

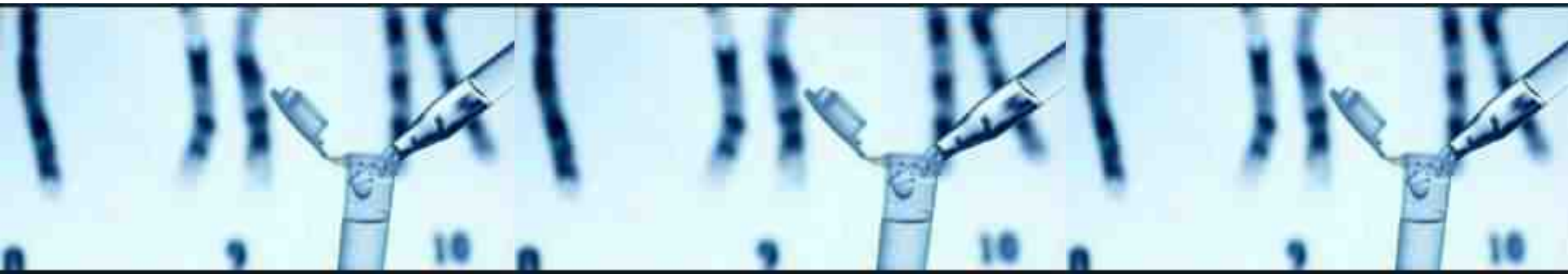
Yard.Doç.Dr.Evrım ÜNSAL

Array CGH Tabanlı PGS:
Güncel Durum ve Gelecek Beklentileri

Array CGH tabanlı PGS;

Güncel durum ve gelecek beklentileri

- Neden PGS
- Array platformları
- NGS teknolojisi ve açılımları
- CCS: Comprehensive Chromosome Screening



Kompetan Embriyo

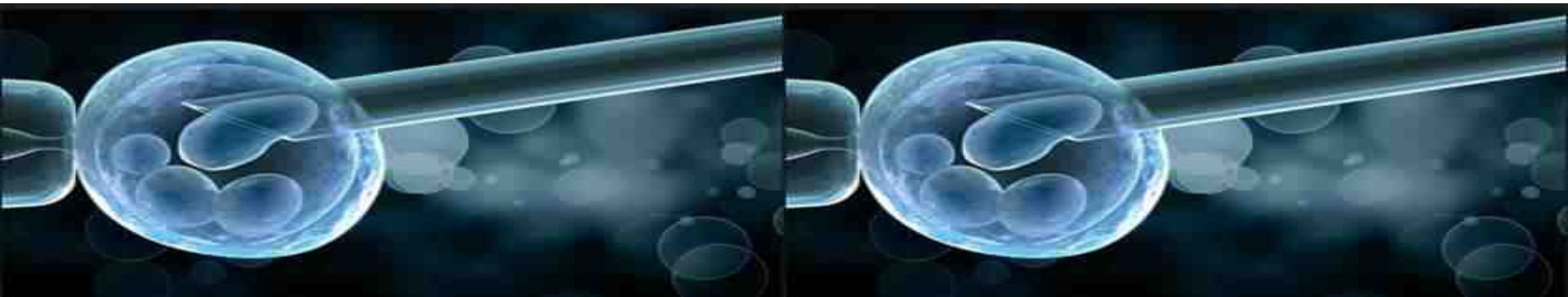
Gebelik oluşturma potansiyeli olan, çiftleri sağlıklı çocuk sahibi yapabilen kusursuzluktaki embriyodur.

- Morfolojik kriterlere dayalı embriyo seçimi
- Fertilizasyon için kullanılacak spermin seçimi (IMSI)
- Time lapse moniterizasyon ve Anöploidi
- Proteomics, (*sekrotom proteinler _ anöploidi _ Lipocalin -1*)



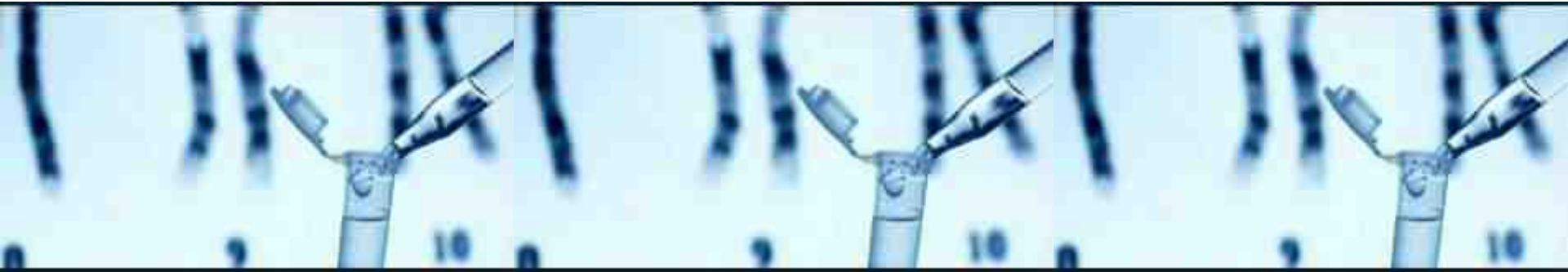
Başarılı bir IVF uygulaması için....

- Blastokist aşamasına gelen, morfolojik olarak kaliteli bir embriyo öploid demek değildir (Fragoulietal.,2008;Alfarawatietal.,2011)...
- Morfoloji ile embriyo seçimi arasındaki bu zayıf korelasyon embriyonun transfer öncesi sayısal kromozomal oluşumunu gösteren PGS yöntemini doğurmuştur....
 - İleri anne yaşı
 - Tekrarlayan IVF başarısızlığı
 - Tekrarlayan düşükler (Wilton 2002)
 - Ağır erkek faktörlü infertilite
 - eSET siklularda tek embriyo seçimi için

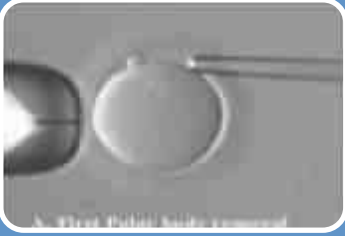


PGS eve bebek götürme oranını arttıran etkin bir yöntem mi?

- Harper et al., 2010;
 - Mastenbroek et al., 2011;
 - Mastenbroek and Repping, 2014
 - Rubio et al., 2011
 - Limitasyonlar
 - FISH analizi
 - Biyopsi günü (trofektoderm biyopsiye yönelim)
 - Klivaj embriyosunda self correction ihtimali
- (Bazrgar et al., 2013)*



PGS embriyo gelişiminin üç farklı aşamasında uygulanabilir...



1. Polar Body

- Daha çok tanısıl
- paternal/mayoz2/post zigotik bilgi yok
- İleri test gerekebilir (3/5. gün)



2. Polar body

- Mayoz 2 hatalarını gösterir
- paternal/post zigotik bilgi yok
- Tanı için pahalı bir yöntem



Blastomer

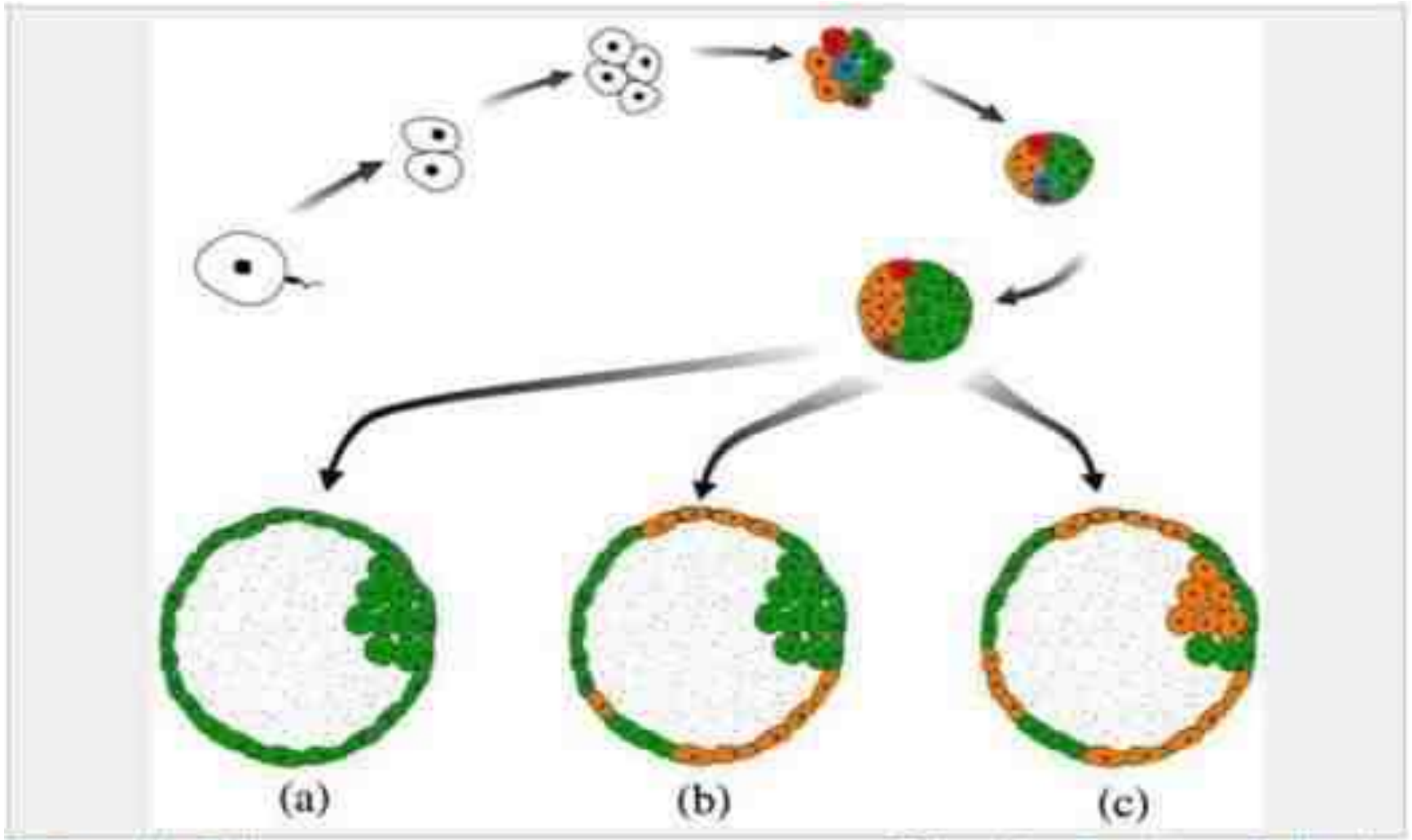
Biyopsi hasarı yüksek
Yaygın kromozomal mozaisizm (%55-73)



Trofektoderm

- 3-6 hücre (güvenirliliği yüksek)
- Düşük mozaisizm
- Hasta başı düşük maliyet
- Vitrifikasyon gerektirir

