

Aus der Frauenklinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
(Direktor: Universitätsprofessor Dr. H. G. Bender)

NICHT-INVASIVE UND MINIMAL-INVASIVE
PRÄNATALE GENETISCHE DIAGNOSTIK

Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Der Hohen Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Boris Tutschek

Düsseldorf, 2002

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG.....	4
EINLEITUNG.....	6
Pränatale genetische Beratung und Diagnostik.....	6
Datierung und Embryologie.....	7
Screening-Untersuchungen zur Identifikation gestörter Schwangerschaften.....	11
Invasive pränatale Untersuchungstechniken.....	13
Schwangerschaftsabbruch.....	17
Mögliche fetale Zellarten für eine nicht-invasive Diagnostik.....	18
Fetale Trophoblastzellen im mütterlichen Blut.....	18
Trophoblastzellen im Zervikalkanal schwangerer Frauen.....	20
Fetale Blutzellen und fetale genetische Marker im mütterlichen Blut.....	21
Fetale Hämatopoese.....	24
Anzüchtung fetaler Zellen aus dem mütterlichen Blut.....	27
Ziele der vorgelegten Arbeit.....	29
Material und Methoden.....	30
Verwendete Reagenzien.....	30
Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	33
Polymerase-Ketten-Reaktion ("polymerase chain reaction", PCR).....	35
PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern.....	35
Untersuchung fetaler Marker aus maternalem Blut durch PCR und FISH.....	37
Population und Material.....	37
Geschachtelte ("nested") PCR aus dem mütterlichen Blut.....	37
Vermeidung von Kontamination.....	38
Elektrophoretische Darstellung der amplifizierten Fragmente.....	38
Eigenschaften der Trophoblastzellen in Hinblick auf eine Anreicherung mittels Antikörpern.....	39
Mechanische Herstellung einer Trophoblast-Zellsuspension.....	39
Zytospin-Zentrifugation und Giemsa-Färbung der Trophoblast-Suspension.....	39
Antikörperbindung an Ersttrimester-Trophoblastzellen an Gewebsschnitten und Zytospin-Präparationen.....	40
Blutzellreinigung durch Gradientenzentrifugation.....	40
Gradientenzentrifugation der Trophoblast-Suspension.....	40
FACS-Untersuchung von Leukozyten mit unspezifischen, mit Leukozyten-spezifischen und mit EGF-R-Antikörpern.....	41
Reduktion unspezifischer Antikörper-Bindungen.....	41
Modellsystem: Mischung aus Blutzellen und Trophoblastzellen.....	41
Modellsystem: Mischung aus Blutzellen und einer EGF-R-positiven Zelllinie.....	42
Magnetische Zellsortierung aus dem peripheren Blut schwangerer Frauen.....	42
Materialgewinnung, Sortierung und Untersuchung durch FISH.....	43
Fetale Zellen aus dem Zervixschleim schwangerer Frauen.....	44
Populationen.....	44
Methoden zur Gewinnung fetaler Zellen aus dem Zervikalkanal.....	45
Materialverarbeitung, Mikromanipulation und Vorbereitung für PCR und FISH.....	45
PCR mit Mikrosatelliten-Markern und Loci auf den Geschlechtschromosomen.....	46
Einzelzell-PCR.....	47
Anzüchtung fetaler Zellen aus dem mütterlichen Blut.....	48
Patientenkollektiv.....	48
Reinigung und Anzüchtung der mononukleären Zellen.....	48

Auswertung und Verarbeitung der Kolonien	49
DNS-Extraktion aus Fruchtwasser	49
Fluoreszente Multiplex-PCR.....	50
ERGEBNISSE.....	51
PCR zum Nachweis fetaler Marker im peripheren mütterlichen Blut.....	51
Fetale DNS im peripheren mütterlichen Blut im Verlauf normaler Schwangerschaften.	51
Anreicherung von Trophoblastzellen mittels Antikörpersortierung	55
EGF-R-Antikörper-Bindung an Ersttrimester-Plazenta	55
Herstellung und Untersuchung einer Zell-Suspension aus Ersttrimesterplazenten	55
Antikörperbindung in der Durchflußzytometrie (FACS).....	56
Modell für die magnetische Zellsortierung (MACS) von Trophoblastzellen aus Blut....	61
Magnetische Zellsortierung (MACS) mit EGF-R-Antikörpern aus dem peripheren Blut von schwangeren Frauen und Untersuchung durch Interphase-FISH.....	64
Fetale Zellen aus dem Zervikalkanal	66
Schwangerschaftsausgang nach zervikaler Schleimaspilation	66
Fetale Zellen im Zervixschleim der Ektozervix und vom inneren Muttermund.....	68
Isolation einzelner fetaler Zellen durch Mikromanipulation.....	70
Molekulare Untersuchungen fetaler Zellen aus dem Zervixschleim	72
Molekulare Diagnose einer fetalen Chromosomenstörung aus dem Zervixschleim.....	74
Anzüchtung fetaler Zellen aus dem mütterlichen Blut.....	76
Sensitivität der verwendeten PCR.....	76
Modellsystem: Männliches Nabelschnurblut in peripherem mütterlichen Blut	76
Schwangerschaftsverläufe im untersuchten Kollektiv	76
Zellausbeute und Kolonietypen.....	79
Multiplex-Fluoreszenz-PCR-Analyse der aus dem Blut angezüchteten Kolonien	80
DISKUSSION	84
Literatur	97
Anhang	107

ZUSAMMENFASSUNG

Vorgeburtliche genetische Untersuchungen zur Erkennung chromosomaler und anderer genetischer Störungen benötigen bislang die Gewinnung fetalen Materials durch einen invasiven Eingriff. Jedoch trägt die dafür häufig eingesetzte Punktion der Amnionhöhle zur Gewinnung von Fruchtwasserzellen zum Beispiel ein etwa einprozentiges Risiko für eine Störung bis hin zum Verlust der Schwangerschaft. Die in jüngster Zeit möglich gewordene Präimplantationsdiagnostik –eine Alternative zur Gewinnung embryonaler Zellen für eine genetische Diagnostik- erfordert eine Befruchtung der Einzelle außerhalb des Körpers (in-vitro-Fertilisation) und eine Embryobiopsie in einem der frühesten Stadien der Entwicklung noch vor der Rückgabe in die mütterliche Gebärmutter.

Indirekte Hinweise wie zum Beispiel die Immunisierung von rhesus-D-negativen Schwangeren durch einen Rhesus-D-positiven Feten haben seit langem vermuten lassen, daß fetale Zellen die "Plazentaschranke" überwinden und im mütterlichen Blut nachweisbar sein könnten. Durch Untersuchungen der letzten Jahre gelang der Nachweis fetalen genetischen Materials (in der Regel) aus fetalen zellulären Bestandteilen im peripheren mütterlichen Blut.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit verschiedenen Aspekten neuer, nicht-invasiver bzw. minimal-invasiver Techniken. Der erste Teil beschreibt die **Detektion fetaler DNS im mütterlichen Venenblut durch Amplifikation** mittels einer sensitiven Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie die Etablierung eines Modells zur **Anreicherung von Trophoblastzellen aus dem Blut**. Durch Einsatz einer besonders sensitiven Technik gelang der Nachweis fetaler DNS bereits in der sechsten Woche nach der letzten Periodenblutung, also etwa in der vierten Woche nach der Befruchtung. Bei allen Patientinnen, deren Feten das untersuchte genetische Merkmal trugen, nicht aber bei solchen ohne dieses Merkmal konnte fetales genetisches Material spätestens in der siebten Schwangerschaftswoche gefunden werden. Es war im Verlauf der gesamten Schwangerschaft bis vier Wochen nach der Entbindung, nicht aber weitere vier Wochen später nachweisbar. Die Anreicherung der frühesten im maternalen Blut vermuteten Zellen, der fetalen Trophoblastzellen, gelang in einem Modellsystem. Für den Nachweis fetaler Zellen aus dem mütterlichen Blut mittels Zellsortierung mit Antikörpern gegen ein Epitop von Trophoblastzellen, gefolgt von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) der Chromosomen X und Y zur Detektion fetaler männlicher Zellen, waren diese Zellen dort aber zu stark verdünnt.

Im zweiten Teil wurden als alternatives Material *trophoblastäre Zellen aus dem Schleim im Zervikalkanal schwangerer Frauen* untersucht. Durch den Gebärmutterhalskanal besteht eine Verbindung von der Scheide in die Gebärmutterhöhle zur fetoplazentaren Einheit. Deren äußere Schicht, die Zottenhaut (Chorion), trägt in der Regel denselben Chromosomensatz wie der eigentliche Fetus. Die vom Chorion abgeschilferten und in den Zervixschleim gelangten Zellen wurden z.T. durch Mikromanipulation aus den Proben isoliert und mit molekulargenetischen Techniken (PCR, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) untersucht. Bei etwa jeder dritten Schwangeren konnten durch eine einmalige Probenentnahme während der ersten 15 Schwangerschaftswochen fetale Zellen nachgewiesen werden. Dabei wurde auch eine chromosomale Anomalie diagnostiziert. Im Zuge dieser Untersuchung wurden PCR-Methoden zum Nachweis monogenetischer Veränderungen am Beispiel der Sichelzellanämie und der zystischen Fibrose an geringsten Mengen von Untersuchungsmaterial bis hin zur Einzelzelle entwickelt.

Um das Problem der geringen Zahl fetaler (Blut-) Zellen im peripheren mütterlichen Blut zu lösen, wurde schließlich eine Methode zur *ex-vivo-Expansion fetaler Blutzellen* entwickelt. *Aus peripherem mütterlichem Venenblut* wurden durch die Verwendung von selektiven Wachstumsfaktoren und halbfesten Nährmedien -neben den überwiegenden maternalen- auch fetale Zellen in Kolonien angezüchtet. Diese Kolonien wurden individuell durch PCR auf ihr genetisches Profil anhand von sogenannten Mikrosatellitenmarkern untersucht. Unter einer großen Anzahl von Kolonien wurden bei einigen Schwangeren fetale Kolonien gefunden. Diese könnten durch ihren hohen Gehalt an fetalen Zellen weiterführende genetische Untersuchungen ermöglichen.

EINLEITUNG

Pränatale genetische Beratung und Diagnostik

Eine vorgeburtliche genetische Beratung und Diagnostik muß neben den Bedürfnissen und Wünschen der Ratsuchenden die zu erwartenden Störungen, das Alter der Schwangerschaft, mögliche Konsequenzen und das gewünschte und sinnvolle Maß an Sicherheit der Aussage abwägen. Klinisch relevante angeborene Störungen finden sich bei drei bis fünf Prozent aller Neugeborenen (McKusick 1990).

Es kann für die vorgeburtliche Beratung und Untersuchung zwischen verschiedenen Gruppen von Störungen und klinischen Situationen unterschieden werden (siehe Tab. 1).

Typ der Störung	Ursache	Möglicher Anlaß zur Untersuchung	Erkrankung (Bsp.)
Aneuploidien	meist bei der Gametogenese oder Entwicklung der Zygote entstanden	Auffälligkeiten in der Routinediagnostik (Ultraschall, Blutprobe)	Trisomien
		erhöhtes mütterliches Alter	Trisomien
	selten ererbt	bekannte balanzierte Translokation/ wiederholte Aborte	Translokation
Genetische Störungen	monogenetisch	betroffenes Kind in der Familie	Mukoviszidose
	multifaktoriell oder ohne erkennbare Ursache	Auffälligkeit in Routinediagnostik (Ultraschall); bekannte familiäre Belastung	Herzfehler; Neuralrohrdefekte
Exogene Störungen	infektiös	typische mütterliche Erkrankung oder Anamnese	Röteln-Embryopathie, Toxoplasmoseinfektion
	toxisch; spezifischer Mangel; spezifische Medikation	typische mütterliche Erkrankung oder Anamnese; Auffälligkeit in Routinediagnostik	Alkohol- und diabetische Fetopathie; Neuralrohrdefekte; Struma
Entwicklungsbedingte Störungen		Auffälligkeiten in der Routinediagnostik (Ultraschall)	Amnionbänder; Deformationen durch Fruchtwassermangel

Tab. 1 Beispiele für Indikationen zur Pränataldiagnostik

Datierung und Embryologie

Die Befruchtung der Eizelle fällt bei einem 28-tägigen Zyklus in der Regel auf den 14. Tag nach Beginn der Periodenblutung. Zur Datierung einer Schwangerschaft wird daher gynäkologisch-geburtshilflich Bezug genommen auf den ersten Tag der letzten Menstruationsblutung (letzte Regelblutung, L.R.), da dieser für die meisten Schwangerschaften bekannt ist. Man spricht daher vom post-menstruellen Gestationsalter. In der embryologischen Literatur hingegen werden die Stadien der Entwicklung meist mit dem Schwangerschaftsalter nach Konzeption (postkonzeptionelles Gestationsalter) korreliert. Dies ist theoretisch die ideale Datierung. Es entspricht z.B. die embryologische Angabe von 12 postkonzeptionellen Wochen einem postmenstruellen Gestationsalter von 14 Schwangerschaftswochen" (SSW). Allerdings ist in den meisten Schwangerschaften der Termin der Konzeption nicht bekannt, so daß in der gynäkologisch-geburtshilflichen Praxis die Datierung nach L.R. zur Anwendung kommt.

Sollte auch das Datum der L.R. in einer Schwangerschaft unklar oder unsicher sein, ein unregelmäßiger Zyklus vor der Konzeption vorgelegen haben oder die Schwangerschaft kurz nach Geburt, Abstillen oder Absetzen einer hormonalen Behandlung eingetreten sein, kann die L.R. zur Datierung unsicher sein. In diesem Fall kann aus der Messung der so genannten embryonalen Scheitel-Steiß-Länge ("crown-rump length CRL") mit hoher Genauigkeit (\pm zwei Tage) auf das wahre Gestationsalter zurückgerechnet werden.

In der vorliegenden Arbeit wird zur Angabe des Schwangerschaftsalters das postmenstruelle Gestationsalter verwendet, möglichst bestätigt oder korrigiert nach sonographisch bestimmter Scheitel-Steiß-Länge. Die Angabe des Schwangerschaftsalters erfolgt in abgeschlossenen SSW plus 0 bis 6 Tage bezogen auf den ersten Tag der letzten Periodenblutung vor Eintreten der Schwangerschaft. Es entspricht somit z.B. 10 Wochen plus 3 Tage (kurz: 10+3 SSW) der Mitte der 11. Schwangerschaftswoche. In der Literatur wird zwischen der Embryonalperiode, entsprechend meist den ersten zwölf Wochen der Schwangerschaft, und danach der Fetalperiode unterschieden. Embryologisch entspricht dieser zeitliche Übergang nach einer gängigen Definition dem Auftreten des blutbildenden Knochenmarks in den langen Röhrenknochen. In der englischsprachigen gynäkologisch-geburtshilflichen Literatur wird "embryonal" und "fetal" oft nicht streng diesen Zeiträumen zugeordnet, so daß häufig für das Ungeborene, egal welchen Gestationsalters, der Begriff "Fetus" verwendet wird. Man teilt im praktischen Sprachgebrauch die Dauer einer Schwangerschaft, im Mittel 280 Tage, in drei

gleiche Teile von je drei Monaten ein, die so genannten Trimester. Das erste Trimester (auch: Trimenon) wird im Sprachgebrauch häufig mit der Embryonalperiode gleichgesetzt.

Nach dem Eisprung wird die befruchtungsfähige amotile Eizelle vom Trichter der Tuba uterina (Eileiter) aufgefangen und vom Tubenepithel in Richtung Gebärmutterhöhle (Uteruscavum) transportiert. Die Befruchtung findet innerhalb 24 Stunden in der Regel im Eileiter statt. Bereits vor Erreichen des Uteruscavums hat sich aus der Zygote durch mehrere mitotische Teilungen über das Stadium der Morula die Blastozyste, gekennzeichnet durch einen flüssigkeitsgefüllten Hohlraum, einen äußeren Zellmantel und eine innere Zellmasse, gebildet. In diesem Stadium ist bei der Ultraschalluntersuchung einer Schwangeren lediglich die durch die Eierstockhormone hochaufgebaute und transformierte Uterusschleimhaut zu sehen. Aus der inneren Zellmasse entwickelt sich im folgenden der Embryoblast, der das Embryo samt Amnionhaut, aus den restlichen Zellen der Trophoblast, der das Chorion hervorbringen wird.

Die Blastozyste nistet sich im hoch aufgebauten Endometrium ein (Nidation). Von dem Trophoblasten wachsen Zytotrophoblastzellen invasiv in die mütterliche Schleimhaut (Dezidua) und die Muskulatur der Gebärmutter (Myometrium) ein. Durch Arrosion der vaskulären Muskulatur der mütterlichen Blutgefäße (Spiralarterien) und durch die lokale Bildung von Stickoxid sorgen diese extravillösen Zytotrophoblastzellen für eine Aufhebung der außerhalb der Schwangerschaft physiologischen Autoregulation dieser Gefäße, um eine Drosselung der Blutzufuhr in den intervillösen Raum zu verhindern (Nanaev 1995).

Trophoblastzellen überziehen zunächst die gesamte Oberfläche der Anlage, polarisieren sich aber an der Stelle der Nidation, wo sich das Chorion frondosum (Zottenhaut) ausbildet (siehe Abb. 2). An der restlichen Oberfläche degenerieren die Chorionzotten, und es bildet sich dort das Chorion laeve (glattes Chorion) aus. Das Chorion frondosum stellt ein fein verästeltes, später von fetalen Kapillaren durchzogenes Gewebe dar, von dem verankernde Zotten in das mütterliche Gewebe einwachsen. Darüber hinaus verlassen einige trophoblastäre Zellen (invasiver Zytotrophoblast) sogar den Gewebeverbund des Chorions und arrodieren die maternalen Spiralarterien im Myometrium. Die von fetalen Zellen bedeckte Oberfläche der Plazenta erreicht bis zum Ende der Schwangerschaft eine Fläche von 11-13 Quadratmetern (Benirschke 1990).

Ausgehend vom Embryoblast entwickelt sich der Ductus omphaloentericus mit dem Dottersack. Der Dottersack ist bei seriellen Ultraschalluntersuchungen sogar die erste weitere

Struktur, die sich nach dem Auftreten des Chorions ("Fruchtsack") in der Chorionhöhle darstellen läßt. Erst danach wird sonographisch die embryonale Platte sichtbar. Zu diesem Zeitpunkt ist der Dottersack etwa 5mm im Durchmesser groß und die Embryonalplatte 1,5-3mm lang. Von der Zellmasse überwiegt jetzt noch bei weitem das Chorion.

Ab Ende der 6. SSW kann per Ultraschall die fetale Herzaktion nachgewiesen werden. Allerdings sind zu diesem Zeitpunkt die Chorionzotten noch nicht vollständig vaskularisiert. Pfropfen aus extravillösem Zytotrophoblastzellen verschließen den Zufluß mütterlichen Blutes zum intervillösen Raum.

Im ersten Trimester werden die Organe angelegt. Die Stammzellen wandern in die Zielregionen, so etwa die hämatopoetischen Stammzellen aus dem Dottersack und der aortogonadalen Region zunächst in die Leber und Milz, später in das Knochenmark. Mit Erreichen der 12. SSW sind alle fetalen Organe und die Gestalt angelegt und theoretisch auch sonographisch darstellbar (siehe Abb. 1 und 2). Etwa zu diesem Zeitpunkt sind sowohl von kindlicher Seite das Chorion perfundiert als auch auf der mütterlicher Seite die Trophoblastpfropfen gelöst, so daß die Chorionzotten von mütterlichem Blut umflossen werden (Burton 2001).

Der Dottersack liegt zwischen der Außenseite der sich entwickelnden Amnionhaut und der Innenseite des Chorions in dem sogenannten extraembryonalen Zölom. Der Dottersack ist ein Ort der Stammzellbildung, und in dem ihn umgebenden extraembryonalen Zölom lassen sich diese Zellen nachweisen. Dieser Raum wird mit dem Wachstum der Amnionhöhle immer enger und obliteriert in der Regel nach 14 Schwangerschaftswochen.

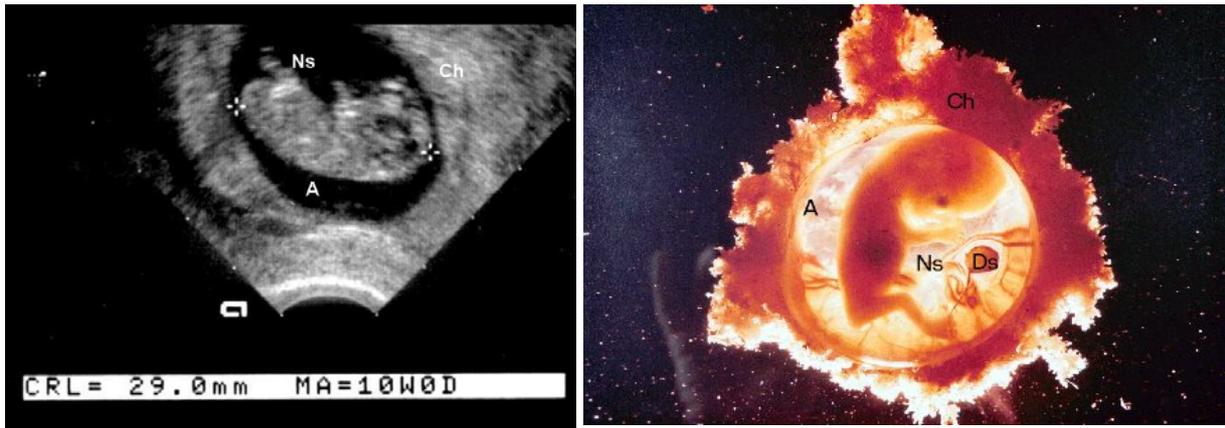


Abb. 1 Embryo am Ende des ersten Trimesters. Das Embryo mißt in diesem Alter vom Scheitel bis zum Steiß 3-6cm (Scheitel-Steiß-Länge, "crown-rump length CRL"). Die Zottenhaut (das Chorion, Ch) als äußerste embryonale Lage polarisiert sich zur Plazenta. In der Chorionhöhle ist der fast klare Raum der Fruchthöhle (Amnionhöhle, A) mit dem Embryo und der Nabelschnur (Ns) samt Gefäßen zu erkennen. In Projektion vor dem Embryo stellt sich der Dottersack (Ds) dar, der im extraembryonalen Zölo (zwischen Chorion und Amnion) liegt. Links: transvaginale Ultraschallaufnahme, medianer Sagittalschnitt; rechts: Nativansicht eines abortierten Feten im entsprechenden Gestationsalter (modifiziert nach L. Nilsson).

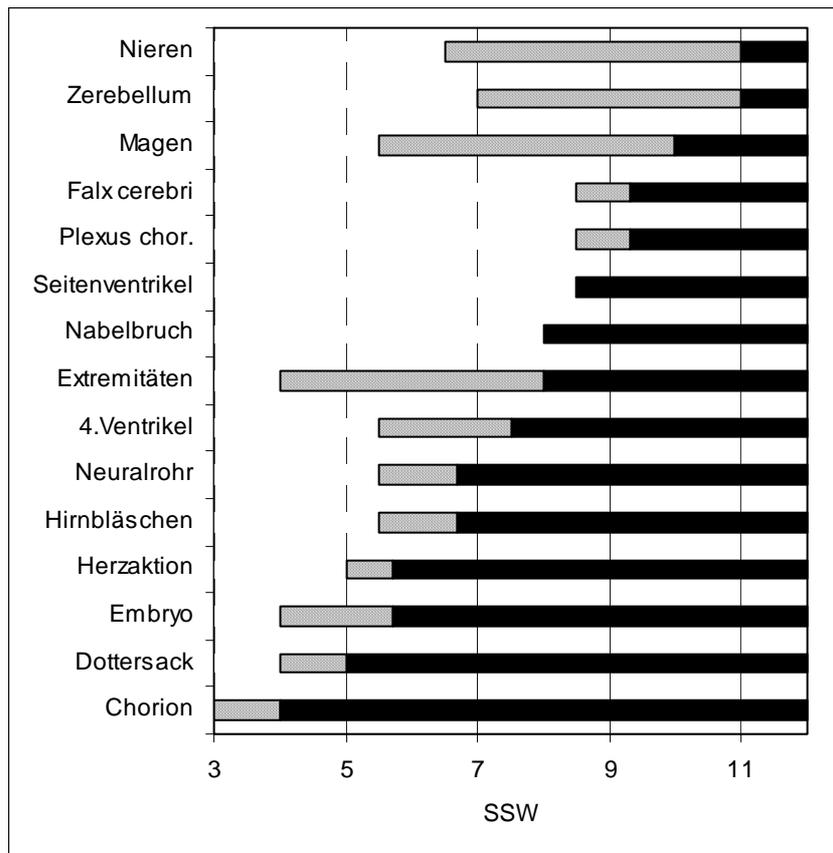


Abb. 2 Morphologische Ausbildung (schraffiert) und sonographische Nachweismöglichkeit (ausgefüllte Balken) der normalen embryonalen Strukturen in Abhängigkeit von dem Gestationsalter (Schwangerschaftswochen nach der letzten Regelblutung) (modifiziert nach Takeuchi 1992)

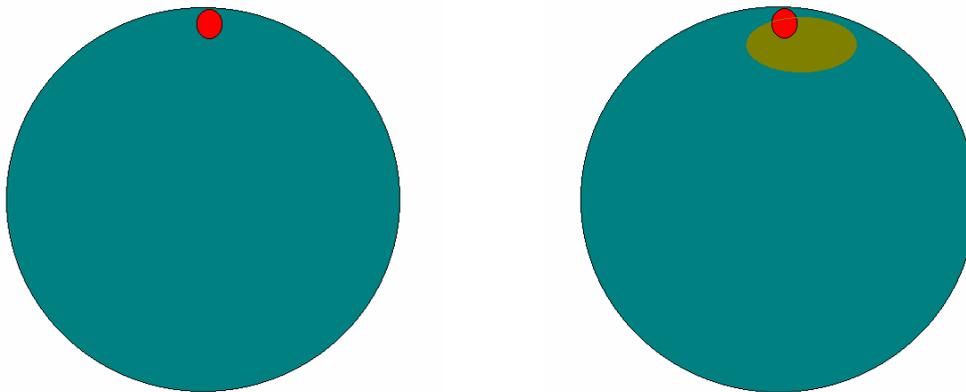
Screening-Untersuchungen zur Identifikation gestörter Schwangerschaften

Bei den vorgeburtlichen Untersuchungen werden häufig Suchtests ("Screeningtest") eingesetzt, die in den meisten Fällen das Vorliegen einer normal verlaufenden Schwangerschaft bestätigen, andererseits für einige Schwangere ein erhöhtes Risiko für eine Störung beim Ungeborenen erkennen lassen. Solche Tests können einer großen Population angeboten werden, um die Fälle zu identifizieren, die keine sonstigen klinischen oder anamnestischen Auffälligkeiten zeigen. Suchtests erkennen nicht alle Betroffenen, und nicht alle in einem Suchtest Auffälligen haben auch tatsächlich die gesuchte Störung. Die Merkmale eines Suchtests sind durch die gesuchte Störung und die Parameter des Tests definiert: Die gesuchte Störung muß "ausreichend selten", prinzipiell erkennbar und bei frühzeitiger Erkennung behebbar oder in ihren relevanten negativen Folgen signifikant abminderbar sein. Der Suchtest muß einfach durchführbar, der Gesamtpopulation ohne Risiken oder hohe Kosten anzubieten und sensitiv und ausreichend spezifisch sein. Ein auffälliges Ergebnis des Suchtests bedeutet, daß das Risiko für das Vorliegen der Störung erhöht ist, nicht aber, daß die Störung auch tatsächlich vorliegt. Zur definitiven Abklärung muß ein weiterer, sogenannter diagnostischer Test, der eine definitive Aussage über das Vorliegen der Störung zuläßt, verfügbar sein. Dieser diagnostische Test erfordert meist einen höheren Aufwand, muß aber nur dem durch das Screening reduzierten Kollektiv angeboten werden.

Zum Vergleich von Risikountersuchungen für fetale chromosomale Störungen können zwei rechnerische Parameter herangezogen werden. Die Detektionsrate beschreibt den Anteil der im Test Erkannten unter den tatsächlich Betroffenen. Die falsch-positiv-Rate entspricht dem Anteil der im Screening auffälligen, aber tatsächlich nicht betroffenen Individuen. Die falsch-positiv-Rate ist oft größer als die richtig-positiv-Rate. Bei seltenen Störungen wie fetalen Aneuploidien stellt die falsch-positiv-Rate in der Regel den Hauptteil der auffälligen Screening-Ergebnisse (siehe Abb. 3).

Unter Lebendgeborenen ist die Trisomie 21 eine der häufigsten Chromosomenstörungen. Da das Auftreten fetaler Trisomien mit dem mütterlichen Alter korreliert, kann als vorgeburtlicher Suchtest das "Altersscreening" angewendet werden: Frauen, die bei Geburt des Kindes 35 Jahre oder älter sind (Screening), wird eine Fruchtwasseruntersuchung (diagnostischer Test) angeboten. Wenn man den diagnostischen Test strikt nur auf alle Schwangeren über 34 Jahren begrenzte, würde allerdings nur ein kleiner Teil der Schwangerschaften (etwa 20-30%) mit Trisomie 21 erkannt (geringe Detektionsrate).

Außerdem wären bei der überwiegenden Mehrzahl der Schwangeren über 34 Jahre chromosomal unauffällige Feten zu erwarten (z.B. nur bei 0,3% bzw. 1% der Schwangeren im Alter von 35 bzw. 40 Jahren), die aber dem Risiko einer invasiven Testung unterzogen worden wären (geringe Spezifität). Durch die Anwendung eines diagnostischen Tests (z.B. Amniozentese, die eine Rate von testbedingten Fehlgeburten von etwa 1% hat), können je nach Kollektiv sogar mehr Schwangerschaften verloren gehen, als tatsächlich betroffene durch den Test erkannt werden.



a. Größenverhältnisse der Populationen:
Gesamtpopulation (grün), Betroffene (rot)

b. nach Durchführung eines Screeningtests: Screening-Positive (braun)

Abb. 3 Prinzip eines Suchtests. Den Testpositiven müßte ein diagnostischer Test angeboten werden.

Ein Ansatz zum vorgeburtlichen Screening hat sich aus der Beobachtung entwickelt, daß gestörte Schwangerschaften diskrete, aber typische Abweichungen der Serumkonzentrationen bestimmter Analyten aufweisen. Am längsten wird klinisch die Messung des alpha-Fetoproteins (AFP) im mütterlichen Venenblut in der klinischen Routine eingesetzt, das bei Neuralrohrdefekten und anderen Spaltbildungen erhöht (Brock 1972), bei Trisomie 21 aber erniedrigt ist (Merkatz 1984). Durch die Berücksichtigung verschiedener Marker in Kombination (z.B. AFP, humanes Choriongonadotropin, unkonjugiertes Estriol) kann dieses Serumscreening eine Risikogruppe erkennen, die bis zu 2/3 bis 3/4 der Trisomien enthält (Wald 1988). In den letzten Jahren wird auch vermehrt nach Möglichkeiten gesucht, bereits im ersten Trimester Serummarker zu identifizieren, die auf eine Chromosomenstörung hinweisen (Wald 1995). Sehr vielversprechend, da mit einer hohen Detektionsrate (bis 80%) verbunden, ist ebenfalls der Suchtest für Chromosomenstörungen durch Ultraschall-Messung

der Nackentransparenzdicke oder "nuchal translucency" (NT), die zwischen 11+0 und 14+0 SSW bestimmt wird (Nicolaidis 1994).

Viele relevante Chromosomenstörungen sind mit strukturellen Anomalien assoziiert, die pränatal sonographisch prinzipiell darstellbar sind. In spezialisierten Zentren können bei fast allen Fällen mit Trisomie 13, bei 77-100% mit Trisomie 18 und bei 33-50% der Feten mit Trisomie 21 im zweiten Trimester sonographische Auffälligkeiten erkannt werden (Benacerraf 1999). Allerdings lassen sich manche strukturelle Hinweiszeichen für Aneuploidien erst relativ spät, z.B. nach 20 SSW, sicher darstellen.

Viele strukturelle Anomalien, von denen manche auf Chromosomenstörungen hinweisen können, die aber auch bei karyotypisch normalen Feten auftreten, können durch entsprechende Ultraschalluntersuchungen erkannt werden. Dabei schwanken die Entdeckungsraten zwischen untersuchten Körperregionen, erreichen aber außer bei schwersten Störungen (z.B. Anenzephalie) nicht 100%. Die vorgeburtlichen Ultraschalluntersuchungen, mit deren Hilfe man also nicht in allen Fällen eine definitive Diagnose stellen kann, werden daher auch häufig als Screening-Untersuchungen betrachtet.

Invasive pränatale Untersuchungstechniken

Als invasive diagnostische Tests werden in der klinischen Routine die Fruchtwasserpunktion (Amniozentese, AZ), die Chorionzottenbiopsie (Plazentabiopsie; "chorion villus sampling", CVS) und die fetale Blutentnahme ("fetal blood sampling", FBS) eingesetzt. Durch ihre invasive Natur tragen sie alle ein Eingriffsrisiko und damit die Notwendigkeit zur besonders sorgfältigen Indikationsstellung. Das Risiko der Auslösung einer Störung durch den diagnostischen Eingriff beträgt selbst bei dem ungefährlichsten Verfahren, der Amniozentese, etwa ein Prozent.

Amniozentese

Die Amniozentese (AZ) ist der am häufigsten angewendete invasive pränatale diagnostische Eingriff. Sie wird typischerweise im zweiten, gelegentlich auch im dritten Trimester angewendet. Durch transabdominale Punktion der Amnionhöhle mit einer dünnen Nadel (etwa 0,7mm Außendurchmesser) wird Fruchtwasser (ab der 15. SSW mehrheitlich fetaler Urin) mit den darin enthaltenen fetalen Zellen gewonnen. 1953 wurde die AZ zur Untersuchung von fetalen Blutfarbstoffabbauprodukten bei der fetalen Rhesuserkrankung benutzt (Bevis 1953), wofür sie auch heute noch gelegentlich eingesetzt wird. Ihre heutige Bedeutung erhielt die AZ, als Techniken zur genetischen Untersuchung einzelner Zellen

verfügbar wurden. Durch die Anfärbung des Geschlechtschromatins mit Quinakrin-Fluoreszenz (Pearson 1970) konnte eine -wenn auch nur auf die Geschlechtsselektion- eingeschränkte pränatale Diagnose X-chromosomaler Störungen wie Hämophilie und Muskeldystrophie durchgeführt werden (Riis 1960; Serr 1964). Auch Stoffwechselstörungen können im Fruchtwasser diagnostiziert werden (Jeffcoate 1965; Nadler 1968; Dancis 1968). Der größte Fortschritt und die weiteste Verbreitung der AZ erfolgte mit der Möglichkeit zur Anzüchtung der Zellen aus dem Fruchtwasser und der Darstellung der Chromosomen (Steele 1966), was zu der ersten pränatalen Diagnose des Down-Syndroms (Valenti 1968) führte.

Die AZ ist als sicheres Verfahren akzeptiert und weit gebräuchlich. Die maternalen Risiken sind gering und umfassen die Infektion der Amnionhöhle (Amnion-Infektionssyndrom) durch vom Stichkanal eingetragene Erreger (Risiko etwa 1:8.000; Crane 1983) oder durch akzidentelle Punktion einer zwischen Bauchwand und Gebärmutter liegenden Darmschlinge. Ein weiteres Risiko ist die bei allen invasiven Prozeduren mögliche Immunisierung der Mutter durch bei der Punktion in ihre Blutbahn eingeschleppte kindliche Zellen. Die fetalen Risiken umfassen darüber hinaus den Verlust von Fruchtwasser zum Beispiel durch einen vorzeitigen Blasensprung und die direkte fetale Verletzung mit der Punktionsnadel. Das Punktionsrisiko ist, wie bei allen invasiven Prozeduren, von verschiedenen Faktoren (mütterliche Konstitution, kindliche und Plazentalage, Sichtbedingungen bei der Ultraschalluntersuchung, Erfahrung des Durchführenden) abhängig.

