

medizinische genetik

Gegründet 1989 durch Jan Murken

**Elektronischer Sonderdruck für
M. Montag**

Ein Service von Springer Medizin

medgen 2011 · 23:479–484 · DOI 10.1007/s11825-011-0300-1

© Springer-Verlag 2011

zur nichtkommerziellen Nutzung auf der
privaten Homepage und Institutssite des Autors

M. Montag · B. Toth · T. Strowitzki

Polkörperdiagnostik

Numerische und strukturelle Analyse von Chromosomenaberrationen

Polkörperdiagnostik

Numerische und strukturelle Analyse von Chromosomenaberrationen

Seit der Einführung der Polkörperdiagnostik (PKD) 1989 stand diese lange Zeit im Schatten der Blastomerenbiopsie. Zum einen können mithilfe der PKD ausschließlich mütterliche strukturelle und numerische Chromosomenfehlverteilungen untersucht werden, zum anderen wurde die PKD international als ein Resultat der engen gesetzlichen Bestimmungen im Rahmen des Embryonenschutzgesetzes in Ländern wie Deutschland, Österreich und der Schweiz angesehen. Mit wenigen Ausnahmen wurde die PKD bis vor Kurzem hauptsächlich von IVF-Zentren in diesen Ländern angewandt.

Renaissance der PKD

Die Daten des Konsortiums für Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) der European Society for Human Reproduction & Embryology (ESHRE) belegen in Hinblick auf die Anzahl an durchgeführten PGD-/PGS-Behandlungszyklen den geringen Stellenwert der PKD im Vergleich zur Blastomerenbiopsie [4]. Auch wenn diese Daten nicht die internationale Realität vollständig abbilden, so lassen sie doch erkennen, dass die PKD – genauso wie die Blastomerenbiopsie – im Wesentlichen für die Aneuploidiediagnostik eingesetzt wurde und nur in geringerem Maß zum Ausschluss genetischer Erkrankungen. Da chromosomale Aneuploidien sich mehrheitlich während der Eizellreifung manifestieren, also mütterlichen Ursprungs sind, sollte eine PKD zum Nachweis einer numerischen Chromosomenaberration ausreichen. Gleiches gilt für mütterlicherseits vorliegende struktu-

relle Chromosomenaberrationen, die im Wesentlichen Translokationen umfassen. Auch hier belegt eine Vielzahl von Publikationen, dass mithilfe der PKD eine zuverlässige und umfassende Diagnostik erstellt werden kann (Übersicht bei [8]).

Die Renaissance der PKD erfolgte vor dem Hintergrund der Kritik an der Blastomerenbiopsie zum Zweck des PGS und der unbeantworteten Frage nach dem Vorteil dieses Verfahrens. Innerhalb der letzten 6 Jahre wurden weit mehr als 10 randomisierte kontrollierte Studien veröffentlicht, die allesamt belegen, dass PGS nach einer Blastomerenbiopsie in der Studiengruppe nicht zu besseren Ergebnissen führt (Übersicht bei [2]). In einigen Studien zeigten sogar die Kontrollgruppen höhere Schwangerschaftsraten. Dies führte zu der Frage, ob die Blastomerenbiopsie eine unzulängliche Methode darstellt. Einige Probleme der Blastomerenbiopsie sind heute bekannt und beinhalten die Diagnoseunsicherheit durch das Auftreten von embryonalen Mosaiken als auch die in den meisten Studien geringe Anzahl an untersuchten Chromosomen. Gleichzeitig wird diskutiert, ob ein Embryo durch die Entnahme von 1–2 Blastomeren in seiner weiteren Entwicklungs- und Implantationskompetenz direkt beeinträchtigt wird oder ob er in der Lage ist, den Verlust von 1–2 Blastomeren auszugleichen. Aufgrund dieser Datenlage wird derzeit die Durchführung der Blastomerenbiopsie ausschließlich zum Zweck des PGS von renommierten Fachgesellschaften nicht empfohlen [5].

Als Alternative bieten sich für mütterlich bedingte numerische und struk-

turelle Chromosomenaberrationen die Polkörper(PK)-Biopsie und die Trophektodermbiopsie an. Dabei ist vom methodischen Standpunkt die PK-Biopsie als eine etablierte Technik anzusehen. Der 1. und der 2. PK entstehen im Rahmen der meiotischen Reifeteilung und haben für die weitere Entwicklung der Eizelle bzw. des Embryos keine Bedeutung. Für die Durchführung der PK-Biopsie gibt es valide Empfehlungen seitens der entsprechenden Fachgesellschaften [6].

