Länge beurteilen zu können. Danach wurde für ca. 30 Minuten eine Spannung von ca. 165 V angelegt. Das Agarose-Gel wurde anschließend von einer UV-Lampe durchleuchtet, sodass die einzelnen DNA-Fragmente durch das interkalierende Ethidiumbromid sichtbar wurden. Die Länge der PCR-Produkte konnte dann durch Vergleich mit den Banden der 100 bp DNA-Ladder grob abgeschätzt werden.

### **2.3.3.2 Kapillarelektrophorese**

Um die genaue Länge der Mikrosatelliten-Marker zu bestimmen, ist die herkömmliche Gelelektrophorese zu ungenau. Deswegen wurde zusätzlich eine Kapillarelektrophorese durchgeführt, bei der die Fragmentlängen auf eine Base genau bestimmt werden können.

#### **Prinzip**

Bei der Kapillarelektrophorese werden die DNA-Fragmente in dünnen Kapillaren aus Quarzglas in einem Sequenziergerät aufgetrennt. Die Kapillaren sind mit beiden Enden in je ein Gefäß mit Puffer getaucht, sodass sie komplett mit Puffer gefüllt sind. Zwischen beiden Kapillarenden kann durch eine Hochspannungsquelle ein elektrisches Feld erzeugt werden. Zu Beginn der Messung wird das eine Ende der Kapillare in die Probe getaucht und saugt diese an. Daraufhin taucht das Kapillarende wieder in das Puffergefäß. Die DNA-Fragmente wandern dann im elektrischen Feld und passieren dabei je nach Größe und Ladung zu unterschiedlichen Zeitpunkten einen UV-Detektor, der durch die 6-FAM-Markierung der Fragmente ein Signal registriert, welches in der Auswertung als Peak zu erkennen ist.

#### **Sephadexaufreinigung der PCR-Produkte**

Vor der Durchführung der Kapillarelektrophorese müssen die PCR-Produkte von überschüssigen Primern und Nukleotiden befreit werden, um Störfaktoren bei der Fragmentlängenanalyse zu minimieren. Hierzu werden die PCR-Produkte über Sephadexsäulen filtriert. Sephadex ist ein poröses Dextrangel, welches durch Quervernetzungen unterschiedlicher Dextranfraktionen mit Epichlorhydrin hergestellt wird. Das Polymer ist durch zahlreiche Hydroxylgruppen stark hydrophil und quillt daher unter Zugabe von Wasser zu einem Gel. Sephadex wird in verschiedenen

Vernetzungsgraden hergestellt, die die Ausschlussgrenze bei der Filtration bestimmen. Sephadex G-50 eignet sich für die Filtration der DNA-Fragmente in dieser Dissertation und wurde folglich verwendet. Sephadex wird in Pulverform geliefert und muss vor der Anwendung gequollen werden. Dazu wurden mit Hilfe des Column Loaders 45 µl Sephadex in jedes Well der Filterplatte gefüllt. Das Sephadex wurde mit je 300 µl HPLC-Wasser überschichtet und 3 Stunden bei Raumtemperatur gequollen. Daraufhin wurde das überschüssige Wasser 5 Minuten bei 910 g abzentrifugiert. Danach wurden ca. 20 µl pro PCR-Produkt mittig auf je eine Sephadexsäule pipettiert und 5 Minuten bei 910 g in eine Mikrotiterplatte zentrifugiert.

### **Durchführung der Kapillarelektrophorese**

Die mit Sephadex aufgereinigten PCR-Produkte wurden je nach Stärke der Bande auf dem Agarose-Gel 1:10-1:500 mit HPLC-Wasser verdünnt. In die 96-Well-Platte wurden 10 µl 1:100 mit HiDi-Formamid verdünnten Längenstandards (ROX-500) vorgelegt. Daraufhin wurde je 1 µl der verdünnten PCR-Produkte hinzugegeben. Die Gemische wurden ca. 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend wieder auf Raumtemperatur gebracht. Danach wurde die Messung im Sequenziergerät gestartet.

## **2.3.4 Einzelzell-Isolation**

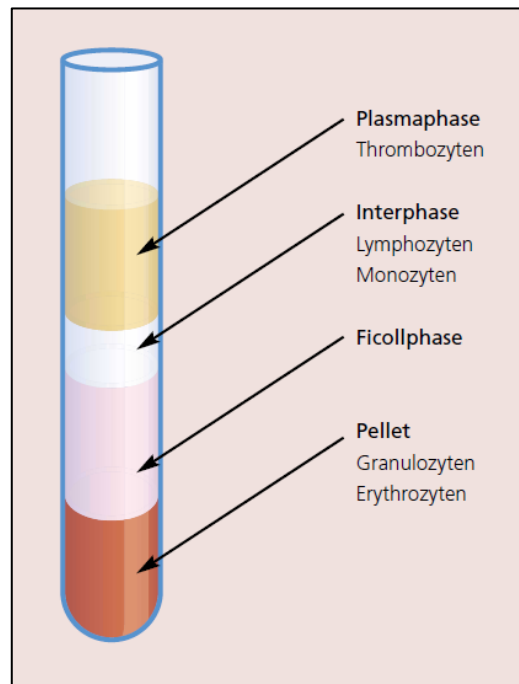
Bei der Etablierung einer PID/PKD müssen die PCR-Systeme zur Validierung an Einzelzellen getestet werden. Deswegen wurden einzelne Lymphozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation und Durchflusszytometrie aus dem peripheren Blut der Ratsuchenden isoliert.

### **2.3.4.1 Dichtegradientenzentrifugation**

#### **Prinzip**

Die Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) mittels Dichtegradientenzentrifugation ist der erste Schritt bei der Gewinnung von einzelnen Lymphozyten. Hierbei wird ein Stoffgemisch über ein bestimmtes Separationsmedium gegeben und zentrifugiert, sodass es zur Auftrennung der verschiedenen Bestandteile des Stoffgemischs nach Dichte und Volumen kommt und mehrere Phasen entstehen. Das hier verwendete Separationsmedium (LSM - Lymphocyte Separation Medium) ist speziell für

die Isolation von Lymphozyten entwickelt worden. Folglich wandern bei der Zentrifugation, wie in Abbildung 7 dargestellt, nur Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen durch das LSM und befinden sich damit nach der Zentrifugation ganz unten im Reaktionsgefäße. Die Lymphozyten befinden sich in der so genannten Interphase, direkt über dem LSM. Die Interphase wird noch von einem Plasma-Phosphatpuffer-Gemisch überdeckt.



**Abb. 7: Auftrennung der verschiedenen Zelltypen des Blutes nach Dichtegradientenzentrifugation mit LSM**

aus: PAA, The Cell Culture Company, URL: <http://www.paa.com/download/brochures/lymphocyteseperationmedium.html>

### Durchführung

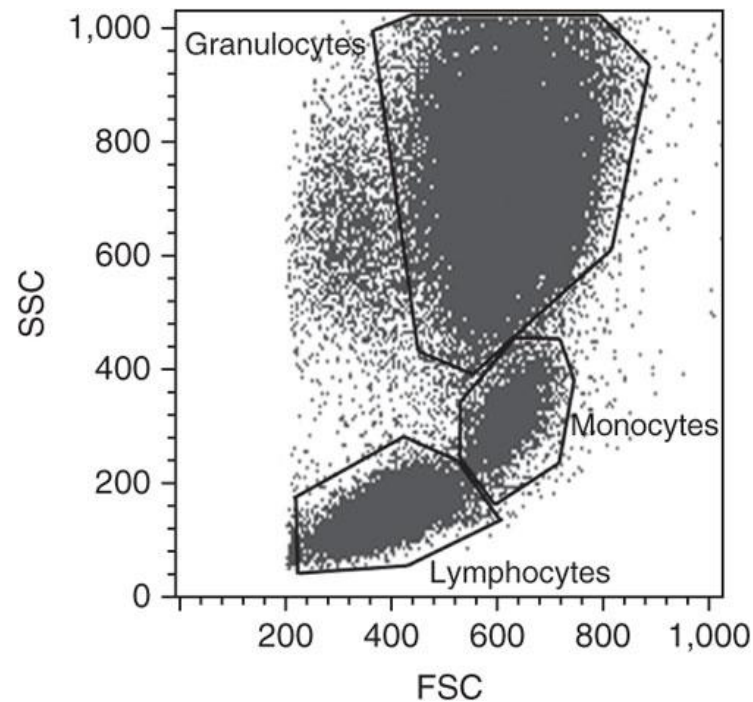
Es wurden 10 ml LSM in ein Reaktionsgefäß vorgelegt. Anschließend wurde das LSM vorsichtig mit 9 ml EDTA-Blut überschichtet, sodass zwei Phasen zu erkennen waren. Daraufhin wurde das Gemisch 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 300 g zentrifugiert. Um eine Zerstörung der Phasenauftrennung zu vermeiden, war darauf zu achten, dass die Zentrifuge nicht gebremst wurde. Nach der Zentrifugation waren die oben beschriebenen Phasen zu erkennen (s. Abb. 7). Da die Lymphozyten isoliert werden sollten, wurde die gesamte Interphase entnommen. Um die Interphase von Thrombozyten und Plasma zu befreien, wurden mehrere Waschschriffe angeschlossen. Dazu wurde die entnommene Interphase in ein zweites Reaktionsgefäß mit ca. 20 ml kaltem Waschlösungsmittel (PBS/1 mM

EDTA) gegeben. Das Gemisch wurde 7 Minuten bei 4 °C mit 350 g zentrifugiert, die Bremse wurde eingeschaltet. Es entstand ein Zellpellet am Boden des Reaktionsgefäßes, überdeckt von einem Überstand. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml kaltem Waschpuffer resuspendiert. Daraufhin wurde die Suspension auf 15 ml mit kaltem Waschpuffer aufgefüllt und das Gemisch wurde erneut 7 Minuten bei 4 °C mit 350 g zentrifugiert. Das Waschen wurde so oft wiederholt, bis der Überstand klar war. Auch der klare Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde mit ca. 1 ml 1:10 mit Waschpuffer verdünntem BSA-Puffer (1 Vol %) überschichtet und erneut resuspendiert. Anschließend wurden 10 µl der Suspension entnommen und mikroskopisch beurteilt. Dabei wurde eine Zellzählung durchgeführt. Auf Basis dieser wurde die Zellsuspension durch Hinzufügen von FACS-Puffer auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$ / ml gebracht.

### **2.3.4.2 Durchflusszytometrie**

#### **Prinzip**

Die isolierten PBMCs wurden mit Hilfe eines Fluorescence Activated Cell Sorters (FACS) sortiert. Die Grundlage des FACS ist die Durchflusszytometrie. Bei dieser Methode werden einzelne Zellen an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Durch das entstehende Streulicht können Rückschlüsse auf die Morphologie der jeweiligen Zelle gezogen werden. Bei dem Streulicht unterscheidet man den Forward Scatter (FSC) von dem Sideward Scatter (SSC). Mit Hilfe des FSC lassen sich Rückschlüsse auf das Volumen der Zelle, mit Hilfe des SSC Rückschlüsse auf die Granularität sowie etwaige Vesikel ziehen. Somit lassen sich die relativ kleinen Lymphozyten mit rundem kompakten Kern mittels FACS gut von Monozyten und Granulozyten unterscheiden (s. Abb. 8). In dem FACS-Gerät werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom einzeln an dem Laser vorbei geleitet. Je nach FSC und SSC werden direkt nach deren Messung unterschiedliche elektrische Ladungen an den Flüssigkeitsstrom gelegt, sodass Lymphozyten eine andere elektrische Ladung tragen als die übrigen PBMCs. Durch eine dünne vibrierende Nadel entstehen kleine Tropfen, die je eine Zelle enthalten und an elektrisch geladenen Platten vorbeigeleitet werden. Da die Lymphozyten eine andere elektrische Ladung tragen, werden sie von den Platten abgelenkt und in jeweils ein Well einer PCR-Platte geleitet.



**Abb. 8: Dotplot der Verteilung unterschiedlicher Zelltypen einer Zellsuspension nach Durchflusszytometrie**

SSC (Sideward Scatter): Sortierung nach Granularität der Zellen; FSC (Forward Scatter): Sortierung nach Volumen der Zellen; beispielhaft gezeigt aus: Basford et al. (2010) Fig. 1

### Durchführung

Die Sortierung der PBMCs mittels FACS erfolgte durch Dr. rer. nat. Tillman Vollbrandt aus dem Institut für systemische Entzündungsforschung der Universität zu Lübeck.

Nach der Sortierung wurden die PCR-Platten mit Siegelfolie verschlossen und bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.3.5 Zellyse

Um die DNA für die PCR zugänglich zu machen, wurden die Einzelzellen zunächst mittels Proteinase K lysiert. Dazu wurden von den mit Einzelzellen bestückten PCR-Platten nach kurzem Antauen Streifen a 8 Wells abgeschnitten. In die Wells wurden daraufhin Tris-Puffer und Proteinase K (Mengenangaben s. Tab. 18) gegeben. Die Streifen wurden verschlossen und abzentrifugiert. Daraufhin wurden die Wells kräftig gevortext, erneut abzentrifugiert und in den Thermocycler mit in Tabelle 19 dargestelltem Lyseprotokoll gegeben.

**Tab. 18: Zusammensetzung der Zellyse-Ansätze**

Ingredienz	Konzentration	Menge
Zelle im PCR-Gefäß	1	1 Zelle
Proteinase K-Lsg.	10 mg/ml	3,0 µl
Tris pH 8,0	5 mM	10,0 µl
Σ		13,0 µl

**Tab. 19: Lyseprotokoll**

Temperatur	Zeit
58 °C	15 min
95 °C	10 min
4 °C	10 min

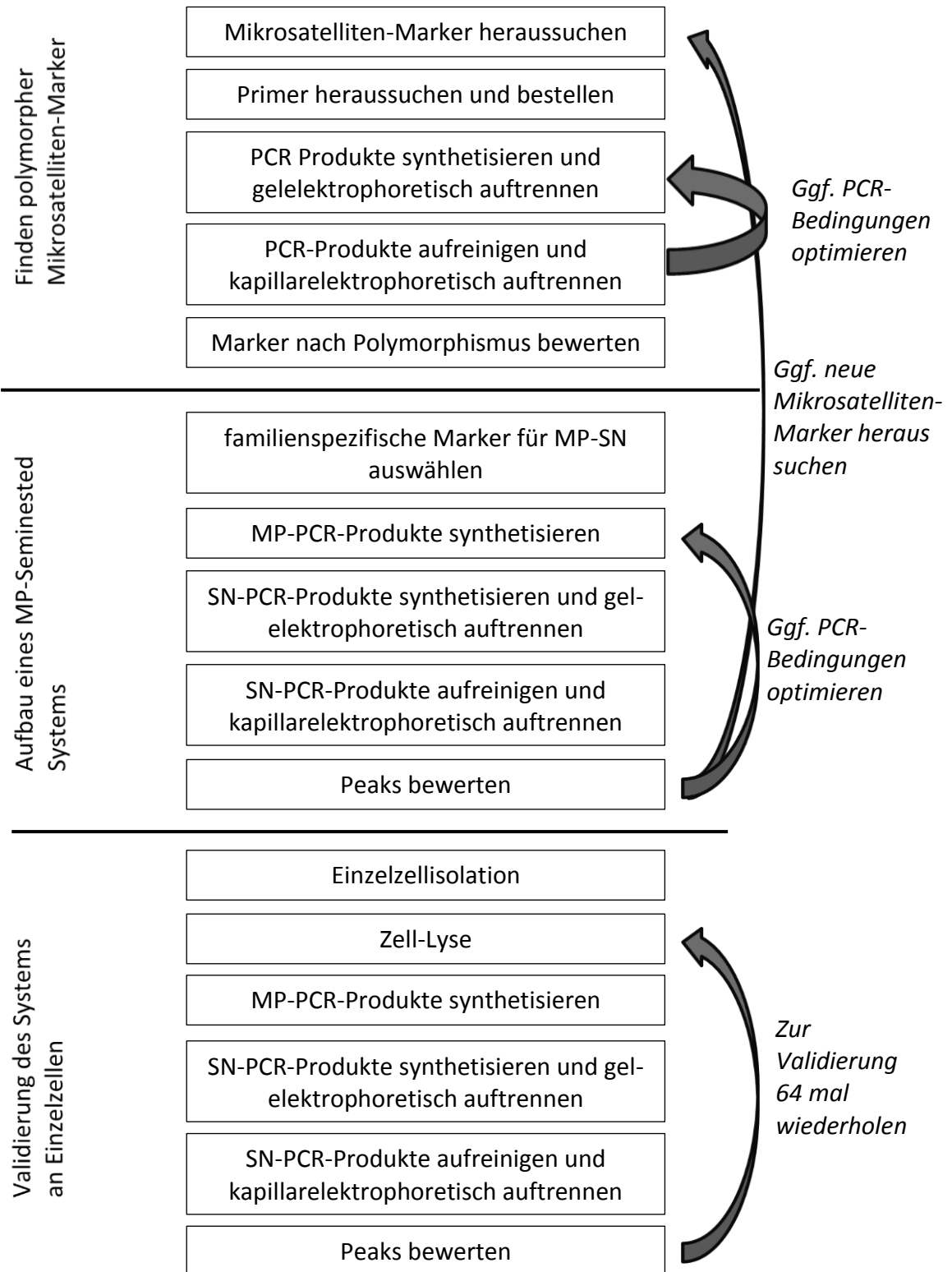
## 2.3.6 Spezielle Methoden

### 2.3.6.1 Aufbau von Testsystemen für die Einzelzelldiagnostik

Zur Etablierung von Testsystemen für die Einzelzelldiagnostik wurden die oben beschriebenen Methoden miteinander verknüpft. So entstand ein bestimmtes Schema, an welches sich während des Etablierungsprozesses gehalten wurde (s. Abb. 9).

Zunächst wurden Mikrosatelliten-Marker aus der Onlinedatenbank „UCSC Genome Browser“ herausgesucht (3.1.1; 3.2.1). Diese wurden an Kontroll-DNAs mittels PCR und Elektrophorese auf Längenpolymorphismen (3.1.2) und anschließend an den DNAs der ratsuchenden Familien auf Informativität getestet (3.1.3; 3.2.2). Des Weiteren wurde für die Erkrankung Chorea Huntington die Länge des CAG-Repeats im *HTT*-Gen bei dem Ehepaar bestimmt (3.1.4). Anschließend wurden Multiplex-Seminested-PCR-Systeme mit einer Kombination aus informativen Mikrosatelliten-Markern an genomischer DNA (3.1.5; 3.2.3/3.2.7) etabliert. Im nächsten Schritt wurden einzelne Lymphozyten der ratsuchenden Ehepaare isoliert und lysiert. Das Multiplex-Seminested-PCR-System wurde dann an den einzelnen Lymphozyten (3.1.6; 3.2.4/3.2.8) getestet. Zur Validierung wurden die Systeme an insgesamt 64 Einzelzellen (32 jedes Ehepartners) getestet (3.1.7; 3.2.9) und die Allele Dropout Raten wurden berechnet.

Zur Verdeutlichung ist in Abbildung 9 das generelle Vorgehen bei der Etablierung eines Testsystems für eine PID/PKD schematisch dargestellt.



**Abb. 9: Schema der Schritte bei der Etablierung einer PID**

MP: Multiplex; SN: Seminested

### 3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Dissertation wurden zwei Multiplex-Seminested-PCR-Systeme für die Analysen von Mutationen der Erkrankungen Chorea Huntington und Fragiles X-Syndrom aufgebaut. Diese Systeme wurden anschließend an einzelnen Lymphozyten validiert.

#### 3.1 Etablierung eines Testsystem für die Erkrankung Chorea Huntington

In der Familie A (Stammbaum s. Abb. 3) kommt die Erkrankung Chorea Huntington vor. Für den Betroffenen und seine Ehefrau wurde ein Testsystem für diese Erkrankung an Einzelzellen etabliert, welches für eine PID eingesetzt werden kann.

##### 3.1.1 Heraussuchen polymorpher Mikrosatelliten-Marker

Zunächst wurden zehn polymorphe, das *HTT*-Gen flankierende Mikrosatelliten-Marker aus der Datenbank „UCSC Genome Browser“ herausgesucht. Tabelle 20 zeigt die Lokalisationen der Mikrosatelliten-Marker.

**Tab. 20: Lokalisation und Polymorphismus der das *HTT*-Gen flankierenden Mikrosatelliten-Marker**

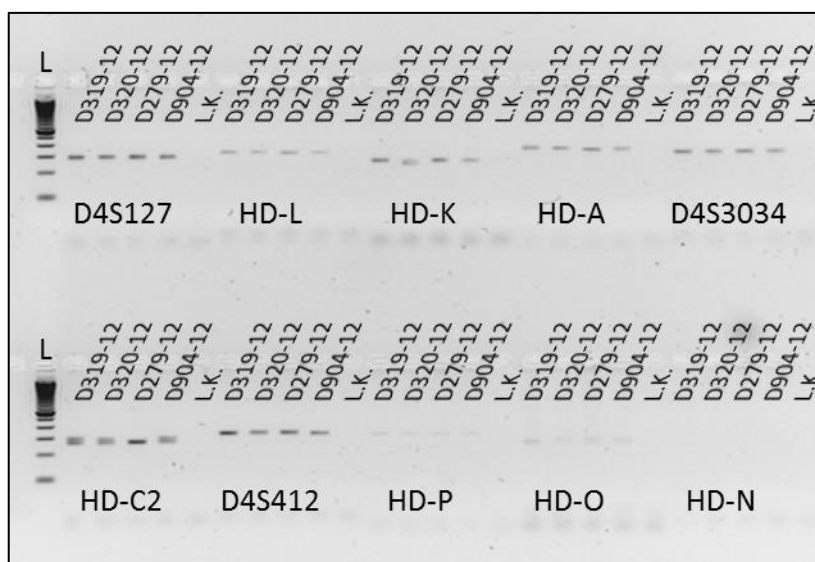
Mikrosatelliten-Marker	Lokalisation	Entfernung zum <i>HTT</i> -Gen	Anzahl der Allele in 4 Kontrollen
HD-P	2890127	186 kb	2
HD-O	2917889	159 kb	4
HD-N	3003053	73 kb	nicht auswertbar
D4S127	3038771	38 kb	4
HD-L	3051633	25 kb	3
HD-K	3052757	24 kb	5
<i>HTT</i> -Gen	3076606-3076667	-	-
HD-A	3085257	8 kb (intragenisch)	6
D4S3034	3225411	149 kb	4
HD-C2	3273833	197 kb	4
D4S412	3280692	241 kb	3

### 3.1.2 Test auf Polymorphismus

Um den Längenpolymorphismus der Marker an Kontroll-DNAs zu testen, wurden die Mikrosatelliten-Marker per PCR amplifiziert und mittels Fragmentlängenanalyse die Allelgrößen bestimmt. Die Fragmentlängenanalyse von Marker HD-N war nicht auswertbar. Die Analyse der anderen Marker ergab zwei (HD-P) bis sechs (HD-A) verschiedene Allele bei einer Anzahl von insgesamt acht Allelen (4 Kontroll-DNAs, s. Tab. 20), sodass alle Marker als polymorph bewertet und im weiteren Verlauf an den Patienten-DNAs getestet wurden.

### 3.1.3 Test auf Informativität

Daraufhin wurden die Marker auf Informativität für die Familie A an den DNAs des Ratsuchenden (D320-12), seiner Ehefrau (D319-12) und später seiner Mutter (D426-12) getestet. Ein Marker galt als informativ, wenn sich eindeutig zuordnen ließ, welches der beiden Allele des Ratsuchenden mit dem *HTT*-Normalallel bzw. dem *HTT*-Allel mit Repeat-Expansion koppelt und sich letzteres von den Allelen seiner Ehefrau unterschied. Zur Amplifikation der Marker wurde das Standard-PCR-Programm verwendet (s. Tab. 9 und 10). Wie in der Gelelektrophorese (Abb. 10) zusehen, sind bei den Markern D4S127, HD-L, HD-K, HD-A, D4S3034, HD-C2, D4S412, HD-P, HD-O und HD-N spezifische PCR-Produkte entstanden.



