

Aus der Universitätskinderklinik  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg  
Direktor: Prof. Dr. med. G. Jorch

**Kinetik des Auftretens fetaler DNA im mütterlichen Blut  
während und nach der Schwangerschaft**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von

Maria Barleben

aus

Magdeburg

Magdeburg

2010

## **Dokumentationsblatt**

### Bibliographische Beschreibung:

Barleben, Maria:

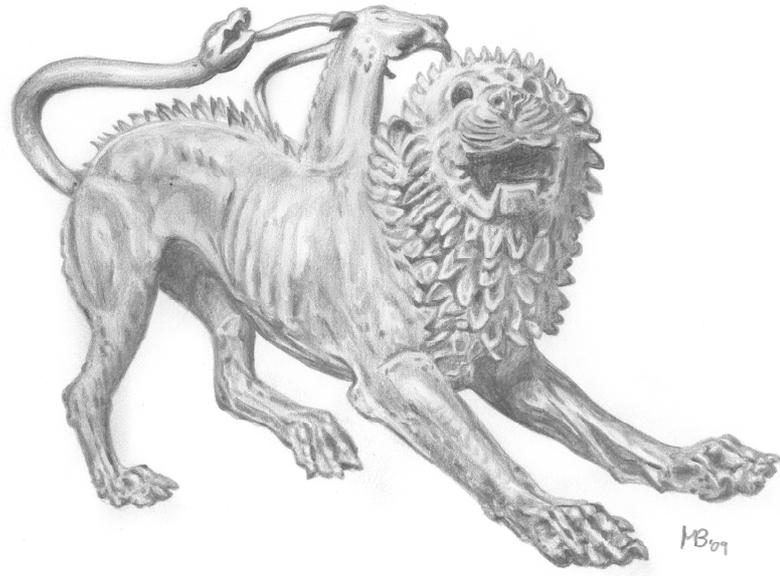
Kinetik des Auftretens fetaler DNA im mütterlichen Blut während und nach der Schwangerschaft. – 2010. – 76 Bl.: 10 Abb., 18 Tab., 1 Anl.

### Kurzreferat

Mit dieser experimentellen Studie wurde die Kinetik des Auftretens fetaler DNA im Blut von 125 Probandinnen während und nach einer Schwangerschaft mit einem männlichen Feten mittels nested PCR einer Y-Chromosom-spezifischen Sequenz (DYS14) untersucht. Hierzu erfolgten Blutentnahmen einmalig bei 17 Schwangeren in der 17.-39. Schwangerschaftswoche, bei 56 Probandinnen zu 1 bis 3 Zeitpunkten im Zeitraum von 24 Stunden vor bis 6 Tage nach der Geburt eines Sohnes sowie einmalig bei 52 Probandinnen, welche 20 Tage bis 36 Jahre zuvor einen Sohn geboren hatten. Y-chromosomale, mutmaßlich fetale DNA konnte ab der 27. und bei allen Probandinnen ab der 29. Schwangerschaftswoche (> 24 Stunden vor Entbindung) nachgewiesen werden. Innerhalb von 24 Stunden vor der Geburt war eine signifikante Reduktion der Nachweisrate DYS14-positiver Proben auf 71,1 % gefolgt von einem weiteren kontinuierlichen Abfall bis auf 21,1 % in den ersten 6 Tagen nach der Entbindung zu verzeichnen. Langzeitpersistente fetomaternale Mikrochimärismen wurden bei 2 Probandinnen (10 Monate bzw. 36 Jahre nach Geburt eines Sohnes) nachgewiesen. Die Arbeit bestätigt den in der Literatur beschriebenen Verlauf mit einer Zunahme nachweisbarer fetaler Erbsubstanz im mütterlichen Blut mit fortschreitender Schwangerschaft und raschem Abfall derselben nach der Geburt sowie das Vorkommen langzeitpersistenter fetomaternaler Mikrochimärismen bei gesunden Frauen. Neu ist die gezeigte Reduktion der Nachweisrate fetaler DNA bereits unmittelbar vor der Geburt. Zudem ist die vorliegende Arbeit die erste, welche das Auftreten fetaler DNA in der mütterlichen Zirkulation ab dem zweiten Trimenon der Schwangerschaft bis Jahrzehnte nach der Geburt mit ein und derselben Methode untersucht hat.

### Schlüsselwörter

Schwangerschaft, fetale DNA, fetomaternale Mikrochimärismen, Kinetik, nested PCR, DYS14



*Meinen Eltern*

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	IV
Symbol- und Abkürzungsverzeichnis .....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis .....	IX
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Thematik.....	1
1.2 Aufbau und Funktion der Plazenta .....	1
1.3 Bidirektionaler Zelltransfer .....	2
1.4 Fetale DNA im mütterlichen Plasma.....	3
1.5 Zustände mit erhöhter fetomaternaler Transfusion .....	5
1.6 Implikationen für die pränatale Diagnostik .....	5
1.7 Mikrochimärismen.....	7
1.8 Fetomaternale Mikrochimärismen und ihre Konsequenzen für die mütterliche Gesundheit .....	10
1.9 Kinetik des Auftretens fetaler Zellen im mütterlichen Blut .....	12
1.10 Kinetik des Auftretens zellfreier fetaler DNA im mütterlichen Plasma.....	14
1.11 Ziel der Studie .....	15
<b>2 Probanden, Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
2.1 Probanden .....	16
2.2 Material.....	17
2.2.1 Untersuchungsmaterial .....	17
2.2.2 Chemikalien.....	18
2.2.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	19
2.3 Methoden .....	20
2.3.1 DNA-Extraktion aus venösem Vollblut .....	20
2.3.2 Konzentrationsbestimmung der extrahierten DNA .....	20
2.3.3 Längenbestimmung der extrahierten DNA.....	21
2.3.4 Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	21
2.3.5 Nested PCR.....	21
2.3.6 PCR-Bedingungen .....	23

---

2.3.7 Agarosegelelektrophorese .....	24
2.3.8 Vorkehrungen zur Vermeidung von Kontaminationen .....	25
2.3.9 Vorversuche .....	25
2.3.9.1 Vorversuch 1 - Lagerungsbedingungen .....	25
2.3.9.2 Vorversuch 2 – Optimierung der PCR-Bedingungen .....	26
2.3.10 Datenverarbeitung .....	27
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>28</b>
3.1 Konzentrations- und Längenbestimmung der extrahierten DNA.....	28
3.2 Vorversuch 1 – Lagerungsbedingungen .....	28
3.3 Vorversuch 2 – Optimierung der PCR-Bedingungen.....	29
3.4 Ergebnisse der Hauptversuche.....	30
3.4.1 Blutentnahme im Verlauf der Schwangerschaft .....	30
3.4.2 Blutentnahme um den Zeitpunkt der Geburt .....	31
3.4.3 Blutentnahme Wochen bis Jahre nach der Geburt eines Sohnes.....	35
3.4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Hauptversuchen .....	36
<b>4 Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
4.1 Zur Methode der Arbeit .....	37
4.2 Nachweis fetaler DNA im mütterlichen Blut im Verlauf der Schwangerschaft .....	38
4.3 Abfall der fetalen DNA-Konzentration im mütterlichen Blut unmittelbar vor der Geburt .....	40
4.4 Nachweis fetaler DNA im mütterlichen Blut in den Tagen nach der Geburt...	41
4.5 Langzeitpersistente fetomaternale Mikrochimärismen .....	43
4.6 Fazit .....	45
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>47</b>
Literaturverzeichnis .....	X
Danksagung .....	XXII
Erklärung .....	XXIII
Darstellung des Bildungsweges .....	XXIV
Tabellenanhang .....	XXV

## Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGS	Adrenogenitales Syndrom
bp	Basenpaare
BS	Blasensprung
βHCG	β-Untereinheit des humanen Choriongonadotropin
CFS	<i>Charge flow seperation</i> (Zellseparation im elektrischen Feld)
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Differenzierungsmarker an der Oberfläche von Zellen)
DAZ	<i>Deleted in azoospermia</i> (bei Azoospermie deletiertes Gen auf dem Y-Chromosom)
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphate (umfasst dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>Et alteri</i> (und andere)
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FG	Frühgeburt
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i> (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)
g.e.	<i>Genome equivalents</i> (Genomäquivalente)
Gpt	Gigapartikel
HbF	Fetales Hämoglobin
HLA	Humanes Leukozytenantigen
kb	Kilobasen
Konz.	Konzentration
M	Molar (Mol/l)
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i> (magnetische Zellseparation)
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Mon.	Monat
mRNA	<i>Messenger (Boten-) RNA</i>
Nr.	Nummer

---

OD	Optische Dichte
p	Wahrscheinlichkeitswert (Index für statistische Signifikanz)
PAPC	<i>Pregnancy-associated progenitor cells</i> (schwangerschaftsassozierte Vorläuferzellen)
<i>p.c.</i>	<i>Post conceptionem</i> (nach der Empfängnis)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
Rh	Rhesus-Proteine
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
<i>rpm</i>	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
SRY	<i>Sex determining region of Y</i> (die das Geschlecht bestimmende Region auf dem Y-Chromosom)
SS	Schwangerschaft
SSW	Schwangerschaftswoche
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
U	<i>Unit</i> (Enzymeinheit)
<i>vs.</i>	<i>Versus</i> (gegen)
vorz.	Vorzeitig
♀	Weiblich
♂	Männlich
®	Registrierter Produktname

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Chimäre.....	8
Abb. 2.1	Verwendete Primer .....	22
Abb. 2.2	Gelfoto einer nested PCR.....	25
Abb. 3.1	Ergebnisse der Studiennummern 61 bis 68 (Blutentnahme im Verlauf der Schwangerschaft) und 6-4 (Blutentnahme 10 Monate nach der Geburt) ....	31
Abb. 3.2	Ergebnisse der Studiennummern 4 bis 6 (Blutentnahme um den Zeitpunkt der Geburt) .....	32
Abb. 3.3	Ergebnisse der Studiennummern 23 bis 25 (Blutentnahme im Verlauf der Schwangerschaft) sowie 26 und 27 (Blutentnahme um den Zeitpunkt der Geburt) .....	32
Abb. 3.4	Ergebnisse der Studiennummern 69 bis 81 (Blutentnahme innerhalb von 24 Stunden vor der Geburt).....	33
Abb. 3.5	Ergebnisse – Blutentnahme innerhalb 24 Stunden vor Entbindung .....	34
Abb. 3.6	Ergebnisse der Studiennummern 44, 45 und 49 (Blutentnahme Jahre nach der Geburt), 46 und 54 (Blutentnahme innerhalb von 24 Stunden vor der Geburt) sowie 47 und 48 (Blutentnahme im Verlauf der Schwangerschaft).....	35
Abb. 3.7	Kinetik der Nachweisrate fetaler Erbsubstanz im mütterlichen Blut im Verlauf der Schwangerschaft und nach der Geburt .....	36

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 2.1	Verwendete Kits.....	18
Tab. 2.2	Allgemeine Chemikalien .....	18
Tab. 2.3	Biochemikalien .....	18
Tab. 2.4	Puffer.....	18
Tab. 2.5	Geräte .....	19
Tab. 2.6	Verbrauchsmaterialien .....	19
Tab. 2.7	Testansatz für primäre und sekundäre PCR.....	23
Tab. 2.8	PCR-Programm.....	24
Tab. 2.9	Testansatz für Vorversuch 1 .....	26
Tab. 2.10	PCR-Programm für Vorversuch 1 .....	26
Tab. 3.1	Vorversuch 1 - Lagerungsbedingungen.....	29
Tab. 3.2	Vorversuch 2 - Optimierung der PCR-Bedingungen.....	30
Tab. 3.3	Ergebnisse – Blutentnahme im Verlauf der Schwangerschaft.....	31
Tab. 3.4	Ergebnisse – Blutentnahme um den Zeitpunkt der Geburt.....	33
Tab. 3.5	Abhängigkeit der Nachweisrate Y–chromosomaler DNA im um den Entbindungszeitpunkt gewonnenen mütterlichen Blut vom Gestations- alter bei Geburt .....	34
Tab. I	Blutentnahme im Verlauf der Schwangerschaft .....	XXV
Tab. II	Blutentnahmen um den Zeitpunkt der Geburt .....	XXVI
Tab. III	Blutentnahme Wochen bis Jahre nach der Entbindung .....	XXVIII

# 1 Einleitung

## 1.1 Thematik

Eine phylogenetisch früh entwickelte Eigenschaft der Säugetiere zum Schutze des embryonalen Organismus ist die Separierung des fetalen vom mütterlichen Blutkreislauf. Die Trennung zwischen beiden Zirkulationssystemen ist jedoch inkomplett. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass während jeder normalen Schwangerschaft fetale Zellen in den mütterlichen Kreislauf übertreten und umgekehrt auch mütterliche Blutzellen die Plazentaschranke passieren. Außerdem wurde freie fetale *DNA* im Plasma Schwangerer nachgewiesen. Seit einiger Zeit weiß man, dass fetale Progenitorzellen jahrzehntelang im Organismus der Mutter persistieren können.

