

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ
ΧΩΡΕΜΕΙΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΠΑΙΔΩΝ «ΑΓΙΑ ΣΟΦΙΑ»
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αξιολόγηση της καταλληλότητας των μικροσυστοιχειών
Συγκριτικού Γενωμικού Υβριδισμού
(micro-array comparative genome hybridization, aCGH) στην
ανάλυση χρωμοσωμάτων σε έμβρυα για προεμφυτευτική γενετική
διάγνωση (PGD) και έλεγχο (PGS).

Πάντου Αμέλια

<i>ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ</i>	<i>ΥΠΟΓΡΑΦΗ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ</i>
Joanne-Traeger Συνοδινού, Επίκουρη Καθηγήτρια Γενετικής	
Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής Τομέα Φυσιολογίας Ζώων	
Λιαδάκη Καλλιόπη, Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας	

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση (PGD)

1.1.1. Εξωσωματική Γονιμοποίηση (IVF)

Η διαδικασία της IVF

1.1.2. Βιοψία εμβρύου

1.1.3. Μοριακές τεχνικές γενετικής ανάλυσης

Κυκλική αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Φθορίζον in situ υβριδισμός (FISH)

1.2. Προεμφυτευτικός Γενετικός Έλεγχος (PGS)

1.3. Συγκριτικός γενωμικός υβριδισμός

ΣΚΟΠΟΣ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Απομόνωση μεμονωμένων ανθρώπινων λεμφοκυττάρων

2.2. Ενίσχυση ολόκληρου του γονιδιώματος

2.2.1. Ενίσχυση ολόκληρου γονιδιώματος (WGA)

2.2.2. Καθαρισμός των PCR προϊόντων.

2.2.3. Φασματοφωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος καθαρότητας ολικού DNA

2.3. Συγκριτικός Γενομικός Υβριδισμός (microarray-CGH)

2.3.1. Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH

2.3.2. Bluegenome 24sure

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Ενίσχυση ολόκληρου του γονιδιώματος

3.1.1. GenomePlex®

3.1.2. SurePlex™

3.2. Συγκριτικός Γενομικός Υβριδισμός (microarray-CGH)

3.2.1. Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH

3.2.2. Bluegenome 24sure

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, της Ιατρικής Σχολής Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, «Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο», Νοσοκομείο Παίδων «Αγία Σοφία», κατά το χρονικό διάστημα Σεπτεμβρίου 2010-Ιουνίου 2011.

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Διευθυντή του Εργαστηρίου, Καθηγητή Εμμανουήλ Καναβάκη, για την δυνατότητα που μου προσέφερε να διεκπεραιώσω την μελέτη αυτή στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών και για το ενδιαφέρον του κατά την διάρκεια της.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα. Joanne Traeger-Συνοδινού, Επίκουρη Καθηγήτρια Γενετικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε για την επίβλεψη, την καθοδήγηση και τις υποδείξεις της σε όλα τα στάδια της εργασίας.

Ευχαριστίες οφείλω και στον κ. Κουρέτα Δημήτριο, Καθηγητή Τομέα Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, καθώς και την κα. Καλλιόπη Λιαδάκη, Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την συγκατάθεσή τους να συμμετάσχουν ως μέλη της τριμελούς επιτροπής της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην κα. Μαρία Τζέτη, Επίκουρη Καθηγήτρια Γενετικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες παρατηρήσεις κατά τη διάρκεια των πειραμάτων καθώς και για την αξιολόγηση των εργαστηριακών αποτελεσμάτων.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τη Γεωργία Κάκουρου, PhD προεμφυτευτική γενετική, για την πολύπλευρη βοήθεια και στήριξη που μου παρείχε, την καθοριστική συμβολή της στη συγγραφή των πειραμάτων, τις χρήσιμες επιστημονικές της επισημάνσεις καθώς και την διάθεσή της να μου λύσει όσο το δυνατόν περισσότερες απορίες.

Εξαιρετικά χρήσιμη και καθοριστική υπήρξε η στήριξη που μου παρείχαν οι υποψήφιοι διδάκτορες, Βασίλης Οικονομάκης και Κρινιώ Γιαννίκου, οι οποίοι με μύησαν στις μοριακές τεχνικές και με βοήθησαν σημαντικά στην οργάνωση και στη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να επισημάνω την ιδιαίτερα σημαντική συμβολή των ανθρώπων που απαρτίζουν το εργαστήριο αυτό στην διεκπεραίωση της εργασίας αυτής. Ευχαριστώ θερμά την Χριστίνα Βρεττού (PhD), την Ασπασία Δεστούνη (PhD), την Ειρήνη Φυλακτού (MSc) και όλα τα μέλη του εργαστηρίου.

Τέλος, χρωστάω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξη που μου παρέχουν σ' όλα τα βήματα της ζωής μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (PGD) αποτελεί ένα από τα τελευταία επιστημονικά επιτεύγματα στον τομέα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και της γενετικής, προσφέροντας λύσεις σε ζευγάρια που επιθυμούν να αποκτήσουν υγιή παιδιά. Με τον προεμφυτευτικό γενετικό έλεγχο (PGS) υπάρχει πια η δυνατότητα να ελεγχθούν τα έμβρυα για χρωμοσωμικές ανωμαλίες, πριν την εμφύτευσή τους στη μήτρα της υποψήφιας μητέρας, μειώνοντας την πιθανότητα για αποβολή, όπως επίσης και την πιθανότητα ενός πάσχοντος απογόνου. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η εφαρμογή δύο τεχνολογιών (Oligo-arrays και BAC-arrays), με σκοπό τη χρήση τους στο PGS. Συγκεκριμένα, έγιναν πειράματα με βάση δύο πρωτόκολλα: αυτό της κατασκευάστριας εταιρίας Agilent, με χρήση της τεχνολογίας των Oligo-arrays και αυτό της εταιρίας Bluegenome, με χρήση της τεχνολογίας των BAC-arrays. Σκοπός ήταν η αξιολόγηση και σύγκριση των δύο αυτών μεθόδων για την ανάλυση χρωμοσωμάτων σε έμβρυα για PGD και PGS.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση

Η ανάπτυξη των τεχνικών μοριακής και κυτταρικής γενετικής φέρνουν τα ζευγάρια πιο κοντά στη δυνατότητα να αποκτήσουν υγιή παιδιά, χωρίς γενετικές και χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Η Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση (PGD) χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την εξωσωματική γονιμοποίηση προκειμένου να πιστοποιηθεί η γενετική κατάσταση των εμβρύων ώστε να μεταφερθούν, στη μήτρα της υποψήφιας μητέρας, μόνο τα υγιή εξ' αυτών. Θεωρείται ένας άλλος τρόπος προγεννητικού ελέγχου, αποφεύγοντας την περίπτωση επιλεκτικής διακοπής της κύησης, αφού ελέγχει ότι τα έμβρυα είναι απαλλαγμένα από την υπό εξέταση νόσο πριν την επίτευξη της εγκυμοσύνης.

Η μέθοδος κυρίως εφαρμόζεται:

- για τη διάγνωση αυτοσωμικών υπολειπόμενων κληρονομικών νοσημάτων, μεταξύ των οποίων η μεσογειακή αναιμία και η κυστική ίνωση που ενδημούν στην Ελλάδα,
- για τη διάγνωση αυτοσωμικών επικρατούντων κληρονομικών νοσημάτων,
- για κληρονομικά φυλοσύνδετα νοσήματα.

Η ιδέα της PGD προτάθηκε για πρώτη φορά το 1967, όταν οι Robert Edwards και Richard Gardner επιχείρησαν να πιστοποιήσουν το φύλο βλαστοκύστεων κουνελιού, με χρώση για την ανάδειξη του σωματίου Barr, μιας φυλετικής πρωτεΐνης. Η πρώτη κλινική εφαρμογή της PGD έγινε το 1990 στο νοσοκομείο Hammersmith του Λονδίνου, από τον βιολόγο Alan Handyside και τους συνεργάτες του (Handyside et al 1990). Η τεχνική χρησιμοποιήθηκε για δύο ζευγάρια που διέτρεχαν τον κίνδυνο να μεταδώσουν στους απογόνους τους ένα φυλοσύνδετο νόσημα, ειδικότερα, αδρενολευκοδυστροφία (ALD) και φυλοεξαρτόμενη νοητική υστέρηση. Και στις δύο περιπτώσεις έγινε βιοψία με σκοπό την πιστοποίηση του φύλου του εμβρύου και την επιλογή των θηλυκών εμβρύων για μεταφορά. Δύο χρόνια μετά, η ίδια ομάδα χρησιμοποίησε τη μέθοδο της PGD για πρώτη φορά για ένα μονογονιδιακό νόσημα, την κυστική ίνωση (Handyside et al 1992). Ήδη από το 1998 γεννήθηκε στην Ελλάδα το πρώτο παιδί που σε εμβρυϊκό στάδιο (έμβρυο τριών ημερών) υποβλήθηκε σε έλεγχο για την β- μεσογειακή αναιμία (Kanavakis et al 1999). Ο αριθμός των

ασθενειών που σήμερα έχουν διαγνωστεί μέσω PGD είναι περίπου 200, και περιλαμβάνουν κληρονομικά νοσήματα όπως η αχονδροπλασία, η νόσος Tay-Sachs, η μυϊκή δυστροφία Becker/Duchenne, το σύνδρομο εύθραυστου X, η χορεία του Huntington. Επίσης σήμερα μπορούν και ελέγχονται μερικές κληρονομήσιμες μορφές καρκίνων, όπως το ρετινοβλάστωμα και το γονίδιο ευαισθησίας (BRCA-2) για τον καρκίνο του μαστού, για τα οποία έχουν γίνει πολλές συζητήσεις πάνω σε ηθικά ζητήματα που προκύπτουν από τη διάγνωσή τους (Fragouli E. 2007). Επιπλέον, η ευρεία εφαρμογή και τελειοποίηση των μεθόδων βιοψίας σε συνδυασμό με τον όλο και περισσότερο αυξανόμενο αριθμό πρωτοκόλλων για τη γενετική ανάλυση που εφαρμόζονται δίνει, από τον Δεκέμβρη του 2003, τη δυνατότητα για ταυτοποίηση της ιστοσυμβατότητας (HLA) εμβρύων. Έτσι μπορεί πλέον να γίνει επιλογή εμβρύων που θα χρησιμοποιηθούν και ως δότες πολυδύναμων κυττάρων του αιμοποιητικού σε πάσχοντα αδέρφια. Το 2005 γεννήθηκε στην Ελλάδα το πρώτο παιδί διεθνώς όπου πραγματοποιήθηκε βιοψία στο στάδιο της βλαστοκύστης για έλεγχο της β-μεσογειακής αναιμίας (Kokkali et al 2005).

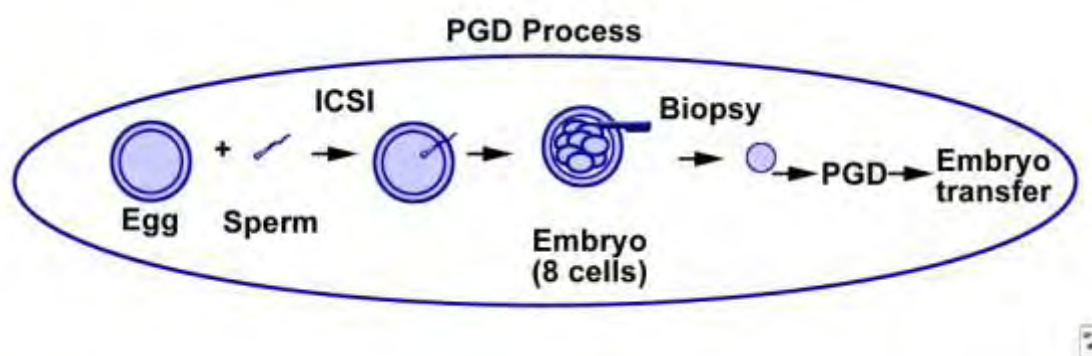
Τα τελευταία χρόνια άρχισε να εφαρμόζεται και ένας γενικότερος έλεγχος των χρωμοσωμάτων, γνωστός ως προεμφυτευτικός γενετικός έλεγχος (PGS). Έτσι η PGD χωρίζεται σε << υψηλού κινδύνου PGD >> (high risk PGD) και προτείνεται σε ζευγάρια που διατρέχουν τον κίνδυνο μεταβίβασης κάποιου γενετικού νοσήματος ή συγκεκριμένης χρωμοσωμικής ανωμαλίας στους απογόνους τους, και σε <<χαμηλού κινδύνου PGD>> (low risk PGD ή PGS), για τον έλεγχο των εμβρύων για αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Το τελευταίο θα συζητηθεί εκτενέστερα στην συγκεκριμένη εργασία παρακάτω.

Στην Ευρώπη, σύμφωνα με τα στοιχεία που έχει δημοσιεύσει η ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) στην τελευταία αναφορά της για τη χρονιά 2007-2008, όπου συμμετείχαν 57 κέντρα, πραγματοποιήθηκαν 5887 ωοληψίες, 1516 εγκυμοσύνες και 1206 γεννήσεις. Συνολικά αναφέρθηκαν 3753 κύκλοι για PGS. Οι ενδείξεις ήταν, χρωμοσωμικές ανωμαλίες για 729 κύκλους, φυλοσύνδετες διαταραχές για 110 κύκλους και μονογονιδιακά νοσήματα για 1203 κύκλους (Harper et al 2010).

Η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση είναι αποτέλεσμα συνεργασίας πολλών επιστημονικών ειδικοτήτων, γυναικολόγων, εμβρυολόγων και γενετιστών.

Συγκεκριμένα, για τη διαδικασία ακολουθούνται τα εξής στάδια: η εξωσωματική γονιμοποίηση, η βιοψία, η γενετική ανάλυση και η εμβρυομεταφορά (*Εικόνα 1.*)

Εικόνα 1. Τα στάδια της διαδικασίας της PGD.



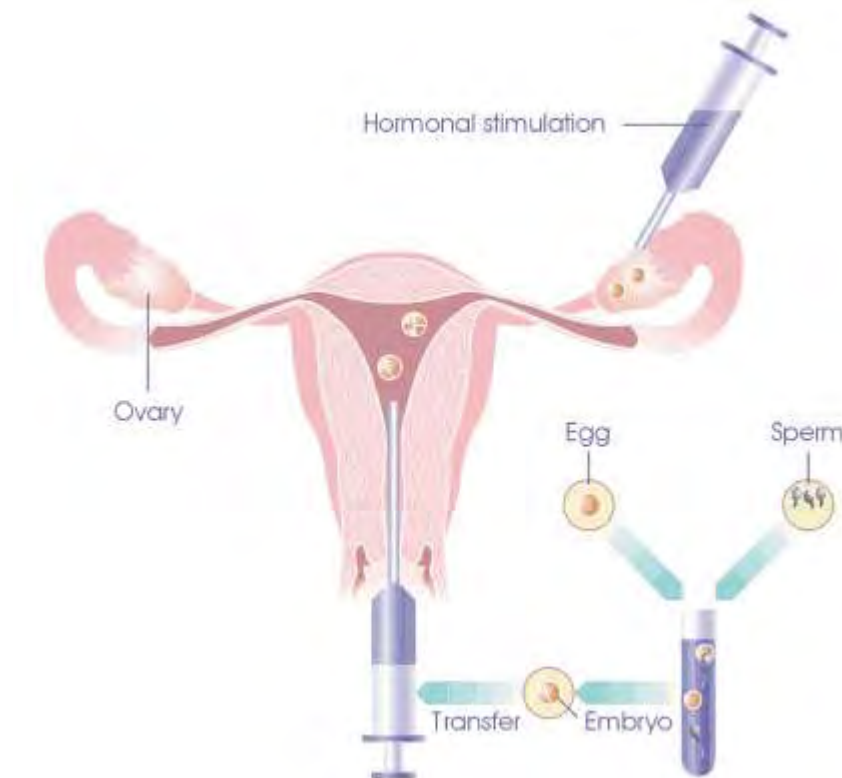
1.1.1. Εξωσωματική Γονιμοποίηση

Η υποβοηθούμενη αναπαραγωγή αποτελεί έναν από τους τομείς που γνώρισαν μεγάλη ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια, δίνοντας λύσεις στην υπογονιμότητα που ταλαιπωρεί πάνω από το 15% των ζευγαριών ανα τον κόσμο, ενώ πανελληνίως υπολογίζονται 250.000-300.000 τα υπογόνιμα ζευγάρια. Το 1973 αναφέρθηκε, από την ερευνητική ομάδα των καθηγητών Carl Wood και John Leeton, του πανεπιστημίου Monash της Μελβούρνης, η πρώτη εγκυμοσύνη με IVF, η οποία όμως οδήγησε σε πρόωρη αποβολή. Το πρώτο «παιδί του σωλήνα», η Louise Joy Brown, γεννήθηκε στις 25 Ιουλίου του 1978, στο Νοσοκομείο Oldham της Αγγλίας, από τον βρετανό γυναικολόγο και μαιευτήρα στο Γενικό Νοσοκομείο του Oldham, Dr. Patrick Steptoe, σε συνεργασία με τον βιολόγο και φυσιολόγο του πανεπιστημίου του Cambridge, Dr. Robert Edwards. Έκτοτε με τη βοήθεια της εξωσωματικής γονιμοποίησης έχουν γεννηθεί έως σήμερα 2.300.000 παιδιά σε όλο τον κόσμο (IVF worldwide unit directory IVF History, ιστοσελίδα <http://www.ivf-worldwide.com>). Αρχικά, η εξωσωματική γονιμοποίηση εφαρμόστηκε σε γυναίκες με απόφραξη σαλπίγγων. Σταδιακά, επεκτάθηκε και σε άλλες αιτίες στειρότητας, όπως η ολιγοσπερμία, η ενδομητρίωση, η ανεξήγητη στειρότητα, αλλά και εκεί όπου όλες οι άλλες μέθοδοι αντιμετώπισης της στειρότητας ενός ζευγαριού είχαν ήδη αποτύχει. Σήμερα, καλύπτει όλες τις αιτίες υπογονιμότητας, ενώ χρησιμοποιείται και στην περίπτωση που το ζευγάρι δεν είναι υπογόνιμο, αλλά επιθυμεί να προβεί στη διαδικασία της PGD.

Η διαδικασία της IVF

Η μέθοδος της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης (IVF) αποτελείται από ορισμένα στάδια (*Εικόνα 2.*) που απαιτούν τη συνεργασία γυναικολόγων και εμβρυολόγων.

Εικόνα 2. Σχηματικά η διαδικασία της IVF.