**Abb. 10: Gelelektrophorese der das *HTT*-Gen flankierenden Mikrosatelliten-Marker an genomischer DNA mit Multiplex-Primern**

L: Längenstandard (100 bp DNA-Ladder); DNA-Proben: D319-12: Ehefrau des Ratsuchenden; D320-12: Ratsuchender; D279-12: Kontrolle 1; D904-12: Kontrolle 2; L.K.: Leerkontrolle

Die Marker HD-P, HD-O und HD-N zeigten nach PCR bei 55 °C sehr unspezifische Banden in der Gelelektrophorese. Deswegen wurde die PCR auf 60 °C eingestellt, wobei die Banden deutlich schwächer aber dafür spezifischer wurden (s. Abb. 10). Schon in der Gelelektrophorese war bei einigen Markern (i.B. HD-K, HD-A, HD-C2) zu erkennen, dass die DNA-Fragmente der verschiedenen Personen im elektrischen Feld unterschiedlich weit gewandert waren und sich damit in ihrer Länge unterscheiden. Bei dem Marker HD-C2 waren darüber hinaus bei drei der vier DNAs Doppelbanden erkennbar, was für eine Heterozygotie dieses Markers bei den entsprechenden DNAs spricht (vgl. Abb. 10).

Zur Bestimmung der Allelgrößen der Marker wurden die PCR-Produkte kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Daraufhin wurde erörtert, welche der Marker für Familie A informativ sind. Die Analyse ergab einen nicht auswertbaren Marker (HD-N), zwei nicht informative Marker (HD-P und HD-L) sowie sieben informative Marker (s. Tab. 21).

**Tab. 21: Allelverteilung der das HTT-Gen flankierenden Mikrosatelliten-Marker in bp**

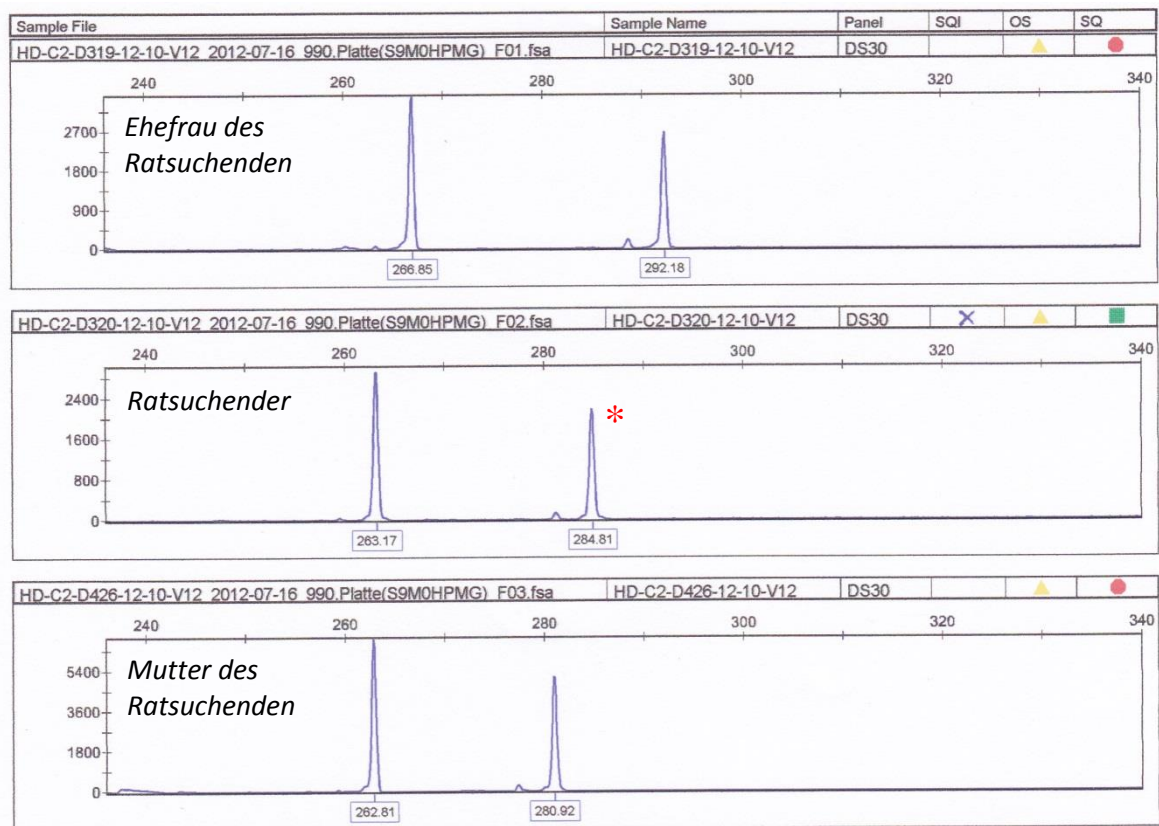
Marker	Ehefrau des Ratsuchenden		Ratsuchender		Mutter des Ratsuchenden		Bewertung
			Maternal	Paternal			
P	317	317	320	320	/	/	nicht informativ
O	264	273	279	273	279	279	informativ
127	281	283	283	285	283	287	informativ
N	?	?	?	?	/	/	nicht auswertbar
L	327	329	329	331	329	331	nicht informativ
K	264	264	244	262	244	266	informativ
A	342	356	342	344	342	338	informativ
3034	313	313	311	313	311	311	informativ
C2	267	291	263	285	263	281	informativ
412	324	324	332	324	332	334	informativ

?: Fragmentlängenanalyse nicht auswertbar; /: Fragmentlängenanalyse wurde nicht durchgeführt; rot: Allel koppelt mit Repeat-Expansion im HTT-Gen; orange: Kopplung des Allels mit Repeat-Expansion im HTT-Gen unklar

Beispielhaft soll im Folgenden für den informativen Marker HD-C2 (Abb. 11) und den nicht informativen Marker HD-L (Abb. 12) besprochen werden, wie sich die Beurteilung der Marker aus den Fragmentlängenanalysen ergibt.

Der Ratsuchende hat für den Marker HD-C2 ein 263 bp sowie ein 285 bp langes Allel. Die leicht variierenden Messungen von bspw. 263,17 bp (Ratsuchender) und 262,81 bp

(Mutter des Ratsuchenden) sind technisch bedingt und können gerundet werden. Das Allel wird mit 263 bp angegeben. Da die Mutter des Ratsuchenden ein 263 bp und ein 281 bp Allel aufweist, lässt sich schlussfolgern, dass der Ratsuchende das 263 bp Allel von seiner Mutter geerbt hat. Folglich muss er das 285 bp Allel von seinem Vater geerbt haben. Da der Vater des Ratsuchenden von Chorea Huntington betroffen war, ist es eindeutig, dass das 285 bp Allel des Ratsuchenden an das *HTT*-Allel mit Repeat-Expansion und das 263 bp Allel an das Wildtyp-*HTT*-Allel koppelt. Die Ehefrau des Ratsuchenden trägt die Allel 267 bp und 291 bp, die sich von denen ihres Ehemannes unterscheiden.



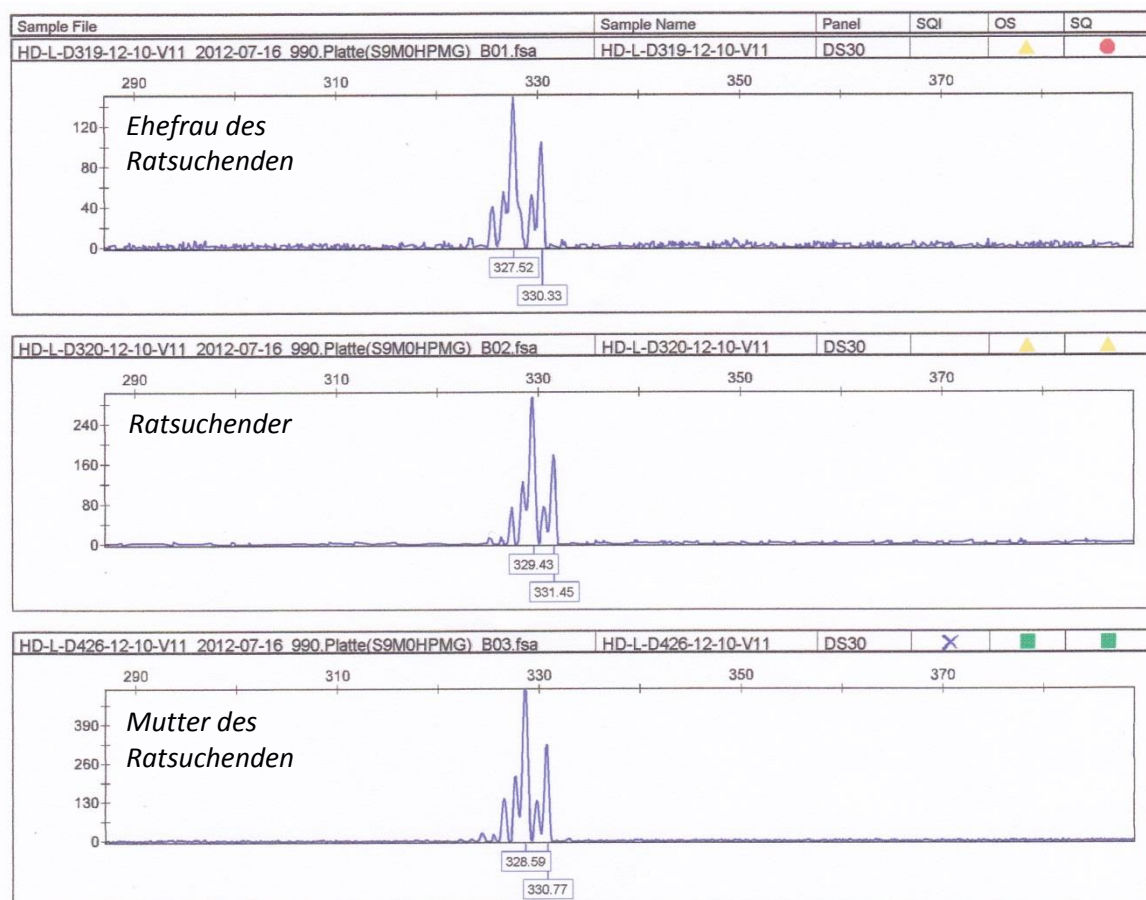
**Abb. 11: Kapillarelektrophorese des Markers HD-C2 von dem Ratsuchenden sowie seiner Ehefrau und seiner Mutter**

Die drei getesteten Personen weisen in der Kapillarelektrophorese des Markers HD-C2 je zwei Peaks auf und sind damit heterozygot für diesen Marker. Der Ratsuchende hat wie seine Mutter ein 263 bp langes Allel und hat dieses somit von ihr geerbt. Das paternal ererbte Allel des Ratsuchenden koppelt mit Repeat-Expansion im *HTT*-Gen (\*).

Damit ein Marker informativ ist und für die PID eingesetzt werden kann, sollte es für jeden Embryo des Paares möglich sein, zu beurteilen, welches paternale bzw. maternale Allel des Markers er geerbt hat. Im Falle des Markers HD-C2 wird ein Embryo, der das

väterliche 285 bp Allel, welches mit der Repeat-Expansion koppelt, trägt, Anlageträger für die Chorea Huntington sein.

Für den Marker HD-L weist der Ratsuchende die gleichen Allele wie seine Mutter auf (329 bp und 331 bp). Da keine DNA-Probe des Vaters des Ratsuchenden vorliegt, lässt sich nicht klären, welches der beiden Allele er von seiner Mutter und welches er von seinem Vater geerbt hat. Folglich kann auch nicht geschlussfolgert werden, welches der Allele des Markers HD-L des Ratsuchenden an das *HTT*-Allel mit Repeat-Expansion koppelt. Der Marker HD-L ist damit in dieser Familie nicht informativ.

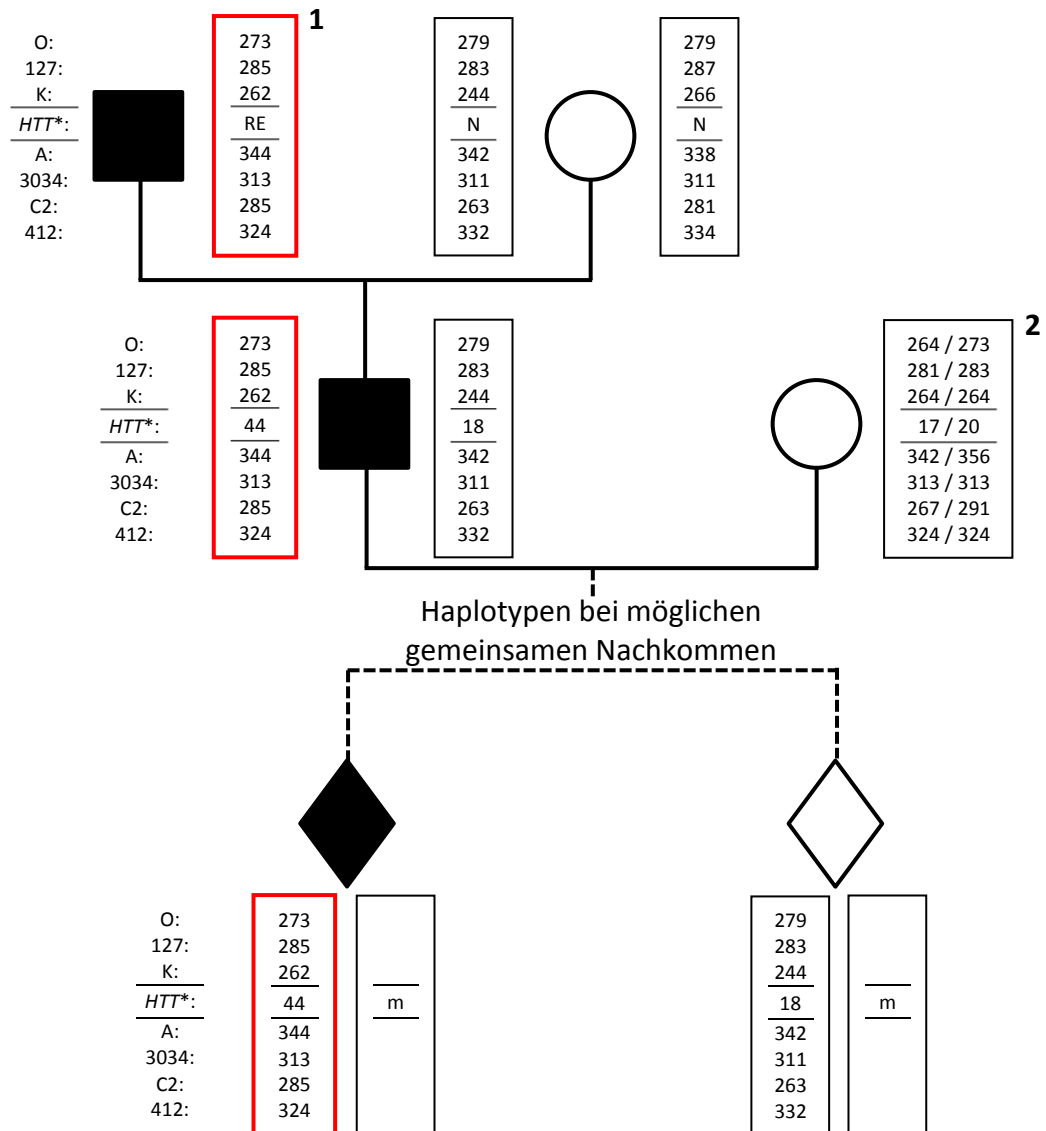


**Abb. 12: Kapillarelektrophorese des Markers HD-L von dem Ratsuchenden sowie seiner Ehefrau und seiner Mutter**

Die drei getesteten Personen weisen in der Kapillarelektrophorese des Markers HD-L je zwei Peaks auf und sind damit heterozygot für diesen Marker. Beide Allele des Ratsuchenden und seiner Mutter sind identisch. Deswegen kann nicht erörtert werden, welches Allel er von seiner Mutter geerbt hat.

Aus den Allelgrößen der informativen Marker lässt sich ableiten, welcher Haplotyp eines Kindes des ratsuchenden Ehepaars das expandierte und welcher das normal lange CAG-Repeat tragen würde. Die Haplotypen der Ehefrau des Ratsuchenden konnten nicht

konstruiert werden, da keine DNA-Proben ihrer Eltern zur Verfügung standen. Somit kann auch für mögliche gemeinsame Nachkommen nur der paternal ererbte Haplotyp genau bestimmt werden. Der maternal ererbte Haplotyp bei gemeinsamen Nachkommen dieses Paares ist für die diagnostische Aussage bezüglich der Anlageträgerschaft der Chorea Huntington nicht relevant. Die Haplotypen der drei untersuchten Personen sowie der möglichen gemeinsamer Nachkommen sind in Abbildung 13 dargestellt.

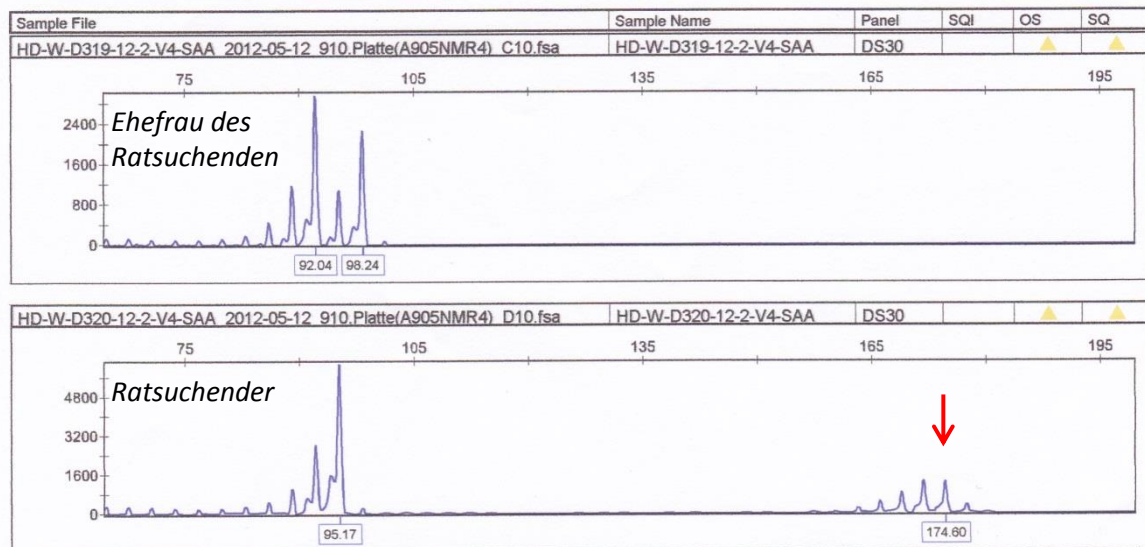


**Abb. 13: Haplotypen für die repetitive CAG-Sequenz im HTT-Gen und sieben gekoppelte Marker der Familie A und der möglichen gemeinsamen Nachkommen**

○ : weibliche Person; □ : männliche Person; ◇ : möglicher Nachkomme des Ehepaars, Geschlecht unbekannt; ■, ◆ : Träger eines expandierten CAG-Repeats im HTT-Gen; □ : Haplotyp mit expandiertem CAG-Repeat; \* : bei getesteten Personen und möglichen Nachkommen angegeben in Anzahl der CAG-Repeats nach Rieß, bei nicht getesteten Personen: N: HTT-Normalallel; RE: Repeat-Expansion im HTT-Gen; <sup>1</sup> Haplotyp rekonstruiert, da Person verstorben; <sup>2</sup> Die Haplotypen konnten nicht konstruiert werden, da lediglich eine Blutprobe der Ehefrau des Ratsuchenden, nicht jedoch von ihren Eltern verfügbar war, m: maternale Allele

### 3.1.4 Nachweis des krankheitsverursachenden CAG-Repeats

Das bei pathologischer Expansion Chorea Huntington verursachende CAG-Repeat im *HTT*-Gen wurde bei beiden Ehepartnern mit den Methoden nach Riess et al. (1993) und Warner et al. (1993) (s. Tab. 14-17) nachgewiesen. Die Analyse ergab ein Normalallel und ein expandiertes Allel für den Ratsuchenden sowie zwei Normalallele für seine Ehefrau. Die Ergebnisse der Kapillarelektrophorese zeigt Abbildung 14.



**Abb. 14: Fragmentlängenanalyse des CAG-Repeats des Ratsuchenden und seiner Ehefrau nach PCR nach Warner et al. (1993)**

Der Ratsuchende weist ein Normalallel und ein expandiertes *HTT*-Allel (↓), seine Ehefrau zwei Normalallele auf.

Die Anzahl der CAG-Repeats berechnet sich aus der gemessenen Fragmentlänge abzüglich der mitamplifizierten, das CAG-Repeat umspannenden DNA-Sequenz, dividiert durch drei. Es fielen geringe Unterschiede zwischen den nach Rieß et al. (1993) bzw. Warner et al. (1993) ermittelten Repeatlängen auf. Ursache hierfür ist ein polymorphes CCG-Repeat in direkter Nachbarschaft zu dem CAG-Repeat. Dieses wird bei den direkt an das CAG-Repeat grenzenden Primern bei der Methode nach Warner et al. (1993) nicht mitamplifiziert, bei der Methode nach Rieß et al. (1993) schon. Die berechneten Repeatlängen sind in Tabelle 22 dargestellt.