Preembryonik mozaïsizm



Mekanik blastomer biyopsisi



Mekanik trofektoderm biyopsisi



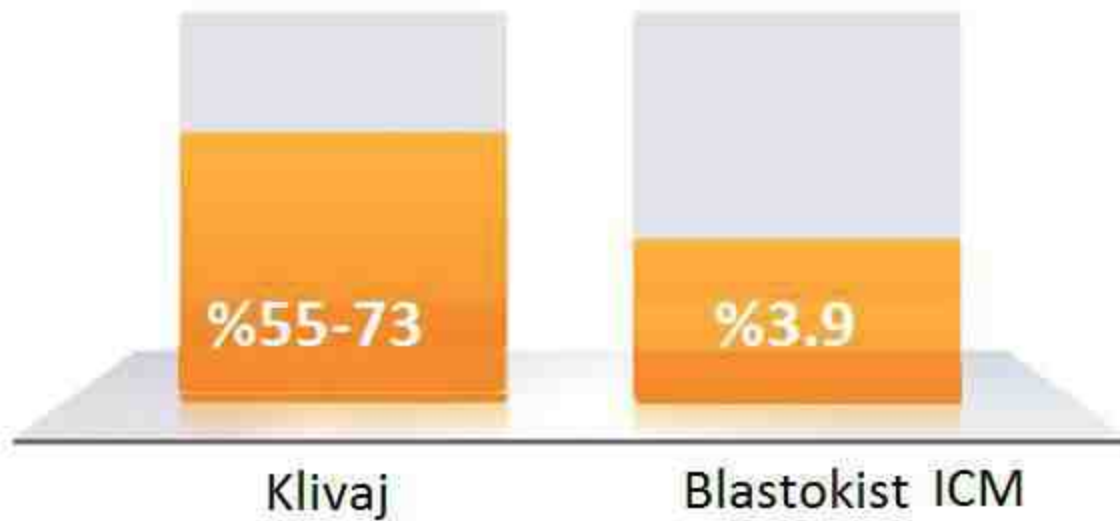
Hangi aşama?

Tuzaklar:

- Amplifikasyon kaybı (AK)
- Kontaminasyon
 - Reaksiyona farklı bir DNA karışması
- Preferential amplification
 - Bir alelin diğerine göre daha fazla amplifiye olması
- Allel dropout (ADO)
 - Heterozigot örneklerdeki bir alelin rasgele amplifiye olmaması
- Mozaisizm



Blastokistlerde mozaisizm



Johnson et al., 2010

Blastokistlerde Anöploidi



Tanya Milachich, 2014

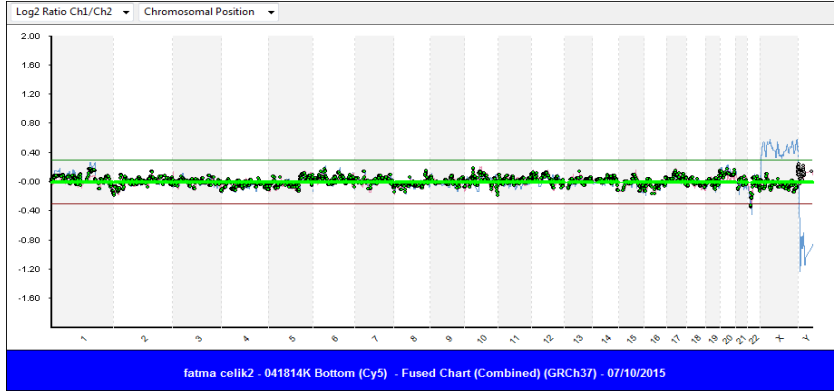
embriyo oluşumuna katılmayan hücreler biyopsi edilir

Blastomer ve trofektoderm hücrelerinde değerlendirme güvenilirliği

Array CGH

NGS

TROFEKTODERM



Summary result

Normal

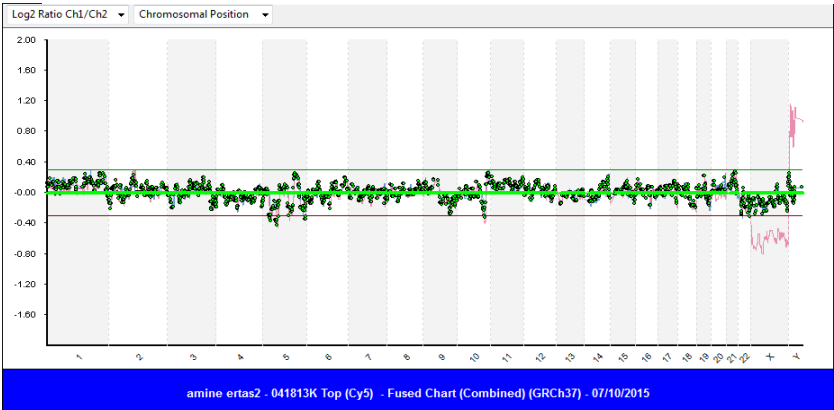
Reference type

Male

Detailed result

Chromosome	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
Imbalances	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Confidence	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

BLASTOMER

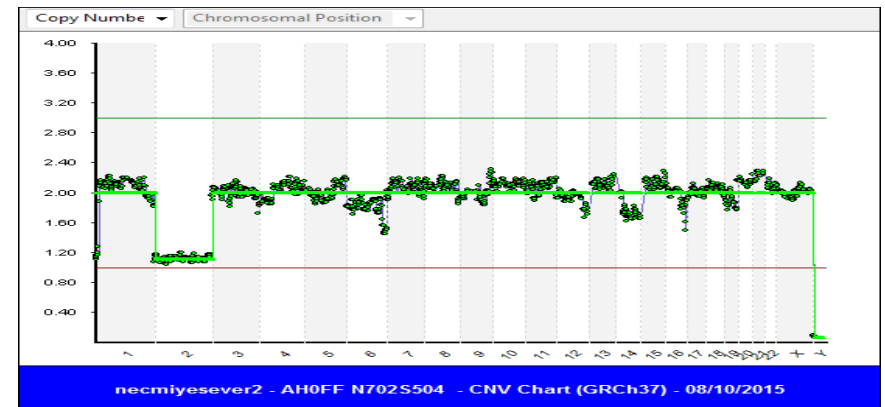
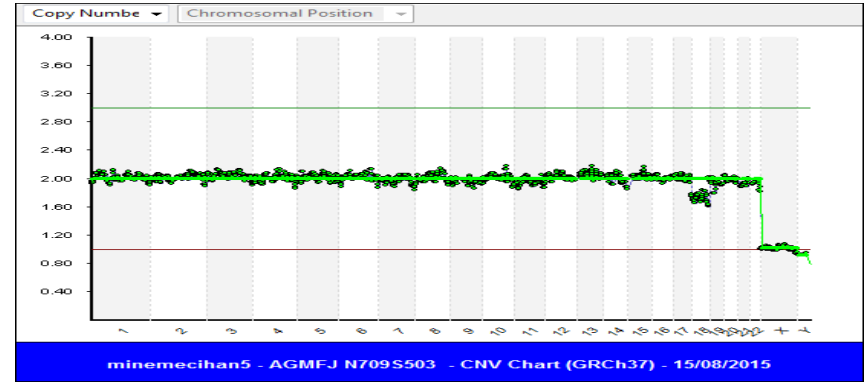


Summary result

Abnormal: -2

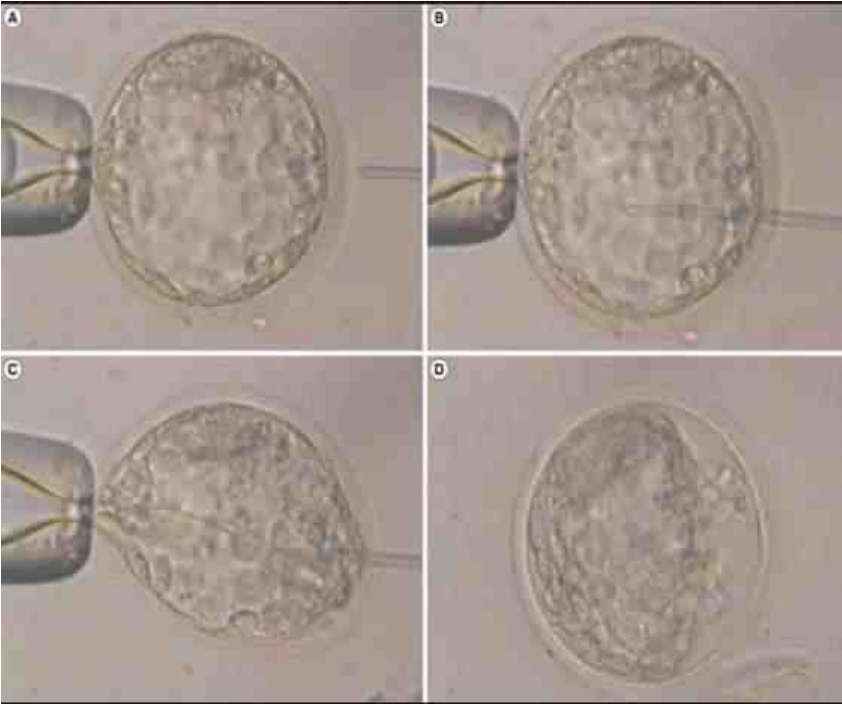
Detailed result

Chromosome	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
Imbalances	L																							
Confidence	0.94	0.99	0.99	0.99	0.99	0.92	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.93	0.99	0.97	0.99	0.99	0.99	0.99	0.96	0.99	0.99	0.99



Blastosöl sıvısı aspirasyonu

Biyopsi yapılmadan embriyonik DNA eldesi



- Blastosöl sıvı örneklerinin %90'ında fetal genomik DNA saptanmıştır.
- Embriyonik hiçbir hücre alınmadan bu sıvı ICSI pipetle aspire edilebilmektedir.

