

Chromosomal abnormalities in human gametes

Citation for published version (APA):

Martini, E. (1998). *Chromosomal abnormalities in human gametes*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/1998

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Aim of the study:

The study of the chromosomal content of single gametes can provide valuable diagnostic information and contribute to basic knowledge in the field of reproductive biology. Patients carrying chromosomal defects or requiring medically assisted reproduction (MAR) techniques may benefit from gamete analysis.

Numerical and structural chromosomal aberrations are correlated with embryonic and fetal wastage, perinatal and infant mortality, mental retardation and congenital anomalies. Some studies suggest that approximately half of all human conceptuses bear chromosomal abnormalities. Analysis of gametes provides information on the origin and frequency of these chromosomal aberrations.

Methodology:

For this purpose a new protocol was developed to screen a relatively large number of gametes avoiding labour intensive and time-consuming pre-treatment steps. The non-radioactive in situ hybridization (ISH) technique allows the detection of chromosomal abnormalities in human interphase nuclei, and can thus be used for detection of numerical and structural chromosomal abnormalities in sperm cells and oocytes.

The combination of ISH, brightfield microscopy and Diff-Quik staining enables visualisation of single sperm cells and makes it possible to discriminate between nullisomic, disomic, diploid and morphologically abnormal spermatozoa, overlapping cells, somatic cells and immature germ cells (Chapter 2).

Spermatozoa:

In Chapter 3 semen from two 47,XYY males and one 46,XY/47,XXY male with fertility problems were analysed with the brightfield ISH procedure. The ratio of X- to Y-bearing spermatozoa did not differ from the expected 1:1 ratio, but the sex chromosome aneuploidy rate was much higher than in normal 46,XY males. In both 47,XYY males, approximately 15% of the sperm cells were aneuploid, while in the 46,XY/47,XXY male, the aneuploidy rate was 3%. The most striking finding was the relatively low percentage of spermatozoa in these patients, with an average of 65% in the XYY males and 84% in the XY/XXY male. The other cells were immature germ cells (IGC), including spermatogonia and spermatocytes. However, the finding that the majority of spermatozoa in semen of 47,XYY and 47,XXY males were not aneuploid strengthens the hypothesis that a 46,XY germ cell line must be present, apparently with a proliferative advantage over the 47,XYY and 47,XXY cells.

In the study described in Chapter 4, semen samples from 15 infertile males were analysed with sex chromosome probes in order to study whether a correlation exists between infertility and increased aneuploidy levels. Semen from fertile volunteers, unexplained infertility patients and severe male factor patients were analysed, and morphologically normal spermatozoa carrying an abnormal chromosome constitution for the sex chromosomes were detected at frequencies of 0.86%, 0.75% and 1.35%, respectively. The value of aneuploidy in the severe male factor group of patients was significantly higher than in the other two groups.

A fluorescent ISH approach was used to detect structural and numerical chromosomal aberrations in spermatozoa from a reciprocal translocation $t(3;11)(q27.3;q24.3)$ carrier

(Chapter 5). The presence of chromosomal aberrations in spermatozoa is a direct consequence of the meiotic behaviour of the translocation chromosomes. To analyse the meiotic segregation modes, a tailored FISH approach was developed in order to study both numerical and structural aberrations in spermatozoa. A combination of three different probes, hybridising to the centromeric region of chromosome 11 and to two specific DNA loci (a cosmid probe for chromosome 11q and a YAC probe for chromosome 3q) were used. Spermatozoa from the patient and from a normal donor were analysed and the abnormal chromosome constitutions were established. In the translocation carrier, 44.3% of the analysable sperm cells carried a normal or balanced karyotype, while the remaining cells were abnormal resulting from adjacent I segregation mode (15.9%), adjacent II segregation (6.5%), 3:1 segregation (28.9%), 4:0 segregation (0.8%) and aberrant segregation (3.6%). In the control sperm cells, 92.0% exhibited a normal chromosome pattern.

