

Nicht-invasive pränatale Diagnostik an fetalen kernhaltigen Erythrozyten aus mütterlichem Blut

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Dipl. Biol. Harald Hohmann
geboren am 27.08.1967 in Kirchheim unter Teck**

**Gutachter: Prof. Dr. med. Uwe Claussen
Prof. Günther Theißen,
Prof. Dr. Erika Kothe**

Verteidigungsdatum: 17.02.2003

„Jeder Mensch ist eine Unendlichkeit. Der Mensch ist stets mehr als von ihm
erkannt wird.“

(Karl Jaspers, Existenzphilosoph)

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	1
II. Abbildungsverzeichnis.....	3
III. Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung.....	6
1.1 Invasive Pränataldiagnostik	7
1.1.1 Pränataldiagnostik – konventionelle Routineuntersuchung	7
1.2 Nicht-invasive Pränataldiagnostik	7
1.2.1 Etablierte Methoden der nicht-invasiven Pränataldiagnostik.....	8
1.2.2 Fetale Zellen im mütterlichen Blut – ihre Bedeutung für eine nicht-invasive pränatale Diagnostik	8
1.2.2.1 Isolierung von fetalen Zellen	9
1.2.2.2 Kultivierung von fetalen Zellen aus mütterlichem Blut.....	11
1.2.2.3 Isolierung von fetaler DNA aus Blutplasma und Serum.....	11
1.2.3 Die zukünftige Bedeutung der nicht-invasiven Pränataldiagnostik in der Gesellschaft	11
2 Ziel der Arbeit.....	13
2.1 Spezifische Anreicherung der fetalen Zellen über Antikörpermarkierung	13
2.2 Optimierung der Kulturbedingungen von fetalen Zellen	14
2.3 Immortalisierung.....	14
3 Material und Methoden.....	16
3.1 Material	16
3.1.1 Technische Ausrüstung	16
3.1.2 Chemikalien	16
3.1.3 Puffer und Lösungen.....	17
3.1.4 Kits und Reagenziensätze	18
3.1.5 Oligonukleotide.....	18
3.1.5.1 PCR-Primer.....	18
3.1.6 FISH-Sonden.....	19
3.1.7 Kulturmedien	19
3.1.8 LB-Medium.....	19
3.1.9 Einfrieren von Bakterienkulturen.....	19
3.2 Methoden	20
3.2.1 Schwangerenblut.....	21
3.2.2 Dichtegradienten-Zentrifugation.....	21
3.2.2.1 Protokoll zur Einfachdichtegradienten-Zentrifugation	21
3.2.2.2 Protokoll zur Dreifachdichtegradienten-Zentrifugation.....	21
3.2.3 Magnetische Zellsortierung (<i>magnetic activated cell sorting</i> , MACS).....	23
3.2.4 OncoQuick®	23
3.2.4.1 Protokoll.....	24
3.2.5 Sammeln von Einzelzellen	25
3.2.6 DNA-Isolation aus Blut und Fruchtwasser	25
3.2.6.1 Protokoll (nach Qiagen).....	25
3.2.7 DNA-Konzentrationsbestimmung durch UV-Spektrometrie	26
3.2.8 Proteinase K–Verdau von Einzelzellen zum Aufschließen der DNA	26
3.2.9 Polymerase Kettenreaktion	27
3.2.9.1 Komponenten der Einzelzell-PCR	29
3.2.9.2 PCR-Protokoll.....	29
3.2.10 Quantitative <i>realtime</i> PCR	29
3.2.10.1 Zusammensetzung der qPCR für SYBR Green I.....	30
3.2.10.2 Protokoll.....	31
3.2.11 Elektrophoretische Auftrennung von DNA – Fragmenten	31

3.2.11.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	31
3.2.11.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	32
3.2.12	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung (FISH).....	33
3.2.13	Präparation von Blutzellen für die FISH-Analyse	34
3.2.13.1	Protokoll zur Gewinnung der Zellen.....	34
3.2.13.2	Alternative Fixierung der Zellen	36
3.2.13.3	Präparation der kultivierten Zellen für FISH	36
3.2.14	Kultivierung von nukleierten Vorläuferzellen der roten Reihe.....	37
3.2.15	Nachweis von DNA durch Restriktionsfragmentanalyse.....	37
3.2.15.1	Spaltung mit Hilfe des Restriktionsenzym Eco R1	37
3.2.16	Klonierung	39
3.2.16.1	Isolierung von DNA (genomisch oder cDNA) und Plasmid-DNA.....	40
3.2.16.2	Restriktionsspaltung der DNA und des Plasmids	40
3.2.16.3	Ligation von DNA-Fragmenten mit der Plasmid-DNA	40
3.2.16.4	Transformation von Plasmiden in humane Zellen	41
3.2.16.5	Plasmidisolierung aus einem Bakterienklon	43
3.2.17	Mikroskopische Auswertung der Zellen	43
3.2.17.1	Lichtmikroskopie	43
3.2.17.2	Fluoreszenzmikroskopie	44
4	Ergebnisse.....	45
4.1	Isolierung von Einzelzellen mit CD71 und ihre Charakterisierung über Einzelzell-PCR	45
4.2	CD71-MACS selektierte Zellen und ihre Evaluierung mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper	47
4.3	Verschiedene Antikörper für die spezifische Markierung von fetalen Zellen	49
4.3.1	Charakterisierung der Antikörper	49
4.3.1.1	2G5 und 3F9	49
4.3.1.2	Flk1.....	49
4.3.1.3	Epo-R.....	49
4.3.2	Vergleich der Effektivität der untersuchten Antikörper mit dem CD71-Antikörper	50
4.4	Verschiedene Kulturmedien für eine spezifische Anzucht von fetalen Zellen	54
4.4.1	Modifikation des Basiskulturmediums Chang C.....	54
4.4.2	Austestung von weiteren Kulturmedien.....	55
4.4.2.1	STem.αHIE	55
4.4.2.2	C-Plus Medium select	56
4.4.2.3	StemSpan SF Expansions Medium	56
4.4.2.4	Vorversuche mit dem Komplettmedium Methocult 4431	57
4.4.2.5	Ergebnisse der Kultivierungsversuche mit Methocult 4431 in einer ausgedehnten Studie	59
4.5	Immortalisierung	65
4.6	Analyse der Zellen aus maternalem Blut nach OncoQuick [®] -Aufreinigung.....	68
5	Diskussion	69
5.1	Microbeadmarkierung für das computerunterstützte Scannen von fetalen Zellen.....	69
5.2	Spezifische Antikörper für die Markierung von nukleierten Erythrozyten.....	70
5.3	Kultivierung von fetalen Zellen aus maternalem Blut	72
5.4	Immortalisierung.....	75
6	Zusammenfassung	76
7	Literaturverzeichnis	79
8	Danksagung	87

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Methode der Aufbereitung von peripherem Schwangerenblut	20
Abbildung 2: Dreifachdichtegradienten-Zentrifugation	22
Abbildung 3: MACS	23
Abbildung 4: OncoQuick®	24
Abbildung 5: Schematische Darstellung des PCR-Zyklus (modifiziert nach M. Manske).....	28
Abbildung 6: <i>Realtime</i> PCR mit SYBR® Green I	30
Abbildung 7: Die Einzelschritte der Klonierung	39
Abbildung 8: Die Transfektion von humanen Zellen	42
Abbildung 9: Nukleierte Erythrozyten unter dem Lichtmikroskop (400-fache Vergrößerung).....	45
Abbildung 10: Amelogenin Einzelzell-PCR.....	46
Abbildung 11: Interphase-FISH von zwei Zellkernen mit fetalem und maternalem Ursprung	48
Abbildung 12: Die Spezifität der Antikörper 2G5, 3F9, EPO-R und Flk1	53
Abbildung 13: Zellkolonien unter dem Lichtmikroskop	55
Abbildung 14: Schmelzpunktanalyse am LightCycler	58
Abbildung 15: Quantifizierung am LightCycler	59
Abbildung 16: Sammeln einer Einzelkolonie	60
Abbildung 17: Unterschiedliche Klone der roten Reihe	60
Abbildung 18: Sensitivitätsvergleich der PCR mit SRY- und mit Amelogenin-Primern	61
Abbildung 19: Amelogenin-PCR an Einzelkolonien.....	64
Abbildung 20: Fetale Metaphase	64
Abbildung 21: Zweifarben-FISH.....	65
Abbildung 22: Der Vektor pIRES2-EGFP.....	66
Abbildung 23: Nachweis der hTRT-Untereinheit auf dem Elektrophoresegel.....	66

III. Abkürzungsverzeichnis

abs	absolut
Ac	Acetat
APS	Ammoniumpersulfat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
DAPI	4,6diamidino-2'phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	2'-Desoxy-nukleosid-5'-triphosphat
dITP	2'-Desoxy-inosin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
g	Gramm
h	Stunde
kb	Kilobasenpaar(e)
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
M	Molarität
m	milli-
μ	mikro
Mb	Megabasenpaar(e)
min	Minute
OD	Optische Dichte
OT	Objekträger
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSW	Schwangerschaftswoche
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA

TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymaktivität)
üN	über Nacht
UV	ultraviolett
v	Volt
Vol	Volumen

1 Einleitung

Unter Pränataldiagnostik versteht man die diagnostischen Maßnahmen während der Schwangerschaft, durch die morphologische, strukturelle, funktionelle, chromosomale und molekulare Störungen vor der Geburt des Kindes erkannt oder ausgeschlossen werden können. Dadurch werden Schwangerschaftsrisiken, bedingt durch eine mögliche Schädigung oder Erkrankung des ungeborenen Kindes verringert bzw. vermieden. Zu den Untersuchungsmethoden gehören sowohl bildgebende Verfahren wie Sonografie (Ultraschall) und Dopplersonografie, als auch die Fruchtwasseruntersuchung (Amniozentese) und die Chorionzottenbiopsie. Die rasante Entwicklung der pränatalen Diagnostik in über 25 Jahren war, neben der ständigen Verbesserung der Ultraschalldiagnostik, vor allem einer steten Erweiterung der genetischen Diagnosemöglichkeiten zu verdanken. Im Jahre 1966 veröffentlichten Steele und Breck den ersten Bericht über eine erfolgreiche vorgeburtliche Chromosomenuntersuchung an Zellen aus dem Fruchtwasser. Im Jahre 1973 und 1974 wurde die Chorionzottenbiopsie von Hahnemann erfolgreich eingeführt. Diese beiden Methoden werden bis heute in der Routinediagnostik eingesetzt. Über die pränatale Diagnostik nach einer Amniozentese oder einer Chorionzottenbiopsie können Chromosomenanomalien schon vor der Geburt erkannt bzw. ausgeschlossen werden, wie z. B. Trisomie 21, die in ihrer Wahrscheinlichkeit des Auftretens mit dem zunehmenden Alter der Mutter korreliert. Darüber hinaus kann man bei der pränatalen Diagnostik über 100 Stoffwechselerkrankungen und einige hundert weitere schwere und unheilbare Erbkrankheiten nachweisen. Mit Hilfe neuester technischer Diagnosemöglichkeiten (z. B. Dopplersonographie) und einer Palette laborchemischer Untersuchungsmethoden können vorgeburtliche Störungen vorzeitig ausgeschlossen und frühzeitig erkannte Anomalien differenziert werden. Dabei handelt es sich um ganz unterschiedliche Anomalien, die erstmalig bei allgemeinen Schwangerschaftsvorsorgeuntersuchungen vermutet werden oder mit denen sich die Familie schon vor Schwangerschaftsbeginn belastet fühlt. Untersuchungen dazu erfolgen meist im 1. und 2. Trimenon der Schwangerschaft, können aber auch erst zu einem späteren Zeitpunkt der Schwangerschaft erforderlich werden. Zur Durchführung einer pränatalen Diagnostik mit zytogenetischen bzw. molekulargenetischen Untersuchungen benötigt man kindliche Zellen. Diese werden bislang durch die invasiven Techniken gewonnen und sind mit einer eingriffsbedingten Wahrscheinlichkeit zum Abort von zusammengefasst ca. 1% belastet. Durch die routinemäßige Etablierung einer nicht-invasiven Pränataldiagnostik mit der Gewinnung fetaler Zellen aus dem peripheren Blut der Mutter tendiert diese

Wahrscheinlichkeit gegen 0%. So würden die gängigen Techniken der invasiven pränatalen Diagnostik überflüssig werden.

1.1 Invasive Pränataldiagnostik

1.1.1 Pränataldiagnostik – konventionelle Routineuntersuchung

Der konventionellen zytogenetischen Pränataldiagnostik geht in der Regel ein invasiver Eingriff voraus, bei dem der Schwangeren über Amniozentese oder mittels Chorionzottenbiopsie fetale Zellen entnommen werden, die im Anschluß an eine Kultivierungsphase zytogenetisch untersucht werden. Inzwischen ist auch die sogenannte Frühamniozentese, eine Fruchtwasserentnahme zwischen der 12. und 15. Schwangerschaftswoche, mit ausreichender Sicherheit beim Eingriff und in der Labordiagnostik möglich (Rousseau *et al.* 1995). Grundsätzlich bestehen bei der Fruchtwasserentnahme, wie bei jedem invasiven Eingriff, Risiken für die Schwangere und ihr ungeborenes Kind. Komplikationen mit Abortfolgen kommen bei ca. 1% aller Eingriffe vor. Dabei liegt die Abortrate bei der Amniozentese mit 0,5% um einiges niedriger als bei der Chorionzottenbiopsie (ca. 2%). Diese Abortraten wurden durch internationale Sammelstatistiken ermittelt, wobei die Ergebnisse verschiedener Zentren zusammengefaßt wurden (McNay *et al.* 1984). Für die Bundesrepublik Deutschland bedeutet das bei rund 85000 Untersuchungen den eingriffsbedingten Abort von ca. 850 Feten im Jahr. Die nicht-invasive Pränataldiagnostik an fetalen Zellen aus dem peripheren Blut der Mutter, könnte die gängigen Techniken der invasiven pränatalen Diagnostik überflüssig machen und damit die Wahrscheinlichkeit eines Abortes verhindern.

1.2 Nicht-invasive Pränataldiagnostik

Unter nicht-invasiven Verfahren versteht man alle Methoden zur Früherkennung vorgeburtlicher Schäden, die nicht mit einer untersuchungsbedingten Wahrscheinlichkeit einer Fehlgeburt einhergehen. Das geschieht entweder über optische Methoden, wie z. B. der Ultraschalldiagnostik, die als Vorsorgeuntersuchung während der Schwangerschaft routinemäßig eingesetzt wird, oder über das periphere Blut der Mutter mittels Triple Test (Wagner *et al.* 1994). Treten hier Auffälligkeiten auf, wird meist eine invasive Pränataldiagnostik in Erwägung gezogen. Eine neue wissenschaftliche Herausforderung stellt in diesem Zusammenhang die Diagnostik an fetalen Einzelzellen und an fetaler DNA aus dem Blut der Mutter dar, die erst in den letzten zehn Jahren zunehmend an Interesse gewonnen hat.

1.2.1 Etablierte Methoden der nicht-invasiven Pränataldiagnostik

Die klassischen Vorsorgeuntersuchungen für Schwangere sind Messung des Blutdruckes, der Gewichtsentwicklung, Untersuchungen des Urins und die Bestimmung des Blutbildes. Die Blutuntersuchung schließt den Triple-Test mit ein, der zwischen der 15. und 20. Schwangerschaftswoche durchgeführt wird. Dieser beinhaltet die Bestimmung von drei Hormonen im Blut der Mutter: Das alpha-Fetoprotein (AFP), das freie Estriol (E3) und das beta-Choriongonadotropin (beta-HCG). Aus den gemessenen Werten kann bei genauer Kenntnis des Schwangerschaftsalters errechnet werden, ob eine erhöhte Wahrscheinlichkeit besteht, daß das ungeborene Kind z. B. an einem Down-Syndrom (Trisomie 21) oder an einer Spina bifida erkrankt ist. Heutzutage sind auch Ultraschalluntersuchungen nicht mehr wegzudenken. Diese optische Methode wurde in den letzten Jahren zunehmend weiterentwickelt. Die sogenannte Ultraschallfeindiagnostik und deren immer höhere Auflösung dient der noch differenzierteren Früherkennung von Schäden oder Fehlbildungen des Feten. In den letzten Jahren haben internationale Studien zeigen können, daß das sog. Ersttrimester-Screening eine hohe, bisher nicht erreichte Entdeckungsrate von Schwangerschaften mit Down Syndrom aufweist. Während der Triple- (Double-) Test in der 15./16. SSW lediglich Erkennungsraten von 60 - 65% aufweist, führt die Kombination der Serumparameter PAPP-A und freies β -hCG mit dem mütterlichen Alter (Basisrisiko) und der Messung der sog. Nackentransparenz (NT) zu einer Erkennungsrate von ca. 90% bei einer Screen-positiv-Rate von 5% (zwei-zeitiges Konzept nach Wald *et al.* 2000).

1.2.2 Fetale Zellen im mütterlichen Blut – ihre Bedeutung für eine nicht-invasive pränatale Diagnostik

Im Jahre 1893 berichtete der Pathologe Schmorl erstmals über das Auftreten von fetalen Zellen in der mütterlichen Zirkulation. Er entdeckte Trophoblasten in den Lungen von Patientinnen, die an einer Eklampsie verstorben waren. Die Existenz von fetalen Zellen im Blut von normalen Schwangeren war jedoch zunächst noch sehr umstritten. Erst mit Hilfe neuer molekularbiologischer Nachweismethoden war es möglich, die Existenz von fetalen Zellen im Blut von Schwangeren nachzuweisen. 1972 zeigten Schröder *et al.*, daß fetale Zellen während der Schwangerschaft in den mütterlichen Kreislauf übertreten können. Nach jahrzehntelangen intensiven Bemühungen erkannte man, daß eine nicht-invasive Pränataldiagnostik aus mütterlichem Blut nur dann gelingt, wenn sich die wenigen fetalen Zellen, die sich in der mütterlichen Zirkulation befinden, anreichern lassen. Grundsätzlich

kommen drei verschiedene fetale Zelltypen aus mütterlichem Blut für die Pränataldiagnostik in Frage. Dabei handelt es sich um kernhaltige Erythrozyten, Leukozyten und Trophoblastzellen (Bianchi *et al.* 1990). Von diesen Zelltypen eignen sich die nukleierten Erythrozyten besonders gut, weil sie im peripheren Blut der Mutter in einer geringeren Anzahl vorkommen, als die anderen Zelltypen. Hier ist also das Mengenverhältnis zugunsten der fetalen Erythrozyten verschoben (Simpson und Elias, 1995). Da außerdem die Lebensdauer der Erythrozyten nur maximal 120 Tage beträgt, ist hier eine Kontamination durch fetale Zellen einer vorangegangenen Schwangerschaft ausgeschlossen (Bianchi *et al.* 1996).

1.2.2.1 Isolierung von fetalen Zellen

Im Prinzip können fetale Zellen aus dem peripheren Blut der Mutter isoliert, angereichert und zur Diagnostik genutzt werden (Gänshirt *et al.* 1993; Bianchi *et al.* 1993; Simpson und Elias 1994). Trophoblasten erwiesen sich relativ früh als problematischer Zelltyp für diesen Zweck, da sie deutliche Nachteile aufweisen. Durch ihre enorme Größe werden sie rasch aus der Lunge der Schwangeren herausfiltriert (Attwood und Park, 1960), so daß sie in der Peripherie besonders selten vorkommen. Da Trophoblastzellen meistens mehrkernig sind und die Plazenta gerade in der Frühschwangerschaft Mosaikzustände aufweisen kann, eignen sie sich schlecht für eine Diagnose mittels FISH (Henderson *et al.* 1996; Goldberg und Wohlferd 1997). Dennoch gelang es 1994 Hawes *et al.*, Trophoblastzellen erfolgreich für die pränatale Diagnose von Hämoglobinopathien einzusetzen. Fetale Leukozyten sind zwar leichter anzureichern (Herzenberg *et al.* 1979) und lassen sich kultivieren (Walknoska *et al.* 1969), können aber sehr langlebig sein. Es könnte also sein, daß isolierten fetale Leukozyten von einer früheren Schwangerschaft stammen. In manchen Fällen waren diese noch mehrere Jahre nach der Geburt nachweisbar (Schröder *et al.* 1974; Bianchi *et al.* 1996). Inzwischen ist es klar, daß nur kurzlebige fetale Zellen für die pränatale Diagnostik in Frage kommen. Eine Zelle, die diesen Anforderungen gerecht wird, ist der fetale Erythroblast, der sowohl eine kurze Lebensdauer als auch einen Zellkern besitzt, wodurch eine genetische Untersuchung durchgeführt werden kann. Das Vorkommen von kernhaltigen Erythrozyten im maternalen Kreislauf ist ein seltenes Ereignis. Zahlenangaben schwanken dabei zwischen 1 : 50000 und 1 : 1000000 (Hamada *et al.* 1993). Es wurden spezielle Strategien entwickelt, um die fetalen Zellen isolieren zu können. Bestimmte Aufreinigungsmethoden wie z. B. die Dreifachdichtegradienten-Zentrifugation in Kombination mit FACS (fluorescence activated cell sorter; Bianchi *et al.* 1990) bzw. MACS (magnetic cell sorter; Gänshirt *et al.* 1992)

wurden dabei erfolgreich angewendet und dienen der Anreicherung von fetalen Zellen. Mit diesen Methoden läßt sich das Verhältnis der kernhaltigen Erythrozyten zu anderen Blutbestandteilen erheblich verbessern. Sortierungsverfahren wie FACS und MACS bedienen sich der selektiven Markierung der Zellen. Dabei sind eine Reihe von monoklonalen Antikörpern in Gebrauch, wie z. B. Anti-CD71, der Antikörper gegen den Transferrinrezeptor (Bianchi *et al.* 1990; Gänshirt *et al.* 1992), einem Oberflächenmolekül, daß besonders stark auf Erythroblasten exprimiert wird, der Antikörper CD36 gegen den Thrombospondin-Rezeptor (Bianchi *et al.* 1993) bzw. Glycophorin A (Price *et al.* 1991). Auch diese Oberflächenmoleküle werden vermehrt auf der Zelloberfläche von erythroiden Zellen exprimiert. Dabei wird vermutet, daß ihre Dichte in Abhängigkeit von der jeweiligen Schwangerschaftswoche (Zheng *et al.* 1997) variiert. Mit den bestehenden kombinierten Aufreinigungsmethoden (z. B. Triple density gradient und MACS; Gänshirt *et al.* 1994b) läßt sich das Verhältnis der kernhaltigen Erythrozyten zu den anderen Blutbestandteilen zwar verbessern, jedoch mit der Einschränkung, daß dadurch auch viele fetale Zellen verloren gehen. Die Unterscheidung zwischen fetalen und mütterlichen kernhaltigen Erythrozyten bereitet dabei unerwartete Schwierigkeiten. Dieses Problem kann weder durch den Einsatz von Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH; z. B. Elias *et al.* 1992), noch durch die Antikörper eindeutig gelöst werden (Zheng *et al.* 1993). Eine zusätzliche vielversprechende Möglichkeit einer Markierung und Identifizierung von fetalen Zellen bietet die immunochemische Färbung von γ - und ϵ -Hämoglobin (Mesker *et al.* 1998). Diese Methode läßt sich jedoch nur an fixierten Zellen anwenden, die dann für eine weitere molekulargenetische Diagnostik nur noch bedingt zur Verfügung stehen. Eine 100%ige Differenzierung läßt sich bisher nur an Einzelzellen erzielen, die mikromanipulatorisch gesammelt wurden (Takabayashi *et al.* 1995; von Eggeling *et al.* 1997). Der diagnostische Weg über Einzelzellen führt aber zum nächsten Problem. Aufgrund des geringen DNA-Gehaltes von Einzelzellen ist meist nur eine PCR-Testung verläßlich möglich. Hier muß dann über eine unspezifische PEP- oder DOP-PCR eine generelle Amplifikation durchgeführt werden, die dann bei der spezifischen Amplifikation von Polymorphismen zu *allelic drop outs* führen kann.

1.2.2.2 Kultivierung von fetalen Zellen aus mütterlichem Blut

Eine Alternative, um ausreichend fetale Zellen zu erhalten, stellt die Kultivierung von erythroiden fetalen Vorläuferzellen dar. Die im peripheren Blut der Mutter bestehende Mischung aus fetalen und mütterlichen Vorläuferzellen erschwert bisher eine effektive

Kultivierung, da eine Abtrennung der fetalen Stammzellen aus einem Gemisch von unterschiedlichen Zelltypen nahezu unmöglich ist. Eine Anzüchtung ausschließlich fetaler erythroider Vorläuferzellen ist bisher nicht beschrieben worden, da die speziellen Wachstumsbedingungen für fetale Vorläuferzellen *in vitro* noch konkretisiert werden müssen (Alter 1994; Valerio *et al.* 1996; Valerio *et al.* 1997; Chen *et al.* 1998; Han *et al.* 2001).

1.2.2.3 Isolierung von fetaler DNA aus Blutplasma und Serum

Im Jahre 1998 wurde von Lo *et al.* das erste Mal das Vorkommen von freier fetaler DNA nachgewiesen, die im mütterlichem Plasma bzw. Serum zirkuliert. Mit Hilfe einer Echtzeit-qPCR kann die Konzentration dieser freien fetalen DNA ermittelt werden. Wie bei den Einzelzellen kann daran molekulargenetische Diagnostik durchgeführt werden. Auch diese Technologie befindet sich in der Entwicklungsphase. In letzter Zeit wurden auf diesem Gebiet vielversprechende Fortschritte erzielt (Amicucci *et al.* 2000; Samura *et al.* 2000; Zhong *et al.* 2001; Chen *et al.* 2001).

1.2.3 Die zukünftige Bedeutung der nicht-invasiven Pränataldiagnostik in der Gesellschaft

Die pränatale Diagnostik an fetalen Zellen bzw. fetaler DNA aus mütterlichem Blut stellt im Gegensatz zu den konventionellen Methoden der Pränataldiagnostik eine nahezu risikofreie Alternative dar. So könnten in der BRD jährlich bis zu 850 eingriffsbedingte Aborte verhindert werden.

Die Indikationen für eine Pränataldiagnostik sind mittlerweile sehr umfangreich. Wichtige Indikatoren sind z. B. Anomalien, die in der Ultraschalldiagnostik diagnostiziert werden. Bei der Altersindikation wird den Schwangeren ab einem Alter von 35 Jahren eine Amniozentese bzw. Chorionzottenbiopsie angeboten. Die Wahrscheinlichkeit für eine Chromosomenanomalie beim Kind ist hier höher einzuschätzen als das Punktionsrisiko, das im Wesentlichen als Abortrisiko von Bedeutung ist. Außerdem werden sozialen Indikationen als zunehmend höher eingestuft. Bei einer nicht-invasiven Pränataldiagnostik an fetalen Zellen aus dem peripheren Blut der Mutter, ohne die Wahrscheinlichkeit eines Abortes, könnten derartige Indikationen ganz wegfallen. Die nicht-invasive Pränataldiagnostik an fetalen Einzelzellen würde für jede Schwangere fast risikolos zugänglich sein, weil die Wahrscheinlichkeit für einen Abort nicht mehr gegeben wäre. Mit der Einführung ihrer routinemäßigen Anwendung würde auch der persönliche oder gesellschaftliche Druck zur Inanspruchnahme dieser Diagnostik bei den Schwangeren steigen.

Ein Screening ohne Indikation wäre bei allen Schwangerschaften möglich, was unter ethisch moralischen Gesichtspunkten eine kritische Entwicklung mit sich ziehen könnte. Deswegen ist in diesem Zusammenhang eine gesellschaftliche und politische Diskussion und Klärung von immenser Wichtigkeit.

