

Masterarbeit

**METHODIK, AKTUELLE TECHNIKEN UND
FORTSCHRITTE IN DER PRÄFERTILISATIONS-
UND PRÄIMPLANTATIONS-DIAGNOSTIK**

eingereicht von

Dr.med.univ. Peter Fillaus, MHE

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science (MSc)

in medizinischer Genetik

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt im Rahmen des

Universitätslehrgangs Master of Science in med. Genetik

unter der Anleitung von

ao.Univ.-Prof. Mag. Dr.rer.nat. Dr.scient.med. Erwin Petek

Graz, am 11.10.2020

Eidesstattliche Erklärung

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

Graz, am 11.10.2020

Dr.med.univ. Peter Fillaus, MHE eh

Danksagungen

An erster Stelle möchte ich mich insbesondere bei meinem Masterarbeitsbetreuer Herrn ao.Univ.-Prof. Mag.Dr.rer.nat. Dr.scient.med. Erwin Petek für die fortwährende Unterstützung und Begleitung meiner Studien und Abschlussarbeiten an der Medizinischen Universität Graz bedanken. Ebenfalls gebührt mein Dank dem Lehrgangsteam des Universitätslehrgangs Master of Science in medizinischer Genetik für die stetige Hilfsbereitschaft und geduldige Betreuung.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei all meinen Freunden, welche mich meine Studienzeit über begleitet und unterstützt sowie mir Motivation gegeben haben.

Vor allem möchte ich mich jedoch bei meinen Eltern bedanken, welche keine Mühen gescheut haben, um mir meine umfangreiche Ausbildung zu ermöglichen, mich stets mit allen Mitteln unterstützt haben und mir mein Leben lang zur Seite gestanden sind.

Zusammenfassung

Hintergrund: Aufgrund mittlerweile mehr als 10 Prozent an ungewollt kinderlosen Paaren im reproduktionsfähigen Alter sowie stets steigender Prävalenz von Infertilität aufgrund gesellschaftlicher und lebensstilbedingter Einflüsse spielt die Weiterentwicklung und Verbesserung von Verfahren der Präfertilisations- und Präimplantationsdiagnostik eine zunehmende Rolle. Diese Masterarbeit soll durch Darstellung aktueller sowie zukünftiger Entwicklungen der analytischen Verfahren sowie Gegenüberstellung und Diskussion der Indikationen, Problemstellungen sowie Vor- und Nachteile einen Überblick über den Stand der Wissenschaft geben.

Methode: Im Rahmen einer ausführlichen, systematischen Literaturrecherche werden rezente Erkenntnisse und Empfehlungen zu Verfahren der Präfertilisations- und Präimplantationsdiagnostik aufbereitet, die verschiedenen Methoden gegenübergestellt und neuste Entwicklungen bzw. entsprechende Tendenzen aufgezeigt und im Rahmen dieser Arbeit diskutiert.

Ergebnisse: Nicht nur langjährig als Goldstandard angepriesene Methoden der Probengewinnung wie die Blastomerenbiopsie werden heutzutage durch sicherere Verfahren der Blastozystenbiopsie bzw. nicht-invasive Methoden abgelöst, auch altgediente Analysetechniken wie die FISH, PCR oder sogar die noch relativ junge array CGH werden nach und nach durch moderne Sequenzierungsverfahren abgelöst. Die Entwicklungen gehen hin zu äußerst raschen, kosteneffektiven, allumfänglichen Techniken, welche neue Möglichkeiten und Dimensionen der Präimplantationsdiagnostik eröffnen.

Schlussfolgerung: Während sich analytische Verfahren der Reproduktionsgenetik rasant weiterentwickeln und sich sowohl Grenzen der Diagnostik als auch Verfügbarkeit und Anwendung zunehmend auflösen, rücken neue nicht-invasive Methoden zur Probengewinnung sowie höchst effektive Sequenzierungsverfahren für komplette Analysen ohne Amplifizierung und damit einhergehender Probleme binnen weniger Minuten in den Vordergrund. Gleichzeitig ergeben sich jedoch noch zu im internationalen wissenschaftlichen Kontext diskutierende Problematiken der gesteigerten Auflösungstiefe und ökonomischen Relevanz von Screeningverfahren.

Abstract

Background: With more than 10 percent of unintentionally childless couples of reproductive age and the ever increasing prevalence of infertility due to social and lifestyle-related influences, the further development and optimization of methods of prefertilization and preimplantation diagnostics is playing an increasing role. This master's thesis is intended to provide an overview of the current state of science by presenting recent and future developments of analytical techniques as well as comparing and discussing the indications, problems, advantages and disadvantages associated with these.

Method: As part of a detailed, systematic literature review, recent findings and recommendations on methods of prefertilization and preimplantation diagnosis are analyzed, the various methods compared, and the latest developments and corresponding tendencies shown as well as discussed in the context of this work.

Results: Not only are sample collection methods that have long been advertised as the gold standard, such as blastomere biopsy, being replaced by safer methods of blastocyst biopsy or non-invasive techniques, but also long-serving analysis procedures such as FISH, PCR or even the relatively young array CGH are gradually being substituted by modern sequencing methods. The developments are moving towards extremely rapid, cost-effective, comprehensive techniques which open up new possibilities and dimensions in preimplantation diagnostics.

Conclusion: While analytical procedures in reproductive genetics are developing rapidly and the limits of diagnostics as well as availability and application are increasingly dissolving, new non-invasive methods for sample collection and highly effective sequencing procedures for complete genome analyzes within a few minutes are coming to the fore. At the same time, however, there are still problems to be discussed in the international scientific context concerning the increased depth of resolution and diagnosis as well as the economic relevance of screening methods.

Inhaltsverzeichnis

Glossar und Abkürzungen	vii
Abbildungsverzeichnis.....	viii
1 Einleitung	1
1.1 Physiologie und Genetik der humanen Reproduktion	3
1.1.1 Grundlagen der Genetik.....	3
1.1.2 Gametogenese der Frau.....	4
1.1.3 Gametogenese des Mannes.....	4
1.1.4 Fertilisation und frühe Entwicklung	5
1.2 Grundlagen der In-vitro-Fertilisation.....	6
1.3 Definition reproduktionsgenetischer Diagnoseverfahren.....	8
1.3.1 Präfertilisationsdiagnostik	8
1.3.2 Präimplantationsdiagnostik	8
1.3.3 Pränataldiagnostik	9
1.4 Geschichtliche Entwicklung der Reproduktionsgenetik.....	10
1.5 Indikationen reproduktionsgenetischer Diagnoseverfahren	11
1.5.1 Numerische Chromosomenaberrationen	11
1.5.2 Strukturelle Chromosomenaberrationen	12
1.5.3 Monogenetische Erkrankungen	13
1.5.4 Immunologische und soziale Faktoren.....	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Literaturrecherche.....	16
3 Ergebnisse – Resultate	17
3.1 Probengewinnung zur reproduktionsgenetischen Diagnostik.....	18
3.1.1 Polkörperbiopsie	19
3.1.2 Blastomerenbiopsie	20
3.1.3 Blastozystenbiopsie	21
3.1.4 Minimalinvasive Blastozentese	21
3.1.5 Nichtinvasives Chromosomenscreening (NICS) aus Kulturmedien	22
3.2 Reproduktionsgenetische Diagnostikverfahren	23
3.2.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	23
3.2.2 Diagnostische Polymerasekettenreaktion (PCR)	24
3.2.3 Array-basierte komparative genomische Hybridisierung (aCGH)....	27

3.2.4	Single-Nucleotide-Polymorphism-Array (SNP-Array).....	28
3.2.5	Next Generation Sequencing (NGS).....	29
3.2.6	Third Generation Sequencing	31
3.3	Problemstellungen der Diagnostik	32
3.4	Aktuelle und zukünftige Entwicklungen	35
3.5	Rechtliche Rahmenbedingungen und Grenzen	37
3.6	Ökonomische Aspekte	39
4	Diskussion.....	40
	Literaturverzeichnis	42

Glossar und Abkürzungen

ART	Assistierte Reproduktionstechnik
ADO	Allel-Dropout
eSET	Elektiver singulärer Embryotransfer
IVF.....	In-Vitro-Fertilisation
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
PID	Präimplantationsdiagnostik
PCR.....	Polymerase-Kettenreaktion
PKD.....	Polkörperdiagnostik
PGT	Präimplantationsgenetische Testung
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
CGH	Komparative genomische Hybridisierung
aCGH	Array-basierte CGH
CNV.....	Kopienzahlvariation
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Probengewinnung zur reproduktionsgenetischen Diagnostik (11)..	18
Abbildung 2 - Methodik von SNP array, array CGH und NGS (59)	27

1 Einleitung

Mit einer stets steigenden Zahl ungewollt kinderloser Paare aufgrund reduzierter Fertilität sowie sozial induziertem Aufschub der Familiengründung in ein höheres Alter spielt die In-vitro-Fertilisation sowie damit assoziierte Maßnahmen der Präfertilisations- und Präimplantationsdiagnostik eine immer wichtiger werdende Rolle der modernen Reproduktionsmedizin. Hinzukommend unterliegen reproduktionsgenetische Verfahren aufgrund des technischen Fortschritts sowie steter Legalisierung einer gesteigerten Akzeptanz und Verfügbarkeit. (1,2)

Die Präfertilisationsdiagnostik, als Untersuchung der Eizelle vor der Befruchtung, sowie die Präimplantationsdiagnostik, als Untersuchung des Embryos vor Einpflanzung in den Uterus, stellen bereits seit einigen Jahren etablierte Verfahren zur Erkennung genetischer Defekte wie numerischer oder struktureller Chromosomenaberrationen oder auch Genmutationen bei der In-vitro-Fertilisation dar. Basierend auf entsprechenden Ergebnissen der extrakorporalen Untersuchungen, wie z.B. dem Vorliegen von Aneuploidien oder Erbkrankheiten, kann entschieden werden, ob und welcher Embryo für den Transfer verwendet wird und das größte Potential hinsichtlich Implantation und weiterer Entwicklung verfügt. (1,3)

Zyto- und molekulargenetischen Methoden wie FISH, PCR, array CGH, Next Generation Sequencing und dergleichen entwickeln sich dabei zunehmend rasant und unterliegen einem ständigen Wandel. Exponentiell ansteigende Auflösungsgrenzen sowie Diagnose- und Leistungsfähigkeiten ermöglichen es ganze Genome bei gleichzeitiger Kostenreduzierung und Steigerung der zu sequenzieren. (4)

Die vorliegende Masterarbeit soll anhand einer strukturierten Literaturrecherche klären, welche gentechnologischen Methoden der Reproduktionsmedizin in der Präfertilisations- und Präimplantationsperiode zur Verfügung stehen und wie neuste Fortschritte sowie mögliche zukünftige Entwicklungen aussehen. Der erste Teil liefert dabei einen Überblick über die Grundkenntnisse, Indikationen und die

bisherige geschichtliche Entwicklung. Im zweiten Teil werden aktuelle Methoden der Probengewinnung sowie reproduktionsgenetischen Analytik gegenübergestellt, aktuelle Problemstellungen analysiert und mögliche künftige Entwicklungen aufgezeigt. Schlussendlich werden technische und genetische Aspekte der Entwicklungstendenzen sowie die Relevanz der Verfahren diskutiert.

1.1 Physiologie und Genetik der humanen Reproduktion

Als Basis, für die im weiteren Verlauf thematisierten, reproduktionsgenetischen Verfahren, wird im Folgenden kurz und nur überblickshaft auf die Grundlagen der humanen Fortpflanzung mit speziellem Fokus auf genetische Aspekte der Gametogenese und Fertilisation sowie frühen Embryonalentwicklung eingegangen. Eine entsprechende Basis humangenetischer Kenntnisse wird im weiteren Verlauf vorausgesetzt.

