

Institut für Humangenetik  
Fachbereich 2.6 Theoretische Medizin  
Der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
(Prof. Dr. med. Klaus D. Zang)

# **Nachweis und klinisch-diagnostische Bedeutung fetaler DNA in mütterlichem Blut**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

Der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2011

Vorgelegt von Andrea Schneider  
Geb. am: 30.01.1979 in Püttlingen

# Inhalt

Zusammenfassung.....	7
Abstract .....	9
Kapitel 1 - Einleitung.....	11
1.1 Pränataldiagnostik.....	11
1.2 Invasive Pränataldiagnostik.....	13
1.2.1 Amniozentese .....	13
1.2.2 Chorionzottenbiopsie .....	15
1.3 Nicht-invasive Pränataldiagnostik .....	18
1.3.1 Ultraschall.....	18
1.3.2 Triple-Test.....	19
1.3.3 Kombiniertes 1. Trimenon-Test.....	20
1.4 Experimentelle Ansätze der nicht-invasiven Pränataldiagnostik .....	20
1.4.1 Fetale Zellen in mütterlichem Blut .....	21
1.4.2 Fetale DNA in mütterlichem Blut .....	26
1.5 Fragestellung der Arbeit: Nachweis fetaler DNA in mütterlichem Blut .....	31
1.5.1 Anwendung des SRY-Primers .....	31
1.5.2 Anwendung des DYS14-Primers .....	32
1.5.3 Klinische Durchführbarkeit.....	33
1.5.4 Entwicklung des Nachweises fetaler DNA im mütterlichen Blut seit Abschluss der experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit.....	33
Kapitel 2 -Material und Methoden.....	34
2.1 Untersuchungsmaterial .....	34
2.2 DNA-Isolierung .....	36
2.2.1 Versuchsprotokoll der DNA-Isolierung.....	38
2.3 PCR.....	39
2.4 Real-Time PCR .....	42

2.4.1 DNA interkalierende Farbstoffe .....	43
2.4.2 Sonden.....	46
2.4.3 LightCycler .....	52
2.4.5. TaqMan.....	56
2.4.6 SRY-qRT-PCR.....	56
2.4.7 Versuchsprotokoll der SRY-qRT-PCR .....	58
2.4.8 DYS14-qRT-PCR.....	58
2.4.9 Versuchsprotokoll der DYS14-qRT-PCR.....	60
2.4.10 GAPDH-qRT-PCR .....	60
2.4.11 Versuchsprotokoll der GAPDH-qRT-PCR .....	62
2.5 Agarosegelelektrophorese .....	62
2.5.1 Versuchsprotokoll der Agarosegelelektrophorese.....	65
2.6 Statistische Auswertung.....	66
2.6.1 Sensitivität .....	66
2.6.2 Spezifität.....	66
2.6.3 Positiver prädiktiver Wert .....	67
2.6.4 Negativer prädiktiver Wert .....	67
Kapitel 3 - Ergebnisse .....	69
3.1 GAPDH-Real-Time-PCR .....	69
3.1.1 Ergebnisse.....	69
3.1.2 Auswertung .....	72
3.1.3 Vergleich TaqMan mit LightCycler.....	73
3.2 SRY-Real-Time-PCR.....	74
3.2.1 Ergebnisse.....	74
3.2.2 Auswertung .....	78
3.2.3 Vergleich positive - negative DNA-Proben .....	79

3.2.4 TaqMan.....	81
3.3 DYS14-Real-Time-PCR.....	82
3.3.1 Ergebnisse.....	82
3.3.2 Auswertung .....	84
3.3.3 Vergleich positive - negative DNA-Proben .....	87
3.3.4 TaqMan.....	89
3.4 Vergleich SRY und DYS14-Primer .....	90
Kapitel 4 - Diskussion.....	91
4.1 Möglichkeiten der Pränataldiagnostik .....	91
4.1.1 Amniozentese.....	91
4.1.2 Chorionzottenbiopsie .....	92
4.1.3 Ultraschall.....	93
4.1.4 Triple-Test.....	94
4.1.5 Kombiniertes 1. Trimenon-Screening.....	94
4.1.6 Fetale Zellen im mütterlichen Blut .....	95
4.2 Fetale DNA im mütterlichem Blut .....	95
4.2.1 Ursprung fetaler DNA im mütterlichen Blut.....	95
4.2.2 Rhesusfaktor.....	97
4.3 Klinische Durchführbarkeit.....	99
4.3.1 Proben-Entnahme .....	99
4.3.2 DNA-Isolierung .....	99
4.3.3 LightCycler .....	100
4.3.4 Anwendung des SRY-Primers .....	103
4.3.5 Anwendung des DYS14-Primers .....	104
4.4 Entwicklung des Nachweises und zunehmend klinisch-diagnostische Bedeutung fetaler DNA im mütterlichen Blut seit Abschluss der experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit (2002-2010) .....	107

4.4.1 Numerische Chromosomenanomalien.....	107
4.4.2 Monogen vererbte Erkrankungen .....	110
4.4.3 Gestosen.....	110
4.4.4 Intrauterine Wachstumsretardierung .....	112
4.4.5 Plazentationsstörungen.....	113
4.4.6 Mehrlingsschwangerschaften .....	114
4.4.7 Extrauterine Gravidität.....	114
4.4.8 Spontanaborte und Abortus imminens.....	115
4.4.9 Invasive Pränataldiagnostik.....	115
4.4.10 Abruptio graviditatis.....	116
4.4.11 Herkunft der Mutter.....	117
4.4.12 Chronische Erkrankungen der Mutter.....	117
4.4.13 Anreicherung freier fetaler DNA .....	117
4.4.14 Ursprung freier DNA.....	119
4.4.15 Selektive Anreicherung freier fetaler DNA durch Größenfraktionierung .....	120
4.4.16 STR-Sequenz-Analyse .....	121
4.4.17 Kalibrierungskurve.....	122
4.4.18 MALDI-TOF-MS .....	122
4.4.19 SNPs.....	123
4.4.20 SABER.....	125
4.4.21 Maspin.....	126
4.4.22 Shotgun Sequencing.....	127
4.4.23 Freie fetale RNA.....	129
4.4.24 Ethische Überlegungen .....	130
5.1 Bezugsquellen der Materialien.....	132
5.2 Lösungen .....	133

5.3 Geräte und Software .....	133
5.4 Abkürzungen.....	134
Kapitel 6 - Danksagung .....	136
Kapitel 7- Lebenslauf .....	138
Kapitel 8- Literaturverzeichnis.....	139

## Zusammenfassung

Im Blut von Schwangeren findet sich bekanntermaßen nicht nur eigene freie DNA, sondern auch eine variable, aber deutlich geringere Menge freier DNA des Feten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Versuch eines standardisierten Nachweises dieser fetalen DNA und der Prüfung ihrer Eignung für pränatal-diagnostische Untersuchungen auf genetisch bedingte Besonderheiten.

Die Arbeit gliedert sich in zwei Teile:

A: Methodische Ansätze und Schwierigkeiten sowie Ergebnisse einer bereits im Jahre 2002, also zur „Frühzeit“ der quantitativen PCR durchgeführten experimentellen Untersuchungsreihe über Nachweismöglichkeiten und die Eignung fetaler DNA für eine weiterführende genetische Diagnostik.

B: Eine kritische Literaturübersicht über die noch immer nicht abgeschlossenen methodischen Entwicklungen und die inzwischen erreichte klinische Bedeutung dieses Themas seit dem Jahr 2002.

Zu A: Untersucht wurden 45 in der Universitäts-Frauenklinik Homburg asservierte Blutproben von Frauen, bei denen eine Amniozentese durchgeführt worden war, auf Y-chromosomale DNA-Sequenzen, die fetalen Ursprungs sein mussten. Es wurden Blutproben von 23 Frauen mit einer männlichen mit 20 Blutproben mit einer weiblichen Schwangerschaft verglichen. Zwei der Proben

stammten von Frauen, die einen Tag vor der Blutentnahme von einem männlichen Kind entbunden worden waren.

Alle Untersuchungen wurden mit einem LightCycler (Firma Roche) des Instituts für Humangenetik durchgeführt. Strichprobenweise erfolgten zusätzlich Untersuchungen mit einem TaqMan-Gerät (Firma ABI) des Instituts für Biochemie und Medizinische Molekularbiologie. Kontrollen mit der GAPDH-Sequenz zeigten, dass aus allen Proben erfolgreich DNA nachgewiesen wurde. Als Y-chromosomale Zielsequenzen dienten zum einen das sehr kurze SRY-Gen und die wesentlich längere, allerdings variable, repetitive DYS14-Sequenz.

Der Nachweis der SRY-Sequenz erwies sich als unbefriedigend (Sensitivität 0,13/ Spezifität 1), derjenige der DYS14-Sequenz war erfolgreich (Sensitivität 0,91/ Spezifität 0,9).

Die Ergebnisse zeigten, dass es in Zukunft möglich sein müsste, auch andere, Gen-spezifische, diagnostische Fragestellungen mit dieser Methode zu bearbeiten.

Zu B: Im zweiten Teil der Arbeit wird gezeigt, welche methodischen Entwicklungen in den vergangenen acht Jahren vollzogen wurden, aber auch, welche Schwierigkeiten noch immer bestehen, die mütterliche und die quantitativ sehr variable freie fetale DNA sicher zu unterscheiden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass es in absehbarer Zeit möglich werden wird, eine zunehmend größere Zahl pathologischer genetischer Veränderungen des Feten aus dem mütterlichen Blut sehr früh pränatal zu diagnostizieren. Die dabei entstehenden ethischen Probleme werden diskutiert.



# Abstract

A well known fact is that in the blood of pregnant women, not only their own free DNA can be found, but also free fetal DNA – although considerably less of the latter.

It was the aim of this thesis to attempt a standardized evaluation of the fetal DNA and the validation of its suitability for prenatal diagnostic testing for genetically caused disorders.

This thesis is divided into two sections:

A: The experimental study, dating from 2002, the early days of quantitative PCR, deals with the possibility of detection and suitability of fetal DNA for further genetic diagnostics, the methodical attempts, difficulties and results.

B: Section B is a critical summary of the literature on the still not yet completed methodical progress and the clinical relevance of this subject since 2002.

A: 45 blood samples of women who had an amniocentesis performed by the institute of Gynaecology and Obstetrics of the University hospital in Homburg were examined for Y-chromosomal DNA sequences, which can only be of fetal origin.

23 blood samples of women who were pregnant with a male fetus were compared to 20 blood samples of women who were pregnant with a female fetus. Two samples were taken from women who had given birth to a boy the day before. All experiments were conducted using the institute of human

genetics' LightCycler (Roche). Some samples were also analysed using the institute of biochemistry and medical molecular biology's TaqMan (ABI). Double checks using GAPDH sequence showed that DNA was successfully extracted from all samples. The very short SRY gene and the larger, but variable length repetitive DYS14-sequence were used as Y-chromosomal target sequences.

Detection of the SRY-sequence proved not to be satisfactory (sensitivity 0,13/ specificity 1), but detection of DYS14 sequence was successful (sensitivity 0,91/ specificity 0,9).

These results show that it should be possible in future to deal with other gene specific diagnostic problems using this method.

B: The second part of this thesis shows which methodical developments were achieved during the last eight years, and the difficulties still exist to differentiate between maternal and quantitatively very variable free fetal DNA.

It is reasonable to assume that in the near future it will be possible to diagnose an increasing number of fetal genetic variances from maternal blood in a very early stage of the pregnancy. In this section the thesis also addresses the ethical problems resulting from this anticipated development.

# Kapitel 1 - Einleitung

## *1.1 Pränataldiagnostik*

Nachdem in den letzten einhundert Jahren durch die verbesserten sozio-ökonomischen Bedingungen die Mortalität während Schwangerschaft und Geburt, sowohl der Mutter als auch des Neugeborenen, in den Industrieländern sehr stark zurückging, begann etwa zeitgleich die Entwicklung der Pränataldiagnostik. Die ersten Grundsteine zur Entwicklung der Pränataldiagnostik wurden bereits im 19. Jahrhundert gelegt. Damals wurden die ersten Versuche zur Amnionpunktion durchgeführt, wobei die frühen Versuche der Therapie des Polyhydramnions dienten.

Im 20. Jahrhundert erlebte die vorgeburtliche Diagnostik nicht zuletzt aufgrund der großen technischen Fortschritte eine enorme Weiterentwicklung. Dazu zählen neben der Entwicklung der Ultraschalldiagnostik auch die Fortschritte auf dem Gebiet der Zellzüchtung aus Fruchtwasser oder Chorion. Während die nicht-invasive Ultraschalluntersuchung des Feten, die Mitte des 20. Jahrhunderts in die medizinische Diagnostik eingeführt wurde, inzwischen bei jeder Schwangerschaft in den Routinevorsorgeuntersuchungen von großer Bedeutung ist, spielt die invasive Pränataldiagnostik heute vor Allem bei Risikoschwangerschaften eine große Rolle. Da die Zahl der Spätgebärenden über 35 Jahren und damit das Risiko für mögliche Chromosomenanomalien steigt, wird die Pränataldiagnostik auch in Zukunft immer wichtiger zur Beurteilung der Schwangerschaft und des Gesundheitszustandes des ungeborenen Kindes. Gerade bei Frauen über 35 Jahren steigt das Risiko einer

kindlichen numerischen Chromosomenaberration stark an. Ab dem 45. Lebensjahr kann das Alter des Vaters ebenfalls einen Risikofaktor, allerdings überwiegend für autosomal-dominante Fehlbildungen, darstellen. In der Abbildung 1.1 wird die zu erwartende mütterliche altersspezifische Rate an Chromosomenanomalien (Trisomie 21) pro 1000 Schwangerschaften zum Zeitpunkt der Amniozentese dargestellt. Die für das Diagramm zugrunde liegenden Zahlen wurden aus [Diedrich, 2000] entnommen.

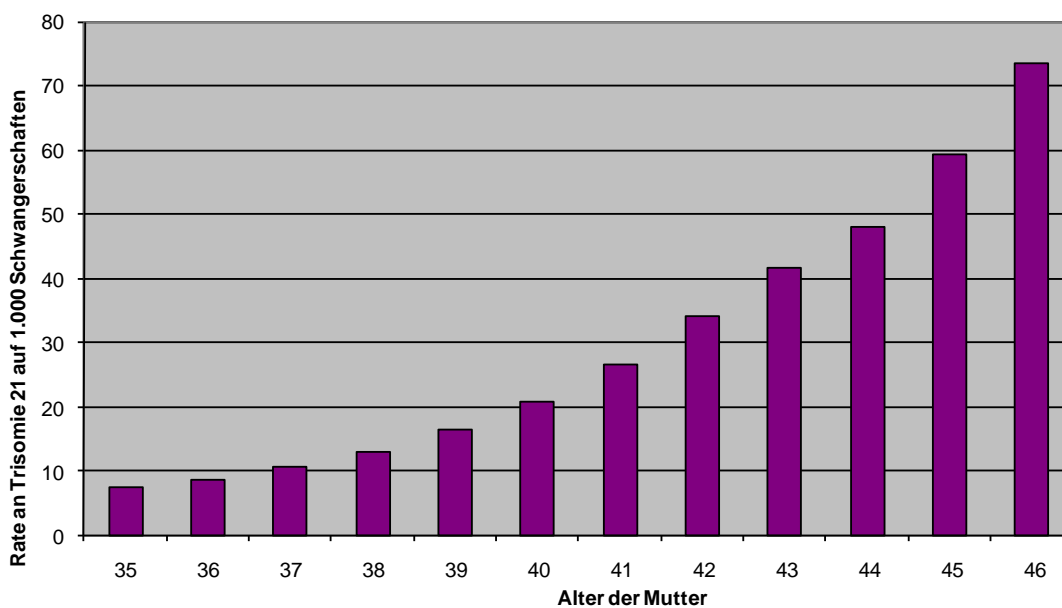


Abbildung 1.1: Trisomie-21-Rate

Neben den medizinischen Indikationen zu einer invasiven Pränataldiagnostik bewegt auch der Wunsch vieler werdender Mütter, „ein gesundes Kind“ zur Welt zu bringen, diese zur Durchführung eines invasiven Eingriffs während ihrer Schwangerschaft - trotz aller damit verbundenen Risiken und der nur begrenzten diagnostischen Aussagefähigkeit. Ein weiterer Aspekt der Zunahme vorgeburtlicher Untersuchungen ist eine möglichst frühzeitig einsetzende Behandlung des ungeborenen, potentiellen Patienten dar. Hinzu kommt, dass bei

einigen erblichen Erkrankungen eine frühe Diagnosestellung die Prognose verbessern kann. Die heute üblichen Untersuchungen zur genetischen vorgeburtlichen Diagnostik sind hierbei die Amniozentese und die Chorionzottenbiopsie. Mit der steigenden Anzahl der Risikoschwangerschaften gewinnt auch eine nicht invasive Pränataldiagnostik immer mehr an Bedeutung. Neben den Fortschritten in der Ultraschalldiagnostik stellt der physiologische Übertritt fetaler Zellen und fetaler DNA in den mütterlichen Kreislauf eine Möglichkeit einer für Mutter und Kind schonenden Diagnostik dar.

## ***1.2 Invasive Pränataldiagnostik***

### **1.2.1 Amniozentese**

1966 gelang es erstmals mittels Amniozentese und Anzüchtung der Amnionzellen einen fetalen Karyotyp zu bestimmen [Steele, Berg, 1966]. 1968 wurde mit dieser Methode erstmals pränatal ein Down- Syndrom diagnostiziert [Valenti et al., 1968]. Neben der Diagnostik von numerischen und grobstrukturellen Chromosomenanomalien kann heutzutage mit Hilfe der aus dem Fruchtwasser gewonnenen Zellen auch eine Diagnostik nicht chromosomaler, genetisch bedingter Erkrankungen wie zum Beispiel cystische Fibrose, Muskeldystrophie Duchenne etc. erfolgen. Das Amnion entsteht etwa am 8. Entwicklungstag, also im Entwicklungsstadium der zweiblättrigen Keimscheibe, zwischen dem Ektoderm und dem Trophoblast. Als innerste der drei Eihäute umhüllt das Amnion den Embryo während der weiteren Entwicklung. Die Amnionflüssigkeit selbst wird von den Amnionzellen sezerniert, so dass sich die Flüssigkeit in der Amnionhöhle sammelt. In dem

Fruchtwasser sind Ektodermzellen des Amnions, aber auch des Embryos, nachweisbar.

Die klassische Amniozentese wird im Allgemeinen zwischen der 15. und 18. SSW durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt sowohl eine ausreichende Fruchtwassermenge vorhanden ist, als auch bereits genügend fetale Zellen im Fruchtwasser sind, um eine erfolgreiche Kultur anlegen zu können. Unter Ultraschallkontrolle wird der Uterus transabdominal punktiert und etwa 15 ml Fruchtwasser entnommen. Das Fruchtwasser enthält neben fetalen Zellen auch fetale Stoffwechselprodukte, so dass die gewonnene Amnionflüssigkeit, sowohl für eine Chromosomenanalyse als auch für eine Untersuchung auf eine pathologische Veränderung von Stoffwechselprodukten wie z.B. AFP verwendet werden kann. Da für die Chromosomenanalyse zunächst eine Zellkultur angelegt werden muss, können die Ergebnisse der Chromosomenanalyse der Schwangeren erst etwa zwei Wochen später mitgeteilt werden.

Neben der klassischen Amniozentese gibt es die Möglichkeit einer Fruchtwasserentnahme in der 12. bis 14. SSW. Diese sogenannte frühe Amniozentese wurde nach der erfolgreichen Einführung der, im Vergleich zur klassischen Amniozentese wesentlich früher durchführbaren, Chorionzottenbiopsie eingeführt. Die Anzahl der Zellen ist hierbei allerdings niedriger als bei der Fruchtwasserentnahme zu einem späteren Zeitpunkt. Außerdem kann es zu diesem Zeitpunkt, aufgrund der noch sehr weichen anatomischen Verhältnisse während den ersten drei Monaten der Schwangerschaft, zu einem Verschieben der Amnionmembran kommen [Diedrich, 2000]. Neben diesen Nachteilen wurde bei Anwendung dieser Methode eine Häufung fetaler Fehlbildungen, wie

beispielsweise Klumpfüße, festgestellt, so dass die frühe Amniozentese heute kaum mehr durchgeführt wird.

Auch bei der Amniozentese in oder nach der 16. SSW, besteht die Gefahr von Komplikationen. Zu diesen Komplikationen zählen leichte abdominelle Schmerzen, Fruchtwasserabgang und vorzeitige Wehen. Die Spontanabortrate beträgt etwa 1% [Tercanli, Holzgreve, 2000]. Des Weiteren kann es zu Fruchtwasserverlusten und in seltenen Fällen zu intrauterinen Infektionen kommen. Vereinzelt wurden Punktionsverletzungen des Feten beschrieben, wobei leichtere Verletzungen in der Regel narbenlos verheilen [Miny et al., 1987]. Bei RhD negativen Frauen muss außerdem eine Anti-D-Prophylaxe durchgeführt werden, da es während der Punktion zu einem Übertritt potentiell RhD positiver fetaler Erythrozyten kommen kann, als dessen Folge eine Aktivierung des mütterlichen Immunsystems gegen fetale Erythrozyten möglich ist. Dies kann im Verlauf der Schwangerschaft zu einer schweren hämolytischen Erkrankung des Feten, dem Morbus Haemolyticum Neonatorum, führen.

### **1.2.2 Chorionzottenbiopsie**

Da es bei der Amniozentese aufgrund der erst späten Diagnosestellung und damit relativ langen Dauer der Schwangerschaft, bei einem medizinisch indizierten Abbruch, zu schweren psychologischen Folgen für die betroffene Frau und Komplikationen während des Schwangerschaftsabbruchs kommen kann, wurde schon bald nach der Einführung der Amniozentese in die vorgeburtliche Diagnostik nach zeitlich früher durchführbaren Möglichkeiten der pränatalen Diagnostik gesucht.

Bereits 1968 wurde in Skandinavien eine pränatale Diagnostik mittels Chorionzottenbiopsie durchgeführt [Mohr et al., 1968]. 1981 gelang die Kultur von Fibroblasten aus Chorionzotten [Niazi et al., 1981]. Mitte der 80er Jahre konnte sich diese Methode der Pränataldiagnostik durch Verbesserung der Ultraschalltechnik weiter durchsetzen. Außerdem wurde es möglich, auch ohne Kultur der Chorionzotten mittels DNA-Analyse bestimmte genetisch bedingte Erkrankungen zu diagnostizieren. Bis vor 20 Jahren wurde die Entnahme der Chorionzotten hauptsächlich transzervical durchgeführt. Heute ist der transabdominale Eingriff üblich. Bei der Chorionzottenbiopsie, CVS (chorionic villi sampling), wird mit Hilfe eines Katheters unter Ultraschallkontrolle eine Biopsie des Chorion frondosum der Plazenta entnommen. Die Entnahme der Chorionzotten kann bereits im 1. Trimenon der Schwangerschaft durchgeführt werden. Dies führt dazu, dass verlässliche Ergebnisse der Untersuchung bereits vor der 12. SSW vorliegen können. Für eine molekulargenetische Untersuchung müssen 20 bis 30mg Chorionzotten gewonnen werden. Um eine Chromosomenanalyse durchführen zu können, müssen nur etwa 5 bis 10mg aus dem Choriongewebe gewonnen werden. Die Chorionzotten sind am Ende des 1. Trimenons aus Synzytiotrophoblasten, Zytotrophoblasten und extra-embryonalem kindlichem Bindegewebe aufgebaut. Die Zytotrophoblasten bilden eine einkernige Zellschicht mit einer hohen mitotischen Aktivität, so dass diese Zellen gut für eine Pränataldiagnostik geeignet sind. Nach einer kurzen Zellkultur können die Metaphasen der Zellkerne beurteilt werden. Auch eine direkte Chromosomenpräparation ist möglich. Die beiden anderen Zellarten, die Synzytiotrophoblasten und das Mesenchym, zeigen keine hohe spontane mitotische Aktivität. Während Synzytiotrophoblasten für eine diagnostische Auswertung ungeeignet sind, können die mesenchymalen Zellen stimuliert werden, so dass diese Zellen invitro proliferieren. Nach etwa zwei bis drei



Wochen können die mit Hilfe der Langzeitkultur gewonnenen Zellen analysiert werden.

Ein Nachteil dieser Methode ist, dass sich in etwa 1,5% der Fälle zytogenetische Unterschiede zwischen dem chromosomalen Befund der Chorionzottenbiopsie und dem tatsächlichen fetalen Chromosomensatz finden [Hahnemann et al., 1997]. Meist handelt es sich hierbei um eine Mosaik-Trisomie der Zytotrophoblasten der Plazenta bei einem normalen fetalen Chromosomensatz [Kalousek et al., 1983]. Dieser diskrepante Befund wird als auf die Plazenta beschränkte Mosaikbildung, kurz CPM, bezeichnet. Diese falsch pathologischen Ergebnisse erfordern eine genaue genetische Beratung, mit der möglichen Konsequenz einer zusätzlichen Amniozentese oder einer Untersuchung des fetalen Blutes. In seltenen Fällen kann es umgekehrt auch zu falsch negativen Ergebnissen kommen.

Auch im 2. und 3. Trimenon ist eine Punktion der Plazenta möglich. Obwohl die Mitoserate gegen Ende der Schwangerschaft abnimmt, ist selbst im 3. Trimenon eine pränatale Chromosomenanalyse möglich. Auch in diesem fortgeschrittenen Stadium der Schwangerschaft sind noch Chromosomendirektpräparationen durchführbar. Das Abortrisiko liegt bei der Chorionzottenbiopsie, höher als bei der Amniozentese, bei etwa 1 bis 2%. Daher sollte die Indikation für diesen Eingriff streng gestellt werden. Eine Chorionzottenbiopsie wird heute hauptsächlich bei familiär bekannten Chromosomenanomalien durchgeführt.

Da es bei einer Chorionzottenbiopsie vor der 10. SSW zu einer geringfügigen Risikoerhöhung für die Entstehung von Extremitätendefekten kommt, sollte diese Methode erst ab der 10. SSW angewandt werden. Bei einer nicht

unerheblichen Zahl von Schwangeren kommt es nach der Chorionzottenbiopsie zu vaginalen Blutungen, zur Ausbildung eines intrauterinen Hämatoms oder zu intrauterinen Infektionen. Es wurden außerdem im weiteren Verlauf der Schwangerschaft auftretende Spätkomplikationen wie vorzeitiger Blasensprung, Frühgeburtlichkeit oder vorzeitige Entbindungen vor der 37. SSW beschrieben [Branbati, Simoni, 1987].

### ***1.3 Nicht-invasive Pränataldiagnostik***

#### **1.3.1 Ultraschall**

1958 wurde erstmals eine zweidimensionale Sonographie bei schwangeren Frauen durchgeführt [Donald et al., 1958]. Durch die technischen Fortschritte, wie Verbesserung der Schallkopf- und Bildqualität, gehört die Ultraschalldiagnostik heute zu den unerlässlichen Mitteln zur Überwachung einer Schwangerschaft.

In Deutschland wurden 1979 drei Ultraschallscreenings während der Schwangerschaft in die Mutterschaftsrichtlinien aufgenommen. Mit Hilfe des Ultraschalls besteht die Möglichkeit frühzeitig anatomische Veränderungen des Embryos bzw. des Feten zu erkennen und therapeutische Konsequenzen daraus zu ziehen. Auch lassen sich Hinweiszeichen auf chromosomale Anomalien im Ultraschall darstellen. So kann die Messung der Nackentransparenz ein diagnostischer Hinweis auf eine Trisomie 21, Trisomie 13, Trisomie 18 und auf das Ullrich-Turner-Syndrom sein. Das in dieser Phase der Schwangerschaft physiologisch vorliegende Ödem zwischen Haut und zervikalem Weichteilgewebe wird hierbei gemessen. In letzter Zeit spielt auch die

Ausmessung der Länge des Os nasi, vor allem bei der Diagnostik des Down-Syndroms, zunehmend eine Rolle. Diese Messungen sind besonders bei der sonographischen Untersuchung im ersten Trimenon von Bedeutung.

Im Gegensatz zur invasiven Pränataldiagnostik wurden bisher bei der Ultraschalldiagnostik keine Risiken für Mutter und Kind nachgewiesen. Dadurch ist diese Art der Vorsorgeuntersuchung während der gesamten Schwangerschaft beliebig oft durchführ- und wiederholbar. Allerdings kann eine alleinige Ultraschalluntersuchung Chromosomenanomalien niemals ganz ausschließen, beziehungsweise beweisen, so dass im Zweifelsfall eine invasive Maßnahme zur Gewinnung fetaler Zellen indiziert ist.

### **1.3.2 Triple-Test**

Da die Ultraschalldiagnostik allein sich als ungeeignet für eine genauere Abschätzung des Gesundheitszustandes des Kindes erwies, die Nachfrage nach risikoarmer Diagnostik des Feten aber stieg, wurden „Checklisten“ entwickelt, anhand derer verschiedene Merkmale des Feten oder des fetalen Stoffwechsels beurteilt wurden. So wurde seit den 80er Jahren zunehmend zur Beurteilung von Risikoschwangerschaften der sogenannte Triple-Test durchgeführt. Hierbei handelte es sich nicht um eine Pränataldiagnostik im eigentlichen Sinne, sondern vielmehr um eine individuelle Risikoabschätzung. Der Triple-Test beinhaltet eine Bestimmung der Östriol-, AFP- und  $\beta$ -HCG-Werte aus dem mütterlichen Serum in der 16. SSW. Anhand der Konstellation dieser Werte zueinander, können Risikoabschätzungen für einige wenige Erkrankungen abgegeben werden. Zu diesen Erkrankungen zählen Trisomie 21, Trisomie 18, Triploidien, das Ullrich-Turner-Syndrom sowie Bauchwand- und Neuralrohrdefekte. Da es bei

dieser Risikoabschätzung relativ häufig zu falsch positiven Ergebnissen kam, war dieser Test für eine generelle Screening-Untersuchung nicht geeignet. Daher wird der Triple-Test allein heute nur noch selten durchgeführt.

### **1.3.3 Kombiniertes 1. Trimenon-Test**

Eine Weiterentwicklung des Triple-Tests ist das sogenannte Ersttrimesterscreening. Dieses Screening beruht zum einen auf der Bestimmung des schwangerschaftsassozierten Plasmaproteins A, kurz PAPP-A, im Serum zwischen der 10. und 16. SSW. Das von der Plazenta gebildete PAPP-A liegt bei chromosomalen Aberrationen in erniedrigter Konzentration vor. Zum anderen wird, wie auch beim Triple-Test, das freie  $\beta$ -HCG im Serum bestimmt. Als dritter Faktor dieses Tests kommt noch die Ultraschalldiagnostik hinzu. Zwischen der 10. und 14. SSW erfolgt eine sonographische Messung der Nackentransparenz (NT). Bei Chromosomenaberrationen zeigte sich in fast 80% der Fälle eine Zunahme der Dicke der nuchalen Transparenz [Nicolaidis et al., 1994].

## ***1.4 Experimentelle Ansätze der nicht-invasiven Pränataldiagnostik***

Obwohl es in jüngster Zeit zu einer erheblichen Verbesserung der Möglichkeiten nichtinvasiver Pränataldiagnostik gekommen ist, geben sowohl die Ultraschalldiagnostik als auch der Triple-Test lediglich Hinweise auf eine möglicherweise vorliegende Chromosomenanomalie. Trotz dieser mittlerweile etablierten nicht-invasiven Methoden muss, um letztendlich Sicherheit bezüglich

chromosomaler Aberrationen zu erhalten, noch auf die invasive Pränataldiagnostik zurückgegriffen werden.

Nicht zuletzt aufgrund der Entdeckung fetaler Zellen im mütterlichen Blutkreislauf Ende des 19. Jahrhunderts [Schmorl, 1893], wurden die teilweise auf einen Übertritt fetaler Zellen vor allem in den letzten Jahren intensiv weiterverfolgt. Hierbei konzentriert sich die heutige Forschung sowohl auf den Nachweis fetaler Zellen als auch fetaler DNA in mütterlichem Blut. Sollte es gelingen durch eine einfache Blutentnahme bei der Mutter Hinweise auf den fetalen Karyotyp zu erhalten, so würde dies die Pränataldiagnostik revolutionieren, da auf einen invasiven Eingriff in Zukunft verzichtet werden könnte. Noch steht man sicherlich am Anfang, so dass sich zunächst erst einmal die Forschung auf den Nachweis von spezifischer fetaler DNA, also z. B. dem Nachweis männlicher fetaler DNA oder RhD-positiver Feten bei RhD-negativen Müttern, konzentriert. Inwiefern eine weitergehende Diagnostik mit Hilfe des Nachweises fetaler DNA möglich ist, wird sich sicher erst in den nächsten Jahren oder Jahrzehnten zeigen.

Im folgenden Teil wird versucht einen kurzen Überblick über die zurzeit bestehenden Chancen, aber auch die Probleme, des Nachweises fetaler Zellen und fetaler DNA aus mütterlichem Blut zu geben.