Zur Beurteilung der durch die AZ bedingte Verlustrate muß die natürliche Schwangerschaftsverlustrate, also das so genannte Hintergrundrisiko, beachtet werden. Die spontane natürliche Schwangerschaftsverlustrate sinkt mit zunehmendem Gestationsalter. Ein großer Anteil aller eingetretenen Schwangerschaften abortiert spontan, und zwar mehrheitlich im ersten Trimester (Simpson 1987; Boue 1985). Die spontane Verlustrate von in der 12. SSW intakten Schwangerschaften bis zur 16. SSW liegt zwischen einem und neun Prozent (Lippman, 1984). In gerade diesem Zeitfenster werden häufig invasive Pränataldiagnostik-Eingriffe durchgeführt. Je früher in der Schwangerschaft daher ein invasiver Eingriff durchgeführt würde, desto höher wäre die zu berücksichtigende spontane Verlustrate. Das Risiko eines Schwangerschaftsverlustes durch Mitt-Trimester-AZ wird in der Regel mit einem Prozent über der natürlichen Verlustrate in diesem Gestationsalter angegeben. Die Kenntnis dieser Risikozahlen und ihrer zeitlichen Abhängigkeit ist essentiell für die Beratung, Planung und Durchführung von diagnostischen Maßnahmen.

Die Früh-Amniozentese zwischen 10 und 14 SSW soll den diagnostischen Nutzen der Mitt-Trimester-AZ mit der frühen Durchführung im ersten Trimester verbinden (Hanson 1987). Allerdings sind z.B. die biochemischen Untersuchungen aus Fruchtwasser vor 14 SSW aufgrund der Organunreife limitiert (Crandall 1995). Vor 9 SSW enthält die Amnionflüssigkeit weniger Zellen, und die Anzüchtung dauert länger (Evans 1989; Hackett 1991). Zusätzlich erschweren die geringeren Größenverhältnisse und die in der Regel erst mit 14 SSW erfolgte Verschmelzung von Amnion und Chorion (laeve) das Eingehen mit der Nadel. Weiterhin wird erst im zweiten Trimester der Großteil der Amnionflüssigkeit durch fetalen Urin gestellt, der in der Regel die entnommene Flüssigkeitsmenge innerhalb von Stunden wieder ersetzen kann. Aspiration von 20ml Amnionflüssigkeit in der 16. SSW entsprechen etwa 5% des Gesamtvolumens, Aspiration von nur 10ml mit 12 SSW jedoch bereits 35% der Amnionflüssigkeit (Silverman 1992). Dies wird mit den beobachteten erhöhten Raten an Lungendysplasie und Extremitäten-Fehlstellungen nach Früh-Amniozentese in Verbindung gebracht.

Chorionzottenbiopsie

Um früher als durch Amniozentese, nämlich bereits im ersten Trimester, eine pränatale genetische Diagnose zu erzielen, kann Material aus dem Chorion villosum entnommen werden. Die Entnahme von Chorionzotten zur pränatalen genetischen Untersuchung wird "chorion villus sampling" (CVS) oder Chorionzottenbiopsie genannt. 1983 wurde die transzervikale Chorionzottenbiopsie bereits zur Diagnose verschiedener Stoffwechsel- oder Muskelerkrankungen oder Hämoglobinopathien eingesetzt (Silverman 1992). Heute wird von den meisten Zentren die Ultraschall-kontrollierte Nadelpunktion des Chorions durch die mütterliche Bauchdecken analog der Amniozentese (Smidt-Jensen 1993) angewendet. Gegenüber der Amniozentese hat sie den Vorteil, daß mit den Zytotrophoblastzellen sehr teilungsaktive Zellen zu Verfügung stehen, aus denen durch Direktpräparation unter optimalen Bedingungen bereits am Tag der Punktion eine numerische Aussage über den Chromosomensatz möglich ist.

Verschiedene Studien verglichen die Risiken von Chorionzottenbiopsie und Amniozentese. Das „Medical Research Council“ in England fand das Risiko einer Chorionzottenbiopsie im ersten Trimester 0,5 bis 4,6% über dem einer Amniozentese im zweiten Trimester (MRC 1991). Eine andere Studie fand hingegen nur eine Risikoerhöhung um 0,8% (Rhoads 1989). Bei Vergleich der Risiken muß aber berücksichtigt werden, daß aufgrund des jüngeren Gestationsalters auch ein höheres Hintergrundrisiko einkalkuliert werden muß.

1991 wurde das vermehrte Auftreten von Extremitätendefekten bei chromosomal gesunden Kindern berichtet, die intrauterin vor 9 abgeschlossenen SSW durch Chorionzottenbiopsie untersucht worden waren (Firth 1991, 1994). Eine Übersicht von knapp 140.000 Chorionzottenbiopsie-Schwangerschaften mit Informationen über den Ausgang konnte keine erhöhte Inzidenz an Reduktionsfehlbildungen in der Chorionzottenbiopsie-Gruppe zeigen (Froster 1994). Die meisten Fälle in diesem Register hatten eine Chorionzottenbiopsie nach 10 abgeschlossenen SSW (im Mittel 71,5 Tage); das Fehlen eines oder mehrerer Extremitäten in vier Fällen betraf Schwangerschaften mit sehr früh durchgeführter Chorionzottenbiopsie zwischen dem 53. und dem 63. Tag nach der letzten Periodenblutung. Daher werden Chorionzottenbiopsien heute meist erst nach dem 70. Tage nach der letzten Periodenblutung durchgeführt.

Andere invasive Techniken

Fetalblut kann etwa ab der 18. SSW durch transabdominale, ultraschallgesteuerte Punktion mit einer feinen Nadel aus der Nabelschnurvene entnommen werden. Die ersten Anwendungen umfaßten Diagnosen von fetalen Thalassämien und Toxoplasmose. Der direkte Zugang zu fetalem Blut erlaubt aber die Untersuchung des vollen Spektrums der hämatologischen sowie vieler Stoffwechsel- und infektiöser Störungen. Weiterhin wird Fetalblut auch nach einer Karyotypisierung aus fetalen Zellen anderer Keimblätter, d.h. nach Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie, entnommen, um unklare Befunde oder Mosaik zu klären. Die Karyotypisierung aus Fetalblut wird (mit seltenen Ausnahmen) als Referenzmethode zur Chromosomenbestimmung angesehen. Ein weiterer Vorteil ist die schnelle Verfügbarkeit der Chromosomenuntersuchung aus stimulierten fetalen Blut-Lymphozyten, so daß die Fetalblutentnahme oft gerade in dringlichen Fällen eingesetzt wird. Diesen Vorteilen steht die im Vergleich zur Mitt-Trimester-Amniozentese höhere eingriffsbedingte fetale Verlustrate (2% über dem natürlichen Verlustrisiko) gegenüber (Daffos 1985, Shulman 1990), weswegen die Fetalblutentnahme oft für die dringliche Karyotypisierung, zur Infektionsabklärung oder für andere Indikationen, die nicht durch Techniken mit geringerem Risiko abgeklärt werden können, vorbehalten bleibt.

Die Biopsie der fetalen Haut oder von fetalen Organen ist ein immer seltener benutztes Verfahren zur Diagnose bestimmter (erblicher) Störungen, die gegenwärtig noch nicht durch genetische Untersuchungen, sondern nur histologisch erkannt werden können. Prinzipiell können fetale Zellen aus Punktionen aller Organe oder Körperhöhlen (Harnblase, Nieren,

Ureter, Aszites, Pleuraerguß) gewonnen werden. Die enthaltenen Zellen können auch angezüchtet werden.

Bei der bisher nur im Rahmen von Studien angewendeten Zölozentese wird ultraschall-gesteuert das extraembryonale Zöлом punktiert (Jauniaux 1991). Durch Anwendung molekularer Methoden (FISH und PCR) konnte erfolgreich das fetale Geschlecht diagnostiziert werden, so daß in der Methode eine mögliche Alternative zur genetischen Diagnostik bereits im ersten Trimenon gesehen wurde (Jurkovic 1993). Die Zölozentese wird gegenwärtig aber als experimentelles Verfahren angesehen. Da das Risiko einer Punktion eingegangen wird, aber an den gewonnenen Zellen nicht alle Untersuchungen durchführbar sind (z.B. vollständige Karyotypisierung) wie bei der vergleichbaren CVS, hat sie keine breite Anwendung gefunden.

An durch in-vitro-Fertilisation (IVF) entstandenen Embryonen können vor dem Einsetzen in den Uterus eine oder mehrere Zellen ohne offensichtliche nachteilige Folgen für die Entwicklung biopsiert und genetisch untersucht werden. Dadurch kann bereits vor der Nidation eine genetische Diagnose gestellt und als betroffen erkannte Embryonen könnten dann nicht transferiert werden. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß Paare mit bekanntem Risiko z.B. für eine autosomal rezessive Störung nicht eine "Schwangerschaft auf Probe" auf sich nehmen müßten, bis durch eine invasive Pränataldiagnostik diese z.B. durch Chorionzottenbiopsie nach 11 Wochen untersucht werden kann. Diese sogenannte Präimplantationsdiagnostik (PID) wird im Ausland bei belasteter Anamnese bereits angewendet, wenn zum Beispiel die Anlagen einer schwerwiegenden Erkrankung in einer Familie, z.B. durch Manifestation bei einer vorangegangener Schwangerschaft, bekannt und genetisch untersuchbar sind (Handyside 1990; Harper 1994; Handyside 1997). In Deutschland ist diese Untersuchung aber gegenwärtig rechtlich nicht zulässig.

Schwangerschaftsabbruch

Die jährlich Zahl der in Deutschland ohne medizinischen Grund durchgeführten Schwangerschaftsabbrüche beläuft sich auf knapp 130.000 bei etwa 771.000 Geburten in demselben Zeitraum (Statistisches Bundesamt, 1999). Diese Datenerhebung aller Schwangerschaftsabbrüche zeigt auch, daß pro Jahr zwischen 400 und 500 Abbrüche nach Pränataldiagnostik und infolge erkannter fetaler Fehlbildungen durchgeführt werden. Diese Zahl hat sich auch durch die Verbreitung der Pränataldiagnostik über die vergangenen Jahre nicht erhöht.

Nach der aktuellen Rechtsprechung stellt das Vorliegen einer Störung allein oder ihre Schwere per se keine Indikation zu einem Schwangerschaftsabbruch dar. In jedem Einzelfall muß die Schwere der drohenden gesundheitlichen Störung der Mutter körperlich wie seelisch beurteilt werden. Nur dies läßt eine Entscheidung zu, ob der Abbruch der Schwangerschaft tatsächlich die einzig zumutbare Maßnahme zur Abwendung einer mütterlichen Schädigung ist.

Die üblichen Maßnahmen für einen Schwangerschaftsabbruch nach Pränataldiagnostik sind die durch eine Operation durchgeführte Entfernung des Schwangerschaftsprodukts, was bis nach etwa 14 Schwangerschaftswochen nach der letzten Periodenblutung möglich ist. Im weiter fortgeschrittenen Gestationsalter wird die Einleitung einer Fehlgeburt (Abortinduktion) durch lokale oder systemische Gabe von Medikamenten mit der Intention des frühzeitigen Versterbens des Feten bei Einsetzen der Geburtswehen durchgeführt. Das Risiko eines Abbruchs für die Schwangere ist auch vom Gestationsalter abhängig. Das physische und seelische Trauma ist umso größer, je weiter die Schwangerschaft fortschreitet, was eine frühestmögliche Pränataldiagnostik wünschenswert macht.

Da bei der Abortinduktion ab einem Gestationsalter von etwa 24 Schwangerschaftswochen in einem kleinen Teil der Fälle mit der Geburt eines Kindes mit Lebenszeichen gerechnet werden muß, wird sie in Deutschland nach 24 Schwangerschaftswochen in der Regel nicht mehr durchgeführt.

Weitere wichtige Fragen zur Durchführung bleiben gegenwärtig noch offen. Der Begriff "Fetozid" bezeichnet die unmittelbare Tötung des Feten in der Gebärmutter durch Medikamentengabe, z.B. im Rahmen einer (späten) Abortinduktion. Dieser wird von vielen im Vergleich zur ausschließlichen Abortinduktion als eine zu aktive oder direkte Intervention gesehen. Allerdings ist die Intention, also die Verhinderung eines Lebens mit einer schwersten Störung, mit und ohne Fetozid gleich.

Mögliche fetale Zellarten für eine nicht-invasive Diagnostik

Fetale Trophoblastzellen im mütterlichen Blut

In der menschlichen Plazenta kommen der fetale Trophoblastzellen durch das Fehlen maternaler Zell-Lagen in direkten Kontakt mit dem mütterlichen Blut. Fetale Zellen können einerseits durch Abschilferung von Trophoblastzellen, aber auch bei Eröffnung von Zottenkapillaren durch Mikrotransfusion fetaler Blutzellen in die mütterliche Zirkulation kommen. Damit wären diese Zellen prinzipiell für eine genetische Untersuchung zugänglich.

Der erste Bericht über fetale Trophoblastzellen in der mütterliche Zirkulation stammt von dem deutschen Pathologen Schmorl (1893). Er fand bei 14 von 17 untersuchten Frauen, die an Eklampsie verstorbenen waren, in den Lungenkapillaren vielkernige Synzytiotrophoblastzellen, nicht aber bei vier weiteren Schwangeren, die aus anderen Gründen verstorben waren. Attwood und Park (1961) untersuchten histopathologische Lungenschnitte von 220 Frauen, die während der Schwangerschaft, Geburt oder im Wochenbett verstorben waren und fanden Synzytiotrophoblastzellen in 44% der Fälle, bei Prä-Eklampsie oder Eklampsie sogar in 81%. Fruchtwasserembolien mit Verschleppung ganzer Chorionzotten wurde in nur 2 Fällen beobachtet. Diese Ergebnisse unterstützen die Schmorl'sche Vorstellung, daß Trophoblastzellen in normalen Schwangerschaften, vermehrt aber bei (Prä-) Eklampsie in den mütterlichen Kreislauf eingeschwemmt werden.

Experimentell wurden diese Daten durch die Untersuchungen von Douglas (1959) untermauert, der bei Schnittentbindungen Blut aus den uterinen Venen, aus der Vena cava inferior sowie peripher entnahm. Synzytien wurden bei 8 von 13 (62%) Proben aus den uterinen Venen, aber nur bei 3 von 33 (9%) aus der V. cava. inferior gewonnen. In keiner der 80 peripheren Blutproben konnte Synzytiotrophoblastzellen gefunden werden.

Iklé (1961, 1964) entnahm bei einer Schwangeren in der 8. SSW Blut aus der Vena uterina und fand synzytiale Fragmente. Er berechnete die Einschwemmungsrate von Synzytiotrophoblastfragmenten auf 100.000-150.000 pro Tag. Auch Jäämeri (1965) untersuchte gezielt das Phänomen der Trophoblasteinschwemmung bei Prä-Eklampsie. Zum Zeitpunkt der Schnittentbindung wurde von 10 gesunden und 10 präeklampsischen Frauen uterines Venenblut gewonnen. Bei neun der zehn Frauen mit Präeklampsie und bei sieben der zehn gesunden Schwangeren wurden Trophoblastzellen gefunden, im Mittel drei Trophoblastzellen pro Milliliter bei den präeklampsischen, aber nur 0,15/ml bei den gesunden Probandinnen. Wagner (1968) untersuchte Blut aus einem Katheter in der Vena cava inferior von Schwangeren und zeigte, daß uterine Manipulationen (Palpation, Ausschabung) die Trophoblastausschwemmung erhöhen. In keiner der drei ebenfalls untersuchten Eileiterschwangerschaften konnten Trophoblastzellen gefunden werden. Lee (1986) untersuchte Blutproben aus Pulmonalarterienkathetern von 14 Schwangeren mit schwerer Präeklampsie in der Eröffnungsphase der Geburt, unmittelbar nach Geburt der Plazenta sowie vier Stunden post partum. Plattenepithel- oder Trophoblastzellen fand er bei 3 von 14 (21%) Proben.

Chua (1991) verwendete über die morphologische Untersuchung hinaus eine Färbung mit einem Antikörper gegen Zytokeratin, das epitheliale (z.B. Synzytiotrophoblast), nicht aber maternale

Blutzellen kennzeichnet. Wiederum wurde uterines Venenblut von 10 Frauen mit und von 10 Frauen ohne Präeklampsie bei der Schnittentbindung gewonnen. Bei Präeklampsie fanden sich bei allen Frauen Trophoblastzellen (im Mittel 11 Zellen/ml), bei den Kontrollen nur in 2 Fällen (0,1 Zellen/ml). Einkernige Trophoblastzellen im peripheren Blut konnten nur bei einer präeklampsischen Frau gefunden werden. Daraus wurde gefolgert, daß die größeren synzytialen Zellen zwar in den venösen Blutstrom eintreten, aber im pulmonalen Kapillarbett gefangen würden.

Mueller (1987, 1990) hatte mit neu erzeugten trophoblastspezifischen monoklonalen Antikörpern über eine erfolgreiche Anreicherung von Trophoblastzellen aus der mütterlichen Zirkulation berichtet. Allerdings wurden die Antikörper anderen Gruppen nicht zu Verfügung gestellt, so daß diese Ergebnisse nicht bestätigt werden konnten.

Zur genetischen Untersuchung müssen fetale Zellen aus dem mütterlichen Blut angereichert werden. Für diese Anreicherung müssen hinreichend spezifische "Marker", also z.B. durch Antikörper markierbare Oberflächeneigenschaften der Zielzellen, verwendet werden. Der "epidermal growth factor receptor" (EGF-R) ist ein zytoplasmamembranständiges Molekül mit intrazellulärer, transmembranärer und extrazellulärer Domäne, das auf vielen epithelialen Geweben vorhanden ist, auf Blutzellen aber in der Regel fehlt. EGF-R wird auch von Trophoblastzellen exprimiert. Plazenta kann als ein Referenzgewebe für die Bindung von EGF-R-Antikörper verwendet werden. Der EGF-R kommt auf proliferierenden Geweben vor. Trophoblastzellen teilen sich aktiv und rasch Gewebe und sind reich an Rezeptoren für Wachstumsfaktoren.

Trophoblastzellen im Zervikalkanal schwangerer Frauen

In 1971 untersuchte Shettles Ausstriche von zervikalem Schleim von 30 schwangeren Frauen aus allen drei Trimestern und konnte nach Quinakrin-Färbung des Y-Chromosoms bei 10 Schwangerschaften (4 mit weiblichen und 6 mit männlichen Kindern) das Geschlecht korrekt voraussagen. Bobrow und Lewis (1971) konnten diese Ergebnisse mit derselben Methode aber nicht bestätigen; bei Vorliegen männlicher Feten waren nicht mehr Zellen "positiv" als bei weiblichen. Weitere widersprüchliche Berichte existieren von Warren (1972), Tsuji (1973) und Goldstein (1973).

Rhine (1975) färbte ebenfalls mit Quinakrin die Zellen im Zervixschleim, den er vom äußeren Muttermund aspiriert hatte. Er konnte in der Mehrzahl das fetale Geschlecht korrekt identifizieren. Dabei betrug der Anteil "Y-Chromosom-haltiger" Zellen 4% bis 22,7% (im

Mittel 8,9%) bei männlichen, 0% bis 3% bei weiblichen Feten (0,8%). 1977 berichtete Rhine über die Möglichkeit der Probengewinnung vom inneren Muttermund durch Lavage des Uteruscavum mit 5ml steriler Lösung. Durch Anzüchtung konnten Hinweise für vermutlich fetale Zellen mit Y-Chromosomen gefunden werden, wenn auch die Qualität der Metaphasen für eine sichere Beurteilung zu schlecht war. Bis acht Tagen nach Probenentnahme konnten keine Störungen der so untersuchten Schwangerschaften festgestellt werden. Rhine (1979) berichtete über eine weitere Untersuchung an 53 Schwangeren im ersten Trimester, von denen zervikale Schleimproben vor Schwangerschaftsabbrüchen untersucht wurden. In 37 Fällen (70%) gelang eine Anzüchtung, und fetale Chromosomen konnten aus 26 Proben (49%) nachgewiesen werden.

Goldberg (1980) entnahm endozervikale Lavagen bei 30 Schwangeren unmittelbar vor Schwangerschaftsabbrüchen zwischen 8 und 13 SSW und versuchte eine Anzüchtung der gewonnenen Zellen. 12 Schwangere trugen männliche Feten. In neun Proben wuchsen Zellen an, jedoch zeigten allen Metaphasen einen weiblichen Karyotyp. Coleman (1982) konnte nach intrauteriner Lavage und Anzüchtung ebenfalls nur weibliche Karyotypen finden.

Die Untersuchung der Zellen im Zervixschleim erhielt neuen Auftrieb durch die Einführung der Polymerasekettenreaktion ("polymerase chain reaction", PCR). Griffith-Jones (1992) nutzte die PCR zum Nachweis Y-spezifischer Sequenzen bei Proben von Ektozervix, Zervikalkanal und intrauteriner Lavage bei 33 Schwangeren vor Abbrüchen (9 bis 13 SSW). Durch Y-Chromosom-Nachweis konnte bei 25 der 26 Schwangeren das fetale Geschlecht aus den intrauterinen Proben nachgewiesen werden. Morris (1992) fand mit derselben Nachweismethode allerdings viel weniger richtig-Positive (d.h. korrekt erkannte männliche Feten) und daneben auch falsch-Positive (Nachweis scheinbar männlicher Zellen bei Schwangerschaften mit weiblichem Fetus).

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurde von Adinolfi (1993) an einer intrauterinen Lavage bei einer Patientin in der 12. SSW angewendet. Acht Tage nach Durchführung einer Chorionzottenbiopsie, die eine Trisomie 18 gezeigt hatte, ergab die intrauterine Lavage 25% Trisomie-18-Zellen. Allerdings konnte nicht ausgeschlossen werden, daß die Chorionzottenbiopsie zuvor zu vermehrt gewinnbaren Zellen geführt hatte.

Fetale Blutzellen und fetale genetische Marker im mütterlichen Blut

Durch die Anwendung einer sehr sensitiven PCR konnte Lo 1989 erstmals an Blutproben von 19 Schwangeren, von denen 12 einen männlichen Fetus trugen, das Geschlecht in allen Fällen

korrekt identifizieren. Dabei konnte das Testsystem eine männliche unter 10^5 kernhaltigen Zellen erkennen.

Aus unangereichertem Blut können auch andere paternal geerbte Mutationen oder Polymorphismen nachgewiesen werden. Camaschella (1990) untersuchte bei drei schwangeren Frauen, deren Partner die Anlage für ein abnormes beta-Globin-Gen, verantwortlich für das Hämoglobin-Lepore_{Boston}, trugen, Blut auf diese Anlage. In zwei Fällen wurde die fetale Anlage korrekt erkannt, im dritten korrekt ausgeschlossen. Sowohl Lo (1993) als auch Greifman-Holtzman (1994) untersuchten Blut rhesus-D-negativer Schwangerer und fanden bei Rhesus-D-positiven Feten diese Merkmale per PCR im mütterlichen Venenblut.

Die bisher genannten Verfahren beruhen alle auf dem Nachweis paternal ererbter genetischer Marker, die bei der Mutter nicht vorliegen. Sie sind daher nicht geeignet, um auch bei der Mutter vorkommende Marker bei Feten zu untersuchen. Dafür sind für bestimmte Zellarten spezifische Anreicherungs- oder Isolationsverfahren sowie eine positive Identifikation der fetalen Zellen unerlässlich. Als Zelltypen kommen neben den Trophoblastzellen insbesondere die kernhaltigen Zellen der fetalen Bluts in Betracht.

Walknowska (1969) züchtete aus Venenblut von Schwangeren mit männlichem Fetus Zellen an. Die Anwesenheit von fünf akrozentrischen Chromosomen wurde als Beweis für einen männlichen Chromosomensatz bewertet. Zwischen 0,1 und 1,5% aller untersuchten Zellen wurden als fetal gedeutet. Bei einem geschätzten maternalen Blutvolumen von 4,5 Liter würde ein einprozentiger Anteil fetaler Zellen bedeuten, daß 45ml Fetalblut im mütterlichen Blut zirkulierten. Diese Ansicht wurde initial von weiteren Arbeiten gestützt (De Grouchy 1971; Schindler 1972; Takahara 1972), wobei aber vermeintlich Y-Chromosom-haltige Zellen auch bei Schwangeren gefunden wurden, die ein Mädchen zur Welt brachten. Zilliacus (1975) schließlich untersuchte insgesamt 112.000 Zellen in Mitose aus 10 Blutproben von Schwangeren und konnte keine fetalen (männlichen) Zellen finden. Dieser Befund wurde von Schröder (1977) bestätigt.

Herzenberg (1979) und Iverson (1981) setzen Gradientenzentrifugation, gefolgt von Fluoreszenz-Durchflußzytometrie ("fluorescence activated cell sorting", FACS) ein, um fetale Lymphozyten von HLA-A2-negativen Müttern, deren Partner HLA-A2-positiv war, zu isolieren. Bei 12 Schwangeren war nach Amniozentese ein männlicher Fet bekannt. Von ihnen wurden Blutproben angereichert und die Zellkerne für das Y-Chromosom angefärbt.

Fünf Proben zeigten nach Sortierung und Färbung in wenigen Zellen (0,3-1,5%) ein Y-Signal, was allerdings in der Größenordnung der falsch-positiven Ergebnisse dieser Methode liegt (Thomsen 1986). In einer zweiten Untersuchung an 30 Frauen mit männlichem Fetus hatte wiederum nur ein minimaler Teil der HLA-2A-positiven Zellen ein Y-Signal. Keine der sortierten Zellen konnte zur Teilung stimuliert und karyotypisch untersucht werden. Mit derselben Sortierungstechnik zeigte Tharapel (1989, 1993) an allen "positiven" Zellen einen weiblichen (mütterlichen) Karyotyp. Ebenfalls auf der Basis von paternalen HLA-Antigenen reicherte Covone (1984) durch FACS Lymphozyten an, konnte aber keine fetalen Zellen nachweisen.

Yeoh verwendete molekulare Methoden, nachdem per FACS mit einem HLA-2A-Antikörper Blut einer HLA-2A-negativen Schwangeren sortiert worden war. Die paternal geerbte Eigenschaft wurde in der Fraktion der sortierten Zellen, nicht aber am unsortierten Blut per PCR und Southern Blot nachgewiesen. Dieses Systems konnte eine DR4-positive in 10^5 DR4-negativen Zellen detektieren. Daher schloß man auf eine Verdünnung der fetalen Zellen im mütterlichen Blut von mindestens $1:10^5$, entsprechend etwa 50µl Fetalblut in der gesamten mütterlichen Zirkulation (Yeoh 1990).

Bianchi (1990) wies als erste kernhaltige rote Blutzellen ("nucleated red blood cells", NRBC) im peripheren Schwangerenblut nach. Eine Anreicherung mittels Durchflußzytometrie ("fluorescence activated cell sorting", FACS) mit Antikörpern gegen den Transferrinrezeptor (CD71), der auf frühen Stufen der roten Blutzellreihe, aber auch auf Monozyten und aktivierten Lymphozyten vorhanden ist. Die anschließende PCR für Sequenzen auf dem Y-Chromosom war bei sechs Schwangeren mit männlichen, aber auch bei zwei mit weiblichen Feten positiv.

Für die Zellsortierung von NRBC mittels FACS wurden zusätzliche Marker wie Glykophorin-A, einem Sialoglykoprotein der Erythrozytenzellmembran, das den Leukozyten fehlt (Price 1991), sowie die Zellgröße und -granularität (Wachtel 1993; Simpson 1993) verwendet. Wachtel (1993) erkannte mit diesen Methoden alle 12 männlichen und 5 von 6 weiblichen Feten (d.h. ein falsch-positives Ergebnis). Neben der technisch aufwendigen FACS wurde auch erfolgreich die magnetische Zellsortierung (MACS; Miltenyi 1990) verwendet (Holzgreve 1992).

Bei der Suche nach NRBC wurde auch die Entfernung unerwünschter Zellen, also negative Selektion, angewendet. Diese negative Selektion durch MACS wird oft von einer Reinigung

(positive Selektion) durch FACS gefolgt. Andere Antikörper, aber auch Lysetechniken für reife Zellen der roten Reihe wurden versucht (Simpson 1995; Zheng 1993).

Jedoch sind auch nach erfolgreicher Depletion (z.B. mit anti-CD45) und Selektion (z.B. mit CD71 und GPA) die fetalen NRBC neben den mit-"isolierten" mütterlichen NRBC noch in der Minderzahl (Simpson 1994), was die anschließende spezifische Identifizierung erfordert. Ein möglicher Marker ist das fetale Hämoglobin (HbF), das aus zwei alpha- und zwei gamma-Globinketten (im Gegensatz zum reifen HbA mit zwei alpha- und zwei beta-Globinketten) besteht. Zheng (1993) führte zunächst eine Depletion (MACS, anti-CD45 und anti-CD32) und dann eine simultane Färbung für HbF (mit dem Antikörper UCH gamma) und für die Chromosomen X und Y (mit FISH) durch und konnte männliche, damit also fetale NRBC nachweisen.

Mit der Mikromanipulation zur Isolierung fetaler Zellen in Reinform wendete erstmals Takabayashi (1995) eine neue Methode an, die die Entfernung einzelner Zellen, z.B. von einem Objektträger mit einer angereicherten und gefärbten Fraktion, erlaubt. Diese Technik wurde auch zur Isolierung einzelner NRBC (nach Dreifachgradient und anti-CD71 mit MACS) verwendet, die anschließend mittels polymorpher DNS-Marker, sogenannter "short tandem repeats" (STR), und am Amelogenin-Locus (Amelogenin-Gen auf dem X- und Pseudogen mit internen Deletionen auf dem Y-Chromosom) untersucht wurden. 30% der sortierten und isolierten NRBC waren fetalen Ursprungs (Eggeling 1997).

Fetale Hämatopoese

Man geht davon aus, daß alle Blutzelltypen von einem gemeinsamen Zelltyp, der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle, ausgehen. Aus diesen Stammzellen entwickeln sich auf bestimmte Reize die determinierten hämatopoetischen Vorläuferzellen (lymphoide und myeloide Vorläufer) und aus ihnen schließlich die reifen, funktionellen Zellen. Diese Zelltypen sind in der Tabelle 2 aufgelistet.

Die frühen, zur Bildung verschiedener Reihen befähigten Zellen reagieren auf Wachstumsfaktoren, die eine Differenzierung zu Vorläuferzellen bewirken können. Diese Faktoren umfassen Erythropoetin (Epo), Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF), Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF), Granulozyten- Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), Interleukin 3 (IL3) und Thrombopoietin. Dabei stimulieren einige Faktoren die Bildung mehrerer Zelllinien (GM-CSF), während andere (z.B. Epo) die Bildung einer Reihe fördern.

Mark	Blut	Gewebe
Megakaryoblast	Blutplättchen	
Erythroblast	Erythrozyt	
Mastzellenvorläufer	Mastzelle	Schleimhaut- und Bindegewebemastzelle
Myeloblast	Basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten	Entzündungsherde
Monoblast	Monozyt	Makrophagen; Kupffer-Zellen; Osteoklasten
Vorläuferzellen	dendritische Zellen	dendritische Gewebezellen
Vorläuferzellen	"natural killer cells", NK-Zellen	Lymphgewebe, Entzündungsherde
Pro-B-Zellen	B-Lymphozyten	Lymphgewebe
T-Zell-Vorläufer	T-Zellen	Blut, Lymphgewebe, Entzündungsherde

Tab. 2 Zelltypen der Hämatopoese

Als Maß für die Expansion, ausgehend von einer stimulierbaren Zelle, wird experimentell die Bildung von Kolonien in entsprechenden Medien genutzt. Aus einer Zelle entwickelt sich eine Kolonie. Diese Kolonien sind durch ihre Form und bei der schließlich zu den Erythrozyten führenden roten Reihe durch ihre Hämoglobinisierung charakterisiert. In der roten Reihe finden sich zwei Kolonieförmigkeiten: die unreiferen sogenannten "burst forming unit-erythroid" (BFU-E) und die "colony-forming unit-erythroid (CFU-E).

In ihrer Differenzierung gewinnen oder verlieren die Zelllinien Fähigkeiten oder Eigenschaften. Eine wichtige Funktion in den Zellen der roten Reihe ist die Bildung von Hämoglobin. Hämoglobine sind Tetramere aus je zwei identischen Globinmolekülen. Adultes Hämoglobin "HbA" enthält zwei alpha-Ketten und zwei beta-Ketten ($\alpha_2\beta_2$). Fetales Hämoglobin "HbF" enthält zwei alpha-Ketten sowie zwei gamma-Ketten ($\alpha_2\gamma_2$). Daneben werden in der Embryonalperiode noch anderer Hämoglobine gebildet (Hb ζ , Hb ϵ). HbF ist typisch, aber nicht spezifisch für fetale Blutzellen. In bestimmten Situationen kann die adulte Hämatopoese auf die nicht-HbA-Formen ausweichen, so zum Beispiel bei der β -Thalassämie, bei der ein Synthesedefekt der β -Ketten eine Anämie und regelmäßig auch eine kompensatorische HbF-Bildung bewirkt. In den roten Blutzellen können parallel verschiedene Formen des Hämoglobins gebildet werden. Durch Anlagerung spezifischer Antikörper können rote Blutzellen unterschieden werden, die entweder nur fetales Hämoglobin (F+A-), nur adultes Hämoglobin (F-A+) oder beides enthalten (F+A+).

Das fetale blutbildende System entwickelt sich in Stadien: zuerst im Dottersack, dann in der Leber und zuletzt, ab 20 SSW, vorwiegend im Knochenmark (Tavassoli 1992). Fetales Blut zeigt unterschiedliche Entwicklungsstufen und enthält im Vergleich zu adultem hohe Spiegel von kernhaltigen erythroiden und granulozytär-monozytären Vorläuferzellen (Linch 1982; Migliaccio 1996; Péault 1996). Von besonderer Bedeutung für die hier beschriebenen Untersuchungen sind die Zellen der "roten Reihe", in der sich durch angemessene Stimuli die Vorläuferzellen, dann die kernhaltigen Erythroblasten ("nucleated red blood cells", NRBC) und schließlich die kernlosen reifen Erythrozyten bilden.

Der hohe Anteil an Vorläuferzellen im peripheren fetalen Blut ist auch durch die physiologische extramedulläre Hämatopoese erklärlich, zu der der Fetus zu jedem Zeitpunkt in der Schwangerschaft befähigt ist. Im fetalen Blut findet man selbst am Ende der Schwangerschaft noch einen hohen Gehalt an hämatopoetischen Vorläuferzellen, so daß Nabelschnurrestblut z.B. für therapeutische Zwecke genutzt werden kann (Knochenmarksrekonstitution aus Nabelschnurrestblut) (Broxmeyer 1989; Kögler 1996).

Aus Untersuchungen an Fetalblut von Schwangerschaften mit antikörper-vermittelter fetaler Anämie, fetaler Wachstumsretardierung oder chromosomalen Störungen ist bekannt, daß die spontane Teilungsrate fetaler kernhaltiger Blutzellen in vielen dieser Fälle erhöht ist (Thilaganathan 1994).

In Situationen mit vermehrter Erythropoese, wie z.B. in der Schwangerschaft, können auch bei Erwachsenen physiologisch HbF-Zellen gefunden werden. Slunga-Tallberg (1995) untersuchte kernhaltige rote Blutzellen (NRBC) aus 20ml-Blutproben von 40 Schwangeren mit männlichen Feten und von 10 Frauen, die nie schwanger gewesen waren. Durch Depletion der weißen Blutzellen (magnetische Sortierung mit CD45-Antikörper), gefolgt von Antikörper-Detektion von Glycophorin A, einem Marker der roten Reihe, wurden NRBC angereichert und identifiziert. Mittels XY-FISH wurde dann die Herkunft der Zellen bestimmt: Bei fetalen Zellen wäre je ein X- und ein Y-Signal zu erwarten. Bei fast allen Schwangeren (37 von 40) wurden (zwischen einer und 230) NRBC gefunden, allerdings auch eine bis drei NRBC bei sechs der 10 Kontrollpersonen. Keine der so angereicherten NRBC waren nachweislich fetal. Schwangerschaft führt also zu einer maternalen Mehrproduktion von NRBC.

