

Aus dem Medizinischen Zentrum für Humangenetik der
Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. K.-H. Grzeschik

Pränataldiagnostik der Trisomie 21 durch Mikrosatellitenanalyse

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin
der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Robin Ella
aus Oberhausen

Marburg 2001

Pränataldiagnostik der Trisomie 21 durch Mikrosatellitenanalyse

Angenommen vom Fachbereich HUMANMEDIZIN
der Philipps-Universität Marburg am: 27.9.2001
Dekan: Prof. Dr. R. Arnold
Referent: Prof. Dr. K.-H. Grzeschik
Korreferent: Prof. Dr. S. Schmidt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Down-Syndrom	1
1.2	Postpartale Diagnostik	2
1.2.1	Klinik	2
1.2.2	Zellkultur	2
1.3	Pränatale Diagnostik	3
1.3.1	Invasiv	3
1.3.1.1	Amniozentese	3
1.3.1.2	Chorionzottenbiopsie	4
1.3.1.3	Zervikale Lavage	4
1.3.2	Nicht invasiv	4
1.3.2.1	Tripletest	5
1.3.2.2	Ultraschall	5
1.3.2.3	Fetale Zellen im mütterlichen Blut	5
1.4	Molekulargenetik	6
2	Material und Methoden	9
2.1	Amniozentese	9
2.2	Zytologie	10
2.2.1	Reagenzien	10
2.2.2	Zelllinien	11
2.2.3	Amnionzellkultur	11
2.2.4	Lymphozytenkultur	12
2.2.5	Färbung	13
2.3	DNS Aufschlußverfahren	13
2.3.1	Reagenzien	13
2.3.2	Proteinase K	14
2.3.2.1	Untersuchungsmaterialien	14
2.3.3	Mikrowellen	15
2.4	Polymerase-Kettenreaktion	15
2.4.1	Reagenzien	15
2.4.2	Primer	17
2.4.3	Polymerase	17
2.4.4	Durchführung	18
2.4.5	Kontrolle	18
2.5	Fragmentanalyse	19
2.5.1	Reagenzien	19
2.5.1.1	Fluoreszenzfarbstoffe	19

2.5.2	Denaturierung	20
2.5.3	Kapillarelektrophorese	20
2.5.4	Rohdatenverarbeitung	21
2.6	Vermeidung von Kontaminationen	22
2.7	Durchführung der Blindversuche	23
2.7.1	Kultivierte Lymphozyten	23
2.7.2	Blut	23
2.7.3	Fruchtwasser	23
2.7.3.1	Schemata maternaler Kontaminationen	24
2.7.3.2	Simulation maternaler Kontamination	24
3	Ergebnisse	27
3.1	DNS-Aufbereitung	27
3.1.1	Proteinase K	27
3.1.2	Mikrowellen	27
3.2	PCR	28
3.3	Kapillarelektrophorese	29
3.3.1	Laufparameter	29
3.3.2	Elektropherogramme	29
3.3.2.1	Disomie 21	29
3.3.2.2	Trisomie 21	29
3.3.2.3	Mosaik	30
3.3.2.4	PCR von Lymphozyten aus koaguliertem Blut	30
3.3.2.5	Simulation maternaler Kontamination	31
3.4	Blindversuche	32
3.4.1	Kultivierte Lymphozyten	32
3.4.2	Blut	32
3.4.3	Fruchtwasser	32
4	Diskussion	39
4.1	Auswahl der Marker und Primer	39
4.2	Beurteilung der Blindversuche	40
4.2.1	Kultivierte Lymphozyten	40
4.2.2	Blut	40
4.2.3	Fruchtwasser	41
4.2.3.1	Interpretation der Elektropherogramme	43
4.3	Polymerase-Kettenreaktion	45
4.3.1	Artefakte	45
4.3.2	Ausschluß von Kontaminationen im Labor	46
4.3.3	PCR und Zellkultur	46
4.4	Aussichten	47
5	Zusammenfassung	49
	Literaturverzeichnis	51
	Index	57

Abbildungsverzeichnis

2.1	Amniozentese	9
2.2	Trisomie 21 Panel	17
2.3	Physikalische Karte des Chromosoms 21 mit der Position der verwendeten Marker	18
2.4	6-Carboxyfluoreszein (6-FAM)	20
2.5	Hexachloro-6-Carboxyfluoreszein (HEX)	20
2.6	Tetrachloro-6-Carboxyfluoreszein (TET)	21
2.7	Kontaminationsschemata	25
3.1	Gelelektrophorese mit DNS aus EDTA- und Heparin-Blut	27
3.2	Bedingungen und Ergebnis der DNS-Aufbereitung durch Mikrowellen	28
3.3	Gelelektrophorese der PCR-Produkte der Marker des Trisomie 21-Panels in der DNS einer Kontrollprobe	28
3.4	46, XY	30
3.5	47, XY, +21	30
3.6	46, XX/47, XX, +21	31
3.7	47, XY, +21; koagulierte Probe	31
3.8	Kontaminationssimulation	33
3.9	Rötliche Fruchtwasserprobe, als negativ erkannt	35
3.10	Rötliche Fruchtwasserprobe, falsch negativ	36
3.11	Rötliche Fruchtwasserprobe, falsch positiv	36
3.12	Fruchtwasserprobe, als negativ erkannt	36
3.13	Fruchtwasserprobe, als positiv erkannt	37
3.14	Fruchtwasserprobe, falsch negativ	37
3.15	Fruchtwasserprobe, falsch positiv	37

Tabellenverzeichnis

1.1	Symptome des Down-Syndroms	3
3.1	Ergebnisse der Fruchtwasser Blindstudie	35

1 Einleitung

1.1 Down-Syndrom

1866 beschrieb Langdon Down [15] erstmalig ein Krankheitsbild, welches sich durch ein flaches, breites Gesicht mit schmalen, schrägen Lidspalten, einer kleinen Nase mit breitem Nasenrücken, großen Lippen, einer großen Zunge, hypoplastischer Haut, Anfälligkeit für pulmonale Erkrankungen und einer geringen Lebenserwartung darstellt. Die Betroffenen zeigen Down zufolge praktische Bildbarkeit und ein fröhliches Wesen. Down erkannte den kongenitalen Charakter der Erkrankung, favorisierte aber fälschlich die Tuberkulose als Ursache. Waardenburg [58] nahm 1932 an, daß eine Non-disjunction die Ursache darstellt und forderte Zytogenetiker auf, in diese Richtung Untersuchungen anzustellen. 27 Jahre später gelang es dem französischen Genetiker Lejeune [32], [31] anhand von Fibroblastenkulturen der Fascia lata nachzuweisen, daß das von Down beschriebene Syndrom auf einem überzähligen akrozentrischen Chromosom beruht. Dieses war die erste Chromosomen-Aberration, welche beim Menschen entdeckt worden ist.

Das überzählige akrozentrische Chromosom konnte als Chromosom 21 identifiziert werden. Die Trisomie 21 ist eine der häufigsten Ursachen für eine mentale Retardierung und tritt bei etwa 1:500 Lebendgeburten auf. Dabei steigt die Inzidenz mit zunehmendem Alter der Mutter exponentiell an, so daß bei 20jährigen Schwangeren ein Risiko von 1:1 500 und bei 45jährigen ein Risiko von 1:30 besteht [51].

Ursächlich handelt es sich vor allem um die Folge einer Non-disjunction des Chromosoms 21 in der mütterlichen Meiose. Chromosomale Fehlverteilungen der väterlichen Gameten spielen nur eine untergeordnete Rolle [2], [28]. Spezifische mutagene Einflüsse, welche zur Trisomie 21 führen, sind nicht bekannt.

Mit 95 % der Fälle kommen freie Trisomien 21 am häufigsten vor [37]. Dabei sind Fehlverteilungen in der Meiose I und in der Meiose II möglich. Im idealisierten Fall, bei dem ein Crossing-over in der Prophase I der Meiose I nicht vorkommt, führt eine Non-disjunction in der Meiose I der weiblichen Gameten nach einer Fertilisation zu drei unterschiedlichen Chromosomen 21, von denen zwei mütterlich sind. Dahingegen hat die Fertilisation eines weiblichen Gameten, in dem eine Non-disjunction in der Meiose II stattgefunden hatte, drei Chromosomen 21 zur Folge, von denen zwei mütterlich und identisch sind. Das Verhältnis des Vorkommens einer Fehlverteilung in der Meiose I zur Meiose II beträgt etwa 70:30 [40], [4].

Translokationstrisomien 21 treten in etwa 4 % aller Trisomien 21 auf. Unter diesen bilden die Robertson'schen Translokationen $t(14q21q)$ und $t(21q21q)$

die größte Gruppe [37]. Diese können zum einen de novo auftreten [8], zum anderen aber auch auf einer balancierten zentrischen Fusion bei einem klinisch unauffälligen Elternteil beruhen [62]. Eine partielle Trisomie 21 des Kindes kann hingegen durch eine balancierte reziproke Translokation bei einem Elternteil hervorgerufen werden [44].

Neben den hier erwähnten häufigsten Fällen einer Trisomie 21 treten mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 1% Mosaik [10], [37] und in Einzelfällen auch freie partielle Trisomien [39], [3], [61] auf. Diese selteneren Formen der Trisomie 21 führen nicht in jedem Fall zum klinischen Erscheinungsbild des Down-Syndroms.

1.2 Postpartale Diagnostik

1.2.1 Klinik

Postpartal steht primär die klinische Diagnose im Vordergrund, welche bei Verdacht durch Laboruntersuchungen verifiziert werden kann. Die klinische Diagnose ist nicht immer einfach oder eindeutig zu stellen, da jedes einzelne der vielen Symptome, welche das Down-Syndrom ausmachen, für sich genommen auch außerhalb der Trisomie 21 vorkommen kann. Jackson [25] hat einen diagnostischen Index mit 25 Symptomen (Tab. 1.1) aufgestellt, der den Arzt bei der Diagnosestellung unterstützt. Zehn der Symptome sind hervorgehoben, um auf deren besonderen diskriminatorischen Wert hinzuweisen. Auffällig ist hierbei, daß Merkmale wie Epikanthus oder die Vierfingerfurche nicht zu den besonders aussagekräftigen Symptomen zählen, obwohl diese oft den Anlaß für eine Verdachtsdiagnose geben.

Andere Autoren weisen noch auf charakteristische Dermatoglyphen der Fingerbeeren [45] und auf Keratokonus, Linsentrübung [36] und Duodenalstenose [38] hin, welche mit unterschiedlich hoher Inzidenz das Krankheitsbild des Betroffenen prägen. Nach Schaefer et al. [49] haben Personen mit einer Trisomie 21 auch ein 20 mal höheres Risiko, an einer akuten Leukämie zu erkranken.

Die Trisomie 21 wird durch eine hohe Rate von Herzfehlbildungen geprägt, welche bis vor kurzem noch den entscheidenden limitierenden Faktor in der Lebenserwartung darstellten. Patienten, welche jetzt etwa 25 Jahre alt sind, können aufgrund einer Dekompensation ihres Shunt-Viciums eine Eisenmenger-Reaktion erleiden, da viele Herzfehler heute zwar in den ersten Lebensmonaten operabel sind, vor 25 Jahren aber wegen des hohen Operationsrisikos nicht angegangen worden sind.

Es besteht außerdem eine höhere Wahrscheinlichkeit für Alzheimersche neurodegenerative Veränderungen [6]. Die Alzheimersche Krankheit wird besonders durch die gestiegene Lebenserwartung der Betroffenen heute häufiger beobachtet.

1.2.2 Zellkultur

Bei Neugeborenen mit Verdacht auf das Down-Syndrom und somit auch auf eine Trisomie 21 wird eine Karyotypisierung vorgenommen. Zur Durchführung

Tabelle 1.1: 25 Symptome des Down-Syndroms nach Jackson et al. 1976.
Die 10 Hauptsymptome sind hervorgehoben.

Brachycephalus
lateral ansteigende Lidachsen
Nystagmus
flache Nasenwurzel
schmaler Gaumen
Klinodaktylie V
muskulärer Hypotonus
Sandalenlücke
Einfaltung der Ohrmuschel
kurzer Hals
Epikanthus
Blepharitis, Konjunktivitis
Brushfield-Flecken
ständig geöffneter Mund
Zahnveränderungen
herausragende Zunge
Lingua plicata
hoher Gaumen
Nackenfalte
kurze, breite Hände
Brachydaktylie V
Vierfingerfurche
kongenitaler Herzfehler
Herzgeräusch
ligamentäre Hyperelastizität

benötigt man nicht mehr wie noch 1959 Proben der Fascia lata [32], sondern kann mit Lymphozyten aus Heparin-Blut arbeiten. Das Ergebnis liegt nach etwa einer Woche vor.

1.3 Pränatale Diagnostik

1.3.1 Invasiv

1.3.1.1 Amniozentese

Laboruntersuchungen auf eine Trisomie 21 werden pränatal bei Spätgebärenden und Patientinnen mit erhöhtem Risiko auf eine chromosomale Aberration des Kindes in der Regel in Form von Zellkultur mit nachfolgender Karyotypisierung durchgeführt. Als Ausgangsmaterial werden aus einer Amniozentese gewonnene Amnionzellen eingesetzt. [55]

Die Karyotypisierung nimmt, bedingt durch die damit verbundene Zellkultur

etwa zwei Wochen in Anspruch. Damit einher geht auch eine späte Diagnosestellung, die sich besonders in der fortgeschrittenen Schwangerschaft als eine große Belastung für die Schwangere und daher als ein schwerwiegender Nachteil darstellt. Aufgrund der durch die Amniozentese entstehenden Gefahren, wie des induzierten Aborts (0,5 %–1 % im 2. Trimester [33], [63], 2,8 % zwischen der 11. und 14. Schwangerschaftswoche [20]), vorzeitigen Blasensprungs mit Fruchtwasserabgang, der Verletzung des Feten, vaginalen Blutungen und Infektionen, geht dem Eingriff immer eine sorgfältige Risikoabwägung voran.

1.3.1.2 Chorionzottenbiopsie

Die transzervikal durchgeführte Chorionzottenbiopsie (CVS) [7] kann zu einem früheren Stadium der Schwangerschaft als die Amniozentese angewandt werden und benötigt keine Zellkultur. Diese kann jedoch zur Sicherung des Ergebnisses an die zytologische oder biochemische Analyse angeschlossen werden. CVS hat aber den Nachteil, daß die durch den Eingriff hervorgerufene Abortrate von 1 %–6 %, mit erhöhtem Abortrisiko zu Lasten älterer Mütter und früher Schwangerschaften, relativ hoch liegt [5], [26]. Weiterhin kann das Biopsat mütterliche Fibroblasten oder kindliches Material mit chromosomalen Aberrationen enthalten, welche im Rahmen der natürlichen Selektion zu einem späteren Zeitpunkt der Schwangerschaft von selbst untergegangen wären.

Neben der herkömmlichen Chromosomenanalyse kann im Rahmen der CVS oder Amniozentese auch die „Fluorescence in situ hybridisation“ (FISH) [41] durchgeführt werden. Hierbei werden Chromosomen oder Teile von Chromosomen mit spezifischen Fluoreszenzmarkern versehen und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Diese Methode stellt hohe Anforderungen an den Untersucher, da sich z. B. Chromosomen überlappen können und bei nativer FISH die Möglichkeit besteht, daß Chromosomen mütterlicher Zellen mit angefärbt werden.

1.3.1.3 Zervikale Lavage

Mittels zervikaler Lavage können fetale Trophoblastenzellen gewonnen werden. Hierzu werden etwa 5 ml physiologischer Kochsalzlösung langsam durch die Cervix uteri gespritzt und danach wieder in die Spritze aufgesaugt. Mit dieser Methode gelang es Adinolfi et al. [1] Zellen zu gewinnen, die mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) einer Chromosom 21-spezifischen Region zum Teil als kindlich erkannt werden konnten. Aussagen zur Ploidie konnten nicht gemacht werden.

Auch dieses noch relativ neue Verfahren sollte nicht unkritisch benutzt werden, da auch schon über einen möglichen Zusammenhang zwischen zervikaler Lavage und Extremitätenmißbildung berichtet worden ist. [9]

1.3.2 Nicht invasiv

Aufgrund des gesundheitlichen Risikos für Mutter und Embryo bzw. Fetus durch invasive diagnostische Maßnahmen, werden verschiedene Ansätze verfolgt, nicht-invasiv eine Trisomie 21 zu diagnostizieren.

1.3.2.1 Tripletest

Zur Durchführung des Tripletests werden im Serum der Schwangeren Östriol, α -Fetoprotein (aus Leber, Gastrointestinaltrakt und Dottersack des Feten) und β -HCG¹ (aus dem Synzytiotrophoblasten) bestimmt. Die erhaltenen Werte werden in Relation zu Vergleichswerten von Schwangeren der exakt gleichen biologischen Schwangerschaftswoche gesetzt. Das Ergebnis dieses Tests gibt oft Anlaß für eine weitergehende Fruchtwasseruntersuchung. Es muß aber beachtet werden, daß trotz der Vorteile, die dieser Test bietet, das Ergebnis nicht spezifisch für die Trisomie 21 ist. Weiterhin wurden bei einer Studie an über 5000 Schwangeren [64] nur 5 von 6 Trisomien 21 gefunden und ein positiver Vorhersagewert von weniger als 0,02 erreicht.

1.3.2.2 Ultraschall

Eine weitere nichtinvasive Form der pränatalen Trisomie 21 Diagnose stellt ab dem zweiten Trimester die ultraschallgeführte Suche eines Hautödems der Nackenfalte, einer Pyelektasie oder eines kurzen Humerus' [57] dar. Diese Methode ergibt aber auch bei geübten Untersuchern sowohl falsch positive als auch falsch negative Ergebnisse. Durch den dreidimensionalen fetalen Ultraschall [35], welcher auch Aussagen über die Facies des Kindes ermöglicht, soll die Zuverlässigkeit der Diagnostik erhöht werden; es zeigt sich aber eine hohe Anfälligkeit für Bewegungsartefakte.

1.3.2.3 Fetale Zellen im mütterlichen Blut

Trophoblasten Der Nachweis von mehrkernigen Trophoblastenzellen im mütterlichen Kreislauf wurde 1893 erstmalig von Kark und Schmorl [27] durch histologische Untersuchungen von Lungenkapillaren bei puerperaler Eklampsie erbracht.

Sargent et al. [48] weisen darauf hin, daß von 18 untersuchten präeklampsischen Frauen 16 Trophoblasten im Blut der Vena uterina aufwiesen, aber nur eine Trophoblasten im peripheren Blut zeigte. Die Arbeitsgruppe durchsuchte dabei Blutausstriche mit Hilfe von trophoblastenspezifischen monoklonalen Zytokeratin-Antikörpern und führte auf den positiven Ausstrichen eine FISH durch. Weitere Untersuchungen zeigten, daß bei regelrechten Schwangerschaften keine Trophoblasten im Blut nachzuweisen sind. Aufgrund der Seltenheit des Vorkommens dieser Zellen im peripheren Blut kommen sie nicht für eine Routinediagnostik in Frage.

Erythroblasten 1991 diagnostizierten Price et al. [42] prospektiv die erste fetale Aneuploidie (47, XY, +18) durch Isolation fetaler Zellen aus mütterlichem Blut. Hierzu wurden flußzytometrisch Glykophorin-A- und Transferrinrezeptor (CD71)-positive Zellen ausgewählt und einer FISH für Chromosom Y, X, 18 und 21 unterzogen. Bei 8,7% der Nuclei zeigte sich ein einfaches Hybridisierungssignal für Chromosom Y und auf 8,5% der Nuclei zeigte sich ein dreifaches Hy-

¹Humanes Choriongonadotropin

bridisierungssignal für Chromosom 18. Die Diagnose wurde später durch zytogenetische Untersuchung von Chorionzotten und Abortgewebe bestätigt. Trotz dieses vielversprechenden Resultates weisen Price und Mitarbeiter darauf hin, daß bei der Auswertung auch subjektive Interpretation eine Rolle gespielt hat.

Ein Jahr später gelang es Elias et al. [21] mit der gleichen Methode bei einer 42jährigen Primipara erstmalig prospektiv eine Trisomie 21 des Feten zu diagnostizieren. Es war hierbei wegen der geringen Anzahl zur Verfügung stehender Nuclei nicht möglich, eine X- oder Y-Chromosom-Bestimmung durchzuführen. 74% der untersuchten Nuclei zeigten drei Hybridisierungssignale für Chromosom 21.

Wachtel et al. [59] haben gezeigt, daß mittels einer PCR-basierenden Methode durch die Untersuchung von mütterlichem Blut 15 von 23 Feten dem richtigen Geschlecht zugeordnet werden konnten. Nach flußzytometrischer Sortierung konnten 17 von 18 Proben dem Geschlecht des Feten zugeordnet werden.

Von Eggeling et al. [19] haben aufgrund des geringen Anteils von fetalen Zellen im mütterlichen Blut versucht, isolierte Erythroblasten zu kultivieren, fanden aber in den Klonen nur mütterliches Material. Entweder wurden nur mütterliche Zellen ausgewählt oder die Kultivierung von fetalen Erythroblasten stellt besondere Anforderungen an die Kulturbedingungen.

Leukozyten Schon 1958 [46] wurden im Blut schwangerer Frauen Leukozyten-Antikörper nachgewiesen, so daß vermutet werden kann, daß fetale Leukozyten zu einem geringen Anteil auch im mütterlichen Blut zirkulieren. 1992 zeigten Wessman, Ylinen und Knuutila, daß eine nicht-radioaktive in situ Hybridisierung mit der biotinilierten Y-spezifischen Sonde pY431 Y-Chromosomen auf Granulozyten und Lymphozyten im mütterlichen Blut nachweisen kann. Sieben von elf schwangeren Frauen zeigten auf Granulozyten und Lymphozyten Y-spezifische Signale und gebaren je einen Jungen. Drei von 11 Frauen zeigten kein Y-spezifisches Signal und gebaren ein Mädchen. Eine Frau zeigte ein Y-spezifisches Signal auf einem Lymphozyten, gebar aber ein Mädchen.