#### **1.4.1 Fetale Zellen in mütterlichem Blut**

Bereits 1893 wurden die ersten Hinweise auf einen Übertritt fetaler Zellen in den maternalen Blutkreislauf entdeckt. Der deutsche Pathologe Schmorl fand zu dieser Zeit erstmals Trophoblasten in den Lungen von Patientinnen, die an den

Folgen einer Eklampsie verstorben waren [Schmorl, 1893]. Aber erst ein Jahrhundert später gab es aufgrund dieses Befundes Versuche aus dem Blut schwangerer Frauen Zellen für eine Pränataldiagnostik zu gewinnen. 1969 wurde schließlich ein weiterer Zelltyp - fetale Lymphozyten - im mütterlichen Blutkreislauf entdeckt [Walknowska et al., 1969]. Ein Hauptproblem stellte jedoch die Anreicherung der geringen Menge fetaler Zellen dar. Etwa 20 Jahre später folgte die erste Beschreibung von fetalen Erythroblasten im Blut der Mutter [Bianchi et al., 1990]. Vor allem bei aneuploiden Feten konnte ein erhöhter Übertritt dieser fetalen Zellen in das mütterliche Blut nachgewiesen werden [Bianchi et al., 1997]. Diese drei verschiedenen Zellarten stellen somit die Grundlage einer nicht-invasiven vorgeburtlichen Diagnostik dar, mit deren Hilfe genaue Aussagen über den Genotyp des Feten getroffen werden können.

Allerdings sind fetale Zellen im mütterlichen Blutkreislauf sehr selten, so dass sich als eines der Hauptprobleme die Anreicherung und Erkennung fetaler Zellen darstellte. Um die Abtrennung der kindlichen von den mütterlichen Zellen zu verbessern, wurden bis Anfang der 90er Jahre intensiv nach effektiven Methoden geforscht. Zunächst standen als Auftrennungsmöglichkeiten der Zellen die Fluoreszenzaktivierte Zellauftrennung (FACS), die magnetisch-aktivierte Zellauftrennung (MACS) sowie die immunomagnetische Auftrennung zur Verfügung. Vor gut 10 Jahren wurde von Bianchi die Differenzierung maternaler Zellen von fetalen Zellen mit Hilfe einer zusätzlichen Antikörpermarkierung beschrieben. Hierfür stehen beispielhaft zwei unterschiedliche Methoden zur Verfügung: Zum einen die Verminderung mütterlicher Zellen durch monoklonale Antikörper gegen das Leukozyten-Antigen CD45, zum anderen die Auslese fetaler Zellen durch den Transferrin Rezeptor-Antikörper CD71.

Allerdings kam es zwischen den eingesetzten Methoden zu erheblichen Unterschieden bei dem Nachweis der Zellen. Die FACS Auftrennung mit CD71 Antikörpermarkierung erschien hierbei als die hoffnungsvollste Art der Zellauslese [Bianchi et al., 1996a]. Mit Hilfe der FACS können außerdem reinere Zellpopulationen durch den gleichzeitigen Nachweis eines Zellkerns und von fetalem Hämoglobin erhalten werden [Bianchi et al., 1993] [Zheng et al., 1995]. Im Gegensatz dazu ist z.B. bei der MACS die Zellauftrennung nur mittels eines einzigen Kriteriums möglich, was diese Methode auf der einen Seite zwar unsicherer macht, auf der anderen Seite ist sie jedoch wesentlich einfacher durchführbar und erspart somit sowohl Zeit als auch Kosten.

Natürlich wurde in der Zwischenzeit nach weiteren Möglichkeiten geforscht, mit denen fetale Zellen markiert werden können, um eine bessere Detektion dieser Zellen zu ermöglichen. Als Beispiel sei hier der Nachweis von Erythropoetin-Rezeptoren auf fetalen Zellen genannt. Allerdings lässt auch diese Methode bezüglich der Sensitivität, wie die bereits oben besprochenen Methoden, zu wünschen übrig [Valerio et al., 1997].

Abgesehen von der geringen Menge an fetalen Zellen im mütterlichen Blut, bestehen auch hinsichtlich der Wahl der unterschiedlichen kindlichen Zelltypen Probleme. Für die nicht- invasive Pränataldiagnostik stehen also drei Zellarten potentiell zur Verfügung: Trophoblasten, Leukozyten und Erythroblasten. Die diagnostischen Vor- und Nachteile der einzelnen Zelltypen werden im Folgenden erläutert.

## **Trophoblasten**

Wie bereits oben angeführt, wurden Trophoblasten erstmals 1893 im mütterlichen Blutkreislauf nachgewiesen. Ein Problem ist, dass Trophoblasten nur selten im peripheren Blutkreislauf gefunden werden, da sie aufgrund ihrer Größe in der Lunge ausgefiltert werden [Attwood et al., 1960]. Zunächst wurde daher versucht, Trophoblasten mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen Trophoblastenantigene zu finden [Mueller et al., 1990] [Hawes et al., 1994] [Durrant et al., 1996], und mit Hilfe einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, einer FISH-Analyse, darzustellen [Cacheux et al., 1992]. Mit Hilfe dieser Methode gelang es bei Frauen, die mit einem männlichen Fetus schwanger waren, das fetale Geschlecht korrekt zu bestimmen [Guetta et al., 2004].

Dennoch erwiesen sich diese Zellen für eine weitergehende zuverlässige Pränataldiagnostik als ungeeignet, da die Trophoblastenzellen oft mehrkernig sind und somit falsche Diagnosestellungen möglich sind [Henderson et al., 1997] [Goldberg et al., 1997].

## **Leukozyten**

In den 60er Jahren wurden erstmals fetale Lymphozyten im Blut schwangerer Frauen detektiert [Walknowska et al., 1969]. 10 Jahre später wurde es möglich, diese Zellen ausreichend für eine Pränataldiagnostik anzureichern [Herzenberg et al., 1979]. Mittels FISH-Analyse konnte der fetale Chromosomensatz dargestellt werden. Leider erwiesen sich Lymphozyten ebenfalls als ungeeignet für eine zuverlässige Pränataldiagnostik. Der Nachteil dieser Zellen für den Gebrauch in der nicht invasiven pränatalen Diagnostik liegt in ihrer



Langlebigkeit. So wurden bei einigen Schwangerschaften mit einem weiblichen Feten männliche Zellen gefunden, die aus einer früheren Schwangerschaft stammten [Schindler et al., 1972] [Schröder et al., 1972] [Grosset et al., 1974]. Sogar noch 27 Jahre nach einer Schwangerschaft konnten fetale Leukozyten im Blut nachgewiesen werden [Bianchi et al., 1996b]. Diese Absiedlung teilungsfähiger unreifer Vorstufen im mütterlichen Knochenmark, stellt daher ein Problem für die Verwendung dieser Zellreihe im Rahmen der Pränataldiagnostik dar.

### **Erythroblasten**

Da der Erythroblast sowohl einkernig als auch kurzlebig ist und außerdem bei gesunden Erwachsenen im Blut nicht vorkommt, wurde er bald zum besonderen Interesse. Da Erythroblasten, wie auch alle anderen fetalen Zellen, nicht häufig im mütterlichen Blut gefunden werden, stellte die ausreichende Isolierung der fetalen Erythroblasten eines der größten Probleme dar. Dies war sicher einer der Gründe, weshalb sich die Ergebnisse der Blutuntersuchungen, als nicht besonders zuverlässig zeigten. Falls eine Kultur mit Erythroblasten gelang, so schwankten die Ergebnisse zwischen verlässlichen Resultaten [Kang et al., 1999] und nicht zu diagnostizierender fetalen Karyotyp [Chen et al., 1998]. Des weiteren kam auch FISH als Diagnostikverfahren zur Anwendung. Jedoch gestaltete sich der Nachweis der Zellen mittels FISH als sehr zeitaufwendig, so dass für eine effiziente diagnostische Nutzung der so markierten Erythroblasten eine Automatisierung der Auswertung unbedingte Voraussetzung für weitere Forschungen in diesem Bereich ist [Hahn et al., 1998]. Sowohl die schwierige und sehr aufwendige Isolierung der Erythroblasten, als auch die unzuverlässigen Ergebnissen waren Gründe, weshalb sich der Nachweis von fetaler Zellen aus

dem mütterlichen Blut als ungeeignet für eine aussagekräftige, nicht invasive Pränataldiagnostik erwies [Kolvraa et al., 2004].

Bisher wurde keine geeignete Methode gefunden, um fetale Erythroblasten ausreichend anzureichern, um zuverlässigere Ergebnisse bei der Untersuchung zu erreichen.

#### **1.4.2 Fetale DNA in mütterlichem Blut**

Nachdem sich der Versuch einer nicht-invasiven Pränataldiagnostik mittels fetaler Zellen aus dem mütterlichen Blut als sehr zeitaufwendig und außerdem nicht sehr zuverlässig erwiesen hat, ging man schon bald dazu über, nach neuen Möglichkeiten für eine nicht-invasive vorgeburtliche Diagnostik zu suchen.

Da man freie Tumor-DNA sowohl im Plasma als auch im Serum von Krebspatienten gefunden hatte, gab dies den Anstoß, nach freier fetaler DNA in mütterlichem Blut zu forschen. [Lo et al., 1997]. Hiermit erzielte man im Vergleich zur Diagnostik mit fetalen Zellen wesentlich bessere Resultate. Im Vergleich zu Vollblutproben erwiesen sich vor allem Serum- und Plasmaproben bezüglich des qualitativen Nachweises freier fetaler DNA als erfolgversprechend [Lo et al., 1997].

Die quantitative Analyse der fetalen DNA ergab bereits in der Frühschwangerschaft eine hohe Konzentration freier fetaler DNA im mütterlichen Plasma. Im Verlauf der Schwangerschaft steigerte sich der Gehalt an fetaler DNA sogar noch beträchtlich. Bis etwa zur 25. SSW nahm er noch zu, danach nicht mehr. Danach konnte jedoch keine weitere Zunahme der

kindlichen DNA im Blut der Mutter festgestellt werden [Zhong et al., 2000]. Der Anteil Zell-freier fetaler DNA an der Gesamtmenge der Plasma-DNA wird auf etwa 3-6% geschätzt [Chiu et al., 2002]. Ab einer totalen DNA-Menge von etwa 7,8 pg ist es möglich fetale DNA zu finden [Lo et al., 1998].

Um die DNA nachzuweisen, wurde statt der herkömmlichen Nachweismethode, der klassischen PCR, eine Real-Time PCR (qRT-PCR) angewandt. Hierdurch konnte vor allem das Kontaminationsrisiko gesenkt werden. Aber auch der Zeitaufwand lässt sich durch die qRT-PCR beträchtlich verringern [Lo et al., 1998]. Um eine Verbesserung sowohl der Sensitivität, als auch der Spezifität bei der Detektion freier fetaler DNA zu erreichen, wurden zusätzlich zu den -spezifisch an die fetale DNA bindenden - Primern Sonden eingesetzt. Diese werden zu dem PCR-Master-Mix hinzugegeben und binden an spezifische DNA-Sequenzen, die zwischen den Sequenzen, an die die Primer binden, liegen. Mit dieser Methode versucht man die falsch-positiven Ergebnisse, die eventuell durch Kontamination zustande kommen können, zu reduzieren [Costa et al., 2001].

Neben den Versuchen, freie fetale DNA in mütterlichem Blut nachzuweisen, wurde auch versucht fetale DNA im Urin der Schwangeren nachzuweisen. Auch dies erwies sich als prinzipiell möglich. Allerdings stellte sich die Sensitivität dieser Untersuchung als weitaus geringer als die Sensitivität der Untersuchungen des Plasmas auf fetale DNA dar [Al-Yatama et al., 2001].

Außer dem Gestationsalter scheint es noch weitere Faktoren zu geben, die die fetale DNA-Konzentration beeinflussen können. So konnte eine erhöhte Konzentration fetaler DNA beispielsweise bei Frauen mit aneuploiden Feten

nachgewiesen werden [Lo et al., 1999b] [Zhong et al., 2000]. Neben fetalen Erkrankungen können außerdem auch mütterliche Erkrankungen den Übertritt fetaler DNA in den maternalen Blutkreislauf bewirken. So wurden zum Beispiel auch erhöhte fetale DNA-Konzentrationen bei Präeklampsie-Patientinnen gefunden [Lo et al., 1999a].

Das Auffinden fetaler Merkmale, die bei der Mutter nicht nachzuweisen sind, ist Gegenstand der Forschung. Im Erfolgsfall könnte man Frauen, die Konduktorinnen einer X-chromosomal rezessiven Erkrankung sind, aber auch Rh-negativen Frauen, einen invasiven Eingriff in Zukunft ersparen. Zunächst wurde versucht, bei schwangeren Frauen mit männlichem Fetus, spezifische Sequenzen des Y-Chromosoms zu ermitteln. Als Material wurde in einer der ersten Studien sowohl Plasma, als auch Serum der Schwangeren verwendet. Bei der Untersuchung des Plasmas wurden etwas bessere Ergebnisse erzielt als bei der Analyse des Serums. Allerdings konnten in über 10% der Fälle weder in Plasma noch im Serum männliche DNA gefunden werden. Dieses Ergebnis wurde auf die zu frühe Entnahme dieser Blutproben vor der 15. SSW zurückgeführt. [Lo et al., 1997]. Im Serum konnten größere Mengen an fetale DNA nachgewiesen werden als im Plasma [Lo et al., 1998].

Da bis in die Mitte der 90er Jahre der Nachweis fetaler Zellen als der verheißungsvollste Ansatz in der nicht-invasiven Pränataldiagnostik galt, wurde ein Vergleich zwischen den beiden Methoden vorgenommen. Das Ziel dabei war es, die Blutproben von Frauen, die mit einem männlichen Feten schwanger waren, korrekt zu identifizieren. Bei der Analyse der mütterlichen Blutproben konnte bei annähernd 90% der untersuchten Proben ein positiver Nachweis freier fetaler DNA erbracht werden. Auf fetale Zellen hin untersucht, konnten

bei diesen Proben aber in nur knapp 16% der untersuchten Fälle, die Proben korrekt detektiert werden [Lo et al., 1997]. Die DNA-Analyse erwies sich also als deutlich überlegen. Neben der Detektion des Y-Chromosoms wurde später der Versuch unternommen, den fetalen RhD-Status bei RhD-negativen Schwangeren zu diagnostizieren. Es zeigte sich hier, dass bei RhD-negativen Frauen mit RhD-positiven Fetus während des ersten Trimenons noch falsch negative Ergebnisse auftraten, wohingegen im 2. und 3. Trimenon die Ergebnisse der Blutuntersuchung mit dem Genotyp des Feten immer übereinstimmend waren [Lo et al., 1998]. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in weiteren Studien gefunden. Im Falle des RhD Nachweises bestand eine Übereinstimmung der PCR-Ergebnisse mit den Resultaten der invasiven RhD-Diagnostik [Faas et al., 1998]. Es zeigte sich, dass auch das Erkennen mehrerer fetaler Gensequenzen zeitgleich ohne Verminderung der Sensitivität möglich ist [Kang et al., 1999] [Zhong et al., 2001].

Da sich die Langlebigkeit fetaler Zellen im mütterlichen Organismus, vor allem bei den fetalen Leukozyten, als Problem herausgestellt hatte, wurden schon bald nach den ersten Analysen der fetalen DNA, Untersuchungen über die Möglichkeit eines auch noch postnatalen Nachweises freier fetaler DNA im mütterlichem Blut vorgenommen. Es wurden hierbei sehr unterschiedliche Ergebnisse gefunden. Allerdings fand sich bei den meisten diesbezüglichen Untersuchungen, bereits einen Tag nach der Geburt keine fetale DNA mehr im Blut der Mutter [Lo et al., 1999a], so dass diese Art der Diagnostik auch bei einer erneuten Schwangerschaft angewendet werden kann [Faas et al., 1998] [Costa et al., 2001] [Smid et al., 2003]. Als mittlere Halbwertszeit für zirkulierende freie fetale DNA wurde eine Zeit von 16,3 Minuten, bei einer Zeitspanne von 4 bis 30 Minuten, angegeben [Costa et al., 2001].

Andererseits wurde in einer der Studien fetale DNA in mütterlichem Plasma, in einigen Fällen sogar noch Jahre nach der Schwangerschaft nachgewiesen. Vor allem bei Frauen, die zwei oder mehr Schwangerschaften mit einem männlichen Feten ausgetragen hatten, konnten noch lange Y-spezifische DNA-Sequenzen nachgewiesen werden. In einem Fall wurde sogar von einem Nachweis Y-spezifischer DNA 60 Jahre nach der Geburt eines Sohnes berichtet [Invernizzi et al., 2002]. Diese gravierenden Unterschiede in den Untersuchungen bezüglich der Persistenz fetaler DNA wurden auf Unterschiede bei der Zentrifugation der Proben zurückgeführt [Smid et al., 2003].

Die oben beschriebenen Möglichkeiten des Nachweises fetaler DNA ermutigt zu weiteren Forschungen in diesem Bereich der nicht-invasiven Pränataldiagnostik. Vor allem bei der Bestimmung des fetalen Rhesus D-Status und der Diagnostik von geschlechtsgebundenen genetischen Erkrankungen, aber auch bei Erkrankungen wie der Achondroplasie, der cystischen Fibrose oder der myotonen Dystrophie, könnte der Nachweis fetaler DNA in mütterlichem Blut zu den invasiven Methoden wie der Amniozentese oder der Chorionzottenbiopsie, eine Alternative werden. Mögliche Einschränkungen für die Anwendung dieser Methode sind, dass die genaue genetische Problematik im Vorfeld bekannt sein muss. Außerdem muss sowohl die DNA beider Elternteile zur Verfügung stehen als auch informative Marker bekannt sein.

## ***1.5 Fragestellung der Arbeit: Nachweis fetaler DNA in mütterlichem Blut***

(zum Zeitpunkt der Durchführung der experimentellen Untersuchungen im Jahr 2002)

Der Nachweis von freier fetaler DNA im mütterlichen Blut ist zurzeit einer der Hauptschwerpunkte in der Forschung auf dem Gebiet der nicht-invasiven Pränataldiagnostik. Nicht nur die Verminderung von Komplikationen, wie sie bei der invasiven vorgeburtlichen Diagnostik vorkommen können, sondern auch die Möglichkeit einer schnellen Diagnosestellung gehört zu den Vorteilen dieser Methode. Eine schnelle Diagnosestellung wird vor allem durch die Anwendung der Real-Time PCR (qRT-PCR) ermöglicht. Da die Auswertung mittels eines Computers am qRT-PCR-Gerät selbst - noch während eines Reaktionslaufes - erfolgt, verringern sich mit dieser Methode sowohl der Zeitaufwand, als auch das Kontaminationsrisiko der zu untersuchenden Proben.

### **1.5.1 Anwendung des SRY-Primers**

In der vorliegenden Arbeit erfolgt daher der Nachweis von fetaler DNA mit der Real-Time-PCR. Als Gerät wird der LightCycler (ROCHE) verwendet. Bisher beschränkt sich die Anwendung der Real-time PCR in der Pränataldiagnostik auf den Nachweis von fetalen Merkmalen, die bei der Mutter nicht vorhanden sind. Vor allem die Detektion männlicher fetaler DNA gehört momentan zu einem der Forschungsschwerpunkte. Der Nachweis von männlicher DNA geschah in den letzten Jahren hauptsächlich durch das Detektieren des Y-

Chromosoms mit Hilfe des SRY-Primers. Dieser Primer bindet an die geschlechtsbestimmende Region des Y-Chromosoms (engl.: sex-determining region Y chromosome) Als Detektionsgerät diente hierzu in erster Linie der TaqMan.

Der TaqMan ist, wie der LightCycler, ein Gerät, das zur Durchführung einer qRT-PCR verwendet wird. Der wesentliche Unterscheidungspunkt dieser beiden qRT-PCR Geräte besteht in der Verwendung unterschiedlicher Sonden zur DNA-Detektion. Angesichts der ähnlichen Grundprinzipien der beiden Geräte, wurde die Frage, ob der SRY-Primer, der bei Reaktionen, die mit Hilfe des TaqMans ausgeführt werden, auch bei einer qRT-PCR, die mit dem LightCycler durchgeführt wird, zur Anwendung kommen kann, bearbeitet. Da der Sinn der nicht-invasiven Pränataldiagnostik eine maximale Sicherheit der Diagnose bei minimaler Gefährdung von Mutter und Fetus ist, sind vor allem die Sensitivität und Spezifität dieser Reaktion in dieser Arbeit von Bedeutung.

### **1.5.2 Anwendung des DYS14-Primers**

Neben dem SRY-Primer gibt es noch weitere Möglichkeiten zum Nachweis fetaler männlicher DNA aus mütterlichem Serum. Dazu zählt unter anderem der DYS14-Primer, dessen Abkürzung für DNA-Y-Chromosom Segment (engl.: DNA Y chromosome segment) steht. Dieser Primer dient ebenfalls zum Nachweis des Y-Chromosoms mittels TaqMan. In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob die Detektion männlicher DNA durch Real-Time-PCR unter Verwendung des LightCyclers möglich ist. Neben dem erneuten Nachweis der Sensitivität und Spezifität dieser Methode, ist auch der Vergleich zu dem SRY-



Primer ein Thema der vorliegenden Arbeit. Nicht zuletzt erfolgte auch eine Abwägung der Primer gegeneinander.

### **1.5.3 Klinische Durchführbarkeit**

Da es zu einer erheblichen Zunahme der Risikoschwangerschaften in den letzten Jahren kam, ist die Möglichkeit einer zuverlässigen, nicht-invasiven Pränataldiagnostik von immer größerer klinischer Bedeutung. Zwar wurden in jüngster Zeit nicht zu vernachlässigende Fortschritte in der nicht-invasiven vorgeburtlichen Diagnostik erreicht, aber eine letztendliche Sicherheit bezüglich chromosomaler Aberrationen fehlt. Um die Betreuung und Behandlung von Frauen mit einem erhöhten Risiko für genetische Erkrankungen ihrer Kinder zu optimieren, wäre eine nicht-invasive Pränataldiagnostik mit Hilfe des Nachweises freier fetaler DNA von großer Bedeutung. Insofern ist auch eine Beurteilung der klinischen Durchführbarkeit dieser Methode als Routine-Untersuchung Thema der Arbeit.

### **1.5.4 Entwicklung des Nachweises fetaler DNA im mütterlichen Blut seit Abschluss der experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit**

Seit Beendigung meiner Versuchsreihen sind 8 Jahre vergangen. Wie hat sich die nicht-invasive Pränataldiagnostik weiterentwickelt? Welche neuen Methoden und Ansätze gibt es? Ist die nicht-invasive genetische Untersuchung des Feten in greifbare Nähe gerückt oder bleibt eine risikoarme genetische Diagnostik ein Aufgabengebiet künftiger Forschungen?

Diese Fragen werden im letzten Teil der Arbeit ausführlich abgehandelt.

# Kapitel 2 -Material und Methoden

## *2.1 Untersuchungsmaterial*

Als Material standen 43 eingefrorene Serumproben von schwangeren Frauen sowie von zwei Frauen, die einen Tag zuvor entbunden hatten, zur Verfügung. Die Serumproben stammen von Frauen, die in der Frauenklinik des Universitätsklinikums in Homburg bzw. in der Frauenklinik des Universitätsspitals Basel während ihrer Schwangerschaft betreut wurden, und ihre Zustimmung zur wissenschaftlichen Aufarbeitung ihrer Blutproben gaben. Die Serumproben waren unmittelbar nach Entnahme eingefroren worden, so dass keine Hämolyse vorlag. Es handelt sich um eine retrospektive Aufarbeitung der Proben. Bei den Patientinnen war nach der Entnahme der Proben eine Amniozentese durchgeführt worden, das Geschlecht der Feten war bekannt.

Insgesamt wurden 20 Proben von Frauen, die mit einem weiblichen Feten schwanger waren, 23 Proben von Frauen, die mit einem männlichen Feten schwanger waren, und 2 Proben von Frauen, die einen Tag vor der Blutentnahme einen Sohn geboren hatten, analysiert. Bei 16 der analysierten Proben war die Schwangerschaftswoche, in der die Blutentnahme erfolgte, bekannt. Die Entnahme der Blutproben erfolgte bei diesen Schwangeren zwischen der 9+3 SSW und der 16+0 SSW. In zwei Fällen lag eine numerische Chromosomenaberration des Feten vor. Es handelte sich hierbei in beiden Fällen um eine Trisomie 21. Bei 13 Schwangeren war zusätzlich der sonographisch ermittelte Wert der Nackentransparenz (NT) bekannt. Über mögliche

Komplikationen während der Schwangerschaft, wie zum Beispiel das Auftreten einer Präeklampsie oder Eklampsie bei der Mutter, liegen keine Informationen vor. In den Tabellen 2.1 und 2.2 sind die untersuchten Blutproben aufgelistet.

Nr.	Fall	SSW	NT (mm)	Geschlecht	Entbindung
1	108	12+6	1,9 mm	46, XY	
2	112	12+4	1,8 mm	46, XY	
3	117	12+2	1,9 mm	46, XY	
4	118	9+3	2,1 mm	46, XY	
5	123	12+0	1,9 mm	46, XY	
6	126	13+3	3,5 mm	46, XY	
7	132	12+2	3,2 mm	46, XY	
8	139			46, XY	
9	212	14+4		47, XY+21	
10	213			46, XY	
11	214			46, XY	
12	216			46, XY	
13	216			46, XY	
14	217			46, XY	
15	220			46, XY	
16	221			46, XY	
17	225			46, XY	
18	232			46, XY	
19	236	16+0		47, XY+21	
20	W01			46, XY	
21	W02			46, XY	
22	W10			46, XY	
23	W19			46, XY	
1	234			46, XY	24h vor Blutentnahmen
2	235			46, XY	24h vor Blutentnahmen

Tabelle 2.1: Untersuchte Serumproben von Schwangeren mit männlichen Feten

Nr.	Fall	SSW	NT (mm)	Geschlecht	Entbindung
1	105			46, XX	
2	109	11+3	1,6 mm	46, XX	
3	111	11+2	2,8 mm	46, XX	
4	116	11+0		46, XX	
5	119	12+6	1,3 mm	46, XX	
6	122	12+3	1,5 mm	46, XX	
7	125	11+2	2,5 mm	46, XX	
8	138	12+5	1,8 mm	46, XX	
9	215			46, XX	
10	218			46, XX	
11	219			46, XX	
12	222			46, XX	
13	224			46, XX	
14	226			46, XX	
15	227			46, XX	
16	228			46, XX	
17	229			46, XX	
18	230			46, XX	
19	231			46, XX	
20	233			46, XX	

Tabelle 2.2: Untersuchte Serumproben von Schwangeren mit weiblichen Feten

## ***2.2 DNA-Isolierung***

Der erste Schritt der Versuchsreihe besteht in der DNA-Isolierung aus den maternalen Blutproben. Die Blutprobe wird dazu zunächst in einer Zentrifuge mit 18.000 Umdrehungen 15 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wird das Serum vorsichtig in ein Eppendorf-Gefäß abpipettiert. Das Serum wurde danach entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -70°C bis zur DNA-Isolierung eingefroren.

Die DNA-Isolierung erfolgt mit Hilfe des DNA Blood Mini Kit Qiaamp (QIAGEN). Zunächst werden 400 µl des Serums und 400 µl AL-Puffer in ein 1,5 ml großes Eppendorf-Gefäß pipettiert. Nach kurzem vortexen und anschließenden abzentrifugieren werden 40 µl Proteinase K hinzupipettiert. Danach wird das Gemisch 15 Sekunden lang gevortext und kurz zentrifugiert. Nun wird das Gefäß 10 Minuten lang in ein 56°C warmes Wasserbad gestellt. Das Serumgemisch wird anschließend erneut abzentrifugiert und 400 µl Ethanol hinzugefügt. Nach 15 Sekunden langer Durchmischung und darauf folgender Zentrifugation werden 620 µl in eine Säule abpipettiert und eine Minute lang bei 8.000 Umdrehungen zentrifugiert. Danach wird auch der Rest des Gemischs in die Säule pipettiert und erneut eine Minute lang bei 8.000 Umdrehungen zentrifugiert. Nun werden 500 µl AW1-Puffer hinzugefügt. Der Puffer wird eine Minute lang bei 8.000 Umdrehungen abzentrifugiert. Nach diesem Arbeitsschritt erfolgt der Zusatz von 500 µl AW2-Puffer. Dieser wird bei 14.000 Umdrehungen 3 Minuten lang abzentrifugiert. Die Säule wird nun in ein neues Eppendorf-Gefäß gesetzt und 50 µl, auf 70 °C vorgewärmter, AE-Puffer hinzugefügt. Nach einer Minute folgt erneut eine Zentrifugation mit 8.000 Umdrehungen für eine Minute. Nach der DNA-Isolierung wurde die DNA im Kühlschrank bis zur Weiterverarbeitung in der Real-Time PCR aufbewahrt. War vorzusehen, dass die DNA innerhalb der nächsten Tage nicht bei der Real-Time PCR eingesetzt werden kann, so wurde die isolierte DNA bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

### 2.2.1 Versuchsprotokoll der DNA-Isolierung

400 µl Serum
400 µl AL-Puffer
15 s vortexen
Zentrifugieren
40 µl Protease
15 s vortexen
Zentrifugieren
10 min Wasserbad, 56°C
Zentrifugieren
400 µl Ethanol
15 s vortexen
Zentrifugieren
620 µl in Säule pipettieren
1 min zentrifugieren
620 µl in Säule pipettieren
1 min zentrifugieren
500 µl AW-1-Puffer
1 min zentrifugieren
Zentrifuge auf 8.000 Umdrehungen eingestellt
500 µl AW-2-Puffer
3 min zentrifugieren
Zentrifuge auf 14.000 Umdrehungen eingestellt
50 µl AE-Puffer
1 min stehen lassen
AE-Puffer auf 70°C vorgewärmt
Zentrifuge auf 8.000 Umdrehungen eingestellt
1 min zentrifugieren

### **2.3 PCR**

Vor 20 Jahren entwickelte Kary Mulis, der für diese Leistung 1993 mit dem Chemie-Nobelpreis ausgezeichnet wurde, die Polymerasekettenreaktion, kurz PCR (engl. Polymerase chain reaction). Diese Reaktion dient der Amplifikation spezifischer DNA Sequenzen. Für die PCR-Reaktion benötigt man DNA, zwei Primer, Pufferlösung, DNA-Polymerase, Magnesium (Mg) und Nukleotide. Die Reaktion beruht auf den Prinzipien der DNA-Denaturierung, dem Binden von Oligonukleotiden an die denaturierte DNA und der anschließenden Extension zu neuen DNA-Doppelsträngen.

Zunächst wird die vorhandene DNA denaturiert. Dies wird durch eine Temperaturerhöhung auf über 90°C erreicht. Das sogenannte Melting (Schmelzen) dient dem Aufbrechen der Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den DNA-Strängen. Um sicherzugehen, dass sowohl die zu vervielfältigende DNA, als auch die Primer nach der ersten Phase als Einzelstrang vorliegen, dauert die DNA-Denaturierung zu Beginn der PCR-Reaktion länger als in den später folgenden DNA-Denaturierungszyklen.

Nach dieser etwa 15 Minuten lang dauernden Melting-Phase, wird die PCR-Lösung abgekühlt. Während der Abkühlung der PCR-Lösung erfolgt die Anlagerung von Primern an die denaturierte DNA. Diese Phase wird als Annealing (Anlagern) bezeichnet. Primer ist der englische Begriff für „Startersequenz“. Die Startsequenzen sind synthetische Oligonukleotide. Diese kurzen, synthetisch erzeugten, DNA-Stränge bestimmen den Anfang und das Ende des zu amplifizierenden DNA-Bereichs. Die Primer müssen mehrere Eigenschaften aufweisen, um sich möglichst spezifisch an die DNA Fragmente

anlagern zu können. Zum einen dürfen die Primer nicht zu lang sein. Sie sollten möglichst eine Länge von 18 bis 24 Basen haben. Primer, die zu lang sind, haben das Problem, dass ihr Schmelzpunkt zu hoch ist. Als Schmelzpunkt wird die Temperatur bezeichnet, oberhalb der sich die Doppelstränge trennen und unterhalb der sich die Primer an die DNA anlagern. Dies bedeutet, dass bei einem zu langen Primer mit einer daraus folgenden hohen Schmelztemperatur (über 80 ° C), die Polymerase weniger aktiv ist, was sich ungünstig auf die DNA-Amplifikation auswirkt. Auch zu kurze Primer wirken sich ungünstig auf die DNA-Replikation aus, da sich die Primer dann an verschiedenen DNA-Bereichen unspezifisch anlagern und so die zu amplifizierende DNA-Sequenz nicht mehr genau bestimmt wird. Die optimale Temperatur für die Annealing-Phase liegt etwa 5 °C unter der spezifischen Schmelztemperatur der Primer. Des Weiteren sollten alle verwendeten Primer eine ähnliche Schmelztemperatur besitzen, um eine synchrone Anlagerung der verschiedenen Primer zu gewährleisten. Außerdem sollte darauf geachtet werden, dass ihre Sequenzen spezifisch für die Zielsequenzen der DNA sind. Nach Möglichkeit sollten die verwendeten Primersequenzen auch nicht komplementär zueinander sein.

Nachdem die Primer komplementär an die Ziel-DNA gebunden haben, erfolgt eine Vereinigung der DNA-Einzelstränge zu neuen DNA-Doppelsträngen (Renaturierung). Der Primer dient in diesem Schritt als Ausgangspunkt für die nachfolgende DNA-Synthese. Für diesen Schritt werden neben der DNA-Polymerase-Desoxyribonukleinsäure-Triphosphate (dNTPs) benötigt. Die DNA-Polymerase ist ein Enzym, das in allen Zellen vorkommt und dessen natürliche Aufgabe darin besteht die DNA vor der Zellteilung zu verdoppeln. Da die PCR pro Zyklus einen Denaturierungsschritt beinhaltet, wird eine thermostabile DNAPolymerase, wie sie bei thermophilen Bakterien vorkommt, verwendet. Die



von den Primern markierten Anfang- und Endpunkte der DNA-Fragmente werden von der Polymerase für die Synthese neuer DNA-Stränge genutzt. Die Polymerase füllt hierbei die fehlenden Stränge. Am Primer beginnend folgt sie dem DNA-Strang. Dieser Teil der Reaktion wird auch als Elongation (Verlängerung) bezeichnet. Die Dauer dieses Schrittes ist zum einem von der verwendeten Polymerase, zum anderen von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments abhängig.

