



## PKD und PID - Liegt wirklich alles in den Genen?

Dr. rer. nat. Melanie Rickert-Föhring  
Reproduktionsbiologin (AGRBM)

Kinderwunschpraxis an der Promenade  
GMP Mempel und Stratmann  
Von-Vincke Straße 14  
48143 Münster



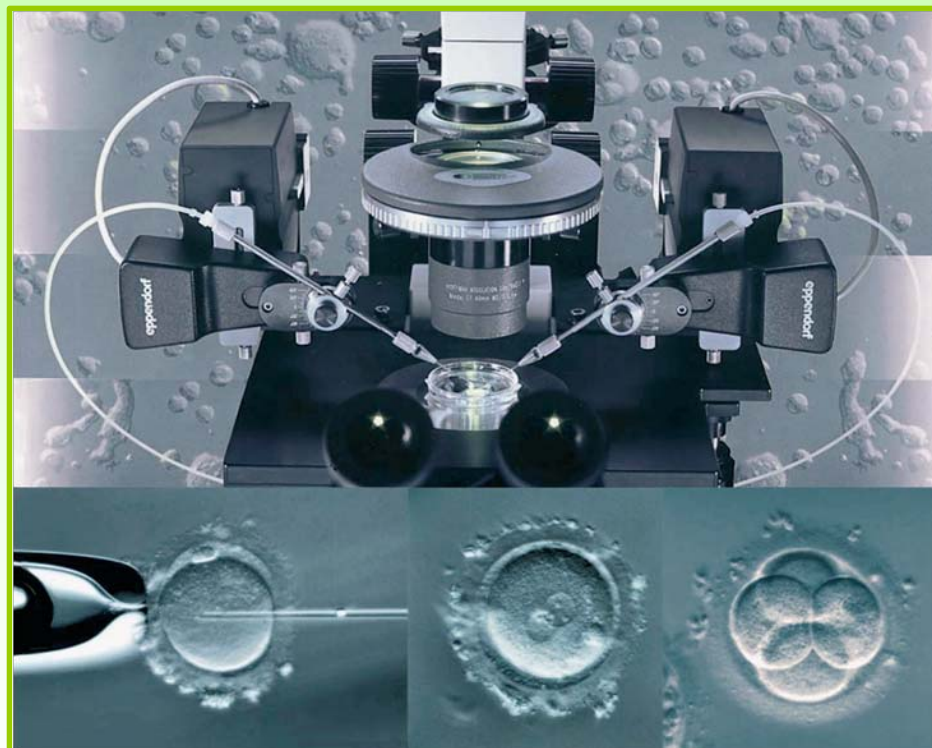
**PKD und PID -  
Liegt wirklich alles in den Genen?  
oder  
Auch Eizellen und Spermien schaut man nur  
vor den Kopf.....**

Dr. rer. nat. Melanie Rickert-Föhring  
Reproduktionsbiologin (AGRBM)

Kinderwunschpraxis an der Promenade  
GMP Mempel und Stratmann  
Von-Vincke Straße 14  
48143 Münster



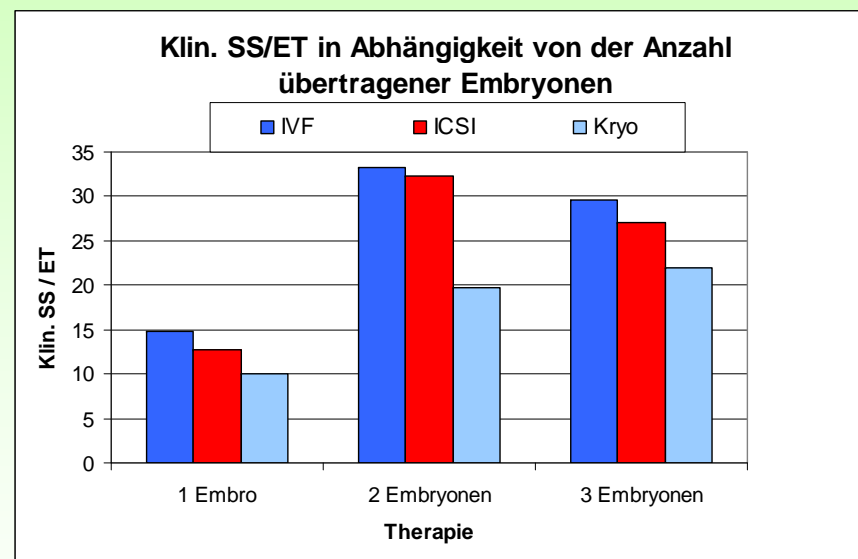
## Warum benötigen wir genetische Diagnostik an Keimzellen?





## Warum benötigen wir genetische Diagnostik an Keimzellen?

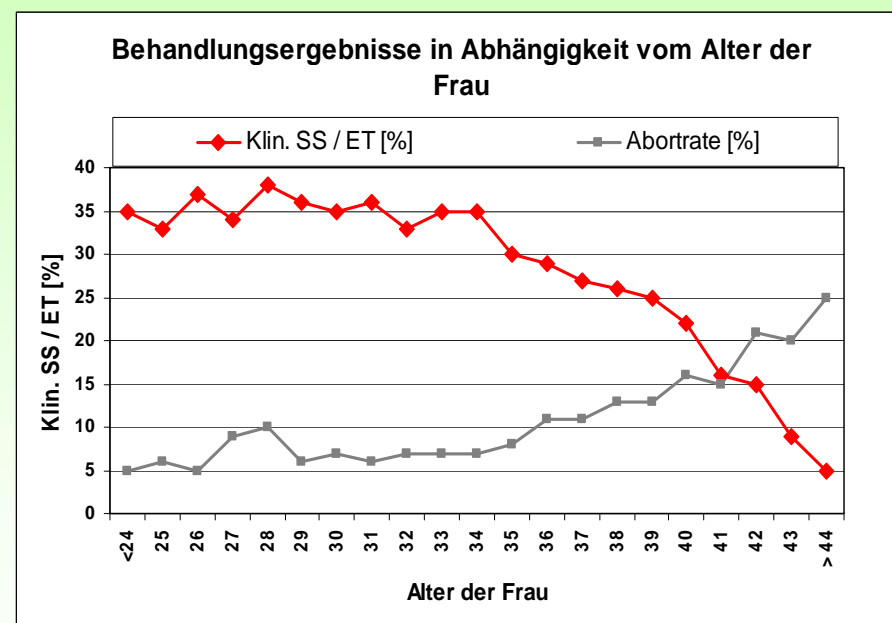
- Hohe Therapiekosten, vergleichsweise niedriger Wirkungsgrad