Die vorliegende Arbeit soll einen Überblick über das Auftreten und die Nachweisbarkeit fetaler Erbsubstanz im mütterlichen Blut während verschiedener Phasen im Verlauf der Schwangerschaft sowie nach der Geburt schaffen.

## 1.2 Aufbau und Funktion der Plazenta

Die Plazenta bildet die Interaktionsfläche zwischen fetalem und mütterlichem Organismus. Dabei bestehen ihre Funktionen vor allem im Austausch von Wasser, Gasen, Nährstoffen und anderer im Blut gelöster Substanzen sowie in der Produktion von Hormonen. Außerdem ist sie in entscheidendem Maße an immunologischen Regulatorvorgängen zur Verhinderung der Abstoßung des Feten beteiligt. Nach ihrer Entstehung aus dem Trophoblasten entwickelt und differenziert sich die Plazenta parallel zu den wachsenden Versorgungsansprüchen des Feten bis zum Ende der Schwangerschaft. Dabei vergrößert sich die maternofetale Austauschfläche und wird durchlässiger, wobei sich die Austauschstrecke verkürzt. Die reife Plazenta wiegt etwa 500 g bei einem Durchmesser von ca. 20 cm. Sie besteht zum einen aus fetalem Gewebe (*Pars fetalis*), welches den Zotten des *Chorion frondosum* entspricht, zum anderen aus der vom mütterlichen Endometrium gebildeten *Decidua basalis* (*Pars materna*). Zwischen fetaler Chorionplatte und mütterlicher Basalplatte befindet sich der intervillöse Raum. Dieser wird durch leistenartige Vorsprünge der Basalplatte in 15 bis 20 Felder (Kotyledonen oder Plazentonen) unterteilt, die jeweils eine Strömungseinheit darstellen und über die Spiralarterien der Gebärmutter mit mütterlichem Blut gespeist werden. Die in diese Fel-

der hineinwachsenden Chorionzotten enthalten im reifen Stadium Kapillaren mit fetalem Blut. Über synzytiokapilläre Membranen, welche die Zottenoberfläche bilden und fetales von mütterlichem Blut trennen, erfolgt ab der vierten Gestationswoche der Stoffaustausch zwischen mütterlichem und fetalem Organismus [154, 155].

### 1.3 Bidirektionaler Zelltransfer

Das Bild der Plazenta als eine natürliche Barriere, die genetisch verschiedene Organismen voneinander trennt und einen Austausch von Zellen nicht zulässt, ist längst überholt. Bereits im Jahre 1893 postulierte der Dresdener Pathologe CHRISTIAN GEORG SCHMORL den Übertritt fetaler Zellen in den mütterlichen Kreislauf, nachdem er bei einer an Eklampsie verstorbenen Frau Trophoblastzellen in pulmonalen Gefäßen entdeckt hatte [85]. Um neue Erkenntnisse hinsichtlich Rhesus-Sensibilisierung und der Pathogenese des Morbus haemolyticus neonatorum zu erlangen beschäftigten sich ab der Mitte des 20. Jahrhunderts zahlreiche Forschungsgruppen mit der Passage fetaler Erythrozyten. Die fetomaternale Transfusion als Ursache für akute oder chronische Neugeborenenanämien diagnostizierte man zu dieser Zeit über den Nachweis von Zellen mit fetalem Hämoglobin (HbF) im mütterlichen Blut, aus deren Anteil sich der kindliche Blutverlust berechnen ließ [157]. DESAI und CREGER lieferten im Jahre 1963 erste Hinweise für einen transplazentaren Übertritt mütterlicher Leukozyten und Thrombozyten in den fetalen Kreislauf. Sie injizierten Schwangeren einige Stunden vor der Entbindung zuvor *in vitro* mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte körpereigene Blutzellen und wiesen anschließend in 6 von 9 Fällen die fluoreszierenden mütterlichen Zellen im kindlichen Nabelschnurblut mittels Fluoreszenzmikroskopie nach [39]. WALKNOWSKA *et al.* gelang im Jahre 1969 erstmals der Nachweis fetaler Zellen im Blut schwangerer Frauen durch Identifikation ihres männlichen Chromosomensatzes. Wenn auch die von ihnen angewandte Methode der Chromosomenanalyse noch recht ungenau war, so stellt die Grundidee doch eine wichtige Basis für die heute gängigen Methoden zur Detektion fetaler Zellen in der mütterlichen Zirkulation dar.

Heute weiß man, dass im Rahmen jeder normalen Schwangerschaft regelmäßig fetale Zellen in den mütterlichen Kreislauf übertreten und umgekehrt auch maternale Zellen im kindlichen Blut nachgewiesen werden können [57, 95, 97, 107]. Den ersten Beweis für bidirektionalen Transfer kernhaltiger Zellen lieferten Lo *et al.* im Jahre 1996 mit der Untersuchung von Mutter-Kind-Paaren nach der Entbindung [97]. Mittels *PCR*-

Diagnostik gelang ihnen in 26 von 51 Fällen die Detektion fetaler zellulärer *DNA* im mütterlichen peripheren Blut und in 16 von 38 Fällen die Amplifikation von maternalen Sequenzen in fetalem Nabelschnurblut.

Es stellte sich schließlich die Frage nach der Art der in die maternale Zirkulation übertretenden Zellen. Von verschiedenen Forschungsgruppen wurden im mütterlichen Blut Trophoblastzellen [111], kernhaltige rote [17, 93, 145] und weiße Blutzellen [149], hämatopoetische Progenitorzellen [54, 93] sowie mesenchymale und hämatopoetische Stammzellen [117] fetaler Abstammung gefunden. WACHTEL *et al.* zeigten mit Hilfe von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, dass etwa 30 % der über Separation im elektrischen Feld (CFS) aus dem Blut Schwangerer zwischen der 7. und 25. SSW gewonnenen kernhaltigen Erythrozyten fetalen Ursprungs sind [145]. GUETTA *et al.* fanden bei allen von 22 untersuchten, mit einem männlichen Fetus schwangeren Frauen zwischen der 15. und 25. Schwangerschaftswoche männliche CD 34+ Zellen (hämatopoetische Progenitorzellen) in einer durchschnittlichen Menge von 13 Zellen pro 20 ml Blut [54]. Fetale mesenchymale Stammzellen wurden von O'DONOGHUE *et al.* bei einer von 20 untersuchten Frauen zwischen der 7. und 13. Schwangerschaftswoche nachgewiesen [117].

#### **1.4 Fetale DNA im mütterlichen Plasma**

Die Tatsache, dass seit den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts Tumor-*DNA* durch molekulare Techniken im Plasma und Serum von Krebspatienten nachgewiesen werden kann, veranlasste LO *et al.* 1997 nach fetaler *DNA* im mütterlichen Plasma und Serum zu suchen [94]. Sie postulierten, dass während der Schwangerschaft neben dem zellulären Übertritt auch ein bidirektionaler Transfer von Plasma-*DNA* stattfindet, welcher das Ausmaß des zellulären Transfers sogar überschreitet [94, 100]. Mithilfe quantitativer *real-time PCR* untersuchten sie diesen bidirektionalen und bimodalen transplazentaren Austausch [95]. Mütterliche kernhaltige Zellen wiesen sie in 24 % und Plasma-*DNA* in 30 % der untersuchten Nabelschnurblutproben nach, während fetale kernhaltige Zellen in 26 % und fetale zellfreie *DNA* in 100 % der untersuchten mütterlichen Blutproben gefunden wurden. Die fraktionellen Konzentrationen freier fetaler *DNA* im mütterlichen Plasma und freier mütterlicher *DNA* im fetalen Plasma lagen jeweils um ein bis zwei Zehnerpotenzen über den fraktionellen Konzentrationen zellgebundener *DNA* ( $3 \times 10^{-3}$

vs.  $2,6 \times 10^{-4}$  mütterliche/fetale *DNA* im fetalen Blut bzw.  $3 \times 10^{-2}$  vs.  $3,2 \times 10^{-4}$  fetale/mütterliche *DNA* im mütterlichen Blut).

Die genaue Herkunft der zellfreien plasmatischen *DNA* wird derzeit noch diskutiert. VAN WIJK *et al.* postulierten, dass fetale *DNA* aus fetalen oder plazentaren Zellen stammt, welche einen programmierten Zelltod (Apoptose) durchlaufen, und daher der größte Teil der Nukleinsäuren vermutlich in membranumschlossenen Vesikeln, sog. Apoptosekörperchen, im mütterlichen Blut zirkuliert [25, 143]. In der Literatur finden sich weitere Hinweise über die Plazenta oder fetale Erythrozyten als Hauptquelle der zellfreien fetalen *DNA* im mütterlichen Plasma [3, 95, 147]. Aber auch der direkte Transfer fetaler *DNA* über die Ausscheidung von Sekreten via Niere oder Lunge in die Amnionflüssigkeit wird diskutiert [147]. LO *et al.* begründeten ihre Hypothese, dass ein Großteil der fetalen Erbsubstanz aus Trophoblastzellen freigesetzt wird, mit der deutlich höheren Frequenz des Auftretens freier fetaler *DNA* im Blut der Mutter im Vergleich zum umgekehrten Phänomen [95]. Andere Hinweise für einen plazentaren Ursprung stellen die schnelle Elimination zellfreier *DNA* nach Beendigung der Schwangerschaft bei in einigen Fällen nachgewiesener jahrelanger Persistenz fetaler Zellen im mütterlichen Organismus sowie der Nachweis von spezifischen *mRNA*-Transkripten für die plazentaren Hormone hPL und  $\beta$ -HCG im maternalen Plasma dar. Schließlich konnte auch eine positive Korrelation zwischen fetaler *DNA*-Menge im Plasma der Mutter und der Plazentamasse sowie der  $\beta$ -HCG-Konzentration nachgewiesen werden [147]. Es gibt jedoch auch Argumente für eine Freisetzung der fetalen *DNA* aus in den mütterlichen Kreislauf übergetretenen fetalen Blutzellen. Das gleichzeitige Auftreten fetaler Zellen und fetaler zellfreier *DNA* in der mütterlichen Zirkulation und der gleichzeitige vermehrte Nachweis beider Fraktionen unter bestimmten (pathologischen) Umständen sprechen ebenso dafür wie die Tatsache, dass ein großer Teil intakter fetaler Blutzellen sowohl in der mütterlichen Zirkulation als auch bereits in den Umbilikalgefäßen apoptotisch wird und die beherbergte Erbsubstanz freigibt. Dennoch gibt es scheinbar keine Korrelation zwischen der Frequenz der Nachweisbarkeit bzw. der Menge nachweisbarer zellfreier *DNA* und intakter Zellen fetaler Herkunft im Blut der Mutter [65, 95, 147]. Da fetale *DNA* bereits in einem sehr frühen Stadium der Schwangerschaft im mütterlichen Kreislauf nachgewiesen werden kann, in welchem die fetoplazentare Zirkulation noch nicht ausgebildet ist, scheint sie zumindest in dieser Phase vorwiegend trophoblastischer Herkunft zu sein [147].