Die Trophektodermbiopsie im Blastozystenstadium wird hingegen im größeren Umfang erst seit wenigen Jahren eingesetzt. Sie beinhaltet die Entnahme von Zellen des Trophektoderm am Tag 5 nach der Insemination und erlaubt ebenfalls einen umfassenden Rückschluss auf väterliche und mütterliche chromosomale bzw. genetische Anteile des Embryos. Trophektodermzellen sind an der Bildung der Plazenta beteiligt, während der spätere Fötus sich aus den Zellen der inneren Zellmasse entwickelt. Insofern wird bei einer Blastozystenbiopsie kein embryonales Gewebe entnommen. Es ist jedoch noch nicht endgültig geklärt, ob die bekannte Mosaikrate für frühe embryonale Teilungsstadien sich auch bei der Blastozyste auswirkt und inwieweit bzw. in welchem Ausmaß Trophektodermzellen und die innere Zellmasse betroffen sind. Ein weiterer Nachteil der Blastozystenbiopsie besteht darin, dass der Zeitpunkt der Biopsie abhängig von der fortschreitenden Ausstülpung von trophektodermalen Zellen aus der Zonöffnung ist. Insofern ist die Blastozystenbiopsie zeitaufwendig und setzt eine große Erfahrung bei der Blastozy-

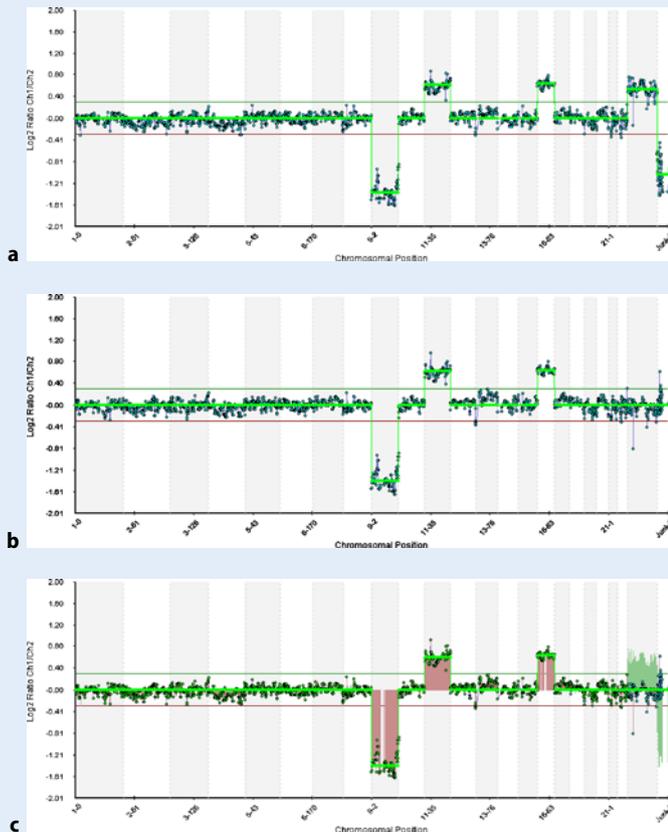


Abb. 1 ▲ Array-CGH zum Nachweis von Aneuploidien aller Chromosomen nach Polkörperbiopsie. Die Abbildung zeigt eine Single-Channel-basierte Array-CGH-Auswertung für einen Cy3-markierten 1. PK nach Intensitätsberechnung der Aneuploidie mit einer männlichen (**a**) und einer weiblichen (**b**) Referenz-DNA. Bei der softwarebasierten Auswertung werden die Farbintensitäten der Hybridisierung graphisch dargestellt. Da der 1. PK kein Y-Chromosom enthält, die männliche Kontrolle hingegen eine Kopie für Y, ist immer ein Verlust für Y zu erwarten und dies dient als erste interne Kontrolle (**a**). Im Vergleich zu einer weiblichen Referenz (**b**) sind bei einem für X und Y euploiden Chromosomensatz kein Zugewinn für X und kein Verlust für Y zu erwarten und dies dient somit als zweite interne Kontrolle. Daneben können in beiden Referenzberechnungen ein Verlust für Chromosom 9 und ein Zugewinn für Chromosom 11 und 16 beobachtet werden. Aufgrund der Höhe der Intensitätsunterschiede handelt es sich bei Chromosom 9 um den Verlust von 2 Chromatiden und bei dem Zugewinn der Chromosomen 11 und 16 jeweils um eine Chromatide. Die graphische Zusammenfassung der Aneuploidiediagnostik für beide Experimente ist in (**c**) gezeigt

stenkultur und bei der Biopsietechnik voraus.