2 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, der Etablierung einer verlässlichen nicht-invasiven Pränataldiagnostik an fetalen Zellen, nach deren Isolierung aus dem peripheren Blut der Mutter, näher zu kommen. Durch die Nutzung der Möglichkeiten der Molekularbiologie, der molekularen Zytogenetik und den Erfahrungen aus der Reproduktionsmedizin (mikromanipulative Techniken) ist dies in Ansätzen schon gelungen, wie die erfolgreiche Entdeckung von Aneuploidien und auch Einzelgen-Erkrankungen zeigen (s. 1.2.2.1).

2.1 Spezifische Anreicherung der fetalen Zellen über Antikörpermarkierung

Der diagnostische Weg über die kindlichen Einzelzellen kann nur dann erfolgversprechend realisiert werden, wenn auch genügend dieser Zellen detektiert werden können. Dabei stellt die an MACS gekoppelte Aufreinigung einen wichtigen Arbeitsschritt dar und sollte deswegen näher analysiert werden. Dazu sollte zunächst die Effektivität des Verfahrens untersucht werden, um herauszufinden, wie hoch die Anzahl der markierten Zellen in der MACS-positiven Fraktion ist. Die Analyse kann mit Hilfe des monoklonalen Antikörper CD71 durchgeführt werden, der mit dem Farbstoff Cy3 Fluoreszenzmarkiert werden sollte (s. 4.2). Zusätzlich kann dadurch eine Quantifizierung seiner Oberflächenantigene (Transferrinrezeptoren) erfolgen. Unterschiede in der Dichteverteilung auf der Zelloberfläche könnten als zusätzlicher Parameter dazu dienen, um zwischen mütterlichen und kindlichen Zellen eindeutiger differenzieren zu können, um damit die Detektionsrate für fetale Zellen zu erhöhen.

Die Spezifität der bis dato verwendeten Antikörper, inklusive CD71, ist so variabel, daß immer noch mit sehr hohen Verlusten an fetalen Zellen zu rechnen ist. Deshalb sollten zudem monoklonale Antikörper mit höherer Spezifität gegen fetale Zellen gesucht und ausgetestet werden. Die Suche nach Antikörpern ist insbesondere von den Oberflächenantigenen der fetalen nukleierten Erythrozyten abhängig. Entsprechend ihrer Eigenschaften kamen vier Antikörper (2G5, Flk1, EPO-R und 3F9) in die engere Auswahl (s. 4.3.1) welche auf ihre Spezifität hin untersucht wurden. Bei hoher Spezifität gegen fetale Zellen wäre auch eine direkte Markierung ohne vorherige Dichtegradienten-Zentrifugation, die wiederum mit fetalem Zellverlust einhergeht, möglich.

Mit einer effizienteren Markierung der fetalen Zellen wäre auch eine computerunterstützte Scanninganalyse durchführbar. Die nukleierten Erythrozyten könnten so mit geringerem Zeitaufwand detektiert und gesammelt werden. Im Anschluß daran kann dann

molekularbiologisch über Einzelzell-PCR bzw. molekularzytogenetisch auf spezifische Erbkrankheiten hin untersucht werden.

2.2 Optimierung der Kulturbedingungen von fetalen Zellen

Eine Alternative, um ausreichend viele fetale Zellen zu erhalten, ist die Kultivierung von erythroiden kindlichen Vorläuferzellen (s. 4.4). Eine selektive Stimulation könnte ihre geringe Anzahl *in vitro* vergrößern und die damit verbundenen technischen Schwierigkeiten ihrer Isolation verringern. Um den spezifischen Ansprüchen der kindlichen Vorläuferzellen gerecht zu werden, sollte ein spezifisch abgestimmter "Wachstumscocktail" für Kulturbasismedien entwickelt werden. Es sollten aber auch fertig konfektionierte Kulturmedien auf ihre Spezifität und Effektivität hin untersucht werden. Da die fetalen Zellen ausschließlich aus dem peripheren Blut von Schwangerschaften mit männlichem Fötus stammt, sollte ein schneller Vorabtest der unterschiedlichen Kulturmedien durchgeführt werden. Mit Hilfe der Etablierung des Nachweises einer Y-chromosomalen Sequenz über SRY-Nachweis mit *realtime* qPCR über den LightCycler (s. 3.2.10) sollte es gelingen, schneller Klarheit über den Kultivierungserfolg fetaler Zellen zu bekommen, als das bei einer herkömmlichen qPCR (s. 4.4.2.4) möglich ist. Erst bei erfolgversprechenden Ergebnissen sollten die entsprechenden Medien einer umfangreicheren Studie unterzogen werden. Nach den Vorabanalysen kamen fünf Medien in die engere Auswahl, die für die Kultivierung fetaler erythroider Vorläuferzellen geeignet erschienen (s. 4.4.2). Eine erfolgreiche Kultivierung fetaler Zellen aus mütterlichem Blut würde die gleichen diagnostischen Möglichkeiten bieten, wie die konventionelle Kultivierung von invasiv gewonnenen Fruchtwasserzellen.

2.3 Immortalisierung

Es wurde festgestellt, daß vor der Kultivierung, nach Aufreinigung über Dichtegradient mit oder ohne magnetische Anreicherung mit CD71, mittels PCR, Y – spezifische Sequenzen fetaler Zellen nachweisbar waren. Nach der Kultivierung waren diese aber nicht mehr vorhanden. Hier bietet der Versuch einer Immortalisierung fetaler Zellen einen vielversprechenden Ansatz. Er beruht auf der Transfektion der aktiven katalytischen Untereinheit (hTERT) der Telomerase.

Das hTERT-Insert sollte zunächst in einen Vektor mit *green fluorescent protein* (GFP) umklontiert werden, um so eine erfolgreiche Transformation humaner Zellen mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie nachweisen zu können. Mit diesem Vektor sollten zuerst

Lymphozyten, danach Nabelschnurblut und Zellen aus mütterlichem Blut mit hTRT transformiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

In diesem Abschnitt sind die Medien und Lösungen sowie das verwendete biologische Material und die verwendeten Proben aufgeführt, die im Abschnitt Methoden Verwendung finden.

3.1.1 Technische Ausrüstung

Geräte	Hersteller
Rollmischer RM5 Assistent	Karl Hecht GmbH & Co.KG
DNA Sequenzer Model 4000s	LI-COR (Lincoln, USA)
LightCycler	Roche (Mannheim)
Sicherheitswerkbank Klasse 2 „HERAsafe HS 12“	Kendro Laboratory Products GmbH (Heraeus)
Sterilwerkbank Laminar Flow Box	Kendro Laboratory Products GmbH (Heraeus)
CO ₂ -Begasungsbrutschrank 6000	Kendro Laboratory Products GmbH (Heraeus, Hanau)
Megafuge 1.0	Kendro Laboratory Products GmbH (Heraeus Sepatech)
Peltier Thermal Cycler PTC-200	MJ Research, Watertown (USA)
Uvikon 930 Spektrophotometer	Kontron Instruments
Laborzentrifuge 3K10	Sigma
Zentrifuge 5415C	Eppendorf
Biofuge 28RS	Kendro Laboratory Products GmbH (Heraeus Sepatech)
Mikrozentrifuge MC13	Amicon Bioseparations
Mikrowelle	Bosch
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2	Zeiss
Mikroskop Axiovert 35	Zeiss
Pufferkammer	Serva Feinbiochemie GmbH & Co

3.1.2 Chemikalien

Bezeichnung der Chemikalien (Hersteller)	Zusammensetzung/Konzentration
Agarose LE; SEA KEM [®] LE (FMC Bioproducts)	
dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Perkin Elmer, Roche Diagnostics; Mannheim)	10 mM
MgCl ₂ -Lösung (Perkin Elmer, Roche Diagnostics; Mannheim)	25 mM
Molekular Weight Marker I; XV (Roche Diagnostics; Mannheim)	
NaCl (Roth)	
Natriumcitrat Dihydrat (Merck)	

Bezeichnung der Chemikalien (Hersteller)	Zusammensetzung/Konzentration
Paraformaldehyd	2,0 g in 100 µl PBS
Polymerase: Stoffel Fragment (Perkin Elmer, Roche Diagnostics; Mannheim)	1000 Units (10 Units/µl)
Spectrum Orange-dUTP, Fluoreszenzfarbstoff gebunden an dUTP; (Vysis)	50 nmol, lyophilisiert, in 50 µl H ₂ O lösen 2'-deoxyuridine-5'-triphosphate
Spectrum Green-dUTP (Fluoreszenzfarbstoff gebunden an dUTP) (Vysis)	50 nmol, lyophilisiert, in 50 µl H ₂ O lösen; 2'-deoxyuridine-5'-triphosphate
Vetren [®] 200 (Byk Gulden)	Heparin-Natrium

3.1.3 Puffer und Lösungen

Bezeichnung (Hersteller)	Zusammensetzung
DAPI-Lösung (Vector Laboratories)	4 µl 50 mg/ml Stocklösung 1 ml Vectashield [®] Mounting Medium Lagerung bei 4°C
Fixativ	75% Methanol 25% Essigsäure (immer frisch ansetzen)
50% Formamid (FA) / 2x SSC	250 ml 99,5% Formamid 50 ml 20x SSC 200 ml H ₂ O, pH 7
Formamid (Merck)	deionisiert Es werden Konzentrationen von 50% und 70% benötigt und mit 4x SSC hergestellt. Wichtig ist die Einstellung des pH-Wertes auf 7,0 mit 1 M HCl.
Gel load Mix (Blue) für Agarosegele	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 30% Glycerin Aufbewahrung bei 4°C
Natriumacetat-Lösung (Sigma)	3M (bezogen auf Acetat) 24,6 g wasserfreies Natriumacetat in 100 ml H ₂ O lösen und pH 4,8 - 5,2 mit Essigsäure (Merck) einstellen
1x PBS (Biochrom KG)	9,55 g werden in 1 l Wasser gelöst
10 x PCR-Buffer II (Perkin Elmer, Roche Diagnostics; Mannheim)	10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 10 mM KCl
Pepsin	1 g auf 50 ml H ₂ O kurz vortexen und zu je 500 µl aliquotieren
Phosphatpuffer	0,89 g Na ₂ HPO ₄ in 10 ml H ₂ O lösen (=0,5 M) 0,69 g NaH ₂ PO ₄ in 10 ml H ₂ O lösen (=0,5 M)
Postfix (für Pepsinverdau)	2,5 ml 1 M MgCl ₂ 22,5 ml 1x PBS 25 ml Paraformaldehyd
Sephadex-Suspension (Pharmacia Biotech)	8 g Sephadex [®] G50 100 ml TE, Ansatz über Nacht quellen lassen

Bezeichnung (Hersteller)	Zusammensetzung
Sequagel XR „ready to use“ (National Diagnostics)	Acrylamid Methylen, Bisacrylamid (1000 ml)
Sequagel complete (National Diagnostics)	50% (250 ml)
SSCTM Blocking Reagenz (Marvel)	0,5 g fettfreie Trockenmilch in 5 ml 4x SSCT lösen, 5 min bei 1500 Upm zentrifugieren, obere Schicht verwerfen (enthält nicht gelöste Milchpartikel)
2x SSC	50 ml 20x SSC 450 ml H ₂ O
20x SSC	3 M NaCl (Roth) 0,3 M Natriumcitrat-Dihydrat (Merck) pH 7,0 mit 1 M HCl einstellen
4x SSCT	100 ml 20x SSC 400 ml H ₂ O 250 µl 0,05% Tween20 (Sigma) pH 7,0
10x TBE	107,8 g Tris (0,89 M) 55 g Borat (0,89 M) 7,4 g EDTA-Na ₂ x2H ₂ O (20 mM)
Tris/HCl pH7,5	1 M Tris mit HCl auf pH 7,5 einstellen
1x TE	10 mM Tris/HCl pH 7,5 1 mM EDTA

3.1.4 Kits und Reagenziensätze

Bezeichnung	Hersteller
LightCycler – FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche (Mannheim)
Effectene-Transfektions Reagents Kit	Qiagen (Hilden)
QIAamp DNA Blood Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep Miniprep	Qiagen (Hilden)

3.1.5 Oligonukleotide

In HPSF gereinigter Form (MWG-Biotech AG)

3.1.5.1 PCR-Primer

Bezeichnung	Oligonucleotid-Sequenz
Amelo A	5'-CCC TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG-3'
Amelo B*	5'-ATC AGA GCT TAA ACT GGG AAG CTG -3'
SRY1	5'-TGG CGA TTA AGT CAA ATT CGC-3'
SRY2*	5'-CCC CCT AGT ACC CTG ACA ATG TAT T-3'

*Mit Fluoreszenz-Farbstoff IRD 800

3.1.6 FISH-Sonden

Bezeichnung	Hersteller
CEP Y, Satelliten III DNA-Sonde für Yq12 markiert in <i>Spectrum Green</i>	Vysis, IL., USA
CEP X, alpha Satelliten-Sonde für Xp11.1-q11.1 labeled in <i>Spectrum Orange</i>	Vysis, IL., USA

3.1.7 Kulturmedien

Bezeichnung	Hersteller
Amnio-max C 100	Gibco, Life Technologies
Chang C	Gibco, Life Technologies
C-Plus Medium select Fördert das rasche Wachstum fetaler Zellen in allen Primärkulturen von Zellen aus fetaler Abstammung	Celina Ruhmann (Ober-Mörlen)
Methocult H4431 Komplettes Methylcellulose-Medium mit 10% Agar-LCM); enthält 1% Erythropoetin, 1% Bovine Serum Albumin, 2nM L-glutamin, 30% fetales Kälberserum	CellSystems (Katharinen)
StemSpan SF Expansions Medium (serumfrei) Es wurde für die <i>in vitro</i> Kultivierung und Expansion von hämatopoetischen Zellen entwickelt	CellSystems (Katharinen)
StemαII E Eignet sich für das Wachstum humaner erythroider Vorläuferzellen (CFU-E, BFU-E) aus aufgereinigtem peripheren Blut	TEBU (Frankfurt/Main)

3.1.8 LB-Medium

1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,2% (w/v) Maltose, der pH wurde mit 10 N NaOH auf 7,0 eingestellt und die Lösung autoklaviert. Das Flüssigmedium eignet sich insbesondere für die Anzucht von *E. coli*-Bakterienstämmen.

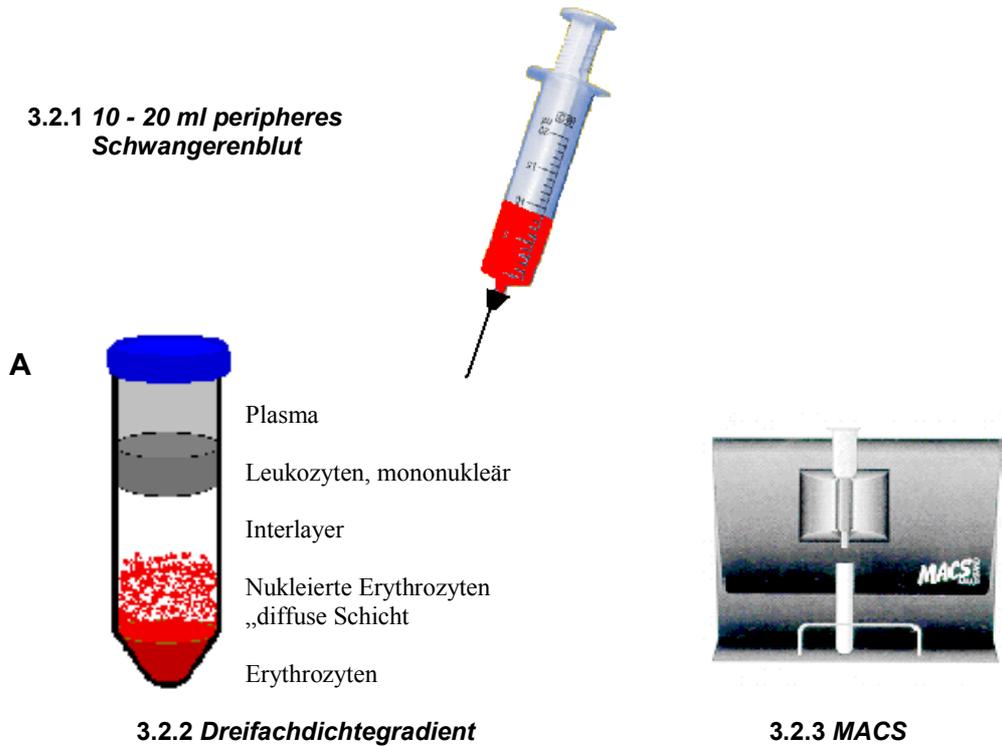
3.1.9 Einfrieren von Bakterienkulturen

Von einer Übernachtskultur mit einer $OD_{580} = 1,0 - 1,5$ werden 850 μl in ein Eppendorfgefäß überführt, mit 150 μl 87%igem Glycerin vermischt und bei -20°C gelagert. So behandelt kann die Bakterienkultur mindestens ein Jahr gelagert werden.

3.2 Methoden

Medien und Puffer wurden mit bidestilliertem H₂O angesetzt und – soweit notwendig - autoklaviert oder sterilfiltriert.

3.2.1 10 - 20 ml peripheres Schwangerenblut



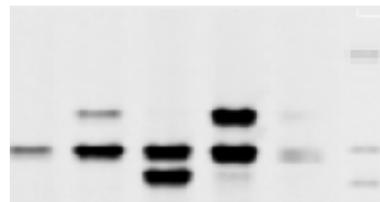
B



C



3.2.12 Interphase FISH



3.2.9 PCR

Abbildung 1: Methode der Aufbereitung von peripherem Schwangerenblut: In der ersten Phase **A** wird das Blut mit Dichtegradient und/oder MACS aufgereinigt. In einer zweiten Phase **B** erfolgt das Sammeln der Einzelzellen direkt oder nach Kultivierung. In Phase **C** erfolgt die Analyse der Zellen über PCR und/oder FISH.

3.2.1 Schwangerenblut

Die Untersuchungen wurden durch die Ethikkommission genehmigt. Die Blutentnahme wurde nach Aufklärung und mit Einverständnis der Schwangeren durchgeführt. 10 – 20 ml peripheres Blut wurde den Schwangeren mit männlichem Fötus mit einer 20 ml Einmalspritze, die mit 2 ml Vetren 200 bestückt wurde, oder mit 10 ml Na-Heparin Monovetten (Sarstedt) abgenommen. Nach der Abnahme wurde das Blut sofort verarbeitet bzw. über Nacht gerollt und anschließend weiterverarbeitet.

3.2.2 Dichtegradienten-Zentrifugation

Bei diesem Verfahren handelt es sich um ein Trennverfahren, um die unterschiedlichen Zelltypen der Dichte nach aufzutrennen. Die hier verwendete Dichtelösung Histopaque ist eine Lösung aus Polysaccharose und Natriumdiatrizoat mit einer Dichte von 1,077 g/l bzw. 1,119 g/l. Histopaque mit der Dichte von 1,110 g/l wird aus einer Mischung der beiden fertigen Lösungen angesetzt. Nukleierte Erythrozyten und andere mononukleäre Zellen verbleiben in der Interphase. Erythrozyten und Granulozyten werden aggregiert und rasch sedimentiert.

3.2.2.1 Protokoll zur Einfachdichtegradienten-Zentrifugation

- Peripheres Schwangerenblut mit PBS 1:1 verdünnen
- Mit der äquivalenten Menge Histopaque –1077 unterschichten
- Bei 800 g für 30 min zentrifugieren
- mononukleäre Zellen mit einer Spritze abziehen (destinkte helle Bande)
- Zellen mit PBS waschen (3 mal)

3.2.2.2 Protokoll zur Dreifachdichtegradienten-Zentrifugation

- Peripheres Schwangerenblut mit PBS-Puffer 1:2 verdünnen
- 6 ml verdünntes Blut in Zentrifugenröhrchen geben
- Je 2 ml Histopaque -1077, -1110, -1119 unterschichten
- Bei 560 g für 30 min zentrifugieren (ohne Bremse)
- Entstandene einzelne Schichten abziehen
- Weiße Bande und den Bereich zwischen weißer Bande und Erythrozytenpellet poolen
- Restbanden verwerfen
- Gepoolte Zellen mit PBS-Puffer 3 mal waschen

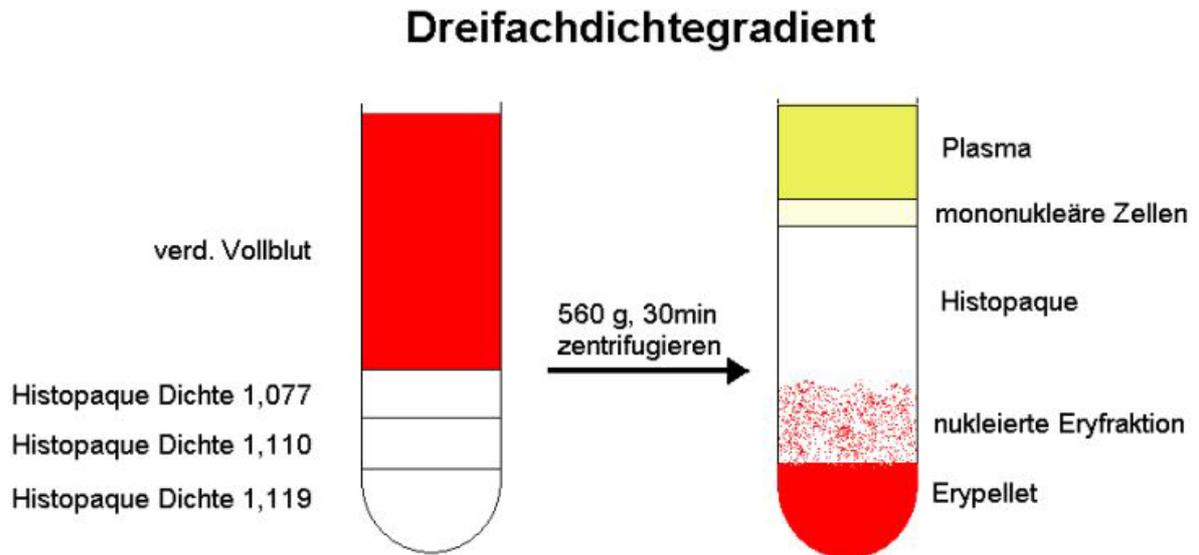


Abbildung 2: Dreifachdichtegradienten-Zentrifugation:

Nach der Zentrifugation haben sich Zellfraktionen in einzelne voneinander getrennten Banden entsprechend ihrer spezifischen Dichte aufgeteilt.

3.2.3 Magnetische Zellsortierung (*magnetic activated cell sorting, MACS*)

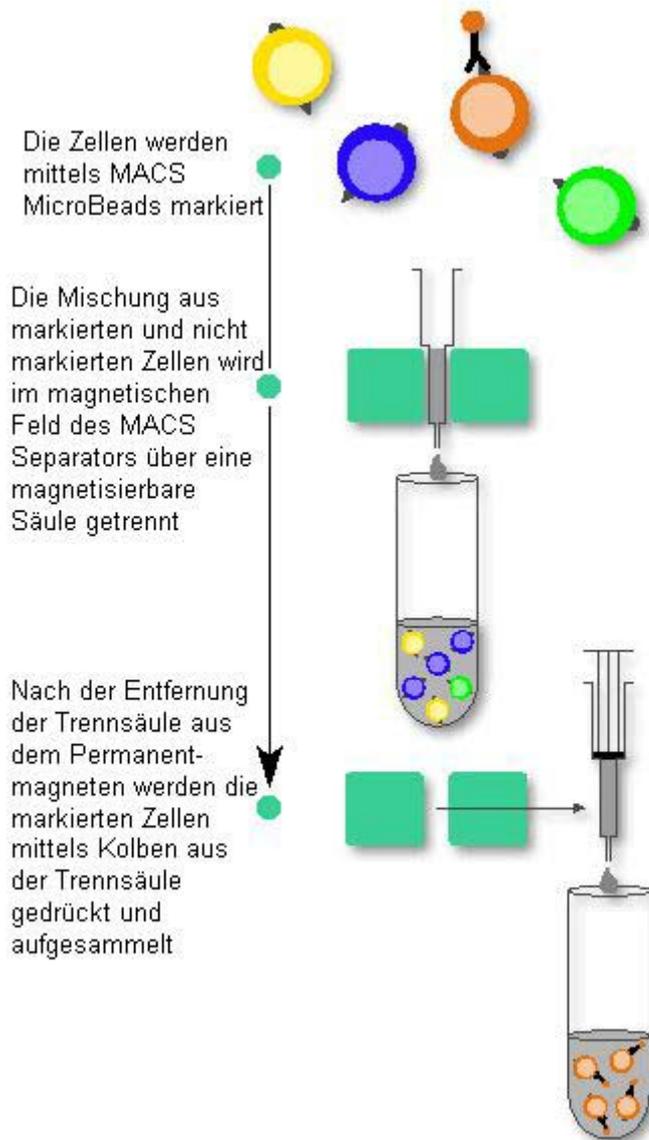


Abbildung 3: MACS (modifiziert nach Miltenyi):

Die Anreicherung erfolgt mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, die an magnetische Beads gekoppelt sind.

3.2.4 OncoQuick®

OncoQuick® dient zur Anreicherung disseminierter, zirkulierender Tumorzellen aus Vollblut und wurde für 15 ml bis 25 ml antikoagulierendes Vollblut optimiert. Es besteht aus einem klaren, sterilen 50 ml Zentrifugenröhrchen, das durch eine poröse Trennscheibe in zwei Kompartimente unterteilt ist. Das untere Kompartiment enthält das blaue Trennmedium und im oberen können bis zu 25 ml der zu untersuchenden Blutprobe eingefüllt werden. Während des 20-minütigen Zentrifugationsschrittes werden die im Blut befindlichen Zellen

entsprechend ihrer spezifischen Dichte getrennt. Aufgrund der besonderen Eigenschaften des Separationsmediums werden Blutzellen wie Erythrozyten und Leukozyten in das untere Kompartiment sedimentiert und verdrängen dabei das Trennmedium in das obere Kompartiment. Die Zellfraktion mit der geringeren Dichte, die die Tumorzellen enthält, wird in der Interphase im oberen Kompartiment zwischen Plasma und Trennmedium angereichert und kann von dort entnommen werden.

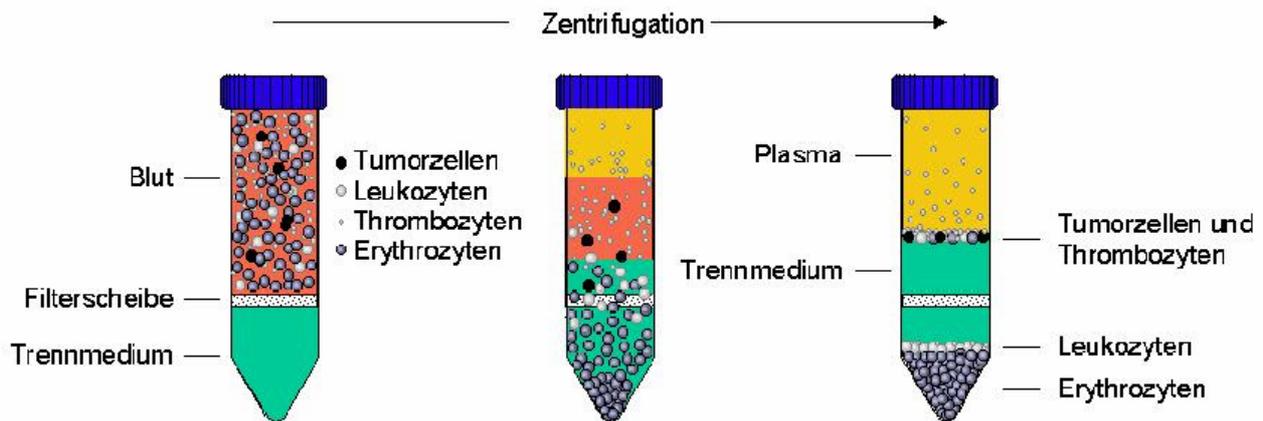


Abbildung 4: OncoQuick®:

Die Röhrchen werden mit Vollblut gefüllt. Dargestellt sind die 3 Phasen, vor, während und nach der Zentrifugation.