Ειδικότερα, πριν ξεκινήσει η διαδικασία, το ζευγάρι υποβάλλεται σε ορισμένες απαραίτητες ιατρικές και αιματολογικές εξετάσεις που σκοπό έχουν να αυξήσουν, όσο το δυνατό περισσότερο, την επιτυχή εφαρμογή της μεθόδου. Πρώτο στάδιο της IVF είναι η ωοθηκική διέγερση. Η χορήγηση φαρμάκων με σκοπό τη διέγερση των ωοθηκών είναι αναγκαία σε κάθε γυναίκα. Ο συνδυασμός φαρμάκων, η δοσολογία και το είδος της θεραπείας εξατομικεύονται και προσαρμόζονται στις ανάγκες του κάθε ζευγαριού. Βάσει αυτών, προσδιορίζεται ο πλέον κατάλληλος χρόνος για την εκτέλεση της ωοληψίας, η οποία αποτελεί το δεύτερο στάδιο της IVF. Η ωοληψία πραγματοποιείται με διακολπική παρακέντηση των ωοθυλακίων και στη συνέχεια

εμβρυολόγοι απομονώνουν τα ωάρια. Λίγη ώρα μετά την ωοληψία ζητείται στον σύζυγο να δώσει το σπέρμα του. Μερικές ώρες μετά την ωοληψία και αφού το σπέρμα έχει υποστεί ειδική επεξεργασία, για την αφαίρεση του προστατευτικού υγρού και τη συλλογή των καλών σπερματοζωαρίων, γίνεται η τοποθέτησή του μαζί με τα ωάρια μέσα σε καλλιεργητικό υγρό ωαρίων (Elder K and Dale B 2000, In Vitro Fertilization (2nd edition), UK, Cambridge University Press.). Σε περιπτώσεις σοβαρής ανδρικής στειρότητας αλλά και στην περίπτωση που θα ακολουθηθεί η διαδικασία της PGD, η γονιμοποίηση των ωαρίων γίνεται με τη μέθοδο που αποκαλείται ενδοκυτταροπλασμική έγχυση σπερματοζωαρίου (Intra Cytoplasmic Sperm Injection, ICSI) (Van Steirteghem et al 1993). Πρόκειται για μία μικρή επέμβαση στο ωάριο, όπου κάτω από ένα πολύ ισχυρό μικροσκόπιο συλλαμβάνεται ένα σπερματοζωάριο με μικροπιπέττα και αφού διανοιχτεί το περίβλημα του ωαρίου τοποθετείται μέσα στο κυτταρόπλασμά του. Με τη μέθοδο ICSI, πάνω από το 95% των ζευγαριών με προβλήματα σπέρματος καταφέρνουν να επιτύχουν γονιμοποίηση και εμβρυομεταφορά, ενώ υπολογίζεται ότι με την τεχνική αυτή γονιμοποιείται περίπου το 70% των ωαρίων (Abdelmassih S. et al 2002). Επίσης χρησιμοποιώντας τη συγκεκριμένη μέθοδο αποφεύγεται η πιθανότητα επιμόλυνσης, η οποία πρέπει να αποφευχθεί στην περίπτωση που ακολουθηθεί η διαδικασία του PGD μετά, ώστε στη φάση της βιοψίας (κεφάλαιο 1.1.2 παρακάτω) να μην υπάρχει επιπλέον σπέρμα. Την επόμενη ημέρα, ελέγχεται η γονιμοποίηση, η οποία επιβεβαιώνεται με τη δημιουργία δύο προπυρινίων εντός των ωαρίων (Elder K and Dale B 2000, In Vitro Fertilization (2nd edition), UK, Cambridge University Press). Σε 48 ώρες μετά την ωοληψία, στα γονιμοποιημένα ωάρια έχει ξεκινήσει ήδη η διαδικασία της διαίρεσης σε 2 ή 4 κύτταρα (Ziebe S. et al 1997). Την τρίτη μέρα ο αριθμός των κυττάρων ποικίλει, αλλά τα καλύτερα έμβρυα έχουν διαιρεθεί σε 8 και περισσότερα κύτταρα, από όπου μπορεί να γίνει βιοψία ενός ή δύο κυττάρων για γενετικό έλεγχο, ενώ την πέμπτη ή έκτη μέρα της ζωής τους είναι πλέον στο στάδιο των βλαστοκύστεων όπου τα έμβρυα έχουν πλέον διαιρεθεί σε 150-200 κύτταρα και έχει αρχίσει να γίνεται διαφοροποίηση τους σε τροφοβλάστη και εμβρυικό πόλο (*Εικόνα 3.*). Σε αυτή τη φάση είναι δυνατή η αφαίρεση 10-30 κυττάρων από την τροφοβλάστη και έτσι είναι διαθέσιμο περισσότερο γενετικό υλικό για έλεγχο (Kokkali et al 2005). Τα διαγνωσμένα έμβρυα πρέπει να μεταφερθούν στη μήτρα της μητέρας την έκτη μέρα μετά τη γονιμοποίηση. Εάν δεν υπάρχει διαθέσιμος χρόνος για την γενετική ανάλυση τα έμβρυα μπορούν να συντηρηθούν με τη μέθοδο της κρυοσυντήρισης στην κατάψυξη, επιτρέποντας στα

ζευγάρια να χρησιμοποιήσουν τα έμβρυά τους σε επόμενο κύκλο. Τα ανθρώπινα έμβρυα καταψύχονται επιτυχώς, είτε στο στάδιο των προπυρηνίων (ζυγωτό), είτε μετά από κυτταρική διαίρεση, ακόμη και ως βλαστοκύστες. Διατηρούνται σε υγρό άζωτο στους -196 βαθμούς Κελσίου. Με τη σημερινή τεχνολογία, το 85% περίπου των εμβρύων επιβιώνουν μετά την απόψυξη. Διεθνώς, οι έως τώρα μελέτες αναφέρουν ότι τα ποσοστά εμβρυικών ανωμαλιών μετά την απόψυξη είναι τα ίδια με τα αντίστοιχα της εξωσωματικής γονιμοποίησης (De Vos A et al 2001).

Εικόνα 3. Η πρώτη εικόνα δείχνει ένα ωκύτταρο, ενώ οι υπόλοιπες τα στάδια διαίρεσης των εμβρύων.



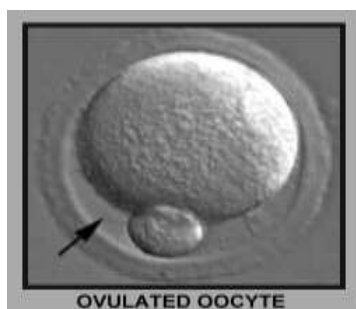
Σύμφωνα με τα στοιχεία της ESHRE, γενικά το ένα τέταρτο περίπου του συνόλου των ζευγαριών που ζητούν PGD (είτε για χρωμοσωμικές, είτε για μονογονιδιακές διαταραχές) έχουν ούτως ή άλλως ανάγκη τη βοήθεια της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, την οποία επιθυμούν να συνδυάσουν με PGD (ESHRE PGD Consortium, 2002). Μετά το στάδιο της εξωσωματικής γονιμοποίησης ακολουθεί η διαδικασία της βιοψίας των εμβρύων που προέκυψαν.

1.1.2. Βιοψία

Αφού έχει προηγηθεί η IVF, τα ωάρια υποβάλλονται σε βιοψία, όπου γίνεται η λήψη ενός ή περισσότερων κυττάρων στο εργαστήριο. Τρεις είναι οι πηγές εμβρυικού γενετικού υλικού που προσφέρονται για PGD (Tarín JJ, Handyside AH. 1993):

A) Βιοψία πολικού σωματίου (polar body, PB / *Εικόνα 4*) στο στάδιο του ζυγωτού την πρώτη μέρα μετά τη γονιμοποίηση (Verlinsky et al, 1990). Η μέθοδος που ακολουθεί εφαρμόζεται μόνο για τον εντοπισμό χρωμοσωμικών ανευπλοειδιών και μετατοπίσεων μητρικής προέλευσης στα ωάρια, αφού μπορεί να ελεγχθεί μόνο ο γονότυπος του μητρικού γαμετικού κυττάρου, ενώ ο πατρικός παραμένει άγνωστος. Έτσι, δεν μπορούν να ελεγχθούν ανωμαλίες που μπορεί να προκύψουν μετά τη γονιμοποίηση, οπότε παραμένει άγνωστη και η ποιότητα των εμβρύων, κατάλληλης ή μη, για εμβρυομεταφορά.

Εικόνα 4. Ωοκύτταρο



B) Βιοψία βλαστομεριδίων στο στάδιο της αυλάκωσης, την 3η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση (φάση 6-8 κυττάρων / *Εικόνα 5*). Η διαδικασία επιτρέπει την απομόνωση ενός ή δύο βλαστοκυττάρων. Παραταύτα, οι απόψεις διίστανται για το κατά πόσο είναι επιβλαβής ή όχι, για την ανάπτυξη του εμβρύου η απομόνωση κυττάρου στο συγκεκριμένο στάδιο, ενώ υπάρχουν και προβλήματα που σχετίζονται κυρίως με τον μωσαικισμό των κυττάρων του εμβρύου στο στάδιο αυτό (Van De Velde H, et al 2000). Η βιοψία εμβρύων στη φάση αυτή είναι η πιο ευρέως εφαρμοζόμενη.

Εικόνα 5. Έμβρυο στο στάδιο της αυλάκωσης, την 3^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση



Γ) Βιοψία τροφοεκτοδερμικών κυττάρων στο στάδιο της βλαστοκύστης, την 5^η ή 6^η μέρα μετά τη γονιμοποίηση (φάση 150-200 κυττάρων / *Εικόνα 6.*). Τα κύτταρα αυτά ισοδυναμούν με αυτά της τροφοβλάστης, αφού η περιφερική στοιβάδα της βλαστοκύστης εξελίσσεται σε χοριακές λάχνες του εμβρύου. Η βιοψία δεν επηρεάζει την ομαλή εμβρυική ανάπτυξη, καθώς δεν παραβιάζεται η εσωτερική κυτταρική μάζα, ενώ εξασφαλίζει μεγαλύτερη ποσότητα γενετικού υλικού. Δυστυχώς μόνο το 40% των εμβρύων επιβιώνουν μέχρι αυτό το στάδιο. Τα περισσότερα κέντρα εξωσωματικής γονιμοποίησης δεν εφαρμόζουν βιοψία εμβρύων που βρίσκονται στο στάδιο αυτό, καθώς απαιτείται σημαντική εμπειρία και εκπαίδευση του εμβρυολόγου που θα την χειριστεί.

Εικόνα 6. Έμβρυο στο στάδιο της βλαστοκύστης, την 5^η ή 6^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση



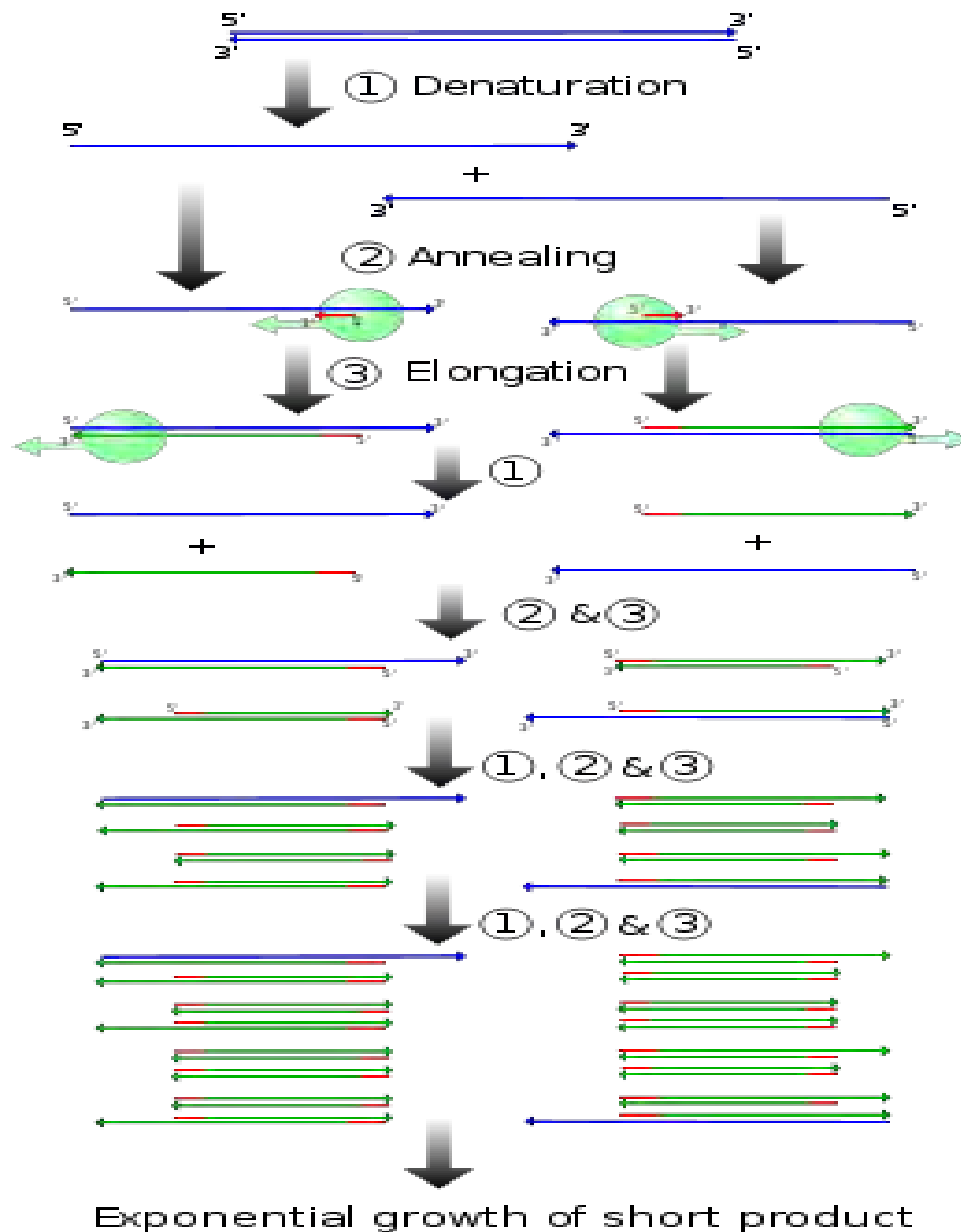
1.1.3. Μοριακές τεχνικές γενετικής ανάλυσης

Η κυκλική αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και ο φθορίζον *in situ* υβριδισμός (FISH) είναι οι δύο πιο χρησιμοποιούμενες τεχνικές πρώτης γενιάς για PGD. Για τον έλεγχο των χρωμοσωμάτων έχουν εφαρμοστεί και άλλες τεχνικές, όπως η μέθοδος CGH, οι οποίες αναλύονται παρακάτω. Η PCR χρησιμοποιείται γενικά για τη διάγνωση μονογονιδιακών διαταραχών και η FISH χρησιμοποιείται για την ανίχνευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών (πχ. έλεγχος ανευπλοειδιών ή χρωμοσωμικών μετατοπίσεων).

Κυκλική αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η κυκλική αντίδραση πολυμεράσης PCR, η οποία επιτρέπει την αύξηση της ποσότητας ενός συγκεκριμένου τμήματος σε ένα δείγμα DNA στο βαθμό που μπορεί να υποστεί περαιτέρω γενετικές εξετάσεις. Η μέθοδος της PCR στοχεύει στον έλεγχο ενός συγκεκριμένου γονιδίου, χρησιμοποιώντας εκκινητές (primers) οι οποίοι συνδέονται στη γονιδιακή αλληλουχία γύρω από την υπό εξέταση γονιδιακή περιοχή. Η ενίσχυση του DNA πραγματοποιείται με ένα ένζυμο πολυμεράσης (Taq), χρησιμοποιώντας διαδοχικούς κύκλους θέρμανσης και ψύξης που επιτρέπει το DNA να επεκταθεί και να ενισχυθεί (*Εικόνα 7*). Το τελικό προϊόν μπορεί να αναλυθεί με τον διαχωρισμό του σε ένα πήκτωμα για τη διάγνωση ελείψεων ή προσθηκών με βάση το μέγεθος, ή να γίνει πέψη με περιοριστικά ένζυμα. Η ανίχνευση της μετάλλαξης γίνεται ανάλογα με το είδος της αλλαγής που προκαλείται στο γονιδίωμα. Μέχρι σήμερα έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες τεχνικές, όπως η ανάλυση προϊόντων σε μηχανήμα αλληλούχισης (sequencer), η πέψη με περιοριστικά ένζυμα (RFLP), η μέθοδος SSCP, real-time PCR και mini-sequencing (Kanavakis et al 1997, Bermudez et al., 2003).

Εικόνα 7. Σχηματικά η διαδικασία της PCR. (1.) Μετουσίωση σε 94-96 ° C. (2.) Προσκόλληση εκκινητών σε ~ 65 ° C (ανάλογα με το είδος των εκκινητών). (3.) Επιμήκυνση στους 72 ° C. Στην εικόνα εμφανίζονται τέσσερις κύκλοι. Οι μπλέ γραμμές αντιπροσωπεύουν το πρότυπο DNA στο οποίο προσκολλώνται οι εκκινητές (κόκκινες γραμμές), που εκτείνονται από την DNA πολυμεράση (πράσινοι κύκλοι), για να δώσουν μικρότερα προϊόντα DNA (πράσινες γραμμές), τα οποία χρησιμοποιούνται ως πρότυπα καθώς προχωράει η διαδικασία της PCR.



Η ανάπτυξη όμως των πρωτοκόλλων της PGD-PCR μπορεί να είναι πολύ απαιτητική καθώς ο μεγάλος αριθμός των κύκλων PCR έχει ως αποτέλεσμα τον υψηλό κίνδυνο μόλυνσης, είτε από ξένο είτε από γονικό DNA, ο οποίος θα οδηγήσει ίσως σε μια λανθασμένη διάγνωση. Για το λόγο αυτό λαμβάνονται αυστηρά προληπτικά μέτρα τόσο κατά την ανάπτυξη της μεθόδου όσο και κατά την εφαρμογή της. Τα μέτρα αυτά περιλαμβάνουν τη χρήση θετικών και αρνητικών δειγμάτων ελέγχου, τα οποία αναλύονται παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα, καθώς και εργαστηριακών χώρων αφιερωμένων αποκλειστικά στην PGD. Ένα πρόσθετο πρόβλημα, που είναι κοινό για όλες τις δοκιμές PCR που αφορούν ένα κύτταρο, είναι ένα φαινόμενο γνωστό ως ADO (Allele Drop Out). Το ADO, η απόρριψη, δηλαδή, αλληλομόρφου, οφείλεται σε εκλεκτική ενίσχυση ενός εκ των δύο αλληλομόρφων ενός γονοτύπου. Αν το απορριπτόμενο αλληλόμορφο είναι το παθολογικό, τότε υπάρχει αυξημένη πιθανότητα για εμβρυομεταφορά προσβεβλημένου εμβρύου. Αντίθετα, αν το απορριπτόμενο αλληλόμορφο είναι το υγιές, το έμβρυο θα εκληφθεί ως προσβεβλημένο (Wells and Sherlock, 1998).