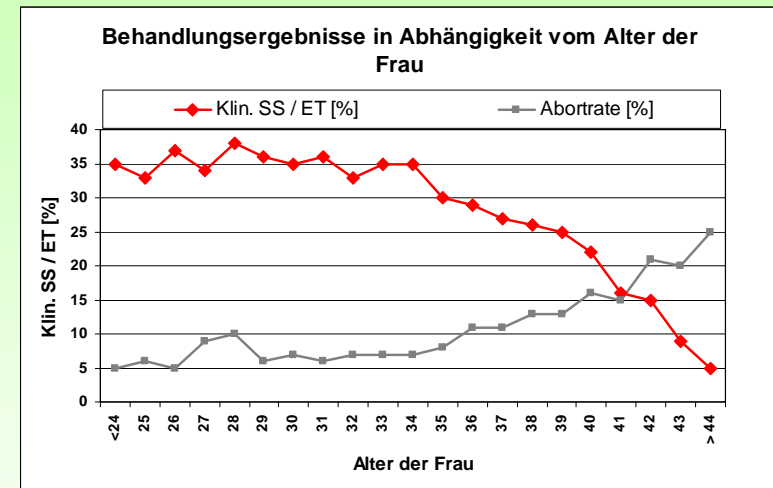
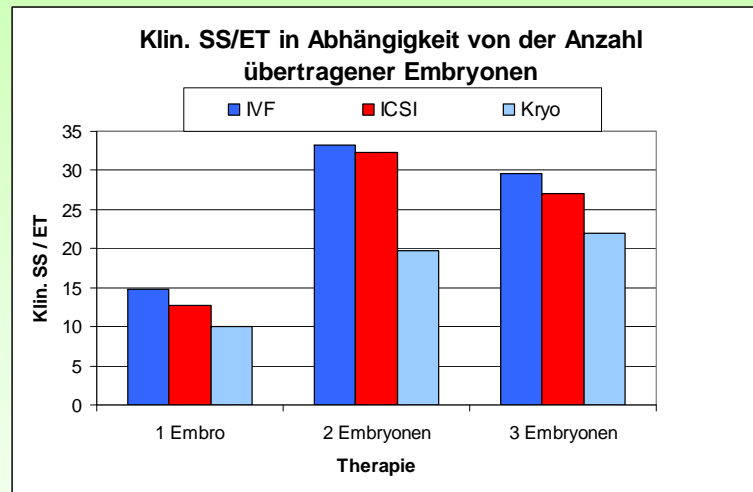


## Warum benötigen wir genetische Diagnostik an Keimzellen?

- Hohe Therapiekosten, vergleichsweise niedriger Wirkungsgrad
- Zunehmendes Alter der Patientinnen bei Behandlungsbeginn
- Erhöhte Fehlbildungs- und Abortraten bei Patientinnen >38 Jahre



## Warum benötigen wir genetische Diagnostik an Keimzellen?



Bedarf an Diagnostik, um das Fehlbildungs- und Abortrisiko zu minimieren

im **Vorfeld** des Embryotransfers



## Indikationen für genetische Diagnostik an Keimzellen

- Mehrere Aborte in der persönlichen Krankengeschichte
- Vorausgegangene Aneuploidien (durch PKD/Abortanalyse gesichert)
- Mehrere erfolglose ICSI-/IVF-Zyklen mit Embryotransfer
- Mütterliches Alter > 38 Jahre
- Sonderfälle Translokation, monogenetische Erkrankung



## Der deutsche Weg: Bis hierhin und nicht weiter!

Reglementierung durch das  
**Gesetz zum Schutz des Embryos (Embryonenschutzgesetz, ESchG)**  
im Sinne eines Strafgesetzes:

### Embryonenschutzgesetz (EschG) § 8 - Begriffsbestimmung

(1) Als Embryo im Sinne dieses Gesetzes gilt bereits die befruchtete, entwicklungsfähige menschliche Eizelle vom Zeitpunkt der Kernverschmelzung an....[...]





## **Der deutsche Weg: Bis hierhin und nicht weiter!**

Reglementierung durch das  
**Gesetz zum Schutz des Embryos (Embryonenschutzgesetz, ESchG)**  
im Sinne eines Strafgesetzes:

### **Embryonenschutzgesetz (ESchG) § 8 - Begriffsbestimmung**

(1) Als Embryo im Sinne dieses Gesetzes gilt bereits die befruchtete, entwicklungsfähige menschliche Eizelle vom Zeitpunkt der Kernverschmelzung an....[...]

**Die einzige in Deutschland gesetzeskonforme Methode der Präimplantationsdiagnostik ist die Polkörperdiagnostik (PKD)**



## Was kann die Polkörperdiagnostik ?

- Diagnostik des chromosomalen Materials der Polkörper
- Anhand des Resultats indirekter Rückschluss auf die chromosomale Ausstattung der befruchteten Eizelle
- Diagnostik chromosomaler Fehlverteilungen



## Was kann die Polkörperdiagnostik

- Diagnostik des chromosomalen Materials der Polkörper
- Anhand des Resultats indirekter Rückschluss auf die chromosomale Ausstattung der befruchteten Eizelle
- Diagnostik chromosomaler Fehlverteilungen

## Warum ist die Polkörperdiagnostik machbar?

Durchführbarkeit nur deswegen möglich, weil Polkörperchen nach der Meiose von der Eizelle exkludiert werden.



Germinal  
Vesicle



MI  
primäre  
Oocyte



MII  
sekundäre  
Oocyte



[Video Meiose](#)



## Polkörperdiagnostik

### Definition

Analyse der in den Polkörperchen enthaltenen, aus der Meiose der Eizellen stammenden Chromosomen

### Ziel:

Analyse der numerischen Verteilung der Chromosomen in den zwei Polkörperchen einer (befruchteten) Eizelle

Indirekte Erkennung numerischer chromosomaler Fehlverteilungen in der befruchteten Eizelle

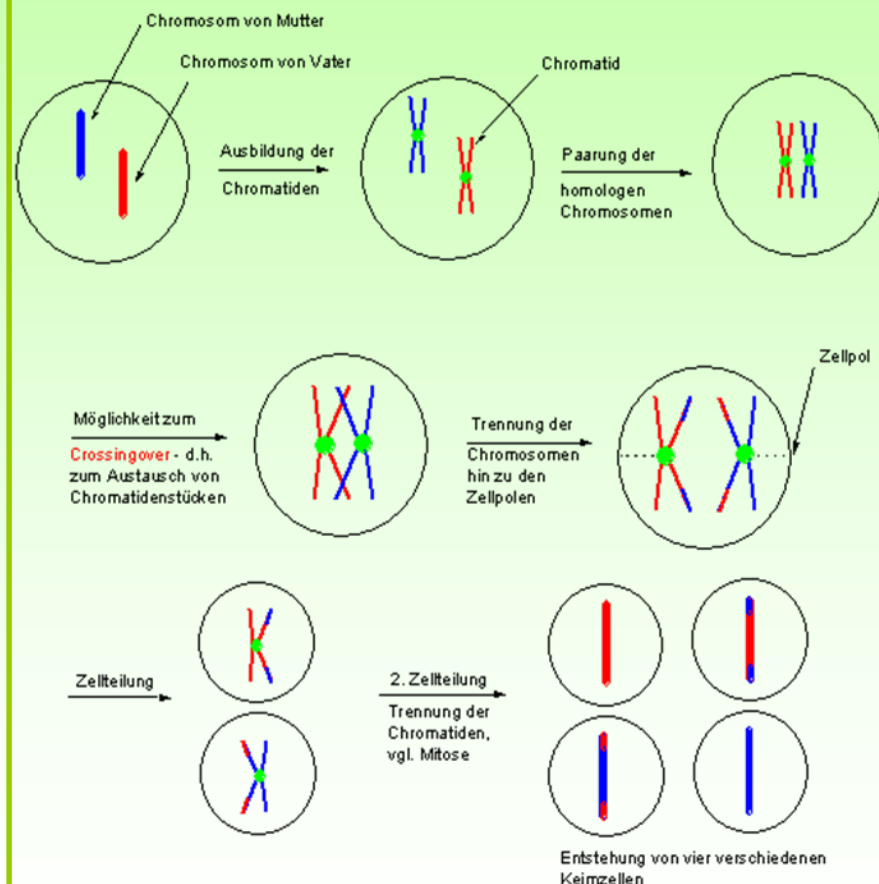
### Prinzip:

A) Markierung der Chromosomen durch Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH) an 5 bis 6 Chromosomen in den Polkörperchen.