Palini et al., 2012

PGS TEKNOLOJİLERİ

FISH ANALİZİ



ARRAY-CGH



NGS



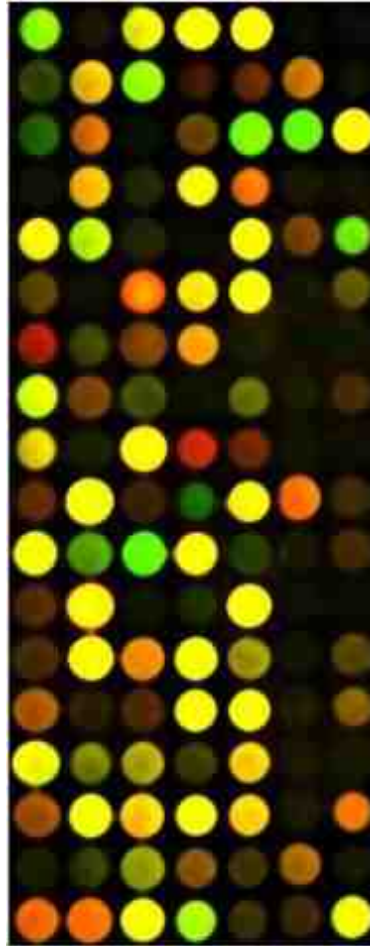
- 8-12 Kromozom tarar
- Öploid embriyo seçiminde sınırlıdır

- 24 kromozom tarar
- IVF başarısını arttırır

- Son teknoloji
- Güvenirliliği yüksek
- Hassasiyeti yüksek

Array CGH Platformları

- **BAC** (Bacterial Artificial Chromosome)
- **SNP**
- **Chromosome Library Arrays**
- **Oligonükleotid Arrays**

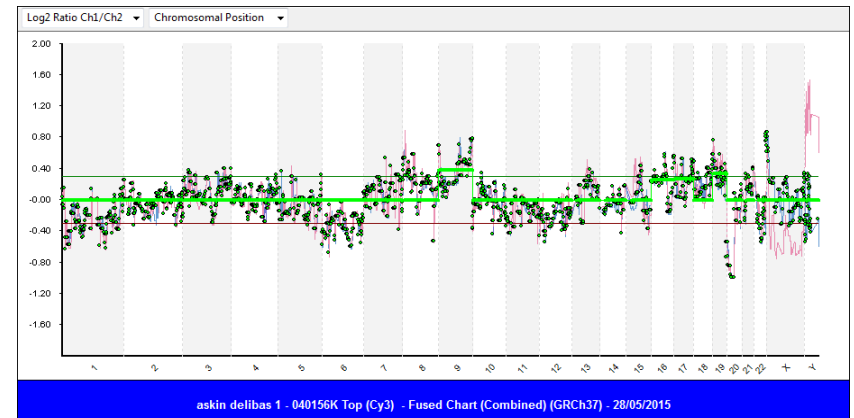
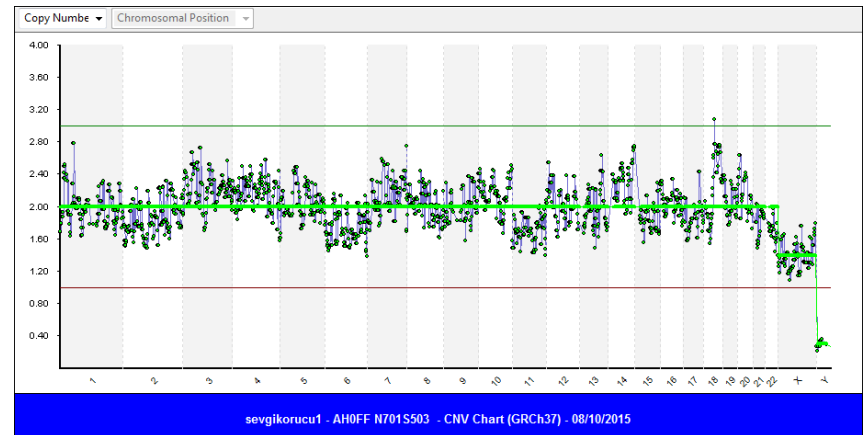


- **24 sure Array CGH (Illumina)**
- **Agilent**
- **RHS**
- **Cytosure Oxford gene technologies**

MIKROGEN
GENETIK HAYATI DAN TANI MEDICAL

A diagram of a cell. On the left is a large blue circle representing the cell membrane. Inside this circle is a smaller blue circle representing the nucleus. To the right of the nucleus are two rectangular boxes, one labeled 'Mitochondrion' and one labeled 'Chloroplast'. Arrows point from the nucleus to each of these two boxes.

İşbirliğine güvendiğimiz almanlar için teşekkür ederiz.



planner

Labelling 8-well strip

Date

Wednesday, October 24, 2018

Operator

Comments

Time started

	1	2	3	4	5	6	7	8	
strip 1	Male	HASTA1(1)	HASTA3(3)	Female	HASTA5(5)	HASTA7(7)	HASTA9(9)	HASTA11(11)	Cy3
strip 2	Male	HASTA2(2)	HASTA4(4)	Female	HASTA6(6)	HASTA8(8)	HASTA10(10)	HASTA12(12)	Cy5
strip 3									Cy3
strip 4									Cy5
strip 5									Cy3
strip 6									Cy5
strip 7									Cy3
strip 8									Cy5
strip 9									Cy3
strip 10									Cy5
strip 11									Cy3
strip 12									Cy5

Slide layout

top	Male	HASTA3(3)	HASTA5(5)	HASTA9(9)
	Male	HASTA4(4)	HASTA6(6)	HASTA10(10)
bottom	HASTA1(1)	Female	HASTA7(7)	HASTA11(11)
	HASTA2(2)	Female	HASTA8(8)	HASTA12(12)
barcode	041818K	041817K	041816K	041815K

Labelling master mix (µl)

	Cy3		Cy5	
	X1	X8*	X1	X8*
reaction buffer	5.0	42.0	5.0	42.0
dCTP lab. Mix	5.0	42.0	5.0	42.0
Cy3 dCTP	1.0	8.4	-	-
Cy5 dCTP	-	-	1.0	8.4
Klenow	1.0	8.4	1.0	8.4
total	12.0	100.8	12.0	100.8

*inc. 5% excess

Sayfa 1

24 Sure Array CGH (Illumina) - Uygulama süresi 12 saat

Figure 1: 24sure Laboratory Workflow



The 24sure laboratory workflow is a straightforward procedure that is completed in < 12 hours.

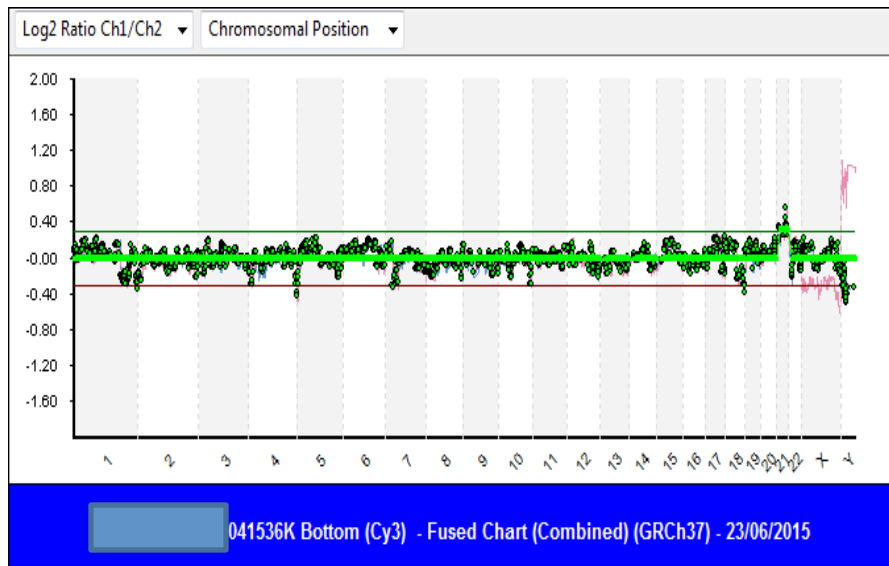
Figure 2: BlueFuse Multi Software Delivers a Complete Data Analysis and Information Management System



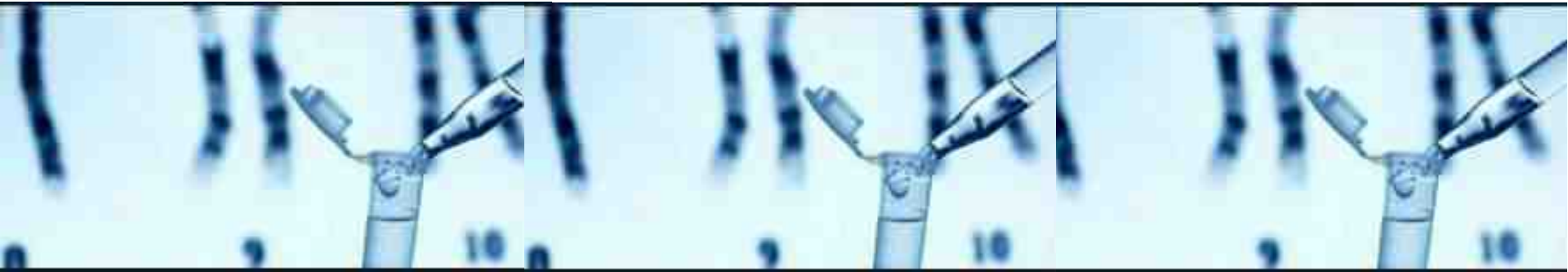
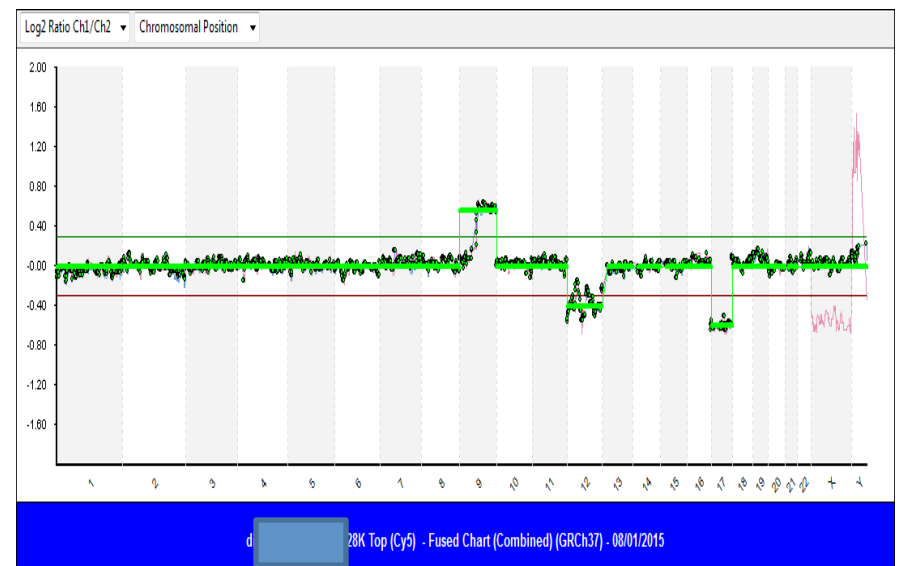
BlueFuse software provides a complete solution for analyzing, storing, and reporting 24sure results. A. Sample database displays experimental information. B. Array images imported directly from the scanner. C. Profiles for sample and reference chromosomes. D. Automated cycle reports.