**Tab. 22: Anzahl der CAG-Repeats des Ratsuchenden und seiner Ehefrau nach PCR nach Riess et al. (1993) bzw. Warner et al. (1993)**

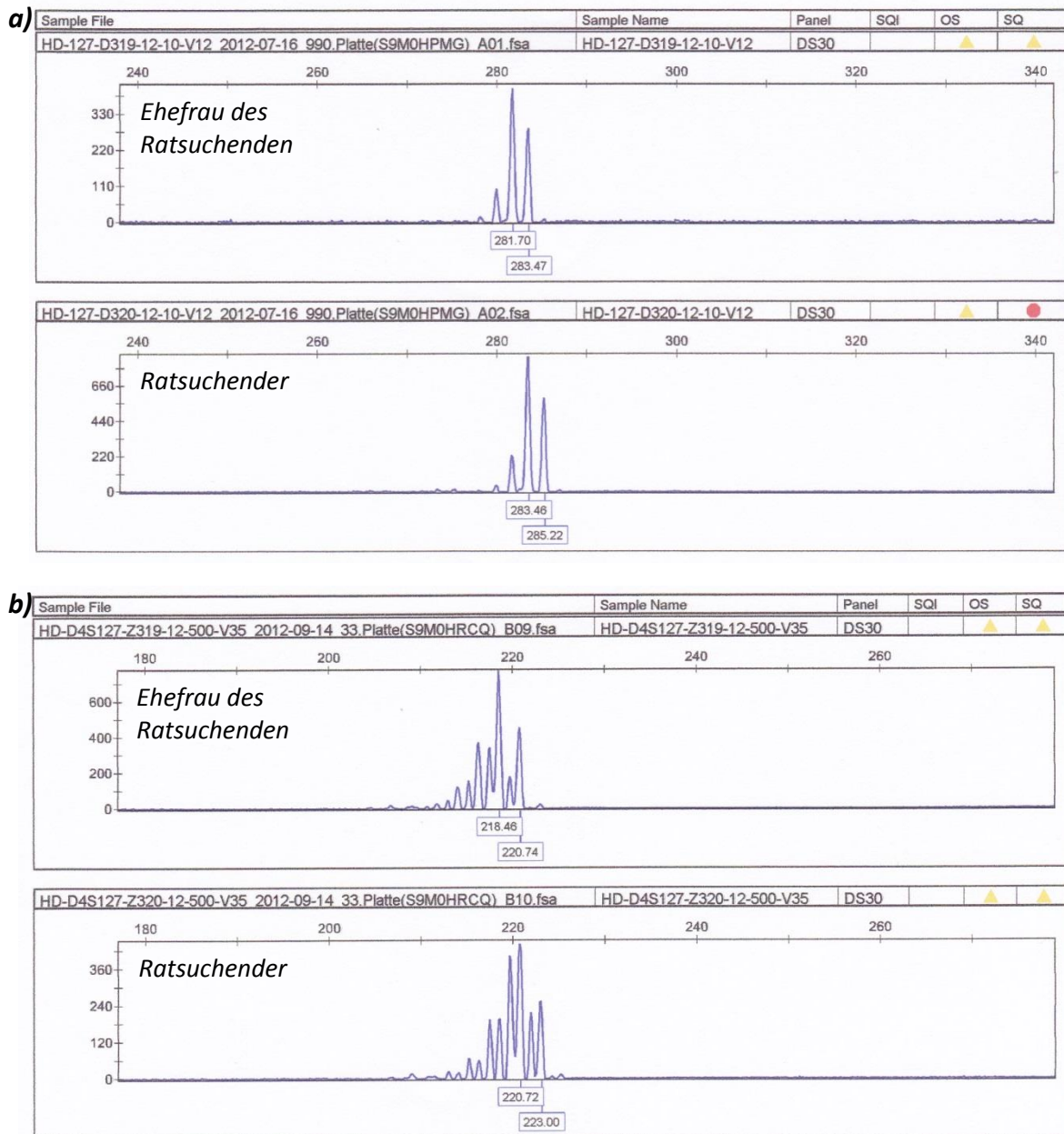
Test-System	PCR nach Rieß et al. (1993)		PCR nach Warner et al. (1993)	
	Fragmentlänge in bp	Anzahl der CAG- Repeats	Fragmentlänge in bp	Anzahl der CAG- Repeats
Ratsuchender	160 / 241	18 / <span style="border: 1px solid red;">44</span>	95 / 174	16 / <span style="border: 1px solid red;">42</span>
Ehefrau des Ratsuchenden	157 / 169	17 / 20	92 / 98	15 / 17

 : expandiertes, die Chorea Huntington verursachendes HTT-Allel

### 3.1.5 Aufbau eines Multiplex-Seminested-Systems an genomischer DNA

Es sollte ein Multiplex-Seminested-PCR-System mit dem Ziel, den direkten Mutationsnachweis (CAG-Repeat) mit der Kopplungsanalyse durch vier Mikrosatelliten-Marker zu kombinieren, aufgebaut werden. Zur Auswahl der Mikrosatelliten-Marker wurden folgende Kriterien angewandt: Die verwendeten Marker sollten das CAG-Repeat flankieren und darüber hinaus, um Rekombinationen auszuschließen, möglichst nah an dem CAG-Repeat liegen. Des Weiteren wurde als vorteilhaft bewertet, wenn die Größen der einzelnen Allele möglichst weit auseinander lagen und somit die Peaks problemlos auszuwerten waren. 5'-wärts des CAG-Repeats standen nur drei informative Marker zur Verfügung: HD-O, D4S127 und HD-K. Da HD-K deutlich näher als die anderen beiden Marker am CAG-Repeat liegt, wählten wir als erstes diesen Marker aus. Da HD-O auf Grund relativ unsauberer PCR-Ergebnisse einige Nebenpeaks aufwies und dadurch etwas schwieriger auszuwerten war, entschieden wir uns für D4S127. 3'-wärts des CAG-Repeats standen uns vier informative Marker zur Verfügung: HD-A, D4S3034, HD-C2, D4S412. Da HD-A durch seine intragenische Lage besonders nah am CAG-Repeat liegt und HD-C2 besonders weit auseinander liegende, gut auswertbare Peaks aufweist, wurden diese beiden Marker ausgewählt.

Bei der Etablierung des Multiplex-Seminested-PCR-Systems wurden die beschriebenen Standard-PCR-Programme (s. Tab. 11 und 13) verwendet. Sowohl alle Marker als auch das CAG-Repeat ließen sich zuverlässig amplifizieren. Bei der Auswertung der Peaks war allerdings erkennbar, dass sich die Muster durch das Vorschalten einer Multiplex-PCR verändert hatten, teilweise komplexer und damit schwieriger auszuwerten waren. Dieses Phänomen ist beispielhaft für den Marker D4S127 in Abbildung 15 gezeigt.



**Abb. 15: Fragmentlängenanalyse des Markers D4S127 des Ratsuchenden und seiner Ehefrau nach a) einfacher PCR und b) Multiplex-Seminested-PCR**

Die Peaks nach Multiplex-Seminested-PCR sind deutlich komplexer als nach einfacher PCR

Da die Primer für die Seminested-PCR nach innen gelegt wurden, sind die detektierten Fragmente kürzer als in den Vorversuchen (vgl. Tab. 21), das Verhältnis der Allelgrößen zueinander ist jedoch unverändert. In Tabelle 23 sind die Fragmentlängen nach Semiested-PCR den entsprechenden Fragmentlängen aus den Vorversuchen zugeordnet.

**Tab. 23: Fragmentlängen der Marker D4S127, HD-K, HD-A, HD-C2 in bp aus den Vorversuchen und nach Seminested-PCR im Vergleich**

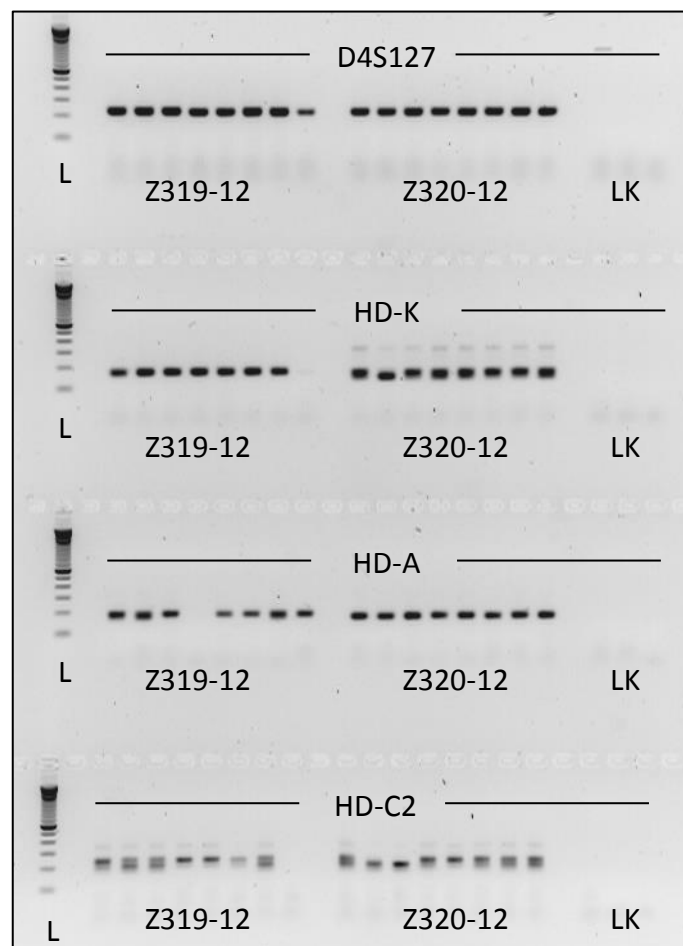
Marker		Ratsuchender		Ehefrau des Ratsuchenden	
		maternal	paternal		
D4S127	VV	283	285	281	283
	SN	220	222	218	220
HD-K	VV	244	262	264	264
	SN	142	162	166	166
HD-A	VV	342	344	342	356
	SN	155	157	155	169
HD-C2	VV	263	285	267	291
	SN	200	226	204	234

VV: Vorversuch; SN: Seminested; rot: Allel koppelt mit Repeat-Expansion im HTT-Gen

### 3.1.6 Optimierung des Multiplex-Seminested-Systems an Einzelzellen

Das an genomischer DNA etablierte Multiplex-Seminested-System wurde im Folgenden auf Einzelzellebene übertragen. Die Ergebnisse der Amplifikation der Mikrosatelliten-Marker entsprachen im Wesentlichen den Ergebnissen der Amplifikation an genomischer DNA. Das CAG-Repeat wurde im Schnitt jedoch nur bei zwei von acht Zellen amplifiziert. Deswegen wurden verschiedene Optimierungsversuche unternommen. Als erstes wurde die Konzentration der Multiplex-Primer des CAG-Repeats (Hu-3 und Hu-4) von 2 pmol/μl auf 4 pmol/μl verdoppelt. Dieses führte nicht zu einer Verringerung der Ausfälle des CAG-Repeats, sondern zu einem erhöhten Ausfall der Mikrosatelliten-Marker und wurde folglich verworfen. Daraufhin wurden zwei kleinere Multiplex-Ansätze verwendet und zwar erstens D4S127, CAG-Repeat, HD-A und zweitens HD-K, CAG-Repeat, HD-C2. Auch diese Ansätze erbrachten in Bezug auf das CAG-Repeat keine akzeptablen Ergebnisse. Anschließend wurden die PCR-Bedingungen verändert. Die Zyklenzahl der Multiplex-PCR wurde von 30 auf 45 Zyklen erhöht und Annealing-Temperaturen von 54 °C bis 60 °C wurden vergleichend getestet. In der Seminested-PCR wurde die Menge an eingesetztem DMSO zwischen 0 μl und 2,5 μl variiert. Ebenfalls wurden Ansätze mit 0,5 μl MgCl<sub>2</sub> bzw. ohne MgCl<sub>2</sub> pipettiert. Des Weiteren wurde versucht, die Seminested-PCR durch Einsatz des Multiplex-PCR Mastermix zu verbessern. Außerdem wurde die Menge des in die Seminested-PCR gegebenen Multiplex-Produktes zwischen 1 μl, 2 μl und 5 μl sowie die Menge der verwendeten Primer zwischen 0,5 μl, 1 μl und 2 μl variiert. Die besten Ergebnisse lieferte die Multiplex-PCR mit 45 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 55 °C und die darauf folgende Seminested-PCR mit 2 μl Multiplex-Produkt, 0,5 μl Primer,

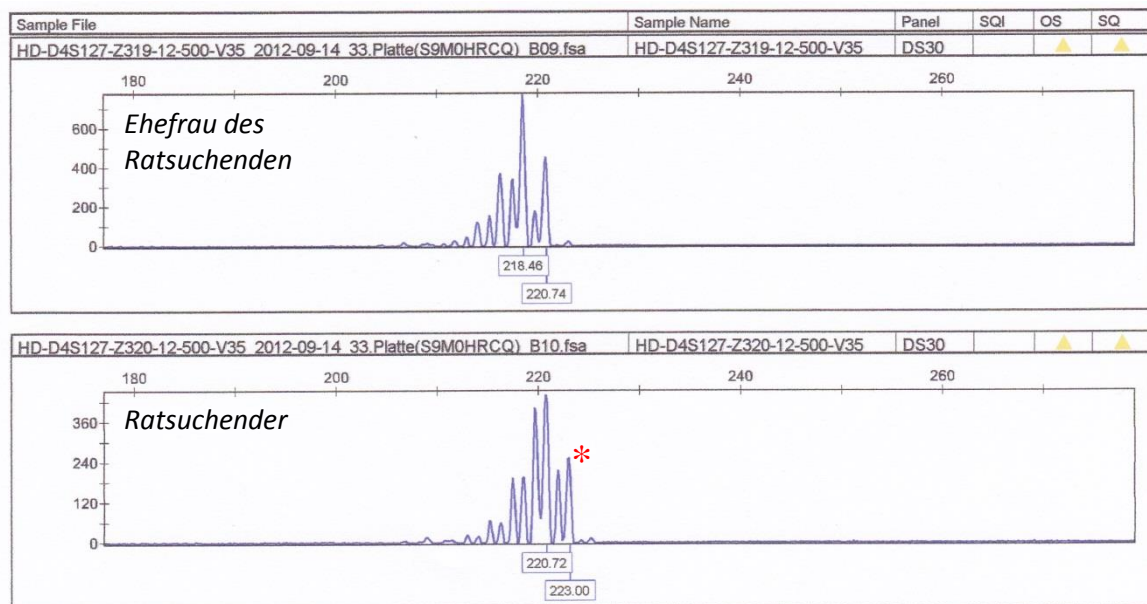
2,5 µl DMSO und 0,5 µl MgCl<sub>2</sub>. Doch selbst bei diesem Ansatz war eine uneingeschränkte Zuverlässigkeit und Wiederholbarkeit nicht gegeben, sodass letztendlich die Primer für das CAG-Repeat aus dem Multiplex-Ansatz entfernt und die vier Marker alleine amplifiziert wurden. Hierbei wurde die Multiplex-PCR, um eine höhere Spezifität zu gewährleisten, wieder bei 60 °C und mit 30 Zyklen durchgeführt. Für die Seminested-PCR wurde 1 µl Multiplex-Produkt eingesetzt und das Standard-PCR Protokoll (s. Tab. 9) verwendet. Des Weiteren wurde auf Grund von Schwierigkeiten bei der Auswertung von D4S127 versucht, diesen Marker durch den Marker HD-O zu ersetzen. Doch auch auf Einzelzellebene kam es bei HD-O zu einigen Nebenpeaks, weswegen diese Überlegung ebenfalls verworfen wurde. Abbildung 16 zeigt die Gelelektrophorese des ausgewählten Multiplex-Seminested-Systems für Einzelzellen mit den Markern D4S127, HD-K, HD-A und HD-C2.



**Abb. 16: Gelelektrophorese der Seminested-PCR der Mikrosatelliten-Marker D4S127, HD-K, HD-A, HD-C2 auf Einzelzellebene**

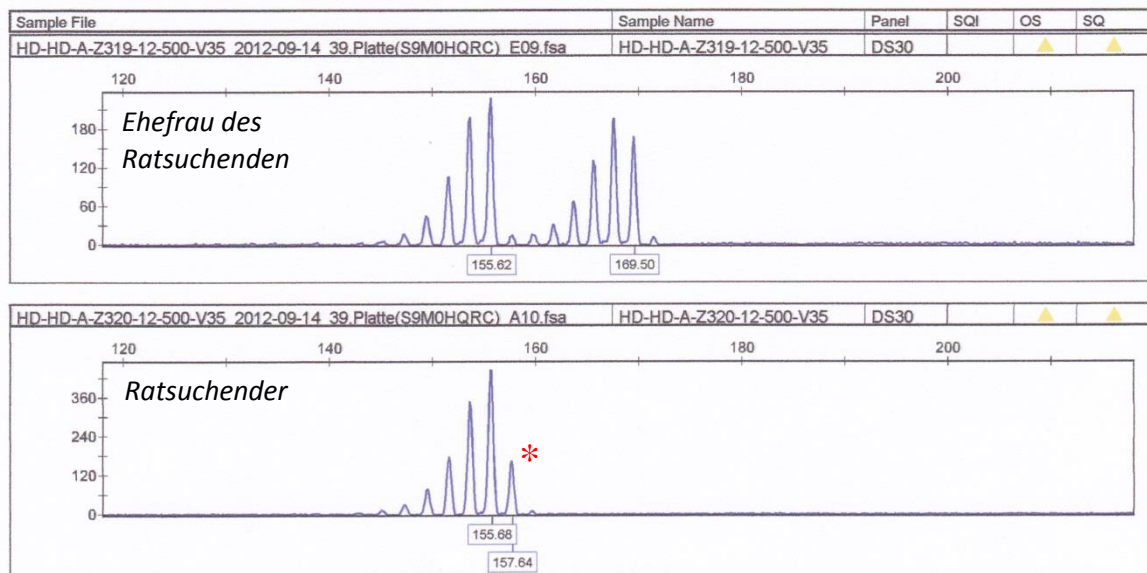
L: Längenstandard (100 bp DNA-Ladder); DNA Proben: Z319-12: einzelne Lymphozyten der Ehefrau des Ratsuchenden; Z320-12: einzelne Lymphozyten des Ratsuchenden; LK: Leerkontrolle

Die Abbildungen 17-20 zeigen die Peaks aller in dem ausgewählten Multiplex-Seminested-PCR-System verwendeten Marker.



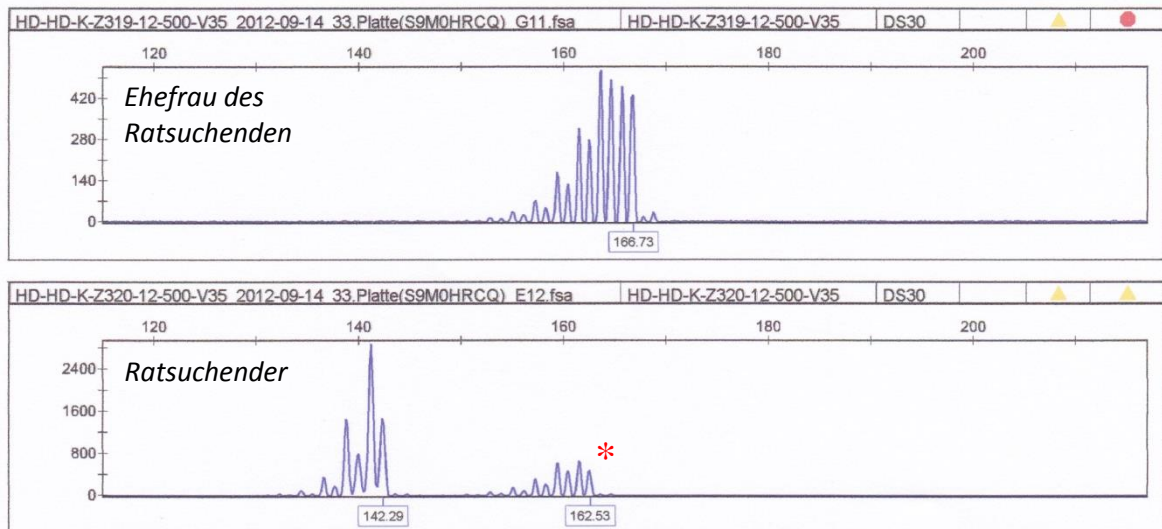
**Abb. 17: Fragmentlängenanalyse des Markers D4S127 des Ratsuchenden und seiner Ehefrau**

\*paternal ererbtes Allel



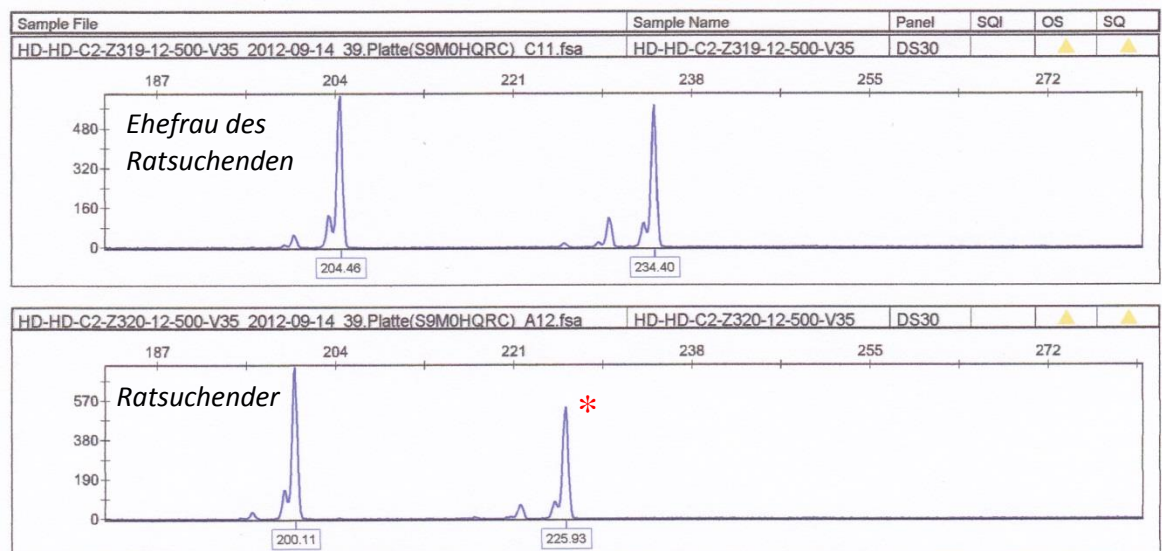
**Abb. 18: Fragmentlängenanalyse des Markers HD-A des Ratsuchenden und seiner Ehefrau**

\*paternal ererbtes Allel



**Abb. 19: Fragmentlängenanalyse des Markers HD-K des Ratsuchenden und seiner Ehefrau**

\*paternal ererbtes Allel



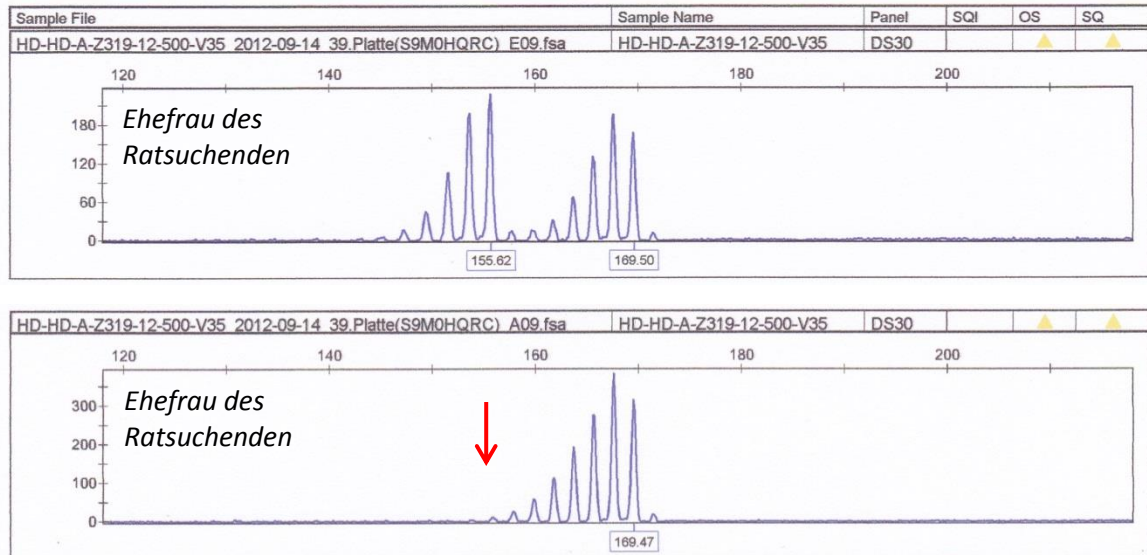
**Abb. 20: Fragmentlängenanalyse des Markers HD-C2 des Ratsuchenden und seiner Ehefrau**

\*paternal ererbtes Allel

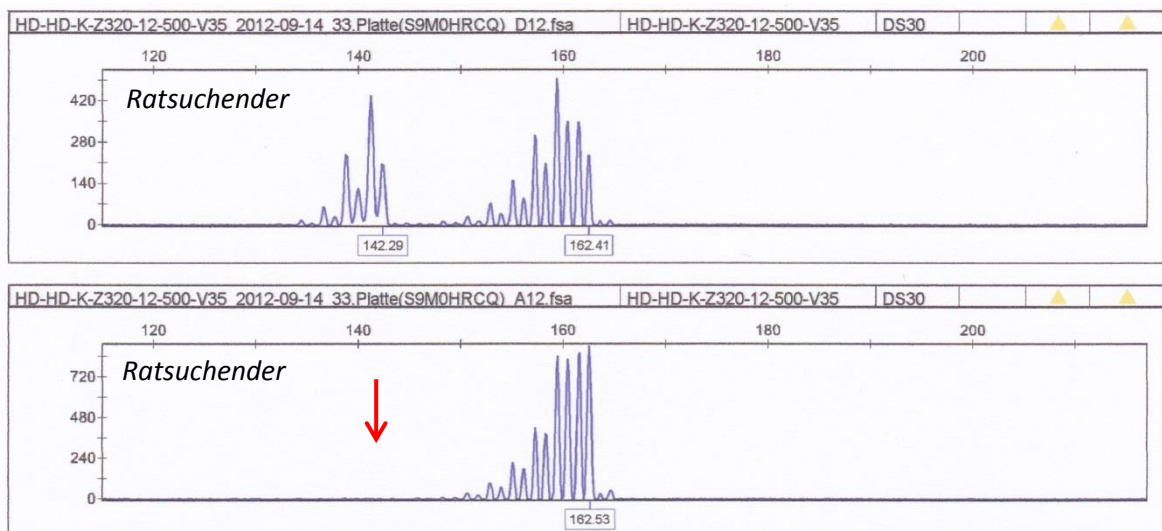
### 3.1.7 Bestimmung der Allele Dropout Rate

Zur Validierung wurde das gewählte Multiplex-Seminested-PCR-System an 64 Einzelzellen (32 Zellen eines jeden Ehepartners) getestet. Es war zu beobachten, dass die Peakmuster typisch für die jeweiligen Marker waren. Im weiteren Verlauf der 64 Versuchsansätze zeigte sich, dass die Peaks wie gefordert reproduzierbar waren. Anhand der 64 getesteten Zellen wurde die Allele Dropout (ADO) Rate für jeden Marker bestimmt. Ein ADO ist das Versagen eines PCR-Systems, eines der beiden Allele zu amplifizieren. Als ADO wurde

bewertet, wenn das jeweilige Allel in der Fragmentlängenanalyse überhaupt nicht zu erkennen war bzw. deutlich unter der Nachweisgrenze lag. Das Bild eines ADO in der Fragmentlängenanalyse zeigen exemplarisch die Abbildungen 21 und 22.