3.2.4.1 Protokoll

- OncoQuick®-Röhrchen und Blutproben 10 - 15 min auf Eis inkubieren
- Das gekühlte Vollblut (15 - 25 ml) vorsichtig und ohne Aufwirbelung des unter der porösen Trennwand befindlichen Trennmediums in das obere Kompartiment füllen
- Das befüllte OncoQuick®-Röhrchen bei 1600 x g und 4°C für 20 min in einem Ausschwingrotor mit geringer Beschleunigung und ohne Bremse zentrifugieren
- Mit einer 10 ml serologischen Einweg-Pipette nun vorsichtig die Interphase-Zellschicht entnehmen und in ein frisches 50 ml Zentrifugenröhrchen überführen
- 1 x Waschpuffer bis zu einem Endvolumen von 50 ml zugeben, Röhrchen verschließen und den Inhalt unter 5-maligem Über-Kopf-Drehen des Röhrchens vorsichtig mischen
- Zellen 10 min bei 200 x g pelletieren
- Vorsichtig und ohne das Zellpellet aufzuwirbeln etwa 45 ml des Überstandes abnehmen und das Pellet in den restlichen 5 ml Waschpuffer belassen. Zellen durch vorsichtiges Vortexen oder Klopfen mit dem Finger an das Röhrchen resuspendieren
- 1 x Waschpuffer bis zu einem Endvolumen von 50 ml zugeben, Röhrchen verschließen
- Inhalt unter 5-maligem Über-Kopf-Drehen des Röhrchens vorsichtig mischen

- Zellen 10 min bei 200 x g pelletieren
- So viel Überstand abnehmen, wie es ohne Aufwirbelung des Zellpellets möglich ist. Zellpellet in dem für das anschließende Verfahren gewünschtem Medium resuspendieren

3.2.5 Sammeln von Einzelzellen

Die Zellsuspension wird in einer Petrischale verdünnt, bis ein *monolayer* entstanden ist. Die Zellen werden nun nach morphologischen Gesichtspunkten lichtmikroskopisch klassifiziert. Nach ihrer Klassifizierung werden die einzelnen Zellen mit Hilfe einer ausgezogenen Pasteurpipette und eines Mikromanipulators entnommen. Zur weiteren PCR Analyse werden die so gesammelten Einzelzellen aus der Pasteurpipette in 0,5 ml Eppendorfgläser transferiert, die mit jeweils 5 µl *aqua dest.* befüllt wurden.

3.2.6 DNA-Isolation aus Blut und Fruchtwasser

Die Isolation wurde mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®) durchgeführt. Die Aufreinigung der DNA funktioniert nach folgendem Prinzip: Optimierte Puffer lysieren die Probe, stabilisieren die Nukleinsäuren und verstärken die selektive Adsorption an die QIAamp-Membran. Danach wird Alkohol hinzugefügt. Mit diesem vorbereiteten Gemisch wird die QIAamp-Säule beladen. Waschpuffer beseitigen die Verunreinigungen. Anschließend wird die DNA in Wasser oder Puffer mit niedrigem Salzgehalt eluiert.

3.2.6.1 Protokoll (nach Qiagen)

3.2.6.1.1 Lyse der DNA

- 20 µl Qiagen Protease in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen geben
- 200 µl Probe (Blut, Fruchtwasser) hinzugeben
- 200 µl Buffer AL hinzugeben
- Mischen durch 15 sec vortexen
- Bei 56°C für 10 min inkubieren
- Kurz abzentrifugieren, um die Tropfen am Rand des Mikrozentrifugenröhrchens zu beseitigen
- 200 µl Ethanol (96% - 100%) hinzugeben
- Für 15 sec vortexen
- Das Lysat in ein QIAamp-Zentrifugenröhrchen überführen
- In ein 2 ml QIAamp-Sammelröhrchen setzen

- Für 1 min bei 6000 x g abzentrifugieren
- Die DNA waschen
- 500 µl Buffer AW1 in das QIAamp-Zentrifugenröhrchen geben
- bei 6000 x g für 1 min abzentrifugieren
- 500 µl Buffer AW2 in das QIAamp-Zentrifugenröhrchen geben
- Bei 20000 x g für 3 min abzentrifugieren
- Bei 20000 x g für 1 min nochmals abzentrifugieren

3.2.6.1.2 *Elution der DNA*

- QIAamp-Zentrifugenröhrchen in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen setzen
- 200 µl Buffer AE hinzugeben
- 1 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Bei 6000 x g für 1 min abzentrifugieren

Die DNA befindet sich nun in der AE-Lösung.

3.2.7 **DNA-Konzentrationsbestimmung durch UV-Spektrometrie**

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren ist einerseits durch photometrische Analyse andererseits durch eine Ethidiumbromid-Fluoreszenzabschätzung möglich. Eine photometrische Analyse erfolgt im Spektralphotometer mit Hilfe einer Quarzküvette. Zu jeder Messung wird zunächst ein Referenzwert ermittelt. Die Messung wird bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt, weil das Absorptionsspektrum der Nukleotide AMP und UMP ein Maximum bei 260 nm besitzt. Bei allen Proben wird zusätzlich die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen, dem Absorptionsmaximum der Aminosäure Tryptophan. Über den Quotienten aus beiden Extinktionwerten (260 nm/280 nm) kann die Verunreinigung der Nukleinsäuren durch Proteine ermittelt werden. Im optimalen Fall sollte der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 liegen (Maniatis, 1985).

3.2.8 **Proteinase K–Verdau von Einzelzellen zum Aufschließen der DNA**

- Einzelzelle in 0,5 ml Eppendorfgefäß mit 5 µl H₂O mittels ausgezogener Pasteurpipette am Mikromanipulator überführen
- 0,3 µl Proteinase K, 1 µl PCR-Buffer, 4 µl H₂O hinzugeben
- 2 h bei 60°C inkubieren
- Proteinase K für 2 min bei 94°C inaktivieren

Eine Einzelzell-PCR des 10 µl Lysats kann jetzt in dem gleichen Gefäß durchgeführt werden. So werden DNA-Verluste minimiert (Mullis und Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988).

3.2.9 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) ist eine schnelle Methode, um *in vitro* ein bestimmtes DNA-Fragment enzymatisch zu vervielfältigen. Die PCR wurde 1983 von Kary B. Mullis erfunden und 1985 erstmals veröffentlicht (Saiki *et al.*, 1985). 1993 wurde diese Technik mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

Der Reaktionsansatz setzt sich aus der zu vervielfältigenden DNA, zwei einzelsträngigen Oligonukleotid-Primern (sense und antisense), sowie einer entsprechenden Menge Desoxyribonukleosid-Triphosphaten (dNTPs) zusammen. Weiterhin wird ein Enzym, die thermostabile DNA-Polymerase aus dem Mikroorganismus *Thermus aquaticus* (Taq-DNA-Polymerase), zur DNA-Synthese benötigt. Die Primer-Konzentration ist um ein Vielfaches höher als die Konzentration der zu amplifizierenden DNA. Der Amplifikationsprozeß unterliegt drei aufeinanderfolgenden Temperaturschritten, welche für jeden Amplifikationsprozeß optimiert werden müssen und in einem programmierbaren Thermocycler ablaufen. Der erste Schritt dient der Denaturierung der doppelsträngigen DNA. Das Prinzip der PCR-Reaktion besteht aus einer Anlagerung (*annealing*) und Verlängerung (*elongation*) der beiden Primer, die gegenläufig an die komplementären DNA-Stränge binden und den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren. Ein PCR-Zyklus beginnt mit der Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94°C. Nach einem Absenken der Temperatur auf die Annealingtemperatur, die von den verwendeten Primern abhängig ist, hybridisieren die Primer an die komplementären Sequenzabschnitte. In der Elongationsphase verlängert die DNA-Polymerase bei ca. 72°C die Primerkomplementarität zur Matrize. Es entstehen zwei doppelsträngige Produkte, die exakt der Länge der Primer und der elterlichen DNA zwischen ihnen entsprechen. Jeder Strang ist erneut komplementär zu einem der beiden Primer. Beim Eintritt in den nächsten Zyklus werden Matrize und neu synthetisierter Strang durch Hitzedenaturierung voneinander getrennt und beide dienen wiederum als Matrize. Durch aufeinanderfolgende PCR-Zyklen kann die *target*-DNA, flankiert durch die beiden Oligonukleotidprimer so exponentiell amplifiziert werden. Da für die PCR hitzestabile DNA-Polymerasen wie z. B. die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* Verwendung finden, können die DNA-Doppelstränge bei 94°C denaturiert werden, ohne eine irreversible Schädigung der Polymerase zu verursachen. Eine ideale Polymerase-Kettenreaktion zeichnet sich durch hohe Spezifität, Ausbeute und Genauigkeit aus. Jeder dieser drei Parameter wird

durch zahlreiche Einzelkomponenten der PCR beeinflusst. In diesem Zusammenhang fallen besonders die Pufferbestandteile, die Amplifikationsbedingungen (insbesondere die Annealingtemperatur, die wiederum abhängig von der Schmelztemperatur (T_m) der jeweiligen Primer ist) und die Qualität der Polymerase (Cha und Tilly, 1993) ins Gewicht. Eine Identifizierung der Länge der generierten Fragmente ist gelelektrophoretisch möglich. Die PCR besitzt weite Anwendungsfelder in der Molekularbiologie, molekularen Evolution, medizinischen Genetik, Populationsgenetik, forensischen Biologie, sowie in Genomkartierungs- und Sequenzierungsprojekten (Seyffert, 1998).

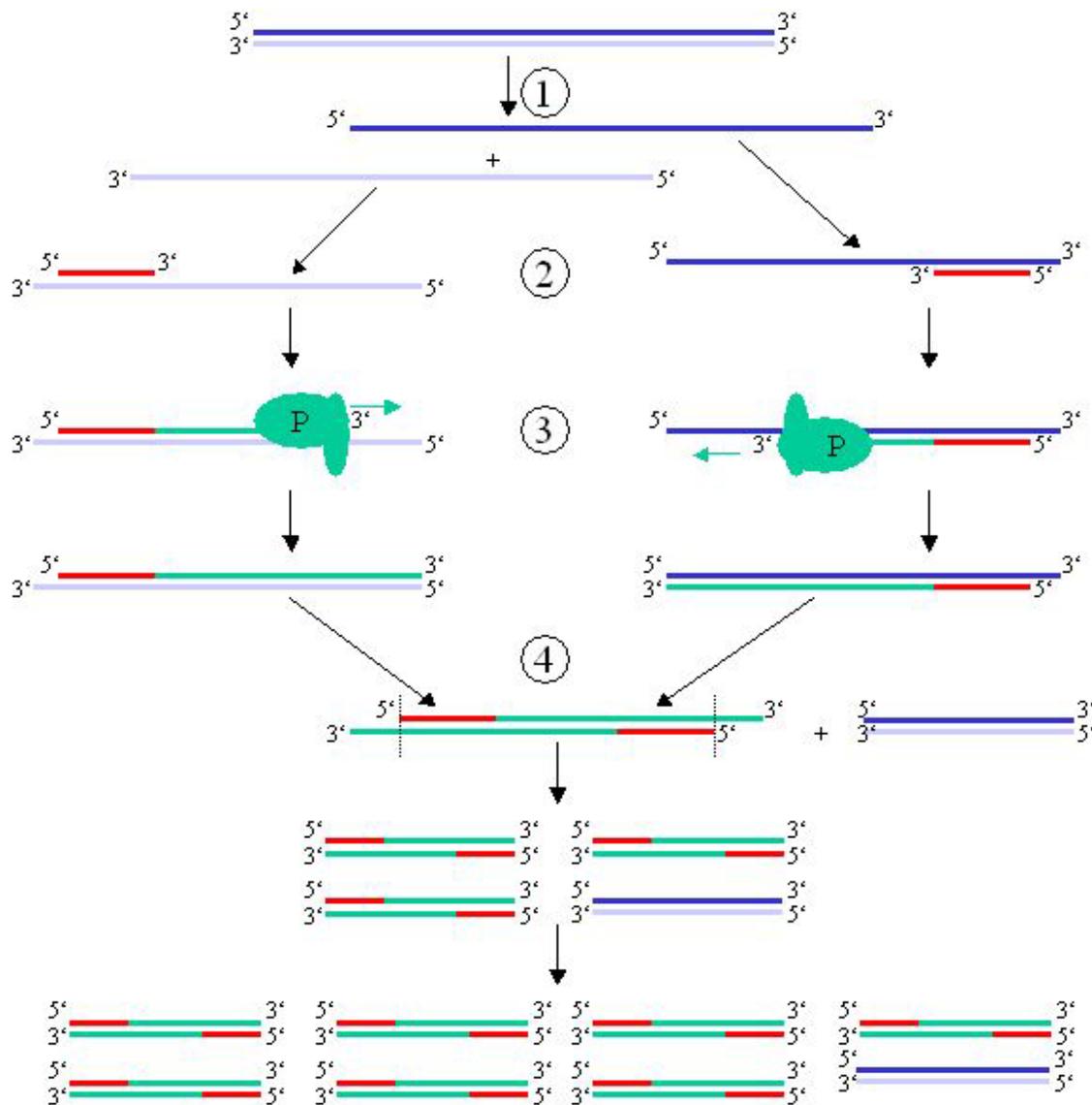


Abbildung 5: Schematische Darstellung des PCR-Zyklus (modifiziert nach M. Manske): (1) Schmelzen bei 96°C. (2) Anlagerung bei 68°C. (3) Verlängerung bei 72°C (P=Polymerase). (4) Der erste Zyklus ist komplett. Die beiden erzeugten DNA-Stränge werden zum Ausgangsmaterial für den nächsten Zyklus, wodurch sich die Menge an DNA bei jedem Zyklus verdoppelt.

3.2.9.1 Komponenten der Einzelzell-PCR

Komponenten	Volumen [µl]	Endkonzentration
-------------	--------------	------------------

H ₂ O	6,5	
DNA	10	3,3 pg / μ l
10 x PCR-Buffer II	1,85	
MgCl ₂	3	2,5 mM
dNTP's	1,25	100 μ M
Amelogenin-Primer (up)	1	0,4 μ M
Amelogenin-Primer (down)	1	0,4 μ M
Taq-Polymerase (Stoffel-Fragment)	0,4	5 U/ μ l
Gesamtvolumen	25 μl	

3.2.9.2 PCR-Protokoll

Die PCR wird mit einer Zyklenzahl von 29 bis 31 Zyklen durchgeführt. Jeder Zyklus besteht aus den folgenden Schritten:

PCR-Schritte	Temperatur [°C]	Zeit [sec]
Denaturierung	95	45
Primer-Annealing	60	45
Primer-Extension	72	45

3.2.10 Quantitative *realtime* PCR

Der LightCycler eröffnet die Möglichkeit, im Gegensatz zu einer konventionellen PCR-Reaktion im Thermocycler, eine PCR-Reaktion in Echtzeit zu verfolgen und das in einer viel schnelleren Reaktionszeit. Dabei kann die amplifizierte DNA online quantifiziert werden. Es existieren zwei Methoden der Online-Detektion und Evaluierung der fluorometrischen PCR Reaktion in Glaskapillaren. Die Detektion der DNA erfolgt zum einen über einen Fluoreszenzfarbstoff, der sequenzunabhängig an doppelsträngige DNA bindet, oder zum anderen mit Hilfe von Hybridisierungsproben, die sequenzspezifisch bestimmte PCR-Produkte detektieren. Der hier verwendete Farbstoff SYBR® Green I lagert sich sequenzunabhängig an der kleinen Furche (Minor Groove) von doppelsträngiger DNA ein. Durch diese Bindung wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein Vielfaches verstärkt und man erhält ein Signal, dessen Intensität direkt proportional zu der Zahl der vorhandenen Doppelstränge ist. Die Fluoreszenzemission besitzt eine Wellenlänge von 521 nm. Im LightCycler wird diese emittierte Fluoreszenz nach jedem Zyklus (Verdoppelung der Menge an doppelsträngiger DNA) gemessen. Nach einer bestimmten Zahl von Zyklen (abhängig von der Zahl der Ausgangskopien) wird die Fluoreszenz schließlich meßbar. Dieses Signal ist direkt proportional zur Menge an gebildeter DNA und steigt wie auch die Menge an DNA exponentiell bis zum Erreichen eines Maximums an. Korreliert man nun den logarithmischen Anstieg mit dem entsprechenden Zyklus und legt einen Standard zugrunde, erhält man eine direkte quantitative Aussage. Die ungebundenen SYBR® Green I –

Moleküle fluoreszieren nur schwach. Diese Fluoreszenz wird über eine nachfolgende Computeranalyse substrahiert und verrechnet. Mit Hilfe der Schmelzkurve kann der Schmelzpunkt des Reaktionsproduktes ermittelt werden. So ist eine weitere Analyse und Differenzierung der Reaktionsqualität möglich.

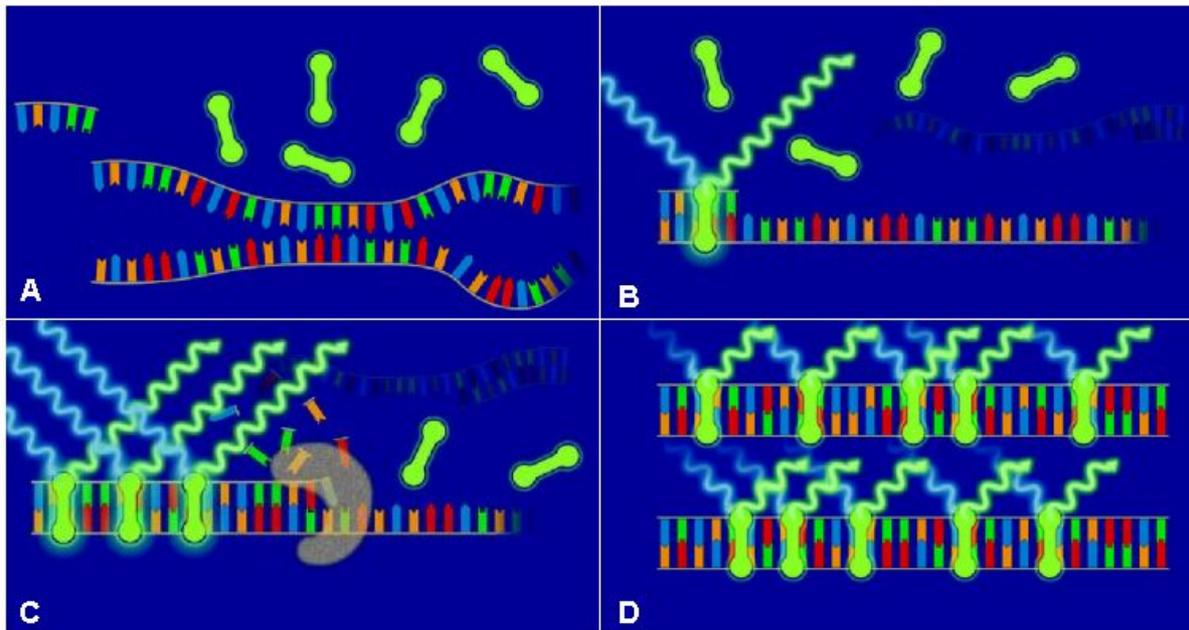


Abbildung 6: *Realtime* PCR mit SYBR® Green I:

Schematischer Ablauf einer PCR Reaktion mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff SYBR® Green I. Bild A zeigt die Denaturierung, Bild B die Primeranlagerung (Annealing), Bild C die Kettenverlängerung (Elongation) und Bild D das Ende des jeweiligen Zyklus.

3.2.10.1 Zusammensetzung der qPCR für SYBR Green I

Komponenten	Volumen [µl]	Endkonzentration
H ₂ O	11,6	
MgCl ₂	2,4	4 mM
SRY-Primer (up)	1	0,5 mM
SRY-Primer (down)	1	0,5 mM
LightCycler – FastStart DNA Master SYBR Green I	2	1 x
Probe (DNA)	2	
Gesamtvolumen	20	

3.2.10.2 Protokoll

3.2.10.2.1 Aktivierung der Polymerase (Hot Start)

Zieltemperatur [°C]	95
Inkubationszeit [min]	10
Temperatur Transitionsrate [°C/s]	20
Zyklenzahl	1

3.2.10.2.2 Amplifikation

	Zieltemperatur [°C]	Inkubationszeit [sec]	Temperatur Transitionsrate [°C/s]
Denaturierung	95	15	20
Annealing	55	5	20
Elongation	72	10	20
Zyklenzahl	42		

3.2.10.2.3 Schmelzkurve

	Zieltemperatur [°C]	Inkubationszeit [sec]	Temperatur Transitionsrate [°C/s]
Denaturierung	95	0	20
Ausgangspunkt	60	15	0
Endpunkt	95	0	0,1

3.2.11 Elektrophoretische Auftrennung von DNA – Fragmenten

3.2.11.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die nicht-denaturierende native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde zur Analyse der PCR-Produkte eingesetzt. Die Auftrennung dieser DNA-Fragmente erfolgte mit 1 x TBE als Laufpuffer. Die Herstellung des PAA-Gels erfolgt nach folgendem Protokoll:

- Gießen eines 6% Sequagels XR in einer 25 cm Apparatur am LI-COR zwischen zwei mit Silan behandelten Glasplatten. Die Dicke des Gels beträgt 0,4 mm.
- 20 ml Sequagel XR und 5 ml Sequagel Puffer in einem Glaszylinder mischen
- 210 µl frisches 10% APS werden hinzugegeben
- Das flüssige Gel in den 4 mm Hohlraum gießen, der von den Glasplatten mittels Spacer gebildet wird
- Den Kamm für die Geltaschen einsetzen
- Gel ca. 1 h aushärten lassen und in den LI-COR 4000 einhängen
- Puffertanks mit 1 x TBE Puffer befüllen
- Das Elektrophoreseprogramm am LI-COR starten

3.2.11.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese kann zur Längen- und Reinheitsbestimmung von PCR-Produkten verwendet werden. Die Proben wandern im Gel durch das Anlegen eines elektrischen Feldes von der Kathode zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit und die Auftrennung der DNA-Fragmente hängen in erster Linie von der Länge und Konformation der DNA, vom pH-Wert und der Zusammensetzung des Gelpuffers, sowie von der elektrischen Spannung und von der Konzentration der Agarose im Gel ab. Der Logarithmus der elektrophoretischen Beweglichkeit der DNA-Moleküle ist proportional zur Agarosekonzentration im Gel. Diese Beziehung gilt jedoch nicht für DNA-Fragmente die größer sind als 50 kb. Sie wandern im Gel mit annähernd gleicher Geschwindigkeit (Seyffert *et al.* 1998).

Das im Elektrophorese-Puffer enthaltene Ethidiumbromid interkaliert während der Elektrophorese in die DNA. Dadurch kann die DNA durch Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden. DNA-Mengen von etwa 2 ng können im Gel gerade noch nachgewiesen werden. Durch Fotografieren des Gels können die Ergebnisse dokumentiert werden. Um die Größe der Banden genau analysieren zu können, läßt man einen Längenstandard im Gel mitlaufen. Die Herstellung des Agarosegels erfolgt nach folgendem Protokoll:

- Agarose LE in mit Ethidiumbromid versetztem 1x TBE lösen
- mehrfach in der Mikrowelle aufgeköchen
- abkühlen lassen und vor der Polymerisation in horizontale Gelträger gießen
- Kunststoffkamm für die Geltaschen einsetzen
- Die DNA-Proben mit entsprechender Menge „Gel Load Mix“ oder „Orange G“ versetzen und in die Geltaschen füllen

3.2.12 Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH)

Im Jahre 1969 wurde die *in situ* Hybridisierung durch Gall und Pardue entwickelt. Die räumliche Lokalisation von DNA oder RNA in Geweben, in Zellen oder auf Chromosomen wurde durch radioaktive Markierung möglich. Dieses Verfahren erlaubt die Lokalisation einzelner Gene auf definierten chromosomalen Regionen und den Nachweis chromosomaler Translokationen und Aberrationen. Aufgrund der Radioaktivität ist diese Methode jedoch mit Risiken verbunden und zudem sehr aufwendig in ihrer Durchführung.

Anfang der 80er Jahre wurde die nichtradioaktive Markierung von DNA entwickelt (Langer *et al.*, 1981; Pinkel *et al.*, 1986). Sie führt schneller zum Ergebnis und zeigt bessere Signale mit weniger Hintergrund. Die Nachweisgrenze dieser Technik liegt jedoch mit etwa 1 kb (Cherif *et al.*, 1989) unter der radioaktiven Technik mit etwa 0,5 kb. Anstatt die DNA- oder RNA-Proben mit Tritium zu markieren, werden Haptene, Biotin, Digoxigenin oder andere an Nukleotide gekoppelte Substanzen verwendet. Dabei kann die DNA indirekt oder direkt markiert werden. Bei der indirekten Methode werden z. B. biotinylierte Nukleotide in die Proben DNA integriert. Die Visualisierung der Sonde wird durch hochspezifische Wechselwirkungen zwischen Biotin und Avidin erreicht (s. oben). Dabei ist an Avidin ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Es kann außerdem eine Verstärkung der Signale durch das Sandwich-System mittels biotinyliertem Antiavidin erreicht werden. Bei der direkten Markierung werden die fluorochrommarkierten dUTPs in das *template* eingebaut. Es ist dann keine Detektion mehr notwendig. Die Signale können jedoch nicht verstärkt werden. Die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten DNA-Sonden werden durch die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht.

An menschlichen Chromosomen wurde die FISH erstmals 1986 von Pinkel *et al.* beschrieben. Um festzustellen, ob eine Deletion von bestimmten chromosomalen Regionen vorliegt, ist die FISH-Analyse eine sehr einfache und vorteilhafte Methode. Die Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung wird in der Forschung zur Kartierung von Genen, sowie zum Nachweis von Chromosomenaberrationen wie z. B. Translokationen, Deletionen, Inversionen und Duplikationen und in der pränatalen und der postnatalen Diagnostik, sowie in der Tumordiagnostik zur exakten Beschreibung von Chromosomenaberrationen eingesetzt. Die FISH ist eine Technik, mit der es möglich ist, DNA-Banken auf Metaphase- oder Interphasepräparaten zu hybridisieren und diese dann im Fluoreszenzmikroskop an den Stellen der DNA nachzuweisen, die für diese Sonden komplementär sind. Folgende DNA-Sonden können für die Hybridisierung verwendet werden:

- Zentromer-spezifische Sonden, die für alle Chromosomen erhältlich sind und hauptsächlich in der Interphasekern-Diagnostik Anwendung finden (Blennow, 1994)
- Chromosomenspezifische Banken, mit denen ganze Chromosomen nachgewiesen werden können („whole chromosome painting“, wcp) und die sowohl über Durchflußzytometrie („flow sorting“), wie auch über Mikrosezierung gewonnen werden können
- Chromosomenarm-spezifische Banken, mit denen jeweils der kurze (p) oder der lange (q) Arm der Chromosomen nachgewiesen werden kann („partial chromosome painting“, pc). Diese Banken werden in der Regel über Mikrosezierung hergestellt.
- Single copy Sonden enthalten einzelne Sequenzen in verschiedenen Größen
- MCB (Multi color banding) In einem Hybridisierungsschritt können mehrere, jeweils unterschiedlich markierte Sonden eingesetzt werden. Das ermöglicht präzisere Aussagen gerade bei komplexen Veränderungen.

