



Präimplantationsdiagnostik – methodische Aspekte

Einleitung

Die Präimplantationsdiagnostik stellt als hoch spezialisiertes, interdisziplinäres Diagnose- und Behandlungsverfahren hohe fachliche und organisatorische Anforderungen an alle beteiligten Fachärzte und Biologen in Humangenetik und Reproduktionsmedizin inkl. der kritischen Schnittstellen. Die ratsuchenden Paare erhoffen sich – nach oft langem und leidvollem Weg und Ringen um eine verantwortliche Entscheidung – ein „gesundes“ Kind und sind bereit, hierfür einen sehr hohen zeitlichen und finanziellen Aufwand auf sich zu nehmen.

Ziel unserer verantwortlichen Arbeit kann für uns als PID-Zentren nur sein, ihnen mit wenigen, schonenden, nebenwirkungsarmen Stimulationszyklen und damit auch möglichst niedrigen Kosten und Aufwand eine hohe Geburtenrate bei hoher Diagnosesicherheit zu ermöglichen. Der beste Weg dahin wird international bis heute kontrovers diskutiert.

Einige Aspekte wie eine gute interdisziplinäre Beratung und Begleitung der Paare oder optimierte Laborabläufe, Schnittstellen und Qualitätssicherung sind recht klar und sollen hier nur kurz anhand der Guidelines des PGD-Konsortiums der „European Society for Human Reproduction and Embryology“ (ESHRE) vorgestellt werden. Für wichtige andere Parameter und Abläufe gibt es diese Klarheit bisher jedoch nicht. Dies müssen wir zunächst einmal anerkennen und gemeinsam bearbeiten, v. a. aber offen mit den Paaren diskutieren, um ihnen eine informierte Entscheidung zu ermöglichen.

Dazu gehören u. a.:

- Welche Evidenz möchten wir bzgl. der Kausalität von Sequenzvarianten für die Indikationsstellung zur PID bei monogenen Erkrankungen haben?
- „Non-disclosure“-PID ja oder nein?
- Was ist die optimale Stimulation, um eine möglichst große Anzahl an Eizellen guter Qualität zu gewinnen?
- Kryozyklus oder Frischtransfer?
- Welchen Nutzen hat eine „Stand-alone-“ oder „Add-on“-Aneuploidiediagnostik, gemessen als klinische Schwangerschaften pro begonnener Stimulation?

Letztlich bleibt zu klären: Was ist eigentlich eine „gute PID“ aus der Perspektive der Paare?

1. Indikationsstellung

In Deutschland dürfen embryonale Zellen eines Paares nach inzwischen vorliegender Rechtsprechung nur mit positivem Votum der PID-Ethikkommission untersucht werden (s. *Beiträge von Wostry und Zühlke et al. in diesem Heft*). Es kann erwartet werden, dass deshalb in Deutschland die PID zunächst überwiegend für monogene Erkrankungen und familiäre Translokationen eingesetzt wird. International wie auch im ESHRE-PGD-Konsortium dagegen ist die Aneuploidiediagnostik (auch „preimplantation genetic screening“ – PGS) weiterhin die mit Abstand häufigste PID-Indikation [1]. Auch in Deutschland wurden inzwischen erste positive Voten für eine Aneuploidiediagnostik erteilt, z. B. für Paare mit wiederholten Fehlgeburten und

dokumentierter fetaler Aneuploidie oder als Zusatzdiagnostik für Paare mit gewünschter PID für familiäre Translokationen oder monogene Fragestellungen.

Vom Gesetzgeber wurde im PID-Gesetz der humangenetische Partner als verantwortlicher Leiter des interdisziplinären PID-Zentrums benannt (s. *Beitrag von Wostry in diesem Heft*). Nur dieser kann einen Antrag auf Zulassung als PID-Zentrum stellen [2, 3]. Dies reflektiert die zentrale Rolle der familienspezifischen humangenetischen Befunde und Konfliktsituation als Voraussetzung für eine deutsche PID.

Fachärzte für Humangenetik in Wohnortnähe sind die ersten Ansprechpartner für diese Paare. In der Regel veranlassen sie befundabhängig auch die genetische Diagnostik zum Nachweis der familienspezifischen genetischen Veränderungen und erläutern die erhobenen genetischen Befunde. Dies beinhaltet auch eine Besprechung der hiermit verbundenen Erkrankungsrisiken für eigene Nachkommen sowie der Möglichkeiten des Umgangs hiermit inkl. Fragen zu den Chancen und Möglichkeiten einer PID oder deren Alternativen im Rahmen der Familienplanung.

Am PID-Zentrum wird dies durch eine vertiefende genetische und reproduktionsmedizinische Beratung vor, während und nach PID ergänzt. Zentrale Inhalte in Anlehnung an die ESHRE-Guidelines [4] sind in **Infobox 1** zusammengefasst.

Insgesamt ist der Beratungsbedarf und -aufwand vor PID außerordentlich hoch. Bei ergebnisoffenem Setting entscheiden sich an unserem Zentrum

Infobox 1 Zentrale Inhalte der interdisziplinären Beratung am PID-Zentrum vor einer PID

- Komplette Familienanamnese
- Genetisches Risiko ohne und mit PID (methodisch bedingtes Restrisiko)
- Klinische Symptomatik der Erkrankung inkl. potenzieller variabler Penetranz, Expression und Antizipation
- Anamnese von medizinischen Problemen mit Relevanz für die humangenetische Diagnostik und/oder reproduktionsmedizinische Behandlung ggf. inkl. Konsultation externer Spezialisten
- Reproduktionsmedizinische Anamnese beider Partner
- Testdesign und Ablauf der Testdurchführung
- Zu erwartende Testeffizienz und Grenzen
- Pränataldiagnostik nach PID

Tab. 1 Praxisleitlinien für PID

Leitlinien des ESHRE PGD Consortium

Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS) (2005) [5]	<ul style="list-style-type: none"> – Organisation eines PID/PGS-Zentrums – Genetische Beratung (allgemein und PID/PGS spezifisch) – Kriterien für psychologische Beratung (bzw. Untersuchung) – Ein- und Ausschlusskriterien für PID/PGS – Testetablierung – Embryokultur und -biopsie – FISH und PCR-Methoden
Best practice guidelines for organization of a PGD centre for PGD/preimplantation genetic screening (2011) [4]	<ul style="list-style-type: none"> – Anforderungen an Personal, Laborausstattung, Kommunikation etc. – Ein- und Ausschlusskriterien für eine PID – Aspekte der genetischen Beratung vor PID, pränatale und postnatale Betreuung – Qualitätsmanagement und Akkreditierung – Spezielle Aspekte zu PGS, mitochondrialen Erkrankungen
Best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS) (2011)[7]	<ul style="list-style-type: none"> – Biopsierelevante Aspekte – Embryokultur – Biopsiezeitpunkt, -medien, -methoden – Kryokonservierung der Embryonen
Best practice guidelines for fluorescence in situ hybridization – PGD (2011) [8]	<ul style="list-style-type: none"> – Generelle Laboranforderungen – Qualitätskriterien für FISH-Sonden – Besondere Aspekte der Translokations- und Aneuploidiediagnostik – Prä- und Postanalytik inkl. Ergebnisinterpretation
Best practice guidelines for amplification-based PGD (2011) [9]	<ul style="list-style-type: none"> – Labor- und gerätetechnische Voraussetzungen – Einzelzellamplifikation, Spezifität, Effizienz, „allele drop-out“ (ADO) und Kontamination – „Whole genome amplification“(WGA)-Methoden, Mutationsnachweisstrategien – Prä- und Postanalytik

Leitlinie der PGDIS

Guidelines for good practice in PGD: programme requirements and laboratory quality assurance (2008) [6]	<ul style="list-style-type: none"> – Aufbau eines PID-Zentrums – Patientenmanagement – IVF, Biopsie und Diagnosetechniken – Embryotransfer – Qualitätskontrolle und -management
---	--

ca. 50 % der Paare nach der Beratung dann noch für einen anderen Weg.