B) Quantitative DNA Amplifikation mittels RT PCR

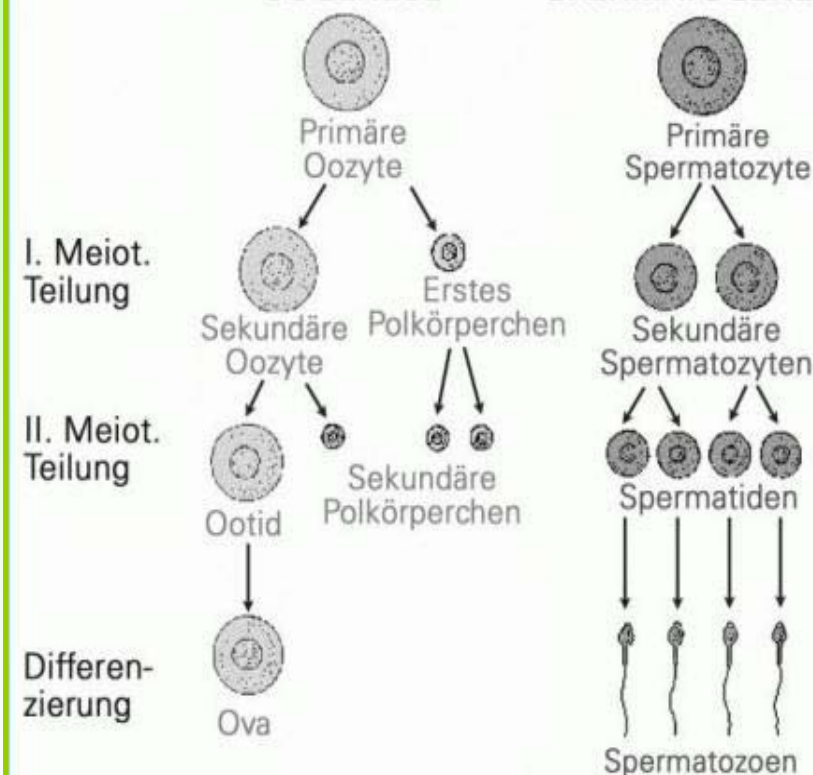
# Keimzellbildung

## Meiose



## OOGENESE

## SPERMATOGENESE



Binkert F Journal für Fertilität und Reproduktion 2006; 16 (4) (Ausgabe für Schweiz): 7-12 ©



Ovulation

Meiose I  
1. PK

Meiose II  
2. PK

ICSI

PN Check

Biopsie

Befund  
übermittlung

Zygote  
(Auflösen der  
Kernmembranen)

=

Embryo  
i.S.d. ESchG

1. Mitose

9:00  
Uhr

15:00  
Uhr

7:00  
Uhr

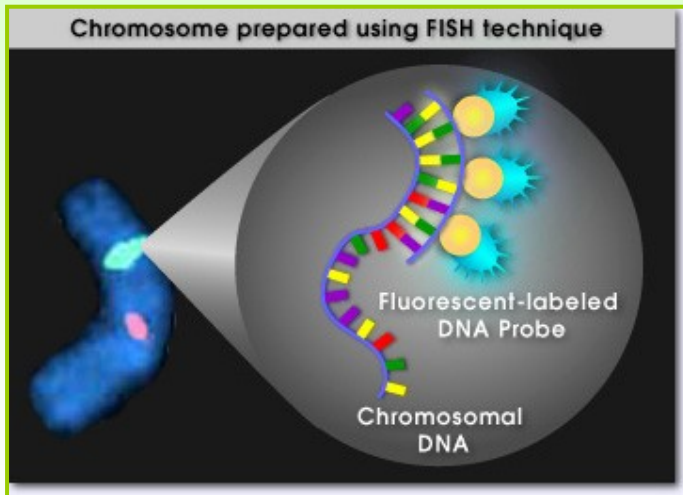
7:00-8:00  
Uhr

13:00  
Uhr

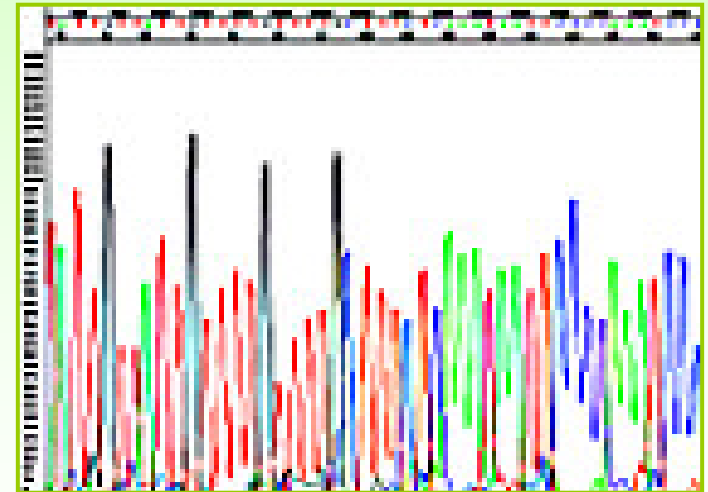
15:00  
Uhr

## Verfahrensweisen

**Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).**  
Der Nachweis einzelner Chromosomen  
im Polkörper erfolgt mit Hilfe  
fluoreszenzmarkierter Gensonden



**Aneuploidiediagnostik (PCR-basiert):**  
Quantitativer Chromosomennachweis  
mittels PCR



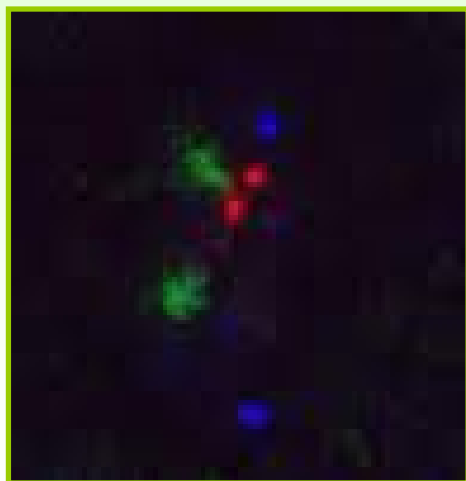


## Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).

