

**Nicht-invasive Bestimmung des fötalen Rhesus-D-Genotyps  
in der Schwangerschaft von Antigen-D-negativen Frauen**

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
an der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Petra Maria Dißmann  
aus Bielefeld

**Bielefeld 2003**

„Aus so krummem Holze, als woraus der Mensch gemacht ist, kann nichts Gerades gezimmert werden.“

**Immanuel Kant**, *Idee zu einer allgemeinen Geschichte in weltbürgerlicher Absicht*, 1784.

„The rarity of fetal cells in maternal blood has encouraged investigators to look for an alternative noninvasive source of fetal genetic material for prenatal diagnosis...Fetal DNA has thus been shown to be present in maternal plasma and serum. It is perhaps ironical that, up to that point in time, maternal plasma and serum were routinely discarded by workers looking for fetal cells in maternal blood.”

**Diana W. Bianchi & Y. M. Dennis Lo**, *Fetomaternal Cellular and Plasma DNA Trafficking: The Yin and the Yang*, 2001.

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I - IV
Abkürzungsverzeichnis	V - VI
Herstellernachweise	VII
<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG..... 1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG..... 2</b>
2.1	Das Rhesus-Blutgruppensystem ..... 2
2.1.1	Die Rhesus-Protein-Familie ..... 2
2.1.2	Struktur der Rhesus-Gene..... 3
2.1.3	Rhesus-D-variante Phänotypen ..... 4
2.1.4	Rhesus-Inkompatibilität in der Schwangerschaft..... 5
2.1.5	Molekulargenetische RHD-Genotypisierung ..... 6
2.2	Pränataldiagnostik ..... 7
2.2.1	Invasive Pränataldiagnostik..... 7
2.2.2	Nicht-invasive Pränataldiagnostik..... 8
2.2.3	Fötale Zellen im Blutkreislauf der Schwangeren ..... 9
2.2.3.1	Trophoblasten..... 10
2.2.3.2	Fötale Lymphozyten..... 11
2.2.3.3	Fötale Erythroblasten..... 12
2.2.4	Häufigkeit fötaler Zellen im Blutkreislauf von Schwangeren..... 12
2.2.5	Fötale DNA im Plasma von Schwangeren ..... 14
2.2.5.1	Entdeckung zellfreier fötaler DNA im mütterlichen Serum bzw. Plasma..... 14
2.2.5.2	Quantifizierung zellfreier fötaler DNA im mütterlichen Blutkreislauf..... 14
2.2.5.3	Existenz von zellfreier fötaler DNA im mütterlichen Blutkreislauf nach der Geburt..... 16
2.2.5.4	Ursprung von zellfreier fötaler DNA im mütterlichen Blutkreislauf ..... 16
2.2.6	Klinische Anwendung von fötalem Material aus mütterlichem Blut..... 17
<b>3</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG ..... 20</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN..... 21</b>
4.1	Probenmaterial..... 21
4.1.1	Blutproben mit bekanntem Rhesus-D-Serotyp..... 21

4.1.2	Blutproben (Transfusionsmedizin Universitäts-Klinik-Münster) .....	21
4.1.3	Schwangeren-Blutplasmaproben (Evangelisches Krankenhaus Oberhausen) .....	21
4.1.4	Amnionflüssigkeitsüberstand (Evangelisches Krankenhaus Oberhausen).....	23
4.1.5	Sonstige Blutproben .....	23
4.2	Nukleinsäuren.....	23
4.2.1	DNA-Längenstandards .....	23
4.2.2	Oligonukleotide .....	25
4.2.2.1	Farbstoffmarkierung von Oligonukleotiden .....	27
4.2.2.2	Berechnung der theoretischen Schmelztemperatur ( $T_M$ ) für Oligonukleotide .....	27
4.3	Präparation von genomischer DNA.....	28
4.3.1	DNA-Präparation mit Silikagelmembran-Zentrifugationssäulen.....	28
4.3.1.1	DNA-Präparation mit dem DNeasy™ Tissue-Kit aus Vollblut .....	29
4.3.1.2	DNA-Präparation mit dem DNeasy™ Tissue-Kit aus Plasma und Amnionflüssigkeit.....	30
4.3.1.3	DNA-Präparation mit dem QIAamp® DNA Blood Midi Kit aus Plasma .....	30
4.3.1.4	DNA-Präparation mit dem QIAamp® DNA Blood Maxi Kit aus Plasma.....	31
4.3.1.5	Optimierung der Silikagelmembran-Säulenextraktion von zellfreier DNA aus Plasma .....	32
4.3.2	DNA-Fällungsextraktionsmethoden.....	32
4.3.2.1	DNA-Schnellpräparationsmethode aus Vollblut.....	33
4.3.2.2	DNA-Präparation aus Plasma und Amnionflüssigkeit mit Hilfe der Phenol-Chloroform- Extraktion .....	34
4.3.2.3	Variationen der Phenol-Chloroform-Extraktion zur DNA-Präparation aus Blutplasma.....	35
4.4	Quantifizierung von DNA .....	36
4.4.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA .....	36
4.4.2	PicoGreen®-Assay zur Quantifizierung von doppelsträngiger DNA .....	37
4.4.3	Quantitative Echtzeit-PCR (Real-Time PCR) .....	38
4.4.4	Quantitative Fluoreszenz-PCR (QF-PCR).....	39
4.5	Gelelektrophoresetechniken .....	39
4.5.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	39
4.5.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) .....	41
4.5.2.1	Silberfärbung.....	42
4.5.3	Kapillarelektrophorese.....	43
4.6	DNA-Amplifikation mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	44
4.6.1	Allel-spezifische PCR.....	45
4.6.2	Methoden zur Optimierung der PCR.....	45
4.6.2.1	Gradienten-PCR .....	45
4.6.2.2	Heißstart (Hot Start) -PCR .....	46

4.6.2.3	Touchdown-PCR.....	47
4.6.3	Vermeidung von Kontaminationen .....	48
4.7	Echtzeit-PCR (Real-Time PCR).....	49
4.7.1	TaqMan®-Sonden .....	50
4.7.2	Beacon-Primer .....	52
4.7.3	Echtzeit-PCR Detektionssystem.....	54
4.7.4	Interpretation von Amplifikationskurven der Echtzeit-PCR.....	55
4.8	Beschreibende Statistik.....	57
4.8.1	Box- und Whisker-Diagramm .....	57
4.8.2	Hardy Weinberg-Gleichgewicht.....	58
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>59</b>
5.1	Entwicklung einer Echtzeit-PCR zur fötalen Rhesus-D-Genotypisierung.....	59
5.1.1	MS-PCR für die Amplifikation RHD- und RHCE-spezifischer Sequenzen .....	59
5.1.2	Echtzeit-PCR zur Detektion RHD- sowie RHCE-spezifischer Sequenzen.....	61
5.1.2.1	Entwicklung einer RHD- und RHCE- TaqMan®-PCR.....	61
5.1.2.2	Optimierung der RHCE- und RHD-TaqMan®-PCR .....	63
5.1.2.3	Sensitivität der RHD-TaqMan®-PCR.....	64
5.2	RHD-Genotypisierung RhD-negativer Blutspender.....	67
5.3	Gewinnung von Blutplasma-DNA .....	68
5.3.1	Sammlung von Blutplasmaproben .....	69
5.3.2	Optimierung der DNA-Präparationsmethoden.....	70
5.3.3	Säulenextraktion und Phenol-Chloroform-Extraktion im Vergleich.....	71
5.3.4	Quantitativer Vergleich verschiedener DNA-Qualitäten .....	72
5.4	Detektion fötaler DNA-Sequenzen im mütterlichen Blutplasma.....	74
5.4.1	Fallbeispiele zur fötalen RHD-Genotypisierung .....	75
5.4.2	Reihenuntersuchung zur fötalen RHD-Genotypisierung anhand der Untersuchung mütterlicher Blutplasma-DNA .....	78
5.5	Beurteilung der Qualität von zellfreier DNA aus Blutplasma.....	82
5.5.1	Vergleich verschiedener Blutplasma-DNA-Qualitäten in der Echtzeit-PCR.....	82
5.5.1.1	RHCE-Echtzeit-PCR zur Detektion von Blutplasma-DNA .....	82
5.5.1.2	RHD-Echtzeit-PCR zur Detektion fötalspezifischer DNA im mütterlichen Blutplasma .....	84
5.5.2	Vergleich von DNA aus Blutplasma oder Vollblut in der RHD-Echtzeit-PCR.....	88
5.5.3	SRY-spezifische PCR anhand von mütterlicher Blutplasma-DNA .....	91

5.5.4	Beurteilung der Qualität von Blutplasma-DNA nach elektrophoretischer Auftrennung im Polyacrylamidgel.....	93
5.6	RHD-Zygotiebestimmung mittels relativer Genquantifizierung.....	94
5.6.1	RHD-Zygotiebestimmung mittels quantitativer Fluoreszenz (QF) -PCR.....	95
5.6.2	RHD-Zygotiebestimmung mittels Beacon-Primer Allel-diskriminierender (BAD-) PCR.....	97
5.6.3	Vergleich der Ergebnisse von zwei unabhängigen Untersuchungsreihen (QF- oder BAD-PCR) zur RHD-Zygotiebestimmung.....	100
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>101</b>
6.1	Pränatale RHD-Genotypisierung.....	101
6.1.1	Nicht-invasive Pränataldiagnostik anhand zellfreier fötaler DNA aus mütterlichem Blutplasma.....	102
6.1.2	Sammlung und Aufarbeitung von Blutproben.....	103
6.1.3	Funktionsweise des pränatalen RHD-Genotypisierungstests im Vergleich.....	105
6.1.4	Der Echtzeit-PCR-Tests zur RHD-Genotypisierung in der Anwendung auf RhD-negative Blutspender .....	108
6.1.5	Voraussetzungen für das Gelingen eines PCR-Tests zur nicht-invasiven fötalen RHD-Genotypisierung.....	108
6.1.5.1	PCR-Sensitivität und PCR-Spezifität .....	108
6.1.5.2	DNA-Präparation.....	109
6.1.5.3	Qualität der Blutplasma-DNA.....	111
6.1.6	Anwendung des RHD-Genotypisierungstests auf Blutplasma-DNA von RhD-negativen Schwangeren .....	112
6.1.6.1	Beurteilung der Konzentration von fötaler DNA im mütterlichen Blutplasma.....	113
6.1.6.2	Variabilität der Konzentration von fötaler DNA im mütterlichen Blutplasma .....	115
6.1.6.3	Beurteilung der Qualität von aus mütterlichem Blutplasma isolierter DNA.....	116
6.2	RHD-Zygotiebestimmung .....	117
<b>7</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>120</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>122</b>

**ANHANG:** Danksagung, Erklärung, Lebenslauf

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
Ø	Arithmetisches Mittel
Δ	Differenz ( <i>Delta</i> )
µg	Mikrogramm ( $10^{-6}$ g)
µl	Mikroliter ( $10^{-6}$ l)
µM	Mikromolar ( $10^{-6}$ M)
6-FAM	<i>6-carboxy-fluorescein</i>
A	Adenin
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ARMS	<i>amplification refractory mutation system</i>
BAD-PCR	<i>Beacon-Primer</i> Allel-diskriminierende PCR
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
CCD	<i>charge coupled device</i>
CF	Cystische Fibrose
CFS	<i>charge flow separation</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
cm	Zentimeter ( $10^{-2}$ m)
Ct	Schwellenwert-PCR-Zyklus (threshold cycle)
DABCYL	<i>(4-dimethylaminophenyl)azobenzene carboxylic acid</i>
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DMPK	<i>Dystrophia Myotonica Protein Kinase</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP)
dsDNA	doppelsträngige DNA ( <i>double-stranded deoxyribonucleic acid</i> )
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
Extr.	Extraktion
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAM	Fluoreszein ( <i>fluorescein</i> )
FGFR3	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 3</i>
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung ( <i>fluorescence in situ hybridisation</i> )
g	Gramm
G	Guanin
g.e.	Genomäquivalente ( <i>genome equivalents</i> )
Hb	Hämoglobin
HDN	<i>Haemolytic Disease of the Newborn</i>
HEX	<i>hexachloro-6-carboxy-fluorescein</i>
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
IgG	Immunglobulin G
IVF	Invitrofertilitisation
kB	Kilobasen (1000 Basen)
kD	Kilodalton (1000 Dalton)
Konz.	Konzentration
l	Liter
m	Meter
M	Molar (Mol/l)
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>

MS-PCR	Mutagenetisch Separierende PCR ( <i>mutagenically separated PCR</i> )
min	Minute
ml	Milliliter ( $10^{-3}$ l)
mM	Millimolar ( $10^{-3}$ M)
ng	Nanogramm ( $10^{-9}$ g)
NICHD	<i>United States National Institute of Child Health and Human Development</i>
NIFTY	<i>the National Institute of Child Health an Human Development Fetal Cell Isolation Study</i>
nm	Nanometer ( $10^{-9}$ m)
nM	Nanomolar ( $10^{-9}$ M)
NRBC	Nukleierte Rote Blutkörperchen ( <i>nucleated red blood cell</i> )
Nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEP	<i>primer extension preamplification</i>
pg	Picogramm ( $10^{-12}$ g)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration [mol/l] von Hydroxoniumionen ( <i>pondus hydrogenii</i> )
PMP 22	<i>Homo Sapiens Peripheral Myelin Protein 22</i>
POP	<i>performance optimized polymer</i>
q	langer Arm eines Chromosoms
QF-PCR	Quantitative Fluoreszenz-PCR
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus ( <i>restriction fragment length polymorphism</i> )
RFU	Relative Fluoreszenzintensität
RFU <sub>max</sub>	maximale Fluoreszenzintensität in der Plateauphase der Echtzeit-PCR
RhAG	Rhesus-assoziiertes Glycoprotein
Rh	Rhesus-Proteine
RH	Rhesus-Gene
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
ROX	<i>Texas Red</i>
STR	<i>small tandem repeat</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
PRINS	<i>primed in situ labeling</i>
R <sup>2</sup>	Korrelationskoeffizient
SDS	Laurylsulfat
SMP1	<i>Homo Sapiens Small Membrane Protein 1</i>
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure ( <i>single-stranded deoxyribonucleic acid</i> )
SSP	<i>single strand polymorphism</i>
SSW	Schwangerschaftswoche
STDEV	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
T	Thymin
TAMRA	<i>6-carboxy-tetramethyl-rhodamine</i>
T <sub>An</sub>	Hybridisierungstemperatur ( <i>annealing temperature</i> )
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur ( <i>melting temperature</i> )
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit ( <i>Unit</i> )
UTR	nicht-translatierte Region ( <i>untranslated region</i> )
v/v	Volumen-Volumen-Verhältnis ( <i>volume/volume</i> )
V <sub>max</sub>	maximales Volumen
w/v	Massen-Volumen-Verhältnis ( <i>weight/volume</i> )

## Herstellernachweise

**Amicon Bioseparations, Millipore, Schwalbach:** Zentrifugalfilter Microcon® YM-100.

**Bio-Rad, München:** PCR-Gerät iCycler™ mit optischem Modul iCycler™ iQ Detektionssystem.

**Bio Whittaker Molecular Applications, Rockland, USA:** NuSieve™-(1:3)-Agarose.

**Clontech, Heidelberg:** Antikörper TaqStart™.

**CTI GmbH, Idastein, Taunus:** Elektrophoresekammer.

**Eurogentec, Köln:** Primer, Beacon-Primer, TaqMan®-Sonden.

**Finnzymes, Göttingen:** dNTPs.

**HT Biotechnology LTD, Cambridge, England:** 10x PCR-Puffer, Taq-DNA-Polymerase Super Taq.

**Kodak, Stuttgart:** Electrophoresis Documentation and Analysis System 120.

**Merck, Darmstadt:** Essigsäure, Borsäure, Glycerin, AgNO<sub>3</sub>.

**Millipore Corporations, Schwalbach:** Tropfendialysefilter (Filtertyp 0,025 µm, weiß VSWP 13 mm).

**Molecular Probes, Mo Bi Tec, Göttingen:** P-7589 PicoGreen® dsDNA Quantitation Kit.

**Molekularbiologisches & biochemisches Labor Dr. Bartling GmbH, Bielefeld:** DNA-Längenstandards 100 Bp-Leiter bis 5000 Bp, 100 Bp-Leiter und pUC 19 / Msp I,

**Nunc, Wiesbaden:** FluoroNunc™ Module (schwarz, gerahmt, polysorp Oberfläche).

**Operon, Köln:** Primer.

**PE Applied Biosystems, Weiterstadt:** ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer, Software ABI PRISM Gene-Scan® Analysis, PCR-Gerät GeneAmp 2400, DNA-Längenstandard GeneScan® TAMRA 500, Gel-Polymer POP™-4.

**PeQLab, Erlangen:** DNA-Längenstandards peqGOLD 100 Bp DNA-Leiter und peqGold DNA-Sizer XV.

**Qiagen, Hilden:** DNeasy™ Tissue-Kit, QIAamp® DNA Blood Midi Kit, QIAamp® DNA Blood Maxi Kit, Carrier-RNA.

**Roth, Karlsruhe:** Ethanol, Chloroform, Polyacrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid, Methanol.

**Sarstedt, Nümbrecht:** Hämatologie-Monovetten®, S-Monovette®, 15 ml-Röhrchen.

**Serva, Heidelberg:** Xylencyanol, N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin.

**Sigma-Aldrich, Taufkirchen:** Tris-HCl, Na<sub>2</sub>EDTA, Herringsspermien-DNA, Dodecyltrimethylammoniumbromid, NaCl, Cetyltrimethylammoniumbromid, Isoamylalkohol, Natriumacetat, Ammoniumacetat, SDS, Tris-Acetat, Ethidiumbromid, Sucrose, Bromphenolblau, Ammoniumpersulfat, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> • 5 H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Formaldehyd, Formamid, MgCl<sub>2</sub>.

# 1 Zusammenfassung

Das Rhesus-Gen RHD kodiert das sehr stark immunogene Transmembranprotein RhD, welches auf der Erythrozytenoberfläche lokalisiert ist. Mit serologischen Untersuchungsmethoden werden in der Blutgruppendiagnostik D-positive und D-negative Individuen unterschieden. Wird dem Kind einer RhD-negativen Mutter ein väterliches RHD-Allel vererbt, kann es in der Schwangerschaft zu einer Rhesus-Immunkompatibilität zwischen Mutter und Kind kommen. Rhesus-Inkompatibilität ist die häufigste Ursache für HDN (*Hemolytic Disease of the Newborn*). Um Risikoschwangerschaften für HDN vor Komplikationen zu schützen, wird im Allgemeinen eine Anti-D-Prophylaxe-Behandlung bei betroffenen Frauen durchgeführt. Ist das Kind ebenfalls RhD-negativ, geschieht diese Verabreichung von Anti-D-Immunglobulinen unbegründet.

Die Analyse seltener fötaler Zellen aus dem Blutkreislauf von Schwangeren ist als nicht-invasive Untersuchungsmethode ein lang ersehntes Ziel der Pränataldiagnostik. In neuerer Zeit wurde die Entdeckung gemacht, dass die zellfreie fötale DNA im mütterlichen Blutplasma eine höhere Konzentration aufweist als die fötalen Zellen im mütterlichen Blut.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein molekulargenetischer Test zur RHD-Genotypisierung entwickelt auf der Grundlage, dass der D-negative Serotyp auf die vollständige Deletion des RHD-Gens zurückzuführen ist. Die Diskriminierung der Amplifikation der stark homologen RHCE-Sequenz wurde mit Hilfe der mutagenetisch separierenden (MS-) PCR erzielt. Der RHD-Genotypisierungstest war als Echtzeit-PCR geplant, um die routinefähige Untersuchung fötaler DNA aus mütterlichem Blutplasma in der Schwangerschaft von RhD-negativen Frauen zu ermöglichen und somit eine gezielte Anti-D-Prophylaxe zu realisieren.

Es sind Variationen des RHD-Geno- und -Phänotypen in verschiedenen Bevölkerungsgruppen bekannt. Um die Zuverlässigkeit des geplanten RHD-Genotypisierungstests für die Anwendung auf die deutsche Bevölkerung zu überprüfen, wurde die DNA von 255 Blutspendern mit Hilfe der entwickelten RHD-Echtzeit-PCR untersucht. Bei 0,78 % der serologisch als D-negativ eingestuften Testpersonen konnte im PCR-Versuch ein RHD-spezifisches Produkt amplifiziert werden, wobei die zwei betreffenden Personen dem seltenen Phänotyp Ccddee entsprechen. Das Risiko einer falsch RHD-positiven Diagnose konnte somit als gering eingestuft werden.

Für den geplanten fötalen RHD-Genotypisierungstest musste gewährleistet werden, dass im DNA-Präparat eine für die PCR ausreichende Menge fötalspezifischer Sequenzen vorhanden ist. Die DNA-Präparationen mittels Silikagelmembran-Säulenextraktion ist im Vergleich zur Phenol-Chloroform-Extraktion für die Aufarbeitung von Blutplasma getestet worden.

Bei der Untersuchung von Blutplasma-DNA von zehn RhD-negativen Schwangeren erreichte der RHD-Echtzeit-PCR-Test eine Sensitivität von 63 %. Der molekulargenetische Nachweis zellfreier fötaler DNA im mütterlichen Blutplasma konnte weder durch eine Veränderung der DNA-Präparation noch durch eine Verkürzung der RHD-PCR-Produktlänge erzielt werden. Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen weisen darauf hin, dass die fötale DNA in äußerst geringer Konzentration im mütterlichen Blutplasma und stark degradiert vorliegt.

Der Verzicht auf die Rhesus-Anti-D-Prophylaxebehandlung, zu Gunsten eines nicht-invasiven pränatalen RHD-Genotypisierungstests, muß aufgrund der erhaltenen Versuchsergebnisse zum jetzigen Zeitpunkt als medizinisch nicht vertretbar eingestuft werden.

Bei der vorgeburtlichen ärztlichen Betreuung von RhD-negativen Frauen könnte eine RHD-Zygotiebestimmung des betreffenden Vaters eine Risikoeinschätzung der Schwangerschaft für die Geburt eines Rhesus-D-positiven Fötus ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit wurde zu diesem Zweck eine Multiplex-Echtzeit-PCR entwickelt, mit der eine relative Quantifizierung des RHD- zum RHCE-Gen möglich ist. Mit dieser Methode wurde bei 87 RhD-positiven Blutspendern eine RHD-Zygotiebestimmung vorgenommen und das Ergebnis anhand einer unabhängigen Methode auf der Grundlage der Quantitativen Fluoreszenz-PCR überprüft. Der Ergebnisvergleich beider Methoden zeigte für 84 Testpersonen eine Übereinstimmung.

## 2 Einleitung

### 2.1 Das Rhesus-Blutgruppensystem

Das Rhesus-System ist neben dem AB0-System das klinisch bedeutsamste Blutgruppensystem. Es wurde 1939 von Landsteiner und Wiener [1940] entdeckt, die feststellten, dass die durch Immunisierung von Versuchstieren gewonnenen Antikörper gegen Erythrozytenantigene von Rhesusaffen auch eine Agglutination menschlicher Erythrozyten hervorriefen. Die Rhesus-Gene RHCE und RHD kodieren die korrespondierenden Transmembranproteine RhCcEe bzw. RhD, die auf der Erythrozytenoberfläche lokalisiert sind, wobei bislang 46 immunologisch unabhängige Antigene identifiziert wurden [Issitt *et al.*, 1989]. Im Wesentlichen unterscheidet man aber mit D-positiven und D-negativen Individuen zwei Rhesus-D-Serotypen. Das Rhesus-D-Antigen weist dabei eine besonders hohe Immunogenität auf. So liegt die Immunisierungsrate RhD-negativer Personen nach Transfusion RhD-positiver Erythrozyten bei 85 % innerhalb von sechs Monaten [Mollison *et al.*, 1997].

#### 2.1.1 Die Rhesus-Protein-Familie

Alle Menschen, bis auf extrem seltene Ausnahmen, exprimieren C- oder c- und E- oder e-Rhesus-Antigene, sowie D-, oder keine D-Antigene auf ihren Erythrozyten. Somit kodieren die am meisten verbreiteten Formen des RHCE- und RHD-Gens acht mögliche Haplotypen: Dce, dce, DCE, dCE, DcE, dcE, DCE und dCE, wobei d für den Antigen-D-negativen Phänotyp verwendet wird. Die Rhesus-Polypeptide werden nicht glykosyliert und umfassen jeweils 417 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von je 30 kD. Die Analyse der primären Aminosäuresequenz hat ergeben, dass die ersten 41 N-terminalen Aminosäuren der RhCcEe- und des RhD-Proteins identisch sind. Außerdem unterscheidet sich der Molekulaufbau nur um 30 bis 35 weitere Aminosäuren entlang der gesamten Proteinstruktur. Trotzdem bilden die verschiedenen RhCcEe-Proteine keine D-Antigene, bzw. das RhD-Protein keine C-, c-, E- oder e-Antigene aus. Ein Aminosäureaustausch Ser103Pro, der den zweiten extrazellulären Loop des RhCE-Transmembranproteins betrifft, entscheidet über das serologische Merkmal C oder c. Ein weiterer Aminosäureaustausch Pro226Ala, der sich auf dem vierten extrazellulären Loop dieses Proteins befindet, entscheidet über das serologische Merkmal E oder e.

Die Expression der Rhesus-Proteine erfolgt nur, wenn das Rhesus-assoziierte Glykoprotein (RhAG) ebenfalls auf der Erythrozytenoberfläche vorhanden ist. Letztgenanntes setzt sich aus 409 Aminosäuren zusammen und weist ein Molekulargewicht von 50 kD auf. Die Aminosäuresequenz-Homologie zwischen den Rh-Proteinen und dem RhAG-Protein, das ebenfalls der Rhesus-Protein-Familie zugerechnet wird, beträgt ca. 40 %. Als hydrophobe Transmembranproteine besitzen sie zwölf Transmembranregionen. Der N- und C-Terminus der Proteine ist zur zyttoplasmatischen Seite orientiert. Zwei RhAG-Moleküle können mit zwei RhCcEe-, zwei RhD-Molekülen, oder jeweils einem Molekül beider Sorten ein Tetramer bilden, das durch N- bzw. C-terminale Assoziation von sogenannten Rhesus-Unterstützer-Proteinen (*Rh accessory proteins*) stabilisiert wird. Man spricht hierbei vom Rhesus-Komplex.

Das Molekulargewicht des gesamten Rhesus-Komplexes wurde über Dichte-Ultrazentrifugation auf 170 kD bestimmt [Avent & Reid, 2000].

### 2.1.2 Struktur der Rhesus-Gene

Auf dem Chromosom 1 sind die beiden Rhesus-Gene RHD und RHCE in Tandemanordnung auf der Position 1p36.13-p34.3 lokalisiert und umfassen zusammen 69 kB. Beide Gene enthalten 10 Exons, wobei sich die Nukleotidsequenz der Exons des RHD Gens um weniger als 10 % von denjenigen des RHCE Gens unterscheidet [Okuda *et al.*, 2000]. Die Regionen mit der höchsten Divergenz zwischen RHD- und RHCE-Gensequenz liegen im Intron 4 und den Exons 4, 7 und 10 [Aubin *et al.*, 1997]. Der evolutionäre Ursprung der beiden Gene lässt sich mit der Dublikation eines gemeinsamen ancestralen Gens erklären. Die Reihenfolge der Anordnung der Rhesus-Gene auf dem Chromosom 1 wird in der Literatur unterschiedlich interpretiert [Carritt *et al.*, 1997; Okuda *et al.*, 1999]. Sie zeigen entgegengesetzte Orientierung, wobei ihre einander zugewandten 3'-Enden durch eine Region aus ca. 30 kB, die das SMP1- (*Homo Sapiens Small Membrane Protein 1*) Gen enthält, getrennt werden [Wagner *et al.*, 2000; Suto *et al.*, 2000]. Das RhD-Gen wird von zwei DNA-Segmenten, den sogenannten Rhesus-Boxen, flankiert. Sie zeigen identische Orientierung, sind ca. 9 kB lang und weisen eine Sequenzhomologie von 98,6 % auf. Die Rhesus-Boxen beinhalten 1463 Bp umspannende identische Regionen (*identity regions*), in denen Bruchpunkte für eine Deletion des kompletten RHD-Gens lokalisiert sind [Wagner *et al.*, 2000].

Das RHAG-Gen ist auf dem Chromosom 6p21.1-p11 lokalisiert und umfasst ca. 32 kB. Wie das RHD- und RHCE-Gen enthält es 10 Exons und weist eine Sequenzhomologie zu den anderen Rhesus-Genen von ca. 40 % auf [Avent & Reid, 2000].

### 2.1.3 Rhesus-D-variante Phänotypen

In seltenen Fällen entwickeln RhD-positive Personen Alloantikörper gegen das Rhesus-D-Antigen. Serologisch wurde dieser Befund damit erklärt, dass bei diesen als Partial-D-Typen bezeichneten D-Varianten die Antigenstruktur qualitativ verändert ist. Innerhalb der D-Varianten werden von den Partial-D-Typen die *Weak-D*-Typen, (0,2 bis 1 % der Europäer) unterschieden. Da letztgenannte nur von besonders sensitiven serologischen Tests als D-positiv erfasst werden können, ging man ursprünglich von einer verminderten Anzahl von D-Antigenen auf der Erythrozytenoberfläche aus. Molekulargenetische Untersuchungen haben gezeigt, dass beide Phänotypen durch Punktmutationen verursacht werden können [Wagner *et al.*, 1999; Avent & Reid, 2000]. Bei einigen Partial-D-Typen sind ein oder mehrere Exons des RHD-Gens gegen die korrespondierenden Segmente des RHCE-Gens ausgetauscht, was zur Bildung von RhD-CE-D-Fusionsproteinen führt, in denen Epitope des vollständigen RhD-Proteins fehlen. Punktmutationen, die den *Weak-D*-Typ verursachen, führen zu Aminosäureaustauschen, die jedoch auf intrazelluläre und Membranabschnitte beschränkt sind [Avent & Reid, 2000]. Dennoch können D-Alloimmunisierungen bei Personen mit dem *Weak-D*-Phenotyp nicht ausgeschlossen werden [Mueller *et al.*, 2001].

Ungefähr 15 % der europäischen Bevölkerung ist serologisch RhD-negativ [Wagner *et al.*, 2001]. Unter Afrikanern (< 7 %) und Asiaten (< 1 %) sind RhD-negative Individuen seltener. Die häufigste Ursache für ein nicht vorhandenes D-Antigen in der weißen Bevölkerung ist das Fehlen des kompletten RHD-Gens [Colin *et al.*, 1991], aufgrund einer Deletion [Wagner *et al.*, 2000]. In der afrikanischen Bevölkerung kommen zwei RHD-positive, aber Antigen-D-negative Allele vor. Das RHD-Pseudogen RHD $\Psi$  trägt eine 37 Bp-Insertion im Grenzbereich von Intron 3 und Exon 4, die *Missense* Mutationen M218I, F223V, S225F, sowie eine *Nonsense* Mutation, Y269X [Singleton *et al.*, 2000]. Ungefähr Zweidrittel der RhD-negativen Afrikaner sind Träger von RHD $\Psi$  und ca. ein Sechstel sind Träger von RHD-CE-D<sup>S</sup>, einem Hybridgen aus RHCE und RHD [Daniels *et al.*, 1998]. RhD-negative Individuen der asiatischen Bevölkerung sind hauptsächlich Träger eines Allels mit G314V *Missense Mutation* [Okuda *et al.*, 1997], außerdem existieren noch verschiedene RHD-CE-D-Hybridgene in dieser Bevölkerungsgruppe [Okuda *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1998; Lan *et al.*, 2000].

Der Anteil von Antigen-D-negativen RHD-positiven Allelen in der weißen Bevölkerung wird allgemein als gering beurteilt. Mehrere Einzelfallbeschreibungen sind in der Literatur dokumentiert [Hyland *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1996; Faas *et al.*, 1996; Gassner *et al.*, 1997; Andrews *et al.*, 1998; Maaskant-van Wijk *et al.*, 1998].

Eine Studie hat eine Frequenz von 22 % für dieses Allel für den seltenen Cde-Haplotyp bestimmt [Avent *et al.*, 1997]. Bei einer umfassenden Studie in der deutschen Bevölkerung wurden von insgesamt 8442 Antigen-D-negativen Testpersonen nur 50 Personen mittels RHD-SSP-PCR molekulargenetisch als RHD-positiv ermittelt [Wagner *et al.*, 2001]. Hierbei waren nur zwei RHD-positive Fälle unter insgesamt 7688 Testpersonen mit dem Phänotyp ccddee zu verzeichnen, welcher mit 92 % den Großteil aller RhD-negativen Blutspender ausmacht [Wagner *et al.*, 1995].

#### 2.1.4 Rhesus-Inkompatibilität in der Schwangerschaft

Wird dem Kind einer RhD-negativen Mutter ein väterliches Rhesus-D-Allel vererbt, kann es während der Schwangerschaft durch fötal-maternale Transfusion fötaler Blutmengen zu einer Alloimmunisierung der RhD-negativen Frau kommen. Alle weiteren Schwangerschaften sind dann mit den Risiken einer Rhesus-Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind behaftet. Rhesus-Inkompatibilität ist die häufigste Ursache für HDN (*Hemolytic Disease of the Newborn*). Der von alloimmunisierten RhD-negativen Schwangeren gebildete IgG-Antikörper passiert die Plazenta, bindet an fötale Rhesus-Antigen-D-positive Erythrozyten und initialisiert deren Zerstörung. Das Kind entwickelt eine Anämie, darüber hinaus führt die steigende Konzentration an Bilirubin zur Schädigung des fötalen Gehirns (Kernikterus) und kann sogar zum intrauterinen Tod führen (Rhesus-Erythroblastose).

Um Risikoschwangerschaften für HDN vor Komplikationen zu schützen, wird im Allgemeinen eine Anti-D-Prophylaxe-Behandlung bei betroffenen Frauen durchgeführt. Hierbei werden der Mutter innerhalb von 24 bis 72 Stunden nach der Geburt des ersten D-positiven Kindes Anti-D-Immunglobuline verabreicht, welche die D-Antigene der in den mütterlichen Kreislauf eingeschwemmten Erythrozyten besetzen, wodurch die Basisimmunisierung der Mutter verhindert wird. Bei einer zweiten D-positiven Schwangerschaft kann es dann nicht zum sogenannten „Booster-Effekt“ kommen, worunter man eine verstärkte Antikörperbildung als Folge der sekundären Immunantwort versteht [Pschyrembel, 1993]. In neuerer Zeit ist man dazu übergegangen die Anti-D-Prophylaxebehandlung bei RhD-negativen Frauen schon in der ersten Schwangerschaft im Zeitraum der 28. bis 30. Schwangerschaftswoche durchzuführen. Mit dieser Vorgehensweise konnte die anti-D-Immunsierung von RhD-negativen Schwangeren in der ersten Schwangerschaft von 1,5 auf 0,2 % gesenkt werden [Robson *et al.*, 1998]. Trotz dieser Präventionsmaßnahmen werden immer noch RhD-negative Frauen aufgrund verschiedener Umstände während der Schwangerschaft alloimmunisiert, wie z.B. nach nicht erkannten vorherigen Fehl-

geburten, bei erhöhtem Austritt fötaler Erythrozyten in den mütterlichen Blutkreislauf in der späten Schwangerschaft oder unterlassener Anti-D-Prophylaxebehandlung. Liegt bei einer Schwangerschaft der Verdacht einer Rhesus-Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind vor, muss der Rhesus-Status des Fötus ermittelt werden und gegebenenfalls sein gesundheitlicher Zustand regelmäßig kontrolliert werden. Hierfür sind zum einen die invasive Entnahme fötaler Blutproben mit anschließender Überprüfung auf vorliegende Anämie, zum anderen serielle Fruchtwasseruntersuchungen zur Analyse der Bilirubinkonzentration notwendig. Bei ungefähr 17 % der Amniozentesen kommt es zu fötal-maternalen Einblutungen [Tabor *et al.*, 1987], wobei für RhD-negative Schwangere die Gefahr einer schwangerschaftsbedingten Immunisierung im Falle eines RhD-positiven Kindes erhöht wird [Murray *et al.*, 1983].

Bei rechtzeitiger Diagnose von HDN kann durch sofortige Maßnahmen am Neugeborenen, wie eine Phototherapie mit ultraviolettem Licht oder Bluttransfusionen, dessen normale Entwicklung gewährleistet werden. Im Notfall müssen aber intrauterine Bluttransfusionen durchgeführt werden.

### 2.1.5 Molekulargenetische RHD-Genotypisierung

In der Blutgruppendiagnostik ergänzen mittlerweile molekulargenetische Untersuchungen die Serologie als die zeit- und kosteneffizientere Standardmethodik, allerdings kann hierbei noch nicht die gleiche Spezifität, wie bei der serologischen Untersuchung erreicht werden [Wagner *et al.*, 2001]. Ein großer Vorteil liegt aber darin, dass der Nachweis von Blutgruppenmerkmalen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, siehe 4.6) im Vergleich zur serologischen Untersuchung keine Erythrozyten erfordert, so dass z.B. bei der RHD-Genotypisierung des ungeborenen Kindes von der invasiven Entnahme einer fötalen Blutprobe mittels Cordozentese (siehe 2.2.1) abgesehen werden könnte [Gassner *et al.*, 1997; Mueller *et al.*, 2001].

Die Schwierigkeiten bei der Entwicklung eines RHD-PCR-Tests liegt zum einen in der großen Homologie zwischen RHCE- und RHD-Gen (siehe 2.1.2), zum anderen in der biologischen Variabilität des RHD-Geno- sowie -Phänotyps (siehe 2.1.3). Da, abgesehen von wenigen Ausnahmen, bei einem Antigen-D-negativen Europäer im allgemeinen eine komplette Deletion des RHD-Gens vorliegt [Colin *et al.*, 1991; Wagner & Flegel, 2000], sind viele RHD-Diagnostikmethoden auf dem Nachweis einzelner RHD-spezifischer Polymorphismen aufgebaut [Lo *et al.*, 1993; Bennett *et al.*, 1993]. In Anbetracht der komplexen Molekulargenetik seltener D-Varianten wird empfohlen, mehrere Abschnitte des RHD-Gens mittels PCR zu untersuchen [Flegel *et al.*, 1998; Gassner *et al.*, 1997; Maaskant-van Wijk *et al.*, 1998].

## 2.2 Pränataldiagnostik

Unter Pränataldiagnostik faßt man die medizinischen Untersuchungen zusammen, die bei einer Schwangeren durchgeführt werden können, um mögliche Schädigungen oder Erkrankungen beim ungeborenen Kind zu erkennen. Man unterscheidet hierbei die nicht-invasiven Methoden (Ultraschalluntersuchung, Triple-Test) von den invasiven Methoden (Amniozentese, Chorionzottenbiopsie, Cordozentese). Eine pränataldiagnostische Untersuchung wird unter folgenden Umständen empfohlen:

- Die Schwangere ist älter als 35 Jahre,
- die Frau hatte bereits Schwangerschaften mit Chromosomenstörungen,
- bei ihr sind Chromosomentranslokationen erkannt oder werden vermutet,
- es besteht eine familiäre Disposition für pränatal diagnostizierbare Erkrankungen,
- bei einem Familienmitglied ist ein Neuraldefekt aufgetreten (z.B. *Spina bifida*).

### 2.2.1 Invasive Pränataldiagnostik

Die Amniozentese wurde erstmalig 1968 durchgeführt. Eine solche *in utero* Untersuchung des Fötus bildet seitdem die Grundlage für vormals rein theoretische humangenetische Beratungsgespräche. Die Fruchtwasseruntersuchung wird in der Regel in der 15. bis 18. Schwangerschaftswoche (SSW) durchgeführt. Durch die Bauchdecke der Frau wird unter Ultraschallkontrolle eine dünne Punktionsnadel bis in die Fruchtblase vorgeschoben, um ca. 15 bis 20 Milliliter Fruchtwasser als Probe abzusaugen. Es wird zum einen eine routinemäßige Eiweißbestimmung des Fruchtwassers durchgeführt, um einen eventuell vorliegenden Neuralrohrdefekt ausschließen zu können. Zum anderen werden die den Fötus umgebenden Zellen des Fruchtwassersacks (Amnion), sowie die ebenfalls vorhandenen abgeschilferten fötalen Hautzellen und Zellen aus dem Magen-Darm-Trakt in Kultur genommen. Die angereicherten Zellen werden dann einer Chromosomenanalyse unterzogen, deren Ergebnis nach etwa zwei bis drei Wochen vorliegt. Das Risiko, dass durch diesen Eingriff eine Fehlgeburt ausgelöst wird, liegt bei etwa 0,5 bis 1 % [Torricelli & Pescucci, 2001].

Zu Beginn der 80-er Jahre wurde mit der Chorionzottenbiopsie eine weitere invasive pränatale Untersuchungsmethode etabliert, die bereits in der 11. bis 14. SSW durchgeführt werden kann. Unter ständiger Ultraschallkontrolle wird durch die Bauchdecke der Schwangeren eine dünne

Punktionsnadel gestochen und bis in die Plazenta geführt, wo eine Gewebeprobe von der fötalen Seite des Mutterkuchens entnommen wird. Ein erstes vorläufiges Ergebnis der Chromosomenanalyse der Chorionzottenzellen liegt bereits zwei bis drei Tage nach dem Eingriff vor. Da dieses Ergebnis aufgrund der Gefahr maternaler Kontaminationen jedoch mit einigen Unsicherheiten behaftet ist, muß es durch eine Chromosomenanalyse an langzeitkultivierten Chorionzottenzellen abgesichert werden, das nach zwei bis drei Wochen vorliegt. Das Risiko eines Aborts liegt bei der Chorionzottenbiopsie bei ca. 2 bis 3 % .

Unter Cordozentese versteht man die Entnahme fötalen Blutes durch Punktion der Nabelschnur, was ab der 20. SSW möglich ist. Das Ergebnis einer Chromosomenanalyse aus Fötalblut steht nach etwa fünf Tagen zur Verfügung. Neben der Chromosomenanalyse können auch andere Untersuchungen an Fötalblut durchgeführt werden (z.B. Erreger-Nachweise, Blutgruppen- und Antikörper-Bestimmungen). Das Risiko, dass durch die Nabelschnurpunktion eine Fehlgeburt ausgelöst wird, beträgt etwa 2 bis 3 %.

### **2.2.2 Nicht-invasive Pränataldiagnostik**

Unter nicht-invasiver Pränataldiagnostik werden solche Untersuchungsmethoden zusammengefasst, die ohne operativen Eingriff erfolgen und daher kein Risiko für Mutter und Kind bergen. Hierzu zählen die Ultraschalluntersuchung und der sogenannte Triple-Test. Durch Ultraschall kann die Größe des Fötus gemessen und verglichen, sowie makroskopische Fehlbildungen beim Embryo erkannt werden. Mit Hilfe der Methode des sogenannten Farbdopplers kann außerdem der kindliche Blutfluss bestimmt werden. Mit hochauflösenden Ultraschallgeräten ist zudem eine Untersuchung der Nackentransparenz des Embryos möglich. Diese Methode beruht auf der Erkenntnis, dass Embryonen mit Trisomien (Trisomie 13, 18 und 21) in den meisten Fällen einen dickeren Nacken aufweisen als normale Embryos. Beim Triple-Test werden drei bestimmte Eiweiße ( $\alpha$ -Fetoprotein, Choriogonadotropin und unkonjugiertes Östriol) als Serummarker im mütterlichen Blut untersucht. Abweichungen vom Normtiter weisen auf beim Fötus vorliegende Trisomien hin. Der Test kann erst ab der 15. Schwangerschaftswoche durchgeführt werden und weist eine hohe Fehlerrate auf. Es werden ungefähr 70 % der Schwangerschaften mit Chromosomenanomalien entdeckt, allerdings liegt eine falsch positiv Rate von 6 % vor [Torricelli & Pescucci, 2001]. Man kann die bislang routinemäßig angewendeten nicht-invasiven pränatalen Diagnostikmethoden als erste Risikoabschätzung für die Schwangere werten. Ein Befund, der die Schwangerschaft als pathologisch auffällig einschätzt, muss mit einer anschließenden invasiven Methode bestätigt werden.

### 2.2.3 Fötale Zellen im Blutkreislauf der Schwangeren

Die Analyse fötaler Zellen aus dem Blutkreislauf von Schwangeren ist als nicht-invasive Untersuchungsmethode ein lang ersehntes Ziel der Pränataldiagnostik. Der erste Bericht über fötal-maternale Zellwanderung wurde 1893 von dem deutschen Pathologen Schmorl veröffentlicht, der bei 14 von insgesamt 17 an Eklampsie verstorbenen Schwangeren in den Lungenkapillaren Trophoblasten entdeckte [Schmorl, 1893]. Die Existenz von fötalen Zellen im Blutkreislauf gesunder Schwangerer wurde 1969 von Walknowska und Kollegen nachgewiesen, indem sie männliche Metaphase-Lymphozyten in Zellkulturen aus Blutzellen von schwangeren Spenderinnen identifizierten [Walknowska *et al.*, 1969]. In 19 von 21 Fällen konnten die Wissenschaftler mit dieser Methode einen männlichen Fötus bestimmen, womit die erste nicht-invasive, pränatale Geschlechtsbestimmung anhand fötaler Zellen aus dem mütterlichen Blutkreislauf durchgeführt wurde.

Mit der Entwicklung von Chromosomen-spezifischen Oligonukleotidsonden und der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungs-Technik (FISH) Ende der 80-er Jahre konnten Aneuploidien in Zellen sichtbar gemacht werden [Yasutake *et al.*, 1989; Kuo *et al.*, 1991]. Das erste Ziel für die Entwicklung der nicht-invasiven Pränataldiagnostik bestand somit darin, fötale Zellen aus dem mütterlichen peripheren Blut zu isolieren und mit Hilfe von für die Chromosomen 13, 18, 21, X und Y spezifischen Oligonucleotiden, die am häufigsten auftretenden Aneuploidien nicht-invasiv nachzuweisen. Neben der molekularzytogenetischen Identifizierung von fötalen Zellen mittels FISH wurde durch die Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (siehe 4.6) [Saiki *et al.*, 1985; Mullis & Faloona, 1987] die Identifizierung von fötalen Zellen anhand von monogenetischen Unterschieden zur Mutter auch auf molekulargenetischer Ebene möglich, sowie die Diagnose von Einzelgndefekten beim Fötus. In den letzten 30 Jahren sind zahlreiche Versuche unternommen worden, fötale Zellen aus dem mütterlichen Blut zu isolieren und anzureichern. Hierfür macht man sich unter anderem zellspezifische Oberflächenmarker, zytoplasmatische Marker oder morphologische Besonderheiten zu Nutze. Die angewandten Techniken sind vielfältig:

- Fluoreszenz-Durchflußzytometrie (FACS)
- Magnetische Zellsortierung (MACS)
- Separation im elektrischen Feld (CFS)
- Mikromanipulation („*cell-picking*“ vom Objektträger)
- Dichtegradienten-Zentrifugation mit verschiedenen Ficoll®- oder Percoll®-Lösungen
- Selektive Lyse von roten Blutkörperchen mit einem Ammoniumchloridpuffer
- Zellkultur mit fötalen Erythroblasten

Neben der Auswahl der Technik ist ebenfalls die Frage, welcher fötale Zelltyp für die pränatale Diagnostik am geeignetsten ist, zu beantworten. Fötale Zellen, die in der Routinediagnostik verwendet werden können, müssen im Blut aller Schwangeren zu einem frühen Zeitpunkt in ausreichender Menge vorkommen. Sie sollten eine geringe Lebensdauer aufweisen, um nicht in einer folgenden Schwangerschaft Fötus-unspezifische Signale zu verursachen. Zell-spezifische Marker sind notwendig, um sie von mütterlichen Zellen unterscheiden zu können. Trophoblastzellen, Lymphozyten und Erythroblasten sind intensiv untersucht worden. Blutplättchen sind aufgrund des fehlenden Zellkerns für genetische Untersuchungen ungeeignet und Granulozyten wurde in der Vergangenheit nur wenig Beachtung geschenkt, wobei die bisher erhaltenen Ergebnisse nicht reproduziert werden konnten [Martin *et al.*, 1998].

### 2.2.3.1 Trophoblasten

Trophoblasten sind invasive, extra-embryonale Zellen. Sie spielen eine entscheidende Rolle für das Wachstum des Fötus und der Plazenta, indem sie z.B. mütterliche Endothelzellen aus den uterinen Spiralarterien und Venen zurückdrängen, ersetzen und damit die mütterlichen Blutgefäße modifizieren, um einen konstanten und optimalen Blutfluß von der Mutter zum heranwachsenden Embryo zu garantieren. Hierbei werden endovaskuläre Trophoblasten vom Blutstrom erfasst und in den mütterlichen Blutkreislauf gespült [Wijk *et al.*, 2001].

Die 5. Schwangerschaftswoche wird als frühester Zeitpunkt für die Detektion einer Y-Chromosom-spezifischen Sequenz im mütterlichen Blut mittels PCR von Thomas und Kollegen angenommen, wobei es sich bei seiner Untersuchung um eine durch In vitro Fertilisation (IVF) eingeleitete Schwangerschaft gehandelt hat [Thomas *et al.*; 1995]. Der Ursprung der fötalen DNA ist hierbei auf Trophoblasten zurück zu führen, da zu diesem frühen Schwangerschaftszeitpunkt noch kein intra-embryonaler Zelltyp in ausreichender Menge gebildet worden sein kann [Goldberg, 1997]. Trophoblasten unterscheiden sich morphologisch von den Blutzellen. Eine Vielzahl von Oberflächenmarkern wurde auf ihre Trophoblasten-Spezifität hin getestet. Zellmarkierung mit anschließender Magnetischer Zellsortierung, Durchflußzytometrie oder einer Kombination beider Techniken wurde zur Trophoblasten-Isolierung verwendet und der fötale Ursprung mittels Y-Chromosom-spezifischer PCR-Produkte nachgewiesen [Mueller *et al.*, 1990; Cacheux *et al.*, 1992; Durrant *et al.*, 1994; Sbracia *et al.*, 1994]. Während die bisher benannten Methoden eine positive Sortierung der gewünschten Zellen zum Ziel hatten, wird von Wijk und Kollegen auch die Methode der negativen Sortierung angewendet.

Über Dichtegradientenzentrifugation werden zunächst die roten Blutkörperchen von der nukleierten Zellfraktion abgetrennt und im nächsten Schritt die Leukozyten mit einem für sie spezifischen Antikörper markiert und mittels magnetischer Zellsortierung entfernt. Anhand der angereicherten Trophoblasten-Zellfraktion konnte in 33 von 36 Fällen eine korrekte Geschlechtsbestimmung durchgeführt werden, wobei von einem falsch positiven Ergebnis berichtet wird [Wijk *et al.*, 1996].

Verschiedene Gründe sprechen gegen den Gebrauch von Trophoblasten als Zielzelle für die Entwicklung einer neuen, nicht-invasiven Pränataldiagnostik. Sie sind nur in sehr geringer Anzahl im mütterlichen Blut zu finden. Dieser Umstand kann dadurch erklärt werden, dass Trophoblasten aufgrund ihrer Größe in den fein verästelten, mütterlichen Lungenkapillaren festgehalten und abgebaut werden [Benirschke *et al.*, 1994]. Da anhand der Untersuchung von Chorionzotengewebe in der Plazenta Mosaikzustände nachgewiesen sind [Henderson *et al.*, 1996; Goldberg *et al.*, 1997], repräsentiert der Trophoblast eventuell nicht zuverlässig das tatsächliche Genom des Fötus. Aufgrund ihrer zum Teil auftretenden Mehrkernigkeit eignen sich Trophoblasten nur bedingt für eine Aneuploidiediagnostik mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung.

### 2.2.3.2 Fötale Lymphozyten

Fötale Lymphozyten können anhand väterlich vererbter humaner Leukozyten-Antigene (HLA)-Merkmalen von mütterlichen Lymphozyten unterschieden werden. Herzenberg und Kollegen versuchten als Erste, fötale Lymphozyten aus dem mütterlichen Blut anzureichern. Sie benutzten Antikörper gegen den väterlichen HLA-Typ, um die fötalen Zellen zu markieren, reicherten diese mittels Durchflusszytometrie an und wiesen den kindlichen Ursprung der Zellen mit einer Quinacrin-Färbung gegen Y-Chromatin nach [Herzenberg *et al.*, 1979]. Die Anwendung dieses Verfahrens für die Pränataldiagnostik setzt ein genetisch polymorphes Elternpaar, sowie eine mit Sicherheit zutreffende Vaterschaft voraus, was nicht in jedem Fall gewährleistet sein kann.

Eine mögliche Langlebigkeit von fötalen Lymphozyten im maternalen Blut bedingt das Risiko, dass isolierte Zellen von einer früheren Schwangerschaft stammen können. Die Gruppe um Diana Bianchi untersuchte das Blut von Frauen, die zuvor schon einen Jungen geboren hatten, mittels Durchflusszytometrie und Y-Chromosom-spezifischer PCR. Es konnten männliche fötale Zellen sowohl in gereinigten hämatopoetischen Vorläuferpopulationen (CD34+, CD38+), als auch unter T-Lymphozyten (CD3+, CD4+) nachgewiesen werden. In einem Fall fanden sich solche Zellen 27 Jahre nach der Geburt des Sohnes [Bianchi *et al.*, 1996].

### 2.2.3.3 Fötale Erythroblasten

Der Zelltyp, auf den die meisten Forschungsgruppen ihre Anstrengungen fokussiert haben, ist der fötale Erythroblast. Seine kurze Lebensspanne von ungefähr 90 Tagen schliesst eine Persistenz aus einer vorherigen Schwangerschaft aus, außerdem ist die Entwicklung der roten Blutkörperchen im Vergleich zu den weißen Blutkörperchen im ersten Trimester weiter fortgeschritten [Bianchi, 1998]. Nukleierte Rote Blutkörperchen (NRBCs) machen circa 10 % aller roten Blutkörperchen eines 11 Wochen alten Fötus aus. Bei einem Fötus von 19 Wochen sind es nur noch 0,5 % [Torricelli & Pescucci, 2001]. Auch wenn ihr Vorkommen im adulten Blut sehr selten ist, können NRBCs aber auch mütterlichen Ursprungs sein [Slunga-Tallberg *et al.*, 1996].

Zur Anreicherung der nukleierten Erythroblasten nutzen viele Gruppen die Markierung mit einem Antikörper gegen den Transferrin-Rezeptor (CD71) [Bianchi *et al.*, 1994; Gänshirt-Ahlert *et al.*, 1992]. Dieser Antikörper ist allerdings nicht ausschließlich NRBC-spezifisch, sondern allgemein auf Zellen zu finden, die Eisen aufnehmen [Martin *et al.*, 1998]. Auf der Suche nach einer spezifischeren Anreicherungs-methode für fötale Erythroblasten wurden verschiedene Antikörper getestet, wie Anti-Glycophorin A [Lewis *et al.*, 1996; Price *et al.*, 1991] oder ein Antikörper gegen fötales Hämoglobin für eine intra-zytoplasmatische Färbemethode [DeMaria *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 1997]. Auch fötales Hämoglobin ist jedoch nicht ausschließlich fötal-spezifisch und kann geringfügig im Blutkreislauf von Erwachsenen auftauchen [Pembrey *et al.*, 1973]. Die einzigen Marker, die tatsächlich spezifisch für fötale Zellen zu sein scheinen, sind embryonales Hämoglobin Epsilon und Zeta [Mesker *et al.*, 1998]. Diese Marker werden aber nur in geringen Mengen in nukleierten fötalen Erythroblasten exprimiert.