Die oben beschriebenen PCR-Schritte werden mehrmals wiederholt, so dass theoretisch die gebildete DNA exponentiell zunimmt. Dies geschieht praktisch nicht, da die auf diese Weise entstehende DNA-Menge sowohl durch die vorhandene Enzymmenge als auch durch die Menge an dNTPs begrenzt wird. Um reinere PCR-Produkte zu erhalten, kann man die sogenannte hot-Start-PCR anwenden. In einer anschließenden Agarosegelelektrophorese können die entstandenen PCR-Produkte analysiert werden. Eine schematische Darstellung der PCR ist in Abb. 2.1 gezeigt

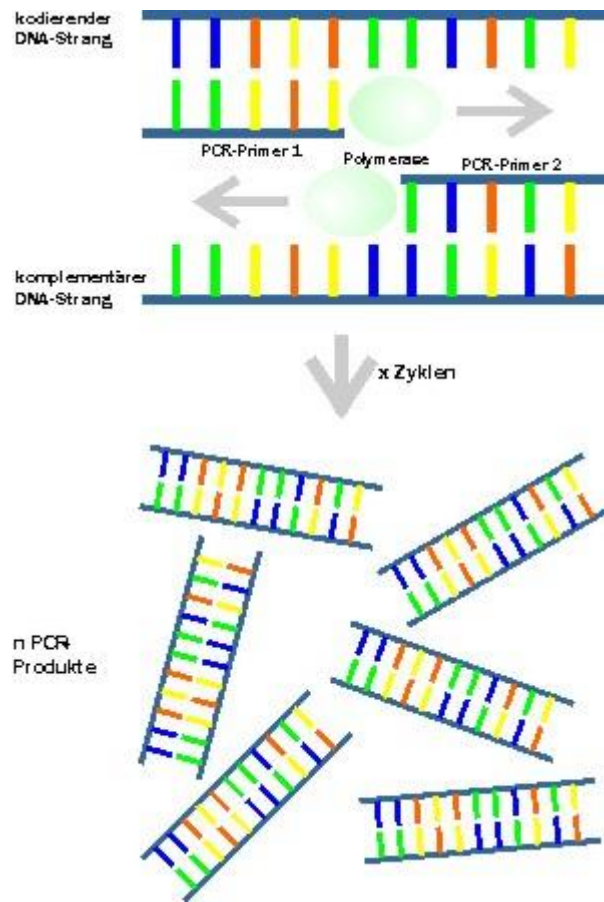


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der PCR

## 2.4 Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) basiert auf den gleichen Grundprinzipien wie die klassische PCR. Sie erlaubt jedoch den Fortschritt der Produktvermehrung zu verfolgen. Nachdem im ersten Schritt die DNA denaturiert wird, wird die Temperatur erniedrigt. Während dieser Phase lagern sich die synthetische Oligonukleotide komplementär an die denaturierte Ziel-DNA an. Durch den Zusatz einer DNA-Polymerase und Desoxyribonuklein-

säure-Triphosphate (dNTPs) erfolgt die Zusammensetzung von komplementären Einzelsträngen zu neuen DNA-Doppelsträngen. Die Primer dienen hierbei als Ausgangspunkt für die Synthese des komplementären DNA-Strangs, so dass neue DNA Doppelstränge mit der gewünschten Sequenz entstehen. Zusätzlich zu den beiden Primern wird eine fluoreszierende Sonde hinzugefügt, die es ermöglicht, parallel zu der laufenden Reaktion die Fluoreszenz der entstehenden Produkte zu messen. Die beschriebenen Reaktionszyklen werden, wie bei der normalen PCR sonst auch üblich, mehrfach wiederholt, so dass die Menge der amplifizierten DNA exponentiell zunimmt. Da die Fluoreszenzmessung bereits während der Reaktion abläuft, bedeutet das, dass bereits während dem Reaktionslauf eine Produktanalyse erfolgen kann und die Ergebnisse der Reaktion im unmittelbaren Anschluss an die qRT-PCR vorliegen. Die zeitaufwendige Auftrennung der PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese ist daher nicht mehr nötig. Neben dieser Zeitersparnis liegt ein weiterer Vorteil der qRT-PCR darin, dass eine mögliche Kontamination der PCR-Produkte, die durch das Öffnen der sonst gebräuchlichen PCR-Gefäße nach Abschluss der Reaktion möglich ist, vermieden wird. Dies ist vor allem bei einer diagnostischen Nutzung der PCR-Produkte von erheblicher Bedeutung.

#### **2.4.1 DNA interkalierende Farbstoffe**

Um die amplifizierte DNA „sichtbar“ zu machen, muss bei der qRT-PCR, wie bei einer klassischen PCR auch, ein Farbstoff hinzugefügt werden. Während bei der PCR die Färbung der PCR-Produkte im Anschluss an die Reaktion erfolgt, findet die Färbung der neu entstehenden DNA bei der qRT-PCR bereits während der Reaktion statt. Die einfachste Methode besteht in der Verwendung von SYBR-Green. SYBR-Green ist ein Farbstoff, der sich in die DNA einlagert.

Dieser Farbstoff ist oft schon dem kommerziell erhältlichen Master-Mix, der als Grundlage für die qRT-PCR dient, hinzugefügt. Das Entscheidende ist, dass der Farbstoff im ungebundenen Zustand nur wenig fluoresziert.

Während der DNA-Synthese heftet sich SYBR-Green an die neu gebildeten Doppelstränge. Durch diese Bindung an die DNA erhöht sich die Fluoreszenz des Farbstoffes um ein Vielfaches. Das so entstehende Lichtsignal wird nach jedem Zyklus gemessen und ist proportional zur gebildeten DNA. Wenn der Anstieg der Fluoreszenz mit der Zykluszahl in Korrelation gesetzt wird, kann die Quantität des Produkts hieraus geschlossen werden. Eine Darstellung des Reaktionsprinzips ist in Abb. 2.2 - 2.5 zu sehen (Bildquelle: [www.pcr.at/html/mbicy.html](http://www.pcr.at/html/mbicy.html)). Am Ende der qRT-PCR ist jedoch noch eine Schmelzkurvenanalyse notwendig. Das bedeutet, dass nochmals eine langsame, sukzessive Temperaturerhöhung stattfindet und hierbei die Fluoreszenz registriert wird. Der Grund hierfür ist, dass unspezifische Produkte, sogenannte Primer-Dimere, bei einer niedrigeren Temperatur schmelzen als die spezifischen PCR-Produkte, und so erkannt werden können.

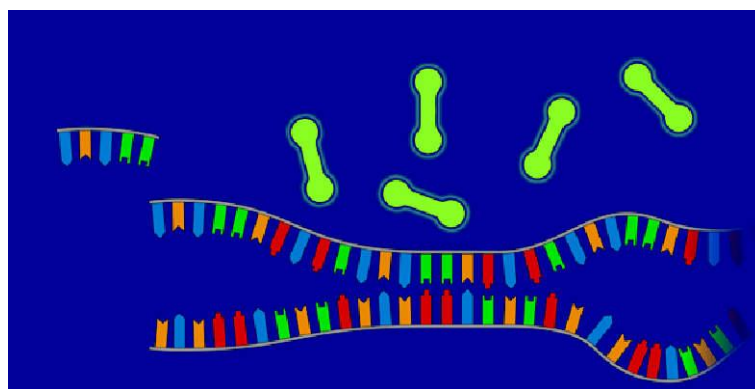


Abbildung 2.2: Denaturierung (SYBR-Green)

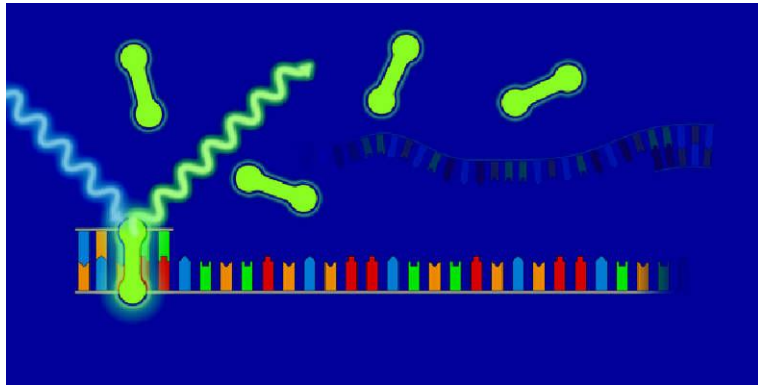


Abbildung 2.3: Primeranlagerung (SYBR-Green)

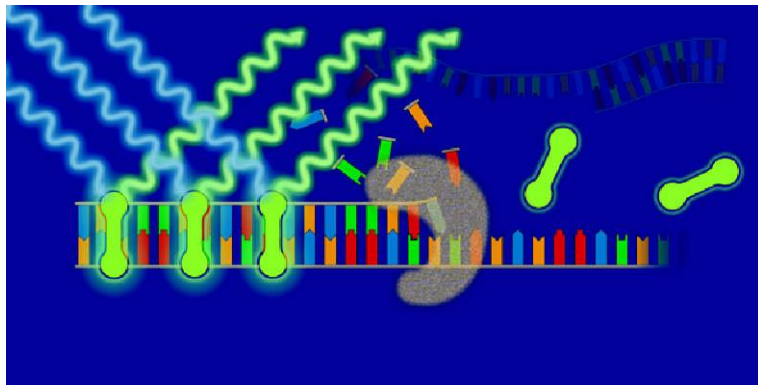


Abbildung 2.4: Kettenverlängerung (SYBR-Green)

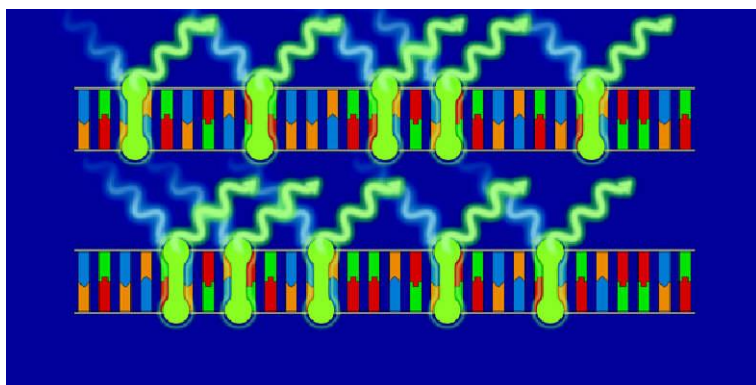


Abbildung 2.5: Ende des Zyklus (SYBR-Green)

Diese Art der Darstellung gilt als die einfachste Methode zur DNA-Quantifizierung. Für komplexere DNA-Analysen müssen jedoch andere Messprinzipien zur Anwendung kommen.

#### **2.4.2 Sonden**

Ein weiterer Unterschied der qRT-PCR, verglichen mit der sonst üblichen PCR, besteht darin, dass zusätzlich zu den beiden Primern eine Sonde, die mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist, hinzugefügt werden kann. Diese Sonde bindet zwischen den beiden Primern an eine bestimmte DNA-Sequenz. Die Messung von Fluoreszenz zum Nachweis amplifizierter DNA hat, verglichen mit immunologischen oder radioaktiven DNA-Markierungen, diverse Vorteile. So sind Fluoreszenzfarbstoffe in ihrer Handhabung weitgehend unbedenklich und können demzufolge auch kostengünstig wieder entsorgt werden. Des Weiteren sind sie auch länger haltbar. In der Anwendung an sich ist von Vorteil, dass durch die Verwendung verschiedenfarbiger Fluorophore sowohl parallele Messungen als auch kontinuierliche Messungen von PCR-Produkten möglich sind. Die Messung ist außerdem auch bei geschlossenen PCR-Gefäßen möglich. Der Nachteil dieser Messmethode ist jedoch, dass die Fluoreszenzmessung wesentlich weniger empfindlich ist als die Messung von immunologisch oder radioaktiv markierter DNA. Außerdem zeigt sie nur einen begrenzten linearen Anstieg, um dann nicht mehr zuzunehmen (Quenching).

In dieser Arbeit wurde die Amplifikation der Ziel-DNA durch Registrierung der emittierten Fluoreszenz gemessen. Für die Real-Time PCR stehen, je nach verwendetem Gerät, zwei unterschiedliche Sondenarten zur Verfügung. Dabei handelt es sich zum einen um Hybridisierungs sonden und zum anderen um

sogenannte TaqMan-Sonden. Die Prinzipien dieser beiden Sondenarten werden im Folgenden kurz erläutert.

### **Hybridisierungssonde**

Mit Hilfe der Hybridisierungssonden ist die Detektion spezifischer PCR-Produkte möglich. Durch den Einsatz dieser Sonden wird vermieden, dass unspezifische Produkte sowie Primer-Dimere fälschlicherweise als spezifisches Produkt interpretiert werden.

Die Hybridisierungssonden bestehen aus sequenzspezifischen Oligonukleotiden, die zu dem PCR-Ansatz hinzugegeben werden. Diese Oligonukleotide sind mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen markiert. Sie binden in einem Abstand von etwa ein bis fünf Nukleotiden zwischen den beiden Primern an die DNA. Die folgende Reaktion beruht auf dem Fluoreszenz Resonanz Energie-Transfer, kurz FRET genannt, der Energieübertragung zwischen den beiden Hybridisierungssonden. Dies bedeutet, dass, wenn beide Sonden in enger räumlicher Nähe zu einander an die DNA binden, die 1. Hybridisierungssonde angeregt wird. Allerdings kommt es nicht zu einer Emission von fluoreszierendem Farbstoff, sondern zu einer Übertragung der Energie des 1. Farbstoffes auf den zweiten, benachbarten Farbstoff, welcher nun fluoresziert. Die Intensität der Fluoreszenz ist proportional der gebildeten DNA. Ungebundene Hybridisierungsproben emittieren kein Fluoreszenz-Signal. Das Schema dieses Vorgangs ist in Abb. 2.6 - 2.9 dargestellt (Bildquelle: [www.pcr.at/html/mblcy.html](http://www.pcr.at/html/mblcy.html)).

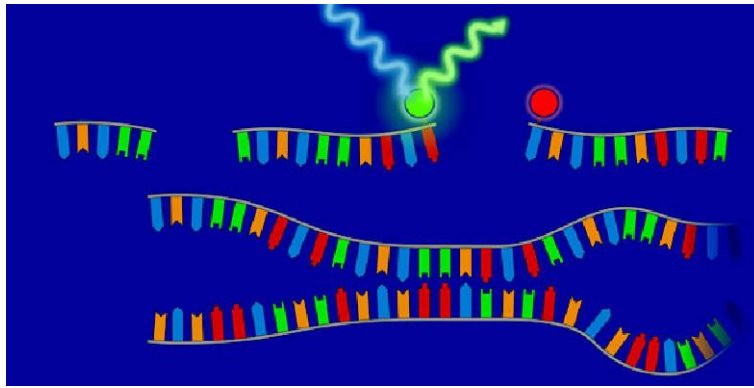


Abbildung 2.6: Denaturierung (Hybridisierungssonde)

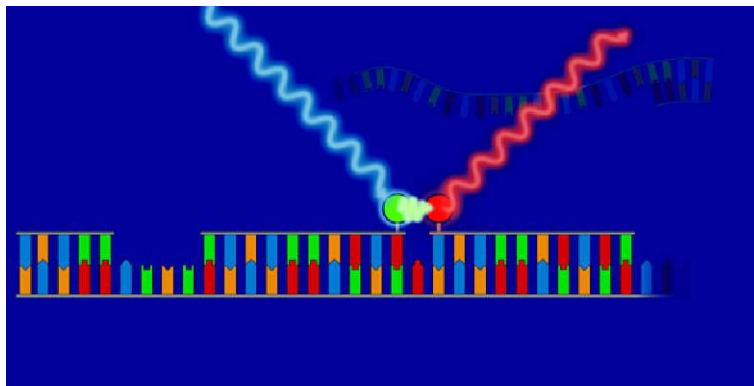


Abbildung 2.7: Primeranlagerung (Hybridisierungssonde)

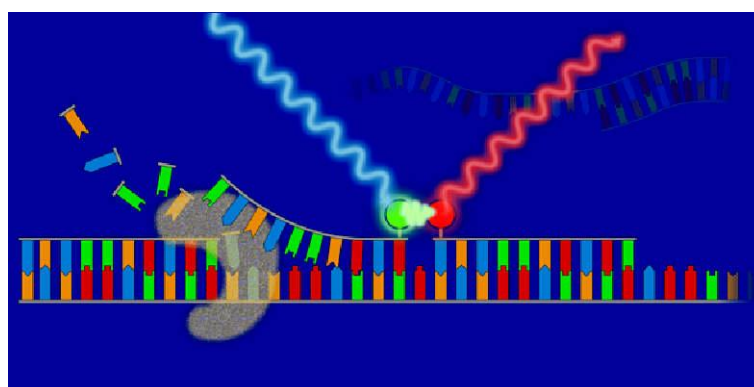


Abbildung 2.8: Kettenverlängerung (Hybridisierungssonde)



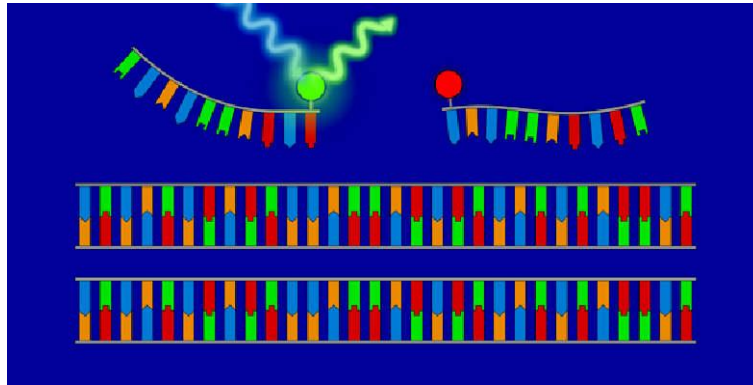


Abbildung 2.9: Ende des Zyklus (Hybridisierungssonde)

Die Signal-Messung erfolgt jeweils einmal pro Zyklus nach der Anlagerungsphase der Primer, da zu diesem Zeitpunkt der Energietransfer stattfindet.

Aufgrund des Wirkprinzips wird deutlich, dass der Vorteil dieser Methode, verglichen mit anderen Sonden, die Unempfindlichkeit dieser Sonden gegenüber einzelnen Fehlbindungen ist, die im Bereich der zu amplifizierenden DNA liegen können. Nach der qRT-PCR ist es möglich eine Schmelzpunktanalyse durchzuführen, wenn heterozygote von homozygoten Genträgern unterschieden werden sollen. Eine Unterscheidung der Merkmalsträger ist dadurch möglich, dass die Gensequenz mit der geringeren Anzahl an Basenpaaren einen niedrigeren Schmelzpunkt besitzen. Dies bedeutet, dass bei Heterozygoten zwei Spitzen, sogenannte „Peaks“, in der Schmelzkurvenanalyse zu sehen sind, bei Homozygoten hingegen nur eine. Der Nachteil bei der Verwendung dieser Art Sonde bei kürzeren Gensequenzen ist, dass ein verhältnismäßig langer Bereich in der Gensequenz markiert werden muss.

## TaqMan-Sonde

Für eine qRT-PCR stehen verschiedene Geräte zur Verfügung. Die Versuche dieser Arbeit wurden vor allem mit dem LightCycler durchgeführt. Zur Überprüfung der Reaktion wurde jedoch auch eine Reaktionsreihe mit dem TaqMan durchgeführt. Speziell für das TaqMan-Gerät wurde eine Sonde entwickelt, mit der ebenso wie mit der Hybridisierungssonde spezifisch DNA nachgewiesen werden kann. Diese Methode macht sich den sogenannten Quenching-Effekt, eine „Fluoreszenz-Löschung“, zu nutzen. Die Sonde besteht aus sequenzspezifischen Oligonukleotiden, an die fluoreszierender Farbstoff sowie ein sogenanntes „Quenching-Molekül“ gebunden ist. Da das Quenching-Molekül den Fluoreszenzfarbstoff unterdrückt, findet keine Emission von Fluoreszenz statt. Der Abstand zwischen dem Quenching-Molekül und dem fluoreszierenden Farbstoff darf daher nicht zu groß sein und soll etwa drei bis dreißig Basen betragen. Die Sonde bindet in derjenigen Phase, in der es zur Anlagerung der Primer kommt. Wenn im darauf folgenden PCR-Schritt die Polymerase den komplementären DNA-Strang synthetisiert und diese an die gebundene Sonde gelangt, so wird die Sonde aufgrund der 5' Exonukleaseaktivität der Polymerase abgebaut. Das bedeutet, dass das Quenching-Molekül von dem Fluoreszenzfarbstoff getrennt wird und die Fluoreszenz nicht mehr unterdrückt wird. Die Intensität der emittierten Fluoreszenz ist proportional der Menge der synthetisierten DNA. Zur Verdeutlichung dieses Vorgangs siehe Abb.2.10 - 2.13 (Bildquelle: [www.pcr.at/html/mblcy.html](http://www.pcr.at/html/mblcy.html)).

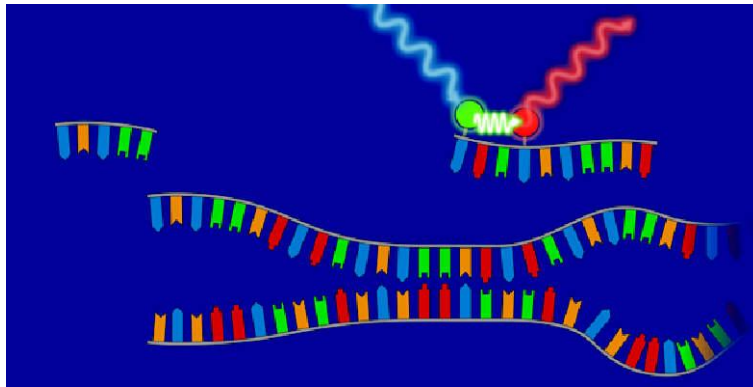


Abbildung 2.10: Denaturierung (TaqMan-Sonde)

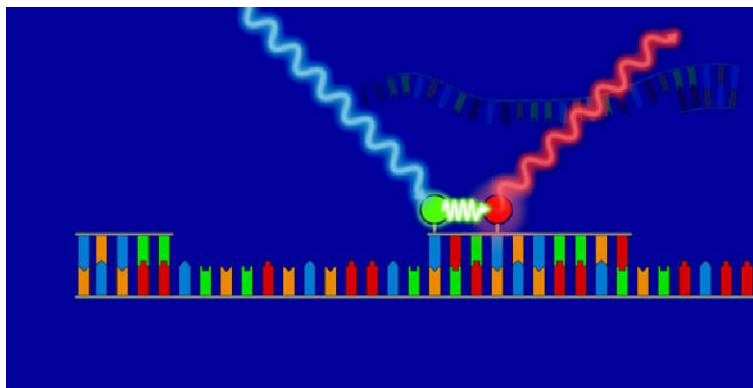


Abbildung 2.11: Primeranlagerung (TaqMan-Sonde)

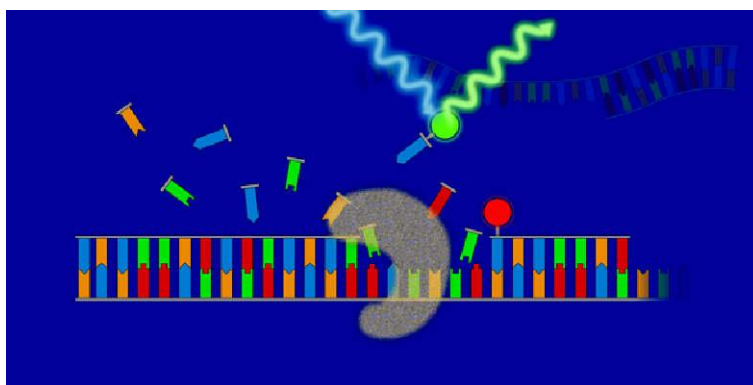


Abbildung 2.12: Kettenverlängerung (TaqMan-Sonde)

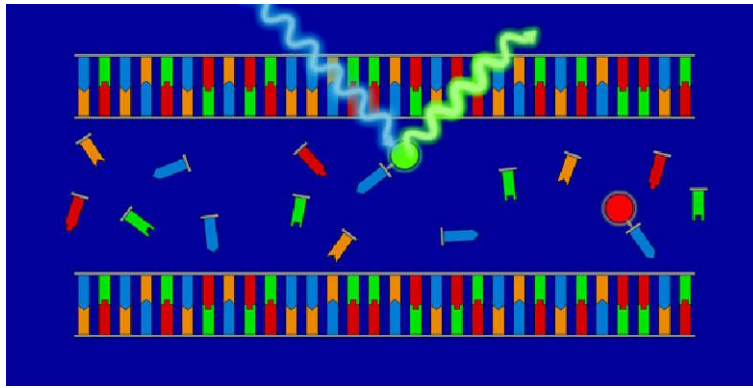


Abbildung 2.13: Ende des Zyklus (TaqMan-Sonde)

Da eine einmal abgebaute TaqMan-Sonde permanent fluoresziert, ist die Fluoreszenzmessung prinzipiell in jeder Phase des PCR-Zyklus möglich. Allerdings muss man, wenn diese Art Sonde zur Anwendung kommen soll, darauf achten, dass die Phase, in der die Anlagerung der Primer stattfindet die gleiche Temperatur haben muss, wie die Phase, in der die DNA-Kettenverlängerung stattfindet. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass diese Sonden besonders empfindlich auf einzelne Fehlbindungen, die in der Gensequenz der Ziel-DNA eventuell enthalten sein können, reagieren. Dies kann möglicherweise zur Folge haben, dass das Fluoreszenzsignal trotz einer erfolgreichen DNA-Amplifikation fehlt.

### 2.4.3 LightCycler

Bei diesem Verfahren wird das vorher auf Eis pipettierte Reaktionsgemisch vorsichtig in spezielle Glaskapillaren pipettiert und danach die zu amplifizierende DNA hinzugefügt. Das Reaktions-Gemisch muss mit einem speziellen Plastikverschluss verschlossen werden, um Kontaminationen im Verlauf der Reaktion zu vermeiden. Danach können die Kapillaren in ein

Karussell, das aus dem LightCycler herausnehmbar ist, eingesetzt werden. Das Karussell wird in eine spezielle Zentrifuge gestellt werden und der Inhalt der Kapillaren kann problemlos abzentrifugiert werden. Anschließend kann das Karussell wieder in den LightCycler gestellt werden. Insgesamt besteht die Möglichkeit pro PCR-Lauf 32 DNA-Proben gleichzeitig zu verarbeiten.

Bevor die Reaktion gestartet wird, muss mit einer speziellen LightCycler Software am Computer die Dauer der einzelnen PCR-Phasen, Zyklenzahl, Anzahl und Namen der Proben eingegeben werden. Nach dem eigentlichen Beginn der PCR findet zunächst eine Erhöhung der Temperatur auf etwa 30°C statt. Bei dieser Temperatur wird überprüft, ob die am Computer eingegebene Anzahl der Proben mit der vom Gerät detektierbaren Proben übereinstimmt. Ist dies der Fall, startet direkt im Anschluss die qRT-PCR. Um eine schnelle Temperaturerhöhung zu gewährleisten, befindet sich in dem LightCycler ein Heizblock, der die gewünschte Reaktions-Temperatur in Sekundenschnelle erreichen kann. Sowohl für die Aufheizung, als auch für die Abkühlung wird Umgebungsluft genutzt, die mit Hilfe eines Ventilators in das Gerät gelangt. Dadurch ist eine sehr schnelle Temperaturänderung, von bis zu 20°C/s möglich. Dies bedeutet, dass so die Länge eines Amplifikationszyklus verglichen zu der unter Verwendung von Heizblöcken oder Wasserbädern, erheblich verkürzt wird. Die Länge eines Zyklus beträgt so nur 30 bis 60 Sekunden. Da Luft eine niedrige thermische Kapazität besitzt, müssen die PCR-Gefäße über ein hohes Oberflächen-Volumen-Verhältnis verfügen. Dies wird durch die speziellen Glaskapillaren erreicht, die aus Bor-Silikat bestehen und die einen Durchmesser von 1,5 mm besitzen. Ihre Kapazität beträgt 20µl.

Der geringe Durchmesser der Kapillaren bewirkt, dass die Fluoreszenz, die während der qRT-PCR emittiert wird, an der Spitze der Glaskapillaren konzentriert wird. Durch die Fluoreszenzmessung kann die Menge der entstandenen Amplifikationsprodukte bestimmt werden. Eine blaue LED Lichtquelle sendet Licht auf die Kapillarspitzen und führt so zu einer Anregung des Farbstoffes. Mit Hilfe von Filtern und Spiegeln findet eine Aufspaltung der ausgestrahlten Fluoreszenz statt, die mit Hilfe eines Fluorimeters gemessen wird. Aufgrund der Optik und der Kapillaren ist die Fluoreszenzmessung sehr sensitiv und kann innerhalb von nur 20 ms erfolgen.

Der LightCycler wird mittels eines Schrittmotors betrieben. Dadurch dass der verwendete Schrittmotor mit einem horizontalen Fluorimeter arbeitet, kann eine optimale Position der Kapillaren bezüglich des Fluorimeterfokus erreicht werden. Eine komplette Drehung des Rotors unter maximaler Auslastung beträgt etwa 5 Sekunden.

Auf den Abb. 2.14 und 2.15 ist zur Verdeutlichung des Funktionsprinzips ein Bild und eine schematische Darstellung des LightCyclers zu sehen (Bildquelle: [www.pcr.at/html/mblcy.html](http://www.pcr.at/html/mblcy.html))



Abbildung 2.14: LightCycler

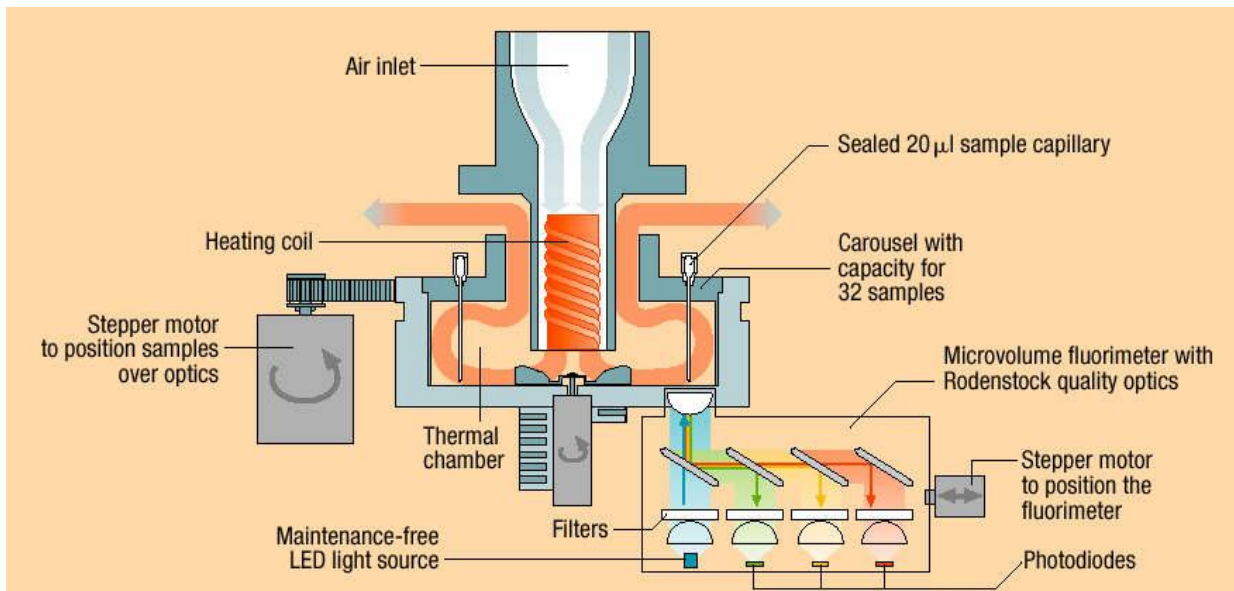


Abbildung 2.15: Aufbauschema LightCycler

#### **2.4.5. TaqMan**

Der TaqMan der Firma ABI wurde für einige Untersuchungen verwendet. Hiermit wurde überprüft, ob eine Übertragung der DNA-Nachweise der auf dem TaqMan etablierten SRY- und DYS14-Primer auf den LightCycler gelungen ist. Der Unterschied zu dem LightCycler besteht darin, dass bei dem TaqMan keine Kapillaren verwendet werden, sondern die Proben in einen Block pipettiert werden, der anschließend mit einer Folie verschlossen wird. Hiermit können bis zu 96 Proben gleichzeitig detektiert werden. Bei dieser Methode wird ein Laser verwendet, um die Proben zum fluoreszieren anzuregen.

#### **2.4.6 SRY-qRT-PCR**

Ziel der qRT-PCR ist in der vorliegenden Arbeit der Nachweis oder Ausschluss fetaler Y-chromosomaler Sequenzen im mütterlichen Blut. Im ersten Teil der Untersuchungen wurden Serumproben auf das SRY (sex determining region Y)-Gen hin untersucht. Das 250 Basenpaar lange SRY-Gen liegt auf dem kurzen Arm (p) des Y-Chromosoms auf Position 11.3 (Yp11.3) und kodiert das Protein TDF (testis-determining factor), das die Entwicklung zum männlichen Geschlecht steuert. Von diesem Gen existiert nur eine Kopie auf dem Y-Chromosom.

