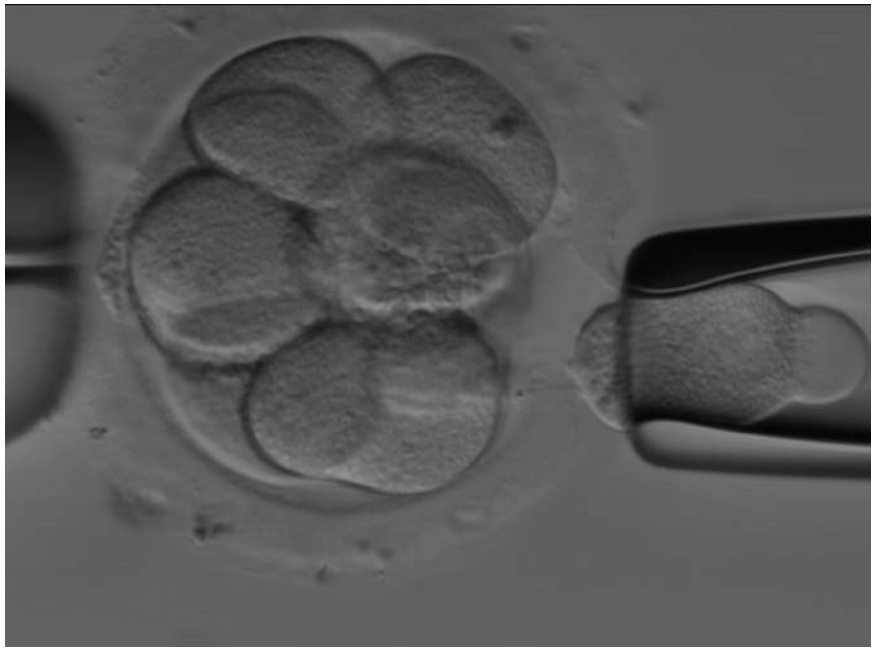
PGD TÄNÄÄN – TEORIA JA KÄYTÄNTÖ

Christel Hydén-Granskog
HUS/HYKS, Naistenklinikka

Sisältö

- Biopsia-menetelmät
- Analyysimenetelmät
  - Vanhat menetelmät
    - FISH ja PCR
  - Uudet menetelmät
    - CGH ja sirutekniikka
- HUS/HYKS
  - Tulokset

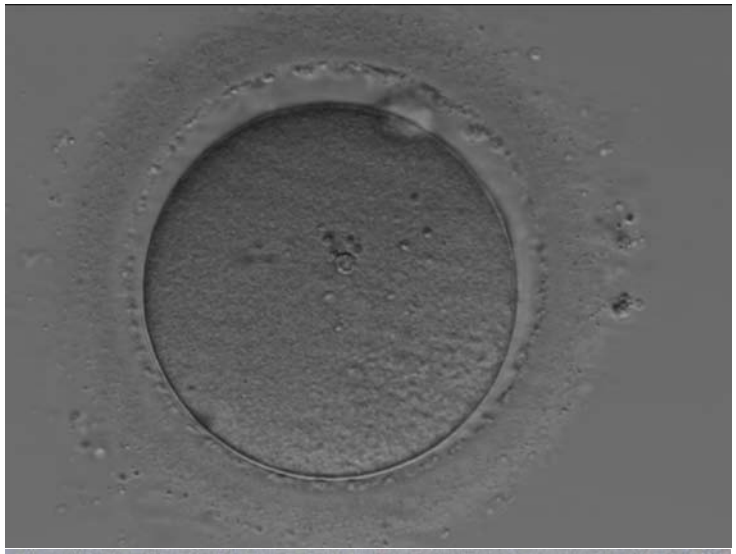
Biopsia pv 3



- Tavallisin
- Ca ja Mg vapaa viljelyliuos
- Reikä zonaan
  - Aikaisemmin Tyrodes solution
  - Nyt useimmiten laserilla
- 1-2 solua poistetaan -> FISH tai PCR
- Ongelmat: haittaako biopsia?

Poistosolu (polarbody, PB) biopsia

- Ainoastaan äidin kromosomit tutkitaan
- Aikaisemmin käytetty ainoastaan muutamassa paikassa
  - Lait (Saksa, Sveitsi, Itävalta)
  - Aneuploidia screening
- Molemmat poistosolut otetaan
  - Samaan aikaan (biopsia x1) vai eri aikaan (biopsia x2)



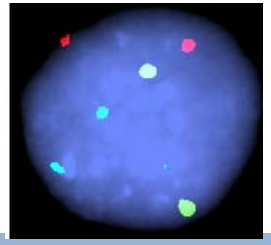
Blastokystibiopsia

- Ollut käytössä muutamassa paikassa, yleistymässä
- Reikä zonaan, muutama tunnin kuluttua, TE-soluja ulkopuolella (vrt hatching), otetaan talteen laserin avulla
- 5-10 solua – alkumateriaali suurempi, diagnoosi luotettavampi
- Analyysi pitää olla nopea tai sitten pakastus (vitrifikaatio) biopsian jälkeen