Gegenwärtiger Stand der PKD

Numerische Chromosomenaberrationen

Mehrheitlich wird derzeit noch die Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) für die Aneuploidiediagnostik eingesetzt. Die Aussagekraft der herkömmlichen FISH-Technik ist bezogen

auf die Anzahl der zu untersuchenden Chromosomen stark eingeschränkt durch die geringe Anzahl von Fluoreszenzfarben und die begrenzte Verfügbarkeit von markierten Chromosomensonden. Unter optimalen Bedingungen können 2–3 Hybridisierungsrounds mit unterschiedlichen Chromosomensonden durchgeführt werden, was die Analyse von 12–15 Chromosomen ermöglicht. Da jedoch die Hybridisierungseffizienz nach jeder Rehybridisierung deutlich geringer wird, ist eine zuverlässige Auswertung erschwert [10].

Array-CGH

Die Untersuchung aller Chromosomen wird derzeit am besten durch die sog. Array-CGH gewährleistet. Eine wesentliche Voraussetzung für die Durchführung der CGH ist eine ausreichende Menge an DNA, die durch eine Amplifikation der ursprünglich in einer Zelle (Polkörper) vorhandenen DNA gewonnen wird. Das ursprüngliche Prinzip der PKD-Array-CGH bestand darin, dass die amplifizierte Test-DNA (1. oder 2. PK) mit einem definierten Fluoreszenzfarbstoff markiert und mit einer männlichen Referenz-DNA gegen chromosomenspezifische BAC-Klonen kohybridisiert wurden. Ein neueres Verfahren basiert auf der Kohybridisierung von der mit einem Farbstoff 1 markierten DNA des 1. PK und der mit einem anderen Farbstoff 2 markierten DNA des 2. PK auf dem selben Array. Zur Berechnung der Aneuploidierate werden 2 Referenzhybridisierungen mit einer markierten männlichen und weiblichen Referenz-DNA (Farbstoff 1/2 vs. Farbstoff 2/1 und umgekehrt) durchgeführt. Mithilfe einer speziellen Software wird für jeden PK sowohl die männliche als auch die weibliche Referenz-DNA zur Berechnung verwendet. Dies ermöglicht sehr exakte Aneuploidieberechnungen zur Unterscheidung von Chromatiden oder Chromosomenaberrationen als auch eine bessere Aneuploidiediagnostik für die Geschlechtschromosomen (■ **Abb. 1**).

ESHRE-PGS-Pilotstudie

Die ESHRE hat 2008 eine Arbeitsgruppe zu dem Themenbereich PGS gegründet. Diese hatte zur Aufgabe, die Möglichkeiten zur Durchführung einer multizentrischen Studie zur Aneuploidietestung zu eruieren und eine solche Studie zu initiieren. Dabei wurde die PK-Biopsie gegenüber der Trophektodermbiopsie favorisiert und gleichzeitig wurde die Untersuchung aller Chromosomen mithilfe der Array-CGH angestrebt [2].

Die Machbarkeit eines solchen Vorgehens wurde in einer Pilotstudie an einem privaten Kinderwunschzentrum in Italien (SISMER, Bologna) und an einem universitären Zentrum in Deutschland (UFK Bonn) evaluiert. Im Rahmen der Pilotstudie wurde bei allen reifen Metaphase-II-Eizellen nach ICSI der 1. und 2. PK biop-

sirt und beide wurden separat mittels der Array-CGH analysiert. Wenn einer oder beide PK aneuploid waren, wurde die korrespondierende Eizelle ebenfalls mithilfe der Array-CGH Methode im jeweils anderen Zentrum und ohne Kenntnis der Ergebnisse der PK-Diagnostik im Sinne einer Konkordanzanalyse untersucht [3]. Die Ergebnisse belegten bei einem mittleren mütterlichen Alter von 40,0 Jahren und nach Untersuchung aller Chromosomen eine Eizellaneuploidierate von 72%. In 45% der Behandlungszyklen waren alle Eizellen aneuploid, sodass kein Transfer durchgeführt werden konnte. Bei den Behandlungszyklen mit Embryotransfer wurde eine klinische Schwangerschaftsrate von 30% erreicht. Die Konkordanzanalyse ergab eine 94%ige Übereinstimmung der Ergebnisse für die PK mit der korrespondierenden Eizelle [3, 7].