1.1.1 Grundlagen der Genetik

Der menschliche Chromosomensatz besteht aus 22 homologen Autosomenpaaren sowie zwei Geschlechtschromosom (Gonosomen) und wird in dieser doppelten Ausführung mit somit 46 Chromosomen als diploider Satz bezeichnet. Ist dieser ausgeglichen, spricht man von Euploidie, fehlen hingegen Chromosomen bzw. -segmente aufgrund von z.B. Fehlverteilungen, wird dies als Aneuploidie bezeichnet. (5)

Die humanen Keimzellvorläufer durchlaufen während Ihrer Entwicklung zu reifen Keimzellen zwei Reduktionsteilung, die sogenannte 1. und 2. Meiose, wovor sich ihre Chromatide jedoch erst noch verdoppeln (Diploider Chromosomensatz mit 2 Chromatiden je Chromosom). Nach Rekombination homologer Chromosome kommt es zur ersten meiotischen Teilung und Verteilung der homologen Chromosome auf die beiden Tochterzellen, welche damit wiederum einen diploiden Chromosomensatz mit jedoch lediglich einem Chromatid pro Chromosom aufweisen und sich nicht gleichen. Im Rahmen der zweiten Reifeteilung werden nun die homologen Chromosomen auf wiederum zwei Tochterzellen aufgeteilt, welche nun nur noch einen haploiden Chromosomensatz aufweisen. Sowohl im Rahmen dieser Reduktionsteilung (Miose) als auch im Rahmen der mitotischen Teilung kann es zu Fehlverteilungen und folgend zur Entstehung von Aneuploidien kommen. (5,6)

1.1.2 Gametogenese der Frau

Bereits während der Embryonalentwicklung kommt es im Rahmen der Oogenese, der Eizellreifung, zur Bildung von Oogonien aus den Urkeimzellen, welche sich folgend zwischen drittem und siebtem Fetalmonat zu primären Oozyten weiterentwickeln und bis hin zur Ovulation während der späteren Geschlechtsreife im Stadium der Prophase der ersten meiotischen Teilung verweilen. Im Gegensatz zur Reifung männlicher Keimzellen ist das Keimzellreservoir der Frau limitiert, die Bildung von primären Oozyten ist nach der Geburt beendet, wodurch die Aneuploidiehäufigkeit in generell starker Relation zum Alter der Frau steht. (7)

Im späteren geschlechtsreifen Alter kommt es schlussendlich im Rahmen des zumeist regelmäßigen Zyklusgeschehens zur abschließenden Reifung von je ein bis zwei Oozyten. Kurz vor der Ovulation entstehen dabei aus der primären, diploiden Oozyte (46 Chromosomen) eine haploide sekundäre Oozyte mit zwei Chromatiden (23 Chromosomen) sowie ein ebenfalls haploider Polkörper mit ebenfalls zwei Chromatiden. Nach erfolgter Ovulation, etwa am 14. Zyklustag, kommt es gegebenenfalls binnen 12-24 Stunden zur Befruchtung, wobei nach Inkorporation des Spermiums die sekundäre Oozyte die 2. Reifeteilung unter Abschnürung des haploiden, mit nur einem Chromatid je Chromosom versehenen, 2. Polkörpers beendet und ein weiblicher, haploider Vorkern mit ebenso lediglich einem Chromatid pro Chromosom entsteht. (7,8)

1.1.3 Gametogenese des Mannes

Die beim Mann beständig ablaufende Spermatogenese als Entwicklung männlicher Keimzellen nimmt ihren Ursprung in der Bildung von Spermatogonien aus den Urkeimzellen. Diese Spermatogonien entwickeln sich ab der Geschlechtsreife des Mannes fortwährend bis zur Beendigung dieser im Hoden zu primären Spermatozyten, welche sich daraufhin meiotisch zu vier gleichwertigen, haploiden Spermatisden mit je einem Chromatid teilen und schlussendlich im Nebenhoden gespeichert werden. (6,9)

1.1.4 Fertilisation und frühe Entwicklung

Bei der geschlechtsreifen Frau kommt es im Rahmen des hormonell gesteuerten zyklischen Geschehens wiederholt zur Reifung einiger Primärfollikel zu Sekundärfollikeln, woraus sich schlussendlich zumeist lediglich ein reifer Tertiärfollikel entwickelt. Die darin heranreifende Oozyte schließt kurz vor der Ovulation die erste meiotische Reifeteilung ab, und entspricht ab diesem Zeitpunkt somit einer haploiden sekundären Oozyte, deren Chromosome aus je einem Chromatidenpaar bestehen. Neben der sekundären Oozyte entsteht durch die erste Reifeteilung der erste, haploide und mit Chromatidenpaaren ausgestattete Polkörper noch vor der eigentlichen Befruchtung. Mit der folgend und ebenso hormonell ausgelösten Ovulation wird die befruchtungsfähige sekundäre Oozyte um den 14. Zyklustag in den Douglas-Raum ausgestoßen und von einem Eileiter aufgenommen. (6,10)

Mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 20 bis 25 Prozent kommt es im Rahmen der natürlichen Befruchtung folgend im ampullären Anteil des Eileiters zur Penetration der Oozyte durch ein aszendiertes, gereiftes Spermium. Daraufhin beendet diese ihre zweite meiotische Reifeteilung und es folgt die Konjugation der beiden Vorkerne hin zu einer diploiden Zygote, welche sich fortan mitotisch teilt. (1,6,11)

Bereits 30 Stunden nach der Fertilisation kommt es zur ersten mitotischen Teilung und damit zur Bildung von zwei Blastomeren, welche sich bis zum dritten Tag nach der Befruchtung zur aus bereits 32 Zellen bestehenden Morula entwickeln, welche schlussendlich in das Cavum uteri gelangt. Am vierten Tag spricht man bereits von der Blastozyste, es lässt sich bereits der Embryoblast vom Trophoblasten unterscheiden. Schlussendlich kommt es zwischen 5.-6. Tag zur Initiierung der Nidation im Bereich der fundusnahen Dezidua und folgend zur weiteren Entwicklung von Plazenta, Chorion und Embryo. (6,7,10)

1.2 Grundlagen der In-vitro-Fertilisation

Diagnostische Maßnahmen der Präfertilisations- und Präimplantationsphase sind auf eine extrakorporale Anwendung im Rahmen einer künstlichen Befruchtung, der In-Vitro-Fertilisation, beschränkt. Die genetischen Analysen können diese dabei sowohl ergänzen oder bedingen. In Anbetracht reproduktionsgenetischer Diagnoseverfahren wird folgend kurz die Methodik der In-vitro-Fertilisation näher betrachtet und erläutert.

Im Rahmen der In-Vitro-Fertilisation werden bei Störungen der Reproduktionsfähigkeit eines oder beider Partner mithilfe, oder zum Teil auch ohne, hormoneller hypophysärer Stimulation multiple Follikel unter gleichzeitiger Unterdrückung der körpereigenen hormonellen Regulation in den Ovarien der Frau kontrolliert zur Reifung und schlussendlich zur Ovulation gebracht. Hierdurch wird es möglich bei nur einmaliger hormoneller Stimulation bereits multiple Oozyten zu erlangen und die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Befruchtung außerhalb des Körpers binnen eines Zyklus zu erhöhen. Zu beachten ist jedoch, dass aufgrund vorliegender ovarieller Hyperstimulation auch jene Follikel heranreifen, welche normalerweise einem natürlichen Selektionsprozess unterliegen würden. (1,6,10)

Die Oozyten werden folgend mittels transvaginaler, sonographisch unterstützter Punktion oder alternativ laparoskopisch gewonnen und nach entsprechender Aufbereitung sowie Inkubation in-vitro mit durch Masturbation bzw. mikrochirurgisch gewonnene und ebenso aufbereitete Spermatozoen extrakorporal befruchtet. Die initiale Reifung der somit gezeugten Embryonen erfolgt ebenfalls extrakorporal in einem Nährmedium bei Körpertemperatur unter steter mikroskopischer Kontrolle. Am dritten, als sogenannte Blastomere, bzw. vierten bis fünften Tag, als Blastozyste, erfolgt schlussendlich der ultraschallgestützte transzervikale Transfer eines bzw. von zwei Embryonen in die Gebärmutter. Hierbei steht heutzutage der elektive Transfer eines gesunden singulären Embryos (eSET) zur Vermeidung von Zwillingsschwangerschaften und assoziierter Komplikationen im Fokus, wobei die Präimplantationsdiagnostik eine besondere Rolle spielt. Im Falle des Vorliegens multipler geeigneter Embryonen bzw. bei möglichen Komplikationen und Verzögerung des Transfers auf den nächsten Zyklus können Embryonen zwischen

dem zweiten und fünften Entwicklungstag nach Befruchtung kryokonserviert werden. (1,2,6,12)

Wie bei allen medizinischen Eingriffen kann es auch bei der künstlichen Befruchtung zu Nebenwirkungen und Komplikationen kommen. Hierzu zählen mitunter Komplikationen durch die ovarielle Hyperstimulation, invasive Eingriffe wie Follikelpunktion oder Transfer der Embryonen, Extrauterin- und/oder Mehrlingsgravidität sowie psychische Belastungen. (6,10)

1.3 Definition reproduktionsgenetischer Diagnoseverfahren

Reproduktionsgenetische Diagnoseverfahren ermöglichen es im Rahmen einer künstlichen Befruchtung genetische Defekte zu erkennen und können entsprechend ihres Anwendungszeitpunktes hinsichtlich methodischer als auch die Fragestellung bzw. Aussagekraft betreffender Aspekte differenziert werden.

Hinzukommend sind Screeningverfahren im primär reproduktionsmedizinischen Aspekt von Diagnoseverfahren, welche bei Verdacht auf genetische Erkrankungen bzw. Veranlagungen zum Einsatz kommen, zu unterscheiden, auch wenn entsprechende Begrifflichkeiten im englischsprachigen Raum zuletzt nach Überarbeitung der geltenden Terminologie unter dem Begriff „Preimplantation Genetic Testing“ zusammengefasst werden. (3,13)

1.3.1 Präfertilisationsdiagnostik

Der Begriff der Präfertilisationsdiagnostik umfasst genetische Analysen der Keimzellen noch vor der Befruchtung. Entsprechend dem methodischen Vorgehen wird dieses Verfahren auch als Polkörperdiagnostik bezeichnet, wobei der erste und/oder zweite Polkörper noch vor Verschmelzung der Vorkerne im Rahmen einer Polkörperbiopsie entnommen und hinsichtlich genetischer Auffälligkeiten analysiert werden. Eine Analyse der männlichen Keimzelle ist im Rahmen der Präfertilisationsdiagnostik mangels Materials nicht möglich. (1,8)

1.3.2 Präimplantationsdiagnostik

Eine weitere Untersuchungsmethode im Rahmen der künstlichen Befruchtung stellt die zyto- bzw. molekulargenetische Diagnostik hinsichtlich möglicher Erbkrankheiten oder gestörter Weitergabe der Erbanlagen an der befruchteten Eizelle bzw. Embryonen unmittelbar vor der Nidation dar. Mithilfe dieses Verfahrens kann das embryonale Erbgut, und somit im Gegensatz zu Präfertilisationsdiagnostik auch unter Berücksichtigung paternaler Anteile, durch rasche und mangels Umfangs des Probenmaterials auch sehr sensitive Methoden analysiert und

schlussendlich ein zumindest genetisch vermeintlich gesunder, euploider Embryo transferiert werden. (1,3,8)

1.3.3 Pränataldiagnostik

Von den beiden bisher genannten reproduktionsgenetischen Verfahren, welche im weiteren Fokus dieser Arbeit stehen werden, sind diagnostische Maßnahmen und genetische Untersuchungen der Pränataldiagnostik abzugrenzen.

Bei der Pränataldiagnostik handelt es sich um Untersuchungen am ungeborenen, jedoch bereits in einem fortgeschrittenen Entwicklungsstadium befindlichen Föten. Neben der primär angewandten Sonographie halten insbesondere humangenetische Untersuchungsmethoden Einzug in diese noch relativ junge Disziplin. (1)

1.4 Geschichtliche Entwicklung der Reproduktionsgenetik

Bereits im Jahre 1965 gelang es dem britischen Genetiker Robert Edwards Oozyten aus humanen Ovarien zu isolieren und schlussendlich in vitro zu kultivieren sowie zu fertilisieren. Gemeinsam mit dem Gynäkologen Patrick Steptoe führte er daraufhin im Jahre 1978 die erste In-Vitro-Fertilisation einschließlich erfolgreichem Embryotransfer sowie folgender Lebendgeburt von Louise Brown als erstes Kind einer künstlichen Befruchtung durch. (14,15)

Erst im Jahre 1990 kam es schlussendlich zur ersten Lebendgeburt eines Kindes, welches zuvor erfolgreich mittels Präimplantationsdiagnostik für einen Embryotransfer durch Handyside et al selektioniert wurde. In diesem Fall handelte sich um einen Ausschluss einer x-chromosomalen Erbkrankheit, einer sozusagen medizinisch indizierten Geschlechtsselektion. 1992 wurde darauffolgend ein Kind geboren, bei welchem mittels Präimplantationsgenetik die monogenetische zystische Fibrose ausgeschlossen wurde. (16,17)

Gleichzeitig wurde im Jahr 1990 seitens Verlinsky und seinem Team die erste Präfertilisationsdiagnostik im Sinne einer Polkörperanalyse beschrieben. (18)

Nach initial zögerlicher Anwendung im Rahmen weniger Indikationen wurden mittlerweile mehr als zehntausend Kinder nach Präfertilisations- bzw. Präimplantationsdiagnostik geboren. Galten initial PCR-basierte Methoden (Polymerase-Chain-Reaction) sowie die Interphase-FISH (Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung) als Goldstandard, wurden diese nach und nach von genomweiten Analysemethoden zum Teil ersetzt. (19,20)

1.5 Indikationen reproduktionsgenetischer Diagnoseverfahren

Im Rahmen reproduktionsgenetischer Untersuchungen sind hinsichtlich Indikationen generell Paare mit bereits vorliegenden bzw. nachgewiesenen genetischen Störungen oder risikoassoziierten genetischen Konstellationen, welche eine Kinderwunschbehandlung erst im Rahmen der geplanten Präfertilisations- bzw. Präimplantationsdiagnostik in Anspruch nehmen, von jenen mit indirekten Risikofaktoren wie u.a. das maternale Alter und darauf basierendem elektivem Screening im Rahmen einer Kinderwunschbehandlung zu unterscheiden. Hinzukommend ist hinsichtlich korrekten methodischen Vorgehens eine genauere Differenzierung nach Art der erwarteten genetischen Störung zu treffen. (8,21)