1.4 Molekulargenetik

1953 klärten Watson und Crick in Ihrem Artikel "A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid" [60] die Struktur der Desoxyribonukleinsäure auf, welche das menschliche Genom trägt. Sie erkannten damals schon die Bedeutung dieser Struktur für die Replikation der DNS: "It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material". Dieser Kopiermechanismus ist aber nicht auf den Organismus beschränkt; so hatte Kary Mullis 1983 die Idee zur Polymerase-Kettenreaktion (PCR), welche 1985 von Saiki et al. [47] erstmalig veröffentlicht wurde und die bis dahin unerreichte Möglichkeit bot, in kurzer Zeit aus geringstem Ausgangsmaterial praktisch beliebig viel identische DNS zu erzeugen.

Von Eggeling et al. [18] haben einen Ansatz zur Diagnostik der Trisomie 21 entwickelt, bei der mittels einer quantitativen PCR sowohl ein Fragment definierter Länge vom Chromosom 21, als auch vom Chromosom 12 amplifiziert

wird. Im Falle einer Disomie 21 sollten die Mengen der amplifizierten Fragmente im Verhältnis 1:1 zueinander stehen und im Falle einer Trisomie 21 im Verhältnis 3:2.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Wege für eine, nach Möglichkeit qualitative, auf PCR basierende Methode zu finden, welche in der Lage sein soll, innerhalb von ein bis zwei Tagen eine zuverlässige prä- und postnatale Diagnose über eine Disomie bzw. Trisomie 21 zu stellen. Diese Methode soll an dem anerkannten und etablierten Standard, welcher durch die Karyotypisierung gegeben ist, gemessen werden. Zur Durchführung dieser Aufgabe gilt es, geeignete Zellaufschlußverfahren zu finden und PCR-Systeme für Chromosom 21-spezifische Mikrosatelliten zu etablieren. Die Produkte dieses Verfahrens sollen durch computergestützte Kapillarelektrophorese veranschaulicht werden. Zeigt sich bei Vorversuchen an verschiedenen Materialien die prinzipielle Eignung dieser Technik, so soll sie zur Aufdeckung von möglichen Fehlerquellen und zur Erprobung auf praktische Anwendbarkeit durch Blindversuche validiert werden. Hierzu sollen aus dem Bereich der postnatalen Diagnostik prospektiv Lymphozyten (Ella et al. [22]) und aus dem Bereich der pränatalen Diagnostik prospektiv Amnionzellen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Amniozentese

Ab der 15.–17. Schwangerschaftswoche enthält die Amnionhöhle etwa 160 ml Fruchtwasser. Dies erlaubt bei gegebener Indikation etwa 12–24 ml Fruchtwasser abzunehmen und zytologischen, biochemischen, mikroskopischen, optischen oder molekulargenetischen Untersuchungen zuzuführen.

Vor der transabdominalen Amniozentese durch einen Gynäkologen wird sonographisch eine Vorderwandplazenta ausgeschlossen. Dann wird eine Desinfektion und gegebenenfalls eine lokale Anästhesie der Einstichstelle durchgeführt und unter sonographischer Kontrolle mit einer Mandrin geführten, dünnen Nadel Fruchtwasser aspiriert. Abbildung 2.1 zeigt eine schematische Darstellung der anatomischen Verhältnisse im 3. Schwangerschaftsmonat. Zur Veranschaulichung sind die Decidua parietalis und capsularis, sowie Chorion und Amnion als noch nicht miteinander verwachsen dargestellt.

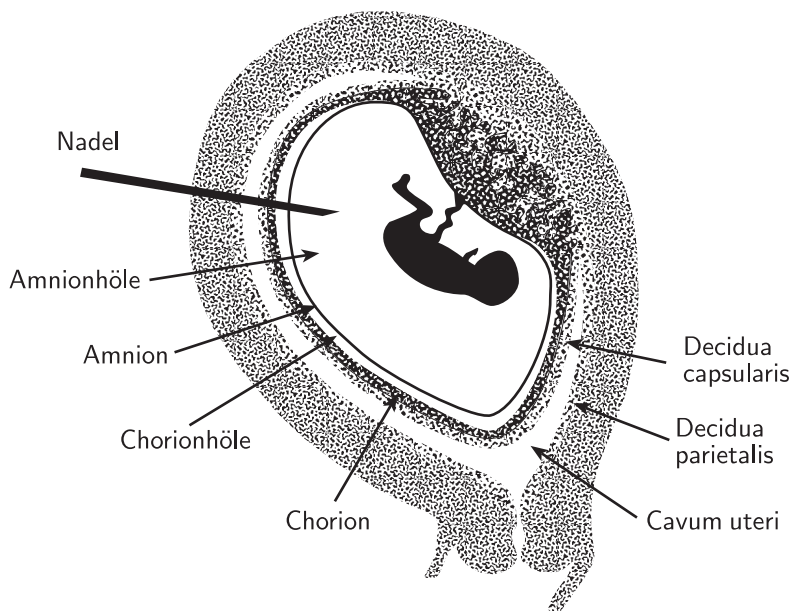


Abbildung 2.1: Amniozentese

2.2 Zytologie

2.2.1 Reagenzien

AmnioMax Gebrauchslösung:	90 ml Flüssigmedium, Gibco 15 ml Supplement, Gibco
0,9%ige NaCl-Lösung:	9 g Tablette Natriumchlorid, Merck 1 l aqua dest.
Colcemidlösung (unsteril):	5 mg Colcemid-Pulver (unsteril), Gibco 200 ml 0,9%ige NaCl-Lösung
Colcemidlösung (steril), Boehringer	
Ethanol Verdünnungsstufen:	100, 95, 70 vol% Ethanol z. A., Merck 0, 5, 30 vol% aqua dest.
Xylol 99 %, Roth	
Carnoy's Fixativ:	1 Teil Essigsäure 99 %, Riedel-de Haen 3 Teile Methanol zur Analyse, Merck
Entfärbefixativ:	45 % Essigsäure 99 %, Riedel-de Haen 55 % Methanol zur Analyse, Merck
KCl-Lösung 0,075 M:	5,6 g KCl, reinst, Merck 1 l aqua dest.
PBS:	10 ml PBS 10×, Gibco 90 ml steriles Wasser ggf. 2,5 g/ml Amphotericin B, Gibco ggf. 100 IU/ml Penicillin ggf. 100 µg/ml Streptomycin
Trypsin-EDTA, Gibco	
Tri-Natrium-Dihydrat 1 %:	10 g Tri-Natrium-Dihydrat, Merck 1 l aqua dest.
Sörensenpuffer 1/15 M, pH 6,8:	11,867 g Na ₂ HPO ₄ , Roth 9,073 g KH ₂ PO ₄ , Merck
Giemsa Gebrauchslösung 6 %:	6 ml Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblaulösung, Merck 94 ml Sörensen Puffer
Kulturmedium für Amnionzellen:	75 % F12, Gibco 25 % FKS, Boehringer 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin

Kulturmedium für Lymphozyten:	75 ml RPMI, Gibco 25 ml FKS, Boehringer 0,4 ml Phytohämagglutinin P, Difco 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Bacto-Trypsin Stammlösung:	Bacto-Trypsin Pulver, Difco 10 ml steriles Wasser à 0,7 ml portionieren
Bacto-Trypsin Gebrauchslösung:	0,7 ml Bacto-Trypsin Stammlösung 50 ml 0,9%ige NaCl-Lösung

2.2.2 Zelllinien

DNS aus folgenden Lymphoblasten-Zelllinien (Phänotyp der Träger: Down-Syndrom) des NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository, Camden, New Jersey, wurde eingesetzt:

Zelllinie	Karyotyp
GM04927 D	47, XY, +21
GM01921 B	47, XY, +21, inv(9)(pter>p11::q13>p11::q13>qter)mat, t(8;14)(8pter>8q13::14q13>14qter;14pter>14q13::8q13>8qter)

2.2.3 Amnionzellkultur

Parallel zu den molekulargenetischen Untersuchungen des Fruchtwassers wurden dieselben Proben an der Universitäts-Frauenklinik in Ulm der herkömmlichen, zytogenetischen Methode der Amnionzellkultur mit anschließender Karyotypisierung unterzogen. Dies erlaubte einen Vergleich der neuen Methode mit den Ergebnissen der etablierten Analyse, welche die endgültigen Ergebnisse über Tri-, Disomien oder andere chromosomale Aberrationen lieferte.

Kulturverfahren:

Fruchtwasserprobe 10 min (1000 U/min, Hettich) zentrifugieren
Überstand bis auf 0,5 ml abpipettieren
Sediment in Kulturflasche mit 4 ml AmnioMax geben
2 d ruhen lassen
2 ml Medium dazugeben
alle 3 d 4 ml abpipettieren und 4 ml Medium zugeben
nach einer Woche Wachstum kontrollieren
— Bei V. a. Infektion Medium 10 min gegen 5 ml PBS + Antibiose wechseln
am Tag nach letztem Mediumwechsel:
0,2 ml sterile Colcemidlösung zugeben
2 h einwirken lassen
Medium abpipettieren
5 ml PBS zugeben, 10 min einwirken lassen, abpipettieren

2 ml Trypsin-EDTA 10 min einwirken lassen
 2 ml Medium dazu geben
 10 min bei 1000 U/min zentrifugieren (Hettich)
 Überstand abpipettieren
 auf Rüttler mit 8 ml Tri-Natriumcitrat-Lösung auffüllen
 10 min 37 °C Wasserbad
 10 min bei 800 U/min zentrifugieren (Heraeus)
 Überstand abpipettieren
 auf Rüttler mit 8 ml Fixativ auffüllen
 20 min Gefrierfach
 zentrifugieren, abpipettieren, Fixativ auffüllen
 zentrifugieren, abpipettieren, Fixativ auffüllen
 zentrifugieren, bis auf 1 ml abpipettieren
 Sediment mit Pasteurpipette aufwirbeln und aufsaugen
 Sediment auf drei kalte Objektträger auftropfen
 Objektträger trocknen lassen
 Suspension mit Fixativ auffüllen und einfrieren

Für die molekulargenetische Untersuchung des Fruchtwassers wurde nach dem initialen Zentrifugieren ein Aliquot von 100 μl des Sedimentes in einem 1,5 ml Röhrchen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Der Median der Zellkonzentration im Aliquot lag bei fünf unter der Zählkammer gezählten Proben bei $70\ \mu\text{l}^{-1}$. Die Variationsbreite lag bei $402,5\ \mu\text{l}^{-1}$.

2.2.4 Lymphozytenkultur

Lymphozytenkulturen wurden von mir in den Laboren von Herrn Professor Passarge in Essen und Frau Professor Gödde in Recklinghausen durchgeführt.

Das eingesetzte Blut darf nicht geronnen sein, da dann die Vermehrungsfähigkeit der Lymphozyten nicht mehr gegeben ist. Blut Erwachsener und Neugeborener kann auf gleiche Weise bearbeitet werden.

Kulturverfahren:

Blutprobe 30 min sedimentieren lassen
 0,5 ml Heparin-Blut in das Kulturmedium pipettieren
 72–96 h im Brutschrank bei 37 °C kultivieren
 0,2 ml Colcemidlösung (unsteril) dazugeben
 1 h bei 37 °C inkubieren
 Kulturmedium in Röhrchen pipettieren
 15 min bei 120 g (\cong 800 U/min, Heraeus) zentrifugieren
 bis auf 1 ml abpipettieren
 unter Rütteln mit 37 °C warmer KCl-Lösung auf 10 ml auffüllen
 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubieren
 4 \times $\left\{ \begin{array}{l} 10\text{ min bei } 120\text{ g zentrifugieren} \\ \text{bis auf } 1\text{ ml abpipettieren} \\ \text{mit eiskaltem Fixativ unter Rütteln auf } 10\text{ ml auffüllen} \\ 20\text{ min auf } -20\text{ }^{\circ}\text{C abkühlen} \end{array} \right.$
 bis auf 1 ml abpipettieren

Sediment mit Pasteurpipette aufwirbeln und aufsaugen
 Sediment auf drei kalte Objektträger auftropfen
 Objektträger trocknen lassen
 Suspension mit Fixativ auffüllen und einfrieren

2.2.5 Färbung

Zur Kontrolle der Zellkultur und zum Aufsuchen geeigneter Mitosen wurde mindestens eins der getrockneten Präparate einer Azur-Eosin-Methylenblaufärbung nach Giemsa unterzogen. Dazu wurde das Präparat 15 min in die zuvor frisch angesetzte Giemsa Lösung getaucht.

Entfärbt werden konventionell gefärbte Präparate nach Abspülen des Öls vom Objektträger auf folgende Weise:

durch absteigende Ethanol-Reihe ziehen: 100 %, 95 %, 70 %
 mit fließendem Wasser abspülen
 mit Entfärb-Fixativ überschichten
 mit fließendem Wasser abspülen.

Dies wurde 3–4 mal wiederholt, bis die Präparate sauber waren. Danach ließ man die Objektträger schräg trocknen.

Für die G-Bandenfärbung mußten die Präparate vorher 2 h auf einer 80 °C Heizplatte getrocknet werden. Danach wurden sie bei guter Zelldichte 20 s in Trypsinlösung gehalten und dann 2 mal in kalte NaCl-Lösung getaucht. Daraufhin wurden die Objektträger 8 min in Giemsa gefärbt.

2.3 DNS Aufschlußverfahren

2.3.1 Reagenzien

Proteinase K, QIAmp

Puffer AL, QIAmp

Puffer AW, QIAmp

Ethanol z. A., Merck

Isopropanol 99 %, Sigma

PBS^{−−} Stammlösung A: 80 g NaCl, Merck
 2 g KCl, Merck
 1 l aqua dest.

PBS^{−−} Stammlösung B: 29,98 g Na₂HPO₄, Roth
 2 g KH₂PO₄, Merck
 1 l aqua dest.

PBS^{−−} Gebrauchslösung: 100 ml Lösung A
 100 ml Lösung B
 1 l aqua dest.

2.3.2 Proteinase K

Zur DNS-Isolierung wurde ein auf Proteinase K [16] basierendes Aufschlußverfahren eingesetzt. Dies geschah unter Zuhilfenahme des QIAmp Blood Kits. Anfangs wurde Isopropanol eingesetzt, welches aber später aufgrund eines besseren DNS Ertrages gegen Ethanol ausgetauscht wurde.

Die folgende Arbeitsanweisung konnte ohne Änderung für Blut, Fruchtwasser, fixierte, kultivierte Lymphozyten und kultivierte Lymphoblasten eingesetzt werden, da sie auch bei unterschiedlichen Materialien gleich gute Ergebnisse erzielte.

ca. 50–200 μ l Probe mit PBS^{––} auf 200 μ l aufstocken
 in 1,5 ml Gefäß überführen
 + 25 μ l Proteinase K
 + 200 μ l Puffer AL
 5 s vortexen
 10 min bei 70 °C inkubieren, kurz zentrifugieren
 + 210 μ l Ethanol
 2 s vortexen, kurz zentrifugieren
 in Zentrifugationssäule mit 2 ml Gefäß überführen
 1 min bei 8000 U/min zentrifugieren
 Filtrat in 2 ml Gefäß verwerfen, Säule in frisches 2 ml Gefäß überführen
 + 500 μ l Puffer AW (Waschen)
 1 min bei 8000 U/min zentrifugieren
 Filtrat in 2 ml Gefäß verwerfen, Säule in frisches 2 ml Gefäß überführen
 + 500 μ l Puffer AW
 1 min bei 8000 U/min zentrifugieren
 2 min bei 14000 U/min zentrifugieren
 Filtrat in 2 ml Gefäß verwerfen, Säule in frisches 1,5 ml Gefäß überführen
 in die Säule 50 μ l 70 °C heißes Wasser geben
 6 min bei 70 °C inkubieren
 1 min bei 8000 U/min zentrifugieren

2.3.2.1 Untersuchungsmaterialien

Blut Von EDTA- oder Heparin-Blut konnten ohne weitere Vorbereitung 200 μ l für die DNS-Isolierung eingesetzt werden.

Fruchtwasser Natives Fruchtwasser wird nach Abschnitt 2.2.3 abzentrifugiert, der Überstand bis auf 0,5 ml abpipettiert und das Sediment aufgewirbelt. 50 μ l dieser Lösung wurden zusammen mit 150 μ l PBS^{––} zur DNS-Isolierung eingesetzt.

Fixierte, kultivierte Lymphozyten Um fixierte Lymphozytenkulturen für die Proteinase K-basierende DNS-Isolierung vorzubereiten, mußte darauf geachtet

werden, daß beim Waschen der Zellen die Kerne nicht platzen. Die Proben wurden bei 1200 U/min 5 min vorsichtig zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert und 1 ml PBS⁻⁻ dazugegeben. Daraufhin wurde erneut bei 1200 U/min 5 min zentrifugiert und der Überstand an PBS⁻⁻ abpipettiert. Schließlich wurde noch 1 ml PBS⁻⁻ hinzugefügt und der Bodensatz in diesem Puffer aufgewirbelt. Zur DNS-Isolierung wurden 200 µl dieser Lösung eingesetzt.

Lymphoblasten-Zelllinien Auch Lymphoblasten-Zelllinien wurden zweimal bei 1200 U/min 5 Minuten lang abzentrifugiert und mit jeweils 1 ml PBS⁻⁻ gewaschen. Der Bodensatz wurde im Puffer aufgewirbelt und 200 µl dieser Lösung zur DNS-Isolierung eingesetzt.

2.3.3 Mikrowellen

An Hand von heparinisierten Blutproben wurde überprüft, ob auch eine wesentlich vereinfachte Form der DNS-Aufbereitung, welche direkt im PCR Reaktionsgefäß durchgeführt wird, durch Mikrowellen möglich ist. Dazu wurden Proben mit 3, 1 und 0,5 µl Blut eine halbe Minute lang Mikrowellenstrahlung ausgesetzt. Weitere Proben mit 3, 1 und 0,5 µl wurden 2 bzw. 5 min den Mikrowellen ausgesetzt. Zum Ausschluß von Verunreinigungen wurde eine Probe mit 5 µl Wasser bei der 5 min langen Bestrahlung mitgeführt. An diesen 10 Proben wurden daraufhin, zusammen mit einer 0,5 µl DNS-Positivkontrolle aus Blut, in den selben Gefäßen eine PCR vorgenommen. In dieser PCR wurde der Marker D21S11 untersucht.

2.4 Polymerase-Kettenreaktion

2.4.1 Reagenzien

PCR-Reaktionspuffer 10× (pH 8,3):	100 mM Tris-HCl 500 mM KCl 15 mM MgCl ₂
TaqStart Stammlsg. 7 µM; 1,1 µg/µl:	Taq-Polymerase Antikörper, Clontech 50 mM KCl 10 mM Tris HCl (ph 7,0) 50 % Glycerin
Taq + Taq-Antikörper:	50 % 0,25 µM Taq-Polymerase 50 % 7 µM Taq-Polymerase Antikörper 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
PCR-Mastermix:	1,5 µl 10× Reaktionspuffer 0,15 µl 10 µM dNTP, Pharmacia 0,15 µl Taq + Taq-Antikörper 3,2 µl steriles Wasser 5 µl Primerpaar (2 pM/ml)
Ansatz für Fruchtwasser-DNS:	10 µl Mastermix 5 µl DNS

Ansatz für Lymphozyten-DNS:	10 μ l Mastermix 0,5 μ l DNS 4,5 μ l steriles Wasser
2%iges Agarosegel:	3 g Elektrophoresis Grade Agarose 7,5 ml 20 μ g/ml Ethidiumbromidlösung 1 \times TBE ad 150 ml
100 bp Längenstandard	
Gelladepuffer 10 \times :	5 ml 1 M Tris, pH 8 $\hat{=}$ 100 mM 1 ml 0,5 M EDTA $\hat{=}$ 10 mM 25 ml 100%iges Glycerin $\hat{=}$ 50 % Bromphenolblau 1 Messerspitze Wasser ad 50 ml
D21S11:	Heterozygotenfrequenz: 0,9 Nukleotidrepeat: Tetra Allele: 12 zwischen 172–264 bp Fluoreszenzfarbstoff: 6-Carboxyfluoreszein (6-FAM) F-Primersequenz: 5'-GTGAGTCAATTCCCCAAG-3' R-Primersequenz: 5'-GTTGTATTAGTCAATGTTCTCC-3'
D21S1435:	Heterozygotenfrequenz: 0,8 Nukleotidrepeat: Tetra Allele: 7 zwischen 163–187 bp Fluoreszenzfarbstoff: Hexachloro-6-Carboxyfluoreszein (HEX) F-Primersequenz: 5'-CCCTCTCAATTGTTTGTCTACC-3' R-Primersequenz: 5'-GCAAGAGATTTTCAGTGCCAT-3'
D21S1437:	Heterozygotenfrequenz: 0,933 Nukleotidrepeat: Tetra Allele: 8 zwischen 107–143 bp Fluoreszenzfarbstoff: 6-Carboxyfluoreszein (6-FAM) F-Primersequenz: 5'-ATGTACATGTGTCTGGGAAGG-3' R-Primersequenz: 5'-TTCTCTACATATTTACTGCCAACA-3'
D21S1440:	Heterozygotenfrequenz: 0,625 Nukleotidrepeat: Tri Allele: 4 zwischen 157–166 bp Fluoreszenzfarbstoff: Tetrachloro-6-Carboxyfluoreszein (TET) F-Primersequenz: 5'-GAGTTTGAAAATAAAGTGTCTGC-3' R-Primersequenz: 5'-CCCCACCCCTTTTAGTTTTA-3'
D21S1446:	Heterozygotenfrequenz: 0,786 Nukleotidrepeat: Tetra Allele: 8 zwischen 209–227 bp Fluoreszenzfarbstoff: Tetrachloro-6-Carboxyfluoreszein (TET) F-Primersequenz: 5'-ATGTACGATACGTAATACTTGACAA-3' R-Primersequenz: 5'-GTCCCAAAGGACCTGCTC-3'

2.4.2 Primer

Für diese Arbeit wurde ein Panel von fünf Primerpaaren eingesetzt, welche für einen hoch-polymorphen Tri- und vier hoch-polymorphe Tetranukleotidrepeatmarker auf Chromosom 21 spezifisch sind. Die Allele dieser Marker liegen zwischen 100 und 270 Basenpaaren. Abbildung 2.2 zeigt die fünf untersuchten Marker und die zu erwartenden Größen der dazugehörigen Allele.