Möglichst frühzeitig und vor dem ersten Beratungstermin am PID-Zentrum sollte anhand der Vorbefunde geklärt werden, ob für die konkrete genetische

Fragestellung am PID-Zentrum eine PID technisch durchführbar ist und bei ausreichend guten Erfolgschancen aus reproduktionsmedizinischer Sicht angeboten werden kann. Wichtig sind hier insbesondere die frühzeitige Abklä-

rung möglicher Ausschlusskriterien oder Aspekte, die methodisch bedingt oder wegen einer evtl. zu erwartenden Ablehnung durch die PID-Ethikkommission gegen eine PID sprechen.

ESHRE-Guidelines. International wird die PID seit mehr als 25 Jahren erfolgreich eingesetzt und mit dem ESHRE-PGD-Konsortium und der „Preimplantation Genetic Diagnosis International Society“ (PGDIS) wurden sehr gute Foren zum Erfahrungsaustausch und zur Entwicklung wirksamer Instrumente für die Qualitätssicherung und die kontinuierliche Verbesserung der Laborabläufe und Behandlungsergebnisse geschaffen.

In sehr gut aufgelegten ESHRE-Guidelines wurden wichtige Erkenntnisse dieser gemeinsamen Lernkurve öffentlich zugänglich gemacht und sind insbesondere auch für neue PID-Labore eine wichtige Anleitung zur Etablierung ihrer Laborabläufe und Schnittstellen (Tab. 1).

Wir möchten uns in dieser Übersicht deshalb auf spezielle methodische Aspekte konzentrieren, die vor oder während einer PID für genetisch bedingte Erkrankungen zu bedenken und ggf. im Untersuchungs- und Behandlungsablauf zu berücksichtigen sind.

1.1 Genetische Veränderungen unklarer klinischer Bedeutung (VUS, Klasse 3)

Zentral für die Indikationsstellung zur PID bei monogenen Erkrankungen oder Translokationen ist der dokumentierte Nachweis einer Anlageträgerschaft für genetische Veränderungen im Erbgut eines oder beider Partner, welche sicher oder hochwahrscheinlich ein deutlich erhöhtes Erkrankungsrisiko für die Nachkommen vermitteln. Mit der breiten Einführung der massiven parallelen Sequenzierung (bzw. Next Generation Sequencing – NGS) in die Patientenversorgung werden zunehmend häufiger Varianten unklarer klinischer Bedeutung allein oder gemeinsam mit sicher pathogenen Sequenzveränderungen als ursächlich für das jeweilige Krankheitsbild diskutiert, kommuniziert und/oder vom Paar (fälschlich) verstanden, ggf.

auch mehrere Varianten unbekannter klinischer Relevanz („variants of unknown significance“ – VUS, Klasse 3) in verschiedenen potenziellen Kandidatengenen [10].

Technisch könnte für die meisten hiervon eine PID angeboten werden, jedoch würde dann bei tatsächlich fehlender Kausalität trotz PID für eine hiermit entstandene Schwangerschaft das familienspezifische Erkrankungsrisiko unverändert weiter bestehen. Dieser Konflikt ist in gleicher Tragweite auch für die gezielte genetische Pränataldiagnostik eminent.

Sicherlich haben die derzeit zugelassenen deutschen PID-Zentren auch eigene Erfahrungen in der Bewertung unklarer Sequenzvarianten oder Chromosomenaberrationen im Kontext der konkreten Patientenversorgung, jedoch gerade für sehr seltene Erkrankungen oft keine eigenen Kenntnisse zu krankheits- oder genspezifischen Besonderheiten. Nach unserer eigenen Erfahrung haben diese und die Einbeziehung konkreter klinischer Befunde der Indexpatienten jedoch für viele Fragestellungen sehr viel mehr Gewicht als bioinformatische Algorithmen und Prädiktionsprogramme. Und auch ein bedeutsamer Anteil der in öffentlichen Datenbanken eingetragenen Mutationen scheint nach aktuellen Einschätzungen falsch oder zumindest unzureichend belegt. Andererseits kann auch weder vom PID-Zentrum noch der zuständigen PID-Ethikkommission eine umfassende Überprüfung jedes vorgelegten genetischen Befundes auf Plausibilität und Kausalität erwartet oder geleistet werden.

Zu wünschen ist, dass bereits im Vorfeld einer angedachten PID wie auch vor jeder genetischen Pränataldiagnostik durch die wohnortnah eingebundenen humangenetischen Kollegen eine qualifizierte fachliche Interpretation der nachgewiesenen genetischen Varianten im individuellen klinischen Kontext erfolgt. Gegebenenfalls muss diese auch nachträglich vom humangenetischen Labor noch angefordert und dem Paar dann transparent und nachvollziehbar vermittelt werden.

Der Ansatz einzelner internationaler PID-Zentren, alle potenziellen VUS parallel zu untersuchen und nur Embryonen zu transferieren, die für alle in Frage

medgen 2016 · 28:332–341 DOI 10.1007/s11825-016-0103-5
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

A. Hehr · B. Paulmann · L. Eichhammer · C. Gassner · B. Seifert · U. Hehr

Präimplantationsdiagnostik – methodische Aspekte

Zusammenfassung

Die Präimplantationsdiagnostik erfordert eine enge und vertrauensvolle interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen hoch qualifizierten Fachärzten und Naturwissenschaftlern aus Humangenetik und Reproduktionsmedizin. In einem sehr engen Zeitfenster müssen komplexe Laborabläufe standardisiert und qualitätsgesichert umgesetzt werden. In diesem Beitrag sollen orientierende Empfehlungen zur Umsetzung kurz vorgestellt werden. Zentral haben wir häufigere Problemsituationen thematisiert, welche bereits bei der Indikationsstellung wie auch

bei den nachfolgenden Schritten in der genetischen Analyse, Datenauswertung und Befunderstellung mögliche Fehlerquellen darstellen. Ziel unserer verantwortlichen Arbeit an den PID-Zentren sollte eine hohe Geburtenrate bei hoher Diagnosesicherheit mit möglichst wenigen schonenden Behandlungszyklen sein.

Schlüsselwörter

PID · Genetische Beratung · Richtlinien · Methoden · Fehldiagnosen

Preimplantation genetic diagnosis – methodical aspects

Abstract

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) requires close interdisciplinary cooperation between highly qualified physicians and scientists from human genetics and reproductive medicine. In a very narrow time window, complex analytic tasks meeting high-quality standards must be completed. In this review, we recommend methodical guidelines and

report on situations throughout PGD that may potentially give rise to misdiagnosis. The central aim of our work at the PGD centers should be a high birthrate with high diagnostic accuracy, achieved with a minimal number of mild treatment cycles.

Keywords

PGD · Genetic counseling · Guidelines · Methods · Misdiagnosis

kommenden Veränderungen keine klinische Symptomatik erwarten lassen [11, 12], erscheint in Deutschland nicht vorstellbar und auch in Hinblick auf das massive und unnötige Verwerfen potenziell transferierbarer Embryonen aus ethischen Gründen u. E. abzulehnen.

Nichtpathogene Sequenzvarianten, wie z. B. *p.Arg668Cys* (c.2002 C > T) oder *p.Arg31Cys* (c.91 C > T) im *CFTR*-Gen, sollten weder Anlass für eine Präimplantationsdiagnostik noch für eine Pränataldiagnostik sein.

An unserem eigenen PID-Zentren bieten wir eine PID derzeit nur für solche Situationen an, in denen (entsprechend dem Erbgang) eine oder beide sicher (entspricht Klasse 5) oder hochwahrscheinlich (entspricht Klasse 4) krankheitsursächliche Mutationen nachgewiesen sind [4].

Entscheidend für die Indikationsstellung zur PID ist der korrekte genetische

Befund für die einbezogenen Angehörigen. So könnte z. B. eine methodisch bedingte, genetische Fehldiagnose an pränatalen Proben (CVS, Amniozentese oder Abort) einer vorangegangenen Schwangerschaft als einzige verfügbare Meiose in einem nachfolgenden PID-Zyklus zur gezielten Auswahl von Embryonen mit Mutation für einen Transfer führen. Hier kann die Einbeziehung von mindestens 2 meiotischen Ereignissen möglichst mit Mutation und eine kritische Prüfung der erstellten Allelsegregation unabhängig durch mindestens 2 Mitarbeiter helfen, Fehler zu vermeiden.