Die häufigsten Behandlungsindikationen seit dem Jahr 1997 wurden seitens Konsortium für Präimplantationsdiagnostik der europäischen Gesellschaft für menschliche Fortpflanzung und Embryologie (ESHRE) erfasst und in absteigender Reihenfolge wie folgt ausgewertet: 61% Screening auf Aneuploidien, 17% monogenetische Erkrankungen, 16% angeborene Chromosomenanomalien sowie 6% geschlechtsspezifische Erkrankungen bzw. Geschlechtswahl aus sozialer Indikation. (22,23)

1.5.1 Numerische Chromosomenaberrationen

Das Aneuploidiescreening stellt die häufigste Indikation der Präimplantations- bzw. Präfertilisationsdiagnostik dar und beschreibt die genetische Analyse hinsichtlich chromosomaler Fehlverteilungen („Genommutationen“) mit einem Zugewinn (Trisomie) oder Verlust (Monosomie) eben solcher der Keimzelle bzw. Blastomere/-zyste. Aneuploidien führen häufig zu Aborten, lediglich die Trisomien der Chromosome 21 („Down-Syndrom“), 18 („Edwards-Syndrom“) oder 13 („Patau-Syndrom“) sowie die Monosomie des X-Chromosoms (Turner-Syndrom) sind mit einer Lebendgeburt vereinbar. (8,21,22)

Das Aneuploidiescreening findet insbesondere für ältere, unfruchtbare Paare sowie im Falle rezidivierender Spontanaborte bzw. erfolgloser IVF-Zyklen mit Implantationsversagen Anwendung und sollte ursprünglich neben der eigentlichen

medizinischen Indikation primär die Erfolgsraten von IVF-Behandlungen durch Selektion von Embryonen ohne numerische Aberrationen steigern, was jedoch heutzutage in einigen Studien stark in Frage gestellt wird. (8,20,24–27)

Vor Allem das maternale Alter spielt hinsichtlich Aneuploidien eine zentrale Rolle, da es aufgrund der langfristigen Exposition der Oozyten gegenüber Umwelteinflüssen mit steigendem Alter gehäuft zu meiotischen Aberrationen kommt. Bis zu 80% der heranreifenden Oozyten von Frauen über 40 Jahren sind lt. aktueller Studienlage aneuploid, womit sich die Relevanz der Polkörperdiagnostik bzw. Präfertilisationsdiagnostik nicht leugnen lässt. Aneuploidien der paternalen Gameten treten seltener und primär bei stark eingeschränktem Spermioogramm auf. (8,28–31)

Nach der Befruchtung, sozusagen post-meiotisch, kommt es ebenso seltener zu Aneuploidien, welche folgend zur Ausbildung eines sogenannten Mosaiks mit unterschiedlichen Zelllinien führen. Diese sind ebenso wie paternale Aneuploidien ausschließlich in genetischen Analysen von Blastomeren bzw. Blastozysten ersichtlich. (8,28–31)

1.5.2 Strukturelle Chromosomenaberrationen

Unter strukturellen Chromosomenaberrationen („Chromosomenmutationen“) werden Veränderungen im chromosomalen Aufbau wie Deletionen, Inversionen, Duplikationen, Insertionen oder Translokationen zusammengefasst. Im Falle von Translokationen sind insbesondere reziproke Translokationen, bei welchen distale Abschnitte zwischen nicht-homologen Chromosomen ausgetauscht werden, von Robertson-Translokationen, bei welchen es zur Fusion von zwei akrozentrischen Chromosomen unter Verlust der kurzen Arme kommt, zu unterscheiden. (21,32)

Liegt bei einem Partner eine balancierte, phänotypisch unauffällige, Translokation unter Beibehaltung sämtlicher notwendiger Informationen vor, so kommt es mit fünfzigprozentiger Wahrscheinlichkeit im Rahmen der Befruchtung zu einer unbalancierten Weitergabe der Translokation unter Verlusten von

Chromosomenabschnitten und damit einhergehenden partiellen Mono- bzw. Trisomien mit hohem Abort- bzw. Fehlbildungsrisiko. (8,21,33)

Während balancierte Translokationen nur schwer zu detektieren sind, können unbalancierte Veränderungen und damit einhergehende Mono- oder Trisomien mittels geeigneter Sonden im Rahmen der Präimplantationsdiagnostik mittels FISH oder array CGH rasch detektiert werden. Diagnostische Maßnahmen sind insbesondere bei bekannten Translokationen oder häufigen Spontanaborten indiziert. (8,21,34)

1.5.3 Monogenetische Erkrankungen

Pathologische Mutationen auf Genebene wie Deletionen, Insertionen oder Duplikationen können im Sinne von Erbkrankheiten auf nachfolgende Generationen übertragen werden und stellen dementsprechend bei gegebenen gravierenden Auswirkungen auf das künftige Leben eine klare Indikation zur genetischen Präimplantationsdiagnostik dar. Screenings ohne vorliegendes Risikoprofil hinsichtlich monogenetischer Erkrankungen eines Elternteils finden international selten Anwendung. (13,21,24)

Monogenetische Erkrankungen folgen Vererbungsmustern unabhängig der Verteilungsprozesse im Rahmen der Gametenbildung oder Fertilisation. Hierbei sind insbesondere autosomal-dominante sowie -rezessive als auch geschlechtsgebundene Erkrankungen für die Präimplantationsdiagnostik von Relevanz. Zu den autosomal-dominant vererbten Erkrankungen mit 50-prozentiger Übertragungswahrscheinlichkeit gehören unter anderem Chorea Huntington, das Charcot-Marie-Tooth-Syndrom oder die Neurofibromatose. Autosomal-rezessive Erkrankungen werden mit 25-prozentiger Wahrscheinlichkeit weitervererbt, hierzu gehören exemplarisch die Mukoviszidose, die Beta-Thalassämie oder die spinale Muskelatrophie. Bei den geschlechtsgebundenen Erkrankungen spielen insbesondere X-chromosomal vererbte Mutationen wie z.B. die Duchenne-Muskelatrophie oder Hämophilie A eine besondere Rolle als Indikation für eine medizinische Geschlechtsselektion der Embryonen. (8,21,23)

1.5.4 Immunologische und soziale Faktoren

Mittlerweile kommt die Präimplantationsdiagnostik auch zur Selektion immunkompatibler Embryonen im Sinne einer HLA-Klassifikation (Humanes-Lymphozyten-Antigen) zur Anwendung. Dabei gilt es ein für an einer erblichen (z.B. Fanconi-Anämie, Beta-Thalassämie) bzw. nicht-erblichen Erkrankung (z.B. Leukämie) der Erythropoese oder Immunabwehr erkranktes Geschwisterkind kompatiblen Embryo mit dem Ziel einer künftigen Spende hämatopoetischer Stammzellen auszuwählen. Man spricht hierbei auch von sogenannten „Retter-Babys“. (19,35)

Einen weiteren, international nur eingeschränkt unterstützten Anwendungsbereich, stellt die Geschlechtsauswahl aufgrund sozialer Indikation dar, sozusagen „Social Sexing“ bzw. „Family Balancing“. (22,24)

2 Material und Methoden

Die vorliegende Masterarbeit dient der Beschreibung und Gegenüberstellung rezenter, aktueller und künftiger Verfahren der Präfertilisations- und Präimplantationsdiagnostik sowie einhergehender technischer, medizinischer, finanzieller und rechtlicher Belange insbesondere im Kontext österreichischer Rahmenbedingungen.

Zur Beantwortung der Fragestellung wurde eine ausführliche Literaturrecherche und -aufarbeitung sowie Konfrontation der Ergebnisse durchgeführt und folgend die aktuellen reproduktionsgenetischen Methoden sowie gewonnenen Erkenntnisse und damit der aktuelle Stand der Wissenschaft zusammengefasst. Es werden sowohl technische Möglichkeiten, Grenzen, Schwierigkeiten, Vor- und Nachteile sowie Entwicklungstendenzen der aktuell und künftig sich etablierenden Methoden wiedergegeben und kritisch hinterfragt werden.

2.1 Literaturrecherche

Die Basis dieser Masterarbeit begründen eine strukturierte Literaturrecherche zur Sammlung aktueller evidenzbasierter Daten sowie darauffolgende Aufbereitung sowie deskriptive Inhaltsanalyse.

Hierfür wurden die Literaturdatenbank PubMed der U.S. National Library of Medicine als auch institutionelle Websites österreichischer und internationaler Gesellschaften der Reproduktionsmedizin nach relevanten Veröffentlichungen durchsucht. Zusätzlich wurden Referenzen bereits verarbeiteter Literaturquellen nach zusätzlichen relevanten Publikationen durchsucht und eben diese verarbeitet. Der Zugang zur medizinischen Literaturdatenbank PubMed der U.S. National Library of Medicine wurde seitens Bibliothek der Medizinischen Universität Graz zur Verfügung gestellt.

Unter Nutzung der Schlagwörter „preimplantation“, „prefertilization“ sowie „methods“ wurden unter Zuhilfenahme verschiedener boolescher Varianten humanwissenschaftliche Arbeiten über einen Veröffentlichungszeitraum von 10 Jahren, exklusive Grundlagenliteratur, bis mitunter August 2020 eruiert und für diese Masterarbeit relevante Studien, Artikel und Reviews als auch anwendbare Fachliteratur in englischer sowie deutscher Sprache eingeschlossen. Ein weiteres Kriterium bildete die für den Rahmen einer Masterarbeit gängige gebührenfreie Zugänglichkeit der verwendeten Literatur im Volltext über die Bibliothek der Medizinischen Universität Graz bzw. öffentliche Sammlungen.

Die Verwaltung, Archivierung sowie Referenzierung erhobener Literatur erfolgte mithilfe des frei erhältlichen Literaturverwaltungsprogramms Mendeley.

Die Literaturrecherche endete am 01.09.2020.

3 Ergebnisse – Resultate

In den folgenden Kapiteln werden nun die aktuellen Verfahren zur reproduktionsgenetischen Probengewinnung und Diagnostik sowie entsprechende Vorteile, Nachteile, Problemstellungen als auch künftige Entwicklungen thematisiert.

Allen Methoden der reproduktionsgenetischen Diagnostik gleich ist der allgemeine Ablauf. Nach initialer Biopsie, Probenaufbereitung und DNA-Isolierung erfolgt meist deren Amplifikation. Daraufhin kommen die verschiedenen analytischen Verfahren mit ihren jeweiligen Vor- und Nachteilen unter Berücksichtigung der jeweiligen Indikation zum Einsatz. Die Auswertung der Ergebnisse sowie folgende Aufbereitung und Befundung erfolgt heutzutage meist computergestützt. (36)

Im Fokus der Gegenüberstellung stehen insbesondere aktuelle Methoden wie das array CGH, SNP-Array sowie Next Generation Sequencing. Hinzukommend sollen die verschiedenen Problemstellungen und Limitationen der einzelnen Techniken sowie aktuelle und mögliche zukünftige methodische Entwicklungen näher beleuchtet werden.

Abschließend beschäftigt sich dieses Kapitel mit der Betrachtung aktueller rechtlicher Rahmenbedingungen der Präimplantationsdiagnostik in Österreich sowie ökonomischer Aspekte der diagnostischen Methoden sowie Screeningverfahren.

3.1 Probengewinnung zur reproduktionsgenetischen Diagnostik

Die zur weiteren Verwendung im Rahmen reproduktionsgenetischer Analytik benötigten Materialien können im Rahmen der In-Vitro-Fertilisation je nach diagnostischer Zielsetzung einerseits zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Gameten- sowie Embryonalentwicklung als auch aus unterschiedlichen Gewebeanlagen gewonnen werden. Einen zusätzlichen Faktor hinsichtlich Probenwahl stellt auch das jeweilige Diagnostikverfahren und entsprechend notwendiges Materialvolumen dar. (8,37,38)

Unmittelbar vor der Probenentnahme ist die Eröffnung der Zona Pellucida allen Verfahren gemeinsam. Dies erfolgt entweder mechanisch oder via Laser. Chemische Eröffnungsmethoden gelten mittlerweile Großteils als obsolet. Die gewünschte Probe wird daraufhin je nach Methodik mittels Aspiration oder Abspaltung gewonnen. (13,39,40)