### Chromosomenpattern für die Standard FISH

13, 16, 18, 21, 22, x

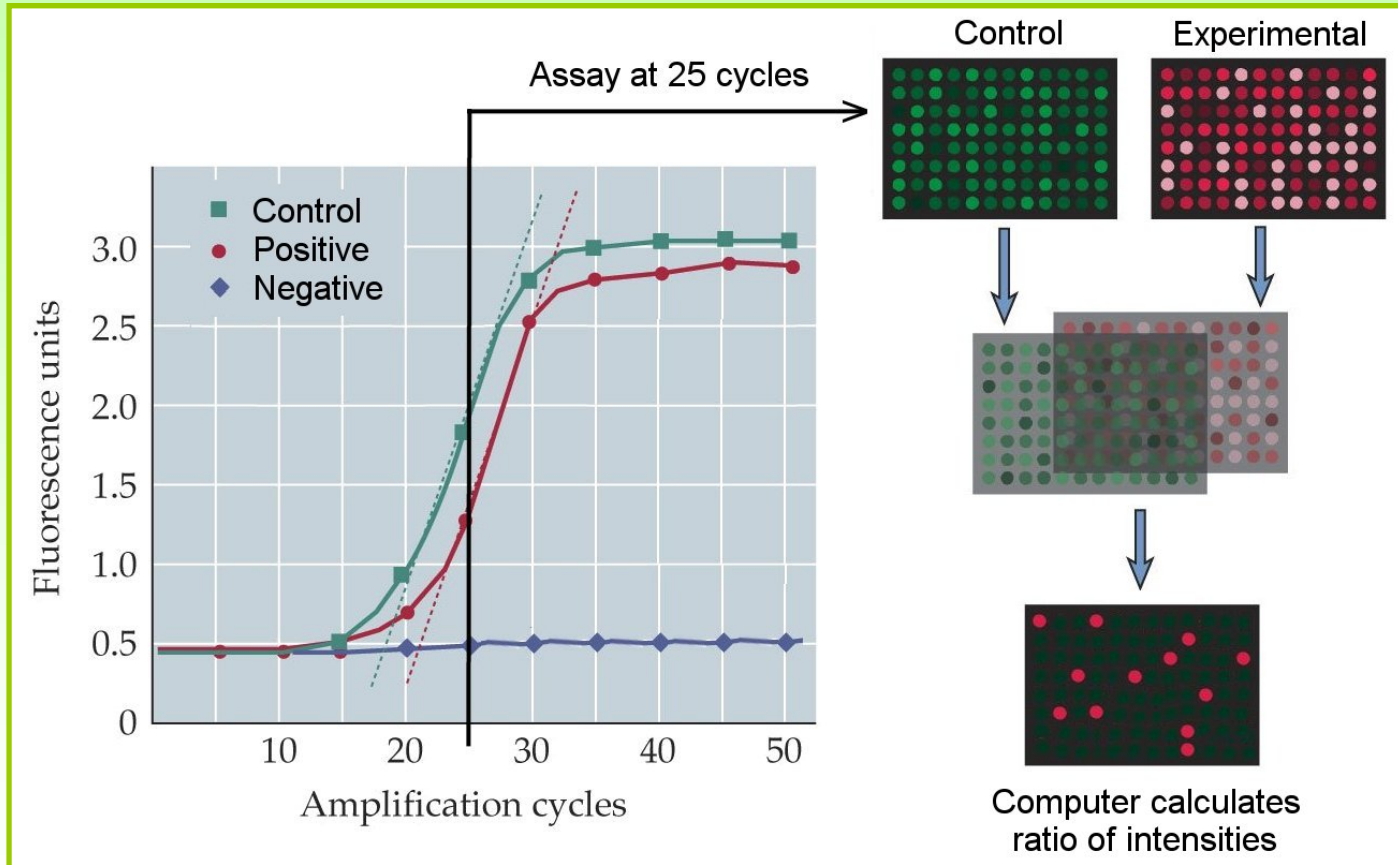
- Beteiligung am Abortgeschehen
- Beteiligung an großen fetalen Malformationen



Dargestellt ist ein Polkörper 1. Die Chromosomen 1 (grün) und 2 (rot) sind regelrecht verteilt und werden durch je zwei Signale nachgewiesen. Für das Chromosom 4 (blau) sind drei Signale erkennbar und somit liegt eine Fehlverteilung vor.

Arztpraxen im Medizin Zentrum Lichtenberg – MZL, Frankfurter Allee  
231A, 10365 Berlin

## Aneuploidiediagnostik (PCR-basiert): Chromosomennachweis mittels PCR




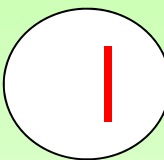


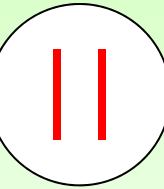



## Fallbeispiele: Befunde der PKD (FISH)

Chr.	13	16	18	21	22	X	PK	Ooc.	Befund
PK 1	2	2	2	2	2	2			Normal
PK 2	1	1	1	1	1	1			





## Fallbeispiele: Befunde der PKD (FISH)

Chr.	13	16	18	21	22	X	PK	Ooc.	Befund
PK 1	2	2	2	2	2	2			Normal
PK 2	1	1	1	1	1	1			
PK 1	2	2	2	1	2	2			Trisomie 21 Down Syndrom  1:500 häufigste Aberation
PK 2	1	1	1	1	1	1			



## Fallbeispiele: Befunde der PKD (FISH)

Chr.	13	16	18	21	22	X	PK	Ooc.	Befund
PK 1	2	2	2	2	2	2			Normal
PK 2	1	1	1	1	1	1			
PK 1	2	2	2	1	2	2			Trisomie 21 Down Syndrom
PK 2	1	1	1	1	1	1			1:500 häufigste Aberation
PK 1	2	2	2	2	2	2			Monosomie X Turner Syndrom
PK 2	1	1	1	1	1	2			1:2000 – 1:2500 Gonadendysgenesie



## Fallbeispiele: Befunde der PKD (FISH)

Chr.	13	16	18	21	22	X	PK	Ooc.	Befund
PK 1	2	2	2	2	2	2			Normal
PK 2	1	1	1	1	1	1			
PK 1	2	2	2	1	2	2			Trisomie 21 Down Syndrom
PK 2	1	1	1	1	1	1			1:500 häufigste Aberation
PK 1	2	2	2	2	2	2			Monosomie X Turner Syndrom
PK 2	1	1	1	1	1	2			1:2000 – 1:2500 Gonadendysgenese
PK 1	1	2	1	2	2	2			Tri 13, bal. 18, Mono 21 Kombinierte Aneuploidie
PK 2	1	1	2	2	1	1			



## Ergebnisse (FISH) der Universitätsfrauenklinik Bonn

**TABELLE 2**

**Ergebnisse der PKD zur Aneuploidie-Testung bei Frauen zwischen 35 und 39 Jahren und mindestens 2 vorausgegangenen IVF-Versuchen**