Anzüchtung fetaler Zellen aus dem mütterlichen Blut

Hassan (1979) züchteten Zellen aus der fetalen Leber, einem Ort der fetalen Hämatopoese, zwischen 13 und 22 SSW und aus Nabelschnurblut in einem Modellsystem aus geronnenem Plasma (je 0,1ml). Sie verglichen sie mit Zellen aus peripherem adulten Blut. Aus jeweils 10^5 eingesetzten Zellen wuchsen ohne Zugabe von Erythropoietin keine Kolonien an. Aus dem adulten Blut wuchsen nach 7 Tagen keine und nach 14 Tage bis zu 100 Kolonien je 0,1ml-Ansatz. Nabelschnurblut zeigte nach 7 Tagen bereits 200 und nach 14 Tagen 125 Kolonien. Die Zellen aus der fetalen Leber hingegen zeigten die meisten Kolonien nach 7 Tagen (>1.500) und eine Abnahme bei weiterer Anzüchtung.

Fetale rote Blutzellen produzieren in Kultur zunächst nur HbF. Erst nach Erreichen hoher intrazellulärer HbF-Spiegel (nach 7-10 Tagen in Kultur) bilden sie auch HbA. In einer Co-Kultur haben adulte rote Blutzellen dann aber bereits hohe HbA-Spiegel, so daß adulte und fetale Zellen z.B. bei einer durchflußzytometrischen Zellsortierung mit dem Unterscheidungsmerkmal HbF+/HbA- effektiv getrennt werden können. Der Grad der Anreicherung hängt auch von der Kulturdauer und dem Serumgehalt des Mediums ab (Bohmer 1998).

Lo (1994) beschrieb als erster die Möglichkeiten der absoluten Vermehrung der Zahl fetaler Blutzellen durch Anzüchtung in einem flüssigen Kulturmedium mit Wachstumsfaktoren, um sie für eine nicht-invasive genetische Diagnostik nutzbar zu machen. Valerio (1996) untersuchte aus Schwangerenblut angezüchtete Zellen der roten Reihe ("colony forming units, erythroid", CFU-E, und "burst forming unit-erythroid", BFU-E) auf ihr Potential für die nicht-invasive pränatale genetische Diagnostik. Ihre Lebenszeit ist ausreichend kurz, um z.B. Kontaminationen aus vorangegangenen Schwangerschaften zu vermeiden. Andererseits erlaubt ihr Wachstumspotential die (klonale) Vermehrung auf über 1000 Zellen aus einer einzigen fetalen Zelle. Zunächst wurden aus Blutproben von Schwangeren fetale Zellen antikörpervermittelt über den Erythropoietinrezeptor angereicht und anschließend in Kultur gebracht. In den Kulturen aus acht Schwangerschaften wurden mittels PCR für das Y-Chromosom, Immunzytochemie mit HbF und FISH 18% fetale Zellen gefunden. In zwei (retrospektiv untersuchten) Schwangerschaften mit Trisomie 21 wurden mit demselben Ansatz mittels FISH sogar noch mehr aneuploide fetale Zellen gefunden (40 bzw. 70% der angereicherten Zellen). Dies wurde als möglicher Hinweis auf einen vermehrten Übertritt fetaler Zellen in chromosomal gestörten Schwangerschaften gedeutet.

Aufbauend auf dieser Idee, nahm Valerio (1997) sieben Schwangeren, bei denen nach invasiven Eingriffen aneuploide Feten bekannt waren, Blut ab. Durch Anreicherung über die Transferrinrezeptoren wurden die Zellen in Kultur gebracht und eine absolute Vermehrung erzielt. Die Zellen wurden dann allerdings insgesamt untersucht, d.h. die gewonnenen Kolonien wurden wieder in Suspension gebracht. Es konnten an dieser Suspension durch FISH die aus der Amniozentese bekannten Aneuploidien bestätigt werden. Es wurden jedoch keine einzelnen Zellen oder einzelne Kolonien untersucht. Dieselbe Gruppe diagnostizierte eine fetale Trisomie 18 aus einer maternalen Blutprobe, die durch Gradientenzentrifugation, Kurzkultur (drei Tage) und Sortierung mittels Antikörper gegen den Erythropoetinrezeptor angereichert und dann mittels FISH untersucht wurde. Aus einer 7ml-Blutprobe der Mutter konnten unter 5640 untersuchten Zellen 84 fetale gefunden werden (Valerio 2000).

Die mit der Methode von Valerio 1997 gefundenen Ergebnisse konnten jedoch von Chen (1998) nicht bestätigt werden, wobei allerdings nur eine geringe Zahl der in Kultur gebrachten Zellen auf eine mögliche fetale Herkunft untersucht wurde. Huber (2000) untersuchte Suspensions-Zellkulturen mittels XY-FISH an einem Modellsystem aus Neugeborenen-Nabelschnurblut sowie aus mütterlichen peripheren Blutproben. Mittels einer Chromatographie wurden Hämoglobin-F-haltige Zellen angereichert. Kernhaltige Zellen aus je peripherem Blut von 13 Schwangeren mit männlichen Feten wurden über 14 Tage in mit Wachstumsfaktoren angereichertem Medium angezüchtet. Die Anwesenheit fetaler Zellen wurde mittels XY-FISH untersucht. In keinem Fall wurden fetale Zellen gefunden.

Coata (2001) wiederum gelang die Darstellung fetaler Zellen im mütterlichen Blut, indem CD34-positive Stammzellen aus dem peripheren Blut durch Antikörper-gestützte Sortierung angereichert und anschließend angezüchtet wurden.

Insgesamt kann die Situation der fetalen genetischen Untersuchung durch nicht-invasiv gewonnene fetalen Zellen so zusammengefaßt werden: Verschiedene Gruppen konnten fetale Zellen im mütterlichen Blut oder auch aus dem Zervixschleim nachweisen und fetale Chromosomenstörungen und genetische Eigenschaften nachweisen. Über die Dynamik des Auftretens fetaler Zellen im mütterlichen Blut lagen bisher keine Daten vor, und ihre Analyse war durch die geringe Zellzahl und die Kontamination mit mütterlichen Zellen erschwert. Weiterhin sind die notwendigen Anreicherungsverfahren sowie die auf kleinste Zellmengen anzuwendenden Untersuchungstechniken bislang so aufwendig, daß eine klinische Routine mit diesen Methoden nicht möglich erscheint.

Ziele der vorgelegten Arbeit

Die hier vorgelegten Untersuchungen betrachten drei unterschiedliche Aspekte der nicht-invasiven oder minimal-invasiven genetischen Diagnostik.

1. Es wurde untersucht, wann im Verlauf normaler Schwangerschaften im peripheren mütterlichen Blut fetales Material durch PCR nachweisbar ist. Ein Modell für die Zellsortierung möglicher Zielzellen und ihre Untersuchung sollte etabliert werden.
2. In einem minimal-invasiven Verfahren wurde Zervixschleim schwangerer Frauen auf fetale Zellen untersucht. Fetale Zellen oder Zellklumpen wurden isoliert und durch FISH und PCR, die ggf. auf die zu erwartenden minimalen Menge angepaßt werden mußten, genetisch analysiert.
3. Eine absolute Vermehrung und Reindarstellung fetaler Zellen aus dem mütterlichen Blut sollte durch ex-vivo-Expansion und Untersuchung durch fluoreszente Multiplex-PCR erfolgen.

MATERIAL UND METHODEN

Verwendete Reagenzien

Enzyme

Alle Enzyme wurden aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt:

- Proteinase K, Sigma
- Taq DNA Polymerase, Promega
- *Hinf* I, Promega
- Trypsin/EDTA, Gibco BRL

Nukleotide und Nukleinsäuren

- Oligonukleotid-Primer für die PCR (HPLC-gereinigt); außer Y1.5/1.6 und Y 1.7/1.8 (X06325, Locus HSYCHR; nach Arnemann et al., 1987) Fluoreszenz-markiert (5'-Ende-Fluoreszein-Label); Standard-Arbeitsverdünnung 10pM/µl; Oswel DNA-Service oder Genosys (Primersequenzen siehe Tab. 3)
- dNTPs für die PCR (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), Promega
- DNS Größenstandards (100bp-Leiter, 1Kb-Leiter), Gibco BRL

Name	Primersequenz	Chromosom, Locus	Het.	PCR-Produkte
Y1.5	5'-CTAGACCGCAGAGGCGCCAT	HSYCHR (nested, äußeres Paar)		239
Y1.6	5'-TAGTACCCACGCCTGCTCCGG			
Y1.7	5'-CATCAGAGCGTCCCTGGCTT	HSYCHR (nested, inneres Paar)		198
Y1.8	5'-CTTTCCACAGCCACATTTGTC			
D21S11 (F)	5'-TAT-GTG-AGT-CAA-TTC-CCC-AAG-TGA-3'	21q22.3	0.93	172-264bp
D21S11 (R)	5'-GTT-GTA-TTA-GTC-AAT-GTT-CTC-CAG-3'			
D21S1414 (F)	5'-AAA-TTA-GTG-TCT-GGC-ACC-CAG-TA-3'	21q21	0.88	330-380bp
D21S1414 (R)	5'-CAA-TTC-CCC-AAG-TGA-ATT-GCC-TTC-3'			
D18S535 (F)	5'-TCA-TGT-GAC-AAA-AGC-CAC-AC-3'	18q12.2-12.3	0.92	≥ 138bp
D18S535 (R)	5'-AGA-CAG-AAA-TAT-AGA-TGA-GAA-TGC-A-3'			
AMXY (F)	5'-CTG-ATG-GTT-GGC-CTC-AAG-CCT-3'	AmelogeninXY		Y 252bp
AMXY (R)	5'-CAA-TTC-CCC-AAG-TGA-ATT-GCC-TTC-3'			

Tab. 3 Verwendete PCR-Primer

Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden mit doppelt destilliertem, deionisiertem Wasser hergestellt, teils durch Autoklavieren (121°C, 30min) sterilisiert und bei Raumtemperatur oder 4°C verschlossen aufbewahrt:

- Blut-Lyse-Puffer: 0.32M Saccharose, 10mM Tris-CL pH7,5, 5mM MgCl₂, 1% v/v Triton X-100, Aufbewahrung bei 4°C
- Hybridisierungs-Mischung: 50% deionisiertes Formamid; 20% w/v Dextransulfat; 2X SSC; 0,1mM EDTA, pH 8; 0,2mM Tris-HCl, pH 7,6

- Ladepuffer (für Agarosegel; 10X Stammlösung): 40% Agarose; 0.025% w/v Bromphenolblau; 0.025% w/v Xylenzanol
- Ladepuffer (für ALF): 10% Dextranblau; 90% Formamid
- MACS-Puffer: PBS mit 1% BSA; bei Inkubation mit Antikörpern zusätzlich mit 1mg/ml Sandoglobulin®, Sandoz
- Paraformaldehydpuffer: 1% Paraformaldehyd, Fluka; 1% w/v MgCl₂
- PBS: 2,7mM KCl, 137mM NaCl, pH7
- Polyacrylamid (6%; 8M Harnstoff): 210g Harnstoff, 75ml 40% Acrylamid, deionisiert, ddH₂O ad 500ml
- Proteinase-K-Puffer: 20mM Tris-HCl, pH 7,5; 2mM Kalziumchlorid (CaCl₂)
- SSC (20X): 75.3g NaCl, 88.2g Natriumzitat, ddH₂O ad 1l, pH 7
- T 0.1E: 100mM Tris-HCl, 1mM EDTA in sterilem ddH₂O, pH 7
- Taq Polymerase-Puffer (Stammlösung 10X): 16,6mM (NH₄)₂ SO₄; 67mM Tris-HCl, pH 8,3; 1,5mM MgCl₂; 10mM Beta-Mercaptoethanol und 170 µM bovines Serumalbumin (BSA)
- TBE (Stammlösung): 90mM Tris-HCl, pH 8; 90mM Borsäure; 2mM EDTA
- TE: 10mM Tris-HCl, pH 8; 0.1M EDTA

Antikörper, FISH-Reagenzien

- Avidin-FITC, Sigma
- Avidin-Texas-Red, Cambio
- EGF-R mab 29.1, Sigma
- EGF-R mab 425-Antikörper, E. Merck
- EGF-R-1-Antikörper, ICRF (zu Verfügung gestellt von Dr. Bill Gullick)
- Immunohistochemie Detektionskit VECTAstain, Vector Labs
- Kaninchen-anti-FITC, Cambio
- Kaninchen-anti-Maus-FITC, Sigma
- OKT3, Maus-IgG-anti-CD3, Dako
- Propidiumjodid (PI) und Diamidinophenylindol (DAPI) zur unspezifischen nukleären Gegenfärbung, Sigma
- Sandoglobulin®, Sandoz
- superparamagnetische Mikrobeads, beschichtet mit anti-Maus-IgG, Miltenyi Biotech
- Vectashield Antifade-Medium mit 0,1 µg/ml DAPI, Vector Laboratories
- Ziege-anti-Kaninchen-IgG-FITC, Sigma
- Ziege-anti-Maus-IgG-FITC, Dako

Sonstige Materialien und Geräte

- 24-Loch-Kulturplatten, Costar

- 3M Filterpapier, Whatman
- 50ml and 200ml-Kulturflaschen, Nunclon, Gibco
- ACC zur parenteralen Injektion, 200mg/ml, Evan
- Accugel 40, National Diagnostics
- AEC, Sigma
- Agarose (Standard-Reinheit), Sigma
- Ammoniumpersulfat (AMPS), NNN'N'tetramethylenediamide (TEMED), Biorad
- Antibiotikamischung für Zellkultur (Penicillin und Streptomycin), Gibco
- APS, Sigma
- Bromophenolblau, Sigma
- bovines Serumalbumin (BSA), Sigma
- Objektträger und Deckgläser (verschiedene Größen), Gibco
- DMEM, Gibco
- DMSO, Sigma
- EDTA, Sigma
- Ethidiumbromid, Sigma
- Fetales Kälberserum (FCS), Globepharm
- Ficoll-Paque, Pharmacia
- Formamid, International Biotechnologies Inc.
- getrocknetes Milchpulver, Premier Beverages
- Glutamin, Gibco
- H₂O₂, Sigma
- Harris Haematoxylin, Sigma
- HMP Agarose, Gibco
- Iscove' s modified DMEM-Medium, Sigma
- Kalziumchlorid, Sigma
- Natriumazid, Sigma
- nicht-essentielle Aminosäuren, Gibco
- Paraformaldehyd, Fluka
- Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), Sigma
- Polaroid 667 film, Polaroid, U.K.
- QIAamp Blood Midi Kit und QIAamp Gewebe-DNS-Extraktions-Kit, Qiagen
- RPMI 1640-Medium, Gibco
- Natriumdodekylsulfat (SDS), Sigma

- Penicillin und Streptomycin (Stammlösung) für Zellkultur
- TEMED, Sigma
- Tween-20, Sigma
- UltraPure Sequigel, Histopaque; National Diagnostics
- Zytospin-Objektträger und -Tischzentrifuge, Shandon

Medien

Aufbewahrung jeweils bei 4°C:

- Medium HC5100: gebrauchsfertig, halbfest; Granulocyte-Erythroid-Macrophage-Megakaryocyte Colony-Forming Unit (CFU-GEMM) Medium mit 0,3% Methylcellulose, 5U/ml hu-IL-3, 30U/ml hu-IL-6, 10U/ml hu-G-CSF, 3U/ml hu-Epo und 15ng/ml hu-SCF; StemBio Research
- Methocult H4330: gebrauchsfertig, halbfest; 0,3% fetales Kälberserum, 1% Rinderserumalbumin (BSA), 2% rekombinantes humanes Erythropoietin, 0,1M Mercaptoethanol, 1,3% Methylcellulose, 7% Iscove-MDM, 200 mM L-Glutamin und 3 U/ml Erythropoietin
- RPMI-Medium: für 100ml 76ml steriles ddH₂O; 9ml 10X RPMI; 10ml FCS; 1ml Stammlösung aus Penicillin und Streptomycin; 1ml Stammlösung nicht-essentielle Aminosäuren; 3ml 5,3% NaHCO₃; 0.5-1.5ml NaOH zu Einstellung des pH

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Zur Untersuchung der Anzahl spezifischer Chromosomen an Zellen in Interphase wurde die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) angewendet. FISH beruht auf der komplementären Bindung von DNS-Strängen. Nach chemischer und physikalischer Denaturierung der DNS im Zellkern des zu untersuchenden Materials wird eine ebenfalls denaturierte, markierte DNS-Sequenz, die sogenannte Sonde, die spezifisch an eine Region eines Chromosoms bindet, hinzugegeben. Diese Sonde lagert sich der komplementären DNS im Untersuchungsmaterial an (Hybridisierung), der Überschuss wird abgewaschen, und das Farbsignal kann mikroskopisch ausgewertet werden.

DNS-Sonden können mit verschiedenen Detektions- oder Farbmolekülen markiert werden. Man unterscheidet direkt Fluoreszenz-markierte Sonden von solchen, die mit anderen Molekülen (z.B. Biotin) markiert sind und einen weiteren Detektionsschritt (mit Avidin) sowie eine Farbverstärkung erfordern. In den hier beschriebenen Untersuchungen wurden mit Fluoreszein (grüne Emission) oder Rhodamin (rote Emission) markierte Sonden verwendet, so daß mit einem entsprechenden Filter am Mikroskop gleichzeitig zwei Chromosomen, z.B. die Chromosomen X und Y, in den Kernen sichtbar gemacht werden konnten.

FISH wurden in zwei unterschiedlichen Ansätzen angewendet: bei den Arbeiten zur Trophoblastsortierung aus mütterlichem Blut und bei den fetalen Zellen aus dem Zervikalkanal. Es wurden Sonden der Firmen Oncor und Vysis für den Nachweis von Sequenzen auf den Chromosomen X und Y verwendet, daneben in einem einzelnen Fall auch auf Chromosom 1.

Nach dem Standardprotokoll für Interphase-FISH werden die zu untersuchenden Zellen auf Objektträgern fixiert und dehydriert. Unmittelbar vor Zugabe der FISH-Sonde werden die Zellen in 70% Formamid, 2XSSC, 40mM/l NaH_2PO_4 über 2,5min bei 65°C denaturiert. Die Sonden werden auf die empfohlene Arbeitsverdünnung in einer Formamidlösung eingestellt und im Wasserbad ebenfalls bei 65°C denaturiert. Dann werden die Sonden aufgetragen, mit einem Deckglas versiegelt und über 2 Stunden oder über Nacht inkubiert. Alternativ können auch die Sonden bereits auf die Deckgläser gegeben und gemeinsame mit dem Material auf einem Objektträger auf einer Heizplatte denaturiert werden. Nach der Hybridisierung wird der Objektträger vorsichtig in 2XSSC gelöst und die im Überschuß hinzugegebene Sondenlösung abgewaschen: Inkubation in 50% Formamide, 0,2X SSC bei 37°C über 40min, gefolgt von zwei Waschgängen in 2XSSC für je 5min bei Raumtemperatur.

Bei den direkt Fluoreszenz-markierten Sonden muß keine Signaldetektion oder Verstärkung mehr erfolgen, so daß die Objektträger unmittelbar weiterverarbeitet werden können. Sie werden anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei 4°C (70%, 90%, 100%, je 5min) entwässert, luftgetrocknet und mit einer dem Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe entgegenwirkenden Lösung ("antifade") sowie einer nukleären Gegenfärbung (DAPI) versiegelt und entweder sofort untersucht oder bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Die Objektträger wurden an zwei ähnlich ausgestatteten Fluoreszenzmikroskopen untersucht. Dabei konnten für die unterschiedlichen Fluorochrome spezifische Wellenlängen durch Filterwahl eingestellt werden, wobei insbesondere die Möglichkeit zur gleichzeitigen Beurteilung der roten (Rhodamin) und grünen (Fluorezein) Fluoreszenz durch einen Doppelband-Filter gegeben war: Nikon Optiphot mit Omega dual-band-pass-Filter sowie ein Zeiss Axioskop-Mikroskop mit einer digitalen Kamera (Kaf 1400 cooled Charge Couple Device, CCD) mit der Smartcapture-Software (Vysis).

Bei jedem FISH-Ansatz wurden Kontrollobjektträger mit normalen Metaphasen und Interphasenkernen (aus weiblichen und männlichen Lymphozytenkulturen) mit untersucht. Bei der Beurteilung des Kerngeschlechts wurden möglichst alle auf dem Objektträger

angefärbten Kerne auf das Vorhandensein roter (Y-Chromosom) und grüner (X-Chromosom) Signale ausgewertet. Dabei wurden die Zellen mit eindeutig einem roten und einem grünen Signal als männlich gewertet. Diese Auswertung wurde ebenso auf den Kontrollobjektträgern durchgeführt.

Polymerase-Ketten-Reaktion ("polymerase chain reaction", PCR)

Durch die PCR können selbst kleinste Mengen gesuchter DNS spezifisch vervielfältigt und nachweisbar gemacht werden. Das Prinzip der PCR beruht auf der wiederholten Denaturierung der DNS, Anlagerung von im Überschuß zugegebener spezifischer und die Zielsequenz flankierender Oligonukleotide (Primer) und Verlängerung der Primer unter Generierung identischer Kopien der gesuchten Sequenz. Der Nachweis der Reaktionsprodukte erfolgt durch elektrophoretische Auftrennung in Gelen und Identifizierung der Produkte über ihre Länge. Die Länge der Amplifikationsprodukte wird von der Position der verwendeten Primer bestimmt. Die Produkte können im Gel durch Anlagerung von interkalierenden DNS-Farbstoffen oder durch Bindung von Fluoreszenzmolekülen an die Primer sichtbar gemacht werden.

Die PCRs wurden auf einem dedizierten Arbeitsplatz mit sterilen Filter-Pipetten durchgeführt. Die Zubereitung der Reaktionslösungen zur PCR für Einzelzellen oder Zellklumpen wurde zur Dekontamination in einer laminaren Luftflußhaube mit separaten Pipetten und Verbrauchsmaterial durchgeführt. Es wurde stets auf eine räumliche Trennung besonders aller Schritte und Materialien vor und nach Amplifikation geachtet.

PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern

Die PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern wurde für einzelne Zellen und Zellklumpen aus dem Zervixschleim und für die angezüchteten Zellkolonien aus dem mütterlichen Blut verwendet. Die Zyklenzahl richtete sich nach der in der Probe erwarteten Menge an DNS: 19 Zyklen für 400ng extrahierte DNS (Kontrollen); 30 für Zellklumpen mit 10-50 Zellen bzw. Zellkolonien; 35 für einzelne Zellen. Ein PCR Mastermix mit je nach Reaktion unterschiedlichen Primern (siehe Tabelle 3) wurde vorab zubereitet und auf Kontamination überprüft. Der typische 25µl-Standardansatz enthielt je 0,2mM jedes 2'-Deoxynucleoside 5'-Triphosphats (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und 2,5µl 10X Enzym Reaktionspuffer (16,6mM (NH₄)₂ SO₄; 67mM Tris-HCl, pH8,3; 1,5mM MgCl₂; 10mM Mercaptoethanol und 170µM BSA). Die Reaktionen erfolgten in 0,5ml PCR-Reaktionsgefäßen mit einem Endvolumen von 25µl (20 plus 5µl DNA oder Einzelzellsuspension). Vor Start der PCR wurden die Gefäße

über 5min auf 94°C erhitzt ("hot start PCR"), bevor die Reaktion durch Zugabe von 5µl T0,1E mit je 1,5E Taq begonnen wurde. Das Programm der PCR war wie folgt: 94°C, 15min (Hot start); 19 bis 35 Zyklen von 93°C*48sec/60°C*48sec/72°C*1min; 72°C*5min. Bei den Einzelzellproben wurde eine Aliquot des Reaktionsprodukts nach 35 Zyklen analysiert und, falls keine spezifischen Produkte gesehen wurden, wurden fünf weitere Zyklen angehängt. Die PCR wurden in Thermocyclern der Firmen Perkin-Elmer-Cetus und Hybaid durchgeführt. Die Untersuchung der fluoreszenten PCR-Produkte erfolgte auf einem automatisiertem Laser-Fluoreszenz-Sequenzier (ALF, Pharmacia), wobei mittels der spezifischen Software (Fragment Manager Version 1.1 oder Prototype P0.2, Pharmacia) und durch kommerziell erhältliche Größenmarker (100 und 300bp, Pharmacia) die Fragmentlängen und die Flächen unter den Peaks als Maß für die Menge des spezifischen PCR-Produkts bestimmt wurden.

Untersuchung fetaler Marker aus maternalem Blut durch PCR und FISH

Die Arbeiten zur PCR und Trophoblastsortierung wurden 1993 und 1994 gemeinsam mit Frau Dr. Margot Thomas am St. Mary's Hospital, Department of Biochemistry (Direktor: Prof. Bob Williamson), London, durchgeführt.

Population und Material

Die Ethikkommission des University College Hospitals London hatte dieser Studie zugestimmt. Patientinnen aus einem Infertilitäts-Programm willigten nach ausführlicher Aufklärung vor Beginn der Behandlung schriftlich zur Teilnahme an der Studie ein. Letztlich wurden 30 Schwangerschaften eingeschlossen, bei denen sich im Verlauf per Ultraschall eine intakte Embryonalanlage gezeigt hatte, darunter sechs mit Mehrlingen und eine Schwangere, bei der nach 17 Schwangerschaftswochen ein intrauteriner Fruchttod festgestellt werden mußte. Vor Embryotransfer, nach zwei und drei Wochen und im weiteren Verlauf alle vier Wochen bis acht Wochen nach Entbindung wurden alle Probandinnen jeweils 10ml peripheres Venenblut ohne Gerinnungsmittel entnommen. Bei jeder Blutentnahme wurden die Schwangeren klinisch untersucht. Außer einem intrauterinen Fruchttod gab es im Verlauf der Schwangerschaften keine Besonderheiten. Alle Kinder waren bei Geburt klinisch unauffällig.

Für die Extraktion der DNS aus dem mütterlichen Blut zur PCR für den Nachweis von Sequenzen des Y-Chromosoms wurden besondere Dekontaminationsmaßnahmen angewendet. Es wurde ein DNS-Extraktionskit (Scotlab) verwendet. Alle Extraktionsschritte wurden in einer laminaren Luftflußhaube in einem Labor durchgeführt, das vom PCR-Labor räumlich getrennt war.

Geschachtelte ("nested") PCR aus dem mütterlichen Blut

Der Nachweis der fetalen Y-Chromosom-DNS erfolgte durch eine geschachtelte PCR, die bei hoher Spezifität den Nachweis geringster Mengen an Minoritäts-DNS erlaubt. Es wird bei einem männlichen Feten der Nachweis von spezifischen Sequenzen des Y-Chromosoms als Nachweis fetalen Materials gewertet. Es wurde die Methode nach Lo (1990) angewendet, wobei die Primer eine Sequenz auf dem Y-Chromosom, die aus einer cosmid-Library identifiziert wurde (HSYCHR; Arnemann 1987), amplifizieren. In zwei sequentiellen Reaktionen wird eine innerhalb der ersten Primer (Y1.5 und Y1.6, Produkt 239 Basenpaare

lang) liegende Sequenz durch ein zweites Primerpaar amplifiziert (Y1.7 und Y1.8, 198bp). Ein 5µl-Aliquot der ersten, "äußeren" PCR wird als Ausgangsmaterial in die zweite, "innere" PCR eingesetzt. Für diese "geschachtelte" PCR am Y-Chromosom gelten folgende Reaktionsbedingungen:

- äußeres Primerpaar Y1.5/Y1.6: 95°C*1 min / 57°C*1 min / 72°C*1 min 30 Zyklen. Dekontamination durch Präinkubation des PCR-Cocktail mit 30 U/100 µl *Hinf* I über eine Std., dann Denaturierung bei 95°C über 10min vor Zugabe der genomischen DNS und Taq.
- inneres Primerpaar Y1.7/Y1.8: 95°C*1 min / 60°C*1 min / 72°C*1 min 30 Zyklen; sonst wie oben.

Vermeidung von Kontamination

Eine Kontamination einer PCR kann im Prinzip bei jedem Teilschritt auftreten und aus jedem zugefügten Reagens stammen, am häufigsten jedoch aus Produkten vorausgegangener Reaktionen derselben PCR, da diese Fragmente in höchster Menge und optimaler Spezifität erzeugt werden und nach kurzer Zeit im Überfluß im Labor vorliegen können. Diese sogenannte "carry-over"-Kontamination kann zu einem schwerwiegenden Problem werden (Kwok 1989).

Zur Kontaminationsprophylaxe wurde folgende Vorgehensweise beachtet:

- Präparation aller Lösungen für die PCR in einer laminaren Luftflußhaube, die sonst nur für Zellkultur, nicht aber für PCR-Ansätze verwendet wurde.
- sterile Handschuhe und Einmalkittel
- Batchzubereitung, Aliquotierung und Batch-Austestung, dann Aufbewahrung bei -20°C bis zur Benutzung
- DNS-Extraktion mittels dedizierter kommerzieller Kits
- Inkubation der PCR-Batch-Lösungen mit einer Restriktionsendonuklease, die ein verschlepptes Reaktionsprodukt für die Amplifikation unbrauchbar macht.
- strikte räumliche Trennung der prä- und post-PCR-Arbeiten

Elektrophoretische Darstellung der amplifizierten Fragmente

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden in horizontalen Agarosegelen (2% oder 4%, 0,5-1cm dick) elektrophoretisch aufgetrennt. 5-10µl PCR-Produkt wurden mit 1µl Ladepuffer aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 15min in Puffer mit 5µl/100ml Ethidiumbromid (10µg/ml) angefärbt und die Fragmente durch UV-Licht visualisiert. Die

Fragmentgröße wurde über eine 1kB-Leiter kontrolliert. Die Dokumentation erfolgte durch Polaroidaufnahmen.

Eigenschaften der Trophoblastzellen in Hinblick auf eine Anreicherung mittels Antikörpern

Die Bindung von EGF-R- und Kontroll-Antikörpern an Ersttrimesterplazenta-Gefrierschnitten, von auf Objektträgern fixierten vereinzelt Trophoblastzellen und von Trophoblastzellen und Blutzellen in der Durchflußzytometrie (FACS) wurden untersucht.

Drei murine IgG-Antikörper gegen verschiedene Epitope der extrazellulären Domäne des EGF-R wurden als mögliche Antikörper für eine Sortierung von Trophoblastzellen aus dem Blut verwendet: 29-1 EGF-R-Antikörper (Sigma), EGF-R-425-Antikörper (E. Merck) und EGFR-1-Antikörper (ICRF, London).

Mechanische Herstellung einer Trophoblast-Zellsuspension

Zur Erstellung einer Trophoblastzellsuspension wurde in Vorversuchen zunächst die enzymatische Dissoziation nach Kliman (1986) angewendet, im weiteren Verlauf für alle Untersuchungen aber eine mechanische Dissoziation der Ersttrimesterplazenten verwendet.

Ersttrimester-Chorion aus nicht medizinisch indizierten Schwangerschaftsabbrüchen wurde in PBS durch vorsichtige Präparation mit zwei Metallkanülen unter dem Mikroskop von maternalen Gewebeteilen (Decidua graviditatis) und Blutklumpen befreit und anschließend durch zweifach Passage in frischem PBS gewaschen. Mit einer feinen Schere wurde dann das grob gereinigte Chorion in feine Stücke zerschnitten, mehrmals durch eine 10ml-Spritze (ohne Kanüle) aufgezogen und wieder in die Petrischale zurückgespritzt. Schließlich wurde diese mechanisch erzeugte Suspension durch zwei Lagen feiner Gaze gefiltert, um Gewebefragmente zu entfernen. Nach Aufschwemmung in 20ml PBS und Absetzen der Gewebefragmente über 3min wurde der Überstand aufgenommen.

Zytospin-Zentrifugation und Giemsa-Färbung der Trophoblast-Suspension

Zur Beurteilung und Färbung der Trophoblast-Suspension und der Mischungen mit anderen Zellen wurden sie mittels der Zytospin-Zentrifugation auf Objektträger gebracht. Dabei werden in einer speziellen Tischzentrifuge (Zytospin, Shandon) 500µl einer Suspension durch einen Trichter auf eine definierte Fläche eines mit Ethanol gereinigten Objektträgers aufgebracht. Die Zellen werden nach 10min Lufttrocknung in 100% Ethanol für 5min

entwässert und erneut luftgetrocknet. Kontrollobjektträger wurden mit Giemsa gefärbt und lichtmikroskopisch beurteilt.

Antikörperbindung an Ersttrimester-Trophoblastzellen an Gewebsschnitten und Zytospin-Präparationen

Für die Austestung der Konzentrationen der EGF-R-Antikörper und den Nachweis der Spezifität wurden Gefrierschnitte aus Ersttrimesterplazenten verwendet. Ersttrimester-Plazenten aus nicht medizinisch indizierten Abbrüchen wurden durch Saugkürettagen gewonnen. Die Zustimmung wurde von den Patientinnen nach erfolgter Aufklärung eingeholt. Der Untersuchung war von der Ethikkommission des University College Hospital London, zugestimmt worden.

Das Plazentagewebe wurde in Pufferlösung (PBS) sorgfältig von mütterlichem Deziduagewebe, Blut und anderem Gewebe getrennt und nach Standardverfahren entweder zu histologischen Gefrierschnitten oder zur Herstellung von Zellsuspensionen frisch verarbeitet. Gefrierschnitte und Zytospin-Präparationen wurden mit den EGF-R-Antikörpern gefärbt. In Verdünnungsreihen wurden die optimalen Konzentrationen der primären Antikörper ermittelt. Zur Detektion der Antikörperbindung wurde das Vectastain-Kit verwendet, das ein Biotin-Avidin-System und Meerrettich-Peroxidase beinhaltet.

Blutzellreinigung durch Gradientenzentrifugation

Zur Reinigung von Lymphozyten aus Vollblut wird das Blut mit demselben Volumen PBS verdünnt und auf Ficoll geschichtet. Nach Zentrifugation (2000rpm über 20min bei 4°C) werden an der Grenzschicht zum Ficoll die Lymphozyten, Monozyten und wenige Granulozyten angereichert. Erythrozyten sedimentieren durch das Ficoll zum Boden des Röhrchens.

Gradientenzentrifugation der Trophoblast-Suspension

Eine weitere Reinigung der mechanisch erzeugten Trophoblast-Suspension erfolgte durch Gradientenzentrifugation analog der Reinigung von mononukleären Blutzellen im Ficoll-Gradienten. Die Trophoblast-Suspension wurde auf 25ml mit PBS aufgefüllt und über einem 25ml-Ficollkissen in einem 50ml-Röhrchen bei 2000rpm über 20min bei 4°C zentrifugiert.

Die Schichten des Gradienten wurden vorsichtig einzeln aufgenommen, dreimal in PBS gewaschen und die Anzahl der vitalen Zellen durch Färbung eines Aliquots und Mikroskopie

in einer Neubauer-Kammer beurteilt. Die Zellen wurden gekühlt und für alle weiteren Experimente am selben Tag eingesetzt.

FACS-Untersuchung von Leukozyten mit unspezifischen, mit Leukozyten-spezifischen und mit EGF-R-Antikörpern

Für alle durchflußzytometrischen Untersuchungen (FACS) wurden die zu untersuchenden Zellen (Trophoblastzellen, Leukozyten, artifizielle Mischungen) nach Reinigung und antikörpervermittelter Färbung im FACS (Epics, Coulter) nach Größe, Granularität und spezifischer Färbung untersucht. Die Auswertung erfolgte mit dem integrierten Programm EPICS Profile Analyzer (Coulter).

Für die Untersuchung der Färbereigenschaften von Leukozyten wurden aus 10ml peripherem Vollblut über einen Ficoll-Gradienten mononukleäre Zellen gewonnen. Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und in einem Volumen von 2ml PBS resuspendiert. Die Konzentration wurde in einer Zählkammer mikroskopisch ausgezählt.