### 1.5 Zustände mit erhöhter fetomaternaler Transfusion

Unter bestimmten Umständen kommt es zu einer vermehrten fetomaternalen Transfusion während der Schwangerschaft. So wurden nach elektiven Schwangerschaftsabbrüchen [16], Spontanaborten [74] und Interventionen im Verlauf der Gravidität [123] erhöhte fetale Zellzahlen im mütterlichen Blut beschrieben. Insbesondere im Anschluss an Interruptiones nach der 9. Schwangerschaftswoche lassen sich zudem erhöhte Konzentrationen fetaler *DNA* im mütterlichen Plasma nachweisen, was sich mit der Entwicklung plazentarer Gefäße zu diesem Zeitpunkt erklären lässt, welche durch den Eingriff zerstört werden [147].

Abnormalitäten der Plazenta führen zu vermehrtem bidirektionalem Zelltransfer und erhöhten Konzentrationen freier fetaler *DNA* im mütterlichen Plasma. Dieses Phänomen wurde u.a. in Fällen von Präeklampsie, HELLP-Syndrom und intrauteriner Wachstumsverzögerung durch Plazentainsuffizienz nachgewiesen [3, 4, 1, 96]. Bei symptomatischen präeklampsischen Patientinnen wurde eine fünffach erhöhte mittlere Konzentration fetaler *DNA* im Vergleich zu gesunden Schwangeren gleicher Gestationswoche festgestellt [96]. Als Ursache nimmt man eine vermehrte Freisetzung aus pathologischem Plazentagewebe in Verbindung mit einer verminderten Elimination der *DNA* bei gestörter Leber- und Nierenfunktion an [25, 96, 147]. Auch in Verbindung mit Frühgeburtlichkeit und Hyperemesis gravidarum wurden erhöhte fetale Plasma-*DNA*-Konzentrationen in mütterlichen Plasmaproben nachgewiesen, wobei auch hier eine vermehrte Freisetzung aus durch ein überaktives Immunsystem zerstörten Trophoblasten als ursächlich betrachtet wird [91, 136]. Zudem wurden im Zusammenhang mit fetomaternaler Hämorrhagie und Polyhydramnion, aber auch mit fetalen Aneuploidien, wie den Trisomien 21 und 13 erhöhte Konzentrationen fetaler zellgebundener und zellfreier *DNA* im mütterliche Blut beobachtet [18, 43, 78, 106, 129].

### 1.6 Implikationen für die pränatale Diagnostik

Mit der Entdeckung fetaler Zellen und *DNA* im mütterlichen Blut begann die Erforschung und Entwicklung neuer Methoden zur pränatalen Diagnostik. Dabei scheinen Verfahren, welche freie fetale *DNA* im Plasma nutzen, besonders erfolgversprechend zu sein, begründet zum einen durch die hohe Verfügbarkeit der Nukleinsäuren im Vergleich zu der geringen Zahl fetaler Zellen im peripheren Blut der Schwangeren, zum

anderen durch die niedrige Halbwertszeit der fetalen *DNA* im mütterlichen Plasma, wodurch Einflüsse früherer Schwangerschaften weitgehend ausgeschlossen werden können. Inzwischen haben zwei Hauptanwendungen Einzug in die Routinediagnostik einiger Kliniken erhalten: Die Feststellung des fetalen Rhesusstatus sowie die kindliche Geschlechtsbestimmung [44, 150].

Eine frühe Geschlechtsdeterminierung ist beispielsweise bei X-chromosomal vererbten Erkrankungen (z. B. Muskeldystrophie Duchenne, Hämophilie) von Bedeutung. Im Falle des autosomal rezessiv vererbten adrenogenitalen Syndroms (AGS) wird dadurch eine frühzeitige Indikationsstellung für den Beginn einer Dexamethasonbehandlung der Mutter zur Reduktion einer Virilisierung bei Mädchen ermöglicht. Eine Geschlechtsbestimmung über die Amplifikation Y-Chromosom-spezifischer Sequenzen aus peripherem mütterlichen Blut gelingt laut verschiedener Studienergebnisse bereits im ersten Trimenon mit bis zu 100 %iger Genauigkeit [5, 13, 122, 133, 141]. Dank dieser nicht-invasiven Methode können Risiken, welche mit jeder der konservativen invasiven Verfahren (Korionzottenbiopsie, Amniozentese) verbunden sind, umgangen werden.

Die pränatale Bestimmung des fetalen Rhesusstatus bei Rh-negativen Schwangeren bietet die Möglichkeit, das Risiko der Entwicklung eines *Morbus haemolyticus neonatorum* bzw. eines *Hydrops fetalis* zu einem frühen Zeitpunkt der Schwangerschaft abzuschätzen und im Falle eines Rh-negativen Feten unnötige invasive Diagnostik und therapeutische Interventionen zu vermeiden. Über die Extraktion und Amplifikation fetaler *DNA* aus dem Plasma 137 Schwangerer gelang es FINNING *et al.* den Rhesusstatus des Ungeborenen schon im ersten Trimenon mit hundertprozentiger Treffsicherheit zu bestimmen [45]. Eine solche nicht-invasive Methode wird in mehreren europäischen Ländern bereits als Teil der Routinediagnostik bei Rh-negativen Müttern eingesetzt [44, 106, 129].

Die Tatsache, dass bestimmte pathologische Zustände in der Schwangerschaft, bei denen die plazentare Perfusion gestört ist, mit erhöhten fetalen Zellzahlen bzw. erhöhten fetalen *DNA*-Konzentrationen im mütterlichen Plasma einhergehen (s. 1.5), bietet einen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer diagnostischer Methoden zur Früherkennung solcher Komplikationen [107]. Es konnte gezeigt werden, dass die erhöhte fetale *DNA*-Konzentration im maternalen Plasma bei Präeklampsiepatientinnen bereits vor dem Auftreten klinischer Symptome nachzuweisen ist und dass eine Korrelation der Konzentrationswerte zum Ausmaß der pathologischen Schädigung besteht [96, 152].

Auch für Aneuploidien und Einzelgendefekte gibt es Bestrebungen, nicht-invasive diagnostische Verfahren auf dem Boden der Detektion fetaler *DNA* im mütterlichen Plasma zu entwickeln [35, 102, 106, 129, 140]. Verschiedene Forschungsgruppen fanden erhöhte Konzentrationen freier und zellgebundener *DNA* im Blut Schwangerer mit von Trisomie 21 betroffenen Feten [19, 43, 49, 108, 148]. FARINA *et al.* berichteten von einer Steigerung der Sensitivität des gegenwärtig routinemäßig durchgeführten Quadrupel-Tests (Alpha-Fetoprotein,  $\beta$ -HCG, unkonjugiertes Östradiol und Inhibin-A) von 81% auf 86% durch die zusätzliche Anwendung ihres quantitativen *PCR*-Verfahrens zum Nachweis fetaler *DNA* und schlugen zudem die Prüfung von fetaler *DNA* als ersten Serummarker für die Trisomie 13 vor [43]. MAVROU *et al.* fanden erhöhte Zahlen mutmaßlich fetaler kernhaltiger Erythrozyten im Blut Schwangerer mit nachgewiesenen Aneuploidien des Feten (Trisomien 21 und 13, Turner-Syndrom) im Vergleich zu solchen mit normalem Chromosomensatz [108].

Über die Untersuchung freier fetaler *DNA* im mütterlichen Plasma konnten experimentell auch genetische Erkrankungen, wie zystische Fibrose [53],  $\beta$ -Thalassämie [32, 60], myotone Dystrophie [6], Achondroplasie [92], AGS [34] und Chorea Huntington [28] erfolgreich diagnostiziert bzw. ausgeschlossen werden.

### 1.7 Mikrochimärismen

Fetale hämatopoetische Progenitorzellen, BIANCHI *et al.* prägten hierfür den Begriff der *pregnancy associated progenitor cells (PAPC)*, können im mütterlichen Blutkreislauf noch Jahrzehnte nach Geburt des Kindes persistieren [11, 20, 42, 84]. BIANCHI *et al.* berichteten im Jahre 1996 erstmals von einer Langzeitpersistenz fetaler Progenitorzellen im mütterlichen Blut bei 6 von 8 untersuchten Frauen bis zu 27 Jahre nach der Geburt [20]. Umgekehrt persistieren auch maternale Zellen im kindlichen Organismus bis in das Erwachsenenalter. Dieses Phänomen wurde zunächst bei immundefizienten Kindern erkannt [121]. Inzwischen können maternale Mikrochimärismen regelhaft auch bei gesunden Menschen nachgewiesen werden [50, 82, 103, 104].

Der Begriff Chimärismus entstammt der griechischen Mythologie (griechisch: *chímaira* = Ziege). HOMER beschreibt in der Ilias eine Kreatur mit den Köpfen eines Löwen, einer Ziege und einer Schlange oder eines Drachen [156] (**Abb. 1.1**). ANDERSON *et al.* prägten den Begriff Chimärismus für die Medizin und definierten ihn als einen Organismus

dessen Zellen von mindestens zwei Zygoten abstammen. Die phänotypischen Auswirkungen reichen von dem Vorhandensein verschiedener Blutgruppen oder HLA-Typen bis hin zu unterschiedlich gefärbten Augen oder Hautarealen und gar intersexuellem Genitale im Falle tetragametischer Chimärismen (Fusion von zwei durch jeweils ein Spermium befruchtete Eizellen) [40].



**Abb. 1.1: Chimäre:** Bleistiftzeichnung nach der etruskischen Bronzestatue von Arezzo, M. Barleben

Als Mikrochimärismus bezeichnet man das Vorhandensein einer kleinen Anzahl von Zellen eines fremden Organismus in einem Individuum. Dem kann, wie oben beschrieben der bidirektionale Zelltransfer während einer Schwangerschaft zugrunde liegen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Mikrochimärismen bei beiden Geschlechtern auftreten. Männer erhalten Stammzellen ihrer Mutter, Frauen sowohl von der Mutter als auch von ihren Kindern [22]. Andere Quellen stellen Organtransplantationen, Bluttransfusionen oder feto-fetale Transfusionen bei Zwillingsschwangerschaften dar [89, 134, 135, 142, 146].

Neben den oben genannten Ursachen, die zu vermehrter fetomaternaler Transfusion führen, wirken sich verschiedene andere Faktoren begünstigend auf die Entstehung von fetomaternalen Mikrochimärismen aus. Beispielsweise scheint die Histokompatibilität (HLA-Kompatibilität) zwischen Mutter und Fetus Ausmaß und Frequenz ihres Auftretens zu beeinflussen.[114, 26]. Das Vorhandensein bestimmter HLA-Haplotypen, wie HLA DQA1\*0501 wird ebenfalls mit einem vermehrten Auftreten fetomaternaler Mikrochimärismen in Verbindung gebracht [82]. Auch Aborte und elektive Schwangerschaftsabbrüche in der Anamnese scheinen die Frequenz des Auftretens von Mikrochimärismen zu erhöhen. Hierbei kommt es bereits in einem frühen Entwicklungsstadium

des Feten zu einer beträchtlichen fetomaternalen Transfusion mit Übertritt von fetalen Progenitorzellen, welche in dieser frühen Phase erstens noch in größerer Zahl im fetalen Blut vorhanden sind (Maximum im zweiten Trimenon) und zweitens möglicherweise noch über eine höhere Proliferations- und Differenzierungskapazität verfügen als die bei einer Geburt übertragenen Blutzellen [16, 29, 30, 74].