Φθορίζον in situ υβριδισμός (FISH)

Ένα ακόμη πρωτόκολλο που συνήθως χρησιμοποιείται στην PGD είναι η μέθοδος που ονομάζεται φθορίζον in situ υβριδισμός (FISH). Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την υβριδοποίηση του χρωμοσώματος με ανιχνευτές που επισημαίνονται με διαφορετικά χρώματα και στη συνέχεια έλεγχό του σε μικροσκόπιο. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται συνήθως για τον καθορισμό του φύλου ενός εμβρύου σε περίπτωση φυλοσύνδετου νοσήματος και την ανίχνευση αριθμητικών και δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών.

1.1.4. Εμβρυομεταφορά

Το τελευταίο στάδιο της διαδικασίας είναι αυτό της εμβρυομεταφοράς, η οποία πραγματοποιείται 4 με 5 ημέρες μετά την ωοληψία ή στην περίπτωση βλαστοκύστεων την 6^η ημέρα μετά την ωοληψία. Αφού έχει γίνει ο γενετικός έλεγχος των εμβρύων, επιλέγονται τα υγιή εξ αυτών και τοποθετούνται με μαλακό ειδικό καθετήρα 2 έως 4 έμβρυα στον πυθμένα της μήτρας. Για τον αριθμό των εμβρύων που μεταφέρονται λαμβάνεται υπόψη ο συνολικός αριθμός γονιμοποιημένων ωαρίων

καθώς και το αποτέλεσμα από τον γενετικό τους έλεγχο, η ποιότητά τους, η ηλικία της γυναίκας, η άποψη του ζευγαριού για πιθανή πολύδυμη κύηση και ο νόμος 3305/2005 με τα ηλικιακά όρια που αυτός θέτει.

1.2. Προεμφυτευτικός Γενετικός Έλεγχος (PGS)

Τα τελευταία χρόνια η τεχνολογία της PGD χρησιμοποιείται από όλο και περισσότερα ζευγάρια που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση, προκειμένου να ελεγχθούν τα έμβρυά τους για χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Οι ανευπλοειδίες είναι εξαιρετικά συχνές στα ανθρώπινα έμβρυα (σε ποσοστά 50%-80%) και πιθανόν οδηγούν σε προβλήματα στην ανάπτυξή τους, στην αποτυχία εμφύτευσής τους και σε αυτόματες αποβολές. Σε γυναίκες ηλικίας άνω των 40 ετών, υπολογίζεται ότι το 40%-70% των ώριμων ωοκυττάρων παρουσιάζουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες, ενώ είναι κοινές στα έμβρυα που προέρχονται από εξωσωματική γονιμοποίηση και κυμαίνονται σε 60% ανώμαλα έμβρυα για γυναίκες κάτω των 35 ετών και σε 80% για γυναίκες 41 ετών και άνω ((Wang et al 2010, Bielanska M et al 2002, Munne S et al 2007).

Ο Προεμφυτευτικός Γενετικός Έλεγχος (PGS) εξετάζει ένα συνδυασμό συγκεκριμένων μόνο χρωμοσωμάτων με την τεχνική του FISH, που συμπεριλαμβάνει τις πιο κοινές χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Μ' αυτόν τον τρόπο αναμένεται ότι μειώνεται η πιθανότητα για αποβολή, όπως επίσης και η πιθανότητα ενός πάσχοντος απογόνου.

Η εξέταση αυτή συνιστάται (Harton et al., 2011):

- σε ζευγάρια με περισσότερες από τρεις αποτυχημένες προσπάθειες εξωσωματικής γονιμοποίησης, στις οποίες έχει γίνει εμβρυομεταφορά καλής ποιότητας εμβρύων,
- σε ασθενείς με ιστορικό επαναλαμβανόμενων αποβολών,
- σε περιπτώσεις σοβαρής ανδρικής στειρότητας,
- σε γυναίκες ηλικίας 35 ετών και άνω και
- σε γυναίκες με προηγούμενη εγκυμοσύνη, όπου βρέθηκαν συγκεκριμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες.

Ο έλεγχος των χρωμοσωμάτων στα πλαίσια του PGS πρωτοεμφανίστηκε για ανάλυση πολικών σωματίων (Verlinsky Y et al 1995, Munne S et al 1995). Από τότε, η συντριπτική πλειοψηφία των μελετών που διεξήχθησαν έγιναν με βιοψία από έμβρυα στο στάδιο της αυλάκωσης, την 3η μέρα μετά τη γονιμοποίηση (φάση 6-8 κυττάρων). Τα πρώτα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν εξέταζαν τα χρωμοσώματα 13, 18, 21, X και Y, ανευπλοειδίες των οποίων μερικές φορές είναι συμβατές με βιώσιμες εγκυμοσύνες και σχηματισμό ανευπλοειδικών συνδρόμων (π.χ. Patau, Edwards, Down, Turner, και Klinefelter). Αυτό οδήγησε σε μείωση της συχνότητας εμφάνισης ανευπλοειδικών συνδρόμων, αλλά δεν οδήγησε σε καμία στατιστικά σημαντική βελτίωση των ποσοστών εμφύτευσης (Gianaroli L. 1997). Μεταγενέστερα πρωτόκολλα επέτρεψαν τον έλεγχο έως και 12 χρωμοσωμάτων με χρήση της μεθόδου FISH, και πάλι όμως χωρίς σημαντικά αποτελέσματα. Τα έμβρυα σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά χρωμοσωμικών ανωμαλιών και μωσαικισμού, με αποτέλεσμα οι ενδείξεις από την γενετική ανάλυση να μην είναι αντιπροσωπευτικές για το γονιδίωμα του εμβρύου. Επιπροσθέτως, οι μελέτες αυτές έγιναν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο FISH, η οποία μπορεί να ελέγξει περιορισμένο αριθμό χρωμοσωμάτων (Harper, Harton F&S 2010). Για να είναι πιο αποτελεσματικός ο έλεγχος ανευπλοειδίας θα πρέπει να εξετάζονται όλα τα χρωμοσώματα (Fragouli E 2007). Παραταύτα μια μέθοδος που επιτρέπει τη διερεύνηση ολόκληρου του γονιδιώματος είναι ο Συγκριτικός Γενομικός Υβριδισμός (CGH), με τον οποίο θα ασχοληθούμε στην παρούσα εργασία.

1.3. Συγκριτικός Γενομικός Υβριδισμός

Η μέθοδος του συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού, CGH, αναπτύχθηκε για πρώτη φορά το 1996 (el-Hashemite N et al 1996) και τεχνική αυτή εφαρμόστηκε για πρώτη φορά για PGD στην κλινική πράξη το 2008.

Η πρόκληση για τη χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι απαιτεί ~ 200 ng DNA, λαμβάνοντας υπόψη ότι ένα μόνο κύτταρο περιέχει μόνο 5-10 pg. Για το λόγο αυτό είναι αναγκαίο να γίνει Ενίσχυση Ολόκληρου του Γονιδιώματος (WGA) πριν από την ανάλυση CGH. Το WGA είναι μια προσέγγιση που χρησιμοποιεί ένα ετερογενές μείγμα ημι-εκφυλισμένων εκκινητών για τη σύνθεση DNA από πολλές τοποθεσίες σε όλο το γονιδίωμα (Telenius H et al 1992). Έχει αποδειχθεί ότι η ενίσχυση του γονιδιώματος παράγει επαρκή ποσότητα DNA για να καταστεί δυνατή,

αφενός η τεχνική CGH, αλλά και πολλαπλές δοκιμές PCR (Wells D 1999) . Το κύριο εμπόδιο για μια ευρύτερη κλινική εφαρμογή της μεθόδου CGH είναι ότι απαιτεί περίπου 5 ημέρες για να αποφέρει αποτελέσματα, χρόνος που δεν είναι συμβατός με το χρονικό περιθώριο που υπάρχει μέχρι την ημέρα της εμβρυομεταφοράς. Μια πιθανή λύση είναι η κρυοσυντήριση των εμβρύων μέχρι να ολοκληρωθεί ο γενετικός έλεγχος και στη συνέχεια μεταφορά τους σε μεταγενέστερο κύκλο.

Επί του παρόντος, η καλύτερη ελπίδα για μια απλοποιημένη CGH μεθοδολογία είναι ο Γενωμικός Συγκριτικός Υβριδισμός σε Μικροσυστοιχίες Ολιγονουκλεοτιδίων (microarray-CGH). Όπως συμβαίνει και με τη συμβατική CGH τεχνική, η μέθοδος αυτή συνεπάγεται την ανταγωνιστική υβριδοποίηση του υπό εξέταση δείγματος DNA και αυτού του φυσιολογικού μάρτυρα, στην περίπτωση αυτή όμως το DNA υβριδοποιείται με ανιχνευτές DNA, συγκεκριμένους για κάθε χρωμοσωμική περιοχή σε μικροσυστοιχίες. Η χρωμοσωμική έλλειψη ή προσθήκη αποκαλύπτεται από την αναλογία των διαφορετικών χρωστικών φθορισμού μετά την υβριδοποίηση. Η ανάλυση των χρωμοσωμάτων γίνεται σε λιγότερο από 48 ώρες, ενώ η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων είναι απλή και αυτοματοποιημένη. Όλα αυτά έχουν συζητηθεί στο άρθρο της Fragouli E, 2007. Υπάρχει μια ποικιλία εφαρμογών της μεθόδου a-CGH, διαθέσιμες για χρωμοσωμικό έλεγχο των εμβρύων και διάφορες μέθοδοι WGA που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με αυτές. Ορισμένοι ερευνητές έχουν επικεντρωθεί στη χρήση βακτηριακών τεχνητών χρωμοσωμικών συστοιχιών (BAC-arrays), που περιέχουν χιλιάδες μεμονωμένους ανιχνευτές (DNA clones), το μέγεθος των οποίων είναι αρκετά μεγάλο (Wells et al 2008). Τα περισσότερα BAC-arrays περιέχουν μερικές χιλιάδες μεμονωμένους ανιχνευτές (BAC clones-probes), ίσως λιγότερες από άλλους τύπους συστοιχιών, αλλά αρκετές για να επιτευχθεί ο κύριος στόχος του PGS: την ανίχνευση των ελλείψεων και διπλασιασμών που επηρεάζουν ολόκληρα τα χρωμοσώματα. Το μέγεθος των ανιχνευτών είναι αρκετά μεγάλο, έτσι ώστε κάθε σημείο επάνω στη μικροσυστοιχία (slide) να υβριδοποιεί πολλά θραύσματα ενισχυμένου DNA που προέρχεται από την περιοχή που καλύπτεται από τους BAC ανιχνευτές. Σε αντίθεση με τα συμβατικά CGH, στους BAC ανιχνευτές κάθε σημείο της μικροσυστοιχίας δίνει κατά μέσω όρο αποτέλεσμα για τα εκατοντάδες ή και χιλιάδες θραύσματα ενισχυμένου DNA. Ένα άλλο είδος aCGH που εφαρμόζεται, χρησιμοποιεί ολιγονουκλεοτίδια, που συντίθενται *in situ* απευθείας στην επιφάνεια του στερεού στήριξης (δηλαδή τη διαφάνεια). Ανάλογα με

τον κατασκευαστή, το μήκος των ανιχνευτών συνήθως κυμαίνεται από 25 έως και 85 νουκλεοτίδια.

Ένα από τα πιο ελπιδοφόρα πρωτόκολλα αυτής της τεχνολογίας είναι αυτό που προσφέρεται από την κατασκευάστρια εταιρία Agilent, με τη χρήση ανιχνευτών 60 νουκλεοτιδίων (Wells et al 2008). Οι CGH αναλύσεις που εκτελούνται χρησιμοποιώντας τις συστοιχίες της Agilent έχουν ανιχνεύσει με επιτυχία ανευπλοειδίες σε μεμονωμένα κύτταρα, απομονωμένα από χρωμοσωμικά ανώμαλες κυτταρικές σειρές, καθώς και από βλαστομερίδια που προέρχονται από ανθρώπινα έμβρυα (Le Caignec et al. 2006). Πιο πρόσφατα, οι συστοιχίες της Agilent χρησιμοποιήθηκαν κλινικά, με σκοπό το PGS, έχοντας σαν αποτέλεσμα πολλές εγκυμοσύνες (Hellani et al. 2008). Αυτό αντιπροσωπεύει την πρώτη επιτυχή κλινική εφαρμογή της τεχνολογίας αυτής για την ανίχνευση σχηματισμού ανευπλοειδικών εμβρύων και επιβεβαιώνει ότι η τεχνική array-CGH μπορεί να επιτρέπει τον ταχέ και πλήρη χρωμοσωμικό έλεγχο, χωρίς την ανάγκη κρυοσυντήρισης των εμβρύων. Το μόνο μειονέκτημα της χρήσης ολιγονουκλεοτιδικών συστοιχιών είναι ότι το μικρό μέγεθος των επιμέρους ανιχνευτών αυξάνει τον κίνδυνο να φανούν τεχνητές προσθήκες και ελλείψεις, που προκαλούνται πιθανώς από τα λάθη που γίνονται κατά τη διάρκεια του WGA (Wells et al 2008).

Μια ακόμη μορφή μικροσυστοιχιών ικανή να ανιχνεύει ανευπλοειδίες, είναι οι μικροσυστοιχίες SNP (single nucleotide polymorphism microarrays), η οποία βασίζεται στην ανάλυση των σημειακών μεταλλάξεων. Τα SNPs είναι κοινές πολυμορφικές αλληλουχίες DNA που βρέθηκαν σε όλο το γονιδίωμα. Η συγκεκριμένη τεχνική διαφέρει ως προς τις παραπάνω τεχνικές μικροσυστοιχιών που αναφέρθηκαν, οι οποίες έχουν παρόμοια προσέγγιση με τα συμβατικά CGH, περιλαμβάνοντας την ταυτόχρονη υβριδοποίηση των διαφορετικά επισημασμένων υπο εξέταση δειγμάτων DNA και αυτά φυσιολογικού μάρτυρα, στην ίδια μικροσυστοιχία. Στα SNP-microarrays χρησιμοποιείται μια καπώς διαφορετική στρατηγική, κατά την οποία το υπο εξέταση ενισχυμένο δείγμα DNA δεν συγκρίνεται με το DNA φυσιολογικού μάρτυρα, αλλά υβριδίζεται ξεχωριστά. Έτσι, καθώς τα υπό εξέταση και φυσιολογικού μάρτυρα δείγματα DNA υβριδίζονται σε ξεχωριστές περιοχές της μικροσυστοιχίας, μπορούν να επισημανθούν με το ίδιο φθοριόχρωμα. Ο αριθμός των χρωμοσωμικών αντιτύπων υπολογίζεται με δυο τρόπους. Πρώτον, τα αλληλόμορφα γονίδια που εντοπίζονται σε κάθε γενετικό τόπο SNP συγκρίνονται με εκείνα των γονέων, αποκαλύπτοντας τα γονεϊκά χρωμοσώματα που κληρονομήθηκαν

στο έμβρυο. Δεύτερον, συγκρίνονται και επεξεργάζονται με ειδικό λογισμικό οι εντάσεις φθορισμού που λαμβάνονται από τα υπό εξέταση και φυσιολογικού μάρτυρα δείγματα DNA. Αν οι ανιχνευτές από ένα δεδομένο χρωμόσωμα δίνουν φωτεινότερο σήμα για το υπό εξέταση δείγμα DNA, τότε προβλέπεται υπέρβαση χρωμοσωμικού υλικού (πχ. Τρισωμία). Αντίθετα, μειωμένος φθορισμός για το υπό εξέταση δείγμα συνδέεται με την απώλεια χρωμοσωμάτων. Στατιστικά στοιχεία δείχνουν ότι η ανίχνευση ανευπλοειδιών με τη συγκεκριμένη διαδικασία είναι ακριβής και παρέχει επιπλέον δεδομένα και για το γονότυπο εκτός από τον αριθμό των χρωμοσωμικών αντιγράφων, αλλά παραμένουν ορισμένα ερωτήματα σχετικά με την αξιοπιστία της ανίχνευσης τρισωμιών (Wells et al 2008). Ένα σημαντικό πλεονέκτημα των SNP-microarrays είναι ότι οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται παρέχουν πέραν από τις πληροφορίες για τον αριθμό χρωμοσωμικών αντιγράφων και επιπλέον δεδομένα για το γονότυπο (Handyside et al 2010). Η ταυτόχρονη ανάλυση των χιλιάδων πολυμορφισμών που υπάρχουν διάσπαρτα σε όλο το γονιδίωμα, παράγει ένα μοναδικό αποτύπωμα DNA για κάθε εξεταζόμενο έμβρυο. Το αποτύπωμα DNA επιτρέπει την επιβεβαίωση της γονικής προέλευσης, μειώνοντας τον κίνδυνο εργαστηριακού σφάλματος που θα μπορούσε να οδηγήσει στη μεταφορά εμβρύων σε λάθος ασθενή. Ένα ακόμη πλεονέκτημα των αποτυπωμάτων DNA των εμβρύων είναι ότι τα παιδιά που γεννήθηκαν μετά τη συγκεκριμένη διαδικασία μπορούν να ελεγχθούν και με βάση τα αποτυπώματα του DNA τους να φανεί η αντιστοιχεία με τα έμβρυα που μεταφέρθηκαν. Αυτό επιτρέπει τον εντοπισμό των εμβρύων που τελικά εμφυτεύτηκαν, προσφέροντας ένα εξαιρετικά ισχυρό εργαλείο για τις ερευνητικές μελέτες που γίνονται ώστε να προσδιορισθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν το δυναμικό της εμφύτευσης ενός εμβρύου. Επί του παρόντος, οι μικροσυστοιχίες SNP αποτελούν μια δαπανηρή επιλογή για τον γενετικό έλεγχο ωαρίων ή εμβρύων. Ωστόσο, δεν είναι ακόμη σαφές εάν η πλατφόρμα αυτή μπορεί να προσαρμοστεί ώστε να αποτελεί μια ανέξοδη, ευρέως εφαρμόσιμη διαδικασία. Επιπλέον, το υπάρχον λογισμικό θα χρειαστεί τροποποίηση πριν από την εκτεταμένη κλινική εφαρμογή, προκειμένου η γενετική ανάλυση να γίνει λιγότερο επίπονη και χρονοβόρα (Wells et al 2008, Handyside et al 2010).

