

Preimplantasyon Embriyolarının Genetik Analizi

Doc. Dr. Evrim ÜNSAL¹

- 1.GİRİŞ
 - 2.Preimplantasyon Genetik Tanı Ve Taramanın Tarihçesi;
 - 3.Preimplantasyon Genetik Tanı
 - 4.Pre-İmplantasyon Genetik Tarama
 - 5.Preimplantasyon Genetik Tanı Endikasyonları
 - 5.1.X'e Bağlı Hastalıklar
 - 5.2.Tek Gen Hastalıkları
 - 5.2.1 Tek Gen Hastalıklarının Tanısında Tüm Ekzom/Genom Testleri
 - 6.HLA Uyumlu Kardeş Amaçlı Pgd Uygulamaları
 - 7.Preimplantasyon Genetik Tarama
 - 8.NGS Teknolojisinin Çalışma Prensibi
 - 9.NGS Teknolojisinin Pgt-A Uygulamalarındaki Yeri
 - 9.1.Dinamik Değerlendirme Aralığı;
 - 9.2.Yüksek Çözünürlük;
 - 9.3.Segmental Veya Parsiyel Anöploidilerin Ngs İle Tespiti;
 - 9.4.Mozaisizm
 - 10.NGS Teknolojisinin Limitasyonları
- KAYNAKLAR

GİRİŞ

Preimplantasyon Genetik Test (PGT), üreme genetiğinde kullanılan invitro fertilizasyon ile elde edilen embriyolardaki genetik kusurları ortaya koyan bir tekniktir. Bu test prenatal tanının erken formu olup çocuklarına kalıtsal hastalık geçirme riski olan çiftler için 1980'lerin sonlarında geliştirilmiştir. Sağlıklı bir aile kurmak isteyen risk taşıyan çiftler için başlıca seçenek, amniyosentez veya koryonik villus biyopsisi (CVS) ile yapılan prenatal tanıdır. Prenatal tanının en önemli dezavantajı, fetusun hasta olduğu tanısı koyulduğunda ailenin gebeliği sonlandırmak veya çocuklarının genetik hastalıklı doğacağını bilerek gebeliği

devam ettirmeye karar vermek zorunda kalmasıdır. İmplantasyon öncesi embriyolara uygulanan ve sadece sağlıklı embriyoların hastaya transfer edildiği bir yöntem olan PGT, bu çiftlere alternatif bir yol planı olarak önerilmektedir. Böylelikle gebelik, fetusun sağlıklı olduğu bilgisi ile başlayabilmektedir. Temel olarak PGT; yardımcı üreme tekniği ile elde edilen embriyonların laboratuvar ortamında teste tabi tutulması ve sağlıklı olanlarının tespit edilerek anneye transfer edilmesini içerir. Bu nedenle rutin genetik tanı yöntemlerine göre önemli zorluklar içerir. Bu zorlukların başında çok az miktardaki bir genetik materyalin (bir veya birkaç hücre) incelemeye alınması, sınırlı bir zaman diliminde sonuç verme zorunlu-

¹ Yüksek İhtisas Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Mikrogen Genetik Tanı Laboratuvarı

mekte hassasiyeti yüksek bir tekniktir. Mamas ve arkadaşları farklı oranlardaki öploid ve anöploid tek hücreleri bir araya getirerek kromozomal mozaizmi taklit etmişler ve NGS'in %16 seviyedeki mozaizme kadar tespit edebildiğini bildirmişlerdir (Mamas ve ark.). Mozaikliği bilinen hücre hatlarının kullanıldığı bir başka çalışma ise aCGH'in %25'in üzerindeki mozaizimleri tespit edebildiğini rapor etmiştir (Fragouli ve ark.).

