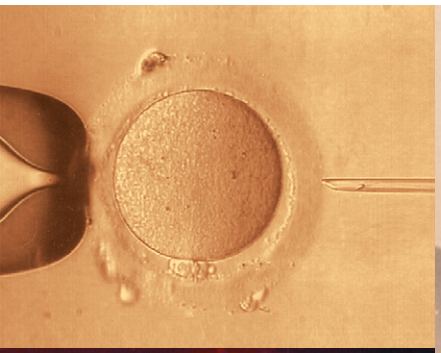
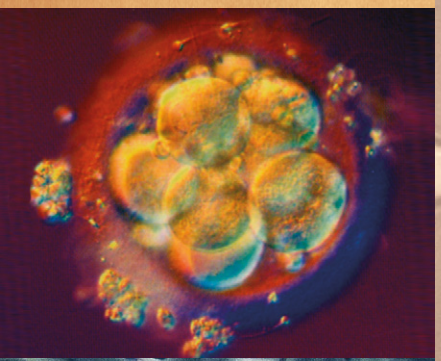
Journal für

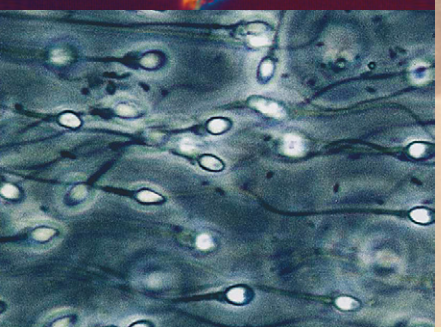
# Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

Andrologie • Embryologie & Biologie • Endokrinologie • Ethik & Recht • Genetik
Gynäkologie • Kontrazeption • Psychosomatik • Reproduktionsmedizin • Urologie







**Studie zur klinischen Etablierung der Präimplantationsdiagnostik**

Seifert B, Paulmann B, Seifert D, Brey S, Gaßner C
Kwiatkowski B, Schön U, Koehler U, Holinski-Feder E

*J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2014; 11 (1), 12-17*

www.kup.at/repromedizin
Online-Datenbank mit Autoren- und Stichwortsuche

**Offizielles Organ:** AGRBM, BRZ, DVR, DGA, DGGEF, DGRM, D·I·R, EFA, OEGRM, SRBM/DGE

**Indexed in EMBASE/Excerpta Medica/Scopus**

**Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, A-3003 Gablitz**

# Studie zur klinischen Etablierung der Präimplantationsdiagnostik

B. Seifert[1], B. Paulmann[1], D. Seifert[1], S. Brey[1], C. Gaßner[1], B. Kwiatkowski[1], U. Schön[2], U. Koehler[2], E. Holinski-Feder[2]

Mit dem Urteil des Bundesgerichtshofes vom 6.7.2010 wurde die Präimplantationsdiagnostik (PID) mit Einschränkungen und unter umschriebenen Bedingungen in Deutschland an pluripotenten Trophoblastzellen rechtlich ermöglicht. Nach dieser höchstrichterlichen Entscheidung wurde eine prospektive Studie zur wissenschaftlichen Etablierung der PID durch Trophoblastbiopsie (TBB) an Blastozysten durchgeführt. Die Studie erfasst Daten von 29 Kinderwunschpaaren mit 40 Behandlungszyklen. Die Untersuchungsgruppe beinhaltet 15 Paare mit chromosomalen Translokationen (reziproke und Robertson'sche Translokationen), 12 Patienten mit habituellen Aborten und 2 Fälle mit positiver Familienanamnese für eine schwerwiegende monogene Erkrankung. Insgesamt wurden 122 Blastozysten (n = 3/Zyklus) biopsiert, wovon 109 im Hinblick auf chromosomale Aberrationen untersucht werden sollten. Von 102 dieser 109 Blastozysten (93,6 %) konnte das Erbgut (DNA) erfolgreich amplifiziert und mittels Array-CGH analysiert werden. Dabei erwiesen sich 36 Blastozysten (35,3 %) als euploid oder balanciert und 66 Blastozysten (64,7 %) als aneuploid oder unbalanciert (als Folge der Translokation bei einem der Kinderwunschpartner oder durch eine numerische Chromosomenaberration). Von 7 Blastozystenbiopsien (6,4 %) konnte keine DNA amplifiziert werden. Die Blastozysten zweier Patienten mit positiver Familienanamnese für eine schwerwiegende monogene Erkrankung (Spinale Muskelatrophie, SMA) wurden nach TBB durch Multiplex-PCR und Sequenzanalyse untersucht. Nach bisher 26 durchgeführten Transfers stellten sich 14 Schwangerschaften ein (53,8 %). Bei 8 von 29 Patienten (27,6 %) konnte aufgrund genetisch auffälliger Befunde kein Transfer durchgeführt werden. Als Fallbericht wird die erste Schwangerschaft nach TBB in Deutschland bei einer monogen vererbten Erkrankung (SMA, Gen SMN1) dargestellt.

**Schlüsselwörter:** assistierte Reproduktion (ART), Präimplantationsdiagnostik (PID), Trophoblastbiopsie, Array-CGH, monogene Erkrankung, reziproke Translokation, Robertson'sche Translokation, habituelle Aborte

**Study for Clinical Establishment of Preimplantation Genetic Diagnosis.** On July 6th, 2010 the German Supreme Court (BGH) approved a case of Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) as conformable with the German Embryo Protection law, but highlighted several restrictions. Following this act, we conducted a prospective study to establish PGD after biopsy of trophectoderm from blastocysts. 40 treatment cycles from 29 nonparous couples were included. Of these, 15 had chromosomal translocations (reciprocal or Robertsonian), 12 patients presented recurrent miscarriages and 2 showed a positive family history for a monogenic disease. In total, 122 blastocysts underwent a biopsy of trophectoderm (n = 3/cycle). Of 109 biopsies for which array CGH has been scheduled, we were able to amplify and analyze DNA of 102 blastocysts (93.6%). Of these, 36 blastocysts (35.3%) were euploid or balanced and 66 blastocysts (64.7%) were aneuploid or unbalanced (as a result of the translocation in the couple or a numerical chromosome aberration). DNA amplification failed for 7 blastocysts (6.4%). Blastocysts from the two patients with a positive family history for a monogenetic disease (SMA, gene SMN1) were analyzed using multiplex PCR and sequence analysis. After 26 transfers we counted 14 pregnancies (53.8%). No transfer took place in 8 of 29 patients (27.6%), as all embryos were affected. Exemplarily, we report the first pregnancy in Germany after TEB in a patient with a positive family history for a monogenic disease.
**J Reproduktionsmed Endokrinol 2014; 11 (1): 12–7.**