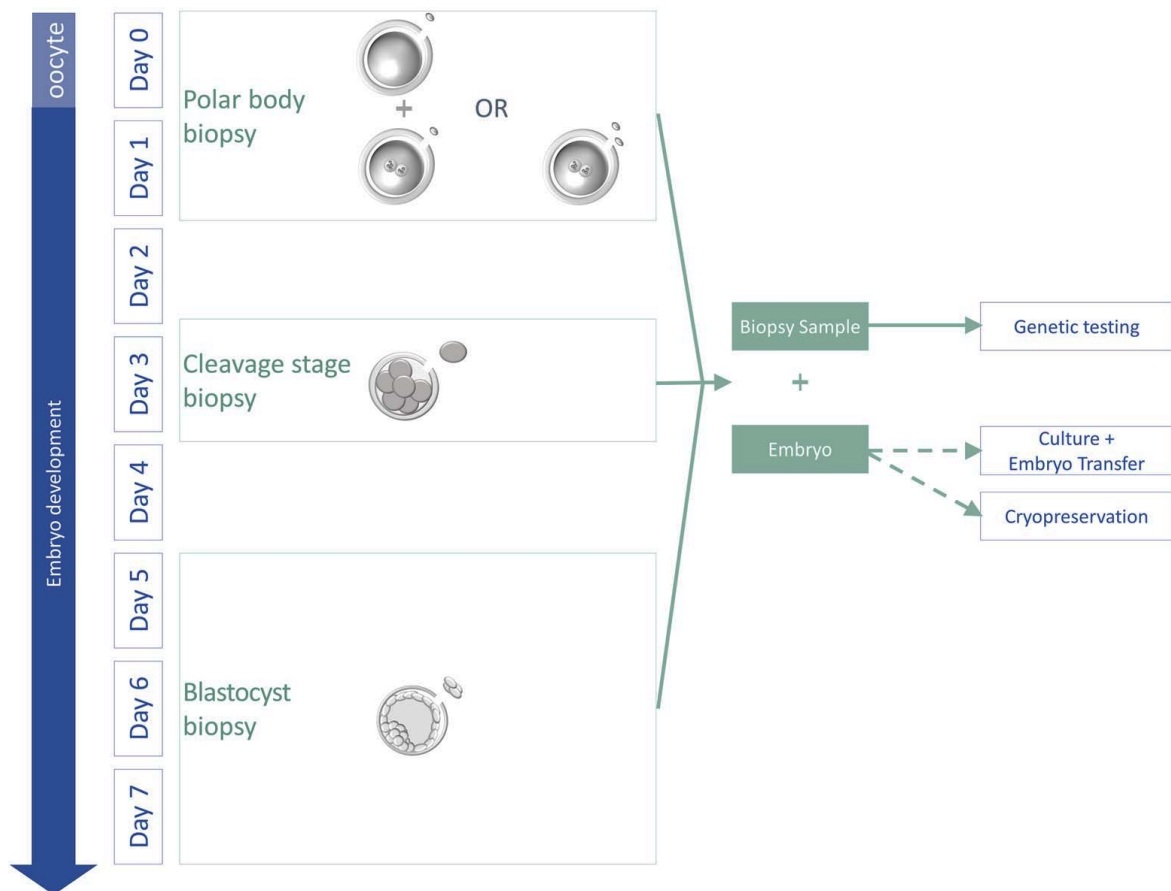


Abbildung 1 - Probengewinnung zur reproduktionsgenetischen Diagnostik (13)

Man unterscheidet generell die Entnahme von einem oder zwei Polkörpern der unbefruchteten Oozyte unmittelbar vor bzw. während der extrakorporalen Befruchtung von der Entnahme einer totipotenten Blastomerenzelle oder mehreren Trophektodermzellen der Blastozyste nach stattgefundener Befruchtung. Neuere, größtenteils noch experimentelle, Verfahren werden im Folgenden ebenso thematisiert. (13)

3.1.1 Polkörperbiopsie

Im Rahmen der Präfertilisationsdiagnostik kann mittels simultaner oder sequenzieller Entnahme des ersten (voller Chromosomensatz mit je zwei Chromatiden) und/oder zweiten Polkörpers (ein Chromatidensatz) im Metaphase-II-Stadium bzw. Vorkernstadium eine Aussage über maternale Anteile bzw. insbesondere Aneuploidien maternaler Keimzellen ohne Eingriff in embryonale Strukturen erfolgen. Die Polkörperbiopsie stellt somit vor allem für Länder mit restriktiveren Rechtslagen oder für Untersuchungen von lediglich maternal erwarteten Aneuploidien, pathologischen Varianten oder strukturellen Aberrationen eine Alternative zu direkten Untersuchungen am Embryo dar. (8,13,41,42)

Nach heutigem Stand der Forschung haben Polkörper keine Bedeutung für die weitere Embryonalentwicklung, die Biopsie hat somit nur geringe Auswirkungen auf diesen. Die entnommenen Polkörper stellen aufgrund der meiotischen Verteilungsprozesse ein Spiegelbild der zu befruchtenden Oozyte dar. Zu berücksichtigen ist hierbei jedoch, wie bereits angemerkt, dass die Untersuchung der Polkörper somit lediglich indirekte Schlüsse auf die Oozyte zulässt, und paternale Anteile in der Analyse zur Gänze nicht berücksichtigt werden. Auch spätere mitotische Fehlverteilungen sind nicht auszuschließen, womit die Polkörperdiagnostik nicht immer gänzlich aussagekräftig hinsichtlich zu transferierenden Embryos ist. (13,24)

Empfohlen wird stets beide Polkörper aufgrund des ansonsten sehr hohen Risikos für Fehldiagnosen zu untersuchen, es wird hierbei die simultane Entnahme ca. 8 bis 14 Stunden nach Fertilisation bevorzugt. Dabei kommt es aufgrund der Vielzahl an zu untersuchenden Oozyten im Vergleich zur späteren Anzahl tatsächlich

heranreifender Embryonen jedoch zu einer höheren Arbeitsbelastung des Labors. Vorteilhaft zeigt sich hier hingegen wiederum der ausgedehnte Zeitraum bis zum schlussendlich Embryotransfer zur Durchführung relevanter diagnostischer Schritte. Trotz Alledem zeigt sich in rezenten Studien, dass die Polkörperanalyse den geringsten prädiktiven Wert hinsichtlich Status der embryonalen Euploidität aufweist, sowohl die Blastomerenbiopsie als auch die Blastozystenbiopsie gelten diesbezüglich als aussagekräftiger. (13,24,43)

3.1.2 Blastomerenbiopsie

Bei der Blastomerenbiopsie wird lediglich eine totipotente, embryonale Blastomere im 6- bis 8-Zell-Stadium am Tag drei nach Befruchtung entnommen. Auf diesen Weg lassen sich genetische Informationen des Embryos mit sowohl paternalen als auch maternalen Anteilen gewinnen und insbesondere im Rahmen der direkten Präimplantationsdiagnostik analysieren. Vorteilhaft ist hierbei auch der frühe Zeitpunkt durchgeführter Analysen, ein frischer Embryotransfer ist in den meisten Fällen möglich. (13,24,44)

Aufgrund möglicher Beeinträchtigung der Schwangerschafts- und Implantationsrate sowie der fetalen Entwicklung kommt die Blastomerenbiopsie jedoch in Screeningverfahren nicht mehr zum Einsatz und rückt ebenso im Bereich der direkten Diagnostik vermehrt in den Hintergrund. Unmittelbar in vitro ließ sich in bisherigen Studien so neben Wachstumsretardierungen biopsierter Embryonen ebenso ein verändertes Schlüpfverhalten nachweisen. (8,45–47)

Hinzukommend ist im Blastomerenstadium aufgrund des beschränkten Analysematerials keine Mosaikanalyse möglich, was bei wiederum gleichzeitig hoher chromosomaler Fehlverteilungsrates (bis zu 50%) und meist trotzdem normaler Entwicklung in diesem Stadium für eine Vielzahl an falsch positiven Analysen sorgt und bereits in der Vergangenheit auch viele Studien verfälschte. Zusätzlich sind umfangreiche Untersuchungen mit lediglich einer Zelle nur eingeschränkt möglich, es besteht das Risiko eines Allel-Dropouts, eine orthogonale Testung ist ausgeschlossen. (13,21,36,48,49)

3.1.3 Blastozystenbiopsie

Die heutzutage am häufigsten angewandte Blastozystenbiopsie beschreibt die Entnahme von 5-10 Zellen des Trophoblasten des Embryos etwa fünf bis sieben Tage nach Insemination. Trophoblastenzellen stellen dabei den äußeren Zellanteil der Blastozyste dar, welcher im weiteren Verlauf für die Plazenta und Chorion verantwortlich ist. Die innere Zellmasse, der Embryoblast, welcher folgend für die Entwicklung embryonaler Strukturen verantwortlich ist, wird dabei nicht manipuliert. (13,21,50)

Auf diesem Wege sind aufgrund der fortgeschrittenen Differenzierung sowie Analyse multipler Zellen sowohl meiotische als auch mitotische Fehlverteilungen und strukturelle Defizite mit hoher Genauigkeit beurteilbar. Zytogenetisch lässt sich jede Zelle einzeln, molekulargenetisch gepoolt, mit hoher Effizienz der DNA-Amplifikation, analysieren. Gleichzeitig hat die Blastozystenbiopsie äußerst geringe Auswirkungen auf die Embryonalentwicklung und gestaltet sich aufgrund der weniger zu testenden Embryonen in diesem Stadium auch kostengünstiger. Weitere Faktoren stellen die geringere prozentuelle Rate an Mosaikkonstellationen in diesem Stadium im Vergleich zur Blastomere (etwa 3-5%) sowie die größere technischere Sicherheit dar. (13,21,44,49,51)

Aufgrund der späten genetischen Diagnostik ist es jedoch notwendig die zu beurteilenden Embryonen einer Kryokonservierung für einen späteren Transfer und damit einem zusätzlichen Risiko einer Beschädigung auszusetzen. Auch ist zu berücksichtigen, dass lediglich Zellen des Trophektoderms getestet werden, und die Ergebnisse im Vergleich zur inneren Zellmasse aufgrund von Mosaikkonstellationen verfälscht sein könnten, wobei dies in bisherigen Untersuchungen bisher negiert wurde. (13,21,49,52)

3.1.4 Minimalinvasive Blastozentese

Zu einem der neueren Verfahren, welches jedoch noch nicht im klinischen Alltag Anwendung findet, gehört die minimalinvasive Blastozentese. Dabei wird zellfreie DNA aus der die Blastozyste ausfüllenden Flüssigkeit, welche minimalinvasiv

biopsiert wird, gewonnen, aufgereinigt und für die weitere Diagnostik amplifiziert. Gleichzeitig spiegeln auch Proteine wie exemplarisch das Histon-Protein H2A oder Metaboliten den chromosomalen Status des Embryos wieder und können deshalb als Marker fungieren. (13,24,44,53)

Bisher ist diese Technik für die Anwendung im klinischen Alltag jedoch noch nicht ausgereift genug und bedarf weiteren Untersuchungen. (13)

3.1.5 Nichtinvasives Chromosomenscreening (NICS) aus Kulturmedien

Ein weiteres, relativ neues und noch nicht im klinischen Alltag angewandtes Verfahren stellt das nichtinvasive Chromosomenscreening über zellfreie DNA in Kulturmedien der in-vitro fertilisierten Embryonen dar. Im Vergleich ist dieses Verfahren jenem der minimalinvasiven Blastozentese im Rahmen erster rezenter Studien vermeintlich überlegen bzw. könnte mit diesem zur Ergebnisoptimierung kombiniert werden. (13,54,55)

Eine besondere Schwierigkeit dieser Technik ist jedoch die Unterscheidung zwischen der embryonalen DNA sowie möglichen (maternalen) Kontaminationen. Es konnte jedoch bereits in mehreren Studien eine vielversprechendere Reduktion falsch positiver Ergebnisse aufgrund von Mosaikkonstellationen im Vergleich zur Blastozystenbiopsie sowie von Embryonenverlusten durch Beschädigung bei Biopsie beobachtet werden. In Ebenso ergibt sich bei dieser Methode aufgrund neuerer Protokolle die Möglichkeit eines unmittelbaren frischen Embryotransfers im Vergleich zur Blastozystenbiopsie. (13,54,56)

3.2 Reproduktionsgenetische Diagnostikverfahren

Nach der Materialgewinnung werden nun im Folgenden die Aufbereitungs- sowie Diagnostikmethoden der Präfertilisations- und Präimplantationsdiagnostik thematisiert, welche in Abhängigkeit der jeweiligen Fragestellung zum Einsatz kommen. Hinzukommend sollen Problemstellungen und Limitationen der jeweiligen Methoden aufgezeigt werden.