24 sure görüntüler ve yorumları

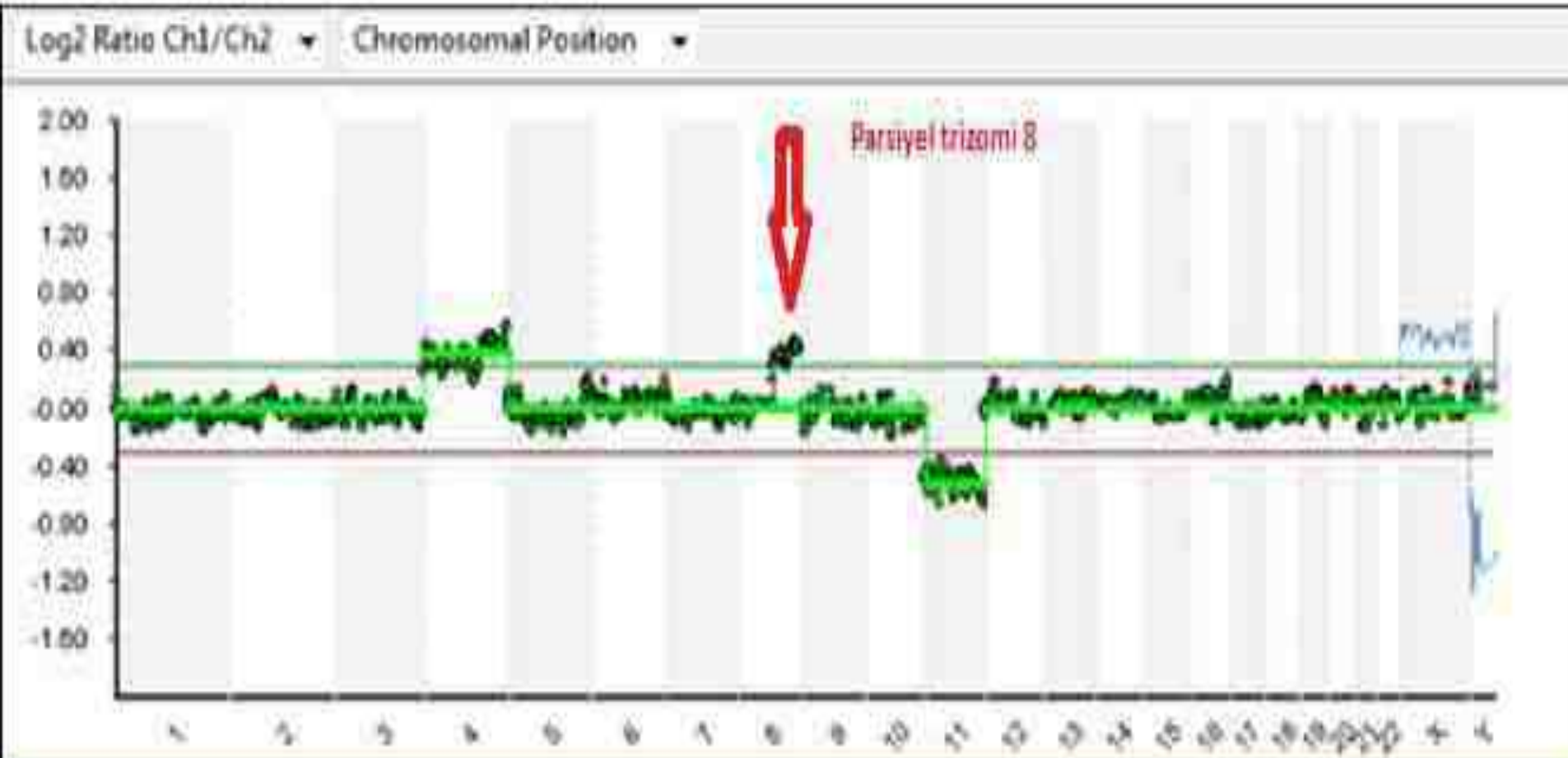
Trizomi 21



Trizomi 9, Monozomi 12,17

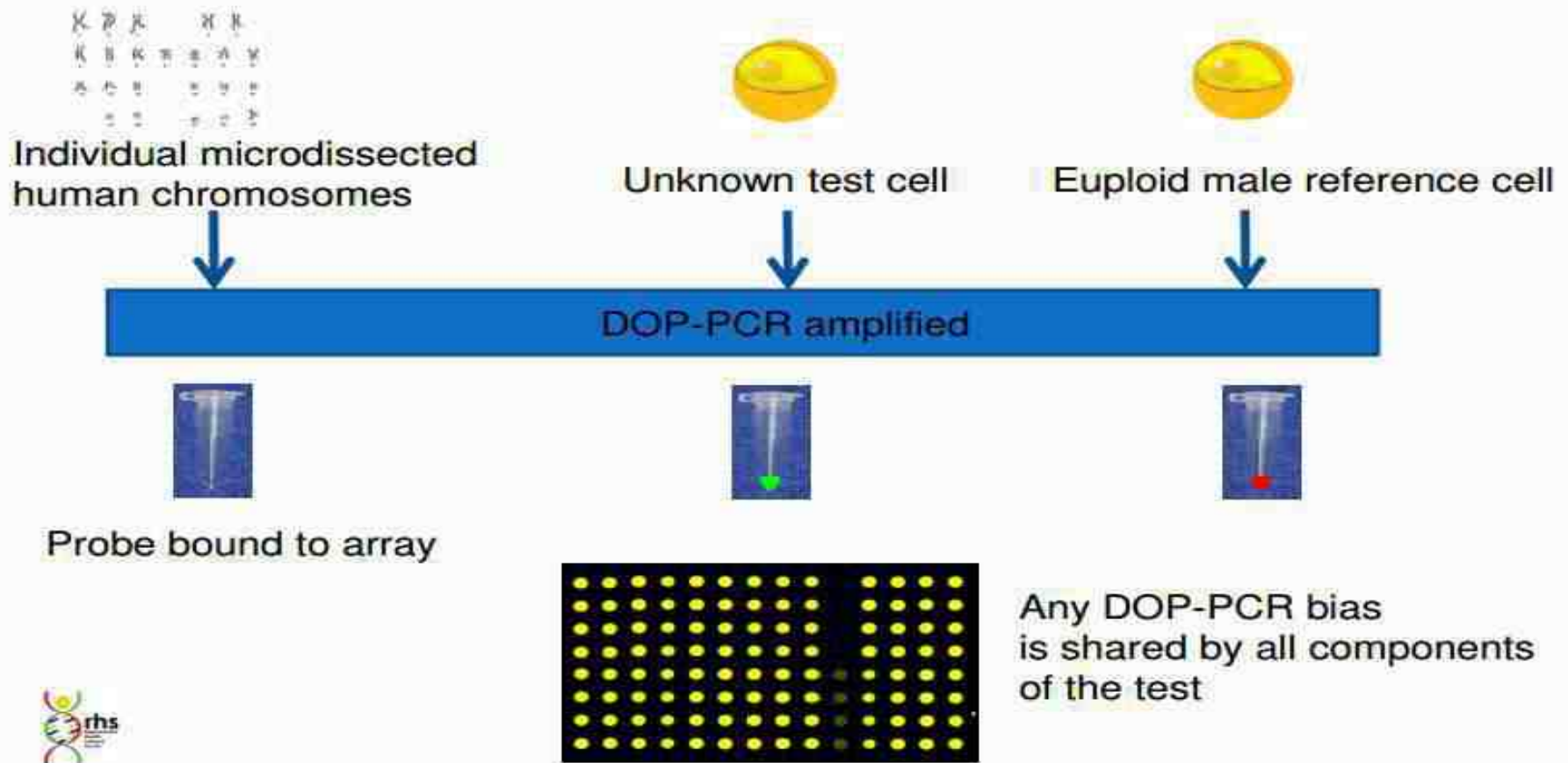


24 sure görüntüler ve yorumları

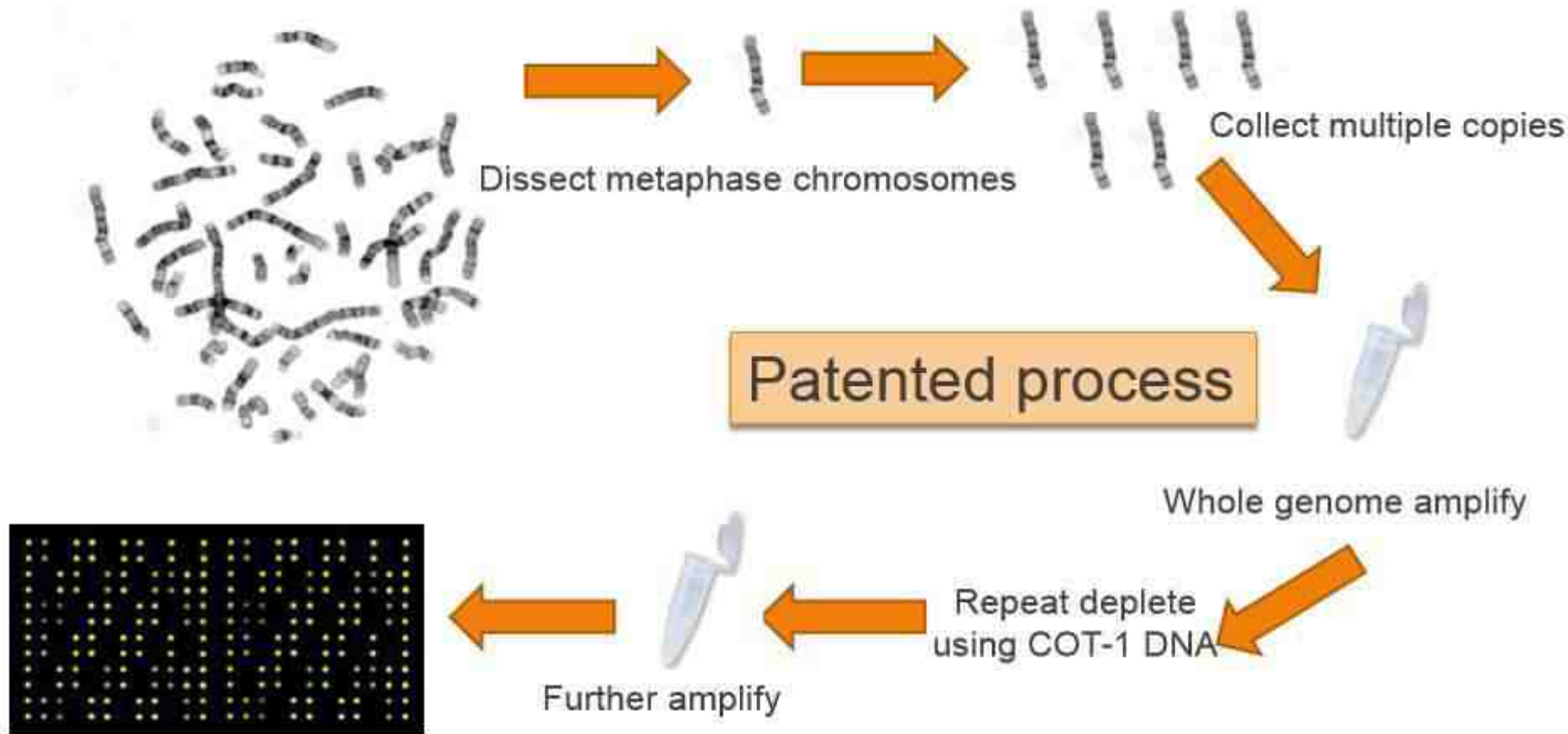


Kromozom Kütüphanesi –RHS Arrayleri

Principles of the RHS Array



Principles of the RHS microarray



Mikroarray üzerindeki her bir spotta tüm kromozom içeriği vardır.

Mikroarray üzerinde her bir kromozom için 8 replika yer almaktadır.

Her bir spot içerdiği kromozoma özgü 1.2 milyon özgün sekans içermektedir.