Für die Reaktion werden je 10,0µl Master Mix (QuantiTect Probe PCR MasterMix) 1,50 µl SRY forward Primer, 1,50 µl SRY reward Primer, 0,50 µl Probe, und 1,50 µl Aqua dest. auf Eis pipettiert, vermischt und anschließen zentrifugiert. Danach wird das Gemisch sowie 5,0 µl der zu untersuchenden DNA-Probe in eine LightCycler Kapillare (ROCHE) pipettiert. Der für die



Reaktion verwendete Master Mix besteht aus Fast Taq DNA Polymerase, Puffer, MgCL<sub>2</sub> und dNTP-Mix. Der SRY forward Primer hat die Sequenz: 5´TCC TCA AAA GAA ACC GTG CAT3´, die des SRY reverse Primers lautet: 5´AGA TTA ATG GTT GCT AAG GAC TGG AT3´. Die Sequenz der verwendeten Sonde ist: 5´(FAM) CAC CAG CAG TAA CTC CCC ACA ACC TCT TT (TAMRA)3´. Der Reaktions-Mix wird in den Kapillaren kurz abzentrifugiert (LC Carousel Centrifuge, ROCHE), bevor diese in den LightCycler (ROCHE) gestellt werden. Das PCR-Programm beginnt mit einer 15-minütigen Denaturierungsphase bei 95°C.

Anschließend wird die denaturierte DNA in 60 Zyklen amplifiziert. Ein Amplifikationszyklus besteht aus einer Denaturierungsphase bei 94°C (temperature transition rate 20°C/Sekunde), die 10 Sekunden lang dauert. Danach erfolgt eine Abkühlung auf 60°C (temperature transition rate 20°C/Sekunde). In dieser Phase findet der Basen-und Primeranbau an die denaturierte DNA statt. Nach 60 Sekunden erfolgt erneut eine Denaturierung der DNA bei 94°C (temperature transition rate 20°C/Sekunde) und es beginnt damit einen neuen Amplifikationszyklus.

Den Abschluss der PCR bildet eine Abkühlung auf 40°C (temperature transition rate 20°C/Sekunde) für 20 Sekunden. Da bereits während der Reaktion die Fluoreszenz, und damit die DNA-Amplifikation, registriert wurde, kann nun direkt die Auswertung der Fluoreszenzkurven erfolgen.

#### 2.4.7 Versuchsprotokoll der SRY-qRT-PCR

<b>Primersequenz SRY-Primer</b>
SRY forward Primer 5' TCC TCA AAA GAA ACC GTG CAT3'
SRY reverse Primer 5'AGA TTA ATG GTT GCT AAg GAC TGG AT3'
SRY Sonde 5'(FAM) CAC CAG CAG TAA CTC CCC ACA ACC TCT TT (TAMRA)
<b>PCR-Mix</b>
10,0 µl Kit
1,5 µl SRY forward
1,50 µl SRY reverse
0,50 µl Sonde
1,50 µl Aqua dest.
5,0 µl DNA
<b>LightCycler</b>
15 min 95°C
10 s 94°C
1 min 60°C
20 s 40°C
Temperature transition rate 20°C/s 60 Zyklen

#### 2.4.8 DYS14-qRT-PCR

In der zweiten Untersuchungsreihe wurde versucht fetale männliche DNA mittels DYS14-Primer nachzuweisen. DYS14 ist eine DNA-Multicopy-Sequenz, die im TSPY1 (testis-specific Y-encoded protein 1)Gen liegt. Die Länge der Sequenz unterliegt hohen interindividuellen Schwankungen und ist kürzer als die Sequenz des SRY-Gens.

Auch diese qRT-PCR wird in dieser Arbeit durchgeführt, um fetale männliche DNA im Blut der werdenden Mutter nachzuweisen. Zunächst werden jeweils 10,0 µl Master Mix (QuantiTect Probe PCR Master Mix) 0,75 µl DYS14 forward Primer, 0,75µl DYS14 reward Primer, 1,0 µl Probe sowie 2,5 µl Aqua

dest. unter Kühlung in ein Gefäß pipettiert, bevor der Inhalt des Gefäßes durchmischt und abzentrifugiert wird.

Der MasterMix beinhaltet Fast Taq DNA Polymerase, Puffer, MgCL<sub>2</sub> und dNTP-Mix. Als DYS14 forward Primer wird ein Primer mit folgender Sequenz verwendet: 5'CCA GAG CGT CCC TGG CT3'. Der DYS14 reverse Primer hat die Sequenz: 5'TCC CCT TTG TTC CCC AAA G3'. Die Sequenz der verwendeten Sonde ist: VIC- TCT AGT GGA GAG GTG CTC-MGB. Der Gefäßinhalt und 5, 0µl der zu untersuchenden DNA Probe werden nun in eine LightCycler Kapillare (ROCHE) pipettiert. Der Inhalt der Kapillaren wird kurz abzentrifugiert (LC Carousel Centrifuge, ROCHE), bevor diese in einen LightCycler (ROCHE) gestellt werden.

Den Beginn der PCR stellt eine 15-minütige Denaturierungsphase bei 95°C dar. Anschließend wird die denaturierte DNA in 50 Zyklen amplifiziert. Ein Amplifikationszyklus besteht aus einer 10 Sekunden dauernden DNA-Denaturierung bei 94°C (temperature transition rate 20°C/Sekunde). Danach kühlt der LightCycler auf 62°C (temperature transition rate 20°C/Sekunde) ab. In dieser Phase erfolgt die Bindung sowohl der DYS14-Primer, als auch der Basen. Nach 60 Sekunden startet ein neuer Zyklus mit der erneuten DNA-Denaturierung bei 94°C (temperature transition rate 20°C/Sekunde). Nach Beendigung der 50 Amplifikationszyklen erfolgt eine 20 Sekunden lang andauernde Abkühlung auf 40°C (temperature transition rate 20°C/Sekunde). Danach ist die PCR beendet und die Ergebnisse können beurteilt werden.

#### 2.4.9 Versuchsprotokoll der DYS14-qRT-PCR

<b>Primersequenz DYS14-Primer</b>
DYS14 forward Primer 5´CCA GAG CGT CCC TGG CT3´
DYS14 reverse Primer 5´TCC CCT TTG TTC CCC AAA G3´
DYS14 Sonde VIC-TCT AGT GGA GAG GTG CTC-MGB
<b>PCR-Mix</b>
10,0µl Kit
0,75 µl DYS14 forward
0,75 µl DYS14 reverse
1,0 µl Sonde
2,5 µl Aqua dest.
5,0 µl DNA
<b>LightCycler</b>
15 min 95°C
10 s 94°C
1 min 62°C
20 s 40°C
Temperature transition rate 20°C/s 50 Zyklen

#### 2.4.10 GAPDH-qRT-PCR

Zur Kontrolle, ob die DNA-Isolierung aus den Spenderproben erfolgreich durchgeführt wurde, wurde jede DNA-Probe zusätzlich auf ihren qualitativen DNA-Gehalt getestet. Als Standard dient hierfür die Bestimmung der GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), als klassisches Housekeeping-Gen. Da dieses Enzym in allen Zellen gleich stark exprimiert vorhanden ist dient es häufig als interner Standard für die Quantifizierung. GAPDH wird von Genen auf unterschiedlichen Chromosomen kodiert.

Für die qRT-PCR werden je 10,0 µl MasterMix (QuantiTect Probe PCR Master Mix) 0,75 µl GAPDH forward Primer, 0,75 µl GAPDH reverse Primer, 1,0 µl Probe und 2,5 µl Aqua dest unter Kühlung in ein Gefäß pipettiert, durchmischt und anschließend zentrifugiert. Der verwendete Master Mix für die GAPDH-qRT-PCR beinhaltet eine Fast Taq DNA Polymerase, Puffer, MgCL<sub>2</sub> und dNTP-Mix. Der verwendete GAPDH forward Primer hat die Sequenz: 5'CCC CAC ACA CAT GCA CTT ACC 3', die des GAPDH reverse Primers lautet: 5'CCT AGT CCC AGG GCT TTG ATT 3'. Die Sequenz der für diese Reaktion benutzten Sonde ist: 5'(VIC) TAG GAA GGA CAG GCA AC(TAMRA)3'. Nun wird der Reaktionsansatz sowie 5,0 µl der jeweiligen DNA-Probe in eine LightCycler Kapillare (ROCHE) pipettiert. Dieser Mix wird in den Kapillaren kurz abzentrifugiert (LC Carousel Centrifuge, ROCHE), bevor diese für die jetzt folgende Real-Time PCR in den LightCycler (ROCHE) gestellt werden.

Den Anfang des PCR-Programms bildet eine 15-minütige Denaturierungsphase bei 95°C. Anschließend werden die DNA-Zielsequenzen in 60 Zyklen vermehrt. Der Amplifikationszyklus startet mit der Denaturierung der DNA bei 94°C (temperature transition rate 20°C/Sekunde). Diese Phase dauert 10 Sekunden. Danach wird das Reaktionsgemisch auf 60°C (temperature transition rate 20°C/Sekunde) abgekühlt. In dieser Zeit erfolgt die Anlagerung sowohl der Basen als auch der Primern an die DNA Einzelstränge. Nach dieser Phase, die 60 Sekunden dauert, beginnt ein neuer Zyklus mit einer erneuten Trennung der gebildeten DNA-Doppelstränge in Einzelstränge. Dieser Vorgang erfolgt wieder bei einer Temperatur von 94°C (temperature transition rate 20°C/Sekunde). Die PCR endet mit einer Abkühlung auf 40°C für 20 Sekunden (temperature

transition rate 20°C/Sekunde). Jetzt kann direkt die Auswertung der aufgezeichneten Fluoreszenzkurven erfolgen.

#### 2.4.11 Versuchsprotokoll der GAPDH-qRT-PCR

<b>Primersequenz GAPDH-Primer</b>
GAPDH forward Primer 5'CCC CAC ACA CAT GCA CTT ACC3'
GAPDH reverse Primer 5'CCT AGT CCC AGG GCT TTG ATT3'
GAPDH Sonde 5'(VIC)TAG GAA GGA CAG GCA AC(TAMRA)
<b>PCR-Mix</b>
10,0 µl Kit
0,75 µl GAPDH forward
0,75 µl GAPDH reverse
1,0 µl Sonde
2,5 µl Aqua dest.
5 µl DNA
<b>LightCycler</b>
15 min 95°C
10 s 94°C
1 min 60°C
20 s 40°C
Temperature transition rate 20°C/s 60 Zyklen

#### 2.5 Agarosegelelektrophorese

Bei einigen Proben wurde zur Überprüfung der Ergebnisse der Fluoreszenzkurven im Anschluss an die qRT-PCR eine elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten. Das

pflanzliche Polysaccharid Agarose bildet in dem Gel netzähnliche Strukturen aus, durch die während der Elektrophorese, die Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe hindurch wandern. Hierdurch findet eine allmähliche Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe statt, wobei die kleinsten Fragmente am schnellsten, das heißt am weitesten, wandern.

Verwendet wurde ein 2%iges Gel. Hierzu werden 1,6 g Agarose (Agarose NEEO, Rotigarose, Carl Roth GmbH +Co) mit 80 ml TAE 5x Puffer vermischt und in einer Mikrowelle erhitzt. Für den TAE-Puffer werden 242 g Tris-Base 57 mit 1 ml Eisessig und 100 ml 0,5 M EDTA vermischt und das Gemisch mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt. Da es sich hierbei um einen 50x Puffer handelt, muss der Puffer noch weiter verdünnt werden, um die gewünschte Konzentration zu erhalten. Hierzu werden 20 ml der Pufferlösung zu 980 ml Aqua dest. hinzugefügt.

Nachdem sich die Agarose während des Aufkochens aufgelöst hat und etwas unter vorsichtigem Schütteln abgekühlt ist, werden 0,1 µl Ethidiumbromid (EtBr) pro ml Gel, also bei diesem Gel insgesamt 8,0 µl Ethidiumbromid, hinzugefügt. Da es sich hierbei um eine mutagene Substanz handelt, ist bei der Handhabung äußerste Vorsicht angebracht. Zum Schutz sind Nitrithandschuhe zu tragen. Diese Mischung wird nun vorsichtig verrührt. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen entstehen, da diese die elektrophoretische Aufteilung behindern können. Wenn sich das Ethidiumbromid gut verteilt hat, wird die Lösung in eine Gelkammer (OWL Gelkammer) gegossen.

Anschließend wird ein schmaler Kamm an einem Ende eingesetzt. Nachdem

das Gel abgekühlt und damit fest geworden ist, wird der Kamm vorsichtig entfernt, wodurch sogenannte Slots, kleine Taschen, in die später die DNA-Lösungen hinein pipettiert werden, entstehen. Das Gel wird anschließend so in die Kammer gestellt, dass die Slots auf der Seite der Anode liegen. Nun wird TAE 5x Puffer in die Kammer gegeben, bis das Gel vollständig bedeckt ist.

Danach werden die Marker und die DNA-Lösungen vorbereitet. Für die Marker-Lösung werden 2,0 µl Marker mit 2,0µl Farbstoff und 3,0µl Wasser vermischt. Die DNA-Lösung besteht aus 8,0µl DNA und ebenfalls 2,0 µl Farbstofflösung. Zum Anfärben der aufgetrennten DNA-Banden wird ein Stop-Lade-Mix verwendet. Die Lösungen werden in die Gelslots pipettiert. Man muss darauf achten, dass die Slots nicht durchstoßen werden und auslaufen. Nach Abschluss des Pipettierens kann nun die eigentliche Gelelektrophorese beginnen.

Die an die Gelkammer angelegte Spannung beträgt 100 Volt. Die Stromstärke liegt bei 90 mA. Die markierten DNA-Fragmente wandern aufgrund der angelegten Spannung von der Anode zur Kathode. Nach etwa 90 Minuten ist die Elektrophorese beendet, wobei man schon vorher darauf achten sollte, dass die wandernde Farbfront das Gel nicht überschreitet. Droht die Farbfront das Agarosegel zu überschreiten, so muss die Elektrophorese bereits früher beendet werden. Im Anschluss an die Elektrophorese kann das Gel vorsichtig aus der Kammer genommen werden und unter einer UV-Lampe analysiert werden. Das an die Nukleinsäure angelagerte Ethidiumbromid fluoresziert unter dieser Lampe und die DNA-Banden können beurteilt werden. Es besteht außerdem die Möglichkeit das Gel zu fotografieren. Alternativ kann zu Beginn bei der Herstellung des Gels das Ethidiumbromid weggelassen werden. Am Ende der Elektrophorese wird dann das Gel zum Anfärben der DNA-Banden ca. 20



Minuten lang in ein Ethidiumbromid-Färbebad gelegt. Nach der Färbung können die Banden unter der UV-Lampe sichtbar gemacht werden.

### 2.5.1 Versuchsprotokoll der Agarosegelelektrophorese

1 l 50x TAE-Puffer
242 g Tris-Base 57
1 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA
Auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen
1l 5X TAE-Puffer
20 ml 50x TAE-Puffer
980 ml Aqua dest.
<b>Agarose-Gel</b>
1,6 g Agarose
80 ml TAE 5x Puff
Erhitzen, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat
Kurz unter leichtem Schütteln abkühlen lassen
8 µl EtBr
Vorsichtig mischen
Gel in Gelkammer gießen
Kamm in das noch flüssige Gel stellen
Kamm entfernen
<b>Marker-Lösung</b>
2 µl Marker
2 µl Stop-Lade Mix
3 µl Aqua dest.
<b>DNA-Lösung</b>
8 µl DNA
2 µl Stop-Lade-Mix
<b>Elektrophorese</b>
Marker-/DNA-Lösungen in Slots pipettieren
100 Volt
90 mA
90 Minuten laufen lassen
Gel unter UV-Lampe legen, Banden auswerten

## **2.6 Statistische Auswertung**

Bei der Auswertung der Ergebnisse konnte auf statistische Verfahren verzichtet werden. Verglichen wurden jeweils der prozentuale Anteil von Proben mit einem positivem bzw. negativem Ergebnis. Die daraus folgenden Schlussfolgerungen sind wie folgt definiert:

### **2.6.1 Sensitivität**

Die Sensitivität ist die Wahrscheinlichkeit, einen Sachverhalt durch ein positives Testergebnis zu erkennen. Sie gibt den Anteil der korrekt als positiv erkannten Sachverhalte an der Gesamtheit der in Wirklichkeit positiven Sachverhalte an. Die Formel der Sensitivität lautet:

P (korrekt positiv erkannt)

=

Anzahl der richtig positiven / (Anzahl der richtig positiven + Anzahl der falsch negativen)

### **2.6.2 Spezifität**

Die Spezifität eines statistischen Tests beschreibt die Wahrscheinlichkeit, einen negativen Sachverhalt durch ein negatives Testergebnis zu erkennen. Sie gibt den Anteil der richtig als negativ erkannten Sachverhalte an der Gesamtheit der negativen Sachverhalte an.

Die Formel der Spezifität ist:

P (korrekt negativ erkannt)

=

Anzahl der richtig negativen/(Anzahl der richtig negativen + Anzahl der falsch positiven)

### **2.6.3 Positiver prädiktiver Wert**

Der positive prädiktive Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass ein positives Test-Ergebnis auf einem positiven Ergebnis beruht. Er gibt den Anteil der richtig positiv erkannten Ergebnisse an der Gesamtheit der als positiv erkannten Ergebnisse an.

Errechnet wird er durch die Formel:

P (korrekt positiv erkannt)

=

Anzahl der richtig positiven/(Anzahl der richtig positiven + Anzahl der falsch positiven)

### **2.6.4 Negativer prädiktiver Wert**

In der Statistik ist der negative prädiktive Wert eines statistischen Tests die Wahrscheinlichkeit, dass ein negatives Ergebnis auch tatsächlich negativ ist. Dieser Wert gibt den Anteil der richtig als negativ erkannten Ergebnisse an der Gesamtheit der als negativ erkannten Ergebnisse an.

Mit Hilfe der folgenden Formel kann er berechnet werden:

P (korrekt negativ erkannt)

=

Anzahl der richtig negativen/(Anzahl der richtig negativen + Anzahl der falsch negativen)

# Kapitel 3 - Ergebnisse

## 3.1 GAPDH-Real-Time-PCR

### 3.1.1 Ergebnisse

Bei 44 der 45 Serumproben wurde, vor der Untersuchung auf fetale DNA, eine Analyse der Proben unter Verwendung des LightCyclers und des GAPDH-Primers durchgeführt. Durch diesen Untersuchungsschritt wurde überprüft, ob die DNA-Isolation und die PCR erfolgreich waren. Zusätzlich zu den maternalen Blutproben, wurden Proben, die nur männliche DNA enthielten und in der Versuchsreihe als VE-DNA bezeichnet wurde, sowie Proben mit rein weiblicher DNA, die als AM-DNA bezeichnet wurde, bei jedem Reaktionszyklus mit amplifiziert. Außerdem wurde immer eine Probe ohne DNA der qRT-PCR unterzogen. Ein Reaktionslauf wurde nur dann gewertet, wenn bei der Leerprobe keine Fluoreszenz detektiert wurde und die DNA-Probe amplifiziert werden konnte. In Tab. 3.1 und 3.2 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung aufgeführt.

Fall	Geschlecht	Anzahl PCR	Positiv	Negativ
108	XY	1	1	
112	XY	1	1	
117	XY	2	2	
118	XY	1	1	
123	XY	1	1	
126	XY	1	1	

132	XY	1	1	
139	XY	1	1	
212	XY (47+21)	1	1	
213	XY	1	1	
214	XY	1	1	
216	XY	1	1	
217	XY	1	1	
220	XY	1	1	
221	XY	1	1	
223	XY	1	1	
225	XY	1	1	
232	XY	1	1	
234	XY	1	1	
236	XY (47+21)	1	1	
W01	XY	4	4	
W02	XY	2	2	
W10	XY	2	2	
W19	XY	2	2	

Tabelle 3.1: GAPDH-qRT-PCR, männliche Serumproben

Anzahl PCR = durchgeführte PCR

positiv = DNA-Nachweis

negativ = kein DNA-Nachweis

Fall	Geschlecht	Anzahl PCR	Positiv	Negativ
105	XX	1	1	
109	XX	1	1	
111	XX	1	1	
116	XX	1	1	
119	XX	1	1	
122	XX	1	1	
125	XX	1	1	
138	XX	1	1	
215	XX	1	1	
218	XX	1	1	
219	XX	1	1	
222	XX	1	1	
224	XX	1	1	

226	XX	1	1	
227	XX	1	1	
228	XX	1	1	
229	XX	1	1	
230	XX	1	1	
231	XX	1	1	
233	XX	1	1	

Tabelle 3.2: GAPDH-qRT-PCR, weibliche Serumproben

Anzahl PCR = durchgeführte PCR

positiv = DNA-Nachweis

negativ = kein DNA-Nachweis

Bei den Proben Nummer 236 und 212 lag eine Trisomie 21 vor. Als Beispiel eines Reaktionslaufes mit GAPDH-Primern ist die Abb. 3.1 angeführt. Die schlechte Abbildungsqualität ist darauf zurückzuführen, dass es sich bei den Kurvenzügen um die damaligen nicht bearbeitbaren Originalkurven des LyghtCyclers handelt. Anhand dieses Ergebnisses lässt sich auf eine erfolgreiche DNA-Isolierung der hier untersuchten Proben schließen.

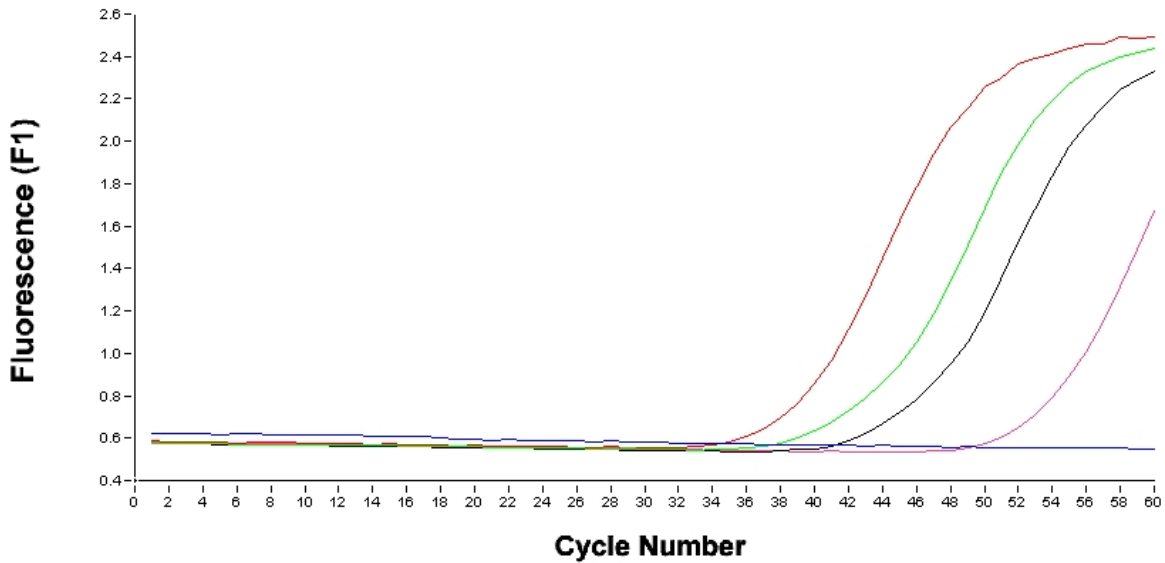


Abbildung 3.1: Beispiel eines Reaktionslaufes mit GAPDH-Primern

Blau = Leerprobe

Grün = AM-DNA = DNA-Probe einer nicht-schwangeren Frau

Braun = VE-DNA = DNA-Probe eines Manns

Schwarz = Probe 118 = Serum einer Schwangeren, fetaler Genotyp 46, XY

Lila = Probe 123 = Serum einer Schwangeren, fetaler Genotyp 46, XY

### 3.1.2 Auswertung

Da es bei dieser Untersuchung um eine generelle Überprüfung auf vorhandene DNA und erfolgreiche PCR ging, und bei einem negativen Ergebnis eine Neuisolierung der DNA vorgenommen worden wäre, wurde bei dieser Untersuchung nur eine qRT-PCR Untersuchung pro Probe vorgenommen. Die Tabelle 3.3 stellt einen kurzen, zusammenfassenden Überblick über die Anzahl der untersuchten Blutproben dar. Sowohl die Sensitivität, als auch die Spezifität dieser Untersuchung lag bei 1,0.



	Männliche Feten	Weibliche Feten	Summe
GAPDH positiv	24	20	44
GAPDH negativ	0	0	0
Summe	24	20	44

Tabelle 3.3: Zusammenfassung GAPDH-qRT-PCR  
GAPDH positiv = DNA-Nachweis  
GAPDH negativ = kein DNA-Nachweis

### 3.1.3 Vergleich TaqMan mit LightCycler

Da die meisten publizierten Untersuchungen bisher mit Hilfe des TaqMans durchgeführt wurden, kam bei einer kleinen Probenanzahl neben dem LightCycler-Gerät auch das Gerät TaqMan zur Anwendung. Auch bei den später angewandten Primern SRY und DYS14 wurde die Übertragbarkeit der Primer vom LightCycler auf den TaqMan anhand einer kleinen Anzahl von Proben miteinander verglichen. So wurden bei dieser Versuchsreihe der LightCycler und der TaqMan anhand von vier Blutproben miteinander verglichen. Wie in Tab. 3.4 dargestellt, wurden hierbei übereinstimmende Ergebnisse erzielt.

Proben	LightCycler		TaqMan	
	GAPDH positiv	GAPDH negativ	GAPDH positiv	GAPDH negativ
W01	4/4 (100%)		2/2 (100%)	
W02	2/2 (100%)		2/2 (100%)	
W10	2/2 (100%)		2/2 (100%)	
W19	2/2 (100%)		2/2 (100%)	

Tabelle 3.4: Vergleich LightCycler - TaqMan  
GAPDH positiv = DNA-Nachweis  
GAPDH negativ = kein DNA-Nachweis

## 3.2 SRY-Real-Time-PCR

### 3.2.1 Ergebnisse

Um zu Beginn der Versuchsreihe zu überprüfen, ob der Reaktionsablauf mittels SRY Primer überhaupt von dem TaqMan auf den LightCycler zu übertragen ist, wurde zunächst eine Leerprobe, ein Probe mit rein männlicher DNA (im Folgenden als VE-DNA bezeichnet) und eine Probe mit rein weiblicher DNA (AM-DNA genannt) untersucht. Hiermit konnte der jeweilige Reaktionslauf kontrolliert werden. Die Abb. 3.2 zeigt einen optimalen Kurvenverlauf. Die schlechte Abbildungsqualität ist darauf zurückzuführen, dass es sich bei den Kurvenzügen um die damaligen nicht bearbeitbaren Originalkurven des LyghtCyclers handelt.

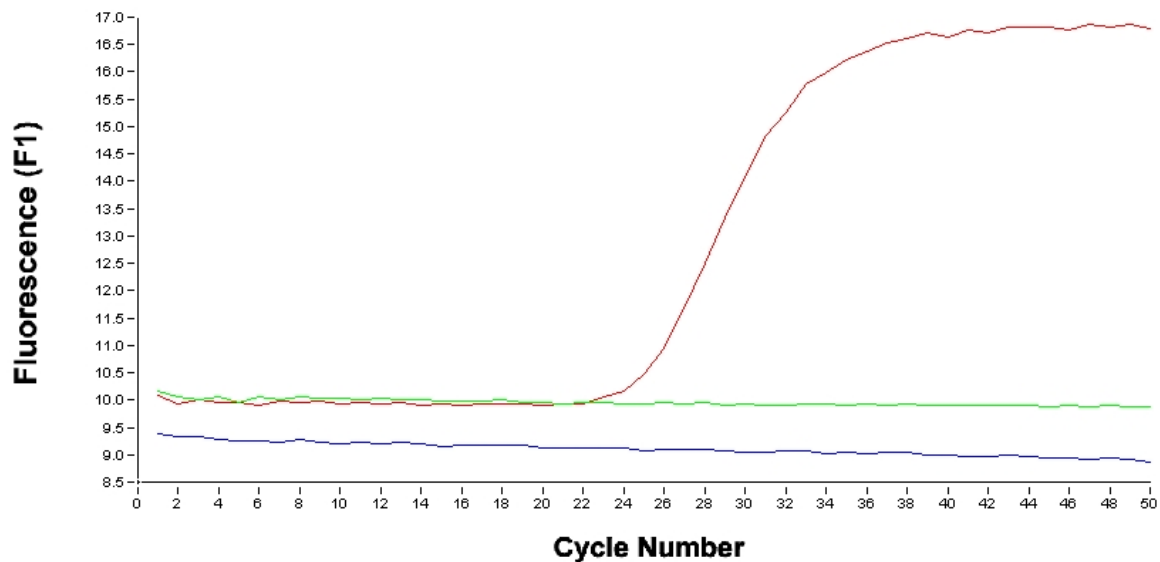


Abbildung 3.2: Optimaler Kurvenverlauf einer PCR mit SRY-Primer  
Blau = Leerprobe  
Grün = AM-DNA = DNA-Probe einer nicht-schwangeren Frau  
Braun = VE-DNA = DNA-Probe eines Manns

Insgesamt wurden 45 Blutproben unter Verwendung des SRY-Primers mittels Real-Time-PCR untersucht. Das verwendete qRT-PCR-Gerät war in allen Fällen der LightCycler. Eine Auflistung der in dieser Arbeit untersuchten Probennummern, des Geschlechts, der Anzahl der qRT-PCR-Reaktionen und des Ergebnisses der qRT-PCR sind in Tab.3.5 und 3.6 zu finden.

Fall	Geschlecht	Anzahl PCR	Positiv	Negativ	Bewertung
108	XY	10	3	7	Negativ
112	XY	2	2		Positiv
117	XY	10	2	8	Negativ
118	XY	4	3	1	Positiv
123	XY	6	1	5	Negativ
126	XY	4	2	2	Negativ
132	XY	8	1	7	Negativ
139	XY	7	1	6	Negativ
212	XY (47+21)	10		10	Negativ
213	XY	6		6	Negativ
214	XY	6		6	Negativ
216	XY	4	1	3	Negativ
217	XY	2		2	Negativ
220	XY	4		4	Negativ
221	XY	2		2	Negativ
223	XY	2		2	Negativ
225	XY	2		2	Negativ
232	XY	6		6	Negativ
234*	XY	8		8	Negativ
235*	XY	2		2	Negativ
236	XY (47+21)	8		8	Negativ
W01	XY	2	2		Positiv
W02	XY	2		2	Negativ
W10	XY	2		2	Negativ

W19	XY	2	2	Negativ
	25 Proben XY			3/25 positiv

Tabelle 3.5: SRY-qRT-PCR, männliche Serumproben

Anzahl PCR = durchgeführte PCR

positiv = DNA-Nachweis

negativ = kein DNA-Nachweis

Fall	Geschlecht	Anzahl PCR	Positiv	Negativ	Bewertung
105	XX	3		3	Negativ
109	XX	3		3	Negativ
111	XX	4		4	Negativ
116	XX	6		6	Negativ
119	XX	3		3	Negativ
122	XX	2		2	Negativ
125	XX	2		2	Negativ
138	XX	2		2	Negativ
215	XX	6		6	Negativ
218	XX	2		2	Negativ
219	XX	2		2	Negativ
222	XX	2		2	Negativ
224	XX	2		2	Negativ
226	XX	6		6	Negativ
227	XX	2		2	Negativ
228	XX	2		2	Negativ
229	XX	2		2	Negativ
230	XX	2		2	Negativ
231	XX	2		2	Negativ
233	XX	2		2	Negativ
	20 Proben XX				0/20 positiv

Tabelle 3.6: SRY-qRT-PCR, weibliche Serumproben

Anzahl PCR = durchgeführte PCR

positiv = DNA-Nachweis

negativ = kein DNA-Nachweis

Bei den Proben 212 und 236 lag eine Trisomie 21 vor. Bei den mit \* gekennzeichneten Proben handelt es sich um Blutproben, die zwei Frauen einen Tag nach der Entbindung eines Sohnes entnommen wurden.

Ein Reaktionslauf wurde nur dann gewertet, wenn die Probe mit der männlichen Probe positiv detektiert wurde und sowohl die weibliche, als auch die Leerprobe ein negatives Resultat erbrachten. Mögliche Fehler der Reaktion, die z.B. durch unsachgemäßes Pipettieren hätten zustande kommen können, konnten auf diesem Weg frühzeitig erkannt und eliminiert werden. So konnte die Anzahl an falsch negativen Ergebnissen reduziert werden. Zusätzlich konnten auf diesem Wege auch mögliche Kontaminationen der Reaktionslösungen entdeckt werden und falsch positive Reaktionen vermieden werden. Nach der qRT-PCR konnte anhand der Aufzeichnung des Kurvenverlaufs der emittierten Fluoreszenz die DNA-Amplifikation beurteilt werden. Bei insgesamt 10 Blutproben, die von Frauen stammten, die mit einem männlichen Feten schwanger waren, war es möglich, die männliche fetale DNA nachzuweisen. In 8 dieser 10 Proben zeigte ein Teil dieser Untersuchungen allerdings ein negatives Ergebnis. Als Beispiel seien hier in der Abbildung 3.3 die Proben 108 und 117 angeführt. Die schlechte Abbildungsqualität ist darauf zurückzuführen, dass es sich bei den Kurvenzügen um die damaligen nicht bearbeitbaren Originalkurven des LyghtCyclers handelt.

In 14 der 24 männlichen Proben ließ sich während keiner qRT-PCR männliche fetale DNA nachweisen.

Bei allen untersuchten Blutproben von Frauen, die mit einem weiblichen Feten schwanger waren, konnte keine männliche DNA nachgewiesen werden. Auch bei den beiden Proben, die von Frauen stammen, die einen Tag vor der

Blutentnahme einen Jungen geboren hatten, fand kein Nachweis männlicher DNA statt.