Je Ansatz wurden 10^6 Zellen in Aliquots von 500ul in PBS mit 5% BSA eingesetzt. In Parallelansätzen ohne Primärantikörper, mit einem Lymphozyten-spezifischen Antikörper (OKT3, anti-CD3), mit einem unspezifischem Maus-IgG oder mit einem EGF-R-Antikörper wurden diese Zellen gefärbt, nach Waschschritten mit 4% Formalin in PBS fixiert und anschließend per FACS untersucht. Alle verwendeten Detektionsantikörper waren mit Fluoreszein (FITC) markiert. Der leukozytenspezifische Antikörper anti-CD3 war direkt mit FITC markiert. Daher wurden bei diesen Färbungen keine Detektionsantikörper verwendet.

Reduktion unspezifischer Antikörper-Bindungen

Zur Reduktion der unspezifischen EGF-R-Bindung wurde menschliches Immunglobulin (Sandoglobin®, Sandoz) in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Die Zellen wurden anschließend zweimal gewaschen und mit den EGF-R-Antikörpern inkubiert (auf Eis, für je 20min). Anschließend erfolgte die Detektion mit anti-Maus-IgG-FITC-Konjugat. Die Reaktionsgefäße wurden mit 4% gepuffertem Formalin aufgefüllt und 20min auf Eis fixiert. Nach erneutem Waschen und Pelletieren wurden die Proben im FACS ausgewertet.

Modellsystem: Mischung aus Blutzellen und Trophoblastzellen

Durch Zentrifugation im Ficoll-Gradienten gereinigte Blutzellen von einer gesunden, nicht schwangeren Probandin und Zellen aus der Trophoblast-Suspension wurden in verschiedenen Verhältnissen gemischt. Aus Trophoblastzellen (Zielzelle) wurden Verdünnungen in

absteigender Reihe mit Leukozyten hergestellt. Dazu wurden auf je 200.000 Leukozyten 200.000, 20.000, oder 2.000 Zielzellen eingesetzt. Anschließend wurden die Suspensionen mit den EGF-R-Antikörpern (Maus-IgG) inkubiert. Nach dem Waschen wurden mit anti-Maus-IgG-Antikörper beschichtete magnetischen Mikropartikel des MACS-Systems (Verdünnung der Mikropartikel 1:40) zugegeben und inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen durch eine Mini-MACS-Säule gereinigt. Die Negativfraktion (Eluat bei anliegendem Magnetfeld) und die Spüllösungen sowie die Positivfraktion (Eluat nach Entfernen des Magnetfeldes) wurden getrennt untersucht. Nach der Sortierung wurden die Zellen gezählt, auf Objektträger zentrifugiert (Zytospin), Giemsa-gefärbt und auf den Objektträgern mikroskopisch auf Blutzellen und Zielzellen ausgezählt.

Modellsystem: Mischung aus Blutzellen und einer EGF-R-positiven Zelllinie

Es wurden zunächst drei Zelllinien mit bekannter EGF-R-Expression auf ihre Färbereigenschaften für die EGF-R-Antikörper untersucht. Die Chorionkarzinom-Zelllinien JEG, die plazentare Chorionkarzinom-Zelllinien JAG und die Vulva-Karzinom-Zelllinie A431 (ATCC, 1992) wurden in RPMI mit Zusatz von 10% FCS bis zur Konfluenz gezüchtet und dann mit Trypsin vereinzelt. Zur Bestimmung des Anteils der EGF-R-positiven Zellen wurden Zytospinpräparate angefertigt und immunzytochemisch mit den EGF-R-Antikörpern gefärbt.

Analog dem Modell der Trophoblast-Suspension wurden aus Einzelzell-Suspensionen der ausgewählten Zelllinie Verdünnungen in absteigender Reihe mit Ficoll-gereinigten Leukozyten hergestellt. Dazu wurden je 200.000 Blutzellen mit 200.000, 20.000 oder 2.000 Zielzellen gemischt und in die magnetische Sortierung eingesetzt. Nach Durchführung der Antikörperbindungs- und Waschschrte ("prä-MACS") sowie nach der magnetischen Zellsortierung wurden zur Ermittlung der Zellkonzentrationen und zur Auszählung der Verhältnisse zwischen Leukozyten und Zielzellen Zytospinpräparate von den gepoolten Negativ- und Waschfraktionen und der Positivfraktion mikroskopisch auf Leukozyten und Zielzellen ausgezählt.

Magnetische Zellsortierung aus dem peripheren Blut schwangerer Frauen

Das etablierte Testsystem der EGF-R-Antikörper zur Anreicherung von Trophoblastzellen aus Vollblut wurde am Blut von 23 schwangeren Frauen angewendet, die sich zur Chorionzottenbiopsie in der Fetal Medicine Unit am University College Hospital, London,

vorstellten. Nach entsprechender Aufklärung wurde vor jeglicher invasiver Diagnostik aus einer peripheren Vene 10ml Blut in Zitratröhrchen gewonnen, bei 4°C gekühlt und binnen 6 Stunden verarbeitet.

Materialgewinnung, Sortierung und Untersuchung durch FISH

Das Blut in Zitratröhrchen wurde mit demselben Volumen PBS verdünnt. Nach Zentrifugation über Ficoll wurde die Grenzschicht vom Überstand zum Ficoll aufgenommen, gewaschen und pelletiert und die Detektion von Trophoblastzellen mit EGF-R-Antikörper, gefolgt von der Reinigung über MACS, vorgenommen.

Schließlich wurden die Zellen der Positivfraktion pelletiert und entweder in PBS mit 4% Formalin oder in Methanol-Eisessig fixiert und tropfenweise auf einen Objektträger aufgebracht. Für FISH wurden die Objektträger luftgetrocknet, in einer Ethanolserie dehydriert und über Nacht bei 42°C getrocknet. Anschließend wurden die Zellen bzw. Zellkerne der Positivfraktion durch FISH auf das Vorhandensein von X- und Y-Chromosomen-Signalen untersucht. Zum Zeitpunkt der mikroskopischen FISH-Untersuchung war das Geschlecht der Feten nicht bekannt.

Fetale Zellen aus dem Zervixschleim schwangerer Frauen

Die Arbeiten wurden 1994 und 1995 am Galton Laboratory, University College London, gemeinsam mit Dr. Jon Sherlock, Dr. A. Halder und Prof. M. Adinolfi im Department of Obstetrics and Gynaecology (Direktor: Prof. C.H. Rodeck) durchgeführt.

Populationen

Zervixschleim wurde von verschiedenen Gruppen von Patientinnen gewonnen. Alle in die Untersuchungen eingeschlossenen Schwangeren wurden vor der Entnahme über die wissenschaftliche Natur der Untersuchung aufgeklärt und hatten ihre Zustimmung zur Probenentnahme einschließlich Blutentnahme gegeben. Die Ethikkommission des University College Hospitals London hatte diesem Vorgehen zugestimmt.

Es wurden drei Kollektive untersucht: Für die Nachverfolgung zur Untersuchung der Sicherheit der Probenentnahmetechnik wurden 130 Schwangere, die sich in der Fetal Medicine Unit des UCH zur Durchführung einer transzervikalen Chorionzottenbiopsie vorstellten, rekrutiert. Der Schwangerschaftsausgang dieser Gruppe wurde entweder durch die Rückmeldungen an die Fetal Medicine Unit oder, wo diese nicht erfolgt waren, durch Aussendung eines Fragebogens an die überweisenden Ärzte erhoben. Analog wurden Daten von weiteren 145 Schwangeren, die in demselben Zeitraum und durch dieselben Untersucher ebenfalls eine Chorionzottenbiopsie (ohne vorherige Entnahme von Zervixschleim) erhalten hatten, als Vergleichskollektiv mit erhoben.

Das zweite und dritte Kollektiv bestand aus Frauen, die aus nicht-medizinischer Indikation einen Abbruch in den ersten 14 Wochen der Schwangerschaft wünschten und bei denen Zervixschleim unmittelbar vor Durchführung einer Saugkürettage gewonnen wurde. Diese Frauen hatten der Untersuchung nach schriftlicher Aufklärung zugestimmt. Aus diesem Kollektiv wurden Frauen mit auffälligem Schwangerschaftsverlauf (z.B. Blutungen) oder solche, die zur Zervixreifung Prostaglandine erhalten hatten, ausgeschlossen.

Bei dem zweiten Kollektiv von 25 Schwangeren bis 14+0 SSW wurde je zunächst Zervixschleim von der Ektozervix durch "Aspiration" in einen sterilen Blasenkatheter gewonnen. Dann wurde eine zweite Probe aus dem oberen Zervikalkanal durch Spülung mit 3-5ml sterile isotone Kochsalzlösung gewonnen ("Lavage"). Die Proben wurden durch FISH mit Sonden für die Chromosomen X und Y (XY-FISH) auf das Vorhandensein diploider männlicher Zellen untersucht. Als Kontrollen wurde in jedem FISH-Ansatz je ein Objektträger mit weiblichen und männlichen Lymphozyten mitgeführt.

Vom dritten Kollektiv mit 21 Schwangeren bis 14+0 SSW wurden Proben durch Schleimaspiration von der Ektozervix sowie nach chirurgischem Abbruch von der Plazenta zur Bestimmung des Geschlechts gewonnen. Aus dem Zervixschleim wurden durch Mikromanipulation einzelne Zellen oder Zellklumpen oder Gewebefragmente isoliert und anschließend durch XY-FISH oder PCR mit Mikrosatelliten bzw. am Amelogenin-Locus untersucht.

Methoden zur Gewinnung fetaler Zellen aus dem Zervikalkanal

Der Zervixschleim wurde immer unter kontinuierlicher abdominaler Ultraschallkontrolle gewonnen, um so den korrekten Ort der Probenentnahme zu gewährleisten. Dabei wurde unmittelbar vor Probenentnahme die Intaktheit der Schwangerschaft gesichert, so daß nicht durch einen drohenden oder in Gang befindlichen Abort oder durch auffällige Pathologie eine Veränderung der Zellzahl zu erwarten waren.

Die Patientinnen wurden gynäkologisch gelagert, mit sterilen Spektula wurde die Zervix uteri eingestellt, und vor jeglicher anderen Manipulation wurde Zervixschleim gewonnen. Dabei kamen unterschiedliche Sammlungsmethoden zur Anwendung (siehe Rodeck, Tutschek et al., 1995). In den Fällen der Untersuchung auf einzelne fetale Zellen oder Zellgruppen und für die Gruppe der Patientinnen vor Chorionzottenbiopsie wurde Zervixschleim in einen dünnen, flexiblen Blasenkatheter, der an eine 10ml-Spritze angesetzt wurde, direkt und ausschließlich vom äußeren Muttermund gewonnen ("Aspiration"). Die Zellsuspension wurden in Medium gegeben und bis zur weiteren Verarbeitung am selben Tag bei 4°C aufbewahrt.

Materialverarbeitung, Mikromanipulation und Vorbereitung für PCR und FISH

Alle Verarbeitungsschritte erfolgten unter einem Invert-Mikroskop (Olympus) in einer Arbeitsbank mit laminarem Luftfluß. Die Zellsuspension wurde in PBS gewaschen, bei 180g über 5min zentrifugiert und erneut in 2 bis 5ml PBS aufgelöst. Bei Proben mit besonders zähem Schleim erfolgten eine dreiminütige Inkubation mit 500µl Acetylcystein-Suspension (1:10 verdünnt) bei Raumtemperatur und zwei weitere Waschschrte.

Das aus dem Zervikalkanal gewonnene Material wurde auf unterschiedliche Weisen untersucht. Entweder wurden aus Aliquots eine Aufbereitung für die PCR (DNS-Extraktion) oder FISH (Zellvereinzelnung, Fixierung) vorgenommen. Für die Untersuchung einzelner fetaler Zellen oder Zellgruppen wurde das Material zunächst unter einem Invertmikroskop in einer laminaren Luftfluß-Haube durchgemustert, potentiell fetales Material identifiziert und durch Mikromanipulation und unter mehreren Waschschrten in einzelne PCR-

Reaktionsgefäße gebracht. Als Zielzellen der mikroskopischen Isolation durch Mikro-manipulation am Nativmaterial wurden solche angesehen, die mikroskopisch morphologisch nicht eindeutig mütterlich erschienen (d.h. z.B. Ausschluß maternaler Plattenepithelzellen), also fetalen Ursprung sein könnten.

Die Zielzellen wurden mit einer Mikropipette mit jeweils neuen sterilen Einmalplastikspitzen in 2µl PBS aufgenommen und in mindestens zwei weiteren Tropfen frischer Lösung gewaschen. Es wurde mikroskopisch kontrolliert, daß nur die gewünschten Zielzellen weitergetragen wurden. Diese wurde schließlich in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben.

Für die Untersuchung mit PCR wurden aus jeder Zervixschleimprobe ebenfalls mikroskopisch maternal erscheinende Zellklumpen, in der Regel Plattenepithelzellen, isoliert. Diese dienten zusammen mit dem mütterlichen Blut als Referenzmaterial (mütterlicher molekularer Genotyp). Als Kontrolle des fetalen Genotyps wurde bei allen Patientinnen mit Schwangerschaftsabbruch Plazenta eingesetzt. Dazu wurde ein kleines Gewebestück der Plazenta zunächst unter dem Mikroskop von mütterlicher Kontamination befreit. Durch Bewegen in einer Pufferlösung wurden Chorionzotten abgespült und einzeln mit einer Pipette aufgenommen. Diese gesäuberten Zotten dienten als fetales Referenzmaterial.

Den einzelnen Zellen oder Zellklumpen in dem PCR-Reaktionsgefäß wurden jeweils 1µl 17µmol/l SDS, 2µl Proteinase K (125mg/ml für einzelne Zellen, 400mg/ml für Zellklumpen) und einige Tropfen Paraffinöl zugesetzt und eine Inkubation für 30-60min bei 37°C, gefolgt von einer Denaturierung bei 99°C über 15min, durchgeführt. Danach wurde die Lösung direkt in die PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert. Für alle Experimente wurden zwei Negativkontrollen (je 2µl zellfreies Medium und ddH₂O) mitgeführt. Bei Auftreten von spezifischen Signalen in den Negativkontrollen wurde der gesamte Ansatz verworfen.

Für die FISH-Untersuchung wurden die isolierten Zellen oder Zellklumpen in dem ursprünglichen PCR-Reaktionsgefäß dreimal in Essigsäure-Ethanol fixiert und unter mikroskopischer Kontrolle auf einen Objektträger aufgebracht.

PCR mit Mikrosatelliten-Markern und Loci auf den Geschlechtschromosomen

Die molekularen Untersuchungen erfolgte mittels Mikrosatellitenmarker und am Amelogenin-Locus. Ein Primer für jeden Locus war mit FITC endmarkiert. Es wurden polymorphe Tetranukleotid-Repeatsequenzen ("short tandem repeats", STR) für die Chromosom 21 und 18 oder das Amelogenin auf dem X-Chromosom bzw. Amelogenin-Pseudogen auf dem Y-Chromosom verwendet. STRs sind hypervariable, nicht für Gene kodierende Regionen des

Genoms, deren repetitive Einheiten eine Länge von wenigen Basenpaaren haben. Der polymorphe Charakter resultiert aus den zwischen den verschiedenen Allelen variablen Anzahlen der wiederholten Sequenzen. Je mehr Allele eines STR existieren und je gleichmäßiger diese in der untersuchten Population verteilt sind, desto höher ist sein Heterzygotitäts-Index. Je höher dieser Index, desto wahrscheinlicher ist es für den Zweck dieser Untersuchung, daß ein paternal geerbtes Allel von den mütterlichen Allelen verschieden ist und daher zur Identifikation fetaler Zellen verwendet werden kann. Trägt das Kind ein von der Mutter an diesem Locus unterscheidbares Allel, wird das Probenpaar Mutter-Kind dafür als "informativ" bezeichnet.

Einzelzell-PCR

An einzelnen Mundschleimhautzellen von Probanden, die aus Abstrichen durch Mikromanipulation vereinzelt und dem beschriebenen Protokoll der PCR unterworfen wurden, sowie der Blut-DNS der Probanden wurden die Reaktionsbedingungen für eine PCR an wenigen oder einzelnen Zellen etabliert.

Anzüchtung fetaler Zellen aus dem mütterlichen Blut

Die Arbeiten wurden 1998 und 1999 gemeinsam mit cand. med. J. Reinhard an der Universitätsklinik Düsseldorf in der Frauenklinik (Direktor: Prof. H.G. Bender), mit Frau Priv.-Doz. Dr. G. Kögler im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (Direktor: Prof. P. Wernet) und im Molekulargenetischen Labor der Frauenklinik (Leiter: Dr. rer. nat. D. Niederacher) durchgeführt.

Patientenkollektiv

Aus der Ultraschall-Sprechstunde wurden Patientinnen rekrutiert, die sich aufgrund ihres Alters, wegen bekannter Risiken oder aus mütterlicher Sorge zur fetalen Chromosomenuntersuchung per Amniozentese vorstellten. Nach der üblichen ausführlichen Aufklärung zur Amniozentese wurden die Schwangeren vor jeglichen weiteren Maßnahmen (Ultraschall, Amniozentese) über die Studie informiert. Die Beratung und Einverständnisnahme erfolgte analog zu den im University College Hospital durchgeführten Untersuchungen.

In Kenntnis des Charakters der Studie, daß ihnen kein Ergebnis mitgeteilt werden könnte, daß ein Aliquot des Fruchtwassers zu Studienzwecken verwendet und daß vor der Amniozentese eine Blutentnahme durchgeführt würde, willigten 14 Patientinnen zur Teilnahme an der Studie ein. In einem Fall entschied sich die Patientin nach genetischer Beratung und Aufklärung über die Amniozentese gegen eine Fruchtwasserpunktion, wollte jedoch an der Studie teilnehmen. In diesem Fall wurden maternales und paternales Blut, in allen anderen 13 Fällen nur maternales Blut gewonnen. Das Blut wurde durch periphere Venenpunktion in Zitratröhrchen abgenommen und binnen 24 Stunden verarbeitet.

Reinigung und Anzüchtung der mononukleären Zellen

Zwischen fünf und neun Milliliter peripheres Venenblut wurden in Zitratröhrchen entnommen und binnen 24 Stunden weiter verarbeitet. Von allen Blutproben wurde ein Blutbild (Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten, Leukozyten) mittels eines Cell Dyn 3500 (Abott Diagnosis GmbH, Wiesbaden) bestimmt. Aus einem kleinen Aliquot wurden von jeder Blutprobe durch ein Extraktions-Kit (QIAamp Blood Midi Kit, Qiagen) nach Angaben des Hersteller DNS gewonnen.

Das periphere mütterliche Venenblut wurde mit demselben Volumen PBS verdünnt und mit Ficoll unterlagert. Durch Zentrifugation bei 1800g über 20min bei Raumtemperatur wurden die mononukleären Zellen ("mononuclear cells", MNC) an der Grenze zwischen Überstand

und Ficoll angereichert und anschließend vorsichtig aufgenommen. Die MNC wurde zweimal jeweils mit dem dreifachen Volumen gewaschen und bei 1800g für 10min bei 10°C pelletiert. Danach wurden die Zellen in einem kleinen Volumen PBS resuspendiert und erneut gezählt. Zur Anzucht der mononukleären Zellen wurden zwei unterschiedliche, mit Wachstumsfaktoren angereicherte halb feste Nährmedien verwendet.

Nicht direkt weiterverarbeitete Aliquots wurden in 0,5ml 50% FCS und 0,5ml 22% DMSO suspendiert und bei -20°C eingefroren. Zum Auftauen wurden die Zellen in einem Wasserbad angewärmt und dann unmittelbar mit 1ml 50% FCS aufgefüllt, pelletiert (1800g für 10 min bei 10°C) und mit PBS gewaschen. Die Zahl der lebenden Zellen wurde durch Zugabe von Trypanblau und mikroskopische Auszählung in einer Neubauer-Kammer ermittelt.

Pro Ansatz wurden je 5×10^5 kernhaltiger Zellen in beide Medien in Kulturplatten ausgebracht. Für alle Patientinnen wurden mehrfach parallele Ansätze angelegt. Die Kulturen wurden in einer angefeuchteten 5%-CO₂-Kammer 14 Tage inkubiert. Danach wurden die Kolonien mikroskopisch gezählt.

Auswertung und Verarbeitung der Kolonien

Kolonien mit mindestens 50 Zellen wurden nach etablierten Kriterien als Kolonien mit Granulozyten-Makrophagen- (CFU-GM), frühem erythroiden (BFU-E) oder multipotentem (CFU-GEMM) Progenitorzellen-Charakter mikroskopisch identifiziert und gezählt. Anschließend wurden die Kolonien einzeln in einem Volumen von je 2µl mit einer Pipette aufgenommen. Für die ersten vier Patientinnen wurden zu jeder mikromanipulierten Kolonie 1µl 17µmol/l Natriumdodecylsulfat (SDS), 2µl Proteinase K (400 µg/ml) und einige Tropfen Paraffinöl hinzugegeben, bei 37°C über 30min inkubiert und bei 95°C über 10min denaturiert. Für die Proben der nächsten 10 Patientinnen wurden je Kolonie nur 8µl steriles ddH₂O zugegeben und entweder die PCR direkt begonnen oder die Proben bei minus 20°C eingefroren.

Zur Identifikation der fetalen Kolonien wurden zunächst die fetalen Muster der verwendeten polymorphen DNS-Marker entweder aus DNS aus dem Fruchtwasser (Pat. zwei bis 14) oder aus den Allelen der mütterlichen und väterlichen Blut-DNS (Pat. 1) bestimmt.

DNS-Extraktion aus Fruchtwasser

Das Fruchtwasser wurde am Tag der Entnahme pelletiert und zweimal in PBS gewaschen. Durch Inkubation des letzten Pellets mit 100µl Proteinase K (1mg/ml) mit SDS (5µmol/l) bei

55°C über 2 Std. und Denaturierung bei 99°C über 10min wurde die DNS aus den Zellen freigesetzt (Rebello, 1991). 5µl dieser Lösung wurden in die PCR eingesetzt.

Fluoreszente Multiplex-PCR

50ng Referenz-DNS aus mütterlichem Blut und die Negativkontrollen wurden in gleicher Weise wie die Untersuchungsproben der PCR unterzogen. Durch Fluoreszenzmarkierung eines Primers pro Locus konnten die amplifizierten Sequenzen im Laser-Sequenzier detektiert und die Produktmengen orientierend quantifiziert werden. Bei Kontaminationsverdacht, d.h. bei Auftreten spezifischer Signale in einer Negativkontrolle wurde der Ansatz verworfen. Es wurden je Reaktion zwei Primerpaare, für wenige Proben auch drei Primerpaare für unterschiedliche Loci eingesetzt, die zuvor für die gemeinsame Amplifikation optimiert worden waren.

ERGEBNISSE

PCR zum Nachweis fetaler Marker im peripheren mütterlichen Blut

Fetale DNS im peripheren mütterlichen Blut im Verlauf normaler Schwangerschaften

Die sogenannte geschachtelte Amplifikation ("nested PCR") mit der sequentiellen Anwendung von zwei Primerpaaren, Y1.5/Y1.6 und Y1.7/Y1.8, erlaubt bei strikter Beachtung von Maßnahmen zur Kontaminationsvermeidung eine ausreichend hohe Anzahl an Zyklen zum Erreichen der notwendigen Sensitivität bei Erhalt der Spezifität. In Vorversuchen war die Sensitivität der geschachtelten PCR bestimmt worden. Dazu wurden definierte geringe Mengen männlicher DNS mit weiblicher DNS gemischt und amplifiziert. Bis minimal 10pg männlicher DNS pro Reaktion können auch unter Zugabe einer wesentlich größeren Menge weiblicher DNS (2µg) mit dieser Methode noch spezifisch nachgewiesen werden (Thomas 1994).

Mit dieser Methode wurden die Serumproben von 30 Schwangeren, die durch Teilnahme an einem Infertilitäts-Programm schwanger geworden waren (in-vitro-Fertilisierung oder intrauterine Insemination), untersucht. Von den 30 Patientinnen waren 13 zum ersten Mal schwanger. Weitere fünf hatten bereits einen Sohn und zwei eine Tochter zur Welt gebracht. Die anderen 10 Frauen hatten vorher Schwangerschaften gehabt, die im ersten Trimester ohne Möglichkeit zur Bestimmung des embryonalen Geschlechts geendet waren (Abort, Extrauterinschwangerschaft oder Abbruch).

Neun der 30 Schwangerschaften waren Mehrlings-Schwangerschaften. Davon reduzierten sich drei spontan auf Einlinge. In einer Einlingsschwangerschaft wurde nach 17 SSW ein intrauteriner Fruchttod festgestellt. Sonst verliefen alle Schwangerschaften ohne Komplikationen.

17 Frauen brachten lebende Söhne zur Welt, davon sechs als Teil von Zwillingsanlagen (n=4) oder Drillingsanlagen (n=2). In je einer Zwillings- und Drillingschwangerschaft reduzierten sich die Mehrlingsanlagen durch intrauterine Fruchttode in der Frühschwangerschaft bei weiterlaufender Schwangerschaft spontan auf Einlinge, und in beiden Fällen wurden Jungen geboren. 11 Frauen brachten "ausschließlich" Mädchen zur Welt, d.h. auch im Fall von Mehrlingen keine Söhne.

In allen Schwangerschaften, die zur Geburt eines männlichen Kindes führten, wurde per PCR Y-Chromosom-spezifisches Material im peripheren mütterlichen Blut nachgewiesen. In allen Schwangerschaften, die ausschließlich weibliche Kinder hervorbrachten, war in keiner peripheren Venenblutprobe aus der Schwangerschaft Y-Chromosom-spezifisches Material mit der PCR nachweisbar.

Das früheste Auftreten von Y-Chromosom-spezifischer DNS im mütterlichen Blut konnte vier Wochen und fünf Tagen (bei zwei Patientinnen) nach dem ersten Tag der letzten Periodenblutung (bei IVF analog) nachgewiesen werden. Nach spätestens sieben Wochen und einem Tag war auch bei der letzten Schwangeren, die später einen Sohn zu Welt brachte und in deren Blutproben aber zuvor noch keine fetalen Marker gefunden worden waren, der Nachweis fetaler DNS aus dem mütterlichen Blut positiv. Im Mittel konnte bei Schwangeren, die einen männlichen Feten trugen, aus dem peripheren mütterlichen Blut 6 Wochen und 4 Tagen nach der letzten Periodenblutung mittels PCR fetale DNS nachgewiesen werden.

Der Nachweis fetalen Y-Chromosom-Materials per PCR war während jeder Schwangerschaft positiv, die zu einem männlichen Kind führte, und zwar bis vier Wochen nach der Entbindung (siehe Abb. 4). Aus keiner der 8 Wochen nach Entbindung entnommenen Proben konnte Y-Material nachgewiesen werden. Tabelle 5 zeigt, sortiert nach Gestationsalter, anhand der Untersuchungsergebnisse aller Proben von Schwangeren, die einen Sohn zur Welt brachten, wann im Verlauf der Schwangerschaft fetale Zellen im mütterlichen Blut nachweisbar wurden.

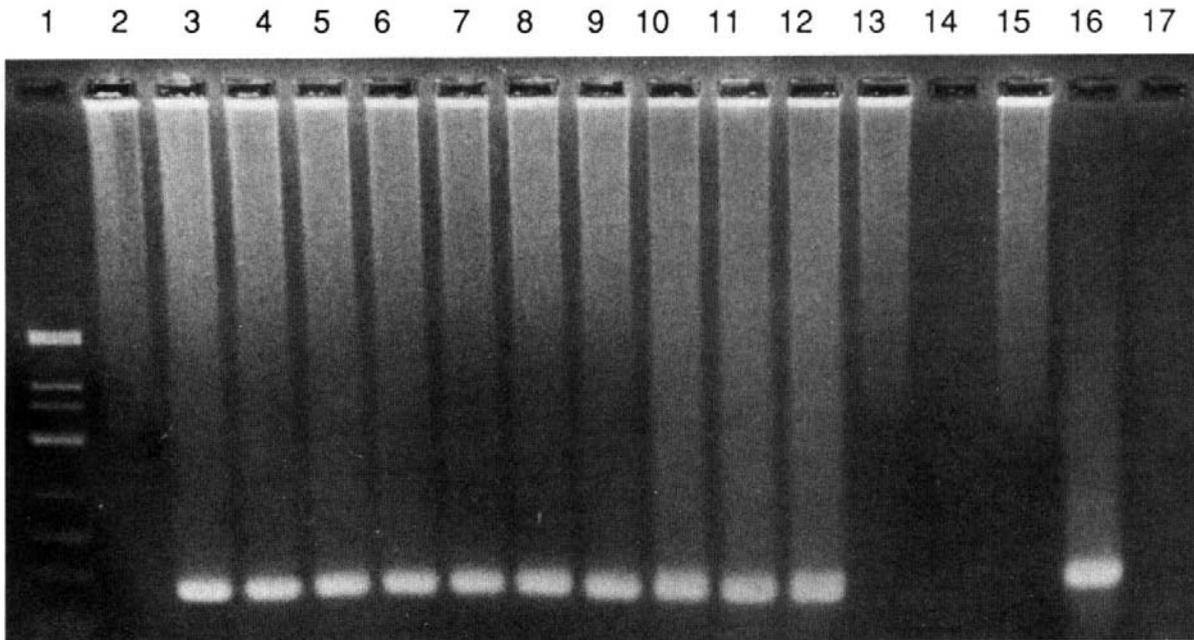


Abb. 4 Nachweis fetaler DNS vom Y-Chromosom im peripheren maternalen Blut im Verlauf einer Schwangerschaft mit männlichen Feten. Die weiße Bande am unteren Rand des Gels (Bahnen 3 bis 12 und 16) entspricht dem spezifischen PCR-Produkt von 198 Basenpaaren Länge. Bahn 1: Größenstandards; Bahn 2-13: 3 Wochen plus 3 Tage/ 6+3/ 10+3/ 11+3/ 15+3/ 19+3/ 23/ 27/ 32/ 36 SSW; 12 und 13: 4 und 8 Wochen post partum; 14: leer; 15: PCR mit 2 μ g weiblicher DNS (Negativkontrolle); 16: PCR mit 2 μ g weiblicher und 10pg männlicher DNS (Positivkontrolle); 17: leer

Pat.	SSW	3+3	4+1	4+3	4+5	5+0	5+3	5+4	5+6	6+0	7	8	12	16	20	24	28	32	36	40	42	1M.pp	2M.pp
1 *		-	-								+		+	+	+	+	+	+	+	+		+	-
2		-		-			-				+		+		-							(-)	(-)
3 &		-								-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	-
4 #		-		-							+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5		-		-							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	-
6 &		-					-				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	-
7 * &		-									+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	-
8 * &		-									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	-
9		-								+		+	+	+	+	+	+	+	+			+	-
10		-								+		+	+	+	+	+	+	+	+			+	-
11		-							+			+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	-
12 §		-						+				+	+	+	+	+	+	+	+			+	-
13 &		-						+				+	+	+	+	+	+	+	+			+	-
14		-					+					+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	-
15		-					+					+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	-
16 &		-				+						+	+	+	+	+	+	+				+	-
17 *		-			+							+	+	+	+	+	+	+	+			+	-
18		-			+					+		+	+	+	+	+	+	+	+			+	-
	SSW	3+3	4+1	4+3	4+5	5+0	5+3	5+4	5+6	6+0	7	8	12	16	20	24	28	32	36	40	42	1M.pp	2M.pp

Tab. 4 PCR-Amplifikation männlicher DNS (zeitlicher Verlauf) aus dem peripheren mütterlichen Blut von 18 Schwangeren, die nach intrauteriner Insemination* oder in-vitro-Fertilisation ein männliches Kind zur Welt brachten (Thomas, Tutschek et al. 1995 und Tutschek et al. 1995). Pat. 2: Intrauteriner Fruchttod mit 12 SSW. SSW: postmenstruelles Gestationsalter in abgeschlossenen Wochen (plus Tage). 1/2 M.pp: ein/zwei Monate post partum. *=Schwangerschaften nach intrauteriner Insemination; §=intrauteriner Fruchttod mit 12 SSW (die letzten beiden Proben wurden 4 und 8 Wochen nach Abortinduktion und Nachkürettage entnommen); #=mit 12 SSW wurde nur 1ml peripheres Blut gewonnen und verarbeitet; &=Mehrlings-Schwangerschaften (Fall 3: Zwillinge männlich/weiblich; 6: in Frühschwangerschaft Zwillingsanlage, intrauteriner Fruchttod eines Embryos mit 12 SSW; 7: Zwillinge männlich/weiblich; 8: Drillinge, intrauteriner Fruchttod zweier Embryos mit 8 SSW; 13: Zwillinge, beide Feten männlich; 16: Drillinge, einer männlich/zwei weiblich)

Anreicherung von Trophoblastzellen mittels Antikörpersortierung

EGF-R-Antikörper-Bindung an Ersttrimester-Plazenta

Zur Ermittlung eines für Plazentagewebe spezifischen und für eine magnetische oder Durchflußzytometrie-Sortierung (FACS) geeigneten Antikörpers wurden drei Antikörper, die gegen die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors gerichtet sind, mittels eines Immunfärbe-Kits an Gefrierschnitten von Plazentagewebe untersucht.

Nur EGF-R-1 und mab425 zeigten reproduzierbare und spezifische Bindung an Zyto- und Synzytiotrophoblast-Zellen von Plazenta-Gefrierschnitten. Der EGF-R-Antikörper 29-1, der kommerziell erhältlich ist, wurde nach Katalogangaben des Vertreibers (Sigma) ausgewählt, zeigte aber nur bei drei Plazenten eine Trophoblastfärbung. 29-1 wurde daher bei den weiteren Untersuchungen nicht mehr verwendet.

Herstellung und Untersuchung einer Zell-Suspension aus Ersttrimesterplazenten

In einem Vorversuch wurden zunächst nach dem Protokoll nach Kliman (1986) Synzytiotrophoblast- und Zytotrophoblastzellen enzymatisch vom mesenchymalen Zottenkern getrennt und Einzelzellsuspensionen einkerniger Zytotrophoblastzellen hergestellt. Die mikroskopische Untersuchung der Zytospinpräparate zeigte nur eine geringe Ausbeute an Zytotrophoblastzellen. Außerdem konnte nach den enzymatischen Vorgängen zur Auflösung des Zellverbands nicht davon ausgegangen werden, daß die Epitope für eine Antikörper-gestützte Sortierung noch im nativen Zustand waren.

Daher wurde eine rein mechanische Aufbereitung entwickelt, gefolgt von einer Gradientenreinigung mit Ficoll, die eine ausreichende Zahl vitaler Zellen in Suspension erbrachte. Dabei mußte in Kauf genommen werden, daß auch nicht in der mütterlichen Zirkulation zu erwartende fetale Zelltypen wie z.B. die mesenchymalen Zellen des Zottenstromas sowie Zelltrümmer und kleine Gewebefragmente enthalten waren.

Die mikroskopische Untersuchung der Ausstriche bzw. der Zytospinpräparate zeigte, daß die mechanische Vereinzelung von Ersttrimesterplazenten eine Mischung aus Zellfragmenten, intakten einzelnen Zellen (Mesenchym der Zottenkerne und Trophoblastzellen der Oberfläche) sowie Synzytien, die dem Synzytiotrophoblastzellen entsprechen, enthielt. Daneben fanden sich in wechselndem Maß trotz der Gaze-Filterung stets auch einzelne Chorionzotten.

Nach der Ficoll-Zentrifugation der mechanisch hergestellten Trophoblastzellsuspension fanden sich vier Banden bzw. Fraktionen in dem 50ml-Röhrchen, die mikroskopisch wie folgt beurteilt wurden:

- (1) ein makroskopisch klarer Überstand, mikroskopisch mit Zelltrümmern und wenigen einzelnen Zellen,
- (2) eine Bande auf dem Ficoll mit einzelnen Zellen, reichlich mehrkernigen Synzytiotrophoblastzellen und wenigen kleinen Chorionzottenfragmenten,
- (3) eine breite, zellarme Zwischenschicht im Ficoll und
- (4) am Boden ein Pellet aus Zelltrümmern, ganzen Chorionzotten und Gewebefragmenten.