1.2 De-novo-Mutationen

Gar nicht so selten liegen uns zu einem oder beiden Eltern eines Partners keine genetischen Befunde vor und/oder weitere betroffene Angehörige bzw. Anlagene

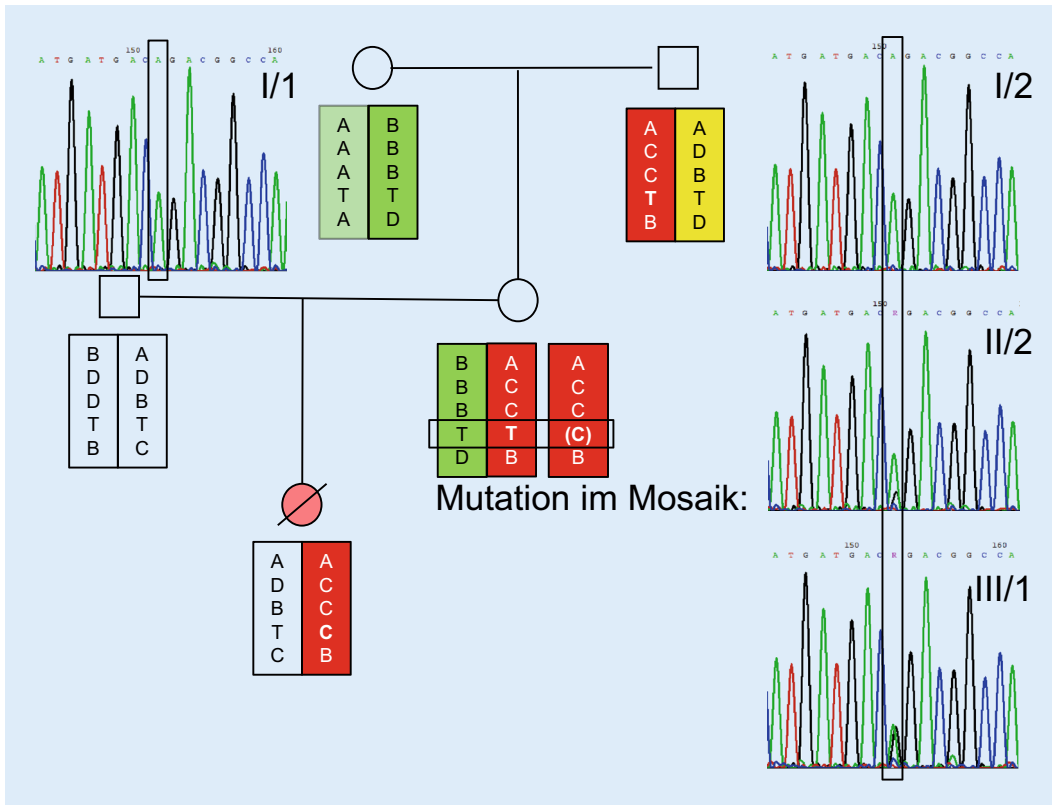


Abb. 1 ▲ Missensemutation im *TSC1*-Gen als somatisches Mosaik im peripheren Blut bei einer klinisch unauffälligen Ratsuchenden. Die Tochter des Paares war postnatal bei schwerer, bereits intrauterin erkannter klinischer Manifestation verstorben. In Rot dargestellt der von der Mutation betroffene Haplotyp: I/2 ohne Mutation, II/2 Mutation im Mosaik T bzw. (C), III/1 mit Mutation incl. der jeweiligen Ergebnisse nach Sanger-Sequenzierung

träger in der Familie sind nicht bekannt. Wenn eine Anlageträgerschaft bei einem Partner des Paares zum ersten Mal beobachtet wurde, könnte sie als postzygotisches Mosaik bei diesem neu aufgetreten sein. Wenn die Mutation dann auch schon bei einem eigenen Kind oder einer vorangegangenen Schwangerschaft nachgewiesen wurde, bestätigt dies das Vorliegen zumindest in einem Teil der Keimzellen. Das Paar ist jedoch bei vermutetem postzygotischen Mosaik schon im Vorfeld einer geplanten PID darauf hinzuweisen, dass das tatsächliche Erkrankungsrisiko eigener Nachkommen deutlich niedriger liegen könnte als formal entsprechend dem jeweiligen Erbgang anzugeben. Praktisch relevant ist dies insbesondere für X-chromosomal vererbte Erkrankungen oder für Anlageträger mit besonders milder klinischer Symptomatik einer autosomal-dominant vererbten, üblicherweise klinisch schwerer ausgeprägten Erkrankung.

Wünschenswert wäre, wenn bereits im initialen genetischen Befund auf ein

mögliches somatisches Mosaik in der untersuchten Blutprobe hingewiesen wird, sofern sich bei der diagnostischen Untersuchung hierfür deutliche Hinweise ergeben haben.

Sofern noch nicht erfolgt, könnte für die Eltern des Anlageträgers eine Analyse diesbezüglich nachgeholt bzw. auch in weiteren Geweben angestrebt werden mit Testsystemen, die gezielt auf den Nachweis geringgradiger Mosaik ausgelegt sind und eine präferenzielle Amplifikation des Mutationsallels erzeugen. Lässt sich hiermit bei einem Elternteil des Anlageträgers doch ein geringgradiges Mosaik bestätigen, dann kann für den Ratsuchenden eine konstitutionelle heterozygote Anlageträgerschaft angenommen werden.

Warum ist dies wichtig?

Nach neueren Erkenntnissen scheinen postzygotische Mosaik sehr viel häufiger zu Erkrankungen beizutragen als bisher angenommen [13]. Für jedes postzygotische Mosaik besteht immer auch die

Möglichkeit eines Keimzellmosaik mit geringerem Anteil mutierter Keimzellen und somit niedrigerem Erkrankungsrisiko für die Nachkommen. Für die Interpretation von PID-Befunden bei einem möglichen Keimzellmosaik muss dann berücksichtigt werden, dass Embryonen den krankheitsvermittelnden Haplotyp auch ohne Mutation tragen können („dritter Haplotyp“). Methodisch fällt dies überhaupt nur auf, wenn die familienspezifische Mutation zusätzlich auch mittels direkter Diagnostik im Embryo nachgewiesen wird. In der Regel ist dieser „dritte Haplotyp“ dann nicht von der Situation eines „betroffenen“ Embryos mit „allele drop-out“ für die Mutation zu unterscheiden. Dies, wie auch der Umgang hiermit, sollte im Vorfeld mit dem Paar thematisiert werden. Im Fall eines tatsächlichen Keimzellmosaik würden bei der PID im Interesse der Diagnosesicherheit potenziell mehr Embryonen vom Transfer ausgeschlossen als notwendig, nämlich auch solche mit

Tab. 2 Erfolgchancen einer PID/PKD für Anlageträgerinnen einer myotonen Dystrophie Typ 1 (MD1) im Vergleich zu a) männlichen Anlageträgern b) X-chromosomalen Erkrankungen und c) „Nicht-Repeat-Erkrankungen“ (NRE)

Carrier von	a) Verpoest [17]		b) Feyereisen [16]		c) Regensburg (PKD)	
	MD1 (Frau)	MD1 (Mann)	MD1	X-chrom. Erkrankungen	MD1 (Frau)	NRE
Patienten	54	24	–	–	11	70
Zyklen mit Embryo-transfer (ET)	109	42	–	–	24	119
Klinische Schwangerschaften	32	16	–	–	4	44
Pro Eizellbiopsie (OR)	22,1 %	26,7 %	–	–	11,4 %	24,6 %
Pro Embryotransfer (ET)	29,4 %	38,1 %	22,0 %	31,7 %	16,7 %	37,0 %
Lebendgeburten	26	15	–	–	2	37
Pro Eizellbiopsie (ET)	17,9 %	25,0 %	–	–	5,7 %	20,7 %
Pro Embryotransfer (ET)	23,8 %	35,7 %	–	–	8,3 %	31,1 %

dem Mutationshaplotyp ohne Mutation (s. **Abb. 1**).