	PKD-Gruppe	Kontrolle	Statistik
Behandlungszyklen	159	163	
Alters-Median	37,8	36,9	n.s.
Transferrate	89,3 % (142/159)	90,2 % (147/163)	n.s.
Embryonen/Transfer	1,77 (251/142)	2,02 (297/147)	P < 0,05
Biochemische SS-Rate/Transfer	31,7 % (45/142)	31,9 % (47/147)	n.s.
Klinische SS-Rate/Transfer	28,9 % (41/142)	21,8 % (32/147)	n.s.
Implantationsrate	17,5 % (44/251)	11,8 % (35/297)	P < 0,05
Abortrate	19,5 % (8/41)	28,1 % (9/32)	n.s.
Geburtenrate/Zyklus	20,8 % (33/159)	14,1 % (23/163)	n.s.
Geburtenrate/Transfer	23,2 % (33/142)	15,6 % (23/147)	P = 0,1

Zur statistischen Analyse wurden ANOVA und Chi-square-Test eingesetzt;  
PKD, Polkörperdiagnostik; IVF, In-vitro-Fertilisation; n.s., nicht signifikant

Ven, Katrin van der; Montag, Markus; Ven, Hans van der; Polkörperdiagnostik – ein Schritt in die richtige Richtung? Dtsch Arztebl 2008; 105(11): 190-6 DOI: 10.3238/arztebl.2008.0190



**TABELLE 3**

**Ergebnisse der PKD zur Aneuploidie-Testung bei Frauen  $\geq 40$  Jahren**

	PKD-Gruppe	Kontrolle	Statistik
Behandlungszyklen	103	110	
Transferrate	80,6 % (83/103)	92,7 % (102/110)	n.s.
Embryonen/Transfer	1,75 (145/83)	2,03 (207/102)	P < 0,05
Biochemische SS-Rate/Transfer	20,5 % (17/83)	18,6 % (19/102)	n.s.
Klinische SS-Rate/Transfer	14,5 % (12/83)	14,7 % (15/102)	n.s.
Implantationsrate	9,7 % (14/145)	7,2 % (15/207)	n.s.
Abortrate	14,3 % (2/14)	46,7 % (7/15)	P = 0,06
Geburtenrate/Zyklus	9,8 % (10/103)	7,3 % (8/110)	n.s.
Geburtenrate/Transfer	12,0 % (10/83)	7,8 % (8/102)	n.s.

Zur statistischen Analyse wurden ANOVA und Chi-square-Test eingesetzt;  
PKD, Polkörperdiagnostik

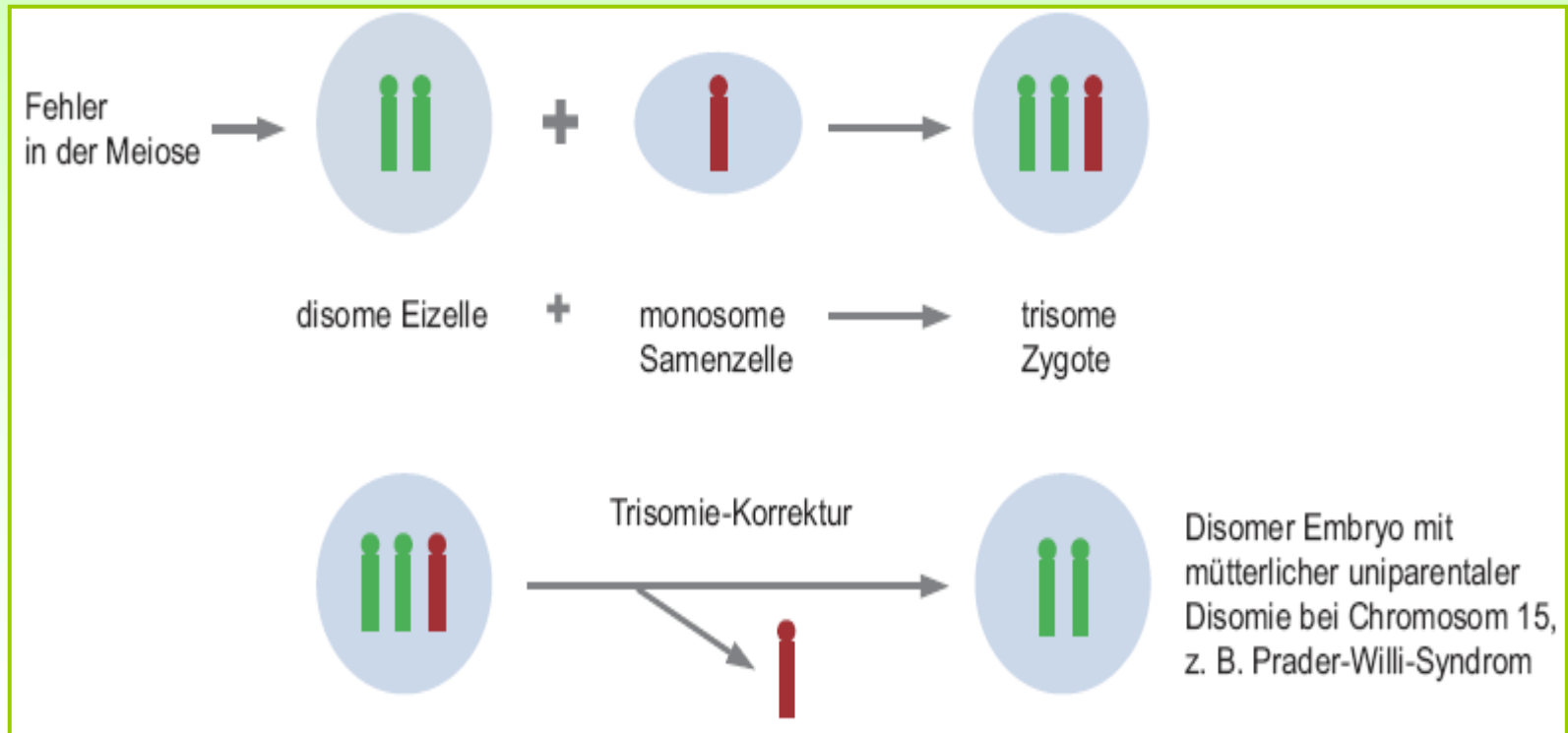
Ven, Katrin van der; Montag, Markus; Ven, Hans van der; Polkörperdiagnostik – ein Schritt in die richtige Richtung? Dtsch Arztebl 2008; 105(11): 190-6 DOI: 10.3238/arztebl.2008.0190