3.2.13 Präparation von Blutzellen für die FISH-Analyse

Die Zellen müssen für die FISH Analyse fixiert werden. Ihre Zelloberfläche muß vorbehandelt werden, damit die FISH-Sonden die DNA im Zellkern erreichen.

3.2.13.1 Protokoll zur Gewinnung der Zellen

- MACS-positive Pellets bei 1500 U/min zentrifugieren
- 5 ml KCl bei 37°C vorwärmen
- 5 ml Fix bei -20°C kaltstellen
- Überstand absaugen
- Die Zellen im restlichen Tropfen resuspendieren
- 5 ml hypotone Lösung hinzugeben
- 20 min bei 37°C inkubieren
- Langsames Zutropfen von 2 ml kaltem Fix
- 5 min bei 1500 U/min zentrifugieren
- Überstand absaugen
- Im restlichen Tropfen resuspendieren
- 3 ml kaltes Fix hinzugeben
- 5 min bei -20°C inkubieren
- 5 min bei 1500 U/min zentrifugieren
- Bis auf 100 µl absaugen

- Zellpellet im verbleibenden Tropfen resuspendieren
- Die Zellen auf Super-Frost OT auftropfen (nahe an der Oberfläche auf die gleiche Stelle)
- Die Zellen lufttrocknen lassen
- Durch die aufsteigende Ethanolreihe (70%, 95%, 100%) ziehen; je 2 min

3.2.13.1.1 Pepsinverdau

- 5 min in einer Küvette bei 37°C

Inhalt der Küvette: 100 ml H₂O, 1ml HCl (1M), 100 µl Pepsin

- 5 min in 1xPBS inkubieren
- 100 µl Postfix 10 min auf OT inkubieren
- 5 min in 1 x PBS inkubieren
- Durch Alkoholreihe ziehen, je 3 min bei 70%, 95% und 100%

3.2.13.1.2 Denaturierung

- OT auf Heizplatte bei 72°C (ca. 5 min) vorwärmen
- 100 µl 70% Formamid auf Deckglas geben und damit OT abdecken
- OT für 3 min auf der Heizplatte denaturieren
- Deckglas entfernen
- OT in 70% Ethanol (-20°C) für 3 min dehydrieren
- OT bei RT für je 3 min in 95% und 100% Ethanol dehydrieren
- Lufttrocknen

3.2.13.1.3 Direktmarkierte Zentromerproben

- Proben (cep X, cep Y; Vysis) werden nicht denaturiert, sondern nur bei RT angewärmt
- 10µl Probe auf OT geben und mit 24x24mm Deckglas abdecken
- Luftdichtes Abschließen mit Fixogum
- OT über Nacht bei 37°C in feuchter Kammer hybridisieren

3.2.13.1.4 Detektion

Rapid wash:

- 0,4x SSC im Wasserbad auf 70°C vorwärmen
- OT bei 70°C für 2 min waschen
- OT bei RT für 1 min in 4x SSC/Tw waschen
- In 1x PBS kurz waschen
- Je 3 min in aufsteigender Ethanolreihe dehydrieren
- OT im Dunkeln lufttrocknen
- Mit 20 µl DAPI-Lösung auf OT gegenfärben; mit Deckglas abdecken
- OT im Dunkeln bei 2 - 5°C lagern

3.2.13.2 Alternative Fixierung der Zellen

- Pellet und 200 µl 1% Formalinlösung (bzw. 2% Paraformaldehyd) für 15 min bei RT inkubieren
- Mit 200 µl PBS waschen und abzentrifugieren
- 150 µl des Überstandes abziehen
- Pellet resuspendieren
- auf OT tropfen
- Über Nacht trocknen lassen
- 20 min in 1% Formalinlösung (bzw. 2% Paraformaldehyd) inkubieren
- durch 1 x PBS und Aqua dest. ziehen, trocknen lassen

3.2.13.3 Präparation der kultivierten Zellen für FISH

Bei Y-positivem PCR-Ergebnis wurden die verbleibenden 150 µl der Zellsuspension einer FISH-Analyse unterzogen

- Die Zellen auf einen Objektträger auftropfen, der in eine Quadripermplatte liegt, die mit 7,5 ml hypotoner Lösung (0.4 % KCl, 0.4 % Na-citrate; 1:1) gefüllt ist
- Nach 12 min erfolgt die Vorfixation mit Methanol/Eisessig (3 : 1)
- Nach 5 min kleben die Zellen auf dem Objektträger
- 3 Waschschrirte mit Fixativ durchführen
- Die Zellen auf dem Objektträger bei RT trocknen lassen
- In einer Alkohloreihe (70%, 95%, 100%) dehydrieren
- FISH

3.2.14 Kultivierung von nukleierten Vorläuferzellen der roten Reihe

Für die Zellkultivierung von fetalen Zellen wurden verschiedene Kulturmedien getestet. Dabei wurde ein Standardverfahren angewendet, welches bei allen Medien durchgeführt wurde. Damit war ein direkter Vergleich der Kulturmedien untereinander möglich.

- Einfach- bzw. Dreifachdichtegradienten-Zentrifugation durchführen
- Die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer ermitteln
- Zwischen 10^5 und 10^6 Zellen pro ml in eine Petrischale mit 2 ml Kulturmedium einsäen
- Bei 37°C im begasten CO_2 Brutschrank in einem Zeitraum von 10 bis 14 Tagen kultivieren
- Die jeweiligen Einzelkolonien mit Hilfe einer ausgezogenen Pasteurpipette und eines Mikromanipulators unter dem Mikroskop sammeln
- Die Kolonien in eine 96 Well-Mikrotiterplatte überführen
- Den Ursprung der Kolonie (mütterlich oder fetal) mittels Amelogenin-PCR analysieren

3.2.15 Nachweis von DNA durch Restriktionsfragmentanalyse

Mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen können DNA-Fragmente auf dem Agarosegel nachgewiesen werden. Sie binden sequenzspezifisch und hydrolysieren dsDNA an der Bindungsstelle. Sie erkennen in der Regel eine palindromische Sequenz von vier bis acht Basenpaaren. Die Hydrolyse der Phosphorsäurediesterbindung kann symmetrisch (es entstehen glatte Enden - blunt ends), oder um mehrere Nukleotide versetzt (es entstehen überhängende Enden - sticky ends) erfolgen. Es sind heute mehr als 250 Restriktionsenzyme bekannt, die in 3 Klassen eingeteilt sind. Für die Molekulargenetik sind nur Enzyme der Klasse II interessant, die sequenzspezifisch spalten.

3.2.15.1 Spaltung mit Hilfe des Restriktionsenzym *Eco R1*

Eco R1 ist ein Restriktionsenzym vom Typ II. Es hat eine spezifische Erkennungssequenz $\text{G}^{\wedge}\text{AATTC-CTTAA}^{\wedge}\text{G}$ und spaltet doppelsträngige DNA in definierter Weise an dieser Stelle. Dabei entstehen Einzelstrangüberhänge, sog. „sticky ends“ in Form von 5'-Überhängen.

3.2.15.1.1 Protokoll

- ca. 1,5 μg DNA in H_2O gelöst in ein steriles Eppendorfgefäß geben
- 2 μl 10x TAM-Puffer zugeben
- Zugabe des Restriktionsenzym (1-5 U / μg DNA)

- steriles demin. H₂O bis zu einem Gesamtvolumen von 20 µl zufügen
- den Ansatz für eine Stunde bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubieren

Zusammensetzung	Volumenanteil
DNA	1 µl (20 - 50ng)
EcoR1	1 µl
Restriktionspuffer	1 µl
H ₂ O	7 µl
Gesamtvolumen:	10 µl

3.2.16 Klonierung

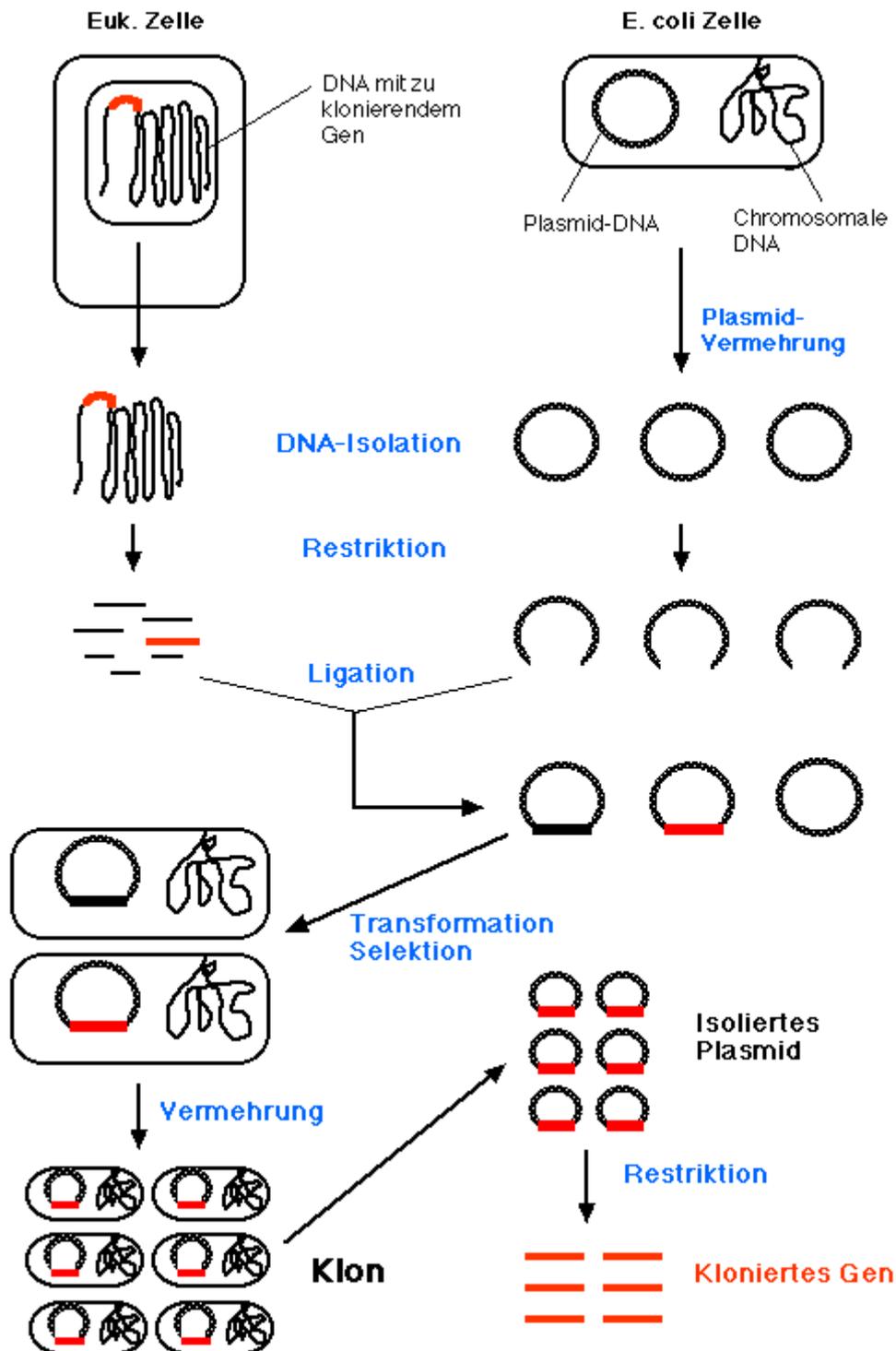


Abbildung 7: Die Einzelschritte der Klonierung:

Zunächst werden die Plasmide in *E. coli* vermehrt. Anschließend wird die Plasmid-DNA isoliert. Über eine Restriktionsspaltung werden die Plasmide und das zu klonierende Fragment gespalten und *blunt end* bzw. *sticky-end* ligiert. Im Anschluß daran erfolgt die Transformation in *E. coli* und deren Vermehrung in Kultur.

3.2.16.1 Isolierung von DNA (genomisch oder cDNA) und Plasmid-DNA

3.2.16.1.1 QIAprep Spin Miniprep Kit Protokoll

- Die pelletierten Zellen in 250 µl Buffer P1 resuspendieren und in ein Mikrozentrifugengefäß transferieren
- 250 µl von Buffer P2 hinzugeben und 4 - 6 mal invertieren
- 350 µl von Buffer N3 hinzugeben und wiederum 4 - 6 mal invertieren
- Für 10 min bei 5000 rpm zentrifugieren
- Den Überstand verwerfen und in die QIAprep Säule pipettieren
- 30 – 60 sec zentrifugieren und den Durchfluß verwerfen
- Die QIAprep Säule mit 5,5 ml Buffer PB waschen und 30 - 60 sec bei 4000 rpm abzentrifugieren
- Die QIAprep Säule mit Buffer PE waschen und nochmals 30 - 60 sec bei 4000 rpm abzentrifugieren
- Den Durchfluß verwerfen und nochmals 1 min bei 4000 rpm abzentrifugieren
- Die QIAprep Säule in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen geben
- 50 µl von Buffer EB hinzugeben, 1 min inkubieren, anschließend 1 min bei 10000 rpm zentrifugieren

3.2.16.2 Restriktionsspaltung der DNA und des Plasmids

Ein typischer Eco-R I- Restriktionsansatz mit einem Volumen von 10 µl sieht folgendermaßen aus:

3.2.16.2.1 Protokoll

- 8 µl DNA-Lösung (in TBE-Puffer oder Wasser)
- 1 µl 10x Reaktions-Puffer
- 0,8 µl Eco RI (5 U/µl)
- 3,2 - 0,2 µl steriles bidest. Wasser

3.2.16.3 Ligation von DNA-Fragmenten mit der Plasmid-DNA

Die T4-DNA-Ligase ist für die Ligation von DNA-Fragmenten besonders geeignet, da sowohl komplementäre als auch "blunt ends" ligiert werden können. Bei der Ligation eines Vektors mit einer Insert-DNA sollte das molare Verhältnis 1 : 3 betragen. Die Ligation erfolgte üN bei 4°C oder für mindestens 4 Stunden bei Raumtemperatur. Um eine optimale Temperatur für die Ligation der jeweiligen DNA-Fragmente zu erreichen, erfolgte die Inkubation z. T. auch

üN in einer mit 30°C warmen Wasser gefüllten Thermoskanne im Kühlschrank (4°C). Hierbei kommt es zu einem langsamen Temperaturabfall von der Ausgangs- zur Umgebungstemperatur im Kühlschrank.

3.2.16.3.1 Protokoll

Bei der Restriktionsspaltung mittels Eco RI entstehen Überhänge, sogenannte „sticky-ends“. Deswegen wird anschließend eine „sticky end“-Ligation durchgeführt.

- Inaktivieren der Restriktionsenzyme der einzusetzenden Spaltungsansätze bei 65°C für 20 min
- 1 µg gespaltene Vektor-DNA und circa 7 µg Insert-DNA in ein Eppendorfgefäß pipettieren (je nach Experiment kann das Verhältnis Vektor- :Insert-DNA zwischen 1:2 und 1:10 schwanken)
- Zugabe von 2 µl 10 x Ligase-Puffer
- Zugabe von 2 µl 10 mM rATP (pH 7,5)
- Zugabe von 2 Weiß Units T4-DNA-Ligase
- den Ansatz mit sterilem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl auffüllen
- Ansatz für 3 h bei Raumtemperatur inkubieren

3.2.16.4 Transformation von Plasmiden in humane Zellen

Das folgende Protokoll ist für die Transfektion von Blutzellen in Suspension in 60 mm Petrischalen gedacht. Man verwendet als Ausgangskonzentration 1µg DNA pro 60 mm Petrischalen.

3.2.16.4.1 Protokoll

- Die Zellen am Tag vor der Transfektion splitten
- Abzentrifugieren der Zellen
- Das Medium entfernen und mit PBS in einem 10 ml Röhrchen waschen.
- 1µg DNA in TE Puffer lösen, gelöste DNA in Buffer EC auf ein absolutes Volumen von 150 µl verdünnen
- 8 µl Enhancer hinzugeben und vortexen
- 2 - 5 min bei RT (5 – 15°C) inkubieren und kurz abzentrifugieren
- 25 µl Effectene Reagenz hinzufügen und 10 sec vortexen
- 2 - 5 min bei Raumtemperatur inkubieren, um die Transfektions-Komplex-Formation zuzulassen
- 1 ml Wachstumsmedium hinzufügen

- Tropfenweise auf die 60 mm Petrischalen geben
- Unter normalen Wachstumsbedingungen (37°C und 5% CO₂) 6 - 18 h im Brutschrank begasen

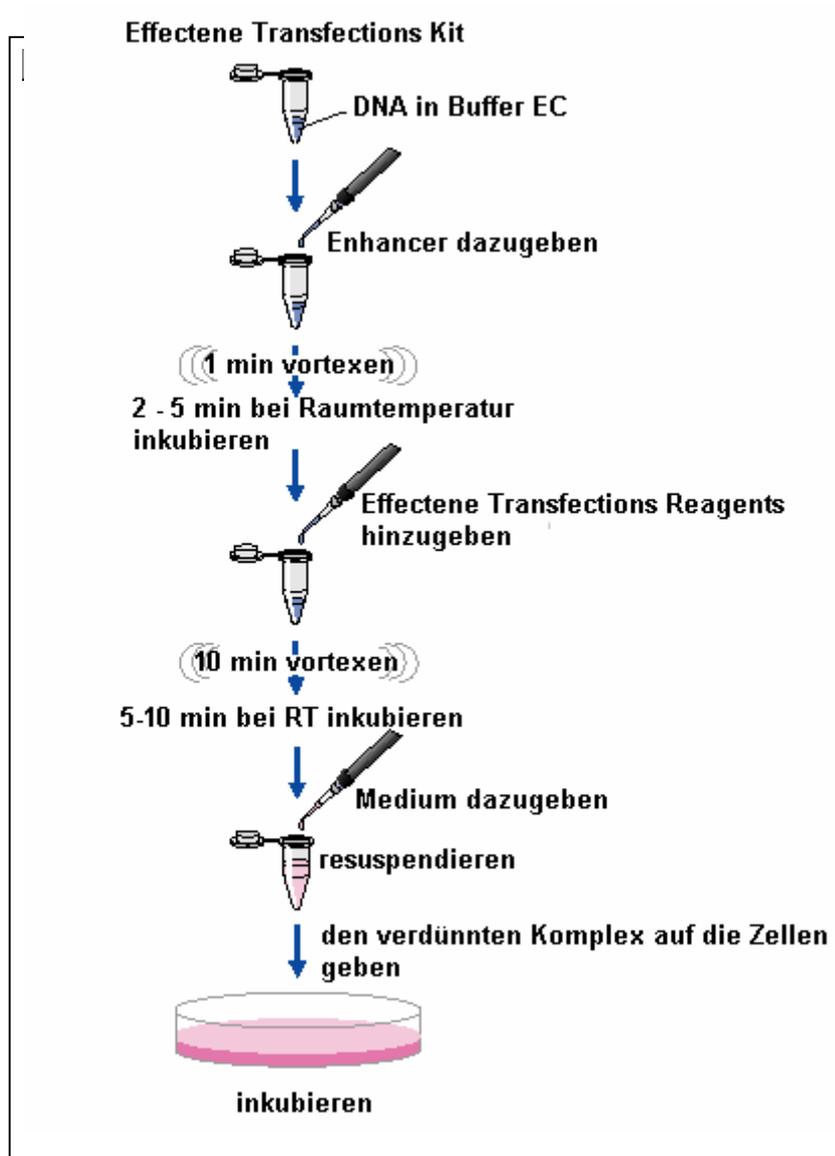


Abbildung 8: Die Transfektion von humanen Zellen:
Vorgehensweise bei der Transfektion von humanen Zellen mit Hilfe des Transfektions Kits Effectene (nach Qiagen modifiziert).

3.2.16.5 Plasmidisolierung aus einem Bakterienklon

Die Plasmidisolierung wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits der Firma Qiagen durchgeführt. Das hier aufgeführte Protokoll eignet sich besonders für die Isolierung und Reinigung von High-copy Plasmiden einer 1 - 5 ml Übernachtskultur von *E. coli* in LB-Medium.

3.2.16.5.1 Protokoll

- Abzentrifugieren der Bakterienkultur bei 1000 g
- Zellpellet in 250 µl Puffer P1 resuspendieren und in ein Mikrozentrifugen-Röhrchen überführen
- 250 µl Puffer P2 hinzugeben und vorsichtig 4 – 6 mal invertieren
- 350 µl Puffer N3 hinzugeben und abermals 4 – 6 mal vorsichtig invertieren
- 10 min abzentrifugieren bei 10000 g
- Den Überstand in eine QIAprep Säule pipettieren
- 30 – 60 sec bei 3000 g zentrifugieren und den Durchfluß verwerfen
- Waschen der QIAprep Säule mit 0,5 ml Puffer PB
- 30 – 60 sec bei 3000 g zentrifugieren
- Waschen der QIAprep Säule mit 0,75 ml Puffer PE
- 30 – 60 sec bei 3000 g zentrifugieren
- Den Durchfluß verwerfen und abermals 1 min zentrifugieren, um den Restpuffer zu entfernen
- QIAprep Säule in ein sauberes 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen setzen
- Die Plasmid-DNA mit 50 µl Puffer eluieren
- 1 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Abzentrifugieren bei 3000 g

3.2.17 Mikroskopische Auswertung der Zellen

3.2.17.1 Lichtmikroskopie

Die Lichtmikroskopische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Mikroskops Axiovert 135 der Firma Zeiss. Die Aufnahmen und die Auswertung der Bilder erfolgte über die Software KS 400 Version 3.0 der Firma Kontron.

3.2.17.2 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Auswertung der Präparate stand ein Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 von Zeiss, das mit einer CCD-Kamera und der ISIS-Software von Metasystems ausgerüstet war, zur Verfügung. Die benötigten Filtersätze für DAPI und Spectrum Green-Fluoreszenz, sowie der anderen Fluoreszenzfarbstoffe standen zur Auswertung zur Verfügung.

Tabelle 1: Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Fluorochrome	Excitation	Emission	Fluoreszenzfarbe
DAPI	360 nm	460 nm	Blau
Spectrum Aqua	433 nm	480 nm	Blau
FITC	490 nm	525 nm	Grün
Spectrum Green	497 nm	524 nm	Grün
Spectrum Orange	559 nm	588 nm	Orange-Rot

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung von Einzelzellen mit CD71 und ihre Charakterisierung über Einzelzell-PCR

In einer ersten Studie wurde zunächst 20 ml Blut von jeweils 10 Schwangeren mit männlichem Fetus untersucht. Nach einer 1 : 1 Verdünnung mit PBS wurde eine Einfachdichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Die so aufgereinigten Zellen wurden mit dem Antikörper CD71 markiert, der direkt an einen MACS-Antikörper gekoppelt ist. Nach der Aufreinigung der markierten Zellen über eine MACS-Säule wurden sie in eine Petrischale gegeben und mit PBS zu einem Monolayer verdünnt. Die nukleierten Erythrozyten (Abbildung 9) wurden nach morphologischen Kriterien detektiert und anschließend mit Hilfe eines Mikromanipulators und einer ausgezogenen Pasteurpipette unter mikroskopischer Beobachtung in je ein 0,5 ml Eppendorfgefäß überführt, das mit 5 µl sterilem *Aqua dest.* befüllt war. Im Anschluß daran wurden die gesammelten Einzelzellen über Einzelzell-PCR im Cap analysiert, um zu ermitteln, ob sie mütterlichen oder fetalen Ursprungs waren.

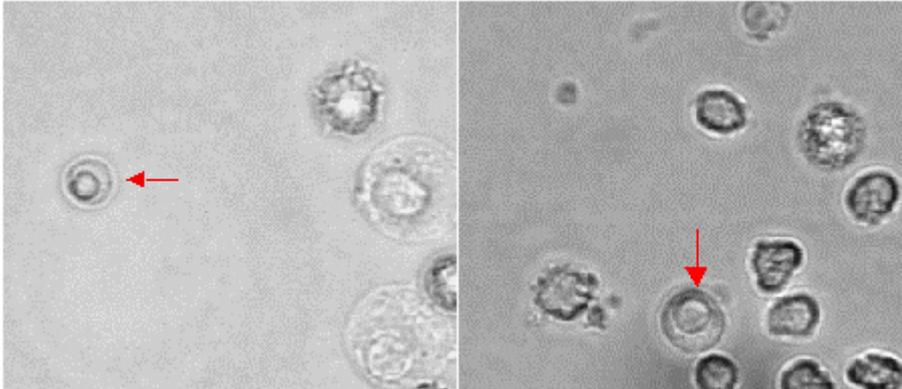


Abbildung 9: Nukleierte Erythrozyten unter dem Lichtmikroskop (400-fache Vergrößerung): In einem Monolayer wurden die nukleierten Erythrozyten unter dem Lichtmikroskop aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften visuell detektiert (rote Pfeile) und anschließend über eine ausgezogene Pasteurpipette einzeln abgesaugt.

Die Studie von von Eggeling *et al.* (1997) konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Nach ihrer Methode wurden 26% nukleierte Erythrozyten gefunden, die fetalen Ursprungs waren. In der hier beschriebenen Studie konnte gezeigt werden, daß ein Anteil von ca. 22% der gesammelten Zellen fetalen Ursprungs waren. Die PCR wurde an Einzelzellen nach Proteinase K – Verdau mit Hilfe des Amelogeninsystems durchgeführt. Ein PCR-Produkt mit einer Basenpaarlänge von 106 bp weist auf weibliche DNA hin. Entstehen zwei Produkte mit

106 bp und 112 bp ist die aufgeschlossenen DNA männlichen und somit fetalen Ursprungs (Abbildung 10). In jeder PCR-Reaktion wurden Positiv- und Negativ-Kontrollen mitgeführt.

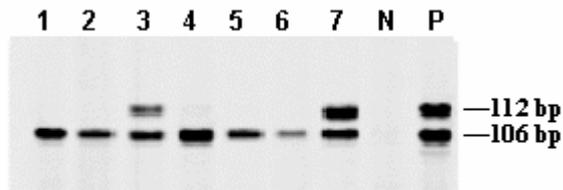


Abbildung 10: Amelogenin Einzelzell-PCR:

Das Gelbild zeigt den untersuchten Fall E 9 (Tabelle 2). 2 von 7 untersuchten Einzelzellen waren fetalen Ursprungs (jeweils 2 Banden bei 106 bp und 112 bp). Spur N zeigt die Negativkontrolle, Spur P die Positivkontrolle.

Die Banden wurden auf dem Gel des LI-COR Sequenzierers sichtbar gemacht. Im Blut einer jeden Probandin konnten fetale Zellen gefunden werden. Die nukleierten Erythrozyten ließen sich zunächst morphologisch unter dem Lichtmikroskop vorselektionieren. Nach der PCR-Analyse zeigte sich, daß die gesammelten Zellen mit einem Prozentsatz von ca. 22%, also jeder 4. – 5. Erythrozyt, fetalen Ursprungs waren (siehe Tabelle 2). Die Studie aus der Veröffentlichung ließ sich also erfolgreich reproduzieren.

Tabelle 2: 20 ml peripheres Blut von insgesamt 10 Probandinnen wurde untersucht. In allen 10 Fällen konnten fetale Zellen detektiert werden. Insgesamt waren 22,04% der gesammelten nukleierten Erythrozyten fetalen Ursprungs.