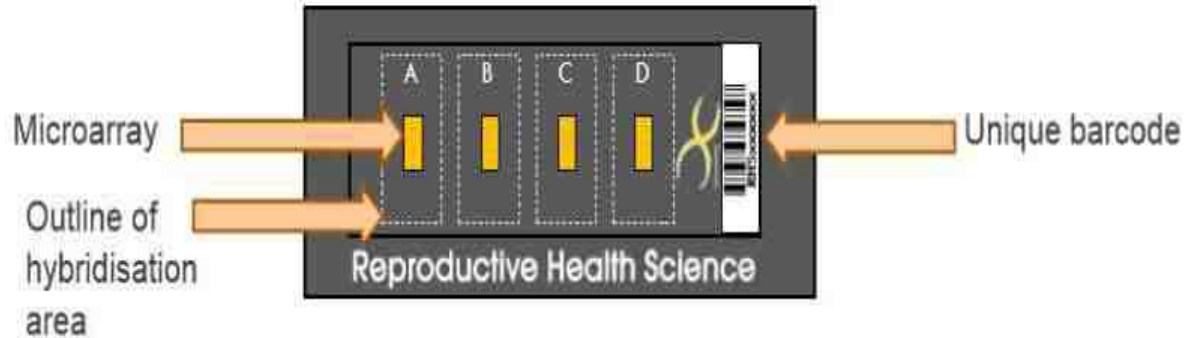
14 Saat uygulama



Microarray Workflow

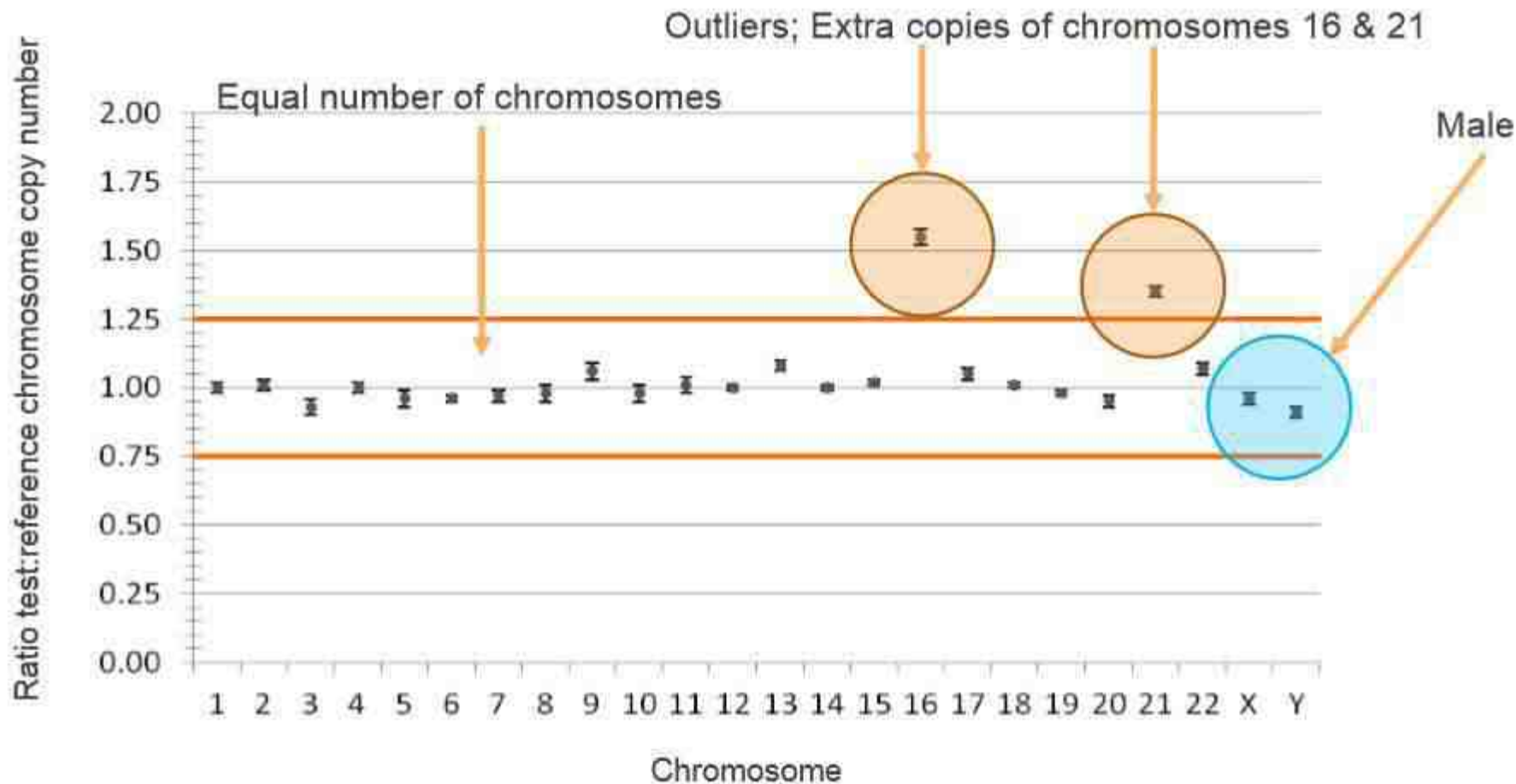
Protocol step	Time
Lysis	30 min set-up 15 min program
Whole Genome Amplification (WGA)	2 hr 30min PCR program 30 min agarose gel
Labelling PCR	15 min set-up 1 hr program 1 hr clean-up and agarose gel
Hybridisation	2-3 hr set-up 3 hr to overnight incubation
Washing and Scanning	15-40 min wash 1 hr to scan and analyse 4 arrays

RHS – Tek seferde kaç embriyo analiz edilebilir?



- Her bir slaytta 4 farklı array alanı bulunmaktadır.
- Test edeceğimiz örnek ve bilinen bir erkek referans kombine edilerek her bir mikroarraye hibridize edilir.
- Referansa göre oluşan kromozom sayısındaki farklılıklar test ve referansın floresan sinyallerinde farklılık oluşturacak ve ilgili kromozomda artış ya da azalışı gösterecektir

EmbryoCollect™ result arr(16,21)x3,(X,Y)x1

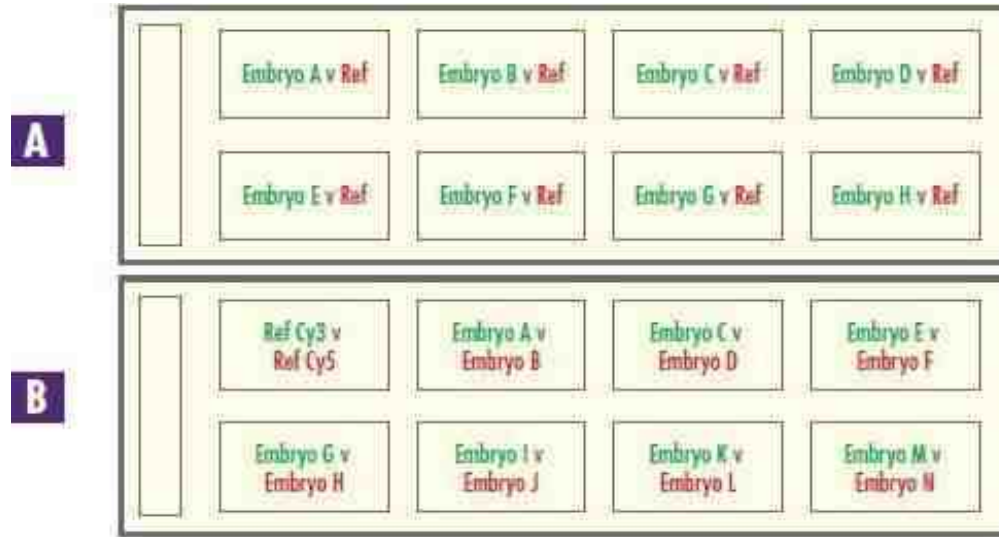


Example of the results graph produced by the RHS Excel macro

RHS Klinik çalışması

Platform	WGA	EMBRIYO SAYISI
RHS	EmbriyoCollect DOP PCR	65
24 Sure	Rubicon WGA	35
NGS Veriseq	Rubicon WGA	30

Cytosure Embryo Screen Array (8x60K)



- Cytosure embryo screen array'ler 8'li ve 14'lü mikroarray opsiyonları ile her hibridizasyonda sadece 2 referansa ihtiyaç olduğundan 112 örnek birkaç gün içerisinde bir yada iki personelle çalışılabilmekte.
- Daha az labelling ve hibridizasyon solusyonları ile işlem tamamlanabiliyor ve
- daha az slaytı scan edip analiz etme kolaylığı sağlıyor.

Using the CytoSure™ Embryo Screen array to identify aneuploidies and large structural imbalances in Polar Bodies 1 and 2

K.R. Held¹, S. Knebel¹, V. Baukloh²

1. Reprogenetics Germany GmbH, 2. MVZ Fertility Center Hamburg GmbH

- İncelenen 101 örnekten 7'si farklı sonuç vermiştir.
- Farklılıklar embriyonun öploid/anöploid olma durumunda bir değişiklik olarak kaydedilmemiştir.
- Daha çok aynı kromozomun delesyon yerine duplikasyon olarak saptanması söz konusu olmuştur.
- Bu durum duplikasyondaki şiddetin delesyondakinden düşük olmasından kaynaklanmıştır.
- Hangi platformun doğru sonucu verdiği ile ilgili ileri çalışma yapmak gerekmektedir.
- Bu çalışmada düşük kalite örnek denk gelmemiş olup değerlendirilemeyen embriyo olmamıştır.
- Bu çalışma ile PGD'nin yasal olmadığı ülkeler için ve non invaziv biyopsi yöntemi düşünüldüğünde polar body taraması ile gebelik başarısının arttırılabileceği önerilmiştir.

	Oocytes	
	Polar body 1 (#58)	Polar body 2 (#46)
# analysed	57	44
# validated	57	44
Chromosome gains /losses	25	N/A
Chromatid gains/losses	50	59

Table 1: Results of aberrations detected on the CytoSure Embryo Screen array platform.