ΣΚΟΠΟΣ

Η διαδικασία του PGS με χρήση μικροσυστοιχειών περιλαμβάνει αρχικά την ενίσχυση ολόκληρου του γονιδιώματος (WGA) και στη συνέχεια την εφαρμογή της τεχνολογίας aCGH. Όσον αφορά στα arrays, δύο είναι τα πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν στην παρούσα εργασία, αυτό της κατασκευάστριας εταιρίας Agilent με χρήση των Oligo-arrays και αυτό της εταιρίας Bluegnome με BAC-arrays. Στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής είναι διαθέσιμα και χρησιμοποιούνται, για έλεγχο γενωμικού DNA, τα Oligo-arrays της Agilent. Το πρωτόκολλο της Bluegnome είναι κοινώς εφαρμοζόμενο για τη χρήση των BAC-arrays με σκοπό το PGS και βελτιστοποιημένο για τον έλεγχο ενός μεμονωμένου κυττάρου. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι, στα πλαίσια του να προσφέρεται από το συγκεκριμένο εργαστήριο η μέθοδος του PGS, να εφαρμοστεί το πρωτόκολλο της Bluegnome για BAC-arrays και να δοκιμαστεί το πρωτόκολλο της Agilent με Oligo-arrays στα πλαίσια του PGS.

Συγκεκριμένα, με σκοπό τη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου της Agilent ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Να συγκριθούν τα πρωτόκολλα της Genomeplex και της Sureplex για WGA.
- Να διερευνηθεί η ευαισθησία της μεθόδου, δοκιμάζοντας τη συγκεκριμένη τεχνολογία σε δείγματα των 5, 10 και 15 μεμονωμένων **ανθρώπινων λεμφοκυττάρων**, καθώς και αν μπορεί να δώσει επαρκή αποτελέσματα η διαδικασία αυτή ακόμα και με ένα μεμονωμένο κύτταρο.
- Να διερευνηθούν οι δυνατότητες τροποποίησης του πρωτοκόλλου, ελέγχοντας τη πιο κατάλληλη επεξεργασία του φυσιολογικού μάρτυρα, καθώς και το λογισμικό της Agilent και τον τρόπο ανάλυσης των αποτελεσμάτων.
- Να γίνουν δοκιμές για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου σε κύτταρα από βιοψία εμβρύου, ώστε να μπορεί να αξιολογηθεί η καταλληλότητά του στην ανάλυση χρωμοσωμάτων από έμβρυα για PGS.

Στη συνέχεια σκοπός ήταν να γίνουν δοκιμές του πρωτοκόλλου της Bluegnome σε λεμφοκύτταρα, σε δείγματα από δότες με γνωστές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, καθώς και να εφαρμοστεί σε κλινικά δείγματα. Τέλος έγινε σύγκριση των δύο τεχνολογιών, για συνδυασμό και τροποποίηση των δύο πρωτοκόλλων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Τα στάδια για την εφαρμογή των δύο διαφορετικών πρωτοκόλλων είναι κοινά. Αρχικά γίνεται η απομόνωση των λεμφοκυττάρων από ολικό αίμα, στη συνέχεια η απομόνωση μεμονωμένων λεμφοκυττάρων, η ενίσχυση ολόκληρου του γονιδιώματος (σε κάποιες περιπτώσεις γίνεται καθαρισμός και ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων) και τέλος ακολουθούνται τα πρωτόκολλα aCGH μικροσυστοιχειών των δύο εταιριών (Agilent και Bluegnome). Σε κάποια από τα πειράματα που έλαβαν χώρα, έγινε συνδυασμός των δύο πρωτοκόλλων για καλύτερα αποτελέσματα. Παρακάτω αναλύεται το κάθε στάδιο της διαδικασίας ξεχωριστά.

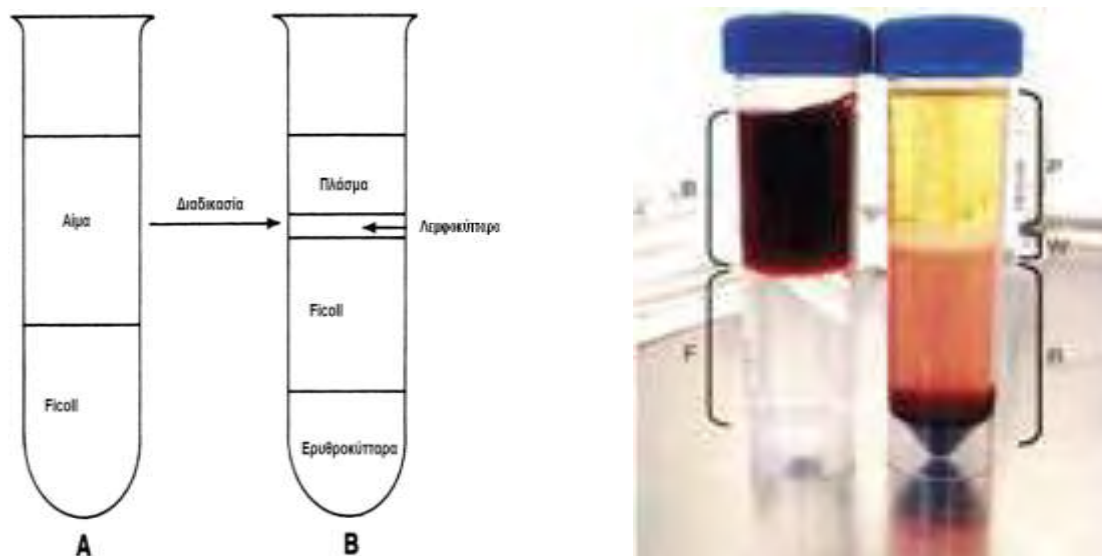
2.1. Απομόνωση ανθρώπινων λεμφοκυττάρων

Η απομόνωση λεμφοκυττάρων από ολικό αίμα γίνεται με την εφαρμογή φυγοκέντρησης σε κλίση φικόλης. Συγκεκριμένα, η φικόλη είναι συνθετική ουσία υψηλού μοριακού βάρους, πολυμερές της σακχαρόζης και της επιχλωρουδρίνης. Έχει υψηλότερη πυκνότητα από αυτή των λεμφοκυττάρων (1.077 g/mL), αλλά χαμηλότερη από αυτή των ερυθροκυττάρων και των κοκκιοκυττάρων. Έτσι, μπορεί και διαχωρίζει τα μονοπύρρηνα από τα υπόλοιπα κύτταρα μετά από φυγοκέντρωση.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Αρχικά συλλέγεται το δείγμα και γίνεται αραίωσή του σε ίσο όγκο φυσιολογικού ορού.
- Προστίθεται φικόλη σε αναλογία ως προς το αραιωμένο αίμα 3:4 και προκύπτουν δυο σαφώς διαχωρισμένες στοιβάδες.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται (1300 rpm για 30 min, χωρίς φρένο στο τέλος της φυγοκέντρωσης) και παρατηρείται ο διαχωρισμός των κυττάρων σε ζώνες. Οι στοιβάδες που προκύπτουν με τη σειρά από πάνω προς τα κάτω είναι: ένα στρώμα που περιέχει αραιωμένο πλάσμα και αιμοπετάλια, μια στοιβάδα λεμφοκυττάρων (μεσοστοιβάδα), η φικόλη και τέλος μια στοιβάδα ερυθροκυττάρων και άλλων κοκκιοδών κυττάρων, που εμφανίζεται ως ίζημα στον πυθμένα του σωλήνα (*Εικόνα 8*).

Εικόνα 8. Σχηματικά η επιστοίβαξη του αίματος σε φικόλη (αριστερά κάθε εικόνας) και οι στοιβάδες που δημιουργούνται μετά την παραπάνω διαδικασία (δεξιά κάθε εικόνας).



- Αναρροφάται με προσεκτικές κινήσεις η μεσοστοιβάδα και μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα φυγοκέντρου.
- Αφού γεμίσουμε τον σωλήνα με φυσιολογικό ορό και τον αναδεύσουμε καλά, το δείγμα φυγοκεντρείται για 15 min στις 1300 rpm. Έτσι τα κύτταρα απαλλάσσονται από διάφορα στοιχεία, όπως πρωτεΐνες ή κατάλοιπα κυτταρικών στοιχείων που προσροφήθηκαν στην επιφάνειά τους.
- Απορρίπτεται το υπερκείμενο διάλυμα, το ίζημα που σχηματίζουν τα λεμφοκύτταρα στον πυθμένα αναδιασπείρεται σε φυσιολογικό ορό και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες.

Προκειμένου να συλλεχθούν όσο το δυνατόν περισσότερα λεμφοκύτταρα επαναλαμβάνεται η διαδικασία της πλύσης τουλάχιστον δυο φορές.

- Προστίθενται στο ίζημα 2 ml φυσιολογικού ορού και το διάλυμα αναμιγνύεται μέχρι να φανεί ομοιογενές.

Η απομόνωση μεμονωμένων λεμφοκυττάρων πραγματοποιείται με τη βοήθεια ειδικού συστήματος αναρρόφησης (mouth-controlled pipetting system) σε ανάστροφο

μικροσκόπιο. Είναι πολύ σημαντικό να ξεπλένονται καλά τα κύτταρα που απομονώνονται, ώστε να ελατώνεται η πιθανότητα επιμόλυνσης.

Στο συγκεκριμένο πείραμα έγινε απομόνωση λεμφοκυττάρων σε ομάδες των 1, 5, 10 και 15 κυττάρων.

Τα μεμονωμένα λεμφοκύτταρα φυλάσσονται στους -80°C , μέχρι να χρησιμοποιηθούν εκ νέου για WGA.

2.2. Ενίσχυση ολόκληρου του γονιδιώματος

Η μέθοδος του WGA, όπου ο τεμαχισμός του DNA δεν επιτυγχάνεται με τη βοήθεια περιοριστικών ενζύμων, είναι η μοναδική μέχρι στιγμής για την οποία υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμες τυποποιημένες συσκευασίες (kits) που έχουν βελτιστοποιηθεί για εφαρμογές σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων. Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η GenomePlex[®] Single Cell Whole Genome Amplification Kit της Sigma-Aldrich καθώς και η SurePlexTM DNA Amplification System της BlueGnome.

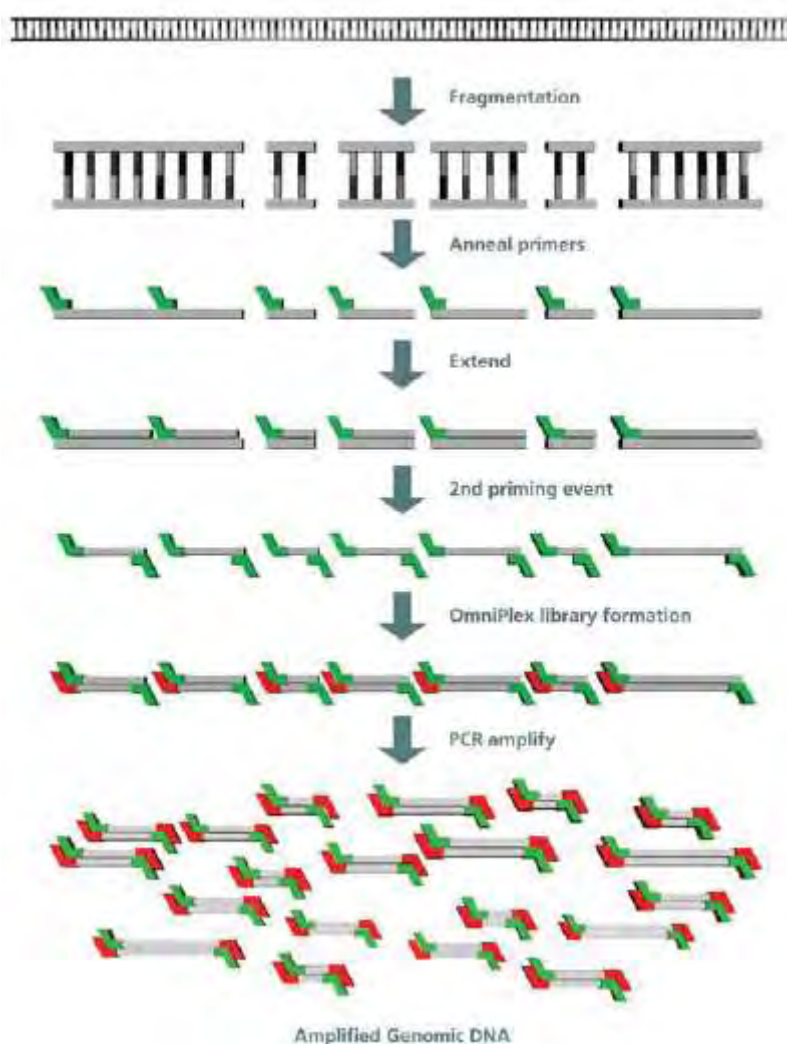
2.2.1. Whole Genome Amplification

GenomePlex[®]

Το πρωτόκολλο που συνιστά η κατασκευάστρια εταιρία περιλαμβάνει μια πολυσταδιακή και σχετικά ταχεία διαδικασία, περίπου 5 ωρών, η οποία περιλαμβάνει την αλκαλική λύση των μεμονωμένων κυττάρων με πρωτεΐνωση K και την κατάτμηση του γενετικού υλικού (επώαση 50°C για 1 h και 99°C για 4 min), τη δημιουργία βιβλιοθήκης των σχηματισμένων θραυσμάτων (16°C για 20 min, 24°C για 20 min, 37°C για 20 min και 75°C για 5 min) και την τελική τους ενίσχυση μετά από ένα βήμα αρχικής αποδιάταξης στους 95°C για 3 min που ακολουθείται από 25 κύκλους των 94°C για 30 s και 65°C για 5 min (*Εικόνα 9.*).

Εικόνα 9. Σχηματικά τα παραπάνω βήματα του πρωτοκόλλου της GenomePlex .

Figure 1 – GenomePlex Mechanism



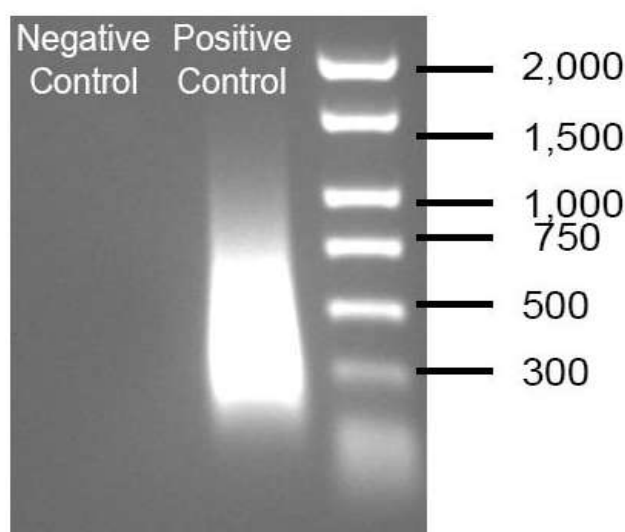
SurePlex™

Η συγκεκριμένη τεχνολογία βασίζεται στον τυχαίο κατακερματισμό του γενομικού DNA και την επακόλουθη ενίσχυση με PCR χρησιμοποιώντας γενικευμένους εκκινητές. Το πρωτόκολλο αυτό είναι ταχύ και προσφέρει σε μεγάλο βαθμό αντιπροσωπευτική ενίσχυση. Περιλαμβάνει τη λύση των μεμονωμένων κυττάρων και τη κατάτμηση του γενετικού υλικού (επώαση στους 75 °C για 10 min και στους 95 °C για 4 min) και τέλος την ενίσχυσή του, αρχικά προσθέτοντας 5μl SurePlex Pre-amplification cocktail και επώασή του στους 95 °C για 2 min καθώς και 12 κύκλους στους 95 °C για 15 sec, στους 15 °C για 50 sec, στους 25 °C για 40 sec, στους 35 °C για 30 sec, στους 65 °C για 40 sec και στους 75 °C για 40 sec, ενώ στη συνέχεια

προστίθεται 60μl Amplification cocktail και ακολουθεί επώαση στους 96 °C για 2 min και 14 κύκλοι στους 95 °C για 15 sec, στους 65 °C για 1 min και στους 75 °C για 1 min.

Η ποιότητα του WGA DNA και από τα δύο πρωτόκολλα, μπορεί να προσδιοριστεί με ηλεκτροφόρηση 5μl από το προϊόν σε πηκτή αγαρόζης (1,5%). Το μέγεθος του DNA θα πρέπει να κυμαίνεται από 100-1000 bp, με κύριο μέγεθος ~ 400 bp (*Εικόνα 10*).

Εικόνα 10. Εικόνα μετά από ηλεκτροφόρηση του ενισχυμένου DNA σε πηκτή αγαρόζης.



Τέλος, φυλάσσεται στους -20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί και πάλι για τα επόμενα βήματα του πειράματος.

2.2.2. Καθαρισμός των PCR προϊόντων

Η τεχνική του καθαρισμού έλαβε χώρα προκειμένου να απομακρυνθούν μη ειδικά προϊόντα, όπως άλατα και διμερή των εκκινητών, τα οποία σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης GenomePlex® WGA, δεδομένου ότι το συνιστά η κατασκευάστρια εταιρία του kit. Πρόκειται για μια πλήρως αυτοματοποιημένη και υψηλής απόδοσης διαδικασία, η οποία βασίζεται στη μέθοδο της υπερδιήθησης. Επιτρέπει την αποτελεσματική (~80-95%) και γρήγορη ανάκτηση των δειγμάτων και διεξάγεται χρησιμοποιώντας πλακίδια 96 θέσεων που ο πυθμένας τους έχει επιστρωθεί με ειδικά σχεδιασμένη, προσροφητική μεμβράνη διοξειδίου του πυριτίου ώστε να εξαλειφθούν οι δυσχέρειες που συνδέονται με τη χρήση ρητινών.

- Τα δείγματα αραιώνονται με δισαπεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml και τοποθετούνται στις θέσεις του πλακιδίου.
- Εφαρμόζεται κενό (~200 mbar) και τα προϊόντα διαχωρίζονται σύμφωνα με το μέγεθός τους. Συγκεκριμένα, όσα έχουν μέγεθος 100 bp-4 kb συγκρατούνται στην επιφάνεια της μεμβράνης, ενώ τα μικρότερα διαπερνούν τους πόρους της και απομακρύνονται.
- Τα καθαρά πλέον προϊόντα εκλούνται με όγκους νερού που δεν πρέπει να ξεπερνούν τα 30 μ l, αναδεύονται έντονα για ~10 min και τοποθετούνται σε καθαρά σωληνάρια.

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το MinElute 96 UF PCR Purification Kit (Qiagen, Cat. No. 28053) και το BioRobot[®] 3000 (Qiagen).

Η παραπάνω διαδικασία καθαρισμού των προϊόντων PCR δεν γίνεται όταν πραγματοποιείται το WGA για το πρωτόκολλο της Bluegnome.