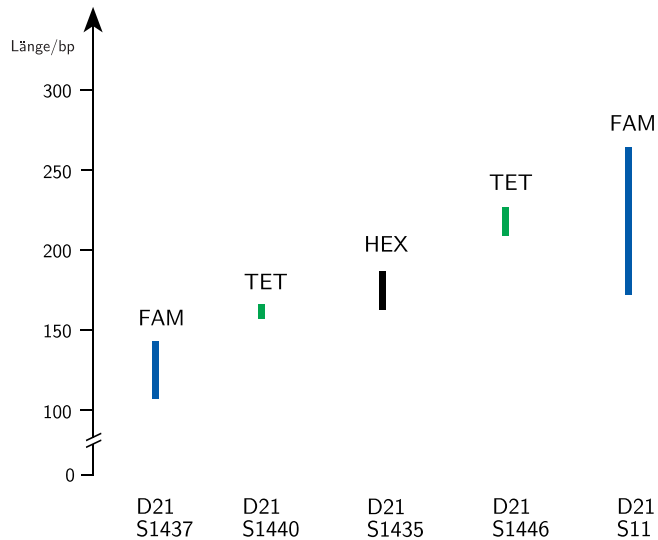


Abbildung 2.2: Trisomie 21 Panel

Die Primer für D21S11 waren GDB [23], zuerst veröffentlicht von Sharma und Litt [50], entnommen, diejenigen für D21S1435, D21S1437, D21S1440 und D21S1446 der CHLC [53] Datenbank. Ihre physikalische Kartierung zeigt Abbildung 2.3, welche nach Daten aus Mapview von GDB [23] angefertigt wurde.

Nach der PCR sollten die amplifizierte Tri- und Tetranukleotidrepeats nach Kapitel 2.5 einer Kapillarelektrophorese unterzogen werden. Um diejenigen Marker auseinanderhalten zu können, deren mögliche Repeatlängen überlappten, wurden die F-Stränge der entsprechenden Primer mit drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt. Siehe dazu auch Abschnitt 2.4.1, 2.5.1.1 und Abbildung 2.2.

2.4.3 Polymerase

Die bei der Arbeit eingesetzte Polymerase entstammt dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* und war erstmalig 1974 von Edgar [17] isoliert worden. Sie ermöglicht die Automatisierung der Polymerase-Kettenreaktion, denn als bei 95 °C thermostabiles Protein muß sie nicht nach jedem PCR-Zyklus erneuert werden.

In den Vorversuchen ist der Einfluß verschiedener DNS- und Taq-Polymerase-Konzentrationen auf die Analyseergebnisse von unterschiedlichem Probenmaterial untersucht worden.

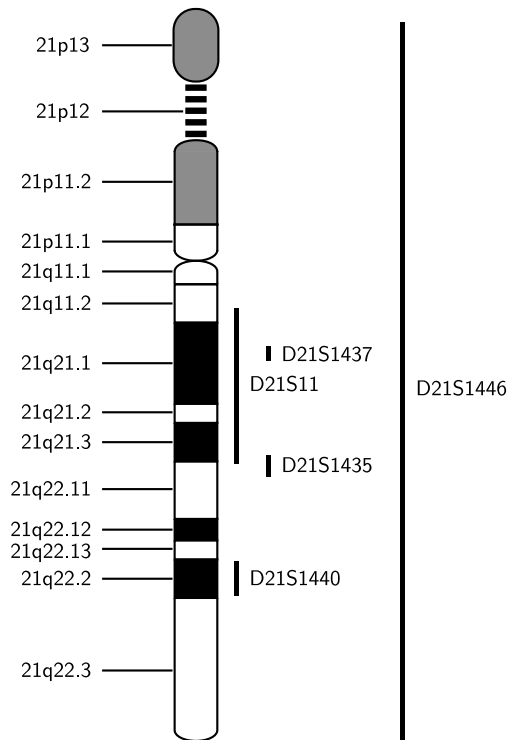


Abbildung 2.3: Physikalische Karte des Chromosoms 21 mit der Position der verwendeten Marker

2.4.4 Durchführung

Um gegenseitige Beeinflussung der Primer zu verhindern, wurde die PCR Amplifikation in fünf Ansätzen durchgeführt. Die Ansätze enthielten unter ansonsten gleichen Bedingungen Primerpaare für die verschiedenen zu untersuchenden Marker.

Ausgeführt wurde die PCR auf einem für 96 Reaktionsgefäße ausgerüsteten ABI 9600 Cycler, der aufgrund eines geheizten Deckels ohne Ölbeschichtung der Proben arbeiten kann. In folgender Tabelle sind die für die DNS Proben verwandten PCR-Bedingungen dargestellt:

Initiale Denaturierung:	95 °C, 3 min
Zyklen:	35
Denaturierung:	95 °C, 30 s
Annealing:	56 °C, 30 s
Extension:	72 °C, 30 s
Finale Extension:	72 °C, 3 min
Kühlen:	4 °C, ∞.

2.4.5 Kontrolle

Nach erfolgter PCR und vor der Kapillarelektrophorese wurde die amplifizierte DNS auf einem 2%igen Agarosegel überprüft. Die Reagenzien für das 2%ige Gel

wurden in der Mikrowelle bei 400 W zum Kochen gebracht. Daraufhin wurde das Gel auf ein faserfrei geputztes Glas gegossen und ein 25-zähliger Kamm eingelegt. Nach dem Erstarren des Gels kam es in die Elektrophoresekammer; dort wurden in jede Tasche 9 μ l DNS und 1 μ l 10 \times Ladepuffer aufgetragen. Das Gel lief 20 min bei 160 V und wurde nach dem Lauf unter Durchleuchtung von 302 nm ultraviolettem Licht auf einem Polaroid 667 Film aufgenommen.

2.5 Fragmentanalyse

2.5.1 Reagenzien

Formamid, 99,5 %, Amresco

Genescan-500 TAMRA, 4 fM/ μ l, Perkin Elmer

Laufpuffer mit 3 % Polymer (Kathode): 1 ml 10 \times Fragmentanalysepuffer, ABI
4,3 g 7%iges Genescan Polymer, ABI
4 g Harnstoff
steriles Wasser ad 10 ml

Anodenpuffer mit 2 % Polymer: 5 ml 10 \times Fragmentanalysepuffer, ABI
14,1 g 7%iges Genescan Polymer, ABI
steriles Wasser ad 50 ml

Bestückung des Sequenzierers: Anode: 7,5 ml Anodenpuffer
1. Position: 1 ml Laufpuffer
2. Position: 1 ml aqua dest.
3. Position: 0,75 ml aqua dest. (Abfall)
4. Position: 0,5 ml 0,3 M NaOH
5. Position: 0,5 ml 1 M HCl

2.5.1.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Zur Markierung der DNS-Stränge wurden 6-Carboxyfluoreszein (6-FAM) sowie seine beiden Derivate Hexachloro-6-Carboxyfluoreszein (HEX) und Tetrachloro-6-Carboxyfluoreszein (TET) eingesetzt. Die Molekülstrukturen sind auf den Abbildungen 2.4–2.6 dargestellt. Der Größenstandard wurde durch Tetramethyl-6-Carboxyrhodamin (TAMRA) markiert. Eine Begrenzung auf 4 Farbstoffe war notwendig, da der Sequenzierer maximal 4 Farben unterscheiden kann. Im folgenden sind Absorptions- und Emissionsmaxima [54] der Farbstoffe aufgezeigt:

	TET	6-FAM	HEX	TAMRA
Absorptionsmaximum/nm	519	495	537	555
Emissionsmaximum/nm	539	521	556	580

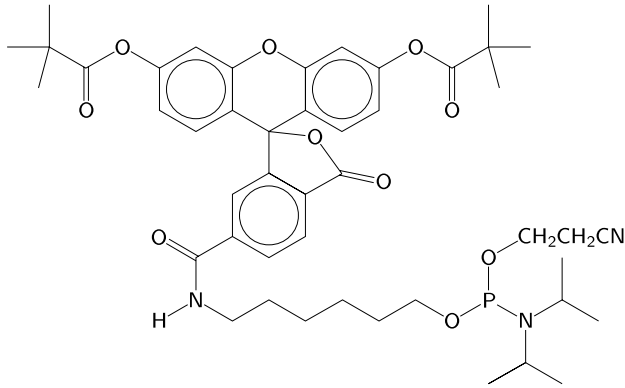


Abbildung 2.4: 6-Carboxyfluoreszein (6-FAM)

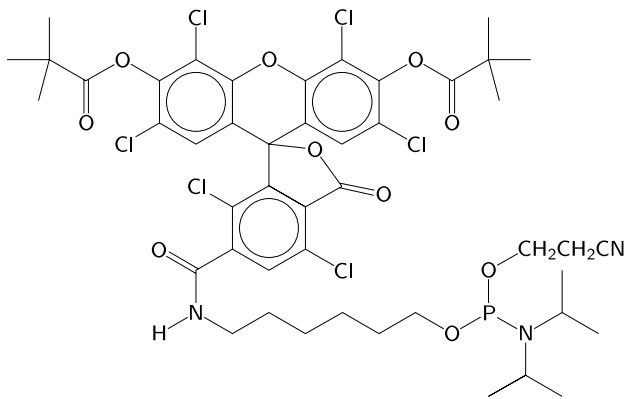


Abbildung 2.5: Hexachloro-6-Carboxyfluoreszein (HEX)

2.5.2 Denaturierung

Nach erfolgter PCR wurden je nach Stärke der Bande in der vorausgegangenen Gelelektrophorese von jedem der fünf amplifizierten Nukleotidrepeats 0,5–2 μl für eine Mixtur eingesetzt, um zusammen weiterverarbeitet zu werden. Daraufhin wurden 0,5 μl dieser Mixtur mit 0,5 μl TAMRA 500 Größenstandard und 12 μl Formamid zusammengegeben und bei 95 °C 2 min denaturiert. Danach wurde die Probe bis zum Einsatz auf dem Sequenzierer auf Eis gelegt, um eine mögliche Wiederanlagerung der Stränge zu verhindern. Die übrige amplifizierte DNS der Mixtur wurde eingefroren und bei ungenügender Qualität der Kapillarelektrophorese oder bei Änderung der Laufparameter wieder eingesetzt.

2.5.3 Kapillarelektrophorese

Zur Detektion wurde ein ABI 310 Sequenzierer mit Genescan Software eingesetzt. Dieser war mit einer Genescan-Kapillare (75 μm Innendurchmesser) und einer Halterung für 48, in neueren Modellen für 96 Proben versehen. Vor jedem Lauf war der Sequenzierer mit den in Abschnitt 2.5.1 aufgezeigten Reagenzien zu bestücken und eine Kalibrierung der Schrittmotoren vorzunehmen. Laufpuffer

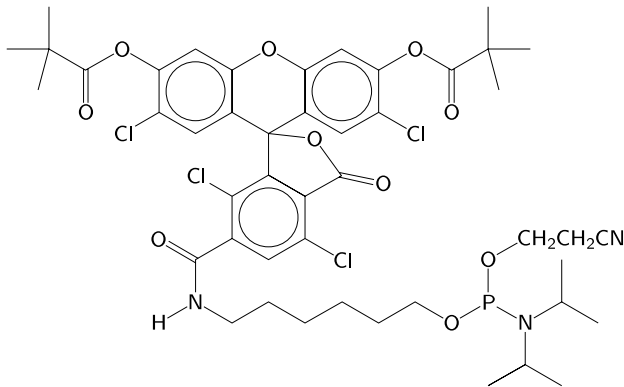


Abbildung 2.6: Tetrachloro-6-Carboxyfluorescein (TET)

und Anodenpuffer hielten sich bei Raumtemperatur 48 h oder bei einer Temperatur von 4 °C einen Monat.

Mit dem ABI 310 stand ein Power Macintosh 7200 in Verbindung, auf dem die Software „ABI PRISM 310 Collection“ installiert war. Diese war für das Sammeln der Rohdaten zuständig und steuerte den Sequenzierer auf Basis der folgenden Voreinstellungen für die Kapillarelektrophorese:

Länge bis zum Detektor: 30 cm
 Injektionszeit 10 s
 Injektionsspannung 7,0 kV
 Laufspannung 13,0 kV
 Lauftemperatur 30 °C
 Laufzeit 18 min .

Nach der Denaturierung der fünf gemischten, amplifizierten Nukleotidrepeats wurden die Proben zusammen mit leeren Behältern, welche alle 8–15 Proben für Waschschritte angesteuert wurden, auf die dafür vorgesehene Halterung gestellt. Eine Kapillare konnte für etwa 80 Proben eingesetzt werden.

2.5.4 Rohdatenverarbeitung

Auf dem Rechner lag das Programm „310 Genescan Analysis 2.0.2“ vor, welches die Rohdaten weiter verarbeitete. Abhängig von der Größe der zu erwartenden Nukleotidsequenzen und von den eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffen wurden im Rahmen der Voreinstellungen der Software verschiedene Parameter eingestellt. Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Parameter verwandt:

Virtuelles Filtrerrad: C
 Matrix: C
 Größenstandard: Rot
 Modul: GS Short Denatured C .

Die PCR-Produkte waren durch den Sequenzierer elektrophoretisch der Länge nach aufgetrennt worden. Der Sequenzierer verarbeitete maximal vier Fluoreszenzfarbstoffe; da drei Farbstoffe für die Primer eingesetzt worden waren,

konnte noch ein weiterer Farbstoff, Tetramethyl-6-Carboxyrhodamin (TAMRA), für die Kennzeichnung eines Längenstandards (TAMRA 500) herangezogen werden. TAMRA 500 weist folgende, farbstoffmarkierte Oligonukleotide auf: 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 und 500 bp. Wenn man diese Werte den dazugehörigen Peaks der Rohdaten zuordnete, konnte eine Eichkurve erstellt werden, die für die gesamten Rohdaten eine Längenzuordnung ermöglichte. Die Eichung wurde EDV-unterstützt mit Hilfe der lokalen Southern Methode [52] durchgeführt; zu beachten war, daß die Größen 250 und 340 nicht zur Kalibrierung herangezogen werden sollten, da sich herausgestellt hatte, daß diese in ihrem Laufverhalten nicht den angegebenen Werten entsprachen. Diese beiden Werte konnten aber innerhalb des Laufes einer Charge auf dem Sequenzierer zum Vergleich der Meßgenauigkeit der einzelnen Proben benutzt werden.

Der Verlauf der Spektralkurven für jeden Fluoreszenzfarbstoff wurde dem Programm in Form einer Matrixdatei mitgeteilt, welche, nach vorhergehender Eichung mit den zu verwendenden Fluoreszenzfarbstoffen, Daten über das Maß ihrer spektralen Überlappung enthielt. Diese Daten waren notwendig, um die einzelnen Farbstoffe auseinanderhalten zu können.

Die Analyse von fünf verschiedenen Nukleotidrepeatmarkern sollte eine qualitative Unterscheidung von Di- und Trisomien erlauben und auch in den Fällen, in denen dies nicht möglich ist, die Option zur quantitativen Unterscheidung bieten.

2.6 Vermeidung von Kontaminationen

Da bei der durchgeführten Studie mit amplifizierter DNS gearbeitet wurde, mußten Sicherheitsmaßnahmen getroffen werden, die eine Kontamination von präamplifizierter DNS mit fremder DNS und insbesondere amplifizierter DNS verhindern. Je höher die Zyklenzahl der Polymerase-Kettenreaktion festgelegt wird, desto größer wird die Gefahr durch Verunreinigungen des präamplifizierten Materials verfälschte Ergebnisse zu erhalten, bzw. mit den Produkten neue Ansätze zu kontaminieren.

Das Labor war in zwei Teile gegliedert, die durch eine Personenschleuse, in der Schuhe und Kittel ausgetauscht wurden, getrennt waren. Ein Bereich, in dem PCR-Geräte standen und in dem der Sequenzierer sowie die Produktion der Gele ihren Platz hatten. Ein zweiter Bereich diente der Arbeit mit nicht amplifizierter DNS. In diesem Bereich befanden sich unter anderem ein Raum zum Extrahieren der DNS und ein Raum, um die PCR anzusetzen. Jedem Arbeitsplatz stand ein eigener Satz Pipetten zur Verfügung, die bei Arbeiten mit Proteinen oder DNS mit gestopften Spitzen benutzt wurden, um Kontaminationen der Pipetten zu verhindern. Vor und nach der Benutzung eines Arbeitsplatzes wurde die Arbeitsfläche desinfiziert und am Ende eines Arbeitstages einer UV-Bestrahlung ausgesetzt.

Die PCR-Proben wurden in einem 96-Proben-Halter vorbereitet, welcher einen Einsatz besaß, der es ermöglichte, alle Proben herauszunehmen, durch eine Durchreiche in den PCR-Bereich zu geben und in den Cyclor einzusetzen. Wurde der Halter in den Ansetzraum zurückgebracht, so erfolgte vor einem erneuten

Gebrauch eine gründliche Reinigung und eine halbe Stunde UV-Bestrahlung.

Die zytologischen Labore, in denen die Fruchtwasser- und Lymphozytenkulturen stattfanden, waren baulich vom molekularbiologischen Labor getrennt.

Bei der DNS Extraktion und jedem PCR-Ansatz wurden Leerproben mitverarbeitet, um mögliche Verunreinigungen bei der Verarbeitung aufzudecken.

2.7 Durchführung der Blindversuche

2.7.1 Kultivierte Lymphozyten

Nachdem das Panel an Amnionzell- und Lymphozyten-DNS etabliert worden war, wurden in einem Blindversuch 21 Lymphozyten-Proben untersucht. Es handelte sich um in Ethanol-Essigsäure fixierte, kultivierte Lymphozyten, welche der herkömmlichen Zellkultur entstammten. Für alle Proben war mit folgenden Ergebnissen eine Karyotypisierung vorgenommen worden:

Karyotyp	Anzahl
46, ..	15
47, .., +21	4
46, XX, -21, +t(21q 21q)	1
45, XX, -14, +t(14q 21q)	1

Nach der DNS-Extraktion wurden die 21 DNS-Proben mit den Bezeichnungen des Ausgangsmaterials beschriftet und dann mit Bänderolen versehen, um die ursprüngliche Kennzeichnung zu verdecken. Daraufhin wurden die Probenbehälter gemischt und neu gekennzeichnet. Unter dieser neuen Kennzeichnung wurden die Proben der PCR mit den fünf Primerpaaren unterzogen und nach Kapillarelektrophorese mit Hilfe der Genescan-Analyse ausgewertet.

2.7.2 Blut

Für einen weiteren Blindversuch wurden 44 Blutproben als Untersuchungsmaterial eingesetzt. Es handelte sich dabei um folgende karyotypisierte Proben: drei freie Trisomien 21 aus venösem Blut Erwachsener, drei freie Trisomien 21 aus Nabelschnurblut und eine Probe einer Erwachsenen mit dem Mosaik 46, XX/47, XX, +21, welche bei einem geringen Anteil von 6% trisomer Zellen kein Down-Syndrom aufwies. Die weiteren 37 Proben waren negativ.

Die extrahierte DNS der Blutproben wurde in Behälter mit gleicher Kennzeichnung wie das Ausgangsmaterial überführt und zum Verdecken dieser Kennzeichnung mit Bänderolen versehen. Daraufhin wurden die Proben auf den Bänderolen in fortlaufender Reihenfolge beschriftet und PCR und Kapillarelektrophorese mit Genescan-Analyse durchgeführt.

2.7.3 Fruchtwasser

Die Fruchtwasserproben sind der Reihe des Eintreffens nach nummeriert, aliquotiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren worden. 17 nummerierte und durch Karyoty-

pisierung als sicher Trisomie 21 positiv identifizierte Proben standen aus früheren Fruchtwassereingängen zur Verfügung. Vor der DNS-Isolierung (Kapitel 2.3) wurde jede Probe einer optischen Kontrolle auf makroskopische Verunreinigungen unterzogen. Die Farbe und subjektive Menge der Verunreinigung wurde zusammen mit der Probennummer dokumentiert. Mit den Fruchtwasserproben wurden bei der DNS-Aufbereitung auch Leerproben mitbearbeitet, um eventuelle Kontaminationen im Aufbereitungsraum aufzudecken. Die isolierte DNS wurde in 1,5 ml Röhrchen mit der gleichen Numerierung wie die Fruchtwasserproben gegeben und eingefroren. Die parallel dazu erfolgte Karyotypisierung der der Reihe nach eintreffenden Fruchtwasserproben zeigte bei keiner Probe einen auffälligen Befund; diese standen also als Negativ-Proben zur Verfügung.

Zur Durchführung der Blindstudie wurden die 83 zuletzt aufbereiteten Fruchtwasser-DNS-Proben ohne Rücksicht auf gegebenenfalls vorhandene Verunreinigungen ausgewählt, um dem Kriterium der streng zufälligen Auswahl zu entsprechen und realistische Ergebnisse zu ermöglichen. Zusätzlich wurden die 17 vorhandenen DNS-Proben von Fruchtwasserproben trisomer Feten ausgewählt. Auch diese Auswahl wurde nicht durch Kriterien wie Kontamination durch Blut oder Verfärbungen eingeschränkt, so daß auch hier von einer streng zufälligen Auswahl ausgegangen werden kann.