## 2.2.4 Häufigkeit fötaler Zellen im Blutkreislauf von Schwangeren

Die Anzahl fötaler Zellen im mütterlichen Blutkreislauf ist sehr gering und wird mit einem Bereich von 1 zu  $10^5$  bis 1 zu  $10^9$  in Bezug auf mütterliche Blutzellen angegeben [Bianchi, 1995; Goldberg *et al.*, 1997]. Bei den meisten Studien zur Beantwortung der Frage, wieviele fötale Zellen tatsächlich im mütterlichen Blutkreislauf zu finden sind, wurden Methoden zur Zellanreicherung angewendet. Der dabei auftretende, technisch bedingte Verlust von Zellen war sehr unterschiedlich und die erhaltenen Ergebnisse sind somit untereinander schwer zu vergleichen.

Hamada und Kollegen untersuchten Y-Chromosom-positive Zellen aus nichtsortiertem mütterlichen Blut mittels FISH und gaben deren Frequenz mit 1 zu  $10^5$  im ersten Trimester bis 1 zu  $10^4$  kurz vor der Geburt an [Hamada *et al.*, 1993].

Bianchi und Kollegen bestimmten die Anzahl männlicher fötaler Zellen im mütterlichen Blut mit Hilfe einer radioaktiv-markierten quantitativen PCR. Zunächst wurde eine DNA-Extraktion aus dem mütterlichen Vollblut vorgenommen, um diese dann in einer Y-Chromosom-spezifischen PCR einzusetzen. Mit Hilfe eines *Phosphoimager* wurden die Intensitäten der erhaltenen PCR-Produktbanden im Elektrophorese-Gel mit denen der PCR-Produkte, die mit einer Standardreihe aus männlicher DNA erhalten wurden, verglichen. Die mittlere Anzahl von fötalen männlichen Genomäquivalenten wird auf 24 (Bereich 0 bis 91) in 16 ml Blut angegeben, bezogen auf eine Gruppe von 90 Schwangeren mit einem 46,XY Fötus [Bianchi *et al.*, 1997]. Vorangegangene Studien ermittelten einen Bereich von 3 bis 74 fötale Zellen in 15 bis 40 ml mütterlichen Blutes [Elias *et al.*, 1992; Wessman *et al.*, 1992; Hawes *et al.*, 1994; Reading *et al.*, 1995; Takabayashi *et al.*, 1995].

Eine neuere Studie von Krabchi und Kollegen gibt die Anzahl von nukleierten fötalen Zellen mit 2 bis 6 auf einen ml mütterlichen Blutes an. Sie untersuchten eine Gruppe von 12 Schwangeren mit einem männlichen Fötus zwischen der 18. und 22. SSW. Die Zellen aus jeweils 3 ml mütterlichen Blutes wurden mit der PRINS-Technik (*primed in situ labeling*) markiert und die XY-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop zwischen den mütterlichen XX-Zellen ausgezählt [Krabchi *et al.*, 2001].

## 2.2.5 Fötale DNA im Plasma von Schwangeren

Die routinemäßige Durchführung einer nicht-invasiven Pränataldiagnostik anhand seltener fötaler Zellen aus dem peripheren Blut von Schwangeren konnte bislang nicht realisiert werden, da ihre Isolierung bzw. Anreicherung für das klinische Personal mit zu großem Arbeitsaufwand verbunden wäre. Der Überschuss an mütterlichen Zellen erschwert die Entwicklung eines hinreichend sensitiven Tests, außerdem besteht bei einer aufwendigen Probenaufarbeitung die Gefahr der Kontamination. Eine neue Möglichkeit der pränatalen Diagnostik ergibt sich aus der Beobachtung, dass fötale DNA frei im Serum von Schwangeren auftritt.

### 2.2.5.1 Entdeckung zellfreier fötaler DNA im mütterlichen Serum bzw. Plasma

Das Wachstum der Plazenta, sowie die Ausbreitung von Trophoblasten im mütterlichen Körper wurde von einigen Autoren mit dem Wachstum eines Tumors, bzw. dem invasiven Charakter von Krebszellen im Körper eines Erkrankten verglichen. In diesem Zusammenhang wurden der Plazenta „pseudo-maligne“ Eigenschaften zugeschrieben [Strickland & Richards, 1992]. Da Tumor-DNA im Plasma oder Serum von Krebspatienten nachweisbar ist, lag die Vermutung nah, dass auch fötale DNA im Blut von Schwangeren zellfrei zirkuliert.

Der Nachweis dieser fötalspezifischen DNA im mütterlichen Blutplasma gelang erstmals Lo und Kollegen mittels einer Y-Chromosom-spezifischen PCR [Lo *et al.*, 1997]. Mit dieser Methode gelang derselben Arbeitsgruppe zuvor schon der erste molekulargenetisch durchgeführte geschlechtsspezifische Nachweis fötaler DNA im Vollblut von Schwangeren [Lo *et al.*, 1989]. Ermutigt durch die Entdeckung von Tumor-spezifischer DNA im Plasma und Serum von Krebspatienten [Chen *et al.*, 1996; Nawroz *et al.*, 1996; Anker *et al.*, 1997], setzten Lo und Kollegen 10 µl aufgekochtes Plasma oder Serum direkt im PCR-Versuch ein, wobei der Test eine Sensitivität von 80 % bzw. 70 % erreichte [Lo *et al.*, 1997].

### 2.2.5.2 Quantifizierung zellfreier fötaler DNA im mütterlichen Blutkreislauf

Der Gehalt an fötaler DNA im mütterlichen Plasma wurde von Lo und Kollegen mittels einer Echtzeit- (*Real Time*) PCR ermittelt [Lo *et al.*, 1998]. Bei dem durchgeführten Verfahren wird in der PCR eine sogenannte TaqMan®-Sonde eingesetzt (siehe 4.7.1). Die Nukleotidabfolge dieser Sonde ist spezifisch für die zu amplifizierende Ausgangssequenz, außerdem ist sie am 5'- und 3'-Ende mit einem signalgebenden Fluoreszenzfarbstoff bzw. einem sogenannten „*Quenching-Molekül*“ markiert. Bei einer intakten TaqMan®-Sonde wird die Fluoreszenzstrahlung des Farb-

stoffs aufgrund der Wechselwirkung mit dem „Quencher“ in langwelligere Wärmestrahlung umgewandelt. Während der PCR hybridisiert die TaqMan®-Sonde auf dem ihr komplementären Abschnitt der Zielsequenz und wird im Laufe des Prozesses aufgrund der 5'→3' Exonuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase abgebaut. Der Fluoreszenzfarbstoff wird somit aus der näheren Umgebung seines „Quenchers“ entfernt. Relativ zur exponentiell ablaufenden PCR-Produktzunahme kommt es zu einem Fluoreszenzanstieg, der in Echtzeit beobachtet werden kann [Holland *et al.*, 1991; Heid *et al.*, 1996].

Lo und Kollegen konnten im Vergleich zu einer DNA-Verdünnungsreihe mit Hilfe einer Y-Chromosom-spezifischen Echtzeit-PCR die mittlere Anzahl fötaler Genomäquivalente für die frühe Schwangerschaft (11. bis 17. SSW) auf 25,4 und für die späte Schwangerschaft (37. bis 43. SSW) auf 292,2 in einem Milliliter mütterlichen Plasmas bestimmen. Fötale DNA im mütterlichen Blutplasma als Ausgangsmaterial für eine nicht-invasive Pränataldiagnostik hat mehrere Vorteile gegenüber der Verwendung fötaler Zellen aus dem mütterlichen Vollblut. Zum einen ist keine aufwendige Probenaufarbeitung notwendig, zum anderen ist die Konzentration dieser zellfreien DNA im Plasma relativ hoch. Diese Aussage wird durch den Vergleich der Ergebnisse von Lo und Kollegen zur Quantifizierung fötaler DNA im mütterlichen Plasma [Lo *et al.*, 1998] mit denen von Bianchi und Kollegen zur Quantifizierung fötaler Zellen im mütterlichen Blut [Bianchi *et al.*, 1997] bestätigt. Bezogen auf eine Gruppe von Probandinnen in der frühen Schwangerschaft ist demnach die Konzentration fötaler DNA im Plasma ca. 20-fach höher, als die Konzentration fötaler Zellen im Vollblut: 25,4 fötale Genomäquivalente pro ml mütterlichen Plasmas im Vergleich zu 1,2 fötale Zellen pro ml mütterlichen Blutes. Vergleicht man die Ergebnisse von Lo und Kollegen mit denen von Krabchi *et al.* [2001], ist die Konzentration fötaler DNA im Schwangeren-Plasma mindestens 4-fach erhöht gegenüber der Anzahl fötaler Zellen im Schwangeren-Blut. Außerdem ist das Verhältnis von fötaler DNA zur Gesamt-DNA im Plasma günstiger, als das Verhältnis fötaler Zellen zu mütterlichen Zellen im Vollblut der Schwangeren. Der prozentuale Gehalt an fötaler DNA in der Gesamt-Plasma-DNA wird von Lo *et al.* mit 3,4 % (Bereich 0,39 % - 11,9 %) in der frühen Schwangerschaft bzw. mit 6,2 % (Bereich 2,33 % bis 11,4 %) in der späten Schwangerschaft angegeben [Lo *et al.*, 1998]. Hamada und Kollegen gaben die Frequenz fötaler Zellen im mütterlichen Blut mit 0,0035 % für das erste Trimester und mit 0,008 % für das dritte Trimester an [Hamada *et al.*, 1993].

Im Rahmen der von Lo und Kollegen durchgeführten Studie wurde ebenfalls die Veränderung der Konzentration von fötaler DNA im mütterlichen Plasma im Verlauf der Schwangerschaft beobachtet [Lo *et al.*, 1998]. Hierfür wurden Probandinnen ausgewählt, deren Schwangerschaften mittels In vitro Fertilisation eingeleitet wurde. Bei allen 12 Probandinnen mit männlichen Fö-

ten konnten vor Beginn der Schwangerschaft keine SRY-Sequenzen im Blutplasma nachgewiesen werden. Ab der 7. Schwangerschaftswoche war die Detektion der SRY-Sequenz mit Hilfe des SRY-TaqMan®-Assays möglich. Außerdem war bei allen Schwangerschaften ein Anstieg der Konzentration von fötaler DNA im mütterlichen Plasma mit fortschreitender Schwangerschaft zu beobachten.

#### 2.2.5.3 Existenz von zellfreier fötaler DNA im mütterlichen Blutkreislauf nach der Geburt

Im Gegensatz zu intakten fötalen Zellen, die nach der Geburt im mütterlichen Blutkreislauf noch länger perexistieren können [Bianchi *et al.*, 1996], wird die frei zirkulierende DNA rasch abgebaut, was in einer weiteren von Lo und Kollegen durchgeführten Studie beobachtet wurde [Lo *et al.*, 1999]. Zunächst untersuchte man die Plasma-DNA von 12 Müttern 1 bis 42 Tage nach der Geburt hinsichtlich der Existenz noch vorhandener fötaler DNA-Sequenzen, hierfür wurde der schon für die erste Studie entwickelte SRY-TaqMan®-PCR-Test verwendet [Lo *et al.*, 1998]. Einen Tag nach der Geburt war keine SRY-Sequenz mehr im mütterlichen Plasma detektierbar. Um den zeitlichen Beobachtungsraum enger einzugrenzen, wurde die Plasma-DNA von 8 Frauen, die ihre Söhne mittels Kaiserschnitt zur Welt brachten, in kürzeren Abständen direkt nach dem Eingriff untersucht. Bei 7 von den 8 Frauen war 2 Stunden nach dem Geburtsvorgang keine fötal-spezifische DNA-Sequenz mehr zu detektieren. Die Autoren geben eine mittlere Halbwertszeit von 16,3 Minuten (Bereich 4 bis 30 Minuten) für fötale DNA im mütterlichen Plasma nach der Geburt an.

#### 2.2.5.4 Ursprung von zellfreier fötaler DNA im mütterlichen Blutkreislauf

Die Existenz großer Mengen zellfreier fötaler DNA im mütterlichen Plasma widerlegt die konventionelle Annahme, dass der fötale und mütterliche Blutkreislauf als zwei physionomisch streng voneinander getrennte Kompartimente koexistieren. So, wie der biologische Hintergrund für die Existenz von fötalen Zellen im mütterlichen Blutkreislauf noch nicht im Detail erklärt werden konnte, so konnte auch noch nicht der biologische Mechanismus aufgedeckt werden, der für die Existenz von zellfreier DNA im mütterlichen Blutkreislauf verantwortlich ist [Bianchi & Lo, 2001]. Es gibt verschiedene Interpretationsansätze, wie z.B. einen kontinuierlichen Ablösungsprozeß von fötalen Zellen aus der Plazenta, oder Transport von fötalen Zellen durch die Plazenta. Das mütterliche Immunsystem zerstört diese, wobei die fötale DNA teilweise ins mütterliche Blut austreten kann. Die im mütterlichen Blut zu findenden seltenen fötalen Zellen sind damit nur ein Restbestand von der ursprünglichen Anzahl frei gegebener fötaler Zellen [Bianchi,

1998]. Ein weiterer Erklärungsversuch geht von einem aktiven Auf- und Abbau von Zellmaterial an der Plazentaoberfläche aus, bei dem kontinuierlich fötale DNA an die Umgebung abgegeben wird [Bianchi, 1998]. Die Existenz fötaler DNA kann auch mit einer Apoptose fötaler Zellen erklärt werden [Sekizawa *et al.*, 2000; Kolialexi *et al.*, 2001], die in Abhängigkeit zum individuellen Verlauf der Schwangerschaft oder in Abhängigkeit zur individuellen Entwicklung des Fötus abläuft. Bei der von Lo und Kollegen durchgeführten Studie der Konzentrationsveränderung von fötaler DNA im mütterlichen Plasma im Verlauf der Schwangerschaft wurde ein starker Anstieg innerhalb der letzten 8 Schwangerschaftswochen detektiert [Lo *et al.*, 1998]. Diese Beobachtung kann mit dem abgeschlossenen Wachstum des Fötus im dritten Trimester, oder mit dem auf mikroskopischer Ebene beginnendem Zusammenbruch der Plazentabariere als Vorbereitung für die bevorstehende Geburt, in Beziehung gebracht werden. Pathologische Vorgänge während der Schwangerschaft, deren Merkmale auf eine abnorme Entwicklung der Plazenta, oder des Fötus schließen lassen, könnten somit einen entscheidenden Einfluss auf die Konzentration von freier fötaler DNA im mütterlichen Serum oder Plasma haben.

### **2.2.6 Klinische Anwendung von fötalem Material aus mütterlichem Blut**

Bis heute konnten unterschiedliche genetische Aberrationen des ungeborenen Kindes anhand der Untersuchung von fötalen Zellen im maternalen Blut, wie in Tabelle 2.1 gezeigt, nachgewiesen werden. Die Detektion von Aneuploidien mittels FISH-Technik anhand fötaler Zellkerne hat hieran einen großen Anteil. Diese Methode findet derzeit Anwendung in einer vom *United States National Institute of Child Health and Human Development* (NICHD) angelegten *Multi-Center* Studie, der sogenannten „*the National Institute of Child Health an Human Development Fetal Cell Isolation Study*“ (NIFTY). Hierbei wird der direkte Vergleich von nicht-invasiver und invasiver Pränataldiagnostik zur Bestimmung des fötalen Geschlechts und den am häufigsten auftretenden Aneuploidien vorgenommen [de la Cruz *et al.*, 1995; Bianchi *et al.*, 1999].

Neben einer nicht-invasiven Pränataldiagnostik anhand der Analyse von fötalen Zellen wird bereits auch zellfreie fötale DNA im mütterlichen Plasma für die Diagnostik genetischer Defekte des Kindes eingesetzt. Voraussetzung ist hierbei ebenfalls die eindeutige Unterscheidbarkeit zwischen dem genetischen Material des Kindes und dem der Mutter. So dient die Y-Chromosom-spezifische PCR vielen Gruppen zur Identifizierung fötaler Zellen und fötaler DNA im mütterlichen Blut bzw. Plasma [Lo *et al.*, 1989, 1997, 1998; Bianchi *et al.*, 1997; Smid *et al.*, 1999; Houfflin-Debarge *et al.*, 2000; Honda *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2001].

<b>Erscheinungsjahr; Erst-Autor</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Zell-Anreicherung / Diagnose-Technik</b>
1990; Camaschella	Hb Lepore-Boston	keine / PCR mit DNA-Extrakt aus mütterlichem Blut
1992; Bianchi	47,XY,+ 21	FACS (AK anti-CD71) / FISH
1992; Elias	47,XY,+ 21	FACS (AK anti-CD71) / FISH
1992; Cacheux	47,XXX	Abtrennung von mütterlichen Lymphozyten mit MACS (AK anti-CD45), anschließend FACS (AK gegen Trophoblasten) / FISH
1993; Ganshirt-Ahlert	47,XY,+ 18 47,XY,+ 21	Dichtegradienten-Zentrifugation anschließend MACS (AK anti-CD71) / FISH
1996 a; Sekizawa	Dyckhoff Muskel Dystrophie	Dichtegradienten-Zentrifugation anschließend Mikromanipulation / PEP anschließend PCR
1996 b; Sekizawa	RHD-Genotyp	Dichtegradienten-Zentrifugation anschließend Mikromanipulation / <i>Nested</i> PCR
1996; Cheung	Sichelzellenanämie $\beta$ -Thalassämie	MACS anschließend Mikromanipulation / FISH
1998; Oostwijk	47,XY,+ 13	Dichtegradienten-Zentrifugation / FISH
1998; Watanabe	Ornithin Transcarbamylase Defizienz	Dichtegradienten-Zentrifugation anschließend Mikromanipulation / PEP anschließend PCR mit RFLP-Analyse
1999; Sekizawa	RHD-Genotyp	FACS (anti- $\gamma$ -Hämoglobin) anschließend Mikromanipulation / PCR
2000; Samura	46,XX	FACS (anti- $\gamma$ -Hämoglobin) anschließend Mikromanipulation / Fluoreszenz PCR mit für Chromosom 18 und 21 spezifischen STR-Markern
2001; Samura	Trisomie 21	FACS (anti- $\gamma$ -Hämoglobin, Hoechst 33342) anschließend Mikromanipulation / PCR mit Chromosom 21 spezifischen STR-Markern

**Tabelle 2.1: Beispiele für eine nicht-invasive Pränataldiagnostik anhand fötaler Zellen aus dem Blutkreislauf von Schwangeren.**

Während die FISH-Diagnostik auf intakte Zellen angewendet wird und hierbei größere Chromosomenabschnitte untersucht werden, ist die Untersuchung der zellfreien DNA auf kleinere DNA-Fragmente mittels PCR beschränkt. Viele Krankheiten, die auf genetische Defekte zurück zu führen sind, beruhen auf nur sehr geringen strukturellen Unterschieden zwischen der DNA-Sequenz des Kranken im Vergleich zu der des Gesunden. In der Tabelle 2.2 werden einige Beispiele aufgeführt, bei denen die Diagnose einer beim Fötus vorliegenden Krankheit anhand der molekulargenetischen Untersuchung von zellfreier DNA aus mütterlichem Blutplasma bereits gelungen ist.

Erscheinungsjahr; Erst-Autor	Diagnose	Diagnose-Technik
2000; Chen	<b>Aneuploidie</b> väterlich vererbte chromosomale Translokation im distalen Chromosom 3p	Mikrosatelliten-Analyse
2000; Amicucci	<b>Myotone Dystrophie</b> Expansion eines CTG- <i>Repeats</i> im DMPK-Gen auf Chromosom 19q13	Mikrosatelliten-Analyse
2000; Saito	<b>Achondroplasie</b> Punktmutation im FGFR3-Gen auf Chromosom 4p16.3	PCR mit RFLP-Analyse
2002; Gonzales-Gonzales	<b>Cystische Fibrose</b> väterlich vererbte Mutation (Q890X) im CFTR-Gen auf Chromosom 7q31.2	PCR mit RFLP-Analyse
2002; Chiu	<b><math>\beta</math>-Thalassämie</b> Codon 41/42 (-CTTT) Mutation im $\beta$ -Globin-Gen auf Chromosom 11p15.5	Echtzeit-PCR

**Tabelle 2.2: Beispiele für eine nicht-invasive Pränataldiagnostik anhand zellfreier fötaler DNA aus dem Plasma von Schwangeren.**

Neben dem Nachweis Y-Chromosom-spezifischer Sequenzen im Plasma von Schwangeren [Lo *et al.*, 1997] gelang auch der fötalspezifische Nachweis von RHD-Sequenzen im Plasma Antigen-RhD-negativer Schwangerer [Lo *et al.*, 1998; Faas *et al.*, 1998; Bischoff *et al.*, 1998; Pertl *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2000 b; Avent *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2001; Legler *et al.*, 2002; Finning *et al.*, 2002]. Bis heute ist es allerdings nicht gelungen, einen routinefähigen Pränataltest zur fötalen RHD-Genotypisierung anhand mütterlichen Blutplasmas zu entwickeln.

### 3 Aufgabenstellung

Die Aufgabenstellung für die vorliegende Arbeit bestand in der Entwicklung eines routinefähigen nicht-invasiven Tests zur Rhesus-D-Genotypisierung des ungeborenen Kindes von Rhesus-D-negativen Frauen. Der geplante RHD-Test sollte auf der molekulargenetischen Untersuchung von zellfreier fötaler DNA aus mütterlichem Blutplasma mittels Echtzeit-PCR beruhen. Hierfür ist lediglich die Entnahme einer mütterlichen Blutprobe erforderlich. Für die bisher mögliche serologische pränatale Rhesus-D-Typisierung wird dagegen die invasive Entnahme einer fötalen Blutprobe durchgeführt.

Da davon auszugehen war, dass die Konzentration von frei zirkulierender fötaler DNA im mütterlichen Blutplasma gering ist, musste eine effiziente DNA-Extraktionsmethode gefunden werden, um eine ausreichende Menge von fötalspezifischen DNA-Ausgangssequenzen im PCR-Versuch zu gewährleisten.

Die Rhesus-D-Genotypisierung des ungeborenen Kindes sollte mittels Amplifikation RHD-spezifischer Sequenzen aus mütterlicher Blutplasma-DNA erfolgen. Neben der großen Sequenzhomologie zwischen dem RHD- und RHCE-Gen war auch das Auftreten von Variationen von RHD-Geno- und -Phänotypen in der Bevölkerung problematisch für die Entwicklung eines zuverlässigen Rhesus-D-spezifischen PCR-Tests. Um den Anteil derartiger Variationen in der deutschen Bevölkerung beurteilen zu können, sollte die entwickelte RHD-spezifische PCR an einer größeren Gruppe serologisch als RhD-negativ bestimmter Blutspender getestet werden.

Bei der vorgeburtlichen ärztlichen Betreuung von Rhesus-D-negativen Frauen könnte eine Rhesus-D-Zygotiebestimmung des betreffenden Vaters eine Risikoeinschätzung der Schwangerschaft für den Erhalt eines Rhesus-D-positiven Fötus ermöglichen. Ist der Vater z.B. ebenfalls Rhesus-D-negativ, bedarf es keiner besonderen Schwangerschaftsbetreuung im Hinblick auf eine eventuelle Rhesus-Inkompatibilität von Mutter und Fötus.

Zu diesem Zweck sollte ein Multiplex-PCR-Test entwickelt werden, der eine relative Allel-Quantifizierung von RHD- und RHCE-Gen und damit eine Rhesus-D-Zygotiebestimmung für betroffene Väter ermöglichen könnte.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Probenmaterial

#### 4.1.1 Blutproben mit bekanntem Rhesus-D-Serotyp

Von jeweils 50 weiblichen (f1 bis f50) und männlichen (m1 bis m50) Blutspendern standen Blutproben zur Verfügung. Die Vollblutproben wurden in 5 ml Serumröhrchen mit EDTA (Hersteller nicht bekannt) gesammelt. Bei der serologischen Prüfung waren von den 100 erhaltenen Proben insgesamt 11 als Rhesus D-negativ eingestuft worden.

Die Extraktion der genomischen DNA erfolgte mit den unter 4.3.1.1 und 4.3.2.1 beschriebenen Methoden.

#### 4.1.2 Blutproben (Transfusionsmedizin Universitäts-Klinik-Münster)

Im Rahmen einer Kooperation wurden von der Transfusionsmedizin der Universitäts-Klinik-Münster 255 serologisch als Rhesus D-negativ eingestufte Blutproben erhalten, die mit dem schriftlichen Einverständnis der Spender/innen parallel zur freiwilligen Blutspende entnommen wurden. Die Probensammlung erfolgte in 2,7 ml Hämatologie-Monovetten® (Kalium-EDTA, Sarstedt). Bis zur Durchführung der DNA-Extraktion nach Methode 4.1.2.1 wurden die Blutproben bei 4 °C gelagert. Gemäß einer von der transfusionsmedizinischen Abteilung vorgenommenen Serotypisierung waren 241 Proben ccdee, 12 Proben Ccdee und 2 Proben ccddEe.

#### 4.1.3 Schwangeren-Blutplasmaproben (Evangelisches Krankenhaus Oberhausen)

Im Rahmen der routinemäßigen Voruntersuchung zur invasiv durchgeführten Pränataldiagnostik wurde Patientinnen des Evangelischen Krankenhauses Oberhausen mit deren schriftlichen Einverständnis jeweils eine 9 ml Blutprobe in eine S-Monovette® (EDTA K<sub>2</sub>-Gel, Sarstedt) entnommen. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 1600 x g und Raumtemperatur trennt sich die Vollblutprobe mit diesem Monovettentyp in drei voneinander getrennte Phasen auf:

- Zellfraktion (*Buffycoat*),
- Geldiffusionsschicht und
- Blutplasma.

Das Plasma wird in ein 15 ml Röhrchen mit konischem Boden (Sarstedt) überführt und einem zweiten Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 3000 x g und Raumtemperatur unterzogen. Das erhaltene zellfreie Plasma wird in ein sauberes 15 ml Röhrchen mit konischem Boden (Sarstedt) überführt und bei -20 °C bis zur DNA-Extraktion aufbewahrt (siehe Abb. 4.1).

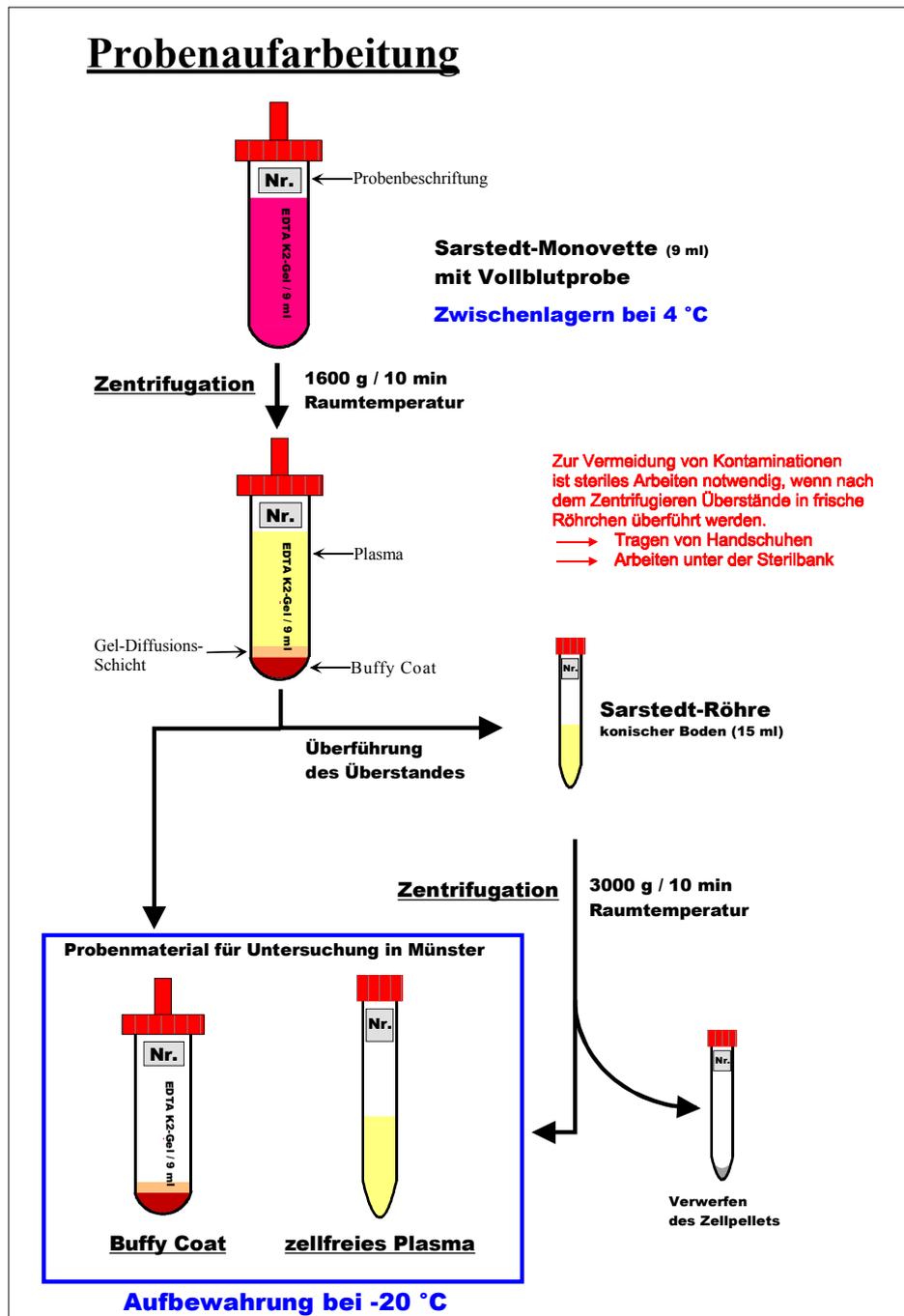


Abbildung 4.1: Informationsblatt zur Blutprobenaufarbeitung, das für das technische Personal im Evangelischen Krankenhaus Oberhausen entworfen wurde.

#### 4.1.4 Amnionflüssigkeitsüberstand (Evangelisches Krankenhaus Oberhausen)

Von jeder Patientin des Evangelischen Krankenhauses Oberhausen, von der eine Blutprobe aufgearbeitet wurde, ist ebenfalls eine Probe von ca. einem Milliliter Amnionflüssigkeitsüberstand abgenommen worden. Dieses Material fällt bei der routinemäßigen Aufarbeitung von Amnionflüssigkeit zur Gewinnung fötaler Zellen für die FISH-Analyse als Abfallprodukt ab. Die für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellten Proben Amnionflüssigkeitsüberstand wurden nach Entnahme bei  $-22\text{ °C}$  zwischengelagert und bis zu ihrer Verwendung bei  $-80\text{ °C}$  aufbewahrt. Durch die molekulargenetische Untersuchung des Amnionflüssigkeitsüberstandes sollte in der vorliegenden Arbeit der RHD-Genotyp des Fötus bestimmt werden.

#### 4.1.5 Sonstige Blutproben

Frische Blutproben wurden in 9 ml S-Monovette® (EDTA  $K_2$ -Gel, Sarstedt) oder einfache 9 ml Hämatologie-Monovetten (Kalium-EDTA, Sarstedt) entnommen. Die Blutproben wurden entweder, wie unter 4.1.3 beschrieben (siehe Abb. 4.1) aufgearbeitet, oder es erfolgte eine DNA-Präparation anhand der Vollblutprobe nach Methode 4.3.1.1 oder 4.3.2.1.

## 4.2 Nukleinsäuren

### 4.2.1 DNA-Längenstandards

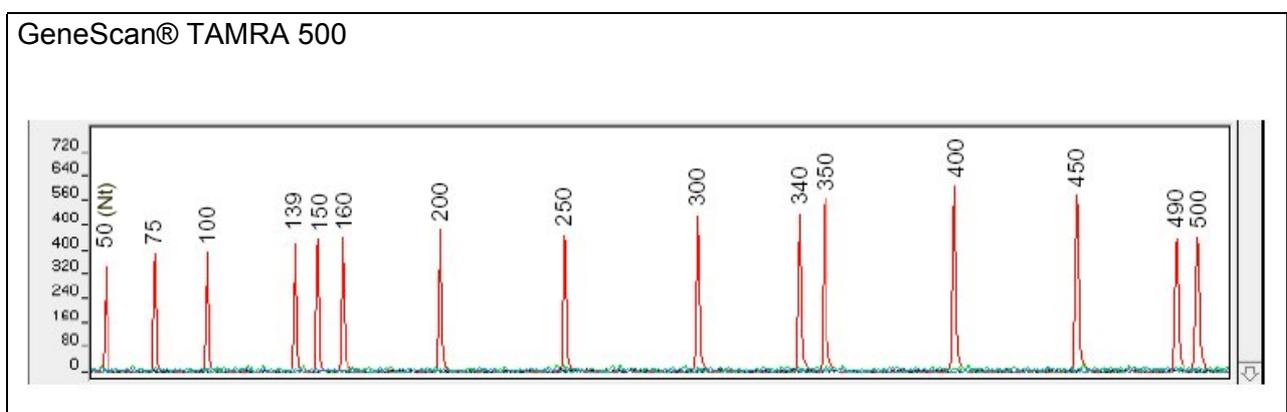


Abbildung 4.2: Elektropherogramm des verwendeten DNA-Längenstandards (PE Applied Biosystems) in der Kapillarelektrophorese

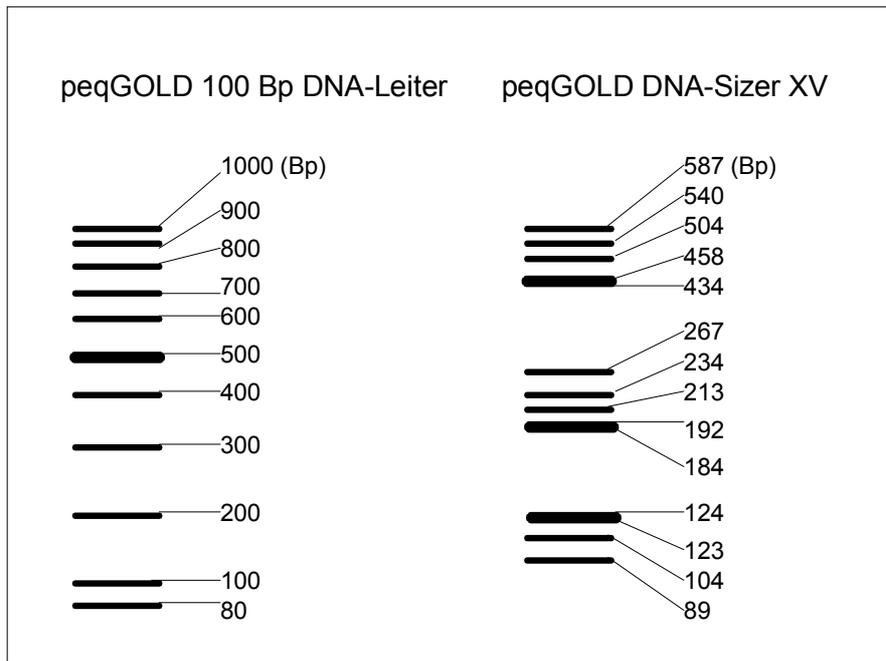


Abbildung 4.3: DNA-Längenstandards (peQLab) für die Agarose-Gelelektrophorese.

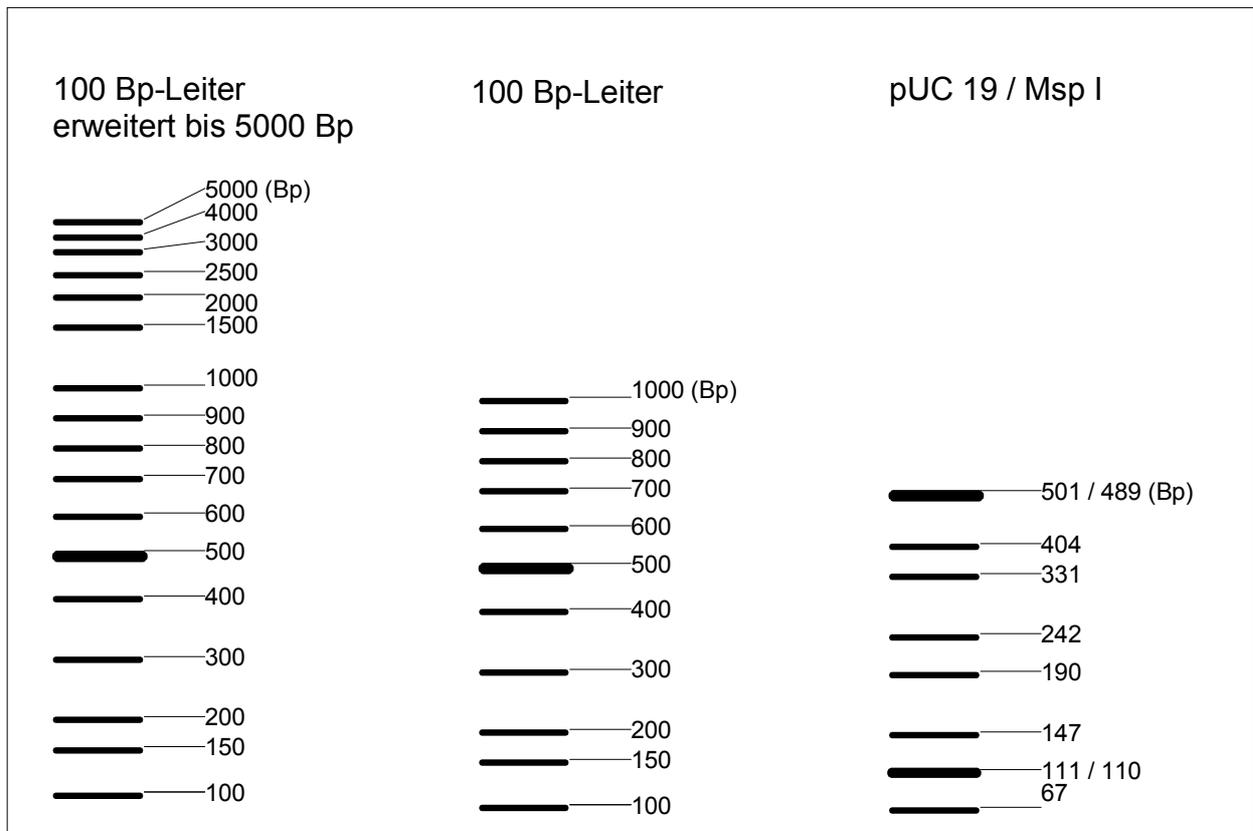


Abbildung 4.4: DNA-Längenstandards (Molekularbiologisches & biochemisches Labor Dr. Bartling GmbH) für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

## 4.2.2 Oligonukleotide

Die in der folgenden Tabelle 4.1 aufgelisteten Oligonukleotide wurden entweder bei den Firmen Eurogentec oder Operon bezogen.

Oligonukleotid 5'-3'		Bp	G + C [%]	T <sub>M</sub> / T <sub>An</sub> [°C]	Literatur	
<b>RHD Exon 3</b>						
D-ex3-F	TTGTCGGTGCTGATCTCAGTGGA	23	52	66 / 51	[Gassner <i>et al.</i> , 1997]	
D-ex3-R	ACTGATGACCATCCTCAGGTTGCC	24	54	65 / 50		
<b>RHD Exon 4</b>						
D-ex4-F	ACATGATGCACATCTACGTGTTTCGC	25	48	64 / 49		
D-ex4-R	CAGACAAACTGGGTATCGTTGCTG	24	50	63 / 48		
<b>RHD Exon 5 / Intron 6</b>						
D-ex5-F	ATGTTCTGGCCAAGTGCAACTCTG	25	48	63 / 48		
D-ex5-R	CTGCTCACCTTGCTGATCTTCCC	23	56	64 / 49		
<b>RHD Exon 6</b>						
D-ex6-F	GGAACAAGGCCAGCTTATTGA	22	50	63 / 48		
D-ex6-R	CCAATCCTCTTGCCTCAGCCTC	22	59	65 / 50		
<b>RHD Exon 10 UTR</b>						
RD-A	CCTCTCACTGTTGCCTGCATT	21	52	61 / 46	[Lo <i>et al.</i> , 1998]	
RD-B	AGTGCCTGCGCGAACATT	18	55	62 / 47		
RD-T <i>TaqMan</i>	<b>6-FAM-</b> TACGTGAGAAACGCTCATGACAGCAAAGTCT <b>-TAMRA</b>	31	45	72 / 57		
<b>RHD Exon 7</b>						
MS-Dex7	GCTGGGGATTCCCCACAGCTCCATCATCGG	30	63	80 / 65		
MS-Dex7b	TCCCCACAGCTCCATCATCGG	21	61	67 / 52		
Dex7-com	GCCATTGCCGGCTCCGACGGTATC	24	66	75 / 60		
BP-Dex7 <i>Molecular Beacon Primer</i>	<b>HEX-</b> AGGACCAGCTTTGCTGGTCC( <b>DABCYL-dT</b> ) -GCTGGTGCTTGATACCGTCGTAGC					

Oligonukleotid 5'-3'		Bp	G + C [%]	T <sub>M</sub> / T <sub>An</sub> [°C]	Literatur
<b>RHCE Exon 7</b>					
MS-CEex7	CAGGTGTGTTGTAACCGAGTCGAGGGGAT- TCACCACATCTCCGTCAAGCA	50	54	87 / 72	
MS-CEex7b	GGATTCACCACATCTCCGTCAAGCA	25	52	68 / 53	
BP-CEex7 <i>Molecular Beacon Primer</i>	<b>6-FAM-</b> ACCTGGTCGTTTCGACCAGG( <b>DABCYL</b> -dT) -GCTGCTGGTGCTTCATACTGTCTGGAA				
<b>RHD / RHCE Exon 7</b>					
RH-com	CTCTGCACACATTTCTTCCTGAGTTGG	27	48	65 / 50	
RH-comx	CCCCAGCTAAGGACTCTGCACACATTT	27	51	69 / 54	
RH-comy	AGTGCACACGCCCCAGCTAAGGACTC	26	61	73 / 58	
RH-comz	CCAGCTAAGGACTCTGCACACATTTCTT	28	46	67 / 52	
RH-com-FI	<b>6-FAM-</b> CTCTGCACACATTTCTTCCTGAGTTGG				
DCE-Taq1 <i>TaqMan</i>	<b>6-FAM-</b> CGGCAATGGCATGTGGGTCACTGGGC <b>-TAMRA</b>	26	65	78 / 63	
DCE-Taq2 <i>TaqMan</i>	<b>6-FAM-</b> CAGCTTGCTGGGTCTGCTTGGAGAG <b>-TAMRA</b>	25	60	71 / 56	
<b>SRY</b>					
SRY-109F	TGGCGATTAAGTCAAATTCGC	21	42	59 / 44	
SRY-245R	CCCCCTAGTACCCTGACAATGTAT	24	50	61 / 46	[Lo et al., 1998]
SRY-142T <i>TaqMan</i>	<b>6-FAM-</b> AGCAGTAGAGCAGTCAGGGAGGCAGA <b>-TAMRA</b>	26	57	68 / 53	
SRY-109Fa	GTCAAATGTTAGCCATCCTAGAAAGTTGGGC	30	46	67 / 52	
SRY-245Ra	GCATTTCTCCGCCCTCAACACCCCTCAAC	30	60	79 / 64	

**Tabelle 4.1:** Überblick der Oligonukleotide, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit im PCR-Versuch zum Einsatz gekommen sind.

#### 4.2.2.1 Farbstoffmarkierung von Oligonukleotiden

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Sorten von Fluoreszenz-markierten Oligonukleotide in PCR-Versuchen eingesetzt:

- Einfach 5'-Fluoreszenz-markierte Farbstoffe,
- TaqMan®-Sonden (siehe 4.7.1) und
- *Beacon-Primer* (siehe 4.7.2).

In der folgenden Tabelle werden die hierfür verwendeten Farbstoffe aufgelistet.

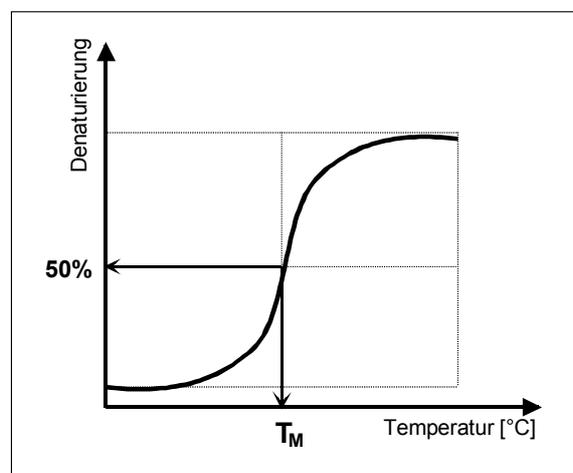
Farbstoff	Emission [nm]	Absorption [nm]	Typ
<b>6-FAM</b>	515	492	Reporter
<b>HEX</b>	556	535	Reporter
<b>TAMRA</b>	580	555	Quencher
<b>DABCYL</b>	nicht sichtbar	453	Quencher

**Tabelle 4.2: Zusammenstellung der für die Fluoreszenzmarkierung von Oligonukleotiden verwendeten Farbstoffe** (Angaben des Herstellers Eurogentec).

#### 4.2.2.2 Berechnung der theoretischen Schmelztemperatur ( $T_M$ ) für Oligonukleotide

Das Denaturierungsverhalten von doppelsträngiger DNA in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur wird durch eine sigmoid verlaufende Kurvenfunktion, der sogenannten Schmelzkurve, beschrieben. Die charakteristische Schmelztemperatur ( $T_M$ ) von DNA beschreibt den Zustand einer zur Hälfte vollständig vorliegenden Denaturierung der DNA-Doppelhelixstruktur (Wendepunkt des sigmoiden Kurvenverlaufs in Abb. 4.5).

Der Anteil von denaturierter DNA ist messbar über den Anstieg der optischen Dichte der DNA-Lösung bei 260 nm (siehe 4.1.1). Man spricht hierbei von dem hyperchromen Effekt von einzelsträngiger DNA.



**Abbildung 4.5: Idealierte Darstellung der sigmoiden Verlaufskurve zur thermischen Destabilisierung der doppelsträngigen DNA-Helix.**

Verschiedene doppelsträngige DNA-Moleküle weisen einen für sie charakteristischen  $T_M$ -Wert auf. Für sehr kurze Sequenzen ist eine thermodynamische Berechnung der Schmelztemperatur möglich. Die  $T_M$ -Werte, die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Oligonukleotide, wurden mit Hilfe des Computerprogramms *DNAssist* auf Grundlage der Basenabfolge nach der sogenannten „Wallace Formel“ [Breslauer *et al.*, 1986] berechnet:

$$T_M = [ (\text{Anzahl von A und T}) \times 2 \text{ }^\circ\text{C} + (\text{Anzahl von G und C}) \times 4 \text{ }^\circ\text{C} ]$$

Die Hybridisierungs- oder auch *Annealing*-Temperatur von Oligonukleotiden wird 5 °C unter der Schmelztemperatur angegeben. Die Abschätzung der *Primer*-Schmelztemperatur war Grundlage für die Planung der in der vorliegenden Arbeit angewendeten *Touchdown*-PCR-Programme (siehe 4.6.2.3).

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten *Beacon-Primer* (siehe 4.7.2) dienen im Echtzeit-PCR-Versuch (siehe 4.7) zur Generierung eines Fluoreszenzsignals, dessen Intensität analog der PCR-Produktbildung zunimmt. Im Grundzustand bilden *Beacon-Primer* eine innermolekulare Haarnadelstruktur aus, bei der sich ein Reporter-Farbstoffmolekül in unmittelbarer Nähe eines „*Quenching*-Moleküls“ befindet. Um ein unspezifisches Öffnen der *Beacon-Primer* während der PCR zu verhindern, musste vor dem Einsatz im PCR-Versuch ihr Schmelzverhalten im Echtzeit-Versuch getestet werden. Zu diesem Zweck wurden 10 pmol *Beacon-Primer* in einem Volumen von 50 µl 1x PCR-Puffer (aus 10x PCR-Puffer, HT Biotechnology LTD) aufgenommen und mit Hilfe des iCycler™ iQ Detektionssystems (siehe 4.7.3) ein Schmelzprofil aufgenommen werden.

### 4.3 Präparation von genomischer DNA

#### 4.3.1 DNA-Präparation mit Silikagelmembran-Zentrifugationssäulen

Die in der vorliegenden Arbeit angewendeten DNA-Säulenextraktionsmethoden stützen sich auf die Silikaoberflächen-Technologie, die ohne die Verwendung von organischen Lösungsmitteln und Ethanol-Präzipitation auskommt. Die aufzuarbeitenden Proben werden unter denaturierenden Bedingungen lysiert und danach auf Zentrifugationssäulen geladen, in der die DNA-Moleküle in Gegenwart hoher Konzentrationen chaotroper Salze an die enthaltene Silikagelmembran binden.

Zellulärer Debris, Hämoglobin, andere Proteine und sonstige Kontaminationen können hier durch Waschen mit alkoholhaltigen Puffern entfernt werden. Die gereinigte DNA wird abschließend mit einem Puffer niedriger Salzkonzentration eluiert.

#### 4.3.1.1 DNA-Präparation mit dem DNeasy™ Tissue-Kit aus Vollblut

Die zu extrahierenden Blutproben wurden zunächst für mindestens eine halbe Stunde auf der Rollbank homogenisiert. In einem 2 ml Eppendorfgefäß wurden 100 µl oder 200 µl EDTA-Vollblut vorgelegt, gegebenenfalls mit TE-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 200 µl gebracht und 200 µl AL-Puffer, sowie 40 µl Proteinase K zugegeben. Nachdem die Lösungen durch Vortexen gut vermischt wurden, erfolgte eine Inkubation bei 70 °C für 90 bis 120 Minuten. Nach Zugabe von 200 µl 98 %igen Ethanol und kräftigem Mischen durch Vortexen, wurde das gesamte Probevolumen auf die DNeasy™ Tissue-Kit Säulen pipettiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 6.000 x g für eine Minute. Das Auffanggefäß wurde verworfen und durch ein Neues ersetzt. Es wurden 500 µl AW1-Puffer auf die Säule pipettiert und ein Zentrifugationsschritt bei 6.000 x g für eine Minute durchgeführt. Der AW1-Puffer wurde aus dem Auffanggefäß entleert und ein zweiter Waschschrift mit 500 µl AW2-Puffer und einem Zentrifugationsschritt bei 16.000 x g für 3 Minuten durchgeführt. Das Auffanggefäß unter der Säule wurde durch ein 1,5 ml Eppendorfgefäß ersetzt. Die Elution erfolgte einmalig oder zweimalig mit 100 µl AE-Puffer, der direkt auf die Säulenmembran pipettiert wurde. Nach einer Inkubationszeit von 5 bis 30 Minuten erfolgte der Zentrifugationsschritt bei 6.000 x g für eine Minute.

DNeasy™ Tissue-Kit (Qiagen):      Tissue-Kit Säulen ( $V_{\max} = 620 \mu\text{l}$ )  
2 ml Tissue-Kit Auffanggefäße  
AL-Puffer  
20 mg/ml Proteinase K  
AW1-Puffer  
AW2-Puffer  
AE-Puffer

TE-Puffer:                              10 mM Tris-HCl pH 8,6 (Sigma)  
1 mM Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma)

98 % (v/v) Ethanol (Roth)

#### 4.3.1.2 DNA-Präparation mit dem DNeasy™ Tissue-Kit aus Plasma und Amnionflüssigkeit

Die DNA-Extraktion aus Plasma und Amnionflüssigkeitsüberstand mit Hilfe des DNeasy™ Tissue-Kits wurde im Prinzip, wie unter 4.3.1.1 beschrieben durchgeführt. Eine Homogenisierung des Ausgangsmaterials auf der Rollbank entfiel. Bei den zu untersuchenden Proben sollte die äußerst gering konzentrierte zellfreie DNA isoliert werden. Um eine möglichst hohe DNA-Ausbeute zu erzielen, wurde das Probenvolumen zum Beladen der DNeasy™ Tissue-Kit Säulen auf 400 bis 800 µl erhöht. Für den Verdau von 200 µl Probenvolumen wurden 20 µl Proteinase K und 200 µl AL-Puffer eingesetzt. Die Inkubationszeit bei 70 °C wurde von 30 Minuten bis 2 Stunden variiert. Vor dem Beladen auf die Säule wurde ein dem Probenvolumen äquivalentes Volumen 98 %igen Ethanol zugegeben. Die für das Beladen der DNeasy™ Tissue-Kit Säule notwendigen Arbeitsschritte wurden solange wiederholt, wie für das gesamte Probenvolumen notwendig war. Bei den vom Hersteller empfohlenen Waschpuffervolumina wurden keine Änderungen vorgenommen. Die Elution der zu extrahierenden DNA wurde einmalig mit einem AE-Puffervolumen von 50 µl durchgeführt.

#### 4.3.1.3 DNA-Präparation mit dem QIAamp® DNA Blood Midi Kit aus Plasma

Mit dem Ziel, eine größere DNA-Ausbeute zu erreichen, wurde der Einsatz des QIAamp® DNA Blood Midi Kit für die DNA-Extraktion aus Plasma getestet. Der Unterschied zu dem DNeasy™ Tissue-Kit (siehe 4.3.1.1) besteht darin, dass größere Zentrifugationssäulen zum Einsatz kommen, so dass ein größeres Probenvolumen prozessiert werden kann. Der Ablauf der Arbeitsschritte blieb identisch, allerdings wurden größere Volumina der Reagenzlösungen, sowie entsprechend angepasste Zentrifugationsschritte angewendet:

- 2 ml Plasma wurden mit 200 µl Proteinase K-Lösung und 2,4 ml AL-Puffer gemischt.
- Die Inkubation bei 70 °C erfolgte für 30 Minuten.
- 2 ml 98 %iger Ethanol wurden zugegeben.
- Das Gesamtvolumen wurde in zwei Schritten auf die QIAamp® DNA Blood Midi Kit Säulen geladen und der Zentrifugationsschritt hierbei mit 1.850 x g für 3 Minuten durchgeführt.
- Der erste Waschschrift wurde mit 2 ml AW1-Puffer durchgeführt und einem Zentrifugationsschritt von 3.200 x g für eine Minute.
- Der zweite Waschschrift wurde mit 2 ml AW2-Puffer durchgeführt und einem Zentrifugationsschritt von 3.200 x g für 15 Minuten.

- Die Elution erfolgte zweimalig mit den selben 100 µl AE-Puffer und einem Zentrifugationsschritt von 3.200 x g für fünf Minuten.

QIAamp® DNA Blood Midi Kit (Qiagen): Midi Kit Säulen ( $V_{\max} = 3,3$  ml)  
15 ml Midi Kit Auffanggefäße  
AL-Puffer  
20 mg/ml Proteinase K  
AW1-Puffer  
AW2-Puffer  
AE-Puffer

#### 4.3.1.4 DNA-Präparation mit dem QIAamp® DNA Blood Maxi Kit aus Plasma

Im Vergleich zu dem DNeasy™ Tissue-Kit (siehe 4.3.1.1) und dem QIAamp® DNA Blood Midi Kit (siehe 4.3.1.3) wurde das QIAamp® DNA Blood Maxi Kit getestet, um das Volumen des zu untersuchenden Plasmas zu maximieren. Im Gegensatz zu Mini- oder Midi-Kit waren größere Volumina der Reagenzlösungen, sowie entsprechend angepasste Zentrifugationsschritte notwendig:

- 10 ml Plasma wurden mit 500 µl Proteinase K-Lösung und 12 ml AL-Puffer gemischt.
- Die Inkubation bei 70 °C erfolgte für 30 Minuten.
- 10 ml 98 %iger Ethanol wurden zugegeben.
- Das Gesamtvolumen wurde in zwei Schritten auf die QIAamp® DNA Blood Maxi Kit Säulen geladen und die Zentrifugation hierfür mit 1.850 x g für 3 Minuten durchgeführt.
- Der erste Waschschrift wurde mit 5 ml AW1-Puffer durchgeführt und einem Zentrifugationsschritt von 3.200 x g für eine Minute.
- Der zweite Waschschrift wurde mit 5 ml AW2-Puffer durchgeführt und einem Zentrifugationsschritt von 3.200 x g für 15 Minuten.
- Die Elution erfolgte zweimalig mit 100 µl AE-Puffer und einem Zentrifugationsschritt von 3.200 x g für fünf Minuten.