2.2.3. Φασματοφωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος καθαρότητας ολικού DNA

Προκειμένου να καταστεί δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της αντίδρασης GenomePlex[®] WGA χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). Το όργανο αυτό είναι κατάλληλα σχεδιασμένο ώστε να αναλύει μικρή ποσότητα δείγματος (μόλις 1 μ L) με εξαιρετική ακρίβεια σε ένα φάσμα απορρόφησης 220-750 nm. Επιτρέπει την αξιόπιστη μέτρηση δειγμάτων υψηλής συγκέντρωσης χωρίς να απαιτείται αραιώσή τους, ενώ καταργεί τη χρήση κυψελίδων και τριχοειδών σωληναρίων καθιστώντας την όλη διαδικασία ευχερέστερη και ταχύτερη συγκριτικά με τη χρήση κλασικών συστημάτων φωτομέτρησης.

Η διαδικασία αυτή δεν γίνεται στην περίπτωση που έχει ακολουθηθεί το πρωτόκολλο της SurePlex[™] για WGA.

2.3. Συγκριτικός Γενωμικός Υβριδισμός (Microarray-CGH)

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι εξής κατασκευάστριες εταιρίες (kits):

1. Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH
2. Bluegenome 24sure Bac- arrays

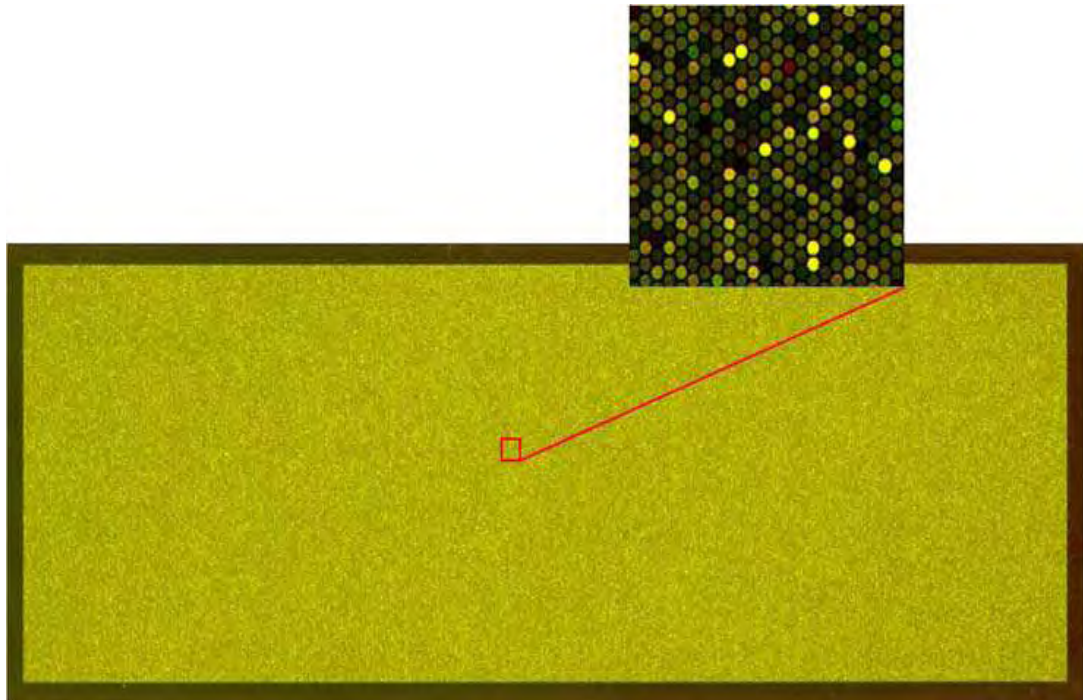
2.3.1. Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH

Το πρωτόκολλο αυτό περιγράφει τη διαδικασία εντοπισμού μικροελλείψεων και μικροδιπλασιασμών στο υπο εξέταση DNA, χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες 60-μερών ολιγονουκλεοτιδίων της Agilent. Η όλη διαδικασία κρατάει περίπου τρεις μέρες.

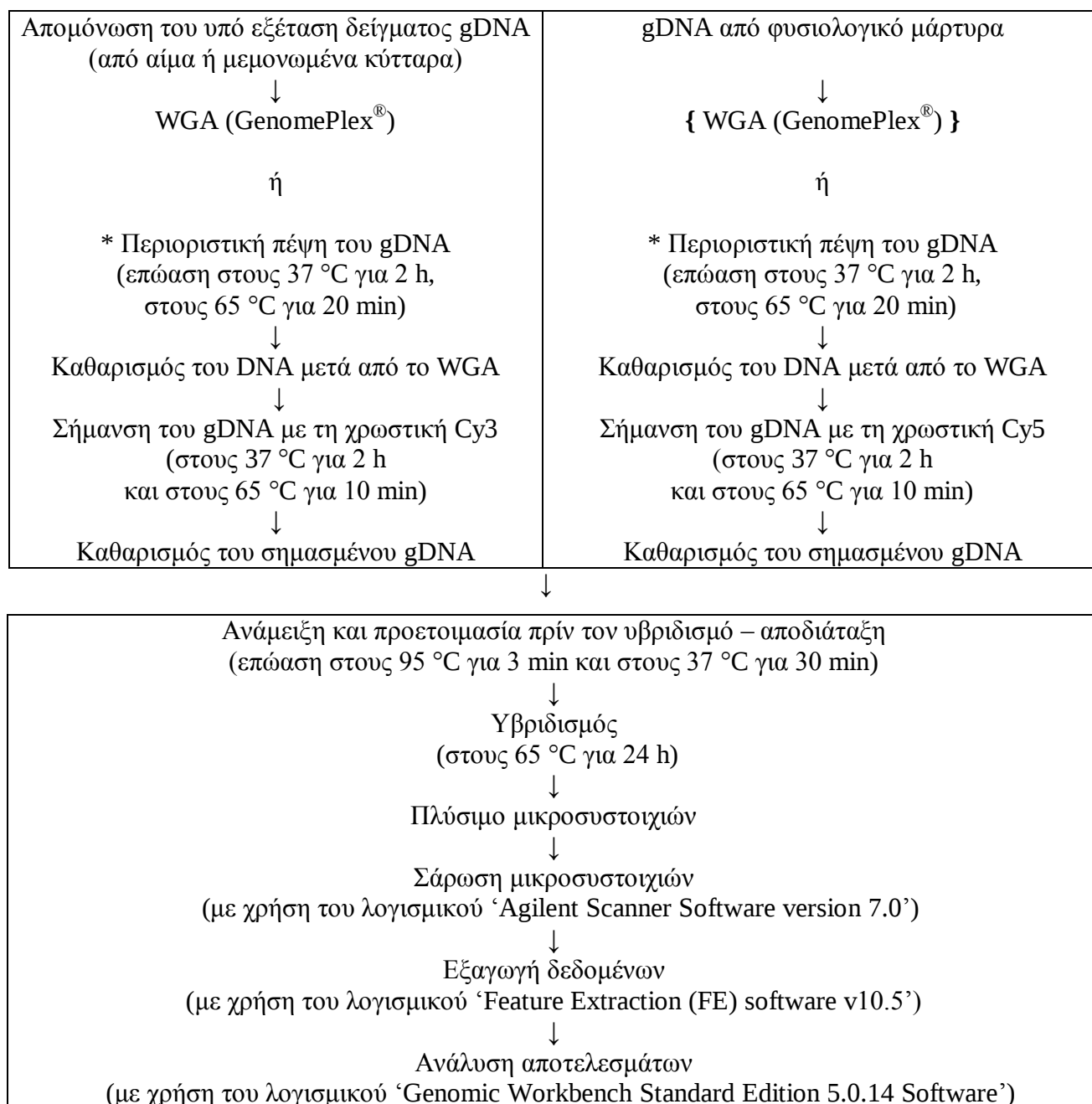
Τα στάδια του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου είναι:

- Ενίσχυση ολόκληρου γονιδιώματος με χρήση του πρωτοκόλλου της GenomePlex.
- Ποιοτικός προσδιορισμός του gDNA.
- Ποσοτικός προσδιορισμός του gDNA (έτσι ώστε οι ποσότητες του υπό εξέταση δείγματος και του φυσιολογικού μάρτυρα να είναι ισομοριακές).
- Επισήμανση του gDNA με φθοροχρωστικές (με Cy3 τα υπό εξέταση δείγματα DNA και με Cy5 το DNA φυσιολογικού μάρτυρα), χρησιμοποιώντας τυχαίους εκκινητές καθώς και της πολυμεράσης Klenow .
- Ανάμειξη κάθε υπο εξέταση δείγματος DNA με αυτό του φυσιολογικού του μάρτυρα και στη συνέχεια καθαρισμός του επισημασμένου gDNA, χρησιμοποιώντας ειδικά φίλτρακια Amicon 30kDA και προετοιμασία των δειγμάτων για υβριδισμό.
- Υβριδισμός των δειγμάτων σε διαφάνειες υβριδισμού της Agilent (για 24 ώρες).
- Πλύσεις των μικροσυστοιχιών με χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων.
- Σκανάρισμα των μικροσυστοιχιών με χρήση του λογισμικού ‘Agilent Scanner Software version 7.0’.
- Εξαγωγή δεδομένων με χρήση του λογισμικού Feature Extraction (FE) software v10.5 (*Εικόνα 11*).
- Ανάλυση των αποτελεσμάτων με το λογισμικό ‘Genomic Workbench Standard Edition 5.0.14 Software’.

Εικόνα 11. Οι μικροσυστοιχίες Agilent SurePrint G3 1x1M CGH εμφανίζονται με κόκκινα και πράσινα σημάδια (σε πλήρη και μεγενθυμένη προβολή).



Εικόνα 12. Τα βήματα της διαδικασίας microarray-CGH ακολουθώντας το πρωτόκολλο που συστήνει η κατασκευάστρια εταιρία Agilent. * Η διαδικασία της περιοριστικής πέψης του DNA δεν ακολουθείται στην περίπτωση ανάλυσης ενός μεμονωμένου κυττάρου, όπου έχει προηγηθεί WGA.



2.3.2. Bluegnome 24sure

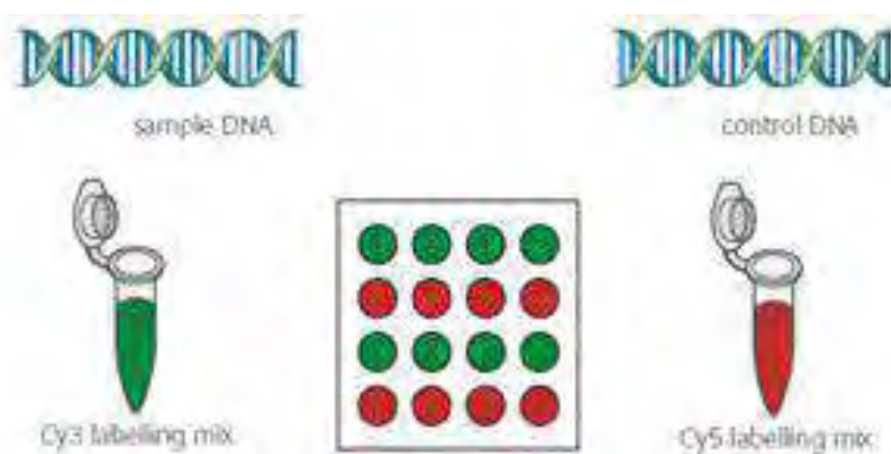
Η πρωτοποριακή τεχνολογία της 24sure ελέγχει και τα 24 χρωμοσώματα για ανευπλοειδίες εντός 12 ωρών (περιλαμβάνοντας και 2,5 ώρες για το στάδιο του WGA), ξεκινώντας από μεμονωμένα κύτταρα. Τα ενισχυμένα δείγματα DNA

υβριδίζονται ανταγωνιστικά από κοινού για την διερεύνηση της αριθμητικής ανισορροπίας στο σύνολο των χρωμοσωμικών αντιγράφων.

Τα στάδια του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου είναι:

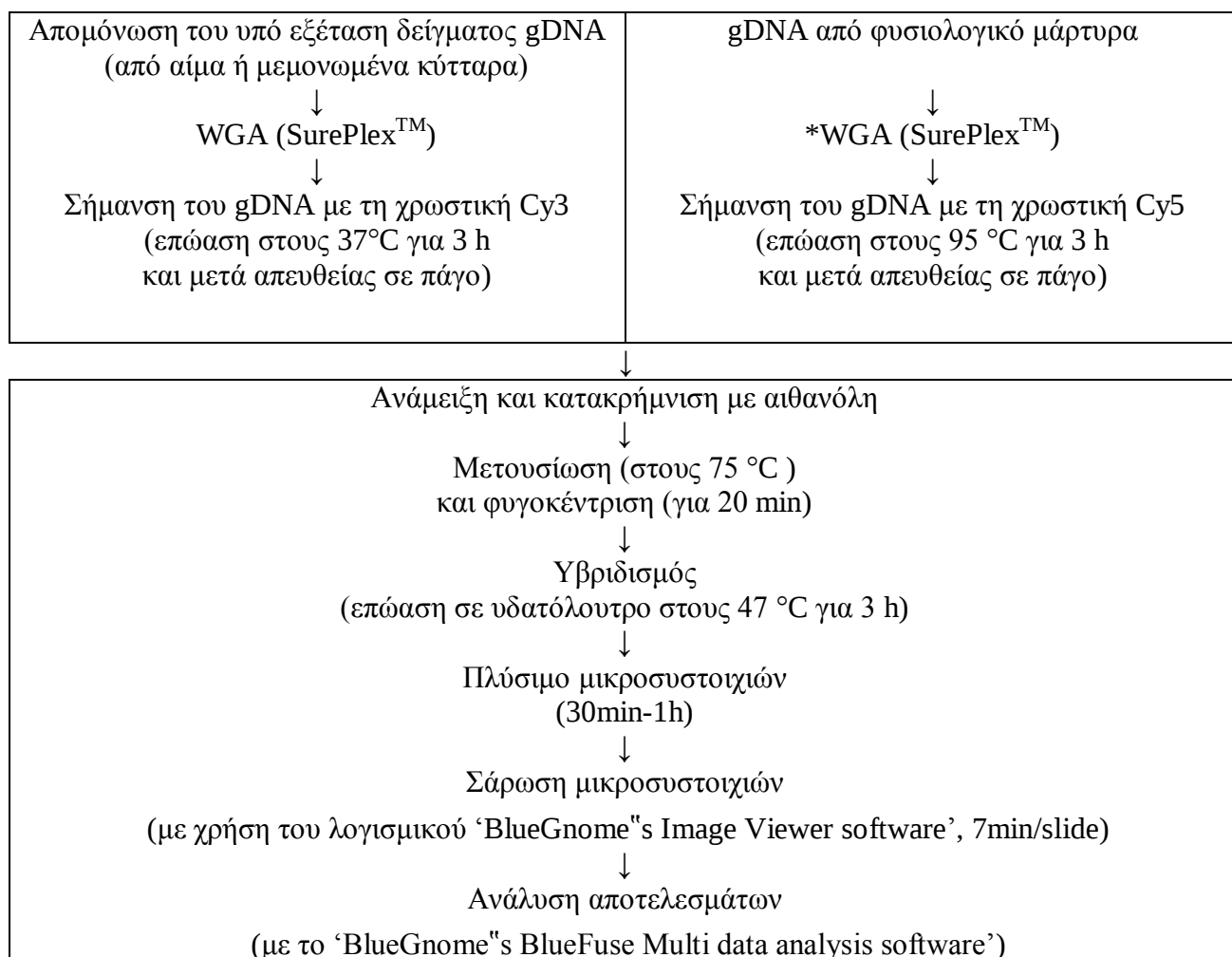
- Ενίσχυση ολόκληρου γονιδιώματος, ώστε οι ποσότητες να είναι κατάλληλες για την υβριδοποίηση των μικροσυστοιχιών. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται το SurePlex™ kit (BlueGnome).
- Επισήμανση των υπό εξέταση δειγμάτων DNA και αυτά φυσιολογικού μάρτυρα με τις χρωστικές Cy3 και Cy5 αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας τυχαίους εκκινητές (*Εικόνα 13*). Τα επισημασμένα μείγματα συνδυάζονται και κατακρινήζονται με αιθανόλη, στο πλαίσιο προετοιμασίας για υβριδοποίηση.

***Εικόνα 13.** Επισήμανση των υπό εξέταση δειγμάτων DNA με Cy3 και των δειγμάτων φυσιολογικού μάρτυρα με Cy5.*



- Το επισημασμένο DNA εναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) υβριδισμού με θειική δεξτράνη και υβριδοποιείται υπό την κάλυψη καλυπτρίδων.
- Πλύσιμο των υβριδοποιημένων 24sure διαφανειών, για την απομάκρυνση του δεσμευμένου σημασμένου DNA.
- Σάρωση των αποτελεσμάτων, με χρήση ενός σαρωτή λάιζερ.
- Ανάλυση δεδομένων, με χρήση του λογισμικού BlueFuse Multi software.

Εικόνα 14. Τα βήματα της διαδικασίας microarray-CGH ακολουθώντας το πρωτόκολλο που συστήνει η κατασκευάστρια εταιρία Bluegnome 24sure. * Το DNA φυσιολογικού μάρτυρα είναι ήδη ενισχυμένο και έτσι δεν το ακολουθεί εκ νέου τη διαδικασία WGA.



Η τεχνική array-CGH (ανεξάρτητα από το ποιο πρωτόκολλο ακολουθείται) απαιτεί τον εξειδικευμένο εξοπλισμό ενός εργαστηρίου Μοριακής Γενετικής, καθώς και απομονωμένους χώρους σε ένα περιβάλλον χαμηλών επιπέδων υγρασίας, όξοντος καθώς και απουσίας φωτός, λόγω της φωτοευαισθησίας των χρωστικών που χρησιμοποιούνται.

Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 1.**) συνοψίζονται οι διαφορές στα δύο πρωτόκολλα (Agilent και Bluegnome).

Πίνακας 1. Οι διαφορές των πρωτοκόλλων Agilent και Bluegenome.

<u>ΔΙΑΦΟΡΕΣ</u>	Agilent	Bluegenome
Ποιοτικός προσδιορισμός DNA	+	-
Ποσοτικός προσδιορισμός DNA	+	-
Καθαρισμός σημειωμένου DNA	+	-
Ποσότητα δείγματος DNA και DNA φυσιολογικού μάρτυρα	500ng-2ng	8μl (από το πρωτόκολλο της Bluegenome)
Κατακρίμνηση των δειγμάτων με αιθανόλη	-	+
Χρόνος	3-4 μέρες	24 h

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Ενίσχυση ολόκληρου γονιδιώματος (WGA)

Παρακάτω παρουσιάζονται παραδείγματα των πειραμάτων που έγιναν με τα δύο διαφορετικά πρωτόκολλα για WGA.