Mikroskopisch intakte Zellen aus der Fraktion 2 zeigten zu 45% eine Anfärbbarkeit mit EGF-R-Antikörpern. Trophoblast-Einzelzell-Suspensionen können mit der beschriebenen mechanischen Dissoziation erzeugt werden und durch Ficoll gereinigt werden. Sollten also aus mütterlichem Blut Trophoblastzellen gesucht werden, wäre ein einfacher Ficollgradient ein geeignetes Mittel für einen ersten physikalischen Reinigungsschritt. Für die weitere Untersuchung von Plazentazellen wurden in den Experimenten aus Ersttrimesterplazenta-Suspensionen daher jeweils die Zellen aus dieser Schicht (2) der Ficoll-gereinigten Trophoblast-Zellsuspension verwendet.

Antikörperbindung in der Durchflußzytometrie (FACS)

Die Leukozyten, die aus der Grenzschicht des Ficollgradienten nach Zentrifugation von peripherem Blut gewonnen werden, enthalten mehrheitlich Lymphozyten, daneben Monozyten und einige Granulozyten. Die meisten Granulozyten finden sich nach Ficoll-Reinigung auf oder in dem roten Pellet am Boden des Röhrchens.

Die Anfärbung der Leukozytenfraktion des Ficollgradienten mit einem EGF-R-Antikörper (hier: mab425) zeigt, daß nur wenige Leukozyten angefärbt werden (Beispiele in Abb. 5).

Durch Eingrenzung der FACS-Analyse auf die Population der Lymphozyten wurde deren Färbeintensität mit nicht-spezifischem Primärantikörper, mit Leukozyten-spezifischem und mit EGF-R-Antikörper untersucht (siehe Abb. 6). Mit einem unspezifischen Primärantikörper (Maus-IgG), gefolgt von einem Detektionsantikörper (anti-Maus-IgG-FITC), werden Lymphozyten nicht gefärbt (Abb. 6a), ebenso nicht bei Verwendung der EGF-R-Antikörpers als Primärantikörper (Abb. 6c). Die Positivkontrolle (direkt Fluoreszein-markierter Lymphozytenantikörper anti-CD3; Abb. 6b) zeigt das erwartete Färbeverhalten der Lymphozyten.

Bei Einsetzen größerer Zellzahlen und Eingrenzung der FACS-Analyse auf die Population der Monozyten stellte sich heraus, daß Monozyten unspezifisch EGF-R-Ak binden (Abb. 7). Diese Bindung könnte durch eine Anlagerung der Antikörper an den Fc-Rezeptor der Monozyten erklärt werden. Um diese Bindung zu unterdrücken, wurden unspezifische menschliche Immunglobuline (Sandoglobulin®, Sandoz) in verschiedenen Konzentrationen beigesetzt und die minimale notwendige Konzentration zur Unterdrückung der Bindung ermittelt (Abb. 8). Diese Konzentration an unspezifischem Immunglobulin wurde in allen weiteren Experimenten, in denen Blutzellen mit EGF-R-Antikörpern mit angefärbt wurden, mit eingesetzt.

Die mechanisch hergestellten Trophoblastzell-Suspensionen wurden mit unspezifischen (Maus-IgG) und mit EGF-R-Antikörpern gefärbt, die mit anti-Maus-IgG-FITC detektiert wurden. Abbildungen 10 zeigt eine FACS-Untersuchung von Trophoblast-Zellsuspensionen, die mit einem der EGF-R-Antikörper als Primärantikörper gefärbt wurden. Bei Anwendung eines nicht-spezifischen Primärantikörpers fehlte eine klar gefärbte Population, es ließ sich keine deutliche spezifische Färbung nachweisen. Bei der Anwendung von EGF-R-Antikörpern findet sich eine deutliche Population unter den Trophoblastzellen, die EGF-R-Antikörper bindet (Abb. 10).

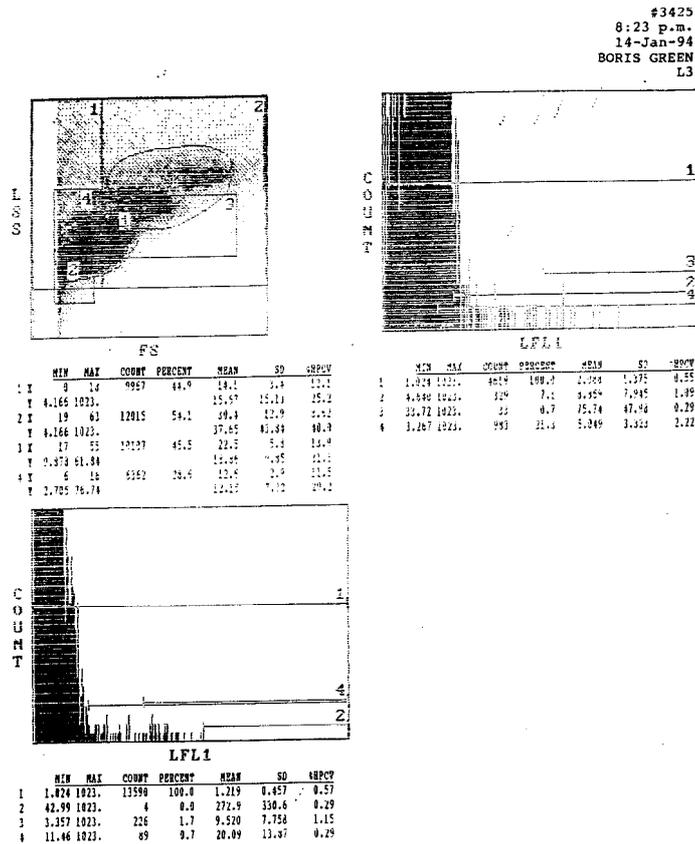
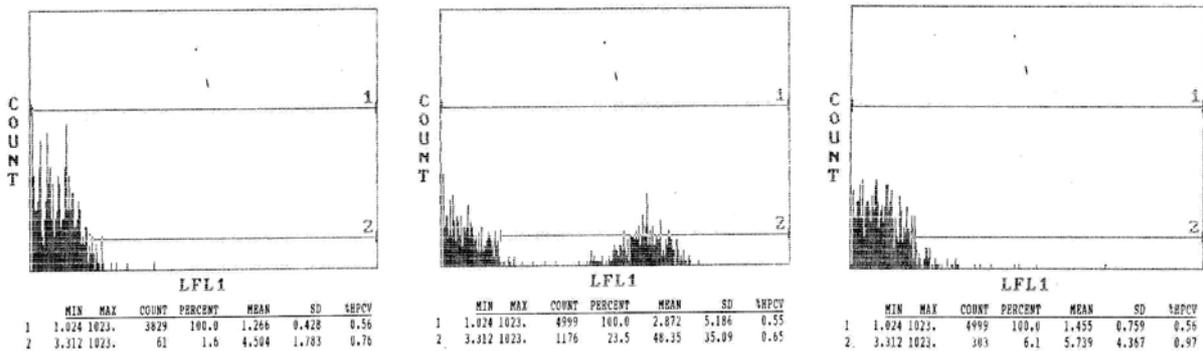


Abb. 5 Ficoll-gereinigte Leukozyten nach Anfärbung mit EGF-R-Ak mab425. Die Sub-Populationen werden sichtbar (Panel links oben, von links nach rechts der Größe und Granularität nach): Lymphozyten (zu Population 2, Auswertung Panel rechts oben) und Monozyten und Granulozyten (zu Population 1 zusammengefasst, Auswertung Panel links unten). Nur wenige der Lymphozyten zeigen eine Anfärbung mit dem verwendeten Primär-Antikörper gegen EGF-R (kein signifikanter zweiter Zellgipfel bei höherer Intensität im Panel rechts oben).



a. Lymphozyten, unspezifischer Primär-Ak.

b. Lymphozyten, Primär-Ak. anti-CD3

c. Lymphozyten, Primär-Ak. anti-EGF-R

Abb. 6 Lymphozyten-Färbung mit einem unspezifischen Primärantikörper (a., Maus-IgG), mit einem Lymphozytenmarker (b., anti-CD3) und mit einem EGF-R-Antikörper (c., EGF-R-1)

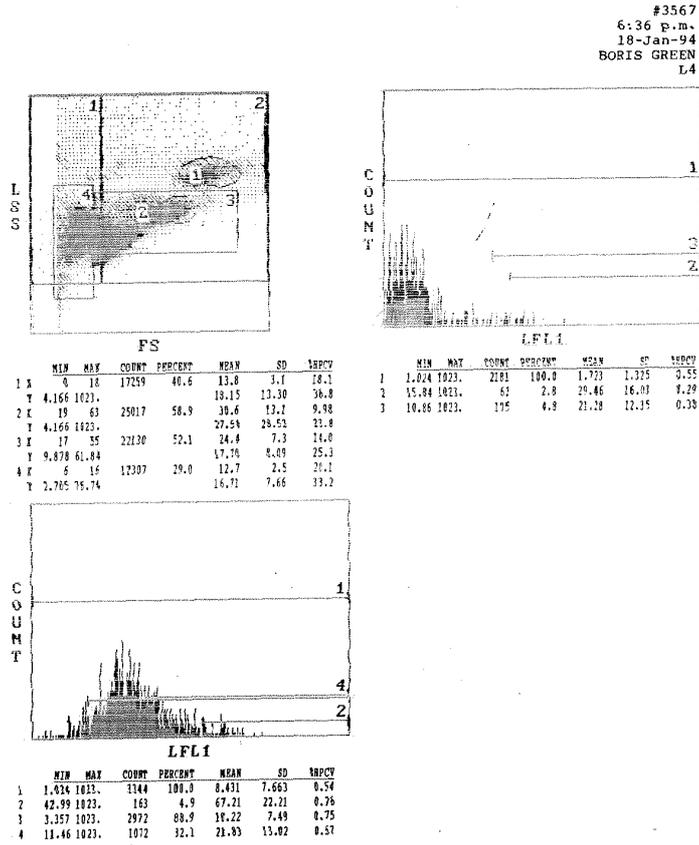
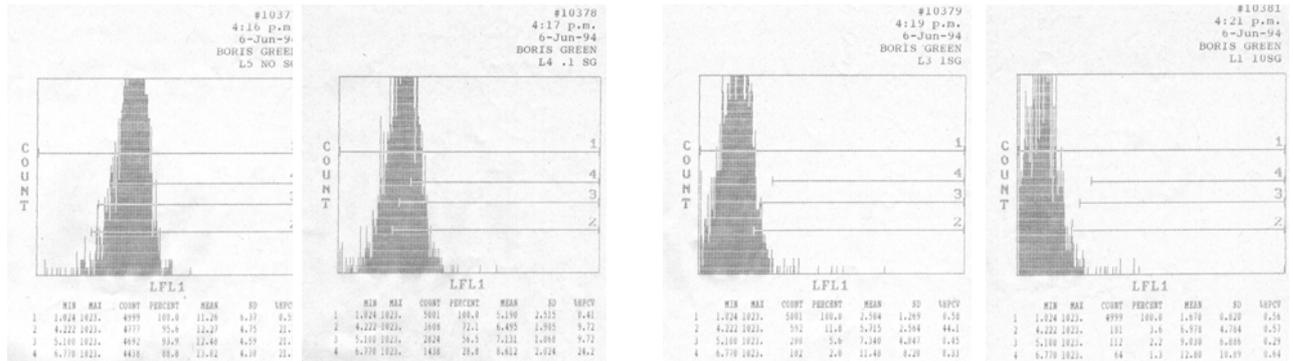


Abb. 7 Unspezifische Bindung von EGF-R-Antikörpern an Monozyten. Monozyten (Population 2 aus dem linken oberen Panel) zeigt eine EGF-R-Bindung (linkes unteres Panel). Die mituntersuchten Granulozyten (Population 1, Panel rechts oben) zeigen keine Bindung von EGF-R-Ak.



a. ohne Sandogloblin b. 0,1mg/ml Sandogloblin c. 1mg/ml Sandogloblin d. 10mg/ml Sandogloblin

Abb. 8 Unterdrückung unspezifischer anti-EGF-R-Bindung an Monozyten. Die unspezifische Anlagerung von EGF-R-Ak (hier: mab425) an Monozyten kann durch Zugabe von unspezifischem Immunglobulin (Sandogloblin®) unterdrückt werden.

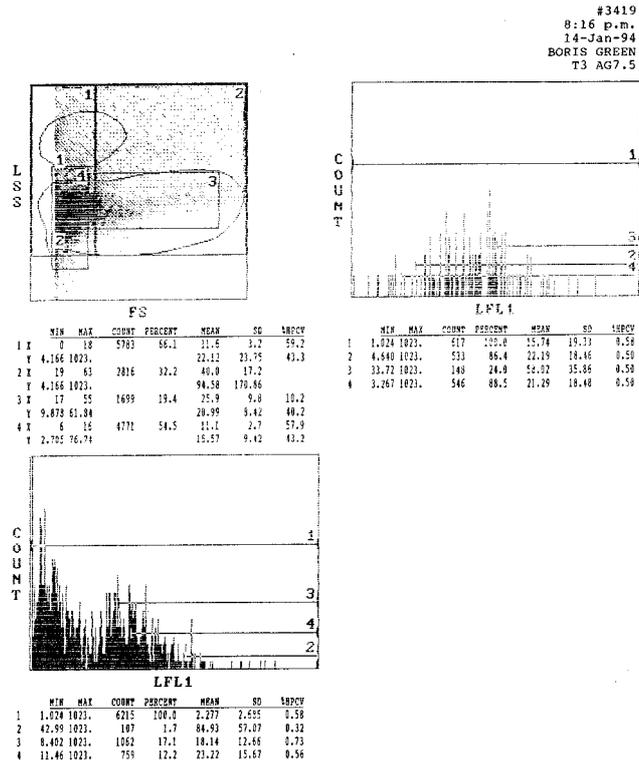


Abb. 10 Trophoblastzell-Suspension, EGF-R-Antikörper-vermittelte Fluoreszenz (Primärantikörper: mab425). Linkes unteres Panel (Population 2) Gate 3: 17,1% der Population gefärbt (mittlere Intensität 18,1%)

Modell für die magnetische Zellsortierung (MACS) von Trophoblastzellen aus Blut

Zunächst wurden Trophoblast-Einzelzellsuspensionen mit Ficoll-gereinigten Blutzellen gemischt und mit dem EGF-R-Antikörper mab425 im MACS zellsortiert. Von den Fraktionen (1. Ausgangsmischung vor MACS; 2. gepoolte Wasch- und Negativfraktion; 3. Positivfraktion) wurden Zytospinpräparate angefertigt, gefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

Bei der Verwendung der Trophoblast-Einzelzellsuspensionen war die Zellausbeute, gemessen an der Summe aller auszählbaren Zellen in den Negativ-, Wasch- und Positiv-Fractionen der magnetischen Zellsortierung, außerordentlich gering. Es konnten nicht mehr als 10% der eingesetzten Zellen wiedergewonnen werden. Auch war in den angefertigten Ausstrichen bzw. Zytospinpräparaten keine sichere morphologische Zuordnung (Zielzelle versus Blutzelle) möglich. Dies wurde als Effekt der grob mechanisch hergestellten Trophoblast-Suspension, die neben Zellfragmenten auch kleine Gewebefragmente enthielt, gedeutet. Diese Gewebefragmente könnten die Passage intakter Zellen durch die Matrix in der magnetischen Zellsortiersäule behindern und damit die geringe Ausbeute in den einzelnen Fraktionen erklären.

Aufgrund der geringen Zellausbeute bei Verwendung der mechanisch hergestellten Trophoblast-Suspension wurden bekannt EGF-R-positive Zelllinien in Hinblick auf ihre Verwendung in einem Modellsystem (Mischung aus EGF-R-positiven Zellen mit Blutzellen) untersucht.

Die immunzytochemische Anfärbung von Zytospinpräparaten von Einzelzellsuspensionen aus den Zellkulturen aller drei untersuchter Zelllinien (A431, JEG und JAR) zeigte in allen Zelllinien eine Expression von EGF-R. Die meisten EGF-R-positiven Zellen fanden sich in der Vulvakarzinom-Zelllinie A431 (>90% der Zellen EGF-R-positiv), gefolgt von JEG und JAR. Für die magnetische Zellsortierung wurde daher die Vulvakarzinom-Zelllinie A431 verwendet.

In verschiedenen Verdünnungen (1:1 bis 1:1000) wurden A431-Zellen den Ficoll-gereinigten Leukozyten beigemischt; diese Mischungen wurden antikörpermarkiert und magnetisch sortiert. Bei fallendem Titer der Zielzellen stieg dabei die relative Anreicherung (Konzentration der Zielzellen in der Positivfraktion geteilt durch Konzentration der Zielzellen im Ansatz). Bei hoher Anfangskonzentration der eingesetzten Zielzellen war die relative Anreicherung also geringer. Die relative Anreicherung lag zwischen zweifach und 40-fach (bei den niedrigsten Ausgangs-Konzentrationen 1:1000 der Zielzellen). Parallel dazu nahm

auch der Anteil der wieder aufgefangenen Zielzellen in der letzten Positivfraktion ("retrieval") zu. Es wurden dabei zwischen 30% und über 90% der eingesetzten Zielzellen in der Positivfraktion nachgewiesen.

Sowohl bei den Inkubationsschritten vor der Zellsortierung als auch bei der magnetischen Sortierung einschließlich der jeweiligen Waschschrte waren deutliche Verluste der Gesamtzahl der eingesetzten Zellen nachweisbar. Nach den Inkubations- und Waschschrten mit dem spezifischen Erstantikörper (EGF-R-Ak) und anschließend mit den an den Zweitantikörper gebundenen magnetischen Mikropartikel gingen ein Viertel bis ein Drittel der ursprünglich eingesetzten Zellen verloren ("prä-MACS loss"). Bei der magnetischen Zellsortierung selbst wurden nochmals (zwischen 40 und 60%) Zellen verloren ("MACS-loss"). Ein Beispiel für die Zellsortierung am Modell der Beimischung von A431-Zellen zu Leukozyten ist in Tabelle 5 gezeigt.

Zielzellen	Leukozyten	Verdünnung Zielzelle	prä-MACS	prä-MACS loss %	Wasch-Negativ-Frk.	Positiv-Fraktion	MACS loss %	Zielzellen in Positiv-Fraktion #	Anreicherungs-Faktor #	% retrieval Zielzellen #
200.000	200.000	1,000	300.000	25,0%	84.000	68.000	49,3%	59.500	1,8-fach	29,8%
20.000	200.000	0,100	180.000	18,2%	64.000	22.000	52,2%	14.667	7,3-fach	73,3%
2.000	200.000	0,010	140.000	30,7%	55.000	5.500	56,8%	1.414	26,0-fach	70,7%
200	200.000	0,001	135.000	32,6%	53.000	5.100	57,0%	192	37,8-fach	96,2%

Tab. 5 Magnetische Zellsortierung von Zielzellen und Leukozyten zur Anreicherung der Zielzellen mit EGF-R-Primärantikörper. Je 200.000 Leukozyten werden abnehmende Mengen an Zielzellen zugesetzt. MACS=magnetische Zellsortierung; prä-MACS loss=durch Antikörperbindungs- und Waschschrte verlorene Zellen; Wasch-Negativ-Frk.=gepoolte Waschlösungen und Negativ-Fraktionen jeweils eines MACS-Ansatzes; Positiv-Fraktion=Eluat der magnetischen Zellsäule nach Entfernen des Magnetfeldes; MACS loss=bei magnetischer Zellsortierung verlorene Zellen; #=*berechnete* Werte aus der Auszählung von ca. 100 Zellen auf einem gefärbten Ausstrich; % retrieval Zielzellen=*berechneter* Anteil der in der Positivfraktion wiedergefundenen an allen eingesetzten Zielzellen

Magnetische Zellsortierung (MACS) mit EGF-R-Antikörpern aus dem peripheren Blut von schwangeren Frauen und Untersuchung durch Interphase-FISH

Die im Modellsystem beschriebene Methodik der Trophoblastsortierung mittels des EGF-R-Antikörper mab425 und magnetischer Sortierung durch MiniMACS wurde auf periphere Blutproben von 23 Schwangeren angewendet. Aus 10ml peripherem Venenblut wurde nach Ficoll-Reinigung die magnetische Sortierung mit dem EGF-R-Antikörper mab425 durchgeführt. Die Positivfraktion wurde anschließend entweder für eine einfache Giemsa-Färbung und zytomorphologische Untersuchung (n=5), Cytokeratinfärbung (n=3) oder für Interphase-FISH für die Chromosomen X und Y (n=15) auf einem Objektträger fixiert.

Es wurden in allen Proben mindestens 500 Zellen bzw. Zellkerne untersucht. Bei der Gruppe, die mittels FISH untersucht wurde, wurden nur Kerne mit zwei eindeutigen Hybridisierungssignalen von X- und Y-Chromosomen untersucht. Für FISH wurden Kontrollobjektträger mit männlichen und mit weiblichen Lymphozyteninterphasen mitgeführt. Auf ihnen wurden ebenfalls 500 Kerne ausgezählt, um die Häufigkeit der inkorrekten Hybridisierung, insbesondere das Auftreten von im FISH scheinbar männlicher Zellen bei bekanntem weiblichen Karyotyp, einschätzen zu können. Zum Zeitpunkt der mikroskopischen Untersuchung war das Geschlecht der jeweiligen Feten nicht bekannt.

Insgesamt konnten nur bei drei Patientinnen aus dem mütterlichen Blut Zellen mit Interphase-Signalen für je ein X- und ein Y-Chromosom gefunden werden, und die Inzidenz von XY-Signalen (männlichen Zellen) war gering (eine bis drei Zellen). In keinem Fall trat bei Vorliegen eines weiblichen Feten eine Zelle mit XY-Signal auf. Allerdings wurden auf zweier fünf Kontrollobjektträger mit weiblichen Interphasenkernen (d.h. bei den Negativkontrollen) eine bzw. zwei Zellen mit vermeintlich einem X- und einem Y-FISH-Signal gefunden, die als unspezifische Signale betrachtet wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Bei magnetischer Zellsortierung mit EGF-R-Antikörpern konnte keine ausreichende Anreicherung gezeigt werden, wenn mit XY-FISH die Anwesenheit männlicher Zellen gesucht wurde. Die Detektionsschwelle der verwendeten Methode (FISH für die Chromosomen X und Y) lag dabei bei ein bis zwei Zielzellen pro 500 ausgezählte Kerne.

Patientin	Gestationsalter (SSW+Tage)	Blutprobe (Volumen)	Fetales Geschlecht	Fetale Zellen
1	9+0	10ml	unbekannt.	morph.neg.
2	10+1	10ml	unbekannt	morph.neg.
3	21+3	10ml	weiblich	morph. fragl. pos. (n=1)
4	17+3	18ml	weiblich	morph.neg.
5	16+1	18ml	weiblich	morph.neg.
6	22+5	15ml	weiblich(*2)	CK neg.
7	17+1	18ml	männlich	keine Frb.
8	18+2	12,5ml	unbekannt	CK neg.
9	19+2	10ml	männlich	-
10	11+5	10ml	weiblich	-
11	11+6	20ml	männlich	-
12	9+1	15ml	weiblich	-
13	18+2	15ml	männlich	-
14	16+3	18ml	männlich	-
15	12+6	18ml	männlich	-
16	15	22ml	männlich	1* XY
17	10+3	18ml	männlich	2* XY
18	10+4	18ml	weiblich	-
19	16+3	15ml	männlich	-
20	10+5	18ml	weiblich	-
21	16+4	18ml	männlich	1* XY
22	11+4	18ml	männlich	-
23	11+2	18ml	weiblich	-

Tab. 6 Magnetische Anreicherung auf fetale Zellen aus mütterlichem Blut über EGF-R-Antikörper. Untersuchung mittels XY-FISH (Pat. 9 bis 23), morphologisch (fraglich) Trophoblast-artigen Zellen (Giemsa-Färbung; Pat. 3 mit einer Zelle) sowie Cytokeratin-positive Färbung (Pat. 6-8). morph.neg.=morphologisch kein Hinweis auf Trophoblastzellen; keine Frb.=keine spezifische Färbung; CK neg.=keine Zelle mit Cytokeratin-Färbung

Fetale Zellen aus dem Zervikalkanal

Schwangerschaftsausgang nach zervikaler Schleimaspilation

Bei 130 Patientinnen, die eine transzervikale Chorionzottenbiopsie erhielten, wurde Zervixschleim von der Ektozervix durch Aspiration über einen Katheter in eine Spritze entnommen. Die Schwangerschaftsverläufe dieser Patientinnen sowie eines Vergleichskollektivs von 145 Patientinnen mit Chorionzottenbiopsie, aber ohne vorherige Schleimaspilation wurden ausgewertet.

In der Gruppe der Patientinnen mit Chorionzottenbiopsie und Schleimaspilation konnten von 87% der Schwangerschaften Informationen über den Ausgang der Schwangerschaft ermittelt werden, von den Patientinnen, die nur eine Chorionzottenbiopsie erhalten hatten, von 83%.

Es wurden vergleichbare Häufigkeiten ungünstiger Schwangerschaftsausgänge in beiden Gruppen gefunden. In der Gruppe mit Schleimaspilation betrug die totale Schwangerschaftsverlustrate (spontane plus induzierte Aborte plus Totgeburten) 21,2% (24/113), in der Kontrollgruppe 19,8% (24/121). Diese relativ hohen Zahlen erklären sich aus den hohen Raten an induzierten Aborten in diesem in Bezug auf genetische Störungen selektierten Kollektiv (Hochrisiko-Kollektiv): 16 der 20 induzierten Abbrüche in der Studiengruppe und 14 von 17 in der Kontrollgruppe erfolgten aufgrund von beim Feten festgestellten genetischen Störungen bei belasteter Familienanamnese.

Soweit bei der Einschränkung der nicht vollständigen Nachverfolgung eingeschränkt beurteilt werden kann, konnte bei zusätzlicher Durchführung einer Zervixschleim-Aspiration kein größeres Risiko für einen ungünstigen Schwangerschaftsausgang festgestellt werden, als wenn nur eine Chorionzottenbiopsie durchgeführt wurde. Die Zusammenstellung der Ergebnisse zeigt Tabelle 7.

	CVS mit Aspiration zervikalen Schleims (n=130)	Kontrollgruppe: CVS ohne Aspiration (n=145)
Vollständiges Follow-up	113 (87%)	121 (83%)
Normale Schwangerschaften*	87 (77%)	97 (80%)
Fehlgeburten*	2 (1,7%) (18 und 27 SSW)	7 (5,8%) (sechs bis 16 SSW, eine unbekannt)
Totgeburten*	2 (1,7%) (27 und 40 SSW)	keine
Induzierte Abbrüche*	20 (17,7%) (4 Chromosomenanomalien, 8 Hämoglobinopathien, 4 Stoffwechselstörungen, 4 andere)	17 (14,0%) (3 Chromosomenanomalien, 8 Hämoglobinopathien, 4 Stoffwechselstörungen, 2 andere)

Tab. 7 Schwangerschafts-Ausgang nach Chorionzottenbiopsie (CVS) mit und ohne vorherige Aspiration von Zervixschleim (aus: Rodeck, Tutschek et al. 1995).

*=Prozentangaben bezogen auf die Fälle mit vollständigen Daten zum Schwangerschaftsausgang.

Fetale Zellen im Zervixschleim der Ektozervix und vom inneren Muttermund

Bei 25 Schwangeren wurde Zervixschleim zum Vergleich der Methoden von der Ektozervix (Gruppe "Aspiration") und anschließend durch transzervikale Spülung am inneren Muttermund (Gruppe "Lavage") gewonnen. Die Ausbeute an fetalen Zellen wurde durch Untersuchung mittels Interphase-FISH für die Chromosomen X und Y (XY-FISH) beurteilt.

Das fetale Geschlecht, bestimmt durch XY-FISH der Plazenta, zeigte 11 männliche und 14 weibliche Feten. Bei den 11 Frauen mit männlichen Feten wurden im aspirierten Zervixschleim bei 7 Frauen und in der Lavage bei 5 Frauen (männliche und damit) fetale Zellen gefunden. Bei keiner der 9 Frauen mit weiblichen Feten konnten im Zervixschleim oder in der Lavage männliche Zellen gefunden werden. Bei Schwangeren mit männlichem Feten waren zwischen 0 und 16,1% der Zellen im Schleim vom äußeren Muttermund männlich und zwischen 0 und 7,1% der Zellen in der Lavage vom inneren Muttermund männlich. Insgesamt (d.h. Aspirat oder Lavage positiv) konnten männliche fetale Zellen damit bei 9 von 11 männlichen Feten nachgewiesen werden. Die Daten der einzelnen Patientinnen sind in Tab. 9 aufgelistet. Bezogen auf das fetale Geschlecht wären damit 23 von 25 Fällen korrekt und ohne "falsch-positive" Fälle diagnostiziert worden (siehe Tabelle 8).

In einem Fall wurden bei der Interphase-FISH-Untersuchung mit Sonden für die Chromosomen X und Y Zellen mit zwei X- und einem Y-Signal gefunden. Dieser Fall wurde mittels Mikromanipulation von Zellklumpen und PCR sowie Mehrfarben-FISH eingehend weiter untersucht (siehe weiter unten).

Probentyp	Männlich (n=11) *	Weiblich (n=14)
Aspirat	7/11 (64%)	14/14
Lavage	5/11 (45%)	14/14
Aspirat oder Lavage	9/11 (82%)	14/14

Tab. 8 Geschlechtsbestimmung von 25 Feten mittels XY-FISH an aspiriertem Zervixschleim vom äußeren Muttermund und aus intrazervikaler Lavage. *=Ein weiterer korrekt als männlich identifizierter Fetus mit XXY-Triploidie wird extra aufgeführt (siehe unten: „Molekulare Diagnose einer fetalen Chromosomenstörung aus dem Zervixschleim“).

Nr.	Fet	Aspirat				Lavage			
		gezählte Zellkerne	% XY	% X0	% andere	gezählte Zellkerne	% XY	% X0	% andere
1	XX	71	0	1,4	1,4	211	0	2,8	1,9
2	XX	280	0	1,4	1,8	162	0	1,9	1,9
3	XX	457	0	0,7	0,9	73	0	2,7	0
4	XX	203	0	1,0	0,5	43	0	2,3	2,3
5	XX	507	0	0,6	0,8	303	0	0,7	3,6
6	XX	275	0	3,3	4	169	0	3	3
7	XX	120	0	2,5	0,8	56	0	0	0
8	XX	254	0	0,8	0,8	121	0	0	0
9	XX	268	0	4,1	0,7	74	0	1,4	1,4
10	XX	94	0	4,3	0	56	0	0	0
11	XX	222	0	1,4	0,5	84	0	0	0
12	XX	314	0	2,9	0	319	0	0	0
13	XX	295	0	0,3	0	294	0	1	1
14	XX	71	0	1,4	0	90	0	0	0
15	XY	104	0	0	6,7	111	0	0	2,7
16	XY	143	16,1	0	0	440	0,23	1,4	0,23
17	XY	527	0,9	2,8	0	200	0	0	0
18	XY	211	5,2	0	0,47	70	7,1	0	0
19	XY	163	0	3,1	0	286	1,4	0	0
20	XY	489	0,8	0	9,4	72	0	0	1,4
21	XY	42	0	0	0	35	0	0	0
22	XY	437	0,5	1,8	2,7	579	0	3	11
23	XY	261	0,8	2,3	0	96	4,2	0	0
24	XY	757	0	0,9	0	155	3,2	5,2	0
25	XY	519	0,2	0,2	0	96	0	2,1	1

Tab. 9 FISH für die Chromosomen X und Y an Zellen im Zervixschleim vom äußeren Muttermund (Aspirat) und aus intrazervikaler Lavage

Isolation einzelner fetaler Zellen durch Mikromanipulation

Das dritte Kollektiv zur Untersuchung fetaler Zellen aus dem Zervixschleim umfaßte die Proben, in denen eine Reindarstellung fetaler Zellen versucht werden sollte. Aus der Zellsuspension wurden dabei durch Mikromanipulation auf fetale Herkunft verdächtige Zellen oder Zellklumpen, d.h. solche, die nicht, wie z.B. Plattenepithelzellen der Vagina oder Zervix, eindeutig mütterlicher Herkunft erschienen, isoliert und untersucht. Bei insgesamt 21 Patientinnen, die entweder eine Chorionzottenbiopsie oder einen Schwangerschaftsabbruch (aus nicht-medizinischer Indikation) erhielten, wurde vor jeder anderen Maßnahme Zervixschleim der Ektozervix aspiriert und an dem Material eine Mikromanipulation und anschließend teils Multiplex-PCR, teils XY-FISH der Zellklumpen ("Isolate") durchgeführt.

Je Patientin wurden zwischen einem und dreizehn und insgesamt 90 mikromanipulierte Isolate untersucht. Bei sieben Patientinnen wurden zwischen einem und vier Isolate mit rein fetalem Muster der STR gefunden. Fünf Patientinnen zeigten in der PCR einzelner Isolate Allele, die auf ein gemischtes Ausgangsmaterial von maternalen und fetalen Zellen hindeuteten. 13 Isolate zeigten keine spezifische PCR-Produkte (fehlerhafte Mikromanipulation oder PCR). Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.

Pat.	Eingriff nach Aspiration	Gestationsalter	Ergebnis der molekularen Untersuchung der Zellklumpen
1	Abbr.	6 SSW	1/6 maternal-fetal, 1/6 maternal, 4/6 fehl.
2	Abbr.	10 SSW	1/4 maternal-fetal, 1/4 maternal, 2/4 fehl.
3	CVS	10 SSW	1/5 fetal, 3/5 mat, 1/5 fehl.
4	CVS	12 SSW	2/3 maternal-fetal, 1/3 fehl.
5	CVS	10 SSW	2/2 maternal/non-informativ
6	CVS	10 SSW	1/3 fetal, 2/3 maternal
7	CVS	9 SSW	1/1 maternal
8	Abbr.	9 SSW	2/8 fetal, 2/8 maternal-fetal, 4/8 maternal,
9	Abbr.	11 SSW	6/6 maternal
10	CVS	11 SSW	1/1 maternal
11	Abbr.	12 SSW	3/3 maternal
12	CVS	10 SSW	2/2 fetal
13	Abbr.	7 SSW	5/5 maternal
14	CVS	10 SSW	1/6 fetal, 3/6 maternal, 2/6 fehl.
15	Abbr.	8 SSW	2/2 non-informativ
16	Abbr.	11 SSW	7/7 maternal
17	Abbr.	10 SSW	1/1 maternal
18	Abbr.	11 SSW	4 maternal/non-informativ
19	Abbr.	9 SSW	2/13 fetal, 1/13 maternal-fetal, 6/13 maternal, 2/13 fehl.
20	Abbr.	9 SSW	3/4 maternal, 1/4 fehl.
21	Abbr.	7 SSW	4 fetal

Tab. 10 Molekulare Untersuchung fetaler Zellen mit dem polymorphen STR D21S11 nach Mikromanipulation. CVS: Chorionzottenbiopsie; Abbr.: Schwangerschaftsabbruch; "fetal": nur fetale PCR-Peaks; "maternal-fetal": maternale und fetale STR-Peaks; "maternal": nur maternal PCR-Peaks; "maternal/non-informativ": STR-Peaks wie maternal, kein fetales Referenzmaterial verfügbar; "non-informativ": Plazenta und Mutter haben dieselben Allele; "fehl.": Fehlerhafte Mikromanipulation, DNS-Extraktion oder PCR.