Nahezu allen Verfahren ist gleich, dass die durch Polkörper- oder Blastomerenbiopsie gewonnenen Einzelzellen bzw. durch Trophektodermbiopsie lukrierten Zellverbände nach initialer Aufbereitung und DNA-Isolierung erst einer gezielten Amplifikation oder aber solcher des gesamten Genoms unterzogen werden. Für die darauffolgende gezielte oder genomweite Analytik kommen im Falle von Aneuploidie-Screeningverfahren primär die Techniken der array CGH und Next Generation Sequencing und für diagnostische Verfahren jene der FISH, array CGH, SNP array und Next Generation Sequencing zum Einsatz. (32,35)

3.2.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Bei der bereits seit 1993 im Einsatz befindlichen Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, kurz FISH, werden 5-6 gewünschte, hinsichtlich ihrer komplementären Bindung an Chromosomenabschnitte hochspezifische, mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Sonden auf biopsierte sowie folgend fixierte Zellen aufgebracht, hybridisiert und auf den Metaphasen- oder Interphasen-Chromosomen mittels Fluoreszenzmikroskopen mit geeigneten Filtern dargestellt. (8,24,57)

Dabei lassen sich mittels spezieller Sonden für ganze Chromosomen, Zentromere, Telomere oder nur chromosomale Abschnitte („Loci“) verschiedene Bereiche darstellen und sowohl numerische als auch strukturelle Chromosomenaberrationen detektieren. Auch die gezielte Darstellung von Geschlechtschromosomen, das sogenannte „Sexing“, ist mit dieser Technik möglich und für geschlechtsspezifische Erkrankungen bereits seit Langem erprobt. Zentromerspezifische Sonden eignen sich besonders zur Detektion von Chromosomenzahlveränderungen und

lokospezifische Sonden zur Analyse von Aneuploidien, Deletionen, Duplikationen oder auch Translokationen. (13,36,48,58)

Begrenzt wird dieses Verfahren jedoch durch die geringe Anzahl an verfügbaren Farben und der lediglich zwei- bis dreimaligen Möglichkeit der Rehybridisierung, womit sich maximal 12-15 Bereiche bzw. Chromosomen darstellen lassen. Dadurch ist die FISH nur bedingt aussagekräftig, es lässt sich kein umfassender chromosomaler Status erheben und die Analyse begrenzt sich auf die häufigsten Aberrationen, wodurch lediglich 60-80% der aneuploiden Embryonen erkannt werden. Hinzukommend kommt es häufig zu Signalartefakten, Überlappungen, und Hybridisierungsproblemen. (24,48)

Heute findet die FISH primär nur noch Einsatz in der Detektion chromosomaler Translokationen, ansonsten ist die Anwendung mittlerweile verstärkt durch die komparative Hybridisierung sowie moderne Sequenzierungsverfahren abgelöst worden, insbesondere da diese auch zufällige Aneuploidien aufgrund der Gesamtanalyse aller Chromosomen entdecken können. Kleine Mutationen, Mosaikkonstellationen, Inversionen und die uniparentale Disomie können mittels FISH jedoch nicht erkannt werden. (8,48,57)

3.2.2 Diagnostische Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion, kurz PCR, dient im Rahmen präimplantationsgenetischer Untersuchungen zwar vordergründig meist der Amplifikation der nur in geringen Mengen vorliegenden, isolierten DNA, jedoch findet sie in ihren verschiedenen weiterentwickelten diagnostischen Varianten auch Anwendung im spezifischen Gennachweis, insbesondere bei monogenetischen Erkrankungen. (8,24,59)

Die PCR in ihrer eigentlichen Form birgt jedoch großes Fehlerpotential aufgrund möglicher Kontamination und entsprechender Vervielfältigung beispielhaft maternaler DNA-Abschnitte sowie folgender Verfälschung der Analysen. Hinzukommend besteht auch die Gefahr des Allel-Dropout, kurz ADO, bei welchem ein Allel präferenziell unter Verlust des Anderen amplifiziert wird, wodurch es

ebenfalls zu falsch-positiven bzw. falsch-negativen Resultaten im Rahmen der Präimplantationsdiagnostik kommen kann. Mitunter aus diesem Grund wurden mit der Zeit zuverlässigere, aber auch schneller und leistungsfähigere diagnostische Varianten der PCR entwickelt. (24,60,61)

Grundlegend wird mit der PCR eine exponentielle Vervielfältigung von DNA-Abschnitten durch initiale Denaturierung, folgender Hybridisierung spezifischer Primer an beide Stränge und schlussendlicher Amplifizierung mittels hitzestabiler DNA-Polymerase und freier Desoxyribonukleotidtriphosphate in einem Thermocycler erreicht. Die mittels initialer PCR-Reaktion vervielfältigten Abschnitte werden im diagnostischen Anwendungsfall entweder einer quantitativen Analyse mit meist fluoreszenzbasierten Methoden hin auf das mögliche verminderte bzw. vermehrte Vorkommen oder aber einer qualitativen Endproduktanalyse durch Sequenzanalysen oder Größenvergleiche beurteilt. Gelten die qualitativen Analysen heute primär als Anwendungsgebiete des SNP-Array oder Next Generation Sequencing, wurden diese in der Vergangenheit mittels PCR und Gelelektrophorese oder Sanger-Sequenzierung, unter Anwendung fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide, unternommen. (5,24,60)

3.2.2.1 Fluoreszenzbasierte Multiplex PCR

Eine der diagnostischen Variationen der Polymerasekettenreaktion, welche nach wie vor in einigen Laboren zur Detektion monogenetischer Erkrankungen verwendet wird, stellt die fluoreszenzbasierte Multiplex PCR dar. Hierbei werden multiple Primer-Paare zur Amplifikation mehrerer zu untersuchender Gene bzw. Varianten sowie gleichzeitig fluoreszenzmarkierte Nukleotide verwendet, wodurch mittels automatisierter optischer Auswertung das Vorhandensein der Zielsequenzen weitaus schärfer und effizienter erfolgen kann. (60)

3.2.2.2 Digitale PCR

Im Rahmen der digitalen PCR kommt es zur Verdünnung und zufälligen Verteilung der DNA-Abschnitte entsprechend Poisson-Wahrscheinlichkeitsverteilung auf eine

Vielzahl an Reaktionsgefäßen, woraufhin manche mehrere und andere keinerlei amplifizierte Abschnitte enthalten. Folgend werden den Gefäßen selektive, fluoreszenzmarkierte Sonden für die gesuchten Sequenzen bzw. ggf. Mutationen sowie Referenzsonden im Sinne eines Wildtyps beigemischt. Kommt es zu einer Hybridisierung zwischen Sonde und gesuchter Sequenz entsteht ein Fluoreszenzsignal, dessen Intensität detektiert und computergestützt als Verhältnis zwischen den jeweiligen Sequenzvarianten analysiert wird. Der Anteil an positiven Signalen ist dabei proportional zur eingesetzten Menge der amplifizierten Sequenzen, wodurch eine absolute Quantifikation dieser möglich wird und so exemplarisch die absolute Anzahl an vorhandenen Chromatiden aller 24 Chromosome einer Probe bestimmt werden kann. (62–64)

Diese Variante der quantitativen, diagnostischen PCR kam jedoch bisher nur bedingt im Rahmen der Polkörperdiagnostik sowie Studien zur nicht-invasiven Analyse von Kulturmedien zum Einsatz. (62–64)

3.2.2.3 Quantitative Real Time PCR (qPCR)

Bei der real time PCR bzw. qPCR erfolgt eine kostengünstige quantitative Bestimmung von Amplifikationsprodukten in Echtzeit mittels spezifischer Sonden mit inaktiviertem Fluoreszenzfarbstoff, welcher erst bei erfolgreicher Hybridisierung, durch z.B. Verlust eines sogenannten Quencher-Moleküls, aktiviert wird und ein messbares Signal abgibt. (48,60)

Treff et al haben diese PCR Variante im Jahr 2012 für das Aneuploidiescreening durch initiale multiplex Präamplifizierung von 96 Loci bzw. 4 Abschnitte pro Chromosom optimiert, womit binnen lediglich 4h das Vorhandensein aller Chromatide ohne Notwendigkeit einer vorhergehenden Amplifizierung des gewonnenen Materials überprüft werden kann. (65)

Die qPCR weist jedoch im Vergleich zum array CGH, dem SNP-Array sowie dem Next Generation Sequencing eine reduzierte Auflösung auf. Es wird lediglich in wenigen Laboren zum Aneuploidiescreening genutzt, auch wenn mittlerweile die Analyse monogener Erkrankungen damit möglich ist. (32,60)

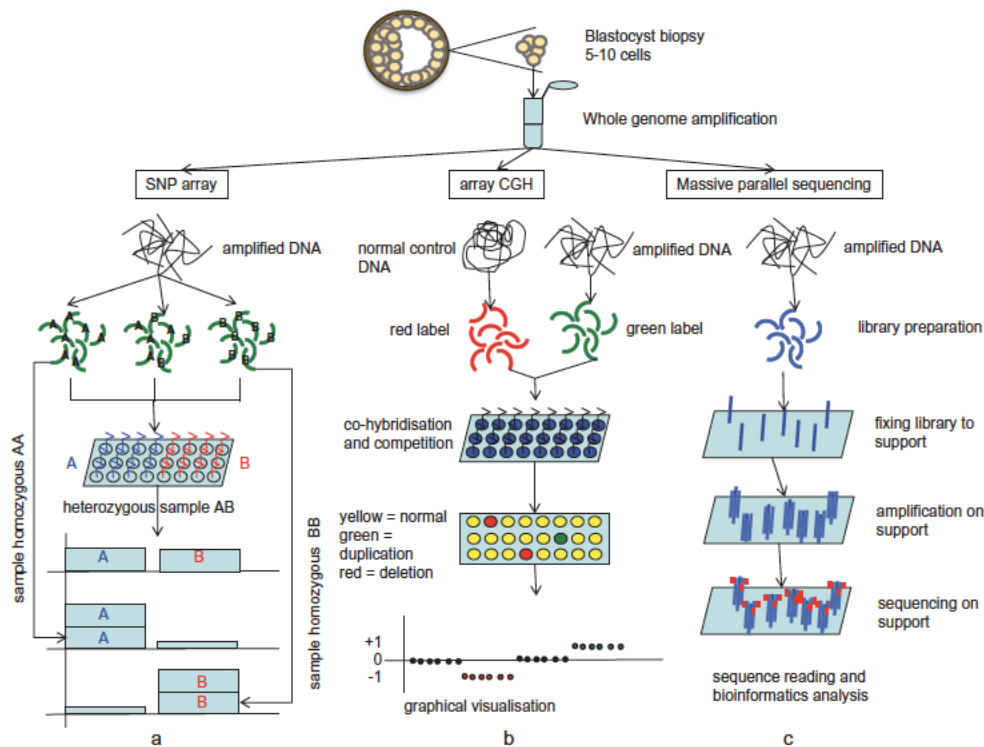


Abbildung 2 - Methodik von SNP array, array CGH und NGS (60)

3.2.3 Array-basierte komparative genomische Hybridisierung (aCGH)

Bei der array CGH werden durch komplementäre Ko-Hybridisierung von zuvor suffizient amplifizierter, fluoreszenzmarkierter und enzymatisch fraktionierter Polkörper- bzw. embryonaler DNA sowie mit einem anderen Farbstoff markierter Referenz-DNA (46, XX sowie 46, XY) gegen definierte Oligonukleotidsonden auf einem rasterförmigen Trägerchip, die in Summe das gesamte Genom abdecken, Zugewinne oder Verluste aller 24 Chromosome über Farbstoffsignalstärken mittels Computer vollautomatisch binnen etwa 12 Stunden analysiert. Dabei kommt meist der Farbstoff rot für die Referenz-DNA und grün für die Test-DNA zur Anwendung, wodurch es im Falle eines ausgeglichenen Vorliegens zu einem gelben Signal kommt. (8,24,36)

Durch die relativ schnelle und akkurate quantitative Verhältnisanalyse mit hoher Sensitivität ist es möglich sehr kleine Aberrationen (bis 2MB) auch ohne Verdachtsdiagnose zu detektieren, wodurch das aCGH relativ rasch die FISH als Goldstandard der Präimplantationsdiagnostik Größtenteils abgelöst hat. Es ermöglicht umfassende Analysen bei gleichzeitiger Möglichkeit eines frischen

Embryotransfers. Anwendung findet diese Technik dabei insbesondere bei monogenetischen, gonosomal oder autosomal rezessiv bzw. dominant vererbten Kopienzahlveränderungen, HLA-Abgleich sowie numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen. Auch unbalancierte Translokationen und komplexere Aneuploidien lassen sich damit detektieren. Nicht nachweisbar sind Polyploidien, balancierte Translokationen, Inversionen, uniparentale Disomien und Mosaikzustände bei nur geringer Anzahl an Zellen mit entsprechenden Aberrationen (<25%). (13,29,36,59,66)

3.2.4 Single-Nucleotide-Polymorphism-Array (SNP-Array)

Im Rahmen des hochauflösenden SNP-Array werden tausende, meist in nicht-codierenden Regionen befindliche, lokusspezifische Variationen einzelner Basenpaare (biallelische Einzelnukleotidpolymorphismen, SNP) mit hoher speziesspezifischer Frequenz (>1%) analysiert. Diese SNPs stellen selbst keine krankheitsverursachenden Mutationen, sondern häufig vorkommende Normvarianten dar, sind jedoch je nach Art der vorliegenden Variation bzw. Verhältnis dieser sowie jeweiliger Kopienzahl eng mit dem Vorkommen einiger krankheitsverursachender Mutationen (ein sozusagen zusammenhängender Haplotyp-Block) assoziiert. (24,48,60)

Methodisch werden hierfür nach vorhergehender Amplifikation die jeweiligen SNP-Varianten mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und folgend auf Anzahl und Vorhandensein der Fluoreszenzsignale sowie Intensität der jeweiligen Farbe computergestützt im Vergleich mit der Normalbevölkerung analysiert, womit sich Rückschlüsse auf die Kopienzahl und Art bzw. Verhältnis der vorliegenden Variation sowie das vermeintliche Vorliegen häufig damit assoziierter Mutationen ziehen lassen. (24,48,60)

Durch die Möglichkeit der gleichzeitigen Kopienzahlauswertung findet das SNP-Array neben den auf dem Vorkommen gewisser Variationen basierenden Analysen monogenetischer Erkrankungen, HLA-Typen, unbalancierter sowie balancierter Translokationen, kleiner bzw. komplexer struktureller sowie numerischer Aberrationen ebenso Anwendung im Aneuploidiescreening aller 24 Chromosomen.