QIAamp® DNA Blood Maxi Kit (Qiagen): Maxi Kit Säulen ( $V_{\max} = 16,25$  ml)  
50 ml Maxi Kit Auffanggefäße  
AL-Puffer  
20 mg/ml Proteinase K  
AW1-Puffer  
AW2-Puffer  
AE-Puffer

#### 4.3.1.5 Optimierung der Silikagelmembran-Säulenextraktion von zellfreier DNA aus Plasma

Um eine hohe DNA-Ausbeute zu erreichen wurde zunächst ein möglichst großes Volumen Blutplasma prozessiert. Das maximale Füllvolumen der verschiedenen Zentrifugationssäulen setzte das Volumen des zu bearbeitenden Blutplasmas auf 200  $\mu$ l, 2 ml oder 10 ml fest (Angaben der Hersteller). Um die Bindungskapazität der kleinsten Zentrifugationssäulen auszuschöpfen, wurde das vom Hersteller empfohlene Probevolumen überschritten und die Säulenbeladung in mehreren Schritten vorgenommen. Auf diese Weise wurde der Einsatz verschiedener Volumina Blutplasma (200  $\mu$ l, 400  $\mu$ l und 800  $\mu$ l) getestet. Bei sehr geringen DNA-Konzentrationen wird der Zusatz von sogenannten *Carrier*-Oligonukleotiden (Herstellerangabe 10  $\mu$ g/ml) zur Probelösung empfohlen. Sie sollen beim DNA-Elutionsschritt freie Bindungsstellen auf der Silikaoberfläche besetzen, um zu verhindern, dass die geringe Menge Proben-DNA im Säulenmaterial zurückgehalten wird. In der vorliegenden Arbeit wurde synthetische *Carrier*-RNA und Herringsspermien-DNA zu diesem Zweck eingesetzt. Um sicherzustellen, dass die im Plasma befindlichen Proteine vollständig degradiert werden, wurde die zum Verdau eingesetzte Menge Proteinase K variiert (Arbeitskonzentrationen von 50 bis 950  $\mu$ g/ml), sowie die für die Lyse vorgesehene Inkubationszeit (10 Minuten bis Inkubation über Nacht). Zu Beginn der Untersuchungen wurde die zu präparierende DNA durch zweimalige Behandlung mit dem selben geringen Puffervolumen von der Silikagelmembran eluiert. Diese Vorgehensweise sollte nach Herstellerinformation eine Erhöhung der DNA-Konzentration erzielen. Später wurde eine einmalige Elution mit dem vom Hersteller empfohlenen geringsten Elutionspuffervolumen durchgeführt.

*Carrier*-RNA (Qiagen)

Herringsspermien-DNA (Sigma)

#### 4.3.2 DNA-Fällungsextraktionsmethoden

Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten DNA-Fällungsextraktionsmethoden werden zunächst Proteinverunreinigungen durch Phenolextraktion aus den wässrigen DNA-Lösungen beseitigt. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften des Phenols reichern sich die Proteine in der Grenzphase von organischer und wässriger Lösung an, während die DNA in der wässrigen Phase verbleibt. Die anschließende Behandlung mit Präzipitationspuffer (siehe 4.3.2.1) oder Ethanol (siehe 4.3.2.2) bewirkte, dass die DNA dehydratisiert und gefällt werden konnte.

#### 4.3.2.1 DNA-Schnellpräparationsmethode aus Vollblut

Die DNA-Schnellpräparation aus humanem Vollblut erfolgte in drei Arbeitsschritten und zeichnete sich durch eine extrem schnelle Verfügbarkeit der DNA (bis 45 Minuten) aus [Gustincich *et al.*, 1991]:

- Für die Blut-Lyse und Denaturierung wurden in einem 2 ml Eppendorfgefäß 300 µl EDTA-Blut mit 600 µl Lyse-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 68 °C inkubiert.
- Um Proteinverunreinigungen zu entfernen, wurde im zweiten Schritt eine Chloroform-Extraktion durchgeführt. Hierfür wurden 900 µl Chloroform zupipettiert, die Phasen kräftig durchmischt und die erhaltene obere wässrige Phase in ein frisches 2 ml Eppendorfgefäß überführt.
- Die Präzipitation der DNA erfolgte durch Zugabe von 900 µl deionisiertem Wasser und 100 µl Präzipitations-Puffer, anschließend wurden die Lösungen gut durchmischt und die DNA durch Zentrifugation bei 12.000 x g für 2 Minuten pelletiert und der Überstand verworfen. Das erhaltene DNA-Pellet wird in 300 µl 1,2 M Natriumchloridlösung resuspendiert und durch Zugabe von 750 µl 98 %igen Ethanol und Zentrifugation bei 12.000 x g für 10 Minuten erneut gefällt. Der Überstand wird verworfen, das DNA-Pellet mit 200 µl 70 %igen Ethanol gewaschen und in 300 µl deionisiertem Wasser aufgenommen. Um eine vollständige Auflösung des Pellets zu gewährleisten, wird eine Inkubation von 10 Minuten bei 50 °C vorgenommen.

Lyse-Puffer:                    8 % (w/v) Dodecyltrimethylammoniumbromid (Sigma)  
                                     1,5 M NaCl (Sigma)  
                                     100 mM Tris-HCl pH 8,6 (Sigma)  
                                     50 mM Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma)

Präzipitations-Puffer:        5 % (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid (Sigma)  
                                     0,4 M NaCl (Sigma)

Chloroform (Roth)

98 % (v/v) Ethanol (Roth)



#### 4.3.2.3 Variationen der Phenol-Chloroform-Extraktion zur DNA-Präparation aus Blutplasma

Bei der Anwendung der Phenol-Chloroform-Extraktion auf Vollblutproben wurden den unter 4.3.2.2 beschriebenen Arbeitsschritten ein Verdau mit Proteinase K voran gestellt. Hierfür wurden 375 µl Blut 1:1 mit SDS-Lösung gemischt und mit ca. 50 µg/ml Proteinase K versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 50 °C über Nacht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Veränderungen der oben beschriebenen Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 4.3.2.2) bei der Anwendung auf Blutplasma durchgeführt, um die Quantität und Qualität der DNA für den Einsatz in der PCR zu optimieren:

- Vor der Phenol-Extraktion wurde die Probelösung 1:1 mit einer 10 %igen SDS-Lösung (Sigma) verdünnt und über Nacht mit 50 µg/ml Proteinase K (20 mg/ml, Sigma) inkubiert.
- Anstelle von Phenol wurde eine Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (25:24:1 v/v/v) zur Extraktion eingesetzt.
- Die Phenol-Extraktion wurde zweimal hintereinander durchgeführt.
- Die Phenol-Extraktion wurde mit einer vorgewärmten Phenol-Lösung für 10 Minuten bei 65 °C vorgenommen.
- Die Präzipitation der DNA erfolgte unter Zugabe von 20 µg Glykogen (20 mg/ml, Sigma) auf 550µl Probevolumen.
- Die für die Präzipitation vorgesehene Probelösung wurde von 550 µl auf 645 µl erhöht, und 1290 µl (1:2 v/v) Ethanol zur Fällung eingesetzt.
- Die DNA-Lösung wurde für eine Stunde einer Tropfendialyse in TE-Puffer unterworfen.
- Die DNA-Lösung sollte durch Anwendung eines Zentrifugalfilters aufkonzentriert werden.

Die ausgeführten Extraktionen mit organischen Lösungsmitteln wurden stets im Verhältnis 1:1 ausgeführt. Um den Verlust von Probelösung zu vermeiden, wurde ein im Vergleich zum folgenden Schritt größeres Volumen gewählt. Aufgrund der zur Verfügung stehenden Tischzentrifuge konnten die bei der Phenol-Chloroform-Methode erforderlichen Zentrifugationsschritte nur in 2 ml Eppendorfgläsern vorgenommen werden.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 8,6 (Sigma)  
1 mM Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma)

Tropfendialysefilter: Filtertyp 0,025 µm, weiß VSWP 13 mm (Millipore Corporations)

Zentrifugalfilter: Microcon® YM-100 (Amicon Bioseparations)

## 4.4 Quantifizierung von DNA

### 4.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung von DNA wird die optische Dichte (OD) von verdünnten DNA-Lösungen bei 260 nm gemessen, da das Absorptionsspektrum von doppelsträngiger DNA ein Maximum bei dieser Wellenlänge aufweist. Bei doppelsträngiger DNA wird bei einer  $OD_{260} = 1,0$  eine DNA-Konzentration von 50 µg/ml zugrunde gelegt [Sambrook *et al.*, 1989].

Formel:  $c = OD_{260} \times k / (\epsilon \times d)$

$c$  = Konzentration in mM/l

$k$  = Verdünnungsfaktor

$\epsilon$  = Extinktionskoeffizient in  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

$d$  = Küvettschichtdicke in cm

Ein weiteres Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm, deutet auf die Anwesenheit von Proteinen in der Lösung hin. Der Quotient der Absorptionskoeffizienten, die bei 260 nm und 280 nm gemessen wurden, gab Aufschluss über die Reinheit einer DNA-Präparation. Bei reinen DNA-Lösungen liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2. Niedrigere Werte sind ein Hinweis auf Verunreinigungen durch Proteine, höhere Werte hingegen können ein Anzeichen für die Anwesenheit von RNA sein oder deuten darauf hin, dass die DNA denaturiert ist.

Die spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösungen wurde in Kunststoffküvetten mit dem Bio-Photometer (Eppendorf) durchgeführt. Hierfür wurden die Proben in der Regel 10-fach mit dem Puffer verdünnt, der bei ihrer Extraktion (siehe 4.3) als Elutionspuffer diente (AE- oder TE-Puffer). Vor der Messung wurde ein „Blindabgleich“ mit dem zur Verdünnung eingesetzten Puffer durchgeführt.

#### 4.4.2 PicoGreen®-Assay zur Quantifizierung von doppelsträngiger DNA

Das PicoGreen® Reagenz ist ein hoch sensibler Fluoreszenzfarbstoff, der für die Quantifizierung von doppelsträngiger DNA in Lösung entwickelt wurde. Ähnlich dem Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert es in die doppelsträngige DNA-Struktur. Nachdem eine Anregung mit Licht von der Wellenlänge 480 nm erfolgt, kann eine Fluoreszenz-Emission der Wellenlänge 520 nm gemessen werden, deren Intensität proportional zu der vorhandenen Menge DNA ist. Die Quantifizierung unbekannter DNA-Lösungen erfolgt durch Abgleich mit einer DNA-Verdünnungsreihe bekannter Konzentration mittels Linearer Regression. Der Hersteller gibt eine Detektionsgrenze von 250 pg/ml dsDNA für das PicoGreen® Reagenz an, wobei die bei der DNA-Extraktion anfallenden Verunreinigungen, wie ssDNA, RNA, Salze, Ethanol, Chloroform und Proteine, das Ergebnis nicht beeinflussen sollen.

Die Probenvorbereitung erfolgt in schwarzen Reaktionsbehältern. Es werden 5 µl der zu untersuchenden DNA-Lösung vorgelegt und mit 95 µl 1x TE-Puffer versetzt. Anschließend werden 100 µl 1x PicoGreen® Reagenz-Lösung zupipettiert. Um eine homogene Inkubationszeit für die einzelnen Proben zu gewährleisten, werden der TE-Puffer und die PicoGreen® Reagenz-Lösung zügig mit einer 8-fachen Multipipette zugegeben.

Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wird die Messung im Fluoreszenzmeßgerät gestartet. Die Messung erfolgt mit dem Einstellungsmodus für Fluoreszein (Anregung 485 nm, Emission 535 nm), von oben, mit einer manuell eingestellten Verstärkung von 70 Prozent, einer Anzahl von 10 Lichtblitzen und einem vorgelagerten Schüttelvorgang von 10 Sekunden im orbitalen Modus. Die einzelnen Konzentrationen der bekannten DNA-Verdünnungsreihe wurden in der Regel als Doppelbestimmung analysiert und die Fluoreszenzmessung dreimal hintereinander vorgenommen. Die anschließende Berechnung wurde mit den erhaltenen Durchschnittswerten für die Fluoreszenzintensität vorgenommen.

Fluoreszenzmeßgerät: Spectra Fluor Plus (Tecan)

Probenbehälter: Schwarze FluoroNunc™ Module, gerahmt, polysorp Oberfläche (Nunc)

Reagentien: P-7589 PicoGreen®dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes)  
Inhalt: 20x TE-Puffer  
200x PicoGreen®dsDNA Reagenz

### 4.4.3 Quantitative Echtzeit-PCR (Real-Time PCR)

Bei der Echtzeit-PCR (siehe 4.7) wird die Zunahme eines Fluoreszenzsignals, welche proportional zur PCR-Produktbildung abläuft, in Abhängigkeit der Zyklenzahl beobachtet [Heid *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 1999; Halford, 1999; Bustin, 2000]. Der Schwellenwert-PCR-Zyklus, oder auch *threshold cycle* (Ct), wird dem Reaktionszeitpunkt zugeordnet, bei dem sich das Fluoreszenzsignal signifikant von der Hintergrundfluoreszenz abhebt (siehe 4.7.4) und die PCR-Produktbildung exponentiell verläuft. Er korreliert mit der Anfangskopienzahl der zu vermehrenden DNA-Sequenz. Auf diese Weise lassen sich DNA-Proben anhand des Vergleichs mit einer DNA-Verdünnungsreihe relativ quantifizieren. Trägt man den Ct-Wert gegen den Logarithmus der Anzahl von Anfangskopien auf, erhält man eine Gerade, aus deren Steigung die Effizienz der PCR-Reaktion zu berechnen ist. Diese lineare Beziehung besteht über einen dynamischen Bereich von bis zu sechs Größenordnungen.

Formel: 
$$\eta = [10^{(-1/r)}] - 1$$

$\eta$  = Effizienz der Amplifikationsreaktion (Werte von 0 bis 1)

r = Geradensteigung

Die Geradensteigung von  $-3,32$  weist auf eine 100 %ige Effizienz beim Ablauf der PCR-Reaktion hin (siehe Abb. 4.6).

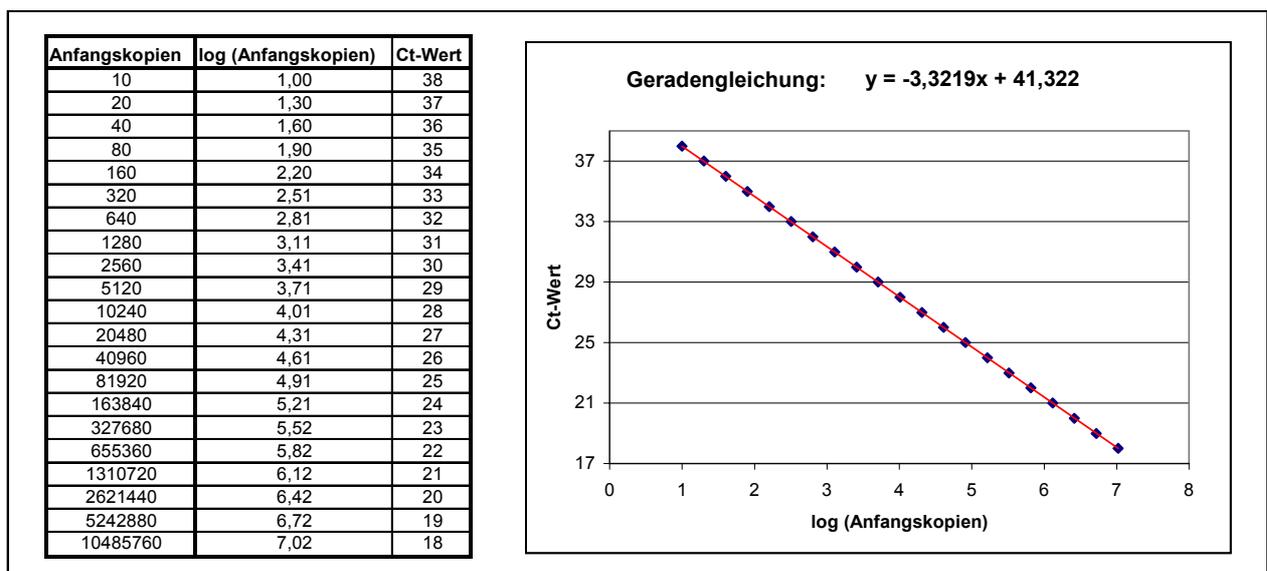


Abbildung 4.6: Lineare Beziehung zwischen dem Ct-Wert und dem logarithmischen Wert für die Anzahl von Anfangskopien für eine theoretische Amplifikationsreaktion mit 100 %iger Effizienz.

Die Anzahl DNA-Startkopien in der zu untersuchenden DNA-Probe kann aus dem für sie ermittelten Ct-Wert mit Hilfe der linearen Regression aus der Standardkurve abgeleitet werden. Die *Software*, des für die Echtzeit-PCR-Versuche verwendeten iCycler™ iQ Detektionssystems (Bio-Rad, siehe 4.7.3), beinhaltet ein Quantifizierungsprogramm, welches das Erstellen der Standardgeraden und die Konzentrationsbestimmung unbekannter DNA-Proben für die vorliegende Arbeit automatisch durchführte.

#### 4.4.4 Quantitative Fluoreszenz-PCR (QF-PCR)

Bei der quantitativen Fluoreszenz-PCR werden fluoreszenzmarkierte PCR-Produkte mit einem automatischen DNA-Scanner laserdensitometrisch analysiert (siehe 4.5.3). Es handelt sich um eine relative Quantifizierungsmethode, da ein Vergleich zwischen zwei PCR-Produkten, die parallel in einem PCR-Versuch (siehe 4.6) amplifiziert werden, gezogen wird. Einer der beiden, für die Generierung eines Produktes notwendigen Primer ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Um einen aussagekräftigen quantitativen Vergleich zwischen zwei nebeneinander amplifizierten PCR-Produkten treffen zu können, sollten beide PCR-Reaktionen mit gleicher Effizienz (siehe 4.4.3) ablaufen und die Reaktionsprodukte zum Zeitpunkt der exponentiellen Produktamplifikation analysiert werden (siehe 4.7.4).

### 4.5 Gelelektrophoretetechniken

Bei der Gelelektrophorese werden DNA-Moleküle in einer Matrix, die einem elektrischen Feld ausgesetzt wird, nach Ladung und Masse aufgetrennt. Die Laufgeschwindigkeit der DNA-Fragmente ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Basenanzahl und proportional zur Porengröße der verwendeten Gelmatrix.

#### 4.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Standardmethode zur qualitativen und präparativen Auftrennung kurzer einzelsträngiger sowie doppelsträngiger Nukleinsäurefragmente [Sambrock *et al.*, 1989]. Eine aus Polyzuckern gebildete, gallertartig erstarrte wäßrige Matrix kann, im Gegensatz zum Polyacrylamid-Gel, in verschiedenen Konzentrationen und Formen in offenen Horizontalelektrophoresekammern hergestellt und eingesetzt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit zu untersuchenden PCR-Produktgrößen lagen zwischen 70 und 450 Bp. Zur Darstellung dieser DNA-Fragmentgrößen wurden 4 %ige NuSieve-Gele verwendet, die vom Hersteller für DNA-Fragmente, die kleiner als 500 bp sind, empfohlen werden. Es wurden hierfür 4 g NuSieve™-(1:3)-Agarose (Bio Whittaker Molecular Applications) in ca. 90 ml deionisiertem Wasser suspendiert, mit 2 ml 50x TAE-Puffer versetzt, in einem Mikrowellengerät zum Sieden erhitzt und einige Minuten bis zum Aufklären gekocht. Nach Zugabe von 10 µl Ethidiumbromidlösung (Konzentration 10 mg/ml, Sigma) und deionisiertem Wasser auf ein Volumen von 100 ml wurde die Mischung zur Homogenisierung erneut kurz aufgeköcht. Nach Abkühlung auf ca. 85 °C wurde die Agaroselösung auf Glasplatten mit waagerechter Ausrichtung und senkrechtem Probenkamm bis auf eine Schichtdicke von ungefähr 5 mm gegossen. Nachdem das Gel innerhalb von 20 Minuten erstarrt war, wurde der Probenkamm gezogen und das fertige Gel in einer Elektrophoresekammer (CTI GmbH) mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit 1/6 V 6x Probenpuffer gemischt, in die Geltaschen pipettiert und bei ungefähr 10 V/cm elektrophoretisiert. Das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid wurde auf einem Transilluminator bei 302 nm zur Fluoreszenz angeregt und somit die DNA-Bandenposition sichtbar gemacht. Die Gele wurden mit einer Digital-Kamera fotografiert und die erhaltenen Bilder mit Hilfe einer speziellen Software (Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 120) bearbeitet und als Negativ-Aufnahmen gespeichert.

<b>50x TAE-Puffer:</b>	2 M Tris-Acetat, pH 8,0 (Sigma) 2 M Essigsäure 100 % (Merck) 500 mM Na <sub>2</sub> EDTA (Sigma)
<b>Elektrophoresepuffer :</b>	1x TAE-Puffer 75 µg / 1000 ml Ethidiumbromid (10 mg/ml, Sigma)
<b>6x Probenpuffer :</b>	40 % (w/v) Sucrose (Sigma) 100 mM Na <sub>2</sub> EDTA (Sigma) 0,25 % (w/v) Xylencyanol (Serva) 0,25 % (w/v) Bromphenolblau (Sigma)

#### 4.5.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet als festes Trägermaterial ein Polyacrylamid-Gel mit N,N'-Methylenbisacrylamid als Vernetzungsreagenz. Durch Variation der Acrylamidkonzentration lässt sich die Porengröße des Gels festlegen. Die Polymerisation des Acrylamids wird radikalisch mit Ammoniumpersulfat (APS) gestartet. Für die Dokumentation der Qualität von Plasma-DNA wurde die Trenngeldichte mit einem Gehalt von 5 % Acrylamid festgelegt. Hierfür wurden 1,66 ml 30 %ige Acrylamidlösung (mit 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid) mit 1 ml 10x TBE-Puffer, 7 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und 7,27 ml deionisiertem Wasser gemischt. Nach Zugabe von 70 µl 10 %iger Ammoniumpersulfatlösung wurde die gut durchmischte Lösung luftblasenfrei zwischen zwei durch sogenannte *Spacer* getrennte und mit einer Silikondichtung versehene Glasplatte (10 cm x 8,5 cm) eingegossen. Die Ausbildung der späteren Geltaschen erfolgte durch einen eingesetzten Teflonkamm. Innerhalb von 30 Minuten polymerisierte das Gel aus und wurde in eine Elektrophoreseapparatur (Technische Werkstatt Universität Bielefeld) eingespannt, wobei die obere und untere Kante jeweils blasenfrei mit 1x TBE-Puffer in Kontakt standen. Die Geltaschen wurden sorgfältig mit 1x TBE-Puffer ausgespült und jeweils 20 µl Probenlösung, die mit 5 µl Ladepuffer versetzt war, einpipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 40 mA bei 250 V für ca. 90 Minuten.

10x TBE-Puffer:                    0,89 M Tris-HCL pH 8,0 (Sigma)  
    0,89 M Borsäure (Merck)  
    2 mM Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma)

6x DNA-Probenpuffer:            0,25% Bromphenolblau (Sigma)  
    0,25% Xylencyanol (Serva)  
    30% Glycerin (Merck)  
    in ddH<sub>2</sub>O

Polyacrylamid (Roth)

N,N'-Methylenbisacrylamid (Roth)

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (Serva)

Ammoniumpersulfat (Sigma)

#### 4.5.2.1 Silberfärbung

Um die bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurde die Methode der Silberfärbung [Blum *et al.*, 1987] angewendet. Im Vergleich zur einfachen Färbung mit Ethidiumbromid und Detektion der erhaltenen Banden auf dem Transilluminator durch die entsprechenden Fluoreszenzsignale, zeichnet sich die Silberfärbemethode für Polyacrylamid-Gele durch ihre hohe Detektionssensitivität aus.

Zunächst wurden die DNA-Banden im Gel fixiert, dann erfolgte eine Sensibilisierung, bei der das in Spuren eingelagerte Thiosulfat den Kontrast der späteren Färbung verstärken sollte. Der nächste Arbeitsschritt diente dazu, Silbernitrat an die DNA anzulagern, das beim anschließenden Entwicklungsprozeß durch Formaldehyd im alkalischen Milieu zu elementarem Silber reduziert wurde. Nachdem die DNA-Banden sichtbar waren, erfolgte das Abstoppen der Reaktion. In der nachfolgenden Tabelle 4.3 wird eine Auflistung der durchgeführten Arbeitsschritte vorgenommen. Die Dokumentation der erhaltenen Polyacrylamid-Gelansicht wurde mit Hilfe eines Flachbildscanners durchgeführt.

Arbeitsschritte	Lösungen	Inkubationszeiten
1.) Fixieren	50 % (v/v) Methanol (Roth) 12 % (v/v) Essigsäure 100 % (Merck) 0,02 % (v/v) Formaldehyd (Sigma)	15 Min
2.) Sensibilisieren	50 % (v/v) Ethanol 98 % (Roth)	dreimal 10 Min
	0,02 % (w/v) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> • 5 H <sub>2</sub> O (Sigma)	1 Min
3.) Waschen	deionisiertes Wasser	dreimal 20 Sek
4.) Färben	0,2 % (w/v) AgNO <sub>3</sub> (Merck) 0,05 % (v/v) Formaldehyd (Sigma)	15 Min
5.) Waschen	deionisiertes Wasser	20 Sek
6.) Entwickeln	6 % (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Sigma) 0,02 % (v/v) Formaldehyd (Sigma) 0,0004 % (w/v) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> • 5 H <sub>2</sub> O (Sigma)	Bis zur Sichtbarkeit der DNA-Banden
7.) Stoppen	50 % (v/v) Methanol (Roth) 12 % (v/v) Essigsäure 100 % (Merck)	

**Tabelle 4.3: Arbeitsschritte der Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen zur Sichtbarmachung von DNA-Banden.**

### 4.5.3 Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese ermöglicht die Automatisierung der elektrophoretischen Trennmethode und bietet gleichzeitig die Möglichkeit die aufgetrennten DNA-Fragmente zu quantifizieren (Abschnitt 1.4.4). Die Hauptelemente der Kapillarelektrophorese sind zwei Puffergefäße, eine mit ihren Enden in die Puffergefäße tauchende Kapillare, eine Hochspannungsquelle, die über zwei Platin-Elektroden mit den beiden Puffergefäßen verbunden ist, ein Detektor und ein System zur Datenerfassung (siehe Abb. 4.6).

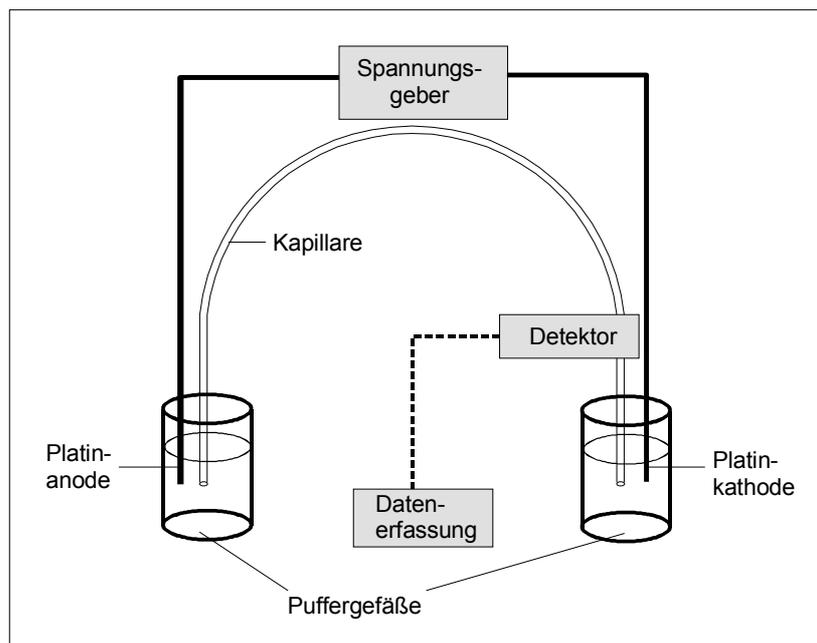


Abbildung 4.7: Schematische Darstellung der Kapillarelektrophoreseapparatur.

Mit Hilfe des ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems) wurden PCR-Produkte kapillarelektrophoretisch untersucht. Die Probenaufnahme, sowie Elektrophorese und Datenerfassung erfolgen nach Auswahl eines entsprechenden Programmes beim ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer automatisch. Für die Untersuchung wurden in einem 0,5 ml Probenbehälter jeweils 2 µl PCR-Reaktionslösung mit 14 µl Formamid (Sigma) und 0,25 µl Gene-Scan® TAMRA 500 Längenstandard (PE Applied Biosystems) gemischt. Das Formamid diente neben dem Zweck der Probenverdünnung noch dazu, doppelsträngige DNA in einzelsträngiger Form zu konservieren. Durch Anlegen einer fünfsekündigen Injektionsspannung (15 kV) wurde ein ausreichendes Probenvolumen in die Kapillare mit 50 µm Innendurchmesser überführt, die mit dem Gel-Polymer POP™-4 (PE Applied Biosystems) gefüllt war. Die anschließende Elektrophorese wurde bei einer Arbeitsspannung von 15 kV für einen Zeitraum von ungefähr 18 Minuten je Probe durchgeführt, wobei die Kapillare auf konstante 60 °C erwärmt wurde.

Die im Gel-Polymer elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente erreichen nach etwa 36 cm das Detektionsfenster der Kapillare. Ein 10 mWatt Argonion-Laser regt hier die an die DNA-Fragmente gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe mit Lichtenergie der Wellenlänge 488 nm und 514 nm an. Die von den Farbstoffen emittierte Fluoreszenzstrahlung (z.B. Fluoreszein = 520 nm, TAMRA = 583 nm) wird von einem Prisma auf einen CCD-Sensor gelenkt. Dem Dispersionsprinzip folgend, bewirken die den unterschiedlichen Wellenlängen zuzuordnenden Brechzahlen, dass die Emissionsstrahlung der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe auf verschiedenen Positionen des CCD-Sensors treffen. Je größer die Wellenlänge ist, umso kleiner ist die Brechzahl und der damit verbundene Austrittswinkel. Die Intensitäten der Fluoreszenzemissionen werden als Funktionen der Zeit, als sogenanntes Elektropherogramm, aufgezeichnet. Die im Elektropherogramm abgebildeten *Peaks* können jeweils einem PCR-Produkt zugeordnet werden. Die Auswertung der erhaltenen Rohdaten erfolgt mit der Software ABI PRISM GeneScan® Analysis (PE Applied Biosystems). Die Größen der DNA-Fragmente können im Vergleich mit dem internen Längenstandard bestimmt werden. Die den einzelnen *Peaks* zuzuordnenden Integrale sind proportional der Menge des entsprechenden DNA-Fragments.

#### **4.6 DNA-Amplifikation mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Bis Mitte der 80er Jahre war es lediglich mittels Klonierungs- und Transformationstechnik möglich, gewünschte DNA-Abschnitte anzureichern. Die bahnbrechende Weiterentwicklung stellte die von Saiki *et al.* [1985] vorgestellte Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dar. Die PCR beruht auf einer vielfachen Wiederholung einer aus drei Teilschritten bestehenden Reaktion [Mullis, 1986; Mullis & Faloona, 1987]. In einem ersten Denaturierungsschritt wird die Ausgangs-DNA (Matrize) durch Hitzeeinwirkung einzelsträngig gemacht. Der zweite Schritt besteht aus dem Hybridisieren (*Annealing*) von im Überschuß zugegebenen kurzen Oligonukleotiden (*Primern*), deren Position auf verschiedenen Strängen der zu amplifizierenden DNA so angeordnet ist, dass ihre 3'-OH-Enden in Richtung auf die Position des jeweils anderen *Primer* zeigen. Diese Positionierung stellt sicher, dass die im dritten Reaktionsschritt vorgenommene Gegenstrangsynthese nach erneuter Denaturierung (erster Schritt des folgenden Zyklus) zusätzliche einzelsträngige Matrizen-DNA (Amplikon oder *Template*) für nachfolgende Reaktionszyklen schafft. Große praktische Bedeutung hat dieses Verfahren nach der Identifikation einer hitzestabilen Taq-DNA-Polymerase erhalten [Saiki *et al.*, 1988], die weit mehr als die benötigten 40 Zyklen der häufig bei Temperaturen bis zu 96° C durchgeführten Denaturierungen widerstehen kann.

### 4.6.1 Allel-spezifische PCR

Der Entwurf der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Allel-spezifischen *Primer* basiert auf einem von Rust und Kollegen beschriebenen Verfahren der mutagenetisch separierenden PCR (MS-PCR). Die MS-PCR wurde als Untersuchungsmethode für die Diagnostik von Punktmutationen entwickelt, wobei Mutant- und Wildtyp-Allel parallel im selben Reaktionsgefäß amplifiziert werden [Rust *et al.*, 1993]. In der PCR-Reaktion werden drei *Primer* eingesetzt: Zwei Allel-spezifische *Primer*, die von der die Punktmutation enthaltenen DNA-Sequenz abgeleitet werden, und ein Gegen-*Primer*, dessen Basenabfolge auf der Struktur des Gegenstranges basiert. Die Allel-spezifischen *Primer* weisen einen Längenunterschied von ca. 20 Basenpaaren auf, um die PCR-Produkte bei der Elektrophorese im Agarose-Gel sichtbar voneinander zu trennen. Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen, sind zusätzlich gezielt Mutationen eingebaut. Analog der ARMS-PCR (*amplification refractory mutation system*) wird das 3'-Ende der Allel-selektiven *Primer* auf die Position der Punktmutation in der Matrize gelegt. Der kürzere *Primer* enthält eine Fehlpaarung für eine der drei Basen, die neben dem 3'-Ende liegen. In der gleichen Region, nicht aber auf derselben Position, erhält auch der längere *Primer* eine Fehlpaarung. Außerdem werden beim längeren *Primer* zusätzlich zwei bis drei Fehlpaarungen an der Position, die dem 5'-Ende des kürzeren *Primers* entspricht, eingebaut. Die nach dem MS-PCR Prinzip konzipierten *Primer* ermöglichen eine sehr spezifische Amplifikation eines Allels auch bei Überrepräsentation des anderen Allels in der PCR-Reaktions-Mischung.

### 4.6.2 Methoden zur Optimierung der PCR

#### 4.6.2.1 Gradienten-PCR

Die geeignete Hybridisierungstemperatur für die *Primer*-Paare wurde mit Hilfe einer Gradienten-PCR bestimmt. Hierbei werden identische PCR-Reaktionsansätze unter verschiedenen Hybridisierungstemperaturen getestet. Das verwendete PCR-Gerät, iCycler™ (Bio-Rad), ermöglicht parallel acht verschiedene Hybridisierungstemperaturen über einen Bereich von maximal 25 °C auch im Echtzeit-PCR-Versuch (siehe 4.7) zu testen. Die Auswertung der Gradienten-PCR erfolgte bei nicht-fluoreszenzmarkierten *Primern* allein durch Vergleich der bei der Agarose-Gelelektrophorese (siehe 4.5.1) erhaltenen DNA-Bandenstärke und -verteilung. Bei Experimenten mit TaqMan®-Sonden (siehe 4.7.1) oder *Beacon-Primern* (siehe 1.7.2) konnte zusätzlich ein Vergleich der erhaltenen Ct-Werte vorgenommen werden (siehe 4.4.2.1).

#### 4.6.2.2 Heißstart (Hot Start) -PCR

Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen wurden durch einen Heißstart eingeleitet. Das Charakteristikum dieser Methode ist, dass eine oder mehrere wichtige Reaktionskomponenten der PCR erst nach der Denaturierung der Matrize zugegeben werden [D'Aquila *et al.*, 1991; Ruano *et al.*, 1992; Chou *et al.*, 1992]. Hintergrund dieser Reaktionsführung ist die nicht unbedeutende Polymeraseaktivität der thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase bei Raumtemperatur. Die optimale Temperatur für die Enzymaktivität der Polymerase liegt bei 72 °C. Nach Zugabe aller für die PCR wichtigen Komponenten bei Raumtemperatur liegt eine sehr hohe Konzentration an Oligonukleotiden sowie DNA-Polymeraseaktivität und die dafür notwendigen Substrate vor. Temperaturen unterhalb der theoretischen Schmelztemperatur der Oligonukleotide begünstigen das zufällige und unvollständige Hybridisieren untereinander (Dimerisierung) und mit genomischer DNA. Kurze aber exakt hybridisierte 3'-Enden der Oligonukleotide können der *Taq*-DNA-Polymerase als Substrat dienen und bei +22 °C um ein Nukleotid in 4 Sekunden verlängert werden [Innis *et al.*, 1988]. Die entstehenden Zufallsprodukte können an der exponentiellen Amplifikation der PCR teilnehmen und bei ungünstigen Voraussetzungen die Amplifikationsrate des gewünschten Produktes unterdrücken oder verhindern. Ein Heißstart der PCR-Reaktion, bzw. die damit verbundene vollständige Denaturierung der beteiligten DNA-Reaktionspartner bei Temperaturen oberhalb +85 °C, verhindert die Bildung unspezifischer Hybridisierungsprodukte.

Der Heißstart für die PCR-Versuche wurde auf zwei unterschiedliche Methoden durchgeführt. Bei der manuellen Methode wurde zunächst der unvollständige PCR-Reaktionsansatz (*Primer*, Eurogentec oder Operon; dNTPs, Finnzymes; MgCl<sub>2</sub>, Sigma; ddH<sub>2</sub>O; DNA-Lsg.) im PCR-Reaktionsgefäß auf 95 °C erhitzt und erst bei dieser Temperatur die mit 10x PCR-Puffer (HT Biotechnology LTD) versetzte *Taq*-DNA-Polymerase zupipettiert (Super Taq, HT Biotechnology LTD). Bei der zweiten Heißstartvariante wurde ein monoklonaler Antikörper (TaqStart™, Clontech), der spezifisch am aktiven Zentrum der *Taq*-DNA-Polymerase bindet, der PCR-Reaktionsmischung zugegeben (1:1 v/v TaqStart™ : *Taq*-DNA-Polymerase). Dieser Antikörper blockiert zunächst die Polymeraseaktivität bei Raumtemperatur, dissoziiert und denaturiert dann irreversibel beim Aufheizen im ersten Denaturierungsschritt des Thermozyklus. In der folgenden Tabelle 4.3 werden Beispiele für Reaktionsmischungen aufgeführt, die in den PCR-Versuchen der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden.

PCR-Versuchstyp	Primer [nM]	TaqMan® [nM]	dNTPs [μM]	10x PCR-Puffer (v/v)	MgCl <sub>2</sub> [mM]	Taq-Polymerase-Antikörper [ <i>Unif</i> ]	DNA-Lsg. (v/v)
TaqMan®	je 200	100	200	1:10	2,5	1	1:10
Beacon-Primer	je 150		100	1:10	1,5	0,5	1:10

Tabelle 4.4: Zusammensetzung verschiedener Echtzeit-PCR-Reaktionsmischungen (Gesamtvolumen: 25 μl).

#### 4.6.2.3 Touchdown-PCR

Die Bezeichnung *Touchdown-PCR* [Don *et al.*, 1991] steht für die kontinuierliche Erniedrigung der Temperatur während der Hybridisierungsphase (*Annealing*) einer PCR. Die Anfangstemperatur für die Hybridisierungsphase liegt dabei über der Schmelztemperatur der verwendeten *Primer* und wird langsam bis auf eine Temperatur unter der *Primer*-Schmelztemperatur gesenkt. Die *Primer* hybridisieren hierbei spezifisch an ihre korrekte Zielsequenz, bevor unspezifische Hybridisierungsvorgänge bei eventuell zu niedrig gewählter Temperatur statt finden können. Mit dieser Methode wird zum einen die PCR-Spezifität erhöht, zum anderen erzielt man eine maximale Ausbeute durch gesteigerte Zyklenzahl.

Bei den für die vorliegende Arbeit entwickelten *Touchdown-PCR*-Protokollen wurde über eine gewisse Anzahl von Zyklen zunächst die Hybridisierungstemperatur gesenkt (erste PCR-Phase) und anschließend innerhalb der restlichen Zyklen die PCR-Reaktion mit der niedrigsten Hybridisierungstemperatur abgeschlossen (zweite PCR-Phase). In Tabelle 4.5 wird ein typisches *Touchdown-PCR*-Programm aufgeführt.

Denaturierung	Hybridisierung	Amplifikation	Zyklen-Wdh.	PCR-Phase
5 min., 95 °C	--	--	--	initiale Denaturierung
30 sek., 95 °C	20 sek., <b>64 °C</b>	15 sek., 72 °C	2	erste PCR-Phase
30 sek., 95 °C	20 sek., <b>63 °C</b>	15 sek., 72 °C	3	
30 sek., 95 °C	20 sek., <b>62 °C</b>	15 sek., 72 °C	4	
30 sek., 95 °C	20 sek., <b>61 °C</b>	15 sek., 72 °C	5	
30 sek., 95 °C	30 sek., <b>60 °C</b>	20 sek., 72 °C	6	
30 sek., 95 °C	30 sek., <b>58 °C</b>	30 sek., 72 °C	20	zweite PCR-Phase
--	--	3 min., 72 °C	--	terminale Amplifikation
--	--	unendlich, 4 °C	--	Lagerung

Tabelle 4.5: *Touchdown-PCR*-Profil für die RHD/RHCE-MS-PCR mit den Primern MS-Dex7, MS-CEex7, RH-com im GeneAmp 2400 (Perkin Elmer).

### 4.6.3 Vermeidung von Kontaminationen

Mit Hilfe der PCR-Methode kann die Kopienzahl einer spezifischen Genomsequenz einer DNA-Probe extrem erhöht werden, allerdings besteht auch eine große Gefahr, dass falsch positive Signale aufgrund von Kontaminationen erzielt werden. Neben der Erzeugung falsch positiver Signale durch Kontamination der zu untersuchenden DNA-Probe mit fremder Proben-DNA ist eine Verschleppung von bereits amplifiziertem DNA-Material eine der Hauptursache für die Erzeugung falscher Ergebnisse. Die hohe Anzahl von etwa  $10^{13}$  Kopien der Zielsequenz pro Milliliter PCR-Reaktionslösung nach erfolgter PCR-Amplifikation bedingt, dass schon minimale Produktübertragungen ein erhebliches Risiko für nachfolgende Reaktionen darstellen [Kwok & Higuchi, 1989]. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die extrem niedrig konzentrierte fötale DNA im mütterlichen Plasma zu detektieren. Der Nachweis von nur wenigen DNA-Molekülen erfordert große Sorgfalt in der Handhabung der PCR-Methode, deshalb wurden folgende Grundregeln [Kwok & Higuchi, 1989] zur Vermeidung von Kontaminationen befolgt:

- Eine strikte räumliche Trennung der Arbeitsplätze für die PCR-Vorbereitung und Handhabung der erhaltenen PCR-Reaktionslösungen wurde eingehalten.
- Das Belüftungssystem der Laborräume gewährleistete einen kontinuierlichen laminaren Luftstrom zur Vermeidung von Kontaminationen durch DNA-Aerosolverbreitung am Arbeitsplatz für die PCR-Vorbereitung.
- Die Gebrauchslösungen zum Ansetzen der PCR-Reaktion wurden aliquotiert und im Raum für die PCR-Vorbereitung aufbewahrt.
- Das Ansetzen der PCR-Reaktionen erfolgte unter der Sterilbank an einem eigenen Arbeitsplatz und mit Pipetten, auf die kein anderer Labormitarbeiter Zugriff hatte.
- Beim Ansetzen der PCR-Reaktionen wurden Einwegschutzhandschuhe getragen, sowie sterile Reaktionsgefäße und für Aerosole undurchlässige Einwegpipettenspitzen verwendet.
- Bei jedem PCR-Versuch wurde eine „Blindprobe“ ohne Proben-DNA parallel untersucht, um eventuelle Kontaminationen der Gebrauchslösungen zu detektieren.

## 4.7 Echtzeit-PCR (Real-Time PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion gewinnt im Bereich der Diagnostik, z.B. bei Virus-erkrankungen oder bei Mutationsanalysen zunehmend Bedeutung [Roth *et al.*, 1999; Hessner *et al.*, 1999]. Neben dem rein qualitativen Nachweis der DNA-Produkte wird immer mehr der Anspruch erhoben, ebenfalls eine Aussage zur Ausgangs-DNA-Menge zu machen. Die dazu notwendige densitometrische Auswertung des PCR-Testergebnisses ist sehr arbeits- und zeit-aufwendig. Dies gilt insbesondere dann, wenn, wie aus Gründen der wirtschaftlichen Rentabilität erforderlich, eine große Probenanzahl gleichzeitig analysiert werden soll. Die Bearbeitung einer hohen Probenanzahl erhöht außerdem die Gefahr der Kreuzkontamination für den PCR-Test. Durch Anwendung der Anfang der 90er Jahre entwickelten Echtzeit-PCR kann auf die nachträg-liche Analyse der PCR-Produkte verzichtet werden. Die PCR-Amplifikation wird anhand eines Fluoreszenzanstiegs, der proportional zur Produktbildung verläuft, in Echtzeit beobachtet. Die PCR-Reaktionsgefäße müssen nach dem Versuch nicht mehr geöffnet werden, so dass die Ge-fahr von Kontaminationen durch Probenverschleppung ebenfalls gebannt wird. Der Vergleich mit einer parallel untersuchten DNA-Verdünnungsreihe ermöglicht außerdem eine quantitative Abschätzung über die DNA-Ausgangsmenge (Abschnitt 1.2.2.1).

Die einfachsten Methoden der Echtzeit-PCR zeichnen sich durch Zugabe eines interkalierenden Farbstoffs zur PCR-Reaktionslösung aus. Hierbei kann Ethidiumbromid [Higuchi *et al.*, 1992] oder auch SYBR-Green® Verwendung finden. Diese Farbstoffe besitzen die Eigenschaft, sich in die „kleine Furche“ (*Minor Groove*) von doppelsträngiger DNA einzulagern. Durch diese Bin-dung wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein Vielfaches ver-stärkt. Das erhaltene Signal ist direkt proportional zur vorhandenen Anzahl doppelsträngiger DNA. Durch Messung des Fluoreszenzsignals zu jedem PCR-Zyklus ist die Beobachtung der Template-Zunahme beim PCR-Versuch in Echtzeit möglich. Der Nachteil dieser Methode liegt in der möglichen Detektion von unspezifischen PCR-Artefakten. Für die Detektion ausschließ-lich spezifischer PCR-Produkte wurden mittlerweile verschiedene Systeme von Fluoreszenz-markierten DNA-Hybridisierungssonden entwickelt, die an die komplementären Regionen der Zielstrang-DNA binden und eine messbare Fluoreszenz-Zunahme während der PCR-Reaktion verursachen. In der vorliegenden Arbeit wurden Echtzeit-PCR-Methoden unter Anwendung von TaqMan®-Sonden (siehe 4.7.1) und *Beacon-Primern* (siehe 4.7.1) durchgeführt.

#### 4.7.1 TaqMan®-Sonden

Beim TaqMan®-Prinzip, oder auch 5'-Nuklease-Assay, wird ein Zielsequenz-spezifisches Oligonukleotid verwendet, das in 5'-Position mit einem Fluoreszenz-Reporter-Farbstoff und in 3'-Position mit einem sogenannten „*Quenching*-Molekül“ markiert ist [Holland *et al.*, 1991; Livak *et al.*, 1995]. Zusätzlich tragen TaqMan®-Sonden an ihren 3'-Enden eine blockierende Gruppe, damit sie während der PCR-Reaktion nicht verlängert werden können. Die Emissions- und Anregungsspektren von Reporter und Quencher überlappen sich, und aufgrund ihrer nahen räumlichen Anordnung auf dem Oligonukleotid, kommt es zum Energietransfer zwischen den Molekülen. Hierbei wird ein Elektron des Reporter-Farbstoffes bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge auf ein höheres Energieniveau angehoben, fällt aber unmittelbar danach auf ein niedriges Energieniveau zurück. Die hierbei emittierte Fluoreszenzenergie wird auf den Quencher übertragen, welcher selber in einen energetisch niedrigeren Zustand versetzt wird, wobei die Energiedifferenz als Wärmestrahlung längerer Wellenlänge wieder an die Umgebung abgegeben wird und somit keine Fluoreszenz sichtbar ist. Während der PCR-Reaktion hybridisiert die TaqMan®-Sonde auf die DNA-Zielsequenz zwischen den *Primer*-Positionen. Die *Taq*-DNA-Polymerase verlängert die *Primer*-Sequenz entlang der Zielsequenz und trifft auf die TaqMan®-Sonde, welche durch die enzymatische 5'→3' Exonukleaseaktivität der verwendeten DNA-Polymerase in kleine Fragmente geschnitten wird. Reporter- und Quencher-Molekül liegen nun getrennt voneinander im Reaktionsgemisch vor, es findet somit kein intermolekularer Energietransfer mehr statt und die Reporterfluoreszenz kann detektiert werden (siehe Abb. 4.8).

Das mit jedem PCR-Zyklus ansteigende Fluoreszenzsignal ist proportional zum exponentiellen Anstieg der PCR-Produktbildung. Die *Taq*-DNA-Polymerase entfaltet ihre 5'→3'-Exonukleaseaktivität nur bei der Synthese des DNA-Doppelstrangs. Daher bleiben die nicht-hybridisierten TaqMan®-Sonden unbeschadet und haben keinen Anteil an dem gemessenen Fluoreszenzsignal.

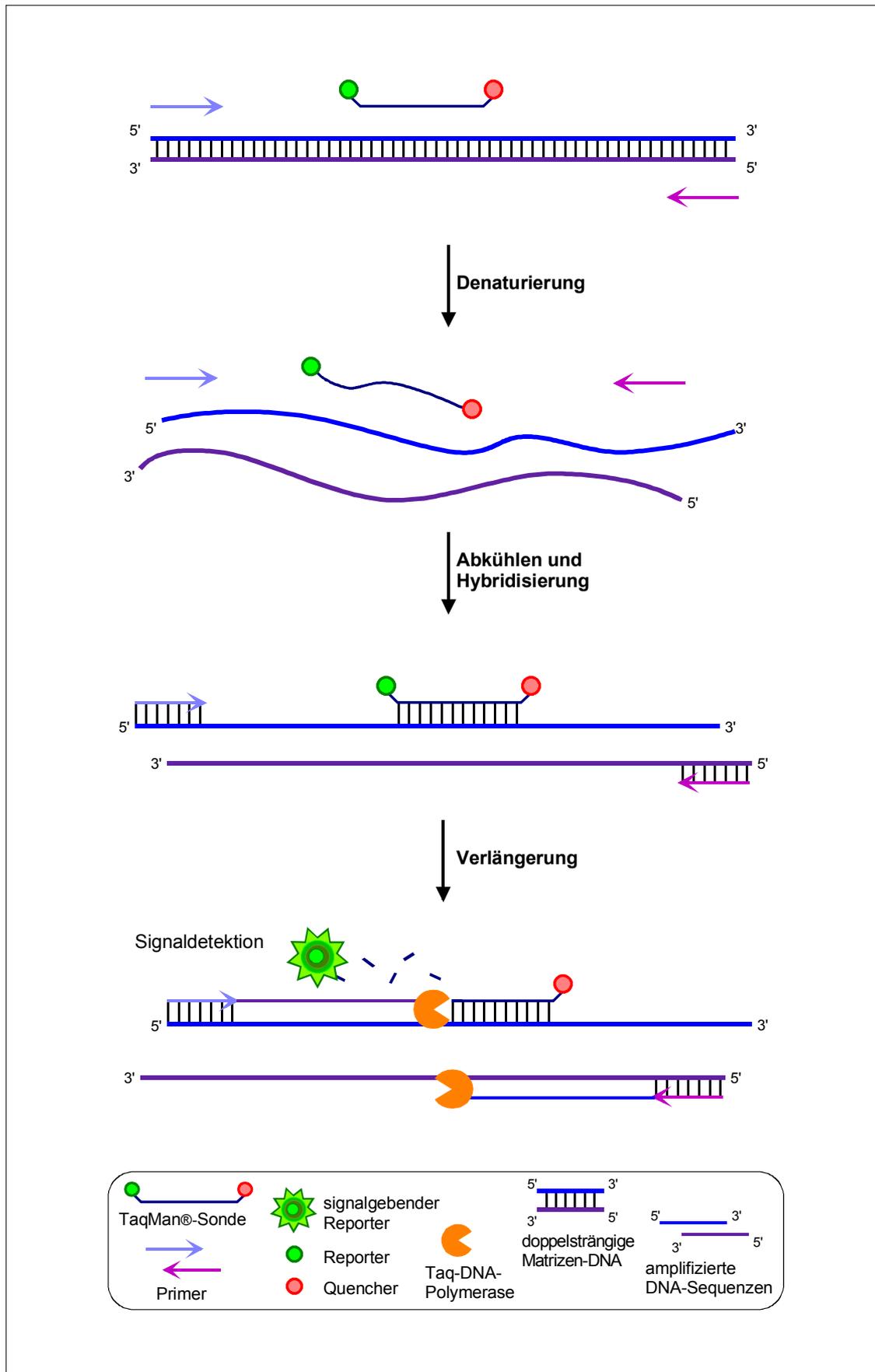


Abbildung 4.8: Schematische Darstellung der Funktionsweise einer TaqMan®-Sonde.

### 4.7.2 Beacon-Primer

Den Aufbau eines *Beacon-Primer* kann man als Kombination eines herkömmlichen PCR-*Primers* mit einem *Molecular Beacon* beschreiben.

*Molecular Beacon* sind Fluoreszenz-markierte Hybridisierungs sonden mit einer charakteristischen Haarnadelstruktur [Tyagi, Kramer, 1996]. Die zur Zielsequenz komplementäre Hybridisierungssequenz (*Loop*) wird von zueinander komplementären Sequenzabschnitten (*Stamm*) flankiert. Ähnlich einer TaqMan®-*Sonde* (siehe 4.5.1) ist ein *Molecular Beacon* am 3'- und 5'-Ende mit einem Fluoreszenz-Reporter-Farbstoff und einem sogenannten „*Quenching-Molekül*“ markiert und wird dem PCR-Reaktionsgemisch beigelegt, ohne an der PCR-Produktbildung direkt beteiligt zu sein. In der Grundformation liegen die Stamm-Sequenzen aneinander gebunden vor, so dass Reporter und Quencher in direkter Nachbarschaft angeordnet sind, wobei die Reporter-Fluoreszenz durch den Quencher absorbiert werden kann. Hybridisiert die *Loop*-Sequenz auf den zu ihr komplementären Sequenzabschnitt des PCR-Produktes, lösen sich die Stamm-Sequenzen voneinander und die Reporter-Fluoreszenz wird aufgrund der Delokalisation von Reporter- und *Quenching-Molekül* messbar (siehe Abb. 4.9). Das mit fortschreitender Zyklenzahl ansteigende Fluoreszenzsignal zeigt die PCR-Produktzunahme in Echtzeit an.