Postpartal wurden männliche, mutmaßlich fetale Zellen im maternalen *CD34+*-Kompartiment nachgewiesen [20, 54]. Außerdem wurden sie im peripheren mütterlichen Blut als T-, B- und natürliche Killerzellen identifiziert, was eine Differenzierung entlang der hämatopoetischen Entwicklungsreihe impliziert [11, 42, 73]. Im mütterlichen Gewebe wurden fetale Zellen als Hepatozyten [72, 73], Nierentubulusepithelzellen [77], Kardiomyozyten [14, 77], Endothelzellen, Thyreozyten [36, 73, 132] und intestinale Epithelzellen [73] nachgewiesen.

Wie verbreitet Mikrochimärismen bei gesunden Frauen sind, zeigt eine Studie von KOOPMANS *et al.*. Mithilfe von *FISH*-Analysen untersuchten sie histologisch unauffällige Autopsiepräparate von 75 Frauen mit bekannter Geburten- und Transfusionsanamnese. Sie fanden Y-Chromosom-haltige Zellen in 13 von 51 Nieren-, 10 von 51 Leber-, und 4 von 61 Herzpräparaten. Allerdings stellten sie keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Rate positiv getesteter Organe zwischen Frauen, die mindestens einen Sohn geboren hatten und kinderlosen Frauen sowie zwischen Frauen mit und ohne Bluttransfusionen in der Anamnese fest [77]. In anderen Publikationen findet man Angaben über rund 20 % bis mehr als 70 % gesunder Frauen mit nachweisbaren langzeitpersistenten Mikrochimärismen [11, 36, 42, 52, 87].

Bis zum jetzigen Zeitpunkt bleibt nicht sicher geklärt, aus welchen Zelltypen die differenzierten mikrochimären fetalen Zellen hervorgehen. BIANCHI *et al.* gelang es, sowohl lymphoide Vorläuferzellen als auch undifferenzierte pluripotente hämatopoetische Stammzellen mit männlicher Erbsubstanz aus mütterlichem Blut zu isolieren [20]. O'DONOGHUE *et al.* zeigten, dass einige der *pregnancy associated progenitor cells* (*PAPC*) wahrscheinlich mesenchymale Stammzellen sind. Aus dem Knochenmark von 9 Frauen, welche 13 bis 51 Jahre zuvor einen Sohn geboren hatten, kultivierten sie männliche mesenchymale Stammzellen. Es gelang ihnen schließlich diese Zellen in Fett-, Muskel-, Nerven- und Knochenzellen differenzieren zu lassen [116]. Außerdem wird vermutet, dass es sich bei einem Teil der *PAPC* um endotheliale Progenitorzellen oder plazentare Stammzellen handelt [109, 120].

KHOSROTEHRANI *et al.* untersuchten Gewebeproben aus Organen mit nachgewiesenem Mikrochimärismus (Schilddrüse, Zervix, Gallenblase, Darm, Leber, Milz und Lymphknoten) hinsichtlich des Phänotyps der mikrochimären Zellen und zeigten, dass diese zum Teil sowohl das Leukozytenantigen *CD45* als auch nicht-hämatopoetische Epithelzellmarker und Hepatozytenmarker exprimieren. Dies unterstützt die Hypothese der Herkunft dieser Zellen aus der hämatopoetischen Reihe und der späteren Transdifferenzierung in verschiedenen Organen der Mutter [73].

### **1.8 Fetomaternale Mikrochimärismen und ihre Konsequenzen für die mütterliche Gesundheit**

Bereits DESAI und CREGER spekulierten im Jahre 1963, nachdem sie den maternofetalen Transfer von Leukozyten nachweisen konnten, über die Möglichkeit einer Langzeitpersistenz pluripotenter mütterlicher Lymphozyten und Ausbildung von maternofetalen Chimärismen, bis hin zur Auslösung einer Graft-versus-host-Reaktion mit Parallelen zu einigen sog. „Autoimmun“-Erkrankungen [39].

Im Jahre 1996 stellte NELSON die Hypothese auf, Krankheiten, von welchen vorwiegend Frauen betroffen sind, könnten auf dem Vorhandensein fetomaternaler Mikrochimärismen beruhen, ebenfalls mit der Vorstellung, dass die semiallogenetischen fetalen Zellen im mütterlichen Organismus eine Art Graft-versus-Host-Erkrankung auslösen [115]. In der Folge wurden eine Reihe von Studien durchgeführt mit dem Ziel, diesen Zusammenhang für die verschiedensten pathologischen Zustände nachzuweisen, von denen Frauen häufiger als Männer betroffen sind.

Bei Patienten mit systemischer Sklerodermie wurden im Vergleich zu gesunden Probandinnen eine erhöhte Nachweisrate bzw. erhöhte Konzentrationen männlicher, mutmaßlich fetaler zellulärer *DNA* sowohl im Blut, als in Haut-, Speicheldrüsen- und anderen Gewebeproben gefunden [8, 12, 70, 113, 125]. SAWAYA *et al.* entdeckten, dass sich in klinisch noch nicht betroffenen Hautpartien von Sklerodermiepatientinnen im Vergleich zu läSIONALER Haut mehr mikrochimäre Zellen und weniger inflammatorische Zellen nachweisen ließen und schlussfolgerten dass die mikrochimären Zellen an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt sein könnten [125].

Bei anderen Autoimmunerkrankungen, wie der primär biliären Zirrhose [38, 51, 127], dem systemischen Lupus erythematosus [75, 80], dem isolierten Sjögren-Syndrom [8,

41, 139] oder autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen [27, 76, 132] wird eine Assoziation mit dem Auftreten von Mikrochimärismen jedoch kontrovers diskutiert. Andererseits wurden fetale Zellen auch in größerer Zahl im pathologisch veränderten Gewebe von Lebern Hepatitis-C-Kranker sowie in Operationspräparaten von verschiedenen benignen und malignen Tumoren gefunden [31, 36, 72, 132].

Man begann die Vorstellung zu entwickeln, dass Frauen im Rahmen einer Schwangerschaft über den fetomaternalen Zelltransfer unter anderem auch Stammzellen bzw. Progenitorzellen ihres ungeborenen Kindes erhalten, welche in ihrem Organismus persistieren, um noch während der Schwangerschaft oder Jahre später in pathologisch veränderte Organe einzuwandern, dort zu für das jeweilige Organ spezifischen Zellen zu differenzieren und eine Reparaturfunktion im geschädigten mütterlichen Gewebe auszuüben [22, 36, 118, 132].

Im Jahre 2001 gelang es SRIVATSA *et al.* mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung männliche Zellen im thyroidalen Gewebe einer Frau nachzuweisen, welche unter einer nichtentzündlichen adenomatösen Hyperplasie der Schilddrüse litt. Rein morphologisch waren diese Zellen nicht von den normalen follikulären Schilddrüsenzellen zu unterscheiden. Immunhistochemisch jedoch konnte gezeigt werden, dass XY-positive Zellen aus gesunden Anteilen des Operationspräparates den Leukozytenmarker *CD45* exprimierten, während sich männliche Zellen im pathologischen Schilddrüsengewebe als positiv für Zytokeratin, einen epithelialen Marker, erwiesen. Dies implizierte die Vermutung, dass fetale Zellen, welche im Rahmen der Schwangerschaft mit einem Sohn in den Organismus der Frau gelangt waren, als *CD45*-positive hämatopoetische Zellen in die Schilddrüse eingewandert waren, um schließlich im defekten Gewebe des Organs zu differenzieren [132].

Im Rahmen einer von JOHNSON *et al.* durchgeführten Studie wurden mittels FISH tausende von männlichen Zellen in Teilen eines Leberbiopsates einer Patientin mit Hepatitis C gefunden. Nach Isolation der *DNA* konnte über eine Amplifikation von *short-tandem-repeat*-Sequenzen gezeigt werden, dass es sich um fetale Zellen aus einer 20 Jahre zuvor elektiv abgebrochenen Schwangerschaft handelte. Über die gleiche Methode konnte der wahrscheinliche Vater des Feten identifiziert werden, dessen Zellen sich in der Leber der Mutter angesiedelt hatten [72].

Die Bedeutung fetaler Mikrochimärismen im Zusammenhang mit malignen Tumorerkrankungen wird aktuell ebenfalls kontrovers diskutiert. Im peripheren Blut und gesunden Gewebe von Patientinnen mit Mammakarzinomen, papillären Schilddrüsenkarzinomen und anderen Malignomen wurden fetale chimäre Zellen in geringerer Frequenz im Vergleich zu gesunden Frauen nachgewiesen, woraus auf einen protektiven Effekt dieser Zellen geschlossen wurde [36, 48, 47, 52]. Andererseits fand man im mütterlichen Tumor- im Vergleich zu gesunden Gewebe häufiger fetale Zellen, denen von einigen Forschern sowohl eine immunologische Überwachungsfunktion gegenüber den allogenetischen Tumorzellen als auch eine reparative Rolle zugeschrieben wird [36, 37, 86]. Andere spekulieren jedoch, dass infolge von Mutationen oder äußeren Einflüssen ein Verlust der regulativen Kontrolle von Proliferation und Differenzierung der pluripotenten fetalen Zellen zu einer Beteiligung an der Pathogenese von Malignomen führen könnte [126].

Nach dem heutigen Erkenntnisstand der Wissenschaft lässt sich also spekulieren, dass fetalen Progenitorzellen im mütterlichen Organismus einerseits möglicherweise eine triggernde oder unterhaltende Rolle bei der Pathogenese bestimmter Erkrankungen zukommt, andererseits spricht ihr Vorhandensein in geschädigtem Gewebe für eine Reparaturfunktion dieser Zellen. Sollten die fetalen Stammzellen im Erwachsenen einen kompetitiven Vorteil gegenüber adulten Stammzellen haben, wären fetomaternale Mikrochimärismen sogar eine mögliche Erklärung für die höhere Lebenserwartung von Frauen gegenüber Männern [22, 116].

### **1.9 Kinetik<sup>1</sup> des Auftretens fetaler Zellen im mütterlichen Blut**

Der plazentare Zelltransfer beginnt bereits in der Frühschwangerschaft. Fetale Blutzellen werden ab der 4. Schwangerschaftswoche initial im Dottersack gebildet, zirkulieren jedoch nicht bevor das Herz in der 5. Gestationswoche zu schlagen beginnt. Fetale Blutgefäße sind erst ab der 8. SSW im Stroma der Chorionzotten vorhanden. Bereits ab der 4. SSW sind die Lakunen des Trophoblasten mit mütterlichem Blut gefüllt, und abgestoßene Trophoblastzellen gelangen so direkt in den mütterlichen Kreislauf [138]. ARIGA *et al.* gelang der Nachweis fetaler Zellen im mütterlichen Blut ab der 6. Schwangerschaftswoche [9].

Mit zunehmenden Gestationsalter steigt laut einigen Studien die Zahl fetaler Zellen in der maternalen Zirkulation [59, 62, 64]. Im zweiten Trimenon beträgt sie bei normalen Schwangerschaften im Durchschnitt etwa 1-6 je Milliliter peripheren Blutes [19, 54, 64, 79].