FISH (fluoresenssi in situ-hybridisaatio)

- Kromosomipoikkeavuudet
  - Translokaatiot
  - Inversiot
- Sukupuolen valinta
- PGS (Aneuploidy screening)
  - Äidin ikä
  - Monta keskenmenoa
  - RIF
  - Vaikeat oligozoospermia tapaukset
  - Alkion valinta (SET)

FISH - ongelmat



- Kaikkia kromosomia ei voida tutkia
- Alkioiden mosaikismi
- Solua ei aina löydy lasilta
- Tulkintavaikeuksia
- Hybridisaatio ongelmia

Aneuploidy screening (PGS)

- Ensimmäiset julkaisut; PGS kannattaa
  - Monessa ”endpoint” raskaus, ei synnytys
- Randomisoidut tutkimukset (11 kpl)
  - Tarkoitus parantaa PR
  - 2 ryhmää; 1. PGS, 2. ilman PGS
  - PR pienempi PGS-ryhmässä
  - Enemmän keskenmenoja / vähemmän synnytyksiä
  - Osa tutkimuksista keskeytettiin
- PGS ei kannata tehdä FISH:llä

PCR (Polymerase Chain Reaction)

- Perinnölliset taudit
  - >200 tautia tutkittu
  - Tavallisimmat taudit
    - Cystic Fibrosis
    - Myotonica Dystrophia, Huntington
    - Fragile X, Duchenne

PCR

- Yleisin nykyisin: Fluoresoiva multiplex PCR, myös muita menetelmiä käytössä
- Koko genomin monistus (WGA) vaaditaan osassa käytössä olevissa menetelmissä, esim minisekvensointi
- Suora menetelmä: mutaatio
  - Jokaista mutaatiota varten oma menetelmä -> menetelmän kehittäminen voi viedä kauan
- Epäsuora menetelmä: kytkentä analyysi polymorfisten markkereiden avulla
  - Samat markkerit voidaan käyttää eri perheissä
  - Vähintään kaksi markkeria pitää käyttää

PCR:n ongelmat

- KONTAMINAATIOT
  - Siittiöt, cumulus-solut jne
- Allele-drop out (ADO)/Epätasainen monistus
- Menetelmät parannetaan
  - Koko genomin monistus (WGA)
  - Uusia menetelmiä otetaan käyttöön , esim RT-PCR, siruteknologia

Uudet menetelmät

- Single-cell Whole Genome Amplification (WGA)
- Comparative Genome Hybridisation (CGH)
  - mCGH
- Array (mikrosiru) teknologia
  - CGH arrays (aCGH)
  - SNP arrays (Single Nucleotide Polymorphism)

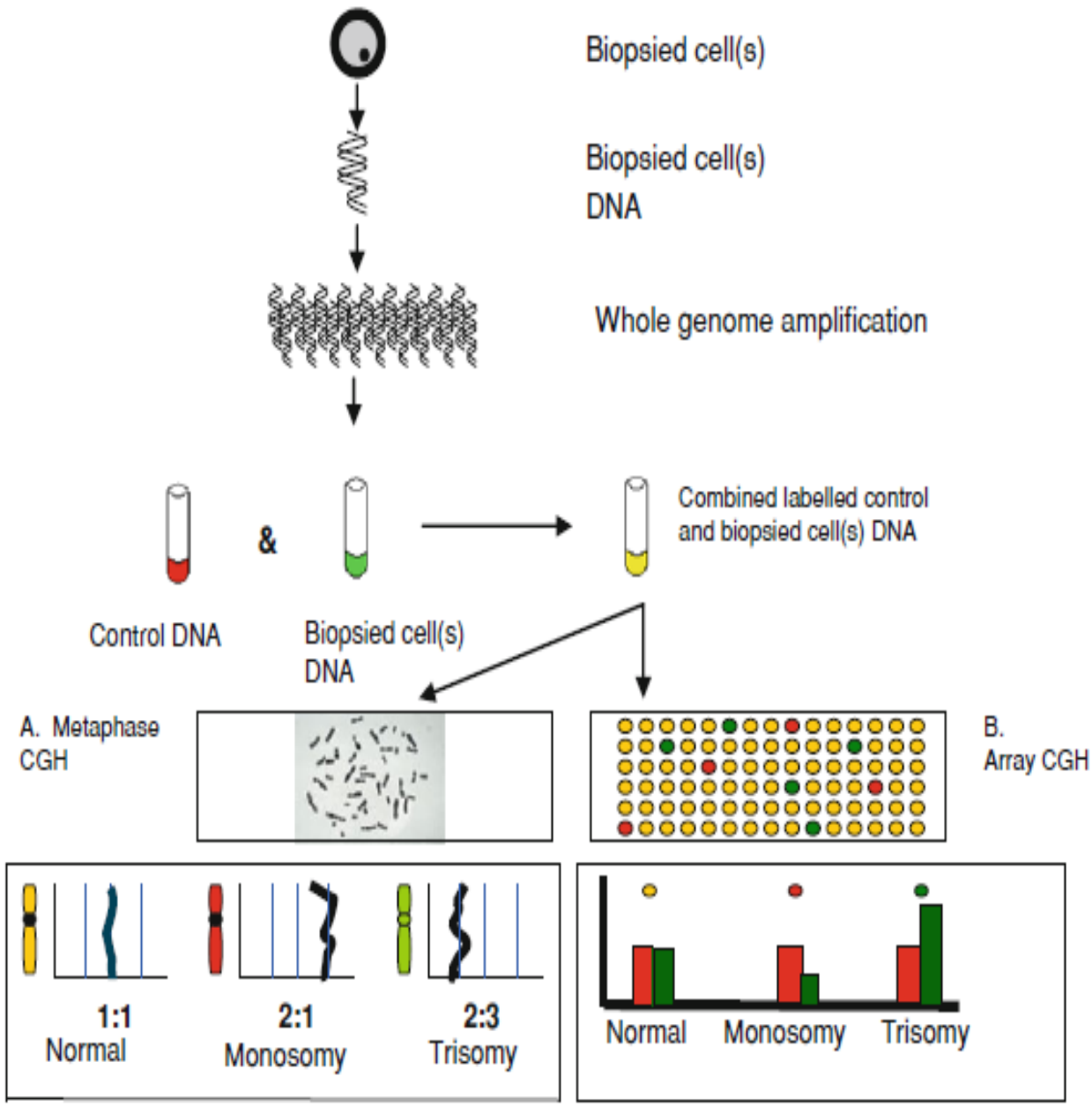
Whole genome amplification (WGA)