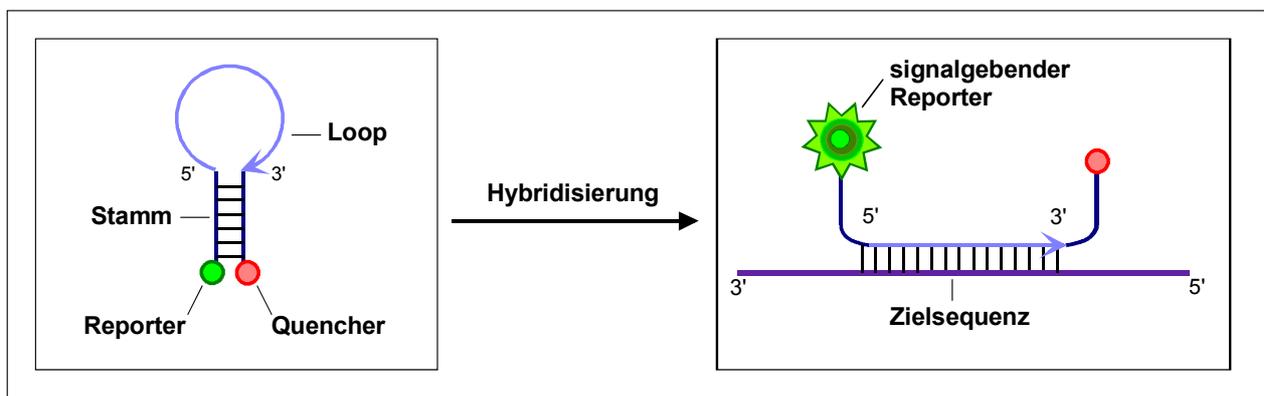


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines *Molecular Beacon*.

Beim *Beacon-Primer* wird der Zielsequenz-spezifische *Primer* an die Struktur eines Zielsequenz-unspezifischen *Molecular Beacon* angehängt. Die Markierung des *Beacon-Primers* erfolgt in 5'-Position mit einem Reporter-Fluorophor und, im Anschluß an die *Molecular Beacon* Sequenz, intern mit einem *Quenching-Molekül*. Das Prinzip der Haarnadelformation wird beim *Beacon-Primer* nur für die Entwicklung eines Fluoreszenzsignals ausgenutzt (siehe Abb. 4.10).

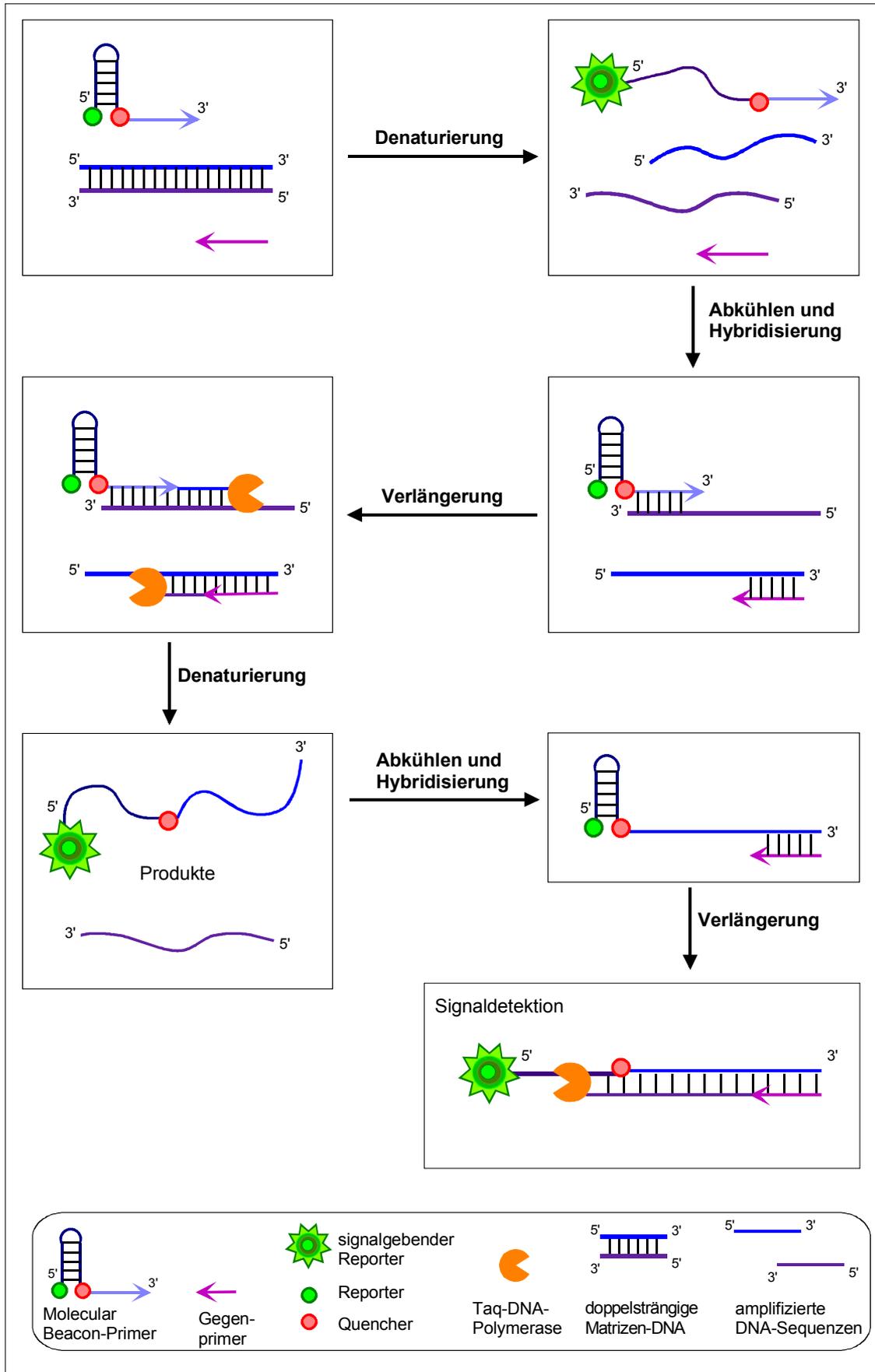


Abb. 4.10: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines *Beacon-Primer*.

Im ersten Zyklus der PCR-Reaktion wird die auf die Matrize hybridisierte *Primer*-Sequenz von der *Taq*-DNA-Polymerase verlängert. Das erhaltene PCR-Produkt, das die Zielsequenz für den Gegen-*Primer* beinhaltet, trägt am 5'-Ende zunächst noch die Haarnadelstruktur des *Molecular Beacon* Abschnitts. In der Verlängerungsphase des zweiten Thermozyklus der PCR-Reaktion wird die Haarnadelkonformation dann von der *Taq*-DNA-Polymerase geöffnet. Die zwischen Reporter- und Quencher-Molekül entstehende Distanz macht einen intermolekularen Energietransfer nicht mehr möglich, so dass das während der PCR-Produktbildung ansteigende Reporter-Fluoreszenzsignal gemessen werden kann. Im Gegensatz zu anderen Fluoreszenz-markierten Hybridisierungssonden, werden *Beacon-Primer* nicht allein für die Erzeugung eines Fluoreszenzsignals eingesetzt, sondern sind auch direkt an der Produktbildung im PCR-Experiment beteiligt.

#### 4.7.3 Echtzeit-PCR Detektionssystem

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Echtzeit-PCR-Versuche wurden mit Hilfe des iCycler™ iQ Detektionssystems (Bio-Rad) durchgeführt, wobei es sich um eine Kombination aus einem Peltier-temperaturgesteuerten PCR-Standardgerät mit einem optischen Modul handelt. Das optische Modul beinhaltet eine Anregungs- und Detektionseinheit zur Erzeugung und Messung des PCR-Fluoreszenzsignals. Als Lichtquelle dient eine 50 Watt Quecksilber-Halogenlampe, der sich ein Hitzefilter aus Infrarot-absorbierendem Glas anschließt. Des Weiteren beinhaltet die Anregungseinheit ein Filterrad mit sechs Positionen für die Farbstoff-angepaßten Anregungsfilter und ein duales Spiegelsystem, welches die simultane Beleuchtung aller 96 *Wells* des Reaktionsblocks und damit die Anregung der Fluoreszenzmoleküle während des PCR-Versuchs ermöglicht. Die Detektionseinheit setzt sich aus einem weiteren Filterrad mit sechs Positionen für die Farbstoff-angepaßten Emissionsfilter, einem Bildverstärker und einem 350.000 Pixel CCD-Detektor zusammen. Die aus den Reaktionsgefäßen emittierte Fluoreszenzstrahlung wird durch den entsprechenden Emissionsfilter und den Verstärker gelenkt, um dann von dem CCD-Detektor gemessen zu werden (siehe Abb. 4.11).

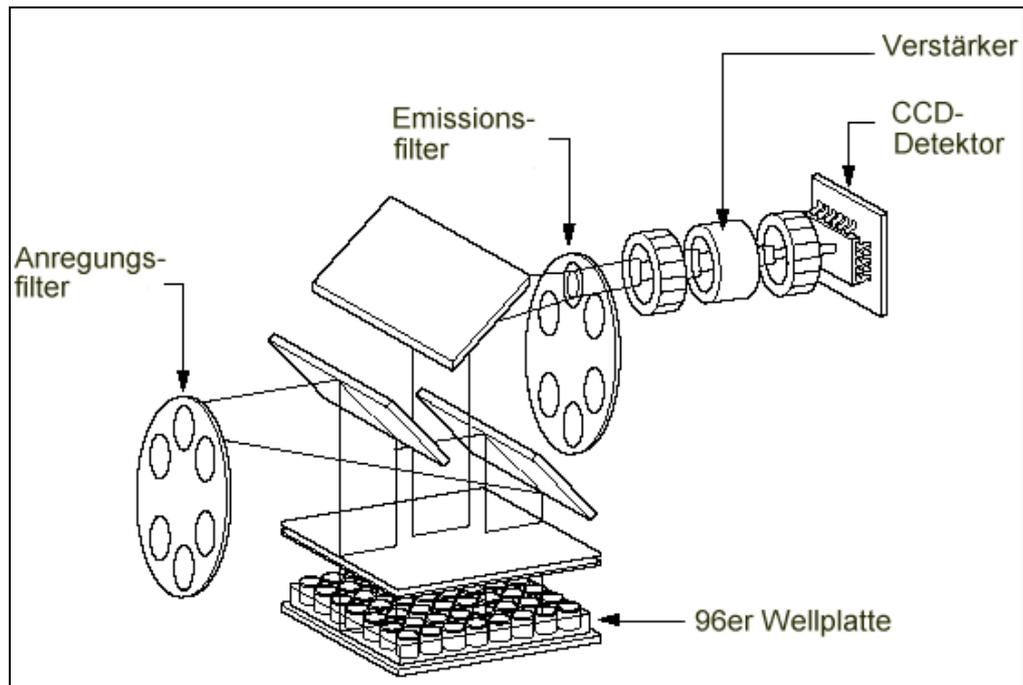


Abbildung 4.11: Schematischer Aufbau des iCycler™ iQ Detektionssystems (Bio-Rad).

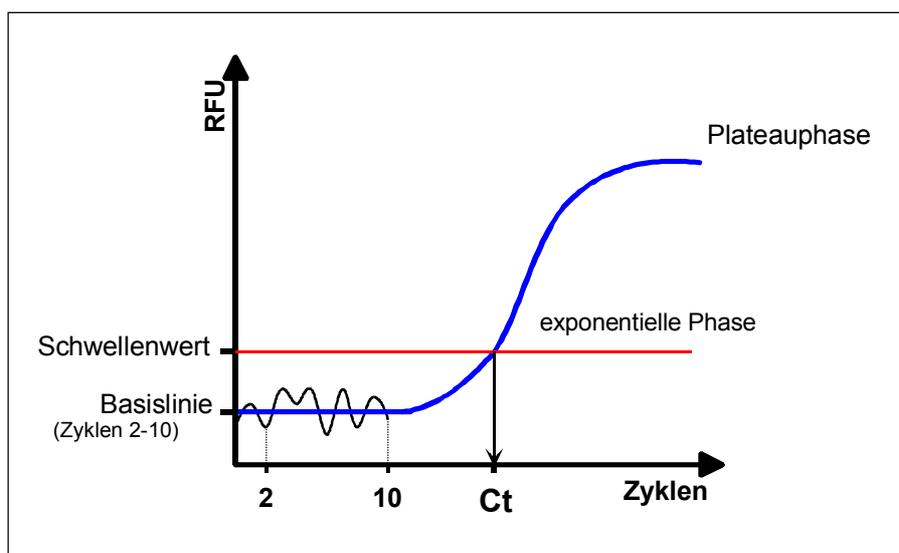
#### 4.7.4 Interpretation von Amplifikationskurven der Echtzeit-PCR

Die Auswertung eines Echtzeit-PCR-Versuchs erfolgt durch die Interpretation der zugehörigen Amplifikationskurve, die durch Auftragen der relativen Fluoreszenzintensität (RFU) gegen die entsprechende Zyklenanzahl erhalten wird. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität mit steigender Zyklenanzahl ist hierbei proportional zur Menge der gebildeten Amplikons.

Im Idealfall wird die gewünschte Zielsequenz in der PCR-Reaktion ab dem vierten Zyklus exponentiell vervielfältigt. Zunächst werden im ersten Schritt entlang der Matrize neue DNA-Stränge gebildet, die noch keine definierte Länge haben. Die DNA-Polymerase synthetisiert solange DNA, bis sie von alleine anhält, oder vom Beginn des zweiten Denaturierungsschrittes unterbrochen wird. Auch im zweiten Zyklus ist die Länge der komplementären Kopien noch nicht festgelegt. Erst nach Vollendung der dritten Runde ist die Zielsequenz gebildet und kann die exponentielle Vervielfältigung beginnen. In jedem weiteren Zyklus verhindern aber unter anderen folgende Faktoren eine 100 %ige Reaktionsausbeute:

- Wenn die Zielsequenz im molaren Überschuss gebildet wurde, reicht die Konzentration der *Taq*-DNA-Polymerase nicht mehr aus.
- Die Enzymaktivität der *Taq*-DNA-Polymerase nimmt im Verlauf der Reaktion ab.
- Die Hybridisierung der gebildeten DNA-Stränge untereinander steht in Konkurrenz mit der eigentlich erwünschten Hybridisierung der Oligonukleotide auf der Zielsequenz.
- Die anderen Reagenzien der PCR-Reaktion erschöpfen sich.

Die PCR-Reaktion endet schließlich in einer Plateauphase, in der keine weitere Ziel-DNA amplifiziert wird. Mit Hilfe der Echtzeit-PCR kann der Verlauf der PCR-Reaktion anhand der Amplifikationskurve beobachtet werden. Ab einem gewissen Schwellenwert-Zyklus ( $C_t$ ) hebt sich das Fluoreszenzsignal in signifikanter Weise von der Hintergrundfluoreszenz ab. Mit Hilfe der Software des iCycler™ iQ Detektionssystems (Bio-Rad) wird ein Emissionsmittelwert durch Auswahl eines Bereiches früher Zyklen berechnet, und somit eine Basislinie für die Hintergrundfluoreszenz festgelegt. Der Schwellenwert (*threshold*) wird im Allgemeinen automatisch auf die 10-fache Standardabweichung vom Mittelwert der Basislinienemission festgelegt, kann aber auch manuell eingestellt werden. Der Schnittpunkt von Amplifikationskurve und Schwellenwert entspricht dem Schwellenwert-Zyklus ( $C_t$ , siehe Abb. 4.12).



**Abbildung 4.12:** Schematische Darstellung einer Amplifikationskurve im Echtzeit-PCR-Versuch. Durch Festlegung eines Schwellenwertes für die relative Fluoreszenzintensität wird der  $C_t$ -Wert durch Extrapolation auf die x-Achse bestimmt.

Zum Zeitpunkt, der dem Ct-Wert zuzuordnen ist, befindet sich die PCR-Reaktion in der exponentiellen Phase, die durch die folgende Formel beschrieben werden kann.

Formel:  $X_n = X_m (1 + \eta)^{n-m}$

$X_n$  = Anzahl der Amplikons im Zyklus  $n$  ( $n \geq m$ )

$X_m$  = Anzahl der Amplikons im Zyklus  $m$

$\eta$  = Effizienz der Amplifikationsreaktion (Werte von 0 bis 1)

$n-m$  = Anzahl der Zyklen zwischen  $m$  und  $n$

Im Idealfall wird die Effizienz der Amplifikationsreaktion mit dem Wert Eins angegeben und mit jedem Zyklus wird die Anzahl der Amplikons verdoppelt.

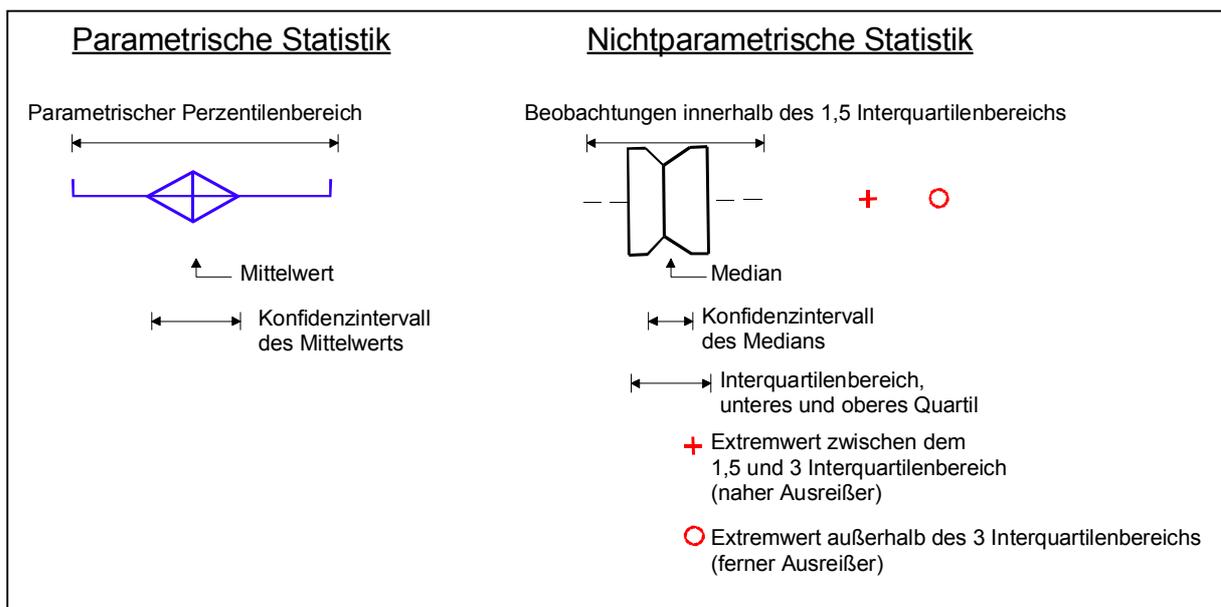
$$\eta = 1 \wedge n-m = 1 \quad \rightarrow \quad X_n = X_m (1 + 1)^1 \\ X_n = 2 X_m$$

## 4.8 Beschreibende Statistik

### 4.8.1 Box- und Whisker-Diagramm

Das Kasten- und (Katzen-) Schnurrhaardiagramm, oft auch abgekürzt als „*Boxplot*“ bezeichnet, stellt schematisch eine Häufigkeitsverteilung dar mit der sich besonders gut verschiedene Verteilungen miteinander vergleichen lassen (siehe Abb. 4.13).

In der vorliegenden Arbeit wurde bei Testpersonen eine RHD-Genotypisierung vorgenommen, wobei anhand der Versuchsergebnisse entweder auf den RHD-heterozygoten, oder RHD-homozygoten Genotyp geschlossen werden konnte (siehe 5.6.). Die graphische Darstellung der ermittelten Datenpopulationen im *Box-* und *Whisker-*Diagramm erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms *Analyse-it* (Version 1.68) für *Microsoft Excel*.



**Abbildung 4.13: Erläuterungen zur beschreibenden Statistik mit Hilfe des *Box-* und *Whisker-Diagramms*.** Die parametrische Statistik wird auf Messdaten angewendet für die eine Normalverteilung angenommen werden kann. Die nichtparametrische Statistik setzt keine Normalverteilung der Messdaten voraus. Der Perzentilenbereich umfasst den Bereich zwischen dem 2,5. und 97,5. Perzentil, in dem sich 95 % der Messdaten befinden. Der Interquartilenbereich umfasst den Bereich zwischen dem ersten und dritten Quartil, also dem 25. und 75. Perzentil, in dem sich 50 % der Meßwerte befinden.

## 4.8.2 Hardy Weinberg-Gleichgewicht

In einer idealen Population stehen die Frequenzen von zwei oder mehreren Allelen eines Genlocus in einem Gleichgewicht. Bei zwei Allelen mit den Frequenzen  $p$  für das Allel A und  $q$  für das Allel a beträgt die Summe der Allelfrequenzen  $p + q = 1$ .

Daher sind:

Homozygote AA =  $p^2$

Heterozygote Aa =  $2pq$

Homozygote aa =  $q^2$

Daraus ergibt sich:  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

Die relativen Häufigkeiten der Homozygoten für das Allel A, der Heterozygoten Aa und Homozygoten für das Allel a bleiben also konstant [Passarge, 2001].

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Entwicklung einer Echtzeit-PCR zur fötalen Rhesus-D-Genotypisierung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine nicht-invasive Untersuchungsmethode für Rhesus-Antigen-D-negative Schwangere zu entwickeln, mit deren Hilfe eine Rhesus-D-Genotypisierung des ungeborenen Kindes möglich sein könnte. Hierfür sollte eine molekulargenetische Untersuchung der mütterlichen Blutplasma-DNA mittels Echtzeit-PCR vorgenommen werden. Damit könnte die Anti-D-Immunglobulin-Behandlung gezielt bei tatsächlich vorliegender Rhesus-Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind (siehe 2.1.4) angewendet werden. Der erste Schritt bestand in der Entwicklung eines PCR-Tests zur Detektion RHD-spezifischer Sequenzen auf der Grundlage einer vollständigen Deletion des RHD-Gens beim D-negativen Serotyp. Die große Homologie von RHD und RHCE erforderte die sorgfältige Auswahl eines Genabschnitts mit möglichst vielen Sequenzunterschieden zwischen beiden Genen. Beim Vergleich verschiedener Exons von RHD und RHCE ist Exon 7 für die Realisierung eines RHD von RHCE unterscheidenden PCR-Tests geeignet.

#### 5.1.1 MS-PCR für die Amplifikation RHD- und RHCE-spezifischer Sequenzen

Der Nachweis RHD-spezifischer Sequenzen wurde zunächst als Multiplex-PCR verwirklicht, wobei RHD- und RHCE-PCR-Produkte parallel nebeneinander amplifiziert worden sind. Hierfür wurden ein RHD- (MS-Dex7) und ein RHCE-spezifischer *Primer* (MS-CEex7) mit einem gemeinsamen Gegen-*Primer* (RH-com) nach dem Prinzip der mutagenetisch separierenden PCR (MS-PCR, siehe 4.6.1) eingesetzt (Abb. 5.1). Die erhaltenen PCR-Produkte konnten im Agarosegel anhand ihrer Längenunterschiede entsprechend zugeordnet werden. Die Spezifität der PCR wurde anhand von DNA-Proben, die aus Blutproben von 50 weiblichen und 50 männlichen Spendern präpariert worden waren (siehe Abschnitte 4.1.1, 4.3.2.1), getestet. Mit den 11 serologisch als Rhesus-D-negativ bestimmten Proben konnte im PCR-Test kein RHD-spezifisches Produkt amplifiziert werden. Eine falsch-negative Bewertung war hierbei auszuschließen, da bei allen Proben das RHCE-spezifische PCR-Produkt nachgewiesen werden konnte. Mit den 89 serologisch Rhesus-D-positiv bestimmten Proben konnten im MS-PCR Test sowohl das RHD- als auch das RHCE-spezifische PCR-Produkt amplifiziert werden (Abb. 5.2).

RHCE-exon7	1	TTT	GAGGTGAGCCTTAGTGCCCATCCCCATTTGGTGGCGCCGGATACCAAGGGTGTGTGAAA	62	
RHD-exon7	1			AAA 3	
<b>MS-CEex7</b>	<b>1</b>			<b>CAGG 4</b>	
RHCE-exon7	63	GGGGTGGGTAGGGAATATGGGTCTCACCTGCCAATCTGCTTATAATAAACTTGTCCACAGG		124	
RHD-exon7	4	GGGGTGGGTAGGGAATATGGGTCTCACCTGCCAATCTGCTTATAATAAACTTGTCCACAGG		65	
<b>MS-CEex7</b>	<b>5</b>	<b>TGTGTTGTAACCGAGT</b>	<b>CGAGGGGATTCCACCACATCTCCGTCAAGCA</b>	<b>50</b>	
RHCE-exon7	125	<b>TGTGTTGTAACCGAGT</b>	<b>GCTGGGGATTCCACCACATCTCCGTCAAGCACTCCATCTTCAGCTTG</b>	186	
RHD-exon7	66	<b>G</b>	<b>GTGTTGTAACCGAGT</b>	<b>GCTGGGGATTCCACCACATCTCCATCATGGGCTACAACTTCAGCTTG</b>	127
<b>MS-Dex7</b>	<b>1</b>		<b>GCTGGGGATTCCCCACAGCTCCATCATCGG</b>	<b>30</b>	
RHCE-exon7	187	<b>CTGGGCTGCTTGGAGAGATCA</b>	<b>CTACATTTGCTGCTGGTGCCTT</b>	<b>CATACTGTCTGGAACGG</b>	248
RHD-exon7	128	<b>CTGGGCTGCTTGGAGAGATCA</b>	<b>CTACATTTGCTGCTGGTGCCTT</b>	<b>GATACCGTGGAGCCGG</b>	189
<b>RH-com</b>	<b>1</b>			<b>CCAACTCAGGA 11</b>	
RHCE-exon7	249	<b>CAATGGCATGTGGGTC</b>	<b>ACTGGGCTTACCCCCATCCCCTTAACACTCCCCTCCA</b>	<b>ACTCAGGA</b>	310
RHD-exon7	190	<b>CAATGGCATGTGGGTC</b>	<b>ACTGGGCTTACCCCCATCCCCTTAACACTCCCCTCCA</b>	<b>ACTCAGGA</b>	251
<b>RH-com</b>	<b>12</b>	<b>AGAAATGTGTGCAGAG</b>		<b>27</b>	
RHCE-exon7	311	<b>AGAAATGTGTGCAGAG</b>	<b>TCCTTAGCTGGGGCGTGTGCACT</b>	349	
RHD-exon7	252	<b>AGAAATGTGTGCAGAG</b>	<b>TCCTTAGCTGGGGCGTGTGCACTCGGGGCCAGGTGCTCAGTAGGCT</b>	313	
RHCE-exon7	350			349	
RHD-exon7	314	<b>TCGGTGAATATTTGTTGGCTGATTTATTCAGAAATCTGTCCAGCCCC</b>	<b>TACCTTGA</b>	370	

**Sequenzunterschiede zwischen Exon 7 von RHD und RHCE**

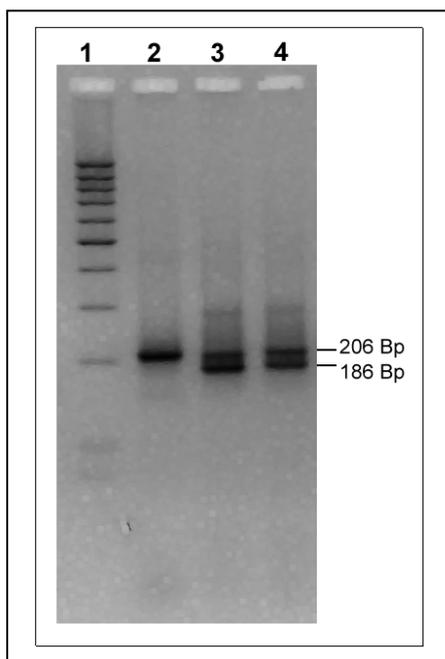
**Primersequenz**

**in Primer eingebaute Mutationen, sowie die dazugehörige Matrizensequenz**

**Matrizensequenz**

**Abbildung 5.1 (oben):** Position des RHD- und des RHCE-spezifischen *Primers* (MS-Dex7 bzw. MS-CEex7), sowie des gemeinsamen *Gegen-Primers* (RH-com) im Exon 7 von RHD bzw. RHCE für die MS-PCR. Zur Veranschaulichung der Sequenzhomologie der Genabschnitte sind jeweils Exon 7 von RHD und RHCE parallel abgebildet (*Accession No.* AJ299026 bzw. AF056967).

Die 3'-Enden der MS-*Primer* wurden auf einen Sequenzabschnitt gelegt, in dem sich die Exons 7 der beiden Gene um zwei Basenpaare voneinander unterscheiden. In direkter Nachbarschaft zu diesen Basenpaaren wurden dem RHD-*Primer* in der dritten Position (C statt G) und dem RHCE-*Primer* in der vierten Position (A statt T) jeweils eine Sequenzabweichung eingefügt. Der RHD-*Primer* wurde 30 Bp, der RHCE-*Primer* 50 Bp lang gewählt, wobei der RHCE-*Primer* auf Höhe des 5'-Endes des RHD-*Primer* eine zusätzliche Mutation von drei aufeinanderfolgenden Basen (CGA statt GCT) erhielt. Die RHCE-PCR-Produktlänge beträgt 206 Bp, die RHD-PCR-Produktlänge 186 Bp.



**Abbildung 5.2 (links):** 4 %iges NuSieve-Agarose-Gel nach Ethidiumbromidfärbung (Negativdarstellung) zur elektrophoretischen Auftrennung von RHD- und RHCE-spezifischen Amplifikaten.

*Primer:* MS-Dex7, MS-CEex7, RH-com.

Zur Veranschaulichung der möglichen PCR-Ergebnisse wurden drei Bahnen ausgewählt, die den theoretisch möglichen RHD-Genotypen zuzuordnen sind (RHD-Zygotiebestimmung siehe 5.6):

Bahn 2: RHD-negative Probe,

Bahn 3: RHD-homozygote Probe,

Bahn 4: RHD-heterozygote Probe,

sowie ein DNA-Längenstandard :

Bahn 1: 100 Bp DNA-Leiter.

## 5.1.2 Echtzeit-PCR zur Detektion RHD- sowie RHCE-spezifischer Sequenzen

Nachdem Exon 7 als geeigneter Genabschnitt für die Entwicklung eines RHD von RHCE diskriminierenden PCR-Tests beurteilt wurde, konnte das Verfahren als Echtzeit-PCR umgestaltet werden.

### 5.1.2.1 Entwicklung einer RHD- und RHCE- TaqMan®-PCR

Auf der Grundlage der zuvor getesteten RHD/RHCE-MS-PCR (siehe 5.1.1) wurde eine Echtzeit-PCR mit einer für RHD und RHCE universell einsetzbaren TaqMan®-Sonde entwickelt (Abb. 5.3).

MS-CEex7b	1	GGATTCCACCACATCTCCGTCAAGCA	25
RHCE-exon7	125	TGTGTTGTAACCGAGTGTCTGGGGATTCCACACATCTCCGTCAAGCACTCCATCTTCAGCTTG	186
RHD-exon7	66	GGTGTGTTGTAACCGAGTGTCTGGGGATTCCACACAGCTCCATCATGGGCTACAACCTTCAGCTTG	127
MS-Dex7b	1	TCCCCACAGCTCCATCATCGG	21
RHCE-exon7	187	CTGGGTCTGCTTGGAGAGATCACCTACATTGTGCTGCTGGTGCTTCATACTGTCTGGAAACGG	248
RHD-exon7	128	CTGGGTCTGCTTGGAGAGATCATCTACATTGTGCTGCTGGTGCTTGATACCGTCCGGAGCCGG	189
DCE-Taq1	1	CGG	3
RH-com	1	CCAACCTCAGGA	11
RHCE-exon7	249	CAATGGCATGTGGGTCACCTGGGCTTACCCCCCATCCCCTTAACACTCCCCTCCAACCTCAGGA	310
RHD-exon7	190	CAATGGCATGTGGGTCACCTGGGCTTACCCCCCATCCCCTTAACACTCCCCTCCAACCTCAGGA	251
DCE-Taq1	4	CAATGGCATGTGGGTCACCTGGGC	26
RH-comz	1	A	1
RH-com	12	AGAAATGTGTGCAGAG	27
RHCE-exon7	311	AGAAATGTGTGCAGAGTCCTTAGCTGGGGCGTGTGCACT	349
RHD-exon7	252	AGAAATGTGTGCAGAGTCCTTAGCTGGGGCGTGTGCACTCGGGGCCAGGTGCTCAGTAGGCT	313
RH-comx	2	AGAAATGTGTGCAGAGTCCTTAGCTGG	28
RH-comy	1	GAGTCCTTAGCTGGGGCGTGTGCACT	26
RH-comz	1	AAATGTGTGCAGAGTCCTTAGCTGGGG	27

**Sequenzunterschiede zwischen Exon 7 von RHD und RHCE**

**Primersequenz**

**in Primer eingebaute Mutationen, sowie die dazugehörige Matrizensequenz**

**TaqMan Sonde und dazugehörige Matrizensequenz**

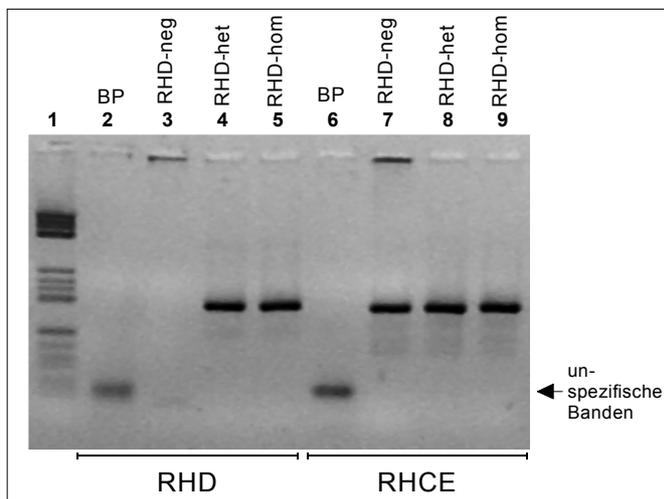
**Matrizensequenz**

**Abbildung 5.3: Position der verkürzten RHD- und RHCE-spezifischen Primer (MS-DEex7b bzw. MS-DEex7b), der TaqMan®-Sonde (DCE-Taq1), sowie der Auswahl gemeinsamer Gegenprimer (RH-com, -x, -y oder -z) im Exon 7 des RHD- bzw. RHCE-Gens für den Einsatz in der Echtzeit-PCR. PCR-Produktlängen je nach Primer-Kombination: 177 bis 209 Bp.**

Grundsätzlich sollte die Schmelztemperatur einer TaqMan®-Sonde über der der eingesetzten PCR-Primer liegen, damit gewährleistet wird, dass die Sonde auf die Matrize hybridisiert, bevor die Taq-DNA-Polymerase die Primer verlängert. Die ursprünglichen MS-Primer wurden hierfür verkürzt (MS-CEex7b: 25 Bp; MS-Dex7b: 21 Bp). Die TaqMan®-Sonde durfte auch nicht zu lang sein, damit Reporter- und Quencher-Molekül miteinander in Wechselwirkung treten konnten.

Die RHD/RHCE-TaqMan®-Sonde wurde auf einen Sequenzabschnitt von 26 Basenpaaren festgelegt. Eine Auswahl verschiedener Gegenprimer ist in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz gekommen (RH-com/x/y/z). Die Anwendung der nicht zwischen RHD und RHCE diskriminierenden TaqMan®-Sonde erforderte die separate Amplifikation der beiden Gensequenzen.

Es konnte mit allen RHD-spezifischen *Primer*-Kombinationen nur mit serologisch RhD-positiv eingestuften Proben ein RHD-spezifisches Signal detektiert werden. Ebenso konnte mit allen RHCE-spezifischen *Primer*-Kombinationen sowohl mit RhD-positiven, als auch RhD-negativen Proben ein Fluoreszenzsignal im Echtzeit-PCR-Versuch generiert werden (Abb. 5.5). Das RHCE-positive Ergebnis bei RhD-negativen Proben zeigte die Anwesenheit von amplifizierbarer DNA an (Bahn 7, Abb. 5.4) und konnte als Kontrolle des RHD-negativen Versuchsergebnisses angesehen werden.



**Abbildung 5.4 (links):** 4 %iges NuSieve-Agarose-Gel nach Ethidiumbromidfärbung (Negativdarstellung) mit Amplifikaten einer Echtzeit-RHD/RHCE-PCR, wobei DNA aller drei möglichen RHD-Genotypen untersucht worden ist: RHD-negativer, -heterozygoter, -homozygoter Genotyp.

*Primer* der RHD-PCR: MS-Dex7b und RH-comz (PCR-Produktlänge = 188 Bp),

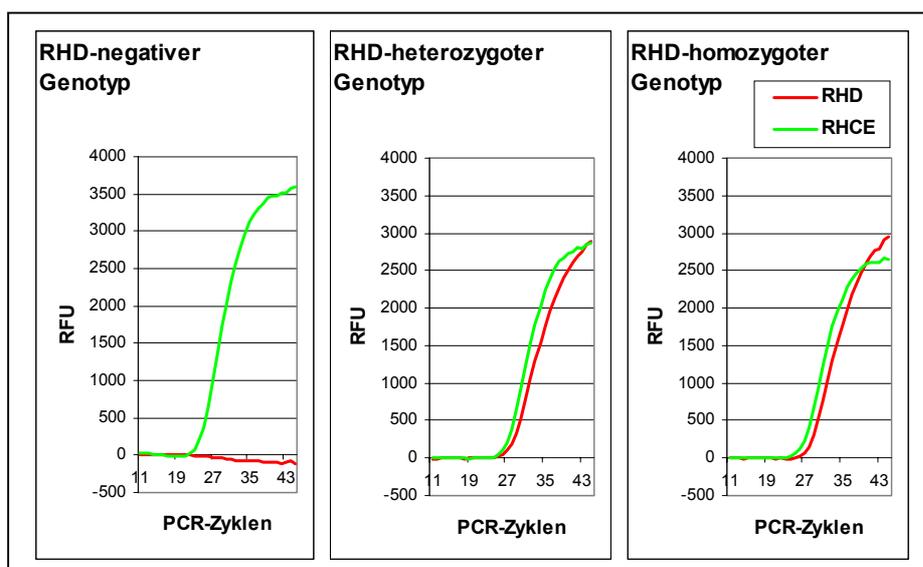
*Primer* der RHCE-PCR: MS-CEex7b und RH-com (PCR-Produktlänge = 181 Bp).

Bahnen 3-5: Ergebnisse der RHD-PCR;

Bahnen 7-9: Ergebnisse der RHCE-PCR;

Bahn 1: DNA-Sizer XV;

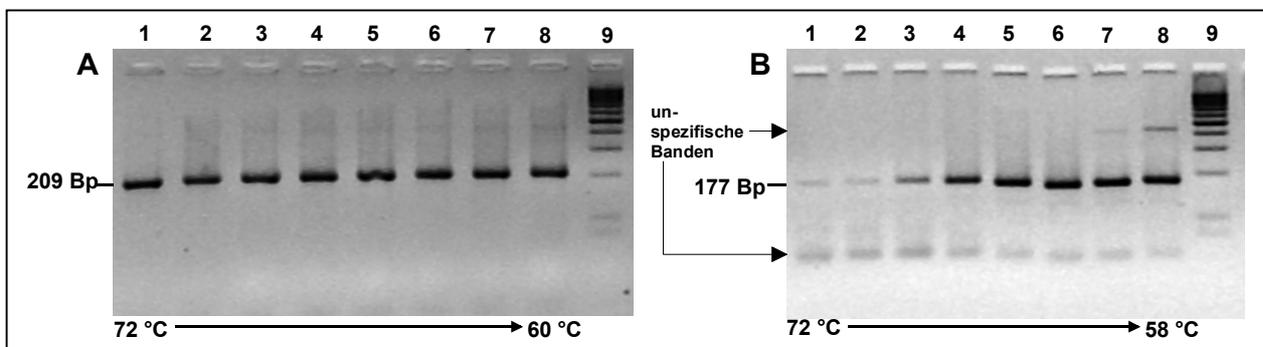
Bahn 2: PCR-Blindprobe (BP).



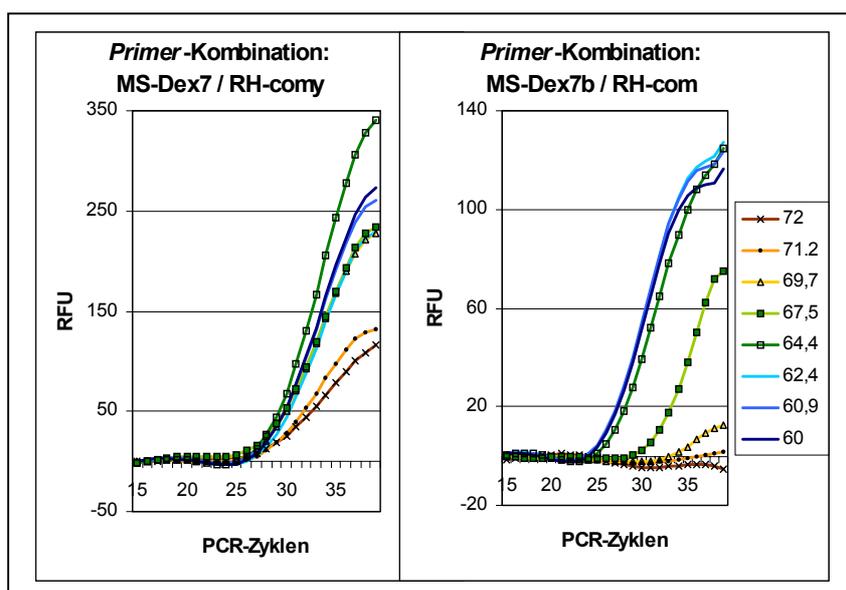
**Abbildung 5.5 (oben):** Echtzeit Fluoreszenz-Detektion der Produktzunahme bei der RHD/RHCE-PCR mit einer TaqMan®-Sonde (DCE-Taq1). Die Amplifikationskurven sind der entsprechenden PCR zuzuordnen, in der die in Abb. 5.4 gezeigten PCR-Produkte der verschiedenen RHD-Genotypen jeweils amplifiziert wurden.

### 5.1.2.2 Optimierung der RHCE- und RHD-TaqMan®-PCR

Zur Einstellung eines optimalen Temperaturbereichs für die TaqMan®-PCR wurden für alle beschriebenen RHD- und RHCE-spezifischen *Primer*-Paare unterschiedliche Hybridisierungstemperaturen mittels Gradienten-PCR getestet. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden im Agarose-Gel elektrophoretisch untersucht, wobei das PCR-Ergebnisse anhand der Bandenintensitäten, die der jeweiligen Temperatur zuzuordnen sind, verglichen wurden. In welchem Maß die PCR-Produktamplifikation mit der Entwicklung des Fluoreszenzsignals korrelierte konnte anhand der jeweiligen Amplifikationskurve abgeschätzt werden. Die vorgenommenen Untersuchungen sollen hier anhand der Ergebnisse für die Untersuchung von zwei *Primer*-Kombinationen exemplarisch gezeigt werden (siehe Abb. 5.6 und Abb. 5.7).



**Abbildung 5.6 (oben):** Gelelektrophoretische Auftrennung von Produkten der Gradienten-PCR in 4 %igen NuSieve-Agarose-Gelen und anschließender Ethidiumbromidfärbung (Negativdarstellung). *Primer* Gel A: MS-Dex7, RH-comy; *Primer* Gel B: MS-Dex7b, RH-com. Bahn 9: Jeweils DNA-Sizer XV. Temperaturgradient [°C] Gel A Bahn 1 → Bahn 8: 72,0; 71,2; 69,7; 67,5; 64,4; 62,4; 60,9; 60. Temperaturgradient [°C] Gel B Bahn 1 → Bahn 8: 72,0; 71,0; 69,3; 66,7; 63,1; 60,7; 59,1; 58. Gel B zeigt deutlich eine un-spezifische Produktbande (ca. 450 Bp) für die Temperaturen 59,1 °C, 58 °C.

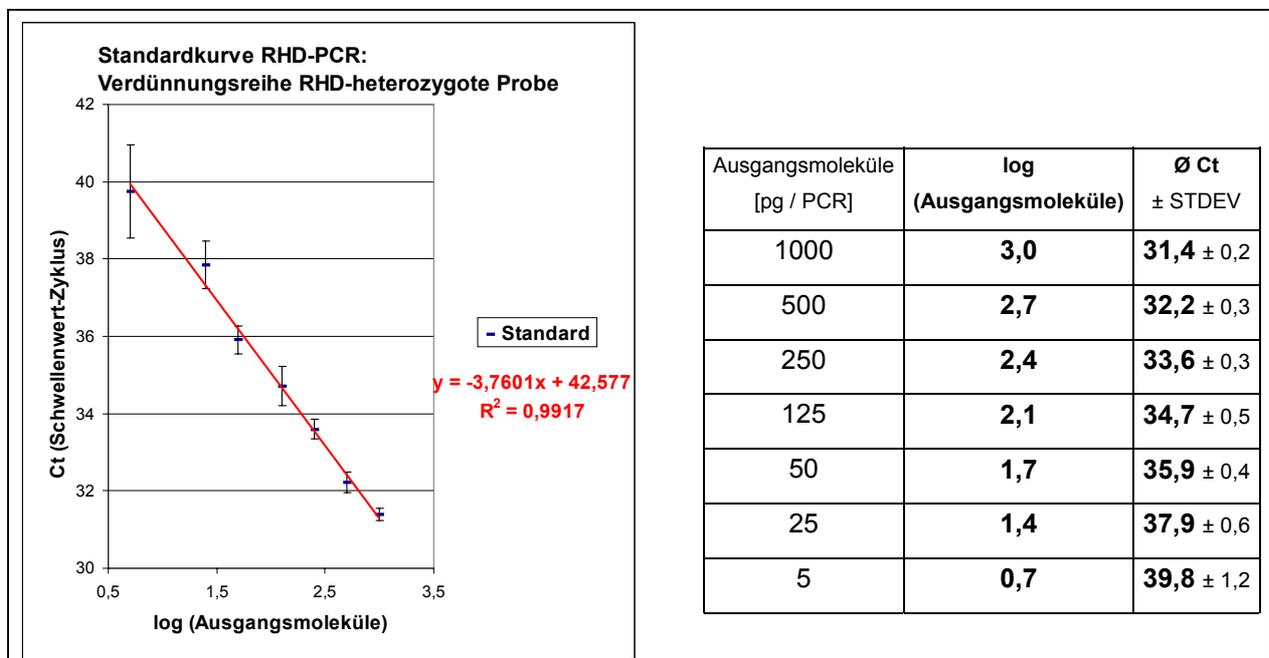


**Abbildung 5.7 (links):** Amplifikationskurven von Gradienten-PCR-Versuchen mit der TaqMan®-Sonde DCE-Taq1. Die einzelnen Graphen sind den verschiedenen Hybridisierungstemperaturen [°C] zuzuordnen

Auf der Grundlage der in den Abbildungen 5.6 und 5.7 aufgeführten Versuchsergebnisse sind für die *Primer*-Kombination MS-Dex7, RH-comy und MS-Dex7b, RH-com *Touchdown*-PCR-Programme (siehe 4.6.2.3) im Temperaturbereich 67 → 62°C bzw. 65 → 60°C entwickelt worden. Mit den hier beschriebenen Untersuchungsmethoden zeigte sich, dass auch die längeren *Primer* (MS-Dex7 und MS-CEex7) zusammen mit der TaqMan®-Sonde im Echtzeit-PCR-Versuch eingesetzt werden konnten. Mit jedem Gegen-*Primer* (RH-com, -x, -y oder -z) wurden zufriedenstellende Ergebnisse erzielt.

### 5.1.2.3 Sensitivität der RHD-TaqMan®-PCR

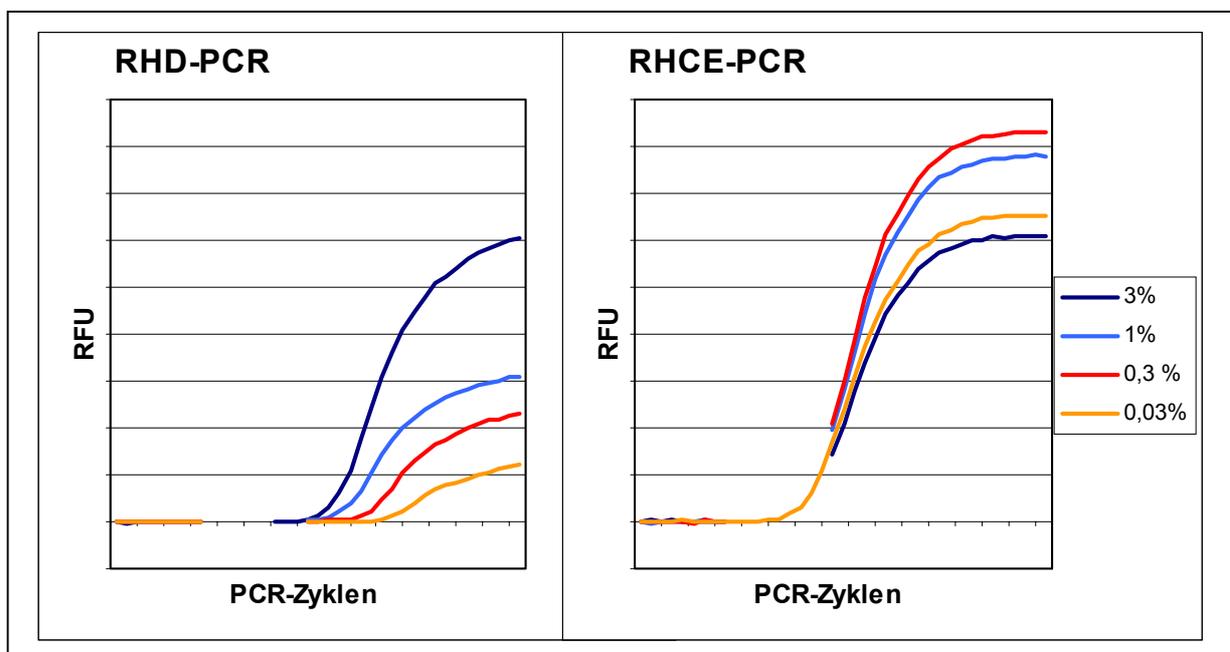
Um die nur in sehr geringer Konzentration im mütterlichen Blut auftretende zellfreie fötale DNA detektieren zu können, musste der geplante PCR-Test eine hohe Sensitivität für die RHD-Detektion aufweisen. Anhand der Untersuchung von Konzentrationen einer Verdünnungsreihe aus RHD-heterozygoten DNA-Proben mit Hilfe der Echtzeit-PCR wurde die unterste Detektionsgrenze auf bis zu 5 pg DNA pro PCR bestimmt (Abb. 5.8). Dies entspricht ungefähr einem Genomäquivalent. In der Literatur wird die Menge DNA, die in einer Zelle enthalten ist mit 6,8 pg angegeben [Lo *et al.*, 1998]. Als Genomäquivalent wird die Menge einer bestimmten Genomsequenz bezeichnet, die in einer diploiden humanen Zelle zu finden ist.



**Abbildung 5.8: Lineare Beziehung zwischen Ct-Wert und Logarithmus der Anzahl von Ausgangsmolekülen in der Echtzeit-PCR.** *Primer:* MS-Dex7, RH-comy, DCE-Taq1.

Abgebildet sind die Ergebnisse einer *Touchdown* RHD-PCR, die jeweils mit einer Konzentration einer Verdünnungsreihe RHD-heterozygoter DNA (1 ng bis 5 pg pro PCR) durchgeführt wurde. Die Ct-Werte entsprechen dem Durchschnittswert einer sechsfachen Bestimmung (Basislinie: PCR-Zyklen 12 bis 26; Schwellenwert: RFU 15).

Neben der gering konzentrierten fötalen DNA, ist auch ein erheblich höherer Anteil mütterlicher DNA im Schwangeren-Blutplasma vorhanden. Die TaqMan®-PCR wurde deshalb hinsichtlich der RHD-Detektion anhand von DNA-Verdünnungsreihen getestet, in denen RHCE gegenüber RHD überrepräsentiert war. Da für die vorliegende Arbeit nur eine begrenzte Anzahl an Probenmaterial (Schwangerenplasma mit zugehöriger Probe Amnionflüssigkeitsüberstand) zur Verfügung stand, musste der Test zunächst an einem Vergleichssystem durchgeführt werden. Hierfür wurden Mischungen aus RHD-heterozygoter Probe (RHD-Zygotiebestimmung, siehe 5.6) und RHD-negativer Probe mit unterschiedlichen Konzentrationen erstellt und in der Echtzeit-RHD/RHCE-PCR eingesetzt (Abb. 5.9). Der RHD-heterozygote Genotyp entspricht dem theoretisch möglichen Genotyp eines RhD-positiven Kindes einer RhD-negativen Mutter.



**Abbildung 5.9: Amplifikationskurven von RHD- und RHCE-spezifischen PCR-Versuchen, die mit Hilfe der TaqMan®-Sonde DCE-Taq 1 erstellt wurden.** Primer: MS-Dex7b bzw. MS-CEex7b, jeweils mit RH-com. Es wurden verschiedene Konzentrationen einer Verdünnungsreihe RHD-heterozygoter in RHD-negativer Probe untersucht. Im PCR-Versuch wurden jeweils 45 ng DNA eingesetzt, wobei der Anteil von RHD-heterozygoter Probe variierte: 3 %; 1 %; 0,3 %; 0,03 % bzw. 1350 pg, 450 pg, 135 pg, 14 pg. Die Amplifikationskurven, die den verschiedenen DNA-Mischungen zugeordnet werden können, liegen bei der RHCE-spezifischen PCR im exponentiell verlaufenden Bereich übereinander. Bei den Amplifikationskurven der RHD-spezifischen PCR ist dagegen zu beobachten, dass der Fluoreszenzanstieg sich entsprechend der abnehmenden Anzahl von RHD-Sequenzen in der jeweiligen Probe verzögert.

Die DNA-Mischungen wurden in Anlehnung der Angaben von Lo *et al.* [1998] angesetzt, wonach der Anteil fötaler DNA an der gesamten Blutplasma-DNA in der frühen Schwangerschaft (11. bis 17. SSW) ungefähr 3 %, in der späten Schwangerschaft (37. bis 43. SSW) ungefähr 6 % ausmachen soll (siehe 2.2.5.2).

Die hohe PCR-Sensitivität konnte bei der Untersuchung von Verdünnungsreihen RHD-heterozygoter DNA in RHD-negativer DNA nicht in dem selben Maß beobachtet werden, wie bei der Untersuchung von Verdünnungsreihen homogener RHD-positiver DNA (Abb. 5.8). Die Detektionsgrenze wurde bei einem Gesamt-DNA-Gehalt von 0,5 ng bis 1 ng auf 30 pg (ca. 4 bis 5 Genomäquivalente) RHD-positive DNA bestimmt (Tab. 5.1). Aufgrund der Erfahrungswerte, die bei den Untersuchungen von DNA-Verdünnungsreihen gesammelt worden sind, wurde die erforderliche Mindestmenge von RHD-positiver DNA für die zuverlässige Detektion im RHD-PCR-Versuch auf 50 bis 100 pg geschätzt. Den Angaben für die frühe Schwangerschaft von Lo *et al.* [1998] folgend, wären demnach theoretisch ca. 2 bis 4 ng mütterliche Blutplasma-DNA pro RHD-PCR ausreichend gewesen, um damit fötalspezifische RHD-positive Sequenzen detektieren zu können.