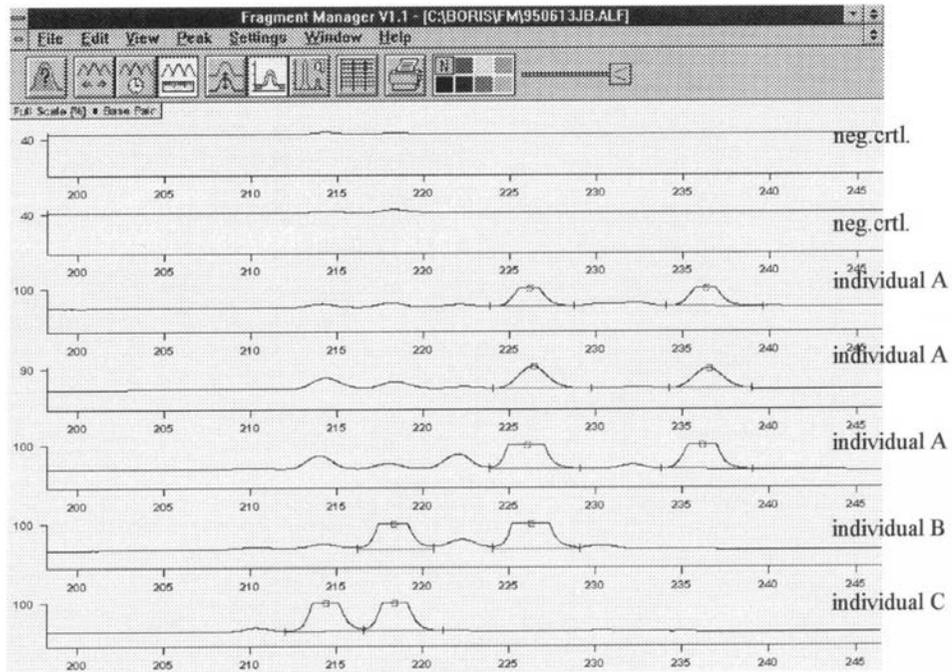
Molekulare Untersuchungen fetaler Zellen aus dem Zervixschleim

Die Sensitivität der fluoreszenten Einzelzell-PCR wurde zunächst in einem Testsystem an Einzelzellen mit dem STR D21S11 und Amelogenin getestet. In allen Experimenten wurden Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt und berücksichtigt. Es wurden Mundschleimhautzellen von drei Probanden mit bekannten Mustern für die verwendeten STR verwendet, die durch Mikromanipulation vereinzelt aufgenommen und in der PCR untersucht wurden.

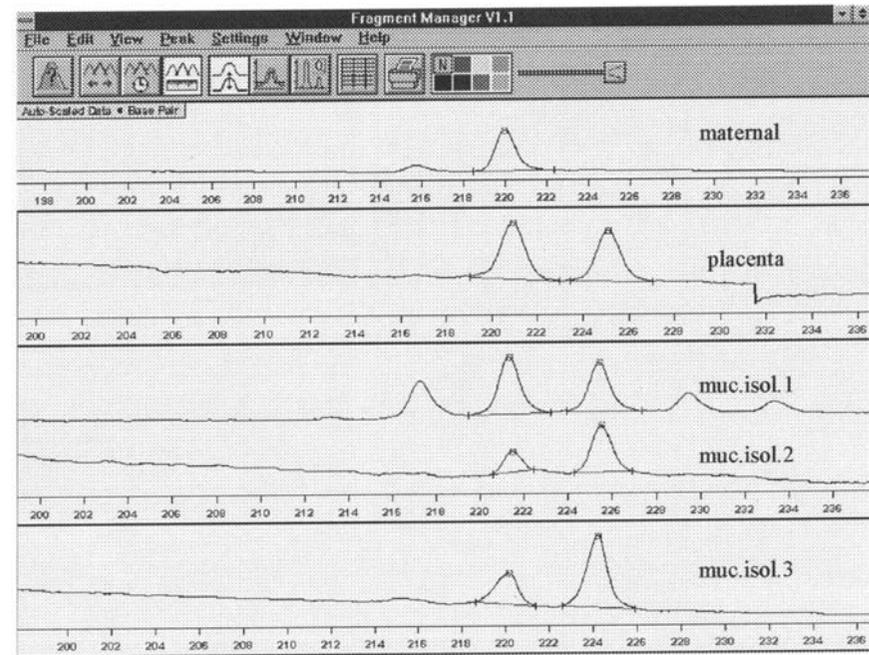
Abbildung 11 zeigt die PCR von zwei negativen Kontrollen, drei einzelnen Zellen von Proband A und je eine von Probandin B und Proband C. Obwohl die Spitzen der PCR-Signale (Peaks) "abgeschnitten" sind (d.h. mehr PCR-Produkt als bei den verwendeten Geräteeinstellungen lesbar), sind trotzdem die Flächen unter den Peaks zwischen den beiden Allelen gleichgroß (Flächenrelationen unter den Peaks: für Proband A 0,99, 1,07 und 1,14; für Probandin B 0,87; für Proband C 1,04). Es wurde keine signifikante präferentielle Amplifikation oder "allelic drop-out" (vollständiges Fehlen der Amplifikation eines Allels) gefunden.

Die Methodik wurde durch Hinzunahme anderer STR-Loci sowie des Amelogenins erweitert und auch bei den durch Mikromanipulation gewonnenen Proben angewendet, wobei ein Fall einer Triploidie ebenfalls per PCR bestätigt wurde (siehe weiter unten und Abb. 13).

Weiterhin wurden ebenfalls die Möglichkeit des Nachweises z.B. der die Sichelzellanämie verursachenden Punktmutation HbS oder der häufigsten Mutation für Mukoviszidose in die Multiplexreaktion integriert. Allerdings kam letztere PCR nicht an Patientenmaterial der vorliegenden Studie zum Einsatz (Sherlock 1998).



a. Einzelzell-PCR mit STR D21S11 an einzelnen Mundschleimhautzellen von drei gesunden Probanden



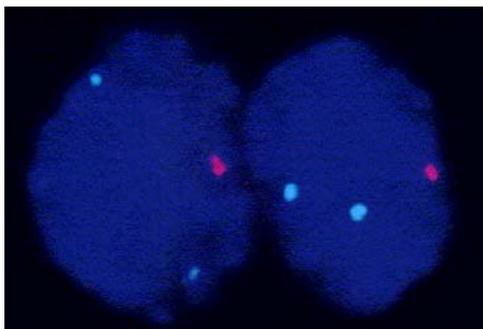
b. PCR-Untersuchung an durch Mikromanipulation gewonnenen fetalen Zellklumpen aus dem Zervixschleim.

Abb. 11 PCR mit STR D21S11 an einzelnen Mundschleimhautzellen (a.) und Zellklumpen aus dem Zervixschleim (Tutschek et al. 1995a). individual A/B/C=einzelne Mundschleimhautzellen von gesunden Probanden. maternal=DNS aus mütterlichem; placenta=Kontrolle fetaler Genotyp; muc.isol.=Zellklumpen aus Zervixschleim

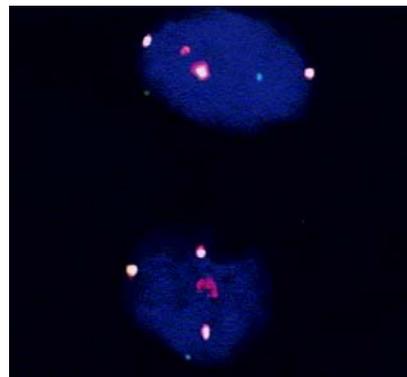
Molekulare Diagnose einer fetalen Chromosomenstörung aus dem Zervixschleim

In einer der Proben aus der Gruppe der Mikromanipulation wurden Zellen mit einem Y- und zwei X-Signalen gefunden, was am ehesten durch einen 47,XXY-Karyotyp oder durch eine Triploidie zu erklären gewesen wäre. Daher wurden Trophoblastzellen aus der Plazenta dieses Falles zusätzlich per FISH mit einer Sonde für Chromosom 1 untersucht, die dort drei Signale zeigte. Damit wurde die Verdachtsdiagnose einer Triploidie mit den Geschlechtschromosomen XXY gestellt. FISH mit den Sonden für Chromosomen X und Y zeigte im Aspirat 6,7% (7 von 104 Kernen) der untersuchten Kerne und in der Lavage 2,7% (3 von 111) mit der fetalen XXY-Konstellation (siehe Abb. 12a).

Per Multiplex-PCR wurden daraufhin extrahierte DNS sowohl aus der Plazenta als auch dem Aspirat und der Lavage sowie aus einzelnen mikromanipulierten Zellklumpen aus dem Zervixschleim untersucht. Weiterhin wurde an Zellklumpen aus dem Zervixschleim Mehrfarben-FISH mit Sonden für die Chromosomen X, Y und 1 durchgeführt. Die Ergebnisse der PCR zeigten in der Plazenta eine mengenmäßige Verschiebung der Produkt-Ratio der PCR-Signale zugunsten des X-Chromosoms sowie des einen Allels des STRs D21S11 (siehe Abb. 13). Auch die Dreifarben-FISH-Untersuchung an einzelnen Zellklumpen bestätigte die Chromosomenanomalie (siehe Abb. 12b).



a. Zwei fetale Zellen mit Interphase-FISH für die Chromosomen X und Y (grün-blau=X, rot=Y)



b. Zwei fetale Zellen mit Interphase-FISH für die Chromosomen X, Y und 1 (grün-blau=X, rot=Y, gelb=1)

Abb. 12 Triploidie-Diagnose an fetalen Zellklumpen aus dem Zervixschleim der Ektozervix mittels Interphase-FISH (Tutschek et al. 1995)

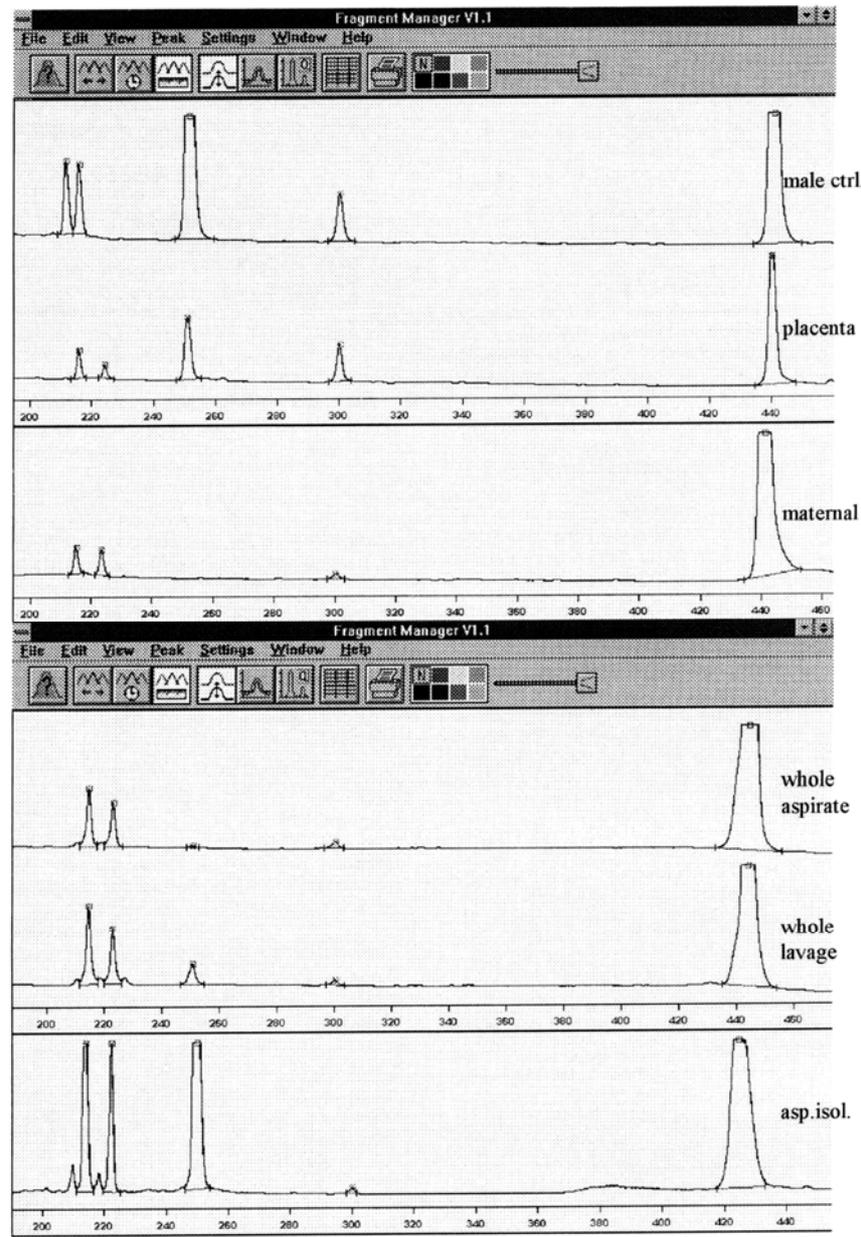


Abb. 13 Quantitative fluoreszente PCR mit STR D21S11 und Amelogenin von der Plazenta und von einem isolierten Zellklumpen in einer Schwangerschaft mit XXY-Triploidie (Tutschek 1995). Von oben nach unten: "male ctrl."=männliche Kontroll-DNS mit folgenden PCR-Peaks (von links nach rechts): STR D21S11 um 250bp, Amelogenin Y, Größenmarker mit 300bp und Amelogenin X; "placenta"=triploide Plazenta mit diallelischem STR D21S11 mit verschobener Produktgrößenverteilung zugunsten des kürzeren Allels sowie zugunsten des Amelogenin-X-Peaks; "maternal"=DNS aus mütterlichem Blut; "whole aspirate/lavage"=Aliquot des aspirierten Schleims bzw. der Lavageflüssigkeit; "asp. isolate"=Amplifikationsprodukt eines fealen Zellklumpens aus dem Zervixschleim mit demselben PCR-Muster wie in der Plazenta.

Anzüchtung fetaler Zellen aus dem mütterlichen Blut

Sensitivität der verwendeten PCR

Zunächst wurde bestimmt, welcher Anteil männlicher (und damit im Fall eines männlichen Feten fetale) DNS in einer Mischung mit weiblicher DNS mit der verwendeten PCR unter Nutzung der Amelogenin-XY-Primer detektiert werden könnte. Dafür wurden kleine Mengen männliche DNS weiblicher DNS beigemischt.

Es wurden zwei Verdünnungsreihen mit einem Verhältnis von männlicher zur weiblicher DNS von 1:1 bis 1:32.000 bzw. 1:1 bis 1:400 untersucht. Bei Beimischung von männlicher DNS in diesen Verdünnungen lag die Nachweisgrenze bei einem Verhältnis von 1:20 männliche zu weiblicher DNS bzw. 5% der Minoritäts-DNS.

Modellsystem: Männliches Nabelschnurblut in peripherem mütterlichen Blut

In einem Modellsystem wurde dem peripheren Blut einer nicht schwangeren Probandin Nabelschnurblut eines männlichen Neugeborenen beigemischt und die kernhaltigen Zellen gereinigt. Es wurden dann aus jeweils 5×10^5 kernhaltigen Zellen Kolonien angezüchtet, diese durch Mikromanipulation entfernt und einzeln per PCR mit dem Amelogenin-XY-Primern untersucht.

Aus dem Ansatz ohne Nabelschnurblutzusatz konnte in keiner Kolonie ein Signal für das Amelogenin-Y-Produkt gefunden werden. Bei einer Beimischung entsprechend einer männlichen zu 100 bzw. 1.000 weiblichen kernhaltigen Zellen wurden aus beiden verwendeten Wachstumsmedien unter 24 bzw. 29 amplifizierten Kolonien je insgesamt 2 männliche gefunden (8,3 % bzw. 6,9%). Damit ergab sich bei Verwendung von Nabelschnurblut von am Termin Geborenen eine maximale Expansion von 69-fach (siehe Tabelle 11).

Schwangerschaftsverläufe im untersuchten Kollektiv

Unter den 14 Schwangeren in der Studie, die sich zwischen 14+0 und 20+6 SSW zur invasiven pränatalen Diagnostik vorstellten, waren drei erstmals schwanger. Die Indikationen zur Amniozentese waren in der Hälfte der Fälle die "Altersindikationen" (35 Jahre oder älter).

Es wurden peripher-venös zwischen 5 und 9ml Blut entnommen. Bei 13 Patientinnen wurde eine Amniozentese durchgeführt, gefolgt von der Bestimmung des Karyotyps durch das Humangenetische Institut der Heinrich-Heine-Universität. In 12 Fällen ergab sich ein insgesamt unauffälliger Chromosomensatz. In einem Fall (Pat. 11) wurde der Verdacht auf

das mögliche Vorliegen eines Pallister-Killian-Syndroms geäußert. Diese Pat. entschied sich nach ausführlicher Beratung zum Austragen der Schwangerschaft, und der Verdacht bestätigte sich im Verlauf nicht.

Es traten keine Komplikationen nach den Punktionen auf, und alle untersuchten Schwangerschaften führten zur Geburt eines gesunden Kindes. Die Charakteristika des Kollektivs sind in Tabelle 12 zusammengefaßt.

Medium	XY / XX Zellen vor Anzuchtung	amplifiz. Kolonien	weibliche Kolonien	männliche Kolonien	PCR-Versager	rechnerische Expansion
4330	keine XY	15	14	0	0	
4330	1 XY / 100 XX	10	9	1 (10%)	0	
5100	1 XY / 100 XX	14	13	1 (7,1%)	0	
4300 oder 5100	1 XY / 100 XX	24	22	2 (8,3%)	0	8,3-fach
4330	1 XY / 1.000 XX	15	13	1 (6,1%)	1	
5100	1 XY / 1.000 XX	14	13	1 (7,1%)	0	
4300 oder 5100	1 XY / 1.000 XX	29	26	2 (6,9%)	1	69-fach

Tab. 11 Nachweis männlicher Kolonien bei Anzuchtung von Mischungen aus weiblichem Blut und männlichem Nabelschnurblut

Pat.	Alter	GP	Gest.-Alter	ml	Indikation zur invasiven Diagnostik	Schwangerschaftsverlauf und -Ausgang
1	27	G6 P5	14+0 SSW	7,5	n.d. *	normal
2	39	G5 P3	15+4 SSW	8,0	Altersindikation	normal
3	37	G3 P2	15+2 SSW	9,0	Altersindikation	normal
4	23	G3 P2	15+0 SSW	6,0	GM ₂ -Gangliosidose	normal
5	34	G2 P1	15+4 SSW	5,0	Altersindikation	normal
6	33	G3 P1	14+6 SSW	6,5	bekannte balanz. Translokation der Schwangeren	normal (balanzierte Translokation geerbt)
7	39	G4 P3	16+2 SSW	7,5	Altersindikation	normal
8	26	G2 P1	16+1 SSW	7,0	Z.n. Chemotherapie	normal
9	28	G1	17+0 SSW	6,5	auffälliges Serumscreening	normal
10	37	G1	16+0 SSW	7,5	Altersindikation	normal
11	42	G6 P5	20+6 SSW	6,0	Altersindikation	normal, #
12	32	G2 P0	19+2 SSW	7,5	mütterliche Sorge	normal
13	30	G1	19+1 SSW	7,0	mütterliche Sorge	normal
14	36	G2 P1	14+4 SSW	7,5	Altersindikation	normal

Tab. 12 Patientencharakteristika und Schwangerschaftsausgang. Gn Pn=Anzahl aller Schwangerschaften (G) und der vorigen Geburten (P); ml=Menge des entnommenen Blutes; *=keine Amniozentese durchgeführt, maternales und paternales Blut als Referenz-DNS verfügbar; #=aus der Amniozentese Verdacht auf Pallister Killian-Syndrom, der sich aber im Verlauf nicht bestätigte.

Zellausbeute und Kolonietypen

Nach Entnahme des peripheren Venenblutes von schwangeren Frauen und Ficoll-Reinigung der kernhaltigen Zellen wurden diese in Kultur gebracht. Es wurden für jede Schwangere mindestens zwei Ansätze mit den beiden verwendeten Medien vorgenommen: In jedem Medium wurden 5×10^5 kernhaltige Zellen angesetzt. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien gezählt und in Vorbereitung für die Untersuchung mit PCR durch Mikromanipulation einzeln in Reaktionsgefäße aufgenommen.

Pro Patientin wurden nach 14 Tagen Anzuchtung aus mindestens zwei Ansätzen zu je 5×10^5 eingesetzten kernhaltigen Zellen zwischen 150 und 807 Kolonien gezählt. Die überwiegende Mehrzahl der Kolonien entfiel auf Hämoglobin-haltige BFU-E. Insgesamt wurden 5.939 Kolonien gezählt, wovon 5.289 Kolonien durch Mikromanipulation einzeln aufgenommen und 2.966 zufällig ausgewählte für die PCR vorbereitet wurden.

Pat.	Medium	Kolonien	isoliert	amplifiziert
1	4330, 5100	807	381	381
2 #	4330	181	194	0
	5100	219	193	0
3	4330	256	218	99
	5100	296	252	143
4	4330	104	113	113
	5100	150	180	180
5	4330	205	166	166
	5100	257	273	273
6	4330	351	299	299
	5100	510	298	298
7	4330	173	203	76
	5100	244	210	76
8	4330	81	59	38
	5100	69	61	38
9	4330	217	179	122
	5100	311	290	112
10	4330	225	241	144
	5100		45	0
11 #	4330	122	129	0
	5100	217	188	0
12	4330	158	170	38
	5100	183	175	76
13	4330	216	210	72
	5100	164	224	72
14	4330	242	180	122
	5100	206	158	28

Tab. 13 Angezüchtete Kolonien bei 14 Patientinnen. #=nicht-informative Proben, die von der weiteren Untersuchung ausgenommen wurden. Kolonien= Anzahl der nach Anzuchtung auszählbaren Kolonien. Isoliert=Anzahl der mit einer Mikropipette einzeln aufgenommenen Kolonien. Amplifiziert= Anzahl der pro Patientin einzeln mit PCR untersuchten Kolonien.

Multiplex-Fluoreszenz-PCR-Analyse der aus dem Blut angezüchteten Kolonien

Für jedes Probenpaar, bestehend aus DNS aus dem Blut der Schwangeren und DNS aus der Amnionflüssigkeit, wurde mit der PCR mit den verwendeten Mikrosatelliten die Informativität untersucht. Bei Patientin 1 wurden zur Bestimmung der (möglichen) fetalen Allele maternales und paternales Blut untersucht. Informativität bestand bei allen Probenpaaren für mindestens einen Marker bis auf die Patientinnen 2 und 11, deren Kolonien daher nicht mit PCR amplifiziert wurden. Insgesamt waren also 12 Patientinnen informativ.

Die durch Mikromanipulation isolierten Kolonien wurden durch Multiplex-PCR mit polymorphen Mikrosatellitenmarkern sowie am Amelogenin-Locus untersucht. Aus den mütterlichen Blutproben war stets jeweils der mütterliche Genotyp bezüglich der untersuchten Loci und in 13 von 14 Fällen aus der Amnionflüssigkeit auch der fetale Genotyp bekannt. In einem Fall (Pat. 1) hatte sich die Schwangere nach Aufklärung über die Amniozentese gegen die AZ, aber zur Teilnahme an der Studie samt Blutprobe entschieden. In diesem Fall wurde nach entsprechender Aufklärung vom Vater des ungeborenen Kindes eine Blutprobe genommen, um die möglicherweise zu erwartenden fetalen Allele zu erkennen.

Die PCR-Muster (Peaks) aus den amplifizierten Kolonien wurden in die folgenden Kategorien eingeteilt: "maternal", wenn beide Allele mit den Allelen aus der mütterlichen Kontroll-DNS übereinstimmten; "fetal", wenn beide Allele mit denen aus dem Fruchtwasser oder (Pat. 1) mit je einem Allel beider Eltern übereinstimmten; "gemischt (fetal und maternal)", wenn neben den beiden maternalen ein weiterer Peak vorlag, der von der Länge einem fetalen Allel entsprechen könnte, dessen PCR-Produktmenge (Fläche unter dem Peak) aber den anderen Peaks vergleichbar war; "ein maternales Allel", wenn im PCR-Muster ein Peak maternal erklärlich, der zweite aber weder in der maternalen DNS noch im Fruchtwasser enthalten war.

Das Ergebnis der PCR einer Patientin (Pat. 1) mit dem Nachweis einer fetalen Kolonie ist in der Abb. 14 dargestellt. Neben den beiden Bahnen mit Amplifikations-Produkten aus mütterlichem (Bahn 33) und väterlichem Blut (Bahn 31) sind die PCR-Produkte von zwei amplifizierten Kolonien aufgetragen. Davon wurde eine als "fetale" (Bahn 27), die zweite als "gemischt fetal und maternal" (Bahn 8) bewertet.

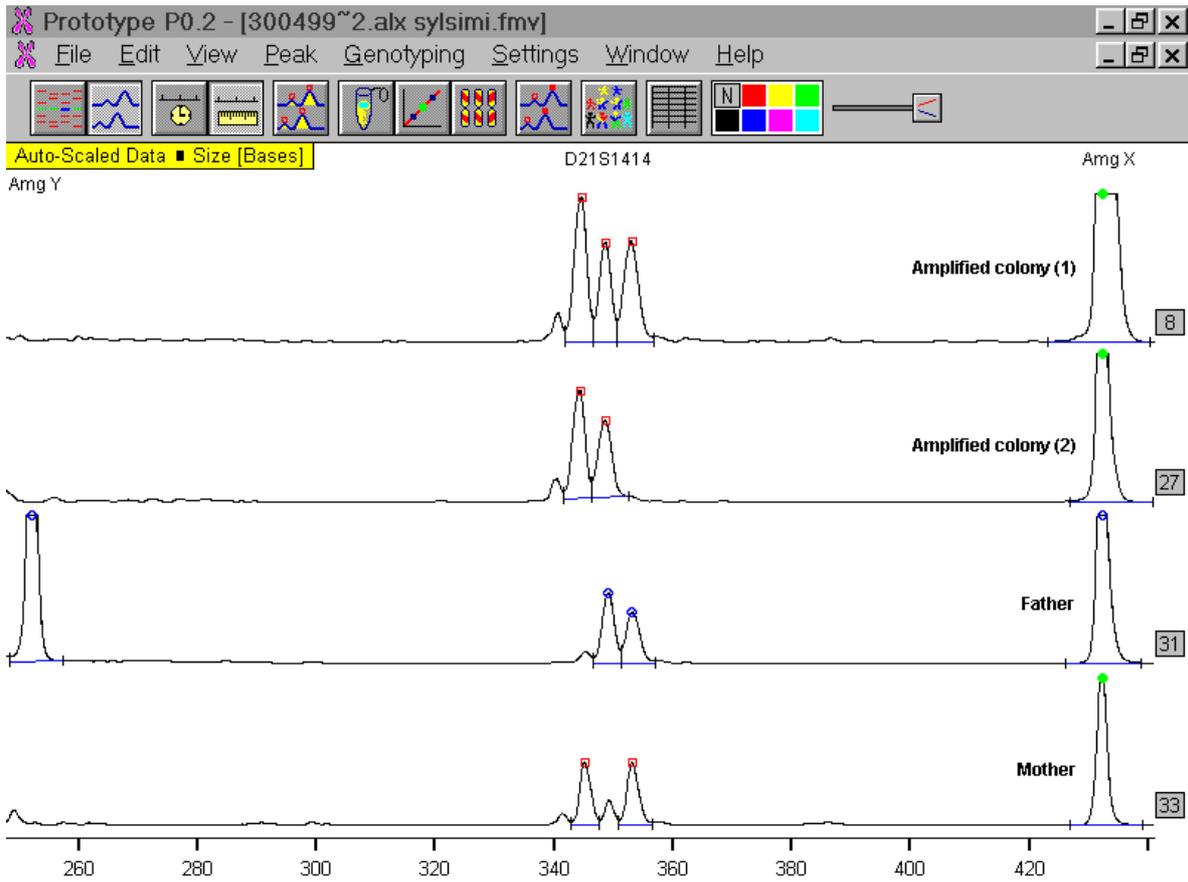


Abb. 14 PCR-Analyse von Zellkolonien aus dem peripheren mütterlichen Venenblut mit Referenzamplifikationen aus fetaler DNS (aus Fruchtwasserzellen) und mütterlichem und väterlichem Blut. Die spezifischen Produkte sind AmgXY bei 432 und 252bp sowie D21S1414 zwischen 340 und 260bp Fragmentlänge. Spur 33: PCR von mütterlicher DNS, Spur 31: Vater, Spur 27: rein fetale Kolonie; Spur 8: gemischt fetale und maternale Kolonie (Tutschek 2000).

Die Auswertung der PCR einer weiteren Patientin, bei der in einzelnen Kolonien Hinweise für eine Kontamination und für präferentielle Amplifikation gefunden wurden, ist in Abb. 15 dargestellt. Die oberen vier Bahnen zeigen die Produkte einer PCR mit drei Mikrosatelliten-Markern in einer Multiplex-PCR (D18S535, D21S11 und D21S1414): in Bahn 1 maternale DNS; in Bahn 3 DNS aus Fruchtwasserzellen (haplo-identischer Genotyp in allen drei Markern); Bahnen 9 und 11: maternale Kolonien mit PCR-Versagern der D21S11 und D18S535. Die Produkte in den Bahnen 25, 29, 27 und 33 stammen von derselben Patientin aus einer PCR mit zwei Markern (D18S535 und D21S11). Die Bahnen 25, 29 und 33 wurden als maternale Muster gewertet. Dabei zeigen die längeren Allele des D21S11 in den Bahnen 25 und 29 jeweils weniger Amplifikationsprodukt (Fluoreszenzeinheiten unter den Peaks: 208 versus 418 in Bahn 25; 1011 versus 3821 in Bahn 29), was als präferentielle Amplifikation

gedeutet wurde. Das PCR-Produkt-Muster in Bahn 27 kann nicht durch eine maternale oder fetale Kolonie oder eine akzidentelle Mischung erklärt werden: Der Marker D18S535 zeigt ein Allel, das weder bei der Mutter noch in der Amnionflüssigkeit vorlag (Kontamination).

In neun der 12 untersuchten Probenpaare wurden 42 Kolonien (42 [1,2%] von 2966) identifiziert, die mögliches fetales Material enthielten, und zwar bei vier Patientinnen zwischen zwei und vier rein fetale Kolonien (10 [0,8%] von 1227), wovon drei Patientinnen auch gemischte Kolonien hatten. Weitere fünf Probenpaare hatten gemischte, aber keine rein fetalen Kolonien.

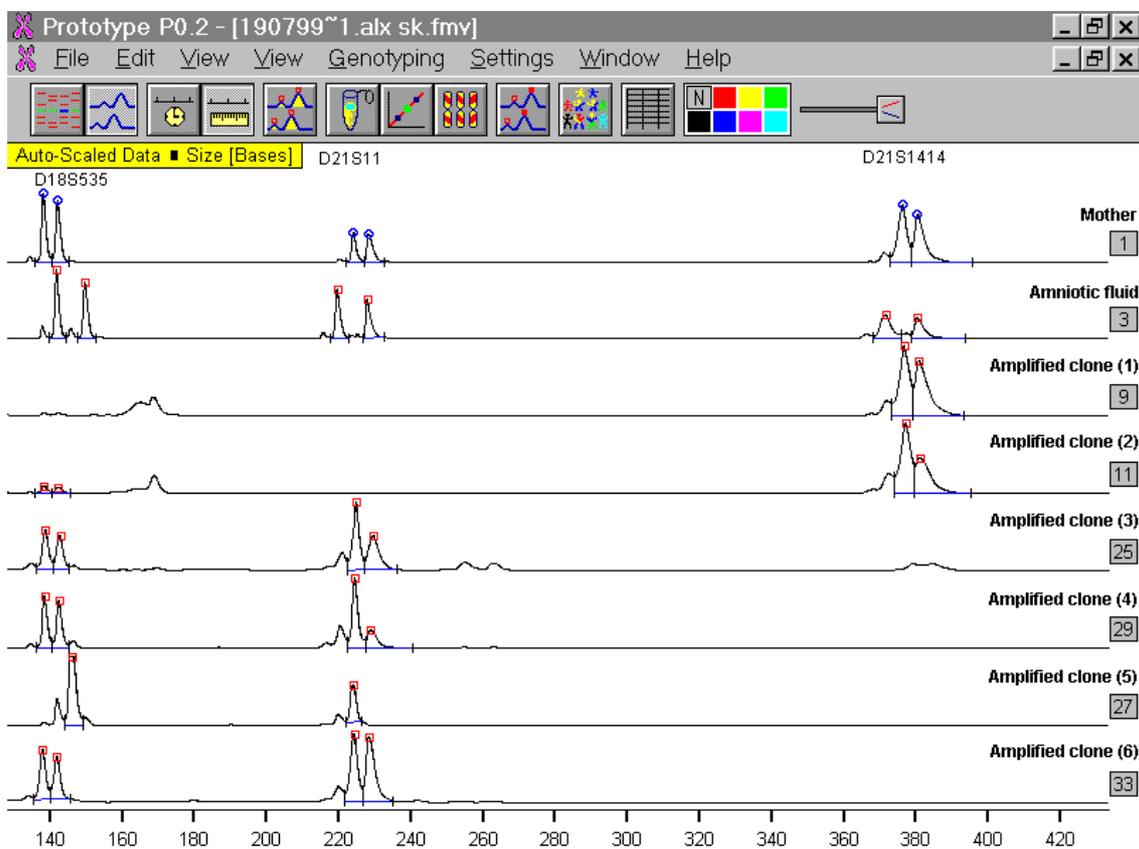


Abb. 15 PCR-Analyse angezüchteter Kolonien mit Anhalt für Kontamination und präferentielle Amplifikation (Erklärung siehe Text)

Drei Kolonien von zwei Patientinnen (Pat. 6 und 8) zeigte eine Kontamination (bei korrekter Negativkontrolle des Ansatzes). Bei drei Patientinnen (Pat. 4, 6 und 11) fanden sich Kolonien mit Anzeichen von präferentieller Amplifikation, also mit diallelischem Muster, wobei von einem Allel deutlich mehr PCR-Produkt gemessen wurde als von dem zweiten (siehe Abb 16). Vier Patientinnen (Pat. 3, 5, 7 und 8) zeigten Kolonien mit einem maternalen und einem weiteren Allel, das nicht in der Fruchtwasser-DNS nachweisbar war. Alle diese vier

Patientinnen hatten vorangegangene Schwangerschaften gehabt. Tabelle 14 zeigt die Zusammenfassung der Auswertung der angezüchteten und amplifizierten Kolonien.

Pat.	amplif. Kolonien	fetale Kolonien	gemischte Kolonien	ein mat. Allel	Kontamination	präfer. Amplif.	kein PCR-Produkt
1	381	2 (0,5%)	7	0	0	0	15 (3,9%)
3	252	0	8	13	0	0	6 (2,4%)
4	293	2 (0,7%)	8	0	0	8	12 (4,1%)
5	439	4 (0,9%)	9	33	0	0	9 (2,1%)
6	597	0	0	0	2	36	14 (2,3%)
7	152	0	1	1	0	0	6 (3,9%)
8	76	0	0	1	1	0	3 (3,9%)
9	234	0	1	0	0	11	14 (6,0%)
10	144	0	0	0	0	0	6 (4,2%)
12	114	2 (1,7%)	0	0	0	0	3 (2,6%)
13	144	0	1	0	0	0	7 (4,9%)
14	150	0	1	0	0	0	4 (2,7%)

Tab. 14 Molekulare Untersuchung der aus dem mütterlichen Blut angezüchteten Kolonien. Pat. 2 und 11 hier nicht aufgeführt, da nicht-informativ (identischer mütterlicher und fetaler Genotyp bezüglich der verwendeten Marker).

DISKUSSION

Der Begriff "Plazentaschranke" beschreibt den grundsätzlichen Aufbau der menschlichen Plazenta. Das maternale Blut umfließt die fetalen Chorionzotten zum Austausch von gelösten Stoffen, ohne daß es dafür zu einer Vermischung fetalen und mütterlichen Blutes kommt. Allerdings ist diese Plazentaschranke beim Menschen auch für Zellen nicht völlig undurchlässig, was seit über 100 Jahren bekannt ist (Schmorl 1893).

Fetale Zellen gelangen in normalen Schwangerschaften in geringer Zahl in den mütterlichen Kreislauf und sind dort direkt oder über die durch sie ausgelöste Phänomene indirekt nachweisbar. Spätestens wenn der intervillöse Raum des Chorions von mütterlichem Blut durchströmt ist, möglicherweise aber noch früher tritt das mütterliche Blut in engen Kontakt mit fetalen Zellen. Die trennenden Lagen am Chorion frondosum bestehen, angrenzend an den intervillösen Raum, aus den Schichten der Synzytiotrophoblast-Zellen, der Zytotrophoblast-Zellen und der Basalmembran, der schließlich im Zotteninneren das mesenchymale Stroma mit den fetalen Blutgefäßen folgt. Das Chorion laeve andererseits liegt der Schleimhaut des Uteruscavums an.