Mittels Karyomapping ist es hierbei sogar möglich die parentale oder maternale Herkunft der jeweiligen Variante zu bestimmen. Abstriche zeigen sich jedoch insbesondere bei den Kosten, der Dauer sowie der bedingten Aussagekraft hinsichtlich Mosaikkonstellationen. (24,32,36,60)

3.2.5 Next Generation Sequencing (NGS)

Next Generation Sequencing beschreibt moderne, automatisierte Hochdurchsatzverfahren zur kostengünstigen, raschen und parallelen Sequenzanalyse von Teilen bzw. des gesamten Genoms. Sie stellen somit Nachfolger der ursprünglichen und nach wie vor in Anwendung befindlichen Sanger-Sequenzierung (Kettenabbruch-Synthese) dar, bei welcher mittels fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleosidtriphosphate Syntheseabbrüche im Rahmen der Amplifizierungsschritte verursacht und damit die Basenabfolge anhand unterschiedlicher Fragmentlängen und Farbcodierungen je nach Base eruiert werden konnte. (36,67,68)

Alle Verfahren des Next Generation Sequencing ist gleich, dass die im Rahmen der Präimplantationsdiagnostik in nur geringen Mengen vorhandene, isolierte DNA initial präamplifiziert werden muss. Folgend wird diese enzymatisch oder mechanisch fragmentiert und spezifische Adapter-Oligonukleotide an diese Bruchstücke geheftet. Anhand dieser kommt es zur Bindung der Fragmente an einen Chip oder Beads und daraufhin zur Amplifizierung hin zu Clustern identischer Sequenzen, innerhalb welcher parallel für alle Fragmente die Sequenzierung durchlaufen wird („Massive Parallel Sequencing“). Schlussendlich folgt die bioinformatische Analyse und Modellierung der Sequenzteile zur Gesamtsequenz („Shotgun-Sequencing“) anhand von Referenzgenomen. (36,60,67)

Die Sequenzierung selbst kann dabei mittels verschiedener Verfahren erfolgen, wovon folgend einige beschrieben werden. Bei der Pyrosequenzierung kommen an Pyrophosphat gebundene Nukleotide zum Einsatz, woraufhin es bei Basenpaarung zur Freisetzung von eben diesem und folgend zu einer Lichtreaktion kommt. Die Illumina-Sequenzierung basiert auf an die Nukleotide gebundene Fluoreszenzfarbstoffe und Terminatormoleküle, welche bei Basenpaarung ein

Farbsignal abgeben und erst bei Entfernung des Terminators im nächsten Zyklusschritt die weitere Base mit erneutem Farbsignal binden lassen („Sequencing-by-Synthesis“). Im Rahmen der SOLiD-Sequenzierung kommen 16 Oligonukleotidsonden mit je zwei spezifischen Basen sowie Farbstoff zum Einsatz, welche mittels Ligase gebunden und das Farbsignal folgend ausgewertet wird („Sequencing-by-Ligation“). Ein viertes exemplarisches Verfahren stellt die Halbleitersequenzierung dar, bei welcher jeder Cluster von einem pH-Meter umgeben ist, welches die spezifische Protonfreisetzung bei Basenpaarung aufzeichnet. (32,36,67,69)

Bei der Auswahl des Testverfahrens spielt insbesondere die Coverage als Mindestanzahl an Reads, der Anzahl an zum Fragment komplementär amplifizierten Sequenzen, eine zentrale Rolle. Für das menschliche Genom sollte diese Sequenzabdeckung stets über 30 liegen. Um eine Vielzahl verschiedener Proben kosteneffektiv gleichzeitig am selbigen Chip analysieren zu können, kann im Rahmen der Präamplifizierung und Adapterligation hinzukommend ein Barcode-Index an die Fragmente zur Identifizierung gebunden werden. Gleichzeitig ist es im Rahmen der Präimplantationsdiagnostik durch Kryokonservierung möglich, ein größeres Testkollektiv anzusammeln und gemeinsam kostengünstig auszuwerten. (35,49,60)

Zum Einsatz kommen Verfahren des Next Generation Sequencing aufgrund der gleichzeitig möglichen Analyse von numerischen, strukturellen und monogenetischen Veränderungen theoretisch bei allen Typen genetischer Erkrankungen. Hinzukommend lassen sich im Vergleich zu bisher erwähnten diagnostischen Verfahren auch geringgradige Mosaikkonstellationen sowie mitochondriale und neu entstandene, sogenannte „de novo“, Mutationen, ohne entsprechenden Verdacht hochauflösend nachweisen. (35,36)

In den rezenten Studien zur klinischen Anwendung des NGS im Rahmen der Präimplantationsdiagnostik konnte durch diese hochauflösende und umfassende Analysemöglichkeit eine deutliche Überlegenheit gegenüber dem array CGH und anderen Methoden sowie Steigerung der Implantations- und Schwangerschaftsraten nachgewiesen werden. Zu beachten ist jedoch die

Einhaltung festgelegter, restriktiver Auswertekriterien, da aufgrund der umfangreichen und hochauflösenden Sequenzierung eine Vielzahl an unbekanntem Varianten und damit einhergehende Fragestellungen bzw. Problemsituationen aufgeworfen werden. (49,60,69,70)

3.2.6 Third Generation Sequencing

Bei der neusten Generation an Sequenzierungsverfahren ist es möglich längere DNA Abschnitte ohne vorhergehende, teils mit Fehlern und größerem Aufwand behaftete Amplifizierung und Fragmentierung zu analysieren. Dabei werden Reaktionen einzelner Moleküle wie z.B. die Abgabe von Protonen oder Fluoreszenzsignalen in Echtzeit gemessen. Ein mittlerweile in Studien, aber noch nicht im Bereich der klinischen Präimplantationsdiagnostik, angewandtes Verfahren stellt exemplarisch die Nanoporesequenzierung dar. Hierbei werden für Nukleotide spezifische Änderung des Ionenstroms in Nanoporen einer künstlichen Membran rasch und exakt gemessen sowie unmittelbar ausgewertet. Das Aneuploidie-Screening einer Blastozystenbiopsie konnte in ersten Versuchen binnen 20 Minuten durchgeführt und analysiert werden, womit künftig die Biopsie, Testung und der Transfer am selbigen Tag durchführbar wären. (71,72)

3.3 Problemstellungen der Diagnostik

Bei der Präimplantationsdiagnostik kann es allgemein sowie je nach angewandter diagnostischer Methodik zu verschiedenen, die Anwendung limitierenden und bereits im vorherigen Kapitel kurz angeführten Problemen kommen, auf welche folgend nochmals näher eingegangen werden soll.

Einer der wichtigsten allgemein limitierenden Faktoren stellt der geringe Zeitfaktor ab bzw. unmittelbar vor In-vitro-Fertilisation bis zum Embryotransfer dar. Dies ist insbesondere von Bedeutung, als dass Methoden der frühen Polkörperanalyse nur sehr eingeschränkt aussagekräftig sind und auf die Blastomerenbiopsie heutzutage nicht mehr zurückgegriffen wird. Zwischen Blastozystenbiopsie und Embryotransfer im selbigen Zyklus beschränkt sich der Zeitraum für reproduktionsgenetische Analysen auf 1-2 Tage, was eine umfangreiche Aufbereitung, Analytik, Auswertung sowie Befundverarbeitung mehr als einschränkt. Lediglich moderne Verfahren des array CGH sowie des Next Generation Sequencing und Nachfolger haben sich hier als erfolgreiche Anwendungsmodelle bewiesen. Alternativ kann der Embryotransfer allerdings auch nach Kryokonservierung erfolgen, was trotz der geringen Gefahr der Beschädigung des potentiellen Embryos eine Mehrzahl an Vorteilen mit sich bringt. So ist es nicht nur möglich eine ausführlichere Diagnostik anzuwenden, auch das Pooling mehrerer zu testender Embryonen zeigt sich hinsichtlich der Kosten insbesondere bei Anwendung von Verfahren des Next Generation Sequencing als zielführend. Hinzukommend wurde gynäkologischerseits bereits die vermeintlich bessere Implantationsrate bei optimalerer Endometriumstimulation im Vergleich zum hyperstimulierten Setting im Zyklus der Oozytengewinnung postuliert. (24,60,73)

Ebenfalls ein im Rahmen der Probengewinnung gegebenes Risiko stellen mögliche Biopsiekomplikationen oder eine negative Beeinflussung der Implantation bzw. weiteren embryonalen oder kindlichen Entwicklung aufgrund der Mikromanipulationen dar. Hierbei konnten insbesondere in Bezug auf die Blastomerenbiopsie Folgen für die weitere Embryonalentwicklung in mehreren Studien nachgewiesen werden, weshalb mittlerweile nur noch selten auf diese Methodik und bevorzugt auf die Blastozystenbiopsie zurückgegriffen wird. (47,51)

Einen weiteren allgemein limitierenden Faktor der Präimplantationsdiagnostik stellt die Menge des zur Verfügung stehenden Materials dar. Dies trifft insbesondere auf die Polkörperbiopsie sowie Blastomerenbiopsie mit lediglich je ein bis zwei Zellen dar. Im Falle der Direktanalyse zeigt sich hier die Trophektodermbiopsie mit 5-10 zu analysierenden Zellen klar im Vorteil. Für die meisten aktuell angewandten Methoden wird die vorhandene DNA jedoch einer Präamplifizierung unterzogen, welche folgend wiederum Probleme mit sich führen kann. So kann es neben Amplifizierungsversagen und Verlust der Probe zum sogenannten Allel-Dropout kommen, wodurch lediglich ein Allel im Rahmen der Amplifizierung vermehrt und das folgende Ergebnis verfälscht wird. Diesem Effekt kann durch Anwendung der Multiplex PCR, Trophektodermbiopsie mit multiplen Zellen oder aber durch Direktanalyse der gewonnenen Zellen begegnet werden. Hinzukommend ist es aufgrund der geringen Probenmenge schwierig mögliche Kontaminationen mit exogener DNA von der gewünschten Probe zu differenzieren, wodurch es ebenso zu verfälschten Analyseergebnisse kommen kann. (13,24,60)

Die Aussagekraft der jeweiligen Analyse betreffend zählt das Problem der Mosaikbildung. Hiervon spricht man bei Vorliegen von zwei oder mehr Zelllinien mit unterschiedlichem chromosomalem Status aufgrund mitotischer Fehlverteilung oder DNA-Veränderungen. Mosaik sind dabei nicht unbedingt pathologisch, sondern liegen insbesondere im Blastomerenstadium in größerem Ausmaß, lt. rezenter Studien sogar bis zu 70%, vor und der Anteil sinkt mit dem embryonalen Entwicklungsfortschritt durch Apoptose. Im späteren Blastozystenstadium sollen lediglich 3-5% der Proben als Mosaik vorliegen, womit sich erneut die Trophektodermbiopsie als heutiger Goldstandard auszeichnet. Die angeführten reproduktionsgenetischen Verfahren können Mosaik jedoch zum Teil gar nicht und zum Teil nur ab einem gewissen prozentuellen Ausmaß registrieren. Auch hier gilt das Next Generation Sequencing als sensitivste Methode wieder als wegweisend Richtung in der Präimplantationsgenetik. (24,74)

Zu den weiteren technischen Komplikationen im Rahmen reproduktionsgenetischer Verfahren zählen Hybridisierungsfehler aufgrund degeneriertem Probenmaterial

oder falschen Hybridisierungssonden sowie im Falle der FISH Überlappungen oder Aufspaltung der DNA-Proben mit folgenden Signalfehlern. (24,32)

Zwei die schlussendliche Befundung betreffende Problemstellen sind einerseits unbekannte Variationen bzw. Zufallsbefunde der modernen, hochauflösenden Verfahren wie array CGH und Next Generation Sequencing sowie falsch-negative bzw. falsch-positive Ergebnisse aufgrund zu geringer Auflösung (z.B. FISH) oder Inkompatibilität der angewandten Methodik (z.B. balancierte Translokationen, Polyploidien). Tiefe Analysen moderner Verfahren weisen nach wie vor zu häufig auf unbekannte Varianten hin, welche eine darauffolgende Entscheidung hinsichtlich weiteren Vorgehens mit dem betroffenen Embryo erschweren. Dies als auch mögliche Zufallsbefunde können nur durch zielführende Einschränkung und Fokussierung der Auswertung auf für die Fragestellung wesentliche Faktoren verhindert werden. (35,60,75)

Zu guter Letzt ist ebenfalls zu erwähnen, dass die postulierten Vorteile von Screeningverfahren im Rahmen der Präimplantationsdiagnostik wie verkürzter Zeit bis zum Eintritt einer Schwangerschaft, reduzierte Raten an Implantationsfehlern sowie eine niedrigere Frequenz an Aborten nach wie vor nicht suffizient seitens qualitativ hochwertiger, randomisierter Kontrollstudien untermauert sind. Im Gegenteil konnte für den damaligen Goldstandard der Blastomerenbiopsie mit folgender FISH-Analyse aufgrund des schädigenden Effekts der Blastomerenbiopsie sowie nur eingeschränkter Aussagekraft der FISH-Analyse mittlerweile sogar das Gegenteil verifiziert werden. Ob nun moderne, umfangreichere und schonendere Verfahren tatsächlich zu einer Optimierung der In-vitro-Fertilisation führen, gilt es noch zu evaluieren. (24,76)

3.4 Aktuelle und zukünftige Entwicklungen

Mit dem fortwährend steigenden Bedarf von Maßnahmen der künstlichen Befruchtung aufgrund Veränderungen unserer sozialen Umgebung mit einem zunehmenden Anteil älterer Schwangerer in westlichen Ländern sowie Häufung von Fällen früher Infertilität spielt die Präfertilisations- und Präimplantationsdiagnostik eine immer wichtiger werdende Rolle und die Entwicklung immer hochauflösenderer, kostengünstigerer und schnellerer Methoden rückt in den Vordergrund. (1)