**Key words:** assisted reproductive technology (ART), preimplantation genetic diagnosis (PGD), trophectoderm biopsy, monogenic disease, array CGH, reciprocal translocation, Robertsonian translocation, recurrent miscarriage

## Einleitung

Die Präimplantationsdiagnostik (PID) mit Untersuchungen von Eizellen durch Polkörperdiagnostik (PKD) für monogene Erkrankungen geht in Deutschland auf das Jahr 2001 zurück [1], für Aneuploidieuntersuchungen auf das Jahr 2004 [2]. Der Deutsche Ethikrat hat 2004 eine Anhörung einberufen, die im Ergebnis die Polkörperuntersuchung medizinisch und ethisch als Möglichkeit zur Diagnostik schwerwiegender genetischer Erkrankungen bestätigt hat. In Regensburg, München und Lübeck wurde die Diagnostik monogener Erkrankungen durch PKD erfolgreich entwickelt [3, 4]. Seit diesem Zeitraum liegen kontinuierliche Untersuchungsergebnisse vor, die im Vergleich zur international praktizierten Blastomerenbiopsie an Tag-3-Embryonen hohe Schwangerschaftsraten vorweisen [1]. Mit dem Urteil des Bundesgerichtshofes (BGH; AZ: 5 StR 386/09) vom 6.7.2010 zur PID wurde bestätigt, dass die Untersuchung von Embryonen auf schwerwiegende genetische Erkrankungen nicht im Widerspruch zum Embryonenschutzgesetz steht. Nach dem Präimplantationsdiagnostikgesetz (PräimpG) vom 8.12.2011 ist nach Wirksamwerden der Rechtsverordnung (PIDV) zum 1.2.2014 die PID an pluripotenten Trophoblastzellen in Deutschland möglich. Nach Kenntnisnahme der BGH-Rechtsprechung wurde die aktuelle Studie etabliert und ein Ethikvotum der zuständigen Kommission für diese Untersuchungen der LMU München (Projekt

Nach der Befruchtung der menschlichen Eizelle entwickeln sich durch Teilungen Blastomeren, die sich zur frühen Blastozyste weiterentwickeln, bei der einige *Zellen innen* und einige *Zellen außen* liegen. In der deutschen embryologischen Terminologie sprechen wir von den *innen liegenden Embryoblastzellen* und den *außen liegenden Trophoblastzellen*. Diese Begriffe enthalten eine Aussage über das Entwicklungsschicksal der beiden Zellpopulationen.

In der englischsprachigen Embryologie wurde, vor allem durch die Entwicklungsexperimente an der Maus, die Bezeichnung „inner cells" und „outer cells" gewählt, weil man zunächst in den 1970er-Jahren zurückhaltend geworden war, eine frühe Aussage über das Entwicklungsschicksal dieser Zellen zu treffen. Nach kontroversen Diskussionen verwendeten zahlreiche englischsprachige Biologen in den 1990er-Jahren zunehmend die Begriffe „inner cell mass" und „trophectoderm". Der Begriff „trophectoderm" soll nach der Gastrulation beschreiben, dass diese Zellen dem embryonalen Ektoderm anliegen.

Deutsche und englische Terminologie unterscheiden sich also darin, dass die deutsche früh das Entwicklungsschicksal der Blastozystenzellen beschreibt, die englische Terminologie dies aber vermeidet. Es ist wissenschaftlich verständlich, in deutschen Texten den Begriff „Trophoblast" für dieselbe Zellpopulation der Blastozyste zu verwenden, die in englischen Texten mit „trophectoderm" beschrieben wird.

*H. M. Beier, Herausgeber Biologie und Embryologie*

Eingegangen: 20.2.2013; akzeptiert nach Revision: 9.10.2013; Pre-Publishing Online: 17.1.2014

Aus dem [1]KITZ-KinderwunschTherapie im Zentrum, Regensburg, und dem [2]MGZ – Medizinisch Genetisches Zentrum, München

**Korrespondenzadresse:** Prof. Dr. med. Bernd Seifert, KITZ-KinderwunschTherapie im Zentrum, Hemauerstraße 1, D-93047 Regensburg; E-Mail: info@kitz-regensburg.de



For personal use only. Not to be reproduced without permission of Krause & Pachernegg GmbH.

008-11 vom 28.2.2011) eingeholt. Parallel dazu hat die Entwicklung neuer Untersuchungsmethoden der Einzelzelldiagnostik (z. B. Array-CGH) und die Technik der Trophoblastbiopsie (TBB) an Blastozysten dazu geführt, dass mit hoher Sicherheit sowohl Chromosomenaberrationen als auch monogene Erkrankungen im Rahmen einer PID diagnostizierbar sind [5–8]. Die Trophoblastbiopsie an Blastozysten setzt besondere manipulatorische Fertigkeiten bei der atraumatischen Entnahme weniger Trophoblastzellen und Erfahrungen mit der Vitrifikation von Embryonen voraus. Zum derzeitigen Zeitpunkt können nur wenige Zentren verlässliche Ergebnisse vorweisen [7, 9]. Ziel dieser prospektiven Behandlungsstudie war die Etablierung der TBB an Tag-5-Blastozysten mit anschließender Untersuchung der biopsierten Zellen mittels Array-CGH. Weiterhin wurde die molekulargenetische Untersuchung einer monogen vererbten Erkrankung (Spinale Muskelatrophie, SMA) nach TBB etabliert, für die eine Polkörperdiagnostik nicht zielführend ist. Die TBB mit Vitrifikation der Blastozysten und die genetische Diagnostik des biopsierten Materials bietet im Rahmen der PID eine Reihe von erweiterten Möglichkeiten gegenüber den bislang gebräuchlichen Verfahren.