Gesamt DNA [ng]	D-heterozygote Probe		Ø Ct	
	Anteil an Gesamt-DNA [%]	[pg]	RHCE	RHD
25	6	1500	23,8	31,3
	3	750	23,8	32,1
	1	250	23,7	33,2
5	6	300	26,0	33,1
	3	150	26,1	33,7
	1	50	26,0	36,7
1	6	60	28,8	37,2
	3	30	28,8	36,1
	1	10	29,0	--
0,5	6	30	29,5	38,6
	3	15	29,5	--
	1	5	29,2	--

**Tabelle 5.1: Ct-Werte einer RHD/RHCE-Echzeit PCR mit der TaqMan®-Sonde DCE-Taq1, die verschiedenen Konzentrationen einer Verdünnungsreihe RHD-heterozygoter in RHD-negativer Probe zuzuordnen sind.** Die Amplifikation RHD- (*Primer*: MS-Dex7b, RH-com) und RHCE-spezifischer Produkte (*Primer*: MS-CEex7b, RH-com) wurde im selben PCR-Lauf durchgeführt (Basislinie: PCR-Zyklen 12 bis 22; Schwellenwert: RFU 18,3). Die angegebenen Ct-Werte entsprechen dem Durchschnittswert einer Doppelbestimmung, wobei die maximale Standardabweichung:  $\pm 0,8$  betrug. Die Versuche, bei denen kein PCR-Produkt generiert werden konnte sind mit -- gekennzeichnet.

## 5.2 RHD-Genotypisierung RhD-negativer Blutspender

Das Rhesus-Blutgruppen-System unterscheidet im Wesentlichen RhD-positive und RhD-negative Individuen. Das Vorhandensein oder Fehlen von Rhesus-Antigenen auf der Erythrozytenoberfläche wird routinemäßig anhand serologischer Tests bestimmt. In der kaukasischen Bevölkerung wird das Fehlen des Rhesus-D-Antigens hauptsächlich durch eine Deletion des kompletten RHD-Gens verursacht [Wagner *et al.*, 2000]. Der in der vorliegenden Arbeit entwickelte molekulargenetische Test zur Rhesus-D-Genotypisierung, basiert auf der vollständigen Deletion des RHD-Gens und detektiert einen Sequenzabschnitt im Exon 7 dieses Gens. Um die Zuverlässigkeit des Tests für die pränatale Diagnostik bei Risikoschwangerschaften für HDN (*Haemolytic Disease of the Newborn*, siehe 2.1.4) zu gewährleisten, wurde zunächst eine Reihenuntersuchung anhand einer größeren Gruppe von serologisch D-negativ getesteten Blutspendern kaukasischer Herkunft vorgenommen. Es sollte die Frage geklärt werden, bei welchem Prozentsatz RhD-negativer Testpersonen, die Deletion des Exon 7 im RHD-Gen mit dem D-negativen Serotyp übereinstimmt. Zu diesem Zweck wurde von insgesamt 255 RhD-negativen Blutproben (Universitäts-Klinik-Münster, siehe 4.1.2) die DNA isoliert (siehe 4.3.1.1) und im PCR-Test eingesetzt.

Die molekulargenetische RHD-Genotypisierung der Blutspender wurde mit Hilfe der RHCE/RHD-TaqMan®-PCR vorgenommen (siehe 5.1.2), wobei die Produktamplifikation in Echtzeit beobachtet werden konnte und erhaltene PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese und anschließender Dokumentation im Agarose-Gel kontrolliert wurden. Die RHD-spezifische PCR wurde für jedes Individuum als Doppelbestimmung in zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Um ein falsch negatives PCR-Versuchsergebnis auszuschließen, wurde zusätzlich als Positivkontrolle eine PCR für den Sequenzabschnitt im Exon 7 vom RHCE-Gen durchgeführt.

Die Verteilung der serologischen Phänotypen der untersuchten Proben (Information der transfusionsmedizinischen Abteilung der Universitäts-Klinik-Münster) entsprach der früherer Arbeiten; ccee 94.5 %, Ccee 4.7 %, und ccEe 0.78 % [Wagner *et al.*, 1995]. Die untersuchte Kohorte ist daher als repräsentativ anzusehen. Von den 255 untersuchten Proben zeigten zwei serologisch als RhD-negativ eingestufte Testpersonen (entspricht 0,78 %), die beide dem Phänotyp Ccddee entsprechen, im molekulargenetischen Test ein RHD-spezifisches PCR-Produkt. Somit besitzen diese Personen keine vollständige Deletion von Exon 7 des RHD-Gens und können mit der entwickelten TaqMan®-PCR nicht als RHD-negativ erkannt werden. Einen Ergebnisüberblick gibt die folgende Tabelle 5.2:

Phänotyp (Ergebnis des serologischen Tests)	Anzahl Testpersonen	prozentualer Anteil am Testpersonen-Kollektiv
<b>dd</b>	255	100 %
<b>ccddee</b>	241	94,51 %
<b>Ccddee</b> (mit Deletion Exon 7 RHD)	10	3,92 %
<b>Ccddee</b> (ohne Deletion Exon 7 RHD)	2	0,78 %
<b>ccddEe</b>	2	0,78 %

**Tabelle 5.2: Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung von RhD-negativen Individuen mittels RHD/RHCE-Echtzeit-PCR hinsichtlich einer Deletion im Exon 7 des RHD-Gens.**

*Primer:* MS-Dex7b oder MS-CEex7b, mit RH-com bzw. RH-comy; TaqMan®-Sonde: DCE-Taq1.

Um der Frage nachzugehen, ob die fehlende Ausbildung des Rhesus-D-Antigens bei den beiden auffälligen Blutspendern eventuell auf eine Deletion in einem anderen Genabschnitt zurückzuführen ist, wurden weitere molekulargenetische Tests anhand der DNA-Proben vorgenommen. Unter Verwendung der von Gassner *et al.* [1997] publizierten PCR-Primer ist jeweils eine mögliche PCR-Produktbildung im Exon 3, 4 und 5 überprüft worden. Mit Hilfe einer von Lo *et al.* [1998] publizierten RHD-TaqMan®-PCR (siehe später Abb. 5.24) wurde die RHD-spezifische Sequenz in der nicht-translatierten Region des Exon 10 untersucht und für die Untersuchung des Exons 6 im RHD-Gen wurde ein selbstentworfenen *Primer*-Paar im PCR-Versuch eingesetzt. Das Ergebnis der PCR-Versuche wurde jeweils mittels parallel überprüfter Positiv- und Negativkontrolle abgesichert. Hierfür wurden DNA-Proben eingesetzt, die in früheren PCR-Tests bezüglich Exon 7 RHD-positiv oder –negativ waren. Bei den beiden Testpersonen konnte jedoch keine Deletion in den überprüften Sequenzabschnitten des RHD-Gens nachgewiesen werden. Bei 98,22 % der untersuchten Personen stimmte das molekulargenetische Testergebnis mit dem der serologischen Untersuchung des RHD-Genotyps überein, deshalb konnte das Risiko einer falsch RHD-positiven Diagnose mit der RHD-TaqMan®-PCR als gering eingestuft werden.

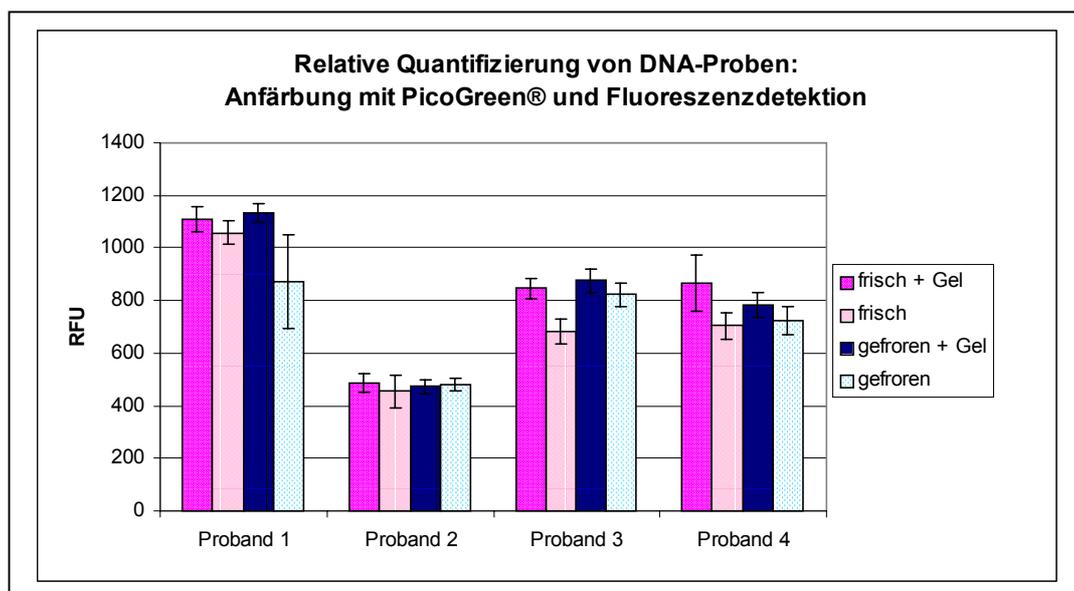
### 5.3 Gewinnung von Blutplasma-DNA

Der in der vorliegenden Arbeit zu entwickelnde Echtzeit-PCR-Test zur RHD-Genotypisierung des ungeborenen Kindes sollte auf Blutplasma-DNA von schwangeren Frauen angewendet werden. Um eine sichere Diagnose gewährleisten zu können, mußte eine homogene routinefähige Sammel- und Aufbewahrungsmethode für das biologische Material entwickelt werden. An die DNA-Extraktionsmethode waren außerdem hohe Ansprüche im Hinblick auf Ausbeute und Reinheitsgrad gestellt.

### 5.3.1 Sammlung von Blutplasmaproben

Die Blutentnahme und Probensammlung wurde im Evangelischen Krankenhaus Oberhausen durchgeführt. Hierfür wurde für das technische Personal ein Informationszettel zur Probenaufarbeitung gestaltet (siehe Abb. 4.1). Die Blutproben wurden in speziellen EDTA-Monovetten gesammelt, in denen sich durch Zentrifugation eine Geldiffusionsschicht ausbildet, die Plasma und Zellfraktion voneinander trennt. Die quantitative Überführung des Plasmas in einen anderen Probenbehälter war somit durch einfaches Umschütten möglich. Ohne Geldiffusionsschicht hätte das Plasma in mehreren Schritten pipettiert werden müssen. Dadurch hätte die Gefahr von Zellverschleppung oder Probenverlust bestanden.

Um etwaige DNA-Verluste bei der Verwendung der Monovetten zu vermeiden, wurden die Geldiffusionsmonovetten mit herkömmlichen EDTA-Monovetten verglichen. Hierfür wurden Blutproben männlicher Spender in beide Monovettensorten gesammelt und dem erstellten Protokoll (Abb. 4.1) folgend aufgearbeitet. Anhand der erhaltenen frischen Blutplasmaproben wurden DNA-Präparationen jeweils als Doppelbestimmung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 4.3.2.2) vorgenommen. Eine zweite Phenol-Chloroform-Extraktion wurde ebenfalls als Doppelbestimmung durchgeführt, nachdem die Plasmaproben über Nacht bei  $-20\text{ °C}$  gelagert waren. Der quantitative Vergleich der präparierten DNA-Proben erfolgte über die Anfärbung mit PicoGreen® (siehe 4.4.2) und Messung der relativen Fluoreszenz (Abb. 5.10).



**Abbildung 5.10: Quantitativer Vergleich von DNA-Proben, die aus mit verschiedenen Monovetten gewonnenem Blutplasma präpariert worden sind.** Von vier Probanden wurden Blutproben mit zwei unterschiedlichen EDTA-Monovettensorten, mit (+Gel) und ohne Geldiffusionsschicht, entnommen. Die DNA-Präparation wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (4.3.2.2) einmal am Tag der Blutentnahme (frisch) und ein zweites Mal nach Aufbewahrung bei  $-20\text{ °C}$  (gefroren) durchgeführt. Die aufgeführten relativen Fluoreszenzen (4.4.2) entsprechen jeweils den Mittelwerten aus einer Doppelbestimmung.

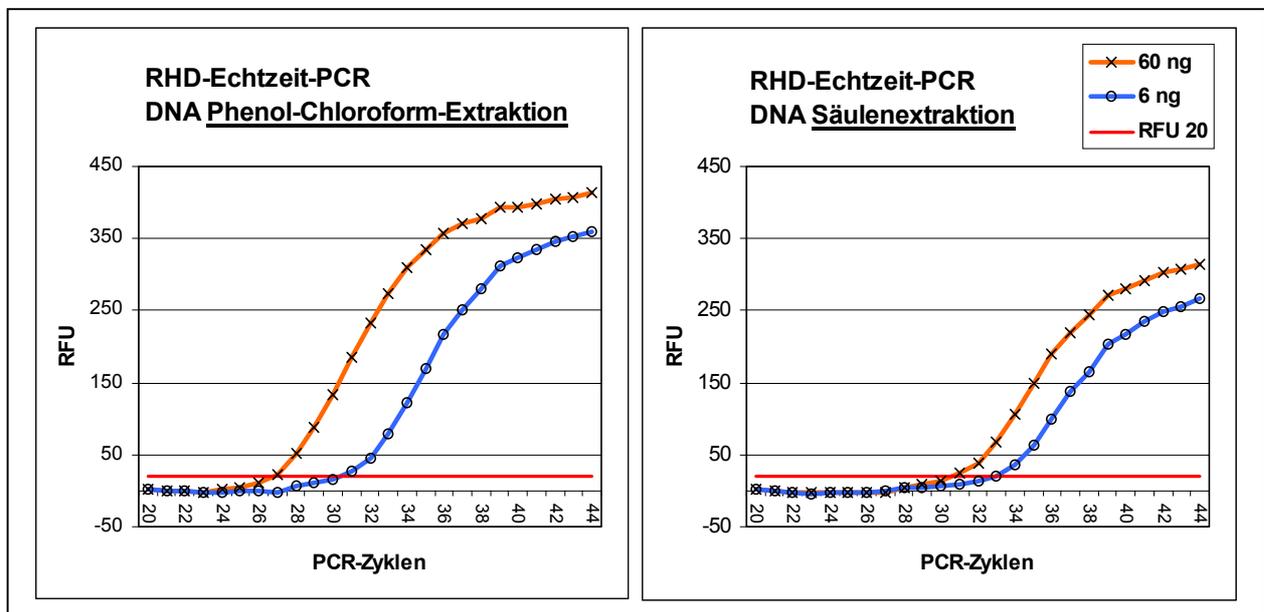
Vergleicht man in Abbildung 5.10 die Konzentrationen der vier unterschiedlichen DNA-Präparate, die jeweils anhand von Blutplasma eines Probanden präpariert worden waren, deutet nichts auf einen DNA-Ausbeuteverlust durch Verwendung der Geldiffusionsmonovetten hin. Die DNA-Konzentration ist sogar etwas erhöht bei diesen Präparaten, gegenüber den DNA-Präparaten, die anhand von Blutplasma aus herkömmlichen EDTA-Monovetten erstellt worden waren. Auch die kurzfristige Aufbewahrung des Probenmaterials bei  $-20\text{ °C}$  scheint die DNA-Ausbeute nicht weiter zu beeinflussen. Vergleicht man die Daten zu den Probanden 1 und 2 in Abb. 5.10 miteinander, sind aber deutliche individuelle Schwankungen der Blutplasma-DNA-Konzentration zu erkennen.

### 5.3.2 Optimierung der DNA-Präparationsmethoden

Eine Voraussetzung für die Entwicklung einer zuverlässigen nicht-invasiven Pränataldiagnostik anhand der Untersuchung mütterlichen Blutplasmas ist eine effiziente DNA-Präparation. Für den geplanten fötalen RHD-Genotypisierungstest musste gewährleistet werden, dass im DNA-Präparat für die PCR eine ausreichende Menge fötalspezifischer Sequenzen vorhanden ist. Es wurde die Silikagelmembran-Säulenextraktion (siehe 4.3.1) getestet, die die spezifische Bindung von DNA an Silikaoberflächen nutzt. Ebenso wurde die klassische Methode der Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 4.3.2.2) angewendet, die bei gewissenhafter Durchführung eine anschließende quantitative Fällung der DNA mit Ethanol ermöglichen kann. Bei der Optimierung der beiden DNA-Präparationsmethoden stand zunächst eine Steigerung der DNA-Ausbeute im Vordergrund (siehe 4.3.1.5 und 4.3.2.3). Die Qualitäten der erhaltenen DNA-Proben wurden anhand ihrer Amplifikationskurven, die in Echtzeit-PCR-Versuchen erhalten wurden, beurteilt (siehe auch 5.3.3). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei der Säulenextraktion ein größeres Säulenvolumen, bzw. eine damit verbundene größere Menge Silikagelmaterial, nicht zu einem besseren Ergebnis geführt hat. Auch durch die Zugabe von *Carrier*-Oligonukleotiden, die Variation der Menge an Proteinase K oder die Variation der Inkubationszeit mit diesem Enzym führten zu keiner deutlichen Verbesserungen der DNA-Präparation. Schließlich wurde ausschließlich der DNeasy<sup>TM</sup> Tissue-Kit (Abschnitt 4.3.1.2) verwendet, wobei möglichst ein Blutplasmavolumen von 800  $\mu\text{l}$  eingesetzt wurde. Für die Phenol-Chloroform-Extraktion kann zusammenfassend gesagt werden, dass die DNA-Ausbeute durch Präzipitation aus 645  $\mu\text{l}$  Probelösung, sowie durch Zugabe von Glykogen vor der Fällung (20 mg/ml) gesteigert werden konnte (siehe 4.3.2.2). Eine Aufreinigung der DNA-Lösung mittels Tropfdialyse oder Aufkonzentrierung mittels Zentrifugalfiltern führten zu keinen Verbesserungen von PCR-Versuchen, die mit diesen DNA-Präparaten im Vergleich zu unbehandelten DNA-Proben durchgeführt wurden.

### 5.3.3 Säulenextraktion und Phenol-Chloroform-Extraktion im Vergleich

Um einen Vergleich der Silikagelmembran-Säulenextraktion (siehe 4.3.1.1) und der Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 4.3.2.2) vorzunehmen, wurde eine definierte Menge RHD-positive DNA mit Blutplasma einer RHD-negativen Testperson gemischt und anhand diesen Materials DNA-Präparationen nach beiden Methoden durchgeführt. Durch Auswertung der Amplifikationskurven, die im Echtzeit-RHD-PCR-Versuch die Bildung von RHD-spezifischen PCR-Produkten dokumentieren, wurde ein Vergleich der erhaltenen DNA-Proben verschiedener Qualitäten vorgenommen (Abb. 5.11).



RHD-pos DNA [ng / PCR]	Präparations- methode	Ø Ct <sub>RHD</sub>
60	Säulenextraktion	30,2
	Phenol-Chloroform	26,3
6	Säulenextraktion	32,5
	Phenol-Chloroform	29,9

**Abbildung 5.11: Vergleich von DNA-Proben der Silikagelmembran-Säulenextraktion und der Phenol-Chloroform-Methode anhand ihrer Amplifikationskurven der RHD-Echtzeit-PCR**

Primer-Kombinationen: MS-Dex7 mit RH-com; TaqMan®-Sonde: DCE-Taq1.

Die angefügte Tabelle gibt die erhaltenen Ø Ct-Werte (maximale Standardabweichung ± 0,1) aus einer Doppelbestimmung an (Basislinie: PCR-Zyklen 12 bis 30; Schwellenwert: RFU 20).

Als Ausgangsmaterial der DNA-Präparationen dienten zwei Mischungen von RHD-heterozygoter DNA in Blutplasma einer RhD-negativen Testperson (60 ng oder 6 ng DNA / 55 µl Plasma). In beiden DNA-Präparationsmethoden wurde der DNA-Gehalt von 550 µl Plasma in 50 µl Puffervolumen aufgenommen. Im PCR-Versuch sind 1:10 v/v DNA-Probe eingesetzt worden.

Die DNA-Proben der Phenol-Chloroform-Extraktion zeigten in der Echtzeit-PCR einen früheren Fluoreszenzanstieg, als die DNA-Proben der Silikagelmembran-Extraktion (siehe  $\emptyset$  Ct<sub>RHD</sub>-Werte in Abb. 5.11). Außerdem wurde ein steilerer Anstieg der Amplifikationskurven, sowie höhere maximale Fluoreszenzintensitäten im Echtzeit-PCR-Versuch mit den DNA-Proben der Phenol-Chloroform-Extraktion erreicht, verglichen mit denen der DNA-Proben der Säulenextraktion. Aus diesen Beobachtungen wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass mit der Phenol-Chloroform-Extraktion eine höhere DNA-Ausbeute erzielt werden konnte. Anzumerken ist, dass die RHD-positive DNA, die mit dem RhD-negativen Blutplasma vermischt worden war, um die DNA-Präparationen zu vergleichen, mittels Säulenextraktion anhand einer Vollblutprobe präpariert worden war. Im Vergleich zu der im Blutplasma frei zirkulierenden DNA, war diese DNA zellulären Ursprungs von guter Qualität. Außerdem wurde eine relativ große Menge DNA im PCR-Versuch eingesetzt (bei einer theoretisch 100 %igen DNA-Ausbeute der Präparationsmethode 6 ng bzw. 60 ng pro PCR).

#### **5.3.4 Quantitativer Vergleich verschiedener DNA-Qualitäten**

Anhand des Probenmaterials von sechs Schwangeren (siehe 2.1.3) wurden beide Präparationsmethoden durchgeführt und ein quantitativer Vergleich der erhaltenen DNA-Proben mittels Anfärbung mit PicoGreen® und anschließender Fluoreszenzmessung durchgeführt (siehe 4.4.2). Auf der nachfolgenden Seite werden in Tab. 5.5 die erhaltenen Ergebnisse der DNA-Quantifizierung im Detail aufgeführt.

Die PicoGreen®-Fluoreszenzintensitäten, die bei den DNA-Proben der Säulenextraktion gemessen werden konnten, unterschieden sich nur geringfügig von den Fluoreszenzintensitäten, die bei den Blindproben ohne DNA zu beobachten waren. Deshalb wurde in diesen Fällen auf eine Berechnung der DNA-Konzentration verzichtet.

Probandin	Präparationsmethode	Probenmaterial	Ø RFU	RFU STDEV	berechnete Konz. [ng DNA / ml Probenmaterial]
1	Säulenextraktion	Amnion	26	1	--
		Plasma	32	2	--
	Phenol-Chloroform-Extraktion	Amnion	54	3	<b>7,000 ± 0,389</b>
		Plasma	1001	19	<b>319,050 ± 6,056</b>
2	Säulenextraktion	Amnion	26	1	--
		Plasma	27	1	--
	Phenol-Chloroform-Extraktion	Amnion	53	2	<b>6,675 ± 0,252</b>
		Plasma	1129	40	<b>361,075 ± 12,793</b>
3	Säulenextraktion	Amnion	49	28	--
		Plasma	30	4	--
	Phenol-Chloroform-Extraktion	Amnion	48	3	<b>5,425 ± 0,339</b>
		Plasma	981	49	<b>312,350 ± 15,602</b>
4	Säulenextraktion	Plasma	32	2	--
	Phenol-Chloroform-Extraktion	Amnion	57	3	<b>8,050 ± 0,424</b>
		Plasma	854	14	<b>270,375 ± 4,432</b>
5	Säulenextraktion	Amnion	27	2	--
		Plasma	25	1	--
	Phenol-Chloroform-Extraktion	Amnion	66	2	<b>11,225 ± 0,340</b>
		Plasma	1040	28	<b>331,850 ± 8,934</b>
6	Säulenextraktion	Amnion	26	2	--
	Phenol-Chloroform-Extraktion	Amnion	47	4	<b>4,750 ± 0,287</b>
		Plasma	910	55	<b>288,825 ± 12,034</b>
Blindproben			24	1	--

**Tabelle 5.3: Quantitativer Vergleich von DNA-Proben aus Amnionflüssigkeitsüberstand oder Blutplasma von sechs Probandinnen, die entweder mittels Silikagelmembran-Säulenextraktion oder mittels Phenol-Chloroform-Extraktion präpariert worden sind.** Es sind jeweils 400 µl Probenmaterial prozessiert und die erhaltene DNA in 50 µl Puffer aufgenommen worden. Die Quantifizierung erfolgte nach der Picogreen®-Methode, wobei die Standardkurve mit einer DNA-Verdünnungsreihe folgender Konzentrationen erstellt wurde: 12, 60, 120, 600, 1200, 6000, 12000 pg/µl. Der Korrelationskoeffizient betrug hierbei  $R^2 = 0,9999$ . Probenkonzentrationen, die unter der Detektionsgrenze lagen sind mit -- gekennzeichnet.

Für die DNA-Proben, die mittels Phenol-Chloroform-Extraktion präpariert worden waren, konnten die folgenden Konzentrationen gemittelt werden:

7,188 ± 2,297 ng DNA/ml Amnionflüssigkeitsüberstand und  
313,921 ± 31,937 ng DNA/ml Blutplasma.

Im Vergleich zur Säulenextraktionsmethode, konnte mit der Phenol-Chloroform-Extraktion also eine wesentlich höhere DNA-Ausbeute erzielt werden. Bei der Optimierung der Phenol-Chloroform-Extraktion wurden verschiedene Variationen der Methode auf homogenes Probenmaterial angewendet und verglichen (siehe 4.3.2.3 und 5.3.2). Es konnte hierbei eine leichte Verbesserung der DNA-Ausbeute durch eine Erhöhung des zur Fällung eingesetzten Probevolumens, sowie durch den Einsatz von Glykogen erzielt werden. Deshalb wurde eine zweite DNA-Quantifizierung mittels PicoGreen®-Anfärbung und Messung der Fluoreszenzintensität mit dem Probenmaterial von 9 schwangeren Frauen vorgenommen. Mit den DNA-Präparationen, die nach der optimierten Phenol-Chloroform-Extraktion präpariert wurden, konnten folgende Konzentrationen gemittelt werden:

$39,178 \pm 30,624$  ng DNA/ml Amnionflüssigkeitsüberstand;

$270,860 \pm 50,646$  ng DNA/ml Blutplasma.

Die Konzentrationen der DNA-Präparate aus Amnionflüssigkeitsüberstand zeigten einen deutlich höheren Wert im Vergleich zu denen, der ersten Untersuchungsreihe. Die für Blutplasma gemittelte DNA-Konzentration der zweiten Untersuchungsreihe lag, trotz optimierter DNA-Präparation, unter der Konzentration, die in der ersten Untersuchungsreihe ermittelt werden konnte.

Die hier gezeigten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die individuellen Schwankungen der DNA-Konzentration im mütterlichen Blutplasma relativ groß sind. Aufgrund der Variationsbreite der Plasma-DNA-Konzentration, war die Verbesserung der Phenol-Chloroform-Extraktion im Vergleich der beiden unabhängigen Versuchsreihen nicht zu erkennen.

#### **5.4 Detektion fötaler DNA-Sequenzen im mütterlichen Blutplasma**

Auf der Grundlage der molekulargenetischen Untersuchung der DNA im mütterlichen Blutplasma sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Test zur Rhesus D-Genotypisierung des ungeborenen Kindes entwickelt werden. Bisher beruht die routinefähige Pränataldiagnostik zur Erkennung von Einzelgendefekten beim Kind auf der Durchführung von invasiven Untersuchungsmethoden. Die Realisierung des geplanten RHD-Genotypisierungstests könnte dieser mit gesundheitlichen Risiken für Mutter und Kind behafteten Diagnostik eine Alternative gegenüber stellen. Im Rahmen der routinemäßigen Geburtsvorsorgeuntersuchungen müsste lediglich eine Blutabnahme bei der werdenden Mutter durchgeführt werden.

### 5.4.1 Fallbeispiele zur fötalen RHD-Genotypisierung

Die Etablierung des RHD/RHCE-PCR-Tests erfolgte zunächst mit DNA-Proben, die aus Vollblut mit bekanntem Serotyp (siehe 4.1.1 und 4.1.2) präpariert worden waren. Im nächsten Schritt sollte der Echtzeit-PCR-Test am tatsächlichen Untersuchungsmaterial, Blutplasma-DNA von Schwangeren, getestet werden.

Während eine DNA-Probe, die aus mütterlichem Plasma gewonnen wird, einen hohen Anteil mütterlicher DNA enthält, beinhaltet eine DNA-Probe, die aus Amnionflüssigkeit gewonnen werden kann, hauptsächlich fötale DNA. Verunreinigungen durch mütterliche Einblutung während der Amnionzentese (siehe 2.2.1) sind durch eine rötliche Verfärbung der normalerweise klaren Amnionflüssigkeit leicht zu erkennen.

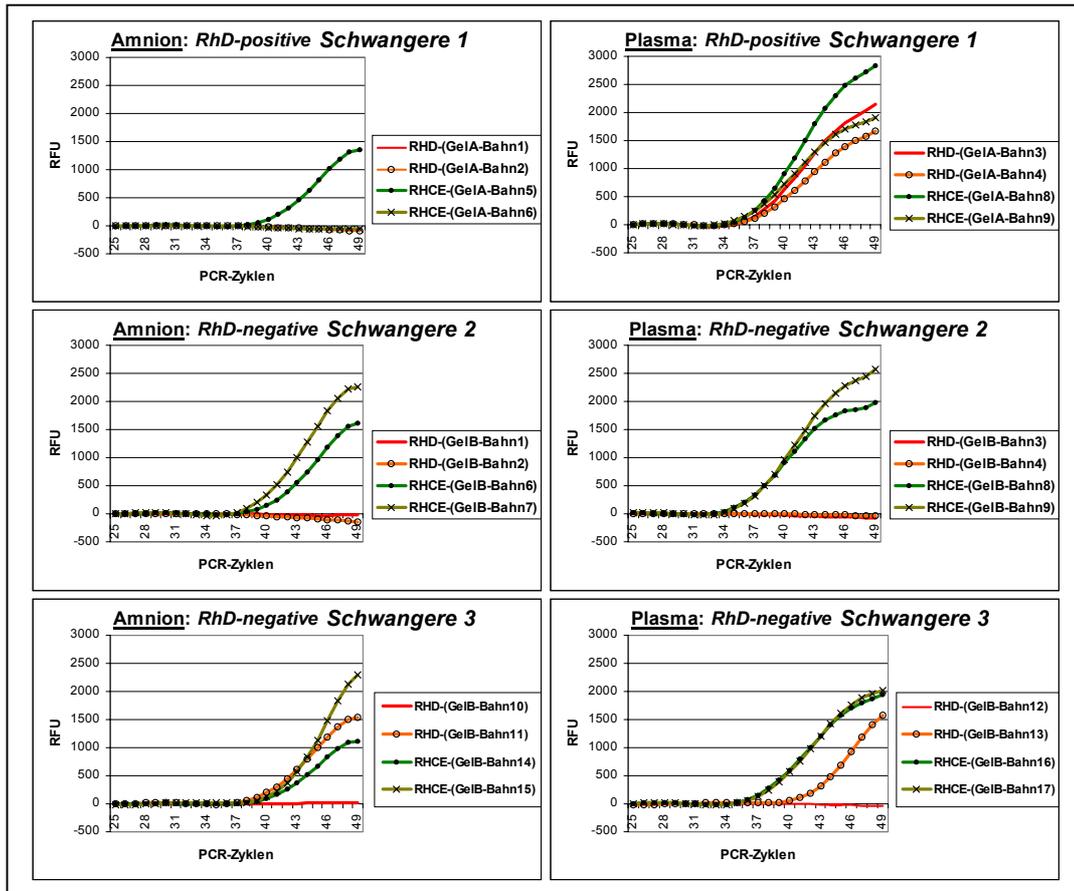
In Abbildung 5.12 werden drei Fallbeispiele aufgeführt, bei denen eine RHD-Genotypisierung anhand der molekulargenetischen Untersuchung von Blutplasma- und Amnionflüssigkeits-DNA (siehe 4.1.3 bzw. 4.1.4) vorgenommen wurde. Für die RHD/RHCE-spezifischen Echtzeit-PCR-Versuche wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die parallele Detektion von RHCE-spezifischen Signalen sollte anzeigen, dass amplifizierbare DNA aus Amnionflüssigkeitsüberstand oder mütterlichen Blutplasmas präpariert wurde. Die Detektion von RHD-spezifischen Signalen im Blutplasma einer RhD-negativen Schwangeren würde auf einen fötalspezifischen RHD-positiven Genotyp hinweisen. Als positive Kontrolle des fötalen Genotyps diente die DNA aus Amnionflüssigkeit.

Die in Abbildung 5.12 exemplarisch aufgeführten Fallbeispiele entsprechen somit folgenden Konstellationen:

- Schwangere 1: RhD-positive Mutter mit RHD-negativem Kind;
- Schwangere 2: RhD-negative Mutter mit RHD-negativem Kind;
- Schwangere 3: RhD-negative Mutter mit RHD-positivem Kind.

**Amplifikationskurven der RHD/RHCE-Echtzeit-PCR mit einer TaqMan®-Sonde**



**Elektrophoretische Auftrennung von RHD/RHCE-Amplifikaten**  
 4%iges Nusieve-Agarose-Gel nach Ethidiumbromidfärbung (Negativdarstellung)

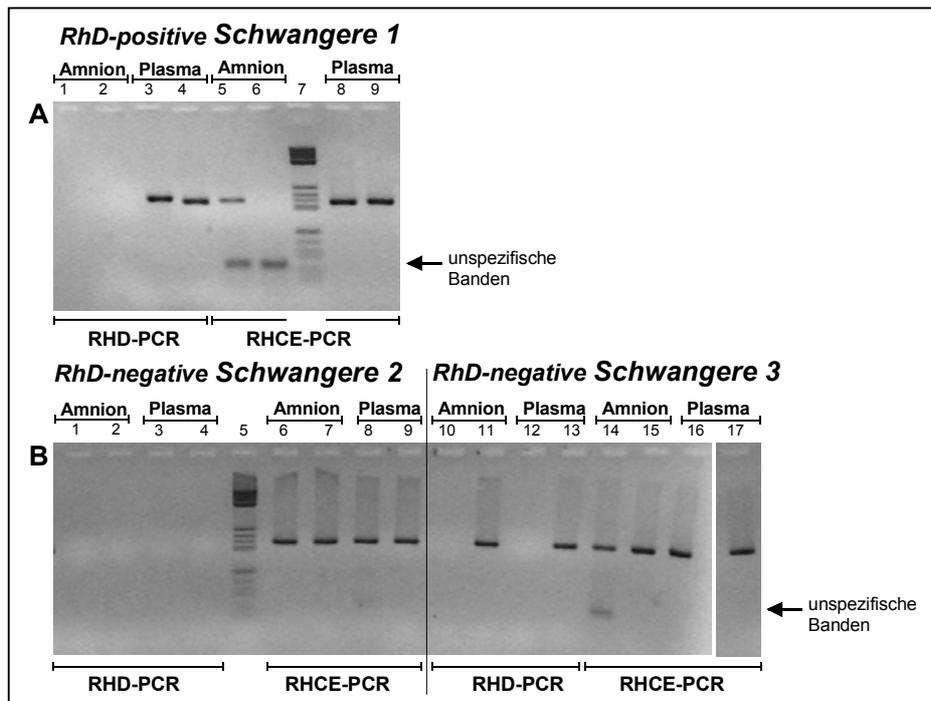


Abbildung 5.12: Echtzeit RHD/RHCE-PCR mit DNA aus Blutplasma (Plasma) und Amnionflüssigkeitsüberstand (Amnion) von 3 schwangeren Testpersonen (DNA-Präparation mit Säulenextraktion siehe 4.3.1.2). Primer: MS-Dex7b oder MS-CEex7b, jeweils mit RH-comy; TaqMan®-Sonde: DCE-Taq1; RHD-PCR-Produktlänge: 200 Bp; RHCE-PCR-Produktlänge: 204 Bp.

Im Fall der RhD-positiven Schwangeren 1 lag keine Rhesus-Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind vor. Die Untersuchung ihres Blutplasmas soll hier aber exemplarisch als Positivkontrolle für die Detektion eines RHD-spezifischen Echtzeit-PCR-Signals gezeigt werden. Der signifikante Fluoreszenzanstieg, der mit Hilfe der Amplifikationskurven dokumentiert wird, ist im Fall der RHD-spezifischen PCR um ca. einen PCR-Zyklus im Vergleich zur RHCE-spezifischen PCR verzögert ( $\emptyset$   $C_{t_{RHD}}$ : 36,2;  $\emptyset$   $C_{t_{RHCE}}$ : 35,2; Schwellenwert-PCR-Zyklus: RFU 100). Die Anzahl der Genkopien von RHD und RHCE in der DNA-Probe war also ähnlich groß. Die Detektion von RHCE- und RHD-spezifischen Signalen ist demnach auf die Amplifikation der mütterlichen DNA zurückzuführen. Die molekulargenetische Untersuchung der Amnionflüssigkeit der Schwangeren 1 weist auf den RHD-negativen Genotyp des Fötus hin, da nur ein RHCE-, nicht aber ein RHD-spezifisches Signal im Echtzeit-PCR-Versuch generiert werden konnte. Das DNA-Präparat aus Amnionflüssigkeit enthielt nur wenige amplifizierbare DNA-Sequenzen, was daran zu erkennen ist, dass nur in einem von zwei PCR-Versuchen eine schwache RHCE-spezifische Amplifikation geglückt war.

Die fötale RHD-Genotypisierung anhand der Untersuchung der mütterlichen Plasma-DNA von der Schwangeren 2 fiel eindeutig RHD-negativ aus. In der RHCE-spezifischen PCR konnten in beiden Fällen der Doppelbestimmung RHCE-Amplifikate nachgewiesen werden. In der RHD-spezifischen PCR konnte jedoch kein RHD-Amplifikat nachgewiesen werden. Das RHD-negative Genotypisierungsergebnis wurde anhand der analog durchgeführten Untersuchung von Amnionflüssigkeits-DNA bestätigt. Bei der Schwangeren 2 hätte damit keine Notwendigkeit für eine Anti-D-Prophylaxe (siehe 2.1.4) bestanden.

Bei der Schwangeren 3 konnte der RHD-positive Genotyp durch die molekulargenetische Untersuchung des mütterlichen Blutplasmas mittels RHD-spezifischer Echtzeit-PCR nachgewiesen werden. Auch in diesem Fall wurde das Ergebnis der nicht-invasiven fötalen RHD-Genotypisierung anhand der Untersuchung der Amnionflüssigkeits-DNA bestätigt. Mit beiden DNA-Qualitäten konnte bei der Doppelbestimmung jeweils in einer PCR ein RHD- und damit fötalspezifisches Signal detektiert werden. Bei der molekulargenetischen Untersuchung der mütterlichen Plasma-DNA war der signifikante Fluoreszenzanstieg in der RHD-spezifischen PCR im Vergleich zur RHCE-spezifischen PCR um ca. vier PCR-Zyklen ( $\Delta C_t$ : 4,4) verzögert zu beobachten ( $C_{t_{RHD}}$ : 40,4;  $\emptyset$   $C_{t_{RHCE}}$ : 36,0; Schwellenwert-PCR-Zyklus: RFU 100). In diesem Fall wurde das fötalspezifische RHD-Signal vor dem Hintergrund der mütterlichen DNA generiert. Bei der Schwangeren 3 lag eine Rhesus-Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind und damit eine Risikoschwangerschaft für HDN vor. In diesem Fall hätte eine Rhesus-D-Prophylaxe bei der Schwangeren durchgeführt werden müssen.

### 5.4.2 Reihenuntersuchung zur fötalen RHD-Genotypisierung anhand der Untersuchung mütterlicher Blutplasma-DNA

Im Einzelfall war es gelungen, den RHD-positiven Genotyp des ungeborenen Kindes anhand der Untersuchung von Blutplasma-DNA der RhD-negativen Frau mittels RHD-Echtzeit-PCR zu bestimmen (siehe 5.4.1). Um die Routinefähigkeit des RHD-Genotypisierungstests für die nicht-invasive Pränataldiagnostik zu beurteilen, musste er auf eine größere Gruppe von Schwangeren angewendet werden. Zu diesem Zweck wurden von zehn RhD-negativen schwangeren Probandinnen DNA-Präparationen anhand ihres Blutplasmas und Amnionflüssigkeitsüberstandes mittels Silikagelmembran-Säulenextraktion vorgenommen (siehe 4.3.1.2). Hierbei wurden jeweils 400 µl Probenmaterial prozessiert und 50 µl AE-Puffer für den finalen DNA-Elutionsschritt eingesetzt.

Die DNA-Proben wurden jeweils mindestens in zwei RHCE- und in insgesamt vier RHD-spezifischen Echtzeit-PCR-Versuchen eingesetzt, um amplifizierbare DNA bzw. fötalspezifische RHD-Sequenzen nachzuweisen. Anhand von Positiv- und Negativkontrollen, die bei jeder PCR parallel untersucht wurden, konnte die Spezifität des Testes überprüft und Kontaminationen ausgeschlossen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind im Detail in Tabelle 5.4 aufgeführt.

Probandin	PCR	Ct-Werte (PCR-Lauf)							
		Amnionflüssigkeitsüberstand				Blutplasma			
7	RHCE	Ø 39,8 ± 0,1(a)		Ø 40,3 ± 0,4 (b)		Ø 36,1 ± 0,3 (a)		Ø 38,4 ± 0,1 (b)	
	RHD	-- (a)	-- (a)	-- (b)	-- (b)	-- (a)	-- (a)	-- (b)	-- (b)
8	RHCE	Ø 38,8 ± 1,2(a)		Ø 40,7 ± 0,9 (b)		Ø 34,7 ± 0,4(a)		Ø 36,8 ± 0,1 (b)	
	RHD	-- (a)	<b>40,0 (a)</b>	-- (b)	-- (b)	-- (a)	-- (a)	-- (b)	-- (b)
9	RHCE	39,3 (c)		42,5 (c)		35,5 (c)		35,0 (c)	
	RHD	-- (c)	-- (c)	-- (d)	-- (e)	-- (c)	-- (c)	-- (d)	-- (e)
10	RHCE	43,4 (c)		44,9 (c)		37,3 (c)		36,1 (c)	
	RHD	-- (c)	-- (c)	-- (d)	-- (e)	-- (c)	-- (c)	-- (d)	-- (e)
11	RHCE	38,4 (c)		38,9 (c)		36,4 (c)		35,1 (c)	
	RHD	<b>39,0 (c)</b>	<b>40,1 (c)</b>	<b>41,9 (d)</b>	<b>42,3 (e)</b>	<b>40,3 (c)</b>	-- (c)	<b>36,2 (d)</b>	<b>39,6 (e)</b>
12	RHCE	38,8 (c)		40,1 (c)		36,3 (c)		36,5 (c)	
	RHD	<b>41,8 (c)</b>	<b>43,5 (c)</b>	<b>37,5 (d)</b>	-- (e)	-- (c)	<b>41,8 (c)</b>	<b>37,8 (d)</b>	<b>40,2 (e)</b>
13	RHCE	38,3 (c)		38,7 (c)		36,2 (c)		34,9 (c)	
	RHD	<b>43,3 (c)</b>	<b>40,8 (c)</b>	-- (d)	-- (e)	-- (c)	<b>42,5 (c)</b>	<b>36,0 (d)</b>	<b>40,9 (e)</b>

<b>14</b>	RHCE	40,1 (c)		44,1 (c)		36,3 (c)		36,8 (c)	
	RHD	<b>44,3</b> (c)	-- (c)	-- (d)	<b>40,4</b> (e)	<b>40,2</b> (c)	-- (c)	<b>37,5</b> (d)	<b>45,0</b> (e)
<b>15</b>	RHCE	37,5 (c)		38,6 (c)		34,8 (c)		35,2 (c)	
	RHD	<b>38,3</b> (c)	<b>40,8</b> (c)	<b>40,3</b> (d)	-- (e)	-- (c)	<b>42,9</b> (c)	<b>35,7</b> (d)	<b>40,0</b> (e)
<b>16</b>	RHCE	38,5 (c)		37,4 (c)		34,9 (c)		35,7 (c)	
	RHD	-- (c)	-- (c)	-- (d)	-- (e)	-- (c)	-- (c)	-- (d)	-- (e)

**Tabelle 5.4: Ct-Werte, die in RHD- und RHCE-spezifischen Echtzeit-PCR Versuchen mit DNA aus Amnionflüssigkeit und Blutplasma von zehn RhD-negativen schwangeren Frauen ermittelt wurden.**

RHD- und RHCE-spezifischer *Primer*: MS-Dex7b bzw. MS-CEex7b; TaqMan®-Sonde: DCE-Taq1. Es werden die Ct-Werte aus insgesamt fünf unabhängigen PCR-Läufen (a bis e) präsentiert.

Für Probandin 1 und 2 sind jeweils  $\bar{C}t_{RHCE}$ -Werte aus einer Doppelbestimmung ( $\pm$  STDEV) angegeben.

a: Gegen-*Primer* RH-comz; Basislinie Zyklen 12 bis 32; Schwellenwert RFU 236,6;  $\bar{C}t_{RHCE} = 1809 \pm 825$ ;

b: Gegen-*Primer* RH-comy; Basislinie Zyklen 12 bis 32; Schwellenwert RFU 389,5;  $\bar{C}t_{RHCE} = 2124 \pm 318$ ;

c: Gegen-*Primer* RH-comx; Basislinie Zyklen 12 bis 30; Schwellenwert RFU 71,3;  $\bar{C}t_{RHCE} = 414 \pm 115$ ;

d: Gegen-*Primer* RH-com; Basislinie Zyklen 12 bis 32; Schwellenwert RFU 93,2;  $\bar{C}t_{RHCE} = 546 \pm 377$ ;

e: Gegen-*Primer* RH-comz; Basislinie Zyklen 12 bis 32; Schwellenwert RFU 211,0;  $\bar{C}t_{RHCE} = 720 \pm 233$ .

Zwischen den PCR-Läufen b und c ist ein Austausch des optischen Moduls am iCycler™ iQ Detektionssystem vorgenommen worden. Versuche, bei denen kein PCR-Produkt generiert werden konnte sind mit -- gekennzeichnet.

Die DNA-Präparationen anhand von Amnionflüssigkeitsüberstand ergaben im RHCE-PCR-Versuch einen höheren Ct-Wert, als die von Blutplasma:

$$\bar{C}t_{RHCE-Amnion} = 40,0 \pm 2,2 \text{ (Variationsbreite: 37,4 bis 44,9);}$$

$$\bar{C}t_{RHCE-Plasma} = 36,0 \pm 1,0 \text{ (Variationsbreite: 34,7 bis 38,4).}$$

Die im RHD-PCR-Versuch erhaltenen Ct-Werte anhand der Amnionflüssigkeits-DNA unterschieden sich nur gering von den zugehörigen Ct-Werten der RHCE-PCR:

$$\bar{C}t_{RHD-Amnion} = 41,0 \pm 1,9 \text{ (Variationsbreite: 37,5 bis 44,3).}$$

Die DNA-Proben aus Blutplasma ergaben im RHD-PCR-Versuch höhere Ct-Werte, als im parallel durchgeführten RHCE-PCR-Versuch:

$$\bar{C}t_{RHD-Plasma} = 39,8 \pm 2,7 \text{ (Variationsbreite: 35,7 bis 45,0).}$$

Allgemein kann aufgrund der unterschiedlichen  $\bar{C}t_{RHCE}$  gesagt werden, dass die DNA-Proben aus Amnionflüssigkeitsüberstand geringer konzentriert sind, als die aus Blutplasma ( $\Delta Ct = 4,0$ ).

Der Unterschied zwischen  $\bar{C}t_{RHCE}$  und  $\bar{C}t_{RHD}$  ( $\Delta Ct = 3,8$ ) in PCR-Versuchen mit Blutplasma zeigt, dass der geringe Anteil RHD-positiver fötaler DNA vor dem Hintergrund der überrepräsentierten mütterlichen DNA detektiert wurde.

In der folgenden Tabelle 5.5 werden die Ergebnisse der Reihenuntersuchung von zehn RhD-negativen Schwangeren zur fötalen RHD-Genotypisierung mittels RHD/RHCE-Echtzeit-PCR zusammengefasst.

<b>Probandin</b>	<b>Fötale RHD-Genotypisierung</b>			
	<b>Amnionfl.</b>		<b>Blutplasma</b>	
	<b>positiv</b>	<b>negativ</b>	<b>positiv</b>	<b>negativ</b>
<b>7</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>4</b>
<b>8</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>4</b>
<b>9</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>4</b>
<b>10</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>4</b>
<b>11</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
<b>12</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
<b>13</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
<b>14</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
<b>15</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
<b>16</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>4</b>

**Tabelle 5.5: Zusammenfassung der in Tabelle 5.4 aufgeführten Ergebnisse im Hinblick auf die fötale RHD-Genotypisierung bei der Untersuchung von zehn schwangeren RhD-negativen Probandinnen.** Mit den DNA-Präparaten aus Amnionflüssigkeitsüberstand oder aus Blutplasma sind jeweils vier RHD-spezifische PCR-Versuche durchgeführt worden. Konnte ein signifikanter Fluoreszenzanstieg detektiert werden (Ct-Wert in Abhängigkeit der 10-fachen RFU Standardabweichung der festgelegten Basislinie, siehe 4.7.4), wurde das Untersuchungsergebnis als RHD-positive Genotypisierung gewertet, wurde kein signifikanter Fluoreszenzanstieg in der RHD-Echtzeit beobachtet, fiel die fötale Genotypisierung RHD-negativ aus.

Bei den Probandinnen 7, 9, 10 und 16 konnte der fötale Rhesus D-Genotyp eindeutig als RHD-negativ bestimmt werden. In keinem Fall konnte ein RHD-spezifisches PCR-Produkt mit der DNA-Proben aus Amnionflüssigkeit oder Blutplasma amplifiziert werden. Das Vorhandensein von amplifizierbarer DNA konnte hierbei für jede Probe im RHCE-PCR-Versuch nachgewiesen werden. Bei Probandin 8 konnte in vier PCR-Versuchen einmal mit der DNA aus Amnionflüssigkeit ein RHD-spezifisches Fluoreszenzsignal detektiert werden. Da die Negativkontrollen im PCR-Versuch nicht auf eine Kontamination hinwiesen, wurde der Rhesus D-Genotyp des Kindes als RHD-positiv gewertet. Das Genotypisierungsergebnis fiel bei der Untersuchung der mütterlichen Blutplasma-DNA in diesem Fall RHD-negativ aus. Die Diagnose für die ungeborenen Kinder der Probandinnen 11, 12, 13, 14 und 15 fiel bei der Untersuchung von Blutplasma-DNA RHD-positiv aus und wurde auch durch die Ergebnisse der Untersuchung von DNA aus Amnionflüssigkeit bestätigt.

Die statistische Auswertung der Diagnosen zur nicht-invasiven RHD-Genotypisierung (siehe Tab. 5.6), die aufgrund der RHD-Echtzeit-PCR mit mütterlicher Blutplasma-DNA gestellt wurden, ergibt eine geringe Test-Sensitivität von 63 %. Bei den RHD-negativen Föten wurde in keinem Fall eine falsch positive RHD-Genotypisierung vorgenommen, die Test-Spezifität beträgt somit 100 %.

<b>Diagnose</b> <i>RHD-PCR-Ergebnis</i>	<b>tatsächlicher fötaler RHD-Genotyp</b>		
	<b>RHD-positiv</b>	<b>RHD-negativ</b>	
<b>RHD-positiv</b>	richtige Diagnose 15	falsch positive Diagnose 0	<b>positiver Vorhersagewert</b> $15 / (15 + 0) = 1,00$ <b>100 %</b>
<b>RHD-negativ</b>	falsch negative Diagnose 9	richtige Diagnose 16	<b>negativer Vorhersagewert</b> $16 / (16 + 9) = 0,64$ <b>64 %</b>
	<b>Sensitivität</b> $15 / (15 + 9) = 0,63$ <b>63 %</b>	<b>Spezifität</b> $16 / (16 + 0) = 1$ <b>100 %</b>	

**Tabelle 5.6: Statistische Auswertung der Diagnosen zur nicht-invasiven fötalen RHD-Genotypisierung, die aufgrund der Ergebnisse von einzelnen RHD-PCR-Versuchen mit mütterlicher Blutplasma-DNA gestellt werden konnten.** Die Untersuchung der zehn RhD-negativen Frauen wurde jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt (Summe der Einzelversuche: 40 PCR).

Die Sensitivität gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der das ungeborene Kind aufgrund des RHD-PCR-Testergebnisses tatsächlich als RHD-positiv bestimmt werden kann. Die Spezifität bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, mit der ein nicht HDN-gefährdeter Fötus tatsächlich aufgrund eines einzelnen RHD-PCR-Testergebnisses als RHD-negativ erkannt wird. Die Vorhersagewerte geben an, mit welcher Wahrscheinlichkeit die jeweilige Diagnose richtig gestellt worden ist. Definitionen nach [Harms, 1998].

Der tatsächlich vorliegende fötale RHD-Genotyp wurde jeweils aus dem RHD-PCR-Ergebnis mit Amnionflüssigkeits-DNA abgeleitet.

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Reihenuntersuchung basieren auf PCR-Versuchen, die mit Blutplasma-DNA der Silikagelmembran-Säulenextraktion präpariert worden waren (siehe 4.3.1.2). Im Vergleich zur Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 4.3.2.1) ist die Säulenextraktion weniger zeitaufwendig und verzichtet auf die Verwendung von organischen Lösungsmitteln. Auch wenn vorherige Untersuchungen darauf hingewiesen haben, dass mit der Phenol-Chloroform-Extraktion eine im Vergleich zur Säulenextraktion höhere DNA-Ausbeute zu erzielen war (siehe 5.3.3 und 5.3.4), wurde zunächst von dieser Methode abgesehen, da sie für die Anwendung in der Routinediagnostik nicht in Frage kommt.

## 5.5 Beurteilung der Qualität von zellfreier DNA aus Blutplasma

### 5.5.1 Vergleich verschiedener Blutplasma-DNA-Qualitäten in der Echtzeit-PCR

#### 5.5.1.1 RHCE-Echtzeit-PCR zur Detektion von Blutplasma-DNA

Bei der Beurteilung des fötalen RHD-Genotypisierungstests fiel die Sensitivität zu niedrig aus (siehe Tab. 5.6). Durch die Wahl einer effizienten DNA-Präparationsmethode sollte die DNA-Ausbeute gesteigert und somit im PCR-Versuch eine größere Anzahl fötalspezifischer DNA-Sequenzen bereit gestellt werden. Vorherige Untersuchungen hatten gezeigt, dass die Phenol-Chloroform-Extraktion im Vergleich zur Silikagelmembran-Säulenextraktion eine höhere DNA-Ausbeute ermöglichen kann (siehe 5.3.3 und 5.3.4). Ein direkter Vergleich beider Methoden zur DNA-Präparation aus mütterlichem Plasma und anschließender RHD-Echtzeit-PCR zeigte aber, dass die Anwendung der Phenol-Chloroform-Extraktion im Vergleich zur Säulenextraktion, die Sensitivität des fötalen RHD-Genotypisierungstest nicht verbessern konnte (ohne Abb.).