KUO beobachtete einen Anstieg der Zahl fetaler Erythrozyten bis zu einem Peak im zweiten Trimenon, gefolgt von einem diskreten Abfall am Ende der Schwangerschaft [81]. HAMADA *et al.* konnten mittels *FISH*-Analyse einer Y-Chromosom-spezifischen Sequenz (*DYS1*-Familie) bei allen 35 untersuchten, mit einem männlichen Fetus schwangeren Frauen ab der 15. SSW das Vorkommen fetaler kernhaltiger Zellen im peripheren Blut nachweisen. Die relative Anzahl dieser Zellen stieg mit zunehmendem Gestationsalter von weniger als einer fetalen Zelle unter 100.000 mütterlichen Zellen bis auf ein Verhältnis von rund 1 zu 10.000 zum Ende der Schwangerschaft an. [59]

Einige Studien zeigen, dass die meisten fetalen Zellen innerhalb von zwei bis drei Tagen nach der Geburt aus der mütterlichen Zirkulation eliminiert werden [58, 138]. Dagegen konnten ARIGA *et al.* zelluläre fetale DNA bis 39 Tage nach Entbindung im mütterlichen Blut nachweisen [9]. Im Jahre 2001 veröffentlichten OSADA *et al.* eine Studie, die an 15 Erstgebärenden durchgeführt wurde. Sie kultivierten mononukleäre Zellen aus peripherem Blut der Mütter zu fünf verschiedenen Zeitpunkten innerhalb eines Jahres nach Geburt ihres Sohnes und untersuchten die gesammelten Kolonien hinsichtlich fetaler Herkunft mittels *nested PCR* unter Amplifikation einer für das Y-Chromosom spezifischen Sequenz (*SRY*). Die durchschnittliche Zahl fetaler Progenitorzellkolonien pro Milliliter mütterlichen Blutes lag am Tag der Geburt bei 1,63, vier Tage post partum bei 2,48 und fiel anschließend über 0,56 nach einem Monat und 0,12 nach sechs Monaten bis auf null nach einem Jahr ab [119].

Wie unter 1.7 beschrieben, persistieren fetale Progenitorzellen in vielen Fällen im mütterlichen Organismus und können noch Jahrzehnte nach der Entbindung mit den heute eingesetzten Methoden bei rund 20 % bis mehr als 70 % gesunder Frauen mit Schwangerschaften in der Anamnese im peripheren Blut nachgewiesen werden [11, 36, 42, 64, 84].

---

<sup>1</sup> Der Begriff Kinetik wird in dieser Arbeit für die Abhängigkeit der Menge bzw. der Nachweisrate fetaler Zellen und fetaler DNA im mütterlichen Blut von der Zeit vor bzw. nach der Entbindung gebraucht.

### 1.10 Kinetik des Auftretens zellfreier fetaler DNA im mütterlichen Plasma

Der früheste Zeitpunkt, zu dem fetale *DNA* im mütterlichen Plasma nachgewiesen werden konnte, ist die vierte Gestationswoche [9, 66]. Einige Forschungsgruppen wiesen mit quantitativen *PCR*-Methoden einen progressiven Anstieg der Kopienzahl fetaler *DNA* in der mütterlichen Zirkulation direkt proportional zum Gestationsalter nach [3, 32, 44, 49, 100], wohingegen andere einen leichten Abfall der im mütterlichen Blut nachweisbaren fetalen *DNA* zwischen dem ersten und zweiten Trimenon feststellten [62, 98, 131]. BIRCH *et al.* fanden einen Anstieg fetaler *DNA*-Konzentrationen im maternalen Plasma mit steigendem Gestationsalter zwischen 1,2 Genomäquivalenten/ml am 37. Gestationstag und 507,5 Genomäquivalenten/ml am 291. Gestationstag. Während die Unterschiede bezüglich fetaler *DNA*-Konzentration zwischen den ersten beiden Trimenen gering waren, konnte ein deutlicher Anstieg im dritten Trimenon verzeichnet werden, verbunden mit einer größeren Streuung der einzelnen Ergebnisse. Extrem hohe Konzentrationswerte wurden bei einer Frau in der 41. SSW gefunden [23]. Auch LO *et al.* berichteten von einem steilen Anstieg der fetalen *DNA*-Konzentration im mütterlichen Blut während der letzten 8 Wochen der Schwangerschaft [100]. CHAN *et al.* spezifizierten dies. Sie untersuchten seriell Plasmaproben von 33 Schwangeren zwischen der 35. und 42. SSW und errechneten eine durchschnittliche Konzentrationszunahme freier fetaler *DNA* von 29,3 % pro Woche in diesem Zeitraum [32].

Die Elimination der freien fetalen Erbsubstanz aus der mütterlichen Zirkulation erfolgt im Gegensatz zu jener fetaler Zellen offenbar rapide nach der Geburt [65, 67, 101]. LO *et al.* konnten unter Verwendung quantitativer *PCR* Analysen des *SRY*-Gens nachweisen, dass freie fetale *DNA* in den meisten Fällen bereits nach 2 Stunden aus der mütterlichen Zirkulation eliminiert wird und errechneten bei acht Wöchnerinnen eine mittlere Halbwertszeit der Nukleinsäure von 16,3 Minuten. Außerdem zeigten sie, dass im menschlichen Plasma vorkommende Nukleasen wahrscheinlich nur teilweise am Abbau der fetalen Nukleinsäuren beteiligt sind. Organe, die darüber hinaus für die Elimination verantwortlich sein könnten sind Leber, Niere und Milz [101]. Dagegen konnten HUI *et al.* bei Frauen mit vaginaler Entbindung und Wehentätigkeit, nicht jedoch bei Frauen mit elektiver Sectio caesaria zellfreie fetale *DNA* noch an den ersten beiden Tagen post partum nachweisen. Sie erklären dies mit einer Freisetzung zellfreier *DNA* aus Trophoblastengewebe im Rahmen einer kontraktionsinduzierten Hypoxie bzw. eines mechani-

schen Traumas oder einer verstärkten fetomaternalen Hämorrhagie im Zusammenhang mit Wehentätigkeit [63].

### 1.11 Ziel der Studie

Verschiedene Forschungsgruppen untersuchten den Beginn des transplazentaren Zelltransfers und zeigten, dass fetale *DNA* ebenso wie fetale Zellen bereits während des ersten Trimenons in der mütterlichen Zirkulation nachzuweisen sind. Andere Wissenschaftler bestimmten die Konzentrationen fetaler *DNA* im mütterlichen Blut in Abhängigkeit vom Gestationsalter, widmeten sich dem postpartalen Abbau der fetalen zellgebundenen wie zellfreien *DNA* im mütterlichen Blut direkt nach der Entbindung oder der Langzeitpersistenz fetomaternaler Mikrochimärismen. All diese Untersuchungen tragen zum Verständnis des Ausmaßes und Verlaufs des fetomaternalen Zell- und Nukleinsäuretransfers sowie der Entstehung und Bedeutung fetomaternaler Mikrochimärismen bei. Bisher findet sich jedoch keine Studie, welche die Kinetik des Auftretens fetaler *DNA* im mütterlichen Blut im Verlauf der Schwangerschaft, um den Zeitpunkt der Entbindung und über mehrere Jahre nach der Geburt mit Hilfe einer einzigen Methode darstellt.

Die meisten Protokolle enthalten quantitative *PCR*-Verfahren und liefern uns eine gute Vorstellung über die absoluten und relativen Konzentrationen fetaler *DNA* im Blut der Mutter während verschiedener Phasen prä- und postpartal. Allerdings wurden viele dieser Studien an relativ kleinen Probandenkollektiven durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, unter Verwendung einer einfachen nichtquantitativen *PCR*-Methode möglichst viele Frauen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während und nach einer Schwangerschaft zu untersuchen um die Kinetik des Auftretens fetaler *DNA* in der mütterlichen Zirkulation über einen weit gefassten Zeitraum von der Schwangerschaft bis mehrere Jahre nach der Geburt zu erfassen.

## 2 Probanden, Material und Methoden

### 2.1 Probanden

Für die Untersuchung der Kinetik des fetomaternalen Zell- bzw. *DNA*-Transfers während der Schwangerschaft wurden 17 Schwangere mit männlichen Feten zwischen der 17. und 39. SSW, die sich von Mai bis September 2006 in der Schwangerenberatung der Universitätsfrauenklinik Magdeburg vorstellten oder stationär in die Klinik aufgenommen wurden, rekrutiert. Die fetale Geschlechtsbestimmung erfolgte initial mittels Ultraschalldiagnostik und wurde retrospektiv überprüft. Den Probandinnen wurden einmalig im Rahmen von routinemäßig durchgeführten Blutentnahmen 4-7 Milliliter venösen Blutes entnommen.

Weiterhin wurden 56 Frauen, welche im Zeitraum von Juli 2005 bis Oktober 2006 in der Universitätsfrauenklinik Magdeburg einen Sohn zur Welt brachten in die Studie eingeschlossen. Ihnen wurden im Zeitraum von 24 Stunden vor bis maximal 6 Tage nach der Geburt zu einem, zwei oder drei Zeitpunkten 4-7 ml venösen Blutes entnommen. Dies erfolgte ebenfalls zusammen mit routinemäßig durchgeführten Blutentnahmen innerhalb von 24 Stunden vor der Geburt, am ersten Tag nach der Entbindung sowie am Entlassungstag. Einer Probandin (Studiennummer 6) wurde zusätzlich 10 Monate nach der Entbindung Blut für die Untersuchung auf fetale *DNA* (Probennummer 6-4) entnommen.

Zur Untersuchung des Auftretens langzeitpersistenter Mikrochimärismen wurden 52 Mitarbeiterinnen der Universitätsfrauenklinik und der Universitätskinderklinik Magdeburg rekrutiert, die mindestens einen Sohn zur Welt gebracht hatten. Die Geburt ihres jüngsten leiblichen Sohnes lag zum Untersuchungszeitpunkt zwischen 20 Tagen und 36 Jahren zurück. Ihnen wurden einmalig 4-7 ml venösen Blutes entnommen.

Alle Probandinnen wurden im Voraus über Inhalt und Ziel der Studie, Zweck der Blutentnahmen sowie über die Freiwilligkeit der Studienteilnahme und über die Gewährleistung des Datenschutzes aufgeklärt und unterschrieben anschließend eine Einverständniserklärung. Zudem erhielten sie einen Fragebogen zur Erfassung anamnestischer Daten, wie Anzahl der Söhne und Töchter, Aborte, Erhalt von Bluttransfusionen, Vorliegen chronischer Erkrankungen und, bezogen auf die Indexschwangerschaft, Vorliegen einer Mehrlingsschwangerschaft und Auftreten von Schwangerschaftskomplikationen.

Als Ausschlusskriterien wurden der Erhalt einer Fremdbluttransfusion oder Organtransplantation sowie das Auftreten von Präeklampsie, HELLP-Syndrom oder Eklampsie im Verlauf der Indexschwangerschaft festgelegt. Zusätzlich führten bei den vor bzw. um den Zeitpunkt der Geburt zu untersuchenden Probandinnen vorausgegangene Schwangerschaften mit männlichen Feten sowie Aborte oder Interruptiones in der Anamnese zum Ausschluss aus der Studie.

Die Studie wurde gemäß den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki durchgeführt und durch die Ethikkommission der Universitätsklinik Magdeburg in der vorliegenden Form genehmigt.

## **2.2 Material**

### **2.2.1 Untersuchungsmaterial**

#### *Periphere Venenblutentnahme:*

Es wurden jeweils 4 bis 7 ml *EDTA*-Blut mithilfe des Vacutainer®-Systems aus einer Kubitalvene gewonnen. Die Proben wurden maximal zwei Tage lang bei Raumtemperatur und anschließend bis zur Aufarbeitung bei  $-20\text{ °C}$  gelagert. Die Lagerungsbedingungen wurden durch Vorversuche evaluiert (s. **2.3.9**) Die Verarbeitung des Blutes erfolgte wie unter **2.3.1** beschrieben durch *DNA*-Extraktion.