Detaylı kromozom taramaları sonucunda kliyaj embriyolarındaki mozaiklik oranı %70 iken blastokist hücrelerinde %30-40 olarak bildirilmiştir (Yang ve ark)

NGS TEKNOLOJİSİNİN LİMİTASYONLARI

- Total DNA içeriğinde dengesizlik olmadığı için diğer platformlar gibi sadece dengesiz translokasyonları görüntüleyebilmektedir.
- NGS haploidi ve bazı poliploidileri alel oranlarını kullanarak tespit edebilme potansiyeline sahip olmasına rağmen hali hazırdaki protokolün sekans kapsamı ve okuma derinliği alel tespiti için yetersizdir.
- Embriyo başı maliyetin uygun seviyede tutulabilmesi ancak aynı koşumda 24 embriyonun çalışmaya alınması ile sağlanabilmektedir. Yetersiz numune örnek başı maliyeti artıracaktır.

Klinik ve devam eden gebelik oranlarını artırmada aldığı etkin rolü sürdüren PGT-A uygulamalarında gelişmeler dünya üzerinde oldukça hızlı bir ilerleme göstermektedir. Özellikle mitokondriyal içeriğin mercek altına alındığı ve invaziv olmayan PGT-A yöntemlerinin literatürde daha kapsamlı yer bulduğu üreme genetiği alanı yakın gelecekte de bu hızlı gelişimini sürdürecektir.

KAYNAKLAR

Balaban B, Yakin K, Alatas C, Oktem O, Isıklar A, Urman B. Clinical outcome of intracytoplasmic injection of spermatozoa morphologically selected under high magnification: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online*. 2011; 22:472–6.

Baltacı V, Satiroglu H, Kabukçu C, Unsal E, Aydinuraz B, Uner O, ve ark. Relationship Between Embryo

Quality and Aneuploidies. *Reprod Biomed Online*, 2006;12(1):77-82.

Bazrgar M., Gourabi H., Rezazadeh Valojerdi M., Yazdi P.E., Baharvand H.. Self-Correction of Chromosomal Abnormalities in Human Preimplantation Embryos and Embryonic Stem Cells. *Stem Cells And Development* 2013; 22, 17,

Borgulova I, Putzova M, Soldatova I, Krautova L, Pecnova L, Mika J, ve ark. Preimplantation genetic diagnosis of X-linked diseases examined by indirect linkage analysis. *Bratisl Lek Listy* 2015;116(9):542-6.

Botstein, D. & Risch, N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat. Genet.* 2003; 33 (Suppl), 228–237

Capalbo A, Treff N, Cimadomo D, Tao X, Ferrero S, Vaiarelli A, ve ark. Abnormally fertilized oocytes can result in healthy live births: improved genetic technologies for preimplantation genetic testing can be used to rescue viable embryos in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*. 2017 Dec;108(6):1007-1015.e3.

Dahdouh EM, Balayla J, Audibert F; Genetics Committee, Wilson RD, Audibert F, ve ark. Technical Update: Preimplantation Genetic Diagnosis and Screening. *J Obstet Gynaecol Can.* 2015; 37(5):451-63.

Dresser R. Preimplantation genetic diagnosis as medical innovation: reflections from The President's Council on Bioethics. *Fertil Steril*. 2006; 85(6):1633-7.

Fiorentino F, Bono S, Biricik A et al. Application of next generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Hum Reprod*. 2014b;29:2802-13.

Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Babariya D, Tarozzi N, Borini A, Wells D. Analysis of implantation and ongoing pregnancy rates following the transfer of mosaic diploid-aneuploid blastocysts. *Hum Genet*. 2017;136(7):805-819.

Grati FR, Gallazzi G, Branca L, Maggi F, Simoni G, Yaron Y. An evidence based scoring system for prioritizing mosaicaneuploid embryos following preimplantation genetic screening. *Reprod Biomed Online* 2018; Apr;36(4):442-449.

Gutierrez-Mateo C, Colls P, Sanchez-Casas Padilla E, Escudero T, Prates R, Ketterson K, ve ark. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil Steril*. 2010; 95:953–8.