Die Röhrchen mit den 100 DNS-Proben wurden auf einem Tisch gemischt und mit schwarzen Banderolen versehen. Diese wurden danach fortlaufend nummeriert. Mit dieser neuen Kennzeichnung wurden dann die PCR (Kapitel 2.4) und Fragmentanalyse (Kapitel 2.5) durchgeführt. Wie bei jeder PCR wurden auch diese Proben zusammen mit Leerwerten bearbeitet, um Kontaminationen bei der Verarbeitung aufzudecken.

2.7.3.1 Schemata maternaler Kontaminationen

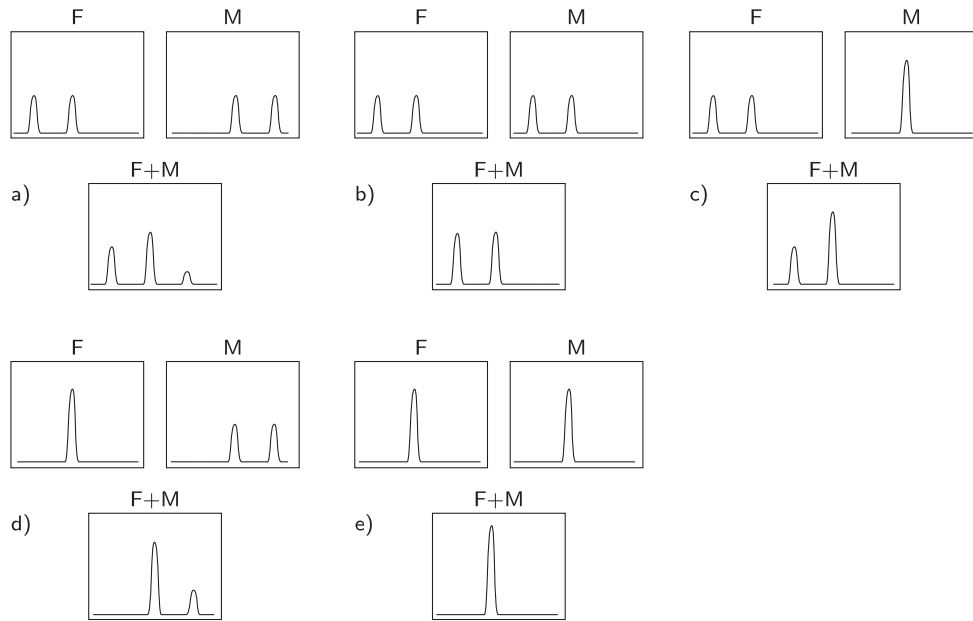
Bezüglich der besonderen Problematik der Diagnose mit mütterlicher DNS verunreinigter Fruchtwasserproben zeigt Abbildung 2.7 die theoretisch möglichen Muster, welche solche Proben nach Bearbeitung durch PCR und Kapillarelektrophorese zeigen könnten. Die Schemata gehen bei den Trisomien von einer Non-disjunction in der mütterlichen Meiose aus.

2.7.3.2 Simulation maternaler Kontamination

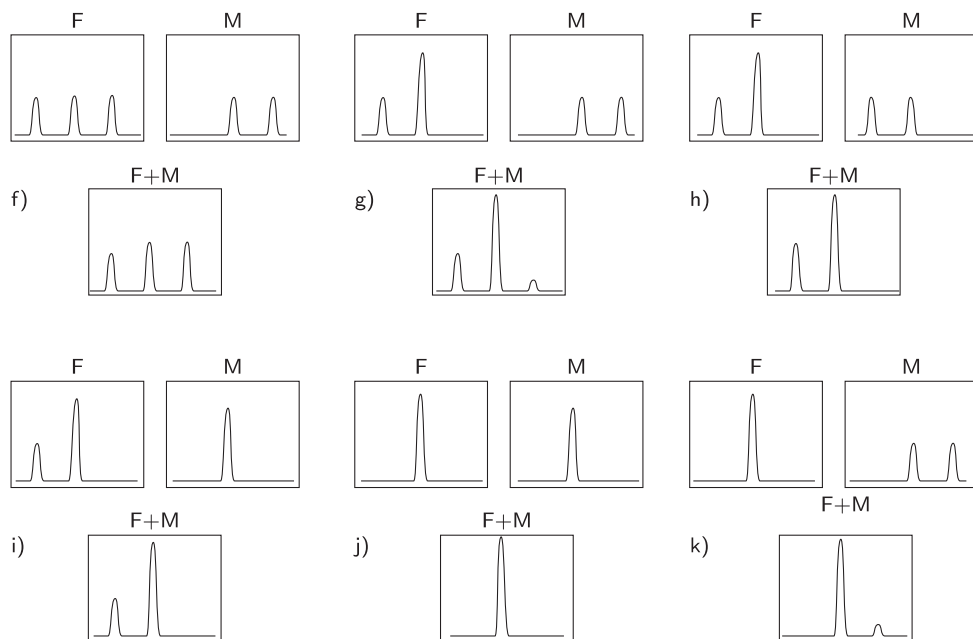
Um einen Eindruck von den möglichen Ergebnissen einer Kontamination des Fruchtwassers durch mütterliches Blut und somit fetaler DNS durch mütterliche DNS zu erhalten, wurden kindliche mit mütterlichen Zellen in definierten Mengen vermischt und dann der DNS-Extraktion, PCR und Kapillarelektrophorese unterzogen.

Um mit ähnlichen Zellzahlen wie bei der Analyse von Fruchtwasser zu arbeiten, bei der von jeder Probe etwa 5000 Zellen eingesetzt werden (siehe Seite 12), wurden sowohl die mütterlichen als auch die kindlichen heparinisierten Blutproben mit PBS⁻ 1:50 verdünnt. Aus dem verdünnten Vollblut wurden Proben zu je 50 µl erstellt, die jeweils 0 %, 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % und 100 % mütterliches Blut enthielten. Diese Proben beinhalteten jeweils etwa 5000 Leukozyten und wurden wie Fruchtwasserproben weiterverarbeitet.

Disomer Fetus



Trisomer Fetus



F: fetal, M: maternal, F+M: verunreinigter Wert
 Abszisse: Länge der Nukleotidrepeats, Ordinate: Intensität

Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der möglichen Ergebnisse einer Fruchtwasserkontamination durch mütterliche Zellen

3 Ergebnisse

3.1 DNS-Aufbereitung

3.1.1 Proteinase K

Die Proteinase K-basierende DNS-Isolierung gelang sowohl für Fruchtwasser als auch für native und kultivierte Lymphozyten. Abbildung 3.1 zeigt, daß sowohl EDTA- als auch Heparin-Blut nach der DNS-Isolierung für die PCR geeignet sind.

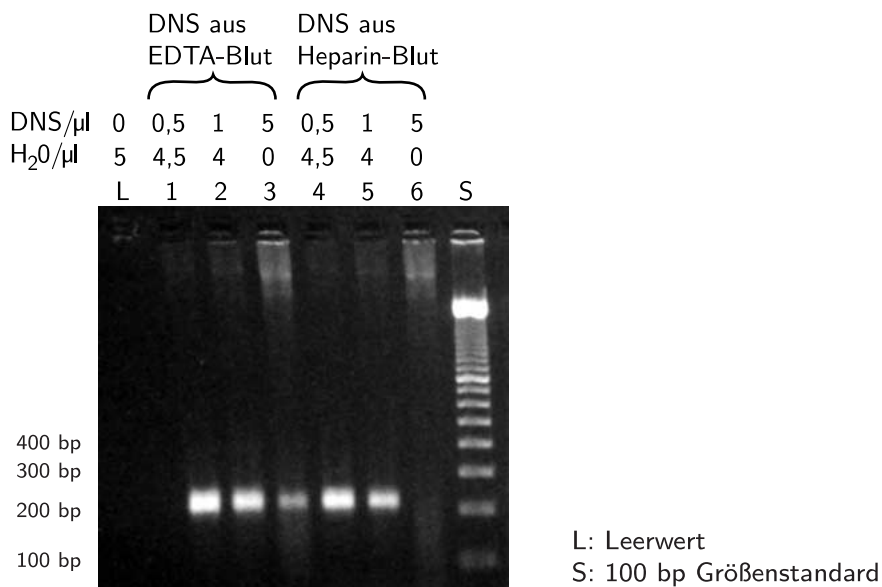


Abbildung 3.1: Gelelektrophorese mit DNS aus EDTA- und Heparin-Blut

3.1.2 Mikrowellen

Die Versuche mit der Mikrowellenextraktion zeigten in der Gelelektrophorese von PCR-Produkten einen negativen Leerwert, eine positive Positivprobe und keine erkennbare Amplifikation der durch Mikrowellen bestrahlten Blutproben. Damit wurde gezeigt, daß diese Methode im Rahmen der hier gewählten PCR Bedingungen nicht geeignet ist, um DNS aus Blut zu isolieren. Siehe dazu Abbildung 3.2, sowie Abschnitt 2.3.3.

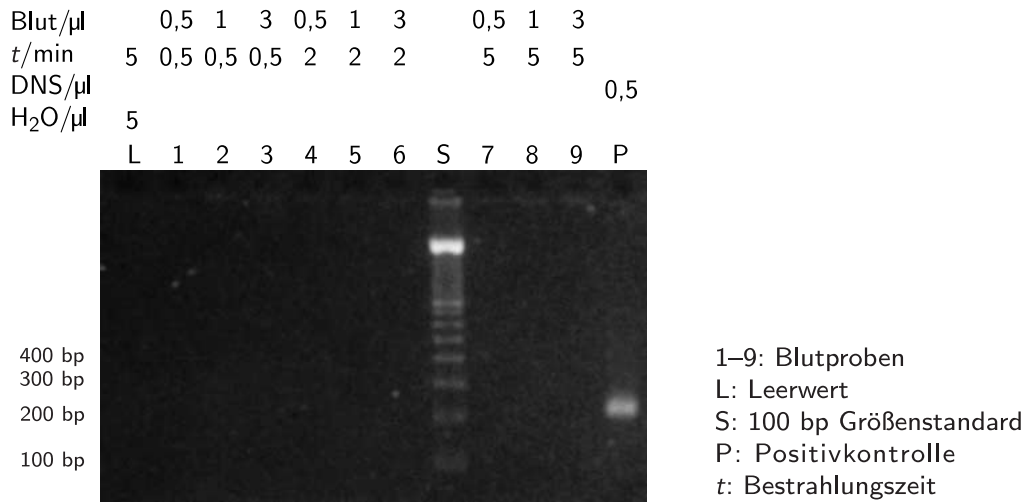


Abbildung 3.2: Bedingungen und Ergebnis der DNS-Aufbereitung durch Mikrowellen

3.2 PCR

Die Untersuchung der in Abbildung 2.2 aufgeführten Marker zeigt in der Gelelektrophorese auf Abbildung 3.3 die für den Trisomie 21-Panel typische, treppenförmige Anordnung, welche zum Zweck hat, die PCR-Produkte gesammelt der Fragmentanalyse zuzuführen und dennoch die einzelnen Amplifikationsprodukte den Markern zuordnen zu können.

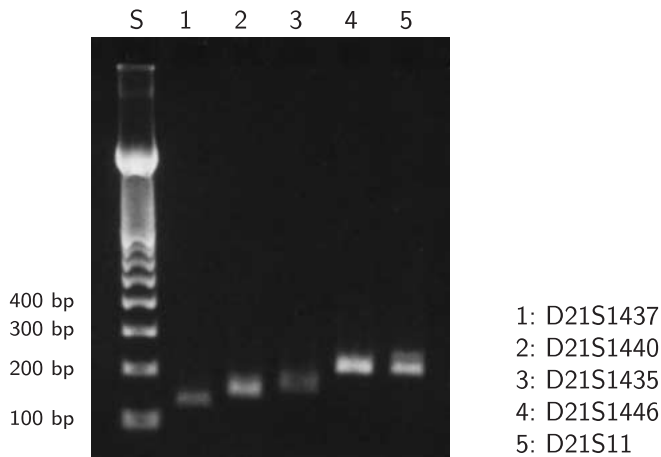


Abbildung 3.3: Gelelektrophorese der PCR-Produkte der Marker des Trisomie 21-Panels in der DNS einer Kontrollprobe

Abbildung 3.1 zeigt neben der Gleichwertigkeit von EDTA- und Heparin-Blutproben für DNS-Aufbereitung und Polymerase-Kettenreaktion, daß die eingesetzte Menge an DNS ausschlaggebend für den Erfolg einer PCR ist. Während bei 5 μ l DNS nur eine schwache, bzw. gar keine Bande zu sehen ist, wird die Bande bei weniger eingesetzter DNS deutlich stärker. Bei PCR-Ansätzen mit

DNS aus Fruchtwasser zeigte sich hingegen eine Menge von 5 µl eingesetzter DNS als ideal.

3.3 Kapillarelektrophorese

3.3.1 Laufparameter

Eine Änderung der Injektionszeit zeigte deutlichen Einfluß auf die Höhe der detektierten Signale. Während eine Einstellung von 5 s eine starke Verringerung der Signalintensität zur Folge hatte und daher nur in Fällen von Proben zu hoher Intensität in einem zweiten Durchgang benutzt werden kann, hatte eine Erhöhung über 10 s hinaus keine wesentliche Wirkung auf die Signalintensität, so daß 10 s als Optimum angesehen werden können.

Auch die Erhöhung der Injektionsspannung führte zu einem Anstieg der Signalintensität und zeigte über 7 kV keine wesentliche Verbesserung mehr.

Die Laufspannung ändert primär die Geschwindigkeit mit welcher Proben die Kapillare passieren. Eine erhöhte Laufspannung kann unter Einbüßen der Auflösung für Proben eingesetzt werden, deren Allele sich in der Länge stark voneinander unterscheiden. Dies war jedoch bei den gewählten Nukleotidrepeats nicht günstig, da ihre Allele mit 107–264 bp nah aneinander liegen.

In Einzelfällen waren Artefakte aufgetreten, die exakt unter einem sehr intensiven Signal ein schwaches Signal anderer Färbung zeigten. Dies konnte durch Optimierung der Matrixdatei in den meisten Fällen ausgeschlossen werden.

3.3.2 Elektropherogramme

3.3.2.1 Disomie 21

Bei einer Disomie 21 sind für jedes amplifizierte Nukleotidrepeat einer Probe folgende Konstellationen denkbar: es zeigen sich zwei unterschiedliche Allele, deren Peaks Integrale im Verhältnis 1:1 aufweisen, bzw. in selteneren Fällen, in welchen diese Marker homozygot sind, einen einzigen Peak. Abbildung 3.4 zeigt die Anwendung des Panels an der Blutprobe eines 46, XY Individuums. Die roten Signale stellen den Tamra-Größenstandard dar.

3.3.2.2 Trisomie 21

Trisomien stellen sich entweder mit drei unterschiedlichen Allelen, deren Peaks Integrale in einem Verhältnis von 1:1:1 aufweisen, oder mit zwei Allelen und einem Verhältnis der Flächen unter den Peaks von 2:1 dar. In seltenen Fällen kann auch bei einer Trisomie ein Nukleotidrepeatmarker auf allen drei Chromosomen homozygot sein und daher nur einen, nichtinformativen, Peak aufweisen. Alle drei Möglichkeiten kann man in Abbildung 3.5 sehen, welche die Anwendung meines Panels auf DNS der Zelllinie GM 04927 D (siehe auch Abschnitt 2.2.2) demonstriert.

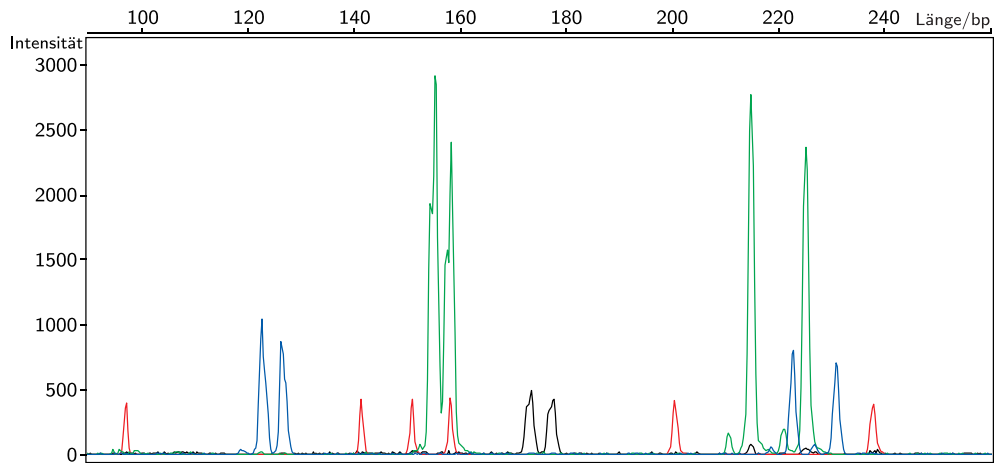


Abbildung 3.4: 46, XY

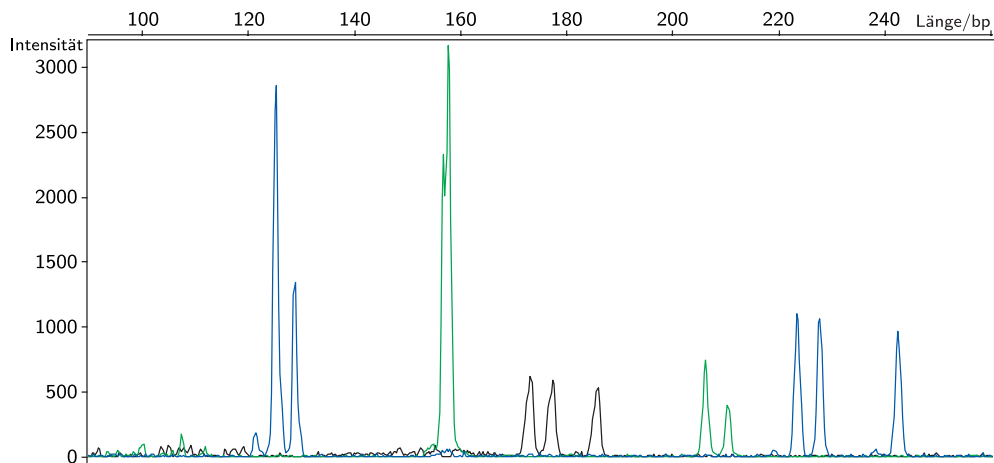


Abbildung 3.5: 47, XY, +21

3.3.2.3 Mosaik

Unter den 44 Blutproben, welche im Blindversuch analysiert worden sind, befand sich auch eine Probe mit dem Karyotyp 46, XX/47, XX, +21, deren Elektropherogramm sich im Versuch wie auf Abbildung 3.6 dargestellt zeigte. Die Trägerin wies einen Anteil von etwa 6% trisomen Zellen im Blut auf und hatte phänotypisch kein Down-Syndrom. Im Abschnitt 3.4.2 wird genauer auf diese Probe eingegangen.

3.3.2.4 PCR von Lymphozyten aus koaguliertem Blut

Zwei Blutproben von Patienten mit Down-Syndrom wurden aufgrund der Koagulation des Blutes als für die Zellkultur unbrauchbar eingestuft. Sie wurden daher nicht in die Blindstudie aufgenommen. Auf Grundlage der Ergebnisse der PCR-basierenden Methode konnte aber dennoch eine Trisomie 21 diagnostiziert werden.

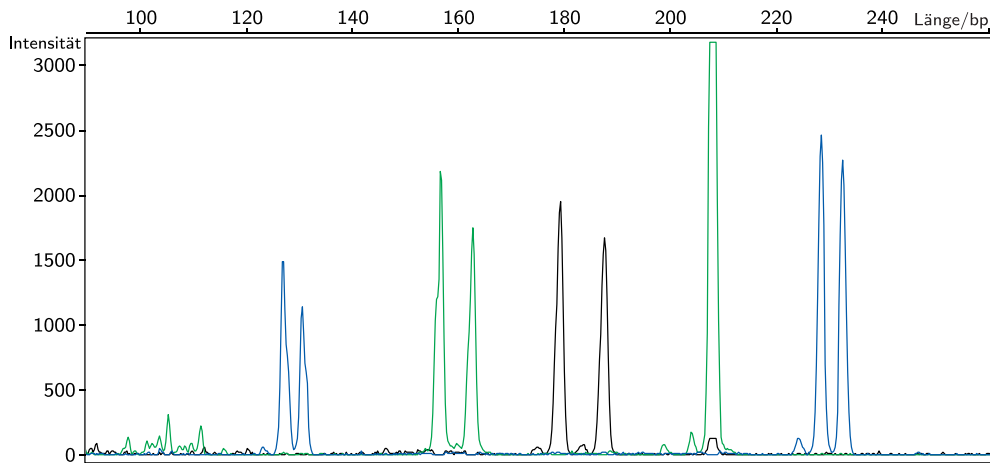


Abbildung 3.6: 46, XX/47, XX, +21

Abbildung 3.7 zeigt eine dieser Proben, bei welcher jeweils drei Marker auf allen drei Chromosomen heterozygot, ein Marker auf zwei Chromosomen heterozygot und ein Marker homozygot ist. Der homozygote Marker läßt keine Diagnose zu, wohingegen die heterozygoten Marker klar auf eine Trisomie 21 hinweisen.