## 2.2.2 Chemikalien

**Tab. 2.1: Verwendete Kits**

---

Taq DNA Polymerase + 10xPCR-Puffer + MgCl	Invitrogen, Karlsruhe
QIAamp DNA Blood Mini Kit®	Qiagen, Hilden

**Tab. 2.2: Allgemeine Chemikalien**

---

Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ampuwa® - Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Ethanol 96 %, entwässert	Zentralapotheke - Medizinische Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim

**Tab. 2.3: Biochemikalien**

---

100 bp DNA-Leiter	Promega Madison, WI USA
Desoxynukleotid-Triphosphat Set	Invitrogen, Karlsruhe
Oligonucleotid-Primer	MWG, Ebersberg

**Tab. 2.4: Puffer**

---

5 x TBE-Puffer	0,445 M Tris-HCl, 0,445 M Borsäure, 0,1 M Na <sub>2</sub> EDTA
Lysis-Puffer	155 mM NH <sub>4</sub> Cl, 10 mM KHCO <sub>3</sub> , 0,1 mM Na <sub>2</sub> EDTA; pH 7,4
SE-Puffer	75 mM NaCl, 25 mM Na <sub>2</sub> EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA

### 2.2.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

**Tab. 2.5: Geräte**

---

<i>Elektrophoresekammern:</i>	
Horizon® 58	Gibco BRL, Karlsruhe
Horizon® 11.14	Gibco BRL, Karlsruhe
Feinwaage Typ BP 3100P	Sartorius, Göttingen
Heizplatte/Magnetrührer Typ RCT basic	IKA®, Guangzhou, China
<i>Pipetten:</i>	
	Eppendorf, Hamburg
	Gilson, Middleton, WI, USA
Plexiglas-Arbeitshaube	Fritz Gössner GmbH
Sofortbildkamera Typ CU-5	Polaroid, Offenbach
<i>Spectrophotometer:</i>	
DU®-64 Spectrophotometer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
SmartSpec®Plus	Bio-Rad, München
<i>Thermocycler:</i>	
iCycler Thermal Cycler	Bio-Rad, München
Vortex-Genie®2-Mixer	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad Typ M12/MS2	LAUDA, Königshofen
<i>Zentrifugen:</i>	
Desaspeed MH 2K	Desaga (Sarstedt Gruppe), Nümbrecht
Desaspeed MH 2	Desaga (Sarstedt Gruppe), Nümbrecht
Mini Centrifuge	Costar, Cambridge, MA, USA

**Tab. 2.6: Verbrauchsmaterialien**

---

Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Falcon, Heidelberg
Einmalhandschuhe	Baxter, Unterschleißheim
Polaroid®-Filme Typ 665	Polaroid, Offenbach

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 DNA-Extraktion aus venösem Vollblut

Die *DNA*-Extraktion erfolgte aus 200 µl Vollblut mithilfe des QIAamp *DNA* Blood Mini Kit® der Firma Qiagen. Diese *DNA*-Säulenextraktionsmethode stützt sich auf eine Silikaoberflächen-Technologie, die ohne die Verwendung von organischen Lösungsmitteln und Ethanol-Präzipitation auskommt.

Durch Zugabe von 20 µl Proteinase K und 200 µl eines speziellen Lyse-Puffers (AL-Puffer) mit anschließender Inkubation bei 56 °C wurden zunächst die zellulären Bestandteile des Blutes lysiert. In einem zweiten Schritt wurde die *DNA* durch einminütige Zentrifugation in einer Minizentrifuge bei 8000 rpm an die Silikagelmembran einer kleinen Säule gebunden. Es folgten zwei Zentrifugationsschritte, während derer die Membran mit den Puffern AW1 und AW2 gewaschen wurde. Anschließend erfolgte die Elution der *DNA* aus der Säule in 50 µl AE-Puffer (abweichend vom Protokoll des Herstellers). Die eluierte genomische *DNA* wurde direkt für die *PCR* eingesetzt. Um eine Kontamination mit Y-chromosomaler *DNA* bereits bei der *DNA*-Isolation auszuschließen, wurde bei jedem Extraktionsschritt die Blutprobe einer Nullgravida (weibliche Person ohne Schwangerschaft in der Anamnese) mitgeführt.

### 2.3.2 Konzentrationsbestimmung der extrahierten DNA

Mithilfe eines Spektralphotometers erfolgte im Anschluss an die Extraktion stichprobenhaft die Bestimmung der *DNA*-Konzentration im Eluat. Hierfür wurde die Extinktion der Proben bei den Wellenlängen 260 nm, 280 nm und 320 nm gegen einen Leerwert gemessen. Nach der Formel

$$c = (E_{260} - E_{320}) * d * f * K$$

(*c* = Konzentration in [mM/l], *E* = Extinktion, *d* = Küvettschichtdicke [cm], *f* = Verdünnungsfaktor, *K* = 1 OD (optische Dichte) entsprechende Konzentration der *DNA* [µg/ml \* cm])

errechnete das Gerät die Nukleinsäurekonzentration. Über den Quotienten aus OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> konnte eine Verunreinigung durch Proteine ausgeschlossen werden. Für reine Nukleinsäurelösungen liegt dieser zwischen 1,8 und 2,0.

### 2.3.3 Längenbestimmung der extrahierten DNA

Für die einmalige *DNA*-Längenbestimmung wurde 1 µl des Eluats dreier Proben gemeinsam mit 1 µl eines  $\lambda$ /*Hind*-III-Markers sowie einer Kontroll-*DNA* auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen und 140 Minuten lang bei einer Spannung von 75 Volt elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Agarosegelelektrophorese; Kapitel 2.3.7).

### 2.3.4 Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [124, 108]

Das 1983 von MULLIS entwickelte Verfahren beruht auf der enzymatischen Vervielfältigung von definierten *DNA*-Fragmenten. Eine bestimmte Menge an präparierter *DNA* wird hierzu mit zwei Oligonukleotidprimern, einer thermostabilen *DNA*-Polymerase, einer ausreichenden Menge der vier verschiedenen Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dNTP) sowie mit einer speziellen Pufferlösung versetzt. Die Polymerase-Kettenreaktion (*PCR*) läuft anschließend in einem Thermocycler in mehreren Zyklen mit je 3 Phasen ab. Beginnend mit einer Denaturierung bei etwa 94 °C kommt es zur Trennung der *DNA* in ihre beiden Einzelstränge, woraufhin im nächsten Schritt die beiden *Primer* bei einem für sie jeweils spezifischen Temperaturoptimum an die 3'-Enden der jeweiligen Zielsequenz hybridisieren (engl.: *annealing*) und die Polymerase schließlich durch Einbau von dNTP beide Einzelstränge zu je einem neuen Doppelstrang komplementiert (Elongation). Mit der Zahl der Zyklen steigt so die Ausbeute an einem *PCR*-Produkt von spezifischer Größe und Sequenz annähernd exponentiell an. Die amplifizierten *DNA*-Fragmente können anschließend mittels Gelelektrophorese dargestellt werden.

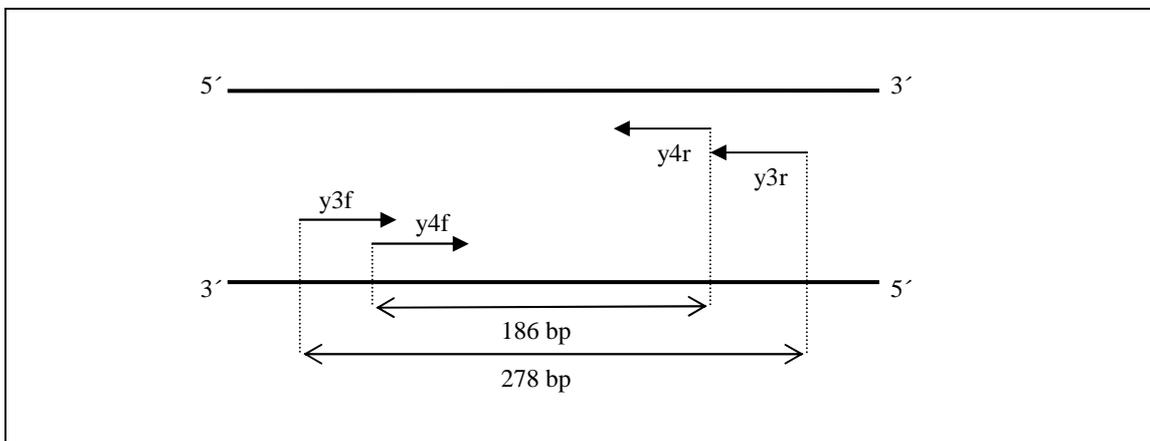
### 2.3.5 Nested PCR<sup>2</sup>

Um die Sensibilität der Methode zu erhöhen und gleichzeitig eine möglichst spezifische Amplifikation zu gewährleisten, ist es möglich, das *PCR*-Produkt nochmals auf gleiche Weise zu vervielfältigen (s. **Abb. 2.2**). Hierfür werden Primer gewählt, welche innerhalb der Ansatzstellen für das erste *Primer*paar binden (s. **Abb. 2.1**). Dieses Verfahren ermöglicht es, auch sehr geringe Mengen an Ausgangs-*DNA* nachzuweisen.

---

<sup>2</sup> Der Begriff *nested PCR* wird in der Literatur unterschiedlich gebraucht. In der vorliegenden Arbeit werden hierunter die beiden Teilschritte, primäre und sekundäre *PCR*, zusammengefasst.

Für die vorliegende Arbeit sollte fetale *DNA* in mütterlichem Blut nachgewiesen werden. Dafür bot es sich an, eine für das Y-Chromosom und somit für das männliche Geschlecht spezifische Sequenz zu amplifizieren. ARNEMANN *et al.* (1987) beschrieben einen solchen Y-spezifischen Abschnitt, den Klon pJA36B [10]. Dieser ist Teil des Gens TSPY (Testis-spezifisches Protein, Y kodiert). Der 1,6 kb große Subklon pJA36B2 (DYS14) wurde zunächst für ein *single-copy*-Element gehalten [10]. Später stellte sich jedoch heraus, dass es sich hierbei um eine ca. 30 bis 60 Mitglieder umfassende Sequenzfamilie auf dem kleinen Arm des Y-Chromosoms handelt [105, 69]. LO *et al.* (1990) verwendeten den beschriebenen *DNA*-Abschnitt erstmals für den Nachweis fetaler Erbsubstanz in mütterlichem Blut [99]. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde pJA36B mittels *nested PCR* untersucht.



**Abb. 2.1: Verwendete Primer:** Die Primer y3f und y3r flankieren einen 278 bp langen DNA-Abschnitt auf dem *DYS14*-Gen (primäre PCR), die Primer y4f und y4r einen 186 bp langen Abschnitt innerhalb der Ansatzstellen für das erste Primerpaar (sekundäre PCR)

Das *Primerdesign* erfolgte mithilfe der von ARNEMAN *et al.* veröffentlichten Sequenz [10]. Es handelt sich um Oligonukleotide einer Länge von jeweils 20 Basen mit einem GC-Anteil von 55 % und einer Schmelztemperatur von 59,4 °C. Das *Primerpaar* der primären *PCR* (y3f und y3r) flankiert einen Abschnitt von 278 bp (Basenpaare), das der sekundären *PCR* (y4f und y4r) einen Bereich von 186 bp (s. **Abb. 2.1**).

Die verwendeten *Primer* haben folgende Sequenzen:

y3f: 5' - ATG CGG CAG AGA AAC CCT TG - 3'

y3r: 5' - TAA GGC CTC CTG TGT TCA CG - 3'

y4f: 5' - CAG AAG CGA GTT CAG AGC AG - 3'

y4r: 5' - TTC TGA GGC TGA CTG CAC TG - 3'

Die kommerziell synthetisierten *Primer* wurden auf eine Stock-Konzentration von 100 pmol/ $\mu$ l verdünnt und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.3.6 PCR-Bedingungen

Um das Verfahren der *nested PCR* für die Amplifikation des DYS14-Abschnittes mit Hilfe der oben genannten *Primer* zu etablieren wurden Vorversuche durchgeführt. Dabei erwiesen sich die folgenden *PCR*-Bedingungen mit den in **Tab. 2.7** aufgeführten Testansätzen als optimal.