## Material und Methoden

Die Studie erfasst Daten von 29 zugewiesenen Kinderwunschpaaren mit 40 Behandlungszyklen, bei denen eine IVF/ICSI-Behandlung mit anschließender PID vorgenommen worden ist (Tab. 1). Die Transfers fanden jeweils in einem Kryozyklus statt, da die Blastozysten nach TBB vitrifiziert wurden. Das Durchschnittsalter der untersuchten Patientengruppe betrug 37 Jahre. Anamnestisch lag ein hoher Anteil von 48 Aborten bei den Patienten vor. Die erfassten gynäkologischen Zusatzbefunde bei 5 Endometriose-Patienten und 7 Fällen mit immunologischen Implantationsstörungen waren im Rahmen der Behandlungsstrategie zu berücksichtigen. Die genetischen Fragestellungen der 29 Kinderwunschpaare betreffen 15 Fälle mit chromosomalen Translokationen (reziproke und Robertson'sche Translokationen) und 12 Fälle mit habituellen Aborten sowie 2 Paare mit einer monogen vererbten Erkrankung (Spinale Muskelatrophie, SMA).

**Tabelle 1:** Klinische Befunde

| | | | |
|---|---|---|---|
| Patienten | | 29 | |
| Behandlungszyklen | | 40 | |
| Alter | | 23–46 Jahre | (Ø 37) |
| BMI | | 18,2–30,9 kg/m² | (Ø 23) |
| Geburtshilfliche Anamnese | Primäre Sterilität | 3 | |
| | Sekundäre Sterilität | 26 | |
| | Geburten | 13 | |
| | Perinatale Todesfälle | 5 | |
| | Aborte | 48 | |
| Gynäkologische Anamnese | Immunologische Ursachen | 7 | |
| | Polyzystische Ovarien (PCO) | 8 | |
| | Endometriose | 5 | |
| | Auffälliges Spermiogramm | 13 | |
| | Myom | 2 | |
| Indikationen PID (Anzahl Patienten) | Translokationen | 15 | |
| | Habituelle Aborte | 12 | |
| | Monogene Erkrankungen | 2 | |
| Behandlungsprotokolle | Antagonisten | 18 | |
| | Agonisten | 22 | |

### Ovarielle Stimulation

Als Behandlungsprotokoll wurde in 18 Fällen ein Antagonistenprotokoll (Cetrorelix) verwendet und bei 22 Frauen die Down-Regulation nach dem langen Protokoll unter Anwendung von Buserelin vorgenommen (Tab. 1). Die Ovarstimulation erfolgte in der Regel mit Menotropin bis zu einer maximalen Dosierung von 450 internationalen Einheiten (IE). Die Stimulationsdauer betrug durchschnittlich 11 Tage, sodass die Ovulation bei einem mittleren Östradiol-Wert von 3993 pg/ml mit 5000 IE humanem Choriongonadotropin (HCG) ausgelöst werden konnte. Die Lutealphase wurde mit 1500 IE humanem Choriongonadotropin 2× im Abstand von 3 Tagen unterstützt, danach ist eine Substitutionsbehandlung mit Östradiol und vaginalem Progesteron erfolgt.

### Eizell-Behandlung

Durchschnittlich wurden 11 Eizellen gewonnen, davon waren im Mittel 9 reif. Die gewonnenen Oozyten wurden ca. 1–2 Stunden nach der Punktion mechanisch, anschließend enzymatisch mit Hylase (Sydney IVF Hyaluronidase, COOK-Australien; Denudationspipetten von Vitrolife, Schweden) auf einer 37°C beheizten Werkbank zur Entfernung der Corona radiata behandelt. Die Denudation hatte zum Ziel, eine Kontamination mit mütterlicher DNA auszuschließen. Die ICSI-Behandlung erfolgte 3 Stunden nach der Follikelpunktion. 16–18 Stunden später wurde der Pronukleusstatus beurteilt und die Embryonen bis zum Blastozystenstadium (Tag 5/6) bei 37°C und 5% $CO_2$ kultiviert (Brutschränke der Firma Binder, seit 1.1.2012 EmbryoScope™, Unisense FertiliTech A/S, Dänemark). Am Tag 1 nach der ICSI-Behandlung konnten im Durchschnitt 7 Vorkernstadien diagnostiziert werden. Bis zum Tag 3 erfolgte die Kultur in 4-Well-Schälchen mit 0,75 ml Cleavage Medium (COOK-Australien). Ab Tag 3 wurden die Embryonen in 0,75 ml Blastozystenmedium (COOK-Australien) kultiviert. Die Eizellkulturen im EmbryoScope™ sind unter Mikrobedingungen in 25 µl Cleavage- bzw. Blastozystenmedium vorgenommen worden.

### Trophoblastbiopsie

Voraussetzung für die Diagnostik pluripotenter Trophoblastzellen ist die Kultivierung aller Embryonen bis zum Blastozystenstadium (Tag 5 oder 6). Am Tag 4 wurde unter mikroskopischer Sicht eine etwa 2–3 µm große Öffnung in der Zona pellucida mittels Laser (Octax Laser, MTG, Landshut) erzeugt, damit sich am Tag 5 wenige Trophoblastzellen aus diesem Zonaspalt vorwölben können. Bei der Entnahme wurden 2–6 Zellen mit einer Biopsiepipette (30 µm, COOK-Australien) angesaugt und durch Laserimpulse abgetrennt. Die Zellentnahme erfolgte schnell und atraumatisch, um die Entwicklungspotenz des Embryos nicht zu beeinträchtigen. Die biopsierten Trophoblastproben wurden unmittelbar nach der Biopsie in 2 µl sterilen Phosphatpuffer (1 × PBS, Cell Signaling) überführt und bis zur Analyse bei –20°C eingefroren. Die Blastozysten sind nach der Biopsie vitrifiziert worden (Kitazato Kit, Bio-