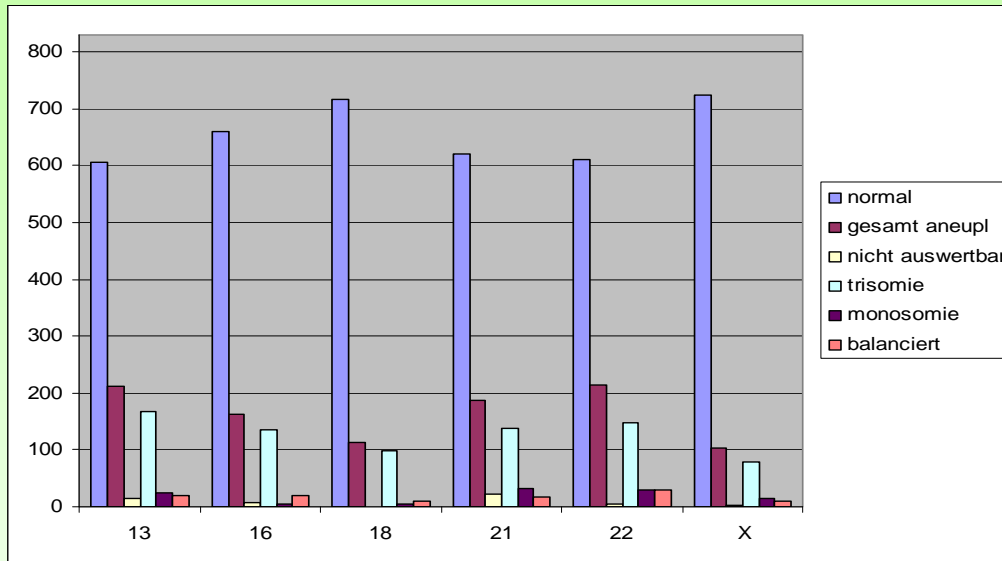
## Meiotische Nondisjunction

Häufigster Grund für numerisch chromosomale Aberationen

Sonderform: Uniparentale Disomie



## Statistik Labor Polaris, Düsseldorf



148

Patientinnen

830

EZ gesamt

119

Trisomie gesamt

42

Monosomie gesamt

415

kombinierte Aneuploidie

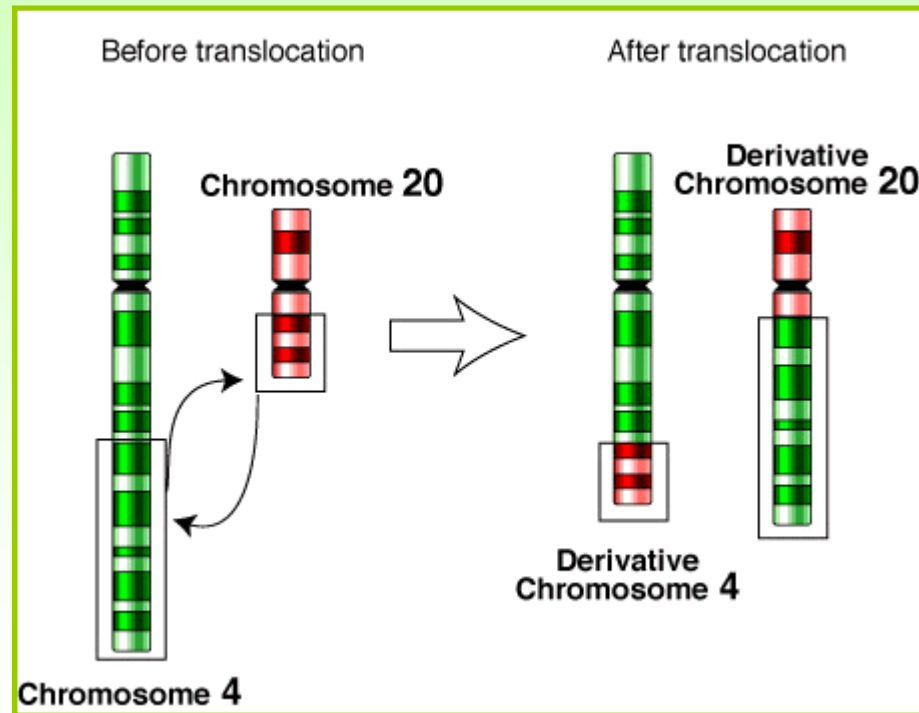
Chr.	13	16	18	21	22	X
normal	605	660	716	621	610	724
gesamt aneupl	211	162	114	187	214	104
nicht auswertbar	14	8	0	22	6	2
trisomie	167	136	99	137	149	80
monosomie	25	6	6	33	29	15
balanciert	19	20	9	17	30	9

## Sonderfall: Translokation

### Indikation

Bekannte Translokation bei der Frau

-> **keine** Sterilitätspatientinnen im klassischen Sinne





## Sonderfall: Translokation

### **Translokationsdiagnostik:**

Zieldiagnostik mittels spezieller FISH-Sonden.

### **Prinzip**

Fluoreszenzmarkierung des translozierten Abschnittes

Prüfen auf Vorhandensein in der Eizelle ja oder nein

### **CAVE: Der Ausschluß einer Translokation**

**läßt noch keinen Rückschluß auf Euploidie zu!!!**

Die Translokationsdiagnostik sollte optimal in Kombination

Mit einer Aneuploidiediagnostik durchgeführt werden



Ovulation

Meiose I  
1. PK

Meiose II  
2. PK

ICSI

Biopsie

PN Check

Befund  
übermittlung

**Zygote**  
(Auflösen der  
Kernmembranen)

=  
**Embryo**  
i.S.d. ESchG

1. Mitose

8:00  
Uhr

10:00  
Uhr

16:00  
Uhr

7:00  
Uhr

8:00  
Uhr

10:00  
Uhr



## **Sonderfall: monogenetische Erkrankungen**

Bekannte, krankheitsverursachende Mutation bzw. Erbkrankheiten

Cystische Fibrose  
Chorea Huntington  
Spinale Muskelathrophie  
Fragiles X Syndrom  
Freeman Sheldon Syndrom

## **Diagnostik monogenetischer Erkrankungen**

Individuelle Kombination der FISH-Sonden.



## Chip-Untersuchungen per Standard PCR

- Qualitative Bestimmung aller 23 Chromosomen im Polkörper
- Einfach abzuarbeitendes Standardprotokoll
- Schnelle, automatisierte Auswertung
- Simultane Abarbeitung von 20 Polkörpern
- molekulargenetische Methodik mit dem Ziel, klare Ja/Nein-Entscheidungen treffen zu können

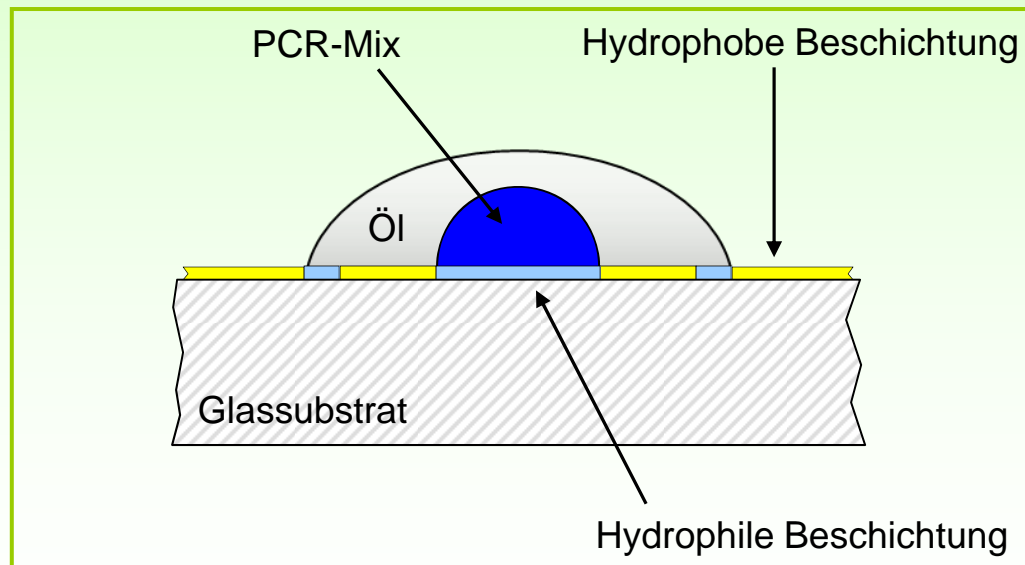
### CAVE!