Blutprobe	Schwangerschafts- wochen	Anzahl der mit PCR untersuchten Zellen	Amelogenin positive Zellen
E 1	17 + 2	11	2
E 2	16 + 4	13	2
E 3	17+3	13	1
E 4	16+ 5	12	3
E 5	18 + 2	14	1
E 6	17+2	12	1
E 7	20+2	10	2
E 8	18+3	11	2
E 9	17+4	7	2
E 10	19+1	13	3
Gesamt		116	19 (22,04%)

4.2 CD71-MACS selektierte Zellen und ihre Evaluierung mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper

Die fetalen Zellen im maternalen Blut könnten über einen hoch spezifischen Antikörper so markiert werden, daß im Anschluß daran eine computerunterstützte Scanninganalyse die fetalen Zellen automatisch detektieren würde. In diesem Zusammenhang wurde zunächst getestet, ob sich die mit Hilfe von anti CD71 markierten Zellen (Isotyp: Maus IgG2a) für eine Computerauswertung eignen. Zu diesem Zweck wurden die magnetischen Beads des Antikörpers über eine Sekundärmarkierung sichtbar gemacht. Der sekundäre Antikörper (Isotyp: Ziege *anti mouse*; IgG2a) ist an den fluoreszierenden Farbstoff Cy3 gekoppelt. Unterschiede zwischen der Markierungsintensität von fetalen und maternalen Zellen könnten so zur Identifikation der Zellen unterschiedlichen Ursprungs herangezogen werden. Die Dichte der Transferrinrezeptoren, die durch den CD71 Antikörper detektiert werden, könnte auf der Zelloberfläche der Mutter und des Fötus unterschiedlich sein. Dieser Parameter wäre somit ein spezifischer Marker für fetale Zellen. Eine quantitative Auswertung der markierten Zellen wäre in diesem Fall möglich. Zudem kann über dieses Verfahren evaluiert werden, wieviele der aufgereinigten Zellen auch wirklich markiert worden sind, um parallel dazu die Effektivität von MACS zu analysieren: Sind auch wirklich alle Zellen nach MACS markiert, oder befinden sich auch unmarkierte und damit unspezifische Zellen in der aufgereinigten Phase. In einer Testreihe wurden in 10 Fällen jeweils über 1000 Zellen analysiert (Tabelle 3).

Tabelle 3: 20 ml peripheres Blut von insgesamt 10 Probandinnen wurde mittels Cy3-Fluoreszenzmarkierung nach Aufreinigung mit MACS analysiert. Insgesamt waren 89,78% der 10000 gesammelten Zellen Cy3 positiv.

Blutprobe	Schwangerschaftswochen (SSW)	Cy3 positiv fluoreszenzmarkierte Zellen unter 1000 Zellen
A 1	21 + 3	916
A 2	21 + 0	892
A 3	20 + 3	845
A 4	21 + 1	923
A 5	19 + 6	870
A 6	19 + 4	907
A 7	21 + 3	820
A 8	16 + 6	940
A 9	17+4	921
A 10	19+3	944
Gesamt		8978 (89,78%)

Nach einer Einfachdichtegradienten-Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml PBS, das mit 1% FCS versehen wurde, resuspendiert. Anschließend erfolgte eine 15 minütige Inkubation

mit dem CD71-MACS – Antikörper bei 4°C. Das MACS-positive Zellpellet wurde mit dem an Cy3 gekoppelten Antikörper für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach einer Fixierung der Zellen mit KCl und Fixativ (Methanol : Eisessig) wurden die Zellen auf einen Objektträger getropft und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Der Ursprung der Zellen wurde über FISH analysiert. Dabei wurden direkt fluoreszenzmarkierte XY-spezifische Zentromer-Proben verwendet (Spectrum CEP Y *green*; Aqua CEP X *orange directly-labeled probes*; Vysis). Die Gegenfärbung der Interphasekerne erfolgte mit DAPI. Bis zu 90% der Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert (Tabelle 3). Das deutet auf eine hohe Effektivität der Aufreinigung mittels MACS hin.

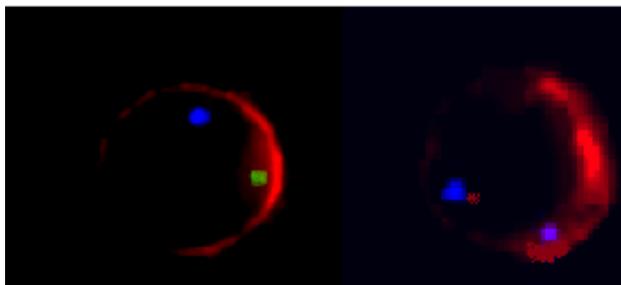


Abbildung 11: Interphase-FISH von zwei Zellkernen mit fetalem und maternalem Ursprung (1000-fache Vergrößerung):

Es wurden direktmarkierte X/Y-Zentromerproben verwendet. Das X-Chromosom wurde mit dem Fluoreszenz-Farbstoff *Blue Aqua* (blau) gelabelt, das Y-Chromosom mit dem Fluoreszenz-Farbstoff *Spectrum Green* (grün). Der Antikörper gegen die Microbeads wurde mit dem Fluoreszenz-Farbstoff CY 3 (rot) angefärbt. Ein signifikanter Unterschied in der Färbematrix der Zellkerne verschiedenen Ursprungs war nicht zu erkennen, auch nicht in der gemessenen Intensität.

Mit Hilfe der Doppelmarkierung der Antikörper CD71 + Ziege *anti-mouse* Cy3 konnten nun indirekt die CD71 Rezeptoren nachgewiesen werden. 50% der so aufgereinigten Zellen zeigten starke Fluoreszenzsignale über die gesamte Zelloberfläche verteilt. Bei der anderen Hälfte der Zellen wurde jeweils nur eine distinkte Oberflächenregion markiert. Um festzustellen, ob es sich bei den untersuchten Zellen um fetale oder maternale Zellen handelt, wurde nachfolgend eine FISH-Analyse durchgeführt. Mit Hilfe von Zentromer-Proben für das Chromosom X und Y konnte der Ursprung der Zellen ermittelt werden. Es zeigte sich, daß eine Differenzierung zwischen den maternalen und fetalen Zellen nicht möglich war (Abbildung 11), denn es war kein signifikanter Unterschied zwischen den Fluoreszenzintensitäten der Zellen unterschiedlichen Ursprungs vorhanden. Das Markierungsmuster war ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich. Ein computergestütztes Screening mit Hilfe dieser beschriebenen Parameter ist also nicht möglich.

4.3 Verschiedene Antikörper für die spezifische Markierung von fetalen Zellen

In einer weiteren Studie wurden Antikörper analysiert, die bis dahin noch nicht an fetalen Erythrozyten getestet wurden (Hohmann *et al.*, 2001). Bei den vier monoklonalen Antikörpern handelte es sich um folgende: 2G5, 3F9, EPO-R und Flk1.

4.3.1 Charakterisierung der Antikörper

4.3.1.1 2G5 und 3F9

Bei 2G5 und 3F9 handelt es sich um monoklonale Antikörper, die zwischen fetalen und adulten nukleierten Erythrozyten beim Huhn differenzieren können (Isotyp: *Mouse anti-chicken* IgG1). 2G5 soll dabei neben fetalen Erythrozyten auch fetale Lymphozyten und Myelozyten detektieren. 3F9 markiert spezifisch adulte Erythrozyten (Informationen von T. Graf, EMBL Heidelberg).

4.3.1.2 Flk1

Bei dem humanen Antikörper mit der Bezeichnung Flk1 (PharMingen, Europe) handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper (Isotyp: *Mouse anti-human* IgG2a). Er reagiert spezifisch mit der fetalen Leberkinase 1 (Flk1) beim Menschen. Dieses Rezeptorprotein ist auch bekannt unter dem Namen VEGF-R2 (*vascular endothelial growth factor-receptor-2*; Hanahan *et al.* 1997). Es handelt sich um einen Rezeptor, der bei der endothelialen Gefäßentwicklung des Fötus eine wichtige Rolle spielt und ebenfalls auf der Oberfläche der hämatopoetischen Zellreihe vermehrt vorkommt (Nishikawa *et al.* 1998). *In vivo* und *in vitro* Studien zeigen, daß Flk1 involviert ist in die Entwicklung der Gefäßendothelzellen des Embryos (Kataoka *et al.* 1997; Millauer *et al.* 1993; Quinn *et al.* 1993).

4.3.1.3 Epo-R

Epo-R (MCA1636, Serotec Ltd., Großbritannien) ist ein humaner monoklonaler Antikörper gegen den Erythropoetin-Rezeptor (Isotyp: *Mouse anti-human* IgG2a+b). Erythropoetin regt im Blut die Proliferation, Differenzierung und Ausreifung der erythroiden Vorläuferzellen an (Jones *et al.* 1990) und steigert die Bildung von Erythrozyten, indem es den genetisch vorprogrammierten Zelltod (Apoptose) erythroider Stammzellen verzögert (Longmore *et al.* 1994).

4.3.2 Vergleich der Effektivität der untersuchten Antikörper mit dem CD71-Antikörper

20 ml peripheres Blut von insgesamt 40 Frauen mit männlichem Fetus wurden untersucht. Zunächst wurde das Blut 1:1 mit PBS verdünnt. Nach einer Einfachdichtegradienten-Zentrifugation mit einer Dichte von 1,077 g/ml wurden die Zellen mit einem der vier Antikörper markiert. Dazu wurden die Zellen nach dem Waschen zusammen mit den entsprechenden Antikörpern in 1 ml PBS mit einem Zusatz von 1% PBS-FCS für eine Dauer von 60 min unter gleichbleibender Rotation bei 4°C inkubiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 600 g wurde die sekundäre Markierung durchgeführt. Über einen sekundären Antikörper wurden die magnetischen Beads an den jeweiligen primären Antikörper gekoppelt. Dabei wurde zunächst der entsprechende Sekundärantikörper zusammen mit den primär markierten Zellen 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Für Flk1 wurde als sekundärer Antikörper Ziege *anti-mouse* IgG1 verwendet, bei EPO-R war es der Ratte *anti-mouse* IgG2a+b Antikörper. 2G5 und 3F9 wurden mit dem Ratte *anti-mouse* Antikörper IgG1 (Miltenyi Biotec GmbH) markiert. Nach dieser Sekundärmarkierung erfolgte die Aufreinigung über MACS. Dazu wurden die isolierten, mononukleierten Zellen auf einen Objektträger getropft und nach der Fixierung im Rahmen einer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) mit Hilfe von X und Y-Zentromerproben fluoreszenzmarkiert. Bei der Analyse wurden pro Fall 500 Interphasekerne ausgezählt. Die Ergebnisse wurden mit dem direkt *microbead*-markierten Referenzantikörper CD71 verglichen.

Über den Antikörper 3F9 wurde nur eine fetale Zelle von 2500 ausgezählten Zellen markiert. Aufgrund dieser geringen Ausbeute wurden hier nur 5 Fälle ausgewertet (Tabelle 4).

Tabelle 4: Der Antikörper 3F9 wurde an 5 Blutproben getestet. Es wurden in 5 untersuchten Fällen durchschnittlich 0,2 fetale Zellen innerhalb der 500 analysierten Zellen detektiert.

Mit 3F9 untersuchte Blutproben	Schwangerschaftswoche (SSW)	XY – positive Zellen nach FISH-Analyse (500 ausgezählte Zelle)
1	19	0
2	19	0
3	18	0
4	21	1
5	20	0
Durchschnittswerte	19	0,2

Der Antikörper 2G5 markierte im Durchschnitt 1,2 männliche und somit fetale Interphasekerne. Für diese Testreihe wurde das Blut von 11 Probandinnen analysiert (Tabelle 5).

Tabelle 5: Der Antikörper 2G5 wurde an 11 Blutproben getestet. Für diese Testreihe wurden durchschnittlich 1,2 fetale Zellen innerhalb der 500 analysierten Zellen detektiert.

Mit 2G5 untersuchte Blutproben	Schwangerschaftswoche (SSW)	XY-positive Zellen nach FISH-Analyse (500 ausgezählte Zellen)
1	19	1
2	19	2
3	18	0
4	21	1
5	20	1
6	20	2
7	21	0
8	21	2
9	22	1
10	19	2
11	16	1
Durchschnittswerte	19,6	1,2

Über die Antikörper EPO-R und Flk1 wurden die meisten männlichen Zellen detektiert (Tabelle 6, Tabelle 7). Die Analyse erfolgte hier an dem peripheren Blut von 10 beziehungsweise 8 Probandinnen.

Tabelle 6: Der Antikörper EPO-R wurde an 10 Blutproben getestet. Für diese Testreihe wurden durchschnittlich 1,6 fetale Zellen innerhalb der 500 analysierten Zellen detektiert.

Mit EPO-R untersuchte Blutproben	Schwangerschaftswoche (SSW)	XY – positive Zellen nach FISH – Analyse (500 ausgezählte Zellen)
1	28	3
2	21	2
3	24	0
4	18	1
5	17	1
6	20	3
7	20	2
8	21	1
9	23	3
10	21	0
Durchschnittswerte	21,3	1,6

EPO-R lag mit durchschnittlich 1,6 XY-positiven Zellen knapp unter der Effektivität von Flk1. Hier konnten im Durchschnitt 1,8 Zellen markiert werden.

Tabelle 7: Der Antikörper Flk1 wurde an 8 Blutproben getestet. In dieser Testreihe wurden durchschnittlich 1,8 fetale Zellen innerhalb der 500 analysierten Zellen detektiert.

Mit Flk1 untersuchte Blutproben	Schwangerschaftswoche (SSW)	XY – positive Zellen nach FISH – Analyse (500 gezählte Zellen)
1	20	1
2	25	0
3	17	2
4	17	1
5	17	2
6	18	3
7	20	3
8	18	2
Durchschnittswerte	19	1,8

Im Vergleich mit dem am häufigsten verwendeten Antikörper CD71 waren alle in dieser Arbeit getesteten Antikörper in Bezug auf fetale Zellen etwas spezifischer. Denn mit CD71 als Referenzantikörper konnten keine männlichen Zellen innerhalb der jeweils 500 analysierten Zellen gefunden werden. Aufgrund der geringen Spezifität von CD71 reicht hier die Menge an untersuchten Interphasekernen nicht aus, um fetale Zellen zu detektieren (Tabelle 8).

Tabelle 8: Die Spezifität des Referenz-Antikörpers CD71 wurde über eine Probenzahl von 6 ermittelt. Innerhalb der 500 untersuchten Zellen wurden keine fetalen Zellen detektiert.

Mit CD71 untersuchte Blutproben	Schwangerschaftswoche (SSW)	XY – positive Zellen nach FISH – Analyse (500 gezählte Zellen)
1	21	0
2	21	0
3	20	0
4	22	0
5	20	0
6	21	0
Durchschnittswerte	20,8	0

Die Studie ist grafisch in der Abbildung 12 nochmals zusammengefasst. Die grafische Darstellung veranschaulicht die Spezifität der getesteten Antikörper im Vergleich zu CD71.

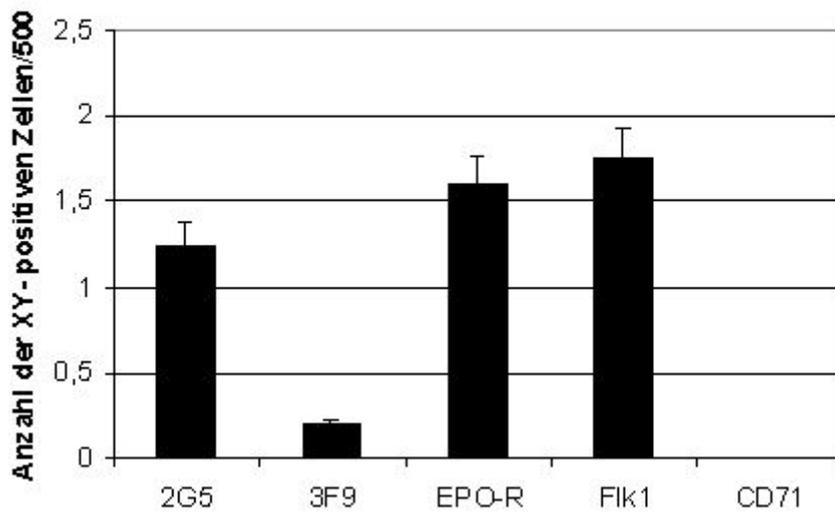


Abbildung 12: Die Spezifität der Antikörper 2G5, 3F9, EPO-R und Flk1: Dargestellt ist die Anzahl der XY-positiven Zellen, die jeder Antikörper detektiert hat, im direkten Vergleich zu Anti-CD71 (inklusive Standardabweichung).

Anhand der Grafik wird veranschaulicht, wie groß die Spezifität der Antikörper 2G5, 3F9, EPO-R und Flk1 im Vergleich zu CD71 ist. Das kann über die Anzahl der mittels FISH detektierten kindlichen Zellen gezeigt werden. Bei der grafischen Auswertung wurde die

Standardabweichung $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}}$ mit einberechnet.

4.4 Verschiedene Kulturmedien für eine spezifische Anzucht von fetalen Zellen

Fetale Vorläuferzellen befinden sich, sobald sie in das mütterliche Blut übertreten in einer „feindlichen“ Umgebung, die nicht spezifisch auf sie abgestimmt ist. Es ist deswegen anzunehmen, daß ihr Proliferationspotential im Blut der Mutter auf ein Minimum reduziert wird. Die in der Hämatologie verwendeten Kultivierungsmethoden sind an die Bedürfnisse von Stammzellen aus dem Knochenmark bzw. an die Bedürfnisse von nicht fetalen Stammzellen im peripheren Blut angepaßt. Fetale Vorläuferzellen, die aus dem mütterlichen Blut isoliert werden, stellen einen Sonderfall im Bezug auf ihre Kultivierbarkeit dar. Um ihren spezifischen Ansprüchen gerecht zu werden, wurden unterschiedliche Kulturmedien auf ihre Effektivität und Spezifität hin untersucht.

Es ist bekannt, daß fetale und adulte erythroide Vorläuferzellen unterschiedlich auf bestimmte Wachstumsfaktoren reagieren (z. B. Epo; Alter *et al.* 1994; Migliaccio *et al.* 1988). Ein spezifisch abgestimmter "Wachstumscocktail" gekoppelt mit den Erfahrungen bei der Kultivierung anderer fetaler Zellen (z. B. Fruchtwasserzellen oder Fibroblasten) könnte dazu beitragen, die Wachstumsbedingungen für fetale erythroide Vorläuferzellen zu optimieren, mit dem Ziel, eine selektive Anzucht fast ausschließlich fetaler Zellen zu erhalten, oder ihnen zumindestens einen Wachstumsvorteil gegenüber den maternalen Zellen zu verschaffen.

4.4.1 Modifikation des Basiskulturmediums Chang C

Dem Basiskulturmedium Chang C wurden diverse Vitamine zugesetzt, die die fetalen Zellen in ihrem Wachstum stimulieren sollten. Das Medium wurde mit Vitaminen versetzt, deren Konzentrationen denen im fetalen Blut entsprechen.

Tabelle 9: Vitaminzusätze für das Kulturmedium Chang C

Vitaminbezeichnung	Konzentration [ng/ml]
B 1	54
B 2	800
B 6	40
B 12	1
C	20

Zusätzlich wurde Chang C noch mit dem Wachstumsfaktor Flt3 – ligand [50 ng/ml] und den Interleukinen IL 6 und IL 3 versetzt [10 ng/ml]. Die Zellen aus 20 ml Blut von 2 Schwangeren wurden nach der Aufreinigung mittels Einfachdichtegradienten-Zentrifugation jeweils in 6 Petrischalen mit einer Zelldichte von ca. 6×10^6 Zellen /ml eingesät. Nach einer 14-tägigen Kultivierung wurden die entstandenen Kolonien analysiert. Aufgrund der

Morphologie der Zellkolonien handelte es sich überwiegend um Fibroblastenkulturen. Zellen aus der roten Reihe waren nur minimal gewachsen. Die anschließende Analyse von jeweils 10 Einzelkolonien mittels Amelogenin-PCR zeigte, daß es sich bei den gesammelten Kolonien um ausschließlich weibliche Kolonien handelte.

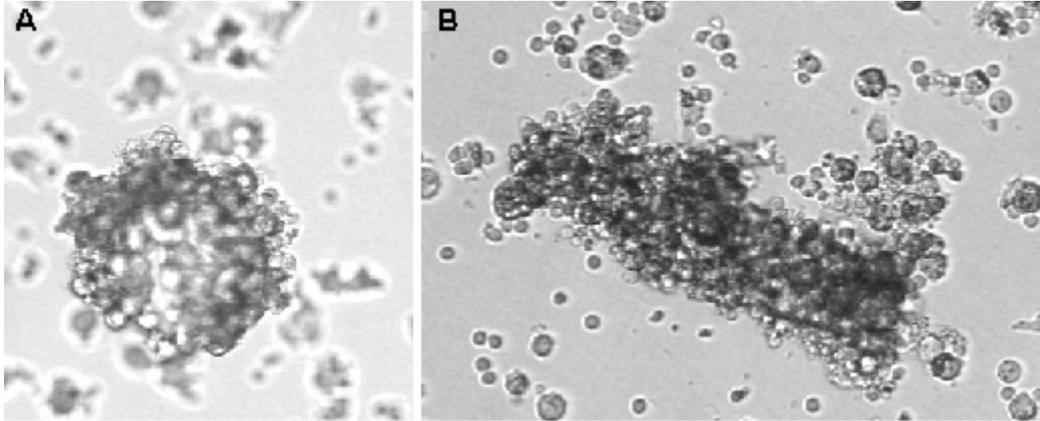


Abbildung 13: Zellkolonien unter dem Lichtmikroskop (100-fache Vergrößerung):

Bei den hier abgebildeten Kolonien handelt es sich um BFU-Es und CFU-Es. Sie wurden für die PCR-Analyse mikromanipulatorisch gesammelt. Es waren ausschließlich weibliche Kolonien zu finden.

4.4.2 Austestung von weiteren Kulturmedien

Es wurden weitere Kulturmedien auf ihre Effektivität hin getestet. Im Material- und Methodenteil (3.1.6) werden die untersuchten Kulturmedien aufgeführt, die an fetalen Vorläuferzellen getestet wurden. Dabei wurde analysiert, ob die kindlichen Zellen einen Wachstumsvorteil in Medien mit unterschiedlicher Zusammensetzung gegenüber den Zellen mütterlicher Herkunft haben. Es wurden verschiedene Medien mit und ohne entsprechende Wachstumsfaktoren eingesetzt. Im Folgenden sind die Medien und ihre Wirkung auf das spezifische Zellwachstum beschrieben.

4.4.2.1 *STem.c11E*

Das Kulturmedium der Firma Tebu zeigte in zwei Vorversuchen mit Nabelschnurblut innerhalb von zwei Wochen ein sehr schnelles Wachstum und Ausreifen der erythroiden Vorläuferzellen. Die Morphologie der Kolonien ließ auf einen hohen Anteil an CFU-Es mit einigen wenigen BFU-Es schließen. Im Anschluß daran wurde das Medium am peripheren Blut von Schwangeren mit männlichen Fötus getestet. Nach Dreifachdichtegradienten-Zentrifugation wurden die gewonnenen Zellen mit einer Zelldichte von ca. 5×10^4 Zellen / ml in das Medium eingesät. Innerhalb von drei untersuchten Proben wurden die Ery-Klone aus jeweils einer Petrischale gesammelt und gepoolt. Nach der DNA-Isolierung und deren

molekulargenetischer Analyse mit Hilfe einer SRY-qPCR am LightCycler konnten keine fetalen Zellen nachgewiesen werden.

4.4.2.2 C-Plus Medium select

Das Kulturmedium soll laut Hersteller (Celina Ruhmann) das rasche Wachstum fetaler Zellen in Primärkulturen und von Zellen aus fetaler Abstammung fördern, wie zum Beispiel Amnionzellen und Chorionzotten, Embryonal - oder Fetalgewebe aus Aborten und fetalen Tumoren. Zudem soll es eine positive Selektion fetaler Zellen in Kulturen bewirken, die mit nicht fetalen Zellen kontaminiert sind. Dabei beruht die Selektion im wesentlichen in der Förderung des fetalen Wachstums. Das C-Plus Medium select wurde in dieser Arbeit an drei Fällen mit je 20 ml Schwangerenblut getestet. Nach deren Aufreinigung mittels Dreifachdichtegradienten-Zentrifugation wurden 10^6 Zellen/ml in das Medium eingesät. Nach ca. 14 Tagen waren jedoch nur wenige Zellklone gewachsen. Auch hier konnten molekulargenetisch, nach der Isolierung der Gesamt-DNA der gepoolten Klone über eine qPCR am LightCycler keine fetalen Zellen nachgewiesen werden.

4.4.2.3 StemSpan SF Expansions Medium

Das Kulturmedium wurde ursprünglich für die *in vitro* und *in vivo* Kultivierung und Expansion von hämatopoetischen Zellen entwickelt. Das serumfreie Medium wurde an 5 Patientenproben mit jeweils 20 ml Schwangerenblut getestet. Vor der eigentlichen Kultivierung wurde das Medium noch zusätzlich mit einem Cocktail an Cytokinen versehen. Dieser Cocktail trägt die Bezeichnung StemSpan CC 100. Es verbessert selektiv die Kultivierung und Expansion der hämatopoetischen Vorläuferzellen. Zu den darin enthaltenen Cytokinen gehören Interleukin 3 und 6, sowie der Stammzellfaktor (SCF) und der FLT3 – Ligand. Die Konzentrationen der Cytokine, die dem Medium zugefügt wurden, waren den Herstellerangaben entnommen. Zunächst wurde eine Dreifachdichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Die beiden Banden, die sowohl die mononukleären Zellen als auch die nukleierten Erythrocyten enthalten, wurden abgezogen. Im Anschluß daran wurde eine Zellzahl von $3 - 5 \times 10^5$ Zellen/ ml in je eine Petrischale mit 2 ml Medium eingesät. Nach 14-tägiger Expansion wurden die Petrischalen mit den darin enthaltenen Zellkolonien gepoolt und nach DNA – Isolation über qPCR am LightCycler analysiert, um im Vorfeld abzuklären, ob sich das Medium auch eignet. Die Ergebnisse zeigt die Tabelle 10.

Tabelle 10: Zellkultivierung mit Hilfe des Expansionsmediums Stem Span SFEM. Innerhalb von 3 untersuchten konnten SRY-qPCR positive Kolonien gefunden werden.

Blutprobe	Schwangerschafts- wochen	Anzahl der mit PCR untersuchten DNA- Proben	SRY-qPCR positive Kolonien (gepoolt)
E 190	16 + 1	Alle 6 Petrischalen gepoolt	0
E 191	15 + 4	2 x 3 Petrischalen gepoolt	0
E 192	16 + 6	3 x 3 Petrischalen gepoolt	2
E 193	17 + 5	3 x 3 Petrischalen gepoolt	2
E 194	16 + 6	Alle 6 Petrischalen gepoolt	1

Nach der Kultivierung in Petrischalen (jeweils 6 Stück oder mehr) befanden sich zum Teil positive und damit fetale Zellen innerhalb des Expansionsmediums. Jedoch erwies es sich als schwierig, Einzelklone für die Analyse zu sammeln, da es sich bei StemSpan SFEM um Flüssigmedium handelt. Zudem war der Anteil an fetalen Zellen sehr gering. Mittels qPCR wurde am LightCycler eine Menge von ca. 10 männlichen DNA-Anteilen evaluiert, was auf eine nur geringe Vermehrung der fetalen Zellen hinweist.

4.4.2.4 Vorversuche mit dem Kompletmedium Methocult 4431

Vier Blutproben (10 ml Vollblut) von Schwangeren mit männlichem Fötus wurden mit PBS 1 : 1 verdünnt. Nach ihrer Aufreinigung über Dreifachdichtegradienten-Zentrifugation wurden die Zellen mit dem Kompletmedium Methocult 4431 in 2 ml Petrischalen kultiviert. Für eine Vorabanalyse wurden die gewachsenen Kolonien, nach vierzehntägiger Kultivierung, aus je 3 einzelnen Petrischalen gepoolt. Im Anschluß daran erfolgte die Isolierung der Gesamt-DNA und deren molekulargenetische Untersuchung.

Tabelle 11: Vorversuche mit dem Kompletmedium H4431. In allen 4 untersuchten Blutproben waren auch SRY-qPCR positive Kolonien enthalten.