**Abb. 21: Fragmentlängenanalyse des Markers HD-A von der Ehefrau des Ratsuchenden ohne und mit ADO (↓)**



**Abb. 22: Fragmentlängenanalyse des Markers HD-K von dem Ratsuchenden ohne und mit ADO (↓)**

Zur Berechnung der ADO Raten wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{ADO Rate} = \frac{\text{Anzahl der ausgefallenen Allele je Marker}}{\text{Anzahl der getesteten Allele je Marker}} \times 100 \%$$

Die ADO Rate für Marker HD-K bei der Ehefrau des Ratsuchenden lässt sich nicht berechnen, da sie homozygot für das 166 bp Allel ist und folglich ein Ausfall eines Allels in der Fragmentlängenanalyse dasselbe Bild wie eine Amplifikation beider Allele liefern würde. Die ADO Raten variieren zwischen 7,8 % bei dem Marker HD-K und 16,4 % bei den Markern D4S127 und HD-A. Die exakte Verteilung der ADO Raten zeigt Tabelle 24.

**Tab. 24: ADO Raten der Marker D4S127, HD-K, HD-A und HD-C2**

ADO	D4S127	HD-K	HD-A	HD-C2
Ehefrau des Ratsuchenden	14,1 %	/	17,2 %	17,2 %
Ratsuchender	18,8 %	7,8 %	15,6 %	7,8 %
gesamt	16,4 %	7,8 %	16,4 %	12,5 %

*/: ADO Rate auf Grund der Homozygotie nicht berechenbar*

Mit Abschluss dieser Dissertation steht ein System zur Verfügung, das bei der Fragestellung „PID bei Chorea Huntington“ in der Familie A eingesetzt werden kann.

### 3.2 Etablierung eines Testsystems für die Erkrankung Fragiles X-Syndrom

Für die Familie B (Stammbaum s. Abb. 4), in welcher das Fragile X-Syndrom vorkommt, wurde ein Testsystem zum Nachweis bzw. Ausschluss der ursächlichen genetischen Veränderung aufgebaut. Im Gegensatz zu Chorea Huntington ist es bei dem Fragilen X-Syndrom auf Grund der Länge des krankheitsverursachenden CGG-Repeats nicht möglich, die Expansion mittels einfacher PCR zu amplifizieren. Deswegen wurden lediglich Mikrosatelliten-Marker für den Aufbau des Systems verwendet.

#### 3.2.1 Heraussuchen polymorpher Mikrosatelliten-Marker

Es wurden zehn polymorphe, das *FMR1*-Gen flankierende Mikrosatelliten-Marker herausgesucht, die in Tabelle 25 dargestellt sind.

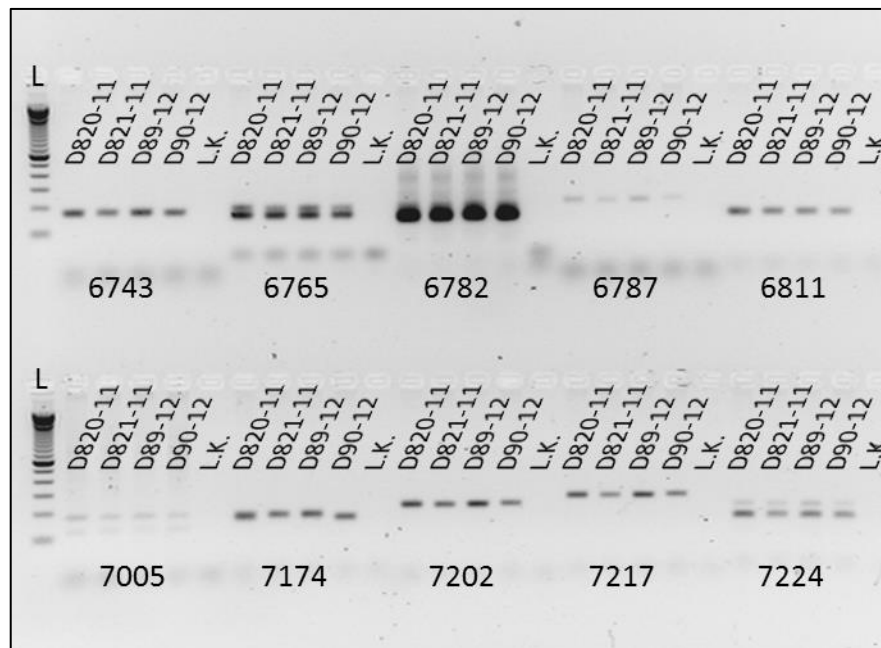
**Tab. 25: Lokalisation der das *FMR1*-Gen flankierenden Mikrosatelliten-Marker**

Mikrosatelliten-Marker	Lokalisation	Entfernung zum <i>FMR1</i> -Gen
FMR1_6743	146.743.080	250 kb
FMR1_6765	146.765.197	228 kb
FMR1_6782	146.782.418	211 kb
FMR1_6787	146.787.118	206 kb
FMR1_6811	146.811.610	181 kb
FMR1-Gen-Anfang	146.993.469	-
FMR1_7005	147.005.686	Intragenisch
FMR1-Gen-Ende	147.032.647	-
FMR1_7174	147.174.588	141 kb
FMR1_7202	147.202.259	169 kb
FMR1_7217	147.217.355	184 kb
FMR1_7224	147.224.418	191 kb

#### 3.2.2 Test auf Informativität

Um die Mikrosatelliten-Marker auf Informativität für die Familie B zu testen, wurden sie per PCR amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. Abb. 23). Bei den Markern 6743, 6787, 6811, 7174, 7202, 7217 entstanden sehr spezifische PCR-Produkte. Bei den Markern 6765 und 7224 waren Doppelbanden zu erkennen, die nach

Fragmentlängenanalyse nicht durch Heterozygotie zu erklären waren und damit als unspezifische Banden zu bewerten sind. Der Marker 6782 zeigte relativ viel Hintergrund und ist damit auch nicht spezifisch amplifiziert worden. Da diese drei Marker (wie die Fragmentlängenanalyse zeigen wird) jedoch ohnehin nicht informativ für Familie B sind, wurden keine weiteren Bemühungen in die Optimierung der PCR-Bedingungen investiert. Der Marker 7005 wurde trotz Optimierungsversuchen nur relativ schwach amplifiziert.



**Abb. 23: Gelelektrophorese der das FMR1-Gen flankierenden Mikrosatelliten-Marker an genomischer DNA mit Multiplex-Primern**

L: Längenstandard (100 bp DNA-Ladder); DNA-Proben: D820-11: Mutter der Ratsuchenden; D821-11: Vater der Ratsuchenden; D89-12: Ratsuchende; D90-12: Ehemann der Ratsuchenden; L.K.: Leerkontrolle

Die Bewertung der Marker bezüglich ihrer Informativität wurde entsprechend der unter 3.1.3 beschriebenen Beispiele durchgeführt. Die Auswertung ergab vier informative Marker, fünf nicht informative Marker und einen nicht auswertbaren Marker (7005). Bei letzterem lagen bei dem Vater der Ratsuchenden zwei Allele vor, was auf Grund der Lage der Marker auf dem X-Chromosom nicht möglich ist. Folglich wurden für diesen Marker neue Primer bestellt. Daraufhin konnte auch dieser Marker als informativ bewertet werden, sodass insgesamt fünf informative Marker vorlagen. Die bestimmten Allele aller Marker sind in Tabelle 26 zusammengefasst.

**Tab. 26: Allelverteilung der das FMR1-Gen flankierenden Mikrosatelliten-Marker in bp**

Marker	Mutter der Ratsuchenden		Vater der Ratsuchenden		Ratsuchende maternal <i>paternal</i>		Ehemann der Ratsuchenden		Bewertung
6743	172	172	174	y	172	174	172	y	informativ
6765	194	194	194	y	194	194	194	y	nicht informativ
6782	151	151	151	y	151	151	151	y	nicht informativ
6787	209	214	207	y	209	207	215	y	informativ
6811	148	150	150	y	150	150	148	y	nicht informativ
7005.1	179	181	178?	181?	179	181	181	y	nicht auswertbar
7005.2	223	223	222	y	223	222	223	y	informativ
7174	156	166	168	y	166	168	156	y	informativ
7202	215	219	215	y	215	215	219	y	nicht informativ
7217	256	262	258	y	256	258	262	y	informativ
7224	157	157	157	y	157	157	157	y	nicht informativ

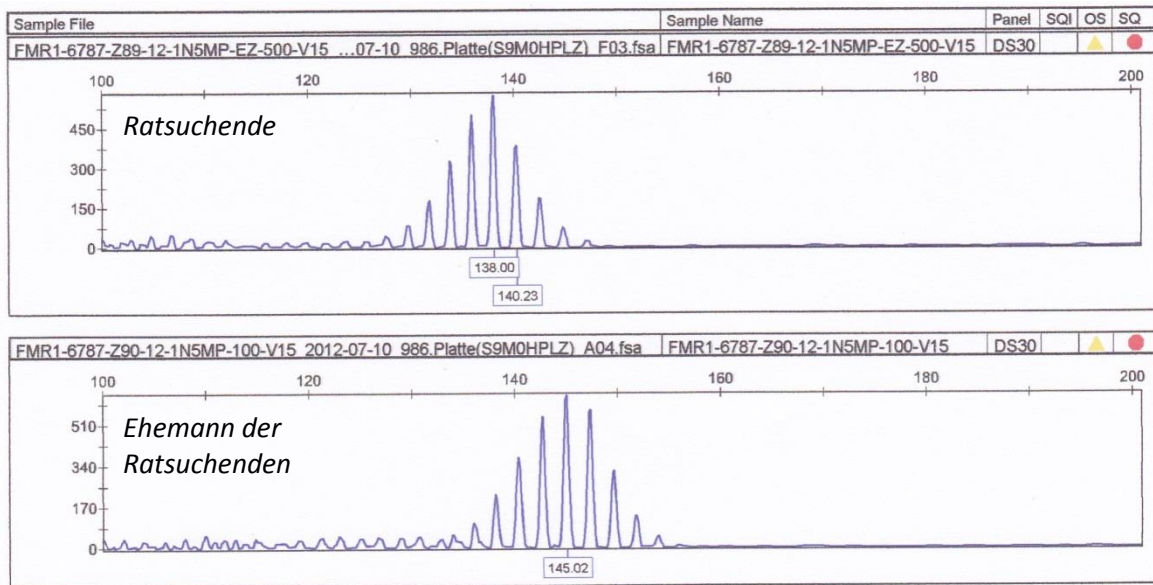
7005.1: Verwendung der ursprünglichen Primer; 7005.2: Verwendung der neu bestellten Primer für Marker 7005; ?: Heterozygotie bei dem Vater der Ratsuchenden auf dem X-Chromosom ist nicht möglich; y: männliche Individuen sind hemizygot für alle Marker, da sie anstelle des zweiten X-Chromosoms ein Y-Chromosom haben; rot: Allel koppelt mit Repeat-Expansion im FMR1-Gen; orange: Kopplung des Allels mit Repeat-Expansion im FMR1-Gen unklar

### 3.2.3 Aufbau eines Multiplex-Seminested-Systems an genomischer DNA

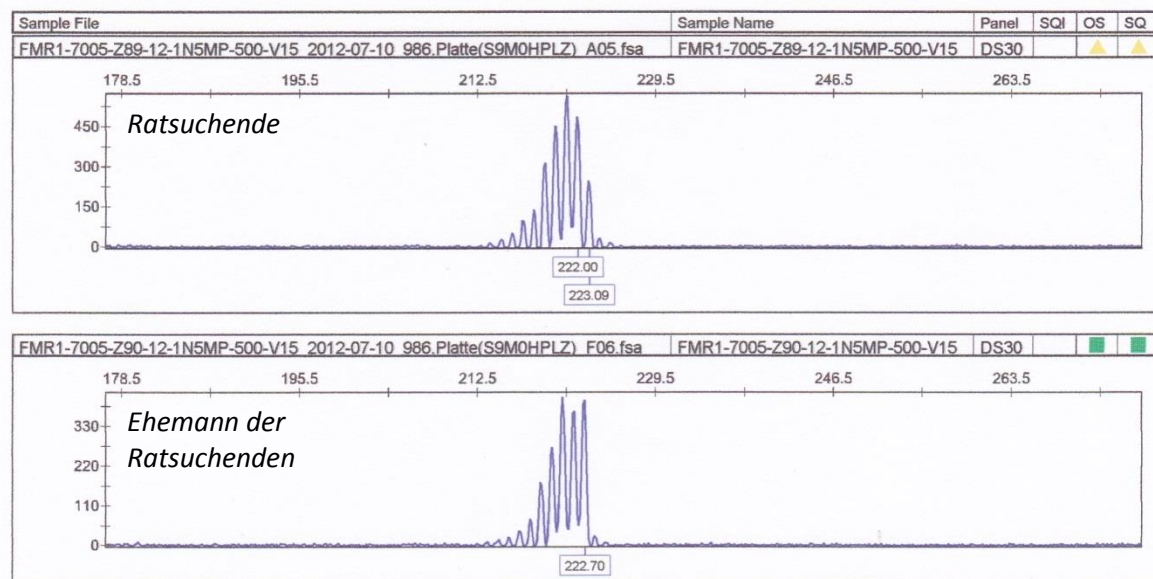
Da nur fünf informative Marker zur Verfügung standen und eine Amplifikation des CGG-Repeats selbst nicht möglich ist, wurde zunächst ein Ansatz mit allen fünf informativen Markern (6743, 6787, 7005, 7174, 7217) pipettiert. Grundsätzlich funktionierte das System, jedoch waren die Fragmentlängenanalysen der Marker 6787, 7005 und 7174 sehr schwer auswertbar. Auf Grund der Vermutung, dass die Auswertbarkeit an Einzelzellen wegen der geringeren Ausgangs-DNA-Menge besser sein könnte, wurde dieses System dennoch auf Einzelzellen übertragen.

### 3.2.4 Optimierung des Multiplex-Seminested-Systems an Einzelzellen

Auch auf Einzelzellebene waren die Fragmentlängenanalysen nicht eindeutig auswertbar, wie die Abbildungen 24 und 25 zeigen. Da mit diesen Peaks kein zuverlässiges System aufgebaut werden konnte, wurden neue Mikrosatelliten-Marker herausgesucht.



**Abb. 24: Fragmentlängenanalyse des Markers 6787 von der Ratsuchenden und ihrem Ehemann nach PCR auf Einzelzellebene**  
 In der Fragmentlängenanalyse sind keine sauberen Peaks erkennbar, deswegen können die Allelgrößen nicht eindeutig bestimmt werden.



**Abb. 25: Fragmentlängenanalyse des Markers 7005 von der Ratsuchenden und ihrem Ehemann nach PCR auf Einzelzellebene**  
 Es sind keine eindeutigen Peaks erkennbar, deswegen können die Allelgrößen nicht eindeutig bestimmt werden.

### 3.2.5 Herausuchen polymorpher Mikrosatelliten-Marker

Um zu vermeiden, dass die nachträglich herausgesuchten Mikrosatelliten-Marker wieder schlecht auswertbar sind, wurden dieses Mal Marker herausgesucht, die in der Literatur bereits verwendet wurden. Die Lokalisation der Marker ist in Tabelle 27 dargestellt.

**Tab. 27: Lokalisation der nachträglich herausgesuchten, das FMR1-Gen flankierenden Mikrosatelliten-Marker**

Mikrosatelliten-Marker	Lokalisation	Entfernung zum FMR1-Gen
DXS998	146.607.907	385 kb
DXS548	146.803.448	190 kb
FMR1-Gen-Anfang	146.993.469	-
FraXAC1	intragenisch	
FMR1-Gen-Ende	147.032.647	-
DXS1215	147.268.642	235 kb
DXS6687	147.602.846	570 kb

### 3.2.6 Test auf Informativität

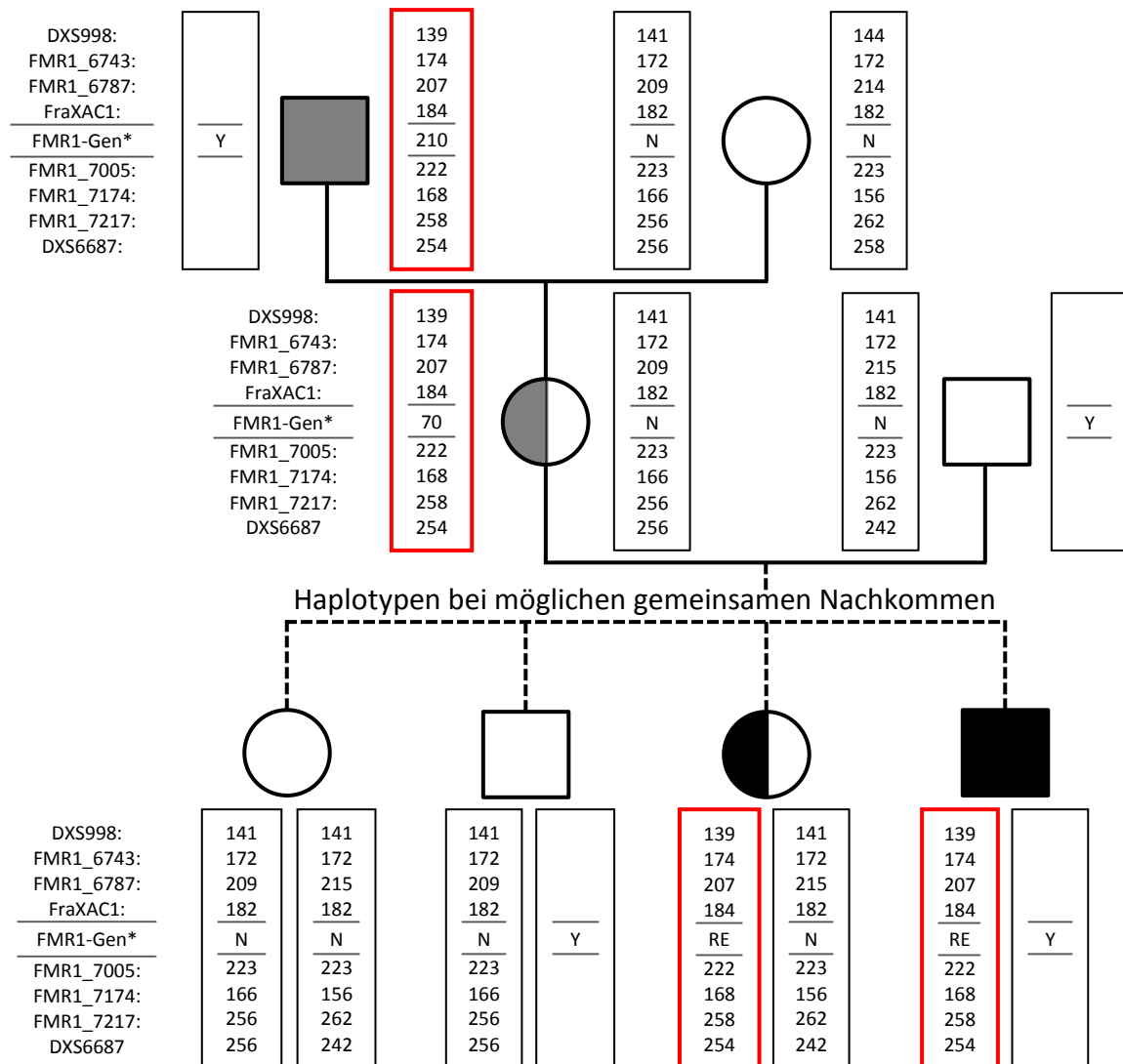
Der Test auf Informativität der nachträglich herausgesuchten Marker ergab drei informative und zwei nicht informative Marker, wie in Tabelle 28 zu sehen ist.

**Tab. 28: Allelverteilung der nachträglich herausgesuchten, das FMR1-Gen flankierenden Mikrosatelliten-Marker in bp**

Marker	Mutter der Ratsuchenden		Vater der Ratsuchenden		Ratsuchende		Ehemann der Ratsuchenden		Bewertung
				y	maternal	paternal		y	
DXS998	141	144	139	y	141	139	141	y	informativ
DXS548	195	195	195	y	195	195	193	y	nicht informativ
FRAXAC1	182	182	184	y	182	184	182	y	informativ
DXS1215	211	213	211	y	211	211	213	y	nicht informativ
DXS6687	256	258	254	y	256	254	242	y	informativ

y: männliche Individuen sind hemizygot für alle Marker, da sie anstelle des zweiten X-Chromosoms ein Y-Chromosom haben; rot: Allel koppelt mit Repeat-Expansion im FMR1-Gen

Auch in dieser Familie konnte für alle informativen Marker ermittelt werden, welche Haplotypen mit der Erkrankung Fragiles X-Syndrom vererbt werden. Die Haplotypen des ratsuchenden Ehepaars, der Eltern der Ratsuchenden sowie möglicher gemeinsamer Nachkommen sind in Abbildung 26 dargestellt.



**Abb. 26: Haplotypen für die repetitive CGG-Sequenz im FMR1-Gen und acht gekoppelte Marker der Familie B und der möglichen gemeinsamen Nachkommen**

○ : weibliche Person; □ : männliche Person; ▲ : Prämutation im FMR1-Gen; ▲ : Mutation oder Prämutation im FMR1-Gen; ◐, ◑ : heterozygote (Prä)mutationsträger; □ (rot) : Haplotyp mit expandiertem CGG-Repeat; \* : bei getesteten Personen: Anzahl der CGG-Repeats, bei allen anderen: N: FMR1-Normalallele; RE: Repeat-Expansion im FMR1-Gen; Y: da männliche Personen anstelle des zweiten X- ein Y-Chromosom haben, sind sie für diese Marker hemizygot

### 3.2.7 Aufbau eines Multiplex-Seminested-Systems an genomischer DNA

Zur Auswahl geeigneter Marker wurden die unter 3.1.5 beschriebenen Kriterien verwendet. Wir entschieden uns für zwei Marker 5'-wärts des CGG-Repeats (DXS998, FRA XAC1) sowie für zwei Marker 3'-wärts des Repeats (7217, DXS6687). Es wurde das Standard-Multiplex-PCR-Protokoll verwendet. Von dem Multiplex-Produkt wurde je 1 µl für die Seminested-PCRs, die ebenfalls unter Standard-Bedingungen abliefen, eingesetzt. Bei dem Marker 7217 wurde für die Seminested-PCR ein Primer nach innen gelegt, sodass die detektierten Fragmente kleiner wurden. Bei den übrigen Markern, wurde für die

Multiplex-PCR ein Primer nach außen gelegt, sodass die Längen der detektierten Fragmente denen aus den Vorversuchen entsprechen (s. Tab. 29).