1.3 Erkrankungen mit reproduktionsmedizinisch relevanter Symptomatik

Bisher gibt es nur wenige Daten zum Einfluss der genetischen Grunderkrankung oder Anlageträgerschaft auf Behandlungsverlauf und Ergebnisse einer PID. Am besten bekannt ist das erhöhte Risiko einer vorzeitigen Ovarialinsuffizienz und Menopause bei heterozygoten Anlageträgerinnen einer *FMRI*-Prämutation [14]. Diese führen auch bei der PID zu einer geringeren Anzahl gewonnener Eizellen und zu einer geringeren Schwangerschaftsrate bei Frauen mit einer *FMRI*-Prämutation [15]. Schlechtere PID-Behandlungsergebnisse werden nach unseren eigenen Erfahrungen ebenfalls für heterozygote Trägerinnen einer *DMPK*-Repeatexpansion erreicht.

Obwohl Signifikanz nicht erreicht wurde, berichteten auch Verpoest und Feyereisen über niedrigere Schwangerschaftsraten nach PID für Anlageträgerinnen einer *DMPK*-Repeatexpansion im Vergleich zur PID bei männlichen Anlageträgern bzw. Carriern anderer Erkrankungen unabhängig von der neurologischen Manifestation typischer klinischer Zeichen einer myotonen Dystrophie Typ 1 ([16, 17]; **Tab. 2**).

Möglichst frühzeitig sollten interessierte Paare auf die geringeren Er-

folgchancen einer PID für diese Erkrankungen angesprochen werden. Insbesondere sollten bei Verdacht auf eine eingeschränkte ovarielle Reserve der Frau möglichst früh im Entscheidungsprozess wichtige reproduktionsmedizinische Parameter wie AMH-Level, Eizellreserve und bei Männern mit Verdacht auf eine begleitende Hormonstörung ggf. Spermienzahl und -motilität geprüft werden. Die entsprechenden Ergebnisse sollten, ebenso wie eine realistische, dem Alter der Frau entsprechende und an die individuelle Situation des Paares angepasste Einschätzung der Chancen für eine Erfüllung des Kinderwunsches, mittels PID, spätestens in der vertiefenden reproduktionsmedizinischen Beratung am PID-Zentrum thematisiert werden. Hierbei werden dann auch Behandlungsoptionen zur Verbesserung der Eizellreserve und PID-Ergebnisse angesprochen, z. B. hormonelle Vorbehandlung bzw. Kryozyklen zur vorbeugenden Konservierung einer ausreichenden Zahl von Eizellen.

2. Methodische Aspekte während einer PID

2.1 Genetische Untersuchungsverfahren

Abhängig von der genetischen Fragestellung stehen verschiedene Methoden für eine PID zur Verfügung (**Tab. 3**).

2.2 PID für monogene Erkrankungen

Für monogen vererbte Erkrankungen wurden international bisher überwiegend Testsysteme eingesetzt, die auf der Kopplungsanalyse mit oder ohne zusätzlichem Nachweis der familienspezifischen intragenischen Sequenzveränderung und/oder der Wildtypsequenz in dieser Position basieren. Der Nachweis der familienspezifischen Mutation erhöht erheblich den technischen Aufwand im Rahmen der Testetablierung, gilt aber nach wie vor als Goldstandard [9].

2.2.1 Indirekte PID mittels Kopplungsanalyse ohne direkten Mutationsnachweis

Ausschließlich indirekte PID-Testsysteme ohne direkten Mutationsnachweis werden für Gene und Mutationsmechanismen verwendet, die für einen direkten Mutationsnachweis schwer oder nicht zugänglich sind (z. B. *FMRI*- oder *DMPK*-Repeatexpansion). International setzen einige PID-Zentren die ausschließlich indirekte PID aus Kostengründen auch für häufige genetische Erkrankungen ein, um preiswert universelle, sofort verfügbare Testsysteme bereitzustellen [18–22]. Dies bietet sich an bei häufigen Erkrankungen und Genen mit zahlreichen verschiedenen Mutationen. Bei allen Vorteilen hinsichtlich Effizienz und Kosten für die Patienten stellt der Verzicht auf den direkten Mutationsnachweis einen Kompromiss zu Lasten der Diagnosesicherheit dar.

Bei der Kopplungsanalyse werden für beide Partner informative (biallelische) genetische Marker möglichst auf beiden Seiten der Mutation und in möglichst geringem Abstand gesucht, wobei voll informative Marker (alle 4 Allele beider Partner diskriminierbar) vorzuziehen sind. In Abhängigkeit von der familiären Situation sind diese optimalen Bedingungen nicht immer zu erzielen, z. B. in konsanguinen Familien. Auch in diesen Fällen sollte eine PID möglich sein. ADO-Ereignisse werden allerdings mit solchen Systemen nicht in jedem Fall erkannt.

Tab. 3 Übersicht über die derzeit häufig eingesetzten PID-Methoden, ihrer Anwendungsgebiete und der methodenspezifischen Vor- und Nachteile

PID-Methode	Prinzip	Indikationen	Vor (+)- und Nachteile (-)
Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	Hybridisierung von fluoreszenz-gelabelten DNA-Sonden an immobilisierten Zellkernen	Aneuploidiediagnostik, Diagnostik größerer Deletionen, Duplikationen Insertionen, Translokationen	– Anzahl der Sonden pro Hybridisierungsrunde begrenzt – Mehrfachhybridisierung sehr aufwendig – wird kaum noch eingesetzt
Array-CGH	Arraybasierte, gemeinsame Hybridisierung von Proben-DNA und Kontroll-DNA auf immobilisierte DNA-Sonden (BAC- oder Oligo-Array)	Aneuploidiediagnostik, Diagnostik größerer Deletionen Duplikationen Insertionen, Translokationen	+ Auflösung abhängig vom eingesetzten Array + Untersuchung aller Chromosomen möglich + zeitnah universell umsetzbar ohne familienspezifische Testetablierung – benötigt Kontroll(competitor)-DNA – hoher Preis – Nebenbefunde
Karyomapping	SNP-Chip-basierte gesamt-genomische Haplotypanalyse	Parallele indirekte monogene Diagnostik und Aneuploidiediagnostik	+ Universell einsetzbar + Keine familienspezifische Testetablierung + Aneuploidiediagnostik ohne Zusatzaufwand – Direkter Mutationsnachweis nicht vorgesehen – Aussagesicherheit abhängig von Dichte informativer Marker – regional und individuell variabel
NGS für Kopienzahlveränderungen (CNV-Analyse)	Quantitative Auswertung (Anzahl Reads pro Chromosom/pro Mb)	Aneuploidiediagnostik, größere genomische Deletionen/ Duplikationen	+ Auflösung abhängig von genomweiter Coverage bzw. Anzahl auswertbarer Reads – Auflösung begrenzt die Detektion von kleineren Fragmenten bei Translokationen, Deletionen etc.
Indirekte monogene Diagnostik mittels Kopplungsanalyse	Lokale Haplotypanalyse in direkter Umgebung des Gens mittels hochpolymorpher Marker ohne direkten Mutationsnachweis	Monogene Erkrankungen, Translokationen	+ Hochspezifisch für die jeweilige Region und die Familie + Hohe Aussagesicherheit – Zeit und materialaufwendige familienspezifische Testetablierung – Kein direkter Mutationsnachweis – Derzeit keine parallele Aneuploidiediagnostik
Indirekte und direkte monogene Diagnostik mittels Kopplung und Mutationsnachweis	Lokale Haplotypanalyse in direkter Umgebung des Gens mittels hochpolymorpher Marker mit zusätzlichem direktem Mutationsnachweis	Monogene Erkrankungen	+ Hochspezifisch für die jeweilige Region und die Familie + Hohe Aussagesicherheit – Zeit und materialaufwendige Testetablierung – Derzeit keine parallele Aneuploidiediagnostik

Die Aussagesicherheit indirekter Testsysteme hängt in erheblichem Maß von der Art der verwendeten polymorphen Marker und der Lokalisation in Bezug auf die Mutation ab.