Die "Plazentamembran" als Austauschfläche wird mit zunehmender Verzweigung des Chorions im Verlauf der Schwangerschaft immer dünner, so daß die terminalen Zotten schlanker und der Anteil der fetalen Kapillaren größer wird (Jackson 1992). Die dünne Membran wird von den zu Schleifen aufgeworfenen fetalen Gefäßen mit zunehmendem Blutfluß und -druck vorgewölbt (Sutton 1990). Die Zellschicht an der zum maternalen Blut gewandten Oberfläche wird sehr dünn (Boyd 1966; Hamilton 1966), bleibt aber in der normalen Schwangerschaft, zumindest soweit morphologisch nachweisbar, immer erhalten und verhindert so eine direkte Vermischung größerer Mengen fetaler Zellen mit dem mütterlichen Blut. Dennoch gelangen, möglicherweise über Mikrotraumen, fetale Zellen in die mütterliche Zirkulation.

Es kommen verschiedene Zelltypen mit fetalem Genotyp, die intakt in die mütterliche Zirkulation gelangen könnten, für eine pränatale genetische Untersuchung in Betracht. Dies sind die Zellen von der Oberfläche der Plazenta, die Trophoblastzellen der mehrkernigen Synzytiotrophoblast-Lage sowie der einkernige Zytotrophoblast, insbesondere auch der extravillöse Zytotrophoblast, der die maternale Schleimhaut invadiert und zum Teil in Klumpen in den maternalen Gefäßlumina zu finden ist. Für Trophoblastzellen als mögliches

Ziel spricht, daß sie als erste mit dem mütterlichen Blut in Kontakt treten und daß im Verlauf der Schwangerschaft die Oberfläche der Plazenta auf über 10m² ansteigt (Benirschke 1990).

Mit dem Wachstum des Feten nimmt auch das fetoplazentare Blutvolumen zu. Im Mittel liegt es in der 16. SSW bei 20ml und erreicht am Termin 300ml. Durch Abschilferung der oberflächlichen Lagen des Chorion frondosum können akzidentell die fetalen Blutgefäße im Kern der Zotten eröffnet werden, so daß es zu einer fetomaternalen Blutung kommt. Damit sind die im embryonalen und fetalen Blut zirkulierenden kernhaltigen Zellen die zweite Gruppe möglicher Zielzellen.

Das ursprüngliche Interesse am Zellverkehr an der Plazentaschranke galt hypothetischen mütterlichen Zellen, die in den fetalen Kreislauf eindringen und dort Störungen der Schwangerschaft auslösen könnten sowie dem Phänomen der Immunisierung durch paternal geerbte Eigenschaften des Feten. In Mausexperimenten zeigte Loewenstein (1971), daß zwar bereits durch Inokulation mit nur 100 Leukämiezellen die Erkrankung bei neugeborenen Mäusen ausgelöst werden konnte. Wurden aber gesunde schwangere Mäuse mit Leukämiezellen inokuliert, kam es nie zu Übertragung auf den Feten.

Manche Frauen entwickeln während der Schwangerschaft Antikörper gegen Eigenschaften, die der Fetus paternal geerbt hat. Rhesus-negative Frauen können Antikörper gegen die Rhesus-D-Eigenschaft von fetalen roten Blutzellen bilden und damit eine schwere fetale Erkrankung, die Erythroblastosis fetalis, auslösen. Dabei gehen maternale Antikörper auf das Ungeborene über und verursachen eine ausgeprägte Anämie bis hin zur universellen Ödembildung und Tod (Levine 1941, Zipursky 1967). Die Existenz dieses Krankheitsbilds stützt die These, daß fetale Blutzellen in die mütterliche Zirkulation übertreten. Aber nur 17% der rhesus-D-negativen Frauen entwickeln durch ihrer ersten Schwangerschaft mit einem Rhesus-D-positiven Feten detektierbare anti-D-Antikörper, wenn keine Prophylaxe durch "passive Immunisierung" (prophylaktische Gabe von Rh-D-Immunglobulin) durchgeführt wird (Mollison 1993). Dies gibt einen Anhalt über die Häufigkeit spontaner, immunologisch relevanter feto-maternaler Transfusionen und spricht gegen einen regelhaften Übertritt fetaler Zellen in größerer Zahl (Bowman und Pollock 1987; Mollison 1987).

Aufgrund dieser Überlegungen wurden verschiedene Ansätze verfolgt, um fetale Zellen aus der mütterlichen Zirkulation nachzuweisen bzw. zu isolieren. Der Nachweis des fetalen Ursprungs an vermuteten fetalen Zellen kann mit unterschiedlichen Methoden erfolgen:

- histomorphologisch: mehrkernige Synzytiotrophoblastzellen, Zytotrophoblastzellen
- DNS: väterlich ererbte Allele (alle fetalen Zellen), z.B. polymorphe DNS-Marker, Y-Chromosom-spezifisches Material bei männlichen Feten, Chromosom-spezifische DNS-Sequenzen für in-situ-Hybridisierung (z.B. FISH), Aneuploidie
- RNS für fetales Hämoglobin (HbF) oder HLA-G (Trophoblastzellen)
- Protein: embryonales (ϵ - oder ζ -Hämoglobinketten) oder fetales Hämoglobin (γ -Hb-Ketten) (fetale Blutzellen); Oberflächeneigenschaften wie Glycophorin A oder CD 71 (Transferrinrezeptor; fetale Blutzellen)

Zum Nachweis fetaler genetischer Marker aus dem mütterlichen Blut sind Verfahren ohne Anreicherung, mit relativer Anreicherung oder mit absoluter Anreicherung denkbar. Im ersten Fall müssen spezifische und besonders sensitive Verfahren angewendet werden, um eine Minoritätspopulation (fetale Zellen) vor dem Hintergrund einer überwiegenden, die Diagnostik störenden Majoritätspopulation (maternale Zellen) zu identifizieren.

Fetale kernhaltige Zellen sind im mütterlichen Blut sehr stark verdünnt, können aber aus der mütterlichen Zirkulation angereichert werden (Herzenberg 1979). Man geht davon aus, dass in einem Milliliter maternalen Blutes eine fetale kernhaltige Zelle enthalten ist, entsprechend einer fetalen in 10^6 maternalen Zellen (Bianchi 1997). Für die Anreicherung kernhaltiger fetaler roter Blutzellen (NRBC) wurden verschiedene Antikörper untersucht. Diese Ansätze haben zu erfolgreichen Diagnosen des fetalen Geschlechts, von fetalen Aneuploidien und auch Einzelgenstörungen geführt (Bianchi 1990, Elias 1992, Gänshirt-Ahlert 1993, Sekizawa 1996, Cheung 1996). In chromosomal gestörten Schwangerschaften scheinen mehr fetale Zellen in die mütterliche Zirkulation zu gelangen, wie die Ergebnisse von Elias (1992: 74% Trisomie-21-Zellen in der sortierten Fraktion) und Gänshirt-Ahlert (1993), Bianchi (1997) (bis 650 fetal NRBCs in 20ml Blut bei Trisomie 21, damit fast sechsmal mehr als bei chromosomal normalen Feten) zeigen.

Für die Suche nach fetalen Zellen aus dem mütterlichen Blut ist neben ihrer geringen Zahl zusätzlich die Anwesenheit einer großer Zahl kontaminierender maternaler Zellen hinderlich. Lo und Mitarbeiter (1989) konnten allerdings zeigen, daß auch aus dem unangereicherten peripherem Venenblut von Schwangeren DNS von fetalen Zellen (sog. Minoritäts-Population), und zwar Sequenzen des fetalen Y-Chromosoms, amplifiziert werden konnten, wenn die Schwangere einen männlichen Feten trug. Der Nachweis des Y-Chromosoms bietet sich zum Nachweis der Anwesenheit fetaler Zellen an. Dies darf natürlich nicht im Sinne einer beabsichtigten Geschlechtsselektion oder so mißverstanden werden, daß nur bei

männlichen Feten basierend auf fetalen Zellen aus dem mütterlichen Blut eine Diagnostik durchgeführt werden könnte.

Auch andere genetische Eigenschaften des Feten, die der Mutter fehlen, wie zum Beispiel die Rhesus-D-Eigenschaft bei rhesus-negativen Schwangeren, oder paternal geerbte Hämoglobinopathien sind mit diesem Ansatz nachgewiesen worden (Lo 1993, Camaschella 1990). Allerdings bleibt besonders bei einer Anwendung wie dem Rhesus-D-Nachweis, aus dem auch klinische oder therapeutische Konsequenzen gezogen werden könnten, der mögliche Kritikpunkt, daß aus dem Fehlen des Nachweises der Eigenschaft auf ein Fehlen der Eigenschaft geschlossen wird.

Mit einer sehr sensitiven PCR untersuchte Lo (1989) Blutproben von 19 Schwangeren, von denen 12 einen männlichen Fetus trugen, und konnte das Geschlecht in allen Fällen korrekt identifizieren. Dabei konnte das Testsystem eine männliche unter 10^5 kernhaltigen weiblichen Zellen erkennen. Diese Methode bzw. das Kollektiv waren nicht geeignet, Aussagen über den fetalen Zelltypen und ihr Auftreten im Verlauf der Schwangerschaft zu machen.

Wir untersuchten ein Kollektiv von genau datierten Schwangerschaften und entnahmen wiederholt periphere Venenblutproben, deren zellulären Bestandteilen wir auf die Anwesenheit von Zellen mit Y-Chromosom-DNS analysierten. Bereits in der fünften Woche nach der letzten Periodenblutung, also wenige Tage nach Ausbleiben der Regelblutung, konnten wir im Blut Schwangerer, die später einen Jungen zur Welt brachten, so fetale Zellen nachweisen. Spätestens nach 7 SSW waren in allen Schwangerschaften mit dieser Methode fetale Zellen nachweisbar. Der Nachweis erfolgte nur bei tatsächlichem Vorliegen männlicher Feten, es gab also keine falsch-positiven Fälle. Alle "männlichen Schwangerschaften" waren bis kurz nach, nicht aber zwei Monate nach der Geburt damit diagnostizierbar.

Mit der dabei verwendeten Methode war es nicht möglich, die Menge fetalen Materials pro Volumeneinheit mütterliches Blut abzuschätzen oder direkte Aussagen zum nachgewiesenen Zelltyp zu machen. In der Frühschwangerschaft überwiegt zunächst die Masse des Chorions die des eigentlichen Embryos. Durch die invasive Natur der Trophoblastzellen, die das Chorion in der Dezidua verankern, aber auch in mütterliche Gefäße einwachsen, kommen sie als erste mit dem mütterlichen Blut in Kontakt. Da die fetoplazentare Perfusion erst mit Etablierung des fetalen Herzschlages, Ausbildung des Gefäßsystems und der Vaskularisierung der Chorionzotten für eine zu postulierende fetomaternal Blutung die Voraussetzungen schafft, erscheinen die Trophoblastzellen in diesem frühen Schwangerschaftsstadium als die

wahrscheinliche Quelle des fetalen Materials. Mit dem fetalen Größenwachstum nimmt auch das fetoplazentare Blutvolumen zu. Fetale Blutzellen könnten daher nach dem ersten Trimester mehr zum fetalen genetischen Material in der mütterlichen Zirkulation beitragen.

Die Ergebnisse der PCR-Studie aus mütterlichem Blut können zum Verständnis der Physiologie fetaler Zellen in der mütterlichen Zirkulation beitragen. Sie belegen die Vermutung, daß auch in normalen Schwangerschaften und im gesamten Verlauf der Schwangerschaft fetale Zellen im mütterlichen Blut zirkulieren und nach der Schwangerschaft wieder geklärt werden.

Die meisten Gruppen, die fetale Zellen aus dem mütterlichen Blut zur genetischen Diagnostik suchen, konzentrieren sich auf fetale kernhaltige Blutzellen ("nucleated red blood cells", NRBC). Mit diesem Ansatz konnten erfolgreich fetale Chromosomenstörungen und paternale Eigenschaften erkannt werden. Zur vollständigen Diagnostik, wie sie z.B. aus einer Fruchtwasserpunktion möglich ist, darf aber keine mütterliche Kontamination vorliegen.

Selbst wenn fetale Zellen aus dem mütterlichen Blut angereichert werden können, müßten sie durch spezifische Marker identifiziert werden. Keiner der heute verfügbaren Marker wird ausschließlich auf fetalen und niemals auf adulten Zellen gefunden. Bezüglich der nukleierten roten Blutzellen kommt aber der Nachweis der frühesten, z.T. embryonalen Hämoglobinformen dem nahe. Wang (2000) reicherten Zellen aus dem mütterlichen Blut durch FACS mittels Antikörper gegen die γ - und ζ -Ketten des Globinmoleküls an. Sie fanden in peripheren Blutproben einer Risikoschwangeren nach 7 SSW keine, nach 11 SSW eine ζ -positive sowie nach 20 SSW 12 γ -positive Zellen. Durch zwei konsekutive Anwendungen von Zweifarben-FISH konnte eine unbalanzierte Translokation bei den so identifizierten fetalen Zellen korrekt ausgeschlossen werden.

Aufgrund des frühen Auftretens fetaler Marker in der PCR-Untersuchung untersuchten wir ein mögliches Anreicherungssystem für Trophoblastzellen mittels magnetischer Zellsortierung mit Antikörpern gegen den EGF-Rezeptor. Nach Anpassung der Reaktionsverhältnisse für die Verwendung an Blutleukozyten konnte mit diesem Ansatz zwar im Modellsystem eine gewisse Anreicherung gezeigt werden. Es wurde dann in Blutproben von gesunden schwangeren Frauen aus dem zweiten Trimester der Nachweis des Y-Chromosoms in den angereicherten Zellen mittels FISH versucht, um damit die Anwesenheit von männlichen Zellen im Blut zu beweisen. Dabei konnten jedoch keine fetalen Zellen gefunden werden. Die wahrscheinlichsten Ursachen dafür sind eine zu geringe Anreicherung

und der relativ hohe Verlust bei der magnetische Zellsortierung. Weiterhin erlaubte die Rate an unspezifischen FISH-Signalen, also das Auftreten scheinbar "fetaler" (männlicher) Zellen in den Negativkontrollen (weibliche Interphasenkerne) mit einer Häufigkeit von 01,-0,2% keine Detektion von Ereignissen mit dieser oder geringerer Inzidenz.

Ein alternativer Ansatz ist die Untersuchung fetaler Zellen, die von der Oberfläche des Chorions zum Uteruscavum hin "abgeschilfert" werden. Bevor dieser Raum zwischen Chorion laeve und Dezidua capsularis obliteriert, können aus ihm Trophoblastzellen mit dem von der mütterlichen Mucosa produzierten Schleim in den Zervikalkanal und bis in die Scheide gelangen. Ihre Anwesenheit in der ersten Schwangerschaftshälfte ist wiederholt nachgewiesen worden. An Proben aus dem zervikalen Schleim war schon einmal die Diagnose einer Chromosomenstörung gestellt worden, allerdings nach einem vorangegangenen invasiven Eingriff (Adinolfi 1993).

Wir untersuchten verschiedene Methoden der Gewinnung des zervikalen Schleims, die Auswirkung der Probenentnahme auf den Fortgang der Schwangerschaften und insbesondere die molekulare Detektierbarkeit fetaler Eigenschaften mittels PCR und FISH. Wir nutzten zum Nachweis von fetalen Zellen Interphase-FISH mit Sonden für das X- und das Y-Chromosom bei männlichen Feten. Im Vergleich der Aspiration von Schleim vom äußeren Muttermund mit der Lavage vom inneren Muttermund fanden wir ähnlich häufig fetale Zellen. Die weniger invasive Methode der Schleimaspilation vom äußeren Muttermund scheint sich nicht negativ auf den Fortgang der Schwangerschaften bis zur Geburt auszuwirken, wie die Nachuntersuchung von 275 Patientinnen zeigte, wenn auch nicht alle Patientinnen nachverfolgt werden konnten. Mit der Ausnahme einer kurzzeitigen Nachbeobachtung von einer Woche nach Entnahme von Zervixschleim (Rhine 1977) fehlten bisher prognostische Daten über den Schwangerschaftsverlauf nach Probenentnahme.

Darüber hinaus können aus dem Schleim vom äußeren Muttermund mittels Mikromanipulation bei einer einmalig durchgeführten Aspiration in der Frühschwangerschaft etwa bei jeder dritten Patientin einige wenige rein fetale Isolate gewonnen werden. Mit dieser Methode führten wir die erste nicht-invasive Diagnostik einer in der Plazenta bestätigten fetalen Chromosomenanomalie an fetalen Zellen aus dem Zervixschleim mittels FISH und PCR durch.

Die geringe Konzentration fetaler Zellen in mütterlichem Blut kann durch Anreicherungsverfahren erhöht werden. Dabei gehen jedoch auch fetale Zellen verloren, d.h. ihre absolute

Anzahl geht zurück. Es erscheint unrealistisch, daß ein Antikörper-gestütztes Anreicherungsverfahren fetale Zellen so rein selektieren könnte, daß eine mütterliche Kontamination z.B. in Hinblick auf Einzelgndefekte ausgeschlossen wird. Dieses Problem kann nur gelöst werden, wenn auf der Basis einzeln als fetal identifizierter Zellen an diesen weitere Diagnostik möglich ist. Entweder kann gleichzeitig mit der Identifikation des fetalen Ursprungs eine diagnostische Aussage getroffen werden (z.B. durch Multiplex-PCR-Untersuchung oder durch Immunophänotypisierung, also Färbung mit einem eindeutigen fetalen Marker und gleichzeitige Untersuchung des Chromosomenkomplements mittels FISH), oder dieselbe Zelle wird mehreren Tests hintereinander unterzogen ("cell recycling", z.B. sequentielle Untersuchung mit PCR und FISH).

Eine mögliche Alternative durch absolute Vermehrung der fetalen Zellen in Zellkolonien, in denen die fetalen Zellen ausreichend rein enthalten sind, um z.B. molekular untersuchbar zu sein, wurde im Ansatz der klonalen Anzüchtung fetaler Blutzellen aus dem mütterlichen Blut realisiert. Die Idee, die Wachstumspotenz fetaler Blutzellen auszunützen, um ihre absolute Zahl in Hinblick auf eine Diagnostik zu erhöhen, wurde erstmals von Lo (1994) formuliert und getestet.

Wir verwendeten einen modifizierten Ansatz, indem wir aus peripheren Blutproben von gesunden schwangeren Frauen alle mit hämatopoetischen Wachstumsfaktoren stimulierbaren Zellen anzüchteten. In den verwendeten halbfesten Medien wuchsen Kolonien an, von denen eine große Zahl einzeln aufgenommen und mit PCR untersucht wurde. Neben den bei weitem überwiegenden maternalen Kolonien konnten bei vier von zwölf Frauen auch rein fetale Kolonien nachgewiesen werden.

Das Anwachsen von Kolonien, also von bis zu ca. 2000 erbgleichen Zellen, dreht die sonst übliche Situation "eine fetale Zelle in einem Meer mütterlicher Zellen" praktisch um. Die relativ hohe Anzahl fetaler Zellen ermöglicht theoretisch den Nachweis jeder genetischen Eigenschaft, die in diesen Zellen vorhanden ist. Allerdings stellten sich auch verschiedene mögliche Probleme dar. Die verwendete Methode des "Herauspipettierens" einzelner Kolonien stellt keine Mikromanipulation im engsten Sinn dar, und die untersuchten Kolonien sind damit nicht strikt klonal. Darauf weisen die als "gemischt fetal-maternal" bezeichneten Kolonien hin. Mit noch größerem Aufwand wäre allerdings die Isolation und Untersuchung einzelner Zellen aus den Kolonien möglich.

Hämatopoetische Stammzellen können über das Oberflächenantigen CD34 angereichert werden, und CD34 wurde auch zur Anreicherung fetaler Zellen verwendet (Bianchi 1996; Coata 2001). Dabei zeigte sich aber, daß offenbar aus vorausgegangenen Schwangerschaften fetale Zellen über einen langen Zeitraum -in der Studie von Bianchi (1996) bis 27 Jahre- persistieren. Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, daß dies nur durch Etablierung eines oder mehrerer Klone des ehemaligen Feten in der Mutter erklärlich wäre. Diesem Gedanken entsprechen auch die Daten von Nelson (1998), die zeigen, daß in Sklerodermie-Läsionen von Frauen, die zuvor eine Jungen zur Welt gebracht hatten, männliche DNS und mittels FISH sogar ganze männliche Zellen in den Hautveränderungen gefunden werden konnten. In einem kürzlich erschienen Bericht werden histomorphologisch normale Schilddrüsenfollikel einer an Thyreoiditis erkrankten Frau, die einen Sohn zur Welt gebracht hatte, beschrieben, die vollständig aus männlichen Zellen bestanden (D. Bianchi, pers. Mitteilung).

In unserer Studie wurden neben der geringen Rate an Kontamination und der Verunreinigung einzelner fetaler Kolonien durch ein zweites mütterliches Allel auch Muster gefunden, die mit der Mutter haplo-identisch, aber vom fetalen Genotyp verschieden waren. Diese Muster könnten einerseits als Kontamination mit zufälliger Konkordanz eines Allels mit dem mütterlichen Genotyp erklärt werden. Aber sie könnten auch auf persistierende Klone aus vorangegangenen Schwangerschaften hindeuten.

Durch Anreicherung von CD34-positiven Stammzellen mittels magnetischer Zellsortierung allein oder gefolgt von einer Anzüchtung in halbfesten Medien gelang Coata et al. (2001) kürzlich die Diagnose von Aneuploidien an fetalen Stammzellen aus dem mütterlichen Blut. Auch sie fanden persistierende fetale Zellen nach Schwangerschaften (über den Nachweis des Y-Chromosoms), und zwar bei drei von 13 Frauen. Weiterhin wurde untersucht, ob in der Mutter verbliebene Zellen einer vorangegangenen Schwangerschaft bei diesem Ansatz eine korrekte Diagnose an fetalen Stammzellen der aktuellen Schwangerschaft erschweren oder unmöglich machen. Unter den angezüchteten Zellen waren diese mit PCR vor Anzüchtung detektierten persistierenden Zellen nicht mehr nachweisbar; die Anzüchtung von CD34-positiven Zellen schien fetale Zellen relativ zu selektieren. Diese Gruppe nutzte jedoch nicht die Möglichkeit der Untersuchung einzelner Kolonien.

Im Mausmodell wurden fetale Zellen auch nach Ende der Schwangerschaft über die Anwesenheit eines im Muttertier sonst fehlenden Markerchromosoms in der Milz und im Knochenmark gefunden. In der Milz stellten fetale Zellen sogar 3-6% aller Zellen (Gaillard 1978). Auch beim Menschen ist in anderem Kontext ein Chimärismus nach Zell- oder

Organübertragung beschrieben, nämlich nach Knochenmarkstransplantation, aber auch nach Leber-Transplantation (Sakamoto 1997).

Gewisse fetale Zellen, möglicherweise fetale Stammzellen, scheinen über die Dauer einer Schwangerschaft hinaus im mütterlichen Organismus zu persistieren. Dabei scheinen sie ein pathologisches, aber auch ein möglicherweise günstiges Potential im Sinne der Induktion einer Immuntoleranz, aber auch möglicher "Kompensationseffekte" zu haben. Alle vier Schwangere in unserer Studie mit den oben genannten haplo-identischen Kolonien waren zuvor ein oder mehrere Male schwanger gewesen. Weitere Untersuchungen über die möglichen Allele dieser Schwangerschaften konnten bei ihnen leider nicht durchgeführt werden.

Die Abbildung 16 zeigt die hypothetisch möglichen Wege fetaler Zellen und fetaler DNS im mütterlichen Organismus.

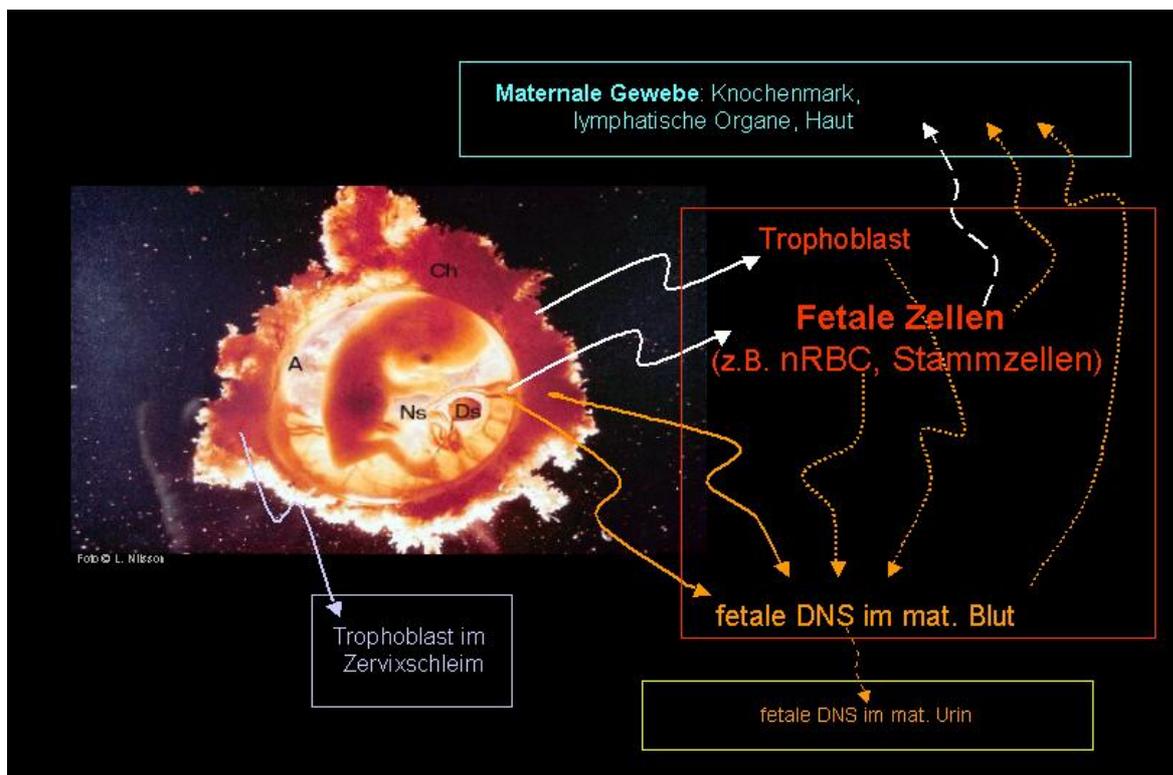


Abb. 16 Mögliche Wege fetaler Zellen und fetaler DNS im mütterlichen Organismus während und nach der Schwangerschaft (Mikrophotographie: modifiziert nach L. Nilsson)

Sowohl aus dem Plasma als auch aus dem Serum, also dem zellfreien Überstand aus peripherem Blut von schwangeren Frauen können in Schwangerschaften mit männlichen oder Rhesus-D-positiven Feten Sequenzen des Y-Chromosoms bzw. des Rh-D-Gens nachgewiesen

werden (Lo 1997, Pertl 2000, Zhong 2000). Weiterhin erschien vor kurzem ein Bericht, der den Nachweis von Fragmenten fetaler DNS sogar im mütterlichen Urin belegt (Botezatu 2000). Es wurde spekuliert, daß der Urin ein Weg für den Körper sein kann, um DNS von zugrundegegangenen Zellen zu eliminieren ("catching DNA on the way out", Lo 2000). Welche Bedeutung diese Techniken über den Nachweis paternal geerbter Eigenschaften für eine mögliche pränatale genetische Diagnostik haben, muß weiter untersucht werden.

Mit der Veränderung der Bevölkerungs- und Familienstruktur, aber auch den diagnostischen Möglichkeiten ändert sich der Anspruch an die vorgeburtliche Diagnostik und der Umfang ihrer Inanspruchnahme. Im Mittel steigt das elterliche Alter bei Geburt des ersten und oft einzigen Kindes, und gleichzeitig wird die Normalität dieses Kindes manchmal nahezu eingefordert. Diesem Anspruch stehen die begrenzten therapeutischen Möglichkeiten gegenüber.

Neben den mütterlichen Untersuchungen kann der Fetus auf nicht-invasive Weise am besten durch Ultraschall untersucht werden. Allerdings ist der vorgeburtliche Ultraschall meist ein Screeningtest, der für viele Störungen nicht diagnostisch ist. Für die häufigste angeborene Chromosomenstörung, die zu geistiger Behinderung führt, die Trisomie 21 (Hook 1983), weisen das klassische Altersscreening, aber auch der Ultraschall nur eine begrenzte Sensitivität aus (Benacerraf 1999). Ein echter diagnostischer Test wie die Fruchtwasseruntersuchung birgt allerdings das Risiko eines invasiven Eingriffs. Bei den vorgeburtlichen Untersuchungen für Chromosomenstörungen hat sich ein zweistufiges Vorgehen etabliert. Bei Auffälligkeiten in einem Such- oder Screeningtest kann ein diagnostischer Test erfolgen, der nur dieser Risikogruppe angeboten werden muß. Dies bedeutet aber, daß die im Screeningtest unauffälligen Schwangeren mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit in die Gruppe der Falsch-negativen (also durch das Testergebnis zu Unrecht Beruhigten) fallen. Andererseits können aber nicht alle Schwangeren z.B. eine Fruchtwasseruntersuchung oder eine Chorionzottenbiopsie erhalten, da neben den entstehenden Kosten durch die invasiven Eingriffe mehr Schwangerschaften verloren gingen, als von der gesuchten Störung betroffen sind. Als beste Screeningtests für fetale chromosomale Aberrationen, in erster Linie für die Trisomie 21, werden gegenwärtig die gezielte Ultraschalluntersuchung zur Messung der Nackentransparenz zwischen 11+0 und 14+0 SSW allein oder in Kombination mit einem frühen Serumscreening (PAPP-A und freies β -hCG) oder das Serumscreening im zweiten Trimester, nach 15 SSW (AFP, hCG,

unkonjugierte Estriol und evtl. weitere Marker) in Betracht. Für Detektionsraten von 60% bis über 80% erfordern diese Screeningtests, daß fünf Prozent der untersuchten Population, nämlich die fünf Prozent mit den auffälligsten Testwerten und damit dem höchsten Risiko für Trisomie 21, einen diagnostischen Test erhalten.

Neue, nicht-invasive Untersuchungen fetaler genetischer Marker, z.B. an fetalen Zellen aus dem mütterlichen Blut oder dem Zervixschleim, erscheinen durch die theoretisch zumindest risikoarme Durchführung attraktiv. Jedoch muß auch ihre Anwendbarkeit an einer großen Population (alle Schwangeren) möglich sein. Dafür müssen der Angemessenheit der Untersuchung (Kann die gesuchte Störung mit der versprochenen Sicherheit/Detektionsrate erfaßt werden?) und die Durchführbarkeit in der Breite (Wie einfach ist der Test anzuwenden?) bewiesen werden. Gegenwärtig erfüllt noch keine der nicht-invasiven oder minimal-invasiven Techniken, wie sie in der vorliegenden Arbeit dargestellt wurden, diese Anforderung.

Die theoretische ideale Zielzelle zur nicht-invasiven pränatalen genetischen Diagnostik würde früh in der Schwangerschaft, möglichst bereits im ersten Trimester, und dann im gesamten Verlauf in ausreichender Zahl verfügbar sein. Sie würde aus dem mütterlichen Organismus nach Ende der Schwangerschaft rasch entfernt werden und müßte bei Feten beiderlei Geschlechts gleichermaßen nutzbar sein. Sie müßte sich möglichst durch mehrere eindeutige Merkmale, z.B. einzigartige Epitope, gegen die es spezifische Antikörper zur Anreicherung z.B. aus dem mütterlichen Blut gäbe, von den mütterlichen Zellen unterscheiden. Damit könnte sie einerseits ausreichend konzentriert und andererseits nach Anreicherung positiv identifiziert werden. Diese optimale Zielzelle hat sich bisher jedoch nicht finden lassen.

Während die PCR-Methodologie heute prinzipiell zur Routinediagnostik gehört und in vielen Bereichen aufgrund ihrer einfachen Durchführbarkeit und auch Automatisierbarkeit andere Verfahren verdrängt hat, sind manche der in dieser Arbeit vorgelegten PCR-Anwendungen für die Routine zu arbeitsaufwendig und von einer manuellen Bearbeitung abhängig. Eine Möglichkeit zur Umgehung des z.T. erheblichen personellen Aufwands für die Auswahl der zu untersuchenden Zellen und ihre genetische Analyse liegt in der Automation. Dabei sind sowohl die Selektion einzelner fetaler Zellen aus der Menge maternaler Zellen z.B. durch Verfahren der Durchflußzytometrie als auch eine automatisierte Mikromanipulation möglich. Insbesondere die Analyseschritte sind durch Pipettier-Roboter und PCR-Automaten mit einem hohen Probendurchsatz bereits realisiert. Für die Isolation von wenigen fetalen Zellen,

die auf einem Objektträger fixiert, aber durch eine spezifische Färbung hervorgehoben sind, ist eine automatisierte Bildanalyse vorstellbar.

Prinzipiell wird bei allen bisher angesprochenen Verfahren durch die Wahl z.B. der PCR- oder der FISH-Technik vor der Untersuchung bereits festgelegt (oder eingegrenzt), welche Störungen erkannt werden können. So wird durch Interphase-FISH gezielt auf numerische Aberrationen der Chromosomen 21, 18 und 13 oder durch PCR auf bestimmte Mutationen oder auch anhand einzelner Loci auf numerische Chromosomenstörungen untersucht. Die umfangreichen Aussagen der klassischen Zytogenetik werden nicht erreicht. Eine mögliche Lösung dieses Problems bieten die aus dem mütterlichen Blut angezüchteten Kolonien, von denen eine klassische Metaphasendarstellung der Chromosomen zumindest vorstellbar wäre.

Schließlich muß bedacht werden, welchen Stellenwert die Einführung einer der in dieser Arbeit beschriebenen Methoden für die klinische Betreuung von Schwangeren und ihren Familien haben könnte. Die PCR aus unangereichertem mütterlichen Blut wird wenige, aber darunter durchaus sehr relevante Fragestellungen beantworten können. Als Beispiel ist in dieser und vielen anderen Arbeiten der Nachweis Y-Chromosom-Material verwendet worden, was sich als einfacher und diskriminierender Marker aus naheliegenden Gründe anbietet, andererseits aber bei Laien oft den Verdacht auf die Absicht einer Geschlechtsselektion erweckt. Besser noch ist der Nutzen der PCR sicher am Nachweis der fetalen Rhesus-D-Eigenschaft aus dem Blut rhesus-D-negativer Schwangeren zu verdeutlichen.

Die Entnahme von zervikalem Schleim z.B. durch Aspiration vom äußeren Muttermund erscheint im Vergleich zu einer maternalen Blutentnahme zunächst invasiver. Allerdings ist z.B. die Palpation der Zervix in der Schwangerschaft durch den Gynäkologen im Rahmen der Schwangerenvorsorge ein üblicher und auch ungefährlicher Untersuchungsschritt und ebenso "nicht-invasiv" oder "minimal-invasiv" wie die Schleimaspilation. Allein körperliche Bewegung der Schwangeren kann größere mechanische Veränderungen hervorrufen: Das Aufsetzen aus der liegenden Position verstärkt das Einschwemmen trophoblastärer Element in die mütterlichen Uterusvenen meßbar. Andererseits kann die inkorrekte Anwendung der Schleimaspilation im Sinne einer blinden transzervikalen Katheteraspiration zu Schädigungen der Frucht führen (Chou 1997).

Die Anzüchtung fetaler Zellen aus dem peripheren mütterlichen Venenblut hingegen kommt der Vorstellung eines einfachen Bluttests entgegen, der schwangeren Frauen aus den üblichen Routineuntersuchungen schon bekannt ist. Dabei wurden in dieser Arbeit neben der

Vermehrung der absoluten Anzahl der fetalen Zellen diese auch als Kolonien von bis zu etwa 2000 erbgleicher Zellen angezüchtet und isoliert, was ihre molekulare Untersuchung im Gegensatz zu einzelnen fetalen Zellen erleichtern kann. Einer klinischen Einführung steht gegenwärtig der hohe manuelle Arbeitsaufwand und die lange Kulturdauer von 14 Tagen zusätzlich zur Dauer der Verarbeitungsschritte entgegen sowie die Tatsache, daß bei einer einmaligen Probenentnahme nur bei jeder dritten Schwangeren rein fetale Kolonien gefunden wurden.