**Tab. 2.7: Testansatz für primäre und sekundäre PCR**

Komponente (Konzentration)	Primäre PCR		Sekundäre PCR	
	50 $\mu$ l-Ansatz	Endkonzentration	20 $\mu$ l-Ansatz	Endkonzentration
H <sub>2</sub> O	32,3 $\mu$ l		12,3 $\mu$ l	
PCR-Puffer (10x)	5 $\mu$ l	1x	2 $\mu$ l	1x
dNTP-Mix (2 mM)	4 $\mu$ l	je 0,08 mM	2 $\mu$ l	je 0,04 mM
Primer (je 20 pm/ $\mu$ l)	je 1 $\mu$ l	je 0,2 $\mu$ M	je 0,5 $\mu$ l	je 0,1 $\mu$ M
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 $\mu$ l	0,75 mM	0,6 $\mu$ l	0,3 mM
Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l	1 U	0,1 $\mu$ l	0,5 U
Template-DNA (130 ng/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l		2 $\mu$ l	

Die einzelnen Komponenten wurden in der angegebenen Reihenfolge in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert, dabei ausreichend gemischt und anschließend mithilfe einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Um Kontaminationen zu vermeiden, erfolgte die Pipettierung aller Reagenzien mit Ausnahme der *DNA* unter einer Plexiglashaube mit UV-Lichtquelle. Als Kontrollen wurden ein Leerwert (Wasser) sowie eine im Verhältnis 1:10.000 verdünnte männliche (Positivkontrolle) und die bei der jeweiligen *DNA*-Extraktion aufgearbeitete Nulligravida-Probe (Negativkontrolle) mitgeführt. Für die sekundäre *PCR* wurde zusätzlich zu den Kontrollproben aus der primären *PCR* ein neuer Leerwert angesetzt.

Die Programmierung des Thermocyclers erfolgte nach dem in **Tab. 2.8** aufgelisteten Schema, wobei die primäre *PCR* 35, die sekundäre 30 Zyklen durchlaufen sollte.

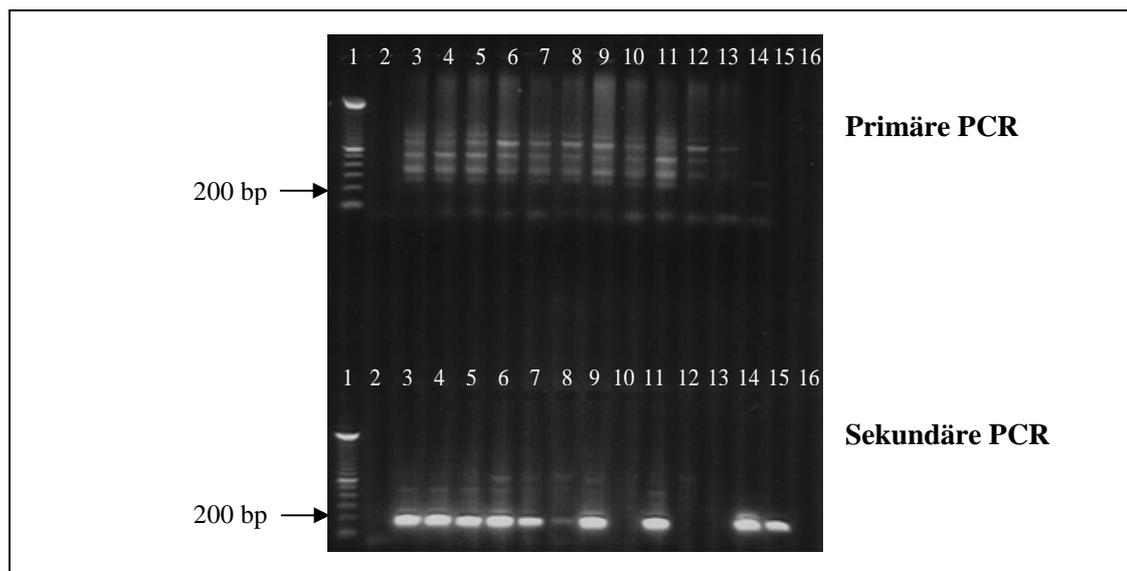
**Tab. 2.8: PCR-Programm**

<i>Denaturierung</i>	94°C	5 min	1 x
<i>Denaturierung</i>	94°C	30 s	35 bzw. 30 x
<i>Primer-Annealing</i>	62°C	30 s	
<i>Elongation</i>	72°C	30 s	
<i>Extension</i>	72°C	10 min	1 x

### 2.3.7 Agarosegelelektrophorese

Jeweils 10 µl der Amplifikationsprodukte aus der sekundären *PCR* wurden mit 3µl eines farbmarkierten Ladepuffers gemischt und gemeinsam mit einem 100-bp-Längenstandard auf ein 2 %iges mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid versetztes Agarosegel aufgetragen. Bei 120 V wurden die Proben etwa 60 Minuten lang im elektrischen Feld durch die Gelmatrix gezogen. Als Elektrodenpuffer wurde 1 x TBE eingesetzt. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandert *DNA* von der Kathode zur Anode. Kleinere Moleküle bewegen sich schneller durch die Poren des Gels, wodurch eine Auftrennung nach der Länge der einzelnen *DNA*-Stränge erfolgt. Mittels des sich der *DNA* interkalierend anlagernden und im ultravioletten Licht fluoreszierenden Ethidiumbromids lassen sich die *DNA*-Banden im Anschluss über einem UV-Lichttisch sichtbar machen. Anhand des mitgelaufenen 100-bp-Längenstandards lässt sich die Größe der Fragmente abschätzen und somit die gesuchte Zielsequenz identifizieren. Zur Dokumentation wurde das Gel mithilfe einer Polaroid-Kamera unter Benutzung eines Rotfilters fotografiert (s. **Abb. 2.2**).

Jede der Proben wurde in zwei Versuchsreihen untersucht. Das qualitative Ergebnis ließ sich so als Anzahl positiver Reaktionen angeben. Der *Y-DNA*-Nachweis wurde als positiv gewertet, wenn mindestens eines der beiden Experimente ein Signal für die gesuchte *DYS14*-Sequenz lieferte.



**Abb. 2.2: Gelfoto einer nested PCR:** Spur 1: 100 bp Längenstandard, Spur 2: Leerwert, Spur 3: Positivkontrolle, Spuren 4-15: Probanden-Proben, Spur 16: Negativkontrolle. Nach der primären PCR ist das gesuchte Fragment noch nicht ausreichend amplifiziert um es mittels Gelelektrophorese detektieren zu können, statt dessen bestimmen zahlreiche Nebenbanden das Bild. Mit der sekundären PCR lassen sich die Nebenprodukte reduzieren (Steigerung der Spezifität) und das gesuchte Hauptprodukt (186 bp) wird sichtbar (Steigerung der Sensitivität)

### 2.3.8 Vorkehrungen zur Vermeidung von Kontaminationen

Neben der Erzeugung falsch positiver Signale durch Kontamination der zu untersuchenden *DNA*-Probe mit Fremd-*DNA* ist eine Verschleppung von bereits amplifiziertem *DNA*-Material eine der Hauptursachen für die Erzeugung falscher Ergebnisse. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden sämtliche Arbeitsschritte einschließlich der Probenaufarbeitung von einer weiblichen Person vorgenommen. Außerdem wurden *DNA*-Präparation, Ansatz der *PCR* und Pipettierung der *PCR*-Produkte in jeweils räumlich voneinander getrennten Bereichen durchgeführt. Bei allen Arbeitsschritten wurden Einweghandschuhe getragen, sowie sterile Reaktionsgefäße und für Aerosole undurchlässige Einwegpipettenspitzen verwendet. Die Mitführung von jeweils drei Negativkontrollen (siehe 2.3.6) in jeder Versuchsreihe diente als Qualitätsnachweis.

### 2.3.9 Vorversuche

#### 2.3.9.1 Vorversuch 1 - Lagerungsbedingungen

Die Lagerung und der Transport von Proben bis zur Aufarbeitung kann einen nicht unerheblichen Einfluss auf Studienergebnisse haben (90). Deshalb sollten in einem Vorversuch verschiedene Lagerungssituationen miteinander verglichen werden. Es

wurde dafür zunächst weibliches mit männlichem *EDTA*-Blut direkt nach Blutentnahme in aufsteigendem Verhältnis gemischt. Die Abstufung erfolgte in Zehnerpotenzen zwischen einem Verhältnis von 1:1000 und 1:1.000.000 (männlich:weiblich). Anschließend wurden die Blutproben wie folgt weiterbehandelt: Die Proben 25 bis 28 wurden sofort aufgearbeitet, für die Proben 25A bis 28A erfolgte die *DNA*-Extraktion nach eintägiger Lagerung bei Raumtemperatur (20-23 °C), die Proben 25B bis 28B wurden einen Tag bei Raumtemperatur und anschließend einen Tag lang bei – 20 °C aufbewahrt und Proben 25C bis 28C nach zweitägiger Lagerung bei Raumtemperatur aufgearbeitet. Im Anschluss an die *DNA*-Extraktion wurden in zwei unabhängigen Versuchsreihen *nested PCR* mit den oben aufgeführten *Primer*paaren und unter den in **Tab. 2.9** und **Tab. 2.10** aufgeführten Standard-*PCR*-Bedingungen durchgeführt.

**Tab. 2.9: Testansatz für Vorversuch 1** (primäre und sekundäre *PCR*)

Komponente (Konz.)	Menge
H <sub>2</sub> O	42µl
10x Puffer (1x)	5µl
dNTP (je 0,08 mM)	1µl
Primer (je 0,2 µM)	je 0,5µl
Taq-Polymerase (1 U)	0,25µl
Template	1µl

**Tab. 2.10: *PCR*-Programm für Vorversuch 1**

95° C	3 min	1 x
95° C	1 min	25 x (primäre <i>PCR</i> )
50° C	1 min	
72° C	1 min	35 x (sekundäre <i>PCR</i> )
72° C	10 min	1 x

### 2.3.9.2 Vorversuch 2 – Optimierung der *PCR*-Bedingungen

Um Sensibilität und Spezifität der *nested PCR* beurteilen zu können bzw. diese zu optimieren wurde ein weiterer Vorversuch durchgeführt. Hierfür wurde *EDTA*-Blut eines Mannes mit dem einer Nulligravida in aufsteigendem Verhältnis (s. **Tab. 3.2**), ähnlich der Anfertigung einer Verdünnungsreihe, gemischt und sofort mittels *DNA*-Extraktion aufgearbeitet. Für die Berechnung des Verhältnisses zwischen der Anzahl männlicher

und weiblicher kernhaltiger Zellen in den einzelnen Gemischen, wurde von beiden Blutproben im Routinelabor der Universitätskinderklinik Magdeburg die Anzahl weißer Blutzellen bestimmt. Die *nested PCR* wurde zunächst unter den in **Tab. 2.9** und **Tab. 2.10** aufgeführten Standardbedingungen durchgeführt und bis zum Erreichen optimaler Bedingungen (s. **2.3.6**) mehrfach modifiziert.

### **2.3.10 Datenverarbeitung**

Die Textverarbeitung erfolgte mit Word®. Für die statistische Datenauswertung und Tabellenkalkulation wurde Excel® verwendet. Sämtliche Gel-Fotos wurden mit Hilfe von Powerpoint® bearbeitet. (Alle Programme aus Microsoft Office® 2003 bzw. 2007). Vergleiche zwischen Probengruppen erfolgten mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher unter Verwendung eines interaktiven Rechenprogramms<sup>3</sup>. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha \leq 0,05$  festgelegt.

---

<sup>3</sup> PREACHER, KJ, & BRIGGS, NE (2001, May). Calculation for Fisher's Exact Test: An interactive calculation tool for Fisher's exact probability test for 2 x 2 tables [Online im Internet]. URL: <http://people.ku.edu/~preacher/fisher/fisher.htm> [Stand: 22.08.2010, 19:20]

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Konzentrations- und Längenbestimmung der extrahierten DNA

Die mittels QIAamp *DNA Blood Mini Kit*® aus 200 ml Vollblut extrahierte *DNA* hatte eine Konzentration in der Größenordnung von 130 µg/ml. Bei der Längenbestimmung ließen sich Fragmente einer Länge von 20 bis 30 kb nachweisen.