**Tabelle 2:** Ergebnisse IVF-Labor

| | |
|---|---|
| Gewonnene Eizellen | 439 |
| Reife Eizellen | 344 (78,4 %) |
| Vorkernstadien | 256 (74,4 %) |
| Biopsierte Blastozysten gesamt | 122 (47,7 %) |
| Biopsierte Blastozysten mit anschließender Array-CGH | 109 (42,6 %) |

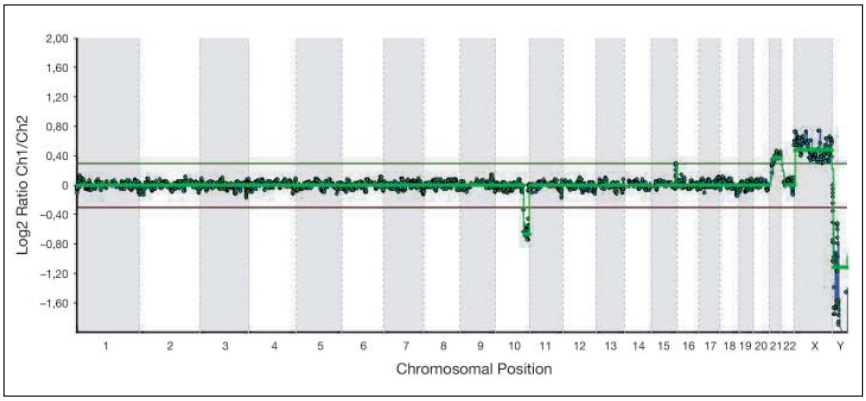



**Abbildung 1:** Array-CGH-Profil (Trophoblastbiopsat): strukturell veränderter Karyotyp (unbalancierte Translokation) mit zusätzlicher numerischer Aberration (Trisomie 21) (Karyotyp: 47,XX,+21,der(10)t(10;15)(q25.3;q26.3).

Pharma Co, Japan), um zu einem späteren Zeitpunkt im Rahmen eines Spontanzyklus oder eines artifiziellen Kryozyklus aufgetaut zu werden. Verluste an Blastozysten waren durch die Vitrifikation nicht zu verzeichnen.

### Array-CGH

Die Analyse chromosomaler Veränderungen in Trophoblastzellen erfolgte mit einer Array-basierten vergleichenden genomischen Hybridisierung (Array-CGH) unter Anwendung des 24sure-Technologie-Protokolls (BlueGnome, Cambridge, UK). Die Amplifizierung der Trophoblastzellen-DNA (Test-DNA) wurde mittels einer gesamtgenomischen Amplifizierung erreicht (Whole Genome Amplification, WGA; SurePlex, Rubicon Genomics, MI, USA). Für die Markierung der Test-DNA und einer männlichen Referenz-DNA (BlueGnome) mit Fluorochrom-gekoppelten Nukleotiden (Cy3-dUTP und Cy5-dUTP) ist das Fluoreszenz-Markierungs-Kit (BlueGnome) verwendet worden. Nach Vereinigung der Test- und Referenz-DNA sowie Zugabe von Cot1-DNA erfolgte die Fällung und Resuspendierung in Hybridisierungspuffer und die Hybridisierung auf BAC-Arrays (24sure+ V1.0, BlueGnome).

### Monogene Diagnostik

Zum Mutationsnachweis im Rahmen der monogenen Diagnostik für Spinale Muskelatrophie (SMA) wurde ein Multiplex-PCR-Protokoll mit 2 spezifischen Primern zur Amplifikation der Exons 7 und 8 des SMN1-Gens etabliert. Das Protokoll beinhaltet weiterhin ein Markerset aus 3 polymorphen Bereichen auf Chromosom 5, die in unmittelbarer Nähe zu der SMN1-Mutation liegen. Die Primer des Markersets waren dabei mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (HEX, 5-FAM). Die heterozygoten Markeralle konnten nach der PCR durch Fragmentlängenanalyse analysiert werden. Die weitere Aufbereitung erfolgte nach einer zweiten Nested-PCR mittels Sequenzierung. Das Protokoll wurde zunächst an 50 Einzelzellen (Lymphozyten des Paares) validiert. Im Rahmen der PID wurden jeweils 3–5 Trophoblastzellen nach alkalischer Lyse untersucht.

## Ergebnisse

Aus 40 ICSI-Zyklen konnten 439 Eizellen gewonnen werden, von denen 344 (78,4 %) reif und 256 (74,4 %) befruchtet waren (Tab. 2). 122 Embryonen sind zu Blastozysten kultiviert worden, 109 wurden auf chromosomale Aberrationen untersucht, 13 hinsichtlich einer Mutation im SMN1-Gen. Bezogen auf die Anzahl der Vorkernstadien ergab sich eine Blastozystenrate von 47,7 %. Pro Zyklus wurden im Durchschnitt 3 Blastozysten gewonnen (n = 3 Blastozysten/Zyklus).

### Array-CGH-Diagnostik

Von 102 der 109 Blastozysten (93,6 %) wurde ausreichend DNA für eine Array-CGH-Diagnostik mittels WGA amplifiziert. Von 7 Blastozystenbiopsien (6,4 %) wurde keine DNA amplifiziert und daher auch keine Array-CGH durchgeführt.

In der Patientengruppe mit reziproken oder Robertson'schen Translokationen (15 Paare, 25 Zyklen) erfolgte die Untersuchung an insgesamt 59 Blastozysten. 18 (30,5 %) der Trophoblastproben ergaben ein unauffälliges Array-CGH-Profil. Dies ist vereinbar mit einem normalen oder hinsichtlich der Translokation balancierten Karyotyp. 41 (69,5 %) TB-Proben waren aberrant, davon 18 (43,9 %) strukturell aberrant (unbalanciert aufgrund der beim Paar vorliegenden Translokation), 17 (41,5 %) numerisch aberrant (Trisomie oder Monosomie eines oder mehrerer zusätzlicher Chromosomen), 6 (14,6 %) TB-Proben waren sowohl strukturell als auch numerisch aberrant. Abbildung 1 zeigt ein Array-CGH-Profil einer TB-Probe mit sowohl struktureller als auch numerischer Aberration; die strukturell veränderten Chromosomen 10 und 15 sind dabei Folge einer beim Kinderwunschpartner vorliegenden reziproken Translokation (Karyotyp: 46,XY,t(10;15)(q25.3;q26.3)); zusätzlich liegt in der TB-Probe eine numerische Aberration (Trisomie 21) vor.