Die Probengewinnung betreffend hat mittlerweile die Trophoblastenbiopsie die Blastomerenbiopsie als Goldstandard aufgrund der bereits genannten, multiplen Defizite verdrängt. Hierbei wird sich in naher Zukunft auch die Einzeltrophoblastenanalyse anstelle aktueller gepoolter Verfahren durch Anwendung der neuen Sequenzierungsmethoden in Hinblick auf die Mosaikanalyse etablieren. (60)

Auch das nicht-invasive Screening mittels gebrauchter Kulturmedien wird in absehbarer Zeit an Stellenwert gewinnen, insofern die Sensitivität bei gleichbleibender Spezifität sowie Amplifikationsraten durch technischen Fortschritt entsprechend gesteigert werden können. Hierbei gilt es insbesondere auch die exakten Prozesse, welche für das Vorkommen zellfreier DNA ursächlich sind, zu erforschen. Die Mischung von gebrauchtem Kulturmedium und sowie Flüssigkeit aus dem Inneren der Blastozysten scheint in ersten durchgeführten Versuchen vielversprechend. (24,54)

Gleichzeitig werden momentan weitere nicht-invasive Methoden wie die Messung von Metaboliten des Zellstoffwechsels in gebrauchten Kulturmedien oder Anteilen mitochondrialer DNA sowie die morphologische Auswertung der Blastozystenentwicklung im Zeitraffer evaluiert und die physiologischen Hintergründe erforscht. (24,53)

Seitens technischer Methodik hat die Verbreitung des Next Generation Sequencing einen Großteil bisheriger Methoden aufgrund der alle Chromosomen umfassenden,

simultanen, hochauflösenden und kosteneffektiven Analyse aller genetischer Aberrationen unter gleichzeitiger Rücksichtnahme auf de novo Mutationen sowie gering ausgeprägter Mosaikkonstellationen abgelöst. Aufgrund ständiger Erweiterung, strengerer Validierung und umfangreicherer Interpretation bestehender Datenbanken wird auch die bestehende Problematik von unbekanntem Varianten ohne klare Handlungsempfehlungen in Zukunft in den Hintergrund rücken. Auch auf das Next Generation Sequencing folgende Techniken des Third Generation Sequencing tragen durch fortwährende Beseitigung technischer Limitationen zu umfangreicheren und verständlicheren Untersuchungen bei. Analysemethoden wie das array CGH, welche mittlerweile auch auf mehr als suffiziente Datenbanken zur Auswertung zurückgreifen kann, SNP-Array oder qPCR werden die kommenden Jahre immer weiter in den Hintergrund treten und lediglich indikationsspezifisch oder zu Zwecken der orthogonalen Testung herangezogen werden. (24,60,71)

Des Weiteren wird man sich in aktuell noch etwas entfernter liegender Zukunft auch um die Frage der Genmodifikation anstelle der Selektion in Anbetracht der jeweiligen ökonomischen Ressourcen und medizinischen Erfolg bemühen müssen. (77)

3.5 Rechtliche Rahmenbedingungen und Grenzen

Methoden der Präfertilisations- und Präimplantationsdiagnostik sind heutzutage in fast allen europäischen Ländern unter strenger gesetzlicher Regulierung erlaubt. Einheitliche Regulierungen über die europäische Union hinweg wurden bis heute noch nicht etabliert. Insbesondere in Österreich zeigt sich nach wie vor ein äußerst restriktives Vorgehen, erst seit der Reform des seit 1992 bestehenden Fortpflanzungsmedizingesetze im Januar 2015 durch das Fortpflanzungsmedizinrechts-Änderungsgesetz sind Untersuchungen an Embryonen und damit die Präimplantationsdiagnostik zusätzlich zu den zuvor bereits eingeschränkt erlauben Polkörperanalysen bzw. der Präfertilisationsdiagnostik überhaupt zugelassen. (78)

Entsprechend §2 Fortpflanzungsmedizinrechts-Änderungsgesetz 2015 ist die Anwendung der Präimplantationsdiagnostik zur Therapie womöglich erblich bedingter Unfruchtbarkeit unter folgenden Einschränkungen erlaubt:

1. Maßnahmen der Präimplantationsdiagnostik können nach dreimal erfolglos verlaufener, medizinisch unterstützter Fortpflanzung bei gegebenem Verdacht hinsichtlich einer genetischen Erkrankung durchgeführt werden.
2. Nach drei ärztlicherseits dokumentierten Fehl- bzw. Totgeburten mit Verdacht auf eine genetische Ursache ist eine künstliche Befruchtung in Kombination mit Verfahren der Präimplantationsdiagnostik erlaubt.
3. Im Falle eines stark erhöhten Risikos aufgrund genetischer Disposition eines oder beider Elternteile für eine Tot- bzw. Fehlgeburt oder Übertragung einer schwerwiegenden, nicht heilbaren Erbkrankheit. Dies umfasst primär Erkrankungen, welche lebenslang lebenserhaltende Maßnahmen bedingen oder zu fortwährend schweren Schmerzen oder Hirnschäden führen.

Dabei gilt jedoch ebenso zu beachten, dass jene die Präimplantationsdiagnostik durchführenden Institute hierfür lizenzierte Zentren entsprechen und sowohl

finanziell, personell als auch organisatorisch unabhängig von jener die In-Vitro-Fertilisation durchführenden Institution sein müssen. (78)

Über das seit Januar 2000 bestehende In-vitro-Fertilisierungs-Fonds-Gesetz sowie spätere Novellen wird in Österreich 70% der Kosten entsprechender Kinderwunschbehandlungen und somit auch der Präimplantationsdiagnostik staatlich gestützt. (78)

3.6 Ökonomische Aspekte

Ebenso wie rechtliche Vorgaben gilt es auch finanzielle Belange hinsichtlich der Indikationen als auch verwendeten Methodik der Präimplantationsdiagnostik zu berücksichtigen. Mit voranschreitender Entwicklung moderner Analyseverfahren wie dem NGS und folgend möglicher massiver paralleler Sequenzierung sowie Automatisierung von Prozessen können mittlerweile nicht nur entstehende Kosten, sondern auch der zeitliche und personelle Aufwand für die reproduktionsgenetische Analyse stark reduziert werden. (24,67,71)

Während die entstehenden ökonomischen Aufwendungen im Falle von diagnostischen Anwendungen der Präimplantationsdiagnostik durchaus in Relation zum gewünschten Behandlungserfolg stehen, ist dies im Falle von Screeningverfahren zumeist nicht der Fall und mittlerweile stark in Frage gestellt.

Wurde in der Vergangenheit mit einer Steigerung der Schwangerschaftsrate durch Aneuploidiescreenings und damit verbundenen langfristig reduzierten Kosten aufgrund ausbleibender multipler Zyklen der Kinderwunschbehandlung argumentiert, zeigen sich aktuelle Studien jedoch eher skeptisch gegenüber dieser Aussage. So konnte mittlerweile aufgezeigt werden, dass Screeningverfahren mittels Blastomerenbiopsie in der Vergangenheit aufgrund in retrospektiven Studien nachgewiesenen reduzierten Schwangerschaftsraten durch Schädigung der Embryonen sowie falsch positiven Ergebnissen bei Mosaikbildung die Behandlungskosten gesteigert haben. (24,45,60)

Es wirken sich sowohl Effektivität der Materialgewinnung als auch Art der Analytik auf die zu erwartenden Kosten im Rahmen von Screeningverfahren aus. Geht man hierbei exemplarisch von Polkörperbiopsien zur Durchführung eines Screenings mittels array CGH aus, bewegen sich die Kosten pro erzielter Schwangerschaft weit über den Zielbereichen. Lediglich in spezifischen Patientenkollektiven würde sich ein entsprechendes Screeningverfahren im Rahmen der Präimplantationsdiagnostik aus ökonomischer Sicht rentieren. (79–81)

4 Diskussion

Bereits seit erstmaliger Etablierung von Verfahren der Präfertilisations- und Präimplantationsdiagnostik im Jahr 1990 unterliegen diese nicht nur einer konstanten Weiterentwicklung, Optimierung und Effizienzsteigerung, sondern auch einem ebenso rasant steigenden Bedarf aufgrund stetig zunehmender Anteile an Paaren mit unerfülltem Kinderwunsch im reproduktionsfähigen Alter.

Insbesondere hinsichtlich Steigerung der Erfolgsraten scheint der Entwicklungsdruck seitens Reproduktionsmedizin groß. Immerhin wurden ganze 60% der Untersuchungen im Sinne eines Aneuploidiescreenings durchgeführt. Direkte diagnostische Maßnahmen aufgrund unmittelbarer medizinischer Indikation bei z.B. Vorliegen einer monogenetischen Erbkrankheit oder Translokation stellen nur einen kleinen, aber für die Weiterentwicklung der Techniken hinsichtlich Auflösungsgrenzen und Diagnostikumfang durchaus wichtigen Anteil dar.

Trotz aller methodischen Fortschritte ist die Relevanz von Screeningverfahren im Rahmen der Präimplantationsgenetik aufgrund fehlender qualitativer Evidenz in Frage gestellt. Insbesondere da den zuvor als Goldstandard etablierten Methoden der Blastomerenbiopsie sowie FISH mittlerweile aufgrund ihrer bereits erwähnten Defizite ein gegenteiliger Effekt hinsichtlich Erfolgsraten künstlicher Befruchtung im Sinne von Implantations- und Schwangerschaftserfolgen nachgewiesen wurde. Mit den nun hochauflösenden, allumfänglichen Sequenzierungsmethoden sowie der heutzutage weitaus sicherer geltenden Blastozystenbiopsie bzw. neueren Verfahren der nicht-invasiven Probengewinnung werden erneut vielversprechende Steigerungen der Erfolgsraten impliziert, bedürfen jedoch erst einer entsprechenden qualitativen Validierung.

Technisch haben mittlerweile Verfahren des Next Generation Sequencing und darauffolgende Methoden des Third Generation Sequencing bestehende analytische Methoden hinsichtlich Auflösungsvermögen, simultaner Erkennung aller genetischen Erkrankungen inklusive de novo Mutationen, Geschwindigkeit und Kosteneffizienz abgelöst und stellen die künftigen Goldstandards trotz möglicher Problematik von Zufallsbefunden und Vorfinden unbekannter Varianten mit

entsprechenden fraglichen Konsequenzen dar. Insbesondere durch das Pooling mehrerer Untersuchungen durch Kryokonservierung von Embryonen könnte sich durch diese Techniken die Präimplantationstechnik aufgrund entsprechender Kosteneinsparungen in Zukunft als Standardverfahren der In-vitro-Fertilisation durchsetzen.

Während sich wie bereits erwähnt die Trophektodermbiopsie als neuer Goldstandard etabliert hat, wecken neue nicht-invasive Möglichkeiten der Lukrierung embryonaler DNA nicht nur aus methodischer Sicht das Interesse der Wissenschaft, sondern ebenso um die physiologischen Hintergründe von zellfreier DNA sowie Metaboliten und weiteren Markern der zellulären und genetischen Konstitution zu erforschen.

Zusammenfassend zeichnet sich nun mittlerweile 30 Jahre nach der erstmaligen Durchführung der Präimplantationsdiagnostik an einem humanen Embryo sowie zahlreichen methodischen Wechseln möglicherweise erstmals die Chance der Etablierung einer nicht-invasiven, kostengünstigen und damit breitflächig einsetzbaren, alle genetischen Defekte umfassenden, exakten und mit einem frischen Embryotransfer vereinbarenden Lösung ab.