- Koko genomin monistus-tekniikalla yhdestä solusta saadaan periaatteessa riittävästi materiaalia mitä tahansa DNA-analyysiä varten
- Ensimmäiset menetelmät olivat epätarkat
  - DNA:n monistus epätasainen
- Nykyiset menetelmät
  - Paremmat, mutta edelleen ADO
  - Alkumateriaali pitää olla puhdasta, KONTAMINAATIO

Comparative Genome Hybridisation (CGH)

- Vertaileva genominen hybridisaatio (Kallioniemi et al. 1992)
- Käytetty useita vuosia syöpädiagnostiikassa
- Kaikki kromosomit tutkitaan
- Sama menetelmä voidaan käyttää monessa perheessä
- Ongelmat ovat olleet: analysointi pitkä (> 72 tuntia) ja hinta
  - Nyt analysointi aika 12-13 tuntia

Fig. 1 Comparative genomic hybridisation *A*. metaphase CGH and *B* array CGH. First, the biopsied material undergoes whole genome amplification and the embryonic DNA is labelled in green fluorescence. A control sample is labelled in red fluorescence. The samples are then co-hybridised onto either *A* a metaphase spread or *B* an array platform. In both cases, a computer analyses the ratio of *red*-to-*green* fluorescence. Courtesy of Thalia Mamas and Leoni Xanthopoulou, UCL Centre for PG&D, UCL, Adapted from Harper and Harton 2010



SNP-arrays

- Voidaan tutkia perinnölliset taudit (kytkentäanalyysi) ja kromosomit samanaikaisesti
  - geneettisesti terve alkio, jolla normaali karyotyyppi
- Ehto: puolisoiden ja lasten tutkimista (miel. sairaan lapsen)
  - myös muita sukulaisia (isovanhemmat)
- Lopputuloksena: paljon tietoa, myös muista geeneistä
  - Alkioista, mutta myös vanhemmista
  - Perinnöllisyysneuvonta haastava
- Kallis ja aikavievä menetelmä, analysointi vaikea
- SNP-siruja myydään jo esim. translokaatioiden tutkimista varten

Naistenklinikan tulokset

- PGD aloitettu v. 2000
- **PCR**
  - Perinnölliset taudit: DM, FRAXA, INCL, CNF
  - Menetelmät: Fluoresoiva PCR tai WGA ja minisekvensointi
- **FISH**
  - Indikaatiot: translokaatiot sukupuolen valinta
- Useimmiten siirretty yksi alkio
- Jos enemmän normaaleja alkioita, alkiot viljelty blastokysti-vaiheeseen ja pakastettu

	PCR	FISH	Sulatus
OPU(biopsia tehty)/sulatus	33	97	32
Siirtoja	30 (90.9%)	81 (83.5%)	29 (90.6%)
- normaali(t) alkio(t) siirretty	30	71 (73.2%)	
- Ei tulosta alkio siirretty		10 (10.3%)	
KI raskaus (PR)	6 (20%)	18 (22.2%)	3 (10.3%)
Synnytys + on-going raskaus (DR)	5 (16.7%)	12 + 1 (16.0%)	3 (10.3%)
Lasta	5*	15	3

* 1 sairas

Tulevaisuus

- Biopsia: blastokysti-biopsia yleistymässä nopeasti
  - vitrifikaatio
- FISH jää pois
  - myös Naistenklinikka aloittaa sirujen testaamista
- SNP-siruja otetaan käyttöön
  - Enemmän tauteja pystytään diagnosoimaan, mutta alkioista saadaan paljon tietoa
- PGS sirutekniikan avulla –
  - randomisoituja tutkimuksia tarvitaan