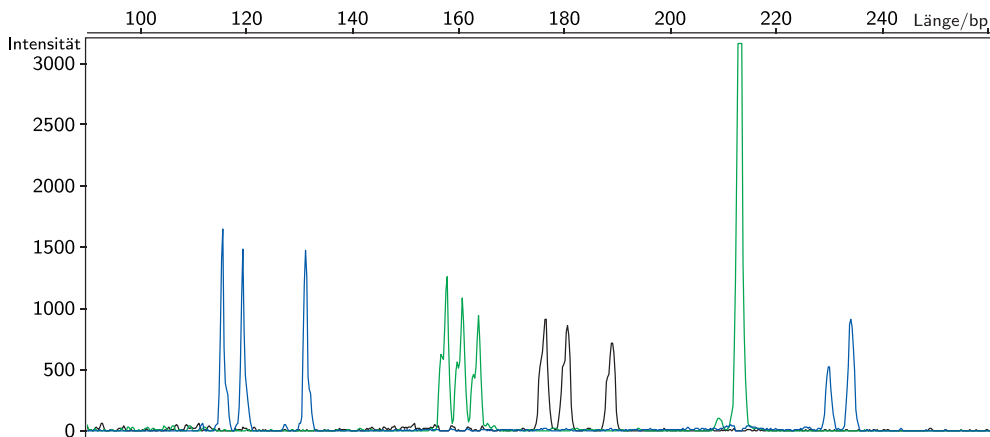


Abbildung 3.7: 47, XY, +21; koagulierte Probe

3.3.2.5 Simulation maternalen Kontamination

Abbildung 3.8 auf Seite 33 zeigt die Ergebnisse der Simulation einer maternalen Kontamination von Fruchtwasser mit Hilfe der Analyse mütterlicher und kindlicher lymphozytärer DNS in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen. Diese Simulation bestätigt das Vorhandensein der auf Abbildung 2.7, Seite 25 postulierten Elektropherogramme a)–c) von mit maternaler DNS kontaminierter fetaler DNS. Weiterhin ist zu erkennen, daß sich je nach Mischungsverhältnis von maternaler und kindlicher DNS die Mengenverhältnisse der PCR-Produkte eines Markers ändern können.

Die Signale der PCR-Produkte der Marker D21S1437, D21S1435 und D21S11 zeigen Kontaminationsmuster, welche dem in Abbildung 2.7 a) postulierten Muster entsprechen. Die amplifizierte Allele des Markers D21S1440 weisen in der Simulation bei Mutter und Kind eine identische Länge auf; es kommt also auch bei Kontamination zu keiner Veränderung der Größenverhältnisse der beiden Signale. Hierdurch wird das Vorhandensein des in Abbildung 2.7 b) postulierten Schemas bestätigt. Die PCR-Produkte des Markers D21S1446 zeigen ein Kontaminationsmuster, welches dem in Abbildung 2.7 c) dargestellten Schema entspricht. Je größer in diesem Beispiel die mütterliche Kontamination wird, desto mehr weicht das Verhältnis der beiden Peaks vom Verhältnis 1:1 ab.

3.4 Blindversuche

3.4.1 Kultivierte Lymphozyten

Die DNS-Extraktion der Proben war erfolgreich, ebenso die PCR und Kapillarelektrophorese. Durch die Mikrosatellitenanalyse sind innerhalb der 21 Proben fünf von fünf Trisomien 21 gefunden worden. Unter diesen fünf Proben befanden sich 4 freie Trisomien 21 und eine Translokationstrisomie mit dem Karyotyp 46, XX, -21, +t(21q 21q). Die 15 euploiden Proben, sowie die eine Probe mit dem Karyotyp 45, XX, -14, +t(14q 21q) sind korrekt als negativ klassifiziert worden. Es gab keine falsch positiven und keine falsch negativen Zuordnungen. Sensitivität, Spezifität, negativer und positiver Vorhersagewert dieser Untersuchung lagen daher bei 1,0.

3.4.2 Blut

Auch beim Blindversuch mit 44 Blutproben konnte aus allen Proben DNS extrahiert werden. Eine dabei mitgeführte Leerprobe zeigte keine Verunreinigungen. Leerkontrollen der PCR waren ebenfalls negativ. PCR und Genescan-Analyse ergaben 6 positive und 38 negative Befunde mit typischen Mustern. Die positiven Befunde wurden den freien Trisomien zugeordnet, die negativen Befunde den Disomien und dem Mosaik 46, XX/47, XX, +21 mit einem nach Karyotypisierung ca. 6%igen Anteil trisomer Lymphozyten. Wie auf Abbildung 3.6 zu sehen ist, lag hier mit einem homozygoten und vier heterozygoten Markern mit in etwa gleich großen Peaks das typische Bild eines negativen Befundes vor. Da bei der Patientin mit dem Mosaik kein phänotypisches Down-Syndrom vorliegt, waren alle Proben von Individuen mit Down-Syndrom und alle Proben von Individuen ohne Down-Syndrom richtig zugeordnet worden.

3.4.3 Fruchtwasser

Aus allen 100 Fruchtwasserproben war DNS zu extrahieren. Dabei mitgeführte Leerkontrollen blieben negativ. Ebenso blieben bei der PCR durchgeführte Leerkontrollen negativ. Die Auswertung der Blindproben fand allein mit Kenntnis der in Kapitel 2.7.3 beschriebenen randomisierten Kennnummern und ohne Kenntnis der Anzahl der makroskopisch verfärbten, ursprünglich eingesetzten Fruchtwasserproben statt. Bei Durchsicht der Elektropherogramme fiel auf, daß,

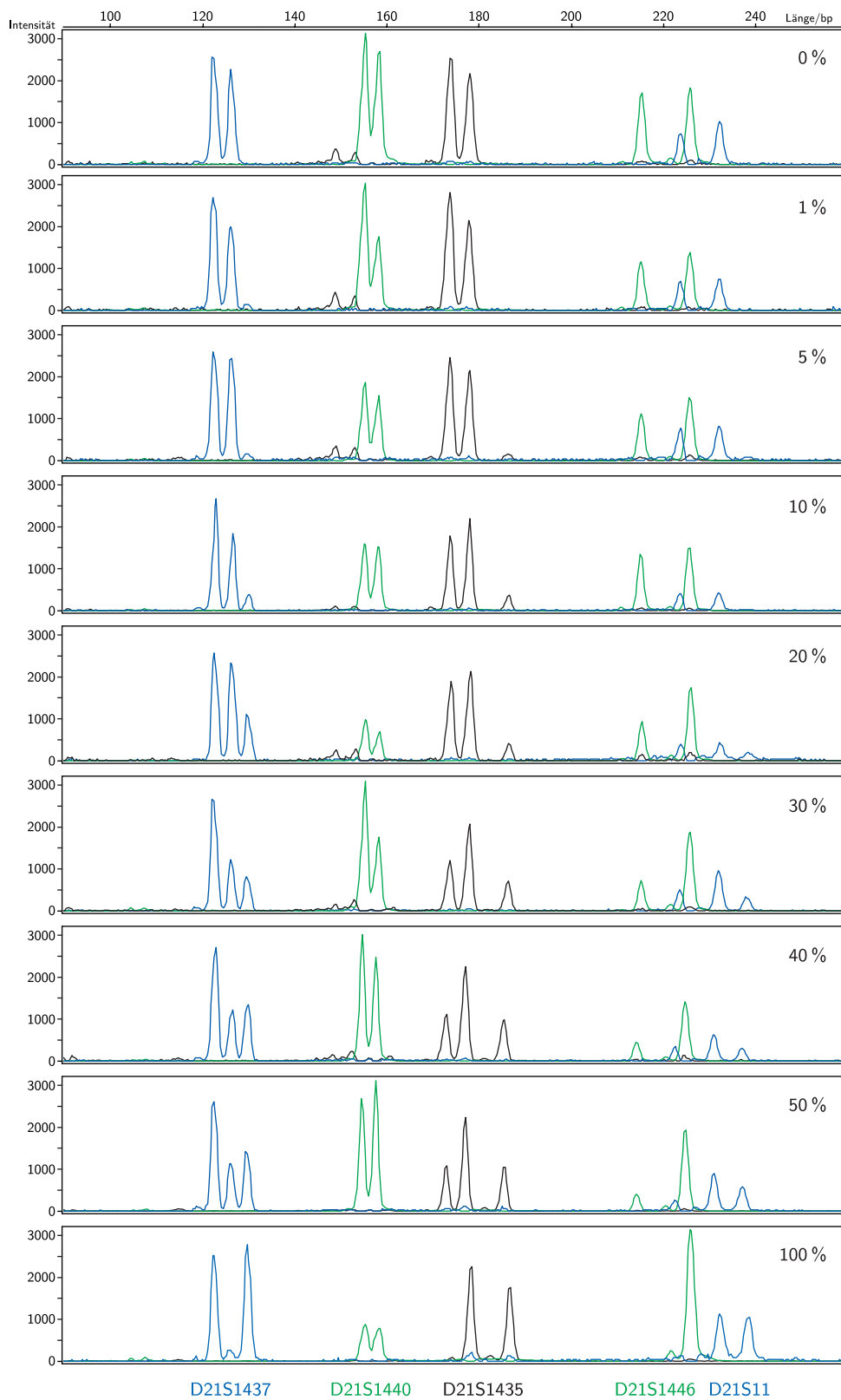


Abbildung 3.8: Simulation einer Fruchtwasserkontamination durch mütterliche Zellen. Anteil mütterlicher Zellen in Prozent.

im Gegensatz zu den Blindversuchen an nativen und kultivierten Lymphozyten, viele Proben nicht die gewohnte deutliche Diskriminationsmöglichkeit zwischen einer Disomie 21 und einer Trisomie 21 boten. Die Signale der Nukleotidrepeats stellten sich, anders als bei den Lymphozyten, singular, doppelt mit gleich hohen Spitzen, doppelt mit unterschiedlich hohen Spitzen, dreifach mit gleich hohen Spitzen und dreifach mit unterschiedlich hohen Spitzen dar, welche in bis jetzt nicht vorgekommenen Kombinationen auftraten. Unter der Annahme, daß es sich hier um einen Effekt der Verunreinigung des Fruchtwassers durch mütterliches Blut handelte wurde das Schema von Abbildung 2.7 auf Seite 25 auf die elektrophoretische Darstellung eines jeden Nukleotidrepeats jeder einzelnen Probe angewandt. Dieses Schema macht deutlich, daß dreifache Signale unterschiedlicher Höhe auch bei mit mütterlicher DNS vermischter DNS gesunder Feten auftreten können und dreifache Signale von trisomen Feten durch mütterliche Kontamination in der Höhe variieren können. Auch können sich doppelte Signale trisomer oder disomer DNS-Proben durch mütterlichen Einfluß in ihren Verhältnissen ändern.

Da die Vergleiche der fünf Elektropherogramme einer Probe nur wenig Aufschluß über das Maß der Verunreinigung gaben und die maternalen Tri- und Tetranukleotidrepeats eine Unbekannte darstellten, war es bei einigen Proben schwierig, bis nicht möglich, die vorliegenden Ergebnisse der Genescan-Analyse korrekt einer Trisomie oder einer Disomie 21 zuzuordnen.

Die Auswertung ergab, daß von 100 Fruchtwasserproben, welche 17 Fruchtwasserproben von Feten mit einer Trisomie 21 enthielten, 73 Proben korrekt einer Disomie 21 und 8 Proben korrekt einer Trisomie 21 zugeordnet werden konnten. Gleichzeitig wurden 9 Proben falsch negativ und 10 Proben falsch positiv gewertet.

Bei der Aufarbeitung der Fruchtwasserproben hatte sich gezeigt, daß ein hoher Anteil der eingehenden Proben Verfärbungen aufwies. Die Zuordnung der Aufzeichnungen über Kontaminationen zu den untersuchten Fruchtwasserproben ergab, daß von den streng zufällig ausgewählten 100 Proben 39 aus Fruchtwasser isoliert worden sind, welches rötliche, makroskopische Blutbeimengungen enthielt. Zwei Proben wiesen gelbliche Spuren und eine Probe grünliche Spuren auf. Die grünlich verfärbte Probe war karyotypisch negativ, die beiden gelblich verfärbten Proben positiv und eine der 39 mit Blut vermengten Proben positiv.

Innerhalb der 39 makroskopisch mit Blut verunreinigten Proben sind 29 von 30 korrekt negativ gewertet worden (Abb. 3.9). Die eine positive Probe wurde als negativ gewertet (Abb. 3.10). Es gab 9 falsch positive Zuordnungen (Abb. 3.11). Die 61 Proben, die Fruchtwasser ohne makroskopische Blutbeimengungen entstammten, beinhalteten 16 Trisomien. Innerhalb dieser 61 Proben wurden 44 von 52 korrekt einer Disomie (Abb. 3.12) und 8 von 9 korrekt einer Trisomie 21 zugeordnet (Abb. 3.13). Es gab 8 falsch negative (Abb. 3.14) und eine falsch positive Zuordnung (Abb. 3.15). Die Probe mit der grünlichen Verfärbung wurde richtig als negativ diagnostiziert und die beiden Proben mit der gelblichen Verfärbung korrekt als positiv.

Tabelle 3.1 zeigt sowohl für die Mikrosatellitenuntersuchung aller Fruchtwasserproben, als auch für beide Untergruppen Sensitivität und Spezifität, sowie den negativen und positiven Vorhersagewert.

Tabelle 3.1: Ergebnisse der Fruchtwasser Blindstudie

<i>Proben gesamt</i>		Karyotyp		
		Trisomie 21	Disomie 21	
Verdachts- diagnose	Trisomie 21	richtig + 8	falsch + 10	pos. Vorhersagewert $8/18 \approx 0,44$
	Disomie 21	falsch - 9	richtig - 73	neg. Vorhersagewert $73/82 \approx 0,89$
		Sensitivität $8/17 \approx 0,47$	Spezifität $73/83 \approx 0,88$	

<i>Proben mit makroskopischer Blutbeimengung</i>					
		Trisomie 21	Disomie 21		
Verdachts- diagnose	Trisomie 21	richtig + 0	falsch + 9	pos. Vorhersagewert $0/9 = 0,00$	
	Disomie 21	falsch - 1	richtig - 29	neg. Vorhersagewert $29/30 \approx 0,97$	
		Sensitivität $0/1 = 0,00$	Spezifität $29/38 \approx 0,76$		

<i>Proben ohne makroskopische Blutbeimengung</i>					
		Trisomie 21	Disomie 21		
Verdachts- diagnose	Trisomie 21	richtig + 8	falsch + 1	pos. Vorhersagewert $8/9 \approx 0,89$	
	Disomie 21	falsch - 8	richtig - 44	neg. Vorhersagewert $44/52 \approx 0,85$	
		Sensitivität $8/16 = 0,50$	Spezifität $44/45 \approx 0,98$		