Blutprobe	Schwangerschafts- woche	Anzahl der mit PCR untersuchten DNA- Proben	SRY-qPCR positive Kolonien (gepoolt)
E164	19+5	4	3
E167	20	13	3
E 170	18	9	3
E 171	33	13	4

Für die Analyse eignete sich auch hier eine qPCR am LightCycler mit dem SRY-System, da sie im Vergleich zu einer herkömmliche PCR zu schnelleren und quantifizierbaren Ergebnissen führt. Die Auswertung erfolgte über die Software LightCycler Version 3.51.

Nach Einstellung der entsprechenden qPCR-Parameter, konnte über die Schmelzpunktanalyse ermittelt werden, ob sich in dem zu untersuchenden Zellpool fetale Zellen befanden (Abbildung 14). Das SRY-Produkt der PCR, das für männliche und damit fetale Zellen steht,

hat einen Schmelzpunkt von ca. 83,3 °C. Im Kurvenverlauf ist dieser Wert als Peak zu erkennen. In dem abgebildeten Probenausschnitt wurden fünf der neun ausgewerteten DNA-Proben fetal positiv getestet.

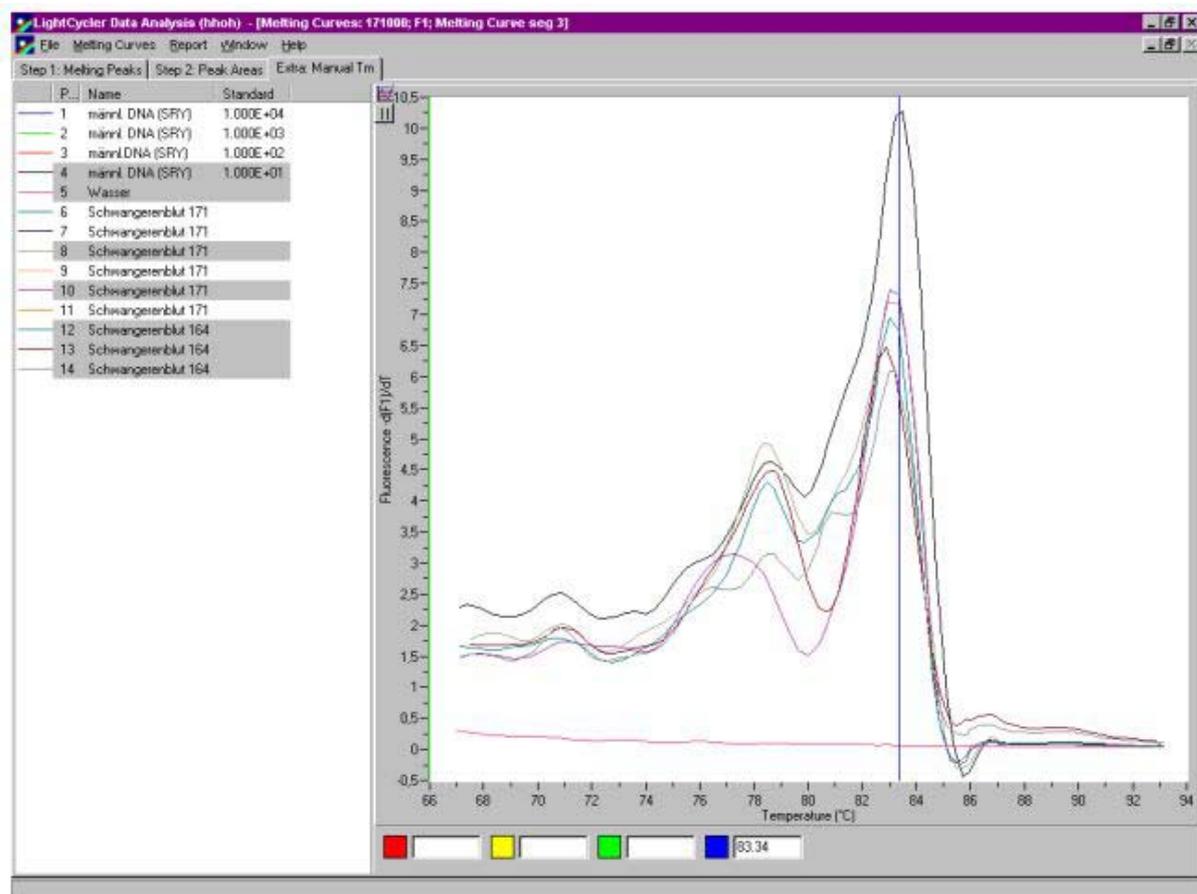


Abbildung 14: Schmelzpunktanalyse am LightCycler:

Mit der Software LightCycler Version 3.51 kann der Schmelzpunkt des Produktes bei der *realtime* PCR ermittelt werden. Der Graph zeigt den Schmelzpunkt des Amplifikates. Er liegt nach SRY-PCR bei einem Peak von ca. 83,3 °C (blaue Linie). Die Positivkontrolle (verdünnte, männliche DNA; schwarze Linie) zeigt dabei den höchsten Peak. Der Peak bei 78,45 °C (grüne Linie) zeigt den Schmelzpunkt der Primer-Dimere. Bei der Negativ-Kontrolle wurde H₂O anstatt DNA verwendet (rote Linie). Sie zeigt keinen Peak.

Im Anschluß an die Schmelzpunktanalyse wurde eine Quantifizierung durchgeführt, um die Menge an fetalem Zellmaterial zu ermitteln. Als Referenzwert diente dabei eine Verdünnungsreihe mit bekannter DNA-Konzentration. So konnte indirekt der Gehalt an männlicher DNA und somit der ungefähre Anteil an männlichen Zellen quantitativ ermittelt werden.

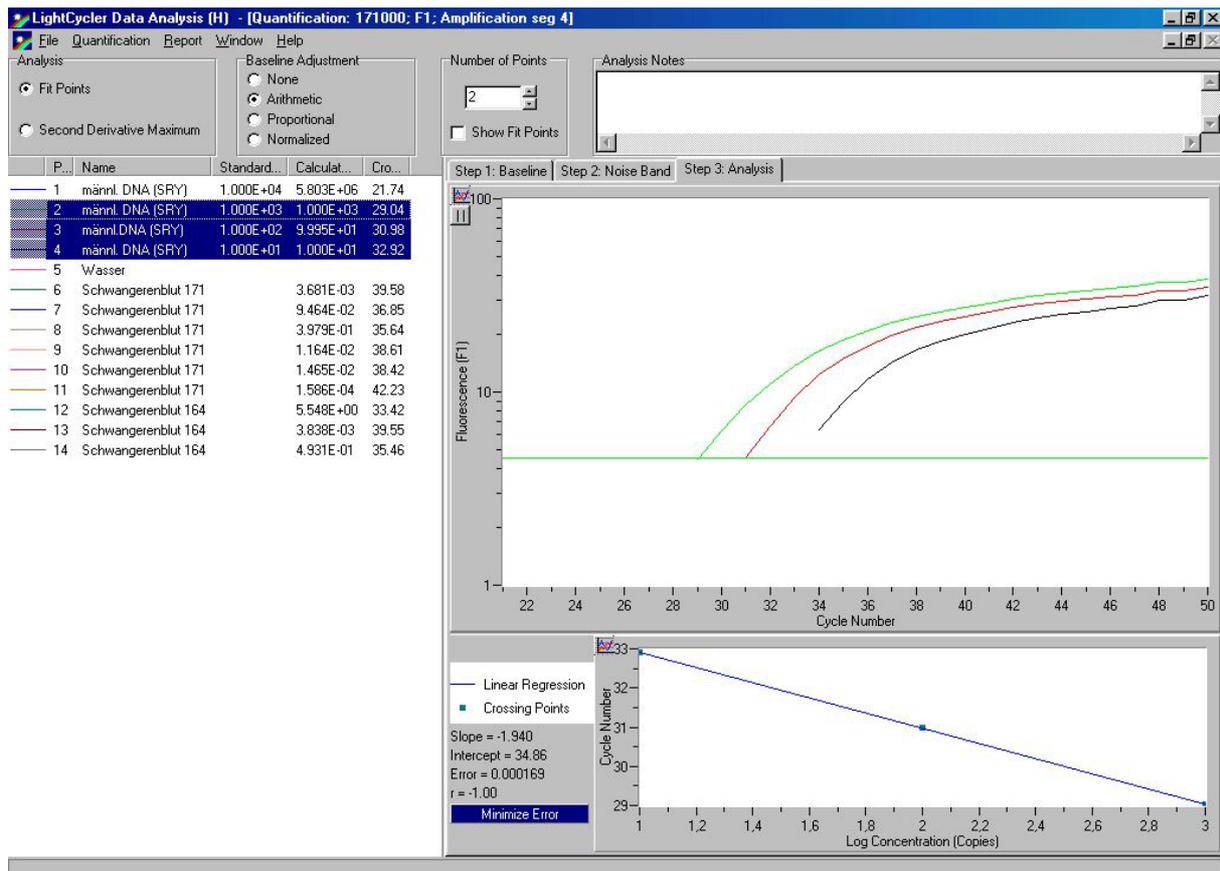


Abbildung 15: Quantifizierung am LightCycler:

Sie erfolgte mit Hilfe eines mitgeführten Standards, einer Verdünnungsreihe aus männlicher DNA. In der Verdünnungsreihe wurden 100 pg, 1 ng, 10 ng und 100 ng DNA/ml eingesetzt. Über eine lineare Regression aus 3 Werten der Verdünnungsreihe wurde die Kopienzahl der männlichen DNA ermittelt. Die Probe Nr. 12 zeigte z. B. die Hälfte der Konzentration an männlicher DNA des Standards Nr.4, also ca. 50 pg. Das entspricht einer DNA-Kopienzahl von umgerechnet ca. 9 fetalen Zellen.

Zieht man die Verdünnungsreihe (100 pg, 1 ng, 10 ng und 100 ng DNA/ml) einer bekannten DNA Konzentration als Vergleichswert heran, so lagen die Einheiten der detektierten fetalen DNA bei maximal 50 pg. Das entspricht umgerechnet der DNA von ca. 9 fetalen Zellen, wenn der Gesamt-DNA einer Zelle 6 pg zugrunde gelegt werden. Der Anteil an männlicher DNA wird zusätzlich durch die weibliche DNA verfälscht, so daß die eigentliche absolute Zellzahl nach oben korrigiert werden muß. Eine Quantifizierung mit Hilfe der Verdünnungsreihe ist somit möglich. Die qPCR kann so Aufschluß über die Qualität der Kultivierung geben. Dieses Verfahren eignet sich gut für einen schnellen Vorabtest von Kulturmedien in Bezug auf die Präsenz fetaler Zellen.

4.4.2.5 Ergebnisse der Kultivierungsversuche mit Methocult 4431 in einer ausgedehnten Studie

Nach vielversprechenden Vorversuchen wurden in einer größeren Studie 22 Blutproben (jeweils 10 ml) von Schwangeren mit männlicher Schwangerschaft untersucht. Nach der

Anreicherung der Zellen über eine Dreifachdichtegradienten-Zentrifugation wurden die mononukleären Zellen in dem semisoliden Kulturmedium Methocult 4431 kultiviert. Nach einer Kultivierungsdauer von 10 Tagen zeigten alle Blutproben mehrere hundert erythroide und myeloide Zellkolonien pro Petrischale (CFU-GEMM, BFU-E, CFU-E, CFU-GM). Der Ursprung der Zellen einer einzelnen Zellkolonie wurde sowohl molekulargenetisch mittels PCR, als auch molekularzytogenetisch mit Hilfe von FISH untersucht. Für die Untersuchung wurden zunächst ausschließlich rote Kolonien über einen Mikromanipulator mit ausgezogener Pasteurpipette gesammelt.

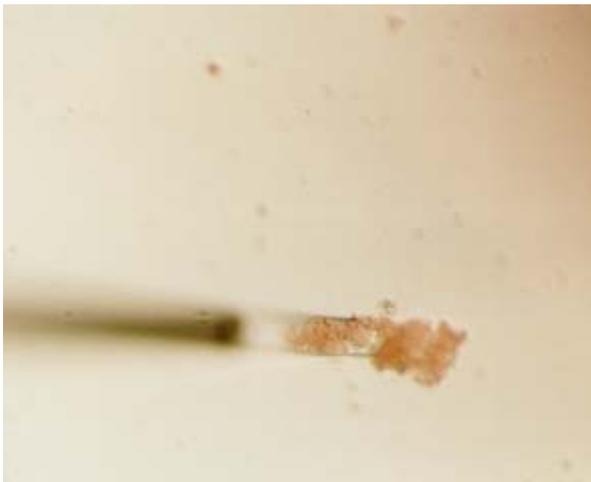


Abbildung 16: Sammeln einer Einzelkolonie (100-fache Vergrößerung): Die Vorläuferzellen der roten Reihe, werden mittels ausgezogener Pasteurpipette gesammelt. Sie haben, bedingt durch das Hämoglobin, eine rötliche Färbung.

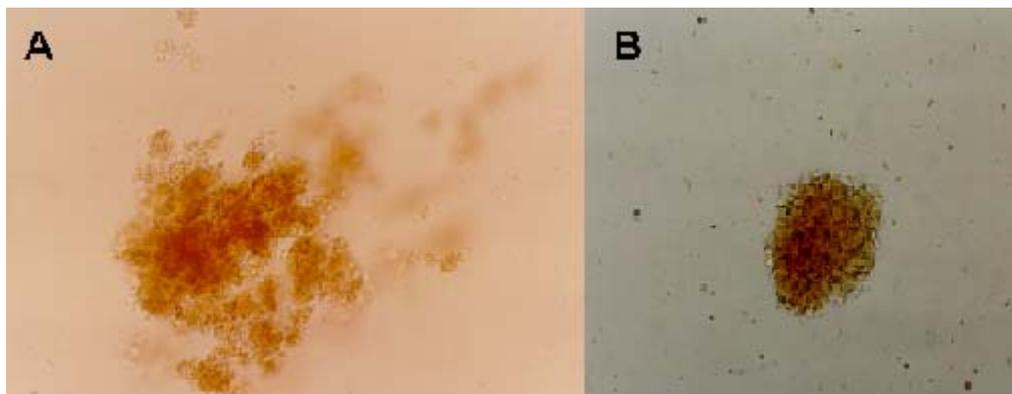


Abbildung 17: Unterschiedliche Klone der roten Reihe (100-fache Vergrößerung): Bild A zeigt einen roten Klon, der morphologisch als BFU-E definiert ist. Bild B zeigt einen roten Klon, der morphologisch als CFU-E bezeichnet wird. Beide Klonkategorien wurden gesammelt und anschließend analysiert.

Auf diese Weise konnten insgesamt 845 rote Einzelkolonien untersucht werden. Zur molekulargenetischen Analyse wurden 2 PCR Methoden verwendet; zum einen die SRY-PCR und zum anderen die Amelogenin PCR. Die zunächst verwendete SRY-PCR war aufgrund ihrer hohen Sensivität für die Analyse weniger geeignet, da sie eine Zelle unter mehr als 1000

mütterlichen Zellen nachweisen kann. Das haben Untersuchungen an Testpopulationen *in vitro* gezeigt. Das weniger sensitiv eingestellte Amelogenin-System kann eine fetale Zelle nur unter bis zu 200 mütterlichen Zellen nachweisen und schien deshalb für den Zweck der Kolonieanalyse besser geeignet (Abbildung 18).

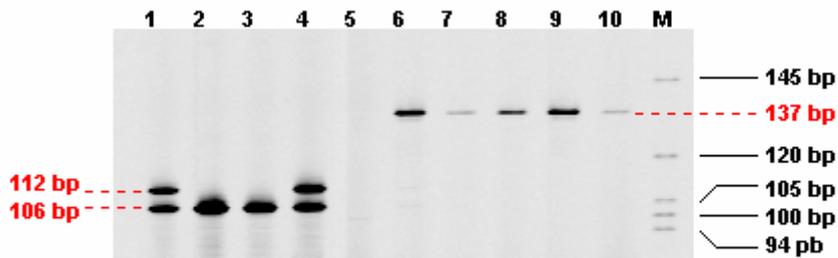


Abbildung 18: Sensitivitätsvergleich der PCR mit SRY- und mit Amelogenin-Primern:

Es wurden im direkten Vergleich jeweils 4 Proben von gesammelten Einzelkolonien mit SRY-PCR (Spur 1 - 4) und parallel dazu mit Amelogenin-PCR (Spur 5 - 8) untersucht. Die Spuren 7 und 8 sind bei der SRY-PCR noch als Y-positiv eingestuft (Banden bei 137 bp). Bei der PCR mit dem Amelogeninsystem sind sie bereits negativ (Spur 2 und 3), also weiblich eingestuft, denn es sind keine „männlichen“ Banden (112 bp) vorhanden.

Ingesamt wurden 72 (8,52%) Kolonien mit Hilfe der beiden PCR-Systeme Y-positiv getestet. In sieben Fällen konnten keine positiven Kolonien gefunden werden. Zunächst wurden 3 Fälle wie folgt charakterisiert, ein Teil (50%) der gesammelten Einzelklone wurde zur DNA Isolierung verwendet und zunächst molekulargenetisch mittels SRY PCR untersucht (Tabelle 12).

Tabelle 12: Ergebnisse von SRY-PCR mit nachfolgender FISH-Analyse aus Blutproben von 3 schwangeren Frauen nach einer Kultivierungsdauer von 10 - 14 Tagen in semisolidem Kulturmedium. (Zeichenerklärung: * inklusive einer Metaphase; ** inklusive 3 Metaphasen, *** keine FISH-Analyse, **** nicht genügend Zellen für FISH)

Blutprobe	Schwangerschaftswochen (SSW)	Anzahl der untersuchten Kolonien (SRY-PCR)	SRY-positive Kolonien	FISH XY-positive Kolonien	Kindliche Zellen pro Kolonie (FISH)
S1	20 +5	212	27	***	-
S2	29	97	6	3	18*/125 (14.4%) 41**/130 (31.5%) 16/254 (6.3%) 0/60; ****
S3	28	70	7	1	1/400 (0.25%); ****
Gesamtanzahl		379	40	4	76/969 (7.84%)

Auf diese Weise konnten 379 Kolonien charakterisiert werden. Eine Anzahl von 40 (10,5%) Kolonien wurde dabei Y-positiv getestet.

Im Anschluß daran wurde die andere Hälfte der 40 positiv getesteten Zellkolonien über direkt markierte X/Y-Sonden mittels FISH einer Analyse unterzogen. Innerhalb der durch SRY-PCR positiv getesteten Kolonien zeigten im Schnitt 7,84% der Zellen auch Y-positive Hybridisierungssignale (Tabelle 12). 19 weitere Proben wurden mit Hilfe einer Amelogenin-PCR getestet. Dabei wurde die DNA von 522 Einzelklonen untersucht. Hier zeigten sich 32 (6,1%) Kolonien als Y-positiv (Tabelle 13:). Die mit dem Amelogenin-System analysierten positiven Kolonien waren nur zu 0,015% nach der FISH-Analyse X/Y-positiv (Tabelle 13:).

Tabelle 13: Ergebnisse der Amelogenin-PCR und nachfolgender FISH-Analyse aus 19 Blutproben von Schwangeren nach einer 14-tägigen Kultivierung im semisoliden Kulturmedium Methocult 4430. (Zeichenerklärung: * eine fetale Metaphase, ** nicht genügend Zellen für FISH, # FISH war negativ, - negative PCR, daher kein FISH)

Blutprobe	Schwangerschaftswoche (SSW)	Anzahl der mit Amelogenin-PCR untersuchten Kolonien	XY-Amelogenin positive Kolonien	FISH XY-positive Kolonien	Fetale Zellen pro Kolonie (FISH)
A1	30	20	2	0	0/700; 0/610
A2	20+1	20	5	1*	1/463; 0/200; 0/200; 0/700; **
A3	18+3	20	0	-	
A4	17+2	19	0	-	
A5	17+5	40	4	**	
A6	17	40	2	**	**
A7	22+6	40	4	0	0/1000; 0/85; **
A8	20+5	33	3	#	**
A9	18	40	3	**	
A10	19+2	20	0	-	
A11	16	40	0	-	
A12	21+2	40	3	0	0/800; 0/800; 0/750
A13	16+2	19	1	0	**
A14	16	20	0	-	
A15	20	20	1	0	0/200
A16	18	60	0	-	
A17	18	20	0	-	
A18	22+4	11	1	0	0/221
A19	17	20	3	#	
Gesamtanzahl		522	32	1	1/6719 (0.015%)

Die Ergebnisse der XX- und XY-spezifischen Produkte im Amelogenin-System können im Gegensatz zu der SRY-PCR quantitativ evaluiert werden (Abbildung 19). Die PCR Produkte des Amelogenin-Systems wurden über die Bandenintensitäten der entsprechenden Y und X-Produkte auf dem Gel untersucht. Das PCR-Amplifikat mit einer spezifischen Sequenz des Chromosom X hat eine Länge von 106 bp, die spezifische Sequenz von Chromosom Y hat eine Länge von 112 bp. Die quantitative Analyse erfolgte über das Bildanalyseverfahren RFLPscan (Scanalytics In., VA; USA).

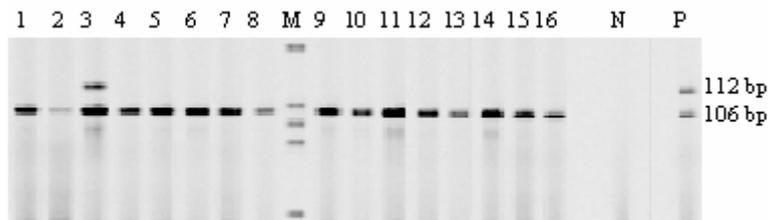


Abbildung 19: Amelogenin-PCR an Einzelkolonien:

In diesem Versuch wurden 16 Kolonien analysiert. Spur 3 zeigt einen Zellklon mit fetalem Zellanteil. P ist die Positivkontrolle mit den Banden bei 112 bp (X-Chromosom) und 106 bp (Y-Chromosom) und N die Negativkontrolle. M zeigt den Längenmarker.

Die PCR-Methode mit Amelogenin hat eine Nachweisgrenze, die zwischen einer fetalen Zelle unter 10 bis 200 mütterlichen Zellen liegt. Geringere Raten wurden als negativ klassifiziert. Im Vergleich dazu wurden 115 weiße Kolonien aus 3 Fällen gesammelt, gepoolt und analysiert. Hier befanden sich nach der PCR-Analyse keine fetalen Zellen in den Kolonien. Dieses Ergebnis zeigt ziemlich eindeutig, daß über die Farbe der Kolonie eine Vorselektion getroffen werden kann. Nur rote Kolonien wurden Y-positiv getestet. Als Negativkontrolle wurden 3 Blutproben von Probandinnen mit einer weiblichen Schwangerschaft untersucht. Keine der 140 analysierten Zellkolonien war Y-positiv. In 3 Fällen gelang es zudem analysierbare, fetale Metaphasen zu preparieren. Das war eine der ersten fetalen Metaphasen, die auf diese Weise erhalten wurde, neben der Veröffentlichung von Valerio *et al.* (1997).

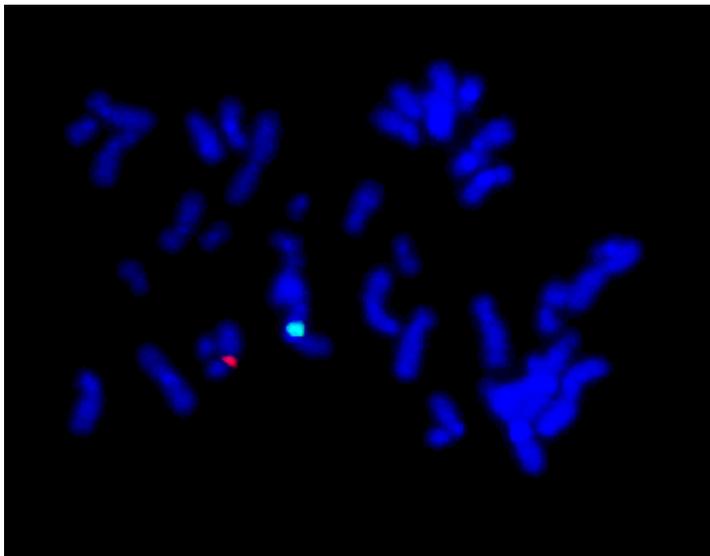


Abbildung 20: Fetale Metaphase:

Die Metaphase wurde mit FISH analysiert. Das Chromosom X wurde mit Hilfe von *spectrum orange* (rotes Fluoreszenz-Signal) und das Chromosom Y wurde mittels *spectrum green* (grünes Fluoreszenzsignal) detektiert. Dabei wurden direktmarkierte Zentromer-spezifische Proben (cep X, cep Y; Vysis) verwendet.

Die Morphologie der XY-positiven Zellen, die nach der Hybridisierung auf den Objektträgern detektiert wurden, unterscheidet sich deutlich von den kompakten und kleinen Zellkernen der mütterlichen Zellen. Die Mehrzahl der fetalen Zellkerne ist bis zu zehnmal größer und zeigt eine lockere und wolkige Struktur.

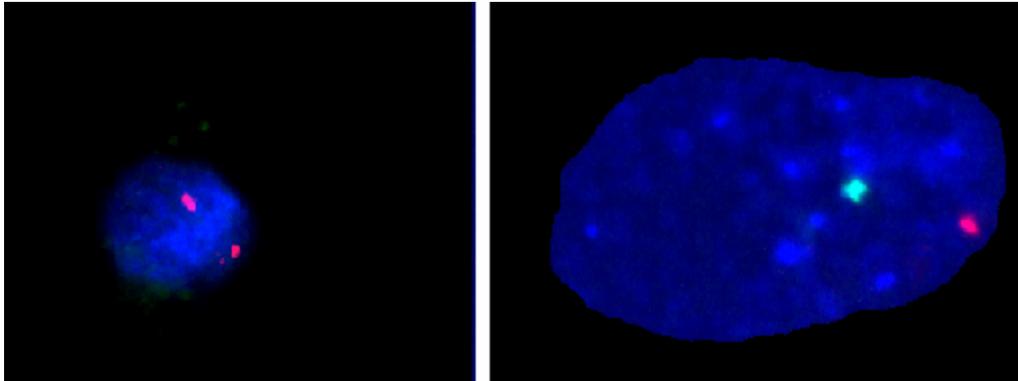


Abbildung 21: Zweifarbige-FISH:

Das Fluoreszenzsignal für das Chromosom X ist rot (*cep X spectrum red*, Vysis), das für das Chromosom Y grün (*cep X spectrum green*, Vysis). Auf dem linken Bild sieht man einen Zellkern einer weiblichen Zelle mit zwei roten Fluoreszenzsignalen, auf der rechten Seite sieht man den Zellkern einer fetalen Zelle, mit rotem und grünem Fluoreszenzsignal. Beide Zellen sind mit derselben Vergrößerung aufgenommen (1000-fach). Im Vergleich zu der maternalen Zelle ist die fetale Zelle deutlich größer. Ihre Zellkernstruktur sieht aufgelockert und wolkig aus.

4.5 Immortalisierung

Vorversuche haben gezeigt, daß in der Zellsuspension, die nach Dichtegradienten-Zentrifugation oder mittels MACS CD71-Aufreinigung gewonnen wurde, Y-spezifische Sequenzen nachweisbar waren. Nach der Kultivierung waren diese Y-positiven Sequenzen dagegen nicht mehr detektierbar. Einen vielversprechenden Ansatz, um diesem Phänomen auf den Grund zu gehen, bietet die Immortalisierung der Zellen. Auf diese Weise kann in den fetalen Zellen keine frühzeitige Apoptose eingeleitet werden (Yu *et al.* 2001).