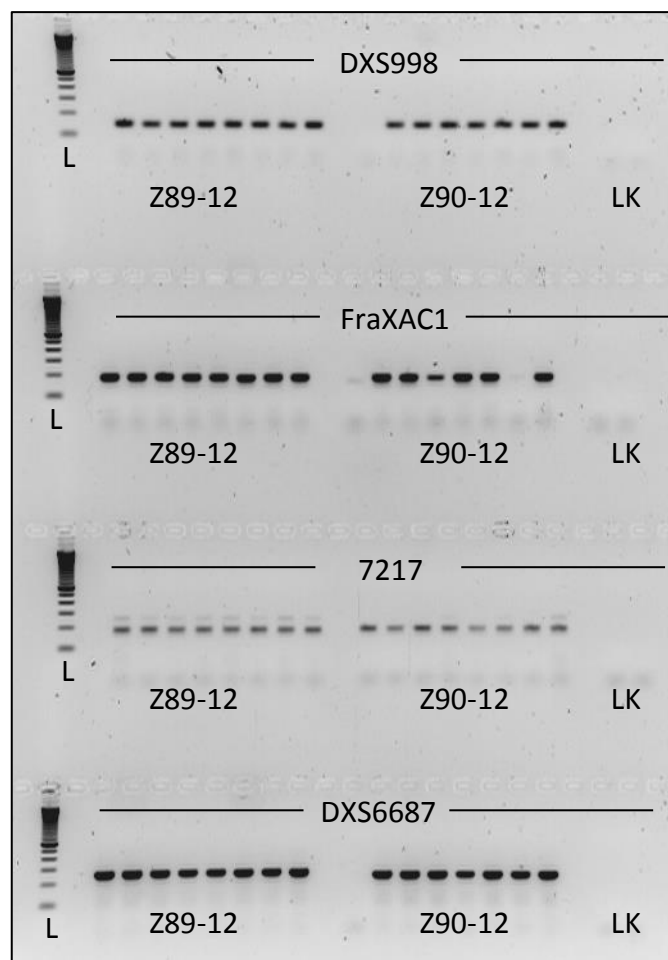
**Tab. 29: Fragmentlängen der Marker DXS998, FRAXAC1, 7217, DXS6687 in bp aus den Vorversuchen und nach Seminested-PCR im Vergleich**

Marker	PCR-System	Ratsuchende		Ehemann der Ratsuchenden	
		bp	bp	bp	bp
DXS998	VV = SN	141	139	141	y
FRAXAC1	VV = SN	182	184	182	y
7217	VV	256	258	262	y
	SN	181	183	187	y
DXS6687	VV = SN	256	254	242	y

VV: Vorversuch; SN: Seminested; rot: Allel koppelt mit Repeat-Expansion im FMR1-Gen

### 3.2.8 Optimierung des Multiplex-Seminested-Systems an Einzelzellen

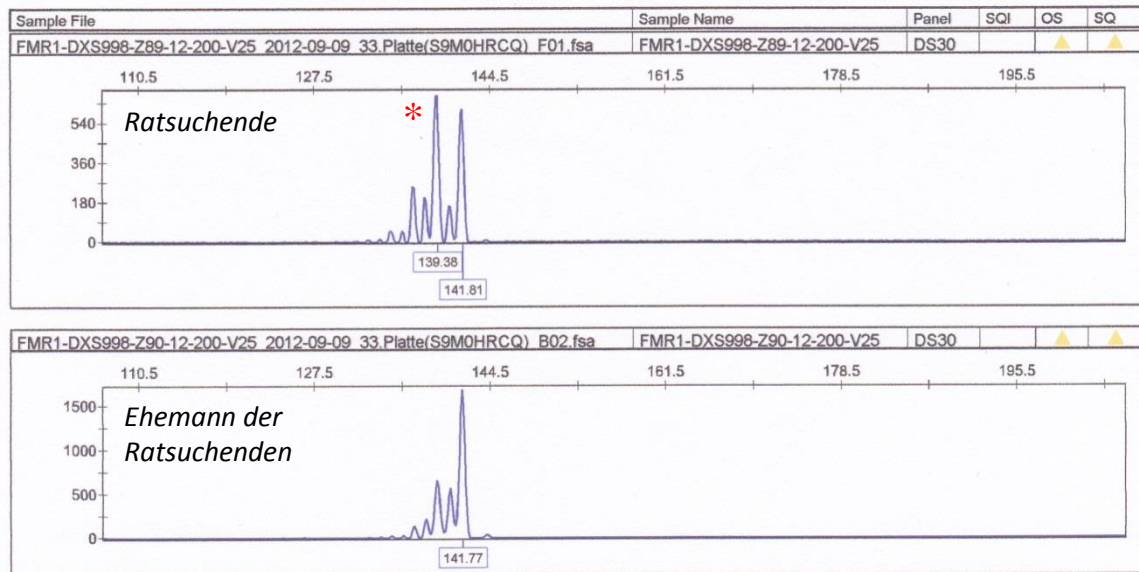
Das System wurde nun an Einzelzellen getestet. Abbildung 27 zeigt die Gelelektrophorese.



**Abb. 27: Gelelektrophorese der Mikrosatelliten-Marker DXS998, FraXAC1, 7217, DXS6687 von der Ratsuchenden und ihrem Ehemann auf Einzelzellebene**

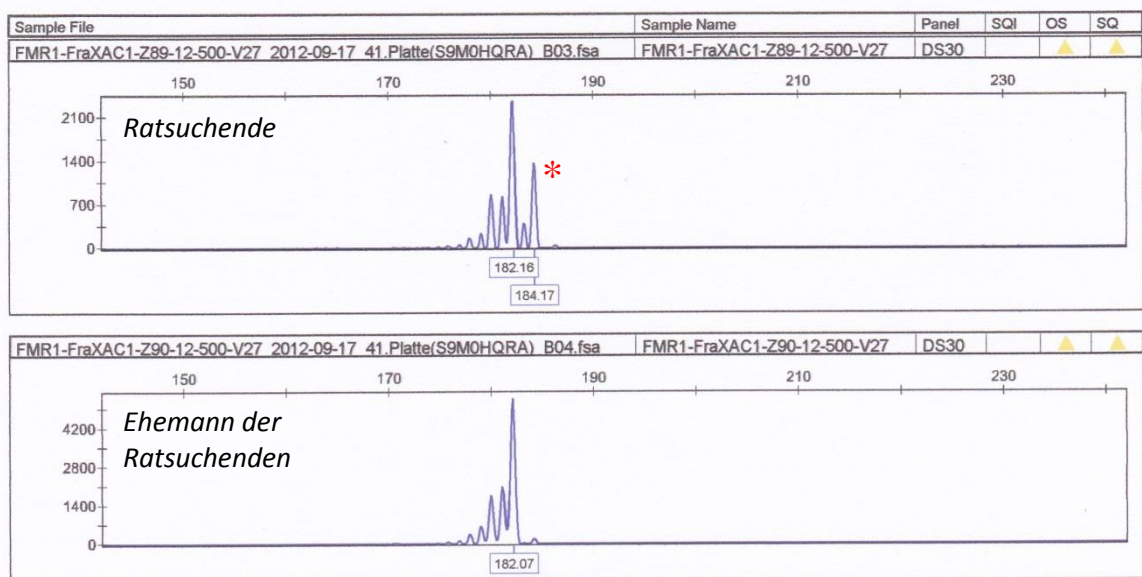
L: Längenstandard (100 bp DNA-Ladder); DNA-Proben: Z89-12: einzelne Lymphozyten der Ratsuchenden; Z90-12: einzelne Lymphozyten ihres Ehemanns; LK: Leerkontrolle

Die Ergebnisse der Fragmentlängenanalysen aller in diesem System verwendeten Marker waren nun eindeutig auswertbar. Die Peaks sind in den Abbildungen 28-31 zu sehen.



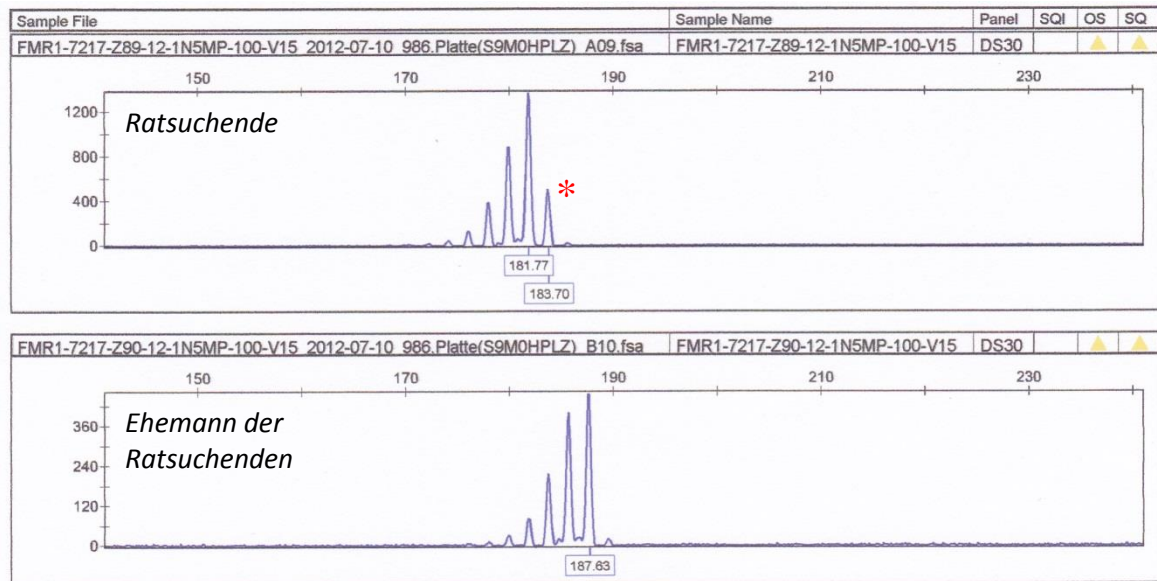
**Abb. 28: Fragmentlängenanalyse des Markers DXS998 von der Ratsuchenden und ihrem Ehemann nach PCR auf Einzelzellebene**

\*paternal ererbtes Allel



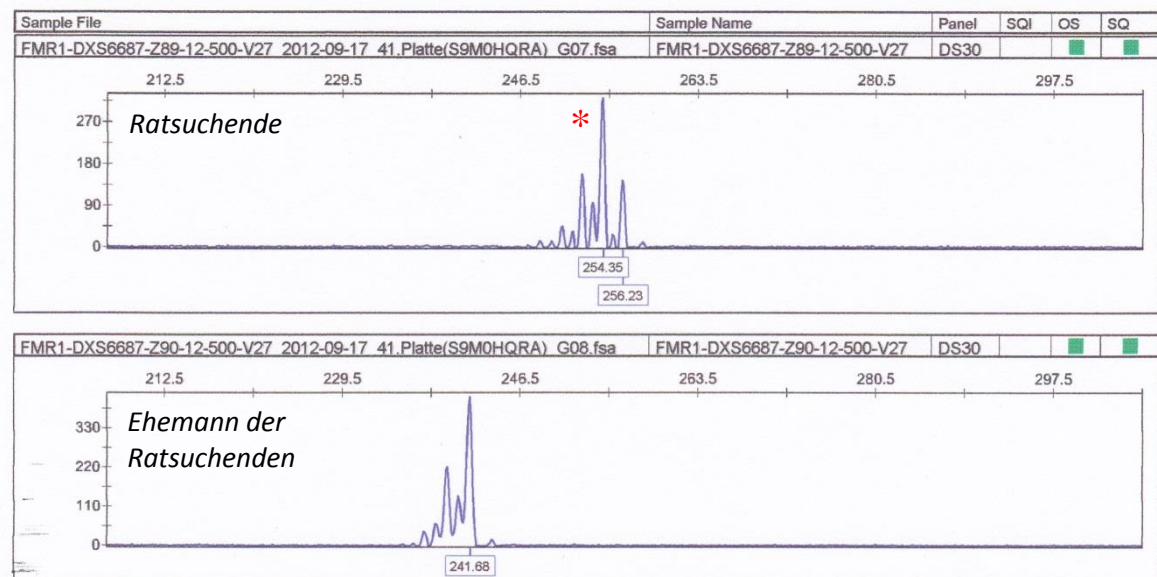
**Abb. 29: Fragmentlängenanalyse des Markers FraXAC1 von der Ratsuchenden und ihrem Ehemann nach PCR auf Einzelzellebene**

\*paternal ererbtes Allel



**Abb. 30: Fragmentlängenanalyse des Markers 7217 von der Ratsuchenden und ihrem Ehemann nach PCR auf Einzelzellebene**

\*paternal ererbtes Allel



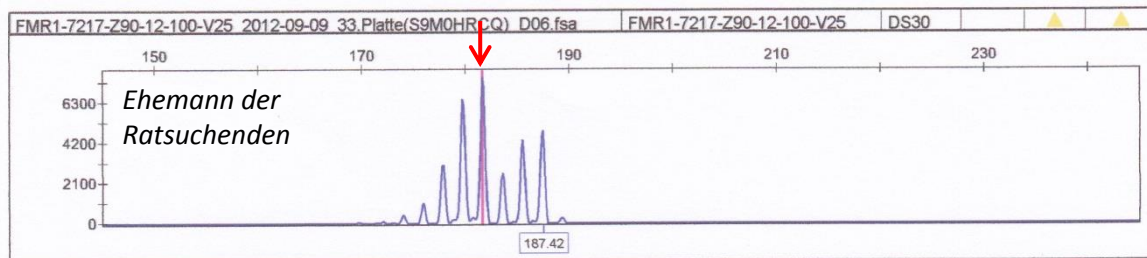
**Abb. 31: Fragmentlängenanalyse des Markers DXS6687 von der Ratsuchenden und ihrem Ehemann nach PCR auf Einzelzellebene**

\*paternal ererbtes Allel

### 3.2.9 Bestimmung der Allele Dropout Rate

Auch bei diesem System zeigte sich, dass die Peaks markertypisch und reproduzierbar waren. Bei 3 der insgesamt 256 zur Berechnung der ADO-Raten durchgeführten Seminested-PCRs waren in der Fragmentlängenanalyse nicht zu erwartende Peaks zu

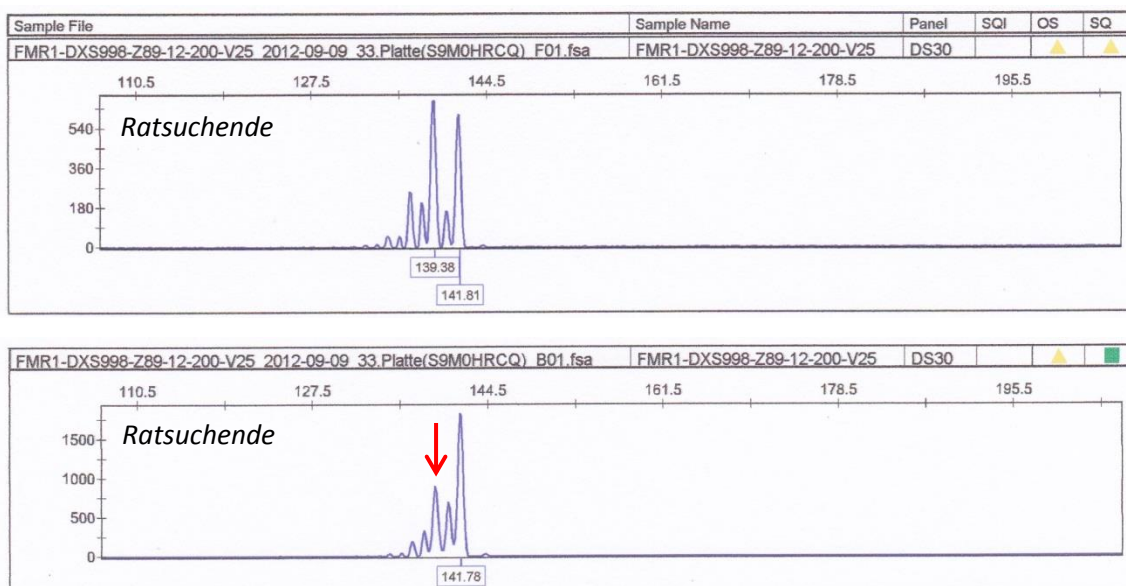
sehen, die möglicher Weise durch Kontaminationen zu erklären sind. Ein Beispiel zeigt Abbildung 32.



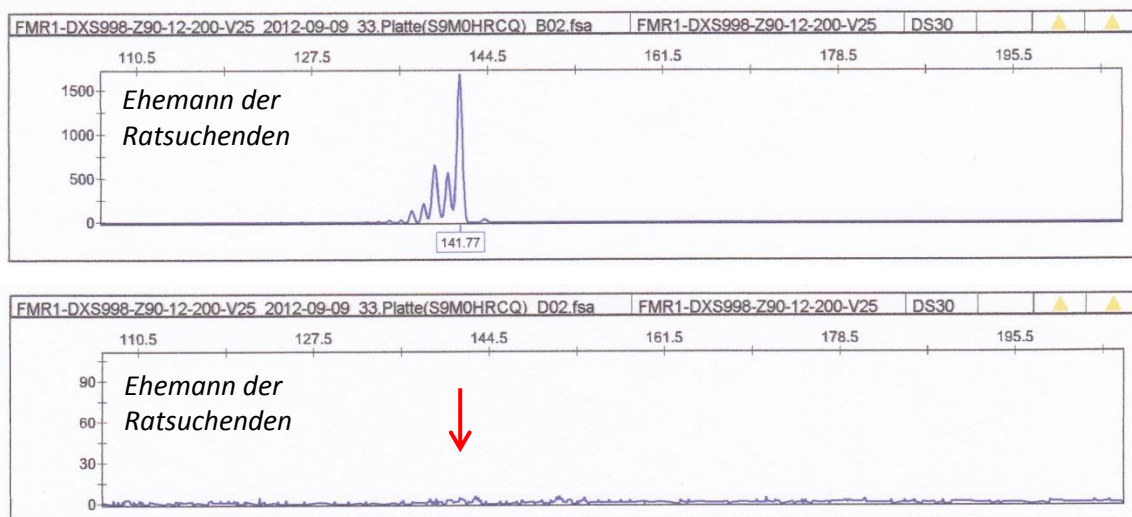
**Abb. 32: Kontamination (↓) in der Fragmentlängenanalyse des Markers 7217 beim Ehemann der Ratsuchenden**

Der Ehemann ist für den Marker 7217 hemizygot mit einem Allel der Länge 187 bp. In dieser Fragmentlängenanalyse scheint ein weiteres, etwas kürzeres Allel (↓) vorhanden zu sein. Möglicherweise wurde die Probe mit einem Allel der Ehefrau (181 bp) kontaminiert.

Die Allele Dropout Raten wurden für jeden Marker anhand von 64 Einzelzellen berechnet. Bei zwei Versuchsansätzen des Ehemanns entstand bei keinem der vier Marker ein PCR-Produkt. Folglich wurde davon ausgegangen, dass keine Zelle vorhanden war. Somit gingen diese Ansätze nicht mit in die Bewertung ein und die ADO Rate wurde anhand von 62 Zellen berechnet. Bei der Ratsuchenden war bei einem ADO nur das amplifizierte Allel zu sehen (s. Abb. 33). Kam es bei dem Ehemann der Ratsuchenden zu einem Allele Dropout, so war in der Fragmentlängenanalyse kein Allel zu sehen, da er für jeden Marker nur ein Allel aufweist (s. Abb. 34).



**Abb. 33: Fragmentlängenanalyse des Markers DXS998 von der Ratsuchenden ohne und mit ADO (↓)**



**Abb. 34: Fragmentlängenanalyse des Markers DXS998 von dem Ehemann der Ratsuchenden ohne und mit ADO (↓)**

Wie in Tabelle 30 zu sehen ist, variieren die ADO Raten hier zwischen 5,3 % bei dem Marker FMR1\_7217 und 9,6 % bei dem Marker DXS998.

**Tab. 30: ADO Raten der Marker DXS998, FRAXAC1, 7217 und DXS6687**

ADO	DXS998	FRAXAC1	FMR1_7217	DXS6687
Ratsuchende	9,4 %	10,9 %	6,3 %	9,4 %
Ehemann der Ratsuchenden	10,0 %	3,3 %	3,3 %	6,7 %
gesamt	9,6 %	8,5 %	5,3 %	8,5 %

Für das Fragile X-Syndrom in der Familie B steht nun ein Multiplex-Seminested-PCR-System zur Verfügung, das für eine PID oder PKD genutzt werden kann.

## 4 Diskussion

Ziel dieser Dissertation war der Aufbau und die Etablierung von PCR-Systemen, die im Rahmen einer Präimplantations- bzw. Polkörperdiagnostik eingesetzt werden können. Es wurden Verfahren für zwei Krankheitsbilder, die Chorea Huntington und das Fragile X-Syndrom, etabliert. Beide Erkrankungen sind laut ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) (Harper et al., 2012) international häufige Indikationen für eine PID. Bei den PIDs zum Ausschluss monogener Erbkrankheiten liegt Chorea Huntington nach der Cystischen Fibrose und der Myotonen Dystrophie auf Platz drei der häufigsten Indikationen. Das Fragile X-Syndrom folgt auf Platz fünf und ist damit die häufigste X-chromosomal vererbte Erkrankung, für die PIDs durchgeführt werden (Harper et al., 2012). Die PIDs zum Ausschluss monogener Erbkrankheiten machen insgesamt nur 17 % aller PID-Zyklen aus. Die Mehrheit der Zyklen (61 %) hatte ein Aneuploidiescreening zum Ziel. 16 % der Zyklen wurden bei elterlichen chromosomalen Aberrationen durchgeführt, in 4 % wurde ein Sexing auf Grund X-chromosomaler Erkrankungen, in 2 % ein Social Sexing gemacht (Harper et al., 2012).

Auch im Institut für Humangenetik der Universität zu Lübeck gab es in den letzten Jahren einige Anfragen bezüglich der Präimplantationsdiagnostik. Dazu zählen die Anfrage der Familie A wegen einer PID bei Chorea Huntington sowie die Anfrage der Familie B wegen einer PID bei Fragilem X-Syndrom. In Familie A ist der Ehemann Anlageträger für die Chorea Huntington, sodass mit dem im Rahmen dieser Dissertation etablierten System keine PKD, aber beispielsweise eine PID an Trophoblasten durchgeführt werden könnte. Allerdings untersagt das Gendiagnostikgesetz (GenDG) wie eingangs erwähnt in Deutschland die vorgeburtliche Untersuchung bei spätmanifestierenden Erkrankungen, zu welchen auch die Chorea Huntington gezählt werden kann (§15 Abs. (2) GenDG). Deshalb bestehen, obwohl das ESchG keine Einschränkungen bezüglich spätmanifestierenden Erkrankungen bei der PID macht (§3a Abs. (2) ESchG), gegenüber der PID bei HD starke Vorbehalte. Es bleibt unklar, ob bei Chorea Huntington hierzulande in Zukunft überhaupt eine PID durchgeführt werden wird. Wird die PID bei HD in Deutschland tatsächlich nicht angeboten, so bleibt ratsuchenden Paaren weiterhin nur der Weg ins Ausland. Dort werden neben PIDs an Embryonen eines Ratsuchenden, der definitiv Anlageträger ist, zum Teil auch die so genannten „non-disclosure“ und „exclusion“ Testungen angeboten. Diese Arten der PID eignen sich für Ratsuchende, die auf Grund eines erkrankten

Elternteils ein 50-prozentiges Risiko haben, ebenfalls an Chorea Huntington zu erkranken, sich jedoch aus persönlichen Gründen keiner prädiktiven Testung unterziehen möchten. Bei der „non-disclosure“ Testung werden die Embryonen direkt auf das expandierte CAG-Repeat getestet. Den Ratsuchenden wird jedoch nicht mitgeteilt, ob es überhaupt betroffene Embryonen gab und selbstverständlich werden nur nicht betroffene transferiert (Sermon et al., 2002). Bei der „exclusion“ Testung werden die Embryonen an Hand von Mikrosatelliten-Markern auf die Allele des erkrankten Großelternteils untersucht ohne zu wissen, ob diese Allele mit einem gesunden oder tatsächlich mit dem expandierten *HTT*-Allel koppeln (Sermon et al., 2002). Diese Art der PID ist eine große Hilfe für Risikopersonen, die ihren HD-Status nicht erfahren möchten. Sie bringt aber auch erhebliche ethische Konflikte, wie den Ausschluss gesunder Embryonen, mit sich.