Je weiter die Marker von der Mutation entfernt liegen, umso höher ist das Risiko für Cross-over-Events als potenzielle Ursache für Fehldiagnosen oder unklare PID-Ergebnisse. Vom ESHRE-PGD-Konsortium wird deshalb empfohlen, dass distal und proximal zur Mutation möglichst je 2 Marker nicht weiter als 1 cM (ca. 1Mb) von der Mutation entfernt liegen sollten [9]. Viele PID-Zentren verwenden kommerziell verfügbare Mikrosatellitenmarker mit bekannter hoher Heterozygotenfrequenz, die nicht selten weiter entfernt liegen. Durch zusätzliche längenpolymorphe Marker lässt sich der Markerabstand nach unserer eigenen Er-

fahrung für viele Testsysteme auf <0,3 Mb reduzieren.

In die Testetablierung für ausschließlich indirekte Systeme sollte möglichst genetisches Material von mindestens 2 oder mehr Verwandten 1. Grades mit genetischem Befund, davon mindestens einer mit Mutation, zur Phasenbestimmung einbezogen werden. Durch Einbeziehung zusätzlicher Familienangehöriger kann eine weitere Zunahme der Aussagesicherheit angestrebt werden [9]. Problematisch ist die ausschließliche Einbeziehung von DNA gesunder Angehöriger, z. B. nur eines Elternteils oder eigener gesunder Kinder, in die Allelseggregation (s. Abschn. 1.2).

Für häufigere Erkrankungen, wie z. B. das Fragile-X-Syndrom mit genetisch gesicherter Anlageträgerschaft nur bei der Ratsuchenden selbst und ggf. ihrer Mut-

ter, sollte zusätzlich auch die Testung ihres Partners und Vaters erwogen werden, sofern für diese nicht aus formalen Gründen eine Anlageträgerschaft (z. B. für eine *FMRI*-Prämutation) ausscheidet. An unserem Zentrum haben wir selbst schon eine Familie beraten, bei der beide Eltern einer Ratsuchenden heterozygote Träger einer *FMRI*-Prämutation waren, die Anlageträgerschaft des Vaters wurde hier nur im Rahmen der diagnostischen Abklärung einer beginnenden Ataxie aufgedeckt.

Für krankheitsursächliche Duplikationen kann mit den gängigen diagnostischen Testverfahren (MLPA, Array-CGH) die Lokalisation des duplizierten Segmentes im Genom üblicherweise nicht bestimmt werden. Eine Kausalität für die klinische Symptomatik sollte hier besonders gut anhand typischer klini-

scher Befunde nachvollzogen werden. Bei typischer klinischer Symptomatik, z. B. hohen CK-Werten bei einem Jungen mit proximal betonter Muskelschwäche und Duplikation mehrerer Exons des *Dystrophin*-Gens, kann sicherlich eine Lokalisation der Duplikation im Leserahmen des *Dystrophin*-Gens mit dessen Unterbrechung angenommen werden. Bisher gibt es allerdings kaum Daten zur intragenischen Lokalisation solcher partiellen Genduplikationen [23, 24], sodass die Markerauswahl sich nicht auf die Herkunftsregion des duplizierten Segmentes beschränken sollte. Für größere Gene wie *Dystrophin* erhöht sich jedoch bei einer Markerverteilung über die gesamte genomische Region das Risiko für Cross-over-Ereignisse mit daraus resultierendem unklarem PID-Befund.

2.2.2 Kombinierte indirekte und direkte PID mit Mutationsnachweis

Der direkte Mutationsnachweis erhöht als Add-on zur indirekten Kopplungsanalyse die Aussagesicherheit einer PID. Steht kein genetisches Material mindestens eines weiteren blutsverwandten Angehörigen mit nachgewiesener Mutation zur Verfügung, kann eine ausreichende Diagnosesicherheit bei der PID überhaupt nur mit zusätzlichem direktem Mutationsnachweis erreicht werden. Bei einer PID ohne verfügbares Material weiterer Familienangehöriger besteht alternativ auch die Möglichkeit, die Allelseggregation maternal vererbter Mutationen mittels kombiniertem direktem und indirektem Mutationsnachweis in einem Zyklus mit Polkörperdiagnostik (PKD) über die haploiden 2. Polkörper zu ermitteln [25–27] bzw. bei paternal vererbten Mutationen über eine Analyse einzelner Spermien [27, 28].

Neben der direkten Sequenzierung und Minisequenzierung können zum Mutationsnachweis ebenso RFLP-Analysen oder allelspezifische PCR-Reaktionen verwendet werden. Voraussetzung ist, dass Mutation und Wildtypallel zweifelsfrei diskriminiert werden können und die entsprechenden Kontrollen in das Testsystem integriert wurden (z. B. eine Kontrolle für die Effizienz des Restriktionsverdau etc.).

2.2.3 Karyomapping (Infinium® Karyomapping Assay, Illumina)

Diese relativ neue Methode beruht auf der Analyse einer hohen Anzahl von Sequenzvarianten mittels SNP-Chip [29–32]. Aus der Analyse der SNP-Haplotypen von Indexpatienten und weiteren Angehörigen lassen sich mit der Mutation gekoppelte Haplotypblöcke ermitteln. Das Verfahren ist technisch für Einzelzellen optimiert und die Datenauswertung benutzerfreundlich. Wichtige genetische Zusatzbefunde, wie z. B. Cross-over-Ereignisse, aber auch Monosomien und Trisomien können hiermit ebenso erkannt und die Analyse mit einbezogen werden. Eine umfangreiche familienspezifische Testetablierung und damit mehrmonatige Wartezeit entfällt. Aufgrund des geringeren Informationsgehaltes der verwendeten SNPs (meist dimorph) kann für jede einzelne Familie nur ein Teil der ausgelesenen SNP-Marker informativ sein, deshalb wird die Verteilung und Aussagesicherheit für die einzelne Familie abhängig von der lokalen Dichte an informativen Markern in der Umgebung der Mutation schwanken.

Auch für das Karyomapping als ausschließlich indirekte genetische Diagnostik wird genetisches Material blutsverwandter Angehöriger (des ratsuchenden Paares) und des Indexpatienten oder weiterer Angehöriger mit Mutationsnachweis zur Phasenbestimmung benötigt. Theoretisch genügt eine Trioanalyse (Indexkind und Eltern). Jedoch können nahe Cross-over-Ereignisse die Datenauswertung erschweren und damit unnötig viele Embryonen vom Transfer ausschließen oder bei ungünstiger Markerlokalisierung auch Fehldiagnosen begünstigen. Da die Häufigkeit von Sequenzpolymorphismen in codierenden oder flankierenden regulatorischen Regionen wie auch die Cross-over-Häufigkeit genspezifisch unterschiedlich sind, kann erwartet werden, dass das Karyomapping nicht für alle krankheitsrelevanten Gene gleich gut funktioniert [33].

Bisher erfordert das Karyomapping eine Präamplifikation mittels WGA („whole genome amplification“). Technisch scheint das sehr gut und robust um-

gesetzt, jedoch birgt jede WGA an Einzelzellen das Risiko einer (Co)Amplifikation von Fremd-DNA. Da das Karyomapping häufige Sequenzvarianten abbildet und nicht längenvariable individuelle Repeatkombinationen, können Kontaminationen mit einzelnen Amplifikationsprodukten genomischer Fremd-DNA bei ungünstigen Haplotypblöcken aufgrund des niedrigeren Informationsgehalts der einzelnen SNPs eher unentdeckt bleiben als bei der Kopplungsanalyse mit hochpolymorphen, repeatbasierten Markern.