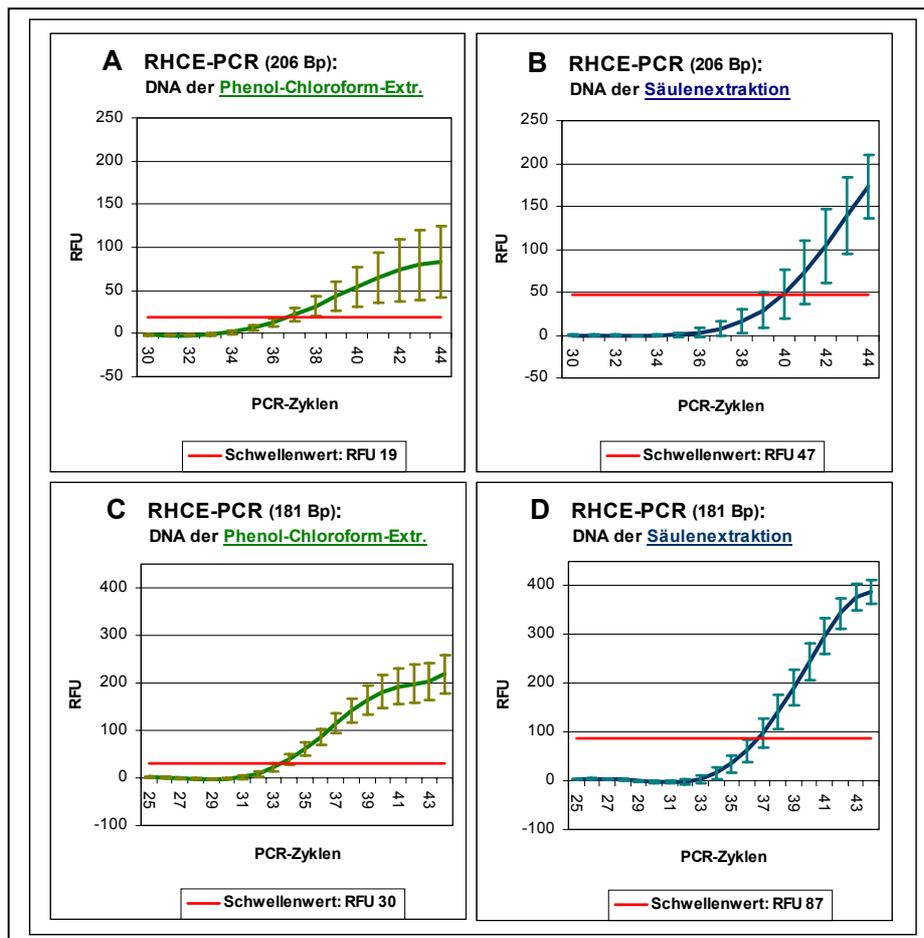
In Abb. 5.14 werden exemplarisch die Ergebnisse von RHCE-spezifischen Echtzeit-PCR-Versuchen präsentiert. In zwei unabhängigen Untersuchungsreihen wurde die Phenol-Chloroform-Extraktion mit der Silikagel-Säulenextraktion bei der Anwendung auf Blutplasma von schwangeren Frauen verglichen.

Die erste Untersuchungsreihe wurde mit dem Probenmaterial von insgesamt neun Probandinnen, die zweite mit dem Probenmaterial von fünf Probandinnen durchgeführt. Bei den durchgeführten RHCE-Echtzeit-PCR-Versuchen wurden in den beiden Untersuchungsreihen unterschiedlich große PCR-Produkte amplifiziert (206 Bp bzw. 181 Bp).

Allgemein konnte bei der Untersuchung der einzelnen Frauen beobachtet werden, dass mit Blutplasma-DNA der Phenol-Chloroform-Extraktion niedrigere Ct-Werte in der RHCE-Echtzeit-PCR erhalten wurden, als mit der DNA-Qualität der Säulenextraktion. Die gemittelte Differenz der Ct-Werte betrug in den beiden Untersuchungsreihen:

$$\Delta Ct_{\text{Säulenextraktion} - \text{Phenol-Chloroform-Extraktion}} = 3,2 \pm 2,3 \text{ bzw. } 3,2 \pm 1,4 \text{ PCR-Zyklen.}$$

Die Amplifikationskurven der DNA-Proben der Säulenextraktion fielen steiler aus und erreichten deutlich höhere maximale Fluoreszenzwerte in den letzten PCR-Zyklen (Graphen B und D), im Vergleich zu den Amplifikationskurven der DNA-Proben der Phenol-Chloroform-Extraktion (Graphen A und C). Die Amplifikationskurven, die dem kürzeren PCR-Produkt von 181 Bp zuzuordnen sind, fielen für die Gruppe von Probandinnen dieser Untersuchungsreihe homogener aus (Graphen C und D), und zeigten höhere maximale Fluoreszenzintensitäten, als die Amplifikationskurven der Untersuchungsreihe mit dem längeren PCR-Produkt von 206 Bp (Graphen C und D).



**Abbildung 5.13: Amplifikationskurven von RHCE-spezifischen Echtzeit-PCR-Versuchen mit Blutplasma-DNA (PCR-Produkte: 206 BP oder 181 BP).**

Primer: MS-CEex7 (A, B) oder MS-CEex7b (C, D), jeweils mit RH-com; TaqMan®-Sonde: DCE-Taq1. Es werden die Ergebnisse zweier unabhängiger Reihenuntersuchungen von Blutplasma-Proben schwangerer Frauen präsentiert (A, B: Probandinnen 17 bis 25; C, D: Probandinnen 26 bis 30). Die Untersuchung der DNA-Proben wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Die abgebildeten Amplifikationskurven wurden jeweils aus allen in der Untersuchungsreihe erhaltenen Amplifikationskurven gemittelt. Die abgebildeten Fehlerbalken veranschaulichen die Variationsbreite der in einem PCR-Zyklus gemessenen Fluoreszenzintensitäten und sind von deren Arithmetischen Mittel abgeleitet. Es sollte ein Vergleich zwischen der Amplifikation von Blutplasma-DNA der Phenol-Chloroform-Extraktion (A, C) mit der, der Silikagel-Säulenextraktion (B, D) gezogen werden. Es wurden 645 µl beziehungsweise 400 µl Blutplasma für die DNA-Präparationen prozessiert und jeweils in 50 µl Puffer aufgenommen, hiervon wurden 1:5 v/v im PCR-Versuch eingesetzt.

Graph A: Basislinie PCR-Zyklen 12-30;	$\bar{C}t_{206 \text{ Bp}} / \text{Phenol-Extr.}: 36,5 \pm 1,0;$
Graph B: Basislinie PCR-Zyklen 12-30;	$\bar{C}t_{206 \text{ Bp}} / \text{Säulenextr.}: 39,7 \pm 1,3;$
Graph C: Basislinie PCR-Zyklen 22-26;	$\bar{C}t_{181 \text{ Bp}} / \text{Phenol-Extr.}: 33,1 \pm 0,5;$
Graph D: Basislinie PCR-Zyklen 12-26;	$\bar{C}t_{181 \text{ Bp}} / \text{Säulenextr.}: 36,3 \pm 0,9.$

### 5.5.1.2 RHD-Echtzeit-PCR zur Detektion fötalspezifischer DNA im mütterlichen Blutplasma

Mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion konnte die Konzentration der DNA-Präparate, die aus Blutplasma oder Amnionflüssigkeitsüberstand präpariert wurden, gesteigert werden (siehe 5.3.4). Bei der Beurteilung der Amplifikationskurven, die in der RHCE-Echtzeit-PCR mit Blutplasma-DNA erhalten wurden, zeigte sich aber, dass diese einen flacheren Verlauf im Vergleich zu denen der DNA-Proben der Silikagelmembran-Extraktion, aufwiesen (siehe Abb. 5.14). Dies deutet auf eine weniger effiziente Amplifikation hin. Bei einem vorherigen Versuch zum Vergleich beider Präparationsmethoden in der Anwendung auf DNA, die aus Vollblut präpariert worden war, konnte diese Beobachtung nicht gemacht werden. Hierbei zeigten die RHD-spezifischen Amplifikationskurven der DNA der Phenol-Chloroform-Extraktion einen steileren Anstieg und eine höhere maximale Fluoreszenzintensität im Vergleich zu denen der DNA der Säulenextraktion (siehe Abb. 5.12).

Da die zellfreie Blutplasma-DNA stark degradiert vorliegt, wurde getestet, ob eine Verkürzung des RHD-PCR-Produktes, die Detektion fötalspezifischer RHD-Sequenzen verbessert. Zu diesem Zweck wurde eine literaturbeschriebene RHD-PCR [Lo *et al.*, 1998], die eine Amplifikation der untranslatierten Region von Exon 10 ermöglicht (PCR-Produktgröße 74 Bp), im Vergleich zum eigenem PCR-System getestet (Abb. 5.14). Zusätzlich wurde für das Exon 7 von RHD ein weiteres Echtzeit *Primer*-System (Abb. 5.15) entwickelt (PCR-Produktgröße 105 Bp).

RDA	1		CCTCTCACTGTTGCCTGCATT	21
RHD-exon10	1280	TCCAAGAAAAACAAGGCTGTTCAAAAACAAGACAAC	TTCTCTCACTGTTGCCTGCATT	1339
RDT	1	TACGTGAGAAACGCTCATGACAGCAAAGTCT		31
RHD-exon10	1340	TGTACGTGAGAAACGCTCATGACAGCAAAGTCT	CCAATGTTGCGGCAGGCACTGGAGTCA	1399
RDB	1		AATGTTGCGGCAGGCACT	18
<b>Primersequenz</b>				
<b>TaqMan Sonde und dazugehörige Matrizensequenz</b>				
<b>Matrizensequenz</b>				

**Abbildung 5.14: Primer-Position der Echtzeit-RHD-PCR zur Amplifikation der untranslatierten Region im Exon 10 vom RHD-Gen (Accession No. X63097).**

*Primer*: RDA, RDB; TaqMan®-Sonde: RDT. PCR-Produktlänge: 74 Bp.

DCE-Taq2	1			CGG	3
RHCE-exon7	187	CTGGGTCTGCTTGGAGAGATCA	CTACATTGTGCTGCTGGTGCCTT	CATACTGTCTGGAA	CGG 248
RHD-exon7	128	CTGGGTCTGCTTGGAGAGATCA	CTACATTGTGCTGCTGGTGCCTT	GATAACCGTCGGAGCCGG	189
MS-Dex7c	1		GCTGGTGCCTTGATACCGTCG	TAGC	24
DCE-Taq2	4	CAATGGCATGTGGGTC	ACTGGGC		26
RHCE-exon7	249	CAATGGCATGTGGGTC	ACTGGGCTTACCCCCATCCCCTTAACACTCCCCTCCA	ACTCAGGA	310
RHD-exon7	190	CAATGGCATGTGGGTC	ACTGGGCTTACCCCCATCCCCTTAACACTCCCCTCCA	ACTCAGGA	251
RH-com	1			CCA	ACTCAGGA 11
RHCE-exon7	311	AGAAATGTGTGCAGAGTC	CCTTAGCTGGGGCGTGTGCACT		349
RHD-exon7	252	AGAAATGTGTGCAGAGTC	CCTTAGCTGGGGCGTGTGCACTCGGGGCCAGGTGCTCAGTAGGCT		313
RH-com	12	AGAAATGTGTGCAGAG			27

**Sequenzunterschiede zwischen den Exonsn 7 von RHD und RHCE**

**Primersequenz**

**in Primer eingebaute Mutationen, sowie die dazugehörige Matrizensequenz**

**TaqMan Sonde und dazugehörige Matrizensequenz**

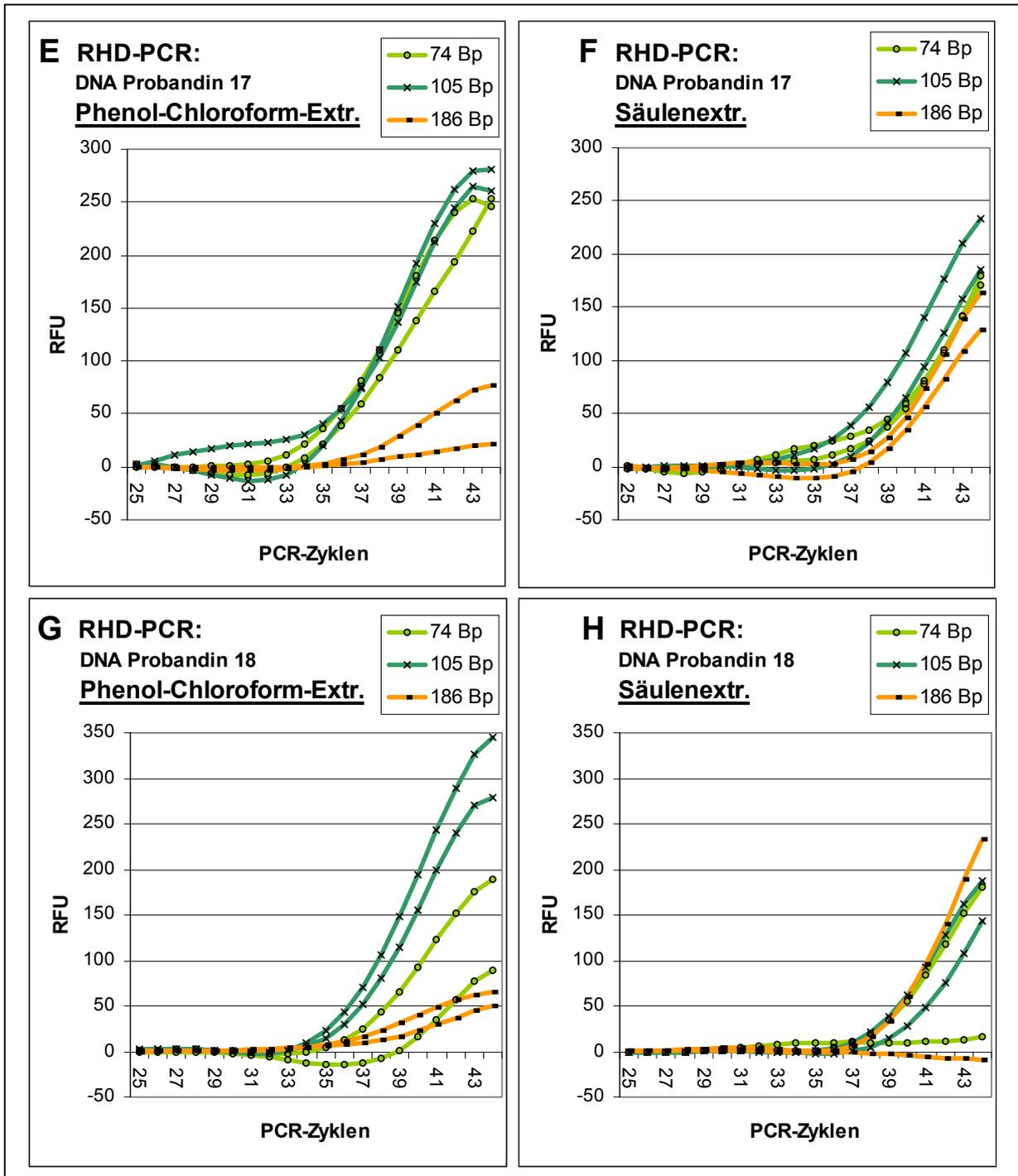
**Matrizensequenz**

**Abbildung 5.15: Primer-Position Der Echtzeit-RHD-PCR zur Amplifikation eines im Vergleich zum ersten Primer-System (Abb. 5.3) verkürzten PCR-Produktes im Exon 7 des RHD-Gens.**  
 Primer: MS-Dex7c, RH-com; TaqMan®-Sonde: DCE-Taq2. PCR-Produktlänge: 105 Bp.

In Tabelle 5.7 und Abbildung 5.16 werden exemplarisch die PCR-Ergebnisse präsentiert, die bei der Untersuchung der Blutplasma-DNA von zwei schwangeren RhD-negativen Probandinnen erzielt wurden. Die RHD-Genotypisierung der entsprechenden Amnionflüssigkeits-DNA mittels RHD-PCR fiel in beiden Fällen eindeutig RHD-positiv aus.

Probandin (RhD-Status)	PCR	PCR-Produktgröße [Bp]	Ø Ct ± STDEV	
			Phenol-Chloroform- Extraktion	Säulenextraktion
17 (RhD-negativ)	RHD	74	35,4 ± 0,6	38,8 ± 0,3
		105	35,3 ± 0,5	37,8 ± 1,3
		186	40,0	39,8 ± 0,4
	RHCE	181	33,1 ± 0,2	34,1 ± 0,1
18 (RhD-negativ)	RHD	74	39,4 ± 2,3	39,0
		105	35,9 ± 0,4	39,6 ± 1,1
		186	40,2	39,0
	RHCE	181	34,4 ± 0,2	35,3 ± 1,0

**Tabelle 5.7: Ct-Werte der RHD- und RHCE-spezifischen Echtzeit-PCR-Versuche, die mit der Blutplasma-DNA von zwei RhD-negativen schwangeren Probandinnen (17 und 18) durchgeführt wurden, um die Amplifikation verschiedener PCR-Produktgrößen miteinander zu vergleichen.** Die zugehörigen Amplifikationskurven der RHD-spezifischen Amplifikation sind in Abbildung 5.16 abgebildet. Die aufgeführten Ø Ct-Werte wurden jeweils aus Doppelbestimmungen gemittelt. Ct-Werte ohne Standardabweichung entsprechen Doppelbestimmungen, bei denen nur in einem Fall ein signifikanter Fluoreszenzanstieg gemessen werden konnte. Für den direkten Vergleich der verschiedenen PCR-Läufe wurden die Ct-Werte auf der Grundlage des aus den einzelnen PCR-Läufen gemittelten Schwellenwertes RFU 45 (manuell festgelegt) ermittelt.



**Abbildung 5.16: Amplifikationskurven von RHD-spezifischen Echtzeit-PCR-Versuchen mit Blutplasma-DNA von zwei RhD-negativen Schwangeren mit Variationen der PCR-Produktlänge.**

Primer-Kombinationen: (1) RDA, RDB mit Taqman®-Sonde RDT (74 Bp);  
 (2) MS-Dex7c, RH-com mit Taqman®-Sonde DCE-Taq2 (105 Bp);  
 (3) MS-Dex7, RH-com mit Taqman®-Sonde DCE-Taq1 (186 Bp).

Die in den Diagrammen jeweils gemeinsam abgebildeten Amplifikationskurven sind bei der Untersuchung der gleichen DNA-Probe erhalten worden. Die in den PCR-Versuchen eingesetzten DNA-Proben wurden entweder mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (E, G), oder mittels Säulenextraktion (F, H) präpariert. Es wurden 645 µl beziehungsweise 800 µl Blutplasma prozessiert und in insgesamt 50 µl Puffer aufgenommen, hiervon wurden 1:5 v/v in der PCR-Reaktionslösung eingesetzt.

In der RHD-Echtzeit-PCR konnten mit dem hier beschriebenen Versuch eindeutige Unterschiede zwischen den Amplifikationskurven der Blutplasma-DNA der Phenol-Chloroform-Extraktion und denen der DNA der Säulenextraktion erkannt werden.

Die Amplifikationskurven der DNA der Phenol-Chloroform-Extraktion zeigten im Fall der Amplifikation von kürzeren PCR-Produkten (74 Bp, 105 Bp) kleinere Ct-Werte und höhere maximale Fluoreszenzintensitäten, im Vergleich zu denen der Säulenextraktion (vergleiche z.B. E und F in Abb. 5.16). Die Amplifikationskurven der DNA der Phenol-Chloroform-Extraktion, die dem längsten PCR-Produkt (186 Bp) zuzuordnen sind, fallen sehr flach aus (siehe E und G in Abbildung 5.16). Im Vergleich zu den Amplifikationskurven der Säulenextraktion sind bei der Amplifikation dieses längsten PCR-Produktes geringere Ct-Werte erzielt worden (siehe Tab. 5.7). Im Fall der DNA-Proben der Phenol-Chloroform-Extraktion zeigt die Amplifikationseffizienz also eine starke Abhängigkeit von der PCR-Produktlänge (siehe z.B. G in Abb. 5.16). Die fötalspezifischen Fluoreszenzsignale, die im Echtzeit-RHD-PCR-Versuch mit der Plasma-DNA RhD-negativer Frauen erhalten wurden (siehe F und H; Abb. 5.16), fielen für die unterschiedlichen PCR-Produktlängen homogener aus, im Vergleich zu denen, die bei der Untersuchung von Plasma-DNA der Phenol-Chloroform-Extraktion beobachtet wurden. Zur Veranschaulichung dieser Beobachtung werden im folgenden die Standardabweichungen der Ct-Werte angegeben, die bei der Untersuchung der beiden DNA-Qualitäten von Probandin 17 und 18 beobachtet werden konnten:

**STDEV** Säulenextraktion  $\emptyset$  **Ct<sub>RHD</sub>** (74, 105, 186 BP): **1,0** (Probandin 17) bzw. **0,3** (Probandin 18).

**STDEV** Phenol-Chloroform-Extraktion  $\emptyset$  **Ct<sub>RHD</sub>** (74, 105, 186 BP): **2,7** (Probandin 17) bzw. **2,3** (Probandin 18).

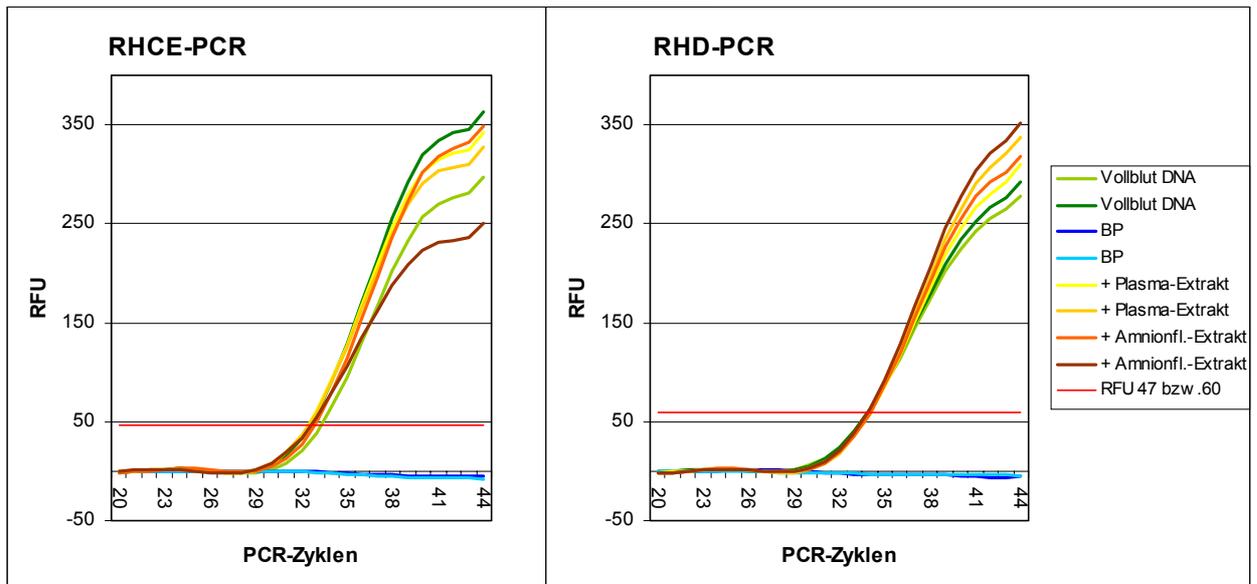
Bei dem Versuch fötalspezifische Sequenzen im mütterlichen Blutplasma mittels RHD-PCR zu detektieren wurden mit DNA-Proben der Säulenextraktion falsch negative Ergebnisse erzielt (siehe z.B. Abb. 5.16; Diagramm H: Graphen 74 Bp und 186 Bp).

### 5.5.2 Vergleich von DNA aus Blutplasma oder Vollblut in der RHD-Echtzeit-PCR

Bei der Untersuchung von Blutplasma-DNA, die mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 4.3.2.2) präpariert wurde, zeigte sich eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Quantifizierung mit Hilfe der PicoGreen®-Färbung und anschließender Fluoreszenzmessung (siehe 4.4.2) und den Ergebnissen, die in der quantitativen Echtzeit-PCR erzielt wurden (siehe 4.4.3). Für beide Quantifizierungsmethoden kam hierbei die gleiche Verdünnungsreihe einer aus Vollblut präparierten DNA zum Einsatz. Im Vergleich wurden aber mit der Picogreen®-Fluoreszenz-Detektion für die zu untersuchenden Blutplasma-DNA-Proben viel höhere Konzentrationen ermittelt, als mit der quantitativen Echtzeit-SRY-PCR (ohne Abb.). Die schlechte Amplifikationseffizienz der PCR-Versuche mit DNA der Phenol-Chloroform-Extraktion konnte verschiedene Ursachen haben:

- Eine Präparationsmethoden-abhängige Einschleppung von im Blut vorhandenen PCR-Inhibitoren [Al-Soud & Radstrom, 2001],
- Rückstände von organischem Lösungsmittel, die ebenfalls PCR-Inhibitoren darstellen,
- eine generell schlechtere Qualität der zellfreien Blutplasma-DNA, im Vergleich zu der aus Blutzellen präparierten DNA.

Um die Frage zu klären, ob eventuell methodenabhängig eingetragene Inhibitoren die PCR-Reaktion hemmen, wurde in einem weiteren Versuch die Amplifikation von qualitativ hochwertiger DNA unter den nachgestellten Versuchsbedingungen der DNA der Phenol-Chloroform-Extraktion überprüft. Die Zugabe von DNA-Präparaten aus Amnionflüssigkeitsüberstand oder aus Blutplasma der Phenol-Chloroform-Extraktion zur Reaktionslösung einer RHCE-, sowie einer RHD-spezifischen PCR hatte keine Auswirkungen auf die Amplifikation von qualitativ hochwertiger RHD-positiver DNA (Abb. 5.17). Die im Echtzeit-PCR-Versuch erhaltenen Amplifikationskurven lagen im exponentiell verlaufenden frühen Bereich der RHCE- beziehungsweise RHD-PCR-Reaktion übereinander und wiesen sehr ähnliche Ct-Werte auf. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren in den DNA-Proben der Phenol-Chloroform Extraktion war aufgrund dieses Versuchsergebnis auszuschließen.



**Abbildung 5.17: Amplifikationskurven von RHD- und RHCE-spezifischen Echtzeit-PCR-Versuchen zur Überprüfung der Anwesenheit von PCR-Inhibitoren in DNA-Proben der Phenol-Chloroform-Extraktion.** Primer: MS-Dex7 bzw. MS-CEex7, jeweils mit RH-com; TaqMan®-Sonde: DCE-Taq1.

Für die PCR-Reaktionen wurden jeweils 2,4 ng RHD-positive DNA eingesetzt, die nach der Säulenextraktionsmethode aus Vollblut isoliert worden war. Diese DNA wurde allein im PCR-Versuch eingesetzt (Vollblut-DNA), außerdem erfolgte die Zugabe von 1:6,75 v/v DNA-Probe, die aus Blutplasma oder Amnionflüssigkeitsüberstand nach der Phenol-Chloroform-Methode gewonnen worden war (Plasma- bzw. Amnionfl.-Extrakt). Zusätzlich werden die Amplifikationskurven der Blindversuche ohne DNA abgebildet (BP). Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Ct-Werte der jeweils zu vergleichenden sechs Einzelreaktionen zeigen keine auffälligen Unterschiede (siehe STDEV):

$\bar{C}t_{RHCE} = 22,27 \pm 0,34$  (Basislinie 12-26, Schwellenwert RFU 47);

$\bar{C}t_{RHD} = 23,53 \pm 0,08$  (Basislinie 12-26, Schwellenwert RFU 60).

Mit einem weiteren Versuch konnte eindeutig gezeigt werden, dass die schlechte Effizienz der Amplifikation in PCR-Versuchen mit Blutplasma-DNA der Phenol-Chloroform-Extraktion auf die für diese DNA spezifische Qualität zurück zu führen ist.

Mit der Blutprobe einer RhD-positiven Testperson wurden drei verschiedene DNA-Präparationen vorgenommen:

- Phenol-Chloroform-Extraktion anhand der Blutzellen (Abschnitt 4.3.2.3),
- Silikagelmembran-Säulenextraktion anhand der Blutzellen (Abschnitt 4.3.1.1) und
- Phenol-Chloroform-Extraktion anhand des Blutplasmas (Abschnitt 4.3.2.2).

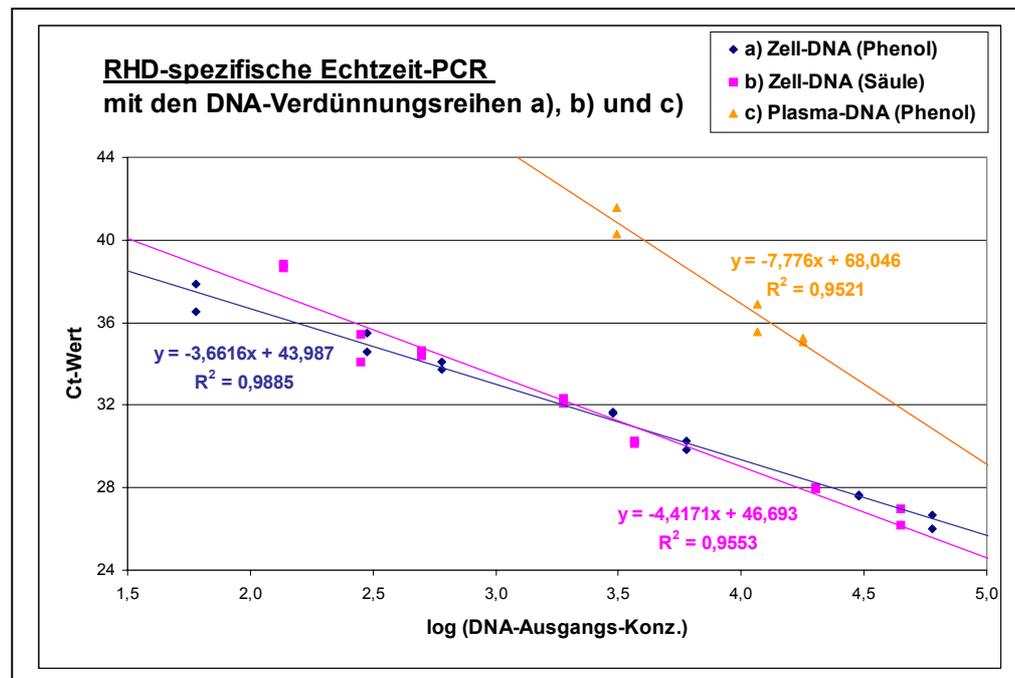
Die Konzentration der DNA-Probe aus Präparation a) wurde mittels photometrischer Messung ermittelt (siehe 4.1.1). Mit allen DNA-Proben wurden Verdünnungsreihen in TE-Puffer angesetzt, wobei aufgrund der vorherigen photometrischen Messung die einzelnen Konzentrationen der Verdünnungsreihe der Präparation a) bekannt waren. Diese Konzentrationen wurden dann

bei der Quantifizierung mit der PicoGreen®-Methode als Standardreihe eingesetzt, um die Konzentrationen der anderen beiden Verdünnungsreihen b) und c) zu bestimmen (Tab. 5.8).

Im Anschluß wurden die einzelnen DNA-Konzentrationen in einer RHD-Echtzeit-PCR eingesetzt (Abb. 5.18). Es sollte überprüft werden, ob die für die Echtzeit-PCR typische lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Anzahl an Startkopien und den dazu ermittelten Ct-Werten besteht. Anhand der Geradensteigung sollte ein Vergleich der Amplifikationseffizienz zwischen den PCR-Versuchen mit verschiedenen DNA-Qualitäten gezogen werden.

DNA-Konz. [pg / 5 µl]	log (DNA-Konz.)	RFU	STDEV <sub>(RFU)</sub>
a) DNA-Standardreihe: Phenol-Chloroform-Extraktion anhand von Blutzellen ( $R^2 = 0,9999$ )			
<b>60.000</b>	<b>4,78</b>	5.311	167
<b>30.000</b>	<b>4,48</b>	2.655	90
<b>6.000</b>	<b>3,78</b>	534	15
<b>3.000</b>	<b>3,48</b>	248	25
<b>600</b>	<b>2,78</b>	84	4
<b>300</b>	<b>2,48</b>	55	3
<b>60</b>	<b>1,78</b>	41	20
b) DNA-Verdünnungsreihe: Säulenextraktion anhand von Blutzellen			
44.311	4,65	3.923	132
20.044	4,30	1.784	75
3.656	3,56	339	9
1.881	3,27	182	6
499	2,70	61	1
283	2,45	42	2
136	2,13	29	2
c) DNA-Verdünnungsreihe: Phenol-Chloroform-Extraktion anhand von Blutplasma			
17.773	4,25	1.583	33
11.591	4,06	1.038	27
3.102	3,49	290	9
1.276	3,11	129	5
300	2,48	43	3

**Tabelle 5.8: Ergebnisse zur Quantifizierung von DNA-Verdünnungsreihen verschiedener Qualitäten mit Hilfe der PicoGreen®-Methode.** Mit der DNA-Probe, die mittels Phenol-Chloroform-Extraktion von Blutzellen präpariert worden war, wurde eine photometrische Konzentrationsbestimmung vorgenommen (92 ng/µl,  $E_{260/280} = 1,78$ ) und eine definierte Verdünnungsreihe a) erstellt. Im Quantifizierungsversuch mit PicoGreen® diente diese Verdünnungsreihe als DNA-Standardreihe (**fett gedruckt**). Durch Abgleich der gemessenen relativen Fluoreszenzwerte (RFU) mittels linearer Regression wurden die Konzentrationen der anderen zu untersuchenden DNA-Verdünnungsreihen b) und c) berechnet. Der Korrelationskoeffizient der DNA-Standardkurve betrug hierbei  $R^2: 0,9999$ . Die Blutzellen und das Blutplasma, die als Ausgangsmaterial für die DNA-Präparation dienten, sind der selben RhD-positiven Vollblutprobe entnommen worden.



**Abbildung 5.18: Lineare Beziehung zwischen den Ct-Werten und den logarithmischen Werten der Anzahl von Startkopien in einer RHD-Echtzeit-PCR mit Konzentrationen von den drei unterschiedlichen DNA-Verdünnungsreihen in Tabelle 5.8.**

*Primer:* MS-Dex7, RH-com; *TaqMan®-Sonde:* Taq-DCE1.

Es sind nur die DNA-Konzentrationen aufgeführt, mit denen in beiden Reaktionen einer Doppelbestimmung ein RHD-spezifisches Signal detektiert werden konnte.

- DNA-Standardreihe (Phenol-Chloroform-Extraktion anhand von Blutzellen):  
Detektionsgrenze = 6 pg / PCR-Reaktion, Ct = 38,4; Korrelationskoeffizient = 0,9885.
- DNA-Verdünnungsreihe (DNA-Präparation mit DNeasy™ Tissue-Kit anhand von Blutzellen):  
Detektionsgrenze = 136 pg / PCR-Reaktion, Ct = 38,7; Korrelationskoeffizient = 0,9553.
- DNA-Verdünnungsreihe (Phenol-Chloroform-Extraktion anhand von Blutplasma):  
Detektionsgrenze = 300 pg / PCR-Reaktion, Ct = 41,8; Korrelationskoeffizient = 0,9521.

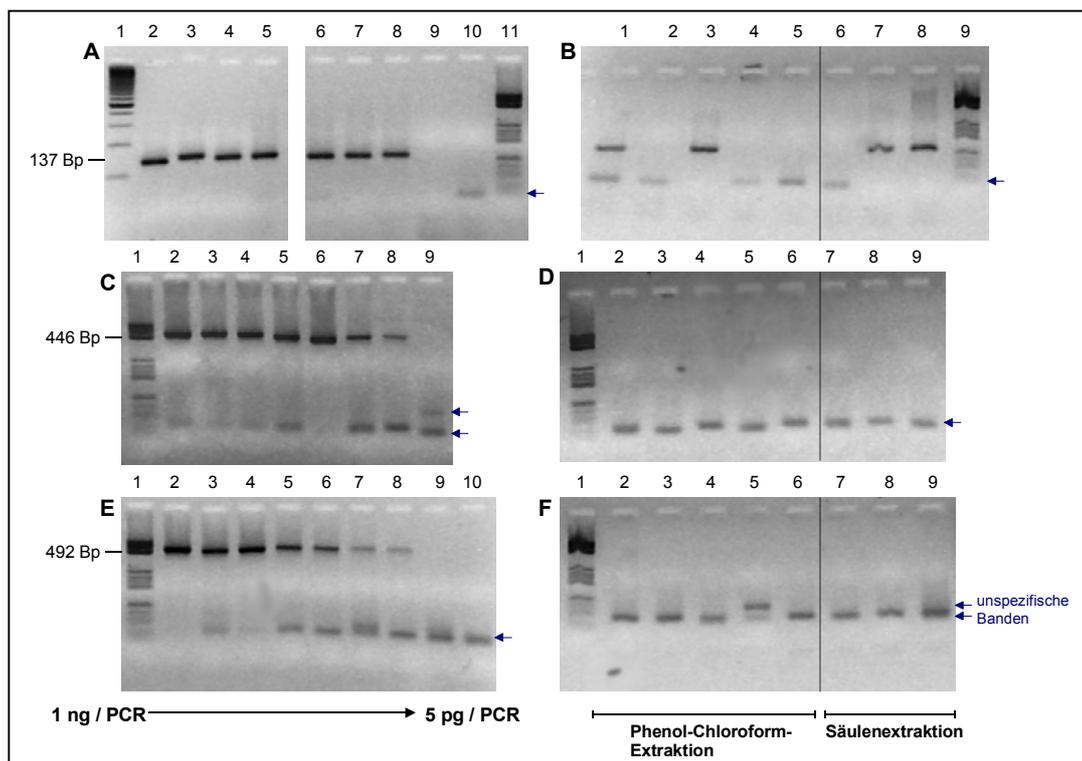
Mit Hilfe dieses Versuchs konnte die eindeutige Aussage gemacht werden, dass sowohl mit der Phenol-Chloroform-Extraktion, als auch mit der Säulenextraktion qualitativ gleichwertige DNA-Präparate aus Vollblut erstellt und mit ähnlicher Effizienz im PCR-Versuch amplifiziert werden können (Geradensteigung: -3,7 bzw -4,4, siehe Abb. 5.18). Die DNA-Präparation aus Blutplasma mittels Phenol-Chloroform-Extraktion erbringt dagegen eine qualitativ minderwertige DNA, die im PCR-Versuch mit nur geringer Effizienz amplifiziert werden kann (Geradensteigung: -7,7, siehe Abb. 5.18).

### 5.5.3 SRY-spezifische PCR anhand von mütterlicher Blutplasma-DNA

Um eine Aussage über den Degradationsgrad der frei zirkulierenden fötalen DNA im mütterlichen Blutplasma machen zu können, wurden verschiedene Y-Chromosom-spezifische SRY-PCR-Versuche anhand von mütterlicher Blutplasma-DNA durchgeführt.

Die acht Frauen, deren Blutplasma für die DNA-Präparation verwendet wurde, erwarteten die Geburt eines Sohnes (Information vom Evangelischen Krankenhaus Oberhausen).

Die DNA-Präparation erfolgte sowohl nach der Phenol-Chloroform-Extraktion, als auch nach der Silikagelmembran-Säulenextraktion. Ausgehend von einem literaturbeschriebenen PCR-Versuch zur Detektion fötaler DNA im mütterlichen Plasma [Lo *et al.*, 1998] sind weitere *Primer* entworfen worden, um auf dem gewählten Bereich des Y-Chromosoms PCR-Produkte unterschiedlicher Länge amplifizieren zu können (137 Bp, 446 Bp oder 492 Bp). Die Sensitivität der PCR-Reaktion wurde anhand der parallel durchgeführten Untersuchung von Konzentrationen einer SRY-positiven DNA-Verdünnungsreihe überprüft (Säulenextraktion anhand von Vollblut). Abb. 5.19 zeigt die Ergebnisse der elektrophoretischen Auftrennung der erhaltenen Amplifikate.



**Abbildung 5.19: 4 %ige NuSieve-Agarose-Gele nach Ethidiumbromidfärbung (Negativdarstellung) mit Amplifikaten von SRY-PCR-Versuchen von unterschiedlicher PCR-Produktlänge.**

*Primer*: **A, B**: SRY-109F, SRY-245R; **C, D**: SRY-109Fa, SRY-245R; **E, F**: SRY-109Fa, SRY-245Ra. DNA-Verdünnungsreihen **A, C, D**: Jeweils Bahn 2 → 8 (1000, 500, 250, 100, 50, 25, 5 [pg DNA/PCR]).

PCR mit Blutplasma-DNA von Schwangeren: **B, D, F**.

DNA-Präparation mittels Phenol-Chloroform-Extraktion: **A** Bahnen 1 → 5; **D, F** jeweils Bahnen 2 → 6. DNA-Präparation mittels Säulenextraktion: **A** Bahnen 6 → 8; **D, F** jeweils Bahnen 5 → 7.

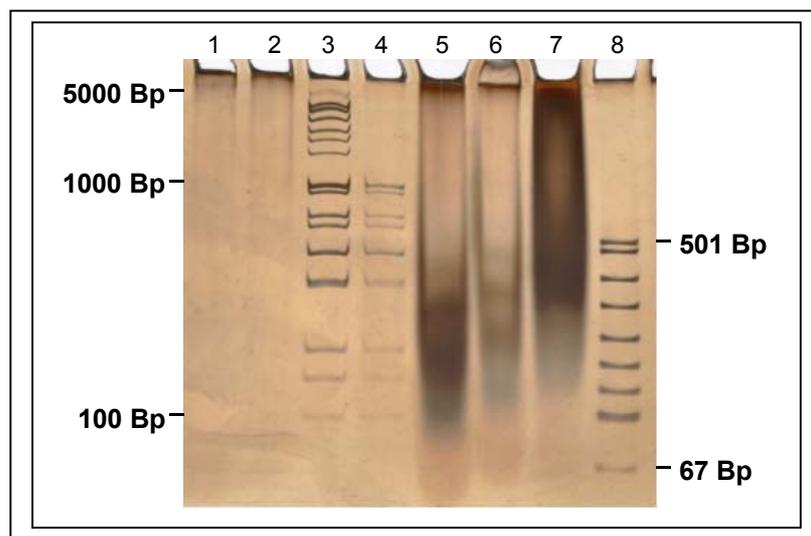
PCR-Blindproben (ohne DNA): **A** Bahnen 9, 10; **C** Bahn 9; **E** Bahnen 9, 10. DNA-Längenstandards:

**A** Bahn 1 (100 Bp DNA-Leiter); **A** Bahn 11, **B, F** jeweils Bahn 1 (DNA-Sizer XV).

Für alle drei SRY-spezifischen *Primer*-Paare konnte bei der Anwendung auf die gleiche Verdünnungsreihe männlicher DNA eine Sensitivität von 5 pg pro PCR-Reaktion festgestellt werden. Die fötalspezifische Detektion von SRY-Sequenzen in mütterlicher Blutplasma-DNA gelang aber nur mit der geringsten PCR-Produktgröße von 137 Bp, wobei dies sowohl mit DNA der Phenol-Chloroform-, als auch mit der der Säulenextraktion zu beobachten war (siehe Abb. 5.19; Gel B: Bahnen 1 und 3 bzw. Bahnen 7 und 8).

#### 5.5.4 Beurteilung der Qualität von Blutplasma-DNA nach elektrophoretischer Auftrennung im Polyacrylamidgel

Um festzustellen, ob bei der Blutplasma-DNA im Vergleich zur DNA aus Blutzellen eine Degradation vorliegt, wurden beide DNA-Qualitäten im Polyacrylamidgel der Elektrophorese unterworfen und die erhaltenen Banden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Zusätzlich wurden die DNA-Qualitäten verschiedener Präparationsmethoden (Silikagelmembran-Säulenextraktion oder Phenol-Chloroform-Extraktion) verglichen (Abb. 5.20).



**Abbildung 5.20:** 5 %iges Polyacrylamidgel nach der Silberfärbung zur Beurteilung von elektrophoretisch aufgetrennter Blutzellen- und Blutplasma-DNA.

Blutzellen-DNA: Bahn 1: 100 ng, Phenol-Chloroform-Extraktion mit Proteinase K Verdau.

Bahn 2: 100 ng, Säulenextraktionsmethode.

Blutplasma-DNA:

Bahn 5: 24 ng, Phenol-Chloroform-Extraktion mit Proteinase K Verdau, Vereinigung mehrerer Proben und Aufkonzentrierung in einer Vakuumzentrifuge

Bahn 6: 7 ng, Phenol-Chloroform-Extraktion mit Proteinase K Verdau.

Bahn 7: 15 ng, Säulenextraktionsmethode mit anschließender Ethanol-fällung aus vereinigten Proben, sowie Aufkonzentrierung in einer Vakuumzentrifuge.

DNA-Längenstandards:

Bahn 3: 100 Bp-Leiter erweitert bis 5000 Bp, Bahn 4: 100 Bp-Leiter,

Bahn 8: pUC 19 / Msp I.

Die Konzentrationen der DNA-Präparationen aus Blutplasma sind mit der Picogreen®-Methode, die der Blutzellen-DNA mittels photometrischer Messung bestimmt worden und dienen als Grundlage der geschätzten DNA-Menge pro Geltasche. Blutzellen und Plasma sind der selben Vollblutprobe einer Testperson entnommen worden.

Während die hochmolekulare Blutzellen-DNA bei der Elektrophorese nicht ins Polyacrylamidgel eingewandert ist, zeigen die unterschiedlichen Blutplasma-DNA-Proben ein breites Bandenspektrum, wobei ein Großteil der DNA-Fragmente kleiner als 500 Bp groß ist (Abb. 5.20).

## 5.6 RHD-Zygotiebestimmung mittels relativer Genquantifizierung

Bei der vorgeburtlichen ärztlichen Betreuung von Rhesus-D-negativen Frauen könnte eine Rhesus-D-Zygotiebestimmung des betreffenden Vaters, eine Risikoeinschätzung der Schwangerschaft für die Geburt eines Rhesus-D-positiven Fötus ermöglichen.

Ist der Vater ebenfalls Rhesus-D-negativ, bedarf es keiner besonderen Schwangerschaftsbetreuung im Hinblick auf eine eventuelle Rhesus-Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind. Wenn der Vater heterozygoter Träger des RHD-Gens ist, besteht eine Wahrscheinlichkeit von 50 %, dass das Kind ein Rhesus-D-Allel vom Vater vererbt bekommt. Kinder von homozygoten Trägern des RHD-Gens sind hingegen in jedem Fall Rhesus-D-positiv. In diesem Fall muß eine prophylaktische Anti-D-Immunglobulin Behandlung bei der Schwangeren durchgeführt werden. Wird diese Behandlung versäumt, ist eine intensive medizinische Überwachung der Schwangerschaft angebracht.

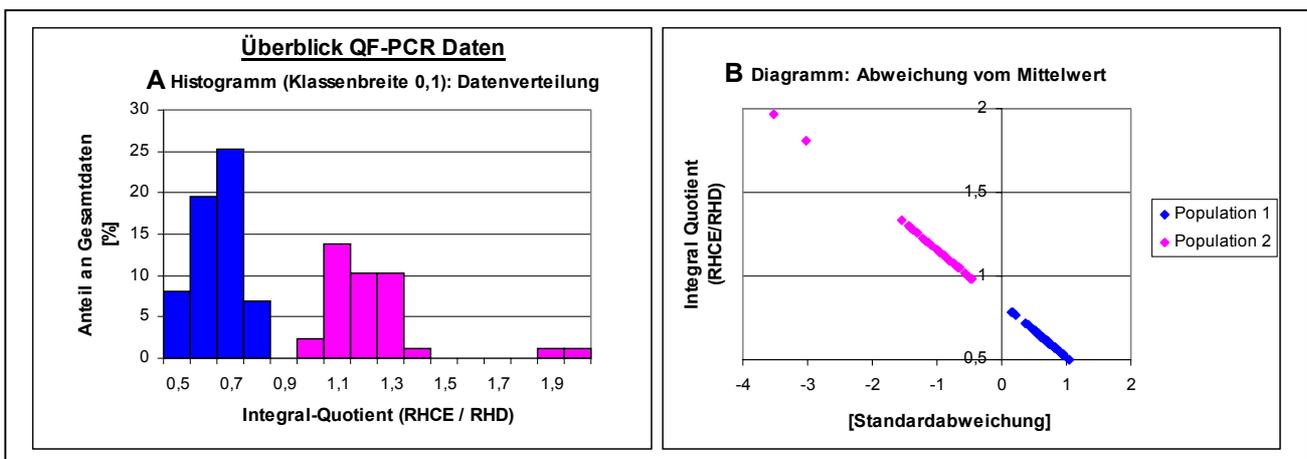
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Multiplex-Echtzeit-PCR entwickelt, mit der eine relative Quantifizierung des RHD- zum RHCE-Gen möglich ist (siehe 4.4.3). Die parallele Amplifikation von RHD und RHCE erfolgte hierbei mit allelspezifischen *Beacon-Primern* (siehe 4.7.2).

Das Verhältnis der RHD- zu den RHCE-Genkopien entspricht beim RHD-heterozygoten Genotyp 1:2 und beim RHD-homozygoten Genotyp 2:2. Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen standen Blutproben zur Verfügung, deren Rhesus-Status aufgrund von serologischen Untersuchungen bekannt war (siehe 4.1.1), nicht aber die vorliegende RHD-Zygotie. Um einen molekulargenetischen Test für die Anwendung in der medizinischen Diagnostik zu etablieren, muß das Testergebnis anhand einer unabhängigen Methode bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurde eine zweite molekulargenetische Genquantifizierung für RHD und RHCE auf der Grundlage der Quantitativen Fluoreszenz (QF-) PCR (siehe 4.4.4) entwickelt.

Es wurden anhand von 87 RhD-positiven Blutproben DNA-Präparationen vorgenommen und diese zunächst in der Quantitativen Fluoreszenz PCR und anschließend in der Echtzeit-PCR auf die vorliegende RHD-Zygotie hin getestet. Zusätzlich erfolgte die Untersuchung von 11 RhD-negativen Blutproben, die in beiden Untersuchungsreihen als Negativkontrollen dienten.

### 5.6.1 RHD-Zygotiebestimmung mittels quantitativer Fluoreszenz (QF) -PCR

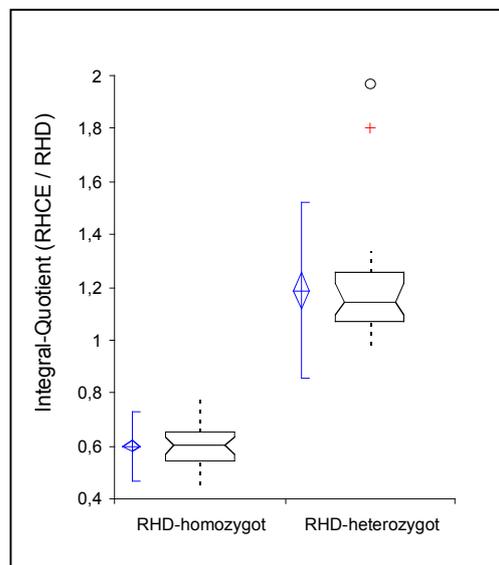
Die quantitative Fluoreszenz-PCR (siehe 4.4.4) zur RHD-Zygotiebestimmung erfolgte mit DNA-Proben, die mittels Silikagel-Säulenextraktions gewonnen worden waren (siehe 4.3.1.1). Dem Prinzip der mutagenetisch separierenden PCR (siehe 4.6.1) folgend wurden der RHCE- und der RHD-spezifische *Primer* (MS-CEex7 bzw. MS-Dex7, siehe Abb. 5.1) mit einem gemeinsamen fluoreszenzmarkierten Gegen-*Primer* (RH-com-FI) parallel eingesetzt. Die Auswertung des PCR-Versuchs erfolgte mittels Kapillarelektrophorese (siehe 4.5.3), hierbei diente der Integral-Quotient der *Peaks* im Elektropherogramm, die den RHCE- und RHD-spezifischen PCR-Produkten zuzuordnen waren, als Grundlage der statistischen Auswertung. Die *Peak*-Höhe, sowie deren Integralfläche sind proportional zur Ausgangsmenge der als Matrize dienenden DNA-Sequenz. Anhand der berechneten Integral-Quotienten (RHCE / RHD) sollten in der untersuchten Stichprobe von 87 RhD-positiven Testpersonen zwei verschiedene Populationen erkannt werden, die entweder dem RHD-heterozygoten (RHCE:RHD = 2:1) oder dem RHD-homozygoten (RHCE:RHD = 2:2) Genotyp entsprechen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.21 zusammengefasst.



**Abbildung 5.21: Reihenuntersuchung von 87 RhD-positiven Testpersonen zur RHD-Zygotiebestimmung mittels quantitativer Fluoreszenz-PCR (Primer-Kombination: MS-CEex7, MS-Dex7, RH-com-FI).** Als Datengrundlage dient der Integral-Quotient (RHCE / RHD) der *Peaks* im Elektropherogramm, die den RHCE- bzw. RHD-spezifischen PCR-Produkten zuzuordnen sind. Im Histogramm A ist die Häufigkeitsverteilung der gesammelten Daten angegeben. Im Diagramm B werden die gesammelten Daten in Abhängigkeit ihrer Differenz zum Arithmetischen Mittel (0,84) dargestellt, wobei als Einheit für die x-Achse die Standardabweichung ( $\pm 0,32$ ) gewählt wurde. Niedrigere Werte, die im Diagramm B rechts vom Arithmetischen Mittel (Standardabweichung = 0) liegen, werden der Population 1, höhere Werte, die links vom Arithmetischen Mittel liegen, der Population 2 zugeordnet. Die Farbkennzeichnung wurde im Histogramm A übernommen.

Das hier abgebildete Histogramm (A) zeigt die Häufigkeitsverteilung der Einzelergebnisse bezogen auf die Bandbreite der erhaltenen Integral-Quotienten. Zwei Gruppen von Daten lassen sich anhand der zwei Maxima, sowie der Distanz zwischen beiden Gruppen unterscheiden.

Im abgebildeten Diagramm (B) werden deutlich zwei unterschiedliche Datenpopulationen sichtbar. Einmal sind die Werte niedriger als das Arithmetische Mittel aller ermittelten Integral-Quotienten (Population 1) und einmal sind sie höher (Population 2). Die relative Quantifizierung vom RHD- zum RHCE-Gen lässt bei den Testpersonen, deren Integral-Quotient der Population 1 zuzuordnen ist, auf den RHD-homozygoten Genotyp schließen, bei den Testpersonen, deren Integral-Quotient der Population 2 angehört, dagegen auf den RHD-heterozygoten Genotyp. Im folgenden wird die schematische Häufigkeitsverteilung der Daten, die für die RHD-homozygoten bzw. RHD-heterozygoten Genotypen erhoben worden sind, im *Box- und Whisker-Diagramm* (siehe 4.8.1.1) dargestellt (siehe Abb. 5.23). Es werden ebenfalls die statistischen Lage- und Streuungsmaße mit den jeweiligen Vertrauensbereichen tabellarisch aufgeführt (Tab. 5.9). Bei der Untersuchung der 11 RhD-negativen Testpersonen konnten kein RHD-spezifisches PCR-Produkte nachgewiesen werden.



**Abbildung 5.22:** *Box- und Whisker-Diagramm* für die mittels quantitativer Fluoreszenz-PCR in einer Reihenuntersuchung von 87 RhD-positiven Testpersonen ermittelten Integral-Quotienten (RHCE / RHD). Es konnten zwei Datenpopulationen erkannt werden, die entweder auf den RHD-homozygoten, oder den RHD-heterozygoten Genotyp schließen lassen.