- Aussage stets reproduzierbar, aber vorzeitige Chromatidentrennung, somit wird die Monosomie einer Eizelle nicht erfasst.

## Chip-Untersuchungen per Chromo Chip System - in Testphase -

### Basis

Chemisch strukturierte BioChips im Objektträgerformat, die Einzelzellanalytik mittels PCR (polymerase chain reaction) ermöglichen







## Chip-Untersuchungen per Chromo Chip System

### Arbeitsschritte

- Ablage des Polkörpers auf den BioChip CC-PK
- Whole Genome Amplification (WGA) des Polkörpers
- Verteilung des Amplifikats auf den BioChip CC-DT
- Chromosomenspezifische PCR und Hybridisierung
- Scannen und Auswertung



## **Array- Comparative Genomic Hybridization CGH - Molekulare Typisierung**

### **Prinzip**

**Bei der Array- oder Matrix-CGH (= comparative genomische Hybridisierung auf einem Chip) werden zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte DNA-Populationen 1:1 gemischt und auf einen Chip-Array (= speziell präparierter Objektträger) aufgebracht.**

**Auf dem Array sind in hoher Dichte DNA-Sonden gespottet, die mit dem DNA-Gemisch hybridisieren.**

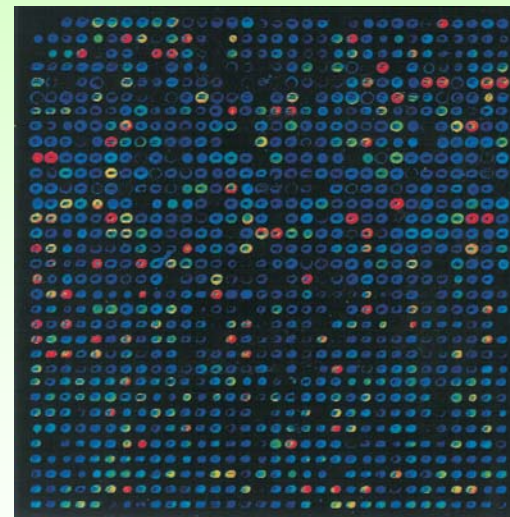
**Die Computer-gestützte Bearbeitung ermöglicht die Detektion chromosomaler Bereiche, die in der Test-DNA im Vergleich zur Referenz-DNA deletiert bzw. amplifiziert vorliegen.**



## Array- Comparative Genomic Hybridization CGH – Molekulare Typisierung

**Live birth after PB array comparative  
genomic hybridization prediction of  
embryo ploidy – the future of IVF?**

**Fishel et al. Fertility and Sterility 2009**



Van Breda/Post, Molecular Human Reproduction, 14, 1, © 2009 Elsevier GmbH



## Zusammenfassung PKD

### Pro

- Nicht embryo-invasiv
- Einzelne Chromatide sind differenzierbar und rückverfolgbar
- Vergleichsweise geringer technischer Aufwand

### Contra

- Es werden nur 6 Chromosomen erfasst
- Die Befundung ist subjektiv, nicht automatisierbar
- Das paternale Erbgut wird nicht erfasst



## Wo ist die PID erlaubt?



Wo **erlaubt**,  
wo **verboten**?

**Germany:**  
**Embryonenschutzgesetz**  
**No PID = no Diagnostics on**  
**Blastomeres,**  
**=> PKD**

- Australien
- Korea
- Taiwan
- USA





## Was kann die Präimplantationsdiagnostik (PID) Pre Genetic Diagnosis (PGD) ?

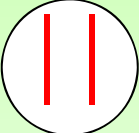
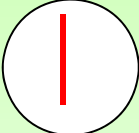
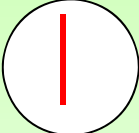
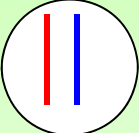
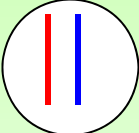
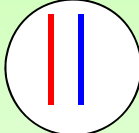
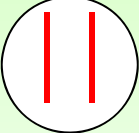
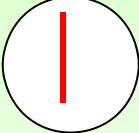
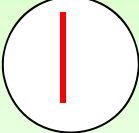
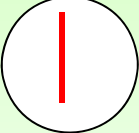
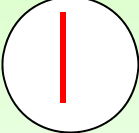
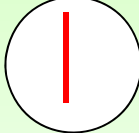
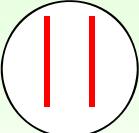
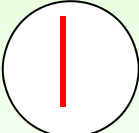
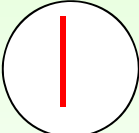
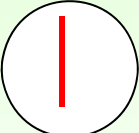
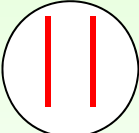
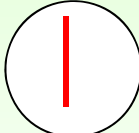
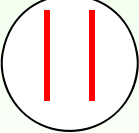
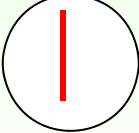
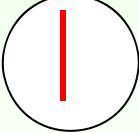
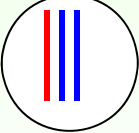
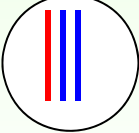
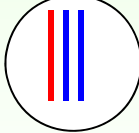
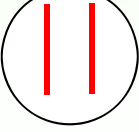
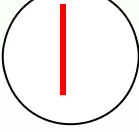
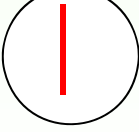
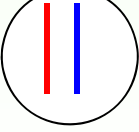
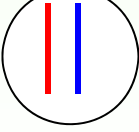
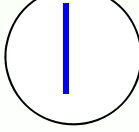
### Prinzip

- Aneuploidie und /oder Translokations Diagnostik am embryonalen Erbgut mittels FISH oder PCR / Array CGH

### Ziel

- Erfassung numerischer chromosomaler Anomalien paternalen und maternalen Ursprungs
- Untersuchung des kompletten embryonalen Chromosomensatzes

# Präimplantationsdiagnostik (PID) - Pre Genetic Diagnostics (PGD)

Meiose			Mitose			Befund
PK1	PK2	EZ	B 1	B 2	B 3	
						normal
						Monosomie/ paternale Nullisomie
						Mosaik Uniparentale Disomie, z.B. Pr.Willi
						Freie Trisomie paternal
						Turner Mosaik



## Präimplantationsdiagnostik (PID) – Pre Genetic Diagnostics (PGD)

Pro

Erfassung des gesamten embryonalen Chromosomensatzes

Contra

Hochinvasiv, Entfernung von embryonaler Zellmasse

Nicht konform mit ESchG





## Präimplantationsdiagnostik (PID) – Pre Genetic Diagnostics (PGD)

2008 Dec;23(12):2813-7. Epub 2008 Jun 21.

**No beneficial effect of preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age with a high risk for embryonic aneuploidy.**

[Twisk M](#), [Mastenbroek S](#), [Hoek A](#), [Heineman MJ](#), [van der Veen F](#), [Bossuyt PM](#), [Repping S](#), [Korevaar JC](#).