Oocytes:

Although far from being ideal, unfertilised oocytes from IVF or ICSI cycles are the only source of human oocytes available for research. Overall, 30-50% of oocytes recovered for IVF fail to fertilise and can therefore be used for chromosome analysis. Various lines of evidence imply that oocyte meiosis is very sensitive to endogenous or exogenous factors and that the incidence of abnormalities is correlated to female age.

In Chapter 6 a method for studying chromosomal anomalies in unfertilised, metaphase II oocytes is presented. This new technical approach allowed us to analyse 85% of the oocytes, compared to the 30-50% of analysable cells obtained by karyotyping. Two rounds of fluorescent ISH were performed using directly labelled probes: chromosomes 1, 7, 15 (round 1); chromosomes 1, X, Y (round 2). The chromosome 1 probe was included in both rounds as an internal control for the specificity, sensitivity and efficiency of the fluorescent ISH procedure.

In the initial study it was not possible to differentiate between polar body (PB) DNA and metaphase II DNA. Therefore, in the following study (Chapter 7), we modified the technique by removing the first PB with pronase so that only the metaphase II chromosomes were evaluated by FISH. Six different probes were used: chromosomes 1, 13, 21 (round 1) and chromosomes X, 7, 18 (round 2). Furthermore, since precocious division (pre-division) of univalents at meiosis I is thought to be responsible for trisomy formation, the position of chromatids was investigated and an association was found with the chromosomal status of the cell. A prevalence of dyads was found in haploid oocytes while there was an increased frequency of pre-division of chromatids in the aneuploid oocytes, especially for chromosome 21.

Conclusions:

The techniques described in this study were successfully applied to study chromosomal abnormalities, both numerical and structural, in human gametes. ISH analysis of spermatozoa from carriers of translocations, numerical sex-chromosomal abnormalities, or on spermatozoa of patients with unexplained fertility problems is realistic. However, it is unrealistic to think that ISH will ever provide error-free estimations of aneuploidy rates in human spermatozoa and oocytes. Nonetheless, it is much quicker and easier to perform than karyotyping. Therefore it enables the accumulation of information about the chromosomal constitution of large numbers of gametes.

Samenvatting

Doel van het onderzoek:

De bestudering van de chromosomale inhoud van individuele gameten kan waardevolle diagnostische informatie bieden en bijdragen aan de basale kennis op het gebied van de reproductieve biologie. Het onderzoek van de gameten kan van nut zijn voor patiënten die drager zijn van chromosomale afwijkingen of gebruik maken van medisch geassisteerde voortplantingsmethoden.

Numerieke en structurele chromosoomafwijkingen veroorzaken embryonale, foetale en perinatale sterfte en mortaliteit op de kinderleeftijd, mentale retardatie en aangeboren afwijkingen. Door sommige auteurs wordt gesuggereerd dat ongeveer de helft van alle humane zygoten chromosomaal afwijkend is. Het onderzoek van de gameten geeft inzicht in het ontstaan en de frequentie van deze chromosomale afwijkingen.

Methodologie:

Er werd een nieuw protocol ontwikkeld dat het mogelijk maakt een relatief groot aantal gameten te onderzoeken zonder bewerkelijke en tijdrovende voorbehandeling. Met behulp van de niet-radioactieve in situ hybridizatie (ISH) techniek kunnen chromosoomafwijkingen in humane interfase kernen aangetoond worden. Deze methode kan derhalve ook gebruikt worden voor het onderzoek van numerieke en structurele chromosoomafwijkingen van zaadcellen en eicellen. Door ISH te combineren met de Diff-Quik kleuring kunnen individuele zaadcellen in een doorvallend lichtmicroscop beoordeeld worden op afwijkingen als nullisomie, disomie, diploidie, morfologische afwijkingen, overlap en kunnen zaadcellen onderscheiden worden van somatische cellen en onrijpe geslachtscellen (Hoofdstuk 2).