In der Patientengruppe mit habituellen Fehlgeburten (12 Paare, 13 Zyklen) wurden insgesamt 43 Blastozysten untersucht. 18 TB-Proben (41,9 %) waren numerisch normal (euploid), 25 (58,1 %) TB-Proben numerisch aberrant (aneuploid).

Insgesamt sind in beiden Patientengruppen 36 (35,3 %) Blastozysten als normal (euploid oder balanciert) und 66 (64,7 %) als aberrant (unbalanciert, aneuploid oder kombiniert unbalanciert/aneuploid) diagnostiziert worden (Tab. 3).

## Monogene Diagnostik

### Falldarstellungen Spinale Muskelatrophie (SMA)

**Fall 1:** Bei beiden Partnern lag eine heterozygote Deletion der Exons 7 und 8 des SMN1-Gens vor. Zwei IVF/ICSI-Zyklen wurden in einem auswärtigen IVF-Zentrum wegen Endometriosis genitalis externa und Oligoasthenozoospermie durch-

**Tabelle 3:** Array-CGH-Untersuchungen

| | | |
|---|---|---|
| **a) Gesamtergebnis aller untersuchten Blastozysten** | | |
| Biopsierte Blastozysten | 109 | |
| Untersuchte Blastozysten nach Amplifikation | 102 | (93,6 %) |
| DNA nicht amplifizierbar | 7 | (6,4 %) |
| Normal | 36 | (35,3 %) |
| Aberrant (gesamt) | 66 | (64,7 %) |
| Numerisch aberrant | 42 | (63,6 %) |
| Strukturell aberrant | 18 | (27,3 %) |
| Strukturell und numerisch aberrant | 6 | (9,1 %) |
| **b) Reziproke und Robertson'sche Translokationen** | | |
| Biopsierte Blastozysten | 62 | |
| Untersuchte Blastozysten nach Amplifikation | 59 | (95,2 %) |
| DNA nicht amplifizierbar | 3 | (4,8 %) |
| Normal (balanciert) | 18 | (30,5 %) |
| Aberrant | 41 | (69,5 %) |
| Numerisch aberrant | 17 | (41,5 %) |
| Strukturell aberrant | 18 | (43,9 %) |
| Strukturell und numerisch aberrant | 6 | (14,6 %) |
| **c) Habituelle Fehlgeburten** | | |
| Biopsierte Blastozysten | 47 | |
| Untersuchte Blastozysten nach Amplifikation | 43 | (91,5 %) |
| DNA nicht amplifizierbar | 4 | (8,5 %) |
| Normal (euploid) | 18 | (41,9 %) |
| Aberrant (aneuploid) | 25 | (58,1 %) |

geführt. Nach der zweiten Behandlung kam es zu einer Schwangerschaft und Geburt durch Sectio; das Kind ist nach 4 Monaten infolge einer SMA verstorben. Im März 2011 wurde nach dem langen Protokoll eine weitere IVF/ICSI-Behandlung in unserer Einrichtung mit Triptorelin 0,1 mg, follikelstimulierendem Hormon (FSH) mit 225 IE, ab 6. Stimulationstag Mischprotokoll FSH/Menotropin, jeweils 225 IE, vorgenommen. Die Follikelpunktion ergab 16 Eizellen, davon 10 reif, die sich alle imprägnieren ließen. Insgesamt waren die Eizellen grob granuliert und hatten intrazytoplasmatische Einschlüsse. Am Tag 6 erfolgte die Trophoblastbiopsie von 3 Blastozysten, die anschließend vitrifiziert wurden. Das Ergebnis der Multiplex-PCR-Untersuchung und Sequenzierung ergab eine Blastozyste ohne Mutation und eine Blastozyste mit heterozygoter Anlageträgerschaft. Die dritte Probe konnte nicht amplifiziert werden. Im Juni 2011 erfolgte ein artifizieller Kryozyklus mit Östradiol und Progesteron und dem Transfer der beiden transferierbaren Blastozysten. Die Behandlung resultierte in einer klinischen Schwangerschaft. Mit der in der Folge durchgeführten Pränataldiagnostik konnte nachgewiesen werden, dass sich die Blastozyste 2 mit der heterozygoten Anlageträgerschaft implantiert hatte. Das Kind kam am 27.3.2012 gesund zur Welt und war damit das erste in Deutschland geborene Kind nach Trophoblastbiopsie an Blastozysten bei einer monogen vererbten Erkrankung [10] (Abb. 2).

**Fall 2:** Beim dem zweiten Paar gingen anamnestisch ein Schwangerschaftsabbruch und die Geburt eines Kindes voraus, das kurz nach der Entbindung aufgrund der Spinalen Muskelatrophie verstarb. Nach dem Transfer von 2 mutationsfreien Blastozysten stellte sich eine dichoriale, diamniote Geminigravidität ein. Die Schwangerschaft verlief ohne Komplikationen. Die Geburt von zwei gesunden Kindern erfolgte in der 39. SSW.