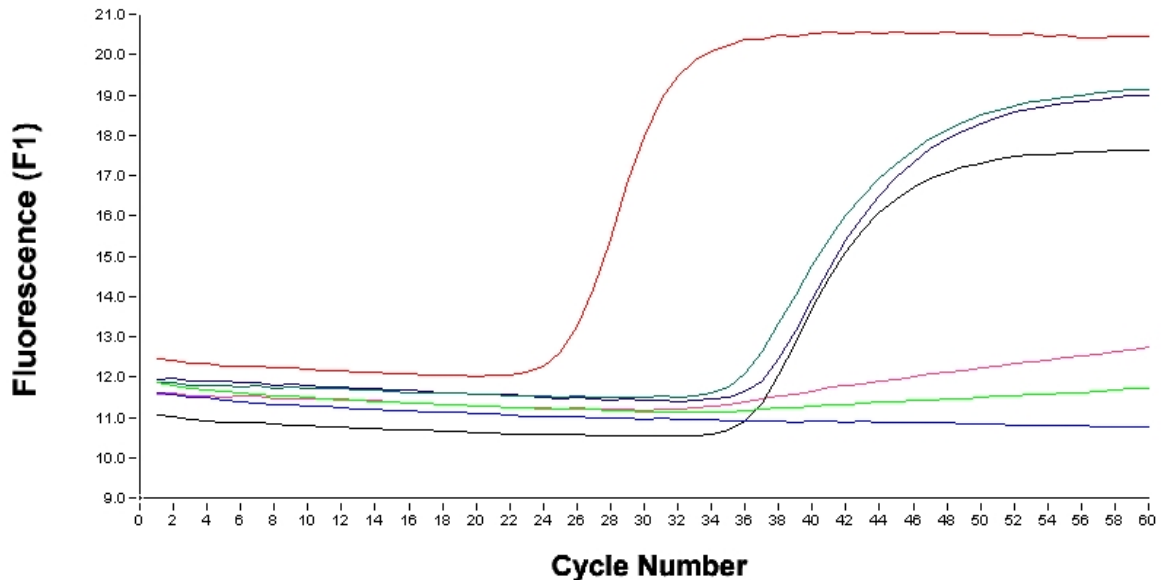


Abbildung 3.3: Nachweis männlicher fetaler DNA mittels SRY-Primer

Blau = Leerprobe

Grün = AM-DNA = DNA-Probe einer nicht-schwangeren Frau

Braun = VE-DNA = DNA-Probe eines Manns

Schwarz = Probe 108 = männliche fetale DNA = positiv

Lila = Probe 108 = männliche fetale DNA = falsch negativ

Dunkelgrün = Probe 117 = männliche fetale DNA = positiv; nach Gesamtauswertung negativ

Dunkelbraun = Probe 117 = männliche fetale DNA = positiv; nach Gesamtauswertung negativ

### 3.2.2 Auswertung

Problematisch bei der Auswertung der erhaltenen PCR-Ergebnisse war vor allem, dass ein Nachweis der männlichen Proben nicht konstant möglich war. So konnte eine DNA-Probe, die beispielsweise in einem Lauf zweimal parallel amplifiziert wurde, einmal korrekt positiv detektiert werden, während sie das zweite Mal keine Fluoreszenz aufwies und somit als negativ gewertet wurde. Das hatte für diese Versuchsreihe zur Folge, dass der Anteil an korrekten DNA-

Nachweisen der männlichen Proben in Abhängigkeit von der Anzahl der Versuche zwischen 12,5% und 100% schwankte. Da es sich um erhebliche Unterschiede bezüglich der Zuverlässigkeit des Nachweises der fetalen DNA handelt, wurden in dieser Arbeit nur solche Proben als positiv gewertet, bei denen in über 50% der Ansätze die männliche DNA korrekt detektiert wurde. In Tab.3.5 ist eine Übersicht über die Auswertung dieser Proben dargestellt.

So wurden von den ursprünglich 10 positiven männlichen Proben letztendlich nur 3 als positiv gewertet. Dieses Ergebnis entspricht einer Sensitivität des SRY-Primers von 0,13 und einer Spezifität von 1. Der positive prädiktive Wert dieser Analyse beträgt 1, der negative prädiktive Wert liegt bei 0,5. Eine Zusammenfassung dieser Versuchsreihe ist in Tab. 3.7 zu sehen. Die beiden Serumproben, die einen Tag nach der Entbindung entnommen worden waren, wurden für die Sensitivitäts- und Spezifitätsbestimmung nicht berücksichtigt.

	Männliche Feten	Weibliche Feten	Summe
SRY positiv	3	0	3
SRY negativ	20	20	40
Summe	23	20	43

Tabelle 3.7: Zusammenfassung SRY-qRT-PCR  
 positiv = DNA-Nachweis  
 negativ = kein DNA-Nachweis

### 3.2.3 Vergleich positive - negative DNA-Proben

Auch bei den als negativ gewerteten DNA-Proben wurde vereinzelt fetale DNA nachgewiesen. Daher wurden diese Ergebnisse noch einmal daraufhin überprüft, ob es bei diesen Proben (positiv bei unter 50% der Reaktionsläufe) hinsichtlich des Zyklus, in dem die Fluoreszenz der Proben detektiert wurden, Unterschiede

zu den als positiv gewerteten Proben (positiv bei über 50% der Reaktionen) gab. Hierfür wurde aufgeschlüsselt, in welchen Zyklen die DNA der positiven Proben detektiert wurde (Tab. 3.8).

Probe	Zyklusnr.
112	33
	33
118	36
	36
	37
W01	36
	39
Mittelwert	35,7
Median	36

Tabelle 3.8: PCR-Zyklen Positive DNA-Proben

Anschließend wurden auch die als negativ bewerteten DNA-Proben, bei denen es in Einzelfällen zu einer DNA-Amplifikation kam, daraufhin untersucht, in ab welchem Zyklus der DNA-Nachweis erfolgte. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Tab. 3.9 dargestellt.

Probe	Zyklusnr.
108	33
	36
	39
117	35
	37
123	37
126	35
	36
132	37
139	37



216	34
Mittelwert	36
Median	36

Tabelle 3.9: PCR-Zyklen Negative DNA-Proben

Die Proben, bei denen in über 50% der Fälle fetale DNA nachgewiesen werden konnte, unterschieden sich von den Proben, die nur in vereinzelter Reaktionen korrekt erkannt wurden weder in Median noch im Mittelwert. Abschließend lässt sich feststellen, dass die Zykluszahlen, nach denen die Fluoreszenz der Proben detektiert worden sind, sich im Mittelwert nur minimal voneinander unterscheiden, so dass anhand dieser Werte keine weiteren Schlüsse gezogen werden können.

### 3.2.4 TaqMan

Um zu überprüfen, ob eine Übertragung der auf dem TaqMan etablierten SRY-Primer auf den LightCycler gelungen ist, wurden vier Blutproben sowohl mit dem TaqMan als auch mit dem LightCycler einer qRT-PCR unterzogen. Bei allen vier Blutproben war die Frau mit einem männlichen Feten schwanger. Der Ergebnissvergleich der PCR, die mit beiden Geräten durchgeführt wurden, ist in Tab. 3.10 zu sehen.

Wie bereits in der angeführten Tabelle zu erkennen, kann der verwendete Primer bei beiden Real-Time-PCR-Geräten zur Anwendung kommen.

Proben	LightCycler		TaqMan	
	SRY positiv	SRY negativ	SRY positiv	SRY negativ
W01	2/2 (100%)		2/2 (100%)	
W02		2/2 (100%)		2/2 (100%)
W10		2/2 (100%)		2/2 (100%)
W19		2/2 (100%)		2/2 (100%)

Tabelle 3.10: Vergleich LightCycler – TaqMan

### **3.3 *DYS14-Real-Time-PCR***

#### **3.3.1 Ergebnisse**

Da die Ergebnisse der qRT-PCR, die zum Nachweis der sehr kurzen SRY-Sequenz durchgeführt worden waren, nicht den Erwartungen entsprachen, wurden die Proben unter Verwendung des *DYS14*-Primer zum Nachweis der wesentlich längeren repetitiven *DYS14*-Sequenz in der zweiten Versuchsreihe amplifiziert und analysiert. Insgesamt wurden für diese Untersuchungsreihe 44 Blutprobeneingesetzt. Auch bei diesen Versuchen wurde die qRT-PCR mit dem LightCycler durchgeführt. Bei zwei Proben war wiederum eine Trisomie 21 bekannt (Probe 212 und 236). Eine Blutprobe wurde erst einen Tag nach der Entbindung eines Jungen entnommen und auf noch eventuell vorhandene männliche fetale DNA in mütterlichem Serum hin untersucht.

Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der qRT-PCR in Tab. 3.11 und 3.12 aufgelistet. Zur Kontrolle der Ergebnisse wurden in jedem Reaktionslauf eine Leerprobe, eine rein männliche (VE-DNA) und eine rein weibliche DNA Probe (AM-DNA) mit amplifiziert. Ein Reaktionslauf wurde nur dann gewertet, wenn

die männliche Probe korrekt als solche erkannt wurde und sowohl die Leerprobe, als auch die weibliche DNA-Probe keine Fluoreszenz zeigten.

Fall	Geschlecht	Anzahl PCR	Positiv	Negativ	Bewertung
108	XY	2	2		Positiv
112	XY	2	2		Positiv
117	XY	2	2		Positiv
118	XY	2	2		Positiv
123	XY	2	1	1	Positiv
126	XY	2	2		Positiv
132	XY	2	2		Positiv
139	XY	2	2		Positiv
212	XY (47+21)	2	2		Positiv
213	XY	2	2		Positiv
214	XY	2	2		Positiv
216	XY	2	2		Positiv
217	XY	4	4		Positiv
220	XY	2	2		Positiv
221	XY	2	2		Positiv
223	XY	2	2		Positiv
225	XY	4	1	3	Negativ
232	XY	2	1	1	Positiv
234*	XY	2		2	Negativ
236	XY (47+21)	2	1	1	Positiv
W01	XY	4	4		Positiv
W02	XY	2		2	Negativ
W10	XY	2	1	1	Positiv
W19	XY	2	1	1	Positiv
	24 Proben XY		22/24	8/24	21/24

Tabelle 3.11: DYS14-qRT-PCR, männliche Serumproben  
 Anzahl PCR = durchgeführte PCR  
 positiv = DNA-Nachweis  
 negativ = kein DNA-Nachweis

Fall	Geschlecht	Anzahl PCR	Positiv	Negativ	Bewertung
105	XX	2		4	negativ
109	XX	4		4	negativ
111	XX	4		4	negativ
116	XX	4	2	2	positiv
119	XX	4		4	negativ
122	XX	2		2	negativ
125	XX	2		2	negativ
138	XX	2		2	negativ
215	XX	2	1	1	positiv
218	XX	2		2	negativ
219	XX	2		2	negativ
222	XX	2		2	negativ
224	XX	2		2	negativ
226	XX	2		2	negativ
227	XX	2		2	negativ
228	XX	2		2	negativ
229	XX	2		2	negativ
230	XX	2		2	negativ
231	XX	2		2	negativ
233	XX	2		2	negativ
	20 Proben XX				2/20 positiv

Tabelle 3.12: DYS14-qRT-PCR, weibliche Serumproben  
Anzahl PCR = durchgeführte PCR  
positiv = DNA-Nachweis  
negativ = kein DNA-Nachweis

### 3.3.2 Auswertung

Da auch diese Reaktionen mittels qRT-PCR durchgeführt wurden, konnte die Auswertung der Fluoreszenzkurven im unmittelbaren Anschluss an die PCR erfolgen. Bei 22 der insgesamt 24 untersuchten Blutproben konnte mit Hilfe des

DYS14-Primers männliche DNA detektiert werden. In Abb. 3.4 ist ein qRT-PCR-Lauf als Beispiel für den positiven Nachweis männlicher DNA angeführt. Die schlechte Abbildungsqualität ist darauf zurückzuführen, dass es sich bei den Kurvenzügen um die damaligen nicht bearbeitbaren Originalkurven des LyghtCyclers handelt.

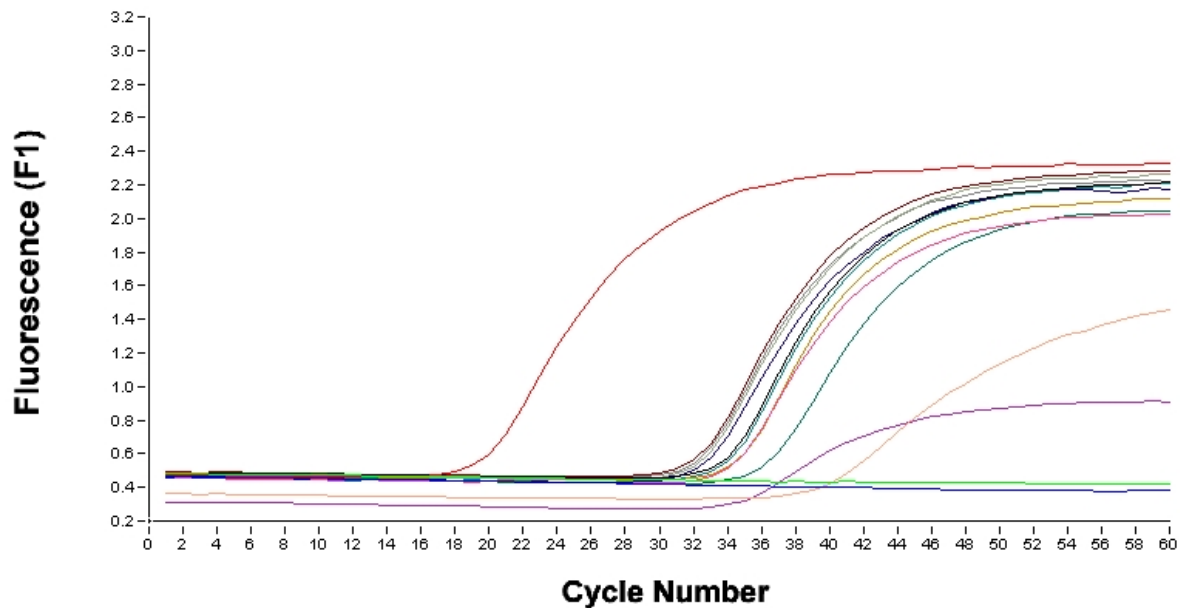


Abbildung 3.4: Positive PCR mit DYS 14-Primer

Blau = Leerprobe

Grün = AM-DNA = DNA-Probe einer nicht-schwangeren Frau

Braun = VE-DNA = DNA-Probe eines Manns

Schwarz = Probe 108 = männliche fetale DNA = positiv

Lila = Probe 108 = männliche fetale DNA = falsch negativ

Dunkelgrün = Probe 139 = männliche fetale DNA = positiv

Dunkelbraun = Probe 216 = männliche fetale DNA = positiv

Hellgrau = Probe 216 = männliche fetale DNA = positiv

Rosa = Probe 220 = männliche fetale DNA = positiv

Dunkellila = Probe 220 = männliche fetale DNA = positiv

Ocker = Probe 221 = männliche fetale DNA = positiv

Türkis = Probe 221 = männliche fetale DNA = positiv

Braun = Probe 223 = männliche fetale DNA = positiv

Dunkelgrau = Probe 223 = männliche fetale DNA = positiv

Wie in der vorhergehenden Versuchsreihe mit dem SRY-Primer wurde ein Ergebnis nur dann als positiv gewertet, wenn in mindestens der Hälfte der durchgeführten Reaktionsläufe eine DNA-Amplifikation nachgewiesen werden konnte. Die Auswertung der positiven Reaktionsergebnisse ist in den Tab. 3.11 und 3.12 dargestellt.

Von den 22 korrekt positiv detektierten Proben gingen nach dieser Auswertung noch 21 als positiv in die endgültige Wertung ein. Die beiden weiblichen Proben, mussten als (falsch) positiv bewertet werden, da sie in 2 von 4 bzw. 1 von 2 Versuchen ein positives Ergebnis zeigten. In Abbildung 3.5 ist ein Beispiel für eine falsch positive Reaktion zu sehen. Die schlechte Abbildungsqualität ist darauf zurückzuführen, dass es sich bei den Kurvenzügen um die damaligen nicht bearbeitbaren Originalkurven des LyghtCyclers handelt.

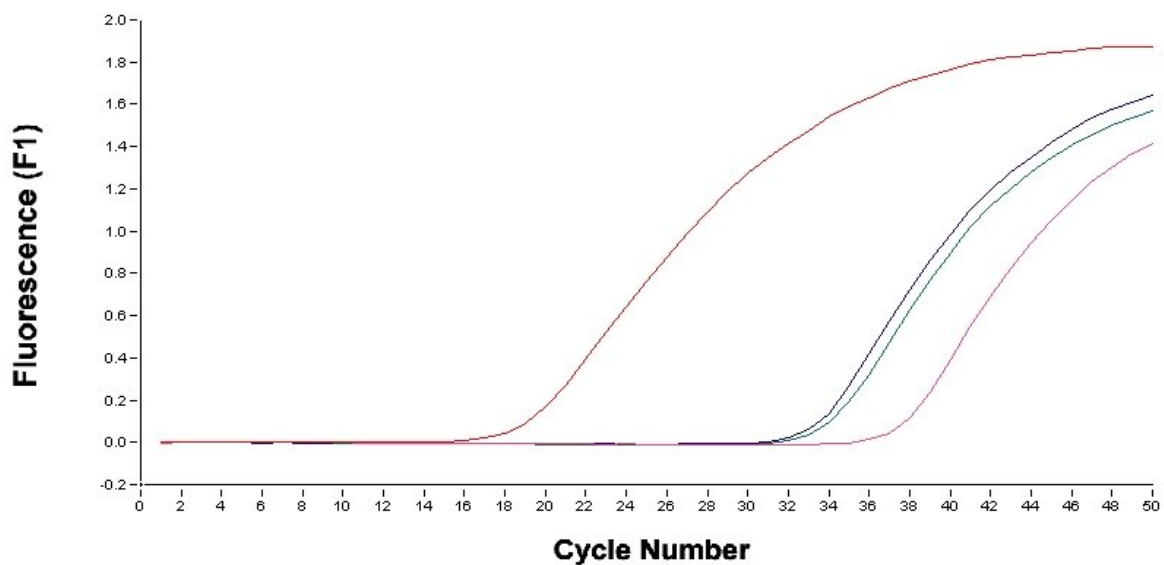


Abbildung 3.5: Falsch positive PCR mit DYS 14-Primer  
 Braun = VE-DNA = DNA-Probe eines Manns  
 Lila = Probe 215 = weibliche fetale DNA = falsch positiv  
 Dunkelgrün = Probe 112 = männliche fetale DNA = positiv  
 Dunkelbraun = Probe 112 = männliche fetale DNA = positiv

Somit ergibt sich für den DYS14-Primer im Vergleich zum SRY-Primer zwar eine wesentlich höhere Sensitivität, nämlich 0,91, jedoch ist dieser Primer auch unspezifischer. Die Spezifität dieses Primers liegt bei 0,9. Hieraus ergibt sich ein positiver prädiktiver Wert von 0,91, sowie ein negativer prädiktiver Wert von 0,9. Die Serumprobe, die einen Tag nach der Entbindung entnommen worden war, wurde für die Sensitivitäts- und Spezifitätsbestimmung nicht berücksichtigt. In Tab. 3.13 sind die Ergebnisse, die mittels DYS14-Primer erzielt wurden noch einmal zusammengefasst.

	Männliche Feten	Weibliche Feten	Summe
DYS positiv	21	2	23
DYS negativ	2	18	20
Summe	23	20	43

Tabelle 3.13: Zusammenfassung SRY-qRT-PCR

positiv = DNA-Nachweis

negativ = kein DNA-Nachweis

### 3.3.3 Vergleich positive - negative DNA-Proben

Wie bereits bei dem SRY-Primer wurde auch bei dem DYS14-Primer überprüft, ab welchem Zyklus jeweils ein positives Ergebnis während der qRT-PCR registriert wurde. Die Aufstellung ist in den Tab. 3.14, 3.15 und 3.16 zu sehen.

Probe	Zyklusnr.
108	34
	34
112	33
	34
117	34

	35
118	46
	46
123	49
126	33
	33
132	33
	34
139	36
212	35
	36
213	36
	36
214	35
	36
216	32
	32
217	33
	33
	34
	34
220	35
	40
221	34
	35
223	32
	32
232	37
236	35
W01	33
	33
	34
	34
W10	39
W19	35
Mittelwert	35,4
Median	35

Tabelle 3.14: PCR-Zyklen positive Proben



Probe	Zyklusnr.
116	34
	34
215	35
Mittelwert	34,3
Median	34

Tabelle 3.15: PCR-Zyklen falsch positive Proben

Probe	Zyklusnr.
225	33

Tabelle 3.16: PCR-Zyklen negative Proben

### 3.3.4 TaqMan

Auch mit dem DYS14-Primer fand eine Versuchsreihe mit dem TaqMan-Gerät statt. Das Ergebnis ist in Tab. 3.17 gezeigt.

Proben	LightCycler		TaqMan	
	DYS 14 positiv	DYS 14 negativ	DYS 14 positiv	DYS 14 negativ
W01	2/2 (100%)		2/2 (100%)	
W02		2/2 (100%)		2/2 (100%)
W10	1/2 (50%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)
W19	1/2 (50%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)

Tabelle 3.17: Vergleich LightCycler – TaqMan

Wie bereits in der angeführten Tabelle zu erkennen, kann der DYS14-Primer bei beiden Geräten zur Anwendung kommen.

### **3.4 Vergleich SRY und DYS14-Primer**

Ein abschließender Vergleich der beiden zum Nachweis fetaler DNA angewandten Primer - SRY und DYS14 - ist in Tab. 3.20 aufgeführt.

	SRY-Primer	DYS14-Primer
Richtig Positiv (%)	13	91,3
Falsch Positiv (%)	0	10
Richtig Negativ (%)	100	90
Falsch Negativ (%)	87	8,7
Sensitivität	0,13	0,91
Spezifität	1	0,9
Positiver prädiktiver Wert	1	0,91
Negativer prädiktiver Wert	0,5	0,9

Tabelle 3.20: Vergleich SRY und DYS14-Primer

# Kapitel 4 - Diskussion

## *4.1 Möglichkeiten der Pränataldiagnostik*

### **4.1.1 Amniozentese**

Bereits im 19. Jahrhundert wurden die ersten Amnionpunktionen durchgeführt, die allerdings der Entlastung eines Polyhydramnion dienten [Lambl, 1881] [Schatz, 1882] [Henkel et al., 1919]. Erst Mitte des 20. Jahrhunderts wurde diese Methode, nachdem es in den 60er Jahren gelungen war, den fetalen Karyotyp zu bestimmen [Valenti et al., 1968], auch zur Pränataldiagnostik angewandt. Die Untersuchung wird meist zwischen der 15. und 18. SSW durchgeführt, da es bei früher in der Schwangerschaft durchgeführten Punktionen zu Fehlbildungen des Feten kommen kann. Aufgrund der Invasivität kann es zu Komplikationen wie abdominellen Schmerzen, Fruchtwasserabgang, vorzeitigen Wehen, intra-uterinen Infektionen sowie zu einem Spontanabort gesunder Feten kommen. Eine Untersuchung von 2002-2003 der Human Genetics Commission in England zeigte, dass bei den in diesem Zeitraum durchgeführten 30.000 Amniozentesen und 8.000 CVS insgesamt 460 Fehlgeburten auftraten. Daher sollte die Indikation für dieses Verfahren streng abgewogen werden.

In erster Linie besteht eine Altersindikation und erst in zweiter Linie eine genetische Indikation für diese Untersuchung. Sie wird seit 30 Jahren als Routineverfahren eingesetzt. Mit der zunehmenden Anzahl spätgebärender Frauen ist es somit nicht nur aus ökonomischer Sicht sinnvoll, alternative

Methoden zur invasiven Pränataldiagnostik zu finden. Problematisch ist, dass die Schwangeren sich bei der Untersuchung in der 15.-16. SSW befinden sollen. Bei genetischer Indikation liegt das Ergebnis häufig erst in der 22. SSW vor. Dieser späte Zeitpunkt stellt eine nicht zu unterschätzende psychische Belastung dar. Sollte sich die Schwangere nach Erhalt eines pathologischen Befundes zu einem Abbruch der Schwangerschaft entscheiden, so kann es angesichts des späten Zeitpunkts zu Komplikationen während des Abbruchs kommen.

#### **4.1.2 Chorionzottenbiopsie**

Die Chorionzottenbiopsie steht seit etwa 20 Jahren zur Pränataldiagnostik zur Verfügung. Erstmals wurde Ende der 60er Jahre eine pränatale Diagnostik mittels dieser Methode durchgeführt [Mohr et al., 1968], aber es sollte noch bis Mitte der 80er Jahre dauern bis sich diese Methode durch die stetig verbesserte Ultraschalltechnik durchsetzen konnte. Der Vorteil ist eine relativ frühe Durchführbarkeit der Untersuchung. Bereits im 1. Schwangerschaftstrimenon kann eine Biopsie der Chorionzotten durchgeführt werden.

Aufgrund eines erhöhten Risikos für Missbildungen der Extremitäten empfiehlt es sich, die Untersuchung jedoch erst ab der 10. SSW durchzuführen. Den Schwangeren liegt dadurch meist schon in der 12. SSW ein Ergebnis der genetischen Untersuchung vor. Allerdings kommt es in circa 1-2% der Fälle zu zytogenetischen Unterschieden zwischen dem chromosomalen Befund der Chorionzotten und dem tatsächlichen fetalen Chromosomensatz [Hahnemann et al., 1997]. Meist liegt in diesen Fällen eine Trisomie der Zytotrophoblasten der Plazenta vor. [Kalousek et al., 1983] Ein pathologischer CVS-Befund erfordert

eine intensive genetische Beratung der Frau und eine anschließende Amniozentese.

Hier könnte die Bestimmung fetaler DNA im Blut der Mutter eine zusätzliche Belastung durch einen erneuten invasiven Eingriff ersparen. Da es sich in der Regel um einen vaginalen invasiven Eingriff handelt besteht ein höheres Risiko einer intrauterinen Infektion. Außerdem kommt es bei einem Teil der Schwangeren zu vaginalen Blutungen oder zur Ausbildung eines intrauterinen Hämatoms. Wie bei der Amniozentese besteht auch bei diesem Eingriff ein 1-2%iges Risiko eines Spontanaborts. Zusätzlich besteht das Risiko von Spätkomplikationen wie vorzeitiger Blasensprung oder Frühgeburtlichkeit [Branbati, Simoni, 1987].

#### **4.1.3 Ultraschall**

Die Sonographie gehört heute nicht nur in der Pränataldiagnostik, sondern auch in anderen Gebieten der Medizin, zu den wichtigsten nicht-invasiven Untersuchungsverfahren. Gerade bei Schwangeren ist dieses Verfahren wegen des Fehlens schädigender Auswirkungen auf den Feten akzeptiert und ist seit 1979 Bestandteil der Mutterschaftsrichtlinien.

Technischer Fortschritt, Verbesserung der Schallkopf- und Bildqualität bis hin zu 3D-Darstellungen lassen heute schon relativ früh anatomische Veränderungen des Kindes erkennen. Durch Messungen der Nackentransparenz oder der Länge des Os nasi ergeben sich bereits im 1. Trimenon Hinweise auf genetisch bedingte Erkrankungen. Da diese Messungen jedoch niemals

beweisend sind, muss im Zweifelsfall anschließend immer auf eine invasive Methode zurückgegriffen werden.

#### **4.1.4 Triple-Test**

Dieser heute nur noch selten durchgeführte Test wurde zur Abschätzung des fetalen Gesundheitszustandes bei Risikoschwangerschaften eingeführt. Hierbei werden in der 16. SSW eine Bestimmung der Östriol-, AFP- und  $\beta$ -HCG-Werte aus dem mütterlichen Serum durchgeführt. Je nach Höhe und Konstellation dieser Werte zueinander, können Risikoabschätzungen für die häufigsten Erkrankungen wie Trisomie 21, Trisomie 18, Triploidien, das Ullrich-Turner-Syndrom sowie Bauchwand- und Neuralrohrdefekte abgegeben werden. Pathologische Werte erfordern eine anschließende invasive Pränataldiagnostik.

#### **4.1.5 Kombiniertes 1. Trimenon-Screening**

Das Ersttrimesterscreening als Weiterentwicklung des Triple-Tests beruht zum einen auf der Bestimmung des schwangerschaftsassozierten Plasmaproteins A, kurz PAPP<sub>A</sub>, im Serum zwischen der 10. und 16. SSW. Außerdem wird, wie auch beim Triple-Test, das freie  $\beta$ -HCG im Serum bestimmt. Der dritte Bestandteil dieses Tests ist die Ultraschalldiagnostik. Es wird zwischen der 10. und 14. SSW eine sonographische Messung der Nackentransparenz (NT) durchgeführt. Aufgrund fehlender Richtlinien und meist nur unzureichender technischer Ausstattung gehört der kombinierte 1. Trimenon-Test jedoch noch nicht zur Routine-Diagnostik.

#### **4.1.6 Fetale Zellen im mütterlichen Blut**

Ab den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts begann eine intensive Forschung über fetale Zellen im mütterlichen Blut. Da die Zellklone noch nach mehreren Jahren bis Jahrzehnten nachweisbar waren und deshalb bei Mehrgebärenden keine sichere Aussage zuließen [Schindler et al., 1972] [Schröder et al., 1972] [Grosset et al., 1974] [Bianchi et al., 1996], wurde diese Methode ab den 90er Jahren als ungeeignet für eine Pränataldiagnostik angesehen. Die Forschung konzentrierte sich nun auf den Nachweis freier fetaler DNA. Dies wird im folgenden Kapitel dargestellt.

#### **4.2 Fetale DNA im mütterlichem Blut**

##### **4.2.1 Ursprung fetaler DNA im mütterlichen Blut**

Obwohl bereits 1893 die ersten Hinweise auf einen Übertritt fetaler Zellen in den maternalen Blutkreislauf entdeckt wurden [Schmorl, 1893], bleibt letztendlich die Frage nach dem Ursprung fetaler Zellen bzw. freier fetaler DNA im maternalen Blutkreislauf ungeklärt. Der deutsche Pathologe Schmorl fand erstmals Trophoblasten in den Lungen von Patientinnen, die an den Folgen einer Eklampsie verstorben waren. Einhundert Jahre nach diesem Fund, wurde in einer Studie an Patientinnen mit Präeklampsie eine erhöhte Zahl an fetalen Erythroblasten im mütterlichen Blut gefunden [Holzgreve et al., 1998]. Dies würde für einen Übertritt fetaler Zellen im Rahmen einer Plazentaschädigung sprechen, erklärt jedoch nicht weshalb auch in normal verlaufenden Schwangerschaften fetale Zellen und DNA im maternalen Blut gefunden werden.

Hierfür gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen wird ein ständiger Transfer fetaler Zellen durch die Plazenta in den mütterlichen Kreislauf mit anschließender Zerstörung der fetalen Zellen durch das mütterliche Immunsystem und verbleibender freier fetaler DNA im Plasma diskutiert [Bianchi, 1998]. In weitergehenden Untersuchungen konnte jedoch keine quantitative Korrelation zwischen Erythroblasten und freier fetaler DNA gefunden werden, so dass der transplazentare Übertritt fetaler Zellen in den mütterlichen Blutkreislauf als Quelle der freien fetalen DNA eher unwahrscheinlich wurde [Zhong et al., 2002]. Ein weiterer Erklärungsversuch ist, dass durch die ständigen Umstrukturierungsmechanismen der Plazenta eine kontinuierliche Apoptose und damit Freisetzung fetaler DNA stattfindet [Bianchi, 1998]. Außerdem wird eine ständige entwicklungsassoziierte Apoptose beim Feten selbst, das heißt der Tod fetaler Zellen als Ursprung fetaler DNA diskutiert [Lo et al., 1998] [Lo, 2000]. Da sich bei einer Molenschwangerschaft ebenfalls nicht von der Mutter stammende freie DNA im Blut findet, könnte der Ursprung der fetalen DNA durchaus auch der Trophoblast sein [Alberry et al., 2007].

Bei allen Erklärungsversuchen muss berücksichtigt werden, dass die Quantität fetaler DNA sich bei gesunden Schwangeren als sehr variabel darstellt. Zwar scheint es um die 25. SSW zu einer Zunahme fetaler DNA zu kommen, im Verlauf kann jedoch nicht immer eine weitere Zunahme der fetalen DNA bis zum Ende der Schwangerschaft nachgewiesen werden [Zhong et al., 2000b]. Der Grund ist ungeklärt.



### 4.2.2 Rhesusfaktor

Die häufigste Form einer Blutgruppenunverträglichkeit zwischen Mutter und Kind ist die Rhesus D-Unverträglichkeit. Die mütterliche Immunisierung erfolgt dabei meist durch eine fetomaternal Transfusion bei der Geburt. Nach initialer IgM-Produktion kommt es bei einem erneuten Kontakt mit Rhesus-Antigenen zur Bildung von IgG-Antikörpern. Da Rhesus-Antigene bereits ab dem 30. Tag der Schwangerschaft vorhanden sind, kommt es bei einer erneuten Rhesus-positiven Schwangerschaft einer Rhesus-negativen Mutter rasch zur Zerstörung von Erythrozyten im Föten. Durch die hierbei entstehende ausgeprägte Anämie tritt ohne Behandlung ein durch hypoxische Gewebsschädigung, Hypoproteinämie, erhöhter Gefäßpermeabilität und Herzinsuffizienz verursachter Hydrops fetalis mit Absterben des Feten in utero auf [Diedrich, 2000] [Sitzmann, 2002]. Eine regelmäßige Kontrolle des indirekten Coombs-Antikörperspiegels sowie sonographische Kontrolluntersuchungen müssen durchgeführt werden. Auch bei nicht-sensibilisierten Rhesus-negativen Schwangeren, die einen Rhesus-positiven Partner haben, sollte eine monatliche Kontrolle des Coombs-Tests erfolgen [Diedrich, 2000].