Die Pilotstudie erbrachte zwei wesentliche Ergebnisse, die für die weitere Anwendung der PKD von größter Bedeutung sind. Zum einen wurde sowohl im 1. PK als auch im 2. PK bei Untersuchung aller Chromosomen eine hohe Aneuploidierate nachgewiesen. Dies belegt die Notwendigkeit, für eine umfassende PKD beide PK zu biopsieren und zu analysieren. Zum anderen ergab eine vergleichende Auswertung der Array-CGH-Ergebnisse gegenüber der konventionellen FISH mit PKD (Chromosomen 13, 16, 18, 21 und 22), dass die Hälfte aller Aneuploidien mit 5 Sonden nicht detektiert wurden. Dies bedeutet, dass bei der herkömmlichen 5-Sonden-FISH-Diagnostik etwa die Hälfte aller transferierten Embryonen unerkannt aneuploid ist.

Auf der Basis der Daten der Pilotstudie wurde seitens der ESHRE für PGS inzwischen eine Strategie für eine multizentrische, prospektiv randomisierte Studie ausgearbeitet. Diese Studie wird derzeit an 6 europäischen Zentren vorbereitet und soll letztlich die Frage beantworten, ob die Aneuploidiediagnostik mithilfe der PKD und bei Untersuchung aller Chromosomen mittels der Array-CGH bei der Behandlung von Kinderwunschpatienten mit definierten Indikationen (erhöhtes mütterliches Alter) von Vorteil ist.

medgen 2011 · 23:479–484 DOI 10.1007/s11825-011-0300-1
© Springer-Verlag 2011

M. Montag · B. Toth · T. Strowitzki

Polkörperdiagnostik. Numerische und strukturelle Analyse von Chromosomenaberrationen

Zusammenfassung

Das derzeitige Haupteinsatzgebiet der Polkörperdiagnostik (PKD) ist die Untersuchung von strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen in Eizellen nach In-vitro-Fertilisation (IVF) oder intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI). Nach der mechanischen oder laserassistierten Biopsie des 1. und 2. Polkörpers gelingt die Darstellung struktureller und/oder numerischer Fehlverteilungen aller Chromosomen durch die komparative genomische Hybridisierung (CGH) mit Arrays. Die methodischen Besonderheiten und die technischen Anforderungen der Array-CGH-basierten PKD sind evaluiert. Optimierte Protokolle stehen für

den Einsatz in der klinischen Routine zur Verfügung. Der Vorteil der PKD für die Detektion struktureller Chromosomenaberrationen ist offensichtlich. Unbeantwortet ist hingegen immer noch die Frage nach einem Vorteil des genetischen Screenings vor der Implantation („preimplantation genetic screening“, PGS). Hierzu wurde eine multizentrische Studie auf der Basis von PKD und Array-CGH auf den Weg gebracht.

Schlüsselwörter

Polkörperbiopsie · Array-CGH · Chromosomale Translokation · Aneuploidie · Präimplantationsdiagnostik

Polar body diagnosis. Numerical and structural analysis of chromosomal aberrations

Abstract

At present the main application of polar body diagnosis is the investigation of structural and numerical chromosomal aberrations in oocytes following in-vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI). After mechanical or laser-assisted polar body biopsy structural and/or numerical aneuploidies for all chromosomes can be detected by comparative genomic hybridization (CGH) and microarrays. The methodological as well as technical requirements of polar body diagnosis and array-CGH have been elaborated and optimized protocols for the application of these techniques in daily clinical routine

are available. The benefits offered by the investigation of structural aberrations are clear. However, whether preimplantation genetic screening of numerical chromosomal aneuploidies will offer a benefit for the patient remains unclear. In order to answer this question, a multicenter study has been initiated.

Keywords

Polar body biopsy · Array comparative genomic hybridization · Chromosomal translocation · Aneuploidy · Preimplantation diagnosis

Strukturelle Chromosomenaberrationen

Paare, bei denen einer der Partner eine strukturelle Chromosomenaberration aufweist, haben im Fall einer Schwangerschaft ein hohes Abortrisiko [4]. Zu den strukturellen Chromosomenaberrationen gehören neben den Inversionen oder Duplikationen von Chromosomenabschnitten im Wesentlichen die reziproken und die Robertson-Translokationen.