3.1.1. GenomePlex®

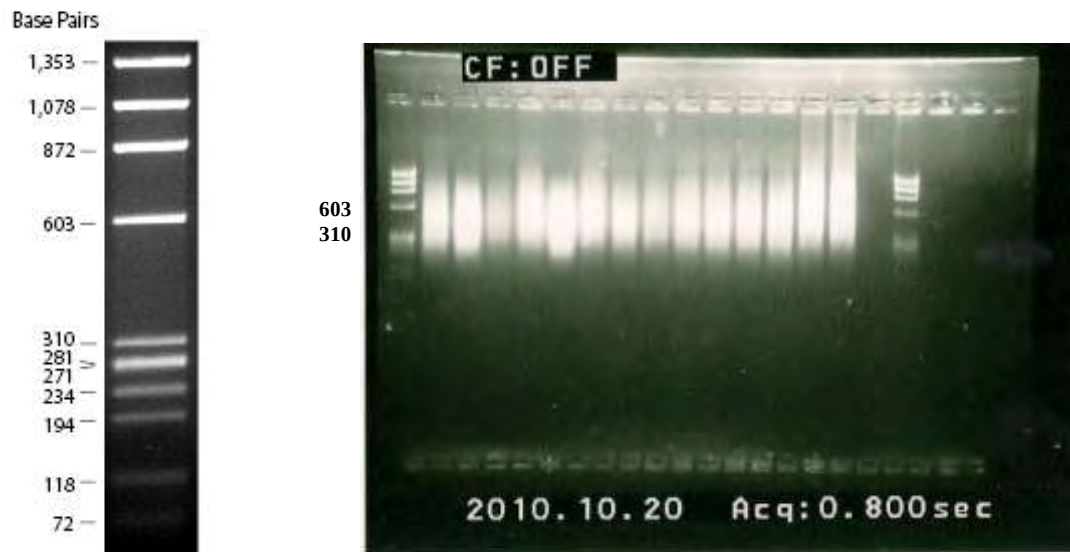
Αρχικά χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της Genomeplex (όπως αυτό περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας) για την ενίσχυση του γενετικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε. Στη συνέχεια, μετά το WGA μετρίεται η συγκέντρωση των δειγμάτων DNA στο NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (**Πίνακας 2.**).

Πίνακας 2. Μετρήσεις των συγκεντρώσεων των δειγμάτων DNA μετά από WGA. Τα δείγματα DNA θεωρούνται καλής ποιότητας για περαιτέρω ανάλυση όταν ο λόγος της απορρόφησης στα μήκη κύματος στα 260 nm και στα 280 nm (260/280) είναι περίπου 1.8 (ένδειξη περιορισμένης μόλυνσης του DNA). Επίσης ένδειξη καθαρότητας του DNA είναι και ο λόγος της απορρόφησης στα 260 nm και 230 nm (260/230), ο οποίος θα πρέπει να κυμαίνεται από 1.8 έως 2.2.

Sample ID	ng/μl	260/280 (1.8-2.0)	260/230 (≥1.5)
Δότης 1			
5a	479.07	1.65	1.78
5b	482.52	1.66	1.71
10a	535.88	1.65	1.75
10b	497.02	1.64	1.75
15a	414.69	1.69	1.77
15b	467.35	1.64	2.87
Δότης 2			
5a	500.91	1.67	1.77
5b	425.71	1.68	1.77
10a	461.56	1.72	1.97
10b	451.95	1.68	1.85
15a	453.17	1.67	1.84
15b	430.95	1.67	1.79

Η ποιότητα του WGA DNA προσδιορίστηκε με ηλεκτροφόρηση 5μl από το προϊόν σε πηκτή αгарόζης (1,5%), όπου δείχνει ότι όλα τα δείγματα είχαν ικανοποιητική ενίσχυση (*Εικόνα 15*).

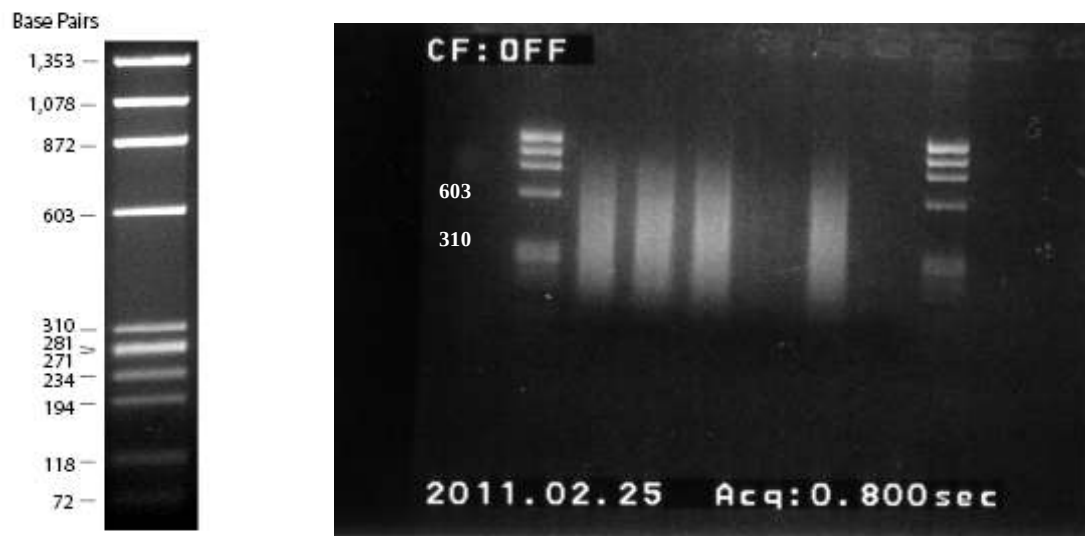
Εικόνα 15. Εικόνα μετά από ηλεκτροφόρηση 5μl WGA (Genomeplex) DNA από απομονωμένα λεμφοκύτταρα, τα οποία είχαν πρὶν χωριστεί σε ομάδες των 5, 10 και 15 κυττάρων (2 ομάδες των 5, δύο των 10 και δύο των 15 κυττάρων από κάθε δότη). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το DNA (227μg/ml) αρσενικού φυσιολογικού μάρτυρα της Promega, ενώ ο αρνητικός μάρτυρας περιελάμβανε 9μl H₂O. (σειρά δειγμάτων:- δοτης 1- 5^α, 5β, 10^α, 10β, 15^α, 15β - δότης 2- 5^α, 5β, 10^α, 10β, 15^α, 15β)



3.1.2. SurePlex™

Σε επόμενα πειράματα έγινε WGA ακολουθώντας το πρωτόκολλο της Sureplex (όπως αυτό περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος παραπάνω). Η ποιότητα του WGA DNA και σε αυτά τα πειράματα προσδιορίστηκε με ηλεκτροφόρηση 5μl από το προϊόν σε πηκτή αγαρόζης (1,5%) (**Εικόνα 16.**). Με την ηλεκτροφόρηση φαίνεται το μέγεθος του DNA κυμαίνεται από 100 bp έως και 1000 bp, με μέσω μέγεθος περίπου 400 bp.

Εικόνα 16. Εικόνα μετά από ηλεκτροφόρηση 5μl WGA (Sureplex) DNA από κύτταρα προερχόμενα από εμβρυικό πόλο βλαστοκύστης, τροφοβλάστη βλαστοσύστης και κύτταρα υπόλοιπου εμβρύου, μετά από βιοψία.(σειρά δειγμάτων: κύτταρα από εσωτερική κυτταρική μάζα, κύτταρα από τροφοβλάστη, κύτταρα από το υπόλοιπο έμβρυο, αρνητικός μάρτυρας, θετικός και αρνητικός μάρτυρας από WGA). Το μέγεθος του DNA φαίνεται ότι είναι περίπου 400 bp (επιθυμητή τιμή).

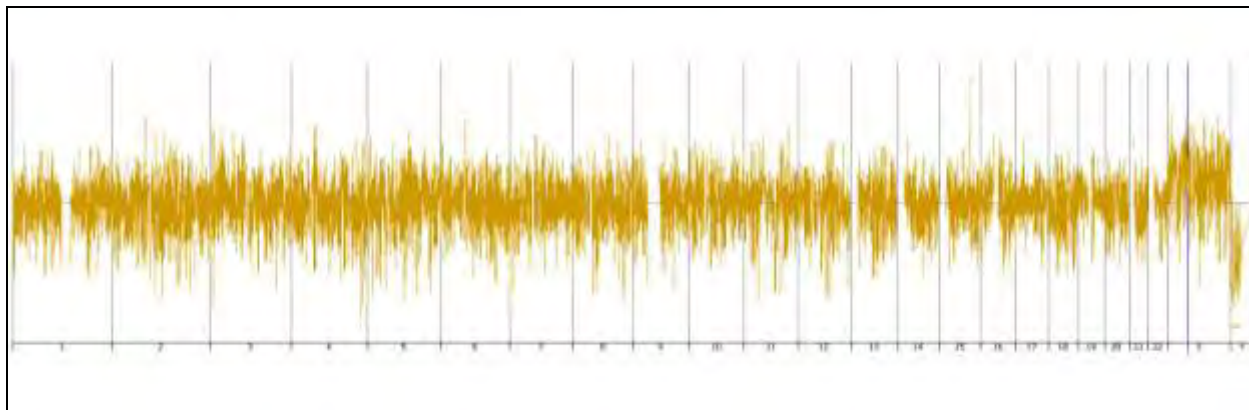


3.2. Συγκριτικός Γενομικός Υβριδισμός (Microarray-CGH)

3.2.1. Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH

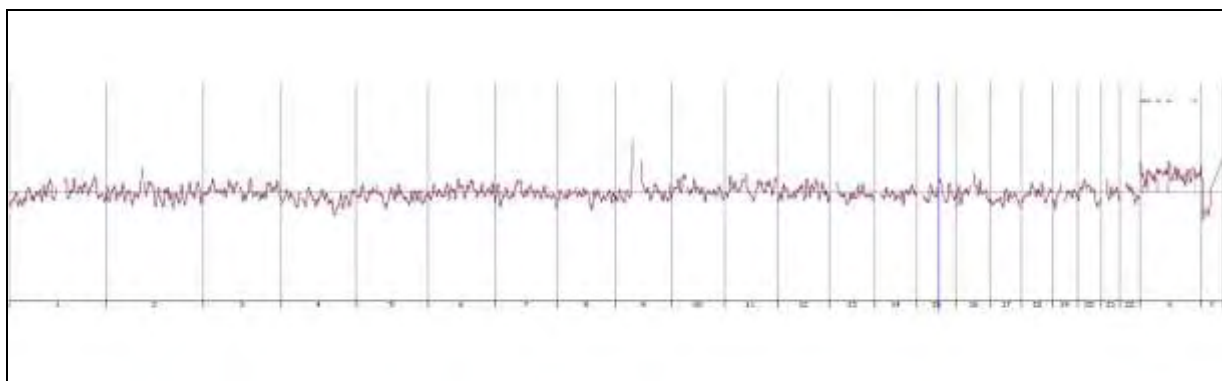
Αρχικά χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της Agilent (όπως αυτό περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας), εφαρμόζοντας WGA με βάση το πρωτόκολλο της Genomeplex. Τα πειράματα έγιναν με γενετικό υλικό από λεμφοκύτταρα, τα οποία είχαν χωριστεί πρώτα σε ομάδες των 5, 10 και 15 κυττάρων. Το DNA φυσιολογικού μάρτυρα που χρησιμοποιήθηκε ήταν φυσιολογικού αγοριού (Promega). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δεν ήταν καθόλου ικανοποιητικά, καθώς δεν ήταν ευανάγνωστα και τα στατιστικά στοιχεία δεν ήταν σωστά (**Εικόνα 17**).

Εικόνα 17. Αποτέλεσμα γενετικού ελέγχου 15 λεμφοκυττάρων (2μg) φυσιολογικού δότη (κοριτσιού), τα οποία είχαν πρώτα ενισχυθεί με τη διαδικασία της WGA με βάση το πρωτόκολλο της Genomeplex, όπως και το δείγμα φυσιολογικού μάρτυρα (φυσιολογικού αγοριού). Στον άξονα των χ είναι αριθμημένα τα χρωμοσώματα με τη σειρά. Από την εικόνα που προκύπτει φαίνεται ότι δεν έχουν βγεί καθόλου ικανοποιητικά σαφή αποτελέσματα, ενώ είναι εξαιρετικά δύσκολο να διαχωριστούν ακόμη και τα χρωμοσώματα X και Y.



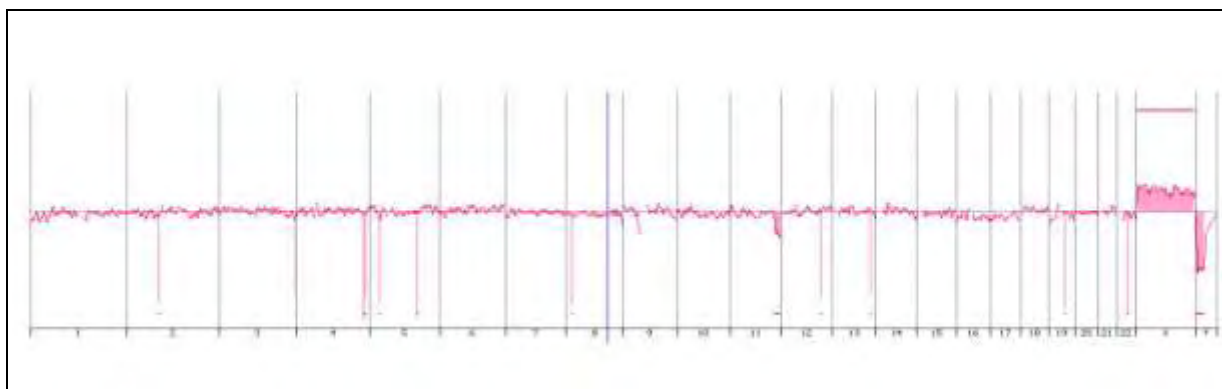
Εν συνεχεία έγιναν αλλαγές στις ποσότητες γενετικού υλικού που χρησιμοποιήθηκαν, οι οποίες κυμάνθηκαν από 2ng έως και 500ng, ενώ δοκιμάστηκαν πειράματα στα οποία το DNA φυσιολογικού μάρτυρα δεν είχε πρίν ενισχυθεί με WGA και άλλα στα οποία είχαν ενισχυθεί. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων φάνηκε ότι ικανοποιητικά αποτελέσματα (χωρίς θόρυβο και με ξεκάθαρα τα φυλετικά χρωμοσώματα) βγήκαν από αυτά στα οποία το DNA φυσιολογικού μάρτυρα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ενισχυμένο (**Εικόνα 18.**).

Εικόνα 18. Αποτέλεσμα γενετικού ελέγχου 15 λεμφοκυττάρων (0,8μg), χωρίς όμως να έχει ενισχυθεί με WGA ούτε το υπό εξέταση δείγμα, ούτε αυτό του φυσιολογικού μάρτυρα (φυσιολογικό αγόρι). Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε περιοριστική πέψη των δειγμάτων DNA πρίν το στάδιο της επισημάνσης με χρωστικές. Από την εικόνα φαίνεται ότι το συγκεκριμένο πείραμα δεν έβγαλε σαφή αποτελέσματα.



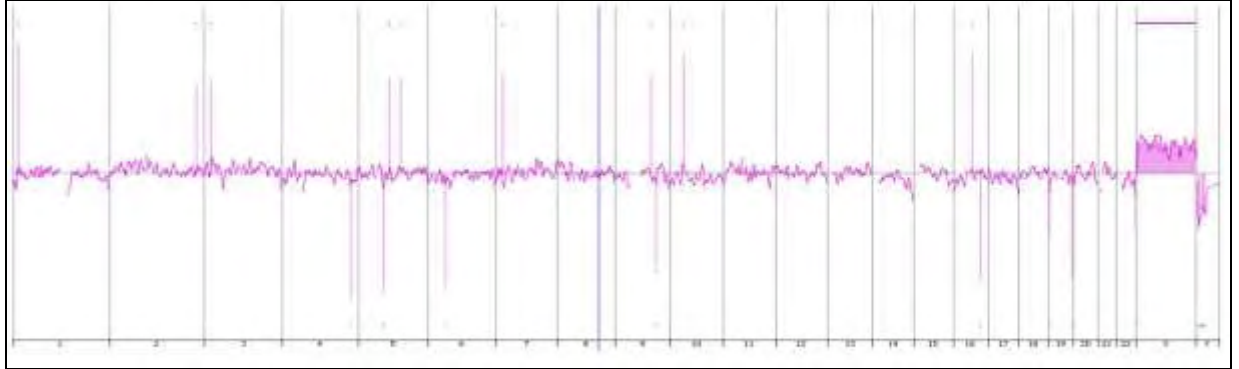
Ακόμη πραγματοποιήθηκαν πειράματα στα οποία έγινε WGA με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρίας Sureplex (**Εικόνα 19.**), αντί της Genomeplex.

Εικόνα 19. Αποτέλεσμα γενετικού ελέγχου 5 εμβρυικών κυττάρων, μετά από βιοψία. Στο πείραμα αυτό έγινε WGA των δειγμάτων με βάση το πρωτόκολλο της Sureplex. Από την εικόνα φαίνεται ότι το υπό εξέταση δείγμα είναι κορίτσι, αφού έχει διπλασιασμένο το χρωμόσωμα X και ελλειματικό το χρωμόσωμα Y. Επίσης παρατηρείται ένα έλλειμα στο χρωμόσωμα 11.



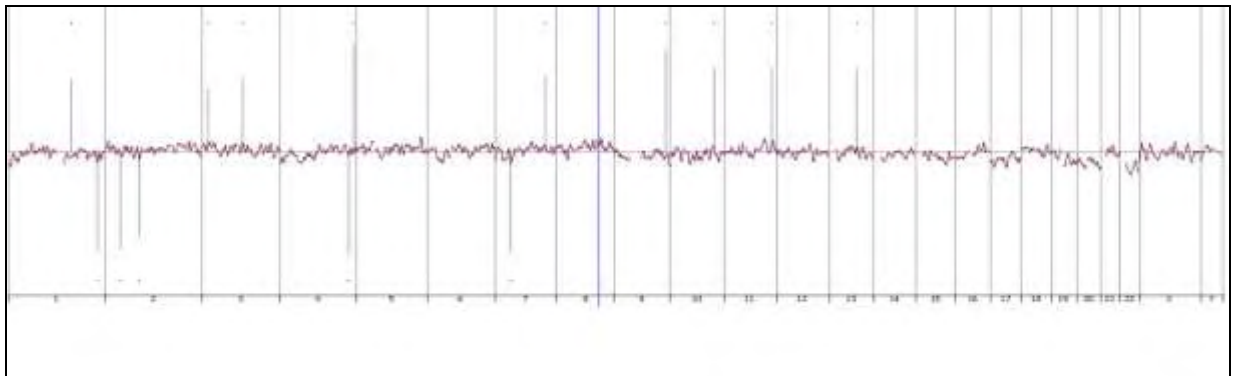
Στη συνέχεια έγιναν πειράματα στα οποία ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της Agilent, με τη διαφορά ότι στο στάδιο του καθαρισμού του σημασμένου gDNA έγινε κατακρίμνηση με αιθανόλη, όπως προτείνει το πρωτόκολλο της Bluegnome. Επίσης έγιναν ορισμένες αλλαγές στο λογισμικό της Agilent (**Εικόνα 20.**), ώστε αυτό να είναι περισσότερο κατάλληλο για την εξαγωγή αποτελεσμάτων από ένα και μόνο κύτταρο.