Literaturverzeichnis

1. Diedrich K, Ludwig M, Griesinger G. Reproduktionsmedizin. Berlin, Heidelberg: Springer; 2013.
2. Frydman R. Development of assisted reproductive medicine in Europe. *Fertil Steril.* 2018;110(1):12–3.
3. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, de Mouzon J, Sokol R, et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertil Steril.* 2017;108(3).
4. Greco E, Litwicka K, Minasi MG, Cursio E, Greco PF, Barillari P. Preimplantation Genetic Testing: Where We Are Today. *Int J Mol Sci.* 2020;21(12):1–29.
5. Buselmaier W, Tariverdian G. Humangenetik. 4th ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2007.
6. Weyerstahl T, Stauber M. Gynäkologie und Geburtshilfe. 4. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2013.
7. Knabl J, Steldinger R, Klosterhalfen T. Regelrechte Anlage und Entwicklung der Schwangerschaft. In: *Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe.* 2013.
8. Montag M, Toth B, Strowitzki T. Polkörper- und Präimplantationsdiagnostik. In: *Reproduktionsmedizin.* 2013.
9. Ludwig M, Nawroth F, Keck C. Kinderwunschsprechstunde. *Kinderwunschsprechstunde.* 2015.
10. von Wolff M, Stute P. Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin: Das Praxisbuch. 1. Auflage. Stuttgart: Schattauer; 2013.
11. Wischmann T. Einführung Reproduktionsmedizin. 1. Auflage. München: Reinhardt UTB; 2012.
12. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK). *Fertility: Assessment and treatment for people with fertility problems.* 2nd ed. Manchester: National Institute for Health and Clinical Excellence; 2013. 1–64 p.
13. Kokkali G, Coticchio G, Bronet F, Celebi C, Cimadomo D, Goossens V, et al. ESHRE PGT Consortium and SIG Embryology good practice recommendations for polar body and embryo biopsy for PGT†. *Hum Reprod*

- Open. 2020;2020(3):1–12.
14. Fauser BC, Edwards RG. The early days of IVF. *Hum Reprod Update*. 2005;11(5):437–8.
 15. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet (London, England)*. 1978;2(8085):366.
 16. Handyside AH, Lesko JG, Tarín JJ, Winston RM I., Hughes MR. Birth of a Normal Girl after in Vitro Fertilization and Preimplantation Diagnostic Testing for Cystic Fibrosis. *N Engl J Med*. 1992;327(13).
 17. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RML. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*. 1990;344(6268).
 18. Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM. Analysis of the first polar body: Preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod*. 1990;5(7).
 19. Simpson JL, Kuliev A, Rechitsky S. Overview of preimplantation genetic diagnosis (PGD): Historical perspective and future direction. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2019. p. 23–43.
 20. Harper JC. Preimplantation genetic screening. *J Med Screen*. 2018;25(1):1–5.
 21. Hehr A, Frister H, Fondel S, Krauß S, Zuehlke C, Hellenbroich Y, et al. Präimplantationsdiagnostik. *Medizinische Genet*. 2014 Dec 19;26(4):417–26.
 22. Harper JC, Wilton L, Traeger-Synodinos J, Goossens V, Moutou C, SenGupta SB, et al. The ESHRE PGD consortium: 10 years of data collection. *Hum Reprod Update*. 2012 May;18(3):234–47.
 23. Stern H. Preimplantation Genetic Diagnosis: Prenatal Testing for Embryos Finally Achieving Its Potential. *J Clin Med*. 2014 Mar 17;3(1):280–309.
 24. Griffin DK, Ogur C. Chromosomal analysis in IVF: Just how useful is it? *Reproduction*. 2018;156(1):F29–50.
 25. Checa MA, Alonso-Coello P, Solà I, Robles A, Carreras R, Balasch J. IVF/ICSI with or without preimplantation genetic screening for aneuploidy in couples without genetic disorders: A systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*. 2009;26(5).
 26. Shahine LK, Cedars MI. Preimplantation genetic diagnosis does not increase pregnancy rates in patients at risk for aneuploidy. *Fertil Steril*. 2006;85(1).
 27. Kuliev A, Cieslak J, Verlinsky Y. Frequency and distribution of chromosome

- abnormalities in human oocytes. *Cytogenet Genome Res.* 2005 Jan;111(3–4):193–8.
28. Pellestor F, Anahory T, Hamamah S. Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes. *Cytogenet Genome Res.* 2005 Jan;111(3–4):206–12.
 29. Geraedts J, Montag M, Magli MC, Repping S, Handyside A, Staessen C, et al. Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results. *Hum Reprod.* 2011 Nov;26(11):3173–80.
 30. Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Gordts S, Fredericks V, Crippa A. Paternal contribution to aneuploidy in preimplantation embryos. *Reprod Biomed Online.* 2009;18(4).
 31. Handyside AH. Molecular origin of female meiotic aneuploidies. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2012 Dec;1822(12):1913–20.
 32. Coonen E, Rubio C, Christopikou D, Dimitriadou E, Gontar J, Goossens V, et al. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of structural and numerical chromosomal aberrations†. *Hum Reprod Open.* 2020;2020(3):1–20.
 33. Chow JFC, Yeung WSB, Lee VCY, Lau EYL, Ng EHY. Evaluation of preimplantation genetic testing for chromosomal structural rearrangement by a commonly used next generation sequencing workflow. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2018;224:66–73.
 34. Gutiérrez-Mateo C, Wells D, Benet J, Sánchez-García JF, Bermúdez MG, Belil I, et al. Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. *Hum Reprod.* 2004 Oct;19(9):2118–25.
 35. Carvalho F, Moutou C, Dimitriadou E, Dreesen J, Giménez C, Goossens V, et al. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of monogenic disorders†. *Hum Reprod Open.* 2020;2020(3):1–18.
 36. Liss J, Chromik I, Szczygłńska J, Jagiełło M, Łukaszuk A, Łukaszuk K. Current methods for preimplantation genetic diagnosis. *Ginekol Pol.* 2016 Jul 29;87(7):522–6.
 37. Sadler TW. *Taschenlehrbuch Embryologie.* Taschenlehrbuch Embryolog. 2014.
 38. Garcia-Herrero S, Cervero A, Mateu E, Mir P, Póo ME, Rodrigo L, et al.

- Genetic Analysis of Human Preimplantation Embryos. In: *Current Topics in Developmental Biology*. 2016. p. 421–47.
39. Cieslak J, Ivakhnenko V, Wolf G, Sheleg S, Verlinsky Y. Three-dimensional partial zona dissection for preimplantation genetic diagnosis and assisted hatching. *Fertil Steril*. 1999;71(2).
 40. Montag M, Van Der Ven K, Delacrétaz G, Rink K, Van Der Ven H. Laser-assisted microdissection of the zona pellucida facilitates polar body biopsy. *Fertil Steril*. 1998;69(3 SUPPL. 2).
 41. Schenk M, Groselj-Strele A, Eberhard K, Feldmeier E, Kastelic D, Cerk S, et al. Impact of polar body biopsy on embryo morphokinetics—back to the roots in preimplantation genetic testing? *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(8):1521–8.
 42. Montag M, van der Ven K, Rösing B, van der Ven H. Polar body biopsy: a viable alternative to preimplantation genetic diagnosis and screening. *Reprod Biomed Online*. 2009 Jan;18 Suppl 1:6–11.
 43. Montag M, Köster M, Strowitzki T, Toth B. Polar body biopsy. *Fertil Steril*. 2013 Sep;100(3):603–7.
 44. Magli MC, Pomante A, Cafueri G, Valerio M, Crippa A, Ferraretti AP, et al. Preimplantation genetic testing: Polar bodies, blastomeres, trophoctoderm cells, or blastocoelic fluid? *Fertil Steril*. 2016;
 45. Goossens V, De Rycke M, De Vos A, Staessen C, Michiels A, Verpoest W, et al. Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod*. 2008;23(3):481–92.
 46. De Vos A, Staessen C, De Rycke M, Verpoest W, Haentjens P, Devroey P, et al. Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: A prospective cohort of single embryo transfers. *Hum Reprod*. 2009;24(12):2988–96.
 47. Cohen J, Wells D, Munné S. Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates. *Fertil Steril*. 2007 Mar;87(3):496–503.
 48. Dahdouh EM, Balayla J, Audibert F, Wilson RD, Brock JA, Campagnolo C, et al. Technical Update: Preimplantation Genetic Diagnosis and Screening. *J Obstet Gynaecol Canada*. 2015;37(5):451–63.

49. Brezina PR, Anchan R, Kearns WG. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: what technology should you use and what are the differences? *J Assist Reprod Genet.* 2016 Jul 14;33(7):823–32.
50. Magli MC, Pomante A, Cafueri G, Valerio M, Crippa A, Ferraretti AP, et al. Preimplantation genetic testing: Polar bodies, blastomeres, trophoctoderm cells, or blastocoelic fluid? *Fertil Steril.* 2016;105(3):676-683.e5.
51. Cimadomo D, Capalbo A, Ubaldi FM, Scarica C, Palagiano A, Canipari R, et al. The Impact of Biopsy on Human Embryo Developmental Potential during Preimplantation Genetic Diagnosis. *Biomed Res Int.* 2016;2016.
52. Kahraman S, Beyazyurek C, Tac HA, Pirkevi C, Cetinkaya M, Gulum N. Recent advances in preimplantation genetic diagnosis. *Adv Genomics Genet.* 2015 Apr;Volume 5:189.
53. Poli M, Ori A, Child T, Jaroudi S, Spath K, Beck M, et al. Characterization and quantification of proteins secreted by single human embryos prior to implantation. *EMBO Mol Med.* 2015;7(11).
54. Jiao J, Shi B, Sagnelli M, Yang D, Yao Y, Li W, et al. Minimally invasive preimplantation genetic testing using blastocyst culture medium. *Hum Reprod.* 2019;34(7):1369–79.
55. Capalbo A, Romanelli V, Poli M, Cimadomo D, Ubaldi F, Rienzi L. Non invasive analysis of the embryonic genome: a critical review of non invasive approaches for PGD and PGS. *Reprod Biomed Online.* 2018 Mar;36:e7–8.
56. Franco JG. New perspectives with the use of noninvasive chromosome screening (NICS) in ART. *Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida.* 2019.
57. Harton GL, Harper JC, Coonen E, Pehlivan T, Vesela K, Wilton L. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for fluorescence in situ hybridization-based PGD. *Hum Reprod.* 2011;26(1):25–32.
58. Scriven PN, Kirby TL, Ogilvie CM. FISH for Pre-implantation Genetic Diagnosis 3 . Analysis using a Fluorescence Microscope Suitably Equipped with Appropriate Filters. 2011;(February):5–9.
59. Harton GL, De Rycke M, Fiorentino F, Moutou C, Sengupta S, Traeger-Synodinos J, et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD. *Hum Reprod.* 2011;26(1):33–40.
60. Sermon K. Novel technologies emerging for preimplantation genetic diagnosis and preimplantation genetic testing for aneuploidy. *Expert Rev Mol Diagn.*

- 2017;17(1):71–82.
61. Collins SC. Preimplantation genetic diagnosis: technical advances and expanding applications. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2013 Jun;25(3):201–6.
 62. Daser A, Day E, Konfortov B, Turley H, Immesberger A, Haaf T, et al. P12 Direct counting of chromatids in polar bodies with digital PCR – a new method for aneuploidy screening in oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2012;24.
 63. Hammond ER, McGillivray BC, Wicker SM, Peek JC, Shelling AN, Stone P, et al. Characterizing nuclear and mitochondrial DNA in spent embryo culture media: genetic contamination identified. *Fertil Steril*. 2017 Jan 1;107(1):220-228.e5.
 64. M. B. Preimplantation genetic screening: Which stage? Which technique? *Iran J Reprod Med*. 2015;13(4):89–90.
 65. Treff NR, Tao X, Ferry KM, Su J, Taylor D, Scott RT. Development and validation of an accurate quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay for human blastocyst comprehensive chromosomal aneuploidy screening. *Fertil Steril*. 2012;97(4).
 66. Handyside AH. 24-chromosome copy number analysis: A comparison of available technologies. Vol. 100, *Fertility and Sterility*. 2013.
 67. Martín J, Cervero A, Mir P, Conejero Martinez JA, Pellicer A, Simón C. The impact of next-generation sequencing technology on preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertil Steril*. 2013;99(4).
 68. Łukaszuk K, Pukszta S, Wells D, Cybulska C, Liss J, Płóciennik Ł, et al. Routine use of next-generation sequencing for preimplantation genetic diagnosis of blastomeres obtained from embryos on day 3 in fresh in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*. 2015;103(4):1031–6.
 69. Fiorentino F, Bono S, Biricik A, Nuccitelli A, Cotroneo E, Cottone G, et al. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Hum Reprod*. 2014 Dec 1;29(12):2802–13.
 70. Friedenthal J, Maxwell SM, Munné S, Kramer Y, McCulloh DH, McCaffrey C, et al. Next generation sequencing for preimplantation genetic screening improves pregnancy outcomes compared with array comparative genomic hybridization in single thawed euploid embryo transfer cycles. *Fertil Steril*. 2018;109(4):627–32.

71. Wei S, Weiss ZR, Gaur P, Forman E, Williams Z. Rapid preimplantation genetic screening using a handheld, nanopore-based DNA sequencer. *Fertil Steril*. 2018;110(5):910-916.e2.
72. Fragouli E, Wells D. Pores for thought: preimplantation genetic testing using a nanopore-based DNA sequencer. Vol. 110, *Fertility and Sterility*. Elsevier Inc.; 2018. p. 853–5.
73. Roque M, Valle M, Guimarães F, Sampaio M, Geber S. Cost-effectiveness of the freeze-all policy. *J Bras Reprod Assist*. 2015;19(3):125–30.
74. van Echten-Arends J, Mastenbroek S, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Heineman MJ, van der Veen F, et al. Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: A systematic review. Vol. 17, *Human Reproduction Update*. 2011.
75. Harper JC, Sengupta SB. Preimplantation genetic diagnosis: state of the art 2011. *Hum Genet*. 2012 Feb;131(2):175–86.
76. Gleicher N, Orvieto R. Is the hypothesis of preimplantation genetic screening (PGS) still supportable? A review. *J Ovarian Res*. 2017;10(1):1–7.
77. V Hammerstein AL, Eggel M, Biller-Andorno N. Is selecting better than modifying? An investigation of arguments against germline gene editing as compared to preimplantation genetic diagnosis. *BMC Med Ethics*. 2019;20(1):83.
78. Urdl W. Rechtliche Regelung der Reproduktionsmedizin in Österreich. In 2019. p. 1–13.
79. Neumann K, Sermon K, Bossuyt P, Goossens V, Geraedts J, Traeger-Synodinos J, et al. An economic analysis of preimplantation genetic testing for aneuploidy by polar body biopsy in advanced maternal age. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2020;127(6):710–8.
80. Neumann K, Griesinger G. An Economic Analysis of Aneuploidy Screening of Oocytes in Assisted Reproduction in Germany. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2020 Feb 21;80(2):172–8.
81. Somigliana E, Busnelli A, Paffoni A, Vigano P, Riccaboni A, Rubio C, et al. Cost-effectiveness of preimplantation genetic testing for aneuploidies. *Fertil Steril*. 2019 Jun 1;111(6):1169–76.