Die emotionalen und sozialen Herausforderungen, die für Familien mit Kindern mit angeborenen Störungen entstehen können, haben die Entwicklung der vorgeburtlichen diagnostischen Techniken vorangetrieben. Mit der vollständigen Kartierung des menschlichen Genoms steigt die Zahl der pränatal diagnostizierbaren Störungen und damit das Verlangen nach fetalem genetischen Material zur Testung auf genetische Störungen stetig. Dabei werden sich durch die Forschung in diesem Bereich nicht nur die diagnostischen Möglichkeiten erweitern, sondern auch das Verständnis für Physiologie und Pathologie der Schwangerschaft und der Fetalentwicklung.

LITERATUR

1. Adinolfi M, Davies A, Sharif S, Soothill P, Rodeck C (1993) Detection of trisomy 18 and Y-derived sequences in fetal nucleated cells obtained by transcervical flushing. *Lancet*, 342, 403-04
2. Arnemann J, Epplen JT, Cooke HJ, Sauermann U, Engel W, Schmidtke J (1987) A human Y-chromosomal DNA sequence expressed in testicular tissue. *Nucleic Acids Res*, 15: 8713-8724
3. Attwood HO, Park WW (1961) Embolism to the lungs by trophoblast. *J Obstet Gynaecol Brit Commonw*, 68, 611-617
4. Benacerraf B (1999) Second trimester features of aneuploidy. In: Rodeck, Whittle (Hrsg.) *Fetal Medicine*. Churchill Livingstone
5. Benirschke K (1994) Anatomical relationship between fetus and mother. *Ann N Y Acad Sci*, 731: 9-20
6. Benirschke K, Kaufmann P (Hrsg.) (1990). *Pathology of the Human Placenta*. Springer, New York
7. Benirschke K, Sullivan MM (1969) The human placenta in relationship to the development of chimerism. In: *The foeto-placental unit*. Excerpta Medical Foundation, Amsterdam
8. Bevis DCA (1953) Composition of liquor amnii in haemolytic disease of newborn. *J Obstet Gynecol Brit Commonw*, 60: 244-251
9. Bhat NM, Bieber MM, Teng NN (1993) One step enrichment of nucleated red blood cells: A potential application in prenatal diagnosis. *J Immun Meth*, 158, 277-280
10. Bianchi (2001) Fetal cells in the mother (Vortrag), *Research and Development in Fetal Medicine*, The Fetal Medicine Foundation, London, September 2001
11. Bianchi D (1994) *Clinical Trials and Experience: Boston*. In: Simpson JL, Elias S (Hrsg.) *Fetal cells in maternal blood: Prospects for non invasive prenatal diagnosis*, N Y Acad Sci New York, 92-102
12. Bianchi D, Flint A.F, Pizzimenti M.F, Knoll J.H.M, Latt S.A (1990) Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 3279-3283
13. Bianchi D, Stuart JE, Garber MF, Lucotte G, Flint AF (1991) Possible effect of gestational age on the detection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood. *Prenat. Diagn*, 523-528
14. Bianchi DW Flint A, Heartline MW Latt SA (1989) Isolation of male DNA from nucleated erythrocytes (NRBC) in maternal blood. *Ped Res*, 25, 139
15. Bianchi DW, Klinger KW (1992) Prenatal diagnosis through the analysis of fetal cells in the maternal circulation. In: Milunsky (Hrsg.) *Genetic Disorders and the fetus*. Johns Hopkins University Press, Baltimore
16. Bianchi DW, Mahr A, Zickwolf GK, Houseal TW, Flint AF, Klinger KW (1992) Detection of fetal cells with 47,XY,+21 karyotype in maternal peripheral blood, *Hum Genet*, 368-370

17. Bianchi DW, Shuber AP, DeMaria MA, Fougner AC, Klinger KW (1994) Fetal cells in maternal blood: determination of purity and yield by quantitative polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol*, 171, 922-926
18. Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM, Hanson FW, Klinger KW, Shuber AP (1997) PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet*, 61, 822-829
19. Bianchi DW, Yih MC, Zickwolf GK, Flint AF (1994) Transferrin receptor (CD71) expression on circulating mononuclear cells during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 170, 202-206
20. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA (1996) Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(2):705-708
21. Bianchi DW, Zickwolf GK, Yih MC, Flint AF, Geifman OH, Erikson MS, Williams JM (1993) Erythroid-specific antibodies enhance detection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood. *Prenat Diagn*, 293-300
22. Bobrow M, Lewis B.V (1971) Unreliability of fetal sexing using cervical material. *Lancet*, 2(7722):486
23. Bohmer RM, Zhen D, Bianchi DW (1998) Differential development of fetal and adult haemoglobin profiles in colony culture: isolation of fetal nucleated red cells by two-colour fluorescence labelling. *Br J Haematol*, 103(2): 351-360
24. Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, Shelepov V, Alechina R, Molyaka Y, Ananov V, Bazin I, Garin A, Narimanov M, Knysh V, Melkonyan H, Umansky S, Lichtenstein A (2000) Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. *Clin Chem*, 46: 1078-1084
25. Bowman JM, Pollock JM (1987) Failure of intravenous Rh immune globuline prophylaxis: An analysis of the reasons for such failures. *Transfus Med Rev*, 1: 101-112
26. Boyd JD, Hamilton WJ (1966) Electron microscopic observations on the cytotrophoblast contribution to the syncytium in the human placenta. *J Anat*, 100:3 535-48
27. Boyd JD, Hamilton WJ (1970) *The Human Placenta*. W. Heffer and Sons Ltd, Cambridge
28. Boyer SH, Noyes AN, Boyer ML (1976) Enrichment of erythrocytes of fetal origin from adult-fetal blood mixtures via selective hemolyses of adult blood cells: an aid to antenatal diagnosis of hemoglobinopathies. *Blood* 47, 883-897
29. Brock DJ, Sutcliffe RG (1972) Alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. *Lancet*, 2(7770):197-199
30. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, Arny M, Thomas L, Boyse EA (1989) Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(10):3828-3832
31. Burton GJ, Hempstock J, Jauniaux E (2001) Nutrition of the human fetus during the first trimester- a review. *Placenta*, 22 (Suppl A):S70-77

32. Camaschella C, Alfarano A, Gottardi E, Travi M, Primignani P, Caligaris-Cappio F, Saglio G (1990) Prenatal diagnosis of fetal hemoglobin Lepore-Boston disease on maternal peripheral blood, *Blood*, 75(11): 2102-2106
33. Carritt B, Steers FJ, Avent ND (1994) Prenatal determination of fetal RhD type. *Lancet*, 344: 205-6
34. Chen H, Griffin DK, Jestice K, Hackett G, Cooper J, Ferguson-Smith MA (1998) Evaluating the culture of fetal erythroblasts from maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Prenat Diagn*, 18(9): 883-892
35. Cheung MC, Goldberg JD, Dau Y. W (1996) Prenatal diagnosis of sickle cell anaemia and thalassaemia by analysis of fetal cells in maternal blood. *Nature Genetics*, 14 264-268
36. Chou MM, Lin AK and Ho ESC (1997) Severe limb reduction defects after uterine lavage at 7-8 weeks' gestation. *Prenat Diag*, 17: 77-80
37. Chua S, Wilkins T, Sargent I, Redman C (1991) Trophoblast deportation in pre-eclamptic pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*, 98(10): 973-979
38. Coata G, Tilesi F, Fizzotti M, Lauro V, Pennacchi L, Tabilio A, Di Renzo G.C (2001) Prenatal diagnosis of genetic abnormalities using fetal CD34+ stem cells in maternal circulation and evidence they do not affect diagnosis in later pregnancies. *Stem Cells*, 19: 534-542
39. Coleman DV (1982) Endocervical lavage in early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 142(1): 118-119
40. Covone A.E, Mutton D, Johnson P.M, Adinolfi M (1984) Trophoblast cells in peripheral blood from pregnant women. *Lancet*, 2: 841-843
41. Crandall BF, Chau C (1995). Detecting neural tube defects by amniocentesis between 11 and 15 weeks gestation. *Prenat Diag*, 15: 339-343
42. Crane JP (1983) Genetic amniocentesis. In: Studd (Hrsg) *Progress in obstetrics and gynaecology*. Churchill Livingstone, Edinburgh
43. De Grouchy J, Trebuchet C (1971) Transfusion foetomaternelle de lymphocytes sanguins et detection du sexe du foetus, *Annales de Genetique*, 14, 133-137
44. Douglas G.W, Thomas L, Carr M, Cullen N.M, Morris R (1959) Trophoblast in the circulating blood during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 78: 960-969
45. Eggeling, F, Michel, S, Gunther, M, Schimmel, B, Claussen, U (1997) Determination of the origin of single nucleated cells in maternal circulation by means of random PCR and a set of length polymorphisms. *Hum Genet*, 99, 266-270
46. Elias S, Price J, Dockter M, Tharapel A, Simpson JL (1992) First trimester prenatal diagnosis of trisomy 21 in fetal cells from maternal blood. *Lancet*, 340(8826):1033
47. Evans MI, Drugan A, Koppitch, FC, Zador I.E, Sacks AJ and Sokol RJ (1989). Genetic diagnosis in the first trimester: the norm for the 1990s. *Am J Obstet Gynecol* 160; 1332-1339
48. Firth HV, Boyd PA, Chamberlain P, MacKenzie IZ, Lindenbaum RH, Huson SM (1991) Severe limb abnormalities after chorionic villus sampling at 56-66 days gestation. *Lancet*, 337: 726-63

49. Firth HV, Boyd PA, Chamberlain P, MacKenzie IZ, Moriss-Kay GM and Huson SM (1994) Analysis of limb reduction defects in babies exposed to chorionic villus sampling at 56-66 days gestation. *Lancet*, 343: 1069-1071
50. Froster UG, Jackson L (1996) Limb defects and chorionic villus sampling: results from an intermation registry, 1992-4. *Lancet*, 347: 489-494
51. Gaillard MC, Ouvre E, Liegeois A, Lewin D (1987) [The concentration of fetal cells in maternal haematopoietic organs during pregnancy. An experimental study in mice] *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 7(6):1043-50
52. Gänshirt-Ahlert D, Börjesson-Stoll R, Burschik M, Dohr A, Garritsen HSP, Helmer L, Miny P, Velasco M, Walde C, Patterson D, Teng N, Bhatt NM, Bieber MM, Holzgreve W (1993) Detection of fetal trisomies 21 and 18 from maternal blood using triple gradient and magnetic cell sorting. *Am J Reprod Immun*, 30: 194-201
53. Goldberg M, Chen A.T.L, Ahn Y.W, Reidy J.A (1980) First-trimester fetal chromosomal diagnosis using endocervical lavage: a negative evaluation, *Am J Obstet Gynecol*, 138, 436-440
54. Goldstein AI, Lukesh RC, Ketchum M (1973) Prenatal sex determination by fluorescent staining of the cervical smear for the presence of a Y chromosome: an evaluation. *Am J Obstet Gynecol*, 115 (6): 866
55. Griffith-Jones MD, Miller D, Lilford RJ, Scott J, Bulmer J (1992) Detection of fetal DNA in trans-cervical swabs from the first trimester of pregnancies by gene amplification: a new route to prenatal diagnosis? *Br. J. Obstet. Gynaecol*, 99, 508-11
56. Hackett GA, Smith JH, Rebello MT, Gray CTH, Rooney DE, Beard RW, Loeffler FE, Coleman DV (1991) Early amniocentesis at 11-14 weeks' gestation for the diagnosis of fetal chromosomal abnormality: a clinical evaluation. *Prenat Diagn*, 11: 311-315
57. Hamilton WJ, Boyd JD (1966) Trophoblast in human utero-placental arteries. *Nature*, 212: 906-908
58. Handyside AH and Delhanty JDA (1997) Preimplantation genetic diagnosis: strategies and surprises. *T I G*, 13(7): 270-275
59. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RML (1990) Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*, 344: 768-770
60. Harper JC, Coonen E, Ramaekers FCS, Delhanty JDA, Handyside AH, Winston RML, Hopman AHN (1994) Identification of the sex of human preimplantation embryos in two hours using an improved spreading method and fluorescent in situ hybridisation using directly labelled probes. *Hum Reprod*, 9: 721-724
61. Hassan MW, Lutton JD, Levere RD, Rieder RF, Cederqvist LL (1979) In vitro culture of erythroid colonies from human fetal liver and umbilical cord blood. *Br J Haematol*, 41(4): 477-84
62. Herzenberg LA, Bianchi DW, Schröder J, Cann HM, Iverson GM (1979) Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting, *Proc Nat Acad Sci USA*, 76: 1453-1455

63. Holzgreve W, Gänshirt-Ahlert D, Burschik M, Horst J, Miny P, Gal A, Pohlschmidt M (1990) Detection of fetal DNA in maternal blood by PCR. *Lancet*, 335: 1220-1221
64. Hook EB, Cross PK, Schreinemachers DM (1983) Chromosomal abnormality rates at amniocentesis and in live-born infants. *JAMA*, 249(15): 2034-2038
65. Iklé F.A (1961) Trophoblastzellen im strömenden Blut, *Schweiz. Med. Wochenschr*, 91, 934-945
66. Iklé F.A (1964) Dissemination von Syncytiotrophoblastzellen in mütterlichen Blut während der Gravidität, *Bull. Schweiz. Akad. Med. Wissensch*, 20, 62-72
67. Iverson GM, Bianchi DW, Cann H., Herzenberg LA (1981) The detection and isolation of fetal cells from maternal blood using the fluorescence-activated cell sorter (FACS). *Prenat Diagn*, 1: 61-73
68. Jäämeri KEU, Koiveusemi AP, Carpen EO (1965) Occurrence of trophoblasts in the blood of toxæmic patients. *Gynaecologica*, 315-320
69. Jackson MR, Mayhew TM, Boyd PA (1992) Quantitative description of the elaboration and maturation of villi from 10 weeks of gestation to term. *Placenta*, 13: 357-370
70. Jauniaux E, Jurkovic D, Gulbis B, Gervy C, Ooms HA, and Campbell S (1991) Biochemical composition of exocoelomic fluid in early human pregnancy. *Obstet Gynecol*, 78: 1124-1128
71. Jurkovic D, Jauniaux E, Campbell S, Pandya P, Cardy DL and Nicolaides KH (1993) Coelocentesis: a new technique for early prenatal diagnosis. *Lancet* 341; 1623-1624
72. Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF 3rd (1986) Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology*, 118(4):1567-82
73. Kögler G, Callejas J, Hakenberg P, Anczmann J, Adams O, Daubener W (1996) Hematopoietic transplant potential of unrelated cord blood: critical issues. *J Hematother*, 5: 105-116
74. Kwok S, Higuchi R (1989) Avoiding false positives with PCR, *Nature*, 339: 237-238
75. Linch DC, Knott LJ, Rodeck CH, Huehns ER (1982) Studies of circulating hemopoietic progenitor cells in human fetal blood. *Blood*, 59(5): 976-979
76. Lo YM, Bowell PJ, Sellinger M, Mackenzie IZ, Chamberlain P, Gillmer MD, Littlewood TJ, Fleming KA, Wainscoat JS (1993) Prenatal determination of fetal RhD status by analysis of peripheral blood of rhesus negative mothers. *Lancet*, 341: 1147-1148
77. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS (1997) Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 350: 485-487
78. Lo YM, Patel P, Baigent CN, Gillmer MDG, Chamberlain P, Travi M, Sampietro M, Wainscoat JS, Fleming KA (1993) Prenatal sex determination from maternal peripheral blood using the polymerase chain reaction. *Hum Genet*, 90: 483-488

79. Lo YMD (2000) Molecular testing of urine: Catching DNA on the way out. *Clin Chem*, 46: 1039-1040
80. Lo YMD, Morey AL, Wainscoat JS, Fleming KA (1994) Culture of fetal erythroid cells from maternal peripheral blood. *Lancet*, 264-265
81. Lo YMD, Patel P, Sampietro MS, Gillmer MDG, Fleming KA, Wainscoat JS (1990) Detection of single-copy fetal DNA sequence from maternal blood. *Lancet*, 335:1463-1464
82. Lo YMD, Patel P, Wainscoat JS, Sampietro MS, Gillmer MDG, Fleming KA (1989) Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet*, 2(8676): 1363-1365
83. Loewenstein D, Hughes WL, Hofer KG, Ketchel MM (1971) Impenetrability of the mouse placenta to maternal leukaemia cells. *Nature*, 231: 389-391
84. McKusick VA (1990) Mendelian inheritance in man: catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive, and X-linked phenotypes. John Hopkins University Press, Baltimore. 1990
85. Merkatz IR, Nitowsky HM, Macri JN, Johnson WE (1984) An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol*, 148(7):886-894
86. Migliaccio G, Biaocchi M, Hamel N, Eddleman K, Migliaccio AR. Circulation of progenitor cells in human ontogenesis: response to growth factors and replanting potential. *J Hematother* 1996, 5: 161-170
87. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A (1990) High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytomet*, 231-238
88. Morris N, Williamson R (1992) Non-invasive first trimester antenatal diagnosis, *Br J Obstet Gynaecol*, 99: 446-448
89. MRC Working Party on the Evaluation of Chorionic Villus Sampling (1991) Medical Research Council European Trial of chorion villus sampling. *Lancet* 337: 1491-1499
90. Mueller UW, Hawes CS, Jones WR (1987) Identification of extravillous trophoblast cells in human decidua using an apparently unique murine monoclonal antibody to trophoblast. *Histochem. J*, 19: 288-296
91. Mueller UW, Hawes CS, Wright AE, Petropoulos A, DeBoni E, Firgaira FA, Morley AA, Turner DR, Jones WR (1990) Isolation of fetal trophoblast cells from peripheral blood of pregnant women. *Lancet*, 336(8709):197-200
92. Nanaev A, Chwalisz K, Frank HG, Kohnen G, Hegele-Hartung C, Kaufmann P (1995) Physiological dilation of uteroplacental arteries in the guinea pig depends on nitric oxide synthase activity of extravillous trophoblast. *Cell Tissue Res*, 282(3):407-421
93. Nelson JL (1998) Microchimerism and autoimmune disease. *N Engl J Med*, 338(17): 1224-1225
94. Nicolaides KH, Brizot ML, Snijders RJ (1994) Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for fetal trisomy in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*, 101(9): 782-786

95. Péault B. Hematopoietic stem cell emergence in embryonic life: developmental hematology revisited. *J Hematother* 1996, 5: 369-378
96. Pertl B, Kopp S, Kroisel P M, Hausler M, Sherlock J, Winter R, Adinolfi M (1997) Quantitative fluorescent PCR for the rapid prenatal detection of common aneuploidies and fetal sex. *Am J Obs Gyn* 177: 899-906
97. Pertl B, Sekizawa A, Samura O, Orescovic I, Rahaim PT, Bianchi DW (2000) Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. *Hum Genet*, 106(1):45-49
98. Price JO, Elias S, Wachtel SS, Klinger K, Dockter M, Tharapel A, Shulman LP, Phillips OP, Meyers CM, Shook D (1991). Prenatal diagnosis with fetal cells isolated from maternal blood by multiparameter flow cytometry. *Am J Obstet Gynecol*, 1731-1737
99. Rebello MT, Hackett G, Smith J, Loeffler FE, Robson S, MacLachlan N, Beard RW, Rodeck CH, Williamson R, Coleman DV (1991) Extraction of DNA from amniotic fluid cells for the early prenatal diagnosis of genetic disease. *Prenat Diagn*, 11(1):41-46
100. Rhine SA, Cain JL, Cleary RF, Palmer CG, Thompson JF (1975) Prenatal sex determination with endocervical smear: successful result utilizing Y-body fluorescence. *Am J Obstet Gynaecol*, 122: 155-160
101. Rhine SA, Milunsky A (1979) Utilization of trophoblast for early prenatal diagnosis. In: Milunsky A (Hrsg.) *Genetic disorders and the fetus*. Plenum Press, New York
102. Riis P, Fuchs F (1960) Antenatal determination of fetal sex in prevention of hereditary disease. *Lancet*, ii: 180-2
103. Rodeck C, Tutschek B, Kingdom J, Sherlock J, Adinolfi M (1995) Methods for the collection of transcervical samples during the first trimester of gestation. *Prenat Diagn*, 15(10): 933-942
104. Rodeck CH, Patrick AD, Pembrey ME, Tzannatos C and Whitfield AE (1982). Fetal liver biopsy for prenatal diagnosis of ornithine carbamyl transferase deficiency. *Lancet*, 2(8293): 297-300
105. Sakamoto T, Murase N, Ye Q, Starzl TE, Demetris AJ (1997) Identification of donor hematopoietic progenitor cells after allogeneic liver transplantation. *Transplant Proc*, 29(1-2): 1211
106. Schmorl G (1893) *Pathologisch-anatomische Untersuchungen über Puerperal-Eklampsie*. Vogel, Leipzig
107. Schmorl G (1905) Über das Schicksal embolisch verschleppter Placentarzellen, *Zentralbl Gynäkol*, 29: 129-137
108. Schröder J, Schröder E, Cann HM (1977) Lack of response of fetal cells in maternal blood to mitogens and mixed leukocyte culture. *Human Genetics*, 38, 91-97
109. Sekizawa A, Kimura T, Sasaki M, Nakamura S, Kobayashi R, Sato T (1996) Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy using a single fetal nucleated erythrocyte in maternal blood. *Neurology*, 46(5):1350-3

110. Serr DM, Margolis E (1964) Diagnosis of fetal sex in a sex linked hereditary disorder. *Am J Obstet Gynaecol*, 88: 230-232
111. Sherlock J, Cirigliano V, Petrou M, Tutschek B, Adinolfi M (1998) Assessment of diagnostic quantitative fluorescent multiplex polymerase chain reaction assays performed on single cells. *Ann Hum Genet*, 62(1): 9-23
112. Shettles L.B (1971) Use of the Y chromosome in prenatal sex determination. *Nature*, 230, 52
113. Shulman LP, Elias S (1990). Percutaneous umbilical blood sampling, fetal skin sampling, and fetal liver biopsy. *Semin Perinatol*, 14; 456-464
114. Shulman LP, Meyers CM, Simpson JL, Anderson RN, Tolley EA, Elias S (1990) Fetomaternal transfusion depends on amount of chorionic villi aspirated but not on method of chorionic villus sampling. *Am J Obstet Gynaecol*, 162: 1185-1188
115. Silverman NS, Wapner RJ (1992) Chorionic Villus Sampling. In: Brock DJH, Rodeck CH, Ferguson-Smith MA (Hrsg). *Prenatal Diagnosis and Screening (1992)* Churchill Livingstone, London
116. Simpson JL, Bombard AT (1987) Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion, frequency, pathology, and genetic counselling. In: Edmonds K, Bennet MJ (Hrsg): *Spontaneous abortion*. Blackwell, London
117. Simpson JL, Elias S (1993) Isolating fetal cells from maternal blood: advances in prenatal diagnosis through molecular technology. *JAMA*, 270: 2357-2361
118. Simpson JL, Elias S (1994) Isolating fetal cells in maternal circulation for prenatal diagnosis. *Prenat Diagn*, 14, 1229-1242
119. Simpson JL, Lewis DE, Bischoff FZ, Elias S (1995) Isolating fetal nucleated red blood cells from the maternal blood: The Baylor experience-1995. *Prenat. Diagn*, 15, 907-913
120. Slunga-Tallberg A, Wessmann M, Ylinen K, von Koskull H, Knuutila (1994) Nucleated erythrocytes in enriched and unenriched peripheral blood samples from pregnant and non-pregnant women. *Fetal Diagn. Ther*, 9, 291-295
121. Smidt-Jensen S, Lundsteen C, Lind AM, Dinesen K, Philip J (1993). Transabdominal chorionic villus sampling in the second and third trimesters of pregnancy: chromosome quality, reporting time, and feto-maternal bleeding. *Prenat Diag* 13; 957-969
122. Steele MW, Breg WT (1966) Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. *Lancet*, 1(7434): 383-385
123. Takabayashi H, Kuwabara S, Ukita T, Ikawa K, Yamafuji K, Igarashi T (1995) Development of non-invasive fetal DNA diagnosis from maternal blood. *Prenat. Diagn*, 15: 74-77
124. Takeuchi H (1992) Sonoembryology. In: Kurjak (Hrsg.) *An atlas of ultrasonography in obstetrics and gynecology*. Parthenon
125. Tavassoli M (1991) Embryonic and fetal hemopoiesis: an overview. *Blood Cells*, 1: 269-281
126. Tharapel A.T, Jaswaney V, Dockter M, Wachtel S, Chandler R, Simpson J.L, Shulman L.P, Meyers C.M, Elias S (1993) Inability to detect fetal metaphases in

- flow-sorted lymphocyte cultures based on maternal-fetal HLA differences. *Fetal Diagn Ther*, 8: 95-101
127. Tharapel A.T, Jaswaney V, Dockter M, Wachtel S, Chandler R, Simpson J.L, Shulman L.P, Meyers C.M, Elias S (1989) Can fetal cells in maternal blood be selected through cytogenetic means? *Am J Hum Genet*, 45(S): 271
 128. Thilaganathan B, Stagiannis K, Meher-Homji NJ, Plachouras N, Nicolaidis KH (1994) Fetal blood mononuclear cell division in normal and pathological pregnancies. *Fetal Diagn Ther*, 9(2): 79-83
 129. Thomas M, Tutschek B, Frost A, Rodeck C, Williamson R (1995) Timing of appearance and disappearance of fetal cells in the maternal circulation. *Prenat Diagn*, 15: 641-646
 130. Thomas MR, Williamson R, Craft I, Yazhani N, Rodeck CH (1994) Y Chromosome sequence DNA amplified from peripheral blood of women in early pregnancy. *Lancet*, 343: 413-414
 131. Tutschek B, Sherlock J, Halder A, Delhanty J, Rodeck C, Adinolfi M (1995) Isolation of fetal cells from transcervical samples by micromanipulation: diagnosis of fetal aneuploidy and molecular confirmation of fetal origin. *Prenat. Diagn*, 15: 951-961
 132. Tutschek B, Thomas M, Williamson R, Rodeck C (1995) Nicht-invasive Pränataldiagnose an fetalen Zellen im mütterlichen Blut. *Gynäkologe*, 28: 289-301
 133. Tutschek B, Thomas M.R, Williamson R, Rodeck C.H (1994) Isolation of trophoblast cells by magnetic cell sorting with epidermal growth factor receptor antibodies. In: Zakut H (Hrsg.) 7th International Conference on Early Prenatal Diagnosis. Moduzzi, Bologna
 134. Valenti C, Schutta EJ, Kehaty T (1968) Prenatal diagnosis of Down's syndrome. *Lancet*, 2(7561): 220
 135. Valerio D, Aiello R, Altieri V (1997) Isolation of fetal erythroid cells from maternal blood based on expression of erythropoietin receptors. *Mol Hum Reprod*, 3(5): 451-455
 136. Valerio D, Aiello R, Altieri V, Malato AP, Fortunato A, Canazio A (1996) Culture of fetal erythroid progenitor cells from maternal blood for non-invasive prenatal genetic diagnosis. *Prenat Diagn*, 16(12): 1073-1082
 137. Valerio D, Altieri V, Cavallo D, Aiello R, Antonucci FR (2000) Detection of fetal trisomy 18 by short-term culture of maternal peripheral blood. *Am J Obstet Gynecol*, 183(1):222-225
 138. Wachtel S, Elias S, Price J, Wachtel G, Phillips O, Shulman L, Meyers C, Simpson JL, Dockter M (1993) Fetal cells in the maternal circulation: isolation by multiparameter flow cytometry and confirmation by polymerase chain reaction. *Hum Reprod*, 1466-1469
 139. Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW (1988) Maternal screening for Down's syndrome in early pregnancy. *British Medical Journal*, 297: 883-887
 140. Wald NJ, Kennard A, Hackshaw K (1995) First trimester serum screening for Down's syndrome. *Prenat Diagn*, 15: 1227-1240

141. Wald NJ, Kennard A, Smith D (1994) First trimester biochemical screening for Down's syndrome. *Ann Med*, 26; 23-29
142. Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM (1969) Practical and theoretical implications of fetal maternal lymphocyte transfer. *Lancet*, 1119-1122
143. Wang JY, Zhen DK, Falco VM, Farina A, Zheng YL, Delli-Bovi LC, Bianchi DW (2000) Fetal nucleated erythrocyte recovery: fluorescence activated cell sorting-based positive selection using anti-gamma globin versus magnetic activated cell sorting using anti-CD45 depletion and anti-gamma globin positive selection. *Cytometry*, 39(3): 224-230
144. Warren R, Sanchez L, Hammond D, McLeod A (1972) Prenatal sex determination from exfoliated cells found in cervical mucus. *Am J Hum Genet*, 24: 22
145. Yeoh S.C, Sargent I.L, Redman C.W.G, Wordsworth B.P.G (1990) Detection of fetal cells in maternal blood. *Prenat Diagn*, 11: 117-123
146. Zheng YL, Carter NP, Price CM, Coleman SM, Milton PJ, Hackett GA, Greaves MF, Ferguson-Smith MA (1993) Prenatal diagnosis from maternal blood: simultaneous immunophenotyping and FISH of fetal nucleated erythrocytes isolated by negative magnetic cell sorting. *J Med Genet*, 1051-1056
147. Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S (2000) Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. *BJOG*, 107(6): 766-769
148. Zilliacus R, de la Chapelle A, Schröder J, Tilikainen A, Kohue E, Kleihauer E (1975) Transplacental passage of foetal blood cells. *Scand J Haemat*, 15: 333-338
149. Zipursky A, Israels LG (1967) The pathogenesis and prevention of Rh immunization. *Canadian Medical Association Journal*, 97: 1245-1257

ANHANG

AUSGEWÄHLTE EIGENE PUBLIKATIONEN ZUM THEMA

1. **Tutschek B**, Reinhard J. (2002) Anzüchtung fetaler Blutzellen aus dem mütterlichen Blut. In: Beckmann MW, Dall P, Fasching P, Niederacher D, Krüssel J, **Tutschek B** (Hrsg.) Molekulare Medizin in der Frauenheilkunde. Steinkopff, Darmstadt
2. **Tutschek B**, Reinhard J, Kögler G, Wernet P, Niederacher D (2000) Clonal culture of fetal cells from maternal blood. *Lancet*, 356(9243):1736-1737
und
Tutschek B, Reinhard J, Kögler G, Wernet P, Niederacher D. (2001)
Correspondence: Clonal culture of fetal cells from maternal blood. *Lancet*, 357: 962
3. **Tutschek B**, Reihls T, Crombach G (1998) Diagnostik und Prognose von Mehrlingsschwangerschaften im ersten Trimester. *Gynäkologe*, 31(3); 209-217
4. **Tutschek B**, Sherlock J, Halder A, Delhanty J, Rodeck CH, Adinolfi M (1995) Isolation of fetal cells from transcervical samples by micromanipulation: Molecular confirmation of their fetal origin and diagnosis of fetal aneuploidy. *Prenatal Diagnosis*, 15(10): 951-960
5. **Tutschek B**, Thomas M, Rodeck CH, Williamson R (1995) Nicht-invasive Pränataldiagnostik an fetalen Zellen im mütterlichen Blut. *Gynäkologe*, 28: 289-301
6. Crombach G, **Tutschek B**, Reihls T, Goecke TO (2000) Spezielle Aspekte der nicht-invasiven und invasiven Pränataldiagnostik bei Mehrlingen, *Gynäkologe*, 31(3): 218-228
7. Crombach G, Larbig D, Picard F, Beckmann MW, **Tutschek B**, Niederacher D (1999) Reliability and clinical application of fetal RhD genotyping with two different fluorescent duplex polymerase chain reaction assays: three years' experience. *Am J Obstet Gynecol*, 180(2,1): 435-440
8. Sherlock J, Cirigliano V, Petrou M, **Tutschek B**, Adinolfi M. (1998) Assessment of diagnostic quantitative fluorescent multiplex polymerase chain reaction assays performed on single cells. *Ann Hum Genet*, 62(1): 9-23
9. Sherlock J, Halder A, **Tutschek B**, Delhanty J, Rodeck C, Adinolfi M (1997) Prenatal detection of fetal aneuploidies using transcervical cell samples. *J Med Genet*, 4: 302-305
10. Crombach G, Picard F, Beckmann MW, **Tutschek B**, Bald R, Niederacher D (1997) Fetal Rhesus D genotyping on amniocytes in alloimmunised pregnancies using fluorescence duplex polymerase chain reaction. *Br J Obstet Gynaecol*, 104(1): 15-19
11. Thomas M, **Tutschek B**, Rodeck CH, Williamson R (1995) The time of appearance and disappearance of fetal DNA from the maternal circulation. *Prenatal Diagnosis*, 15(6)
12. Rodeck CH, **Tutschek B**, Kingdom J, Adinolfi M (1995) Methods for the transcervical collection of fetal cells during the first trimester of pregnancy. *Prenatal Diagnosis*, 15: 933-942
13. Adinolfi M, Sherlock J, **Tutschek B**, Halder A, Delhanty J, Rodeck CH (1995) Detection of fetal cells in transcervical samples and prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities. *Prenatal Diagnosis*, 15(10): 934-949

LEBENS LAUF

<u>Geboren:</u>	20. November 1965, Frankfurt am Main	<u>Staatsangehörigkeit:</u> Deutsch
1975 bis 1984	Lessing-Gymnasium, Frankfurt	
Juni 1984	<i>Abitur</i>	
1984 bis 1991	Medizinstudium, J.W.Goethe-Universität, Frankfurt, und Tufts School of Medicine, Boston	
August 1988 bis Juni 1989	<i>German Academic Exchange Service Scholar</i> , Biomedical Sciences Exchange Program (MHH), Tufts School of Medicine und Sackler School of Biomedical Sciences, Boston	
Juli 1990	<i>U.S. Foreign Medical Graduate Examination in the Medical Sciences</i> , Clinical component, und ECFMG Language test	
Januar 1991	<i>U.S. Foreign Medical Graduate Examination in the Medical Sciences</i> , Preclinical component, und Abschluß des U.S.-amerikanischen Staatsexamens für Ausländer	
Oktober 1991	<i>Medizinisches Staatsexamen (J.-W.-Goethe-Universität, Frankfurt)</i>	
November 1991 bis August 1993	Assistenzarzt, Frauenklinik, J.W.Goethe-Universität, Frankfurt	
Juni 1993	<i>Dissertation</i> 'Western Blot für Rotavirus-Infektion: Aufbau und Perspektive der Methode', Prof. H.W. Doerr, Medizinische Virologie, J.W.Goethe-Universität, Frankfurt	
August 1993 bis Oktober 1993	Assistenzarzt, Frauenklinik, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf	
November 1993 bis Oktober 1995	Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft DFG, Visiting Research Fellow, University College London Medical School, Department of Obstetrics and Gynaecology	
September 1995	<i>Membership Exam, Royal College of Obstetricians and Gynaecologists</i> , Part I, London	
März 1996	<i>UNESCO-Stipendium</i> , European School of Human Genetics, Genetics Course 1996	
November 1995 bis Juli 2000	Assistenzarzt, Frauenklinik, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf	
1998	<i>Stipendium der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe</i> , Anzüchtung und genetische Unters. fetaler Zellen aus dem mütterlichen Blut	
1998 und 1999	<i>Vorsitz</i> , Arbeitsgemeinschaft Informationsverarbeitung AIG, Sektion der DGGG	
Februar und März 1999	<i>WHO Short Term Medical Consultant</i> , 'Maternal Health in Bahrain'	
Juni 1999	<i>Prüfung zum Facharzt für Gynäkologie und Geburtshilfe</i>	
August 1999	<i>Diploma in Fetal Medicine, Fetal Medicine Foundation, London</i> , Kurs und schriftliche Prüfung	
November 1999	<i>Young Investigator Silver Award</i> , International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology	
September 2000	<i>Rockstroh-Preis</i> , Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe	
September 2000	<i>Nourypharma-Stipendium</i> , Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe	
seit August 2000	Oberarzt, Frauenklinik, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf	
Januar 2002	<i>Prüfung zur Fakultativen Weiterbildung „Spezielle Geburtshilfe und Perinatalogie“</i>	