Aufgrund der klinischen Relevanz der Blutgruppenunverträglichkeit sowie der klaren Aussagemöglichkeit - positiv oder negativ? - war die Forschung zur Bestimmung der fetalen Blutgruppe schon früh eines der Ziele der nicht-invasiven Pränataldiagnostik. Anfang der 90er Jahre erfolgte die erste Beschreibung von fetalen Erythroblasten im Blut der Mutter [Bianchi et al., 1990]. Da der Erythroblast, im Gegensatz zu Trophoblasten-Zellen, sowohl einkernig als auch kurzlebig ist und außerdem bei gesunden Erwachsenen im Blut nicht vorkommt, konzentrierte sich die Forschung auf ihn.

Mitte der 90er Jahre wurde damit begonnen, den Rhesus-Faktor in Erythroblasten zu bestimmen. In fast allen Fällen, in denen das Geschlecht der Zellen korrekt bestimmt werden konnte, konnte auch der Rhesus-Faktor korrekt bestimmt werden [Sekizawa et al., 1996]. Allerdings stellte die ausreichende Isolierung der fetalen Erythroblasten ein großes Problem dar [Lo et al., 1998], so dass dieser Zweig der nicht-invasiven Pränataldiagnostik bald verlassen wurde.

Da man freie Tumor-DNA sowohl im Blut von Krebspatienten gefunden hatte, war dies der Anlass für den Beginn der Suche nach freier fetaler DNA in mütterlichen Blut. [Lo et al., 1997]. Nachdem initial aufgrund der klaren Unterscheidungsmöglichkeit nach männlicher fetaler DNA gesucht worden war, begann schon bald die Forschung bezüglich des Rhesus Gens. Auch hier kam man bald zu positiven Ergebnissen. So wurden bei Rhesusnegativen Schwangeren, vor der Amniozentese Blutproben zum DNA-Nachweis freier fetaler DNA entnommen. Die Ergebnisse stimmten miteinander überein, so dass diese Methode durchaus geeignet scheint, schwangeren Frauen einen invasiven Eingriff zu ersparen und die Rhesus D-Prophylaxe nur bei jenen anzuwenden, die mit einem Rhesus D-positiven Feten schwanger sind [Faas et al., 1998]. Bereits im 1. Trimenon ist eine solche Analyse möglich, so dass hier auch ein Vorteil gegenüber der üblichen invasiven Diagnostik besteht.

Neben der bisher besprochenen Detektion nur eines Gens, besteht auch die Möglichkeit mehrere Gene simultan z.B. das Geschlecht und den Rhesus Typ zu bestimmen [Zhong et al., 2001]. Dies ist gerade in dieser Kombination von Vorteil, da man weiß, dass männliche Feten ein höheres Risiko für einen schweren Verlauf der Blutgruppenunverträglichkeitsreaktion mit erhöhtem Transfusionsrisiko in utero sowie erhöhtem Mortalitätsrisiko haben.

## **4.3 Klinische Durchführbarkeit**

### **4.3.1 Proben-Entnahme**

Die Beurteilung der klinischen Durchführbarkeit und Nutzung dieser Methode beginnt bereits bei der Wahl eines geeigneten Zeitpunkts für die Blutentnahme. Wie bereits im Jahr 2000 beschrieben [Zhong et al., 2000], zirkulieren individuell unterschiedlich schon in der Frühschwangerschaft freie fetale DNA im mütterlichen Blut. Im weiteren Verlauf konnte bei dieser Untersuchung eine Zunahme des fetalen DNA-Gehalts bis zur 25. SSW verzeichnet werden, danach wurde kein signifikanter Anstieg der fetalen DNA beobachtet. In der vorliegenden Arbeit ist leider nur bei 16 der insgesamt 43 Blutproben der Entnahmezeitpunkt bekannt. Dieser lag zwischen der 9+3 und der 16+0 SSW. Die fetale DNA sollte also, wenn man nach der Literatur geht, zu 100 % nachweisbar sein [Rijnders, 2003].

### **4.3.2 DNA-Isolierung**

Da sowohl Plasma- als auch Serumproben bezüglich des Nachweises freier fetaler DNA erfolgversprechend sind [Lo et al., 1997], wurde in dieser Arbeit die DNA-Isolierung aus dem Serum vorgenommen. Sie erfolgte mittels DNA BloodMini Kit Qiaamp. Aufgrund der raschen Zersetzung (mittlere Halbwertszeit 16,3 Minuten) [Costa et al., 2001] sollte die DNA-Isolierung im optimalen Fall direkt nach der Blutentnahme erfolgen. Ist dies nicht möglich, sollte die Probe möglichst direkt eingefroren werden. Hiernach ist die Probe

etwa ein Jahr lang verwendbar. Bei längerer Aufbewahrung besteht die Gefahr der DNA-Zersetzung. Dies ist wichtig, weil die Menge an zirkulierender fetaler DNA sehr gering ist.

Mehrere Arbeitsgruppen versuchten durch die Gabe von Formaldehyd die mütterliche Zellyse-Rate zu verringern [Dhallan, 2004]. Dieses Problem wird im Abschlusskapitel diskutiert.

### **4.3.3 LightCycler**

Der große Vorteil der in dieser Arbeit angewandten Methode der DNA-Amplifizierung und Real-time Detektion ist die wesentlich größere Menge an kindlicher DNA. Auch liegt bereits nach wenigen Stunden das Ergebnis vor. Dies ist bei der Pränataldiagnostik ein großer Vorteil. Schwangere Frauen müssen nicht mehrere Wochen die Ungewissheit ertragen und können schon nach einem Tag mit dem behandelnden Arzt über das Ergebnis reden. Falls eine genetisch bedingte Erkrankung auf diesem Wege nachgewiesen wird, kann die betroffene Frau ohne Zeitdruck über die weiteren Schritte nachdenken.

Das zum Zeitpunkt der Untersuchungen im Jahr 2001 zur Verfügung gestandene LightCycler-Gerät war für den Ungeübten schwierig zu bedienen. Problematisch war die Verwendung der Kapillaren. Zwar hatten die Kapillaren den Vorteil, dass aufgrund des geringen Durchmessers die emittierte Fluoreszenz der amplifizierten Produkte optimal detektiert werden konnte, aber sie stellten sich, vor allem für noch Ungeübte in der Handhabung doch als recht knifflig dar. Die erste Schwierigkeit bestand darin die Glaskapillaren in das Karussell hineinzudrehen. Die Kapillaren konnten durch den auf sie ausgeübten Druck

zerbrechen. Das Karussell musste danach vorsichtig gereinigt werden, damit Glassplitters nicht das Eindrehen der nächsten Kapillaren behinderten oder diese sogar zerkratzten. Anschließend musste die DNA-Lösung unter Kühlung in die schmale Öffnung der Kapillare mit ruhiger Hand hinein pipettiert werden. Dies gestaltete sich zum Teil als recht zeitaufwendig. Nachdem die Lösung in die Kapillare pipettiert worden war, sollte diese unmittelbar danach verschlossen werden, um Kontaminationen zu vermeiden. Dafür musste ein kleiner Plastikverschluss unter zur Hilfenahme einer spitzen Pinzette auf die Kapillare gedrückt werden. Für Ungeübte war dies zum Teil recht schwierig, da auch hierbei die Glaskapillaren unter Druck leicht zerbrechen konnten.

Neben der manuellen Handhabung war auch eine warme Jahreszeit ein Nachteil für die Anwendung des Geräts. Da der LightCycler selbst nicht gekühlt war und zu Beginn auf 20°C abkühlen musste, um die Anzahl der Proben vor dem eigentlichen Beginn der PCR detektieren zu können, durfte die Umgebungstemperatur 20°C nicht überschreiten. Daher musste sich das Gerät in einem gekühlten Raum befinden um zu jeder Tages- und Jahreszeit für eine DNA-Analyse zur Verfügung zu stehen.

Der eigentliche Ablauf der Reaktion gestaltete sich dann problemlos. Nach kurzer Zeit lag das Ergebnis vor. Die Auswertung der Ergebnisse konnte jedoch weitere Probleme aufwerfen. Neben klar positiven Fluoreszenzkurven, die parallel zu der Positivkontrolle verliefen, und den negativen Proben, die keinerlei Fluoreszenz aufwiesen, gab es auch Fluoreszenzkurven, die zwischen den positiven und negativen Fluoreszenzkurven verliefen. Meist wiesen diese Kurven nur geringe, unspezifische Fluoreszenz auf und zeigten nicht den für die positiven Kurven typischen Kurvenverlauf. Aber es gab auch solche, die eine

ähnliche Fluoreszenzaktivität zeigten wie die der positiven DNA-Amplifikation. Dies war für Ungeübte problematisch zu differenzieren. Auch in dieser Arbeit traten solche „falschen“ Fluoreszenzkurven auf. Trotz intensiver Reinigung sowohl des Arbeitsplatzes als auch des Arbeitsgeräts und Ersetzen der verwendeten Lösungen durch neue Lösungen, traten solche Kurven immer wieder auf, ohne dass der Grund dafür zu finden war. Nachdem zu Beginn der Arbeit bei dieser Art von Fluoreszenzkurven von diesen Proben regelmäßig Agarosegelelektrophoresen durchgeführt werden mussten, um klären zu können, ob es sich um einen positiven DNA-Nachweis gehandelt hat, konnte die Häufigkeit dieses zusätzlichen Arbeitsschritts im Laufe der Arbeit auf ein Minimum reduziert werden. Aber gerade zu Beginn musste relativ häufig eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt werden, obwohl dieser Arbeitsschritt eigentlich durch die Fluoreszenzdetektion während des Reaktionslaufs abgedeckt wurde. Dies verlängerte die Zeit bis zum endgültigen Ergebnis um einige Stunden und verlangte zusätzliche Arbeitslösungen und -gerät. Diese Problematik konnte allerdings dadurch umgangen werden, indem man sich auf SYBR-Green Sonden beschränkte und nicht, wie in dieser Arbeit, eine dritte Sonde einsetzte. In diesem Fall war eine Schmelzkurven-Analyse möglich. Da die unspezifisch entstandenen Primerprodukte nämlich einen vom spezifischen Produkt verschiedenen Schmelzpunkt besaßen, konnten sie so von diesem unterschieden werden.

Als Fazit lässt sich über den LightCycler sagen, dass bereits das seinerzeit verwendete Gerät für einen erfahrenen Anwender sicher ein gutes und zuverlässiges Gerät war, mit dem in sehr kurzer Zeit Ergebnisse einer quantitativen und qualitativen DNA Analyse vorliegen konnten. Allerdings stand der Anfänger vor manchmal nicht zu ergründenden Problemen.

#### 4.3.4 Anwendung des SRY-Primers

Der SRY-Primer bindet an die geschlechtsbestimmende Region des Y-Chromosoms. Von diesem Gen existiert nur eine Kopie auf dem Y-Chromosom. Als frühesten Zeitpunkt zum Nachweis fetaler DNA mit SRY-Primer gilt die 5. SSW. Allerdings wird zu diesem Zeitpunkt nur bei der Hälfte der Proben fetale DNA nachgewiesen. Die Ergebnisse bessern sich im Laufe der Schwangerschaft [Rijnders, 2003]. In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 45 maternale Seren auf fetale DNA mittels SRY-Primer untersucht. Von diesen Proben stammen 23 von Frauen, die mit einem männlichen Feten schwanger waren, davon lag bei 2 Schwangerschaften eine Trisomie 21 vor. 2 Proben waren Frauen entnommen worden, die einen Tag zuvor einen Jungen entbunden hatten. Die 20 übrigen untersuchten Seren stammten von Frauen, die mit einem weiblichen Feten schwanger waren.

Insgesamt konnten mittels SRY-Primer nur 3 Proben mit eindeutig männlicher DNA identifiziert werden. Dies entspricht einer Sensitivität von 0,12. Bei 7 Proben wurde in weniger als der Hälfte der durchgeführten Mehrfach-Ansätze männliche DNA gefunden. Dieses Ergebnis steht in deutlichem Gegensatz zu der Literatur, wo ab der 9. SSW Detektionsraten von 100 Prozent beschrieben werden [Rijnders, 2003]. Die Proben der zuvor entbundenen Frauen waren negativ, ebenso die mit weiblicher fetaler DNA. Die Spezifität lag bei 1. Bei 9 „männlichen Proben“ war der Schwangerschaftszeitpunkt bekannt. Nur bei 2 dieser Proben konnte erfolgreich fetale DNA nachgewiesen werden. Die beiden Proben stammten aus der 9+3 SSW und der 12+4 SSW. Es zeigte sich, dass bei der Probe aus der 12+4 SSW bereits 3 PCR-Zyklen früher als bei der anderen Probe- nämlich im 33. Zyklus- fetale DNA nachgewiesen werden konnte.

Entsprechendes findet sich in der Literatur, wo wie bereits erwähnt ein Anstieg der freien fetalen DNA bis zur 25. SSW beschrieben wird [Costa et al., 2001]. Bei den Proben mit unbekanntem Entnahmezeitpunkt konnte lediglich bei einer Probe mittels SRY-Primer fetale DNA ab dem 38. PCR-Zyklus nachgewiesen werden.

Bei den postpartal entnommenen Proben konnte erwartungsgemäß keine fetale DNA mehr nachgewiesen werden. Obwohl in der Literatur vereinzelt über einen Nachweis Y-spezifischer DNA bis zu 60 Jahre nach Geburt eines Sohnes berichtet wurde [Invernizzi et al., 2002], wird in der neueren Literatur eher eine mittlere Halbwertszeit für zirkulierende freie fetale DNA von 16 Minuten, (Zeitspanne von 4 bis 30 Minuten) angegeben [Costa et al., 2001] Bei nicht-schwangeren Frauen ist somit in der Regel kein Nachweis fetaler DNA möglich. [Faas et al., 1998] [Lo et al., 1999a] [Costa et al., 2001] [Smid et al., 2003] [Rijnders, 2004] Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Es traten keine falsch positiven Ergebnisse auf.

Zum Zeitpunkt der Untersuchungen war die alleinige Anwendung des SRY Primers nicht zur pränatalen Untersuchung geeignet. Die Methode konnte allenfalls ergänzend verwendet werden. Insgesamt entsprachen die Ergebnisse nicht der Literatur. Dies liegt sicher mit an der fehlenden Übung und Erfahrung.

#### **4.3.5 Anwendung des DYS14-Primers**

Der DYS14-Primer bindet an eine DNA-Multicopy-Sequenz des Y Chromosoms. Obwohl die im maternalen Blut zirkulierende Menge an fetaler DNA vor allem im ersten Trimester sehr gering ist, zeigt sich dieser Primer



bereits in der Frühschwangerschaft als geeignet zur Geschlechtsbestimmung [Zimmermann et al., 2005]. Für die 2. Versuchsreihe der vorliegenden Arbeit standen insgesamt 44 Seren zur Untersuchung zur Verfügung. 23 waren von Frauen, die mit einem männlichen Feten schwanger waren, davon lag bei 2 eine aneuploide Schwangerschaft (Trisomie 21) vor. Eine Probe stammte von einer Mutter, die einen Tag zuvor einen Jungen entbunden hatte. 20 Proben waren von Frauen, die mit einem weiblichen Feten schwanger waren. Insgesamt konnten von den 23 „männlichen Proben“ 21 korrekt detektiert werden. Bei der Probe der bereits entbundenen Frau konnte keine Y-spezifische DNA mehr nachgewiesen werden. Umgekehrt wurde bei 2 der 20 weiblichen Proben männliche DNA detektiert. Da es sich um eine retrospektiv durchgeführte Untersuchung an von der Frauenklinik der Universitätskliniken des Saarlandes asservierten und zur Verfügung gestellten Proben handelt, konnten leider über frühere Schwangerschaften der Frauen Informationen erhalten werden.

Die Sensitivität des DYS14-Primers ist mit 0,87 deutlich höher als die des SRY-Primers, jedoch geht dies etwas zu Lasten der Spezifität. Diese liegt bei 0,9. Die beiden durch den DYS 14-Primer falsch negativ detektierten Proben, waren auch mittels dem SRY-Primer falsch negativ detektiert worden.

Der DYS14-Primer wurde bei 9 Proben angewendet, bei denen die Dauer der Schwangerschaft bekannt war. Hier wurde bei allen Proben männliche fetale DNA nachgewiesen. Die niedrigste erforderliche Zyklenzahl lag bei 33 Zyklen bei einer Probe aus der 12+2 SSW. Die höchste Zyklenzahl von 48 fand sich bei einer Probe aus der 12+0 SSW. Im Median lag die Zykluszahl, bei der männliche fetale DNA nachgewiesen werden konnte, bei 34 PCR-Zyklen. Am frühesten konnte die DNA bei Proben aus der 12+2, 12+4, 12+6 und 13+3 SSW

nachgewiesen werden. Die längsten Zykluszahlen traten bei Proben aus der 9+3, 12+0, 14 +4, 16+0 auf. Diese Uneinheitlichkeit könnte auf die bekannten individuelle Unterschiede der Repeat-Zahl der DYS14-Sequenz zurückzuführen sein. In der Literatur wird eine signifikant ansteigende Konzentrationen fetaler DNA im Verlauf der Schwangerschaft [Zhong et al., 2000] beschrieben. Bei den 14 männlichen Proben, bei denen der Schwangerschaftszeitpunkt nicht bekannt war, wurde bei 13 männliche fetale DNA gefunden. Auch hier lagen die Zykluszahlen in einem ähnlichen Bereich wie bei den Proben zuvor. Die niedrigste PCR-Zykluszahl lag bei 32, die höchste bei 39. Eine Probe wurden post partum entnommen. Auch hier konnte, wie bereits bei dem SRY-Primer, keine fetale DNA mehr nachgewiesen werden. Allerdings traten bei 2 weiblichen Proben falsch positive Ergebnisse auf. Diese waren weder durch eine im Vergleich zu den richtig positiven Proben durch den Kurvenverlauf noch durch die PCR-Zykluszahl, ab der DNA nachgewiesen werden konnte, zu unterscheiden. Bei beiden Proben wurde ab dem 34. bzw. 35. Zyklus DNA nachgewiesen. Dies wurde mit einer Agarosegelelektrophorese überprüft und auch hier konnte DNA nachgewiesen werden. Da auch nach Reinigung des Arbeitsplatzes und Ansetzen neuer Reaktionslösungen bei beiden Proben männliche DNA nachgewiesen wurde, ist davon auszugehen, dass diese Proben von vornherein kontaminiert waren. Über vorrausgegangene Schwangerschaften als mögliche Quelle der männlichen DNA lagen keine Informationen vor.

Dies bedeutet, dass der DYS14-Primer zwar insgesamt bessere Ergebnisse liefert, aber zum Zeitpunkt dieser Untersuchung dennoch nicht zur alleinigen pränatalen Diagnostik geeignet war.

#### ***4.4 Entwicklung des Nachweises und zunehmend klinisch-diagnostische Bedeutung fetaler DNA im mütterlichen Blut seit Abschluss der experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit (2002-2010)***

Für die Bestimmung des Geschlechts und des Rhesustyps, Erkennung von Erkrankungen der werdenden Mütter, Nachweis von aneuploiden Feten, für viele genetisch determinierte Erkrankungen scheint künftig der Nachweis von freier fetaler DNA die Möglichkeit einer nicht-invasiven risikoarmen frühzeitigen Diagnostik zu bieten.

Die Bestimmung des fetalen Geschlechts und des Rhesus-Faktors aus zellfreier fetaler DNA als relativ einfach zu bestimmende Merkmale gewinnen nun immer mehr an Bedeutung. Die sichere Bestimmung dieser beiden Merkmale kann bereits zu einer erheblichen Vereinfachung bei der pränatalen Diagnostik z.B. dem indirekten Erkennen oder Ausschließen geschlechtsgebundener genetischer Erkrankungen führen.

##### **4.4.1 Numerische Chromosomenanomalien**

Ein wichtiges Ziel der nichtinvasiven Pränataldiagnostik betrifft jedoch die numerischen Chromosomenanomalien. Zwar steigt mit höherem Alter der Mutter auch das Risiko für einen Feten mit Trisomie 21, aber fast 80% der mit M. Down geborenen Kinder stammen von jungen Müttern unter 35 Jahren. Die üblichen nicht-invasiven Screening-Methoden sind jedoch noch durch eine zu geringe Sensitivität (ca. 80%) sowie relativ hohe falsch-positive Ergebnisse gekennzeichnet. Dadurch wird eine Verunsicherung der werdenden Eltern erzeugt und die Bereitschaft zu einem invasiven komplikationsreicheren

Eingriff, steigt an. Mit Hilfe der zusätzlichen Bestimmung von fetaler DNA könnten solche Tests an Sensitivität gewinnen [Farina et al., 2003].

Nachdem es gelungen war, fetale Zellen in mütterlichem Blut sicher nachzuweisen und zu isolieren, begann man bereits Mitte der 90er Jahre mit der Analyse der fetalen Zellen auf numerische Chromosomenanomalien. Da numerische Chromosomenanomalien der Chromosomen 21, 18, 13, X und Y zu den mit Abstand häufigsten bei lebend-geborenen Neugeborenen zählen, lag das Augenmerk vor allem auf diesen Chromosomen. In der quantitativen Zellanalyse für Trisomie 21 und 18 zeigte sich schon bald, dass zur besseren Differenzierung der Trisomien die Verwendung mehrerer Marker nötig ist [Pertl et al., 1996]. Allerdings fiel auf, dass bei aneuploiden Schwangerschaften bedeutend mehr fetale Zellen aus dem maternalen Blut isoliert werden konnten. So lag die mittlere Anzahl an fetalen Zellen bei gesunden Feten bei 2, bei Feten mit Trisomie 21 bei 110 Zellen in jeweils 16 ml mütterlichem Blut [Bianchi et al., 1997].

Ähnliche Ergebnisse wurden dann auch für freie fetale DNA gefunden. So konnte im Plasma von Frauen, die mit einem Feten mit Trisomie 21 schwanger waren, eine etwa doppelt so hohe Genom-Äquivalentzahl pro ml Plasma gefunden werden, wie in der Vergleichsgruppe mit euploiden Feten [Lo et al., 1999b]. Auch bei anderen numerischen Chromosomenanomalien wie z.B. Trisomie 13 wurde ein im Vergleich zu unauffälligen Schwangerschaften erhöhter Spiegel fetaler DNA festgestellt. Insgesamt scheint die fetale DNA-Konzentration bei einer Trisomie 21 am höchsten zu sein [Zhong et al., 2000]. Allerdings scheint eine erhöhte Konzentration fetaler DNA nicht alle aneuploiden Schwangerschaften anzuzeigen. So zeigt sich zwar eine Erhöhung

fetaler DNA bei Trisomie 13, nicht jedoch bei Trisomie 18 [Wataganara et al., 2003]. Inzwischen, weiß man, dass der Ursprung der freien fetalen DNA in der Plazenta liegt [Li et al., 2004]. Ein Grund für den im Vergleich zu anderen Trisomien niedrigen DNA-Spiegel könnte die bei Trisomie 18 häufig sehr kleine Plazenta bzw. Plazentainsuffizienz sein.

Da bei dieser Methode eine Schwangerschaft mit einem aneuploiden Feten nur anhand von quantitativen DNA-Vergleichsanalysen zu erkennen ist, wurden zur genaueren Differenzierung der fetalen Zellen seinerzeit Analysen mittels FISH-Technik durchgeführt. Diese war bei einer sehr kleinen Gruppe erfolgreich, wurde jedoch nicht weiter verfolgt [Poon et al., 2000]. Nach den ersten erfolgversprechenden Studien stellte sich bald Ernüchterung ein. So konnte in weiteren Studien kein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der Genomäquivalente euploider Feten und der von Feten mit Trisomie 21 gefunden werden. Jedoch war die Konzentration an freier Gesamt-DNA bei Frauen, die mit einem Feten mit Trisomie 21 schwanger waren deutlich erhöht [Spencer et al., 2003]. In anderen Studien konnten anhand der erhöhten fetalen DNA Konzentration bei bis zu 21% der Proben, die von Frauen stammten, die mit einem aneuploiden Feten schwanger waren, eine Trisomie 21 gefunden werden. Jedoch wurden auch bei Schwangeren mit euploiden Feten zuweilen auch erhöhte DNA-Konzentrationen gefunden, so dass 5% der Ergebnisse falsch positiv waren. In Kombination mit der Bestimmung von AFP, uE3,  $\beta$ -hCG und Inhibin A konnte (bei der Rate an 5% falsch positiven Ergebnissen) das Screening-Ergebnis für Trisomie 21 von 81% auf 86% verbessert werden [Farina et al., 2003].

#### **4.4.2 Monogen vererbte Erkrankungen**

Nachdem die Untersuchung fetaler Zellen wegen der schwierigen und aufwendigen Anreicherungstechniken weitgehend verlassen wurde [Kolvraa et al., 2004] und nun freie fetale DNA in den Mittelpunkt des Interesses rückte, begann man auch bei Erkrankungen in der Schwangerschaft oder nicht numerischen, chromosomal bedingten Erkrankungen des Feten nach Hinweisen für eine Zunahme von fetaler DNA zu suchen.

Inzwischen lassen sich auch monogen vererbte Erkrankungen, die z.B. auf Punktmutationen beruhen, wie z.B. die Beta-Thalassämie, die Achondroplasie und die myotone Dystrophie, in einem - zwar noch recht aufwendigen Prozess - nachweisen [Tang et al., 1999] [Amicucci et al., 2000] [Li et al., 2004] [Li et al., 2005]. Damit scheint diese Methode als erste das Potential zu besitzen, bei monogen vererbten Erkrankungen eine nicht-invasive Pränataldiagnostik durchführen zu können. So konnte z.B. die Muskeldystrophie Duchenne oder zystische Fibrose anhand fetaler Zellen bzw. freier fetaler DNA im mütterlichen Blut mittels PCR diagnostiziert werden [Chan et al., 1998] [Gonzalez-Gonzalez et al., 2002]. Diese Diagnosen konnten aber auch mit der bisher üblichen, invasiven Pränataldiagnostik gestellt werden.

#### **4.4.3 Gestosen**

Was bisher im Hintergrund stand, rückt nun weiter nach vorne. Der Schutz der werdenden Mutter. Bei der Präeklampsie mit dem HELLP-Syndrom als lebensbedrohliche Komplikation kommt es zu einer hämolytischen Anämie und einen Anstieg fetaler DNA im mütterlichen Blut. Es scheint nun die

Entwicklung einer einfachen Screening-Methode bereits vor der Entwicklung der vollen Symptomatik möglich zu sein [Zhong et al., 2002] [Swinkels et al., 2002]. Auch bei Plazentationsstörungen wurde eine erhöhte fetale DNA-Konzentration festgestellt [Sekizawa et al., 2002]. Bei entsprechenden Risiko-Schwangerschaften könnte eine einfache Screening-Untersuchung durchgeführt werden, die eine schwere Blutungskomplikation während der Geburt mit Notfallhysterektomie zu vermeiden helfen könnte.

Wie bereits erwähnt, wurden bei Patientinnen mit Präeklampsie erhöhte fetale DNA-Konzentrationen gemessen [Lo et al., 1999a]. Bereits bevor eine Präeklampsie auftrat, kam es zu einer erhöhten fetalen DNA-Konzentration bei Frauen, die dann im weiteren Verlauf diese Erkrankung entwickelten [Zhong et al., 2002]. Außerdem stellte sich heraus, dass die DNA-Clearance bei diesen Frauen verzögert ist. Nach der Entbindung konnte bei diesen Frauen noch 6 Stunden postpartal fetale DNA nachgewiesen werden, während in der gesunden Kontroll-Gruppe kein fetales Genom-Äquivalent mehr gefunden wurde [Lau et al., 2002].

Das HELLP-Syndrom, als Komplikation der Präeklampsie, wurde aufgrund der Ergebnisse der vorausgegangenen Studien ebenfalls auf das Verhalten der freien fetalen DNA hin untersucht. Hierbei fand man, dass eine Korrelation zwischen der Schwere der arteriellen Hypertonie und der Höhe der fetalen DNA-Konzentration besteht. Außerdem fiel auf, dass bei den Frauen, die nach der Entbindung ein HELLP-Syndrom entwickelten, der Spiegel an freier fetaler DNA nochmals höher war, als bei Frauen, die vor der Entbindung ein HELLP-Syndrom entwickelten [Swinkels et al., 2002]. Somit stellt sich die Frage, ob neben fetalen Erkrankungen auch mütterliche Erkrankungen den Übertritt fetaler

DNA in den maternalen Blutkreislauf begünstigen können und, ob daraus Schlüsse für den weiteren Schwangerschaftsverlauf gezogen werden können.

In der Frühschwangerschaft gehören Übelkeit und Erbrechen zu den häufigsten beklagten Begleitsymptomen. Die ausgeprägte Form, einhergehend mit Dehydratation, Elektrolytentgleisungen, Gewichtsverlust sowie Ketonämie und Ketonurie wird als Hyperemesis gravidum bezeichnet. Die bei Patientinnen mit Hyperemesis gravidum gemessene Konzentration an fetaler DNA war im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Außerdem zeigte sich eine Korrelation von fetaler DNA mit dem  $\beta$ -HCG-Spiegel im Plasma. Dies könnte insgesamt darauf hinweisen, dass der Erhöhung der fetalen DNA und der Pathogenese der Hyperemesis gravidum ein ähnlicher Mechanismus, wie z.B. einer Immunreaktion zwischen Mutter und Fetus, zugrunde liegt [Sekizawa et al., 2001].

#### **4.4.4 Intrauterine Wachstumsretardierung**

Auch bei intrauteriner Wachstumsretardierung wurde versucht, die fetale DNA als Marker zu nutzen, da auch hier erhöhte Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen wurden [Caramelli et al., 2003]. Dies konnte jedoch nicht in allen Studien nachgewiesen werden [Sekizawa et al., 2003].

Es existiert außerdem ein Fallbericht, in dem über einen erhöhten fetalen DNA-Spiegel im Blut der Mutter bei ausgeprägter intrauteriner Wachstumsretardierung im 2. Trimenon allerdings in Verbindung mit einem intervillösem Hämatom berichtet wird [Murakami et al., 2003]. Dies lässt die Vermutung zu,



dass der Spiegel an freier fetaler DNA im mütterlichen Blut von plazentaren Faktoren abhängig ist.

#### **4.4.5 Plazentationsstörungen**

Bei der Placenta praevia, bei der im Vergleich zur normalen Plazentation häufiger eine Placenta accreta, increta oder percreta vorkommt [Diedrich, 2000], wurde ebenfalls eine erhöhte fetale DNA-Konzentration festgestellt. Die Erhöhung war vor allem bei dem Vorliegen einer Plazenta percreta auffällig [Sekizawa et al., 2002]. Als Erklärung hierfür wird das invasive Wachstum der Trophoblasten in die Uterusmuskulatur gesehen. Aufgrund des mütterlichen Immunsystems kommt es jedoch zu einer raschen Destruktion der Trophoblasten, so dass als Folge zellfreie fetale DNA im maternalen Blutkreislauf zirkuliert. Zur weiteren Untermauerung dieser These dient der Fallbericht einer Schwangeren mit Placenta increta. Nach der Entbindung des Jungen erfolgte eine manuelle Entfernung der Plazenta. Ein im Durchmesser ca. 7 cm großer Plazentarest verblieb jedoch im Uterus. 10 Wochen post partum kam es zu einem spontanem Abgang dieses Plazentarestes. Während dieser Zeit erfolgten regelmäßige Analysen des maternalen Serums mittels DYS14-Primer. Bis zur 10. Woche postpartum konnte mittels DYS14-Primer fetale DNA nachgewiesen werden [Jimbo et al., 2003].

Insgesamt besteht also sowohl eine enge Korrelation der zellfreien fetalen DNA sowohl mit dem  $\beta$ -HCG als auch mit dem pathologischen Status der plazentaren Trophoblasten [Ohashi et al., 2002].

#### **4.4.6 Mehrlingsschwangerschaften**

In allen besprochenen Studien waren bisher nur Einlingsschwangerschaften untersucht worden. Da Mehrlingsschwangerschaften in den letzten Jahren aufgrund der Fortschritte der Reproduktionsmedizin zunehmen, stellte sich die Frage, wie sich fetale DNA bei diesen Schwangerschaften verhält. In einer Studie an gesunden Zwillingschwangerschaften konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von SRY-DNA mit der Anzahl an männlichen Feten korreliert, jedoch keine Unterschiede der fetalen DNA-Konzentrationen zwischen dichorealen oder monochorealen Schwangerschaften auftraten [Smid et al., 2003].

Die in-vitro-Fertilisierung selbst hat anscheinend keinen Einfluss auf die Konzentration fetaler DNA im mütterlichen Blut [Pan et al., 2005].

#### **4.4.7 Extrauterine Gravidität**

Hingegen konnte bei extrauteriner Gravidität durchaus ein Einfluss auf die freie fetale DNA nachgewiesen werden. Bereits in der 5. SSW lag der DNA-Spiegel bei Vorliegen einer extrauteriner Schwangerschaft deutlich höher als bei einer normalen intrauterinen Graviditäten. So konnten bei einer intrauterinen Schwangerschaft durchschnittlich 19 Genomäquivalente/ml nachgewiesen werden, bei extrauteriner Schwangerschaft lagen durchschnittlich 136 Genomäquivalente/ml vor. Durch diesen weitaus höheren DNA-Spiegel, könnte diese Methode durchaus auch einer frühzeitigen Diagnose von extrauterinen Graviditäten dienen [Lazar et al., 2006].