Harper J, Coonen E, De Rycke M, Fiorentino F, Geraets J, Goossens V, et al. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? A position state-

- ment from the ESHRE PGD consortium steering committee. *Hum Reprod.* 2010; 25:821–3.
- Harper J.C., Wilton L., Traeger Synodinos J., Goossens V., Moutou C., SenGupta S.B., ve ark. The ESHRE PGD Consortium: 10 Years of data collection. *Hum. Reprod. Update.* 2012; 18:234–247.
- Harton G.L., Rycke M. De, Fiorentino F., Moutou C., SenGupta S., ve ark.ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD. *Human Reproduction* 2010; Vol.00, No.0 pp. 1–8,
- Hellani A, Coskun S, Benkhalifa M, Tbakhi A, Sakati N, Al-Odaib A, et al. Multiple displacement amplification on single cell and possible PGD applications. *Mol Hum Reprod.* 2004; 10:847–52
<https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/veriseq-pgs-kit-data-sheet.pdf>
- Huang CC, Chang LJ, Tsai YY, Hung CC, Fang MY, Su YN, ve ark. A feasible strategy of preimplantation genetic diagnosis for carriers with chromosomal translocation: Using blastocyst biopsy and array comparative genomic hybridization. *J Formos Med Assoc.* 2013; 112(9):537-44.
- Lohmann K., Klein C. Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis *Neurotherapeutics* 2014; 11:699–707
- Lukaszuk K, Puksza S, Wells D, Cybulska C, Liss J, Plociennik L, ve ark. 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;103:1031–6
- Majumdar G, Majumdar A, Lall M, Verma I, Upadhyaya K. Preimplantation genetic screening for all 24 chromosomes by microarray comparative genomic hybridization significantly increases implantation rates and clinical pregnancy rates in patients undergoing in vitro fertilization with poor prognosis *J Hum Reprod Sci.* 2016 Apr-Jun; 9(2): 94–100.
- Majumdar G, Majumdar A, Lall M, Verma I, Upadhyaya K. Preimplantation genetic screening for all 24 chromosomes by microarray comparative genomic hybridization significantly increases implantation rates and clinical pregnancy rates in patients undergoing in vitro fertilization with poor prognosis *J Hum Reprod Sci.* 2016; 9(2): 94–100.
- Malcov M, Gold V, Peleg S, Frumkin T, Azem F, Amit A, ve ark. Improving preimplantation genetic diagnosis (PGD) reliability by selection of sperm donor with the most informative haplotype *Reprod Biol Endocrinol.* 2017; 15: 31.
- Mamas T, Gordon A, Brown A, Harper J, Sengupta S. Detection of aneuploidy by array comparative genomic hybridization using cell lines to mimic a mosaic trophectoderm biopsy. *Fertil Steril* 2012;97:943–7.
- Mastenbroek S, Twisk M, van der Veen F, Repping S. Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum Reprod Update.* 2011;17(4):454–66.
- Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkesma-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, ve ark. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *New Engl J Med.* 2007;357(1):9–17.
- McReynolds S., Vanderlinden L., Stevens J., Hansen K. Schoolcraft W.B., Katz-Jaffe M.G. Lipocalin-1: a potential marker for noninvasive aneuploidy screening *Fertility and Sterility* , 2011; 95, 8 , 2631 - 2633
- Munne S., Wells D. Detection of mosaicism at blastocyst stage with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fert. Steril.* 2017; 107, 1085-1091
- Northrop LE, Treff NR, Levy B, Scott Jr RT. SNP microarraybased 24 chromosome aneuploidy screening demonstrates that cleavage-stage FISH poorly predicts aneuploidy in embryos that develop to morphologically normal blastocysts. *Mol Hum Reprod.* 2010; 16:590–600.
- Patel D.V., Shah P.B., Kotdawala A., Herrero J., Rubio I, Banker M.R. Morphokinetic behavior of euploid and aneuploid embryos analyzed by time-lapse in embryoscope. *J Hum Reprod Sci.* 2016; 9(2): 112–118.
- Peyvandi F, Garagiola I, Mortarino M. Prenatal diagnosis and preimplantation genetic diagnosis: novel technologies and state of the art of PGD in different regions of the world. *Haemophilia* 2011;17:14–17.
- Plon, S. E., Eccles, D. M., Easton, D., Foulkes, W. D., Genuardi, M., Greenblatt, M. S., Hogervorst, F. B., Hoogerbrugge, N., Spurdle, A. B. And Tavtigian, S. V. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results *Hum Mutat.* 2008; 29(11): 1282-1291.
- Rabbani B, Tekin M, Mahdieh N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet.* 2014; 59(1):5–15.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, ve ark. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology Genetics in Medicine, 2015; 17(5):405-424
- Rubino P., Dearden L., Guan L., Ruiz De Assin R, Mazmanian K, Kolb B.A., ve ark. Healthy baby after intrauterine transfer of monosomic embryos. *Fert Ster.* 2016; 106, 3, Supplement, Page e160