Εικόνα 20. Αποτέλεσμα γενετικού ελέγχου ενός μεμονωμένου λεμφοκυττάρου. Στο συγκεκριμένο πείραμα έγινε WGA με το πρωτόκολλο της Sureplex. Από την εικόνα φαίνεται ότι το υπό εξέταση δείγμα είναι κορίτσι, αφού έχει διπλασιασμένο το χρωμόσωμα X και ελλειμματικό το χρωμόσωμα Y

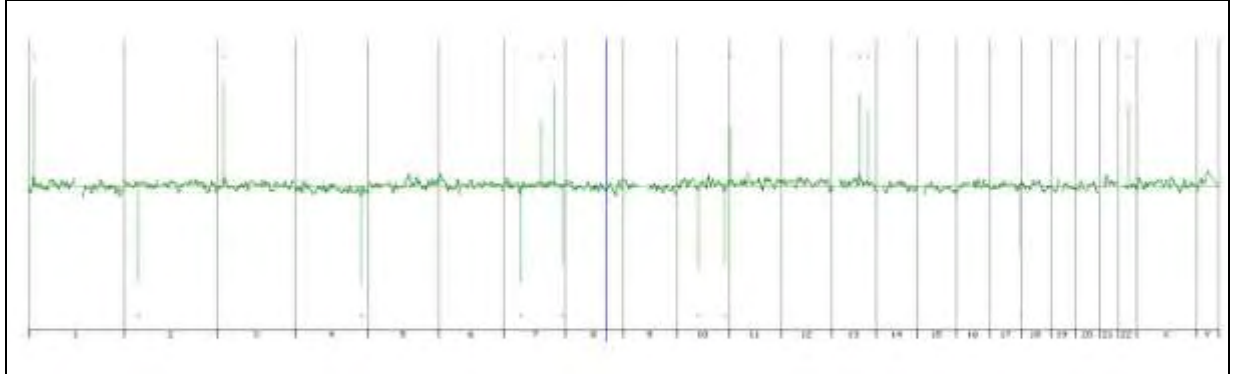


Τέλος έγινε πείραμα χρησιμοποιώντας γενετικό υλικό από δύο βιοψίες του ίδιου εμβρύου, ώστε να μπορούν να συγκριθούν τα αποτελέσματα του γενετικού ελέγχου. Στο ένα πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 5 κύτταρα από το συγκεκριμένο έμβρυο (**Εικόνα 21.**), ενώ στο δεύτερο 10 (**Εικόνα 22.**).

Εικόνα 21. Αποτέλεσμα γενετικού ελέγχου 5 εμβρυικών κυττάρων, μετά από βιοψία. Στην εικόνα δεν παρατηρούνται αριθμητικές μεταλλάξεις. Άρα το υπό εξέταση δείγμα αντιστοιχεί σε φυσιολογικό αγόρι.



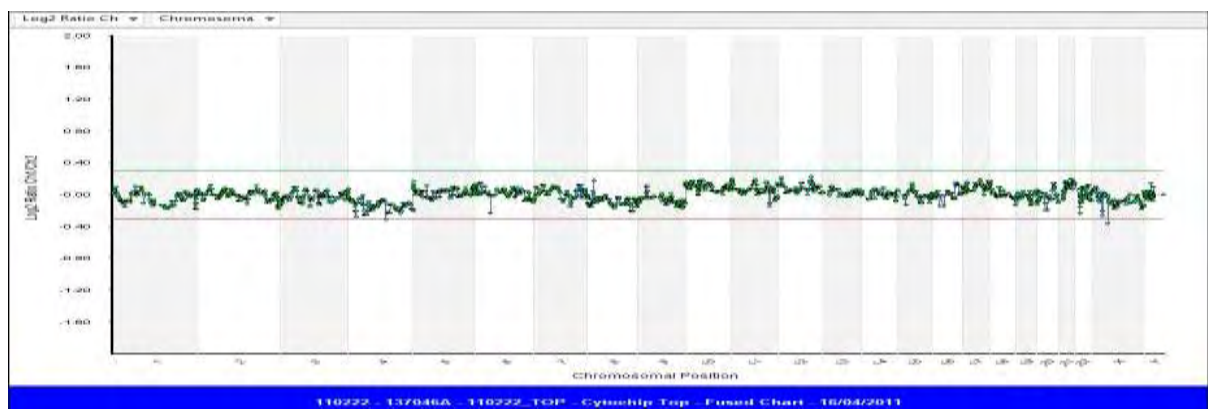
Εικόνα 22. Αποτέλεσμα γενετικού ελέγχου 10 εμβρυικών κυττάρων, μετά από βιοψία. Στην εικόνα φαίνεται δεν υπάρχουν αριθμητικές μεταλλάξεις. Άρα το υπό εξέταση δείγμα αντιστοιχεί σε φυσιολογικό αγόρι και έτσι δεν παρατηρούνται αλλαγές από το αποτέλεσμα που έβγαλε το πείραμα με τα 5 κύτταρα του ίδιου εμβρύου.



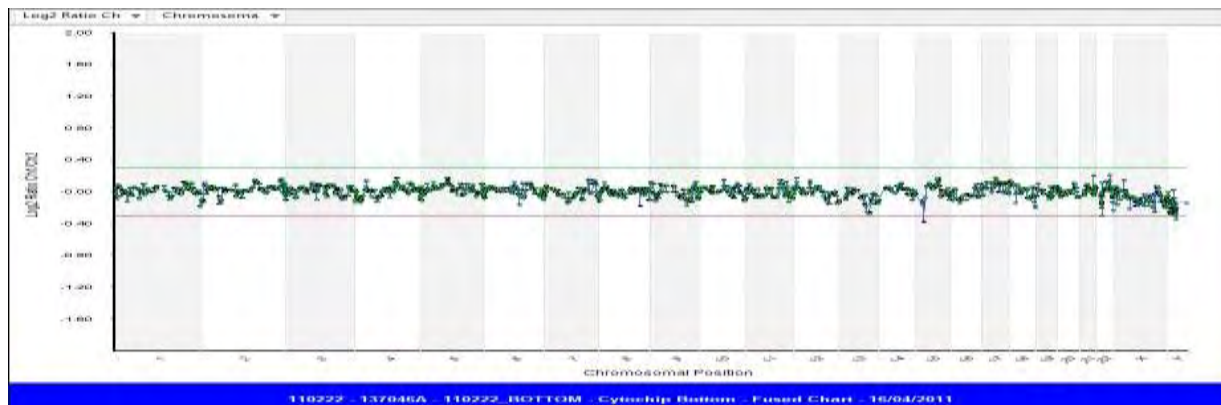
3.2.2. Bluegnome 24sure

Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της Bluegnome (όπως αυτό περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας) και τα πειράματα έγιναν με γενετικό υλικό τροφοβλάστη μετά από βιοψία εμβρύου στο στάδιο της βλαστοκύστης (**Εικόνα 23.**) και στη συνέχεια με γενετικό υλικό μετά από βιοψία του υπόλοιπου εμβρύου (**Εικόνα 24.**), ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους και να φανεί ότι όντως παίρνουμε τα ίδια αποτελέσματα από κύτταρα τροφοβλάστη και εσωτερικής κυτταρικής μάζας.

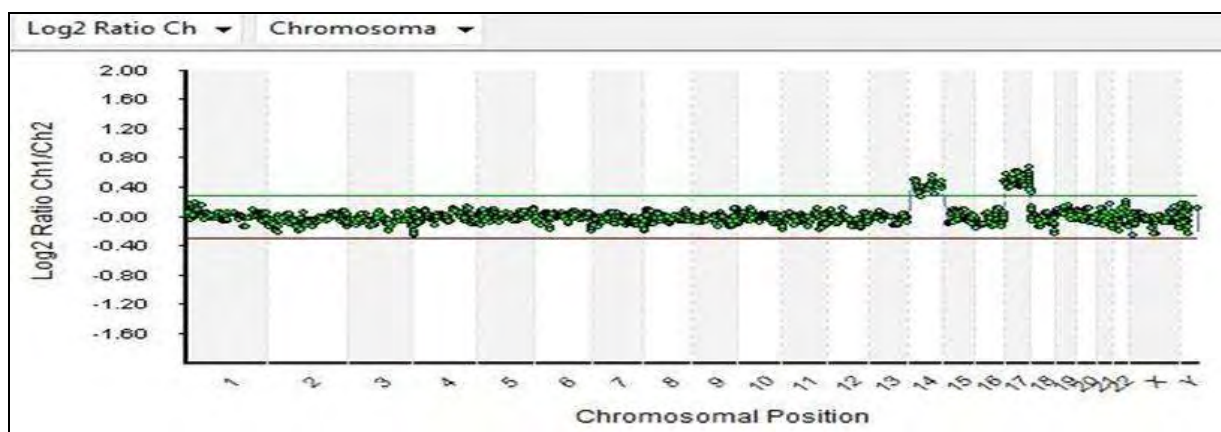
Εικόνα 23. Αποτέλεσμα γενετικού ελέγχου 10 εμβρυικών κυττάρων προερχόμενα από τροφοβλάστη βλαστοκύστης, μετά από βιοψία.



Εικόνα 24. Αποτέλεσμα γενετικού ελέγχου εμβρυικών κυττάρων, του υπόλοιπου εμβρύου που χρησιμοποιήθηκε παραπάνω, μετά από βιοψία. Από την εικόνα φαίνεται ότι τα αποτελέσματα των δύο πειραμάτων συμπίπτουν.



Εικόνα 25. Αποτελέσματα γενετικού ελέγχου κυττάρων εμβρύου μετά από βιοψία. Στην εικόνα φαίνεται ότι υπάρχει πλεόνασμα γενετικού υλικού στα χρωμοσώματα 14 και 17.



Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 3.**) συνοψίζονται οι διαφορές στα αποτελέσματα των πειραμάτων.

Πίνακας 3. Οι δοκιμές που έγιναν στα πλαίσια αυτής της εργασίας.

Όπου - : μη ικανοποιητικά αποτελέσματα

+ : ικανοποιητικά αποτελέσματα

++ : πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα

<i>ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ</i>	<i>ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ</i>
• Agilent • 15 κύτταρα (2μg) • WGA (Genomeplex)	-
• Agilent • 15 κύτταρα (0,8μg) • Περιοριστική πέψη δειγμάτων DNA	-
• Agilent • 5 κύτταρα (από βιοψία εμβρύου) • WGA (Sureplex)	+
• Agilent • 1 κύτταρο • WGA (Sureplex) • Κατακρίμνηση με αιθανόλη • Αλλαγές στο λογισμικό της Agilent	++
• Bluegenome • 10 κύτταρα (από βιοψία από τροφοβλάστη εμβρύου) • WGA (Sureplex)	++
• Bluegenome • 1 κύτταρο (βιοψία από έμβρυο) • WGA (Sureplex)	++

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η κύρια προσέγγιση για τον έλεγχο των σοβαρών γενετικών ασθενειών παραμένει προληπτική, και η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση αποτελεί μια εναλλακτική διαδικασία στο πλαίσιο των υπηρεσιών της προγεννητικής διάγνωσης, λειτουργώντας ως μέσο για την αποφυγή του τραύματος καθώς και του ηθικού διλήματος του τερματισμού μιας κύησης,. (Traeger-Synodinos J et al 2003). Με τον προεμφυτευτικό γενετικό έλεγχο (PGS) υπάρχει πια η δυνατότητα να ελεγχθούν τα έμβρυα για χρωμοσωμικές ανωμαλίες, πριν την εμφύτευσή τους στη μήτρα της υποψήφιας μητέρας, μειώνοντας την πιθανότητα για αποβολή, όπως επίσης και την πιθανότητα ενός πάσχοντος απογόνου. Πρόσφατες μελέτες προτείνουν PGS με χρήση μικροσυστοιχιών (aCGH) για τον έλεγχο 24 χρωμοσωμάτων, με σκοπό να ξεπεραστούν οι τεχνικές δυσκολίες που ταλανίζουν προηγούμενες μελέτες PGS, δηλαδή τον περιορισμένο αριθμό χρωμοσωμάτων που μπορούν να ελεγχθούν με FISH, επιτρέποντας τον έλεγχο ολόκληρου του γονιδιώματος (Gutie'rrrez-Mateo et al, 2011, Treff et al, 2010A, β), με σκοπό την αύξηση του ποσοστού επιτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Στην εργασία αυτή αξιολογούνται και συγκρίνονται δυο κατασκευάστριες εταιρίες, η Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH, με χρήση της τεχνολογίας των oligo-arrays και η Bluegenome 24sure, για τα BAC-arrays, στα πλαίσια του προεμφυτευτικού γενετικού ελέγχου εμβρύων. Και οι δύο μέθοδοι ανιχνεύουν ελλείψεις και προσθήκες ολόκληρων χρωμοσωμάτων με ακρίβεια 95% έως και σχεδόν 100%, ανάλογα με το στάδιο στο οποίο βρίσκεται το υπό εξέταση έμβryo (Fragouli et al. 2010, Gutie'rrrez-Mateo et al. 2010). Σκοπός ήταν να μπορέσει να εφαρμοστεί το PGS με την τεχνολογία των BAC-arrays της Bluegenome, αλλά και να δοκιμαστεί το πρωτόκολλο της Agilent Oligo-arrays στο επιδεδο έως μερικών κυττάρων.

Η προσέγγιση array-CGH έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με άλλες τεχνικές για την ανάλυση χρωμοσωμάτων. Είναι σχετικά κοινό, για την προεμφυτευτική γενετική διάγνωση των χρωμοσωμικών μετατοπίσεων (PGD), ότι πρέπει να συνδυαστεί με ανευπλοειδικό έλεγχο (PGS), για την αξιολόγηση των ανευπλοειδίων για τις γυναίκες προχωρημένης ηλικίας (Gianaroli et al, 2002, Munne et al, 2005). Η PGS στοχεύει να παρέχει ένα μέσο εντοπισμού ευπλοειδικών εμβρύων για μεταφορά, τα οποία μπορεί να έχουν υψηλότερες πιθανότητες παραγωγής μιας εγκυμοσύνης.

Πρόσφατα, έχουν προταθεί προσεγγίσεις μικροσυστοιχειών που βασίζονται στον έλεγχο 24^{ων} χρωμοσωμάτων για PGS, ώστε να ξεπεραστούν οι τεχνικές δυσκολίες που ταλανίζουν προηγούμενες μελέτες, κυρίως όσον αφορά την τεχνική FISH η οποία δεν μπορεί να αναλύσει ολόκληρο το γονιδίωμα, αλλά μερικά μόνο χρωμοσώματα και σε συγκεκριμένα σημεία. Στοιχεία από διεξοδικό ανευπλοειδικό έλεγχο έδειξαν ότι ανευπλοειδίες μπορούν να συμβούν σε προεμφυτευτικά έμβρυα, σε οποιοδήποτε από τα 24 χρωμοσώματα, υποδεικνύοντας ότι ο έλεγχος όλων των χρωμοσωμάτων μπορεί να καθορίσει αν ένα έμβρυο είναι χρωμοσωμικά φυσιολογικό (Gutierrez-Mateo et al, 2011, Treff et al, 2010A, β.). Ένα ακόμη πλεονέκτημα των array-CGH, σε σχέση με άλλες τεχνικές ανάλυσης (κυρίως της FISH), είναι ότι δεν απαιτείται έλεγχος δειγμάτων DNA από το ζευγάρι ή συγγενείς του ζευγαριού, πριν από τον κύκλο εξωσωματικής γονιμοποίησης, και η ανάλυση μπορεί να προγραμματιστεί για την ημέρα της βιοψίας με βάση τον αριθμό των εμβρύων που είναι διαθέσιμα για βιοψία (Gutierrez et al 2010).

Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν και συγκρίθηκαν δύο μέθοδοι aCGH: τα BAC-arrays και τα Oligo-arrays. Γενικά, ο σχεδιασμός των BAC-arrays είναι διαγνωστικά πιο προσανατολισμένος, με υψηλή κάλυψη σε περιοχές της νόσου και μικρότερη κάλυψη στις περιοχές παραλλαγμένου αριθμού αντιγράφων DNA (CNV), ενώ είναι επίσης μια επικυρωμένη πλατφόρμα για όλες τις διαγνωστικές περιπτώσεις, επιτρέποντας την εύκολη ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Evangelidou et al 2010). Τα Oligo-arrays επιτρέπουν μεγαλύτερη ανάλυση (high resolution). Επειδή ο υβριδισμός σε αυτού του τύπου arrays είναι πιο απαιτητικός, παρουσιάζεται μεγαλύτερη ευαισθησία στην ποιότητα του δείγματος. Ακόμη, λόγω του ότι το PGS αφορά έλεγχο ενός ή και μερικών μόνο κυττάρων, κρίνεται απαραίτητη η ενίσχυση των δειγμάτων (WGA). Και πάλι όμως τα αποτελέσματα της Agilent για PGS παρουσιάζουν αρκετό θόρυβο (background noise) που δυσκολεύει την ανάλυση. Φαίνεται πως με ορισμένες αλλαγές στο λογισμικό της Agilent, τα αποτελέσματα μπορούν να βγούν πολύ πιο ξεκάθαρα και σαφή. Έτσι μπορεί και προσφέρει εμπειριστατωμένη και ακριβέστερη διάγνωση, δίνοντας περισσότερες πληροφορίες για το γονιδίωμα, οι οποίες όμως με τα σημερινά δεδομένα ίσως να μην είναι ουσιαστικά χρήσιμες στα πλαίσια του PGS, διότι δεν μπορούν να ερμηνευτούν όλες οι πληροφορίες των χρωμοσωμικών παραλλαγών για αυτό το στάδιο ανάπτυξης των εμβρύων.