#### **4.4.8 Spontanaborte und Abortus imminens**

Bei im ersten Trimester auftretenden Spontanaborten konnten ebenfalls fetale DNA im mütterlichen Blutkreislauf nachgewiesen werden [Skinner et al., 2001]. Die DNA wurde auf numerische Anomalien der Chromosomen 13, 16, 18 und 21 hin untersucht. Bekanntermaßen ist bei Spontanaborten im ersten Trimenon eine numerische Chromosomenanomalie des Chromosoms 16 am häufigsten. Wie zu erwarten wurde auch am häufigsten eine Trisomie 16 gefunden [Skinner et al., 2003].

Außerdem besteht eine Korrelation zwischen dem DNA-Spiegel und dem Outcome bei im ersten Trimenon auftretender vaginaler Blutung. Stark erhöhte fetale DNA-Spiegel waren ein Indikator für die Wahrscheinlichkeit einer Fehlgeburt [Yin et al., 2007].

#### **4.4.9 Invasive Pränataldiagnostik**

Invasive Pränataldiagnostik kann den Spiegel der freien fetalen DNA erhöhen. Durch Bestimmung des AFP oder unter Verwendung des Kleihauer-Tests konnte bereits vor 30 Jahren gezeigt werden, dass bei bis zu 20% der Schwangeren, bei denen eine Amniozentese durchgeführt wurde, ein fetomaternaler Blutübertritt stattfindet [Hay et al., 1979]. In den aktuell durchgeführten Studien zeigte sich zudem ein deutlicher Anstieg an fetaler DNA als Hinweis auf einen Übertritt fetaler Zellen bzw. fetaler DNA in den mütterlichen Blutkreislauf. Hieraus wird deutlich, dass eine Amniozentese die plazentare Grenzfläche verletzt. Allerdings fiel auch auf, dass bei etwa 20% der

Schwangeren der fetale DNA-Spiegel abfiel. Als Erklärung hierfür werden Kontraktionen des Uterus angesehen, die einen Transfer der DNA in den mütterlichen Blutkreislauf unterbinden [Samura et al., 2003]. Diese Hypothese könnte auch die schnelle Elimination der fetalen DNA post partum erklären. Inwieweit sich diese Hypothese z.B. auf den Verlauf vorzeitiger Wehen oder die physiologische Geburt übertragen lässt, wurde noch nicht untersucht. Auch, ob eine Elimination der fetalen DNA nach einer normalen Geburt schneller als nach einer Sectio stattfindet, bleibt noch zu untersuchen.

#### **4.4.10 Abruptio graviditatis**

Bereits in den 70er Jahren waren Untersuchungen auf fetale Zellen im mütterlichen Blut nach Schwangerschaftsabbruch erfolgt. Damals konnten keine fetalen Zellen nachgewiesen werden [Leong et al., 1979].

Bei der Bestimmung der fetalen DNA-Spiegel unmittelbar nach einem Schwangerschaftsabbruch zeigte sich, dass je weiter fortgeschritten die Schwangerschaft zum Zeitpunkt des Abbruchs war, umso stärker war der Anstieg der fetalen DNA im mütterlichen Blut unmittelbar nach dem Abbruch [Wataganara et al., 2004] [Wataganara et al., 2005].

Als Quelle der fetalen DNA werden die fetalen hämatopoetischen Zellen, die sich innerhalb der plötzlich zerstörten plazentaren Blutgefäße befanden, diskutiert. Wahrscheinlich handelt es sich also hier um eine direkte Freisetzung der fetalen DNA durch die plötzliche Zerstörung der fetomaternalen Grenzfläche. Es kommt zu einer raschen Destruktion der fetalen Zellen durch das mütterliche Immunsystem kommen [Wataganara et al., 2005].

#### **4.4.11 Herkunft der Mutter**

Eine Blutuntersuchung der Mutter verrät aber nicht nur Krankheiten, auch die Lebensumstände der Mutter. So wurde bei schwangeren Frauen, die in Tibet lebten ein weitaus höherer Spiegel an fetaler DNA gemessen als bei schwangeren Frauen, die im chinesischen Flachland lebten - unabhängig von der ethnischen Zugehörigkeit [Zhong et al., 2006].

#### **4.4.12 Chronische Erkrankungen der Mutter**

Auch chronische Erkrankungen der Mutter stehen im Zusammenhang mit der Konzentration fetaler DNA im mütterlichen Blut. So konnte bei der rheumatoiden Arthritis eine inverse Beziehung von Krankheitsaktivität und DNA-Spiegel gefunden werden, das heißt bei hoher Krankheitsaktivität ist die DNA-Konzentration erniedrigt [Yan et al., 2006].

#### **4.4.13 Anreicherung freier fetaler DNA**

Das Hauptproblem bei der Bestimmung freier fetaler DNA ist die geringe Konzentration im mütterlichen Serum. Hinzu kommt, dass die Konzentration der zell-freien mütterlichen DNA etwa 20-fach höher ist [Wright et al., 2009] und dass es große interindividuelle Konzentrations-Unterschiede der freien fetalen und mütterlichen DNA gibt. Ein Vergleich zwischen Laboren, die mittels qRT-PCR fetale DNA nachweisen, zeigte deutliche Unterschiede in der Sensitivität für den Nachweis von SRY (Spannweite zwischen 31-97%), jedoch

nur geringe Unterschiede in der Spezifität (Spannweite 93-100%). Bei diesem Vergleich verwendete jedes Labor dieselben Serumproben, gleiche Reagenzien und PCR-Geräte. Hierbei zeigte sich eine Korrelation der Sensitivität sowohl mit der Menge an freier Gesamt-DNA als auch deren Verhältnis zur Menge an fetaler DNA. Deshalb wurde versucht, die Gewinnung freier DNA weiter zu optimieren [Johnson et al., 2004].

Mit Zugabe von Formaldehyd zu den Blutproben wurde versucht, den Anteil an freier fetaler DNA zu erhöhen. Nach Behandlung der Blutproben mit Formaldehyd stieg der Anteil an fetaler DNA an der gesamten freier DNA von durchschnittlich 7,7 % (Spannweite 0,32-40%) auf 20,2% (Spannweite 1,6-40%) [Dhallan, 2004]. Als Grund hierfür wurde angenommen, dass Formaldehyd zum einen die DNA-Struktur erhält aber auch die Zellmembran stabilisiert und die Enzyme, die DNA abbauen, hemmt. Dadurch sollte die Zellyserate gesenkt werden und der relative Anteil fetaler DNA an der gesamten freien DNA erhöht werden.

In anderen Studien wurde gezeigt, dass Formaldehyd keinen Effekt auf die Stabilität der DNA hat. Hierbei machte es keinen Unterschied, ob die Blutproben unmittelbar nach Entnahme, nach 6 oder nach 24 Stunden mit Formaldehyd behandelt worden waren [Benachi et al., 2005]. Auch wurde in weiteren Studien kein bzw. nur ein kleiner, nicht-signifikanter Anstieg der freien DNA-Konzentration gefunden [Chung et al., 2005] [Chinnapapagari et al., 2005]. Es gab keinen Unterschied zwischen den Konzentrationen fetaler DNA, die aus Serumproben und solchen, die aus EDTA-Blut gewonnen wurden [Benachi et al., 2005].

Zusätzlich wurde mit einem neuen Protokoll für die Plasmaisolation gearbeitet. Hierbei wurde beim Zentrifugieren die Anzahl der Umdrehungen pro Minute reduziert. Durch das Minimieren der Gravitationskräfte sollte die Zelllyserate reduziert werden [Dhallan, 2004]. Der positive Effekt konnte in weiterführenden Untersuchungen nicht bestätigt werden [Chung et al., 2005]. Im Durchschnitt konnten 66,1 fetale Genome/ml isoliert werden. Die Spannweite lag zwischen 3,0 und 533 fetale Genome/ml. Auch bei anderen Studien lag eine hohe Variabilität der Ergebnisse vor [Benachi et al., 2005].

Ein weiterer Schritt für eine verbesserte Anreicherung des Anteils an freier fetaler DNA an der freien Gesamt-DNA war die Bestimmung der DNA-Fragmentlänge. Durch ein besseres Verständnis der Mechanismen der DNA-Freisetzung und Elimination konnten Nachweismethoden verbessert und neue entwickelt werden sowie bessere molekulare Marker für die nicht-invasive Pränataldiagnostik entworfen werden [Chan et al., 2004].

#### **4.4.14 Ursprung freier DNA**

Die freie DNA ist im Plasma jedem Menschen nachweisbar und bestehen aus kleinen DNA Fragmenten. Der Nachweis freier DNA bei Tumorpatienten deutete auf einen apoptotischen Ursprung hin [Mutirangura et al., 1998] [Jahr et al., 2001]. Bei Nachuntersuchungen an Knochenmarkstransplantierten Patienten konnte nachgewiesen werden, dass der Großteil freier DNA-Fragmente aus dem hämatopoetischen System stammt [Lui et al., 2002] [Chan et al., 2004]. Bei gesunden, nicht-schwangeren Frauen sind diese DNA-Fragmente etwa 200 Basenpaare lang [Chan et al., 2004]. Bei Schwangeren sind die DNA-Fragmente in der Regel länger und zwischen 500 und 1000 Basenpaare groß [Li et al.,

2004]. Wenn Frauen schwanger werden, wird also nicht nur fetale DNA nachweisbar, sondern es werden zugleich auch längere Fragmente mütterlicher DNA freigesetzt [Chan et al., 2004]. Als Ursache hierfür werden sowohl hormonelle als auch physiologische Veränderungen diskutiert. Aber auch ein nicht hämatopoetischer Ursprung oder ein verminderter Abbau der DNA-Fragmente kommen als Ursache dieses Phänomens in Betracht [Chan et al., 2004].

#### **4.4.15 Selektive Anreicherung freier fetaler DNA durch Größenfraktionierung**

DNA-Moleküle mütterlichen Ursprungs sind größer als die fetalen Ursprungs. Die freie fetale DNA im mütterlichen Blut stammt nicht aus dem hämatopoetischen System des Feten, sondern aus der Plazenta [Li et al., 2004]. Der Großteil der fetalen DNA-Fragmente ist unter 300 Basenpaare lang [Li et al., 2004][Chan et al., 2004]. Ziel ist somit eine selektive Anreicherung von DNA-Sequenzen, die kürzer als 300 Basenpaare sind. Die Anreicherung der fetalen DNA durch Größenfraktionierung der DNA ist vor allem für die nicht-invasive Diagnostik autosomal-rezessiver Erkrankungen und von Aneuploidien wichtig. Eine Größenfraktionierung der Gesamt-DNA wurde durch Kombination aus Agarosegelelektrophorese, Southern blotting und qRT-PCR erreicht. Bisher ist diese Methode jedoch für klinische Anwendung noch zu ungenau und ineffizient.

Auch sind Aneuploidien kaum und nur sehr schwer nachweisbar. Allerdings erleichtert diese Methode die Analyse vererbter Mikrosatelliten-Marker, die zum indirekten Nachweis monogener Erbkrankheiten Verwendung finden [Li et al., 2004].



#### 4.4.16 STR-Sequenz-Analyse

Der vom Vater stammende Anteil der fetalen DNA ist in der freien Gesamt-DNA kaum detektierbar. Nachdem durch Größenfraktionierung der Gesamt-DNA jedoch der relative Anteil an freier fetaler DNA erhöht werden konnten, folgten nun Untersuchungen, ob väterlich vererbte DNA- Polymorphismen in größenfraktionierter zirkulierender DNA erkennbar sind. Es zeigt sich, dass in die durch den Vater vererbte DNA in der DNA Fraktion unter 300 Basenpaaren nachweisbar ist. Hierfür diente eine 228 Basenpaar große STR-Sequenz des Chromosoms 21 [Li et al., 2004]. Es wurde eine STR-Repeat-Sequenz gewählt, da bei STR-Sequenzen sich wiederholende Sequenzmotive vielfach hintereinander geschaltet sind und eine hohe Variabilität innerhalb der Bevölkerung aufweisen, die besonders dazu geeignet ist zwischen Individuen zu unterscheiden. STR-Sequenzen gehören meist zu der nicht-kodierenden DNA. Die vom Vater vererbte STR-Sequenz unterscheidet sich in der Regel in der Repeat-Zahl von der durch die Mutter vererbten STR-Sequenz. Durch die Amplifikation der STR-Sequenz entstehen zwei Produkte, ein Hauptprodukt, das den Allelen der Mutter und dem mütterlichen Allel des Feten entspricht, und ein kleineres Produkt, das der väterlich vererbten Sequenz des Feten entspricht. Insgesamt ist also für den Nachweis freier fetaler DNA das väterliche Allel des Feten entscheidend. Für die klinische Anwendung ist jedoch noch eine weitere Verbesserung der Untersuchungstechnik mit Erhöhung der Sensitivität und Spezifität nötig. In einem Fall konnte schon vor einigen Jahren mit Hilfe der Größenfraktionierung Achondroplasie durch Nachweis einer Punktmutation des FGFR3 Gens diagnostiziert werden [Li et al., 2004].

#### **4.4.17 Kalibrierungskurve**

Auch technische Änderungen wurden vorgenommen. Durch Änderung der Kalibrierungskurve wurde eine Erhöhung der Sensitivität und der Reproduzierbarkeit bei geringer Kopienzahl erreicht. Hierdurch konnten Multicopy-Sequenzen wie DYS14 des Y-Chromosoms schon ab etwa 2 Genomäquivalenten pro Reaktion nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu lag die untere Nachweisgrenze des single-copy SRY Gens deutlich höher bei 20 Genomäquivalenten pro Reaktion [Zimmermann et al., 2005].

#### **4.4.18 MALDI-TOF-MS**

Neben der Real-time PCR wird nun zunehmend Massen-Spektrographie (MS) zum Nachweis freier fetaler DNA eingesetzt. MALDI-TOF dient zur Massenspektrographie von chemischen Verbindungen. Bei MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation) werden die Analyten mittels Laserbeschuss über eine Matrix, in die die Analyten eingebettet sind, ionisiert. Hierdurch verdampft die Matrix und reißt die zu untersuchenden Analytmoleküle, die auch gleichzeitig ionisiert werden, mit. Die Ionen werden durch einen Ionendetektor in ein elektrisches Signal umgewandelt. Wegen der gepulsten Ionenerzeugung wird für die Massenanalyse ein Time-of-flight-Analysator (TOF) verwendet. Da der TOF-Analysator keine Massenbegrenzung besitzt, können auch Ionen mit großer Masse erfasst werden. Die DNA Analyse und Identifikation mittels MALDI-TOF-MS basiert auf dem Masse/Ladungsverhältnis [Braun et al., 2003]. Bei der Untersuchung freier fetaler DNA mittels MALDI-TOF MS werden ähnliche Detektionsraten wie bei der qRT-PCR durch

den TaqMan erreicht. Die Methode ist genauso sensitiv wie die qRTPCR [Li et al., 2006].

Durch Kombination von Real-Time PCR und MALDI-TOF-MS sowie Integration in ein MassARRAY System, kann sogar eine vollautomatische Analyse der Genexpression erreicht werden. Diese, als real competitive PCR (rcPCR) bezeichnete Methode hat jedoch noch mehrere andere Vorteile. So ist diese Untersuchungstechnik weniger anfällig für Artefakte, wie unspezifische Amplifikationen, die auch meiner Untersuchungsreihe auftraten, Mispriming, aber auch Fehler beim Pipettieren. Auch hat diese Methode einen hohen Durchsatz. So können einige hundert Gene aus bis zu 500 Proben pro Tag mit dieser Methode analysiert werden. Insgesamt zeichnet sich die rcPCR auch durch eine höhere Genauigkeit und Reproduzierbarkeit aus [Ding et al., 2003].

MALDI-TOF-Massenspektrometer sind sehr teure Geräte und deshalb nur für Labors mit einem hohen Durchsatz wirtschaftlich zu betreiben.

Durch eine Kombination der Größenfraktionierung der DNA und Analyse durch MALDI-TOF MS wird die Sensitivität erhöht und das Massenspektrumsignal reiner. Die Kombination der beiden Methoden könnte in den Fällen helfen, in denen Signale in der Standard MALDI-TOF-MS nicht erkannt werden [Li et al., 2006]. Dies ist vor allem in der Frühschwangerschaft sinnvoll.

#### **4.4.19 SNPs**

Als SNP (Single Nucleotide Polymorphism), also Einzelnukleotid-Polymorphismen, werden Variationen von einzelnen Basenpaaren in einem DNA-Strang bezeichnet. SNPs stellen ca. 90 % aller genetischen Varianten im

menschlichen Genom. SNP sind im Gegensatz zu Mini- und Mikrosatelliten nur biallelisch, aber sehr häufig. Sie betreffen etwa jedes 100. Basenpaar und sind einigermaßen gleichmäßig über das Genom verteilt.

Durch MS-Analyse von SNP-Unterschieden können Fötus-spezifische Allele z.B. bei der  $\beta$ -Thalassämie im maternalem Plasma gefunden werden. Der große Wert der zahlreichen autosomalen SNPs liegt in ihrem geschlechtsunabhängigen Einsatz [Ding et al., 2004]. Mittels SNPs gelingt die Unterscheidung fetaler DNA von maternaler DNA, außerdem können die fetalen Chromosomen durch SNPs bestimmt werden. Hierfür werden die Plasmafraktionen einer mütterlichen und einer väterlichen Blutprobe durch multiple SNPs charakterisiert und das Verhältnis von fetalem Allelsignal zu kombiniertem mütterlichen und väterlichem Allelsignal in Verhältnis gesetzt. Der durchschnittliche Anteil an freier fetaler DNA liegt bei 34% der gesamten freien DNA in mütterlichem Serum [Dhallan et al., 2007]. Sind SNPs bei Mutter und Vater entgegengesetzt homozygot, muss bei dem Fetus eine Heterozygotie vorliegen. Sind die zu untersuchenden SNPs bei der Mutter homozygot und beim Vater heterozygot vorhanden, dann sind die SNPs beim Feten mit 50%iger Wahrscheinlichkeit von denen der Mutter zu unterscheiden. Die Kopienzahl der Chromosomen, die von Interesse sind, kann direkt bestimmt werden. Durch diese Untersuchungsart werden eine Sensitivität und ein positiver prädiktiver Wert von 66% erreicht. Spezifität und negativer prädiktiver Wert liegen bei 98,2% [Dhallan et al., 2007]. Da sich die maternale von der fetalen DNA nur durch einzelne Basenpaare unterscheiden, ist der Nachweis von fetaler DNA mit SNPs jedoch zum einen abhängig von der selektiven Anreicherung der freien fetalen DNA zum anderen von der Anwendung hoch sensitiver Untersuchungstechniken wie der Massenspektrometrie.

#### **4.4.20 SABER**

Mit Hilfe eines neu entwickelten Protokolls für die Massenspektrometrie SABER (=Single allele base extension reaction) können mit hoher Treffsicherheit SNP-Allele, die nicht von der Mutter stammen, gefunden werden. Hierfür wurden 9 SNPs untersucht und Fötus-spezifische Allele bei mindestens einem SNP nachgewiesen. Hierdurch erhält man eine Sensitivität von 100%. Es traten keine falsch positiven Ergebnisse auf [Chow et al., 2007]. Nach vorausgegangener PCR wurde zuletzt mit Hilfe der Single Base Extension (SBE), die der Genotypisierung von SNPs dient, die Nachweismethode freier fetaler DNA mit MALDI-TOF MS nochmals verfeinert. Dies ermöglicht nun einen hoch spezifischen und hoch sensitiven DNA-Nachweis [Ding et al., 2008].

Für eine Routinediagnostik mit dieser Methode werden multiple Marker benötigt. Eine Polymorphismus-unabhängige Methode wurde zum Nachweis einer Trisomie entwickelt. Dies geschieht durch die Messung der relativen Chromosomenanzahl mit digitaler PCR. Hierfür wurde mit Hilfe von SNPs der PLAC4 mRNA, einer von der Plazenta exprimierten Gens auf Chromosoms 21, ein Allel-Verhältnis festgelegt. Durch diese sogenannte digitale RNA SNP Strategie wurde das Plasma von Frauen, die mit einem Feten mit Trisomie 21 schwanger waren, untersucht. Durch die Ermittlung des relativen Chromosomenmaßes (RCD) konnte ermittelt werden, ob Chromosom 21 im Verhältnis zu einem Referenz-Chromosom überrepräsentiert ist [Lo et al., 2007].

Um diese kleine Erhöhung sicher feststellen zu können, ist eine große, absolute Anzahl von Chromosomen 21 nötig. Auch muss die Referenzsequenz mit hoher Präzision analysiert und quantifiziert werden. Reduziert sich die Konzentration

freier fetaler DNA um die Hälfte, vergrößert sich die Molekülzahl, die für die RCD gebraucht wird um das 4-fache. Das bedeutet, dass in Fällen mit niedriger Konzentration freier fetaler DNA wie z.B. in der Frühschwangerschaft, mehr maternales Plasma für die Analyse benötigt wird.

Die Multiplex PCR-Analyse von bis zu 16 Genloci ist eine Möglichkeit die hierfür angewendet werden kann. Die gleichzeitige Analyse zahlreicher polymorpher Gensequenzen ermöglicht es, dass jedes DNA-Fragment, das auf einem aneuploiden Chromosom lokalisiert ist, Signale liefert, die auf eine Überzahl oder Unterzahl dieses Chromosoms hinweist [Chiu et al., 2008].

#### **4.4.21 Maspin**

Neben den SNPs werden zunehmend weitere Genmarker getestet. Dies ist sinnvoll, da sich zwar z.B. bei Trisomie 21-Schwangerschaften erhöhte fetale DNA-Konzentrationen im mütterlichen Serum finden, jedoch auch große Überschneidungen in der Konzentration freier fetaler DNA bei gesunden und aneuploiden Schwangerschaften auftreten [Lo et al., 1999a] [Farina et al., 2003]. Auch Methylierungsunterschiede werden zunehmend als Marker genutzt um fetale DNA von maternaler DNA zu unterscheiden [Tong et al., 2006]. Ein Beispiel ist die Trisomie 21.

Die Trisomie 18 (Edward Syndrom) tritt etwa bei 1/3000 Schwangerschaften auf und ist die eine der häufigsten Aneuploidien. Zu deren Nachweis wurde das Maspin (SERPIN5) Gen verwendet. Das Maspin Gen liegt auf 18q21.33.

Maspin diene als quantitativer fetaler DNA-Marker zum Vergleich der DNA zwischen Plazenta und maternalem Blut [Chim et al., 2005]. Er besitzt eine hohe Spezifität, auch wenn eine hohe Konzentration an freier maternaler DNA vorliegt. Maspin ist ein Tumorsuppressorgen und der Methylierungsindex in der Promotorregion wird während der Schwangerschaft nicht signifikant geändert. Das Gen wird in Plazenta exprimiert [Dokras et al., 2006]. Die gewebespezifische Expression wird durch die Promoter CpG Methylierung reguliert [Futscher et al., 2002]. Unmethylierte Sequenzen finden sich in Plazenta, jedoch nicht im maternalem Blut. Das DNA-Allel-Verhältnis kann durch einen Single Base-Variationsmarker festgelegt werden. Bei einer niedrigen Kopienzahl fluktuiert jedoch dieses Allel-Verhältnis zu stark. Theoretisch werden minimal 200 Kopien von Maspin benötigt um eine 97%ige diagnostische Sensitivität und Spezifität zur Unterscheidung euploider von aneuploider Schwangerschaften zu erreichen [Tong et al., 2006]. Hierbei werden auch potentielle Ungenauigkeiten in der Bestimmung von Allelhäufigkeiten durch MassARRAY-System berücksichtigt. Diese liegt bei etwa 3% [Ding et al., 2003]. Ziel ist es ähnlich spezifische Marker auch für Trisomie 21 und Trisomie 13 zu entwickeln.

#### **4.4.22 Shotgun Sequencing**

Zuletzt wurde mit Hilfe des Shotgun Sequencing das Plasma schwangerer Frauen direkt auf freie fetale DNA hin untersucht. Diese elegante Weiterentwicklung der 1982 von Sanger entwickelte Methode dient der Sequenzierung langer DNA-Stränge. Zunächst wird die DNA mehrfach kopiert. Die Kopien werden dann zufällig in zahlreiche kleine Fragmente zerteilt und anschließend sequenziert. Die Fragmente werden auf Überlappungen hin

untersucht und automatisiert zu einer Sequenz mit möglichst wenigen Lücken zusammengesetzt. Das Verfahren ist deutlich schneller als sonst üblicherweise angewandten Sequenzierungsalgorithmen. Die Sequenzierung mit dem Shotgun-Verfahren wird in mehrere Phasen eingeteilt. In der Fragmentierungs-Phase werden Fragmente zufällig durch mechanische Scherkräfte wie z.B. Ultraschall erzeugt. Die Verteilung ist zufällig verteilt. Daher stammt auch die Bezeichnung Schrotschuß(Shotgun)-Sequenzierung. Ein sequenziertes Fragment wird als Read bezeichnet. In der Overlap-Phase wird die Überlappung zwischen den sequenzierten Fragmenten ermittelt. Diese Information wird genutzt, um die Fragmente überlappend anzuordnen. Dieser Prozess wird automatisiert durchgeführt. Je nach Anordnung der Fragmente sind jedoch Lücken vorhanden. Die Berechnung von Fragment-Alignments geschieht in der Layout-Phase. Problematisch sind hierbei DNA-Repeats, da in der Layout-Phase Fragmente die Repeats enthalten, falsch angeordnet werden können. Durch statistische Verfahren können solche Stellen erkannt und gesondert ausgewertet werden. In der Konsensus Phase wird die Konsensus-Sequenz ermittelt. Durch diese direkte Sequenzierung konnte ein Polymorphismusunabhängiger Test für fetale Aneuploidien entwickelt werden. Bereits in der 14. SSW konnten die Proben in einem Durchgang auf Trisomie 21, 18 und 13 untersucht und den Proben euploider Feten unterschieden werden [Fan et al., 2008]. Durch die Verwendung freier fetaler DNA statt fetaler Zellen für diese Untersuchung konnten Störungen, die durch Microchimerismus und fremde Zellen bedingt sind, vermieden werden. Da das gesamte Genom erfasst wird und die Anzahl der untersuchten Sequenzen in der verdreifachten Chromosomenregion höher liegt als bei den restlichen Chromosomen, können alle Aneuploidien, vor allem auch seltenere Formen wie z.B. unbalancierte Translokationen oder partielle Chromosomenduplikationen oder -deletion nachgewiesen werden. Mosaik-



Aneuploidien können ebenfalls prinzipiell nachgewiesen werden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass durch direktes Sequenzieren die komplette DNA-Probe genutzt wird, während bei der PCR nur wenige Ziel-Sequenzen bestimmt werden können. Diese „Generation Zwei-Sequenzierungen“ werden zunehmend schneller und billiger. Es ist davon auszugehen, dass sie in wenigen Jahren innerhalb eines Tages und für weniger als 1.000 Euro durchgeführt werden können.

#### **4.4.23 Freie fetale RNA**

Neben dem Nachweis freier fetaler DNA wurden aber noch andere Wege der nicht-invasiven Pränataldiagnostik beschritten. Vor 10 Jahren wurde auch freie fetale RNA im Plasma der Mutter nachgewiesen. RNA ist ebenfalls bereits in der Frühschwangerschaft nachweisbar [Poon et al., 2000b] [Chiu et al., 2006], jedoch ist die Konzentration noch geringer als die freier DNA. Männliche fetale RNA konnte bei 22-63% der Proben nachgewiesen werden [Poon et al., 2000b]. Wie die freie DNA stammt auch die freie fetale RNA aus der Plazenta [Ng et al., 2003] Auch sie hat eine kurze Halbwertszeit von etwa 14 Minuten und ist nach Geburt rasch nicht mehr nachweisbar [Chiu et al., 2006]. Da manche Gene nur während der Schwangerschaft exprimiert sind, ist freie plazentare bzw. fetale RNA relativ einfach von der freien maternalen RNA zu unterscheiden. Wohl aufgrund der sehr geringen Konzentration an freier fetaler RNA mit insgesamt eher unsicherem Nachweis, spielt dieses Forschungsgebiet für die nicht-invasive Pränataldiagnostik bisher eine eher untergeordnete Rolle. Auch der Nachweis von Proteinen, die von Genen codiert werden, die nur in der Plazenta oder im Fötus exprimiert werden, könnten eine Möglichkeit zur Entwicklung neuer Marker in der Pränataldiagnostik bieten [Avent et al., 2008]. Weitere Studien

mit dem Ziel der Entwicklung und Verbesserung von Screening-Markern, vor allem für das Down-Syndrom, beginnen erst.

#### **4.4.24 Ethische Überlegungen**

Der Vorteil des Nachweises freier fetaler DNA im mütterlichen Serum ist zugleich auch ihr Nachteil. Eine nicht-medizinische Nutzung der im Vergleich zur Amniozentese und CVS risikoarmen und früh einsetzbaren Methode ist eines der Hauptprobleme. Noch stecken die Möglichkeiten in den Kinderschuhen, aber eine weitere Entwicklung ist absehbar. Bereits der Nachweis des Geschlechts des Kindes vor der 12. SSW kann in manchen Kulturkreisen durchaus problematisch sein und sogar zum Abbruch der Schwangerschaft führen.

Um Missbrauch zu vermeiden, soll daher die Bekanntgabe des Ergebnisses in Deutschland nicht vor der 14. Woche erfolgen. Problematisch ist jedoch die Durchsetzung solcher Regeln in Staaten wie Indien oder China, die zum Teil aus Angst vor der Geschlechterselektion bereits die Ultraschall-Diagnostik in der Frühschwangerschaft verboten haben. Aber auch in den westlichen Staaten gewinnt das sogenannte family balancing an Bedeutung.

In der Zukunft könnte auch präpartal die Bestimmung von Genen, die z.B. spät auftretende, heute noch unbehandelbare Krankheiten, wie der Chorea Huntington, oder ein erhöhtes Tumorrisiko auslösen, wie die BRCA1/2 Mutation bei Mamma-Karzinom, durchgeführt werden. Niemand weiß, ob die Erkrankung im Erwachsenenalter ausbrechen wird oder nicht und wie die Behandlungsmöglichkeiten der Zukunft aussehen. Dies stellt sicher ein großes

ethisches Problem dar. So bleibt es insgesamt eine Gratwanderung zwischen der Diagnostik genetischer Erkrankungen, die gegebenenfalls bei frühzeitiger Diagnosestellung therapierbar sind, solchen, die (noch) nicht therapierbar sind und der Selektion wohlmöglich gesunder Feten aufgrund des Geschlechts und anderen Eigenschaften.

Die deutsche Gesellschaft für Humangenetik ist mit der Entwicklung von neuen Leitlinien für die Pränataldiagnostik insbesondere bezüglich des klinischen Nutzens beschäftigt. Derzeit sind ca. 6000 klar definierte genetisch bedingte Erkrankungen bekannt. Allerdings soll die Entwicklung von Leitlinien nur für maximal 100 genetische Erkrankungen – hierunter auch die Rhesusinkompatibilität- erfolgen. Diese Erkrankungen machen jedoch deutlich über 95% der Gesamtzahl der genetischen Diagnostik aus, so dass eine größere Anzahl an Leitlinien nicht sinnvoll scheint. Derzeit sind etwa 30 Indikationskriterien auf der Homepage der deutschen Gesellschaft für Humangenetik online verfügbar [Deutsche Gesellschaft für Humangenetik]. Hierbei handelt es sich um Erkrankungen, bei denen eine molekulargenetische Diagnostik einen klinisch relevanten Nutzen erbringt.

Die Bestimmung der freien fetalen DNA als Routineverfahren für die Geschlechts- und Rhesus-Bestimmung bei Hoch-Risiko Patientinnen ist bereits in Vorbereitung. Manche Autoren erklären sogar bereits die Amniozentese zu diesem Zweck als obsolet [Avent et al., 2009].

Die Entwicklung der letzten Jahre zeigt, dass die nicht-invasive Pränataldiagnostik auf der Überholspur ist.

## Kapitel 5 - Anhang

### ***5.1 Bezugsquellen der Materialien***

AE-Puffer	ROCHE
AL-Puffer	ROCHE
AW1-Puffer	ROCHE
AW2-Puffer	ROCHE
DYS-Primer forward	
DYS-Primer reverse	
DYS-Sonde	
EDTA	SIGMA
Essigsäure	MERCK
Ethanol	MERCK
GAPDH-Primer forward	
GAPDH-Primer reverse	
GAPDH-Sonde	
Proteinase K	ROCHE; MERCK
QuantiTect Probe PCR	
Master Mix	QIAGEN
SRY-Primer forward	QIAGEN
SRY-Primer reverse	QIAGEN
SRY-Sonde	QIAGEN

## **5.2 Lösungen**

Die Lösungen, die im Zuge dieser Arbeit am häufigsten verwendet wurden, sind im Folgenden angeführt. Alle verwendeten Lösungen wurden mit Aqua dest. unter so reinen Bedingungen wie möglich angesetzt.

### **1 l 50x TAE-Puffer**

242 g Tris-Base 57

1 ml Eisessig

100 ml 0,5 M EDTA Auf 1 l mit Aqua dest.  
auffüllen

### **1l 5 X TAE-Puffer**

20 ml 50x TAE-Puffer

980 ml Aqua dest.