Die Immortalisierung beruht auf der Transfektion des Gens, das die aktive katalytische Proteinkomponente (hTERT) der Telomerase transkribiert (Meyerson *et al.* 1997). Zunächst wurde eine aufgereinigte Fraktion der Zellen aus Schwangerenblut mit dem Gen der katalytischen Subeinheit (hTERT) der Telomerase transfiziert. Ein Plasmid mit dem Gen der hTERT-Untereinheit wurde für diesen Forschungszweck von der Geron Corporation zur Verfügung gestellt. Für die Klonierung, in diesem Fall die Umklonierung, wurde der Vektor, der die hTERT-Untereinheit enthält (Geron, USA), einer Restriktionsanalyse unterzogen. Dabei wurde das Enzym Eco R1 verwendet, um das hTERT-Fragment herauszuschneiden. Parallel dazu wurde der Expressionsvektor pIRES EGFP (Firma Clontech) ebenfalls einer Restriktionsanalyse unterzogen. Das hTERT-Insert wurde so aus dem mitgelieferten Vektor

herausgeschnitten und über Ligation in den Vektor pIRES-EGFP der Firma Clontech hineinkloniert.

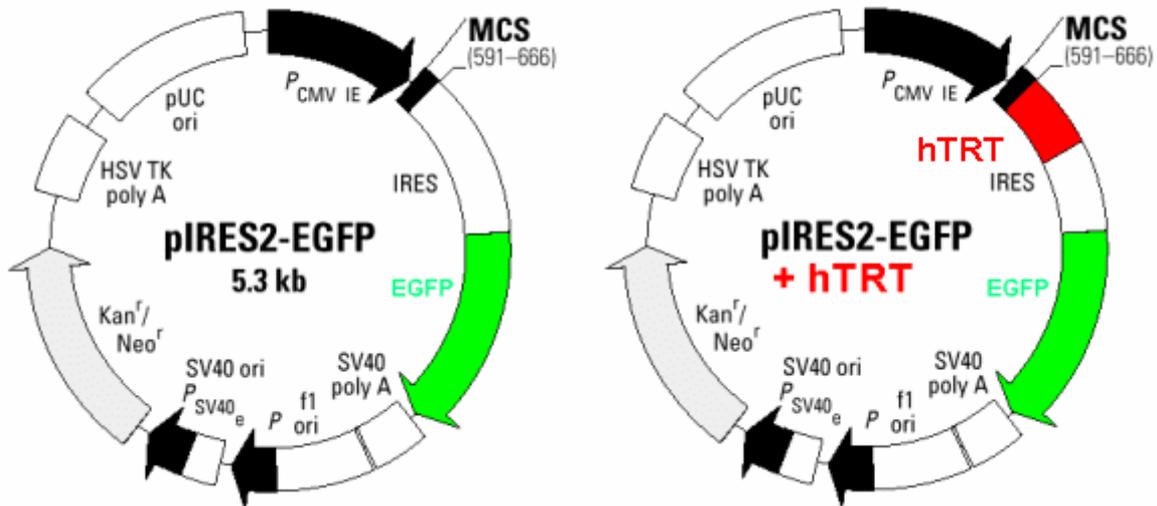


Abbildung 22: Der Vektor pIRES2-EGFP:

In den Vektor wurde die hTERT-Untereinheit der Telomerase hineinkloniert (rot markiert). Bei EGFP handelt es sich um das unter dem Fluoreszenzmikroskop grün emittierende *enhanced green fluorescence protein*.

Der Vektor pIRES-EGFP exprimiert in menschlichen Zellen über eine bicistronische mRNA sowohl die hTERT-Einheit als auch das GFP, so daß der Erfolg der Transformation der Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden kann. Dies geschieht durch die Anregung mit Licht der Wellenlänge von 488 nm. In Vorversuchen konnte die Transfektion an der etablierten Zelllinie cos – 7 erfolgreich durchgeführt werden mit Hilfe des Transfektionkits Effectene der Firma Qiagen.

Visuell wurde die erfolgreiche Transfektion durch das GFP unter dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen. Anschließend wurde der Vektor aus der DNA der Zellsuspension isoliert und über eine anschließende Restriktionsanalyse auf dem Agarosegel nachgewiesen.

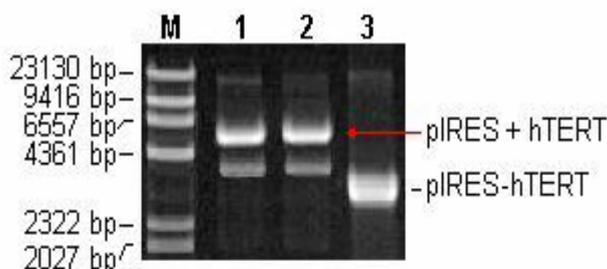


Abbildung 23: Nachweis der hTERT-Untereinheit auf dem Elektrophoresegel:

Auf dem einprozentigen Gel zeigt Spur 1 und 2 den geschnittenen Vektor mit der hTERT-Untereinheit. Spur M zeigt den DNA Molekulargewichtsmarker II (Roche). Spur 3 zeigt den ungeschnittenen Vektor.

Die Transfektion wurde anschließend 4 mal an Schwangerenblut nach Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Jedoch war in jedem versuch der Vektor nach einer ca. vierzehntägigen Kultivierung nicht mehr nachweisbar. Die Transfektion war nur transient. Der Vektor wurde immer wieder nur vorübergehend in die kultivierten Zellen aufgenommen.

4.6 Analyse der Zellen aus maternalem Blut nach OncoQuick® - Aufreinigung

Um eine effektivere Aufreinigung der nukleierten Erythrozyten als Alternative zu der Dichtegradienten-Zentrifugation zu erreichen, wurde in einer Testreihe das Blut von 10 Probandinnen mit PBS 1:2 verdünnt und über Säulen der Firma OncoQuick® aufgereinigt. Nach der Aufreinigungsprozedur wurden die Zellen gewaschen und anschließend unter dem Lichtmikroskop auf ihre Morphologie hin untersucht. Die nukleierten Zellen wurden mittels Mikromanipulator und ausgezogener Pasteurpipette gesammelt und über Amelogenin PCR analysiert. In der Tabelle 14 sind die Ergebnisse der Untersuchung zusammengestellt.

Tabelle 14: Untersuchungen an Zellen nach OncoQuick® Aufreinigung: In den ersten 5 Versuchen konnten insgesamt 8 männliche Zellen (22,8%) gefunden werden. Die restlichen 5 Versuche waren negativ.

Blutprobe	Schwangerschafts- wochen	Anzahl der mit PCR untersuchten Zellen	Amelogenin positive Zellen
S 1	17 + 1	9	3
S 2	17 + 5	11	4
S 3	21	0	-
S 4	18 + 1	10	1
S 5	16 + 5	5	0
S 6	20 + 3	0	-
S 7	18	0	-
S 8	18 + 1	0	-
S 9	17 + 4	0	-
S 10	19 + 1	0	-
Gesamt		35	8 (22,8%)

Diese Methode stellt einen interessanten Ansatz dar, aber nach einer anfänglichen vielversprechenden Ausbeute von fetalen Zellen mit 22,8% konnte mit einer zweiten Charge der OncoQuick®-Säulen, ab dem Versuch Nummer 4, nur noch eine fetale Zelle detektiert werden, weil sonst keine nukleierten Erythrozyten mehr unter dem Lichtmikroskop gefunden werden konnten.

5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, einer verlässlichen, nicht-invasiven pränatalen Diagnostik an fetalen Zellen aus mütterlichem Blut näher zu kommen. Dies sollte über eine spezifische Markierung der fetalen Zellen mit geeigneten Markern, oder einer Zellkultivierung mit eigens für die fetalen Zellen abgestimmten Kulturmedien erreicht werden. Dieses gelang in Ansätzen. Die Antikörper, die für die Markierung von fetalen Zellen getestet wurden, waren jedoch sehr variabel in ihrer Spezifität. Der Verlust an diagnostisch verwertbaren fetalen Zellen, der damit einhergeht, ist aufgrund dieser Tatsache immer noch hoch. Bei der geringen Anzahl an fetalen Zellen im maternalen Blut ist deren Ausbeute zu gering, um eine routinemäßige Diagnostik zu etablieren. Ein ähnliches Phänomen zeigte sich bei der Kultivierung von fetalen Zellen. Auch hier war die Anzahl an fetalen Zellkolonien nur sehr gering. Somit ist auch hier eine Diagnostik nur in Ansätzen möglich. Das Hauptproblem stellt also nach wie vor die geringe Anzahl an fetalen Zellen im mütterlichem Blutkreislauf dar, deren Anreicherung zwar stark verbessert wurde, aber für eine routinemäßige Diagnostik noch keineswegs ausreichend ist. Eine Automatisierung der Prozedur würde eine Erleichterung mit sich bringen. Jedoch fehlen dazu noch die geeigneten Marker, um an den computergescannten Zellen Diagnostik machen zu können. Aus diesen Gründen sind noch weiterführende Forschungsmaßnahmen zu unternehmen, um diese Probleme zu lösen, damit der Weg zu einer durchführbaren routinemäßigen Diagnostik an fetalen Zellen frei gemacht werden kann. Im folgenden sollen die unterschiedlichen Ansätze nochmals detaillierter diskutiert werden.

5.1 Microbeadmarkierung für das computerunterstützte Scannen von fetalen Zellen

Eine Beschleunigung der Detektion von fetalen Zellen würde ein computerunterstütztes Scanningsystem bewirken. Damit könnten die wenigen fetalen Zellen aus der Vielzahl der mütterlichen Zellen einfacher identifiziert, lokalisiert und gesammelt werden. Eine Möglichkeit die fetalen Zellen zu markieren, ist die Aufreinigung der Zellen durch an Microbeads gekoppelte Antikörper, wie z. B. an den Antikörper CD71. Seine Detektion kann durch Fluoreszenzmarkierung erfolgen, in diesem Fall durch den Farbstoff Cy3, der spezifisch an die Microbeads bindet und diese detektiert. Es zeigte sich jedoch, daß sich diese Methode bei diesem Antikörper nicht eignet, weil sich die fetalen Zellen nach der Markierung nicht signifikant von den mütterlichen Zellen unterscheiden. Das gilt sowohl für das

Färbemuster, als auch für die Intensität der Fluoreszenz. Eine Entwicklung einer computergestützten Scanningmethode kommt unter diesen Umständen nicht in Frage. Bis dato gibt es keinen Marker, der spezifisch genug ist, um diese Möglichkeit des Screenings via Computer effektiv nutzen zu können. Ansätze in diese Richtung, z. B. über eine intracytoplasmatische Färbung des ϵ -Hämoglobin der fetalen Zellen (Choolani *et al.* 2001) konnten bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht in ein für die Routinediagnostik eingesetztes Computerscreening umgesetzt werden. Die Erkennung und Erfassung fetaler Zellen ist ein arbeitsintensiver und zeitaufwendiger Vorgang. Eine automatische Erkennung würde den erheblichen Arbeits- und Zeitaufwand beim fetalen Zellscreening erleichtern und zugleich verkürzen. Solche computergesteuerte und automatische Detektionssysteme werden entwickelt und beruhen meistens auf zwei Methoden: Die rechnerunterstützte digitale Mikroskopie (Netten *et al.* 1997; Tanke *et al.* 1996) oder das Scannen der Objektträger mit einem Laser (Oosterwijk *et al.* 1998; Mignon-Godefroy *et al.* 1997). Sie befinden sich aber nach wie vor nicht im diagnostischem Einsatz.

5.2 Spezifische Antikörper für die Markierung von nukleierten Erythrozyten

Man findet im mütterlichem Vollblut einen Anteil von fetalen Zellen, der zwischen 1 : 50000 und 1 : 1000000 liegt (Hamada *et al.* 1993; Sohda *et al.* 1997). Dieses seltene Vorkommen von fetalen Zellen im maternalen Kreislauf ist ein Ausgangspunkt für die Schwierigkeiten, die die nicht-invasive Pränataldiagnostik in sich birgt. Die Detektion der fetalen Zellen über immunochemische Methoden erweist sich als sehr schwierig. Denn auf der Oberfläche der fetalen Zellen sind zur Zeit keine Antigene bekannt, die nur von diesen Zellen exprimiert werden. Bis zu diesem Zeitpunkt ist der Antikörper CD71 gegen den Transferrin-Rezeptor am häufigsten in Gebrauch. Seine Spezifität ist jedoch nicht hoch genug, um einen genügend großen Teil der vorhandenen fetalen Zellen zu detektieren. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit vier weitere Antikörper einer Testreihe unterzogen, um einen Antikörper mit einer höheren Spezifität für fetalen Zellen zu finden. Es kamen zunächst zwei Antikörper in die engere Auswahl. Sie sind spezifisch für die Erythrozyten von Hühnern. Da die Erythrozyten von Hühnern kernhaltig sind, genau wie die humanen Erythrozyten in ihrer frühen Entwicklungsphase, könnten sich diese Antikörper auch übergreifend bei den humanen kernhaltigen Erythrozyten einsetzen lassen, frei nach der Hypothese von Häckel: Die Ontogenese rekapituliert die Phylogenese. Bei der humanen Entwicklung von der Vorläuferzelle zum ausgereiften Erythrozyten könnte diese These dann ebenfalls möglich

sein. Die Erythrozyten der Vögel sind immer kernhaltig. Ein Vergleich mit den humanen kernhaltigen Vorläuferzellen liegt auf der Hand. Der kernhaltige Erythrozyt (Erythroblast) könnte bei Hühnerzellen eine konservierte Zwischenstufe in der Entwicklung des humanen kernhaltigen Erythrozyten darstellen und somit ähnliche Oberflächeneigenschaften besitzen.

Aus diesem Grund wurden die Antikörper mit der Bezeichnung 2G5 und 3F9 einer Testreihe unterzogen. Der Antikörper 3F9, von dem bekannt ist, daß er adulte Hühnererythrozyten markiert und besonders erythrozytenspezifisch ist, war weniger spezifisch. Er konnte im Durchschnitt nur 0,2 fetale Zellen innerhalb der 500 untersuchten Interphasekerne detektieren. Das Antigen dieses Antikörpers auf der Oberfläche der Hühnererythrozyten ist also morphologisch nicht auf die der humanen nukleierten Erythrozyten übertragbar und somit anscheinend nicht phylogenetisch konserviert. Im Gegensatz dazu besitzt der Antikörper 2G5, der beim Huhn Erythrozyten, Lymphozyten und Myelozyten markiert und detektiert, auch eine Spezifität gegenüber humanen Erythrozyten. Unter jeweils 500 ausgezählten Interphasekernen befanden sich im Durchschnitt 1,2 Zellen fetalen Ursprungs.

Der im Anschluß daran getestete humane monoklonale Antikörper EPO-R markierte durchschnittlich 1,6 von jeweils 500 untersuchten Interphasekernen. Er war also bezüglich seiner Spezifität höher als 2G5 und 3F9. Im Gegensatz zu Valerio *et al.* (1997), die rekombinantes, biotinyliertes Erythropoetin verwendet hatten, ist EPO-R hier direkt gegen den Rezeptor gerichtet. Der Erythropoetin-Rezeptor ist ein Antigen, das auf der Oberfläche von erythroiden Vorläuferzellen vermehrt exprimiert wird.

Bei dem vierten getesteten Antikörper mit der Bezeichnung Flk1 handelt es sich um eine fetale Kinase, genauer gesagt ist die Thyrosin Kinase ein Rezeptorprotein, welches von seiner Morphologie her mit dem Antigen CD117 und CD140a in Beziehung gesetzt werden kann. Flk1 wurde als Antikörper verwendet, weil der dazugehörige Rezeptor in die Differenzierung der hämatopoetischen Zellen involviert ist (Kabrun *et al.* 1997; Kataoka *et al.* 1997). Die Ergebnisse zeigten, daß sich die Antikörper Flk1 und EPO-R als spezifischer erwiesen, als der häufig verwendete Antikörper CD71 und deshalb für die Anreicherung von fetalen Zellen besser geeignet erscheinen. Mit einer Detektionsrate von durchschnittlich 1,8 Zellen bei Flk1 und einer Rate von durchschnittlich 1,6 bei den Zellen, die mit EPO-R markiert worden sind, erwies sich ihre Spezifität als immer noch sehr gering. Um diese Ergebnisse noch zu verifizieren, sollen die Untersuchungen an einer größeren Population erfolgen.

Die Möglichkeit einer kombinierten Aufreinigung über CD14 bzw. CD45 wurde nicht untersucht, weil diese Jansen *et al.* (1999) bereits in ihrer Arbeit untersucht hatten und

herausfanden, daß die Kombination weniger Effektivität besitzt als die alleinige Aufreinigung mit dem Antikörper CD71.

Eine verbesserte Dichtegradienten-Zentrifugation (Iverson *et al.* 1981; Sekizawa *et al.* 1999) könnte die Ausbeute an fetalen Zellen ebenfalls steigern, da diese Methode mit einem größeren fetalen Zellverlust verbunden ist. Smits *et al.* (2000) untersuchten z. B. unterschiedliche Einfach- und Zweifach-Dichtegradienten an einem Modellsystem (Gemisch aus Nabelschnurblut und normalem adulten Blut) mit dem Ergebnis, daß die prozentuale Ausbeute an Erythroblasten von 3% bis 68% zunahm, bei zunehmender Dichte des Gradienten (1075 g/l bis 1098 g/l).

Die sich daran anschließende MACS oder FACS Aufreinigung konnte nur unwesentlich verbessert werden, weil die Spezifität der bis dato zur Verfügung stehenden fetalen Antikörpern sehr variabel ist. Ohne diese relativ unspezifische Anreicherung sind insgesamt jedoch zu viele Zellen mit vornehmlich mütterlichem Ursprung vorhanden. So ist es nur mit einem erheblich großen Zeitaufwand möglich, die fetalen Zellen unter den mütterlichen Zellen zu lokalisieren. Im Idealfall sollte ein geeigneter Marker gefunden werden, um den Verlust an fetalen Zellen in Grenzen zu halten, damit die DNA von genügend kindliche Zellen für eine molekulargenetisch Pränataldiagnostik zur Verfügung steht zu.

Alternative Methoden für die Anreicherung von fetalen Zellen wie z. B. die elektrophoretische Trennung (Wachtel *et al.* 1996) oder fetale Merkmale, wie eine erhöhte Thymidinkinaseaktivität (Hengstschläger und Bernaschek 1997) sind mehr oder minder erfolgreich geprüft worden. Hier müssen für eine endgültige Bewertung noch weitere Studien erfolgen.

5.3 Kultivierung von fetalen Zellen aus maternalem Blut

Einen ganz anderen Ansatzpunkt stellt die Kultivierung von fetalen nukleierten Zellen aus mütterlichem Blut dar. Hier liegt ein ganz großer Vorteil darin, daß nach der Kultivierung eine konventionelle zytogenetische Untersuchung durchgeführt werden kann, wie sie in der herkömmlichen invasiven Pränataldiagnostik zur Anwendung kommt. Bei erfolgreicher Kultivierung von fetalen nukleierten Zellen wäre es möglich ihr schlechtes numerisches Verhältnis gegenüber den Zellen mütterlichen Ursprungs zu verbessern. Die Kultivierung wäre so eine adäquate Alternative zur Amniozentese, denn weder bei Analyse von fetalen Einzelzellen (von Eggeling *et al.* 1997; Hahn *et al.* 1998), noch bei der von freier fetaler DNA (Lo *et al.* 1998) ist es möglich Metaphasen darzustellen, vergleichbar mit der herkömmlichen Zytogenetik nach Amniozentese. Der erste Versuch einer Kultivierung wurde von Lo *et al.*

(1994) durchgeführt. Dabei konnte seine Arbeitsgruppe zeigen, daß nach einer Kokultivierung einer hämatopoetischen Zellpopulation, die aus der fetalen Leber stammte, eine selektive Vermehrung von erythroiden Zellen mit einem Reinheitsgrad von 0,01 bis 0,25% möglich ist. Die Zellpopulation war angereichert mit dem hundertfachen an mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut einer nichtschwangeren Frau. Der Arbeitsgruppe um Valerio *et al.* (1997) gelang es das erste Mal nach der Kultivierung von Zellen aus dem peripheren Blut von Schwangeren fetale Kolonien zu identifizieren. Die Identifikation erfolgte über PCR von gepoolten Einzelkolonien bzw. aus der Gesamtheit der Kolonien einer Petrischale. Jedoch wurde diese Arbeit von Chen *et al.* (1998) angezweifelt, denn die Möglichkeit eines falsch-positiven PCR-Ergebnis, beeinflusst durch vereinzelte fetale Zellen, die nicht an einer direkten Koloniebildung beteiligt sind, konnte bei dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden. Dahingegen konnten Tutschek *et al.* (2000) aus einer Auswahl von fast 3000 Einzelklonen 1,4% Kolonien fetalen Ursprungs nachweisen. Han *et al.* (2001) konnte mit Hilfe einer sogenannten 2-Phasenflüssigkultivierung nach Einzelgradienten-Zentrifugation fetale Zellen nachzuweisen. Dies erfolgte über eine immunochemische Markierung von Hb F, PCR und der konventionellen Zytogenetik über die Färbung der G-Banden. Sie konnten jedoch in ihrer keine fetalen Metaphasen, lediglich Valerio *et al.* (1997) waren bisher in der Lage dazu.

Nach der Austestung verschiedener Kulturmedien, fand die erfolgreiche Kultivierung in dieser Arbeit nach einer Dreifachdichtegradienten-Zentrifugation ohne einen zusätzlichen Anreicherungsschritt statt, um einen zusätzlichen numerischen Verlust an fetalen Zellen zu vermeiden. Für die eigentliche Kultivierung wurde ein Medium mit der Bezeichnung Methocult 4431 der Firma Stemcell verwendet, das bis zu diesem Zeitpunkt in dem Bereich der nicht-invasiven Pränataldiagnostik noch nicht eingesetzt wurde. Die einzelnen Kolonien wurden über einen Mikromanipulator mit einer ausgezogenen Pasteurpipette aus der kultivierten Petrischale gesammelt. Eine Hälfte der Kolonie wurde über PCR, die andere Hälfte, bei positivem PCR-Ergebnis, mit FISH weiter differenziert, um die PCR-Ergebnisse zu verifizieren.

Bei der Analyse über das Amelogenin-System konnten 8,9% Y-positive Kolonien gefunden werden, was einem Verhältnis von ca. 1 : 12 und damit einer effektiven Verbesserung des *in vivo* Verhältnisses entspricht. Dabei fanden sich die fetalen Zellen ohne Ausnahme in den roten Kolonien, entstanden aus erythroiden Vorläuferzellen. Alle analysierten weißen Kolonien waren negativ. Auf diese Weise ist also eine Vorselektion der zu sammelnden Kolonien über deren Farbe möglich. Durch die nachfolgende Analyse mittels FISH wurden

die PCR-positiven Kolonien zusätzlich verifiziert. Dabei zeigte sich, daß keine der Kolonien ausschließlich aus fetalen Zellen bestand. Nur in einem geringen Prozentsatz von 25% (3/12) der untersuchten Fälle fanden sich auch fetale Zellen. Ihr prozentualer Anteil schwankte dabei zwischen 0,22% und 31,5% pro Kolonie. Dieses Ergebnis zeigt, daß Untersuchungen von Kolonien ausschließlich mit nicht quantitativer PCR (Han *et al.* 2001) nur mit Vorbehalt gesehen werden können. So ergaben auch die eigenen Studien mit SRY-PCR keinen Hinweis darauf, daß es sich um Mischkolonien handelte. Die sogenannten Mischkolonien können jedoch über eine PCR mit dem Amelogenin-System erkannt werden, weil hier zwei Banden, eine den männlichen und damit den fetalen Zellen und eine Bande den weiblichen Zellen zuzuordnen ist. Über die Intensität der Banden kann man so über eine geeignete Bildanalysesoftware (RFLPscan der Firma Scanalytics In., VA; USA) auf das Verhältnis von fetalen zu mütterlichen Zellen schließen. Aus der Zusammensetzung der Kolonien, definiert sowohl durch PCR, als auch durch die FISH-Analyse, können neuartige Theorien im Bezug auf die Art der Koloniebildung aufgestellt werden. Denn nur maximal 30% der Zellen waren nach FISH-Analyse fetalen Ursprungs. Vielleicht benötigen die fetalen Zellen bestimmte mütterliche Zellen als eine Art Co-Stimulator, wie es von den Arbeitsgruppen Cicuttini *et al.* (1993) und von Nanno *et al.* (1994) in ihren Arbeiten über Kultivierungen anderer Zelltypen herausgefunden wurde. Bis zu diesem Zeitpunkt sind jedoch noch nicht genügend biologische Eigenschaften der fetalen erythroiden Vorläuferzellen bekannt.

Zudem wird wahrscheinlich ein großer Anteil fetaler Zellen aufgrund ihrer andersartigen Oberflächenstruktur durch die intensive Vorbehandlung vor der eigentlichen Hybridisierung zerstört. Die andersartige Oberflächenstruktur geht mit der Beobachtung einher, daß sich die Morphologie der fetalen Zellen, hier der Zellkerne, deutlich von den kompakten und kleinen Zellkernen der mütterlichen Zellen unterscheidet. Wie die Abbildung 21 zeigt, ist ein hoher Anteil der detektierten fetalen Zellkerne bis zu zehnmal größer und hat eine lockere und wolkige Struktur.

Diese Morphologie paßt auf die Beschreibung von Megaloblasten (Galimi *et al.* 1994; Antony *et al.* 1991). Bei den Zellen könnte es sich aber auch um somatische Zellen handeln, wie z. B. um Zytotrophoblasten (van-Wijk *et al.* 2001). Außerdem kann die zytogenetische Präparation bei einer so geringen Zellzahl pro Kolonie zu technisch bedingten Verlusten führen. Die geringe Anzahl an Zellen und die variable Effizienz von FISH (4% - 21%; Liehr *et al.* 1994) minimiert außerdem die optimale Ausbeute für eine statistische Analyse.

Zudem konnte anhand der erfolgreichen Präsentation einer fetalen Metaphase gezeigt werden, daß im Prinzip eine Präparation mit Hilfe der Standardmethode der pränatalen Zytogenetik

funktioniert, auch wenn die fetalen Zellen über das periphere Blut und somit über eine nicht-invasive Technik zugänglich gemacht werden. Unter der Berücksichtigung des limitierenden Faktors der geringen Anzahl der fetalen Zellen ist eine Verbesserung der Präparationstechnik zu diesem Zweck zwingend notwendig. Besser adaptierte Kultivierungsbedingungen für die fetalen Zellen könnten das Ergebnis erfolgreich verbessern.

5.4 Immortalisierung

Der Verlust von Telomeren wirkt als mitotische Uhr, die die Seneszenz der Zellen ankündigt und sie aus dem Zellzyklus herausführt. Die Telomerase, ein Enzym, das die Telomere wieder verlängern kann, wird benötigt, um die sich bei jeder Zellteilung verkürzenden Telomere zu verlängern. Im Menschen wurde Telomeraseaktivität bisher in Zellen mit einem unlimitierten replikativen Potential gefunden. Dies können z. B. Zelllinien von Ovarien und Hoden, aber auch maligne Tumorzellen sein (Übersicht: Dahse *et al.* 1997). Auch in hämatopoetischen Zellen ist die Telomerase auf einem teilweise sehr niedrigen Level aktiv, der eigentlich zu schwach erscheint, um die Telomerlänge in kultivierten hämatopoetischen Zellen aufrecht zu erhalten (Chiu *et al.* 1996). Für primitive hämatopoetische Zellen konnte nach einer Cytokin-induzierten Proliferation eine Erhöhung der Telomeraseaktivität festgestellt werden, wohingegen nach ca. 3 Wochen einer *ex vivo* Expansion die Aktivität, einhergehend mit einer abnehmenden Proliferation und einer stärkeren Expansion der reiferen Zellen, abnahm (Engelhardt *et al.* 1997).