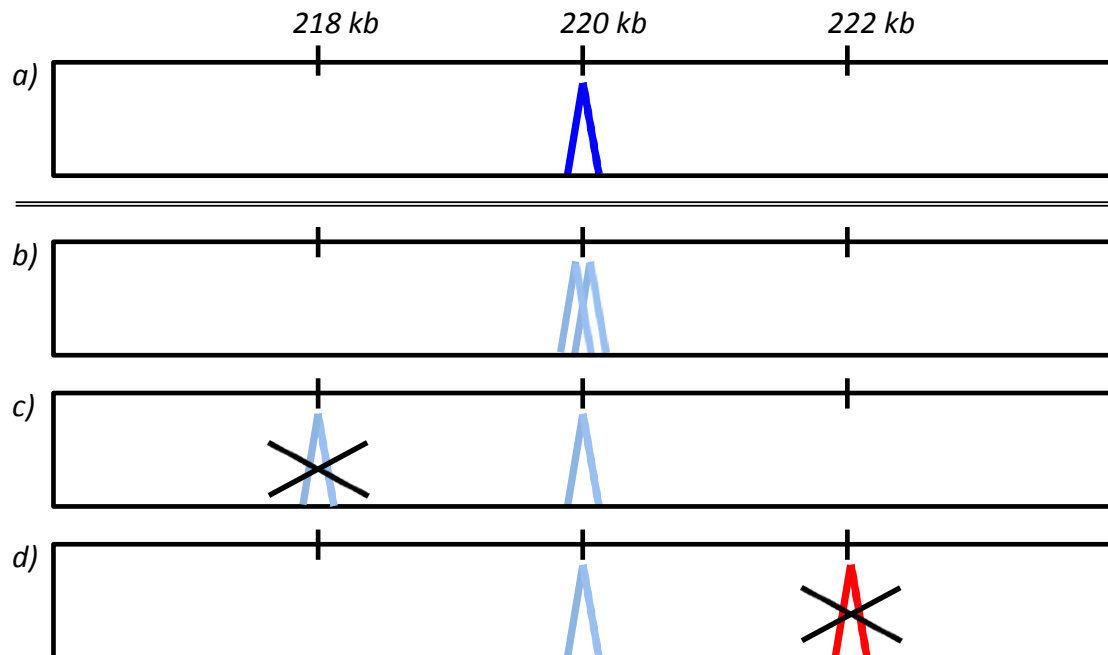
Da in Familie B die Ehefrau Anlageträgerin für die Erkrankung Fragiles X-Syndrom ist, kann hier neben einer PID an Blastomeren oder Trophoblasten auch eine Polkörperdiagnostik durchgeführt werden. Tsafir et al. (2010) empfehlen für das Fragile X-Syndrom eine PKD, da die ADO-Raten geringer seien und der Embryo nicht biopsiert werden müsse. Des Weiteren fallen bei einer PKD Interpretationsschwierigkeiten beim Auftreten nur eines Peaks in der Fragmentlängenanalyse weg, da die Polkörper im Allgemeinen hemizygot seien sollten. Weitere Vor- und Nachteile der PID an den verschiedenen Zellstadien wurden in der Einleitung (s. 1.3) ausführlich dargestellt.

## **4.1 Aufbau eines Multiplex-Seminested-Systems mit Mikrosatelliten-Markern**

### **Chorea Huntington**

In Familie A ist der ratsuchende Ehemann Anlageträger für die Chorea Huntington. Für unsere Analysen standen DNA-Proben des Ratsuchenden, seiner Ehefrau und seiner Mutter zur Verfügung. Es wurden vier informative Mikrosatelliten-Marker (D4S127, HD-K, HD-A, HD-C2) gefunden, die sich in einem Multiplex-Seminested-Assay an einzelnen Lymphozyten kombinieren ließen. Der Marker D4S127 wurde der Literatur entnommen (Sermon et al., 2002; Van Rij et al., 2012). Die übrigen drei Marker wurden aus der Datenbank „UCSC Genome Browser“ herausgesucht. Wie von Harton et al. (2011) empfohlen, befinden sich zwei der Marker (D4S127 und HD-K) 5'-wärts und zwei (HD-A und HD-C2) 3'-wärts des CAG-Repeats. Um Fehldiagnosen durch Rekombinationen

auszuschließen, ist es essentiell, dass die verwendeten Marker in unmittelbarer Nähe des bei Chorea Huntington expandierten CAG-Repeats liegen. Laut Harton et al. (2011) werden Marker bis zu einer Entfernung von 1 Mb empfohlen, ideal sind intragenische Marker. Damit liegen die verwendeten Marker mit Entfernungen von 38 kb (D4S127), 24 kb (HD-K), 8 kb (HD-A, intragenisch) sowie 197 kb (HD-C2) alle im empfohlenen Bereich. Alle vier Marker sind für die Familie A informativ. Die Allelverteilungen der vier verwendeten Marker und des CAG-Repeats bei dem ratsuchenden Ehepaar und möglichen Nachkommen sind in Abbildung 13 (s. 3.1.3) und Tabelle 21 (s. 3.1.3) dargestellt. Für den Marker HD-C2 sind der Ratsuchende und seine Ehefrau beide heterozygot, insgesamt liegen vier verschiedene Allele vor. Er weist ein 226 bp („betroffen“) und ein 200 bp („normal“) Allel auf, sie je eines der Länge 204 bp und 234 bp. Somit kann bei jeder Allelkombination der möglichen Nachkommen eine Aussage über den HD-Status getroffen werden. Bei dem Marker HD-K ist die Ehefrau des Ratsuchenden homozygot für das 166 bp Allel. Der Ratsuchende ist heterozygot und weist Allele der Länge 162 bp („betroffen“) und 142 bp („normal“) auf. Da der Ehemann Anlageträger für die Chorea Huntington ist, können Nachkommen des Paares trotzdem uneingeschränkt bezüglich ihres HD-Status beurteilt werden. Für den Marker D4S127 sind beide Partner heterozygot. Der Ratsuchende weist die Allele 222 bp („betroffen“) und 220 bp („normal“) auf, seine Ehefrau besitzt ebenfalls das 220 bp sowie ein 218 bp Allel, sodass theoretisch für jede mögliche Kombination entschieden werden kann, ob der Embryo betroffen ist oder nicht. Allerdings kann bei einem Ergebnis der Fragmentlängenanalyse, in dem nur ein 220 bp Allel zu erkennen ist (s. Abb. 35a), nicht beurteilt werden, ob der Embryo homozygot für das 220 bp lange Allel ist (s. Abb. 35b) oder ob ein Allele Dropout vorliegt. Bei einem Allele Dropout könnte sowohl das 218 bp lange Normalallel der Mutter (s. Abb. 35c), als auch das mutationstragende 222 bp Allel des Vaters (s. Abb. 35d) ausgefallen sein, sodass bei diesem Ergebnis mit Hilfe des Markers D4S127 allein keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob der Embryo Anlageträger der Chorea Huntington ist oder nicht.



**Abb. 35: Interpretation der Ergebnisse der Fragmentlängenanalyse des Markers D4S127**  
 a) Ergebnis der Fragmentlängenanalyse: ein Peak bei 220 kb; b)-d) tatsächliche Allelkombinationen: b) Homozygotie für das Allel 220 (gesund); c) ADO des Allels 218 (gesund); d) ADO des Allels 222 (betroffen); **dunkelblau**: in der Fragmentlängenanalyse sichtbares Allel; **hellblau**: tatsächliche Allele (normal); **rot**: tatsächliches Allel (betroffen);  $\times$ : ADO des entsprechenden Allels

Bei dem Marker HD-A liegt eine ähnliche Situation vor. Beide Partner sind heterozygot, doch beide weisen u.a. das 155 bp Allel auf, sodass ein Ergebnis von einem alleinigen Peak für das 155 bp Allel nicht sicher interpretiert werden kann.

### Fragiles X-Syndrom

In Familie B ist die ratsuchende Ehefrau Anlageträgerin für das Fragile X-Syndrom. Es standen DNA-Proben der Ratsuchenden, ihres Ehemanns sowie ihrer Eltern zur Verfügung. Auch hier wurden vier informative Mikrosatelliten-Marker (DXS998, FRAXAC1, 7217, DXS6687) gefunden und in einem Multiplex-Seminested-Ansatz kombiniert. Der Marker 7217 wurde aus der Datenbank „UCSC Genome Browser“ herausgesucht, die Marker DXS998, FRAXAC1, DXS6687 wurden der Literatur entnommen (z.B. Tsafir et al., 2010). Alle Marker liegen näher als 1 Mb an dem bei FraX expandierten CGG-Repeat (DXS998: 386 kb; FRAXAC1: intragenisch; 7217: 185 kb; DXS6687: 570 kb). Da das *FMR1*-Gen auf dem X-Chromosom liegt, ist der Ehemann der Ratsuchenden für alle Marker hemizygot. Die Allele der vier verwendeten Marker sowie die Längen der CGG-Repeats für

das ratsuchende Ehepaar und mögliche Nachkommen sind der Abbildung 26 (s. 3.2.6) sowie den Tabellen 26 (s. 3.2.2) und 28 (s. 3.2.6) zu entnehmen.

Für den Marker DXS998 weist die Ratsuchende ein 141 bp („normal“) und ein 139 bp („betroffen“) Allel auf. Ihr Ehemann ist hemizygot für das Allel 141 bp. Wird in der Fragmentlängenanalyse nur ein 141 bp Allel dargestellt, so kann nicht abgeleitet werden, ob der Embryo weiblich und homozygot für das 141 bp Allel ist (gesundes Mädchen), männlich und hemizygot für das 141 bp Allel ist (gesunder Junge), oder ob ein Allel Dropout vorliegt. Hierbei kann entweder das betroffene 139 bp lange Allel (betroffenes Mädchen) oder eines der normalen 141 bp langen Allele (gesundes Mädchen) ausgefallen sein. Eine ähnliche Situation liegt für den Marker FRAXAC1 vor, für den die Ratsuchende ein 182 bp („normal“) sowie ein 184 bp („betroffen“) langes Allel aufweist. Ihr Ehemann hat ebenfalls ein 182 bp langes Allel. Für den Marker 7217 hat die Ratsuchende ein 181 bp („normal“) sowie ein 183 bp („betroffen“) langes Allel. Ihr Ehemann weist ein anderes Allel auf (187 bp), sodass die oben beschriebene Problematik hier nicht vorliegt. Entsprechendes gilt für den Marker DXS6687, für welchen die Ratsuchende ein 256 bp („normal“) und ein 254 bp („betroffen“) Allel, ihr Ehemann ein 242 bp Allel aufweist.

## 4.2 Direkter Nachweis der Repeat-Expansion

Für keines der Krankheitsbilder konnte der direkte Nachweis der Repeat-Expansion mit den Mikrosatelliten-Markern im Multiplex-Seminested-Assay an Einzelzellen kombiniert werden.

### Chorea Huntington

Bei der Chorea Huntington haben pathologisch expandierte CAG-Repeats in der Regel eine Länge von 40-50 Wiederholungen, was einer Fragmentlänge von mehr als 120-150 bp entspricht. Die Amplifikation von Fragmenten dieser Länge mittels PCR ist generell möglich. So wird auch in den PID Zentren in Brüssel, Maastricht und Straßburg bei PIDs für HD ein direkter Nachweis des CAG-Repeats ggf. in Kombination mit einem oder mehreren Mikrosatelliten-Markern durchgeführt (Van Rij et al., 2012). Während unseres Etablierungsprozesses an Einzelzellen konnten wir jedoch mit keinem der verwendeten Systeme in mehr als einem Viertel der Ansätze eine Amplifikation des CAG-Repeats erreichen, was zum Einschluss in das System für die PID deutlich zu wenig war. Auch von

Moutou et al. (2004) werden Schwierigkeiten bei der Amplifikation der expandierten CAG-Repeats beschrieben und unterschiedlich lange *HTT*-Normalallele als Voraussetzung für die Verwendung des direkten Mutationsnachweises in der PID gefordert. Folglich beinhalten auch nur drei der zwölf von Moutou et al. (2004) verwendeten PCR-Systeme für eine PID bei Chorea Huntington den direkten Nachweis des CAG-Repeats. Einige Unterschiede zwischen den von Moutou et al. (2004) verwendeten PCR-Systemen und denen in unserer Etablierung, die möglicherweise ursächlich für die geringeren Amplifikationsraten unsererseits sein könnten, sollen im Folgenden kurz dargestellt werden. Die von Moutou et al. (2004) verwendeten PCR-Systeme, die das CAG-Repeat amplifizieren, beinhalten zusätzlich nur einen Mikrosatelliten-Marker. Im kleinsten unserer Ansätze wurde das CAG-Repeat mit zwei Markern kombiniert, in der Regel jedoch mit vieren. Die Wahrscheinlichkeit von Interaktionen kann mit der Anzahl der unterschiedlichen Primer und damit mit der Anzahl der zu amplifizierenden Mikrosatelliten-Marker steigen. Interaktionen können z.B. dazu führen, dass nicht mehr genügend Primer für die gewollte Reaktion zur Verfügung stehen und damit geringere Amplifikationsraten erreicht werden. Des Weiteren haben Moutou et al. (2004) nicht exakt dieselben Primer wie wir verwendet, was ebenfalls Ursache des unterschiedlichen Out Comes sein könnte. Ein weiterer Unterschied ist, dass Moutou et al. (2004) zwar auch ein Multiplex-System eingesetzt, an dieses aber keine (Semi)-Nested-PCR angeschlossen haben. Möglicherweise ist also auch die hier verwendete Kombination von Multiplex- und Seminested-PCR eine Schwachstelle. Nicht zu unterschätzen ist auch die Verwendung unterschiedlicher Reagenzien oder Geräte. So verwenden Moutou et al. (2004) ausschließlich für die drei PCR-Systeme, die das CAG-Repeat beinhalten, die Polymerase ELT von der Firma Roche. Diese Polymerase wird von Sermon und de Rycke (2007) als für lange Fragmente konzipiert und für GC-reiche Regionen nützlich beschrieben, was beides auf das CAG-Repeat im *HTT*-Gen zutrifft. Die Hersteller der verwendeten Thermocycler sind unklar und können unter Umständen auch Grund für Unterschiede in Amplifikationsraten sein. Da es nicht möglich ist, alle potentiell ausschlaggebenden Optimierungen durchzuführen, wurde nach einer Reihe von Versuchen bezüglich der Zusammensetzung der Ansätze sowie der Programme der Thermocycler entschieden, das Multiplex-Seminested-PCR-System für die PID bei Chorea Huntington ausschließlich aus Mikrosatelliten-Markern aufzubauen.

### **Fragiles X-Syndrom**

Eine Vollmutation im *FMR1*-Gen besteht ab einer Länge von 200 CGG-Repeats, was einer Fragmentlänge von mindestens 600 bp entspricht. Es ist technisch nicht möglich, repetitive DNA-Fragmente dieser Länge zuverlässig mittels einfacher PCR zu amplifizieren (Tsafrir et al., 2010). So ist auch in der postnatalen FraX-Diagnostik, in welcher deutlich mehr DNA zur Verfügung steht als bei der Einzelzell Diagnostik, nicht die einfache PCR sondern der Southernblot Methode der Wahl (Steinbach und Gläser, 2009). Die ersten Ansätze einer PID für das Fragile X-Syndrom wurden dennoch u.a. von Sermon et al. (1999) mittels PCR des CGG-Repeats im *FMR1*-Gen unternommen. Hierbei musste das ratsuchende Ehepaar jedoch informativ für die *FMR1*-Normalallele sein, das heißt die Repeatlängen der Normalallele mussten sich unterscheiden. Selbst die Amplifikation der *FMR1*-Normalallele ist auf Grund des hohen GC-Gehalts der Sequenz schwierig (Burllet et al., 2006) und hat in der Vergangenheit zu einer Fehldiagnose bei der PID geführt (Wilton et al., 2009). Durch den Einsatz polymorpher Mikrosatelliten-Marker konnte die Effizienz der PID bei Fragilem X-Syndrom deutlich verbessert werden (Apeessos et al., 2001; Malcov et al., 2007). Deswegen entschieden auch wir uns, ausschließlich polymorphe Mikrosatelliten-Marker für die PID/PKD bei Fragilem X-Syndrom einzusetzen. Des Weiteren entschieden wir uns u.a. wegen der von Verlinsky et al. (2002) berichteten Fehldiagnose bei einer FraX-PID mit nur zwei Mikrosatelliten-Markern dazu, vier Marker einzusetzen.

### **4.3 Allele Dropout**

Ein Allele Dropout (ADO) ist das Versagen eines PCR-Systems, eines der beiden Allele zu amplifizieren. Dieses zufällige Ereignis kann in Abhängigkeit von dem Locus und dem PCR-System zwischen 0 % und 40 % variieren (Dotan et al., 2010). Die Gefahr bei einem ADO besteht darin, dass betroffene Embryonen fälschlicherweise als nicht betroffen diagnostiziert und transferiert werden. So wird ein ADO z.B. von Wilton et al. (2009) neben Kontaminationen als eine der häufigsten Ursachen für Fehldiagnosen bei PIDs genannt. Ein Beispiel hierfür ist die von Verlinsky et al. (2002) beschriebene Fehldiagnose bei einer PID für das Fragile X-Syndrom.

Die ADO Raten können durch Optimierungen des PCR-Systems minimiert werden, eine vollkommene Elimination ist jedoch nicht möglich (Piyamongkol et al., 2003). Thornhill et

al. (2005) und Harton et al. (2011) empfehlen, die ADO Raten unter 10 % zu senken. Zur Validierung eines Systems für die PID sowie zur zuverlässigen Berechnung der ADO Raten wird von Harton et al. (2011) empfohlen, das System an mindestens 50 Einzelzellen zu testen. Im Rahmen dieser Dissertation wurden die PCR-Systeme für beide Erkrankungen an jeweils 64 Einzelzellen getestet. Dabei konnten für die Marker des Fragilen X-Syndroms ADO Raten zwischen 5,3 % und 9,6 % erreicht werden, sodass hier keine weiteren Optimierungen notwendig sind und das System für die PID/PKD zur Verfügung steht. Die ADO Raten der Marker für Chorea Huntington variieren zwischen 7,8 % und 16,4 %. Somit liegen die ADO Raten der Marker D4S127 und HD-A mit 16,4 % sowie die des Markers HD-C2 mit 12,5 % nicht in dem empfohlenen Bereich. Allerdings ist ein Allele Dropout, wie eingangs erwähnt, ein zufälliges, locusabhängiges Ereignis, was nicht immer in den erwünschten Bereich gebracht werden kann. So berichten auch Piyamongkol et al. (2003), dass es erfahrenen PID-Zentren in der Regel gelingt, ADO Raten auf 5-15 % zu reduzieren. Des Weiteren ist zu beachten, dass durch die Verwendung von vier Markern die Wahrscheinlichkeit, dass bei allen Markern einer Zelle gleichzeitig ein ADO auftritt, sehr gering ist und damit die Wahrscheinlichkeit einer Fehldiagnose ebenfalls sinkt (vgl. Piyamongkol et al., 2001; Piyamongkol et al., 2003). Auch mit diesem System könnte also eine PID durchgeführt werden. Trotzdem wäre es wünschenswert, die ADO Raten weiter zu senken. In der Literatur werden eine Reihe von beeinflussbaren und nicht beeinflussbaren Faktoren diskutiert, die möglicherweise einen Effekt auf einen Allele Dropout haben (vgl. Ray und Handyside, 1996; Piyamongkol et al., 2003; Dotan et al., 2010). Von Ray und Handyside (1996) wurde gezeigt, dass eine höhere Denaturierungstemperatur (96 °C gegenüber 93 °C und 90 °C) einen positiven Effekt auf die ADO Raten hat. Piyamongkol et al. (2003) zeigten dagegen, dass eine Variation der Denaturierungstemperatur zwischen 94 °C und 96 °C keinen Einfluss auf den Allele Dropout hat. Somit bedarf die von uns gewählte Temperatur von 95 °C keiner weiteren Anpassung. Da von Piyamongkol et al. (2003) vermutet wurde, dass ein Zusammenhang zwischen der Denaturierungsdauer der ersten Zyklen der Multiplex-PCR und dem Allele Dropout bestehen könnte, haben wir in den ersten 10 Zyklen der Multiplex-PCR stets eine Denaturierungsdauer von 60 s im Gegensatz zu sonst 30 s gewählt. Ein Ansatz der Optimierung wäre, diese Zeit auf die von Piyamongkol et al. (2003) verwendeten zwei Minuten zu verlängern. Ein weiterer relevanter Schritt der Einzelzell Diagnostik ist die

Zelllyse. Im Rahmen dieser Dissertation wurden alle Zellen mittels Proteinase K lysiert. Von El-Hashemite und Delhanty (1997) wurde ein positiver Effekt der Lyse mittels Proteinase K auf die ADO Raten beschrieben, wohingegen Thornhill et al. (2001) geringere ADO Raten bei der Verwendung alkalischer Lysepuffer nachweisen konnten. Eindeutige Daten, welche Art der Lyse am besten ist, liegen derzeit nicht vor. Piyamongkol et al. (2003) vermuten, dass der Zusammenhang zwischen Lyseprotokoll und ADO Raten abhängig von der Routine des jeweiligen Labors ist. Auch von der ESHRE (Thornhill et al., 2005; Harton et al., 2011) werden die Lyse mittels Proteinase K und mit alkalischem Lysepuffer gleichermaßen empfohlen, sodass wir keine signifikante Verbesserung der ADO Raten durch die Verwendung alkalischer Lysepuffer erwarten. Piyamongkol et al. (2003) sowie Dotan et al. (2010) haben weiterhin gezeigt, dass die ADO Raten mit der Länge der zu amplifizierenden Fragmente korrelieren. Die DNA-Fragmente in unserer Multiplex-PCR waren mit bis zu 356 bp bei dem Marker HD-A relativ lang, was unter Umständen ein Grund für die relativ hohen ADO Raten sein könnte. Somit könnte die Auswahl kürzerer Fragmente die ADO Raten evtl. verbessern. Nicht beeinflussbar ist die Tatsache, dass während der Etablierung einer PID die einzelnen Lymphozyten eingefroren und immer wieder aufgetaut werden müssen. Piyamongkol et al. (2003) haben gezeigt, dass durch das Einfrieren höhere ADO Raten (vermutlich durch Schädigung der DNA) zu beobachten sind. Allerdings werden bei der PID in der Regel frische Zellen verwendet, sodass hier evtl. geringere ADO Raten als während der Etablierung zu erwarten sind. Geringere ADO Raten während der PID lassen auch die Ergebnisse von Dotan et al. (2010) vermuten, da sie einen Zusammenhang zwischen Teilungsfähigkeit der Zellen (Lymphozyten sind im Gegensatz zu embryonalen Zellen nicht mehr teilungsfähig) und erfolgreicher Amplifikation beschreiben. Sollte es während einer PID dennoch zu der Situation kommen, dass eine eindeutige Interpretation der Anlageträgerschaft eines Embryos durch einen Allele Dropout nicht möglich ist, so muss der Embryo als nicht beurteilbar bewertet werden und darf nicht zum Transfer freigegeben werden.