WGA

Οι απαιτήσεις για την ποσότητα του DNA ποικίλουν μεταξύ των διαφόρων πρωτοκόλλων aCGH, από εκατοντάδες νανογραμμάρια μέχρι και μικρογραμμάρια, για ένα πείραμα υβριδοποίησης. Για το λόγο αυτό είναι αναγκαίο να γίνει Ενίσχυση Ολόκληρου του Γονιδιώματος (WGA) πριν από την ανάλυση aCGH. Για τις αναλύσεις μας με χρήση του πρωτοκόλλου της Agilent, επιλέξαμε αρχικά την εταιρία της GenomePlex για WGA των δειγμάτων, ενώ στη συνέχεια έγιναν πειράματα με βάση το πρωτόκολλο της Sureplex, το οποίο συστήνεται και από την Bluegenome για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου της. Η ακρίβεια του WGA για aCGH μελετήθηκε από τον Little et al. (2006), και τα δεδομένα που λαμβάνονταν στα πειράματα με ενισχυμένο DNA ήταν πιο ακριβή σε σύγκριση με αυτά στα οποία είχε χρησιμοποιηθεί μη ενισχυμένο DNA (Bystricka D et al 2010). Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας έγιναν πειράματα με ενισχυμένο DNA φυσιολογικού μάρτυρα και άλλα με μη ενισχυμένο και φάνηκε ότι καλύτερα αποτελέσματα προέκυπταν με χρήση ενισχυμένου DNA για τις αναλύσεις. Το γεγονός αυτό συμπίπτει και με τα στοιχεία που υπάρχουν στη βιβλιογραφία και τις δοκιμές που έχουν γίνει.

ΧΡΟΝΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Καλά σχεδιασμένα πρωτόκολλα aCGH, θεωρούνται σήμερα από τις πλέον αποτελεσματικές τεχνικές για τις περιπτώσεις αριθμητικής χρωμοσωμικής ανισορροπίας (Bystricka D et al 2010). Ένα από τα κύρια ζητήματα για την εφαρμογή των δύο πρωτοκόλλων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα μας, είναι ο χρόνος που απαιτείται για την εφαρμογή τους. Το αρχικό υλικό είναι πολύ περιορισμένο και μη αντικαταστήσιμο και η διάγνωση πρέπει να ολοκληρωθεί σε περιορισμένο χρονικό διάστημα. Ειδικότερα, η ανάλυση με χρήση των BAC-arrays είναι πλήρως αυτοματοποιημένη και η όλη διαδικασία μπορεί να εκτελεστεί μέσα σε 24 ώρες (Fiorentino et al 2011), καθιστώντας δυνατή την εμβρυομεταφορά των υγιών εμβρύων στον ίδιο κύκλο, έως και την 6^η ημέρα μετά την ωοληψία. Αντίθετα, ακολουθώντας το πρωτόκολλο για τα oligonucleotide-based arrays, το χρονικό περιθώριο για διάγνωση και εμβρυομεταφορά σε έναν κύκλο ξεπερνιέται, καθώς δίνουν αποτελέσματα μέσα σε χρονικό διάστημα 3^{ων} ή 4^{ων} ημερών, καθυστερώντας απαραίτητη τη κρυοσυντήριση των εμβρύων και στη συνέχεια την εμβρυομεταφορά τους σε επόμενο κύκλο, ειδικά στην περίπτωση που η βιοψία έχει γίνει στο στάδιο της βλαστοκύστης και όχι την 3^η μέρα μετά τη γονιμοποίηση.

ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΤΑΔΙΟΥ ΒΙΟΨΙΑΣ

Παρά το γεγονός ότι οι μέθοδοι αυτοί έχουν καλές επιδόσεις, ανεξάρτητα από το είδος του εμβρυϊκού υλικού που δοκιμάζεται (πολικό σωματίο, βλαστομερίδιο και τροφοβλάστης), γίνεται ακόμα συζήτηση σχετικά με το βέλτιστο στάδιο για την εκτέλεση της βιοψίας. Ειδικότερα, υπάρχουν ερωτήματα ως προς την αποτελεσματικότητα της ανάλυσης στο στάδιο της 3^{ης} ημέρας (βλαστομερίδιο). Η βιοψία στο στάδιο της αυλάκωσης, την 3^η δηλαδή ημέρα, περιλαμβάνει την αφαίρεση ενός σημαντικού μέρους του όγκου του εμβρύου, που δυνητικά μπορεί να επηρεάσει τη βιωσιμότητά του (Colls P. et al., 2007). Επιπλέον, ο χρωμοσωμικός μωσαϊκισμός είναι αρκετά κοινός κατά τις πρώτες ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, όπως και η δυνατότητα αυτο-διόρθωσης ανευπλοειδισμού στο έμβρυο, και έτσι υπάρχει πιθανότητα να προκύψει λανθασμένη κατηγοριοποίηση των ανευπλοειδικών εμβρύων. Επίσης, η επέκταση του ελέγχου για την κάλυψη όλων των χρωμοσωμάτων αυξάνει την πιθανότητα εντοπισμού μιας ανωμαλίας, η οποία μπορεί να υπάρχει μοναδικά στο υπό εξέταση κύτταρο και να απουσιάζει από το υπόλοιπο έμβρυο, οδηγώντας, πιθανότατα, σε αποκλεισμό ενός κατά τα άλλα φυσιολογικού εμβρύου (Alfarawati et al 2011). Ακόμη, έχει αναφερθεί ότι η ταυτόχρονη δοκιμή πολλών κυττάρων, η οποία μπορεί να επιτευχθεί με βιοψία από τροφοβλάστη, μετριάξει διαγνωστικά προβλήματα που συνδέονται με το φαινόμενο της μωσαϊκισμού (Schoolcraft et al. 2010). Εναλλακτικά, η ανάλυση πολικού σωματίου, δεδομένου ότι τυχόν ανωμαλίες που εντοπίστηκαν στο ωοκύτταρο θα αναμένεται να βρεθούν και σε όλα τα κύτταρα του προκύπτοντος εμβρύου, δεν παρουσιάζει τέτοιου είδους ανησυχίες (Alfarawati et al. 2011).

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Μελλοντικά, σκοπός είναι να βελτιστοποιηθεί το πρωτόκολλο της Agilent για τα Oligo-arrays, ώστε να μπορεί να εφαρμοστεί για έμβρυα. Πειραματικά θα πρέπει να γίνουν δοκιμές για μείωση του χρόνου υβριδισμού καθώς και δοκιμές σε δείγματα μεμονομένων κυττάρων με γνωστές χρωμοσωμικές ανωμαλίες για να διαπιστωθεί αν εντοπίζονται με επιτυχία. Με την πάροδο του χρόνου και τις εξελίξεις στον τομέα αυτό, όλο και περισσότερες γενετικές διαταραχές θα είναι σε θέση να διαγνωσθούν. Ήδη η μέθοδος των μικροσυστοιχειών (arrays) έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε περιπτώσεις μεταθέσεων, είτε αμοιβές είτε κατά Robertson. Δυστυχώς, σήμερα αποτελεί μια δαπανηρή επιλογή για προεμφυτευτικό γενετικό έλεγχο εμβρύων, σε

σύγκριση με τις άλλες συμβατικές μεθόδους, αλλά το κόστος της μεθόδου aCGH αναμένεται να συνεχίσει να πέφτει, όπως συμβαίνει για τις περισσότερες νέες τεχνολογίες (Fiorentino et al 2011). Επίσης, είναι μια υποσχόμενη τεχνολογία, που θα βοηθήσει πολύ στην επίτευξη της μεταφοράς ενός μόνο εμβρύου, με τα μεγαλύτερα περιθώρια για εμφύτευση, μεγιστοποιώντας έτσι τα αποτελέσματα της εγκυμοσύνης και την ίδια στιγμή μειώνοντας την περίπτωση πολύδυμων κυήσεων. Τέλος, από το 2009 η ESHRE έχει ανακοινώσει ότι θα επιχειρήσει την πρώτη κλινική δοκιμή (Randomized Controlled Trial, RCT), η οποία θα χωρίζεται σε δύο στάδια μελέτης, για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της χρήσης του PGS σε γενετικό υλικό από βιοψία πολικού σωματίου και την ανάλυση 24 χρωμοσωμάτων μέσω της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών. Το πρώτο μέρος της μελέτης έχει ως στόχο να καθορίσει εάν η τεχνική της βιοψίας των πολικών σωματίων και η ανάλυση των 24 χρωμοσωμάτων, με τη μέθοδο CGH, είναι εφικτή. Για την πλήρη διερεύνηση του PGS, μια παρόμοια δοκιμή θα πρέπει να πραγματοποιηθεί σε βιοψία βλαστοκύστεων. Το δεύτερο μέρος θα περιλαμβάνει τουλάχιστον πέντε κέντρα σε διάφορες χώρες της ΕΕ, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν το PGS δίνει ένα αυξημένο ποσοστό γεννήσεων σε γυναίκες προχωρημένης ηλικίας. Εάν οι μελέτες αυτές δεν δείξουν βελτίωση των ποσοστών γεννήσεων, ίσως είναι καιρός να αφηθεί το ζήτημα του PGS πίσω μας, αλλά αν αποδειχθεί ότι βελτιώνει τα ποσοστά θα αποτελέσει ένα πολύ σημαντικό βήμα προόδου για την εξωσωματική γονιμοποίηση (Geraedts et al., 2009).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdelmassih S, Cardoso J, Abdelmassih V, Dias JA, Abdelmassih R, Nagy ZP. Laser-assisted ICSI: a novel approach to obtain higher oocyte survival and embryo quality rates. *Hum Reprod.* 2002 Oct;17(10):2694-9.

Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Wells D. First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis. *Hum Reprod.* 2011 Jun;26(6):1560-74. Epub 2011 Mar 29.

Bermudez, M.G., Piyamongkol, W., Tomaz, S., Dudman, E., Sherlock, J.K., and Wells, D. (2003). Single-cell sequencing and mini-sequencing for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 23, 669-677.

Bielanska M, Tan SL, Ao A. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum Reprod* 2002 Feb;17(2):413-9.

Bystřická D, Zemanová Z, Březinová J, Gančarčíková M, Grosová L, Sárová I, Izáková S, Berková A, Michalová K. The Assessment of Array Comparative Genomic Hybridization in Complex Karyotype Analyses (array comparative genomic hybridization / multicolour fluorescence in situ hybridization / myelodysplastic syndromes / complex karyotype). *Folia Biol (Praha).* 2010;56(5):223-30.

Colls P, Escudero T, Cekleniak N, Sadowy S, Cohen J, Munné S. Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for infertility using "no result rescue". *Fertil Steril.* 2007 Jul;88(1):53-61. Epub 2007 Feb 12.

De Vos A, Van Steirteghem A. Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn.* 2001 Sep;21(9):767-80. Review.

el-Hashemite N, Wells D, Delhanty JD. Preimplantation genetic diagnosis of beta-thalassaemia. *Lancet.* 1996 Aug 31;348(9027):620-1.

Elder K. and Dale B. 2000, *In Vitro Fertilization* (2nd edition), UK, Cambridge University Press.

ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). ESHRE PGD Consortium Steering Committee. *Hum Reprod.* 2002 Jan;17(1):233-46.

Evangelidou, P., Sismani, C., Ioannides, M., Christodoulou, C., Koumbaris, G., Kallikas, I., Georgiou, I., Velissariou, V., and Patsalis, P.C. (2010). Clinical application of whole-genome array CGH during prenatal diagnosis: Study of 25 selected pregnancies with abnormal ultrasound findings or apparently balanced structural aberrations. *Mol Cytogenet* 3, 24.

F. Fiorentino^{1,*}, L. Spizzichino¹, S. Bono¹, A. Biricik¹, G. Kokkali², L. Rienzi³, F.M. Ubaldi³, E. Iammarrone¹, A. Gordon⁴, and K. Pantos² PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. *Hum Reprod.* 2011 Apr 12.

Fragouli E Preimplantation genetic diagnosis: present and future. *J Assist Reprod Genet.* 2007 Jun;24(6):201-7.

Fragouli E, Katz-Jaffe M, Alfarawati S, Stevens J, Colls P, Goodall NN, Tormasi S, Gutierrez-Mateo C, Prates R, Schoolcraft WB, Munne S, Wells D. Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure. *Fertil Steril.* 2010 Aug;94(3):875-87. Epub 2009 Jun 21.

Geraedts J, Collins J, Gianaroli L, Goossens V, Handyside A, Harper J, Montag M, Repping S, Schmutzler A. What next for preimplantation genetic screening? A polar body approach!. *Hum Reprod* 2009; [Epub ahead of print December 23].

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fiorentino A, Garrisi J, Munné S. Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. *Fertil Steril.* 1997 Dec;68(6):1128-31.

Gianaroli L, Magli MC, Munné S, Fiorentino A, Montanaro N, Ferraretti AP. Will preimplantation genetic diagnosis assist patients with a poor prognosis to achieve pregnancy? *Hum Reprod.* 1997 Aug;12(8):1762-7.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Tabanelli C, Trombetta C, Boudjema E. The role of preimplantation diagnosis for aneuploidies. *Reprod Biomed Online.* 2002;4 Suppl 3:31-6.

Gutierrez-Mateo C, Colls P, Sánchez-García J, Escudero T, Prates R, Ketterson K, Wells D, Munne S. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil Steril* 2011;95:953–958.

Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature.* 1990 Apr 19;344(6268):768-70.

Handyside AH, Lesko JG, Tarín JJ, Winston RM, Hughes MR Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 1992 Sep 24;327(13):905-9.

Handyside AH, Harton GL, Mariani B, Thornhill AR, Affara N, Shaw MA, Griffin DK. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *J Med Genet.* 2010 Oct;47(10):651-8. Epub 2009 Oct 25.

Harper, J.C., Coonen, E., De Rycke, M., Harton, G., Moutou, C., Pehlivan, T., Traeger-Synodinos, J., Van Rij, M.C., and Goossens, V. (2010). ESHRE PGD Consortium data collection X: cycles from January to December 2007 with pregnancy follow-up to October 2008. *Hum Reprod* 25, 2685-2707.

Harper JC, Coonen E, De Rycke M, Harton G, Moutou C, Pehlivan T, Traeger-Synodinos J, Van Rij MC, Goossens V, Verlinsky Y, Pergament E, Strom C. The preimplantation genetic diagnosis of genetic diseases *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1990 Feb;7(1):1-5.

Harper, Ph.D.,^a and Harton, B.S.^b The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertil Steril.* 2010 Sep;94(4):1173-7. Epub 2010 Jun 25. Review

Harper JC, Wells D. Recent advances and future developments in PGD. *Prenat Diagn.* 1999 Dec;19(13):1193-9.

Harton, G., Braude, P., Lashwood, A., Schmutzler, A., Traeger-Synodinos, J., Wilton, L., and Harper, J.C. (2011). ESHRE PGD consortium best practice guidelines for organization of a PGD centre for PGD/preimplantation genetic screening. *Hum Reprod* 26, 14-24.

Hellani A, Abu-Amero K, Azouri J, El-Akoum S Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening *Reprod Biomed Online.* 2008 Dec;17(6):841-7.

IVF worldwide unit directory IVF History: <http://www.ivf-worldwide.com>.

Kanavakis E, Vrettou C, Palmer G, Tzetis M, Mastrominas M, Traeger-Synodinos J. Preimplantation genetic diagnosis in 10 couples at risk for transmitting beta-thalassaemia major: clinical experience including the initiation of six singleton pregnancies. *Prenat Diagn.* 1999 Dec;19(13):1217-22.

Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, Vrettou C, Maragoudaki E, Tzetis M, Kattamis C Prenatal diagnosis of the thalassaemia syndromes by rapid DNA analytical methods. *Mol Hum Reprod.* 1997 Jun;3(6):523-8.

Kokkali G, Vrettou C, Traeger-Synodinos J, Jones GM, Cram DS, Stavrou D, Trounson AO, Kanavakis E, Pantos K. Birth of a healthy infant following trophoctoderm biopsy in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reprod Biomed Online* 2007

Little, S. E., Vuononvirta, R., Reis-Filho, J. S., Natrajan, R., Iravani, M., Fenwick, K., Mackay, A., Ashworth, A., Pritchard-Jones, K., Jones, C. (2006) Array CGH using whole genome amplification of fresh-frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tumor DNA. *Genomics* 87, 298-306.

Munne, S., Howles, C.M., and Wells, D. (2009). The role of preimplantation genetic diagnosis in diagnosing embryo aneuploidy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 21, 442-449.

Munné S, Chen S, Fischer J, Colls P, Zheng X, Stevens J, Escudero T, Oter M, Schoolcraft B, Simpson JL, Cohen J. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertil Steril.* 2005 Aug;84(2):331-5.

Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG, Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril.* 2010 Oct;94(5):1700-6. Epub 2009 Nov 25.

Traeger-Synodinos, J., Vrettou, C., Palmer, G., Tzetis, M., Mastrominas, M., Davies, S., and Kanavakis, E. (2003). An evaluation of PGD in clinical genetic services through 3 years application for prevention of beta-thalassaemia major and sickle cell thalassaemia. *Mol Hum Reprod* 9, 301-307.

Tarín JJ, Handyside AH. Embryo biopsy strategies for preimplantation diagnosis. *Fertil Steril.* 1993 May;59(5):943-52.

Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder BA, Tunnacliffe A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics.* 1992 Jul;13(3):718-25.

Treff NR, Levy B, Su J, Northrop LE, Tao X, Scott RT Jr. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening is significantly more consistent than FISH. *Mol Hum Reprod.* 2010 Aug;16(8):583-9. Epub 2010 May 19..

Van de Velde H, De Vos A, Sermon K, Staessen C, De Rycke M, Van Assche E, Lissens W, Vandervorst M, Van Ranst H, Liebaers I, Van Steirteghem A. Embryo implantation after biopsy of one or two cells from cleavage-stage embryos with a view to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn.* 2000 Dec;20(13):1030-7.

Van Steirteghem A, Palermo G, Joris H, Derde MP, Camus M, Devroey P. Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1993 Apr;59(4):826-35

Verlinsky Y, Cieslak J, Freidline M, Ivakhnenko V, Wolf G, Kovalinskaya L, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, et al. Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod.* 1995 Jul;10(7):1923-7.

Verlinsky Y, Handyside A, Grifo J, Munné S, Cohen J, Liebers I, Levinson G, Arnheim N, Hughes M, Delhanty J, et al. Preimplantation diagnosis of genetic and chromosomal disorders. *J Assist Reprod Genet.* 1994 May;11(5):236-43.

Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM. Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod.* 1990 Oct;5(7):826-9

Wang W, Yap CH, Loh SF, Tan AS, Lim MN, Prasath EB, Chan ML, Tan WC, Jiang B, Yeo GH, Mathew J, Ho A, Ho SS, Wong PC, Choolani MA, Chong SS Simplified PGD of common determinants of haemoglobin Bart's hydrops fetalis syndrome using multiplex-microsatellite PCR. *Reprod Biomed Online.* 2010 Nov;21(5):642-8. Epub 2010 Jun 19.

Wells,D. and J.K.Sherlock. 1998. Strategies for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders by DNA amplification. *Prenat. Diagn.* 18: 1389-1401.

Wells D. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) *Prenat Diagn.* 1999 Dec;19(13):1190-2.

Wells1,2,3, Alfarawati1 and Fragouli1 Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Mol Hum Reprod.* 2008 Dec;14(12):703-10. Epub 2008 Oct 28.

Wells D, el-Hashemite N, Delhanty JD Preimplantation genetic diagnosis of beta thalassaemia. *Lancet.* 1996 Aug 31;348(9027):620-1.

Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1997 Jul;12(7):1545-9.