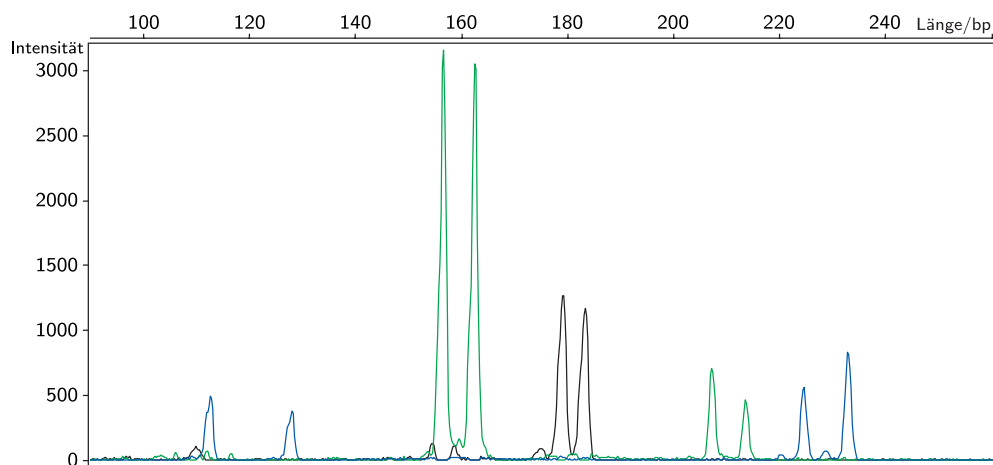


Abbildung 3.9: Rötliche Fruchtwasserprobe, als negativ erkannt

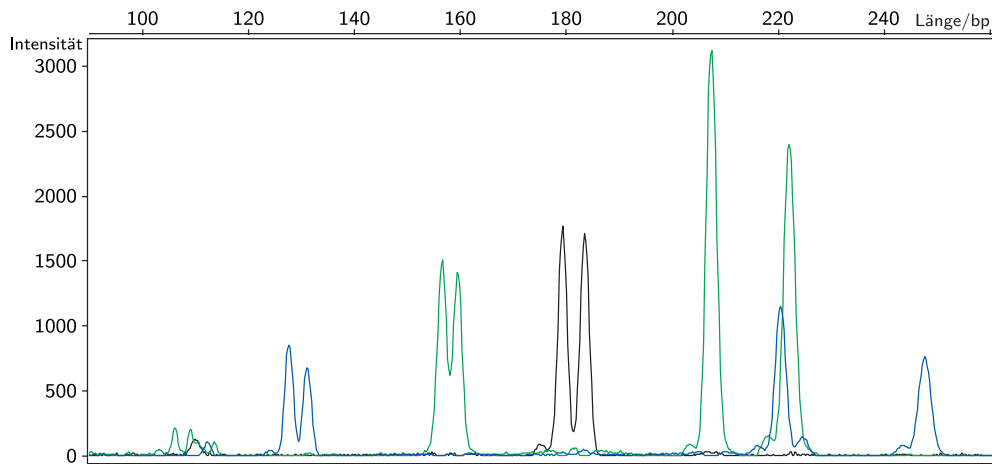


Abbildung 3.10: Rötliche Fruchtwasserprobe, falsch negativ

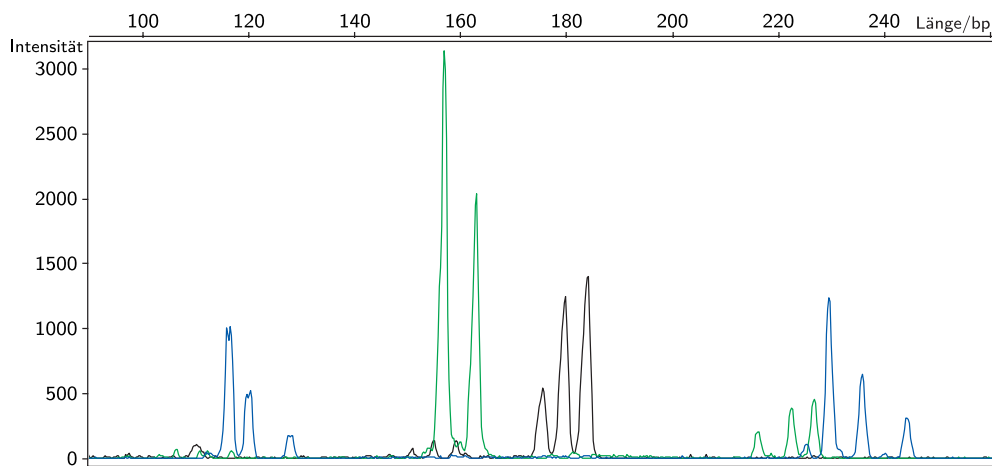


Abbildung 3.11: Rötliche Fruchtwasserprobe, falsch positiv

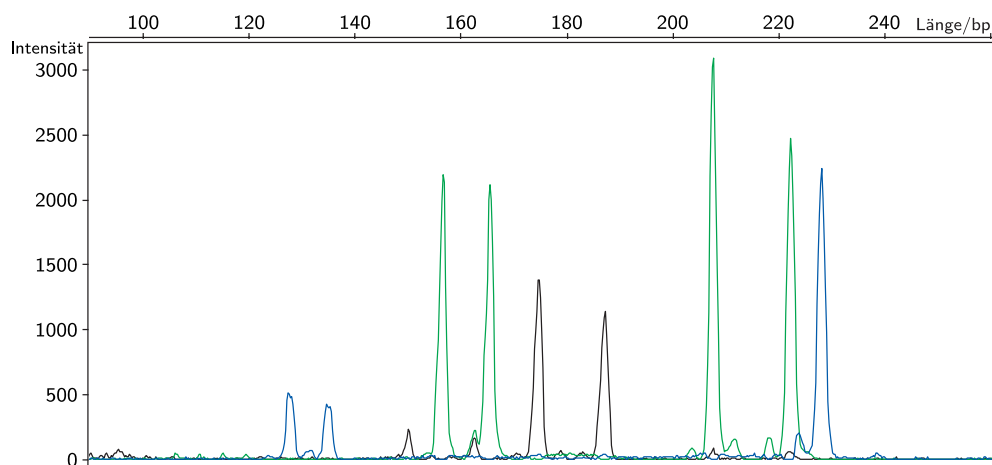


Abbildung 3.12: Fruchtwasserprobe, als negativ erkannt

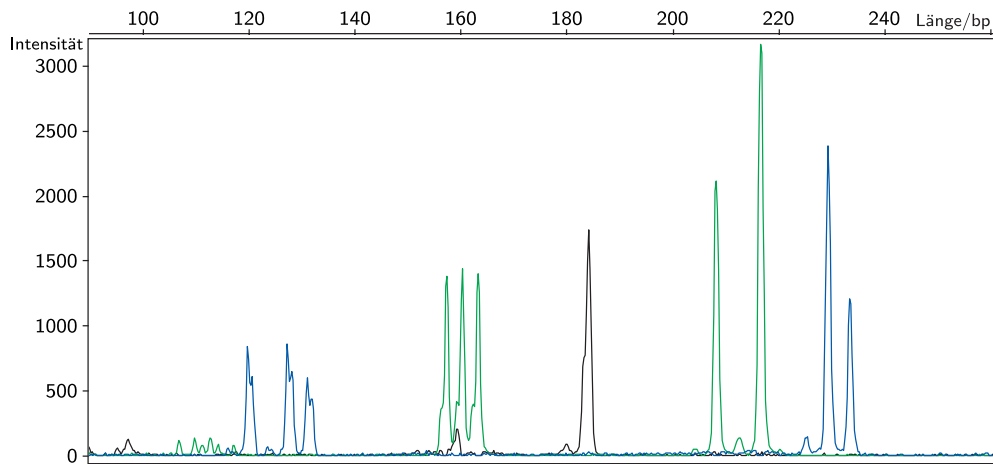


Abbildung 3.13: Fruchtwasserprobe, als positiv erkannt

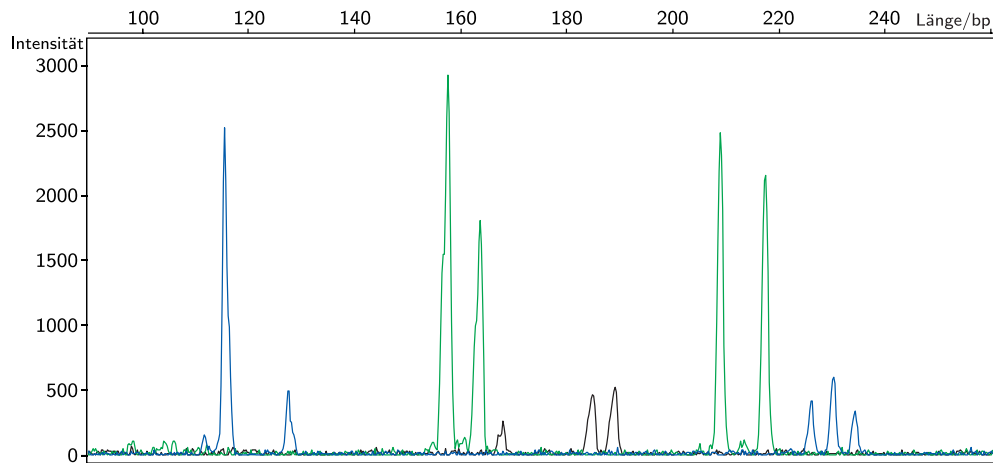


Abbildung 3.14: Fruchtwasserprobe, falsch negativ

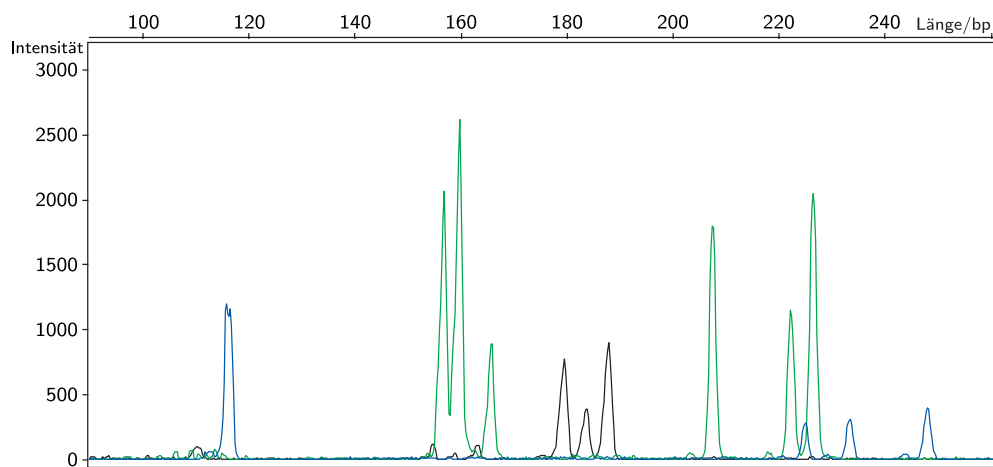


Abbildung 3.15: Fruchtwasserprobe, falsch positiv

4 Diskussion

4.1 Auswahl der Marker und Primer

Die in Abbildung 2.2, 2.3 und Abschnitt 2.4.1 dargestellten Marker sind nach folgenden Gesichtspunkten ausgewählt worden: alle sollten spezifisch für das Chromosom 21 sein, eine hohe Heterozygotität und damit zusammenhängend viele verschiedene Allele aufweisen. Diese Allele sollten auf einem Sequenzierer mit Genescan-Analyse gut auseinandergehalten werden können. Die Wahl fiel daher auf Small Tandem Repeats (STR), wobei darauf Wert gelegt wurde, daß keine Dinukleotidrepeats eingesetzt werden, um auch auf Sequenzierern mit größerer Auflösung eine gute Trennung zwischen zwei nur um ein Repeat unterschiedlichen Allelen zu erreichen. Es sollten mehrere Marker gleichzeitig untersucht werden, so daß die Wahrscheinlichkeit, daß je nach Di- oder Trisomie zwei beziehungsweise drei heterozygote Allele vorliegen, steigt. Die Größenbereiche, in denen die Allele vorkommen können, sollten eine treppenartige Anordnung aufweisen, damit sich dadurch die Möglichkeit ergibt, mit dem Einsatz von nur 3 Fluoreszenzfarben für die Primer und einer Fluoreszenzfarbe für den internen Tamra-Größenstandard alle 5 Primer gleichzeitig einem Lauf auf dem Sequenzierer unterziehen und dennoch die einzelnen Peaks eindeutig einem Marker zuordnen zu können. Die mit dem Primer amplifizierten Fragmente sollten weiterhin wenig Rauschen und wenige Artefakte in der Analyse zeigen.

Im Falle der seltenen partiellen Trisomien erlangt das Problem der „Down-Syndrom-Region“, [13], [12], [14], [30] Bedeutung, welche von einigen Autoren [43] für den Locus D21S55 der Region 21q22.2 bis zum proximalen 21q22.3 angenommen wird. Durch hochauflösende R-Bandenfärbung [34] kann diese Region in der herkömmlichen Zytologie bei partiellen Trisomien entdeckt werden. Ist diese Region aus klinischen Gesichtspunkten relevant? Delabar [14] weist darauf hin, daß sich 19 von 24 Merkmalen des Down-Syndroms auf dieser Region befänden. Darunter Merkmale wie muskulärer Hypotonus, Kleinwuchs, mentale Retardierung, faciale Anomalien, und abnorme Dermatoglyphen. Es liegen aber nach Korenberg et al. [29] Hinweise vor, daß auch Gene außerhalb des Locus D21S55 signifikant zu genau den gleichen Symptomen beitragen. Es kann daher nicht angenommen werden, daß Symptome des Down-Syndrom Phänotyps sich eindeutig einer bestimmten Region zuordnen lassen. Möglicherweise ist aus klinischer Sicht die Bedeutung dieser Region in der Vergangenheit überbewertet worden. Der Befund einer Disomie in diesem Bereich bietet falsche Sicherheit und vermag wenig über das Ausmaß der Erkrankung auszusagen.

Dementsprechend decken die hier eingesetzten Primer einen weiten Bereich des Chromosoms 21 ab (siehe Abbildung 2.3), D21S1440 liegt sogar auf 21q22.2.

4.2 Beurteilung der Blindversuche

4.2.1 Kultivierte Lymphozyten

Die in Kapitel 3.4.1 auf Seite 32 dargestellten Ergebnisse des Blindversuches mit 21 Proben aus kultivierten Lymphozyten zeigen deutlich, daß die in dieser Arbeit vorgestellte, auf Mikrosatellitenanalyse beruhende Methode bei geeignetem Ausgangsmaterial in der Lage ist, in erheblich kürzerer Zeit als eine Zellkultur mit nachfolgender Karyotypisierung eine verlässliche Aussage über das Vorliegen einer Di- oder Trisomie 21 zu machen.

Die Probe mit der Translokation 45, XX, -14, +t(14q 21q) wurde korrekt als negativ bewertet. Die in dieser Arbeit vorgestellte Analyse gibt jedoch keinen Hinweis darauf, daß eine solche Translokation vorliegt. Dies zu wissen, wäre von Vorteil, da der Träger zwar klinisch nicht betroffen ist, aber ein erhöhtes Risiko besitzt, selbst ein Kind mit einer Translokationstrisomie 21 zu bekommen.

Neben den 4 Proben mit einer freien Trisomie 21 konnte, wie durch diesen Blindversuch gezeigt wurde, die Mikrosatellitenanalyse auch eine Translokationstrisomie 46, XX, -21, +t(21q 21q) aufdecken. Hier gilt aber ebenfalls die Einschränkung, daß diese Methode nicht zwischen den beiden Formen der Trisomie 21 differenziert.

Dieser Versuch zeigte auch, daß an kultivierten, fixierten Lymphozyten molekulargenetische Untersuchungen vorgenommen werden können. Diese Lymphozyten fallen in der Zellkultur der zytologischen Routinediagnostik an und können daher parallel zur herkömmlichen Diagnostik für PCR-basierende Methoden eingesetzt werden.

4.2.2 Blut

Der Blindversuch mit 44 Proben, welche 6 freie Trisomien 21 und die Probe einer Person mit dem Karyotyp 46, XX/47, XX, +21 (Trisomie 21 \approx 6 %) beinhaltete, sollte neben der höheren Anzahl an negativen und positiven Proben auch die Anwendbarkeit der in dieser Arbeit gezeigten Methode auf in der Praxis zu untersuchendes Zellmaterial demonstrieren. Bei Neugeborenen und Erwachsenen mit Verdacht auf eine Trisomie 21 wird an Blutproben die auf Zellkultur basierende Karyotypisierung durchgeführt. Blut von Neugeborenen unterscheidet sich dabei von dem Blut Erwachsener durch den hohen Anteil Kern- und damit DNS-haltiger Erythrozyten. Da aber für das Ergebnis der Mikrosatellitenanalyse der absolute DNS-Anteil keine Rolle spielt, konnten für diesen Versuch Proben Neugeborener und Erwachsener gleichzeitig verwandt werden.

Der Einsatz der Blutprobe mit nur einem Teil trisomer Zellen in dem Blindversuch diente dazu, unter praxisnahen Bedingungen die Grenzen der eingesetzten Methode zu finden und eine mögliche Sensitivität für Mosaik mit geringem Anteil einer Trisomie 21 zu untersuchen. Dabei sollte auch die Aufgabenstellung nicht außer acht gelassen werden, welche die Suche nach einer möglichst qualitativen Unterscheidung zwischen einer Trisomie 21 und einer Disomie 21 vorgibt. Demnach sollte ein Ergebnis stets eindeutig für eine Trisomie oder eine Disomie 21 sein. Vor diesem Hintergrund ist es als Erfolg zu werten, daß die Probe

mit dem geringen Anteil trisomer Zellen, ohne dem phänotypischen Down-Syndrom, als negativ gewertet wurde. Das dazugehörige Elektropherogramm auf Abbildung 3.6 verdeutlicht dieses mit fünf paarigen Peaks etwa gleichen Flächeninhaltes und einem singulärem Peak. Eine positive Wertung hätte mit allen ihren möglichen Konsequenzen dem Phänotyp, welcher dieser Probe zugrunde liegt, nicht entsprochen.

Die sechs freien Trisomien 21 waren richtig als positiv erkannt worden. Deren Untersuchung hatte weiterhin gezeigt, daß wie eingangs erwartet kein qualitativer Unterschied zwischen dem Blut Neugeborener und dem Erwachsener besteht. Die übrigen 37 Proben mit einem disomen Chromosomensatz waren ebenfalls korrekt klassifiziert worden, so daß – unter dem Vorbehalt der relativ kleinen Menge an blind untersuchten Proben – die Mikrosatellitenanalyse geeignet erscheint, an Neugeborenen und Erwachsenen eine zuverlässige und schnelle Diagnostik auf eine komplette Trisomie 21 durchzuführen. Die aufwendige Diagnose, bzw. prozentuale Bestimmung eines Mosaikes mit der Karyotypisierung von vielen Zellen, bleibt weiterhin der zytologischen Methode überlassen.

4.2.3 Fruchtwasser

Ziel des Blindversuchs mit den 100 Fruchtwasserproben war zu zeigen, inwieweit die von mir aufgestellte Methode in der Lage ist, bezüglich der Untersuchung auf die Trisomie 21 diagnostische Aussagen zu treffen, die in ihrer Spezifität und Sensitivität der etablierten, aber zeitaufwendigen Methode der Karyotypisierung entsprechen. Gleichzeitig sollten mögliche Fehlerquellen herausgearbeitet werden.

Die erfolgreichen Blindversuche, die mit der hier vorgestellten Methode an kultivierten und nativen Lymphozyten-Proben durchgeführt worden sind, haben das Potential der Mikrosatellitenanalyse deutlich gezeigt. Es ging daher im weiteren darum, auf jegliche Idealisierung der Verhältnisse zu verzichten und unter realitätsnahen Bedingungen zu arbeiten. Daher mußte das Material untersucht werden, dem auch in der Pränataldiagnostik der höchste Stellenwert zukommt: Fruchtwasser. Dieses entstammte Aliquots der Routinediagnostik, die nicht auf spezifische Probleme der PCR hin gesondert behandelt worden waren. Denn nur wenn man die Proben, mit denen später gearbeitet werden soll, in der Entwicklung einsetzt, können Probleme materialspezifischer Natur aufgedeckt werden.

Weiterhin wurde auf eine streng zufällige Auswahl der Proben Wert gelegt, denn in der Praxis ist es auch nicht möglich, diese zu selektieren. So wurde auch rötliches, makroskopisch mit Blut kontaminiertes Fruchtwasser eingesetzt und sogar darauf verzichtet, die Information über eine Kontamination bei der Auswertung zur Verfügung zu haben, so daß die Blinduntersuchung auch eine Aussage über einen möglichen Einfluß der Kontamination durch Blut auf das Ergebnis machen kann; eine Aussage, die durch Wissen um die Verschmutzung verfälscht werden könnte. In der Arbeit von Verma et al. [56] wußten die Untersucher, welche Proben verfärbt waren und nahmen diese aus der Studie heraus. Das ist ein Verfahren, das im praktischen Einsatz nicht durchführbar ist und daher in dieser Arbeit auch keine Anwendung fand.

Das Ergebnis der Blindstudie zeigt, wie auf Seite 35 in Tabelle 3.1 dargestellt

ist, daß unter den gegebenen Bedingungen mit Hilfe der Mikrosatellitenanalyse der Prädiktionswert für eine Trisomie 21 bei ca. 0,44 liegt. Dieser Wert geht mit einer Sensitivität von ca. 0,47 und einer Spezifität von ca. 0,88 einher. Bei diesen Ergebnissen wird deutlich, wie wichtig es war, sich nicht nur auf die Blinduntersuchung der Lymphozyten zu verlassen, sondern Fruchtwasser selbst zu untersuchen. Denn mit einem so geringen positiven Prädiktionswert, sowie einer solch geringen Spezifität und Sensitivität kann keine verlässliche pränatale Diagnostik durchgeführt werden.

Welches sind nun die ausschlaggebenden Faktoren, die die Fruchtwasserproben von den Lymphozyten unterscheiden? Eine Kontamination im Labor wurde ausgeschlossen; in Abschnitt 4.3.2 wird auf diesen Punkt noch eingegangen. Kann die Rotfärbung einzelner Proben ein Faktor sein, der Einfluß auf das Analyseergebnis hat? Um diese Frage beantworten zu können wurden nach Durchführung des Blindversuches die 100 Proben in zwei Gruppen geteilt: Eine Gruppe deren Ausgangsmaterial ohne makroskopische Rotfärbung war und eine andere, deren Ausgangsmaterial eine rötliche Verfärbung aufwies. Unter der Voraussetzung, daß diese Verfärbung keinen Einfluß auf das Analyseergebnis besitzt, wurde die Nullhypothese H_0 formuliert, daß die Spezifität beider Gruppen identisch ist. Zum Vergleich der Gruppen verwende ich den χ^2 -Test. Die beobachteten Häufigkeiten der richtigen und falschen Zuordnungen der rot verfärbten disomen Zellen wurden mit der erwarteten Häufigkeit bei einer Spezifität von 0,98 (Spezifität der Proben ohne makroskopische Rotfärbung) verglichen. Ermittelt wurde ein χ^2 von

$$\chi^2 = \frac{(29 - 38 \times \frac{44}{45})^2}{38 \times \frac{44}{45}} + \frac{(9 - 38 \times (1 - \frac{44}{45}))^2}{38 \times (1 - \frac{44}{45})} \approx 80,56.$$

Die Irrtumswahrscheinlichkeit dieses χ^2 -Wertes mit einem Freiheitsgrad von 1 ist größer als 0,999. Daher kann man die Nullhypothese verwerfen und davon ausgehen, daß die Spezifität der Methode bei Proben mit makroskopischer Rotfärbung signifikant anders ist als die Spezifität der Methode bei Proben ohne makroskopische Rotfärbung.

Über die Sensitivitätsunterschiede in den beiden Gruppen läßt sich keine zuverlässige statistische Aussage machen, da in der Gruppe mit den rot verfärbten Proben nur eine positive Probe war.

Die Art des Unterschiedes zwischen beiden Gruppen liegt darin, daß unter den makroskopisch nicht rot verfärbten Proben eine deutlich geringere Anzahl falsch positiver Diagnosen vorkommt, als in der Gruppe mit den verfärbten Proben. Die Art des Einflusses, den die Verfärbung auf das Ergebnis der Analyse hat, weist auf Kontamination durch DNS hin. Das läßt darauf schließen, daß es sich bei der Rotverfärbung um einen Indikator für mütterliche DNS, also um mütterliches Blut handelt. Kindliches Blut würde auch eine Rotverfärbung des Fruchtwassers verursachen, hätte aber keinen störenden Einfluß auf die Diagnose. Reife Erythrozyten enthalten selbst keine DNS, daher kommen als zelluläre Träger der Kontamination nur mütterliche Lymphozyten in Betracht. Rotes Häm, das noch nicht in andersfarbige Bestandteile abgebaut worden ist, weist auf frisches mütterliches Blut hin, welches durch minimale vaskuläre Verletzun-

gen im Rahmen der Fruchtwasserpunktion – eines invasiven Eingriffs – in das Fruchtwasser übergeht und mit aspiriert wird.

Da es auch unter den Proben, welche auf klarem Fruchtwasser beruhen, Fehlzuordnungen gibt, die sich durch mütterliche Kontamination erklären lassen, kann davon ausgegangen werden, daß mütterliche Zellen zwar vor allem im sichtbar verfärbten Fruchtwasser vorkommen, aber auch weniger frequent und meist in geringerem Ausmaß in nicht verfärbter Amnionflüssigkeit. Makroskopische Rotfärbung ist also ein Zeichen für Kontamination, wohingegen in makroskopisch klaren Fruchtwasserproben Anwesenheit mütterlicher Leukozyten nicht ausgeschlossen werden kann. Hinzu kommt, daß auch geringe störende Einflüsse die Diagnose verfälschen können. In Abschnitt 4.2.3.1 wird die Diagnosefindung bei verunreinigten Proben mit Hilfe der Tabelle 2.7 erörtert, es muß aber das eigentliche Problem, die Kontamination der zur PCR zur Verfügung stehenden Probe, angegangen werden.

Die grünliche Probe war richtig einer negativen Diagnose zugeordnet worden. Die Verfärbung ist auf Mekonium zurückzuführen, welches seine Ursache in einer kindlichen Hypoxie hatte, die über einen höheren CO₂-Wert des Blutes die Darmtätigkeit angeregt. Diese Kontamination führt nicht zu einer Beeinflussung der hier beschriebenen Methode, da es sich hierbei nur um kindliches Material handelt.

Zwei der Proben mit einer Trisomie 21 wiesen eine gelbliche Verfärbung auf, zeigten keine Störungen durch fremde DNS und wurden korrekt zugeordnet. Bei dieser typischen Verfärbung handelt es sich nicht um verdünnte Erythrozyten, sondern um einen Hinweis auf einen gefährlichen Morbus haemolyticus fetalis, der über eine Vermehrung von Bilirubinoiden zu einer Gelbfärbung des Fruchtwassers führt.

Dies bedeutet, daß Verfärbungen des Fruchtwassers nicht immer die gleiche, negative Bedeutung für die PCR-basierende Methode haben, sondern aufgrund der unterschiedlichen Ursachen differenziert betrachtet werden müssen. Eine rote Färbung weist auf mütterliches Blut hin, während eine grünliche Färbung auf Mekonium und eine gelbliche auf den Morbus haemolyticus hinweist. Die beiden letztgenannten Verfärbungen können aber ebensowenig wie die Abwesenheit einer Verfärbung Kontamination durch mütterliche DNS ausschließen.

4.2.3.1 Interpretation der Elektropherogramme

Bei nicht verunreinigten DNS-Proben fallen Meßtoleranzen nicht stark ins Gewicht. Ist aber mit Verunreinigungen des Ausgangsmaterials zu rechnen, wird es schwieriger, verschieden hohe Peaks einer Verunreinigung oder Toleranz zuzuordnen. Mit Hilfe der auf Abbildung 2.7 auf Seite 25 angegebenen Schemata, von denen einige durch Simulation bestätigt worden sind (Abb. 3.8), soll die Zuordnung der Fruchtwasserprobe zur jeweiligen Diagnose nachvollziehbar gemacht werden:

Makroskopisch kontaminierte Proben Die Fruchtwasserprobe auf Abbildung 3.9 zeigt keinen Hinweis auf mütterliche Kontamination und wurde aufgrund

ihrer für jeden Marker etwa gleichgroßen Signale der DNS-Fragmente korrekt als negativ eingeordnet.

Die auf Abbildung 3.10 dargestellte Probe eines Feten mit einer Trisomie 21 zeigt bezüglich eines Markers einen dreifachen Peak. Alle Paare weisen in etwa das gleiche Peak-Integral auf. Daher ist die Probe fälschlich einer Disomie zugeordnet worden. Es ist möglich, daß die Elektropherogramme jedes der fünf Marker nach dem Schema h) beeinflusst worden sind. Dadurch verlagert sich das Verhältnis des großen Signals zum kleinen Signal zugunsten des kleineren Signals und läßt dadurch beide etwa gleich groß erscheinen.

Abbildung 3.11 zeigt eine Fruchtwasserprobe, welche falsch positiv diagnostiziert wurde. Vier Marker zeigen dreifache Signale mit unterschiedlich großen Spitzen, während ein Marker zwei unterschiedlich große Spitzen aufweist. Hierbei wurden die zweifachen Signale nach h) gedeutet und die dreifachen nach g). Retrospektiv kann man die zweifachen Signale c) oder d) und die dreifachen Signale a) zuordnen.

Makroskopisch nicht kontaminierte Fruchtwasserproben Auf Abbildung 3.12 ist eine negative Probe dargestellt, die als negativ diagnostiziert wurde. Es sind keine Anzeichen einer Kontamination vorhanden. 4 Marker sind mit etwa gleichgroßen, zweifachen Signalen dargestellt, ein Marker zeigt ein nichtinformatives, singuläres Signal.