1. Polar body (n=54)		2. Polar body (n=44)	
BAC array	OGT array	BAC array	OGT array
dup 22 sc	dup 22 #	dup 19 sc	normal
del X sc	normal		
dup X sc	dup X #		
dup 15 sc	dup 15 #		
dup 2 sc	del 2 #		
dup 6 #	dup 6 sc		

Table 2: Discrepancies detected between the BAC-based array platform and OGT's CytoSure Embryo Screen arrays platform. # = whole chromosome, sc = single chromatid

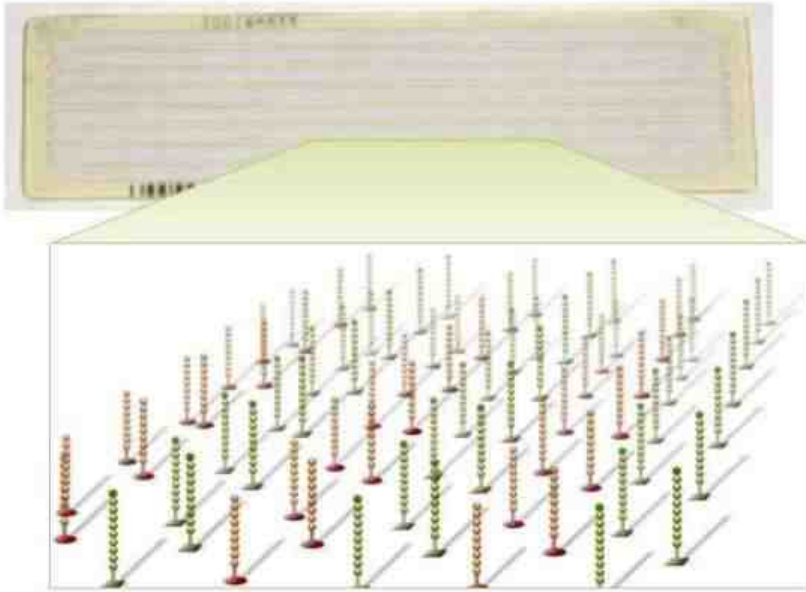
James Watson (2007)

NGS ile ilk genom sekanslaması

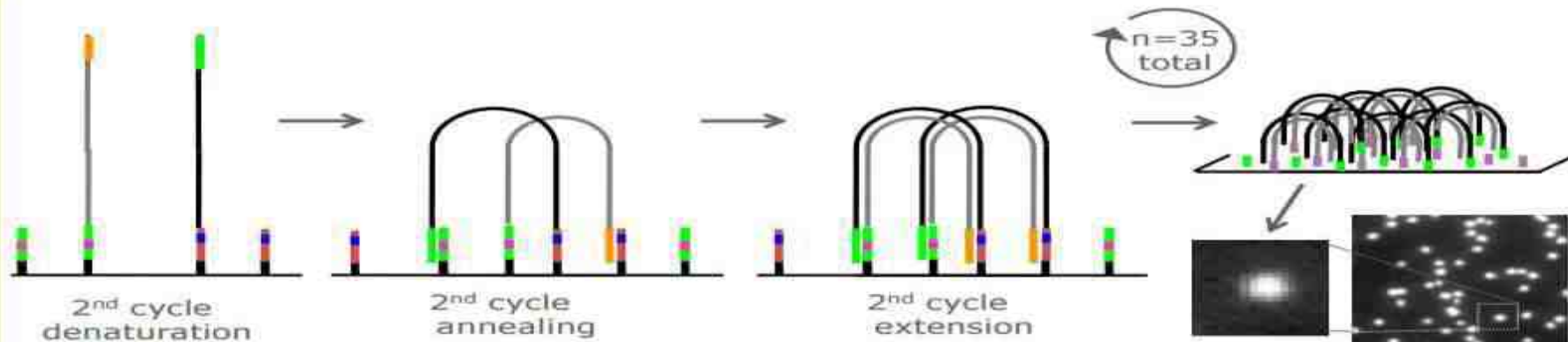
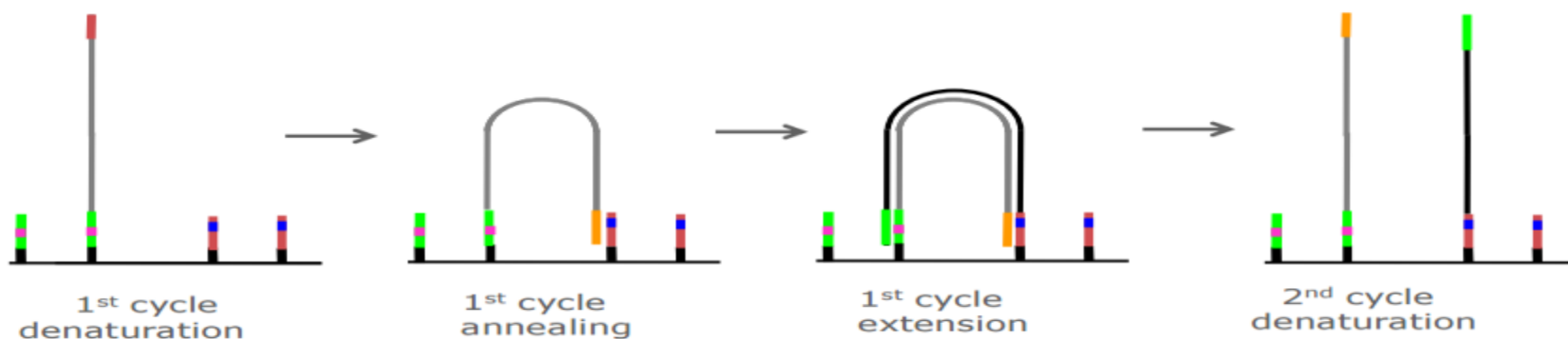
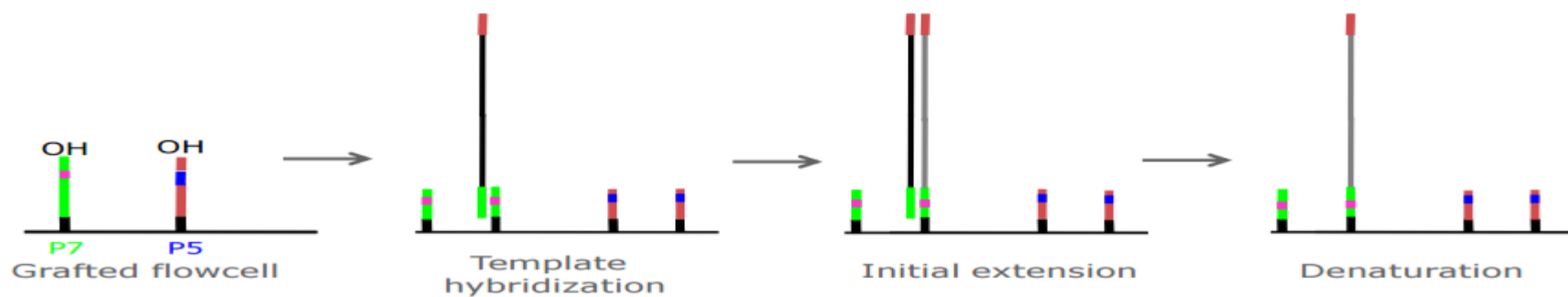


NGS teknolojisi çalışma prensibi

Flow cell yüzeyi



- Oligo çiftlerinin çimen gibi yüzeye dizildiği flow cell...
- Sekanslama flow cell deki clusterlar üzerinden yapılmaktadır