Spermatozoa:

In hoofdstuk 3 is de nieuwe methode toegepast bij twee 47,XYY mannen en een 46,XY/47,XXY man met vruchtbaarheidsproblemen. De verhouding X-: Y-dragende zaadcellen week niet af van de verwachte 1:1 verhouding, maar het percentage numerieke geslachtschromosomale afwijkingen was veel hoger dan bij normale 46,XY mannen. Bij beide 47,XYY mannen was ongeveer 15 % van de zaadcellen aneuploid, terwijl het aneuploidie percentage bij de 46,XY/47,XXY man ongeveer 3 % bedroeg. De meest opvallende bevinding was het relatief lage percentage zaadcellen dat werd waargenomen bij deze patiënten. Dit bedroeg gemiddeld 65 % bij de XYY mannen en 84 % bij de XY/XXY man. De andere cellen waren voornamelijk onrijpe geslachtscellen, zoals spermatogonia en spermatocyten. De bevinding dat de meerderheid van de zaadcellen in het semen van 47,XYY en 47,XXY mannen niet aneuploid was is een sterke aanwijzing voor de hypothese dat er een 46,XY geslachtscellijn aanwezig moet zijn, die waarschijnlijk in proliferatief opzicht in het voordeel is ten opzichte van de geslachtschromosomaal afwijkende cellen. Het onderzoek dat beschreven wordt in Hoofdstuk 4, heeft betrekking op de analyse van zaadmonsters van 15 onvruchtbare mannen. Dit werd gedaan om na te gaan of er een verband bestaat tussen onvruchtbaarheid en toename van aneuploidie. Semen van vruchtbare vrijwilligers werd vergeleken met dat van patiënten met onverklaarde infertiliteit en patiënten met een ernstige infertiliteit op basis van een mannelijke factor. Bij deze drie groepen werden in morfologisch normale zaadcellen percentages afwijkingen van de geslachtschromosomen gevonden van resp. 0,86 %, 0,75 % en 1,35 %. Het aneuploidie percentage in de laatste groep was significant hoger dan dat van de andere twee groepen.

Deze bevindingen werden bevestigd door gebruik te maken van probes voor de autosomen 1 en 17.

Fluorescente in situ hybridizatie (FISH) werd toegepast om structurele en numerieke chromosomale afwijkingen te onderzoeken in zaadcellen van een drager van een reciproke translocatie $t(3;11)(q27.3;q24.3)$ (Hoofdstuk 5). De aanwezigheid van chromosomale afwijkingen in de zaadcellen van een dergelijke translocatiedrager is een direct gevolg van het gedrag van de translocatiechromosomen in de meiose. De verdeling van de bij de translocatie betrokken chromosomen over de meiotische dochtercellen werd onderzocht met behulp van een speciaal ontwikkelde FISH methode waarmee zowel numerieke als structurele afwijkingen van de zaadcellen konden worden aangetoond. Er werd gebruik gemaakt van een combinatie van drie verschillende probes, die hybridiseerden met respectievelijk het centromeer gebied van chromosoom 11 en twee specifieke DNA loci (een cosmide probe op chromosoom 11q en een YAC probe op chromosoom 3q). De zaadcellen van de translocatiedrager werden vergeleken met die van een normale donor en de afwijkende chromosomale constituties werden vastgesteld. Bij de translocatiedrager had 44,3 % van de analyseerbare zaadcellen een normaal of gebalanceerd karyotype, terwijl de overige cellen afwijkend waren tengevolge van adjacent I segregatie (15,9 %), adjacent II segregatie (6,5 %), 3:1 segregatie (28,9 %), 4:0 segregatie (0,8 %) en andere afwijkende segregaties (3,6 %). In het controle monster liet 92,0 % een normaal segregatiepatroon zien.

Oöcyten:

Ofschoon ze zeker geen ideaal onderzoeksobject vormen, zijn na IVF en ICSI onbevrucht gebleven oöcyten het enige beschikbare materiaal voor onderzoek van de vrouwelijke humane gameet. In het algemeen kan gesteld worden dat 30-50 % van de oöcyten onbevrucht blijft en derhalve beschikbaar is voor chromosomaal onderzoek. Er zijn allerlei aanwijzingen dat de meiose bij de vrouw erg gevoelig is voor endogene en exogene factoren en dat de incidentie van chromosoomafwijkingen gecorreleerd is met de leeftijd van de vrouw.