2.3 PID für chromosomale Imbalancen

2.3.1 Translokationsdiagnostik

Gegenwärtig wird die PID für familiäre Translokationen überwiegend mittels Array-CGH durchgeführt, bei ausreichender Größe der distalen genomischen Segmente sollte die Sensitivität hochauflösender NGS-Verfahren oder auch des Karyomapping vergleichbare Ergebnisse erbringen [34–36]. Für reziproke Translokationen oder Insertionen sollten die Bruchpunkte vorab möglichst genau bestimmt sein. Für unbalancierte Feten oder geborene Kinder aus diesen Familien kann eine Array-CGH zur Bruchpunktcharakterisierung und Suche nach zusätzlichen submikroskopischem Imbalancen infolge komplexer Translokation beitragen. Weiterhin diskutiert wird ein möglicherweise generell erhöhtes Risiko für Aneuploidien in Familien mit balancierter Translokation bei einem Partner [37, 38], welche im Rahmen der PID sowohl mittels Array-CGH als auch mittels Karyomapping oder NGS-basierenden Verfahren erkennbar sein sollten.

2.3.2 Aneuploidiediagnostik

Die theoretische Begründung für eine Aneuploidiediagnostik ist allgemein akzeptiert: aneuploide Embryonen werden nicht implantieren oder überwiegend früh zum Abort führen. Eine Vermeidung ihres Transfers im Rahmen einer Kinderwunschbehandlung mit ICSI sollte die Implantationsrate erhöhen, die Abortrate reduzieren und Schwangerschaften mit potenziell lebensfähigen Trisomien vermeiden. In der Praxis

sind diese erwarteten Vorteile weiterhin umstritten [39].

Gut belegt ist allerdings inzwischen die sehr hohe Rate euploid-aneuploider Mosaik während der normalen frühen Entwicklung humaner Embryonen [40], wobei sich tierexperimentell Hinweise für eine präferenzielle Korrektur postzygotischer Mosaik im Embryoblast ergaben, während diese in den trophektodermalen Anteilen eher erhalten zu bleiben scheinen [41]. Dies entspricht auch gut den langjährigen Erfahrungen mit Plazentamosaik bei der Pränataldiagnostik. Der Nachweis einer Aneuploidie in den wenigen, bei der PID entnommenen Trophektodermzellen verweist somit nicht zwangsläufig auf ein schlechteres Entwicklungspotenzial des zugehörigen Embryo. „Gesunde“ Kinder nach diagnostizierter Aneuploidie bei der PID sind inzwischen publiziert [42].

Auch euploid-aneuploide Mosaik in den wenigen entnommenen embryonalen Zellen bei einer PID scheinen nicht selten aufzutreten und sind wohl mit den neueren Untersuchungsverfahren ab einer Mosaikrate von ca. 10 % [43] nachweisbar. Grundsätzlich kann bei einem solchen PID-Mosaikbefund nicht unterschieden werden, ob es sich um ein echtes Mosaik in den wenigen untersuchten Trophektodermzellen handelt oder um ein technisches Artefakt, z. B. zellzyklusbedingt oder infolge Einbeziehung biopsiebedingt nichtintakter Zellfragmente. Ein signifikanter Einfluss der Biopsietechnik und weiterer Entnahmebedingungen auf die Häufigkeit solcher Mosaikbefunde kann erwartet werden. Auf der PGDIS-Tagung 2016 in Bologna wurde aktuell kontrovers diskutiert, ob Embryonen mit einem solchen PID-Mosaikbefund transferiert werden können, sofern sie keine potenziell lebensfähigen Trisomien tragen.

In der Beratung vor jeder Aneuploidiediagnostik ist das Paar darauf hinzuweisen, dass der hiermit erhobene PID-Befund die untersuchten embryonalen Zellen repräsentiert, den tatsächlichen konstitutionellen genetischen Status des Embryos zum Zeitpunkt der Untersuchung jedoch nicht sicher bestimmen bzw. dessen weitere Entwicklung nicht vorhersagen kann. Nach Transfer eines

als euploid befundenen Embryo werden ein aneuploidiebedingtes Implantationsversagen oder Fehlgeburten sicherlich deutlich seltener auftreten [44, 45], vollständig ausgeschlossen werden können diese hiermit jedoch nicht.

In jedem Fall wird ein methodisch gutes Aneuploidiescreening aber auch die Zahl transferierbarer Embryonen deutlich reduzieren und damit die Rate an Eizellpunktionen ohne Transfer erhöhen. Das Risiko für einen solchen PID-Zyklus ohne Transfer sollte mit zunehmendem Alter der Frau steigen und altersunabhängig auch mit abnehmender Anzahl verfügbarer Eizellen und gut entwickelter Blastozysten. Bis zum Vorliegen belastbarer Ergebnisse prospektiver Multizenterstudien sollte die Indikation für eine solche Aneuploidiediagnostik deshalb immer unter Berücksichtigung der individuellen Befundkonstellation mit dem Paar gemeinsam erarbeitet und gerade auch für Frauen mit wenigen Eizellen und altersbedingt kleinem Zeitfenster kritisch gegen Alternativen wie die kumulative Schwangerschaftsrate pro Eizellentnahme ohne Aneuploidiediagnostik abgewogen werden [39].

2.3.3 „Next-Generation“-PID

Erste Publikationen belegen inzwischen die Überlegenheit NGS-basierter Methoden für die PID zur Aneuploidiediagnostik [44, 46] und ein großes Potenzial auch für die Translokationsdiagnostik und möglicherweise monogene Diagnostik sowie deren kombinierten Einsatz. Bei ausreichend hoher Coverage kann mit NGS genomweit eine sehr hohe Zahl an informativen SNPs ausgelesen werden. Nichtinformative SNPs müssen nicht „gecallt“ und berechnet werden. Bei guter bioinformatischer Auswertung sollten die hiermit erheblichen Untersuchungsergebnisse praktisch einem individualisierten Karyomapping entsprechen.

Methodisch werden international verschiedene Ansätze verfolgt, die jeweils eine vorherige Genomamplifikation (WGA) erfordern. Kommerziell gut etabliert sind bereits NGS-basierte Verfahren zur Aneuploidiediagnostik (VeriSeq™ PGS Kit, Illumina), die aufgrund der höheren Sensitivität, gerin-

gerer Kosten pro Probe und einfacher Handhabung die chipbasierte Array-CGH zunehmend ablösen werden.

Erste Ansätze zur NGS-basierten monogenen Diagnostik wurden inzwischen ebenfalls publiziert [47]. Ihre Überführung in die Routine-PID kann in absehbarer Zeit erwartet werden.

In Abhängigkeit von der verwendeten Sequenziermethode generieren diese NGS-basierten Verfahren bereits heute Datenmengen, die als Zusatzbefunde auch das Auffinden von potenziell klinisch bedeutsamen De-novo-Mutationen oder Kopienzahlveränderungen ganz unabhängig von der primären PID-Indikation ermöglichen. In Deutschland wäre die Auswertung und Nutzung dieser zusätzlichen genetischen Informationen nach aktuellem Rechtsverständnis nur zulässig, wenn dies für die einzelne Familie mit ihrem Ethikvotum abgedeckt ist.

2.4 Fehlerquellen

2.4.1 Probenidentität während der Testetablierung und PID

Die Sicherstellung der Probenidentität bereits während der Testetablierung und während der PID ist von entscheidender Bedeutung. Fälle von scheinbarer „non-paternity“ oder „non-maternity“ oder auch Probenverwechslungen können aufgrund von „zufällig“ stammbaumkonformen Allelseggregationen bzw. -interpretationen zu Fehldiagnosen führen.

Eine Überprüfung der Blutsverwandtschaft und soweit möglich der Probenidentität mittels geeigneter Testsysteme (kommerzielle Paternityassays) sollte mit den Familien vorab besprochen werden. Neben Probenvertauschungen bei der externen Blutabnahme (Vater, Mutter) wurden in unserem Labor auf diese Weise und mit hohem Arbeitsaufwand der Nachverfolgung auch insgesamt 3 Fälle von Knochenmarktransplantationen (KMT) aufgedeckt, die in der primären Beratung von der Familie und in den mitgebrachten Arztberichten nicht kommuniziert waren. Insbesondere bei Erkrankungen, bei denen die KMT eine Therapieoption darstellt, sollte dies gezielt erfragt werden und ggf. eine geeignete alternative Quelle für eigenes genetisches Material gewählt werden (z. B. Mundschleimhaut).