<https://www.youtube.com/watch?v=womKfikWlxM>

Sample Prep

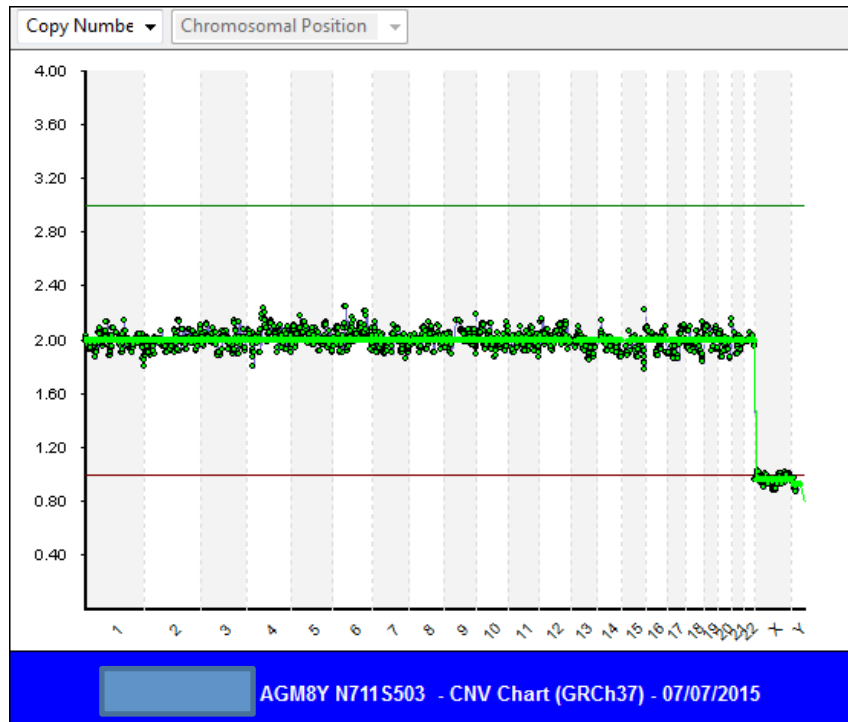


Veriseq NGS –PGS iş akışı ve test süresi

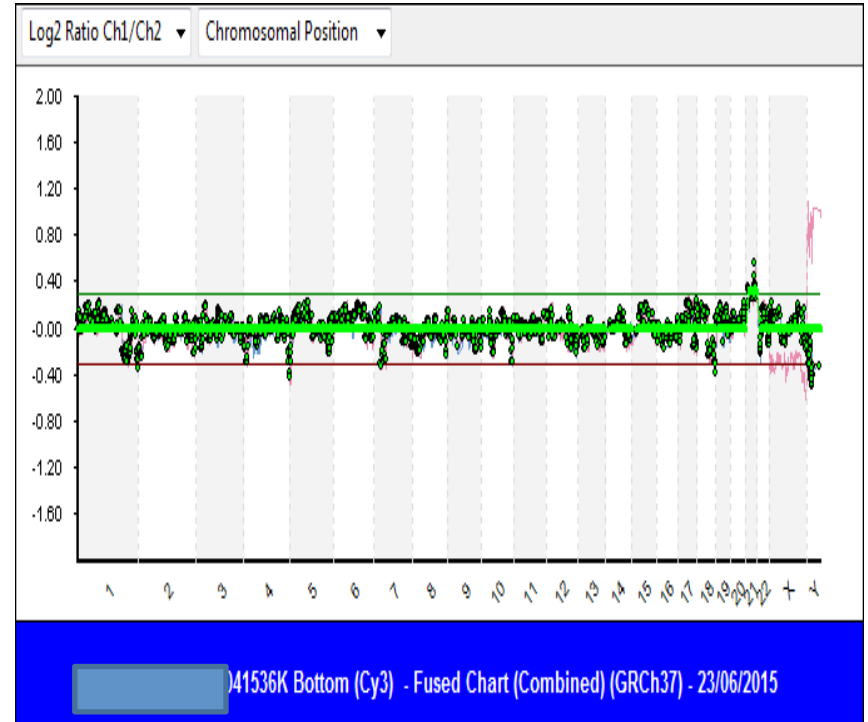


Embriyoda NGS sonuçlarının yorumlanması

NGS



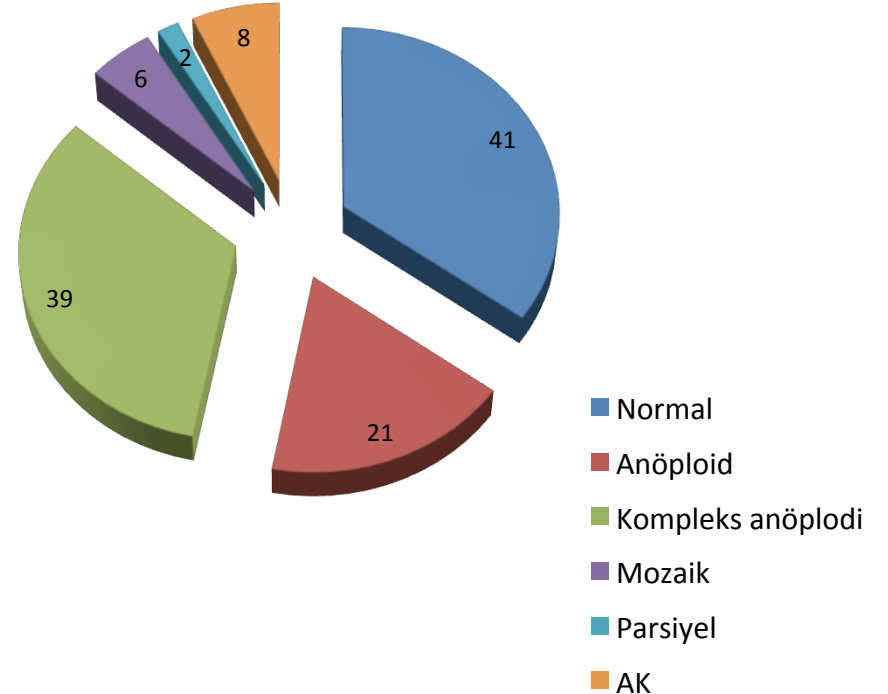
Array CGH



Ağustos-Ekim 2015 NGS Hasta verileri

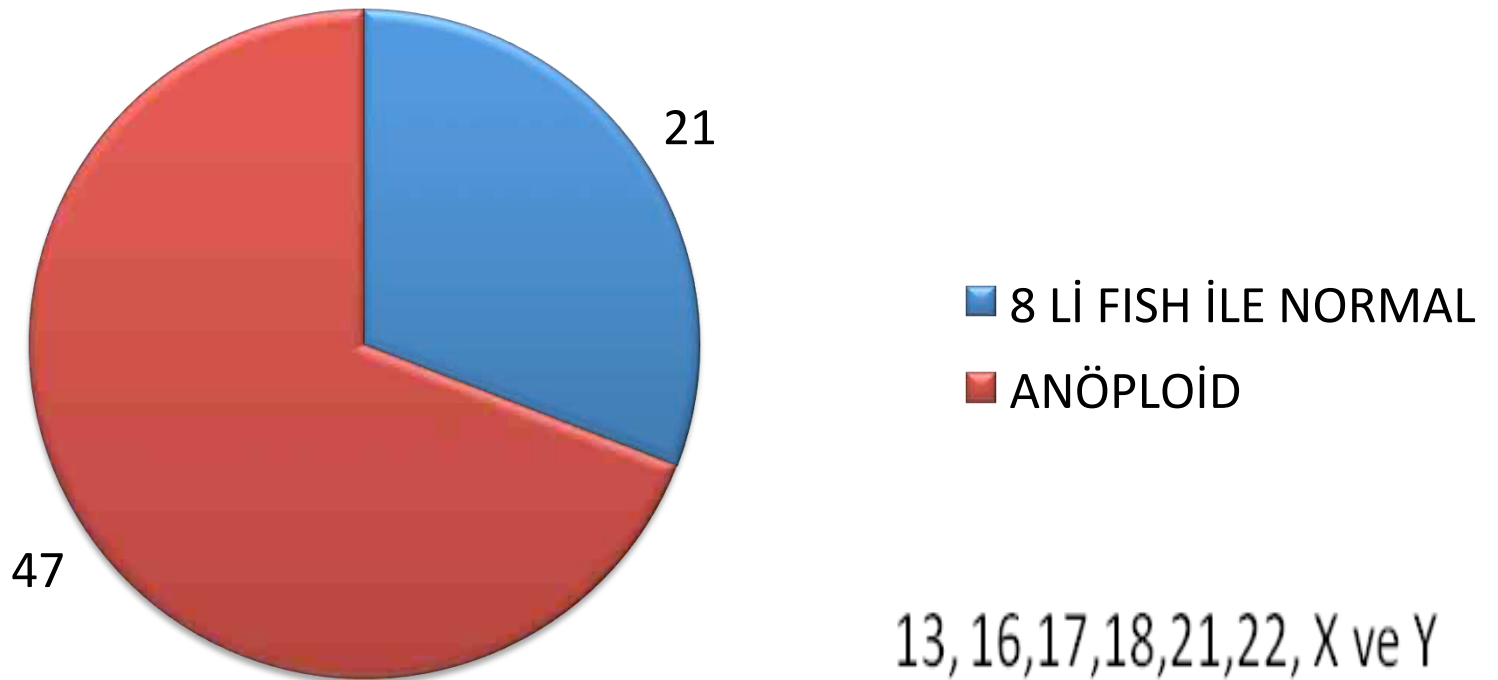
Sütun1	Sütun2
VERISEQ HASTA VERİLERİ	
Toplam Hasta Sayısı	34
Taranan Embriyo Sayısı	117
Hasta Başı Ort. Embriyo	3,44
Değerlendirilen Embriyo sayısı	109 (%93,2)
VERİSEQ EMBRİYO SAYILARI	
Normal	41 (%35)
Anöploid	21 (%18)
Kompleks anöplodi	39(%33)
Mozaik	6(%5)
Parsiyel	2 (%1,5~)
AK	8 (%6,8)

VERİSEQ EMBRİYO DEĞERLENDİRMELERİ

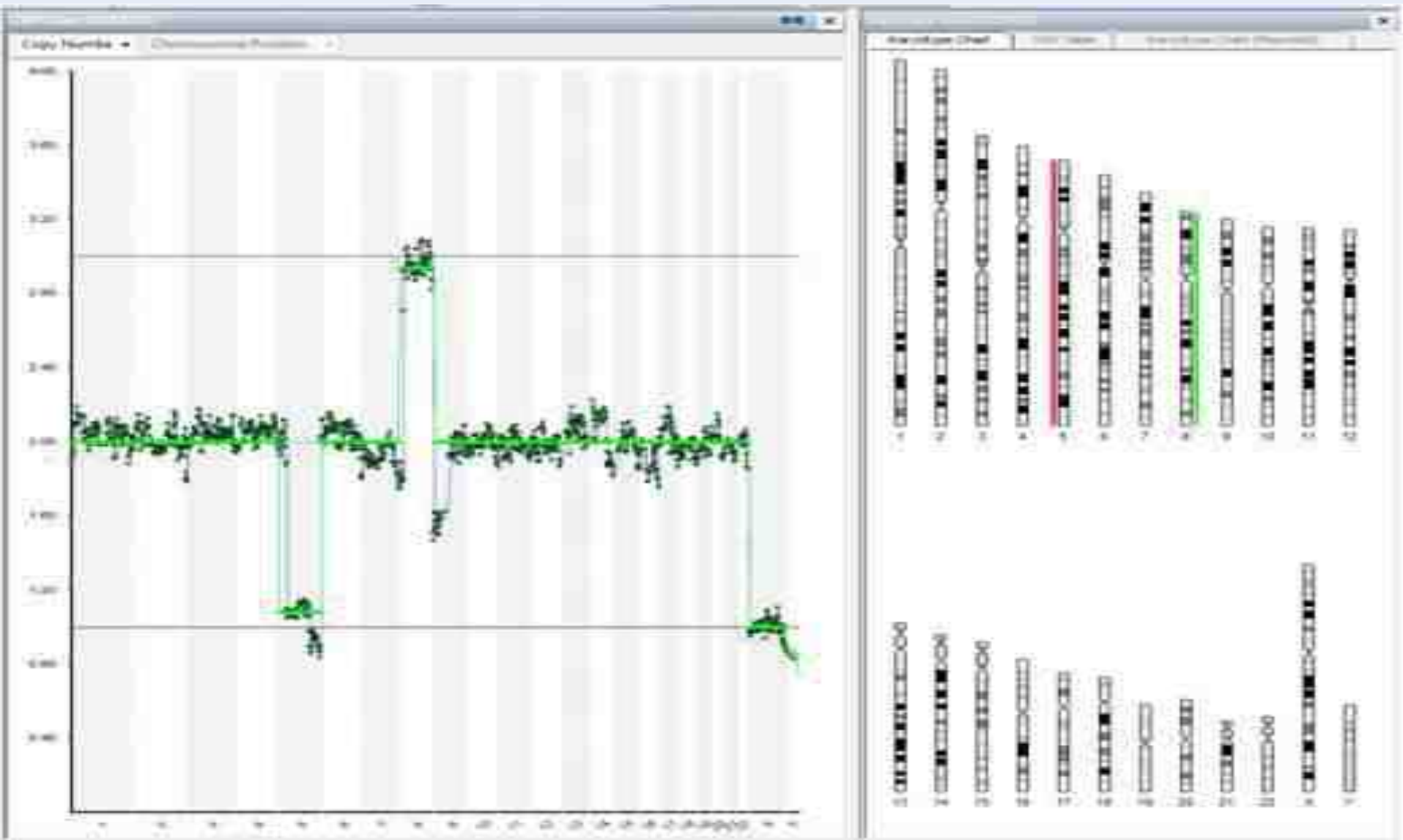


FISH uygulansaydı?

VERISEQ / FISH KARŞILAŞTIRMA



t(5:8)(p13;p12)



NGS teknolojisinin array teknolojilerine olan avantajları:

- (i) yüksek ölçekli dizileme kapasitesi sayesinde aynı anda daha fazla örneğin (24 embriyo için) test edilebilmesine olanak sağlamakta ve daha düşük maliyetle çalışma imkanı vermektedir;
- (ii) kromozomal analiz rezolusyonunun yüksek olması sonucu parsiyel veya segmental anöploidileri daha iyi yakalamaktadır (birkaç megabaza kadar düşebilir);
- (iii) birden fazla hücrenin incelendiği çalışmalarda mozaizmi daha net bir biçimde ortaya koymaktadır;
- (iv) kütüphane hazırlığı sırasındaki otomasyon sayesinde insan hatalarını ve çalışma süresini azaltmaktadır

NGS teknolojisi embriyolarda detaylı anöploidi taramasında güvenilir bir şekilde kullanılabilir mi?

Human Reproduction, Vol.0, No.0 pp. 1–12, 2014

doi:10.1093/humrep/deu277

human
reproduction

ORIGINAL ARTICLE *Reproductive genetics*

Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles

Francesco Fiorentino^{1,*}, Sara Bono¹, Anil Biricik¹, Andrea Nuccitelli¹, Ettore Cotroneo¹, Giuliano Cottone¹, Felix Kokocinski², Claude-Edouard Michel², Maria Giulia Minasi³, and Ermanno Greco³

NGS ile PGS

Table I Characteristic of patients involved in the study and clinical outcomes.

No. of couples treated	55
Mean female age in years (SD) ¹	39.9 (± 2.4)
No. of PGS cycles performed	55
Indication	
Advanced maternal age (≥ 38 years)	45 (81.8%)
Repeated implantation failures	10 (18.2%)
No. of oocytes retrieved	629
No. of mature oocytes injected ²	512 (81.4%)
No. of oocytes fertilized ³	410 (80.1%)
No. of embryos biopsied	195
Mean per cycle (SD) ⁴	3.5 (± 2.0)
No. of embryos analysed	195
No. of embryos with a WGA failure	3 (1.5%)
No. of embryos diagnosed	192 (98.5%)
No. of euploid blastocyst transferred	50
Mean (SD)	1.1 (± 0.2)
No. of embryo transfers	47 (85.5%)
No. of +hCG pregnancies	34 (72.3%)
No. of biochemical pregnancies	3
No. of early miscarriages	1
Clinical pregnancy rate per ET (N)	63.8% (30)
No. of fetal sacs	32
No. of fetal sacs with heart beats	31
Implantation rate	64.0%
Ongoing implantation rate	62.0%
No. of pregnancies went to term	30
No. of babies born	31

ET, embryo transfer; PGS, preimplantation genetic screening; WGA, whole genome amplification; N, Number of clinical pregnancies.