Der erfolgreiche Einsatz der PK-Biopsie mit anschließender FISH-basierter Diagnostik bei Vorliegen einer balancierten Translokation der Frau wurde bereits in mehreren Untersuchungen dokumentiert [9]. Nach PDK sind in der Regel nur 10% der entstehenden Eizellen normal oder balanciert und nur diese Eizellen stehen für eine erfolgreiche Behandlung zur Verfügung. Die anderen Eizellen sind bezüglich der an der Translokation beteiligten Chromosomen unbalanciert, d. h. dass sie eine Chromosomenfehlverteilung aufweisen. Es wird zudem diskutiert, dass das Vorliegen einer Translokation den regelrechten Ablauf der Meiose stört und zusätzliche numerische Chromosomenfehlverteilungen auftreten können. Somit eignet sich insbesondere bei Translokationen der Einsatz der Array-CGH, da neben der Untersuchung translokationsbedingter Aneuploidien der gleichzeitige Nachweis von numerischen Chromosomenaberrationen durchgeführt werden kann. Damit eröffnet die Array-CGH auch für die strukturellen Chromosomenaberrationen neue diagnostische Möglichkeiten. Dieses Vorgehen scheint jedoch nur dann sinnvoll, wenn eine ausreichende Anzahl an BAC-Klonen zur Verfügung steht, die die an der Translokation beteiligten distalen Chromosomenabschnitte spezifisch detektieren (PKD: 8; Embryo: 1). Eizellen mit unbalancierten Chromosomenaberrationen oder mit anderen chromosomalen Fehlverteilungen können somit frühzeitig erkannt werden. Ist der Mann Träger einer Translokation, so kann der Embryo mittels PKD nicht untersucht werden.

Fazit für die Praxis

- Die Untersuchung von strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen mithilfe der PKD ist derzeit auch im internationalen Kontext eine anerkannte Technik.
- Eine hohe Aussagekraft der PKD ist nur bei der Untersuchung beider Polkörper gegeben.
- Eine weitere Vorbedingung ist die methodische Durchführung gemäß etablierten und publizierten Protokollen.
- Für numerische Chromosomenaberrationen ist der Einsatz der Array-CGH zur Untersuchung aller Chromosomen von Vorteil.
- Neue Verfahren der Array-CGH ermöglichen eine Reduktion der Kosten bei verbesserter diagnostischer Aussage.
- Die Wertigkeit der Aneuploidiediagnostik ist hingegen noch umstritten.
- Eine entsprechende prospektive randomisierte Studie wird derzeit in mehreren europäischen Zentren durchgeführt.
- Zur Untersuchung struktureller Chromosomenaberrationen kann bei vorliegenden Aberrationen der Einsatz der Array-CGH durchaus sinnvoll sein, insbesondere insoweit, als damit gleichzeitig eine Aneuploidiediagnostik für alle Chromosomen möglich ist.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. M. Montag

Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Fertilitätsstörungen
Universitäts-Frauenklinik Heidelberg
Voßstr. 9, 69115 Heidelberg
markus.montag@med.uni-heidelberg.de

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S et al (2011) PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. Hum Reprod 26:1925–1935
2. Geraedts J, Collins J, Gianaroli L et al (2010) What next for preimplantation genetic screening? A polar body approach! Hum Reprod 25:575–577

3. Geraedts J, Montag M, Magli MC et al (2011) Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. I Clinical results. Hum Reprod (in press)
4. Harper JC, Coonen E, De Rycke M et al (2010a) ESHRE PGD consortium data collection X: cycles from January to December 2007 with pregnancy follow-up to October 2008. Hum Reprod 25:2685–2707
5. Harper J, Coonen E, De Rycke M et al (2010b) What next for preimplantation genetic screening (PGS)? A position statement from the ESHRE PGD Consortium Steering Committee. Hum Reprod 25:821–823
6. Harton GL, Magli MC, Lundin K et al (2011) ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group – best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). Hum Reprod 26:41–46
7. Magli C, Montag M, Köster M et al (2011) Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte II. Technical aspects. Hum Reprod (in press)
8. Montag M, Köster K, Ven K van der et al (2010) Kombinierte Translokations- und Aneuploidieuntersuchungen nach Polkörperbiopsie und array-Comparative Genomic Hybridisation. J Reproduktionsmed Endokrinol 6:498–502
9. Munné S, Sandalinas M, Escudero T et al (2000) Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. Fertil Steril 73:1209–1218
10. Munné S (2009) Preimplantation genetic diagnosis for infertility (preimplantation genetic screening). In: Harper J (Hrsg) Preimplantation genetic diagnosis, 2. Aufl. Cambridge University Press, Cambridge, S 203–209

Hier steht eine Anzeige.



Hier steht eine Anzeige.