2.4.2 Fehldiagnosen und deren Ursachen

Wie bei allen diagnostischen Verfahren, so ist auch für jede PID ein methodenbedingtes Restrisiko für eine Fehldiagnose und somit für die Geburt eines betroffenen Kindes anzugeben [4]. Wilton et al. ermittelten eine Fehldiagnoserate für die PCR-basierte PID von 0,5 % aufgrund der freiwilligen Meldung von Fehldiagnosen durch die im PGD-Konsortium organisierten Zentren. Die Ursachen hierfür können beim Embryo selbst liegen (chromosomale Mosaik, uniparentale Disomie etc.), methodisch bedingt unvermeidbar (ADO) oder vermeidbar sein (Kontaminationen, Ausfall des Testsystems), auf Fehlern in den Laborabläufen beruhen (Probenverwechslung, Fehlinterpretation der Segregations- oder Analysedaten) oder auch bei den Ratsuchenden selbst liegen (ungeschützter Geschlechtsverkehr während des Behandlungszyklus) [48]. Unter Berücksichtigung dieser vielfältigen Fehlerquellen und der Überlegung, dass Besonderheiten der kritischen genomischen Region für manche Familien und Fragestellungen ein individuell etwas höheres Risiko vermitteln können, wird von den PID-Zentren in der Regel ein etwas höheres Restrisiko für eine Fehldiagnose von ca. 2–3 % angegeben und für jede Schwangerschaft nach PID eine vorgeburtliche genetische Testung zur Abklärung empfohlen.

Zusammenfassung

Als interdisziplinäres, hoch spezialisiertes Diagnose- und Therapieverfahren stellt die PID an die beteiligten humangenetischen und reproduktionsgenetischen Partner des PID-Zentrums hohe Anforderungen. Maßnahmen zur Fehlererkennung und -vermeidung sind als wesentlicher Bestandteil der Optimierung der Laborabläufe stetig weiterzuentwickeln und betreffen den gesamten Ablauf inkl. Testvorbereitung und -validierung inkl. der Schnittstellen, die reibungslose Organisation kann nur im täglichen Miteinander und durch regelmäßige Gespräche bewältigt werden. Vor diesem Hintergrund erscheint die zusätzliche genetische Testung von

extern eingesandten PID-Proben weiterer reproduktionsmedizinischer Partner als sogenannte Transport-PGD als besondere Herausforderung, deren Behandlungsergebnisse und -qualität der medizinischen Beratung und Betreuung sich an den Ergebnissen lokaler PID-Zentren messen müssen.

Mit dem deutschen PID-Gesetz und der Rechtsverordnung zur PID hat der Gesetzgeber auch in Deutschland für Paare mit hohem Risiko einer schweren genetisch bedingten Erkrankung oder Chromosomenstörung bei den Nachkommen die Möglichkeit einer PID eröffnet und gemeinsam mit den Ländern den gesetzlichen Rahmen hierfür definiert. Es ist jetzt an uns, im Dialog mit den PID-Ethikkommissionen und Ihnen allen als betreuende Humangenetiker vor Ort und in enger Zusammenarbeit mit den reproduktionsmedizinischen Kollegen diesen im Interesse der ratsuchenden Paare verantwortlich zu gestalten und die hierfür notwendigen komplexen interdisziplinären Diagnose- und Behandlungsschritte immer wieder kritisch zu hinterfragen und gemeinsam weiter zu entwickeln.

Korrespondenzadresse

Dr. rer. nat. A. Hehr

PID-Labor des Zentrums für Humangenetik
Regensburg
Luitpoldstr. 4, 93047 Regensburg, Deutschland
pid@humangenetik-regensburg.de

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. A. Hehr, B. Paulmann, L. Eichhammer, C. Gassner, B. Seifert und U. Hehr sind am PID-Zentrum Regensburg tätig und direkt in die Durchführung der Präimplantationsdiagnostik auf humangenetischem oder reproduktionsmedizinischem Gebiet eingebunden.

Alle beschriebenen Untersuchungen am Menschen wurden mit Zustimmung der zuständigen Ethik-Kommission, im Einklang mit nationalem Recht sowie gemäß der Deklaration von Helsinki von 1975 (in der aktuellen, überarbeiteten Fassung) durchgeführt. Von allen beteiligten Patienten liegt eine Einverständniserklärung vor.

Literatur

1. De Rycke M, Belva F, Goossens V, Moutou C, SenGupta SB, Traeger-Synodinos J, Coonen E (2015) ESHRE PGD Consortium data collection XIII: Cycles from January to December 2010 with pregnancy follow-up to October 2011. *Hum Reprod* 30:1763–1789
2. (1990) „Embryonenschutzgesetz vom 13. Dezember 1990 (BGBl. I S. 2746), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 21. November 2011 (BGBl. I S. 2228) geändert worden ist“
3. (2013) „Präimplantationsdiagnostikverordnung vom 21. Februar 2013 (BGBl. I S. 323)“
4. Harton G, Braude P, Lashwood A, Schmutzler A, Traeger-Synodinos J, Wilton L, Harper JC, European Society for Human Reproduction and Embryology, P.G.D.C. (2011) ESHRE PGD consortium best practice guidelines for organization of a PGD centre for PGD/preimplantation genetic screening. *Hum Reprod* 26:14–24
5. Thornhill AR, deDie-Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC, Harton GL, Lavery SA, Moutou C, Robinson MD, Schmutzler AG, Scriven PN et al (2005) ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Hum Reprod* 20:35–48
6. Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS) (2008) Guidelines for good practice in PGD: Programme requirements and laboratory quality assurance. *Reprod Biomed Online* 16:134–147
7. Harton GL, Magli MC, Lundin K, Montag M, Lemmen J, Harper JC, European Society for Human Research and Embryology, P.G.D.C.E.S.I.G. (2011) ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group – best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Hum Reprod* 26:41–46
8. Harton GL, Harper JC, Coonen E, Pehlivan T, Vesela K, Wilton L, European Society for Human Research and Embryology, P.G.D.C. (2011) ESHRE PGD consortium best practice guidelines for fluorescence in situ hybridization-based PGD. *Hum Reprod* 26:25–32
9. Harton GL, De Rycke M, Fiorentino F, Moutou C, SenGupta S, Traeger-Synodinos J, Harper JC, European Society for Human Research and Embryology, P.G.D.C. (2011) ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD. *Hum Reprod* 26:33–40
10. Matthijs G, Souche E, Alders M, Corveleyn A, Eck S, Feenstra I, Race V, Sistermans E, Sturm M, Weiss M et al (2016) Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet* 24:2–5
11. Altarescu G, Beerli R, Lazer-Derbeko G, Eldar-Geva T, Steinberg A, Levy-Lahad E, Renbaum P (2015) Preimplantation genetic risk reduction: A new dilemma in the era of chromosomal microarrays and exome sequencing. *Reprod Biomed Online* 31:706–710
12. Aktuna S (2016) PGD for variants of unknown significance (VUS): perform or not to perform? PGDIS annual meeting
13. Lupski JR (2013) Genetics. Genome mosaicism – one human, multiple genomes. *Science* 341:358–359
14. Sullivan AK, Marcus M, Epstein MP, Allen EG, Anido AE, Paquin JJ, Yadav-Shah M, Sherman SL (2005) Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction. *Hum Reprod* 20:402–412
15. Platteau P, Sermon K, Seneca S, Van Steirteghem A, Devroey P, Liebaers I (2002) Preimplantation