In hoofdstuk 6 is een methode beschreven voor de chromosomale bestudering van onbevrucht gebleven, metafase II oöcyten. Deze nieuwe benadering maakte het mogelijk 85 % van de eicellen te analyseren. Na klassieke karyotypering kan een resultaat verkregen worden bij 30 tot 50 % van de cellen. Hiertoe werd FISH met direct gemerkte probes toegepast in twee opeenvolgende ronden: chromosoom 1, 7 en 15 probes in ronde 1 en chromosoom 1, X en Y probes in ronde 2. De chromosoom 1 probe werd in beide ronden toegepast om een interne controle te hebben voor de specificiteit, sensitiviteit en efficiëntie van de FISH procedure.

In het eerste onderzoek was het niet mogelijk het DNA van het poollichaampje te onderscheiden van dat van de metafase II. Daarom werd de methode in het vervolgonderzoek aangepast door eerst het poollichaampje te verwijderen met pronase zodat slechts de metafase II chromosomen overbleven voor FISH onderzoek (hoofdstuk 7). Zes verschillende probes werden gebruikt: chromosoom 1, 13 en 21 probes in ronde 1 en chromosoom X, 7 en 18 probes in ronde 2. Bovendien werd de positie van de chromatiden onderzocht, aangezien vroegtijdige deling (pre-divisie) van univalenten tijdens meiose I verantwoordelijk wordt gehouden voor trisomie vorming. Er werd een verband gevonden met de chromosomale status van de cel. Bij haploïde oöcyten overheerste de aanwezigheid van normale univalenten terwijl er sprake was van een verhoogde frequentie van pre-divisie van de chromatiden bij de aneuploïde oöcyten en speciaal bij aneuploidie voor chromosoom 21.

Conclusies:

De methoden die beschreven zijn in dit proefschrift zijn met succes toegepast bij de bestudering van numerieke en structurele chromosoomafwijkingen van menselijke geslachtscellen. ISH analyse van zaadcellen van translocatiedragers, patiënten met geslachtschromosomale afwijkingen of patiënten met onverklaarde infertiliteit is haalbaar. Het is echter niet realistisch te veronderstellen dat het ooit mogelijk zal zijn met behulp van ISH tot foutloze bepalingen van het percentage aneuploidie van humane spermatozoa en oöcyten te komen. Daar staat tegenover dat ISH veel sneller en gemakkelijker uitgevoerd kan worden dan karyotypering. Daardoor is het mogelijk informatie te verzamelen over de chromosomale inhoud van grote aantallen gameten.

Curriculum Vitae

Elena Martini was born on the 29th of February, 1968 in Livorno, Italy. She graduated in 1987 at the Deutsche Schule Genua and in the same year started her Biology study at the University of Genoa, where she obtained her Masters degree in 1993. In September 1993 she came to the Stichting Klinische Genetica in Maastricht financed by a Commett Grant from the EC. This initial stage of 6 months developed into a Ph.D. project, to be performed at the University of Limburg, Department of Molecular Cell Biology & Genetics (Prof. Dr. FCS Ramaekers and Prof. Dr. JPM Geraedts, under supervision of Dr. AHN Hopman) in collaboration with the Department of Obstetrics & Gynaecology, University of Genoa, Italy (Prof. Dr. GL Capitanio). In 1996 she obtained a 2-years Training and Mobility Research Fellowship from the EC and continued her project as researcher at the University of Maastricht. In September 1996 she visited on basis of a joint grant from the Netherlands Organisation for Scientific Research and Australian Research Council (NWO-ARC), The Queen Elizabeth Hospital in Adelaide, Australia (Prof. Dr. CD Matthews and Dr. SP Flaherty) where she stayed 3 months and performed part of the work published in this thesis.

She is married to Maurice Jansen and they have a one-year old son, Martino.