- Shamonki MI, Jin H, Haimowitz Z, Liu L. Proof of concept: Preimplantation genetic screening without embryo biopsy through analysis of cell-free DNA in spent embryo culture media. *Fertil Steril* 2016; pii: S0015-0282(16) 62550-5
- Sher G, Keskinetepe L, Keskinetepe M, Ginsburg M, Massarani G, Yakut T, et al. Oocyte karyotyping by comparative genomic hybridization provides a highly reliable method for selecting “competent” embryos, markedly improving in vitro fertilization outcome: a multiphase study. *Fertil Steril*. 2007; 87:1033–40
- Sills ES, Palermo GD. Preimplantation genetic diagnosis for elective sex selection, the ivf market economy, and the child—another long day’s journey into night? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2002;19(9):433-437.
- The 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis G. R. Altshuler D. Auton A. Brooks L. D. Durbin R. M A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 2010; 467, 1061–1073. 10.1038/nature09534
- Treff N, Su J, Tao X, Miller K, Scott Jr RT. First IVF babies born after rapid 24 chromosome embryo aneuploidy screening and fresh embryo transfer. *Fertil Steril*. 2009; 92:S49.
- Treff NR, Scott Jr RT. Methods for comprehensive chromosome screening of oocytes and embryos: capabilities, limitations, and evidence of validity. *J Assist Reprod Genet*. 2012; 29:381–90.
- Treff NR, Su J, Tao X, Levy B, Scott Jr RT. Accurate single cell 24 chromosome aneuploidy screening using whole genome amplification and single nucleotide polymorphism microarrays. *Fertil Steril*. 2010; 94:2017–21
- Treff NR, Tao X, Lonczak A, Su J, Taylor D, Scott Jr RT. Four hour 24 chromosome aneuploidy screening using high throughput PCR SNP allele ratio analyses. *Fertil Steril*. 2009; 92:S49–50
- URL : http://www.genomics.cn/en/news/show_news?nid=99607 Accessed 2013-07-22
- URL: <http://www.ivf-worldwide.com/cogen/oep/pgd-pgs/history-of-pgd-and-pgs.html>
- URL:<http://www.thermofisher.com/es/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing.html>
- URL:https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf
- Wells D, MG Bermudez, N Steuerwald, AR Thornhill, DL Walker, H Malter, ve ark. Expression of genes regulating chromosome segregation, the cell cycle and apoptosis during human preimplantation development. *Hum Reprod* 2005; 20:1339–1348.
- Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, Delhanty JD. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res*. 1999; 27:1214–8.
- Yang Z, Lin J, Zhang J, Fong W, Li P, Zhao R, ve ark. Randomized comparison of next-generation sequencing and array comparative genomic hybridization for preimplantation genetic screening: a pilot study *BMC Medical Genomics* 2015; 8:30
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, De Mouzon J, Sokol R, ve ark. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, *Hum. Reprod*. 2017; 1;32(9):1786-1801.
- Zheng H , Jin H , Liu L, Liu J and Wang W. Application of next-generation sequencing for 24-chromosome aneuploidy screening of human preimplantation embryos. *Molecular Cytogenetics* 2015; 8:38