Integral-Quotient (RHCE / RHD)	Anzahl	Mittelwert	Standardabweichung	95 % Konfidenzintervall (Mittelwert)	Median	95 % Konfidenzintervall (Median)
RHD-homozygot Population 1	52	0,60	0,08	0,58 bis 0,62	0,61	0,57 bis 0,63
RHD-heterozygot Population 2	35	1,19	0,20	1,12 bis 1,26	1,14	1,09 bis 1,21

**Tabelle 5.9:** Statistische Daten zu den zwei Populationen von Integral-Quotienten (RHCE / RHD), die mittels quantitativer Fluoreszenz-PCR in einer Reihenuntersuchung von 87 RhD-positiven Testpersonen ermittelt worden sind und die entweder auf den RHD-homozygoten, oder RHD-heterozygoten Genotyp schließen lassen.

## 5.6.2 RHD-Zygotiebestimmung mittels Beacon-Primer Allel-diskriminierender (BAD-) PCR

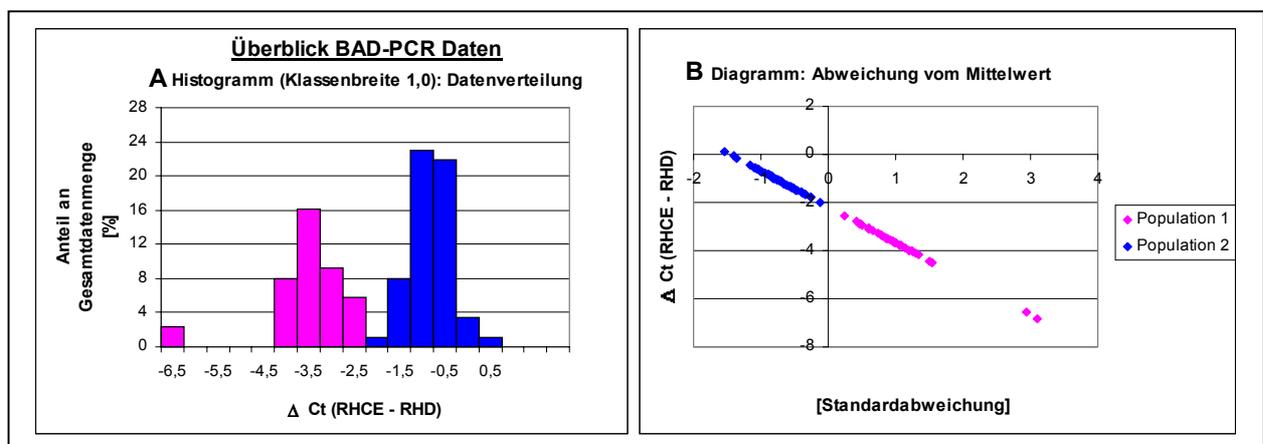
Der Echtzeit-PCR-Test zur RHD-Zygotiebestimmung wurde mit DNA-Proben durchgeführt, die sowohl nach der Silikagel-Säulenextraktion (siehe 4.3.1.1), als auch nach der Schnellpräparationsmethode aus Vollblut (siehe 4.3.2.1) gewonnen worden waren. Für den Test wurden ein RHCE- und ein RHD-spezifischer *Beacon-Primer* (BP-CEex7 bzw. BP-Dex7) entworfen und im Echtzeit-PCR-Versuch mit einem gemeinsamen *Gegen-Primer* (RH-comy) eingesetzt (Abb. 5.24). Aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierung der *Beacon-Primer* konnten die in der gleichen Reaktion ablaufende RHCE- bzw. RHD-Produktamplifikation detektiert werden. Die Diskriminierung zwischen beiden Gensequenz wurde mit Hilfe der mutagenetisch separierenden PCR (siehe 4.6.1) erreicht.

		ACCTGGTCGTTTCGACCAGGT	
BP-Ceex7	1	GCTGCTGGTGCTTCATACTGTTGGAA	48
RHCE-exon7	187	CTGGGTCTGCTTGGAGAGATCACTACATTGTGCTGCTGGTGCTTCATACTGCTGGAA	248
RHD-exon7	128	CTGGGTCTGCTTGGAGAGATCACTACATTGTGCTGCTGGTGCTTGATACCGTCGGAGC	189
BP-Dex7	1	GCTGGTGCTTGATACCGTCGTAGC	45
		AGGACCAGCTTTGCTGGTCCT	
RHCE-exon7	249	CAATGGCATGTGGGTCACCTGGGCTTACCCCCATCCCCTTAACACTCCCCTCCAACCTCAGGA	310
RHD-exon7	190	CAATGGCATGTGGGTCACCTGGGCTTACCCCCATCCCCTTAACACTCCCCTCCAACCTCAGGA	251
RHCE-exon7	311	AGAAATGTGTGCAGAGTCCTTAGCTGGGGCGTGTGCACT	349
RHD-exon7	252	AGAAATGTGTGCAGAGTCCTTAGCTGGGGCGTGTGCACTCGGGGCCAGGTGCTCAGTAGGCT	313
RH-comy	1	GAGTCCTTAGCTGGGGCGTGTGCACT	26
<b>Sequenzunterschiede zwischen Exon 7 von RHD und RHCE</b>			
<b>Primersequenz</b>			
<b>in Primer eingebaute Mutationen, sowie die dazugehörige Matrizensequenz</b>			
<b>FAM-gelabelter Molecular Beacon-Schwanz</b>			
<b>HEX-gelabelter Molecular Beacon-Schwanz</b>			
<b>Matrizensequenz</b>			

**Abbildung 5.23:** Position des RHCE- und des RHD-spezifischen *Beacon-Primer* (BP-CEex7 und BP-Dex7), sowie des gemeinsamen *Gegen-Primer* (RH-comy) im Exon 7 von RHD und RHCE. Die 3'-Enden der *Beacon-Primer* wurden auf einen Sequenzabschnitt gelegt, in dem sich die Sequenzen von RHD und RHCE um drei Basenpaare voneinander unterscheiden. In direkter Nachbarschaft zu diesen Basenpaaren wurden dem RHD-spezifischem *Primer* in der vierten 3'-Position (T statt G) und dem RHCE-spezifischem *Primer* in der sechsten 3'-Position (T statt C) eine Mutation eingefügt. Beide *Beacon-Primer* weisen jeweils einen Fluoreszenz-markierten Sequenzabschnitt (21 Bp) am 5'-Ende auf („*Molecular Beacon* Schwanz“), der zur Ausbildung einer Haarnadelstruktur nach dem Prinzip eines *Molecular Beacon* befähigt ist. Die RHCE-PCR-Produktlänge beträgt 152 Bp, die RHD-PCR-Produktlänge 149 Bp.

Für jede der 87 RhD-positiven und die 11 RhD-negativen Testpersonen wurden jeweils drei  $C_{t_{RHCE}}$ - und gegebenenfalls  $C_{t_{RHD}}$ -Werte in unabhängigen PCR-Versuchen ermittelt. Dazu wurden jeweils nur Amplifikationskurven ausgewertet, die einen gleichmäßigen Verlauf im Bereich einer für alle PCR-Versuche festgelegten Basislinie zeigten.

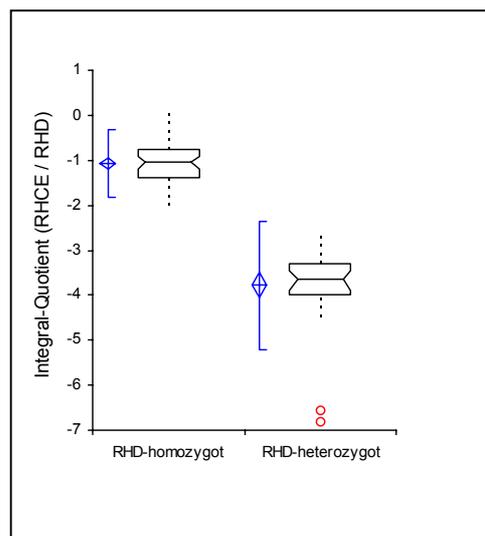
Im Bereich des exponentiell ansteigenden Verlaufs der Amplifikationskurven wurde für alle PCR-Läufe der gleiche Schwellenwert für die Berechnung der Ct-Werte manuell eingestellt, um homogene Daten für die unabhängigen PCR-Versuche zu gewährleisten. Als Grundlage der statistischen Auswertung der gesammelten Daten diente die gemittelte Differenz der für RHCE und RHD gemessenen Ct-Werte ( $\Delta C_{t_{RHCE-RHD}}$ ). Einen Überblick der gesammelten Daten verschafft Abb. 5.24. Das abgebildete Histogramm (A) zeigt die Häufigkeitsverteilung der Einzelergebnisse bezogen auf die Bandbreite der erhaltenen  $\Delta C_{t_{RHCE-RHD}}$ -Werte. Aufgrund der zwei Maxima kann auf zwei unterschiedliche Daten-Populationen geschlossen werden. Im abgebildeten Diagramm (B) sind die zwei unterschiedlichen Datenpopulationen anhand ihrer Position in Bezug auf das Arithmetische Mittel zu unterscheiden, einmal sind die Werte niedriger (Population 1) und einmal sind sie höher als der Mittelwert aller  $\Delta C_{t_{RHCE-RHD}}$ -Werte (Population 2).



**Abbildung 5.24: Reihenuntersuchung von 87 RhD-positiven Testpersonen zur RHD-Zygotiebestimmung mittels Beacon-Primer Allel-diskriminierender PCR (Primer-Kombination: BP-CEex7, BP-Dex7, RH-comy). Datengrundlage ist die gemittelte Differenz der jeweils für RHCE und RHD gemessenen Ct-Werte ( $\Delta C_{t_{RHCE-RHD}}$ ), wobei die Basislinie allgemein auf die PCR-Zyklen 5 bis 22 und der Schwellenwert auf RFU 150 festgelegt wurde. Histogramm A zeigt die Häufigkeitsverteilung der gesammelten Daten. Im Diagramm B werden die gesammelten Daten in Abhängigkeit ihrer Differenz zum Arithmetischen Mittel (-2,18) dargestellt, wobei als Einheit für die x-Achse die Standardabweichung ( $\pm 1,49$ ) gewählt wurde. Niedrigere Werte, die im Diagramm B rechts vom Arithmetischen Mittel (Standardabweichung = 0) liegen, werden der Population 1, höhere Werte, die links vom Mittelwert liegen, der Population 2 zugeordnet. Die Farbkennzeichnung wurde im Histogramm A übernommen.**

Die relative Quantifizierung vom RHD- zum RHCE-Gen lässt bei den Testpersonen, deren  $\Delta Ct_{RHCE-RHD}$ -Wert der Population 1 zuzuordnen ist, auf den RHD-heterozygoten Genotyp schließen, bei den Testpersonen, deren  $\Delta Ct_{RHCE-RHD}$  der Population 2 angehört, dagegen auf den RHD-homozygoten Genotyp.

Die Häufigkeitsverteilung der Daten beider Gruppen wird zur Veranschaulichung im *Box- und Whisker*-Diagramm (Abschnitt 4.8.1.1) abgebildet (siehe Abb. 5.26), sowie die statistischen Lage- und Streuungsmaße mit den jeweiligen Vertrauensbereichen tabellarisch aufgeführt (Tab. 5.10).



**Abbildung 5.25:** *Box- und Whisker*-Diagramm für die mittels *Beacon-Primer* Allel-diskriminierender PCR in einer Reihenuntersuchung von 87 RhD-positiven Testpersonen ermittelten  $\Delta Ct_{RHCE-RHD}$ -Werte. Es konnten zwei Datenpopulationen erkannt werden, die entweder auf den RHD-homozygoten, oder den RHD-heterozygoten Genotyp schließen lassen.

$\Delta Ct$ (RHCE – RHD)	Anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	95 % Konfidenzintervall (Mittelwert)	Median	95 % Konfidenzintervall (Median)
<b>RHD- homozygot</b> Population 2	51	-1,06	0,45	-1,19 bis -0,94	-1,05	-1,21 bis -0,93
<b>RHD- heterozygot</b> Population 1	36	-3,77	0,87	-4,07 bis -3,48	-3,66	-3,89 bis -3,45

**Tabelle 5.10:** Statistische Daten zu den zwei Populationen von  $\Delta Ct_{RHCE-RHD}$ -Werten, die mittels *Beacon-Primer* Allel-diskriminierender PCR in einer Reihenuntersuchung von 87 RhD-positiven Testpersonen ermittelt worden sind und die entweder auf den RHD-homozygoten, oder RHD-heterozygoten Genotyp schließen lassen.

Unter Anwendung der *Beacon-Primer* konnten mit den DNA-Proben der 11 RhD-negativen Testpersonen keine RHD-spezifischen Fluoreszenzsignale in der Echtzeit-PCR detektiert werden.

### 5.6.3 Vergleich der Ergebnisse von zwei unabhängigen Untersuchungsreihen (QF- oder BAD-PCR) zur RHD-Zygotiebestimmung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde bei 87 serologisch als RhD-positiv beurteilten Testpersonen mittels zwei unterschiedlicher molekulargenetischer Untersuchungen eine RHD-Zygotiebestimmung vorgenommen. Der Ergebnisvergleich von Quantitativer Fluoreszenz-PCR und *Beacon-Primer* Echtzeit-PCR zeigte für 84 Testpersonen eine Übereinstimmung. Es wurden 50 Personen eindeutig als RHD-homozygot und 34 Personen eindeutig als RHD-heterozygot bestimmt. Die ermittelten Daten für die drei Personen (3,5 %), bei denen keine eindeutige RHD-Zygotiebestimmung vorgenommen werden konnte sind in Tabelle 5.11 aufgeführt.

Proband	QF-PCR		BAD-PCR	
	Integral-Quotient (RHCE / RHD)	RHD-Genotyp	$\Delta$ Ct (RHCE – RHD)	RHD-Genotyp
<b>m16</b>	1,28	heterozygot	-1,26	homozygot
<b>f21</b>	0,79	homozygot	-3,56	heterozygot
<b>f24</b>	0,49	homozygot	-3,67	heterozygot

**Tabelle 5.11: Ermittelte Daten für drei Probanden, bei denen keine übereinstimmende RHD-Zygotiebestimmung mittels Quantitativer Fluoreszenz-PCR und *Beacon-Primer* Alleldiskriminierender Echtzeit PCR erreicht werden konnte.**

## 6 Diskussion

### 6.1 Pränatale RHD-Genotypisierung

Die Anwendung der Rhesus-Anti-D-Prophylaxe bei RhD-negativen Frauen konnte die Gefahr einer möglichen Rhesus-Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind in der Schwangerschaft und das damit in Verbindung stehende Risiko von HDN (*Hemolytic Disease of the Newborn*) verringern [Robson *et al.*, 1998]. Im Falle eines ebenfalls RhD-negativen Kindes geschieht die Anti-D-Prophylaxe allerdings unbegründet. Die prophylaktische Verabreichung von Rhesus-Anti-D-Immunglobulin bedeutet zwar keine Gefahr für Mutter und Kind, verursacht aber bei nicht notwendiger Anwendung unnötige Kosten für das Gesundheitssystem.

Ein funktionsfähiger nicht-invasiver RHD-Genotypisierungstest für das ungeborene Kind, der auch das Ziel der vorliegenden Arbeit war, würde mehrere Vorteile mit sich bringen:

- Die Möglichkeit zur gezielten Anwendung der Anti-D-Prophylaxebehandlung im Fall eines D-positiven Kindes.
- Das Risiko einer fötal-maternalen Einblutung, die bei der pränatalen Blutabnahme für die serologische Bestimmung des fötalen Rhesus-Status auftreten kann, würde entfallen und damit auch die Gefahr des sogenannten „Booster-Effekts“ bei der Schwangeren (verstärkte Antikörperbildung aufgrund der sekundären Immunantwort als Reaktion auf die Existenz von fötalen Erythrozyten mit D-Antigenen im Blutkreislauf der RhD-negativen Frau).
- Im Fall eines D-positiven Kindes könnte die frühzeitige vorgeburtliche Betreuung im Hinblick auf eine HDN-Risikoschwangerschaft verbessert werden.
- Im Fall eines D-negativen Kindes könnte die Durchführung von unnötigen Untersuchungen mittels invasiver Methoden zur Überprüfung auf HDN verhindert werden.

### **6.1.1 Nicht-invasive Pränataldiagnostik anhand zellfreier fötaler DNA aus mütterlichem Blutplasma**

Die pränatale Diagnostik ist in Deutschland inzwischen nahezu selbstverständlicher Bestandteil der medizinischen Schwangerenvorsorge geworden. In Absprache mit dem betreuendem Arzt können hierbei nicht-invasive und invasive Diagnostikmethoden in Anspruch genommen werden. Während in den Entwicklungsländern immer noch Infektionskrankheiten und Mangelernährung zu einem vorzeitigen Abbruch einer Schwangerschaft führen können, sorgen sich werdende Mütter in den Industrienationen eher darum, ob ihr Kind, trotz guter Lebensumstände, eventuell nicht gesund zur Welt kommen könnte [Bianchi & Lo, 2001]. Neben der Erkennung von fötalen und embryonalen Entwicklungsstörungen soll die pränatale Diagnostik hierzulande auch dazu dienen, Befürchtungen und Sorgen zu objektivieren und abzubauen [Vilmar & Bachmann, 1998]. Die größte klinische Relevanz kommt bei den pränatal zu diagnostizierenden fötalen Defekten dem Down-Syndrom (Trisomie 21) zu. Für die vorgeburtliche Erkennung des Down Syndroms haben sich Diagnosemethoden im klinischen Routineablauf etabliert, die entweder mit einer hohen Fehlerquote behaftet sind oder sogar ein nicht zu vernachlässigendes Risiko für die Gesundheit von Mutter und Kind tragen (siehe 2.2.1 und 2.2.2.). Die Entwicklung neuer aussagekräftiger nicht-invasiver Diagnostikmethoden für die vorgeburtliche Betreuung in der Schwangerschaft ist deshalb ein lang ersehntes Ziel der Medizin.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, anhand der molekulargenetischen Untersuchung von zellfreier fötaler DNA aus dem mütterlichen Blutplasma bei Risikoschwangerschaften für HDN (*Hemolytic Disease of the Newborn*) eine RHD-Genotypisierung des ungeborenen Kindes vorzunehmen. Die hierfür notwendige DNA-Präparation erfordert lediglich die Entnahme einer geringfügigen Menge mütterlichen Blutes und birgt somit kein Risiko für die bestehende Schwangerschaft. Aufgrund der Prävention mittels Anti-D-Prophylaxe steht diese Thematik zwar im klinischen Routineablauf nicht in direkter Konkurrenz mit einer alternativen invasiven Methode, sie kann aber als Modellbeispiel einer nicht-invasiven Pränataldiagnostik für die Detektion eines Einzelgendifekts beim Fötus angesehen werden.

Mit dem Ziel, eine Alternative für invasive Pränataldiagnostikmethoden zu finden, wurden in den letzten drei Jahrzehnten zahlreiche Versuche vorgenommen, zunächst aus mütterlichem Blut fötale Zellen (siehe 2.2.3) und dann in neuerer Zeit aus mütterlichem Blutplasma fötale zellfreie DNA (siehe 2.2.5) zu isolieren. Die Untersuchung von zellfreier DNA im Blutplasma oder Serum für Diagnosezwecke ist auf verschiedene pathologische Zustände anwendbar, wie Krebs-

krankheiten [Chen *et al.* 1996; Nawroz *et al.*, 1996] oder Zellchimerismus nach Transfusionen und den damit einhergehenden Autoimmunreaktionen [David *et al.*, 1999].

Im Vergleich zur Konzentration von fötalen Zellen im mütterlichen Blut ist die Konzentration von zellfreier fötaler DNA im mütterlichen Blutplasma aber bewiesener Maßen höher (siehe 2.2.4 und 2.2.5.2). Die Isolierung von fötalen Zellen aus dem mütterlichen Blutkreislauf ist außerdem sehr arbeitsaufwendig und erfordert vom Laborpersonal in hohem Maße technisches Geschick, Sorgfalt und Erfahrung auf diesem Gebiet (siehe 2.2.3). Zudem besteht mitunter keine Gewähr dafür, dass die isolierten Zellen tatsächlich den kindlichen Genotyp repräsentieren; es ist fraglich, ob sie nicht vielmehr doch mütterlichen Ursprungs sind oder einem früher geborenen Geschwisterkind zugeordnet werden müssen (siehe 2.2.3 und 2.2.5.3).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun die zellfreie fötale DNA als mögliches Ausgangsmaterial für einen routinefähigen nicht-invasiven RHD-Genotypisierungstest am ungeborenen Kind getestet werden.

### 6.1.2 Sammlung und Aufarbeitung von Blutproben

Die Blutproben, die für die in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen Untersuchungen zur Verfügung standen, stammten von RhD-negativen Schwangeren, bei denen aufgrund einer medizinischen Indikation eine Amniozentese im Evangelischen Krankenhaus Oberhausen vorgenommen werden sollte. In den meisten Fällen wurde den Frauen aufgrund ihres erhöhten Alters (> 35 Jahre) die Durchführung der invasiven Untersuchung empfohlen, welche ungefähr in der 12. bis 16. Schwangerschaftswoche durchgeführt wurde. Es bestand keine Möglichkeit, auf die Auswahl des Testpersonenkollektivs hinsichtlich des Schwangerschaftszeitpunktes Einfluß zu nehmen. Da nur ca. 15 % der Europäer RhD-negativ sind [Wagner *et al.*, 2001], war auch die Anzahl der im festgelegten Zeitrahmen der vorliegenden Arbeit gesammelten Proben gering (insgesamt ca. 60 Blutproben mit zuzuordnender Amnionflüssigkeit, siehe 4.1.3 und 4.1.4). Das Blut wurde in speziellen EDTA-Monovetten gesammelt, in denen die Blutgerinnung verhindert werden kann. Die Gefahr einer erhöhten EDTA-Konzentration in den aus Blutplasma gewonnenen DNA-Präparaten wurde als gering angesehen. Einer eventuell hierdurch verursachten Inhibition der *Taq*-DNA-Polymerase im PCR-Versuch hätte gegebenenfalls mit einer erhöhten Menge Magnesiumchlorid entgegengewirkt werden können. Die Abtrennung des Plasmas von den zellulären Bestandteilen erfolgte über einen Zentrifugationsschritt, bei dem sich in den ausgewählten Monovetten eine Geldiffusionsschicht ausgebildet hat. Diese Gelbarriere zwischen festem Zell-

material und flüssigem Blutanteil ermöglichte eine quantitative Überführung des abgetrennten Plasmas durch einfaches Umschütten.

Entnommene Blutproben durften auf keinen Fall vor der Plasmaabtrennung eingefroren werden, um zu verhindern, dass zerstörte Erythrozyten Eisenionen des Hämoglobinkomplexes, die als starke PCR-Inhibitoren gelten [Al-Soud & Radstrom, 2001], an die Umgebung frei geben. Die hier beschriebene Probenprozessierung unterscheidet sich von denen anderer Autoren, die fötale Sequenzen im mütterlichen Plasma nachgewiesen haben und hierfür bei der Blutprobensammlung einfache EDTA-Monovetten benutzten [Lo *et al.*, 1997, 1999; Wei *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 2001; etc.]. Ohne Geldiffusionsschicht hätte das Blutplasma in mehreren Schritten pipettiert werden müssen, wobei dessen Abtrennung von der Monozytenschicht individuell von dem arbeitenden Laborpersonal abhängig gewesen wäre. Die experimentellen Anforderungen für die Präparation von zirkulierender Tumor-DNA aus Plasma oder Serum von Krebspatienten sind ähnlich zu beurteilen wie die für die Isolation freier fötaler DNA aus dem Blutkreislauf von Schwangeren. Die Verwendung von Monovetten mit Gelbarriere wird auch für die Probensammlung bei der Isolation zirkulierender Tumor-DNA aus Blutplasma empfohlen [Jen *et al.*, 2000]. Da der Verdacht bestand, dass die sich während des Zentrifugierens bildende Gelbarriere eventuell freie DNA binden und damit die Konzentration der fötalen DNA im Blutplasma verringern könnte, wurde der Gebrauch von Monovetten mit Geldiffusionsschicht im Vergleich zu einfachen Monovetten getestet (siehe 5.3.1). Bei einer absoluten Quantifizierung von DNA-Proben, die jeweils aus dem Blutplasma beider Monovettensorten isoliert worden waren, konnte kein großer Unterschied zwischen den beiden Blutplasmaqualitäten erkannt werden (siehe Abb. 5.10). Die DNA-Konzentration der DNA-Präparate der Geldiffusionsschicht-Monovetten zeigten eher höhere Werte, was darauf schließen lässt, dass die sich entwickelnde Gelbarriere in geringem Maße Zellen zerstört und somit deren DNA frei setzt.

Generell ist anzumerken, dass das Blutplasma von Schwangeren im Vergleich zum Blutserum besser für die Extraktion fötalen DNA-Materials geeignet ist. Zwar wird in der Literatur beschrieben, dass man im Serum höhere Konzentrationen von genomischer DNA finden kann als im Plasma, jedoch weisen Untersuchungen darauf hin, dass bei dem Prozeß der Blutkoagulation weiße Blutkörperchen lysiert werden [Lee *et al.*, 2001]. Somit hätte bei der Verwendung von Blutserum statt Plasma der Nachteil bestanden, dass die Konzentration der mütterlichen DNA gegenüber der des fötalen DNA-Anteils noch weiter erhöht gewesen wäre. Dies hätte die Möglichkeit der Detektion fötaler Sequenzen im PCR-Versuch verschlechtert.

Es war davon auszugehen, dass die zellfreie DNA unter den vorgegebenen Bedingungen (siehe Abb. 4.1) stabil bleibt [Angert *et al.*, 2003] sowie für mindestens 4 Monate bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  keinen größeren Schaden nehmen würde [Lin & Floros, 2000].

### 6.1.3 Funktionsweise des pränatalen RHD-Genotypisierungstests im Vergleich

Die pränatale RHD-Genotypisierung anhand von Amnionflüssigkeit wird von mehreren Autoren beschrieben [Bennett *et al.*, 1993; Van Den Veyver *et al.*, 1996; Crombach *et al.*, 1997] und auch von verschiedenen Laboren (Labor Keeser, Arndt & Partner, Hamburg; Praxis Mehnert, Neu-Ulm; *International Blood Group Reference Laboratory*, Bristol) als Dienstleistung angeboten. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der für die Untersuchung von Blutplasma entwickelte RHD-Genotypisierungstests auf Amnionflüssigkeitsüberstand angewendet und das erhaltene Ergebnis als zuverlässig beurteilt, um auf den tatsächlich beim Fötus vorliegenden RHD-Genotyp schließen zu können. Im Vergleich zur DNA-Präparation anhand von unbehandeltem Fruchtwasser konnte bei der DNA-Präparation mit zellfreiem Amnionflüssigkeitsüberstand nur eine äußerst geringe DNA-Konzentration erzielt werden, die zum Teil sogar unter dem Detektionsminimum der Quantifizierungsmethode mit PicoGreen® lag (siehe Tab. 5.3). Trotz niedriger DNA-Konzentration war aber davon auszugehen, dass anhand dieser DNA-Präparate im PCR-Versuch nur fötale Sequenzen untersucht werden konnten und das erzielte Ergebnis damit zuverlässig zu bewerten war. Ganz andere Voraussetzungen liegen bei der Detektion fötaler Sequenzen im mütterlichen Blut vor, die vor dem Hintergrund der im Überschuss vorliegenden mütterlichen DNA detektiert werden müssen. Der positive RHD-Nachweis im Blut der Mutter gelang einigen Autoren mit relativ niedriger Detektionsrate, erforderte aber zum Beispiel eine Anreicherung der fötalen Zellen mittels FACS [Geifman-Holtzman *et al.*, 1996], oder möglichst sensitive Amplifikationsmethoden, wie die „*Nested PCR*“ [Lo *et al.*, 1993]. Für eine routinefähige Diagnostik bedarf es aber einer unkomplizierten Probenaufarbeitung und größtmöglicher Maßnahmen zur Kontaminationsvermeidung. Bei der von Lo und Kollegen [1993] beschriebenen zweistufigen „*Nested PCR*“ besteht eine große Kontaminationsgefahr, da im ersten Schritt zunächst ein RHD-spezifisches PCR-Produkt amplifiziert wird, welches im zweiten Schritt als Ausgangsmatrize für die Amplifikation eines kleineren PCR-Produktes eingesetzt werden muß.

Aufgrund der Seltenheit fötaler Zellen im mütterlichen Blutkreislauf verfolgten schließlich zahlreiche Arbeitsgruppen das Ziel, eine pränatale RHD-Genotypisierung anhand der molekulargenetischen Untersuchung mütterlichen Blutplasmas oder Serums vorzunehmen. Hierbei wurde sowohl die konventionelle PCR [Faas *et al.*, 1998; Avent *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2000 b; Nelson *et al.*, 2001], die Echtzeit-PCR [Lo *et al.*, 1998; Legler *et al.*, 2002;

son *et al.*, 2001], die Echtzeit-PCR [Lo *et al.*, 1998; Legler *et al.*, 2002; Finning *et al.*, 2002] als auch die Quantitative Fluoreszenz (QF-) PCR mittels Kapillarelektrophorese [Bischoff *et al.*, 1999; Pertl *et al.*, 2000] angewendet. Die Validierung eines standardisierten Arbeitsprotokolls in einer großangelegten klinischen Studie ist aber bisher nicht erfolgt [Lo *et al.*, 2001].

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu entwickelnde PCR-Test sollte als routinefähiger pränataler RHD-Genotypisierungstest Anwendung finden, wofür die Echtzeit-PCR (siehe 4.7) gute Voraussetzungen schafft [Heid *et al.*, 1996]. Da bei dieser Methode die herkömmliche aufwendige Versuchsauswertung mittels elektrophoretischer Auftrennung der im PCR-Versuch erhaltenen Amplifikate entfällt, kann die Automatisierung des Testablaufs leichter realisiert werden, wodurch ein hoher Probendurchsatz und eine geringe Testdauer ermöglicht werden. Einmal verschlossene PCR-Reaktionsgefäße müssen nach Ablauf der Reaktion nicht mehr geöffnet werden, wodurch außerdem die Gefahr von Kreuzkontaminationen gebannt wird.

Die Detektion RHD- oder RHCE-spezifischer Sequenzen gelang durch den Einsatz einer TaqMan®-Sonde (siehe z.B. Abb. 5.4 und 5.5). Die Gefahr einer falsch positiven Signaldetektion wurde hierbei als gering eingestuft. Eine TaqMan®-Sonde wird im PCR-Versuch nur für die Generierung eines spezifischen Fluoreszenzsignals eingesetzt (siehe Abb. 4.8), während *Beacon-Primer*, neben der Fluoreszenzsignalentwicklung, ebenfalls direkt an der PCR-Produktbildung beteiligt sind (siehe Abb. 4.10).

Faas *et al.* [1998] beschreiben als erste einen nicht-invasiven pränatalen Rhesus D-Genotypisierungstest, der die molekulargenetische Untersuchung der fötalen DNA aus mütterlichem Blutplasma beinhaltet. Sie haben hierfür eine konventionelle PCR angewendet, die ein RHD-spezifisches PCR-Produkt im Exon 7 der Länge 111 Bp generiert. Bei dem von Lo *et al.* [1998] beschriebenen RHD-Tests wird die RHD-positive Diagnose über die Amplifikation eines 74 Bp großen PCR-Produktes in der untranslatierten Region des Exon 10 in RHD gestellt. Er verwendet dazu die TaqMan®-Technologie in einem Echtzeit-PCR-Versuch. Ein parallel durchgeführter  $\beta$ -Globin-Echtzeit-PCR-Test konnte bestätigen, dass in der jeweiligen Blutplasma-Präparation tatsächlich DNA vorhanden war. Die von Lo *et al.* [1998] vorgestellten RHD-spezifischen *Primer* wurden von anderen Autoren übernommen [Nelson *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2001]. Diese verwenden ebenfalls die von Lo entwickelte Y-Chromosom-spezifische SRY-PCR [Lo *et al.*, 1998]. Im Fall eines männlichen Fötus gelingt mit dieser Methode der unabhängige zweifache Nachweis fötalspezifischer Sequenzen. Die Auswahl der untranslatierten Region im RHD-Gen erschien für die Entwicklung eines aussagekräftigen RHD-Genotypisierungstests im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht sinnvoll, da kein direkter Bezug zum Phänotyp der Rhesus-Antigene auf den Erythrozyten besteht.

Viele Autoren strebten bei der Detektion fötalspezifischer Sequenzen im mütterlichen Blutplasma die Bestätigung des fötalen Ursprungs dieses Materials mittels einer zweiten unabhängigen PCR an. Neben dem geschlechtsspezifischen Nachweis von SRY-Genkopien wurde hierbei auch von molekulargenetischen Nachweisen väterlich vererbter Mikrosatelliten berichtet [Tang *et al.*, 1999; Pertl *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000]. Hierbei unterscheidet sich die Sequenzlänge der fötalspezifischen Amplifikate von denen der mütterlichen, was aber mit der in der vorliegenden Arbeit angewendeten Echtzeit-PCR durch bloße Detektion eines Fluoreszenzsignals nicht zu unterscheiden ist. Auch die Unterscheidung anhand von Insertions/Deletions-Polymorphismen, wie sie von Lo *et al.* [2000] am Beispiel des Glutathion S-Transferase M1 (GSTM1) Gens oder des Angiotensin-*Converting*-Enzym (ACE) Gens für die Detektion mütterlicher Sequenzen im fötalen Blutkreislauf genutzt wurde, hat nur in den Einzelfällen Aussagekraft, bei denen sich das kindliche Allel vom mütterlichen Allel unterscheidet.

Der in der vorliegenden Arbeit vorgestellte RHD-Genotypisierungstest verzichtet auf eine Absicherung der fötalspezifischen RHD-Detektion mittels einer ebenfalls fötalspezifischen PCR zur Detektion von SRY-Sequenzen, da diese nur im Fall eines männlichen Fötus, also bei ca. 50 % der zu untersuchenden Schwangerschaften, aussagekräftige Ergebnisse erzielen könnte. Im Falle einer robusten Signaldetektion reicht die Detektion auch einer einzelnen RHD-Sequenz dafür aus, beim Kind den RHD-positiven Genotyp zu diagnostizieren. [Lo *et al.*, 2001].

Als Kontrollreaktion für das Vorhandensein von amplifizierbarer Plasma-DNA sollte beim hier vorgestellten Test die homologe Sequenz des RHCE-Gens im Exon 7 im parallelen PCR-Versuch amplifiziert werden. Die parallele Amplifikation von RHD und RHCE im Exon 7 wurde schon von Van den Veyver *et al.* [1996] als zweiter Schritt einer „*Nested PCR*“ beschrieben, um den fötalen RHD-Genotyp anhand der Untersuchung von Amniozyten zu detektieren. Später haben auch Bischoff *et al.* [1999] das gleiche „*Nested Primer-System*“ für die Untersuchung von mütterlicher Serum-DNA angewendet, wobei das fötalspezifische 99 Bp große RHD-PCR-Produkt neben dem 113 Bp großen RHCE-PCR-Produkt generiert wurde.

In der Literatur werden RHD-PCR Tests für die Untersuchung mütterlichen Plasmas beschrieben, die in der Lage sind, ein RHD $\Psi$ -Allel (siehe 2.1.3) zu erkennen [Finning *et al.*, 2001; Legler *et al.*, 2002]. Dieses Pseudogen ist bei 66 % der RhD-negativen Schwarzafrikaner vorhanden [Singleton *et al.*, 2000], tritt in anderen ethnischen Gruppen jedoch eher selten auf. Bei der Planung des hier vorgestellten RHD-Genotypisierungstest wurde die Existenz von RHD $\Psi$  vernachlässigt, denn der Test hätte im Bereich der europäischen Bevölkerung Anwendung finden sollen.

#### **6.1.4 Der Echtzeit-PCR-Tests zur RHD-Genotypisierung in der Anwendung auf RhD-negative Blutspender**

Bei der Anwendung auf eine größere Gruppe RhD-negativer Blutspender zeigte sich, dass der auf Exon 7 im RHD-Gen ausgelegte Echtzeit-PCR-Test (siehe 5.1.2.1) lediglich eine geringe Gefahr von eventuell falsch RHD-positiven Diagnosen birgt (siehe 5.2). In zwei Fällen von insgesamt 255 untersuchten DNA-Proben, die aus Vollblut präpariert worden waren, wurden RHD-spezifische Amplifikate in der PCR erhalten. Bei dem in allen untersuchten Fällen vorliegenden D-negativen Serotyp war eigentlich von der vollständigen Deletion des RHD-Gens auszugehen [Colin *et al.*, 1991; Wagner *et al.*, 2000]. Der Phänotyp der zwei RhD-negativen Testpersonen (entspricht 0,78 % des Testpersonen-Kollektivs) ohne vollständige Deletion des Exon 7 im RHD-Gen entspricht Ccddee. Eine Studie hat für das Auftreten von Antigen-D negativen, RHD-positiven Allelen die Frequenz von 22 % für den seltenen Cde Haplotyp bestimmt [Avent *et al.*, 1997]. Alle 241 Blutspender (94,51 % des Testpersonen-Kollektivs) des Phänotyps ccddee wurden mit Hilfe des Echtzeit-PCR-Tests übereinstimmend als RHD-negativ beurteilt. In der deutschen Bevölkerung macht dieser Phänotyp ungefähr 92 % aller Rhesus-Antigen-D-negativen Personen aus [Wagner *et al.*, 1995].

Die Konsequenz aus den Ergebnissen für die klinische Anwendung bestünde lediglich darin, dass ein geringer Prozentsatz an Schwangerschaften mit RHD-positiv diagnostizierten Föten weiterhin unbegründet als HDN-Risikoschwangerschaften eingeschätzt würde. Der in der vorliegenden Arbeit entwickelte RHD-Genotypisierungstest konnte somit als geeignet beurteilt werden, um sich im nächsten Schritt bei der Anwendung auf Blutplasma-DNA von RhD-negativen Schwangeren zu bewähren.

#### **6.1.5 Voraussetzungen für das Gelingen eines PCR-Tests zur nicht-invasiven fötalen RHD-Genotypisierung**

##### **6.1.5.1 PCR-Sensitivität und PCR-Spezifität**

Eine gewissenhafte Optimierung des RHD-PCR-Versuchs hinsichtlich Sensitivität und Spezifität war für die Detektion von fötalspezifischen Sequenzen im mütterlichen Blutplasma eine wesentliche Voraussetzung. Es konnte davon ausgegangen werden, dass der fötale DNA-Anteil der Blutplasma-Präparate äußerst gering sein würde, außerdem musste die Diskriminierung von

RHCE- gegenüber RHD-Sequenzen, trotz der Homologie beider Genabschnitte, gewährleistet sein. Die auf der Grundlage der mutagenetisch separierenden PCR [Rust *et al.*, 1993] konzipierten RHD-spezifischen *Primer* zeigten sowohl beim parallelen Einsatz mit RHCE-spezifischen *Primern* (siehe Abb. 5.2) als auch allein im PCR Versuch (siehe Abb. 5.4 und 5.5) eine zuverlässige RHD-spezifische Amplifikation. Um die Effizienz der Amplifikation des RHD-spezifischen PCR-Produktes nicht zu beeinträchtigen, wurde von einer RHD/RHCE-Multiplex-PCR abgesehen. Auch Finning *et al.* [2002] haben bei denen von ihnen konzipierten *Primern* zur Detektion von RHD-spezifischen Sequenzen Basenfehlpaarungen eingebaut, um die *Primer*-Spezifität für die anhand der Ausgangsmatrize gebildeten RHD-Amplifikate zu erhöhen.

Die Funktionsfähigkeit der entwickelten Rhesus-PCR musste zunächst am Modellsystem getestet werden, da die Anzahl der zur Verfügung stehenden Blutplasmaproben von RhD-negativen Schwangeren begrenzt war. Es wurden DNA-Präparationen mit Blutproben vorgenommen, deren serologischer Rhesus-Status bekannt war. Mit diesen DNA-Proben wurden Verdünnungsreihen angesetzt, wobei die Zusammensetzung aus fötalen und mütterlichen Anteil der DNA-Proben, die man aus mütterlichem Blutplasma isoliert, annähernd nachgestellt werden sollte. Die erzielten Sensitivitäten der RHD-spezifischen Amplifikation in der Echtzeit-PCR fielen zufriedenstellend aus (siehe 5.1.2.3). Da die in diesen Versuchen eingesetzte DNA zellulären Ursprungs war, konnte von einer guten DNA-Qualität ausgegangen werden. Eine Einschätzung darüber, ob der RHD-Echtzeit-PCR-Test für die nicht-invasive fötale RHD-Genotypisierung geeignet ist, war nur durch die Untersuchung des eigentlichen Probenmaterials, Blutplasma-DNA von Schwangeren, möglich.

#### 6.1.5.2 DNA-Präparation

Für die Entwicklung einer funktionsfähigen RHD-Echtzeit-PCR, die auf mütterliche Blutplasma-DNA angewendet werden sollte, waren hinsichtlich DNA-Ausbeute sowie DNA-Qualität höchste Ansprüche an die Präparationsmethode gestellt, um deutliche und reproduzierbare Ergebnisse zu erreichen. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Methoden angewendet. Das war zum einen die Verwendung von Silikagelmembran-Zentrifugationssäulen ( $V_{\max} = 620 \mu\text{l}$ ) der Firma Qiagen (siehe 4.3.1.2), die auch in einem Vergleich von insgesamt 13 Verfahren für die Isolation genomischer DNA aus gefrorenem Blutserum die beste Beurteilung erhalten hat [Dixon *et al.*, 1998], zum anderen die Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 4.3.2.2), die in modifizierter Form auch allgemein für die DNA-Isolation aus Plasma und Serum für die Krebsdiagnose empfohlen wird [Jen *et al.*, 2000].

Im Vergleich zu der von Jen *et al.* [2000] empfohlenen Phenol-Chloroform-Extraktion, die für die Prozessierung von 1,5 Milliliter Plasma ausgelegt ist, wurde in der vorliegenden Arbeit auf einen vorangestellten Proteinase K-Verdau verzichtet. Bei diesem zusätzlichen Bearbeitungsschritt wird das Probenmaterial im Allgemeinen mit einem auf das Enzym abgestimmten Puffer im Verhältnis 1:1 versetzt [Sambrook *et al.*, 1989]. Da die DNA-Konzentration im Blutplasma schon sehr gering ist und die Präzipitation nur mit einem geringen maximalen Volumen (645 µl) durchgeführt werden konnte, sollte eine zusätzliche Verdünnung vermieden werden.

Für den geplanten fötalen RHD-Genotypisierungstest anhand mütterlichen Blutplasmas musste gewährleistet werden, dass die DNA-Konzentration entsprechend hoch ausfiel, um eine für die PCR-Reaktion ausreichende Menge fötalspezifischer Sequenzen zur Verfügung zu stellen. Die für den RHD-Genotypierungs-Test entwickelte Echtzeit-RHD-PCR zeigte bei der Anwendung auf DNA-Verdünnungsreihen eine hohe Sensitivität (siehe Abb. 5.8 und Tab. 5.1). Aufgrund der Erfahrungswerte, die hierbei gesammelt worden sind, wurde die erforderliche Mindestmenge von fötaler DNA für die zuverlässige Detektion im RHD-PCR-Versuch auf 50 bis 100 pg geschätzt. Ausgehend von der allgemein getroffenen Aussage von Lo *et al.* [1998], dass der Anteil fötaler DNA an der mütterlichen Blutplasma-DNA in der frühen Schwangerschaft durchschnittlich 3 % ausmachen soll, wäre also theoretisch eine Gesamt-DNA-Menge von knapp 2 bis 4 ng pro RHD-PCR ausreichend gewesen, um damit fötalspezifische Sequenzen detektieren zu können. Die Quantifizierung mittels PicoGreen®-Anfärbung und relativer Fluoreszenzmessung (siehe 4.4.2) der DNA-Proben, die aus mütterlichem Blutplasma präpariert wurden, ergaben nur für die Phenol-Chloroform-Extraktion eine ausreichend hohe DNA-Ausbeute (ca. 13 ng bis 17 ng DNA in 5 µl bzw. pro PCR-Reaktion, siehe 5.3.4). Die DNA-Konzentration der DNA-Proben der Silikagelmembran-Säulenextraktion (siehe 4.3.1.2) lag hierbei unter der Detektionsgrenze der Quantifizierungsmethode (ca. 50 pg DNA in 5 µl bzw. pro PCR-Reaktion, siehe Tab. 5.3). Anzumerken ist, dass sich die Aussage von Lo *et al.* [1998] auf eine Quantifizierung mittels Echtzeit-PCR stützt, also eine Abschätzung über die Menge amplifizierbarer DNA gemacht wurde, während die Quantifizierung mittels PicoGreen®-Anfärbung und relativer Fluoreszenzmessung eine Angabe über die absolute Menge DNA ermöglichte. In der Literatur sind unterschiedliche Angaben über die Konzentration an zellfreier DNA in Plasma und Serum zu finden, so wird zum Beispiel die DNA-Konzentration mit 10 bis 200 ng/ml für Blutserum angegeben [Jen *et al.*, 2000]. Eine Vielzahl von Veröffentlichungen beschreibt die Quantifizierung mittels Echtzeit-PCR von DNA-Proben, die mit Hilfe der Silikagelmembran-Säulenextraktion (Qiagen) aus mütterlichem Blutplasma präpariert wurden.

Die Spannbreiten der ermittelten Werte (DNA-Menge / Volumen mütterliches Blutplasma) betragen hierbei zum Beispiel:

- Lo *et al.* [1998]; **2,3 bis 210,4 ng/ml** (11. bis 43. SSW);
- Wei *et al.* [2001]; **2,7 bis 19,7 ng/ml** (10. bis 23. SSW);
- Finning *et al.* [2002]; **0,5 ng bis 4,5 µg/ml** (8. bis 42. SSW);
- Hromadnikowa *et al.* [2002]; **85,8 pg bis 242,6 ng/ml** (15. bis 19. SSW).

Je nach ausgewähltem Testpersonen-Kollektiv können verschiedene DNA-Konzentrationen ermittelt werden, was auch bei dem Vergleich der unterschiedlichen EDTA-Monovetten in der Anwendung auf Blutproben von vier Testpersonen (siehe Abb. 5.10) zu beobachten war. Ebenso wurde bei dem Vergleich von zwei unabhängigen Untersuchungsreihen zur Quantifizierung von zellfreier DNA im mütterlichen Blutplasma diese Beobachtung gemacht (siehe 5.3.4).

Die Qualität des Probenmaterials (Alter, Aufbewahrung, Prozessierung), die DNA-Präparationsmethode sowie die Vorgehensweise bei der Quantifizierung sind von Methode zu Methode äußerst heterogen zu beurteilen und beeinflussen alle letztendlich das Ergebnis (siehe zum Beispiel [Chiu *et al.*, 2001]).

#### 6.1.5.3 Qualität der Blutplasma-DNA

Bei der Isolierung von zellfreier DNA aus Blutplasma war nicht nur eine ausreichend hohe Konzentration des erhaltenen DNA-Präparates ausschlaggebend für die zuverlässige fötale RHD-Genotypisierung. Auch die DNA-Qualität musste entsprechend gut sein, um die Empfindlichkeit des Tests zu gewährleisten. In der Literatur wird die Existenz von zellfreier DNA im Blutplasma zum Teil durch die Apoptose von nukleierten Zellen erklärt [Sekizawa *et al.*, 2000; van Wijk *et al.*, 2000; Kolialexi *et al.*, 2001]. Es war davon auszugehen, dass die mütterliche Plasma-DNA und die zu detektierende fötale DNA stark degradiert vorlagen. Diese Vermutung konnte aufgrund einiger Versuchsergebnisse im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden:

- Im PCR-Versuch zeigte die Verwendung von Blutplasma-DNA im Vergleich zu DNA zellulären Ursprungs eine schlechtere Amplifikationseffizienz (siehe Abb. 5.19).
- Das Gelingen der Detektion fötalspezifischer Sequenzen im mütterlichen Blutplasma mit Hilfe der SRY-PCR war von der Größe des zu amplifizierenden PCR-Produktes abhängig (siehe Abb. 5.20).
- Die Blutplasma-DNA zeigte nach elektrophoretischer Auftrennung ein Spektrum von Banden, die DNA-Fragmenten von geringer Größe zuzuordnen sind (siehe Abb. 5.21).

Auch andere Wissenschaftler haben bei der Planung ihrer Versuche zur Detektion fötalspezifischer Sequenzen offensichtlich der Tatsache Beachtung geschenkt, dass die Blutplasma-DNA ein stark degradierte Struktur aufweist. Bei der von Lo *et al.* [1998] beschriebenen PCR zur Detektion fötaler RHD-Sequenzen im mütterlichen Blutplasma beträgt z.B. die PCR-Produktlänge nur 74 Bp (siehe Abb. 5.14). Zhong *et al.* [2000 b] amplifizieren für den Nachweis fötalspezifischer RHD-Sequenzen in der mütterlichen Plasma-DNA PCR-Produkte von nur 78 Bp Länge.

### **6.1.6 Anwendung des RHD-Genotypisierungstests auf Blutplasma-DNA von RhD-negativen Schwangeren**

Der in der vorliegenden Arbeit entwickelte RHD-Genotypisierungstest sollte im Fall eines RHD-positiven Fötus die eindeutige Detektion der fötalen RHD-Sequenz im mütterlichen Blutplasma gewährleisten. Hierbei wurde für eine eindeutige Diagnose eine mindestens 95 %ige Sensitivität des PCR-Versuchs vorausgesetzt, da im allgemeinen auch bei der statistischen Auswertung von Messergebnissen eine maximale Fehlerwahrscheinlichkeit von 5 % toleriert wird [Harms, 1998]. Für die bisher in der Literatur beschriebenen pränatalen RHD-Genotypisierungstests anhand von mütterlichem Blutplasma werden Sensitivitäten von bis zu 100 % angegeben, unter der Voraussetzung, dass sich die Schwangere mindestens im zweiten Trimester der Schwangerschaft befindet [Faas *et al.*, 1998; Lo *et al.*, 1998; Finning *et al.*, 2002]. Zum Teil werden die Diagnosen anhand von Mehrfachbestimmungen gestellt. Finning *et al.* [2002] führen zum Beispiel Dreifachbestimmungen durch. Legler *et al.* [2002] berichten von Vierfachbestimmungen, wobei eine RHD-positive Diagnose gestellt wird, wenn mindestens zwei von vier RHD-spezifischen PCR-Versuchen ein positives Signal zeigen. Diese Vorgehensweise wird auch von Smid *et al.* [1999] bei der Detektion Y-Chromosom-spezifischer Sequenzen im mütterlichen Blutplasma beschrieben. Es ist anzuzweifeln, ob die gestellte Diagnose als klinisch relevant beurteilt werden kann, wenn die ihr zugrunde liegenden Versuchsergebnisse zu 50 % als falsch negativ interpretiert werden.

Auch bei der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Reihenuntersuchung von Blutplasmaproben von zehn RhD-negativen Schwangeren konnte nicht die gewünschte Sensitivität im PCR-Versuch erreicht werden (siehe 5.4.2). Die DNA-Präparation erfolgte in diesem Fall mit Hilfe der Silikagelmembran-Säulenextraktionsmethode, wie sie auch von zahlreichen anderen Autoren in ähnlicher Weise angewendet wurde, die fötale RHD-Sequenzen im mütterlichen Blutplasma nachgewiesen haben [Faas *et al.*, 1998; Lo *et al.*, 1998; Finning *et al.*, 2002; etc.].

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist die DNA-Ausbeute bei dieser Präparationsmethode relativ gering (siehe 5.3.4). Es ist davon auszugehen, dass der Anteil fötaler DNA an der DNA-Gesamtmenge im PCR-Versuch nahe an der Detektionsgrenze lag.

#### 6.1.6.1 Beurteilung der Konzentration von fötaler DNA im mütterlichen Blutplasma

In Anlehnung an die Versuche von Lo *et al.* [1998] haben andere Autoren weitere Versuche unternommen, den fötalen Anteil der Blutplasma-DNA von Schwangeren mittels SRY-Echtzeit-PCR und Vergleich mit einer DNA-Verdünnungsreihe zu quantifizieren. Bei der Betrachtung der ermittelten Konzentrationen in Beziehung zum jeweils im PCR-Versuch eingesetzten Äquivalent Plasmavolumen zeigt sich, dass die Ergebnisse auf PCR-Versuchen beruhen, bei denen eine äußerst geringe Anzahl von Genomäquivalenten im Einzelversuch detektiert werden konnte. In der Tabelle 6.1 werden im Folgenden einige Ergebnisse zur Quantifizierung fötaler DNA im mütterlichen Blutplasma zusammengefaßt.

Auch bei der Untersuchung von mütterlicher Blutplasma-DNA auf fötalspezifische SRY-Sequenzen geben einige Autoren die Durchführung von Mehrfachbestimmungen an. Farina *et al.* [2002] und Hromadnikova *et al.* [2002] interpretieren zum Beispiel einzelne Testergebnisse anhand von Dreifachbestimmungen. Zum Teil lässt sich aus den Spannbreiten der ermittelten Konzentrationen (fötale Genomäquivalente pro ml mütterliches Blutplasma) ersehen, dass auch falsch negative Versuchsergebnisse erzielt worden sind, die anscheinend bei der statistischen Auswertung mit einbezogen wurden.

- Wei *et al.* [2001]: Mittelwert von **13,8 bis 291 g.e./ml.**
- Hromadnikova *et al.* [2002]: Median von **0 bis 47,5 g.e./ml.**
- Farina *et al.* [2002]: Median von **2.08 bis 195 g.e./ml.**

Auch die von den Autoren angegebenen hohen Sensitivitäten für die SRY-PCR (91,7 % [Hromadnikova *et al.*, 2002], 94,4 % [Zhong *et al.*, 2001], 95,5 % [Farina *et al.*, 2002]) beziehen sich auf Testergebnisse aus Mehrfachbestimmungen und nicht auf die Sensitivität des einzelnen PCR-Versuchs.

Literatur	SRY-positive Schwangerschaften (Gesamtgruppe)	SSW	Mittelwert* oder Median [Kopien / ml Plasma]	[Kopien / PCR]
[Lo <i>et al.</i> , 1998]	13 (25)	11. – 17.	25,4* 20,6	1,0 – 4,1 0,8 – 3,3
[Lo <i>et al.</i> , 1999]	20 (20)	28. – 40.	76	3,0 – 6,1
[Lo <i>et al.</i> , 1999]	19 (32)	12. – 21.	23,3	0,9 – 1,9
	18 (28)	16. – 21.	16,3	0,7 – 1,4
[Lo <i>et al.</i> , 2000]	50 (50)	34. – 42.	443	35
[Wei <i>et al.</i> , 2001]	19 (30)	10. – 29.	94,4	3,8
[Zhong <i>et al.</i> , 2001]	46 (53)	29. – 42.	332,82*	5,3
[Smid <i>et al.</i> , 2001]	13 (78)	1. Trimester	20,7	1,7
	21 (78)	2. Trimester	13,4	1,1
[Hromadnikova <i>et al.</i> , 2002]	13 (21)	15. – 19.	24,5	0,5
[Farina <i>et al.</i> , 2002]	63 (63)	10.-12.	23,3	1,2

**Tabelle. 6.1: Ergebnisse von Untersuchungen zur Quantifizierung zellfreier DNA von männlichen Föten im mütterlichen Blutplasma mit Hilfe einer Y-Chromosom-spezifischen Echtzeit-SRY-PCR.** Bis auf Zhong *et al.* [2001], der die Amplifikation eines 78 Bp-PCR-Produktes beschreibt, haben alle die von Lo *et al.* [1998] etablierte *Primer*-Kombination (SRY-109F, SRY-245R) zur Amplifikation eines 137 Bp-Produktes im PCR-Versuch in Kombination mit einer TaqMan®-Sonde eingesetzt. Die hier präsentierten Ergebnisse sind jeweils anhand der Untersuchung von pathologisch unauffälligen Schwangerschaften erzielt worden. Der Zeitpunkt der Blutentnahme wird als Schwangerschaftswoche (SSW) angegeben und bezieht sich jeweils auf die Gesamtgruppe der untersuchten Frauen (auch weibliche Föten), wobei eine Quantifizierung nur bei männlichen Schwangerschaften (SRY-positiv) möglich gewesen ist. Der Mittelwert oder der Median wurde jeweils in Bezug auf die Volumina, die zur DNA-Präparation, zur Elution von der Silikagel-Säule und zum Einsatz im PCR-Versuch verwendet worden sind, umgerechnet. Das Ergebnis [Kopien / PCR] gibt die Menge von Genomäquivalenten an, die theoretisch im einzelnen PCR-Versuch detektiert werden konnte.