Das Elektropherogramm der Fruchtwasserprobe auf Abbildung 3.13 stellt zwei Marker mit etwa gleich großen, dreifachen Signalen, zwei Marker mit doppelten Signalen im Verhältnis 1:2 und ein singuläres Signal dar. Es zeigen sich keine Hinweise auf eine Kontamination. Mit Hilfe der 4 informativen Marker konnte diese Probe korrekt als Trisomie erkannt werden.

Das Elektropherogramm der positiven Probe auf Abbildung 3.14 wurde als kontaminiert eingestuft und als negativ diagnostiziert. Es stellt sich ähnlich dar wie das Elektropherogramm der negativen Probe auf Abbildung 3.11. Aufgrund der unterschiedlich großen Integrale der dreifachen Signale wurde von einer kontaminierten Probe ausgegangen. Der Marker D21S1437 (blau, im kürzeren Bereich) stellt sich mit einem großen und einem sehr kleinen Peak dar. Diese Konstellation wurde nach Schema d) interpretiert, es liegt aber eher eine Verunreinigung nach Schema i) oder k) vor. Das heißt, auch das Wissen um die Diagnose Trisomie 21 genügt nicht, um zu erkennen, ob der kleinere Peak mütterlich oder kindlich ist. Der Marker D21S1437 (grün, im kürzeren Bereich) erscheint mit zwei Peaks, die etwa im Verhältnis 1:2 zueinander stehen. Während diese bei einer nicht kontaminierten Probe als Zeichen für eine Trisomie gedeutet werden können, wurden sie hier nach c) interpretiert. Es liegt aber wahrscheinlich eine Kontamination nach h) vor. Die Analyse des schwarz dargestellten Markers D21S1435 und des Markers D21S11 (blau, im längeren Bereich) zeigt drei unterschiedlich große Signale, die nach a) interpretiert wurden, es liegt aber eine Kontamination nach Muster f) oder g) für D21S1435 und nach g) für D21S11 vor. Der Marker D21S1446 erscheint mit zwei etwa gleich großen Signalen und wurde nach c) interpretiert. Es liegt aber am ehesten eine Verunreinigung nach Schema h) vor.

Die Fruchtwasserprobe auf Abbildung 3.15, welche falsch positiv diagnostiziert wurde, zeigt, daß trotz einer fehlenden makroskopischen Verunreinigung mütterliche Zellen im Fruchtwasser sein können, die zu einer Fehldiagnose führen können. Vier Marker zeigen unterschiedlich hohe, dreifache Signale, während ein Marker ein uninformatives, singuläres Signal aufweist. Die verschiedenen hohen, dreifachen Signale sind einer mütterlichen Kontamination gemäß Schema f) oder g) zugeordnet gewesen. Nach Auswertung der Ergebnisse ist jedoch eine Kontamination nach a) anzunehmen.

Beurteilung der Kontaminationsschemata Es hat sich in der Auswertung der Fruchtwasserproben gezeigt, daß alle vorkommenden kontaminierten Proben nach den Schemata auf Abbildung 2.7 interpretierbar sind. Viele Elektropherogramm-Schema-Zuordnungen mußten jedoch nach dem Aufdecken des Karyotypes neu getroffen werden, da kein Signal-Muster so distinkt ist, daß es bei einer kontaminierten Probe eindeutig dem Schema einer Disomie oder einer Trisomie zugeordnet werden kann. Weiterhin hat sich gezeigt, daß auch die Frage, ob eine Probe kontaminiert ist oder nicht, nicht durch das Elektropherogramm entschieden werden kann. So blieb die Auswertung der Fruchtwasserproben zu einem hohen Maße subjektiv. Auch das Vorhandensein der mütterlichen Analysedaten würde diesen subjektiven Faktor nur minimal reduzieren.

4.3 Polymerase-Kettenreaktion

4.3.1 Artefakte

In den Elektropherogrammen fallen einige Artefakte auf; so treten vor einigen Peaks kleinere Stotter-Peaks auf, welche auf einen Fehler der Polymerase zurückzuführen sind. Das Integral dieser Peaks ist jedoch stets bedeutend kleiner als das der relevanten Peaks, so daß sie selten störend in Erscheinung treten. Eine weitere Eigenart der PCR zeigt sich darin, daß bei einer Polymerase-Kettenreaktion von zwei oder drei heterozygoten Nukleotidrepeats das kürzere PCR-Produkt ein etwas größeres Integral aufweist als das nächst längere Nukleotidrepeat (siehe Abbildung 3.5). Dies ist eine Folge davon, daß die Polymerase einen kleineren Strang schneller synthetisieren kann als einen langen und so die beiden erzeugten Stränge ihrerseits auch schneller wieder vervielfältigt werden können. Zu einem gewissen Maß kann dieser Effekt durch Konzentrationserhöhung der Taq-Polymerase reduziert werden. Durch eine quantitative PCR wird dieser Effekt ausgeschlossen.

Der Marker D21S1435, in den Elektropherogrammen schwarz dargestellt, zeigt, wie auf Abbildungen 3.12 und 3.13 dargestellt ist, die Eigenschaft etwa 25 Basenpaare vor den eigentlichen Signalen diese verdoppelt in Miniatur wiederzugeben. Diese „Geistersignale“ liegen überwiegend unterhalb, bei wenigen längeren Allelen aber auch innerhalb des Bereichs, in dem der D21S1435 Marker Allele aufweist.

4.3.2 Ausschluß von Kontaminationen im Labor

Das prinzipielle Problem der PCR, wie in Abschnitt 2.6 gezeigt wurde, durch Verunreinigungen bei der Aufarbeitung der Proben beeinflusst zu werden, spielte bei dieser Arbeit keine Rolle. Sowohl PCRs der Leerwerte aus der DNS Aufbereitung, als auch die bei jeder PCR mitgeführten Leerwerte blieben stets negativ. Die Kontaminationen, welche die Fruchtwasseruntersuchung stark beeinflusst hatten, waren vor der Bearbeitung schon in den Proben vorhanden. Eine Verunreinigung der Proben im Labor wird auch durch die Tatsache unwahrscheinlich, daß bei den Lymphozyten, die mit der gleichen Zyklenzahl amplifiziert worden sind, keine Probleme auftraten. Es kam auch nicht bei mehreren Proben zu den gleichen zusätzlichen Peaks, was auf eine allgemeine Kontamination durch ein Individuum hinweisen würde. Weiterhin kam es bei keinem der insgesamt 500 Elektropherogramme von Markern zu zwei zusätzlichen Peaks, wie es durch eine Kontamination von Dritten zu erwarten wäre. Die in der Fruchtwasseranalyse gefundenen Verunreinigungen lassen sich alle den Schemata der mütterlichen Kontaminationen von Tabelle 2.7 zuordnen, welche eine Höchstzahl von 3 Peaks zeigen.

4.3.3 PCR und Zellkultur

Während die Zellkultur mit anschließender Karyotypisierung Auskunft über eine Vielzahl von Chromosomen-Aberrationen gibt, trifft die hier vorgestellte Mikrosatellitenanalyse nur eine Aussage über das Vorliegen einer Trisomie oder Disomie 21. Die Trisomie 21 ist aber mit einer Häufigkeit von etwa 1:500 Lebendgeburten eine der häufigsten chromosomalen Aberrationen und so ist es, besonders bei Risikoschwangerschaften mit einer nochmals höheren Inzidenz, gerechtfertigt, seinen Blick isoliert auf diese Fehlverteilung zu richten.

Die Zeitdauer der Zellkultur stellt einen wesentlichen Nachteil dar. Zwei Wochen sind in der Schwangerschaft für eine Diagnose eine sehr lange Zeit und mit jedem Tag wächst die Belastung der Schwangeren. Dahingegen soll die Untersuchung von amplifizierter DNS die Möglichkeit bieten, binnen ein bis zwei Tagen ein Ergebnis zu liefern. Neben dem bedeutenden Geschwindigkeitsvorteil, welchen die Polymerase-Kettenreaktion bietet, kommt sie auch grundsätzlich mit weniger Material aus, als bei der zytogenetischen Untersuchung notwendig ist. Dies gilt auch für Fruchtwasser, denn statt der etwa 12 ml für die herkömmliche Diagnostik genügen für die hier vorgestellte PCR-basierende Methode 0,5 ml. Eine geringere Menge bedeutet stets eine geringere Beeinflussung des Feten. Eine geringe Menge erlaubt aber auch, von den normalerweise abgenommenen Proben ein Aliquot für die molekulardiagnostische Diagnostik einzusetzen.

Der Nachteil dieser Methode gegenüber der Amnionzellkultur besteht darin, daß die DNS-Isolierung sowohl kindliche als auch mütterliche DNS extrahiert und die PCR kindliche wie mütterliche DNS gleichberechtigt amplifiziert. Bei der Kultur von Amnionzellen herrscht durch die Kulturbedingungen dahingegen eine Selektion der kindlichen Zellen, so daß nach jeder Zellgeneration der Anteil mütterlicher Fibroblasten oder Lymphozyten abnimmt.

Kommt es bei der Fruchtwasserkultur zu einem mangelnden Wachstum der

Zellen, so ist es nicht ausgeschlossen, daß die Kultur mit neuer Amnionflüssigkeit zeitaufwendig wiederholt werden muß. Hier könnte, auch wenn ungenügend Metaphasen vorliegen, der 1. Ansatz durch PCR untersucht werden. Auch bei einer wiederholten Analyse bleibt der zeitliche Vorteil der PCR bestehen.

4.4 **Aussichten**

In Zukunft wird es in immer früheren Schwangerschaftsstadien möglich sein, zur PCR-Untersuchung geeignete fetale Zellen zu gewinnen. Bei allen frühen Untersuchungen sollte aber, gleich welches Material untersucht wird, die Gefahr im Auge behalten werden, daß der Selbstregulation der Natur vorausgegriffen wird und mit einem eventuell positiven Befund Eltern verunsichert werden, welche später durch natürliches Absterben der Leibesfrucht oder der aberranten Zellen gar kein krankes Kind bekommen hätten. So zeigten Snijders et al. [51], daß zum Zeitpunkt der Geburt die Inzidenz für eine Trisomie 21 33 % geringer ist als zur 15.–20. Schwangerschaftswoche und sogar 54 % geringer als in der 9.–14. Schwangerschaftswoche.

Die Möglichkeit der PCR, selbst die DNS einzelner Zellen zu amplifizieren, führte schon zu Versuchen, aus mütterlichem Blut fetale, kernhaltige Zellen zu isolieren, um diese der PCR zuzuführen [24], [19]. Diese Isolationsmethode befindet sich noch im Stadium der Erprobung, zeigt aber im Ansatz bedeutende diagnostische Möglichkeiten auf und kann prinzipiell mit dem hier vorgestellten Panel kombiniert werden.

Weiterhin bietet es sich an, den Einsatz eines Panels von chromosomenspezifischen Markern auch auf die zwei weiteren nicht letalen Trisomien 13 und 18 auszuweiten.

In Zukunft sollte darauf geachtet werden, Reinheit des Untersuchungsmaterials zu wahren. Native und kultivierte Lymphozyten des Kindes sind für die Mikrosatellitenanalyse geeignet, aus Fruchtwasser isolierte Zellsedimente nicht. Bei Verwendung von Fruchtwasser müssen die Amnionzellen des Kindes von den Lymphozyten der Mutter getrennt werden. Es ist möglich, bei der Amniozentese eine erste, blutige Fraktion zu verwerfen, wie aber die Versuche gezeigt haben, garantiert die Abwesenheit einer makroskopischen Verfärbung nicht die Abwesenheit einer Kontamination. Die Anwendung der Pipettenmethode [11], bei der einzelne Amnionzellen zur PCR in ein Reaktionsgefäß überführt werden, kann die Reinheit erhöhen und bietet einen vielversprechenden Ansatz, zusammen mit dem hier erstellten Panel in Zukunft auch Fruchtwasser erfolgreich einer Mikrosatellitenanalyse zu unterziehen.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein diagnostisches System zur Erkennung einer Trisomie 21 zu entwickeln und zu validieren. Das gängigste zur Zeit eingesetzte System zur Trisomie 21 Diagnostik ist die zellkulturbasierte Karyotypisierung. Diese liefert auch über andere Chromosomen Informationen, ist aber sehr zeitaufwendig, was gerade in der Schwangerschaft ein wesentlicher Nachteil ist. Daher wurde nach einem Ansatz, welcher innerhalb von 1–2 Tagen eine Diagnose ermöglichen sollte, gesucht. Hier bot sich die Polymerase-Kettenreaktion an, da mit dieser das Genom nicht durch Zellkultur, sondern schneller in vitro vermehrt und der Diagnose zugeführt werden kann. Zur Unterscheidung zwischen einem und zwei Chromosomen 21 wurden die Tri- und Tetrarepeatmarker D21S11, D21S1435, D21S1437, D21S1440 und D21S1446 gewählt. Diese zeichnen sich durch Spezifität für Chromosom 21, sowie eine hohe Heterozygotität aus. Weiterhin können diese Marker unter den gleichen PCR-Bedingungen angewendet werden. Durch das Verwenden mehrerer Marker wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, daß mindestens ein Marker auf den vorhandenen Chromosomen 21 unterschiedliche Repeats aufweist, was sich durch ein Verhältnis von 1:1 der amplifizierten Allele bei einer Disomie und 1:1:1 oder 1:2 bei einer Trisomie zeigt. Als Detektionssystem wurde ein Kapillarsequenzierer mit Genescan Anwendung gewählt, da dieser bei einer Auflösung von 1–2 Basenpaaren Proben schnell, sequentiell und ggf. wiederholt mißt. Eine Probe beinhaltete alle fünf Amplifikationsprodukte, sowie einen Größenstandard. Dies konnte trotz einer technischen Beschränkung des Sequenzierers auf 4 Farbstoffe geschehen, da sich Marker, deren Allellängen sich nicht überschneiden, eine Farbe teilen. Während der Entwicklung des Primerpanels und der Untersuchungsbedingungen wurden unter anderem Trisomie 21-Lymphoblasten-Zelllinien des NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository eingesetzt, so daß Ergebnisse reproduzierbar wurden und auch von anderen nachvollzogen werden können.

Eine verblindete Pilotstudie an 21 kultivierten Lymphozyten mit fünf Trisomien zeigte eine Sensitivität und Spezifität der Methode von 1,0.

In einem weiteren Blindversuch an 44 Blutproben mit 6 Trisomien 21 und einem Mosaik 46,XX/47,XX, +21 (Anteil trisomer Zellen ca. 6%) sind alle Trisomien und Disomien richtig zugeordnet worden. Die Probe mit dem Mosaik wurde als negativ klassifiziert.

Eine Blindstudie an 100 streng zufällig ausgewählten, teils mit Blut kontaminierten, abzentrifugierten Fruchtwasserproben, welche den Zellgehalt von ca. 2 ml Fruchtwasser aufwiesen, erbrachte für die hier erarbeitete Methode eine Sensitivität von ca. 0,47 und eine Spezifität von ca. 0,88. Eine nachträgliche Auftrennung der Proben in makroskopisch mit Blut kontaminierte und nicht

kontaminierte Proben zeigte eine signifikante Verbesserung der Spezifität zugunsten der makroskopisch nicht kontaminierten Proben.

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, daß die Mikrosatellitenanalyse in der Lage ist, an Lymphozyten innerhalb von 1–2 Tagen eine zuverlässige Aussage über das Vorliegen einer Di- oder Trisomie 21 zu machen. Bei den Blindversuchen mit Fruchtwasser zeigte sich, daß eine Kontamination des Fruchtwassers durch mütterliches Blut, welches in der Amnionzellkultur keinen negativen Einfluß hat, in der Lage ist, das Ergebnis der auf PCR basierenden Methode empfindlich zu stören.

Der Einfluß mütterlicher DNS beeinträchtigt nicht die prinzipielle Anwendbarkeit der Methode an sich, wie die erfolgreichen Blindstudien an Lymphozyten gezeigt haben, zeigt aber, daß der Beschaffenheit und Reinheit einer Probe ein erhöhtes Maß an Aufmerksamkeit zukommen muß. In Zukunft könnten Mikropipetten eingesetzt werden, um aus kontaminierten Proben einzelne Amnionzellen zur Mikrosatellitenanalyse auszuwählen.

Auch nicht vermehrungsfähige, fixierte Zellen aus einer Lymphozytenkultur sind für die PCR geeignet. Dies ermöglicht, die PCR-Methode auch parallel zur Zytogenetik durchzuführen und dort anfallende kultivierte Zellen zu nutzen.

Literaturverzeichnis

- [1] Adinolfi, M., Sherlock, J., Soothill, P., Rodeck, C. (1995). Molecular Evidence of Fetal-Derived Chromosome 21 Markers (STRs) in Transcervical Samples. *Prenat. Diagn.* 15(1), 35–39.
- [2] Antonarakis, S. E., Down Syndrome Collaborative Group (1991). Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. *N. Engl. J. Med.* 324, 872–876.
- [3] Aula, P., Leisti, J., von Koskull, H. (1973). Partial trisomy 21. *Clin. Genet.* 4, 241–251.
- [4] Ballesta, F., Queralt, R., Gomez, D., Solsona, E., Guitart, M., Ezquerra, M., Moreno, J., Oliva, R. (1999). Parental origin and meiotic stage of non-disjunction in 139 cases of trisomy 21. *Ann. Génét.* 42(1), 11–15.
- [5] Brambati, B., Tului, L., Cislighi, C., Alberti, E. (1998). First 10,000 chorionic villus samplings performed on singleton pregnancies by a single operator. *Prenat. Diagn.* 18(3), 255–266.
- [6] Brugge, K. L., Nichos, M. D., Salmon, D. P., Hill, L. R., Delis, D. C., Aaron, L., Trauner, D. A. (1994). Cognitive impairment in adults with Down's syndrome: similarities to early cognitive changes in Alzheimer disease. *Neurology* 44, 232–240.
- [7] Cadkin, A. V., Ginsberg, N. A., Pergament, E., Verlinski, Y. (1984). Chorionic villi sampling: a new technique for detection of genetic abnormalities in the first trimester. *Radiology* 151(1), 159–162.
- [8] Cantu, J. M., Hernandez, A., Plascencia, L., Vaca, G., Moller, M., Rivera, M. (1980). Partial trisomy and monosomy 21 in an infant with an unusual de novo 21/21 translocation. *Ann. Génét.* 23, 183–186.
- [9] Chou, M. M., Lin, S. K., Ho, E. S. C. (1997). Severe Limb Reduction Defects after Uterine Lavage at 7–8 Weeks' Gestation. *Prenat. Diagn.* 17(1), 77–80.
- [10] Clarke, C. M., Edwards, J. H., Smallpeice, V. (1961). 21-Trisomy/Normal Mosaicism in an Intelligent Child with some Mongoloid Characters. *Lancet* I, 1028–1030.
- [11] Claussen, U. (1980). The Pipette Method: A New Rapid Technique for Chromosome Analysis in Prenatal Diagnosis. *Hum. Genet.* 54, 277–278.

- [12] Crete-Barranger, N. (1993). *Cartographie physique du chromosome 21 : Analyse moleculaire de la region ETS2-D21S55 impliquée dans la pathogenie de la trisomie 21*. Dissertation, Université Paris VII.
- [13] Crété, N., Gosset, P., Théophile, D., Duterque-Coquillaud, M., Blouin, J. L., Vayssettes, C., Sinet, P. M., Créau-Goldberg, N. (1993). Mapping the Down syndrome chromosome region. *Eur. J. Hum. Genet.* 1, 51–63.
- [14] Delabar, J. M. Théophile, D., Rahmani, Z., Chettouh, Z., Blouin, J. L., Prieur, M., Noel, B., Sinet, P. M. (1993). Molecular mapping of 24 features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur. J. Hum. Genet.* 1, 114–124.
- [15] Down, J. L. H. (1866). Observation on an ethnic classification of idiots. *Clin. Lecture Reports* 3, 259–262.
- [16] Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H. D., Lang, H. (1974). Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *Eur. J. Biochem.* 47, 91–97.
- [17] Edgar, D. B. (1974). *DNA Polymerase From an Extreme Thermophile: Thermus aquaticus*. Dissertation, University of Cincinnati.
- [18] von Eggeling, F., Freytag, M., Fahsold, R., Horsthemke, B., Claussen, U. (1993). Rapid detection of trisomy 21 by quantitative PCR. *Hum. Genet.* 91, 567–570.
- [19] von Eggeling, F., Michel, S., Kunert, C., Claussen, U. (1997). Cultivated fetal nucleated erythrocytes isolated from maternal blood: a source for non-invasive parental diagnosis? *Med. Genetik* 9(1), 96.
- [20] Eiben, B., Goebel, R., Hansen, S., Hammans, W. (1994). Early amniocentesis – a cytogenetic evaluation of over 1500 cases. *Prenat. Diagn.* 14(6), 497–501.
- [21] Elias, S., Price, J., Dockter, M., Wachtel, S., Tharapel, A., Simpson, J. L. (1992). First-trimester prenatal diagnosis of trisomy 21 in fetal cells from maternal blood. *Lancet* 340, 1033.
- [22] Ella, R., Speich, N., Passarge, E., Grzeschik, K.-H. (1997). Pre and Postnatal Diagnosis of Trisomy 21 by Means of Micro-satellite Analysis. *Med. Genetik* 9(1), 97.
- [23] Genome Database (1996). URL: <http://www.gdb.org>.
- [24] Gänshirt-Ahlert, D., Börjesson-Stoll, R., Burschyk, M., Dohr, A., Garritsen, H. S., Helmer, E., Miny, P., Velasco, M., Walde, C., Patterson, D., Holzgreve, W. (1993). Detection of fetal trisomies 21 and 18 from maternal blood using triple gradient and magnetic cell sorting. *Am. J. Reprod. Immunol.* 30, 194–201.
- [25] Jackson, J. F., North III, E. R., Thomas, J. G. (1976). Clinical diagnosis of Down's syndrome. *Clin. Genet.* 9, 483–487.