## Schwangerschaftsrate nach Transfer von biopsierten und vitrifizierten Blastozysten

Nach bisher 26 durchgeführten Embryotransfers bei 29 Patienten aus 40 Behandlungszyklen wurden 14 klinische Schwangerschaften/Transfer erzielt (53,8 %, Tab. 4). Bei 8 Patienten (27,6 %) konnte aufgrund des genetischen Status der Blastozyste kein Embryotransfer vorgenom-

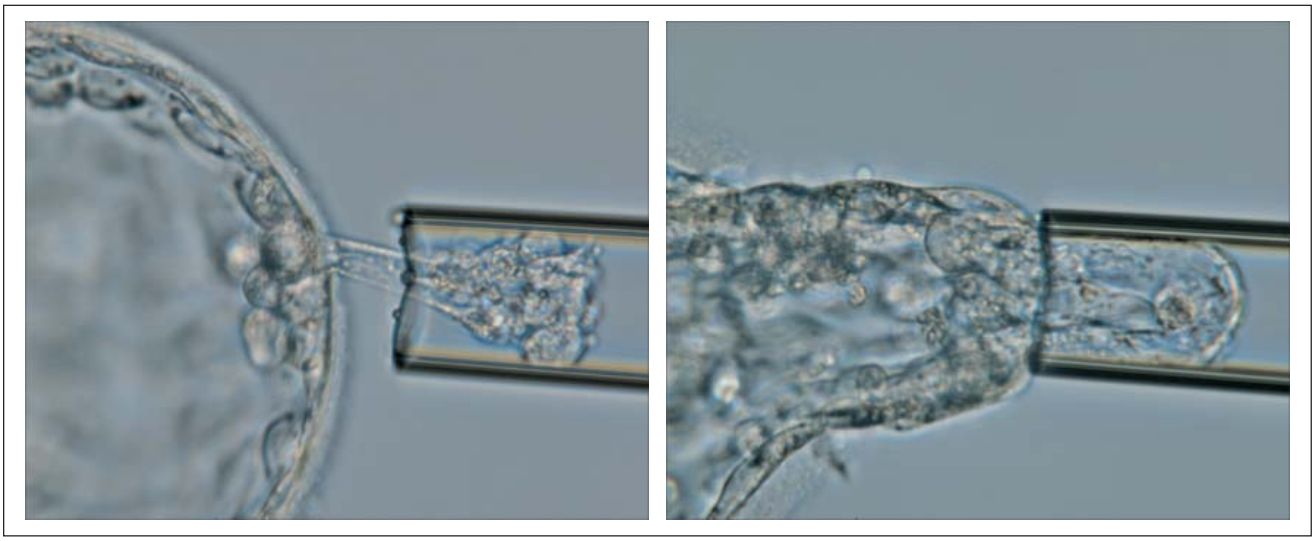


**Abbildung 2:** Trophoblastbiopsie der Blastozysten 1 **(links)** und 2 **(rechts)** am Tag 6; 400-fache Vergrößerung. Aus [10].

**Tabelle 4:** Schwangerschaftsraten nach PID und Vitrifikation

| | | |
|---|---|---|
| Embryotransfer/Patient (29) | 21 | (72,4 %) |
| Patienten ohne Transfer | 8 | (27,6 %) |
| Embryotransfers/Behandlungszyklen (40) | 26 | (65 %) |
| **Schwangerschaften/Embryotransfer (26)** | **14** | **(53,8 %)** |
| Implantationsrate | | 54,5 % |
| Geburten | 12 | |
| Kinder | 16 | |
| davon Zwillinge | 4 | |
| Aborte | 2 | (14,3 %) |
| Lebendgeburtenrate/Transfer | | 46,2 % |

men werden. Die Implantationsrate betrug insgesamt 54,5 %. Bei 2 Schwangerschaften kam es in der 7. und 8. Schwangerschaftswoche zum Abort (Abortrate 14,3 %). Bei einem der Aborte konnte eine Chromosomenanalyse erfolgen, die einen balancierten Karyotyp ergab, beim zweiten Abort handelte es sich um eine Extrauteringravidität. Die Lebendgeburtenrate/Transfer betrug 46,2 % (Tab. 4), 12 Patienten wurden von 16 Kindern entbunden. Den schwangeren Frauen wurde eine Pränataldiagnostik empfohlen und auf die postnatale Untersuchung der Kinder hingewiesen.

## Diskussion

Eine PID erfordert die verlässliche Zusammenarbeit von Reproduktionsmedizin und Humangenetik, wobei der wesentliche Anteil eines IVF-Labors reproduzierbare Ergebnisse der Blastozystenkultur, der Trophoblastbiopsie und der Vitrifikation von Blastozysten ausmacht. Das humangenetische Labor etabliert die auf jedes Paar individuell abgestimmte genetische Diagnostik monogen vererbter Erkrankungen. Die molekulare Karyotypisierung mittels Array-CGH zur Untersuchung chromosomaler Aberrationen wird seit 2010 im Rahmen der PID international eingesetzt; erste Studien belegen die hohe Sensitivität dieser Methode [7, 11]. Ziel der vorliegenden Studie war die deskriptive Bewertung aller Teilbereiche einer PID.

### Trophoblastbiopsie

Die Trophoblastbiopsie hat zu gewährleisten, dass die Entnahme weniger Trophoblastzellen schnell und atraumatisch erfolgt [5]. Aus reproduktionsmedizinischer Sicht ist eine optimale Kultivierung imprägnierter Eizellen bis zum Tag 5 entscheidend, um entwicklungsfähige Blastozysten für einen Embryotransfer zu erhalten. Unter Verwendung des EmbryoScopes™ konnten 47,7 % aller Vorkernstadien erfolgreich zu expandierten Blastozysten kultiviert werden; in der Literatur werden Raten zwischen 21 % und 58 % genannt [12, 13]. Blastozysten mit regelrecht ausgebildetem Trophoblast (Grad A oder B) sind die Voraussetzung für eine Trophoblastbiopsie mit anschließender genetischer Diagnostik. McArthur et al. [20] berichten von 93 %, Liu et al. [21] von 96 % Trophoblastbiopsien, bei denen eine PID durchgeführt wurde. Im Rahmen unserer Studie sind 102 von 109 Trophoblastbiopsien (93,6 %) erfolgreich untersucht worden; von 6,4 % der Proben konnte nicht ausreichend DNA für eine PID amplifiziert werden.