Nachdem die Geron Cooperation 1998 die Klonierung der „human telomerase reverse transcriptase subunit“ (hTERT) und deren Anwendung zur Immortalisierung von Zellen publizierte (Bodnar *et al.* 1998), besteht die Möglichkeit, auch hämatopoetische Zellen mit ihr zu transfizieren. Im Gegensatz zu viral transformierten Zellen bleiben die chromosomale Integrität und der Phänotyp erhalten (Jiang *et al.* 1999). Für die bessere Kultivierung von kindlichen Zellen aus mütterlichen Blut konnte die Transfektion mit hTERT nicht genutzt werden, da diese nur für einen Zeitraum von ca. 14 Tagen hTERT exprimierten. Die Etablierung einer fetalen immortalisierten Zelllinie könnte als Modell für weitere Kultivierungsversuche genutzt werden.

6 Zusammenfassung

Kindliche Zellen treten während der Schwangerschaft in den mütterlichen Kreislauf über. Diese Zellen können aus dem peripheren Blut der Mutter isoliert und anschließend analysiert werden. Diese Tatsache eröffnet die Möglichkeit einer nicht-invasiven pränatalen Diagnostik ohne eingriffsbedingte Wahrscheinlichkeit zum Abort. Bisherige Forschungsergebnisse zeigten, daß eine ausreichende Anreicherung von fetalen Zellen für eine verlässliche Diagnostik nur in Ansätzen erfolgreich ist.

In einer Studie wurden 10 Blutproben von Schwangeren mit männlichem Fötus über MACS mit dem Antikörper CD71 aufgereinigt. In einem Monolayer wurden die nukleierten Erythrozyten mittels ausgezogener Pasteurpipette über einen Mikromanipulator gesammelt. Anschließend erfolgte die molekulargenetische Charakterisierung der gesammelten Zellen über Einzelzell-PCR. Es konnte gezeigt werden, daß 19 (22%) der insgesamt 116 gesammelten Zellen fetalen Ursprungs waren.

Der Antikörper CD71 gegen den Transferrin-Rezeptor wird für eine Anreicherung fetaler Zellen sehr häufig eingesetzt. Um seine Eigenschaften genauer zu charakterisieren; wurde die Dichte der exprimierten Transferrin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von fetalen und maternalen Zellen analysiert. Durch den Einsatz einer gegen die magnetischen Beads gerichteten Cy3-Markierung konnte der Antikörpers CD71 auf der Zelloberfläche über Fluoreszenzmission sichtbar gemacht werden. In 10 Blutproben von Schwangeren mit männlichem Fetus wurden jeweils 1000 Zellen untersucht. Es fluoreszierten ca. 90% aller MACS-positiven Zellen, was auf eine hohe Effizienz von MACS schließen läßt. Signifikante Intensitätsunterschiede in der Fluoreszenz zwischen den fetalen und den mütterlichen Zellen konnten jedoch nicht nachgewiesen werden. Unterschiede in der Färbematrix waren ebenfalls nicht vorhanden. Demnach kann die spezifische Verteilung des Transferrin-Rezeptors auf der Zelloberfläche nicht als Marker fetaler Zellen genutzt werden.

Auf der Suche nach einem besser geeigneten Markern für fetale Zellen wurden eine Reihe von bis dahin noch nicht untersuchten Antikörpern analysiert und mit dem Antikörper CD71 verglichen. Dabei handelte es sich um die vier Antikörper mit der Bezeichnung 2G5, 3F9, EPO-R und Flk1. Im direkten Vergleich zu CD71; der innerhalb der 500 Zellen keine fetale Zelle detektierte, konnten bei 3F9 mit Interphase-FISH durchschnittlich 0,2 XY-positive Zellen detektiert werden, bei 2G5 waren es durchschnittlich 1,2 fetale Zellen. Die Antikörper EPO-R und Flk1 zeigten mit durchschnittlich 1,6 bzw. 1,8 detektierten fetalen Zellen die höchste Spezifität, waren also auch spezifischer als CD71. Jedoch reicht ihre Spezifität noch

nicht aus, um nach der Selektion eine genügend große Ausbeute an fetalen Zellen zu bekommen, die dann für eine umfangreiche Diagnostik zur Verfügung stehen würden. Eine computerunterstützte Scanninganalyse mit geeigneten Markern würde zudem die technische Voraussetzung dafür schaffen, die geringe Anzahl an fetalen Zellen aus der Vielzahl der Zellen mütterlichen Ursprungs mit geringerem Zeitaufwand zu lokalisieren und sie anschließend weiteren Analysen zu unterziehen.

Einen Alternativansatz stellt die selektive Kultivierung fetaler Zellen dar, die in der letzten Zeit immer stärker in den Blickpunkt des Interesses gerückt ist. Aufgrund der weniger geeigneten Kulturmedien konnte dies jedoch bis zu diesem Zeitpunkt nur in Ansätzen gezeigt werden. In dieser Arbeit wurden deswegen unterschiedliche Stammzellmedien auf ihre Effektivität hin getestet. Dabei wurden die Basiskulturmedien mittels bestimmter Wachstumsfaktoren und Vitamine modifiziert, um den fetalen Zellen einen Wachstumsvorteil zu verschaffen. Zu den in dieser Arbeit verwendeten Wachstumsfaktoren zählten unter anderem Cytokine und Interleukine, wie Interleukin IL6 und IL3, sowie der humane Granulozyten-Makrophagen Stimulationsfaktor hGM-SCF, der Stammzellfaktor SCF, Erythropoietin (EPO) und flt-3L. Diese Zusätze bewirkten jedoch keinen Wachstumsvorteil bei den fetalen Zellen gegenüber maternalen Zellen.

Im Gegensatz dazu zeigte das semisolidale Kulturmedium Methocult 4430 fetale Mischkolonien. Über PCR ließen sich in 15 der 22 untersuchten Fälle fetale Zellen nachweisen, also in ca. 68% der untersuchten Proben. 7,9% (27/901) der gesammelten Kolonien waren fetalen Ursprungs. Die ersten drei untersuchten Fällen wurde molekulargentisch mit SRY-PCR untersucht. Hier konnten unter den 379 gesammelten Kolonien 40 (10,5%) SRY-positiv getestet werden. Innerhalb der positiv getesteten Kolonien waren nach anschließender FISH-Analyse durchschnittlich 7,84% der Zellen Y-positiv, bis zu 31,5% einer Kolonie. In 19 weiteren Blutproben, die mittels Amelogenin-PCR analysiert wurden, zeigten 32 (6,1%) der insgesamt 522 untersuchten Einzelklone Y-positive Banden. 0,015% dieser Kolonien waren auch nach FISH-Analyse X/Y-positiv. Dieser Ergebnisse lassen neue Theorien zu, was die Koloniebildung fetaler Zellen angeht. Vielleicht brauchen die fetalen Precursorzellen die maternalen Zellen als Kostimulator, um Kolonien ausbilden zu können. Weitere Kultivierungsversuche könnten Klarheit darüber schaffen.

Im Rahmen der Kultivierungsversuche wurde weiterhin versucht, fetale Zellen aus Schwangerenblut zu immortalisieren, weil beobachtet wurde, daß nur vor Kultivierung, mittels PCR Y-spezifische Sequenzen nachgewiesen werden konnten. In Vorversuchen war die Immortalisierung an der etablierten Zelllinie cos-7 über die Transfektion mit der

katalytischen Subeinheit (hTRT) der Telomerase erfolgreich durchgeführt worden. Im Anschluß daran wurden mehrer Versuche an Zellen von Schwangerenblut nach Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Jedoch war die Expression des Vektors nicht länger als vierzehn Tage in der Kultur nachweisbar. Sie erwies sich als nicht stabil.

7 Literaturverzeichnis

1. Antony AC, Briddel RA, Brandt JE, Strabeva JE, Verma RS, Miller ME, Kalasinski LA, Hoffman R (1991) Megaloblastic hematopoiesis of anti-folate receptor with hematopoietic progenitor cells leads to a proliferate response independent of megaloblastic changes. *J Clin Invest* 87:313-325
2. Alter BP (1994) Biology of erythropoiesis. *Ann N Y Acad* 731:36-47. Review.
3. Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B (2000) Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem* 46:301-302
4. Attwood HD, Park WW (1960) Embolism to the lungs by trophoblasts. *J Obstet Gynaecol* 68:611-617
5. Bhat NM, Bieber MM, Teng-Nelson NH (1993) One-step enrichment of nucleated red blood cells: A potential application in perinatal diagnosis. *J Immun Methods* 158:-280
6. Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF, Knoll JH, and Latt SA (1990) Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci* 87:3279-3283
7. Bianchi DW, Stewart JE, Garber MF, Lucotte G, Flint AF (1991) Possible effect of gestational age on the detection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood. *Prenat Diagn* 11:523-528
8. Bianchi DW, Zickwolf GK, Yih MC, Flint AF, Geifman OH, Erikson MS, Williams JM (1993) Erythroid-specific antibodies enhance detection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood. *Prenat Diagn* 13:293-300
9. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA (1996) Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 93:705-708
10. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279:349-352
11. Cha RS, Thilly WG PCR (1993) Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *Methods Appl* 3:18-29
12. Chen H, Griffin DK, Jestice K, Hackett G, Cooper J, Ferguson-Smith MA (1998) Evaluating the culture of fetal erythroblasts from maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 18:883-892

13. Cherif D, Bernard O, Berger R (1989) Detection of single-copy genes by nonisotopic in situ hybridization on human chromosomes. *Hum Genet* 81:358-62
14. Choolani M, O'Donnell H, Campagnoli C, Kumar S, Roberts I, Bennett PR, Fisk NM (2001). Simultaneous fetal cell identification and diagnosis by epsilon-globin chain immunophenotyping and chromosomal fluorescence in situ hybridization. *Blood* 98:554-557
15. Cicuttini FM, Loudovaris M, Boyd AW (1993) Interactions between purified human cord blood haemopoietic progenitor cells and accessory cells. *Br J Haematol* 84:365-373
16. Chiu CP, Dragowska W, Kim NW, Vaziri H, Yui J, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM (1996) Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow. *Stem Cells* 14:239-248
17. Claussen U, Ulmer R, Beinder E, Voigt HJ (1993) Rapid karyotyping in prenatal diagnosis: a comparative study of the 'pipette method' and the 'in situ' technique for chromosome harvesting. *Prenat Diagn* 13:1085-1093
18. Dahse R, Fiedler W, Ernst, G (1997) Telomeres and Telomerase: Biological and clinical importance. *Clinical Chemistry* 43:708-714
19. Elias S, Price J, Dockter M, Wachtel S, Tharapel A, Simpson JL, Klinger KW (1992) First trimester prenatal diagnosis of trisomy 21 in fetal cells from maternal blood. *Lancet* 340:1033
20. Engelhardt M, Albanell J, Drullinsky P, Han W, Guillem J, Scher HI, Reuter V, Moore MA (1997) Relative contribution of normal and neoplastic cells determines telomerase activity and telomere length in primary cancers of the prostate, colon, and sarcoma. *Clin Cancer Res* 3:1849-1857
21. Galimi F, Bagnara GP, Bonsi L, Cottone E, Follenzi A, Simeone A, Comoglio PM (1994) Hepatocyte growth factor induces proliferation and differentiation of multipotent and erythroid hemopoietic progenitors. *J Cell Biol* 127:1743-1754
22. Gall JG, Pardue ML (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci* 63:378-383
23. Gänshirt Ahlert D, Börejesson-Stoll R, Burschik M, Garritson HS, Helmer E, Miny P, Velasco Mwalde C, Patterson D (1993) Detection of fetal trisomies 21 and 18 from maternal blood using triple gradient and magnetic cell sorting. *Am J Reprod Immun* 30:194-201

24. Gänshirt D, Börejesson-Stoll R, Burschik M (1994b) Successful prenatal diagnosis from maternal blood with magnetic cell sorting. *Ann NY Acad Sci* 731:103-114
25. Gänshirt Ahlert D, Burschik M, Garritsen HS, Helmer L, Miny P, Horst J, Schneider HP, Holzgreve W (1992) Magnetic cell sorting and the transferrin receptor as potential means of prenatal diagnosis from maternal blood. *Am J Obstet Gynecol* 166:1350-1355
26. Goldberg JD, Wohlferd MM (1997) Incidence and outcome of chromosomal mosaicism found at the time of chorionic villus sampling. *Am J Obstet Gynecol* 176:1349-1353
27. Hahnemann N (1973) Chromosome studies in induced abortion. *Clin Genet* 4:328-332
28. Hahnemann N (1974) Early prenatal diagnosis. A study of biopsy techniques and cell culturing from extraembryonic membranes. *Clin Genet* 6:294-306
29. Hahn S, Sant R, Holzgreve W (1998) Fetal cells in maternal blood: current and future perspectives. *Mol Hum Reprod* 4:515-521
30. Hamada H, Arinami T, Kubo T, Hamaguchi H, Iwasaki H (1993) Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age. *Hum Genet* 91:427-432
31. Han JY, Kim KH, Park JI, Kim IH, Je GH (2001) Detection of fetal erythroid cells from maternal blood using fluorescence in situ hybridization and liquid culture. *J Korean Med Sci* 16:145-149
32. Hawes CS, Suskin HA, Kalionis B, Mueller UW, Casey G, Hall J, Rudzki Z (1994) Detection of paternally inherited mutations for β -thalassemia in trophoblast isolated from peripheral maternal blood. *Ann N Y Acad Sci* 731:181-185
33. Henderson KG, Shaw TE, Barret IJ, Tlenius AHP, Wilson RD, Kalousek DK (1996) Distribution of mosaicism in Human placentae. *Hum Genet* 97:650-654
34. Hengstschlager M, Bernaschek G (1997) A new cytofluorometric approach to detect fetal cells in the maternal circulation. *J Med Genet* 34:789-790
35. Herzenberg LA, Bianchi DW, Schröder J, Cann HM Iverson CM (1979) Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. *Proc Natl Acad Sci* 76:1453-1455
36. Hohmann H, Michel S, Reiber W, Gunther M, Claussen U, von Eggeling F (2001) Applicability of four new antibodies for the detection of fetal nucleated cells out of maternal blood by FISH analysis. *Fetal Diagn Ther* 16:52-56
37. Iverson GM, Bianchi DW, Cann HM, Herzenberg LA (1981) Detection and isolation of fetal cells from maternal blood using the fluorescence-activated cell sorter (FACS). *Prenat Diagn* 1:61-73

38. Jansen MW, von Lindern M, Beug H, Brandenburg H, Wildschut HI, Wladimiroff JW, In 't Veld PA (1999) The use of in vitro expanded erythroid cells in a model system for the isolation of fetal cells from maternal blood. *Prenat Diagn* 19:323-329
39. Jiang XR, Jimenez G, Chang E, Frolkis M, Kusler B, Sage M, Beeche M, Bodnar AG, Wahl GM, Tlsty TD, Chiu CP (1999) Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat Genet* 21:111-114
40. Jones SS, D'Andrea AD, Haines LL, Wong GG (1990) Human erythropoietin receptor: cloning, expression, and biologic characterization. *Blood* 76:31-35
41. Kabrun N, Buhring HJ, Choi K, Ullrich A, Risau W, Keller G (1997) Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Blood* 124:2039-2048
42. Kataoka H, Takakura N, Nishikawa S, Tsuchida K, Kodama H, Kunisada T, Risau W, Kita T (1997) Expressions of PDGF receptor alpha, c-Kit and Flk1 genes clustering in mouse chromosome 5 define distinct subsets of nascent mesodermal cells. *Dev Growth Differ* 39:729-740
43. Langer R (1981) Production of antibodies. Polymers for the sustained release of macromolecules: their use in a single-step method of immunization. *Meth Enzymol* 73:57-75
44. Little MT, Langlois S, Wilson RD, Lansdorp PM (1997) Frequency of fetal cells in sorted subpopulations of nucleated erythroid and CD34+ hematopoietic progenitor cells from maternal peripheral blood. *Blood* 89:2347-2358
45. Liehr T, Atanasov N, Tulusan HT, Gebhart E (1993) Amplification of proto-oncogenes in human ovarian carcinomas. *Inter J Oncology* 2:155-160
46. Lo YM, Morey AL, Wainscoat JS, Fleming KA (1994) Culture of fetal erythroid cells from maternal peripheral blood [letter] [published erratum appears in *Lancet* 1994 Aug 13; 344(8920):486]. *Lancet* 344:264-265
47. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AM, Hjelm NM (1998) Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *J Hum Genet* 62:768-75
48. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI (1987) Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development. *Blood* 69:255-263
49. Longmore GD, Pharr PN, Lodish HF (1994) A constitutively activated erythropoietin receptor stimulates proliferation and contributes to transformation of multipotent, committed nonerythroid and erythroid progenitor cells. *Mol Cell Biol* 14:2266-77
50. McNay MB, Whitfield CR (1984) Amniocentesis. *Br J Hosp Med* 31:406-416

51. Mesker WE, Ouwerkerk-van Velzen MC, Oosterwijk JC, Bernini LF, Golbus MS, Kanhai HH, Van Ommen GJ, Tanke HJ (1998) Two-colour immunocytochemical staining of gamma (gamma) and epsilon (epsilon) type haemoglobin in fetal red cells. *Prenat Diagn Nov*;18:1131-1137
52. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu Q, Bacchetti S, Haber DA, Weinberg RA (1997) hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90:785-795
53. Migliaccio AR, Migliaccio G, Adamson JW (1988) Effect of recombinant hematopoietic growth factors on proliferation of human marrow progenitor cells in serum-deprived liquid culture. *Blood*. 72:1387-1392
54. Mignon-Godefroy K, Guillet JG, Butor C (1997) Solid phase cytometry for detection of rare events. *Cytometry* 27:336-344
55. Millauer B, Wизigmann-Voos S, Schnürich H, Martinez R, Möller NPH, Risau W, Ullrich A (1993) High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72: 835-846
56. Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 7: 155335-50
57. Nakahori Y, Takenaka O, Nakagome Y (1991) A human X-Y homologous region encodes "amelogenin". *Genomics* 9:264-269
58. Nanno M, Hata M, Doi H, Satomi S, Yagi H, Sakata T, Suzuki R, Itoh T (1994) Stimulation of in vitro hematopoiesis by a murine fetal hepatocyte clone through cell-cell contact. *J Cell Physiol* 160:445-454
59. Netten H, Young IT, van Vliet LJ, Tanke HJ, Vrolijk H, Slos WCR (1997) FISH and chips: automation of fluorescent dot counting in interphase cell nuclei. *Cytometry* 28:1-10
60. Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, Matsuyoshi N, Kodama H (1998) Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin cells at a diverging point of endothelial hemopoietic lineages. *Development* 125: 1747-1757
61. Oosterwijk JC, Knepfle CF, Mesker WE, Vrolijk H, Sloos WC, Pattenier H, Ravkin I, van Ommen GJ, Kanhai HH, Tanke HJ (1998) Strategies for rare-event detection: an approach for automated fetal cell detection in maternal blood. *Am J Hum Genet* 63:1783-1792.
62. Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:2934-8.

63. Price JO, Elias S, Wachtel SS, Klinger K, Dockter M, Tharapel A, Shulman LP, Phillips OP, Meyers CM, Shook D, et al (1991) Prenatal diagnosis with fetal cells isolated from maternal blood by multiparameter flow cytometry. *Am J Obstet Gynecol* 165:1731-1737
64. Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT, (1993) Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 90:7533-7537
65. Rossi P, Dolci S, Albanesi C, Grimaldi P, Geremia R (1993) Direct evidence that the mouse sex-determining gene SRY is expressed in the somatic cells of male fetal gonads and in the germ cell line in the adult testis. *Mol Reprod Dev* 34:369-373
66. Rousseau O, Boulot P, Lefort G, Nagy P, Bachelard B, Bonifacj C, Hedon B, Laffargue F, Viala JL (1995) Amniocentesis before 15 weeks' gestation: technical aspects and obstetric risks. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 58:127-30
67. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-91
68. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-4
69. Samura O, Pertl B, Sohda S, Johnson KL, Sekizawa A, Falco VM, Elmes RS, Bianchi DW (2000) Female fetal cells in maternal blood: use of DNA polymorphisms to prove origin. *Hum Genet* 107:28-32
70. Schmorl G (1893) *Pathologisch-anatomische Untersuchungen über Puplerekklampsie.* Vogel, Leipzig
71. Schröder J, de la Chapelle A (1972) Fetal lymphocytes in maternal blood. *Blood* 39:153-161
72. Schröder J, Tilikainen A, de la Chapelle A (1974) Fetal leukocytes in maternal circulation after delivery. *Transplantation* 17:346-360
73. Sekizawa A, Samura O, Zhen DK, Falco V, Bianchi DW (1999) Fetal cell recycling: diagnosis of gender and RhD genotype in the same fetal cell retrieved from maternal blood. *Am J Obstet Gynecol* 181:1237-1242
74. Simpson JL, Elias S (1994) Isolating fetal cells in maternal circulation for prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 14:1229-42 Review
75. Simpson JL, Elias S (1995) Isolating fetal cells in the maternal circulation. *Hum Reprod Update* 1:409-418

76. Smits G, Holzgreve W, Hahn (2000) An examination of different Percoll density gradients and magnetic activated cell sorting (MACS) for the enrichment of fetal erythroblasts from maternal blood. *Arch Gynecol Obstet* 263:160-163
77. Sohda S, Arinami T, Hamada H, Nakauchi H, Hamaguchi H, Kubo T (1997) The proportion of fetal nucleated red blood cells in maternal blood: estimation by FACS analysis. *Prenat Diagn* 17:743-752
78. Steele M, Breg W (1966) Chromosome analysis of human amniotic fluid cells. *Lancet* 1: 383-385
79. Takabayashi H, Kuwabara S, Ukita T, Ikawa K, Yamafuji K, Igarashi T (1995) Development of non-invasive fetal DNA diagnosis from maternal blood. *Prenat Diagn* 15:74-77.
80. Tanke HJ, Oosterwijk JC, Mesker WE, Ouwerkerk van-Velzen MC, Knepfle CF, Wiesmeyer CC, van Ommen GJ, Kanhai HH, Vrolijk J (1996) Detection of 'rare event' fetal erythroblasts in maternal blood using automated microscopy. *Early Hum Dev* 47:89-93
81. Tutschek B, Reinhard J, Kogler G, Wernet P, Niederacher D (2000) Clonal culture of fetal cells from maternal blood. *Lancet* 356:1736-1737
82. Valerio D, Aiello R, Altieri V, Malato AP, Fortunato A, Canazio A (1996) Culture of fetal erythroid progenitor cells from maternal blood for non-invasive prenatal genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 16:1073-1082
83. Valerio D, Altieri V, Antonucci FR, Aiello R (1997) Characterization of fetal haematopoietic progenitors circulating in maternal blood of seven aneuploid pregnancies. *Prenat Diagn* 17:1159-1169
84. van Wijk IJ; Griffioen, S, Tjoa ML, Mulders MA; van Vugt JM, Loke YW, Oudejans CB (2001) HLA-G expression in trophoblast cells circulating in maternal peripheral blood during early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 184: 991-997
85. von Eggeling F, Michel S, Günther M, Schimmel B, Claussen U (1997) Determination of the origin of single nucleated cells in maternal circulation by means of random PCR and a set of length polymorphisms. *Hum Genet* 99:266-270
86. Wachtel SS, Sammons D, Manley M, Wachtel G, Twitty G, Utermohlen J, Phillips OP, Shulman LP, Taron DJ, Muller UR, Koeppen P, Ruffalo TM, Addis K, Porreco R, Murata-Collins J, Parker NB, McGavran L (1996) Fetal cells in maternal blood: recovery by charge flow separation. *Hum Genet* 98:162-166

87. Wagner AF, Wagner AM (1994) The triple screen in prenatal care: not just a simple blood test. *Trends Health Care Law Ethics* 9:33-8 Review
88. Wald NJ, Hackshaw AK (2000) Advances in antenatal screening for Down syndrome. *Clin Obstet Gynaecol* 14:563-580
89. Walknoska J, Conte FA, Grumbach MM (1969) Practical and theoretical implication of fetal/maternal lymphocyte transfer. *Lancet* 1:1119-1122
90. Yu X, Lin CS, Costantini F, Noguchi CT (2001) The human erythropoietin receptor gene rescues erythropoiesis and developmental defects in the erythropoietin receptor null mouse. *Blood* 98:475-7
91. Zheng YL, Carter NP, Price CM, Colman SM, Milton PJ, Hackett GA, Greaves MF, Ferguson Smith MA (1993) Prenatal diagnosis from maternal blood: simultaneous immunophenotyping and FISH of fetal nucleated erythrocytes isolated by negative magnetic cell sorting. *J Med Genet* 30:1051-1056
92. Zheng YL, Demaria M, Zhen D, Vadnais TJ, Bianchi DW (1995) Flow sorting of fetal erythroblasts using intracytoplasmic anti- fetal haemoglobin: preliminary observations on maternal samples. *Prenat Diagn* 15:897-905
93. Zheng YL, Zhen DK, DeMaria MA, Berry SM, Wapner RJ, Evans MI, Copeland D, Williams JM, Bianchi DW (1997) Search for the optimal fetal cell antibody: results of immunophenotyping studies using flow cytometry. *Hum Genet* 100:35-42
94. Zhong XY, Laivuori H, Livingston JC, Ylikorkala O, Sibai BM, Holzgreve W, Hahn S (2001) Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 184:414-419

8 Danksagung

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen haben:

- Allen voran Herrn Prof. Dr. Claussen und Herrn Dr. Ferdinand von Eggeling für die Überlassung der Arbeit und die wissenschaftliche Betreuung.
- Frau Susanne Michel für die gute Zusammenarbeit während der gesamten Arbeit und ihrer Unterstützung bei der Einarbeitung in das Gebiet der nicht-invasiven Pränataldiagnostik.
- Allen Mitarbeitern der Abteilung Molekularbiologie, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Hier möchte ich mich insbesondere bei Herrn Dr. Ernst, Frau Dr. Regine Dahse, Constanze Hoppe und Bettina Schimmel für die gute und geduldige Einweisung in die molekularbiologischen Methoden bedanken.
- Den Mitarbeitern der Abteilung molekulare Zytogenetik (Dr. Thomas Liehr, Anita Heller, Heike Starke und Monika Ziegler), die mich bei der FISH-Diagnostik erfolgreich unterstützt haben.
- Natürlich den fleißigen Korrekturlesern der Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten: Name, Vorname: Hohmann, Harald
Geburtsdatum/-ort: 27.08.1967, Kirchheim unter Teck
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 08/1978-06/1987 Thomas-Morus-Gymnasium, Oelde
Erreichen der Allgemeinen Hochschulreife
am 25.05.1987

Ausbildung: 09/1988-07/1991 Energieelektroniker, Fachrichtung: Betriebstechnik
Ausbildungsbetrieb: Gerresheimer-Glas AG, Düsseldorf

Studium: 10/1992 – 4/1998 **Diplom Biologie**

* *Prüfungsfächer:* *Hauptfächer:* Genetik
Pflanzenphysiologie
3. Biologisches
Fach: Biotechnologie/Mikrobiologie
Nichtbiologisches Nebenfach: Chemie

Diplomarbeit: Molekulargenetische Charakterisierung der
Stationärphase-Mutante *Sinorhizobium meliloti*
SP4

Dissertation: seit 07/1998 wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand),
Institut für Humangenetik und Anthropologie,
Friedrich-Schiller-Universität, Jena

Thema der Doktorarbeit: Nicht-invasive pränatale Diagnostik an fetalen
kernhaltigen Erythrozyten aus mütterlichem Blut

1.1 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Das ist geschehen im Rahmen der Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Diese Arbeit wurde noch nicht als Prüfungsarbeit, bzw. als Dissertation an einer anderen Hochschule eingereicht.

Jena, 09.04.2002

•