- genetic diagnosis for fragile Xa syndrome: Difficult but not impossible. *Hum Reprod* 17:2807–2812
16. Feyereisen E, Amar A, Kerbrat V, Steffann J, Munnich A, Vekemans M, Frydman R, Frydman N (2006) Myotonic dystrophy: Does it affect ovarian follicular status and responsiveness to controlled ovarian stimulation? *Hum Reprod* 21:175–182
 17. Verpoest W, Seneca S, De Rademaeker M, Sermon K, De Rycke M, De Vos M, Haentjens P, Devroey P, Liebaers I (2010) The reproductive outcome of female patients with myotonic dystrophy type 1 (DM1) undergoing PGD is not affected by the size of the expanded CTG repeat tract. *J Assist Reprod Genet* 27:327–333
 18. Drusedau M, Dreesen JC, Derks-Smeets I, Coonen E, van Golde R, van Echten-Arends J, Kastrop PM, Blok MJ, Gomez-Garcia E, Geraedts JP et al (2013) PGD for hereditary breast and ovarian cancer: The route to universal tests for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Eur J Hum Genet* 21:1361–1368
 19. Shen X, Xu Y, Zhong Y, Zhou C, Zeng Y, Zhuang G, Ding C, Li T (2011) Preimplantation genetic diagnosis for alpha- and beta-double thalassemia. *J Assist Reprod Genet* 28:957–964
 20. Van de Velde H, Georgiou I, De Rycke M, Schots R, Sermon K, Lissens W, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I (2004) Novel universal approach for preimplantation genetic diagnosis of beta-thalassaemia in combination with HLA matching of embryos. *Hum Reprod* 19:700–708
 21. Wang W, Yap CH, Loh SF, Tan AS, Lim MN, Prasath EB, Chan ML, Tan WC, Jiang B, Yeo GH et al (2010) Simplified PGD of common determinants of haemoglobin Bart's hydrops fetalis syndrome using multiplex-microsatellite PCR. *Reprod Biomed Online* 21:642–648
 22. Vrettou C, Tzetzis M, Traeger-Synodinos J, Palmer G, Kanavakis E (2002) Multiplex sequence variation detection throughout the CFTR gene appropriate for preimplantation genetic diagnosis in populations with heterogeneity of cystic fibrosis mutations. *Mol Hum Reprod* 8:880–886
 23. Zhang Z, Takeshima Y, Awano H, Nishiyama A, Okizuka Y, Yagi M, Matsuo M (2008) Tandem duplications of two separate fragments of the dystrophin gene in a patient with Duchenne muscular dystrophy. *J Hum Genet* 53:215–219
 24. Hu XY, Ray PN, Worton RG (1991) Mechanisms of tandem duplication in the Duchenne muscular dystrophy gene include both homologous and nonhomologous intrachromosomal recombination. *EMBO J* 10:2471–2477
 25. Rechitsky S, Pomerantseva E, Pakhalchuk T, Pauling D, Verlinsky O, Kuliev A (2011) First systematic experience of preimplantation genetic diagnosis for de-novo mutations. *Reprod Biomed Online* 22:350–361
 26. Altarescu G, Eldar-Geva T, Varshower I, Brooks B, Haran EZ, Margalioth EJ, Levy-Lahad E, Renbaum P (2009) Real-time reverse linkage using polar body analysis for preimplantation genetic diagnosis in female carriers of de novo mutations. *Hum Reprod* 24:3225–3229
 27. Altarescu G, Brooks B, Kaplan Y, Eldar-Geva T, Margalioth EJ, Levy-Lahad E, Renbaum P (2006) Single-sperm analysis for haplotype construction of de-novo paternal mutations: application to PGD for neurofibromatosis type 1. *Hum Reprod* 21:2047–2051
 28. Burlet P, Gigarel N, Magen M, Drunat S, Benachi A, Hesters L, Munnich A, Bonnefont JP, Steffann J (2010) Single-sperm analysis for recurrence risk assessment of spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet* 18:505–508
 29. Handyside AH (2015) Live births following karyomapping – a „key“ milestone in the development of preimplantation genetic diagnosis. *Reprod Biomed Online* 31:307–308
 30. Handyside AH, Harton GL, Mariani B, Thornhill AR, Affara N, Shaw MA, Griffin DK (2010) Karyomapping: A universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *J Med Genet* 47:651–658
 31. Natesan SA, Bladon AJ, Coskun S, Qubbaj W, Prates R, Munne S, Coonen E, Dreesen JC, Stevens SJ, Paulussen AD et al (2014) Genome-wide karyomapping accurately identifies the inheritance of single-gene defects in human preimplantation embryos in vitro. *Genet Med* 16:838–845
 32. Thornhill AR, Handyside AH, Ottolini C, Natesan SA, Taylor J, Sage K, Harton G, Cliffe K, Affara N, Konstantinidis M et al (2015) Karyomapping – a comprehensive means of simultaneous monogenic and cytogenetic PGD: Comparison with standard approaches in real time for Marfan syndrome. *J Assist Reprod Genet* 32:347–356
 33. Konstantinidis M, Prates R, Goodall NN, Fischer J, Tecson V, Lemma T, Chu B, Jordan A, Armenti E, Wells D et al (2015) Live births following karyomapping of human blastocysts: Experience from clinical application of the method. *Reprod Biomed Online* 31:394–403
 34. Tan Y, Yin X, Zhang S, Jiang H, Tan K, Li J, Xiong B, Gong F, Zhang C, Pan X et al (2014) Clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis and screening using next generation sequencing. *Gigascience*. doi:10.1186/2047-217x-3-30
 35. Lukaszuk K, Pukszta S, Ochman K, Cybulska C, Liss J, Pastuszek E, Zabielska J, Woclawek-Potocka I (2015) Healthy baby born to a Robertsonian translocation carrier following next-generation sequencing-based preimplantation genetic diagnosis: A case report. *AJP Rep* 5:172–175
 36. Zhang W, Liu Y, Wang L, Wang H, Ma M, Xu M, Xu X, Gao Z, Duan J, Cram DS et al (2016) Clinical application of next-generation sequencing in preimplantation genetic diagnosis cycles for Robertsonian and reciprocal translocations. *J Assist Reprod Genet* 33(7):899–906
 37. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munne S, Balicchia B, Escudero T, Crippa A (2002) Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Hum Reprod* 17:3201–3207
 38. Pujol A, Durban M, Benet J, Boiso I, Calafell JM, Egozcue J, Navarro J (2003) Multiple aneuploidies in the oocytes of balanced translocation carriers: A preimplantation genetic diagnosis study using first polar body. *Reproduction* 126:701–711
 39. Harper J, Wells D, Simpson JL (2016) Current controversies in prenatal diagnosis 4: Preimplantation genetic screening should be routinely offered to all preimplantation genetic diagnosis cases. *Prenat Diagn* 36:25–28
 40. van Echten-Arends J, Mastenbroek S, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Heineman MJ, van der Veen F, Repping S (2011) Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: A systematic review. *Hum Reprod Update* 17:620–627
 41. Bolton H, Graham SJ, Van der Aa N, Kumar P, Theunis K, Fernandez Gallardo E, Voet T, Zernicka-Goetz M (2016) Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential. *Nat Commun* 7:11165. doi:10.1038/ncomms11165
 42. Greco E, Minasi MG, Fiorentino F (2015) Healthy babies after intrauterine transfer of mosaic aneuploid blastocysts. *N Engl J Med* 373:2089–2090
 43. Fragouli E, Alfwarawati S, Spath K, Tarozzi N, Borini A, Wells D (2016) The developmental potential of mosaic embryos. PGDIS annual meeting, Bologna
 44. Sermon K, Capalbo A, Cohen J, Coonen E, De Rycke M, De Vos A, Delhanty J, Fiorentino F, Gleicher N, Griesinger G et al (2016) The why, the how and the when of PGS 2.0: Current practices and expert opinions of fertility specialists, molecular biologists, and embryologists. *Mol Hum Reprod*. doi:10.1093/molehr/gaw034
 45. Geraedts J, Sermon K (2016) Preimplantation genetic screening 2.0: The theory. *Mol Hum Reprod*. doi:10.1093/molehr/gaw033
 46. Brezina PR, Anchan R, Kearns WG (2016) Preimplantation genetic testing for aneuploidy: What technology should you use and what are the differences? *J Assist Reprod Genet* 33(7):823–832
 47. Treff NR, Fedick A, Tao X, Devkota B, Taylor D, Scott RT Jr. (2013) Evaluation of targeted next-generation sequencing-based preimplantation genetic diagnosis of monogenic disease. *Fertil Steril* 99:1377–1384 e1376
 48. Wilton L, Thornhill A, Traeger-Synodinos J, Sermon KD, Harper JC (2009) The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD. *Hum Reprod* 24:1221–1228