### Vitrifikation

Eine wesentliche Voraussetzung für einen erfolgreichen Embryotransfer ist die Gewährleistung einer guten Entwicklungspotenz der Blastozysten [14]. Häufig sind die Blastozysten erst am Tag 6 für eine Biopsie geeignet, ohne dadurch in ihrer Entwicklung eingeschränkt zu sein. Der Vorteil der Vitrifikation ist ein analytischer Zeitgewinn, der einen Embryotransfer in einem Folgezyklus ermöglicht. Nahezu alle Blastozysten in der vorliegenden Studie wurden nach der TBB am Tag 5 vitrifiziert. Es war kein Verlust von Blastozysten durch die Vitrifikation zu verzeichnen. Publizierte Daten beschreiben bis zu 90 % vitale Blastozysten nach dem Auftauen [15, 16].

### Array-CGH

In experimentellen Studien zur Aneuploidiediagnostik an Polkörpern [17] und Blastomeren [18] wurde die vergleichsweise zeitaufwändige vergleichende Genomhybridisierung (CGH) von Metaphasechromosomen bereits im Jahr 2000 eingesetzt. Die Array-basierte CGH an einer einzelnen oder wenigen Zellen ist eine effektive Weiterentwicklung der Methodik [19], die zuverlässige Ergebnisse innerhalb einer kurzen Analysezeit (< 12 Stunden) liefert und daher im Rahmen einer PID Anwendung findet. Andere Methoden, wie z. B. die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), wurden dadurch weitestgehend abgelöst. Die Array-CGH nach TBB erwies sich in dieser Studie als optimale Methode zur Untersuchung des embryonalen Karyotyps bei Paaren mit balancierten reziproken Translokationen oder Robertson'schen Translokationen. Unbalancierte Chromosomenveränderungen konnten in den untersuchten Trophektodermproben zweifelsfrei mit hoher Sicherheit nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Embryonen von Paaren mit balancierten Chromosomenveränderungen in hohem Maße auch Aneuploidien von Chromosomen aufwiesen, die nicht die Translokationschromosomen betreffen. Publikationen beschreiben Aneuploidieraten mit embryonalen Auffälligkeiten zwischen 50 und 70 %. Die unterschiedlichen Raten sind dabei jeweils abhängig von der Indikationsstellung [21–23]. Die mit Array-CGH ermittelte Aneuploidierate unserer Studie betrug 64,7 %. Im Vergleich zu den genannten Publikationen wurde damit eine vergleichbare Rate chromosomaler Fehlverteilungen nachgewiesen. Publizierte Daten berichten über Schwangerschaftsraten nach Array-CGH bis zu 70 % [7, 9, 20, 21]. Die von uns erreichte Schwangerschaftsrate von 53,8 % ist mit den Befunden von Hodes-Wertz [24], die eine Schwangerschaftsrate von 55 % nach Array-CGH veröffentlicht haben, nahezu vergleichbar.

### Monogene Diagnostik

Die Untersuchung von Trophoblastzellen für die monogene Diagnostik zweier Paare mit spinaler Muskelatrophie hat gezeigt, dass die PID nach TBB grundsätzlich mit sehr hoher Sicherheit möglich ist. Im Gegensatz zur Polkörperuntersuchung, bei der durch einen indirekten Nachweis nur die mütterliche Mutation untersucht werden kann, hat die Untersuchung von Blastozysten den Vorteil, dass die väterlichen und mütterlichen genetischen Veränderungen direkt untersucht werden können.

Darüber hinaus werden bei der PID nach TBB mehr Zellen innerhalb einer Probe

untersucht und damit die diagnostische Sicherheit deutlich erhöht. Bei einer Einzelzell-PCR, wie bei der Polkörperdiagnostik, kann es in ca. 10–20 % der Fälle zu einem Allelic-Dropout (ADO) kommen und bei unerkanntem ADO zu Fehldiagnosen führen.

## Originalität

Wir bestätigen, dass die vorliegende Arbeit noch nicht publiziert oder zur Publikation angenommen wurde und bei keiner anderen Zeitschrift eingereicht ist. Alle Autoren waren an der Arbeit beteiligt und haben ihr Einverständnis zur letzten Version gegeben.

## Interessenkonflikt

Die Autoren geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht. Die Firma Ferring Arzneimittel GmbH hat die vorliegende Arbeit finanziell unterstützt.

Bei beiden Einrichtungen handelt es sich um private Zentren. Die mit Index versehenen Mitautoren sind Angestellte dieser Praxen.

Frau Dr. med. Claudia Gaßner ist Partnerin der BGB-Gesellschaft KITZ-Regensburg.

Frau Prof. Dr. med. Dipl. chem. Elke Holinski-Feder ist Inhaberin des MGZ.

## Relevanz für die Praxis

Die von uns dargestellten Ergebnisse belegen eindrucksvoll, dass alle Teilbereiche der PID mit Blastozystenkultivierung, TBB, Vitrifikation, monogener Diagnostik und Array-CGH aus Sicht der Reproduktionsmedizin und Molekulargenetik erfolgreich etabliert werden konnten. Das zum Nachweis chromosomaler Aberrationen ausschließlich verwendete Array-Format 24sure+ zeigte, dass auch sehr kleine strukturelle Aberrationen mit dieser Technik nachzuweisen sind. Die in Abbildung 1 dargestellte partielle Trisomie der Chromosomenregion 15q26.3 hat eine Größe von etwa 0,5 Megabasen, was der Nachweisgrenze der FISH-Diagnostik in den Subtelomerbereichen der Chromosomen entspricht, sodass für die überwiegende Mehrheit der unbalancierten strukturellen Chromosomenaberrationen eine Array-CGH Anwendung finden kann.

Die PID eignet sich als diagnostische Maßnahme für Paare, bei denen aufgrund einer familiären Prädisposition ein hohes Risiko für Kinder mit einer schweren monogen vererbten Erkrankung oder einer Chromosomenaberration vorliegt. Auch bei Frauen mit wiederholten Fehlgeburten, die auf chromosomale Fehlverteilungen zurückzuführen sind, kann die PID helfen, den Transfer von Embryonen mit Chromosomenaberration zu vermeiden [25]. Eine erfolgreiche Durchführung der PID ist nur dann mit hoher Sicherheit zu gewährleisten, wenn eine entsprechend große Erfahrung sowohl im reproduktionsmedizinischen als auch im humangenetischen Zentrum vorliegt und nachgewiesen werden kann. Eine enge Kooperation zwischen den beteiligten Zentren ist dabei eine unabdingbare Voraussetzung für eine optimale Patientenversorgung. Konzepte zur Pränataldiagnostik sowie zu gezielten Vorsorgeuntersuchungen der Neugeborenen sind dabei wichtige Bestandteile einer umfassenden Präimplantationsdiagnostik.