Die wissenschaftliche Aussagekraft der ermittelten Konzentrationen von fötaler DNA im mütterlichen Blutplasma ist aufgrund der extrem niedrigen Werte kritisch zu beurteilen. Generell besteht die Möglichkeit, eine einzelne DNA-Kopie vor dem Hintergrund einer überrepräsentierten DNA unterschiedlicher Sequenz im PCR-Versuch zu detektieren. Eine zuverlässige Quantifizierung weniger DNA-Moleküle mittels Echtzeit-PCR ist allerdings schon aufgrund der stochastischen Verteilung der Zielmoleküle in dem Reaktionsvolumen kaum möglich [Stanman & Orpana, 2001]. Je niedriger die Ausgangs-Kopienzahl im PCR-Versuch ist, desto größer wird demnach auch die Standardabweichung der im Echtzeit-PCR-Versuch ermittelten Ausgangskonzentration (siehe zum Beispiel Abb. 5.8). Es ist davon auszugehen, dass die Konzentration von fötaler DNA im mütterlichen Blutkreislauf generell nur als eine Art Richtwert mit großer Variationsbreite angegeben werden kann.

Neben den rein methodischen Variationen, die durch Probensammlung, DNA-Präparation, PCR-Versuch, Auswertung der Amplifikationskurven etc. bestehen, spielt die von der stochastischen Verteilung abhängige Variation der Ausgangskopienmenge im PCR-Versuch also ebenfalls eine entscheidende Rolle [Stanman & Orpana, 2001].

#### 6.1.6.2 Variabilität der Konzentration von fötaler DNA im mütterlichen Blutplasma

Das Testpersonen-Kollektiv ist bei den in Tabelle 6.1 aufgeführten Untersuchungen zum Teil im Hinblick auf den Schwangerschaftszeitpunkt sehr inhomogen zu beurteilen. Wie schon von Lo *et al.* [1998] beschrieben, steigt die Konzentration zellfreier DNA im mütterlichen Blutplasma mit fortschreitender Schwangerschaft an. Die höchsten Konzentrationen von 443 und ca. 333 Genomäquivalenten pro Milliliter Plasma [Lo *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2001] sind bei einer Gruppe von Frauen bis zur 42. Schwangerschaftswoche ermittelt worden. Die früheste Detektion von fötalspezifischen RHD-Sequenzen im mütterlichen Blutplasma wird von Finning *et al.* [2002] für die 11. Schwangerschaftswoche angegeben. Lo *et al.* [1998] misslang die fötalspezifische RHD-Detektion im mütterlichen Blutplasma bei zwei Versuchspersonen, die sich in der 8. bzw. 9. Woche der Schwangerschaft befunden haben. Die Blutproben, die für die vorliegende Arbeit im Evangelischen Krankenhaus Oberhausen gesammelt worden sind, stammen von Frauen, deren Schwangerschaft sich im Übergang vom 1. zum 2. Trimester (ca. 12. bis 16. Schwangerschaftswoche) befunden hat. Theoretisch war also die Voraussetzung gegeben, anhand dieser Proben fötale DNA im mütterlichen Plasma zu detektieren.

Neben physiologischen Gegebenheiten können auch pathologische Umstände die Konzentration fötaler DNA im mütterlichen Blut beeinflussen. So wird das Auftreten früher Wehen und Präeklampsie [Lo *et al.*, 2001; Leung *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 2001 und 2002] oder eine beim Fötus vorliegende Trisomie 21 [Lo *et al.*, 1999; Hromadnikova *et al.*, 2002] mit einer Erhöhung der fötalen zellfreien DNA in Beziehung gebracht. Es wurde gezeigt, dass eine Preeklampsie mit der Apoptose von Cytotrophoblasten verbunden ist [DiFederico *et al.*, 1999]. Die Formation von mehrkernigen Syncytotrophoblasten, die durch Fusionierung und Differenzierung aus den einkernigen Cytotrophoblasten entstehen, ist bei Trisomie 21-Schwangerschaften gestört [Frendo & Muller, 2001]. Eine krankhafte Veränderung der Plazenta aufgrund verschiedener Ursachen könnte demnach in direkter Beziehung zu erhöhten Konzentrationen fötaler DNA im mütterlichen Blut stehen [Smid *et al.*, 2001]. Bei Frauen, deren Blutproben für die Quantifizierung fötaler DNA verwendet werden soll, müssen verschiedene Auswahlkriterien festgelegt werden, um die Schwangerschaft als pathologisch unauffällig einstufen zu können.

Zhong *et al.* [2000 b] schließen zum Beispiel von vornherein Frauen aus ihrem Untersuchungskollektiv aus, bei denen hämatologische Krankheiten, chronischer Bluthochdruck, Vaginalblutungen, Anzeichen von Preeklampsie oder angeborene Anomalien beim Fötus vorliegen.

Schwer zu beurteilen ist ebenfalls, in wie weit die DNA-Konzentration im Blutplasma individuellen Schwankungen unterworfen ist (siehe Abb. 5.10 und siehe 5.3.4). Zhong *et al.* [2000 a] stellen im Zeitraum von drei Tagen bei 13 normalen Blutspendern eine durchschnittlich 13,5-fache Konzentrationsschwankung der Blutplasma-DNA fest. Die gleiche Untersuchung anhand von 16 schwangeren Testpersonen (14. bis 37. Schwangerschaftswoche) ergab eine mittlere 21,5-fache Konzentrationsschwankung für deren Blutplasma-DNA, wobei für die 10 Schwangeren mit männlichen Föten eine 1,4- bis 4,5-fache Schwankung der fötalen DNA-Konzentration ermittelt wurde.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind viele PCR-Versuche unternommen worden, um die fötalspezifischen RHD-Sequenzen in mütterlicher Plasma-DNA zu detektieren. Hierbei wurden generell sehr hohe Ct-Werte beobachtet, außerdem eine große Variabilität der Werte von Mehrfachbestimmungen (siehe Tab. 5.4). Auch andere Autoren haben die gleichen Beobachtungen gemacht. Finning *et al.* [2002] erwähnen, dass sie allgemein Ct-Werte ab 45 als negatives Testergebnis gewertet haben. Legler *et al.* [2002] dokumentieren die Variabilität ihrer Messwerte durch Abbildung der unterschiedlichen Amplifikationskurven einer Vierfachbestimmung.

#### 6.1.6.3 Beurteilung der Qualität von aus mütterlichem Blutplasma isolierter DNA

Die äußerst geringe Konzentration der fötalspezifischen zellfreien DNA gegenüber dem mütterlichen DNA-Anteil im Plasma der Frauen war eine Schwierigkeit bei der Entwicklung des RHD-PCR-Tests. Die andere Schwierigkeit lag darin, die Qualität der fötalspezifischen DNA im Hinblick auf die Gewährleistung der PCR-Amplifikationseffizienz abschätzen zu können.

Mit der Phenol-Chloroform-Extraktion konnte man eine ausreichend hohe Menge DNA für den PCR-Versuch präparieren (siehe 5.3.4). Im RHCE-PCR-Versuch wurden hierbei auch niedrigere Ct-Werte erzielt im Vergleich zum Einsatz von DNA-Präparaten, die mit Hilfe der Säulenextraktion anhand der gleichen Plasmaprobe erstellt wurden ( $\Delta Ct_{\text{Säulenextr.}-\text{Phenol-Extr.}}$  betrug ca. 3 PCR-Zyklen, siehe 5.5.1.1). Es wurde allerdings beobachtet, dass die Amplifikationskurven der DNA-Proben der Phenol-Chloroform-Extraktion flacher ausfielen (siehe Abb. 5.13). Bei der Detektion von fötalspezifischen RHD-Sequenzen im mütterlichen Blutplasma konnte außerdem kein besseres Ergebnis erzielt werden, wenn anstatt der DNA-Proben der Säulenextraktion Präparate der Phenol-Chloroform-Extraktion eingesetzt wurden (hier nicht dokumentiert).

Es kann davon ausgegangen werden, dass die Plasma-DNA stark degradiert vorliegt (siehe 6.1.5.3). Anscheinend passieren die kurzen DNA-Fragmente die Silikagelmembran-Säule, wohingegen die wenigen hochmolekularen Fragmente zurückgehalten werden. Bei der Phenol-Chloroform-Extraktion werden alle DNA-Fragmente isoliert, allerdings gelingt eine Amplifikation nur mit den höhermolekularen Nukleinsäuren. Auch auf die niedermolekularen DNA-Fragmente können *Primer* hybridisieren und damit die Polymerisation eingeleitet werden, allerdings gelingt nicht die vollständige Synthese amplifizierbarer Produkte. Die kurzen Fragmente scheinen also mit den amplifizierbaren Fragmenten um die *Primer* zu konkurrieren. Die PCR-Effizienz wird bei fortschreitender PCR-Zyklenzahl geschwächt und die Amplifikationskurven flachen somit frühzeitig ab. Diese Hypothese konnte auch bei dem Vergleich der Amplifikation verschiedener PCR-Produktlängen bei der RHD-PCR mit Blutplasma-DNA von schwangeren RhD-negativen Frauen bestätigt werden (siehe 5.5.1.2). Die Amplifikationskurven, die der RHD-PCR mit DNA aus der Phenol-Chloroform-Extraktion zuzuordnen sind, fallen für das größte PCR-Produkt (186 Bp) flacher aus im Vergleich zu den beiden kürzeren RHD-PCR-Produkten (74 Bp, 105 Bp). Diese Tendenz ist bei den Amplifikationkurven von DNA aus der Säulenextraktion nicht zu beobachten. In diesem Fall waren dafür falsch negative RHD-Signale beobachtet worden, was ein Hinweis auf die im Vergleich zur Phenol-Chloroform-Extraktion geringere DNA-Ausbeute war (siehe Abb. 5.16, Diagramm H und Tabelle 5.3).

## 6.2 RHD-Zygotiebestimmung

Wagner & Flegel [2000] haben die genetisch strukturellen Gegebenheiten der RHD-Deletion aufgeklärt. Auf der Grundlage dieser Untersuchungen haben Chiu *et al.* [2001] kurze Zeit später zwei unabhängige Methoden zur Bestimmung der RHD-Zygotie vorgestellt. Ein Vergleich der ermittelten RHD-Zygotien von Testpersonen aus beiden Untersuchungsreihen konnte die Zuverlässigkeit ihrer Tests bestätigen. Einmal weisen sie die bei RHD-heterozygoten Testpersonen vorliegende Deletion des RHD-Gens anhand der Amplifikation eines PCR-Produktes (1507 Bp) nach, welches die Deletionsbruchstelle überspannt. Die andere Methode beinhaltete die relative Quantifizierung des RHD-Gens in Bezug auf das Albumin-Gen durch Anwendung der Echtzeit-PCR unter Gebrauch von Taqman®-Sonden. Anhand der berechneten Differenz der Ct-Werte, die jeweils in der RHD- und Albumin-spezifischen PCR erhalten worden sind, konnten homozygote ( $\Delta Ct_{\text{RHD-Albumin}} = 1,70 \pm 0,17$ ) und heterozygote ( $\Delta Ct_{\text{RHD-Albumin}} = 2,62 \pm 0,29$ ) RHD-Genotypen eindeutig bestimmt werden.

Ähnliche relative Genquantifizierungen wurden auch schon auf das PMP22 (*Homo Sapiens Peripheral Myelin Protein 22*)-Gen angewendet [Young, 1998; Aarskog & Vedeler, 2000]. Dieses Gen liegt in einer 1,5 Mb Region im Chromosom 17p11.2-p12, welche für das Auftreten zweier Krankheiten eine entscheidene Rolle spielt. Eine heterozygote Deletion dieser Region liegt bei Patienten mit HNPP (*Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsies*) vor, eine heterozygote Duplikation hingegen bei Patienten mit Charcot-Marie-Tooth Typ 1 A. Bei der relativen Genquantifizierung in Bezug auf ein Vergleichs-Gen konnte somit das Verhältnis der Genkopien-Anzahl von 1:2 bzw. 3:2 detektiert werden.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war nun die Entwicklung eines routinefähigen Multiplex-PCR-Tests, der eine relative Allel-Quantifizierung des RHD- zum RHCE-Gen vornehmen und damit eine Rhesus-D Zygotiebestimmung für betroffene Väter ermöglichen sollte (siehe 5.6). Im Fall des Genotypisierungsergebnis eines RhD-negativen Vaters könnte sich die Rhesus-Anti-D-Prophylaxe bei RhD-negativen Schwangeren (siehe 2.1.4) erübrigen. Zu Bedenken ist allerdings, dass die Vaterschaft in jedem Fall zweifelsfrei bei dem zu untersuchenden Mann vorliegen muß. Da kein validiertes Probenmaterial vorhanden war, wurde in Anlehnung zu dem Vorgehen von Chiu *et al.* [2001] die Zuverlässigkeit der entwickelten MS-PCR mit RHD- und RHCE-spezifischem *Beacon-Primer* (siehe 5.6.2) durch den Ergebnisvergleich mit einer zweiten Methode bestätigt. Hierfür wurden die DNA-Proben des Testpersonen-Kollektivs ebenfalls mittels einer Quantitativen Fluoreszenz- (QF-) PCR zur relativen Quantifizierung von RHD zu RHCE untersucht (siehe 5.6.1).

Die Methode der QF-PCR findet unter anderem Anwendung bei der Erkennung von Aneuploidien des ungeborenen Kindes. Ausgangsmaterial für die molekulargenetische Untersuchung ist hierbei Zellmaterial, dass bei einem invasiven pränatalen Eingriff (siehe 2.2.1) gewonnen wird. Im PCR-Versuch werden fluoreszenzmarkierte Mikrosatellitenmarker verwendet, die chromosomenspezifische, hochpolymorphe (8 bis 12 Allele) *Short Tandem Repeats* (STRs) detektieren. Der Vergleich der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten der erhaltenen PCR-Produkte, die proportional der Anzahl von Ausgangssequenzen sind, ermöglichen eine Aussage darüber, ob der untersuchte Genabschnitt mono-, di- oder triallelisch vorhanden ist [Pertl *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2000].

Mit beiden PCR-Methoden wurden jeweils anhand der Untersuchung von RhD-positiven Blutspendern zwei unterschiedliche Datenpopulationen ermittelt, die entweder auf den RHD-homozygoten oder den RHD-heterozygoten Genotyp schließen lassen. In 96,55 % (84 von 87 Testpersonen) der Fälle stimmte hierbei die Einzeldiagnose der RHD-Zygotie aus beiden Untersuchungsreihen überein. Die 11 RhD-negativen Blutspender wurden ebenfalls richtig erkannt.

Somit wurden also für D (vorhandenes RHD-Gen) und d (Deletion des RHD-Gens) Allelfrequenzen von 0,71 bzw. 0,29 ermittelt.

Ungefähr 15 % der europäischen Bevölkerung sind RhD-negativ [Wagner *et al.*, 2001]. Hieraus ergibt sich nach dem Hardy Weinberg-Gleichgewicht (siehe 4.8.1.2) für D und d eine Allelfrequenz von 0,61 bzw. 0,39. Man kann also von dem untersuchten Testpersonen-Kollektiv nicht direkt auf die Grundgesamtheit der europäischen Bevölkerung schließen. Für die vorgenommene Zygotiebestimmung stand aber für jede Allelkombination (DD, dD, dd) eine repräsentative Menge von Testpersonen (50, 34, 11 untersuchte Fälle) zur Verfügung.

Beide Untersuchungsreihen weisen zwei Extremwerte auf (siehe Abb. 5.22, 5.23, 5.25 und 5.26, Standardabweichung  $\sim 3$ ). Hierbei handelt es sich für beide Untersuchungsmethoden um Versuchsergebnisse, die anhand der Untersuchung von DNA-Proben der gleichen Testpersonen ermittelt werden konnten. Es ist also davon auszugehen, dass diese Werte nicht durch einen systematischen Messfehler verursacht wurden. Die Höhe der erhaltenen *Peak*-Integrale in der QF-PCR lagen im Mittelfeld aller erhaltenen *Peak*-Höhen. Die bei der Echtzeit-RHCE-PCR ermittelten Ct-Werte waren unauffällig, allerdings fielen die für die RHD-PCR ermittelten Werte höher aus, im Vergleich zu den anderen Messergebnissen der als RHD-heterozygot bestimmten Gruppe. Eventuell lag bei den betroffenen Personen eine Mutation in dem für die angewendete RHD-PCR wichtigen Sequenzabschnitt vor, so dass die Effizienz der RHD-spezifischen Amplifikation herabgesetzt wurde. Das Ziel der Untersuchung bestand lediglich darin, zwei deutlich voneinander getrennte Datenpopulationen zu erhalten. Von einer genauen Analyse der mit beiden Untersuchungsmethoden detektierten, eventuell vorliegenden Sequenzmutationen bei den auffälligen Testpersonen wurde deswegen abgesehen.

Das nicht eindeutige Ergebnis der RHD-Zygotiebestimmung für die Testperson m16 (siehe Tab. 5.13) kann mit einem Messfehler bei der QF-PCR erklärt werden. Anscheinend war im PCR-Versuch nicht genügend DNA eingesetzt worden, denn die erhaltenen *Peak*-Integrale für RHD und RHCE wiesen die niedrigste Höhe von allen erhaltenen Integralen auf. In diesem Fall kann somit mehr dem Ergebnis der Echtzeit-PCR vertraut werden, mit der ein RHD-homozygoter Genotyp diagnostiziert wurde. Die Diskrepanz zwischen beiden Untersuchungsmethoden zur RHD-Zygotiebestimmung in den Fällen f21 und f24 (siehe Tab. 5.13) lässt sich dagegen nicht so einfach erklären. Da das Ergebnis der Echtzeit-PCR aber auf einer Dreifachbestimmung beruht und der  $\Delta$  Ct-Wert für beide Personen jeweils im 95 % Konfidenzintervall vom Mittelwert und Median liegt, ist in beiden Fällen wohl von dem RHD-heterozygoten Genotyp auszugehen.

## 7 Ausblick

Seit der Entdeckung von zellfreier fötaler DNA im mütterlichen Blutplasma [Lo *et al.*, 1997] wurden zahlreiche Versuche unternommen, durch die molekulargenetischen Untersuchung dieses Materials eine nicht-invasive Pränataldiagnostik zu entwickeln (siehe Tab. 2.2). Bis heute ist es allerdings nicht gelungen, dieses Vorhaben für die klinische Routinediagnostik umzusetzen. Das biologische Phänomen der Rhesus-Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind stellt ein gutes Beispiel dar, um im Blut der Schwangeren fötalspezifische DNA nachzuweisen, die von der mütterlichen Erbinformation abweicht. Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit deutet allerdings darauf hin, dass die molekulargenetische Untersuchung von zellfreier fötaler DNA im Hinblick auf einen Einzelgenunterschied zwischen Mutter und Kind nicht die gleiche Aussagekraft erreichen wird, wie die Untersuchung von fötalem Zellmaterial, welches nur mit Hilfe invasiver Untersuchungsmethoden in ausreichendem Maß gewonnen werden kann. Die zellfreie fötale DNA im mütterlichen Blutkreislauf zeigt sowohl in quantitativer, als auch qualitativer Hinsicht eine große individuelle Variabilität. Die biologischen Mechanismen, die zur Freisetzung fötaler DNA in den mütterlichen Blutkreislauf führen, sind noch nicht im Detail geklärt worden [Bianchi, 1998], ebenso der Zeitpunkt für die Blutabnahme, bei dem der Schwangeren gewährleistet werden kann, dass sich aus dem Plasma genügend fötale DNA-Sequenzen zur Detektion isolieren lassen. Die technologischen Voraussetzungen der PCR sind mittlerweile weit fortgeschritten. Die Detektion geringster Mengen Fremd-Nukleotide im Blut ist mit Hilfe dieser Technologie möglich, was insbesondere in der Krebsdiagnostik [Chen *et al.*, 1996; Anker *et al.*, 1997], oder der Diagnose viraler Infektionen Anwendung findet [Soderberg-Naucler *et al.*, 1997]. Die Fortschritte auf dem Gebiet der SNP-Analyse zeigen deutlichen Spezifitätsgewinn bei der Verwendung von alleldiskriminierenden Oligonukleotiden [Newton *et al.*, 1989; Rust *et al.*, 1993], was für die eindeutige Unterscheidung von fötalspezifischen RHD-Sequenzen vor dem Hintergrund der mütterlichen RHCE-Sequenzen gewährleistet sein muß. Trotzdem ist der Verzicht auf die Rhesus-Anti-D-Prophylaxebehandlung zu Gunsten eines nicht-invasiven pränatalen RHD-Genotypisierungstests, wie er auch in der vorliegenden Arbeit vorgestellt wird, zum jetzigen Zeitpunkt medizinisch nicht vertretbar.

Wahrscheinlich wird in Zukunft die molekulargenetische Untersuchung von zellfreier fötaler DNA auf Einzeldefekte des Kindes, oder auch die Quantifizierung dieses Materials im mütterlichen Blutplasma zur Erkennung pathologisch auffälliger Schwangerschaften lediglich als eine Art *Screening*-Test mit hoher Fehlerquote angeboten werden können.

Wie bei den heute schon routinemäßig angewendeten nicht-invasiven Pränataldiagnostikmethoden zur Risikoeinschätzung von beim Fötus vorliegenden Aneuploidien (Triple-Test), muß dann die verantwortungsvolle Interpretation der Untersuchungsergebnisse gemeinsam vom Labormediziner und dem betreuenden Arzt durchgeführt werden. Die aus der Diagnose getroffenen Konsequenzen für die Schwangerschaft sind anschließend unter Einbeziehung der betroffenen Frau abzuwägen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein funktionsfähiger Test für die RHD-Zygotiebestimmung von Testpersonen entwickelt werden. Da die molekulargenetische Detektion des RHD-Gens auf einen Abschnitt im Exon 7 von RHD beschränkt ist, kann der Test nicht auf Personen afrikanischer Abstammung mit dem Pseudogen RHD $\Psi$  angewendet werden. Der Test sollte somit eine auf Männer europäischer Abstammung beschränkte Anwendung finden. Um in der Routinediagnostik erfolgreich durchgeführt werden zu können, muß für den Test allerdings noch eine standardisierte Methode zur Auswertung der im Echtzeit-PCR-Versuch ermittelten Ct-Werte erarbeitet werden.

## 8 Literatur

- Aarskog** NK, Vedeler CA. Real-time quantitative polymerase chain reaction. A new method that detects both the peripheral myelin protein 22 duplication in Charcot-Marie-Tooth type 1A disease and the peripheral myelin protein 22 deletion in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Hum.Genet.* **2000**;107:494-498.
- Al-Soud** WA, Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J.Clin.Microbiol.* **2001**;39:485-493.
- Amicucci** P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin.Chem.* **2000**;46:301-302.
- Andrews** KT, Wolter LC, Saul A, Hyland CA. The RhD- trait in a white patient with the RhCCee phenotype attributed to a four-nucleotide deletion in the RHD gene. *Blood* **1998**;92:1839-1840.
- Angert** RM, LeShane ES, Lo YM, Chan LY, Delli-Bovi LC, et al. Fetal cell-free plasma DNA concentrations in maternal blood are stable 24 hours after collection: analysis of first- and third-trimester samples. *Clin.Chem.* **2003**;49:195-198.
- Anker** P, Lefort F, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, et al. K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology* **1997**;112:1114-1120.
- Aubin** JT, Le Van KC, Mouro I, Colin Y, Bignozzi C, et al. Specificity and sensitivity of RHD genotyping methods by PCR-based DNA amplification. *Br.J.Haematol.* **1997**;98:356-364.
- Avent** ND, Martin PG, Armstrong-Fisher SS, Liu W, Finning KM, et al. Evidence of genetic diversity underlying Rh D-, weak D (Du), and partial D phenotypes as determined by multiplex polymerase chain reaction analysis of the RHD gene. *Blood* **1997**;89:2568-2577.
- Avent** ND, Finning KM, Martin PG, Soothill PW. Prenatal determination of fetal blood group status. *Vox Sang.* **2000**;78 Suppl 2:155-162.
- Avent** ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood* **2000**;95:375-387.
- Benachi** A, Steffann J, Gautier E, Ernault P, Olivi M, et al. Fetal DNA in maternal serum: does it persist after pregnancy? *Hum.Genet.* **2003**;113:76-79.
- Benirschke** K. Anatomical relationship between fetus and mother. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1994**;731:9-20:9-20.
- Bennett** PR, Le Van KC, Colin Y, Warwick RM, Cherif-Zahar B, et al. Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. *N.Engl.J.Med.* **1993**;329:607-610.
- Bianchi** DW, Mahr A, Zickwolf GK, Houseal TW, Flint AF, et al. Detection of fetal cells with 47,XY,+21 karyotype in maternal peripheral blood. *Hum.Genet.* **1992**;90:368-370.
- Bianchi** DW, Yih MC, Zickwolf GK, Flint AF. Transferrin receptor (CD71) expression on circulating mononuclear cells during pregnancy. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **1994**;170:202-206.
- Bianchi** DW. Prenatal diagnosis by analysis of fetal cells in maternal blood. *J.Pediatr.* **1995**;127:847-856.
- Bianchi** DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **1996**;93:705-708.
- Bianchi** DW, Williams JM, Sullivan LM, Hanson FW, Klinger KW, et al. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am.J.Hum.Genet.* **1997**; 61:822-829.

- Bianchi DW.** Current knowledge about fetal blood cells in the maternal circulation. *J.Perinat.Med.* **1998**;26:175-185.
- Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, Evans MI, Elias S, et al.** Fetal cells in maternal blood: NIFTY clinical trial interim analysis. DM-STAT. NICHD fetal cell study (NIFTY) group. *Prenat.Diagn.* **1999**;19:994-995.
- Bianchi DW, Lo YM.** Fetomaternal cellular and plasma DNA trafficking: the Yin and the Yang. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **2001**;945:119-31.:119-131.
- Bischoff FZ, Nguyen DD, Marquez-Do D, Moise KJJ, Simpson JL, et al.** Noninvasive determination of fetal RhD status using fetal DNA in maternal serum and PCR. *J.Soc.Gynecol.Investig.* **1999**;6:64-69.
- Blum, Beier, Gross.** *Elektrophoresis* **1987**;8:93-99.
- Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, Shelepov V, Alechina R, et al.** Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. *Clin.Chem.* **2000**;46:1078-1084.
- Breslauer KJ, Frank R, Blocker H, Marky LA.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**;83:3746-3750.
- Bustin SA.** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J.Mol.Endocrinol.* **2000**;25:169-193.
- Cacheux V, Milesi-Fluet C, Tachdjian G, Druart L, Bruch JF, et al.** Detection of 47,XXY trophoblast fetal cells in maternal blood by fluorescence in situ hybridization after using immunomagnetic lymphocyte depletion and flow cytometry sorting. *Fetal Diagn.Ther.* **1992**;7:190-194.
- Camaschella C, Alfarano A, Gottardi E, Travi M, Primignani P, et al.** Prenatal diagnosis of fetal hemoglobin Lepore-Boston disease on maternal peripheral blood. *Blood* **1990**;75:2102-2106.
- Carritt B, Kemp TJ, Poulter M.** Evolution of the human RH (rhesus) blood group genes: a 50 year old prediction (partially) fulfilled. *Hum.Mol.Genet.* **1997**;6:843-850.
- Chan AK, Chiu RW, Lo YM.** Cell-free nucleic acids in plasma, serum and urine: a new tool in molecular diagnosis. *Ann.Clin.Biochem.* **2003**;40:122-130.
- Chen CP, Chern SR, Wang W.** Fetal DNA in maternal plasma: the prenatal detection of a paternally inherited fetal aneuploidy. *Prenat.Diagn.* **2000**;20:355-357.
- Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, Kurt AM, et al.** Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat.Med.* **1996**;2:1033-1035.
- Cheung MC, Goldberg JD, Kan YW.** Prenatal diagnosis of sickle cell anaemia and thalassaemia by analysis of fetal cells in maternal blood. *Nat.Genet.* **1996**;14:264-268.
- Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chow KC, Chui DH, et al.** Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet* **2002**;360:998-1000.
- Chiu RW, Lo YM.** Non-invasive prenatal diagnosis: on the horizon? *Pharmacogenomics* **2003**;4:191-200.
- Colin Y, Cherif-Zahar B, Le Van KC, Raynal V, Van HV, et al.** Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood* **1991**;78:2747-2752.
- Crombach G, Picard F, Beckmann M, Tutschek B, Bald R, et al.** Fetal Rhesus D genotyping on amniocytes in allo-immunised pregnancies using fluorescence duplex polymerase chain reaction. *Br.J.Obstet.Gynaecol.* **1997**;104:15-19.
- D'Aquila RT, Bechtel LJ, Videler JA, Eron JJ, Gorczyca P, et al.** Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. *Nucleic.Acids.Res.* **1991**;19:3749

- Daniels** GL, Faas BH, Green CA, Smart E, Maaskant-van WP, et al. The VS and V blood group polymorphisms in Africans: a serologic and molecular analysis. *Transfusion* **1998**;38:951-958.
- David** B, Bernard D, Navenot JM, Muller JY, Blanchard D. Flow cytometric monitoring of red blood cell chimerism after bone marrow transplantation. *Transfus.Med.* **1999**;9:209-217.
- de la Cruz**, Shifrin H, Elias S, Simpson JL, Jackson L, et al. Prenatal diagnosis by use of fetal cells isolated from maternal blood. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **1995**;173:1354-1355.
- DeMaria** MA, Zheng YL, Zhen D, Weinschenk NM, Vadnais TJ, et al. Improved fetal nucleated erythrocyte sorting purity using intracellular antifetal hemoglobin and Hoechst 33342. *Cytometry* **1996**;25:37-45.
- Don** RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic.Acids.Res.* **1991**;19:4008
- Durrant** LG, Martin WL, McDowall KM, Liu DT. Isolation of fetal trophoblasts and nucleated erythrocytes from the peripheral blood of pregnant women for prenatal diagnosis of fetal aneuploidies. *Early Hum.Dev.* **1996**;47 Suppl:79-83
- Elias** S, Price J, Dockter M, Wachtel S, Tharapel A, et al. First trimester prenatal diagnosis of trisomy 21 in fetal cells from maternal blood. *Lancet* **1992**;340:1033
- Faas** BH, Beckers EA, Simsek S, Overbeeke MA, Pepper R, et al. Involvement of Ser103 of the Rh polypeptides in G epitope formation. *Transfusion* **1996**;36:506-511.
- Faas** BH, Beuling EA, Christiaens GC, von dem Borne AE, van der Schoot CE. Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *Lancet* **1998**;352:1196
- Finning** KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* **2002**;42:1079-1085.
- Flegel** WA, Wagner FF, Muller TH, Gassner C. Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. *Transfus.Med.* **1998**;8:281-302.
- Frendo** JL, Muller F. Placenta et trisomie 21. *Gynecol.Obstet.Fertil.* **2001**;29:538-544.
- Freeman** WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* **1999**; 26:112-115.
- Ganshirt-Ahlert** D, Burschik M, Garritsen HS, Helmer L, Miny P, et al. Magnetic cell sorting and the transferrin receptor as potential means of prenatal diagnosis from maternal blood. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **1992**;166:1350-1355.
- Ganshirt-Ahlert** D, Borjesson-Stoll R, Burschik M, Dohr A, Garritsen HS, et al. Detection of fetal trisomies 21 and 18 from maternal blood using triple gradient and magnetic cell sorting. *Am.J.Reprod.Immunol.* **1993**;30:194-201.
- Gassner** C, SchmarDA A, Kilga-Nogler S, Jenny-Feldkircher B, Rainer E, et al. RHD/CE typing by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. *Transfusion* **1997**;37:1020-1026.
- Geifman-Holtzman** O, Bernstein IM, Berry SM, Holtzman EJ, Vadnais TJ, et al. Fetal RhD genotyping in fetal cells flow sorted from maternal blood. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **1996**;174:818-822.
- Goldberg** JD. Fetal cells in maternal circulation: progress in analysis of a rare event. *Am.J.Hum.Genet.* **1997**;61:806-809.
- Gonzalez-Gonzalez** MC, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ, Rodriguez dA, Lorda-Sanchez I, et al. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat.Diagn.* **2002**;22:946-948.
- Gustincich** S, Manfioletti G, Del SG, Schneider C, Carninci P. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques* **1991**;11:298-300, 302.

- Halford** WP. The essential prerequisites for quantitative RT-PCR. *Nat.Biotechnol.* **1999**;17:835.
- Hamada** H, Arinami T, Kubo T, Hamaguchi H, Iwasaki H. Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age. *Hum.Genet.* **1993**;91:427-432.
- Harms** V. *Biomathematik, Statistik und Dokumentation*. Harms Verlag, Kiel **1998**.
- Hawes** C, Kalionis B, Jones W. Isolating fetal trophoblast cells for prenatal genetic diagnosis. *JAMA* **1994**;271:1079-1080.
- Heid** CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **1996**;6:986-994.
- Henderson** KG, Shaw TE, Barrett IJ, Telenius AH, Wilson RD, et al. Distribution of mosaicism in human placentae. *Hum.Genet.* **1996**;97:650-654.
- Herzenberg** LA, Bianchi DW, Schroder J, Cann HM, Iverson GM. Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **1979**;76:1453-1455.
- Hessner** MJ, Luhm RA, Pearson SL, Endean DJ, Friedman KD, et al. Prevalence of prothrombin G20210A, factor V G1691A (Leiden), and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T in seven different populations determined by multiplex allele-specific PCR. *Thromb.Haemost.* **1999**;81:733-738.
- Higuchi** R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N.Y.)* **1992**;10:413-417.
- Holland** PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **1991**;88:7276-7280.
- Honda** H, Miharu N, Ohashi Y, Ohama K. Successful diagnosis of fetal gender using conventional PCR analysis of maternal serum. *Clin.Chem.* **2001**;47:41-46.
- Houfflin-Debarge** V, O'Donnell H, Overton T, Bennett PR, Fisk NM. High sensitivity of fetal DNA in plasma compared to serum and nucleated cells using unnested PCR in maternal blood. *Fetal Diagn.Ther.* **2000**;15:102-107.
- Huang** CH. Alteration of RH gene structure and expression in human dCCee and DCW-red blood cells: phenotypic homozygosity versus genotypic heterozygosity. *Blood* **1996**;88:2326-2333.
- Hyland** CA, Wolter LC, Saul A. Three unrelated Rh D gene polymorphisms identified among blood donors with Rhesus CCee (r'r) phenotypes. *Blood* **1994**;84:321-324.
- Innis** MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **1988**;85:9436-9440.
- Issitt** PD. The Rh blood group system, 1988: eight new antigens in nine years and some observations on the biochemistry and genetics of the system. *Transfus.Med.Rev.* **1989**;3:1-12.
- Jen** J, Wu L, Sidransky D. An overview on the isolation and analysis of circulating tumor DNA in plasma and serum. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **2000**.Apr.;906.:8-12. **2000**;906:8-12.
- Kolialexi** A, Tsangaris GT, Antsaklis A, Tzortzatou F, Amentas C, et al. Apoptosis in maternal peripheral blood during pregnancy. *Fetal Diagn.Ther.* **2001**;16:32-37.
- Krabchi** K, Gros-Louis F, Yan J, Bronsard M, Masse J, et al. Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques. *Clin.Genet.* **2001**;60:145-150.
- Kuo** WL, Tenjin H, Segraves R, Pinkel D, Golbus MS, et al. Detection of aneuploidy involving chromosomes 13, 18, or 21, by fluorescence in situ hybridization (FISH) to interphase and metaphase amniocytes. *Am.J.Hum.Genet.* **1991**;49:112-119.

- Kwok S**, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* **1989**;339:237-238.
- Lan JC**, Chen Q, Wu DL, Ding H, Pong DB, et al. Genetic polymorphism of RhD-negative associated haplotypes in the Chinese. *J.Hum.Genet.* 2000;45:224-227.
- Landsteiner K**, Wiener AS. An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood. *Proc Soc Exp Biol Med.* **1940**;43:223.
- Lee TH**, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion* **2001**;41:276-282.
- Legler TJ**, Lynen R, Maas JH, Pindur G, Kulenkampff D, et al. Prediction of fetal Rh D and Rh CcEe phenotype from maternal plasma with real-time polymerase chain reaction. *Transfus.Apheresis.Sci.* **2002**;27:217-223.
- Lewis DE**, Schober W, Murrell S, Nguyen D, Scott J, et al. Rare event selection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood by flow cytometry. *Cytometry* **1996**;23:218-227.
- Lin Z**, Floros J. Protocol for genomic DNA preparation from fresh or frozen serum for PCR amplification. *Biotechniques* **2000**;29:460-462.
- Livak KJ**, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR.Methods Appl.* **1995**;4:357-362.
- Lo YM**, Patel P, Wainscoat JS, Sampietro M, Gillmer MD, et al. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet* **1989**;2:1363-1365.
- Lo YM**, Bowell PJ, Selinger M, Mackenzie IZ, Chamberlain P, et al. Prenatal determination of fetal RhD status by analysis of peripheral blood of rhesus negative mothers. *Lancet* **1993**;341:1147-1148.
- Lo YM**, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* **1997**;350:485-487.
- Lo YM**, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am.J.Hum.Genet.* **1998**;62:768-775.
- Lo YM**, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N.Engl.J.Med.* **1998**;339:1734-1738.
- Lo YM**, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am.J.Hum.Genet.* **1999**;64:218-224.
- Lo YM**, Lau TK, Chan LY, Leung TN, Chang AM. Quantitative analysis of the bidirectional fetomaternal transfer of nucleated cells and plasma DNA. *Clin.Chem.* **2000**;46:1301-1309.
- Lo YM**. Fetal DNA in maternal plasma: application to non-invasive blood group genotyping of the fetus. *Transfus.Clin.Biol.* **2001**;8:306-310.
- Maaskant-van WP**, Faas BH, de RJ, Overbeeke MA, von dem Borne AE, et al. Genotyping of RHD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six RHD-specific exons. *Transfusion* **1998**;38:1015-1021.
- Martin WL**, Durrant LG, Liu DT. Non-invasive fetal cell isolation from maternal blood. *Br.J.Obstet.Gynaecol.* **1998**;105:576-583.
- Mesker WE**, Ouwerkerk-van VM, Oosterwijk JC, Bernini LF, Golbus MS, et al. Two-colour immunocytochemical staining of gamma (gamma) and epsilon (epsilon) type haemoglobin in fetal red cells. *Prenat.Diagn.* **1998**;18:1131-1137.
- Mollison PL**, Engelfriet CP, Contreras M. *Blood transfusion in clinical medicine.* Blackwell Science, London 1997.

- Mueller** UW, Hawes CS, Wright AE, Petropoulos A, DeBoni E, et al. Isolation of fetal trophoblast cells from peripheral blood of pregnant women. *Lancet* **1990**;336:197-200.
- Mueller** TH, Hallensleben M, Schunter F, Blasczyk F. Molekulargenetische Blutgruppendiagnostik: Grundlagen und klinische Anwendungen. *Deutsches Ärzteblatt* **2001**;98:317-322.
- Mullis** K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **1986**;51 Pt 1:263-273.
- Mullis** KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **1987**;155:335-50.:335-350.
- Murray** JC, Karp LE, Williamson RA, Cheng EY, Luthy DA. Rh isoimmunization related to amniocentesis. *Am.J.Med.Genet.* **1983**;16:527-534.
- Nawroz** H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat.Med.* **1996**;2:1035-1037.
- Nelson** M, Eagle C, Langshaw M, Popp H, Kronenberg H. Genotyping fetal DNA by non-invasive means: extraction from maternal plasma. *Vox Sang.* **2001**;80:112-116.
- Newton** CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic.Acids.Res.* **1989**;17:2503-2516.
- Okuda** H, Kawano M, Iwamoto S, Tanaka M, Seno T, et al. The RHD gene is highly detectable in RhD-negative Japanese donors. *J.Clin.Invest.* **1997**;100:373-379.
- Okuda** H, Suganuma H, Tsudo N, Omi T, Iwamoto S, et al. Sequence analysis of the spacer region between the RHD and RHCE genes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **1999**;263:378-383.
- Okuda** H, Suganuma H, Kamesaki T, Kumada M, Tsudo N, et al. The analysis of nucleotide substitutions, gaps, and recombination events between RHD and RHCE genes through complete sequencing. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **2000**;274:670-683.
- Oosterwijk** JC, Mesker WE, Ouwerkerk-van VM, Knepfle CF, Wiesmeijer KC, et al. Prenatal diagnosis of trisomy 13 on fetal cells obtained from maternal blood after minor enrichment. *Prenat.Diagn.* **1998**;18:1082-1085.
- Passarge** E. *Color Atlas of Genetics*. Thieme, **2000**.
- Pembrey** ME, Weatherall DJ, Clegg JB. Maternal synthesis of haemoglobin F in pregnancy. *Lancet* **1973**;1:1350-1354.
- Pertl** B, Pieber D, Lercher-Hartlieb A, Orescovic I, Haeusler M, et al. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy by quantitative fluorescent PCR on fetal samples from mothers at high risk for chromosome disorders. *Mol.Hum.Reprod.* **1999**;5:1176-1179.
- Pertl** B, Sekizawa A, Samura O, Orescovic I, Rahaim PT, et al. Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. *Hum.Genet.* **2000**;106:45-49.
- Poon** LL, Leung TN, Lau TK, Lo YM. Prenatal detection of fetal Down's syndrome from maternal plasma. *Lancet* **2000**;356:1819-1820.
- Price** JO, Elias S, Wachtel SS, Klinger K, Dockter M, et al. Prenatal diagnosis with fetal cells isolated from maternal blood by multiparameter flow cytometry. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **1991**;165:1731-1737.
- Pschyrembel**. *Klinisches Wörterbuch*, 257. Auflage. Walter de Gruyter, Hamburg **1994**.
- Reading** JP, Huffman JL, Wu JC, Palmer FT, Harton GL, et al. Nucleated erythrocytes in maternal blood: quantity and quality of fetal cells in enriched populations. *Hum.Reprod.* **1995**;10:2510-2515.

- Robson** SC, Lee D, Urbaniak S. Anti-D immunoglobulin in RhD prophylaxis. *Br.J.Obstet.Gynaecol.* **1998**;105:129-134.
- Roth** WK, Weber M, Seifried E. Feasibility and efficacy of routine PCR screening of blood donations for hepatitis C virus, hepatitis B virus, and HIV-1 in a blood-bank setting. *Lancet* **1999**;353:359-363.
- Ruano** G, Pagliaro EM, Schwartz TR, Lamy K, Messina D, et al. Heat-soaked PCR: an efficient method for DNA amplification with applications to forensic analysis. *Biotechniques* **1992**;13:266-274.
- Rust** S, Funke H, Assmann G. Mutagenically separated PCR (MS-PCR): a highly specific one step procedure for easy mutation detection. *Nucleic.Acids.Res.* **1993**;21:3623-3629.
- Saiki** RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **1985**;230:1350-1354.
- Saiki** RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **1988**;239:487-491.
- Saito** H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet* **2000**;356:1170.
- Sambrook** J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second Ed.. Anonymous Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory **1989**.
- Samura** O, Pertl B, Sohda S, Johnson KL, Sekizawa A, et al. Female fetal cells in maternal blood: use of DNA polymorphisms to prove origin. *Hum.Genet.* **2000**;107:28-32.
- Samura** O, Sohda S, Johnson KL, Pertl B, Ralston S, et al. Diagnosis of trisomy 21 in fetal nucleated erythrocytes from maternal blood by use of short tandem repeat sequences. *Clin.Chem.* **2001**;47:1622-1626.
- Sbracia** M, Scarpellini F, Lalwani S, Grasso JA, Scarpellini L. Possible use of an unusual HLA antigen to select trophoblast cells from the maternal circulation to perform early prenatal diagnosis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1994**;731:170-4.:170-174.
- Schmidt** W, Jenderny J, Hecher K, Hackeloer BJ, Kerber S, et al. Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk. *Mol.Hum.Reprod.* **2000**;6:855-860.
- Schmorl** G. *Pathologisch-Anatomische Untersuchungen über Publeraleklampsie*. Vogel, Leipzig **1893**.
- Sekizawa** A, Watanabe A, Kimura T, Saito H, Yanaihara T, et al. Prenatal diagnosis of the fetal RhD blood type using a single fetal nucleated erythrocyte from maternal blood. *Obstet.Gynecol.* **1996 a**; 87:501-505.
- Sekizawa** A, Kimura T, Sasaki M, Nakamura S, Kobayashi R, et al. Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy using a single fetal nucleated erythrocyte in maternal blood. *Neurology* **1996 b**;46:1350-1353.
- Sekizawa** A, Samura O, Zhen DK, Falco V, Bianchi DW. Fetal cell recycling: diagnosis of gender and RhD genotype in the same fetal cell retrieved from maternal blood. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **1999**;181:1237-1242.
- Sekizawa** A, Samura O, Zhen DK, Falco V, Farina A, et al. Apoptosis in fetal nucleated erythrocytes circulating in maternal blood. *Prenat.Diagn.* **2000**;20:886-889.
- Singleton** BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, et al. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood* **2000**;95:12-18.
- Slunga-Tallberg** A, el-Rifai W, Keinanen M, Ylinen K, Kurki T, et al. Maternal origin of transferrin receptor positive cells in venous blood of pregnant women. *Clin.Genet.* **1996**;49:196-199.
- Smid** M, Lagona F, de BL, Ferrari A, Ferrari M, et al. Evaluation of different approaches for fetal DNA analysis from maternal plasma and nucleated blood cells. *Clin.Chem.* **1999**;45:1570-1572.

- Soderberg-Naucler** C, Fish KN, Nelson JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* **1997**;91:119-126.
- Stenman** J, Orpana A. Accuracy in amplification. *Nat.Biotechnol.* **2001**;19:1011-1012.
- Strickland** S, Richards WG. Invasion of the trophoblasts. *Cell* **1992**;71:355-357.
- Sun** CF, Chou CS, Lai NC, Wang WT. RHD gene polymorphisms among RhD-negative Chinese in Taiwan. *Vox Sang.* **1998**;75:52-57.
- Suto** Y, Ishikawa Y, Hyodo H, Uchikawa M, Juji T. Gene organization and rearrangements at the human Rhesus blood group locus revealed by fiber-FISH analysis. *Hum.Genet.* **2000**;106:164-171.
- Tabor** A, Bang J, Norgaard-Pedersen B. Feto-maternal haemorrhage associated with genetic amniocentesis: results of a randomized trial. *Br.J.Obstet.Gynaecol.* **1987**;94 :528-534.
- Takabayashi** H, Kuwabara S, Ukita T, Ikawa K, Yamafuji K, et al. Development of non-invasive fetal DNA diagnosis from maternal blood. *Prenat.Diagn.* **1995**;15:74-77.
- Tang** NL, Leung TN, Zhang J, Lau TK, Lo YM. Detection of fetal-derived paternally inherited X-chromosome polymorphisms in maternal plasma. *Clin.Chem.* **1999**;45:2033-2035.
- Thomas** MR, Tutschek B, Frost A, Rodeck CH, Yazdani N, et al. The time of appearance and disappearance of fetal DNA from the maternal circulation. *Prenat.Diagn.* **1995**;15:641-646.
- Torricelli** F, Pescucci C. Isolation of fetal cells from the maternal circulation: prospects for the non-invasive prenatal diagnosis. *Clin.Chem.Lab.Med.* **2001**;39:494-500.
- Tyagi** S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat.Biotechnol.* **1996**;14:303-308.
- Van den Veyver** IB, Moise KJJ. Fetal RhD typing by polymerase chain reaction in pregnancies complicated by rhesus alloimmunization. *Obstet.Gynecol.* **1996**;88:1061-1067.
- van WI**, van VJ, Mulders MA, Konst AA, Weima SM, et al. Enrichment of fetal trophoblast cells from the maternal peripheral blood followed by detection of fetal deoxyribonucleic acid with a nested X/Y polymerase chain reaction. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **1996**;174:871-878.
- van WI**, de HA, Jurhawan R, Tjoa ML, Griffioen S, et al. Detection of apoptotic fetal cells in plasma of pregnant women. *Clin.Chem.* **2000**;46:729-731.
- Vilmar** K, Bachmann KD. Richtlinien zur pränatalen Diagnostik von Krankheiten und Krankheitsdispositionen, *Deutsches Ärzteblatt* 1998;95:3236-3242.
- Wagner** FF, Kasulke D, Kerowgan M, Flegel WA. Frequencies of the blood groups ABO, Rhesus, D category VI, Kell, and of clinically relevant high-frequency antigens in south-western Germany. *Infusionsther.Transfusionsmed.* **1995**;22:285-290.
- Wagner** FF, Gassner C, Muller TH, Schonitzer D, Schunter F, et al. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* **1999**;93:385-393.
- Wagner** FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood* **2000**;95:3662-3668.
- Wagner** FF, Frohmajer A, Flegel WA. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC.Genet.* **2001**;2:10
- Walknowska** J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer. *Lancet* **1969**;1:1119-1122.
- Watanabe** A, Sekizawa A, Taguchi A, Saito H, Yanaihara T, et al. Prenatal diagnosis of ornithine transcarbamylase deficiency by using a single nucleated erythrocyte from maternal blood. *Hum.Genet.* **1998**;102:611-615.

**Wei C**, Saller DN, Sutherland JW. Detection and quantification by homogeneous PCR of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Clin.Chem.* **2001**;47:336-338.

**Wessman M**, Ylinen K, Knuutila S. Fetal granulocytes in maternal venous blood detected by in situ hybridization. *Prenat.Diagn.* **1992**;12:993-1000.

**Wijk et. al.** Fetal Cells and Fetal DNA in maternal Blood. in Hahn S, Holzgreve W. *NewDevelopments for a new Millenium.* Karger, Basel 2001.

**Yasutake T**, Tagawa Y, Miyashita K, Ishikawa H, Hara S, et al. [Study of fluorescence in situ hybridization for detection of chromosome aberration]. *Hum.Cell* **1989**;2 :436-438.

**Young P**, Stogbauer F, Wiebusch H, Lofgren A, Timmerman V, et al. PCR-based strategy for the diagnosis of hereditary neuropathy with liability to pressure palsies and Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Neurology* **1998**;50:760-763.

**Zheng YL**, Demaria M, Zhen D, Vadnais TJ, Bianchi DW. Flow sorting of fetal erythroblasts using intracytoplasmic anti-fetal haemoglobin: preliminary observations on maternal samples. *Prenat.Diagn.* **1995**;15:897-905.

**Zhong XY**, Burk MR, Troeger C, Jackson LR, Holzgreve W, et al. Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. *Prenat.Diagn.* **2000** a;20 :795-798.

**Zhong XY**, Holzgreve W, Hahn S. Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. *BJOG.* **2000** b;107:766-769.

**Zhong XY**, Holzgreve W, Hahn S. Risk free simultaneous prenatal identification of fetal Rhesus D status and sex by multiplex real-time PCR using cell free fetal DNA in maternal plasma. *Swiss.Med.Wkly.* **2001**;131:70-74.

## Danksagung

Prof. Dr. Harald Jockusch danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe *Entwicklungsbiologie & Molekulare Pathologie* der Biologie Fakultät der Universität Bielefeld.

Herrn PD. Dr. Thomas Schmitt-John möchte ich für die offizielle Betreuung meiner Promotion danken. Dr. Thomas Schmitt-John und Dr. Jürgen Weidner danke ich für die Möglichkeit, die für die vorliegende Dissertation erforderlichen Arbeiten in ihrer Firma Praenadia GmbH ausführen zu können.

Mein Dank gilt ebenfalls Dr. Daniela Ehling und Dr. Uwe Schlomann, die beide mitgeholfen haben, die von mir übersehenen Fehler in der Dissertation aufzuspüren und zu beseitigen.

Tobias Radke danke ich für seine Hilfe bei der durchgeführten Reihenuntersuchung mittels Kapillarelektrophorese, sowie für den gemeinsamen Bergwanderurlaub in Wolkenstein.

Irina Deters möchte ich für ihre hilfreichen Ratschläge und die gemeinsame Zeit danken.

Ulrich Siemeling danke ich dafür, dass er immer für mich da ist.

Dr. Niels Wedemeyer gilt mein besonderer Dank. Er ist zwar erst zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt meiner Arbeit als neuer Kollege bei der Praenadia GmbH angefangen, hat aber mit seinem stetigen Engagement entscheidend die Fertigstellung der vorliegenden Dissertation vorangetrieben.

Mein größter Dank gilt Dr. Heiko Wiebusch, auch wenn er durch seine rationale, offene und immer ehrliche Art in unseren gemeinsamen Gesprächen nicht immer zu meinem Wohlbefinden beigetragen hat. Letztendlich ist er aber derjenige gewesen, von dem ich in wissenschaftlicher Hinsicht am meisten gelernt habe und der die ganze Zeit über hilfreich an meiner Seite stand.

Dr. Heiko Wiebusch ist diese Arbeit gewidmet.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig und nur mit Hilfe der hier aufgeführten Materialien und Quellen angefertigt habe.

Bielefeld, 01.10.2003

Petra Dißmann

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: **Petra Maria Dißmann**  
Nationalität: deutsch  
geboren am: 01.01.1970  
Geburtsort: Bielefeld  
Eltern: Horst Dißmann  
Barbara Dißmann (geb. Fuhrmann)  
Familienstand: ledig  
gegenwärtiger Wohnsitz: Paul-Engelhard-Weg 15, D-48167 Münster

## Schulbildung

Aug. 1976 – Juni 1980 Queller Schule, Städt. Grundschule, Bielefeld.  
Aug. 1980 – Juni 1989 Brackweder Gymnasium, Bielefeld.  
Mai 1989 Erwerb der **Allgemeine Hochschulreife (Abitur)**; Gesamtnote „gut“.

## Berufsausbildung

Aug. 1989 – Juli 1992 **Ausbildung zur Textillaborantin (chemisch-technisch)**  
bei der Windel Textil GmbH & Co, Bielefeld.  
Juli 1992 Abschlussprüfung Gesamtnote „gut“.

## Studium

WS 1992 Studienbeginn in Chemie (Diplom), Universität Bielefeld.  
WS 1995 **Diplom-Vorprüfung** in den Fächern  
Anorganische und Analytische Chemie, Organische Chemie,  
Physikalische Chemie, Experimentalphysik; Gesamtnote „gut“.  
April – Juli 1996 Teilnahme am **ERASMUS-Programm**;  
Studium am *Queen Mary and Westfield College*, London.  
April 1999 **Diplom** im Studiengang Chemie.  
Prüfungsfächer: Anorganische Chemie, Biochemie, Organische Chemie,  
Physikalische Chemie.  
Diplomarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Tschesche;  
Thema (Biochemie): *Isolierung von humanem Plasma-Fibronektin und  
Untersuchung der bei proteolytischer Spaltung erhaltenen Fragmente.*  
Diplom-Gesamtnote „gut“.  
Aug. 1999 **Beginn der Dissertation** an der Biologie Fakultät, Bielefeld.  
Betreuer Prof. Dr. H. Jockusch.  
Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin bei der Praenadia GmbH.  
Juli 2001 Betreuerwechsel zu Herrn PD. Dr. Th. Schmitt-John.

gedruckt auf alterungsbeständigem Papier (ISO 9706)