## **5.3 Geräte und Software**

<b>Gerät/ Software</b>	<b>Firma/Typ</b>
Eppendorfszentrifuge (gekühlt)	Hermle Z233 MK
Eppendorfszentrifuge Gelkammer Owl	OWL Gelkammer Roche LC Carousel
Karussellzentrifuge	Centrifuge
LightCycler	Roche LightCycler
Software LightCycler	Roche
Wasserbad	

## 5.4 Abkürzungen

### Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AFP	Alpha- Fetoprotein
Aqua dest	Destilliertes Wasser
BZW	Beziehungsweise
β-HCG	Engl.: β- human chorionic gonadotrophin
Ca.	Circa
CPM	Engl.: confined placenta mosaicism
CVS	Engl.: Chorionic villi sampling
°C	Grad Celsius
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Desoxyribonukleinsäure-Triphosphat
DYS	Engl.: DNA Y-Chromosome segment Engl.: ethylene diamine tetraacetic acid (Äthylendiamintetraessigsäure)
EDTA	
Engl.	Englisch
EtBr	Ethidiumbromid
Etc.	Et cetera
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellauftrennung
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
Fragl.	Fraglich
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
G	Gramm
hCG	Engl.: human chorionic gonadotrophin
Hrsg.	Herausgeber
L	Liter
LED	Licht emittierende Dioden
MA	Milliampere
MACS	Magnetisch-aktivierte Zellauftrennung
Männl.	Männlich
Mg	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ms	Millisekunde

Neg.	Negativ
Nr.	Nummer
NT	Nackentransparenz
PAPP-A	Engl.: Pregnancy Associated Plasma Protein A
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
Pg	Pikogramm
Pos.	Positiv
qRT-PCR	Real-Time Polymerase Ketten Reaktion
RhD	Rhesus D
S	Sekunde
Sec.	Sekunde
SRY	Engl.: Sex determining region Y gene
SSW	Schwangerschaftswoche
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-Puffer
uE3	Engl.: unconjugated oestriol
UV	Ultraviolett
Weibl.	weiblich
Z.B.	Zum Beispiel
µl	Mikroliter

## Kapitel 6 - Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Zang, den ehemaligen Leiter des humangenetischen Instituts der Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg für das Stellen des Dissertationsthemas, die Unterstützung und Geduld währenddessen sowie die anregenden Diskussionen über die Arbeit.

Außerdem danke ich Herrn Dr. Thomas Martin sowie allen anderen Mitarbeitern des humangenetischen Instituts für die Betreuung während des praktischen Teils der Arbeit.

Ich bedanke mich des Weiteren bei den Mitarbeitern sowie den Patientinnen der Frauenklinik der Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg/Saar für das Überlassen der Blutproben ohne die die Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Dr. Sinuhe Hahn und Herrn Dr. Bernhard Zimmermann des Kantospitals in Basel/Schweiz gilt mein besonderer Dank. Durch ihre schnelle, freundliche und zuverlässige Hilfe haben sie entscheidend zum Fortschritt des experimentellen Teils meiner Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Gregor Schaffrath möchte ich mich für die Hilfe - sowohl bei den kleineren als auch größeren Computerproblemen - bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch meiner Familie für die Ermöglichung meines Studiums und ihre Unterstützung währenddessen.



Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann Herrn Philip Schneider für das unermüdliche Korrekturlesen und die beständige Unterstützung während der letzten Jahre herzlich bedanken.

# Kapitel 7- Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Nachname: Schneider

Vorname: Andrea Martina

Geburtsdatum: 30.01.1979

Geburtsort: Püttlingen

Nationalität: deutsch

Familienstand: verheiratet

## Ausbildung:

### Schulbildung:

1985-1989 Grundschule Pater Eberschweiler, Püttlingen

1989-1998 Realgymnasium, Völklingen

### Studium:

1998-2005 Medizinstudium, Homburg/Saar

2001 Physikum

2002 1. Ärztliche Prüfung

2004 2. Ärztliche Prüfung

2005 3. Ärztliche Prüfung

seit 2002 Doktorarbeit am Institut für Humangenetik

seit 2006 Assistenzärztin für Innere Medizin, Evangelisches Krankenhaus  
Zweibrücken

## Kapitel 8- Literaturverzeichnis

Alberry M., Maddocks D., Jones M., Abdel Hadi M., Abdel-Fattah S., Avent N., Soothill P. W. (2007) Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenatal diagnosis* 27: 415-418

Al-Yatama M. K., Mustafa A.S., Ali S., Abraham S., Khan Z., Khaja N. (2001) Detection of Y chromosomespecific DNA in the plasma and urine of pregnant women using nested polymerase chain reaction. *Prenatal diagnosis* 21: 399-402

Amicucci P., Gennarelli M., Novelli G., Dallapiccola B. (2000) Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clinical Chemistry* 46: 301-302

Attwood H.D., Park W.W. (1960) Embolism to the lungs by trophoblast. *Journal of Obstetrics and Gynaecology of the British Commonwealth* 68: 611-617

Avent N.D., Plummer Z.E., Madgett T.E., Maddocks D.G., Soothill P.W. (2008) Post-genomics studies and their application to non-invasive prenatal diagnosis. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 13: 91-98

Avent N.D., Madgett T.E., Maddocks D.G., Soothill P. W. (2009) Cell-free fetal DNA in the maternal serum and plasma: current and evolving applications. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, Vol. 21, Issue 2: 175-179

Benachi A., Yamgnana A., Olivi M., Dumez Y., Gautier E., Costa J.-M. (2005) Impact of formaldehyde on the in vitro proportion of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Clinical Chemistry* 51: 242-244

Bianchi D.W., Flint A.F., Pizzimenti M.F., Knoll J .H. M., Latt S. A. (1990) Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proceedings of the National Academy of sciences USA* 87: 3279-3283

Bianchi D.W., Mahr A., Zickwolf G. K. et al (1993) Erythroidspecific antibodies enhance detection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood. *Prenatal Diagnosis* 13: 293-300

Bianchi D.W., Klinger K.W., Vandais T. J., DeMaria M.A., Shuber A.P., Skoletsky J., Midura P., Diriso M., Pelletier C., Genova M., Erikson M.S., Williams J.M. (1996) Development of a model system to compare cell separation methods for the isolation of fetal cells from maternal blood. *Prenatal Diagnosis* 16: 289-298

Bianchi D.W., Zickwolf G.K., Weil G.J., Sylvester S., DeMaria M.A. (1996) Male progenitor Cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proceedings of the National Academy of sciences USA* 93: 705-708

Bianchi D.W., Williams J.M., Sullivan L.M., Hanson F.W., Klinger K.W., Shuber A.P. (1997) PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *The American Journal of Human Genetics* 61: 822-829

Bianchi D.W. (1998) Fetal DNA in maternal plasma: The plot thickens and the placental barrier thins. *The American Journal of Human Genetics* 62: 763-764

Branbati B., Simoni G. (1987) Chorionzottenentnahme im 1. Trimenon: Techniken und Anwendungen zur zytogenetischen Diagnostik. *Pränatale Medizin*: 117-131. Springer, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo

Braun A., Roth R., McGinniss M.J. (2003) Technology challenges in screening single gene disorders. *European Journal of Pediatrics* 162: 13-16

Cacheux V., Milesi-Fluet C., Tachdjian G., Druart L., Bruch J.F., Hsi B.L., Uzan S. et al. (1992) Detection of 47, XYY trophoblast cells in maternal blood by fluorescence in situ hybridization after immunomagnetic lymphocyte depletion and flow cytometric sorting. *Fetal Diagnosis and Therapy* 7: 190-194

Caramelli E., Rizzo N., Concu M., Simonazzi G., Carinci P., Bondavalli C., Bovicelli L., Farina A. (2003) Cell-free fetal DNA concentration in plasma of patients with abnormal uterine artery Doppler waveform and intrauterine growth restriction – a pilot study. *Prenatal Diagnosis*, Vol. 23, Issue 5: 367-371

Chan V., Lau K., Yip B., Sin S.Y., Cheung M.-C., Kan Y.W. (1998) Diagnosis of spinal muscular atrophy from fetal normoblasts in maternal blood. *The Lancet*, Vol. 352, Nr 9135

Chan K. C. A., Thang J., Hui A.B.Y., Wong N., Lau T.K., Leung T.N., Lo K.-W., Huang D.W.S., Lo Y.M.D. (2004) Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clinical Chemistry* 50: 88-92

Chen H., Griffen D.K., Jestice K., Hackett G., Cooper J., Ferguson-Smith M.A. (1998). Evaluating the culture of fetal erythroblasts from maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis* 18: 883-892

Chim S. S. C., Tong Y.K., Chiu R.W. K., Lau T.K., Leung T.N., Chan L.Y.S., Oudejans C.B.M., Ding C., Lo Y.M.D. (2005) Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of sciences USA* 102(41): 14753-14758

Chinnapapagari S.K.R., Holzgreve W., Lapaire O., Zimmermann B., Hahn S. (2005) Treatment of maternal blood samples with formaldehyde does not alter the proportion of circulatory fetal nucleic acids (DNA and mRNA) in maternal plasma. *Clinical Chemistry* 51: 652-655

Chiu R.W.K., Poon L. L.M., Lau T.K., Leung T.N., Wong E.M.C., Lo Y.M.D. (2002) Effects of blood-processing protocols on quantification of fetal and maternal DNA in maternal plasma. *Quiagen News Issue No. 5*: 2-6

Chiu R.W. K., Lui W.-B., Cheung M.-C., Kumta N., Farina A., Banzola I., Grotti S., Rizzo N., Haines C.J., Lo Y.M.D. (2006) Time profile of appearance and disappearance of circulating placenta-derived mRNA in maternal plasma *Clinical Chemistry* 52: 313-316

Chiu R.W. K., Chan K. C. A., Gao Y., Lau V.Y. M., Zheng W., Leung T.Y., Foo C.H.F., Xie B., Tsui N.B.Y., Lun F.M.F., Zee B.C.Y., Lau T.K., Cantor C.R., Lo Y.M.D. (2008) Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 105 No. 51: 20458-20463

Chow K.C.K. Chow, Chiu R.W. K. Chiu, Tsui N.B.Y., Ding C., Lau T.K., Leung T.N., Lo Y.M. D. (2007) Mass spectrometric detection of an SNP panel as an internal positive control for fetal DNA analysis in maternal plasma. *Clinical Chemistry* 53: 141-142

Chung G.T.Y., Chiu R.W.K, Chan K.C.A., Lau T.K., Leung T.N., Lo Y.M. D. (2005) Lack of dramatic enrichment of fetal DNA in maternal plasma by formaldehyde treatment. *Clinical Chemistry* 51: 655-658

Costa J.-M., Benachi A., Gautier E., Jouannie J.-M., Ernault P., Dumez Y. (2001) First-trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR. *Prenatal Diagnosis* 21: 1070-1074

Deutsche Gesellschaft für Humangenetik e.v. [www.gfhev.de](http://www.gfhev.de): Leitlinien/Stellungnahmen

Dhallan R. (2004) Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation. *JAMA*, March04, Vol. 291: 1114-1119

Dhallan R., Gio X., Emche S., Damewood M., Bayliss P., Cronin M., Barry J., Betz J., Franz K., Gold K., Vallecillo B., Varney J. (2007) A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA in maternal blood: a preliminary study. *The Lancet*, 369: 474-481

K. Diedrich Gynäkologie und Geburtshilfe: 323. Springer, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo, 2000

Ding C., Cantor C.R. (2003) A high-throughput gene expression analysis technique using competitive PCR and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(6): 3059-3064

Ding C., Chiu R.W. K., Lau T.K., Leung T. N., Chan L.C., Chan A.Y.Y., Charoenkwan P., Ng I.S.L., Law H.-y., Ma E.S.K., X. Xu, Wanapirak C., Sanguanserm Sri T., Liao C., Ai M.A.T.J., Chui D.H.K., Cantor C.R., Lo Y.M. D. (2004) MS analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: Application to noninvasive prenatal diagnosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 101 No. 29: 10762-10767

Ding C. (2008) MALDI-TOF mass spectrometry for analyzing cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Methods in Molecular Biology. Prenatal Diagnosis* Vol. 444: 253-267

Donald I., Vicar J.M., Brown T.G. (1958) Investigation of abdominal masses by pulsed ultrasound. *Lancet* I: 1188

Durrant L.G., Martin W.L., McDowall K.M., Liu D.T.Y. (1996) Isolation of fetal trophoblasts and nucleated erythrocytes from the peripheral blood of pregnant women for prenatal diagnosis of fetal aneuploides. *Early Human Development* 47: 79-83

Dokras A., Coffin J., Field L., Frakes A., Lee H., Madan A, Nelson T., Ryu G.-Y., Yoon J.-G. (2006) Epigenetic regulation of maspin expression in the human placenta. *Molecular Human Reproduction* 12(10): 611-617

Faas B.H.W., Beuling E.A., Christiaens G.C.M.L., Kr von dem Borne A.E.G., van der Schoot C.E. (1998) Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *The Lancet* Vol. 352: 1196-1198

Fan H.C., Blumfeld Y.J., Chitkara U., Hudgins L., Quake S.R. (2008) Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008 Vol. 105 No. 42: 16266-16271

Futscher B.W., Oshiro M.M., Wozniak R.J., Holtan N., Hanigan C.L., Duan H., Domann F.E. (2002) Role for DNA methylation in the control of cell Type-specific maspin expression. *Nature Genetics* 31: 175-179

Farina A., LeShane E.S., Lambert-Messerlian G.M., Canick J.A., Lee T., Neveux L.M., Palomaki G.E., Bianchi D.W. (2003) Evaluation of cell-free fetal DNA as a secondtrimester maternal serum marker of Down syndrome pregnancy. *Clinical Chemistry* 49:2: 239-242

Goldberg J.D., Wohlferd M.M. (1997) Incidence and outcome of chromosomal mosaicism found at the time of chorionic villus sampling. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 176: 1349-1353

Gonzalez-Gonzalez M.C., Garcia-Hoyos M., Trujillo M.J., Rodriguez de Alba M., Lorda-Sanchez I., Diaz-Recasens J., Gallardo E., Ayuso C., Ramos C. (2002) Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenatal Diagnosis* 2002; 22: 946-948

Grosset L., Barelet V., Ordatchenko N. (1974) Antenatal fetal sex determination from maternal blood during pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 120: 60-63

Guetta E., Gutstein-Abo L., Barkai G. (2004) In-vitro expansion of trophoblasts isolated from the maternal circulation: potential application in non-invasive prenatal diagnosis. *Medizinische Genetik* Nr. 1, März 2004, 16. Jahrgang: 99

Hahn S., Holzgreve W. (1998) Fetale Zellen in mütterlichem Blut. *Reproduktionsmedizin* 14: 143-147

Hahnemann J.M., Vejerslev L.O. (1997) European collaborative research on mosaicism in CVS (EUCROMIC) - fetal and extrafetal cell lineages in 192 gestations with CVS mosaicism involving single autosomal trisomy. *American Journal of Medical Genetics* 70: 179-187

Hay D.L., Barrie J.U., Davison G.B., Buttery B.W., Horacek I., Pepperell R.J. et al. (1979) The relation between maternal serum alpha-fetoprotein levels and fetomaternal haemorrhage. *British Journal of Obstetrics and Gynecology* 1979; 86: 516-520

Hawes C.S., Suskin H.A., Kalonis B., Mueller U.W., Casey G., Hall J., Rudzki Z. (1994) Detection of paternally inherited mutations for b-thalassemia in trophoblast isolated from peripheral maternal blood. *Annals of the New York Academy of Sciences* 731: 181-185

Henderson K.G., Shaw T.E., Barret I.J., Telenius A.H.P., Wilson R.D., Kalousek D.K.I. (1996) Distribution of mosaicism in human placentae. *Human Genetics* 97: 650-654

Henkel (1919) Akutes Hydramnion, Leberkompression, enges Becken. Punktion des Hydramnion. *Zentralblatt für Gynäkologie*, 43. Jahrgang: 841-846

Herzenberg L.A., Bianchi D.W., Schröder J., Cann H.M., Iverson C.M. (1979) Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76: 1453-1455

Holzgreve W., Ghezzi F., Di Naro E., Maymon E., Gänshirt D., Hahn S. (1998) Fetomaternal cell traffic is significantly perturbed in preeclampsia. *Journal of Obstetrics and Gynecology* 91: 669-672



Invernizzi P., Biondi M.L., Battezzati P.M., Perego F., Selmi C., Cecchini F., Podda M., Simoni G. (2002) Presence of fetal DNA in maternal plasma decades after pregnancy. *Human Genetics* 110: 587-591

Jahr S., Hentze H., Englisch S., Hardt D., Fackelmayer F.O., Hesch R.-D., Knippers R. (2001) DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence of their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Research* 61: 1659-1665

Jimbo M., Sekizawa A., Sugito Y., Matsuoka R., Ichizuka K., Saito H., Okai T. (2003) Placenta increta: Postpartum monitoring of plasma cell-free fetal DNA. *Clinical Chemistry* 49: 1540-1541

Johnson K.L., Dukes K.A., Vidaver J., LeShane E.S., Ramirez I., Weber W.D., Bischoff F.Z., Hahn S., Sharma A., Dang D.X., Hire L.M., Bianchi D.W., Simpson J.L., Holzgreve W., Elias S., Klinger K.W. (2004) Interlaboratory comparison of fetal male DNA detection from common maternal plasma samples by real/time PCR. *Clinical Chemistry* 50: 516/521

Kang A., Hahn S., Holzgreve W. (1999) Fetale Zellen im mütterlichen Blut - ihre Bedeutung für eine nicht-invasive pränatale Diagnostik und bei der Ätiologie bestimmter Erkrankungen. *Schweizer Medizinische Wochenschrift* 129: 1740-1743

Kalousek D.K. (1983) Chromosomal mosaicism confined to the placenta in human conceptions. *Science* 221: 665-667

Kolvraa S., Christensen B., Philip J. (2005) The fetal erythroblast is not the optimal target for non-invasive prenatal diagnosis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*: 331-336

Lambl (1881) Ein seltener Fall von Hydramnios. *Zentralblatt für Gynäkologie*, 5.Jahrgang, 14/15: 329-334/353-358

Lau T.-W., Leung T.N., Chan L.Y.S., Lau T.K., Chan K.C.A., Tam W.H., Lo Y.M.D. (2002) Fetal DNA clearance from maternal plasma is impaired in preeclampsia. *Clinical chemistry* 48: 2141-2146

Lazar L., Nagy B., Ban Z., Nagy G., Papp Z. (2006) Presence of cell-free fetal DNA in plasma of women with ectopic pregnancies. *Clinical chemistry* 52, No 8: 1599-1601

Leong M., Duby S., Kinch R.A. (1979) Fetal-maternal transfusion following early abortion. *Obstetrica and Gynecology* 54: 424-426

Li Y., Holzgreve W., Page-Christiaens G.C.M.L., Gille J.J.P., Hahn S. (2004) Improved prenatal detection of a fetal punct mutation for achondroplasia by the use of size-fractionated circulatory DNA in maternal plasma - case report. *Prenatal Diagnosis* Vol. 24, Issue 11: 896-898

Li Y., Zimmermann B., Rusterholz C., Kang A., Holzgreve W., Hahn S. (2004) Size-separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clinical Chemistry* 50: 1002-1011

Li Y., di Naro E., Vitucci A., Zimmermann B., Holzgreve W., Hahn S. (2005) Detection of paternally inherited fetal point mutations for  $\alpha$ -Thalassemia using size-fractionated cellfree DNA in maternal plasma. *JAMA* Vo.1 293, No. 7: 843-849

Li Y., Wenzel F., Holzgreve W., Hahn S. (2006) Genotyping fetal paternally inherited SNPs by MALDI-TOF MS using cell-free fetal DNA in maternal plasma: Influence of size fractionation. *Electrophoresis* 27: 3889-3896

Li Y., Holzgreve W., Kiefer V., Hahn S. (2006) MALDI-TOF Mass spectrometry compared with real-time PCR for detection of fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Clinical Chemistry* 52: 2311-2312

Lo Y.M.D., Corbetta N., Chamberlain P.F., Rai V., Sargent I.L., C.W.G., Redman, Wainscoat J.S. (1997) Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet* Vol. 350: 485-487

Lo Y.M.D., Hjelm N.M., Fiedler C., Sargent I.L., Murphy M.F., Chamberlain P.F., Poon P.M.K., Redman C.W.G., Wainscoat J.S. (1998) Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *The New England Journal of Medicine*: 1734-1738

Lo Y.M.D., Tein M.S.C., Lau T.K., Haines C.J., Leung T.N., Poon P.M.K., Wainscoat J.S., Johnson P.J., Chang A.M.Z., Hjelm N.M. (1998) Quantitative

Analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: Implications for noninvasive prenatal diagnosis. *The American Journal of Human Genetics* 62: 768-775

Lo Y.M.D., Zhang J., Leung T.N., Lau T.K., Chang A.M.Z., Hjelm N.M. (1999) Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *The American Journal of Human Genetics* 64: 218-224

Lo Y.M.D., Lau T.K., Zhang J., Leung T.N., Chang A.M.Z., Hjelm N.M., Elmes R.S., Bianchi D.W. (1999) Increased fetal DNA concentration in the plasma of pregnant women carrying fetuses with Trisomy 21. *Clinical Chemistry* 45:10: 1747-1751

Lo Y.M.D., Leung T.N., Tein M.S.C., Sargent I.L., Zhang J., Lau T.K., Haines C.J., Redman C.W.G. (1999) Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal plasma in Preeclampsia. *Clinical Chemistry* 45: 184-188

Lo Y.M.D. (2000) Fetal DNA in maternal plasma: Biology and diagnostic applications. *Clinical Chemistry* 46: 1903-1906

Lo Y.M.D., Lun F.M.F., Chan K.C.A., Tsui N.B.Y., Chong K.C., Lau T.K., Leung T.Y., Zee B.C.Y., Cantor C.R., Chiu R.W.K. (2007) Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(32): 13116-13121

Lui Y.Y.N., Chik K.-W., Chiu R.W.K., Ho C.-Y., Lam W.K., Lo Y.M.D. (2002) Predominant Hematopoietic origin of cellfree DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clinical Chemistry* 48: 421-427

Miny P., Holzgreve W., Pawlowitzki I.-H. (1987) *Amniozenteseprogramm Münster: Erfahrungen nach 7000 Eingriffen*. *Pränatale Medizin*:1-18. Springer, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo

Mohr J. (1968) Foetal genetic diagnosis: Development of techniques of early sampling of foetal cells. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavia* 73: 7377

Mueller U.W., Hawes C.S., Wright A.E., Petropoulos A., Deboni E., Firgaira F.A., Morley A.A. (1990) Isolation of fetal trophoblasts cells from peripheral blood of pregnant women. *Lancet* 336: 197-200

- Murakami K., Shimada K., Maeda E., Segawa T., Shozu M., Inoue M. (2003) Fetal DNA Levels in Maternal Blood Correlated with Fetal Prognosis in a Case of Intervillous Hematoma. *American Journal of Perinatology*, Vol. 20(7): 361-366
- Mutirangura A., Pornthanakasem W., Theamboonlers A., Sriuranpong V., Lertsanguansinchi P., Yenrudi S., Voravud N., Supiyaphun P., Poovorawan Y. (1998) Epstein-Barr viral DNA in serum of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Clinical Cancer Research* Vol. 4: 665-669
- Ng E.K.O., Tsui N.B.Y., Lau T.K., Leung T.N., Chiu R.W.K., Panesar N.S., Lit L.C.W., Chan K.-W., Lo Y.M.D. (2003) mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 100 No. 8: 4748-4753
- Niazi M., Coleman D.V., Loeffler F.E. (1981) Trophoblast sampling in early pregnancy. Culture of rapidly dividing cells from immature placental villi. *British Journal of Obstetrics and Gynecology* 88: 1081-1085
- Nicolaides K.H., Snijders R.J.M. (1994) Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for fetal trisomy in the first trimester of pregnancy. *British Journal of Obstetrics and Gynecology* 01: 782-786
- Ohashi Y., Miharu N., Honda H., Samura O., Ohama K. (2002) Correlation of fetal DNA and Human Chorionic Gonadotropin concentrations in second-trimester maternal serum. *Clinical Chemistry* 48: 386-388
- Pan P.D., Peter I., Lambert-Messerlian G.M., Canick J.A., Bianchi D.W., Johnson K.L. (2005) Cell-free fetal DNA levels in pregnancies conceived by IVF. *Human Reproduction* 20(11): 3152-3156
- Pertl B., Weitgasser U., Kopp S., Kroisel P.M., Sherlock J., Adinolfi M. (1996) Rapid detection of trisomies 21 and 18 and sexing by quantitative fluorescent multiplex PCR. *Human Genetics* 98: 55-59
- Poon L.L.M., Leung T.N., Lau T.K., Lo Y.M.D. (2000) Prenatal detection of fetal Down syndrome from maternal plasma. *The Lancet* Vol. 356, No. 9244: 1819-1820

Poon L.L.M., Leung T.N., Lau T.K., Lo Y.M.D. (2000) Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clinical Chemistry* 46: 1832-1834

Rijnders R.J. (2003) Earliest gestational age for fetal sexing in cellfree maternal plasma. *Prenatal Diagnosis* Vol. 23: 1042-1044

Rijnders R.J. (2004) Cell-free fetal DNA is not present in plasma of nonpregnant mothers. *Clinical Chemistry* Vol. 50: 679-681

Samura O., Miharu N., Hyodo M., Honda H., Ohashi Y., Honda N., Hara T., Ohama K. (2003) Cell-free fetal DNA in maternal circulation after Amniocentesis. *Clinical Chemistry* Vol. 49: 1193-1195

Schatz (1882) Eine besondere Art von einseitiger Polyhydramnie mit anderseitiger Oligohydramnie bei Zwillingen. *Zentralblatt für Gynäkologie*, 6.Jahrgang: 712-714

Schindler A.M., Graf E., Martin-du-Pan R. (1972) Prenatal diagnosis of fetal lymphocytes in the maternal blood. *Obstetrics and Gynecology* 40: 340-346

Schmorl G. (1893) *Pathologisch-anatomische Untersuchungen über Puerperalklampsie*. Vogel. Leipzig

Schröder J., de la Chapelle A. (1972) Fetal lymphocytes in maternal blood. *Blood* 39: 153-161

Sekizawa A., Watanabe A., Kimura T., Saito H., Yanaihara T., Sato T. (1996) Prenatal diagnosis of the fetal RhD blood type using a single fetal nucleated erythrocyte from maternal blood. *Obstetrics and Gynecology* Vol. 87, No 4: 501-505

Sekizawa A., Sugito Y., Iwasaki M., Watanabe A., Jimbo M., Hishi S., Saito H., Okai T. (2001) Cell-free fetal DNA is increased in plasma of women with Hyperemesis gravidum. *Clinical Chemistry* 47: 2164-2165

Sekizawa A., Jimbo M., Saito H., Iwasaki M., Sugito Y., Yukimoto Y., Otsuka J., Okai T. (2002) Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta. *Clinical Chemistry* 48: 353-354

Sekizawa A., Jimbo M., Saito H., Matsuoka M.I.R., Sugito Y., Okai T., Farina A. (2003) Cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women with severe fetal growth restriction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 188(2): 480-484

Sitzmann F.C. Pädiatrie: 109-110. Duale Reihe, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2002

Skinner J., Luettich K., Ring M, O'Leary J.J., Turner M.J. (2001) Fetal DNA in maternal circulation of first-trimester spontaneous abortions. *Obstetrics and Gynecology*, Vol. 97, No 3: 460-463

Skinner J., Luettich K., Ring M., O'Leary J.J., Turner M.J. (2003) Analysis of fetal DNA in the maternal venous blood for abnormalities of chromosomes 13, 16, 18 and 21 in first-trimester spontaneous miscarriage. *Obstetrics and Gynecology*, Vol. 23, No 3: 228-232

Smid M., Galbiati S., Vassallo A., Gambini D., Ferrari A., Viora E., Pagliano M., Restagno G., Ferrari M., Cremonesi L. (2003) No evidence of fetal DNA in maternal plasma after pregnancy. *Human Genetics* 112: 617-618

Smid M., Galbiati S., Vassallo A., Gambini D., Ferrari A., Restagno G., Viora E., Pagliano M., Calza S., Ferrari M., Cremonesi L. (2003) Fetal DNA in maternal plasma in twin pregnancies. *Clinical chemistry* 49: 1526-1528

Spencer K., de Kok J.B., Swinkels D.W. (2003) Increased total cell-free DNA in the serum of pregnant women carrying a fetus affected by trisomy 21. *Prenatal Diagnosis* 23: 580-583

Steele M.W., Berg W.R. jr (1966) Chromosome analysis of human amniotic fluid cells. *Lancet* I: 383

Swinkels D.W., de Kok J.B., Hendriks J.C.M., Wiegerinck E., Zusterzeel P.L.M., Steegers E.A.P. (2002) Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, and Low Platelet Count (HELLP) Syndrome as a Complication of Preeclampsia in Pregnant Women Increases the Amount of Cellfree Fetal and Maternal DNA in Maternal Plasma and Serum. *Clinical Chemistry* 48: 650-653

- Tang N.L.S., Leung T.N., Zhang J, Lau T.K., LO Y.M.D. (1999) Detection of fetal-derived paternally inherited X-chromosome polymorphisms in maternal plasma. *Clinical Chemistry* 45: 2033-2035
- Tercanli S., Holzgreve W. (2000) Pränatale Diagnostik. In: K. Diedrich (Hrsg) *Gynäkologie und Geburtshilfe*: 322-323. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo, 2000 322-323
- Thomas M.R., Tutschek B., Frost A., Rodeck C.H., Yazdani N., Craft I., Williamson R. (1995) The time of appearance and disappearance of fetal DNA from the maternal circulation. *Prenatal Diagnosis* 15(7): 641-646
- Tong Y.K., Ding C., Chiu R.W.K., Gerovassili A., Chim S.S.C., Leung T.Y., Leung T.N., Lau T.K., Nicolaides K.H., Lo Y.M.D. (2006) Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: theoretical and empirical considerations. *Clinical Chemistry* 52: 2194-2202
- Valenti C., Schutta E.J., Kehaty T. (1968) Prenatal diagnosis of Down syndrome. *Lancet* II: 220
- Valerio D., Aiello R., Altieri V. (1997) Isolation of fetal erythroid cells from maternal blood based on expression of erythropoietin receptors. *Molecular Human Reproduction*, Vol. 3 No. 5 pp.: 451-455
- Walknowska J., Conte N.P., Grumbach M.M. (1969) Practical and theoretical implication of fetal/maternal lymphocyte transfer. *Lancet* 1: 1119-1122
- Wataganara T., LeShane E.S., Farina A., Messerlian G.M., Lee T., Canick J.A., Bianchi D.W. (2003) Maternal serum cell-free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18. *Human Genetics* 112(2): 204-208
- Wataganara T., Chen A.Y., LeShane E.S., Sullivan L.M., Borgatta L., Bianchi D.W. (2004) Cell-free fetal DNA levels in maternal plasma after elective first trimester termination of pregnancy. *Fertil Steril* 81: 639-644
- Wataganara T., Chen A.Y., LeShane E.S., Sullivan L.M., Borgatta L., Bianchi D.W., Johnson K.L. (2005) Changes of cell-free fetal DNA in maternal plasma after elective termination of pregnancy. *Clinical Chemistry* 51: 217-219

Wright C.F., Burton H. (2009) The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Human Reproduction Update*, Vol. 15, No. 1: 139-151

Yan Z., Lambert N.C., Stensen M., Adams K.M., Guthrie K.A., Nelson J.L. (2006) Prospective study of fetal DNA in serum and disease activity during pregnancy in women with inflammatory arthritis. *Arthritis and Rheumatism* Vol. 54, Issue 7: 2069-2073

Yin A., Ng E.H.Y., Zhang X., He Y., Wu J., Leung K.Y. (2007) Correlation of maternal plasma total cell-free DNA and fetal DNA levels with short term outcome of first-trimester vaginal bleeding. *Human Reproduction* 22: 1736-1743

Zheng Y.L., Demaria M., Zhen D. (1995) Flow sorting of fetal erythroblasts using intracatoplasmatic anti-fetal haemoglobin: preliminary observations on maternal samples. *Prenatal Diagnosis* 15: 897-905

Zhong X.Y., Bürk M.R., Troeger C., Jackson L.R., Holzgreve W., Hahn S. (2000) Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. *Prenatal Diagnosis* 20: 795-798

Zhong X.Y., Bürk M.R., Troeger C., Kang A., Holzgreve W., Hahn S., (2000) Fluctuation of maternal and fetal free axtracellular circulatory DNA in maternal plasma. *Obstetrics and Gynecology* Vol. 96, No. 6: 991-995

Zhong X.Y., Holzgreve W., Hahn S. (2001) Risk free simultaneous prenatal identification of fetal Rhesus D status and sex by multiplex real-time PCR using cell free fetal DNA in maternal plasma. *Swiss Medical Weekly* 131: 70-74

Zhong X.Y., Laivouri H., Livingston J.C. (2001) Elevation of both maternal and fetal extracellular circulatory DNA concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 184: 414- 419

Zhong X.Y., Holzgreve W., Hahn S. (2002) The levels of circulatory fetal DNA in maternal plasma are elevated prior to the onset of preeclampsia. *Hypertension in pregnancy* Vol. 21: 77-83



Zhong X.Y., Holzgreve W., Hahn S. (2002) Cell-free fetal DNA in the maternal circulation does not stem from the transplacental passage of fetal erythroblasts. *Molecular Human Reproduction* Vol. 8 No 9: 864-870

Zhong X.Y., Wang Y., Chen S., Labu, Pubuzhuoma, Gesangzhuogab, Ouzhuwangmu, Hahn C., Holzgreve W., Hahn S. (2006) Can circulatory fetal DNA be used to study placentation at high altitude? *Annals of the New York Academy of Sciences* Vol. 1022: 124-128

Zimmermann B., El-Sheikhah A., Nicolaidis K., Holzgreve W., Hahn S. (2005) Optimized Real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. *Clinical chemistry* Vol. 51: 1598-1604