- [26] Jahoda, M. G., Brandenburg, H., Reuss, A., Cohen-Overbeek, T. E., Wladimiroff, J. W., Los, F. J., Sachs, E. S. (1991). Transcervical (TC) and transabdominal (TA) CVS for prenatal diagnosis in Rotterdam: experience with 3611 cases. *Prenat. Diagn.* 11(8), 559–561.
- [27] Karg, C., Schmorl, G. (1893). *Atlas der pathologischen Gewebelehre in mikrophotographischer Darstellung*. Vogel, Leipzig, Tafel VI.
- [28] Ko, T. M., Hwa, H. L., Tseng, L. H., Lin, Y. W., Cheung, Y. P. (1998). Fluorescence microsatellite analysis to study the parental origin of the supernumerary chromosome in Down's syndrome. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 61(2), 149–153.
- [29] Korenberg, J. R., Chen, X. N., Schipper, R., Sun, Z., Gonsky, R., Gerwehr, S., Carpenter, N., Daumer, C., Dignan, P., Disteché, C. et al. (1994). Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(11), 4997–5001.
- [30] Korenberg, J. R., Kawashima, H., Pulst, S.-M., Ikeuchi, T., Ogasawara, N., Yamamoto, K., Schonberg, S. A., West, R., Allen, L., Magenis, E., Ikawa, K., Taniguchi, N., Epstein, C. J. (1990). Molecular definition of a region of chromosome 21 that causes features of the Down syndrome phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 47, 236–246.
- [31] Lejeune, J., Gautier, M., Turpin, R. (1959). Etude des chromosomes somatique de neuf enfants mongoliens. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 248, 1721–1722.
- [32] Lejeune, J., Gautier, M., Turpin, R. (1959). Les chromosomes humains en culture de tissu. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 248, 602–603.
- [33] Leschot, N. J., Verjaal, M., Treffers, P. E. (1985). Risks of midtrimester amniocentesis; assessment in 3000 pregnancies. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 92(8), 804–807.
- [34] Mattei, J. F., Mattei, M. G., Baeteman, M. A., Giraud, F. (1981). Trisomy for the region 21q223: Identification by High-Resolution R-Banding Patterns. *Hum. Genet.* 56, 409–411.
- [35] Meinel, K., Guntermann, E. (1998). Transparente 3D-Sonographie bei fetalen Fehlbildungen. *Ultraschall-Med.* 19(3), 120–125.
- [36] Murken, J. (1997). Pädiatrische Genetik und teratogene Fruchtschädigung. In: von Harnack, G.-A., Koletzka, B. (Hg.), *Kinderheilkunde*, 10. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, S. 29.
- [37] Mutton, D., Alberman, E., Hook, E. B. (1996). Cytogenetic and epidemiological findings in Down syndrome, England and Wales 1989 to 1993. National Down Syndrome Cytogenetic Register and the Association of Clinical Cytogeneticists. *J. Med. Genet.* 33(5), 387–394.

- [38] Nützenadel, W. (1997). Erkrankungen des Verdauungstraktes. In: von Harnack, G.-A., Koletzka, B. (Hg.), *Kinderheilkunde*, 10. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, S. 434.
- [39] Park, J. P., Wurster-Hill, D. H., Andrews, P. A., Cooley, W. C., Graham, J. M. (1987). Free proximal trisomy 21 without the Down's syndrome. *Clin. Genet.* 32, 342–348.
- [40] Passarge, E. (1994). *Taschenatlas der Genetik*. Thieme, Stuttgart, New York, S. 342.
- [41] Pinkel, D., Straume, T., Gray, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2934–2938.
- [42] Price, J. O., Elias, S., Wachtel, S. S., Klinger, K., Dockter, M., Tharapel, A., Shulman, L. P., Phillips, O. P., Meyers, C. M., Shook, D. et al. (1991). Prenatal diagnosis with fetal cells isolated from maternal blood by multiparameter flow cytometry. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165(6 Pt 1), 1731–1737.
- [43] Rahmani, Z., Blouin, J.-L., Créau-Goldberg, N., Watkins, P. C., Mattei, J.-F., Poissonnier, M., Prieur, M., Chettouh, Z., Nicole, A., Aurias, A., Sinet, P.-M., Delabar, J.-M. (1990). Down syndrome critical region around D21S55 on proximal 21q22.3. *Am. J. Med. Genet. Suppl.* 7, 98–103.
- [44] Raoul, O., Carpentier, S., Dutillaux, B., Mallet, R., Lejeune, J. (1976). Trisomies partielles du chromosome 21 par translocation maternelle t(15;21)(q26.2;q21). *Ann. Génét.* 19, 187–190.
- [45] Rex, A. P., Preus, M. (1982). A diagnostic index for Down syndrome. *J. Pediatr.* 100(6), 903–906.
- [46] van Rood, G. G., Eernisse, G. (1982). Leukocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature* 181, 1735–1736.
- [47] Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N. (1985). Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* 230(4732), 1350–1354.
- [48] Sargent, I. L., Johansen, M., Chua, S., Redman, C. W. G. (1994). Clinical Experience: Isolating Trophoblasts from Maternal Blood. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 731, 154–161.
- [49] Schaefer, H.-E., Riede, U.-N., Herbst, E. W. (1995). Leukozyten. In: Riede, U.-N., Schaefer, H.-E. (Hg.), *Allgemeine und Spezielle Pathologie*, 4. Aufl. Thieme, Stuttgart, New York, S. 545.
- [50] Sharma, V., Litt, M. (1992). Tetranucleotide repeat polymorphism at the D21S11 locus. *Hum. Mol. Genet.* 1(1), 67.

- [51] Snijders, R. J. M., Holzgreve, W., Cuckle, H., Nicolaides, K. H. (1994). Maternal Age-Specific Risks for Trisomies at 9–14 Weeks' Gestation. *Prenat. Diagn.* 14, 543–552.
- [52] Southern, E. M. (1979). Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 100(2), 319–323.
- [53] The Cooperative Human Linkage Center (1996).
URL: <http://www.chlc.org>.
- [54] The Perkin-Elmer Corporation (1995). GeneScan Chemistry Guide. Part. Number 903560.
- [55] Valenti, C., Kehaty, T. (1969). Culture of cells obtained by amniocentesis. *J. Lab. Clin. Med.* 73(2), 355–358.
- [56] Verma, L., Macdonald, F., Leedham, P., McConachie, M., Dhanjal, S., Hultén, M. (1998). Rapid and simple prenatal DNA diagnosis of Down's syndrome. *Lancet* 352, 9–12.
- [57] Vintzileos, A. M., Campbell, W. A., Guzman, E. R., Smulian, J. C., Mclean, D. A., Ananth, C. V. (1997). Second-Trimester Ultrasound Markers for Detection of Trisomy 21: Which Markers Are Best? *Obstet. Gynecol.* 89(6), 941–944.
- [58] Waardenburg, P. J. (1932). Das menschliche Auge und seine Erbanlagen. In: Lotsy, J. P., Kooiman, H. N. (Hg.), *Bibliographia Genetika*, Bd. VII. Martinus Nijhoff, 's Gravenhage, S. 47.
- [59] Wachtel, S., Elias, S., Price, J., Wachtel, G., Phillips, O., Shulman, L., Meyers, C., Simpson, J. L., Dockter, M. (1991). Fetal cells in the maternal circulation: Isolation by multiparameter flow cytometry and confirmation by PCR. *Hum. Reprod.* 6(10), 1466–1469.
- [60] Watson, J. D., Crick, F. H. C. (1953). A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171(4356), 737–738.
- [61] Williams, C. A., Frias, J. L., McCormick, M. K., Antonorakis, S. E. (1990). Clinical, cytogenetic, and molecular evaluation of a patient with partial trisomy 21 (21q11-q22) lacking the classical Down syndrome phenotype. *Am. J. Med. Genet. Suppl.* 7, 110–114.
- [62] Williams, J. D., Summit, R. L., Martens, P. R., Kimbrell, R. A. (1975). Familial Down syndrome due to t(10;21) translocation: evidence that the Down phenotype is related to trisomy of a specific segment of chromosome 21. *Am. J. Hum. Genet.* 27, 478–485.
- [63] Wilson, R. D. (2000). Amniocentesis and chorionic villus sampling. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 12(2), 81–86.

- [64] Zwahr, C., Voß, P., Kistner, G. (1994). Nichtinvasiver Serum-Test (NIS) zur pränatalen Erfassung von Morbus Down, anderen chromosomalen Anomalien und offenen Neuralrohrdefekten - Eine prospektive Studie. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 54, 355–361.

Index

- α -Fetoprotein 5
- β -HCG 5
- Aberration
 - chromosomal 1f., 11, 46
- Abort
 - ~gewebe 6
 - ~rate 4
 - induziert 4
- Absorptionsmaximum 19
- Agarosegel 16, 18
- Allele
 - elektrophoretische Darstellung 29
 - Heterozygotität 39
 - Längenbereich 16, 17
- Alter der Mutter 1
- Alzheimersche Erkrankung 2
- AmnioMax 10, 11
- Amnion
 - ~höhle 9
 - ~zellen 3
 - DNS-Extraktion 23, 27
 - Gewinnung 47
 - Kultur 10, 11, 23, 46, 50
 - Mikropipetten 50
 - prospektive Untersuchung 7
- Amniozentese 4
 - Durchführung 9, 47
 - Indikation 3
 - Risiko 4
 - Schwangerschaftsstadium 4
- Amphotericin 10
- Amplifikation 27
 - ~produkte 28, 49
 - interferieren der Primer 18
- Aneuploidie *siehe* Chromosom oder Trisomie 21
- Anodenpuffer 19, 21
- Azur-Eosin-Methylenblaufärbung 10, 13
- Bestrahlung
 - Mikrowellen 15, 27
 - UV 22
- Bilirubinoide 43
- Blasensprung
 - vorzeitig 4
- Blepharitis 3
- Blindstudie 23
 - Aussage über Kontamination 41
 - Ausschluß wegen Koagulation 30
 - Blut 23, 30, 32
 - Ergebnisse 35, 40f., 49
 - Fruchtwasser 24f., 34
 - Auswertung 32
 - Lymphozyten 32
 - Ziel 7
- Brachycephalus 3
- Brachydaktylie V 3
- Bromphenolblau 16
- Brushfield-Flecken 3
- Carboxyfluoreszein 16, 19–21
- Carboxyrhodamin 19, 22
- Cervix
 - Lavage 4
- Chorion 9
 - ~gonadotropin *siehe* β -HCG
 - ~zottenbiopsie 4f.
- Chromosom 47
 - ~enanalyse 4
 - ~ensatz 41
 - akrozentrisch 1
 - maternal 4
 - X 5
 - Y 5, 6
 - 12 6
 - 13 47
 - 18 5, 47
 - 21 5, 6, 49
 - Kartierung 18, 39

- spezifische Region 4, 6, 7, 17, 39
- CO₂ 43
- Colcemid 10–12
- Crossing-over 1
- Cycler 18, 22
- Denaturierung 20, 21
- Dermatoglyphen 2, 39
- Desoxyribonukleinsäure *siehe* DNS
- Diagnose
 - falsch negativ 5, 34
 - falsch positiv 5, 34, 42, 44, 45
 - richtig negativ 34, 44
 - richtig positiv 44
- Diagnostik 40, 41, 49
 - invasiv 3f.
 - molekularbiologisch 46
 - nicht invasiv 4f.
 - PCR-basierend 6
 - postpartal 2
 - pränatal 3, 41, 42
- Disomie 21 7, 11, 29, 34, 35, 39, 40
 - DD Trisomie 21 46
- DNS
 - ~-Extraktion 7, 13f., 23, 24, 27, 32, 46, 47
 - Leerwert 23, 24, 32, 46
 - Raum 22
 - Amnionzellen 24
 - amplifiziert 19, 20, 22, 29, 46
 - fetal 31
 - Konzentration 17
 - Lymphoblasten 11, 29
 - Lymphozyten 23, 31
 - maternal 31, 42, 43, 50
 - Struktur 6
- dNTP 15
- Down 1
 - ~-Syndrom 1, 2, 39
 - ~-Region 39
 - Phänotyp 11
- Duodenalstenose 2
- EDTA 10, 12, 14, 16, 27, 28
- Elektrophorese
 - ~kammer 19
 - Gel~ *siehe* Gelelektrophorese
 - Kapillar~ *siehe* Kapillarelektrophorese
- Emissionsmaximum 19
- Epikanthus 2, 3
- Erkrankung
 - pulmonal 1
- Erythroblasten 5, 6
- Erythrozyten 42, 43
 - fetal 40
- Ethidiumbromid 16
- Extremitätenmißbildung 4
- Facies 5, 39
- FAM *siehe* Carboxyfluoreszein
- Fehlverteilung
 - chromosomal 1, 46
- Fibroblasten 1, 4, 46
- FISH 4–6
- Fixativ 10, 12, 13
- Fluoreszenz
 - ~farbstoff 16, 17, 19, 21f., 39
 - ~marker 4
 - ~mikroskop 4
- Formamid 19, 20
- Fragment 6, 7, 39
 - ~analyse 19, 24, 28
 - ~puffer 19
- Fruchtwasser 9f., 11, 12, 14, 23, 29, 32, 35, 41
 - ~untersuchung 5
- Kontamination *siehe* Kontamination
- Menge 6, 46, 49
- Sedimente 47
- Fusion
 - zentrische 2
- G-Bandenfärbung 13
- „Geistersignale“ 45
- Gel 18, 22
 - ~elektrophorese 20, 27, 28
 - ~ladepuffer 16
- Genescan
 - ~-Analyse 23, 32, 34, 39
 - Anwendung 20, 49
 - Kapillare 20

- Polymer 19
- Glycerin 15, 16
- Granulozyten 6

- Harnstoff 19
- Haut
 - ~ödem 5
 - Hypoelastizität 1
- HCl 15, 19
- Heparin-Blut 3, 12, 14, 15, 24–28
- Herzfehler 2, 3
 - Operationsrisiko 2
- Heterozygotizität 31, 32, 39, 45, 49
- HEX *siehe* Carboxyfluoreszein
- Hyperelastizität 3
- Hypotonus
 - muskulär 3, 39
- Hypoxie 43

- Infektionsrisiko 4
- Isolationsmethode 47
- Isopropanol 13, 14

- Kapillar
 - ~elektrophorese 7, 17, 18, 20, 23, 24, 29, 32
 - Auflösung 29, 39
 - Eichung 22
 - Größenstandard 19–21, 29, 39, 49
 - Laufparameter 20, 21, 29
 - Voreinstellungen 21
 - ~sequenzierer 19–22, 39, 49
 - Auflösung 49
 - Kalibrierung 20, 22
 - Meßgenauigkeit 43
- Kleinwuchs 39
- Klinodaktylie 3
- Konjunktivitis 3
- Kontamination
 - amplifizierte DNS 22
 - Ausschluß 15, 24, 32, 42, 46
 - Einfluß auf Diagnose 43
 - makroskopisch 24, 32, 34, 35, 41–43, 47
 - Bilirubinoide 43
 - maternal 32, 34, 42, 43
 - Leukozyten 43
 - Schema 24, 25, 34, 44
 - Simulation 24, 31, 33
 - Vermeidung 22, 47
- Ladepuffer 19
- Längenstandard 16, 22
- Laufpuffer 19, 20
- Lebenserwartung 1, 2
- Leukämie
 - akute 2
- Leukozyten 6
 - ~-Antikörper 6
 - Konzentration 24
- Linsentrübung 2
- Lymphoblasten
 - ~-Zelllinien 11, 15, 29, 49
 - kultiviert 14
- Lymphozyten 27, 34, 50
 - ~-DNS 31
 - ~kultur 3, 11, 12, 23, 50
 - Analyse 47, 49
 - aus koaguliertem Blut 30
 - Blindstudie 42
 - im mütterlichen Blut 6
 - Kontamination 42, 46
 - kultiviert 14, 23, 32, 40
 - fixiert 40
 - prospektive Untersuchung 7
 - trisom 32
- Meiose
 - Non-disjunction 1f., 24
- MgCl₂ 15
- Mikropipetten 50
- Mikrosatelliten 7
 - ~analyse 32, 34, 40, 41, 46, 50
 - Anwendungsbereiche 47
 - Geschwindigkeit 40
 - Grenzen 40
 - Prädiktionswert 42
- Mikrowellenextraktion 15, 27
 - Leerwert 27
- Mitose
 - Färbung 13
- Mosaik *siehe* Trisomie 21
- Nackenfalte 3, 5
- Na₂HPO₄ 10, 13

- Nabelschnurblut 23
- NaOH 19
- Nukleotidrepeatmarker 16, 17, 21
- Analyse 20, 22
 - Artefakte 45
 - D21S11 15, 16, 17, 32, 44, 49
 - D21S1435 16, 17, 32, 44, 45, 49
 - D21S1437 16, 17, 32, 44, 49
 - D21S1440 16, 17, 32, 39, 49
 - D21S1446 16, 17, 32, 44, 49
 - D21S55 39
 - Elektropherogramm 29, 34, 49
 - Heterozygotität 29
 - Länge 29
 - Panel 17, 47
 - Anordnung 28, 39
 - Anwendung 29
 - Etablierung 23, 49
 - Kombination mit anderen Methoden 47
- Östriol 5
- PBS 10, 11, 13–15, 24
- PCR 6, 15, 17, 18f., 20, 22–24, 28, 32, 43, 45
- ~-Ansatz 15, 23
 - ~-Bedingungen 49
 - Annealingtemperatur 18
 - Extensionstemperatur 18
 - Zyklen 17, 18, 22, 46
 - ~-Produkte 21
 - Mengenverhältnisse 31
 - ~-System 7
 - Artefakte 45
 - Aussichten 47
 - Automatisation 17
 - bei wenigen Metaphasen 47
 - DNS-Menge 28
 - Eignung 27
 - Geschwindigkeitsvorteil 46, 49
 - Leerwert 23, 24, 32
 - mögliche Kontaminationen 46
 - Raum 22
 - Reagenzien 15
 - Vor- und Nachteile 46
- Peak *siehe* Signal
- Penicillin 10
- Phytohämagglutinin 11
- Pipettenmethode 47
- Polymer 19
- Polymerase-Kettenreaktion *siehe* PCR
- Prädiktionswert
- Fruchtwasseruntersuchung 42
- Primer 17
- ~sequenz 16
 - Auswahl 39
 - Farbstoffmarkierung 21
 - gegenseitige Beeinflussung 18
 - Konzentration 15
- Proteinase K 14
- Sandalenlücke 3
- Schwangerschaftsstadium 4, 5
- Sensitivität 32, 34, 49
- Fruchtwasseruntersuchung 42
 - für Mosaik 40
 - Vergleich 41, 42
- Sequenzierer *siehe* Kapillarsequenzierer
- Signal 44
- Artefakte 32, 34, 44, 45f.
 - Beurteilung 45
 - Intensität 29
 - Interpretation 43f.
 - Verhältnis der Integrale 29, 44, 45
 - Y-spezifisch 6
 - Zuordnung zu Marker 39
- Simulation
- maternale Kontamination 24, 31, 43
- Small Tandem Repeats 39
- Sörensenpuffer 10
- Spektralkurven 22
- Spezifität 32, 34, 42, 49
- Fruchtwasseruntersuchung 42
 - Vergleich 41
- Synzytiotrophoblast 5
- TAMRA *siehe* Carboxyrhodamin
- Taq
- ~-Polymerase 17, 45

- Antikörper 15
- TET *siehe* Carboxyfluoreszein
- Thermus aquaticus* *siehe* Taq
- Translokation
 - ~strisomie 1, 32
 - Risiko 40
 - Diagnostik 40
 - reciprok 2
 - Robertson'sche 1
- Triplettest 5
- Trisomie 21 1f.
 - Blutproben 23f., 30
 - DD Disomie 21 34, 39, 40, 45, 46
 - Elektropherogramme 29, 44
 - Fruchtwasserproben 34f., 41
 - Häufigkeit 1, 40, 46, 47
 - Karyotypisierung 2
 - Klinik 2
 - Mosaik 30, 40f., 49
 - Diagnostik 41, 49
 - Häufigkeit 2
 - Phänotyp 30, 32
 - Untersuchung 23
 - partiell 2, 39
 - Pränataldiagnostik 3, 4, 6, 32, 42
 - Zelllinien 11, 49
- Trophoblasten 4, 5
- Trypsin 10, 13
- Tuberkulose 1

- Ultraschalldiagnostik 5

- Verblindung 23
- Verunreinigung *siehe* Kontamination
- Vierfingerfurche 2, 3
- Vorderwandplazenta 9

- Zell
 - ~dichte 13
 - ~en
 - fetal in maternalem Blut 5, 6
 - maternal 43, 45
 - ~gewinnung 4
 - ~konzentration 12, 24
 - ~kultur 2, 4, 13, 23, 40, 49
 - Eignung 30
 - Vor- und Nachteile 46
 - Zeitaufwand 41, 46, 47, 49
 - ~linien *siehe* Lymphoblasten-Zelllinien
 - ~sedimente 47
- Zytokeratin-Antikörper 5

Danksagungen

Herrn Professor Dr. Grzeschik, Medizinisches Zentrum für Humangenetik, Klinikum der Philipps-Universität Marburg, und seinen Mitarbeitern für Annahme und Betreuung dieser Arbeit

Herrn Dr. Speich für Anleitung und Unterstützung

Herrn Professor Dr. Giesing und Frau Professor Dr. Gödde, Gemeinschaftspraxis für Laboratoriumsmedizin und Humangenetik, Recklinghausen, für Bereitstellung von Arbeitsplatz und Materialien

Herrn Professor Dr. Passarge, Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen, für die Bereitstellung von Arbeitsplatz, sowie Lymphozyten- und Blutproben

Herrn Dr. Grill, Universitäts-Frauenklinik Ulm, für die Bereitstellung von Fruchtwasserproben

Herrn Dr. Wiegand, Mülheim a. d. Ruhr, für die Bereitstellung von Blutproben