**Literatur:**


1. Hehr A, Paulmann B, Seifert B, Hehr U. Präimplantationsdiagnostik für monogen vererbte Erkrankungen. medgen 2011; 23: 469–78.
2. Montag M, Isachenko E, van der Ven K, Dorn C, Isachenko V, van der Ven H. Technischer und zeitlicher Ablauf der Polkörperpräparation mit anschließender Aneuploidiediagnostik. medgen 2004; 16: 404.
3. Hehr A, Gross C, Bals-Pratsch M. Polkörperdiagnostik für monogene Erkrankungen als deutsche Alternative zur Präimplantationsdiagnostik. In: Felberbaum RE, Bühler K, Ven H van der (Hrsg). Das Deutsche IVF-Register 1996–2006. 10 Jahre Reproduktionsmedizin in Deutschland. Springer, Berlin, 2006; 97–101.
4. Mayer V, Schoen U, Holinski-Feder E, Koehler U, Thalhammer S. Single cell analysis of mutations in the APC gene. Fetal Diagn Ther 2009; 26: 148–56.
5. Koehler U, Schön U, Mayer V, Stegerer A, Sendelbach K, et al. Preimplantation genetic diagnosis for monogenic diseases and chromosomal aberrations after trophectoderm biopsy – results from 2010 to 2011. Eur J Hum Genet 2012; 20: 140.
6. Koehler U, Schön U, Mayer V, Holinski-Feder E. Preimplantation genetic diagnosis for monogenic disorders and chromosomal rearrangements – the German perspective. J Reproduktionsmed Endokrinol 2013; 10 (Special Issue 1): 36–42.
7. Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X, et al. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with Array-CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. Mol Cytogenet 2012; 5–24.
8. Schön U, Koehler U, Mayer V, Stegerer A, Sendelbach K, et al. Increased pregnancy rates after trophectoderm biopsy for PGD of monogenic diseases and chromosomal aberrations. Reprod BioMed Online 2012; 24: 55–6.
9. Fragouli E, Katz-Jaffe M, Alfarawati S, Stevens J, Colls P, et al. Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure. Fertil Steril 2010; 94: 875–87.
10. Seifert B, Schön U, Paulmann B, Seifert D, Hehr A, et al. Diagnostik der spinalen Muskelatrophie Typ 1 (SMA1) durch Trophektodermbiopsie von Blastozysten. J Reproduktionsmed Endokrinol 2011; 8: 335.
11. Scott Jr RT, Ferry K, Su J, Tao X, Scott K, Treff NR. Comprehensive chromosome screening is highly predictive of the reproductive potential of human embryos: a prospective, blinded, nonselection study. Fertil Steril 2012; 97: 870–5.
12. Krüssel J, Hirchenhain J, Bender H. Blastozystenkultur: Pro und Contra. Der Gynäkologe 2004; 37: 696–700.
13. Papanikolaou EG, Kolibianakis EM, Tournaye H, Venetis CA, Fatemi H, et al. Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. Hum Reprod 2008; 23: 91–9.
14. Ku PY, Lee RK, Lin SY, Lin MH, Hwu YM. Comparison of the clinical outcomes between fresh blastocyst and vitrified-thawed blastocyst transfer. J Assist Reprod Genet 2012; 29: 1353–6.
15. Liebermann J, Nawroth F. Kryokonservierung. In: Diedrich K, Ludwig M, Griesinger G (Hrsg). Reproduktionsmedizin. Springer, Berlin, 2013; 236–40.
16. Van Landuyt L, Verpoest W, Verheyen G, De Vos A, Van de Velde H, et al. Closed blastocyst vitrification of biopsied embryos: evaluation of 100 consecutive warming cycles. Hum Reprod 2011; 26: 316–22.
17. Wells D, Delhanty JD. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. Mol Hum Reprod 2000; 6: 1055–62.
18. Voullaire I, Slater H, Williamson R, Wilton L. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using whole comparative genome hybridization. Hum Genet 2000; 106: 210–7.
19. LeCaignac C, Spits C, Sermon k, De Rycke M, Thienpont B, et al. Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH. Nucleic Acid Res 2006; 34: e68.
20. McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, de Boer KA, Jansen RP. Pregnancies and live births after trophectoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. Fertil Steril 2005; 84: 1628–36.
21. Liu J, Wang WH, Sun X, Liu L, Jin H, et al. DNA microarray reveals that high proportions of human blastocysts from women of advanced maternal age are aneuploid and mosaic. Biol Reprod 2012; 87: 1–9.
22. Munne S, Chen S, Fischer J, Colls P, Zheng X, et al. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. Fertil Steril 2005; 84: 331–5.
23. Mertzanidou A, Wilton L, Cheng J, Spits C, Vanneste E, et al. Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. Hum Reprod 2013; 28: 256–64.
24. Hodes-Wertz B, Grifo J, Ghadir S, Kaplan B, Laskin CA, et al. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. Fertil Steril 2012; 98: 675–80.
25. Suttner R, Shakeshaft D, Koehler U, Schön U, Harasim T, et al. First experiences with PGD after trophectoderm biopsy at Kinderwunsch Centrum Munich (KCM), Germany. Reprod BioMed Online 2012; 24: 48.

# Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

**☑ Medizintechnik-Produkte**

Neues CRT-D Implantat
Intica 7 HF-T QP von Biotronik

Artis pheno
Siemens Healthcare Diagnostics GmbH

Philips Azurion:
Innovative Bildgebungslösung

Aspirator 3
Labotect GmbH

InControl 1050
Labotect GmbH

## e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

**☑ Bestellung e-Journal-Abo**

**Haftungsausschluss**

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

**Impressum** **Disclaimers & Copyright** **Datenschutzerklärung**