¹Median age (years): 39.3 (range 32.5–46.1).

²Calculated on no. of oocytes retrieved.

³Calculated on no. of mature oocytes injected.

⁴Median number of embryo biopsied per cycle: 4 (range: 1–10).

Table II Comprehensive aneuploidy screening results from the embryos investigated.

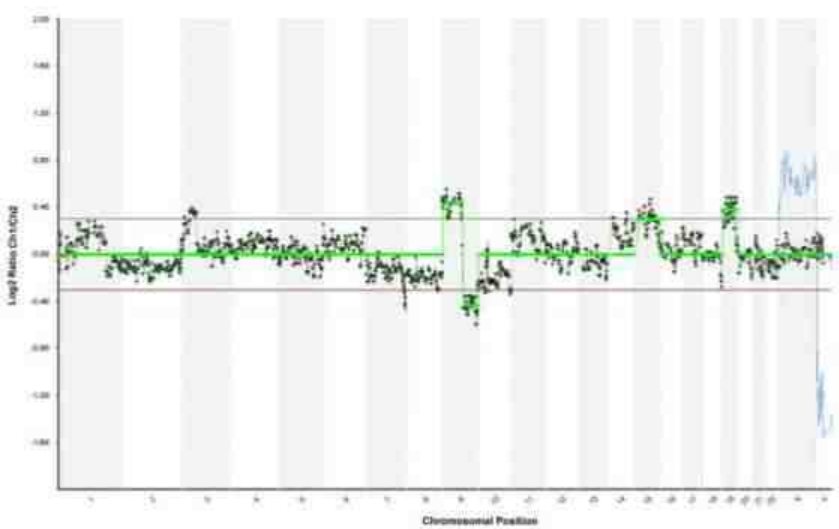
Samples	No. (%)
No. of embryos diagnosed	192
Euploid	74 (38.5)
Aneuploidy	106 (55.2)
Inconclusive	12 (6.3)
No. of chromosomes assessed	4608
No. of chromosomes with a conclusive diagnosis	4545
No. of chromosomes with an inconclusive diagnosis	63
Euploid	4334 (95.4)
Aneuploidy	211 (4.6)
Trisomies	80 (37.9)
Monosomies	90 (42.7)
Segmental imbalances	41 (19.4)

blastokist transferi
anöploidiyi ekarte eder mi?



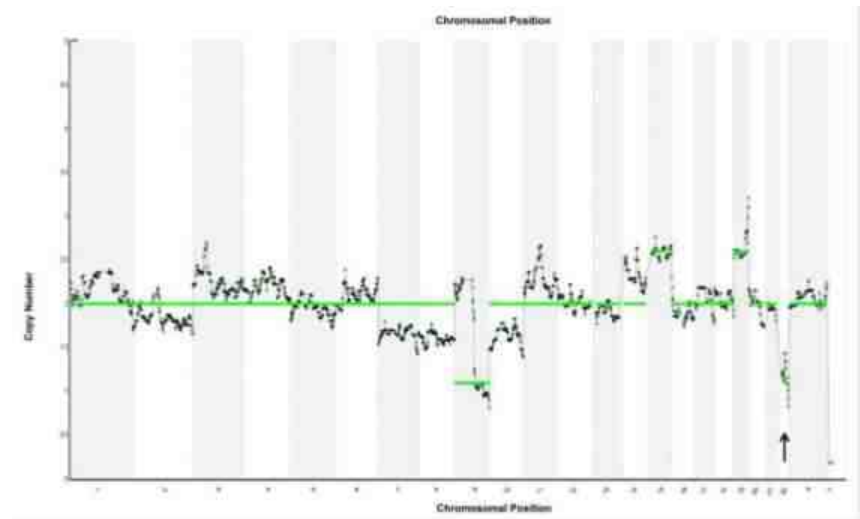
Fiorentino et. al., 2014

Array CGH



(+3p,7*,8*,+9p, 29q,10*,14*,+15 ve +19)

NGS



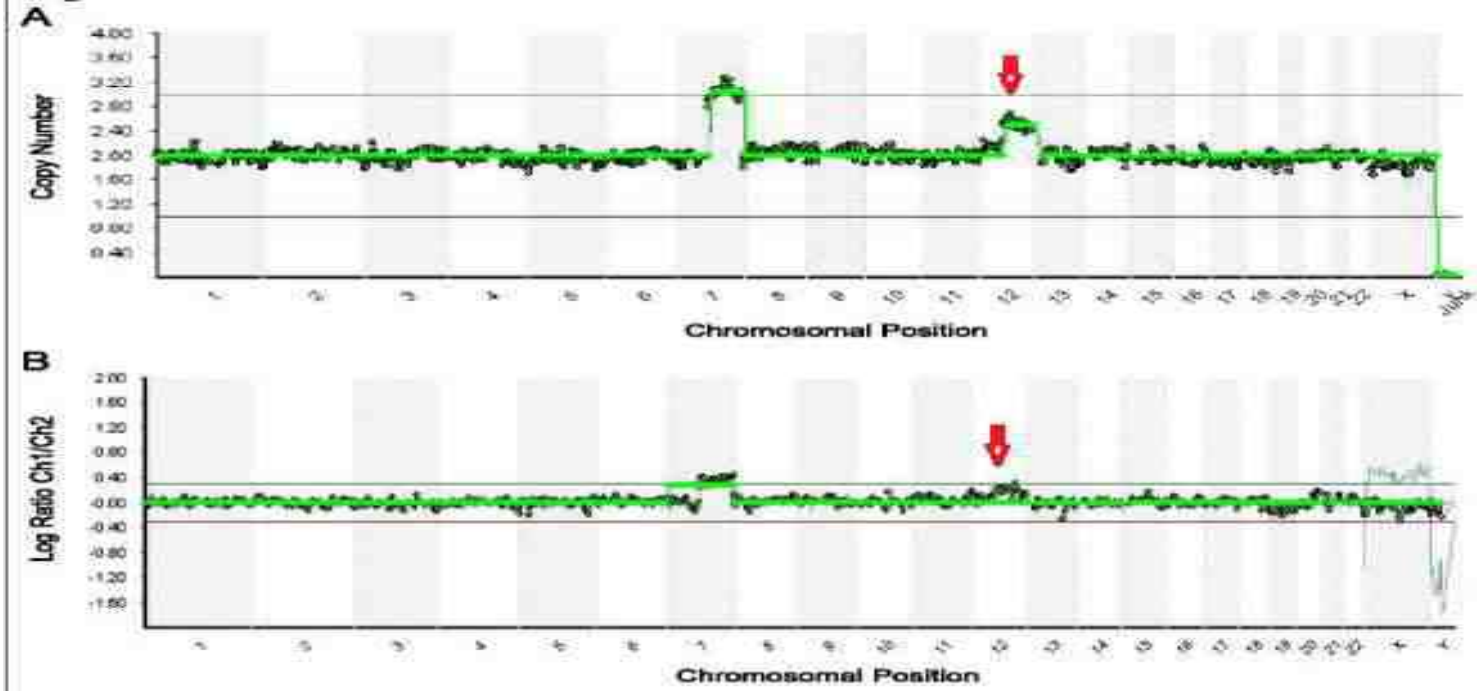
(+3p,7*,8*, +9p, 29q, 10*, 14*,+15,+19 ve **-22**)

NGS ile mozaik embriyo transfer kararı!



Yang et al. BMC Medical Genomics 2015 8:30

(Van Echten-Arends et al., 2011)



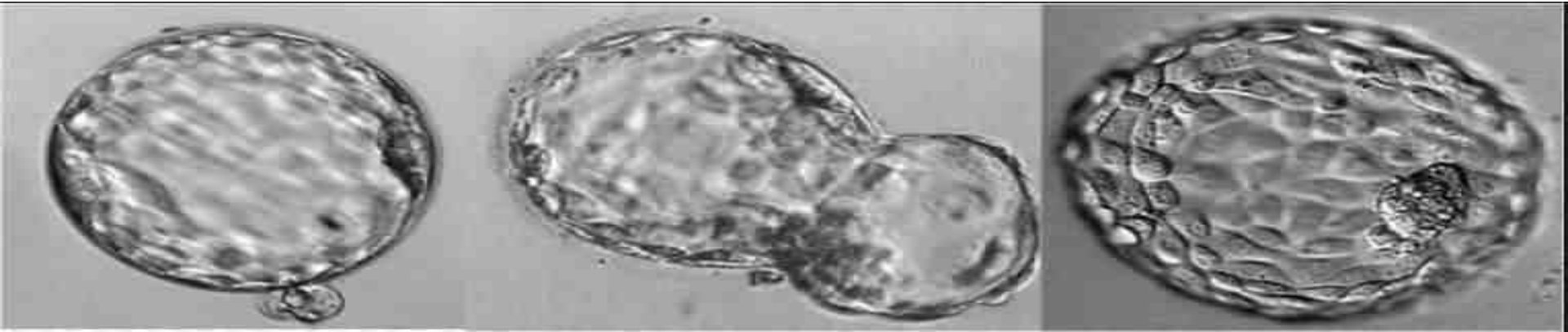
- NGS ile kromozom 12 de %46 mozaizm tespit edilmiştir.

NGS teknolojisi neler getiriyor?

- NGS embriyoda 24 kromozom taramada yüksek güvenilirlikte bir tekniktir.
- Array teknolojisi ile tespit edilemeyen mozaizizmleri yakalar
- NGS yüksek çözünürlükte bir tarama yapabildiğinde 14Mb'lık kromozomal dengesizliklere kadar yakalamaktadır.
- Daha yüksek okuma derinliğine sahip bu teknoloji embriyo başı daha düşük bir maliyetle servis vermektedir.
- NGS teknolojisi aynı wga örneğinden translokasyon, anöploidi tarama ve tek gen hastalıklarını belirleme şansı tanımaktadır. (*Treff et al., 2013; Wellsetal.,2013*)
- Tüm prosedür 24 saat içerisinde tamamlanabilmektedir.

NGS teknolojisinin limitasyonları

- Embriyo başı maliyetin uygun seviyede tutulabilmesi ancak aynı run da 24 embriyonun çalışmaya alınmasını ile sağlanabilmektedir. Yetersiz numune örnek başı yüksek maliyeti ortaya çıkaracaktır.
- Total DNA içeriğinde dengesizlik olmadığı için diğer platformlar gibi sadece dengesiz translokasyonları görüntüleyebilmektedir.
- NGS haploidi ve bazı poliploidileri alel oranlarını kullanarak tespit edebilme potansiyeline sahip olmasına rağmen bu protokolün sekans kapsamı ve okuma derinliği alel tespiti için yetersizdir.
- NGS uygulaması için gerekli cihaz parkı maliyeti çok yüksektir. Yetersiz numune kapasitesi bu teknolojinin kurulabilirliğini azaltmaktadır.



Teşekkürler



Teşekkürler