#### **4.4 Aktuelle Entwicklungen des Methodenspektrums bei der PID**

Die PID/PKD mittels Kopplungsanalyse mit flankierenden Mikrosatelliten-Markern ist eine sehr sichere aber auch sehr aufwändige Methode. Für jedes ratsuchende Paar muss das Multiplex-Seminested-PCR-System in Abhängigkeit der Informativität der Marker neu

angepasst werden, was einen hohen zeitlichen, personellen und finanziellen Aufwand bedeutet. Aktuell werden von internationalen Forschergruppen neue Techniken entwickelt, die einen geringeren Aufwand sowie eine höhere Effizienz bei der PID/PKD erhoffen lassen.

### **Array-CGH und SNP-Array**

Ein Beispiel hierfür ist die Array Technologie. Dabei muss zwischen der Array-CGH (Comparative Genomic Hybridization) und dem SNP (Single Nucleotide Polymorphism) Array unterschieden werden. Die Array-CGH ist, wie der Name schon sagt, eine vergleichende Hybridisierung von einer Test-DNA und einer Kontroll-DNA an eine Plattform (Array), die mit kleinen DNA-Fragmenten beladen ist. Hiermit können numerische Chromosomenaberrationen, wie Monosomien oder Trisomien, größere Deletionen und Duplikationen, jedoch keine Punktmutationen oder Repeat-Expansionen detektiert werden. Die Test- und Kontroll-DNAs werden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und mittels WGA (Whole Genome Amplification) vervielfältigt. Daraufhin werden die DNAs auf das Array gegeben und hybridisieren an dieses. Ein Detektor kann anschließend analysieren, in welchem Verhältnis die beiden Fluoreszenzfarbstoffe und damit die beiden DNAs an das Array gebunden haben. Daraus kann geschlussfolgert werden, ob bei der Testpersonen in bestimmten Bereichen Monosomien oder Trisomien vorliegen (Harper und Harton, 2010). Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) sind DNA-Loci, an denen in der Population unterschiedliche Basen auftreten, ohne dass dieses einen Krankheitswert hat. SNPs kommen über das gesamte Genom verteilt vor. Mit Hilfe der SNPs lässt sich ebenfalls die Anzahl aller Chromosomen einer Testperson bestimmen. Darüber hinaus können durch Kopplungsanalysen mit SNPs auch spezifische monogene Erbkrankheiten erkannt werden. Folglich können Embryonen mittels SNP-Array gleichzeitig auf Aneuploidien und eine bestimmte monogene Erbkrankheit untersucht werden, was einen entscheidenden Vorteil gegenüber Multiplex-Seminested-PCR basierten Verfahren aber auch der Array-CGH darstellt.

### **Next Generation Sequencing**

Eine weitere neue Technik, die aktuell für den Einsatz bei der PID/PKD getestet wird (Treff et al., 2013) ist das so genannte Next Generation Sequencing (NGS). NGS ist eine moderne

Methode der DNA-Sequenzierung, die nicht mehr auf der bisher üblichen Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977) beruht. Sie wurde erstmals 2005 von Margulies et al. erwähnt. Das Prinzip der Erkennung der Nukleotid-Abfolge beruht auf enzymatischen Prozessen, die ein detektierbares Lichtsignal auslösen. NGS erlaubt die parallele Sequenzierung von mehreren Tausend Ansätzen, ohne dass es sich notwendiger Weise um Proben desselben Embryos, oder um Sequenzierungen desselben Locus handeln muss (Schuster, 2008). Folglich ist von dem Einsatz von NGS eine enorme Zeit- und Personaleinsparung zu erwarten. Darüber hinaus entfällt, wenn das Verfahren vollständig etabliert ist, die individuelle Anpassung der Diagnostik für jedes ratsuchende Paar, was erneut Zeit und Kosten spart. Derzeit wird die Methode noch nicht routinemäßig in der PID/PKD angewandt. Treff et al. (2013) haben jedoch kürzlich an Lymphozyten und Trophoblasten von sechs ratsuchenden Paaren mit monogenen Erbkrankheiten wie Cystischer Fibrose und Neurofibromatose gezeigt, dass die Ergebnisse des Mutationsnachweises mittels NGS zu 100 % mit den Ergebnissen mittels herkömmlicher Amplifikation und Sequenzierung übereinstimmen. Darüber hinaus kann mittels NGS zusätzlich analysiert werden, ob eine Aneuploidie oder Translokation vorliegt. Das Verfahren wurde bisher noch nicht an Einzelzellen, sondern lediglich an einem Minimum von 5 Trophoblast-Zellen durchgeführt. Für eine Diagnostik an Polkörpern oder Blastomeren bedarf es also noch weiterer Optimierungen. Dennoch ist zu erwarten, dass NGS die Zukunft der PID/PKD sein wird, da sie einige entscheidenden Vorteile gegenüber den herkömmlichen Methoden mit sich bringt.

#### **4.5 Ethische Aspekte der PID**

Obwohl die Möglichkeit eine PID/PKD in Anspruch zu nehmen für viele ratsuchende Paare einen Lichtblick darstellen mag, bringt sie auch einige Nachteile und Hindernisse mit sich. Wie bereits erwähnt, müssen sich die Paare einer IVF unterziehen. Diese kann durch häufige Arztbesuche und die hormonelle Stimulation mit möglichen Nebenwirkungen eine große Belastung sein. Dazu kann eine große Frustration kommen, wenn bspw. nach erfolgter Untersuchung der Embryonen keine „nicht betroffenen“ zum Transfer zur Verfügung stehen oder aus einem erfolgten Embryotransfer keine Schwangerschaft resultiert. Die Schwangerschaftsrate bei der PID beträgt ca. 27 % pro Embryotransfer (Goossens et al., 2012). Sie unterscheidet sich nicht wesentlich von der

Schwangerschaftsrate bei ICSI ohne PID (28 % nach Embryotransfer (Deutsches IVF-Register, 2012)). Die PID ist außerdem mit einer finanziellen Belastung verbunden. Die Kosten belaufen sich auf mehrere Tausend Euro pro Zyklus.

Neben diesen Problemen bei der Durchführung einer PID wird, seitdem die PID technisch möglich ist, auch über ihre ethische und moralische Vertretbarkeit diskutiert. Neben dem im ESchG verankerten Schutz des Embryos gibt es zahlreiche Argumente der PID-Gegner. Sie argumentieren, mit der Durchführung einer PID würde ein Urteil über den Wert eines Lebens gefällt, die nicht selektierten Embryonen würden als weniger lebenswert bezeichnet. Einige sehen in der Selektion der Embryonen im Rahmen der PID gar eine Parallele zur eugenischen Selektion zu Zeiten des Nationalsozialismus (Deutscher Ethikrat, 2011). Es käme zu einer Diskriminierung von Personen, die bereits von dieser Krankheit betroffen sind, im Speziellen und zur Diskriminierung von Behinderten im Allgemeinen. Menschen mit Behinderungen würden künftig als vermeidbar gelten und dadurch würden sie an sozialer und gesellschaftlicher Anerkennung verlieren. Des Weiteren wird argumentiert, dass die Inanspruchnahme der PID „angebotsgesteuert“ (Kollek, 2000) sei und eine Legalisierung der PID zu einem enormen „moralischen Druck“ (Kollek, 2000) auf betroffene Paare führen würde. Darüber hinaus wird befürchtet, eine Legalisierung der PID stelle einen Dammbbruch dar und bewirke das Entstehen von „Designer-Babys“ in naher Zukunft.

Andererseits bietet die PID Paaren mit einem erhöhten Risiko für eine bestimmte genetisch bedingte Erkrankung die Möglichkeit, ein Kind ohne diese Erkrankung zu bekommen, wenn für sie ein Leben mit einem betroffenen Kind nicht vorstellbar oder realisierbar ist. Die ratsuchenden Paare befinden sich oft in einer großen Not. Sie wünschen sich kein „Designer-Baby“, was nach derzeitigem medizinischen Stand auch nicht möglich wäre, sondern ein Kind ohne die eine Erkrankung, die oftmals in der Familie gehäuft vorkommt. Dabei haben die Paare keinerlei Garantie auf ein gesundes Kind ohne Behinderung. Das Risiko für andere Erkrankungen oder Beeinträchtigungen entspricht dem der Allgemeinbevölkerung. Für Paare, die sich eine PID wünschen, wäre die Alternative eine Schwangerschaft auf Probe mit gegebenenfalls folgendem Schwangerschaftsabbruch. PID-Befürworter sehen hier einen enormen Wertungswiderspruch. Wenn ein Schwangerschaftsabbruch z.T. bis in die letzten Schwangerschaftsmonate nicht rechtswidrig und von der Gesellschaft akzeptiert sei, sei

ein Verbot der PID nicht wertungsgleich. Darüber hinaus geht ein Schwangerschaftsabbruch immer auch mit medizinischen Risiken für die Schwangere sowie möglicherweise mit einer starken psychischen Belastung vor und nach dem Abbruch einher. Für manche Paare kommt ein Abbruch der Schwangerschaft auch aus ethischen Gründen nicht in Frage. Für viele Ratsuchende stellt somit die PID einen großen Lichtblick dar. Einige Paare, die selber von einer schweren Erbkrankheit betroffen sind oder die Erkrankung bei Familienangehörigen miterlebt haben, blieben in der Vergangenheit kinderlos. Andere haben bereits ein betroffenes Kind und möchten dessen Leid einem weiteren Kind ersparen. Somit sehen einige Ratsuchende in der PID die einzige Möglichkeit, sich ihren Kinderwunsch zu erfüllen.

## 5 Zusammenfassung

Die Präimplantationsdiagnostik ist eine Untersuchung von *in vitro* erzeugten Embryonen noch vor dem Transfer in den Uterus der Mutter. Sie kann Paaren angeboten werden, die ein erhöhtes Risiko für eine bestimmte genetisch bedingte Erkrankung haben. Beispiele für solche Erkrankungen sind die Chorea Huntington (Repeat-Expansion im *HTT*-Gen), eine letal verlaufende, neurodegenerative Erkrankung, und das Fragile X-Syndrom (Repeat-Expansion im *FMR1*-Gen), eine neuronale Entwicklungsstörung. Ziel dieser Dissertation war der Aufbau von Multiplex-Seminested-PCR-Systemen an Einzelzellen von zwei Familien, in welchen die Erbkrankheiten Chorea Huntington bzw. Fragiles X-Syndrom vorkommen. Die PCR-Systeme sollen später zur Präimplantations- oder Polkörperdiagnostik bei den entsprechenden Familien eingesetzt werden.

Da der direkte Mutationsnachweis bei beiden Erkrankungen nicht immer zuverlässig möglich ist, wurde die Etablierung einer Kopplungsanalyse mit Hilfe von Mikrosatelliten-Markern angestrebt. Hierzu wurden das *HTT*- bzw. das *FMR1*-Gen flankierende Mikrosatelliten-Marker herausgesucht und mittels PCR und Elektrophorese bestimmt, welche dieser Marker für die entsprechende Familie informativ sind. Anschließend wurden geeignete Marker in einem Multiplex-Seminested-PCR-System kombiniert. Des Weiteren wurde für die Erkrankung Chorea Huntington die Länge des krankheitsverursachenden CAG-Repeats bei dem ratsuchenden Ehepaar bestimmt und versucht, diesen Nachweis in das aufgebaute PCR-System zu integrieren. Mittels Dichtegradientenzentrifugation und Durchflusszytometrie wurden einzelne Lymphozyten der ratsuchenden Ehepaare isoliert. An diesen Einzelzellen wurden die PCR-Systeme zur Validierung getestet. Für alle Marker wurde die Allele Dropout Rate bestimmt.

Der Aufbau eines Multiplex-Seminested-PCR-Systems mit Mikrosatelliten-Markern ist für beide Fragestellungen gelungen. Der direkte Mutationsnachweis bei der Erkrankung Chorea Huntington konnte allerdings nicht in dieses System integriert werden. Die Allele Dropout Raten der Marker für die Fragestellung Fragiles X-Syndrom liegen mit 5,3 % bis 9,6 % im empfohlenen Bereich, wohingegen die Allele Dropout Raten bei der Fragestellung Chorea Huntington mit 7,8 % bis 16,4 % relativ hoch sind und weiter optimiert werden könnten.

Mit Abschluss dieser Dissertation stehen zwei Multiplex-Seminested-PCR-Systeme für die Präimplantations- oder Polkörperdiagnostik zur Verfügung.

## 6 Literaturverzeichnis

Allingham-Hawkins DJ, Babul-Hirji R, Chitayat D, Holden JJ, Yang KT, Lee C, Hudson R, Gorwill H, Nolin SL, Glicksman A, Jenkins EC, Brown WT, Howard-Peebles PN, Becchi C, Cummings E, Fallon L, Seitz S, Black SH, Vianna-Morgante AM, Costa SS, Otto PA, Mingroni-Netto RC, Murray A, Webb J, Webb J, MacSwinney F, Dennis N, Jacobs PA, Syrrou M, Georgiou I, Patsalis PC, Giovannucci Uzielli ML, Guarducci S, Lapi E, Cecconi A, Ricci U, Ricotti G, Biondi C, Scarselli B, Vieri F: Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study--preliminary data. *Am J Med Genet* 83, 322-325 (1999)

Altarescu G, Eldar-Geva T, Brooks B, Zylber-Haran E, Varshaver I, Margalioth EJ, Levy-Lahad E, Renbaum P: Preimplantation genetic diagnosis (PGD) for nonsyndromic deafness by polar body and blastomere biopsy. *J Assist Reprod Genet* 26, 391-397 (2009)

Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B, Telenius H, Theilmann J, Adam S, Starr E, Squitieri F, Biaoyang L, Kalchman MA, Graham RK, Hayden MR: The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet* 4, 398-403 (1993)

Apeessos A, Abou-Sleiman PM, Harper JC, Delhanty JD: Preimplantation genetic diagnosis of the fragile X syndrome by use of linked polymorphic markers. *Prenat Diagn* 21, 504-511 (2001)

Baruch S, Kaufman D, Hudson KL: Genetic testing of embryos: practices and perspectives of U.S. IVF clinics. *Fertil Steril* 89, 1053-1058 (2008)

Basford C, Forraz N, McGuckin C: Optimized multiparametric immunophenotyping of umbilical cord blood cells by flow cytometry. *Nat Protoc* 5, 1337-1346 (2010)

Bear MF, Huber KM, Warren ST: The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci* 27, 370-377 (2004)

Bundesgerichtshof: Die Präimplantationsdiagnostik zur Entdeckung schwerer genetischer Schäden des extrakorporal erzeugten Embryos ist nicht strafbar. Mitteilung der Pressestelle, Nr. 137/2010 (2010) Onlinedokument, URL: <http://juris.bundesgerichtshof.de/cgi-bin/rechtsprechung/document.py?Gericht=bgh&Art=pm&Datum=2010&Sort=3&nr=52539&pos=0&anz=137> (Tag des Zugriffs: 04.08.2013)

Burlet P, Frydman N, Gigarel N, Kerbrat V, Tachdjian G, Feyereisen E, Bonnefont JP, Frydman R, Munnich A, Steffann J: Multiple displacement amplification improves PGD for fragile X syndrome. *Mol Hum Reprod* 12, 647-652 (2006)

Chang LJ, Chen SU, Tsai YY, Hung CC, Fang MY, Su YN, Yang YS: An update of preimplantation genetic diagnosis in gene diseases, chromosomal translocation, and aneuploidy screening. *Clin Exp Reprod Med* 38, 126-134 (2011)

Chason RJ, Csokmay J, Segars JH, DeCherney AH, Armant DR: Environmental and epigenetic effects upon preimplantation embryo metabolism and development. *Trends Endocrinol Metab* 22, 412-420 (2011)

Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF: Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 67, 604-606 (1986)

Deutscher Ethikrat: Präimplantationsdiagnostik. Stellungnahme (2011) Onlinedokument, URL: <http://www.ethikrat.org/dateien/pdf/stellungnahme-praeimplantationsdiagnostik.pdf> (Tag des Zugriffs: 04.08.2013)

Deutsches IVF-Register: DIR Annual 2011. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 9, 453-484 (2012)

De Vos A, Staessen C, De Rycke M, Verpoest W, Haentjens P, Devroey P, Liebaers I, Van de Velde H: Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: a prospective cohort of single embryo transfers. *Hum Reprod* 24, 2988-2996 (2009)

Diedrich K, Griesinger G, Hepp H, Hilland U, Kentenich H, Koch HG, Kreß H, Montgomery FU, Nieschlag E, Schulze J, Scriba PC, Wiesing U: Memorandum zur Präimplantationsdiagnostik. *Dtsch Arztebl* 108, 1701-1708 (2011)

Dotan K, Feldman B, Goldman B, Peri Y, Peleg L: The single cell as a tool for genetic testing: credibility, precision, implication. *J Assist Reprod Genet* 27, 335-341 (2010)

Dreesen JC, Bras M, de Die-Smulders C, Dumoulin JC, Cobben JM, Evers JL, Smeets HJ, Geraedts JP: Preimplantation genetic diagnosis of spinal muscular atrophy. *Mol Hum Reprod* 4, 881-885 (1998)

El-Hashemite N, Delhanty JDA: A technique for eliminating allele specific amplification failure during DNA amplification of heterozygous cells for preimplantation diagnosis. *Mol Hum Reprod* 3, 975-978 (1997)

Embryonenschutzgesetz vom 13.12.1990, zuletzt geändert durch Artikel 1 G. vom 21.11.2011, Onlinedokument, URL: <http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/eschg/gesamt.pdf> (Tag des Zugriffs: 23.08.2013)

Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJ, Holden JJ, Fenwick RG Jr, Warren ST, Oostra BA, Nelson DL, Caskey CT: Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67, 1047-1058 (1991)

Garber KB, Visootsak J, Warren ST: Fragile X syndrome. *Eur J Hum Genet* 16, 666-672 (2008)

Gedeon AK, Baker E, Robinson H, Partington MW, Gross B, Manca A, Korn B, Poustka A, Yu S, Sutherland GR, Mulley JC: Fragile X syndrome without CCG amplification has an FMR1 deletion. *Nat Genet* 5, 341-344 (1992)

Gendiagnostikgesetz vom 31.07.2009, zuletzt geändert durch Artikel 4 Absatz 18 vom 07.08.2013, Onlinedokument, URL: <http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/gendg/gesamt.pdf> (Tag des Zugriffs: 11.12.2013)

Geraedts J, Montag M, Magli MC, Repping S, Handyside A, Staessen C, Harper J, Schmutzler A, Collins J, Goossens V, van der Ven H, Vesela K, Gianaroli L: Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results. *Hum Reprod* 26, 3173-3180 (2011)

Gerfen CR: The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu Rev Neurosci* 15, 285-320 (1992)

Gleicher N, Kim A, Weghofer A, Barad DH: Lessons from elective in vitro fertilization (IVF) in, principally, non-infertile women. *Reprod Biol Endocrinol* 10 (2012) Onlinedokument, URL: <http://www.rbj.com/content/10/1/48> (Tag des Zugriffs: 04.08.2013)

Goossens V, Traeger-Synodinos J, Coonen E, De Rycke M, Moutou C, Pehlivan T, Derks-Smeets IAP, Harton G: ESHRE PGD Consortium datacollection XI: cycles from January to December 2008 with pregnancy follow-up to October 2009. *Hum Reprod* 27, 1887-1911 (2012)

Griesinger G, Bündgen N, Salmen D, Schwinger E, Gillessen-Kaesbach G, Diedrich K: Polkörperdiagnostik für monogene Erkrankungen. Geburt von drei gesunden Kindern. *Dtsch Arztebl* 106, 533-538 (2009)

Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR, Sakaguchi AY, Young AB, Shoulson I, Bonilla E, Martin JB: A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306, 234-238 (1983)

Gutekunst CA, Norflus F, Hersch SM: The neuropathology of Huntington's disease. In: Bates G, Harper P, Jones L: *Huntington's disease*. 3. Aufl., 251-275, Oxford University Press, Oxford (2002)

Haaf T, Tresch A, Lambrecht A, Grossmann B, Schwaab E, Khanaga O, Hahn T, Schorsch M: Outcome of intracytoplasmic sperm injection with and without polar body diagnosis of oocytes. *Fertil Steril* 93, 405-415 (2010)

Hagerman PJ, Hagerman RJ: The fragile-X premutation: a maturing perspective. *Am J Hum Genet* 74, 805-816 (2004)

Hagerman RJ, Leehey M, Heinrichs W, Tassone F, Wilson R, Hills J, Grigsby J, Gage B, Hagerman PJ: Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology* 57, 127-130 (2001)

Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ, Delhanty JD, Winston RM, Tuddenham EG: Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 333, 347-349 (1989)

Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM: Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 344, 768-770 (1990)

Harper JC, Harton G: The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertil Steril* 94, 1173-1177 (2010)

Harper JC, Wilton L, Traeger-Synodinos J, Goossens V, Mouou C, SenGupta SB, Pehlivan Budak T, Renwick P, De Rycke M, Geraedts JPM, Harton G: The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. *Hum Reprod Update* 18, 234-247 (2012)

Harper PS: The epidemiology of Huntington's disease. In: Bates G, Harper P, Jones L: *Huntington's disease*. 3. Aufl., 159-197, Oxford University Press, Oxford (2002)

Harton GL, De Rycke M, Fiorentino F, Moutou C, SenGupta S, Traeger-Synodinos J, Harper JC: ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD. *Hum Reprod* 26, 33-40 (2011)

Hassold T, Chiu D: Maternal agespecific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet* 70, 11-17 (1985)

Huntington G: On Chorea. *Medical and Surgical Reporter of Philadelphia* 26, 317-321 (1872) (Nachdruck: *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 15, 109-112 (2003))

Kokkali G, Traeger-Synodinos J, Vrettou C, Stavrou D, Jones GM, Cram DS, Makrakis E, Trounson AO, Kanavakis E, Pantos K: Blastocyst biopsy versus cleavage stage biopsy and blastocyst transfer for preimplantation genetic diagnosis of  $\beta$ -thalassaemia: a pilot study. *Hum Reprod* 22, 1443-1449 (2007)

Kollek R: Präimplantationsdiagnostik. *Huntington-Kurier* 2, 11-14 (2000)

Landgericht Berlin: Freispruch eines Arztes nach Anklage wegen Vergehens gegen Embryonenschutzgesetz. Pressemitteilung Nr. 26/2009 (2009) Onlinedokument, URL: <http://www.berlin.de/sen/justiz/gerichte/kg/presse/archiv/20090514.1745.127943.html> (Tag des Zugriffs: 04.08.2013)

Liebaers I, Desmyttere S, Verpoest W, De Rycke M, Staessen C, Sermon K, Devroey P, Haentjens P, Bonduelle M: Report on a consecutive series of 581 children born after blastomere biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 25, 275-282 (2010)

Liu J, Lissens W, Silber SJ, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A: Birth after preimplantation diagnosis of the cystic fibrosis delta F508 mutation by polymerase chain reaction in human embryos resulting from intracytoplasmic sperm injection with epididymal sperm. *JAMA* 272, 1858-1860 (1994)

Lubs HA: A Marker X Chromosome. *Am J Hum Genet* 21, 231-244 (1969)

Malcov M, Naiman T, Yosef DB, Carmon A, Mey-Raz N, Amit A, Vagman I, Yaron Y: Preimplantation genetic diagnosis for fragile X syndrome using multiplex nested PCR. *Reprod Biomed Online* 14, 515-521 (2007)

Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer MLI, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM: Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437, 376-380 (2005)

Martin JP, Bell J: A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *J Neurol Psychiatry* 6, 154-157 (1943)

Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, Vogel NE, Arts EG, de Vries JW, Bossuyt PM, Buys CH, Heineman MJ, Repping S, van der Veen F: In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med* 357, 9-17 (2007)

Milà M, Castellví-Bel S, Sánchez A, Barceló A, Badenas C, Mallolas J, Estivill X: Rare variants in the promoter of the fragile X syndrome gene (FMR1). *Mol Cell Probes* 14, 115-119 (2000)

Montag M, Isachenko E, van der Ven K, Dorn C, Isachenko V, van der Ven H: Technischer und zeitlicher Ablauf der Polkörperpräparation mit anschließender Aneuploidiediagnostik. *medgen* 16, 404-407 (2004)

Moutou C, Gardes N, Viville S: New tools for preimplantation genetic diagnosis of Huntington's disease and their clinical applications. *Eur J Hum Genet* 12, 1007-1014 (2004)

Munne S, Weier HUG, Grifo J, Cohen J: Chromosome Mosaicism in Human Embryos. *Biol Reprod* 51, 373-379 (1994)

Munne S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J, Cohen J: The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod* 10, 1014-1020 (1995)

Munne S, Scott R, Sable D, Cohen J: First Pregnancies After Preconception Diagnosis of Translocations of Maternal Origin. *Fertil Steril* 69, 675-681 (1998)

Nakamoto M, Nalavadi V, Epstein MP, Narayanan U, Bassell GJ, Warren ST: Fragile X mental retardation protein deficiency leads to excessive mGluR5-dependent internalization of AMPA receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 15537-15542 (2007)

Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, Houck GE Jr., Gargano AD, Sullivan A, Biancalana V, Bröndum-Nielsen K, Hjalgrim H, Holinski-Feder E, Kooy F, Longshore J, Macpherson J, Mandel JL, Matthijs G, Rousseau F, Steinbach P, Väisänen ML, von Koskull H, Sherman SL: Expansion of the Fragile X CGG Repeat in Females with Premutation or Intermediate Alleles. *Am J Hum Genet* 72, 454-464 (2003)

PAA, The Cell Culture Company: LSM 1077 Handout German, Onlinedokument, URL: <http://www.paa.com/download/brochures/lymphocyteseperationmedium.html> (Tag des Zugriffs: 7.3.2013)

Piyamongkol W, Harper JC, Sherlock JK, Doshi A, Serhal PF, Delhanty JD, Wells D: A successful strategy for preimplantation genetic diagnosis of myotonic dystrophy using multiplex fluorescent PCR. *Prenat Diagn* 21, 223-232 (2001)

Piyamongkol W, Bermúdez MG, Harper JC, Wells D: Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* 9, 411-420 (2003)

Ray PF, Handyside AH: Increasing the denaturation temperature during the first cycles of amplification reduces allele dropout from single cells for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* 2, 213-218 (1996)

Reiner A, Albin RL, Anderson KD, D'Amato CJ, Penney JB, Young AB: Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 5733-5737 (1988)

Riess O, Noerremoelle A, Soerensen SA, Epplen JT: Improved PCR conditions for the stretch of (CAG)<sub>n</sub> repeats causing Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 2, 637 (1993)

Roos RAC: Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet J Rare Dis* 5 (2010) Onlinedokument, URL: <http://www.ajrd.com/content/5/1/40> (Tag des Zugriffs: 04.08.2013)

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467 (1977)

Schuster SC: Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature Methods* 5, 16-18 (2008)

Schwinger E, Ludwig M, Tomi D, Diedrich K: Präimplantationsdiagnostik. In: Ganten D, Ruckpaul K, Wauer RR: *Molekularmedizinische Grundlagen von fetalen und neonatalen Erkrankungen*. 1. Aufl., 97-120, Springer, Berlin (2005)

Sermon K, Seneca S, Vanderfaeillie A, Lissens W, Joris H, Vandervorst M, Van Steirteghem A, Liebaers I: Preimplantation diagnosis for fragile X syndrome based on the detection of the non-expanded paternal and maternal CGG. *Prenat Diagn* 19, 1223-1230 (1999)

Sermon K, De Rijcke M, Lissens W, De Vos A, Platteau P, Bonduelle M, Devroey P, Van Sterteghem A, Liebaers I: Preimplantation genetic diagnosis for Huntington's disease with exclusion testing. *Eur J Hum Genet* 10, 591-598 (2002)

Sermon K, De Rycke M: Single Cell Polymerase Chain Reaction for PGD: Methods, Strategies and Limitations. In: Thornhill A: Single Cell Diagnostics – Methods and Protocols. *Methods in Molecular Medicine* 132, 31-42, Humana Press, Totowa (2007)

Snow K, Doud LK, Hagerman R, Pergolizzi RG, Erster SH, Thibodeau SN: Analysis of a CGG Sequence at the FMR-I Locus in Fragile X Families and in the General Population. *Am J Hum Genet* 53, 1217-1228 (1993)

Steinbach D, Steinbach P: Fragiles-X-Syndrom: Störung synaptischer Plastizität mit Hoffnung auf Heilung. *medgen* 18, 182-186 (2006)

Steinbach P, Gläser D: Leitlinien zur molekulargenetischen Diagnostik: Fragiles-X und Fragiles-X assoziiertes Tremor/Ataxie Syndrom. *medgen* 21, 276-283 (2009)

Strom CM, Levin R, Strom S, Masciangelo C, Kuliev A, Verlinsky Y: Neonatal Outcome of Preimplantation Genetic Diagnosis by Polar Body Removal: The First 109 Infants. *Pediatrics* 106, 650-653 (2000)

Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, Pieretti M, Caskey CT, Saxe D, Warren ST: DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 1, 397-400 (1992)

The Huntington's Disease Collaborative Research Group: A Novel Gene Containing a Trinucleotide Repeat That Is Expanded and Unstable on Huntington's Disease Chromosomes. *Cell* 72, 971-963 (1993)

Thornhill AR, McGrath JA, Eady RAJ, Braude PR, Handyside AH: A comparison of different lysis buffers to assess allele dropout from single cells for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 21, 490-497 (2001)

Thornhill AR, de Die-Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC, Harton GL, Lavery SA, Moutou C, Robinson MD, Schmutzler AG, Scriven PN, Sermon KD: ESHRE PGD Consortium Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic screening (PGS). *Hum Reprod* 20, 35-48 (2005)

Treff NR, Fedick A, Tao X, Devkota B, Taylor D, Scott RT: Evaluation of targeted next-generation sequencing-based preimplantation genetic diagnosis of monogenic disease. *Fertil Steril* 99, 1377-1384 (2013)

Tsafir A, Altarescu G, Margalioth E, Brooks B, Renbaum P, Levy-Lahad E, Rabinowitz R, Varshaver I, Eldar-Geva T: PGD for fragile X syndrome: ovarian function is the main determinant of success. *Hum Reprod* 25, 2629-2636 (2010)

van der Ven K, Montag M, van der Ven H: Polkörperdiagnostik – ein Schritt in die richtige Richtung? *Dtsch Arztebl* 105, 190-196 (2008)

Vandervorst M, Liebaers I, Sermon K, Staessen C, De Vos A, Van de Velde H, Van Assche E, Joris H, Van Steirteghem A, Devroey P: Successful preimplantation genetic diagnosis is related to the number of available cumulus-oocyte complexes. *Hum Reprod*. 13, 3169-3176 (1998)

Van Rij MC, De Rademaeker M, Moutou C, Dreesen JCFM, De Rycke M, Liebaers I, Geraedts JMP, De Die-Smulders C, Viville S: Preimplantation genetic diagnosis (PGD) for Huntington's disease: the experience of three European centres. *Eur J Hum Genet* 20, 368-375 (2012)

Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP, Eussen BE, van Ommen GJB, Blonden LAJ, Riggins GJ, Chastain JL, Kunst CB, Galjaard H, Caskey CT, Nelson DL, Oostra BA, Warren ST: Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65, 905-914 (1991)

Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM: Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod* 5, 826-829 (1990)

Verlinsky Y, Rechitsky S, Evsikov S, White M, Cieslak J, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM: Preconception and preimplantation diagnosis for cystic fibrosis. *Prenat Diagn* 12, 103-110 (1992)

Verlinsky Y, Rechitsky S, Schoolcraft W, Strom C, Kuliev A: Preimplantation diagnosis for Fanconi anemia combined with HLA matching. *JAMA* 285, 3130-3133 (2001)

Verlinsky Y, Rechitsky S, Verlinsky O, Kenigsberg D, Moshella J, Ivakhnenko V, Masciangelo C, Strom C, Kuliev A: Polar body-based preimplantation diagnosis for X-linked disorders. *Reprod Biomed Online* 4, 38-42 (2002)

Verlinsky Y, Rechitsky S, Sharapova T, Morris R, Taranissi M, Kuliev A: Preimplantation HLA testing. *JAMA* 291, 2079-2085 (2004)

Warner JP, Barron LH, Brock DJ: A new polymerase chain reaction (PCR) assay for the trinucleotide repeat that is unstable and expanded on Huntington's disease chromosomes. *Mol Cell Probes* 7, 235-239 (1993)

Wilton L, Thornhill A, Traeger-Synodinos J, Sermon KD, Harper JC: The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD. *Hum Reprod* 24, 1221-1228 (2009)

Wittenberger MD, Hagerman RJ, Sherman SL, McConkie-Rosell A, Welt CK, Rebar RW, Corrigan EC, Simpson JL, Nelson LM: The FMR1 premutation and reproduction. *Fertil Steril* 87, 456-465 (2007)

Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, Reijo Pera RA: Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 28, 1115-1121 (2010)

Zühlke C, Thies U: Chorea Huntington: Molekulargenetische Grundlagen, Mutationsnachweis und prädiktive Diagnostik. *Nervenarzt* 67, 25-35 (1996)

## 7 Anhänge

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

#### Allgemein

6-FAM	6-Carboxy-Fluorescein
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADO	<i>engl: Allele Dropout</i>
AMPA	<i>engl: <math>\alpha</math>-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
Aqua dest.	Aqua destillata
BGH	Bundesgerichtshof
BSA	<i>engl: Bovine Serum Albumine</i>
C	Cytosin
CGH	<i>engl: Comparative Genomic Hybridization</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>engl: Desoxyribonukleinacid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESchG	Embryonenschutzgesetz
ESHRE	<i>engl: European Society of Human Reproduction and Embryology</i>
FACS	<i>engl: Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
<i>FMR1</i>	<i>engl: Fragile X mental retardation 1</i>
FMRP	<i>engl: Fragile X mental retardation 1 protein</i>
FSC	<i>engl: Forward Scatter</i>
FraX	Fragiles X-Syndrom
FXTAS	Fragiles-X assoziiertes Tremor/Ataxie Syndrom
G	Guanin
HEX	Hexachloro-6-Carboxy-Fluorescein
HD	<i>engl: Huntington's disease</i>
HIDI	<i>engl: highly deionized</i>
HLA	<i>engl: Human Leukocyte Antigen</i>
HPLC	<i>engl: High Performance Liquid Chromatography</i>

---

HTT	<i>engl: Huntingtin</i>
ICSI	Intracytoplasmatische Spermieninjektion
IVF	<i>In-vitro-Fertilisation</i>
LSM	<i>engl: Lymphocyte Separation Medium</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
NGS	<i>engl: Next Generation Sequencing</i>
PBS	<i>engl: Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>engl: Polymerase Chain Reaction</i>
PID	Präimplantationsdiagnostik
PIDV	Präimplantationsdiagnostikverordnung
PKD	Polkörperdiagnostik
PBMC	<i>engl: Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
POI	Prämatüre Ovarialinsuffizienz
SNP	<i>engl: Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSC	<i>engl: Sideward Scatter</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Titriplex	Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat
tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UCSC	<i>engl: University of California, Santa Cruz</i>
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
WGA	<i>engl: Whole Genome Amplification</i>

**Maßeinheiten**

b	Basen
bp	Basenpaare
°C	Temperaturangabe in Grad Celsius
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
l	Liter
M	Molarität (mol/l)
min	Minute
mol	Mol (Stoffmengeneinheit, 1 mol = $6,022 \times 10^{23}$ Teilchen)
s	Sekunde
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
V	Volt

**Vorsätze**

M	Mega	( $10^6$ )
k	Kilo	( $10^3$ )
m	Milli	( $10^{-3}$ )
μ	Mikro	( $10^{-6}$ )
n	Nano	( $10^{-9}$ )
p	Piko	( $10^{-12}$ )

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b>	Schema der Mikrosatelliten-Marker.....	15
<b>Abb. 2:</b>	Prinzip der Kopplungsanalyse .....	16
<b>Abb. 3:</b>	Stammbaum der Familie A mit Chorea Huntington .....	24
<b>Abb. 4:</b>	Stammbaum der Familie B mit Fragilem X-Syndrom.....	25
<b>Abb. 5:</b>	Schematische Darstellung von a) Multiplex- und b) Seminested-PCR .....	29
<b>Abb. 6:</b>	Lokalisation der Primer nach Riess et al. (1993) und Warner et al. (1993).....	30
<b>Abb. 7:</b>	Auftrennung der verschiedenen Zelltypen des Blutes nach Dichtegradientenzentrifugation mit LSM .....	35
<b>Abb. 8:</b>	Dotplot der Verteilung unterschiedlicher Zelltypen einer Zellsuspension nach Durchflusszytometrie.....	37
<b>Abb. 9:</b>	Schema der Schritte bei der Etablierung einer PID .....	39
<b>Abb. 10:</b>	Gelelektrophorese der das <i>HTT</i> -Gen flankierenden Mikrosatelliten-Marker an genomischer DNA mit Multiplex-Primern .....	41
<b>Abb. 11:</b>	Kapillarelektrophorese des Markers HD-C2 von dem Ratsuchenden sowie seiner Ehefrau und seiner Mutter .....	43
<b>Abb. 12:</b>	Kapillarelektrophorese des Markers HD-L von dem Ratsuchenden sowie seiner Ehefrau und seiner Mutter .....	44
<b>Abb. 13:</b>	Haplotypen für die repetitive CAG-Sequenz im <i>HTT</i> -Gen und sieben gekoppelte Marker der Familie A und der möglichen gemeinsamen Nachkommen.....	45
<b>Abb. 14:</b>	Fragmentlängenanalyse des CAG-Repeats des Ratsuchenden und seiner Ehefrau nach PCR nach Warner et al. (1993) .....	46
<b>Abb. 15:</b>	Fragmentlängenanalyse des Markers D4S127 des Ratsuchenden und seiner Ehefrau nach a) einfacher PCR und b) Multiplex-Seminested-PCR.....	48
<b>Abb. 16:</b>	Gelelektrophorese der Seminested-PCR der Mikrosatelliten-Marker D4S127, HD-K, HD-A, HD-C2 auf Einzelzellebene.....	50
<b>Abb. 17:</b>	Fragmentlängenanalyse des Markers D4S127 des Ratsuchenden und seiner Ehefrau.....	51
<b>Abb. 18:</b>	Fragmentlängenanalyse des Markers HD-A des Ratsuchenden und seiner Ehefrau.....	51

---

<b>Abb. 19:</b> Fragmentlängenanalyse des Markers HD-K des Ratsuchenden und seiner Ehefrau .....	52
<b>Abb. 20:</b> Fragmentlängenanalyse des Markers HD-C2 des Ratsuchenden und seiner Ehefrau .....	52
<b>Abb. 21:</b> Fragmentlängenanalyse des Markers HD-A von der Ehefrau des Ratsuchenden ohne und mit ADO .....	53
<b>Abb. 22:</b> Fragmentlängenanalyse des Markers HD-K von dem Ratsuchenden ohne und mit ADO .....	53
<b>Abb. 23:</b> Gelelektrophorese der das <i>FMR1</i> -Gen flankierenden Mikrosatelliten-Marker an genomischer DNA mit Multiplex-Primern .....	56
<b>Abb. 24:</b> Fragmentlängenanalyse des Markers 6787 von der Ratsuchenden und ihrem Ehemann nach PCR auf Einzelzellebene .....	58
<b>Abb. 25:</b> Fragmentlängenanalyse des Markers 7005 von der Ratsuchenden und ihrem Ehemann nach PCR auf Einzelzellebene .....	58
<b>Abb. 26:</b> Haplotypen für die repetitive CGG-Sequenz im <i>FMR1</i> -Gen und acht gekoppelte Marker der Familie B und der möglichen gemeinsamen Nachkommen .....	60
<b>Abb. 27:</b> Gelelektrophorese der Mikrosatelliten-Marker DXS998, FraXAC1, 7217, DXS6687 von der Ratsuchenden und ihrem Ehemann auf Einzelzellebene.....	61
<b>Abb. 28:</b> Fragmentlängenanalyse des Markers DXS998 von der Ratsuchenden und ihrem Ehemann nach PCR auf Einzelzellebene .....	62
<b>Abb. 29:</b> Fragmentlängenanalyse des Markers FraXAC1 von der Ratsuchenden und ihrem Ehemann nach PCR auf Einzelzellebene .....	62
<b>Abb. 30:</b> Fragmentlängenanalyse des Markers 7217 von der Ratsuchenden und ihrem Ehemann nach PCR auf Einzelzellebene .....	63
<b>Abb. 31:</b> Fragmentlängenanalyse des Markers DXS6687 von der Ratsuchenden und ihrem Ehemann nach PCR auf Einzelzellebene.....	63
<b>Abb. 32:</b> Kontamination in der Fragmentlängenanalyse des Markers 7217 beim Ehemann der Ratsuchenden .....	64
<b>Abb. 33:</b> Fragmentlängenanalyse des Markers DXS998 von der Ratsuchenden ohne und mit ADO .....	64
<b>Abb. 34:</b> Fragmentlängenanalyse des Markers DXS998 von dem Ehemann der Ratsuchenden ohne und mit ADO .....	65

**Abb. 35:** Interpretation der Ergebnisse der Fragmentlängenanalyse des Markers D4S127  
..... 69

### 7.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b>	Risiko der Expansion von maternalen prämutierten CGG-Repeats im <i>FMR1</i> -Gen zur Vollmutation bei Nachkommen (aus Steinbach und Gläser (2009)) .....	10
<b>Tab. 2:</b>	Diagnostik an Polkörpern, Blastomeren und Trophoblasten im Vergleich .....	14
<b>Tab. 3:</b>	Chemikalien und Reagenzien .....	17
<b>Tab. 4:</b>	Geräte und Gebrauchsartikel.....	18
<b>Tab. 5:</b>	Puffer und Medien .....	19
<b>Tab. 6:</b>	Primer für das CAG-Repeat im <i>HTT</i> -Gen (4p16.3) und flankierende Mikrosatelliten-Marker sowie deren Fragmentlänge und repetitive DNA-Sequenz.....	20
<b>Tab. 7:</b>	Primer für das <i>FMR1</i> -Gen (Xq27.3) flankierende Mikrosatelliten-Marker sowie deren Fragmentlänge und repetitive DNA-Sequenz.....	21
<b>Tab. 8:</b>	Programme und Datenbanken.....	23
<b>Tab. 9:</b>	Zusammensetzung der PCR-Ansätze zur Amplifikation der Mikrosatelliten-Marker.....	27
<b>Tab. 10:</b>	PCR-Programm zur Amplifikation der Mikrosatelliten-Marker .....	27
<b>Tab. 11:</b>	Zusammensetzung der Multiplex-PCR an genomischer DNA.....	28
<b>Tab. 12:</b>	Zusammensetzung der Multiplex-PCR an Einzelzellen .....	28
<b>Tab. 13:</b>	PCR-Programm der Multiplex-PCR.....	28
<b>Tab. 14:</b>	Zusammensetzung der Reaktionsansätze nach Warner et al. (1993) .....	30
<b>Tab. 15:</b>	PCR-Programm für die PCR nach Warner et al. (1993) .....	31
<b>Tab. 16:</b>	Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die PCR nach Riess et al. (1993)	31
<b>Tab. 17:</b>	PCR-Programm für die PCR nach Riess et al. (1993) .....	31
<b>Tab. 18:</b>	Zusammensetzung der Zellyse-Ansätze.....	38
<b>Tab. 19:</b>	Lyseprotokoll.....	38
<b>Tab. 20:</b>	Lokalisation und Polymorphismus der das <i>HTT</i> -Gen flankierenden Mikrosatelliten-Marker .....	40
<b>Tab. 21:</b>	Allelverteilung der das <i>HTT</i> -Gen flankierenden Mikrosatelliten-Marker in bp..	42
<b>Tab. 22:</b>	Anzahl der CAG-Repeats des Ratsuchenden und seiner Ehefrau nach PCR nach Riess et al. (1993) bzw. Warner et al. (1993).....	47

---

<b>Tab. 23:</b> Fragmentlängen der Marker D4S127, HD-K, HD-A, HD-C2 in bp aus den Vorversuchen und nach Seminested-PCR im Vergleich.....	49
<b>Tab. 24:</b> ADO Raten der Marker D4S127, HD-K, HD-A und HD-C2 .....	54
<b>Tab. 25:</b> Lokalisation der das <i>FMR1</i> -Gen flankierenden Mikrosatelliten-Marker .....	55
<b>Tab. 26:</b> Allelverteilung der das <i>FMR1</i> -Gen flankierenden Mikrosatelliten-Marker in bp	57
<b>Tab. 27:</b> Lokalisation der nachträglich herausgesuchten, das <i>FMR1</i> -Gen flankierenden Mikrosatelliten-Marker .....	59
<b>Tab. 28:</b> Allelverteilung der nachträglich herausgesuchten, das <i>FMR1</i> -Gen flankierenden Mikrosatelliten-Marker in bp.....	59
<b>Tab. 29:</b> Fragmentlängen der Marker DXS998, FRAXAC1, 7217, DXS6687 in bp aus den Vorversuchen und nach Seminested-PCR im Vergleich.....	61
<b>Tab. 30:</b> ADO Raten der Marker DXS998, FRAXAC1, 7217 und DXS6687 .....	65

## 8 Danksagungen

Ich möchte mich herzlich bei Frau Prof. Dr. med. Gillessen-Kaesbach bedanken, die mir durch die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Materialien die Anfertigung dieser Dissertation am Institut für Humangenetik ermöglicht hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Christine Zühlke für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung im gesamten Verlauf der Arbeit. Ihre guten Ratschläge und ihr geduldiges Lesen des Manuskripts haben mir beim Anfertigen dieser Dissertation enorm geholfen.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. rer. nat. Sabine Fondel und Frau Heike Böttger für die Einarbeitung in die molekulargenetischen Methoden, die Hilfe und Unterstützung bei jeglichen Problemen und das freundschaftliche Miteinander bedanken.

Mein Dank gilt außerdem allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für ihre Hilfsbereitschaft und das hervorragende Arbeitsklima, was erheblich dazu beigetragen hat, dass ich mich immer wohl und willkommen gefühlt habe.

Zu guter Letzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie bedanken. Ich danke meinem Vater für das gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit, meiner Mutter für die moralische Unterstützung und Entscheidungshilfe bei all meinen Problemen, meiner Schwester für das stets offene Ohr und Niklas für die liebevolle Unterstützung und Geduld in allen Lebenslagen.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Karen Heitmann  
Geburtsdatum: 11.01.1989  
Geburtsort: Hildesheim



### Schulausbildung

1995 – 1999: Grundschule Greifswalder Straße, Hildesheim  
1999 – 2008: Gymnasium Andreanum, Hildesheim  
Abschluss: Abitur  
2005 – 2006: Houston County High School, Warner Robins, Georgia, USA

### Studium

Seit 10/2008: Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck  
08/2010: 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
03/2012 – 09/2012: experimenteller Teil der Dissertation am Institut für Humangenetik der Universität zu Lübeck

Poster: Heitmann K, Hellenbroich Y, Fondel F, Gillessen-Kaesbach G, Griesinger G, Zühlke C: Nicht ohne Fehler aber ohne Chorea Huntington – Aufbau einer Präimplantationsdiagnostik. 6. Lübecker Doktorandentag, 13.06.2012. Gewinn des Posterpreises.