Department of Obstetrics and Gynaecology, Centre for Reproductive Medicine, Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands

Human Reproduction Vol.23, No.12 pp. 2626–2628, 2008

**DEBATE—CONTINUED**

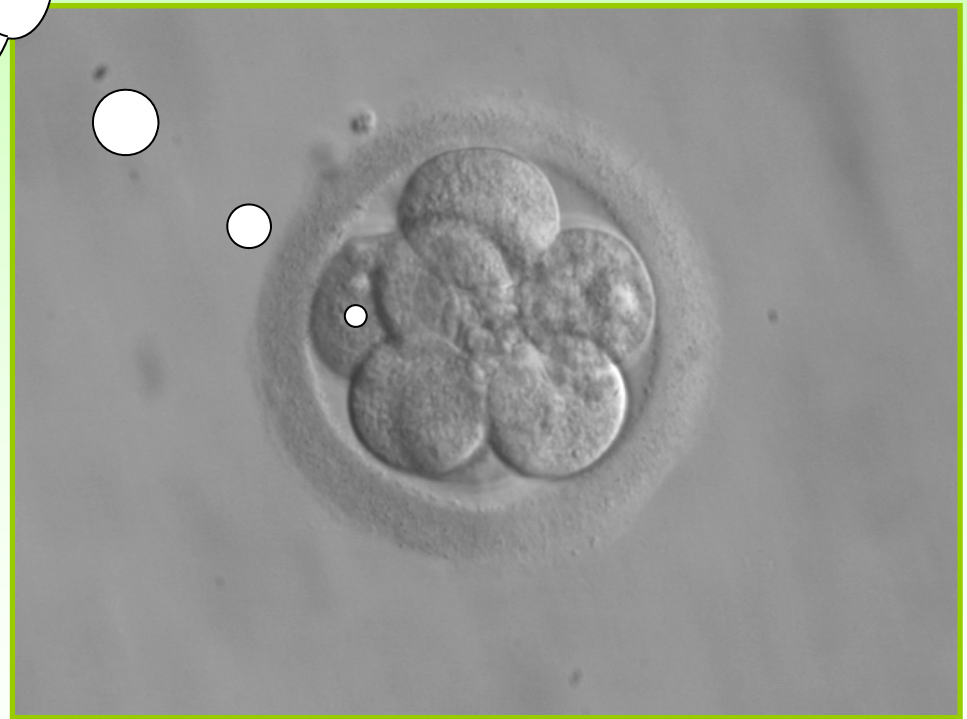
**What next for preimplantation genetic screening? More randomized controlled trials needed?**

S. Mastenbroek<sup>1,6</sup>, P. Scriven<sup>2</sup>, M. Twisk<sup>1</sup>, S. Viville<sup>3,4,5</sup>, F. Van der Veen<sup>1</sup> and S. Repping<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center for Reproductive Medicine, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands; <sup>2</sup>Center for Preimplantation Genetic Diagnosis, Department of Cytogenetics, Guy's and St Thomas' NHS Foundation Trust, London, UK; <sup>3</sup>Service de Biologie de la Reproduction—Syndicat Inter-Hospitalier de la Communaute' Urbaine de Strasbourg, Centre Me'dico-Chirurgical et Obste'trical, Service de Biologie, Schiltigheim, France; <sup>4</sup>Department of Developmental Biology, Institut de Ge'ne'tique et de Biologie Mole'culaire et Cellulaire, Illkirch, France; <sup>5</sup>Faculte' de Me'decine, Centre Hospitalier Universitaire, Universite' Louis Pasteur, Strasbourg, France



Where to go?









Vielen Dank



PKD Uni Bonn



Ende

Frauen mit balancierten Translokationen haben ein individuell erhöhtes Risiko, Fehlgeburten zu erleiden oder Nachkommen mit Entwicklungsstörungen und Fehlbildungen auszutragen. Im Rahmen einer Behandlung mittels künstlicher Befruchtung bietet die PKD mit individuell generierten molekularen Sonden eine Möglichkeit, Eizellen mit unbalancierten Verteilungen der Translokationschromosomen (= fehlerhaft) zu erkennen, nicht zu verwenden und damit die Wahrscheinlichkeit für weitere Fehlgeburten zu reduzieren (Montag et al., 2007; Buchholz & Clement-Sengewald, 2004).

Dargestellt ist der Polkörper 1 einer Frau mit einer balancierten *reziproken* Translokation. Die *Translokationschromosomen werden mit einer Kombination von drei FISH-Sonden (blau, rot und grün) nachgewiesen* und sind hier regelrecht verteilt (*je zwei Signale für jede FISH-Sonde*) .

In dieser Praxis wurde seit 2006 die PKD für 10 Translokationsträgerinnen (1 Robertsonsche Translokation, 9 reziproke Translokationen) durchgeführt. In sechs Fällen setzte nach dem Embryotransfer eine Schwangerschaft ein (43 %). Davon führten bereits zwei Schwangerschaften zu gesunden Kindern (14 %) und zu zwei weiteren aktuell intakten Schwangerschaften. In zwei Fällen kam es dennoch zu einem frühzeitigen Verlust der Embryonen. Eine genetische Ursache konnte hier durch die Untersuchung des Abortmaterials in unserem Labor ausgeschlossen werden (jeweils normaler Chromosomensatz).

Hinweis:

Die Durchführung einer PKD für eine Translokation ist mit einer individuell unterschiedlichen Vorbereitungszeit verbunden. Eine humangenetische Beratung zu dieser Thematik ist in unserer Einrichtung möglich und wird betroffenen Paaren dringend empfohlen.

Bei bestehendem Interesse an einer Polkörperdiagnostik oder der Zusendung von Polkörperpräparaten können Sie sich gern telefonisch für weitere Informationen mit uns in Verbindung setzen.





KINDERWUNSCHPRAXIS

*an der Promenade*



## Weiter Weg zum Wunschkind

Behandlungserfolge künstlicher Befruchtungen

Von ... **100 %** der eingeleiteten Behandlungen

wird in **89,4 %** eine künstliche Befruchtung versucht,

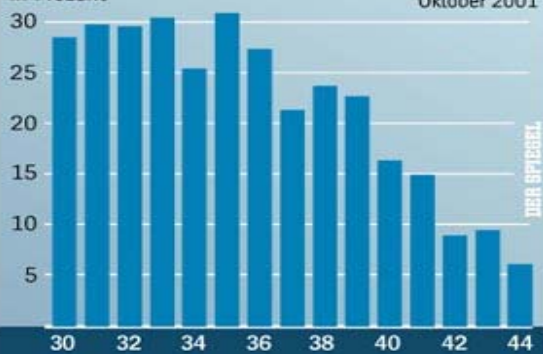
aber nur in **20,3 %** der Fälle kommt es zur Schwangerschaft

und in **10,4 %** zur Geburt eines oder mehrerer lebensfähiger Kinder.

## Bergab ab 35

Schwangerschaftsrate in Abhängigkeit vom Alter der Patientinnen nach ICSI-Behandlungen

in Prozent





<http://www.youtube.com/watch?v=qhrZj2RuNgQ&feature=related>



KINDERWUNSCHPRAXIS

*an der Promenade*