#### 3.2 Vorversuch 1 – Lagerungsbedingungen

Im ersten Vorversuch sollten verschiedene Lagerungsbedingungen hinsichtlich möglicher Auswirkungen auf das *PCR*-Ergebnis überprüft werden. Die in bestimmten Verhältnissen aus männlichem und weiblichem Blut zusammengesetzten Proben wurden wie im Methodenteil beschrieben nach dem Mischen auf vier verschiedene Weisen weiterbehandelt und anschließend nach Aufarbeitung durch *DNA*-Extraktion in zwei Versuchsreihen mittels *nested PCR* untersucht. Die Ergebnisse sind in **Tab. 3.1** dargestellt. Sowohl nach ein- als auch nach zweitägiger Lagerung der Proben bei Raumtemperatur (20-23 °C) ließ sich männliche *DNA* in beiden Versuchsreihen bis zu einem Mischungsverhältnis männlichen zu weiblichen Blutes von 1:10.000 nachweisen. Dasselbe Ergebnis wurde nach 24stündigem Einfrieren bei –20 °C und vorheriger eintägiger Lagerung bei Raumtemperatur erzielt. Für die sofort aufgearbeiteten Proben ergab sich im Rahmen der ersten Versuchsreihe ein positives *PCR*-Ergebnis bis zu einem Verhältnis von 1:100.000, in der zweiten Versuchsreihe jedoch wiederum lediglich von 1:10.000.

Nach diesen Resultaten wurden die Lagerungsbedingungen für die gewonnenen Blutproben der Probandinnen festgelegt. Eine sofortige Aufarbeitung der Proben war organisatorisch nicht durchführbar. Da sich zwischen der ein- und zweitägigen Lagerung bei Raumtemperatur kein Unterschied im *PCR*-Ergebnis ergab und auch das Tieffrieren der Proben auf –20 °C diesbezüglich zu keiner Veränderung führte, wurden alle Proben nach der Entnahme maximal 2 Tage lang bei Raumtemperatur gelagert und anschließend bis zur Aufarbeitung bei –20 °C tiefgefroren.

**Tab. 3.1: Vorversuch 1 - Lagerungsbedingungen**

Probennr.	Lagerungsbedingungen	Mischungsverhältnis ♂ : ♀	Ergebnis <sup>a</sup>	
25	sofortige Aufarbeitung	1 : 1.000	+	+
26		1 : 10.000	+	+
27		1 : 100.000	+	-
28		1 : 1.000.000	-	-
25A	1 Tag bei Raumtemperatur	1 : 1.000	+	+
26A		1 : 10.000	+	+
27A		1 : 100.000	-	-
28A		1 : 1.000.000	-	-
25B	1 Tag bei Raumtemperatur + 1Tag bei -20 °C	1 : 1.000	+	+
26B		1 : 10.000	+	+
27B		1 : 100.000	-	-
28B		1 : 1.000.000	-	-
25C	2 Tage bei Raumtemperatur	1 : 1.000	+	+
26C		1 : 10.000	+	+
27C		1 : 100.000	-	-
28C		1 : 1.000.000	-	-

<sup>a</sup> „+“ für positives *PCR*-Ergebnis, „-“ für negatives *PCR*-Ergebnis, 2 Versuchsreihen

### 3.3 Vorversuch 2 – Optimierung der *PCR*-Bedingungen

Ziel dieses Versuches war es, abschätzen zu können, in welcher Größenordnung die Nachweisgrenze der gesamten Methode für männliche *DNA* in weiblichem Blut anzusiedeln ist. Gleichzeitig sollten die *PCR*-Bedingungen sowie einzelne Parameter der *DNA*-Extraktion dahingehend verändert werden, dass sich hinsichtlich Sensibilität und Spezifität optimale Resultate erzielen ließen. Ein Nachweis männlicher *DNA* gelang unter optimalen Bedingungen bis zu einem Mischungsverhältnis männlicher und weiblicher Leukozyten in der Größenordnung von 1:48.000 (s. **Tab. 3.2**). Dies entspricht etwa 150 männlichen Zellen in 1 Milliliter weiblichen Blutes bzw. 0,5 µl männlichen Blutes in 20 ml weiblichen Blutes. In keiner der Negativkontrollen wurde unter diesen Bedingungen eine Amplifikation der Y-spezifischen Zielsequenz nachgewiesen.

**Tab. 3.2: Vorversuch 2 - Optimierung der PCR-Bedingungen**

Mischungsverhältnis des Blutvolumens $\text{♂} : \text{♀}$	Mischungsverhältnis der Leukozyten <sup>a</sup> $\text{♂} : \text{♀}$	Ergebnis <sup>b</sup>
1 : 1.000	1 : 1.200	+
1 : 10.000	1 : 12.000	+
1 : 20.000	1 : 24.000	+
1 : 40.000	1 : 48.000	+
1 : 80.000	1 : 96.000	-
1 : 100.000	1 : 120.000	-
1 : 160.000	1 : 192.000	-
1 : 320.000	1 : 384.000	-
1 : 640.000	1 : 768.000	-
1 : 1.000.000	1 : 1.200.000	-

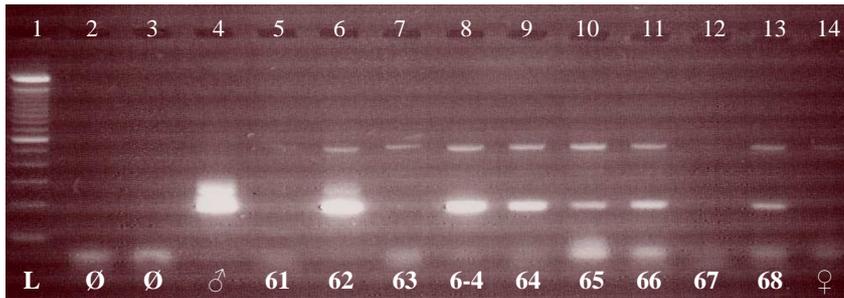
<sup>a</sup> Leukozytenzahlen: weibliche Probe: 7,3 Gpt/l; männliche Probe: 6,3 Gpt/l; Umrechnungsfaktor = 1,2

<sup>b</sup> „+“ für positives PCR-Ergebnis, „-“ für negatives PCR-Ergebnis

### 3.4 Ergebnisse der Hauptversuche

#### 3.4.1 Blutentnahme im Verlauf der Schwangerschaft

Die 17 Probandinnen dieser Gruppe waren im Durchschnitt  $27,4 \pm 4,4$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) Jahre alt. Unter ihnen waren 13 Erstgravida, 4 Teilnehmerinnen hatten bereits ein Mädchen zur Welt gebracht. In 10 Fällen lag ein unkomplizierter Schwangerschaftsverlauf vor, während bei 7 Frauen Komplikationen wie vorzeitige Wehentätigkeit (5), Zervixinsuffizienz (1) und Gestationsdiabetes (1) aufgetreten waren. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme befanden sich die Probandinnen zwischen der 17. und 39. Schwangerschaftswoche. Zwei von ihnen vor der 26. SSW (Zeitpunkt 1), 4 zwischen 26. und 30. SSW (Zeitpunkt 2), 7 zwischen 31. und 35. SSW (Zeitpunkt 3) und 4 zwischen 36. und 39. SSW (Zeitpunkt 4). Die Ergebnisse sind in **Tab. 3.3** sowie beispielhaft in **Abb. 3.1** und **Abb. 3.3** dargestellt. In allen 11 Proben der Schwangeren nach der 30. SSW (Zeitpunkt 3 und 4) und bei 3 der 4 Probandinnen zwischen 26. und 30. SSW ließ sich fetale DNA nachweisen. Insgesamt waren alle ab der 29. SSW entnommenen Blutproben DYS14-positiv während vor der 27. SSW kein Nachweis männlicher DNA gelang.



**Abb. 3.1: Ergebnisse der Studiennummern 61 bis 68 (Blutentnahme im Verlauf der Schwangerschaft) und 6-4 (Blutentnahme 10 Monate nach der Geburt):** Spur 1: 100 bp Längenstandard, Spur 2: Leerwert (sek. PCR), Spur 3: Leerwert aus prim. PCR, Spur 4: Positivkontrolle, Spuren 5-13: Probanden-Proben, Spur 14: Negativkontrolle; *DYS14*-positive Proben: 62 (27. SSW), 64 (34. SSW), 65 (29. SSW), 66 (33. SSW), 68 (38. SSW) und 6-4 (10 Monate nach Entbindung)

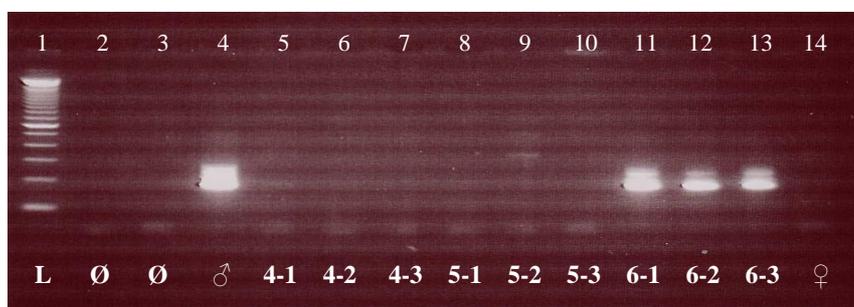
**Tab. 3.3: Ergebnisse – Blutentnahme im Verlauf der Schwangerschaft**

	<i>Zeitpunkt der Probenentnahme</i>			
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
	<i>17.-25. SSW</i>	<i>26.-30.SSW</i>	<i>31.-35. SSW</i>	<i>36.-39. SSW</i>
<i>Pos. PCR-Ergebnis</i>	0	3	7	4
<i>Neg. PCR-Ergebnis</i>	2	1	0	0
$\Sigma$	2	4	7	4
<i>% pos.</i>	0	75	100	100

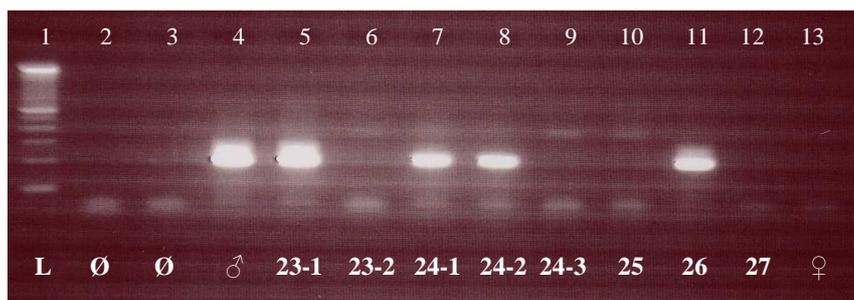
### 3.4.2 Blutentnahme um den Zeitpunkt der Geburt

Das Durchschnittsalter der Probandinnen dieser Gruppe betrug  $26,9 \pm 4,6$  Jahre. Einnundvierzig von ihnen waren Erstgebärende, 15 hatten bereits Mädchen geboren. Bei keiner der Frauen war eine vorhergehende Schwangerschaft mit einem männlichen Feten oder ein Abort bekannt. Die Entbindung erfolgte im Durchschnitt nach  $39,6 \pm 1,6$  Schwangerschaftswochen. Neunundvierzig Geburten erfolgten vaginal, 2 als primäre, 5 als sekundäre Sectio caesaria. Bei 45 der 56 Probandinnen dieser Gruppe wurde innerhalb von 24 Stunden vor der Entbindung Blut zum Nachweis fetaler *DNA* entnommen. In 32 Fällen (71,1 %) gelang die Amplifikation der *DYS14*-Sequenz. Am ersten Tag nach Entbindung wurden 21 Probandinnen untersucht wobei in 10 Fällen (47,6 %) der Nachweis Y-chromosomaler *DNA* gelang. Am Tag zwei nach Geburt des Kindes war noch in 3 von 12 untersuchten Blutproben (25,0 %) männliche *DNA* nachgewiesen worden, während am 3. bis 6. Tag post partum der Anteil positiver *PCR*-Ergebnisse auf 4 von 19 getesteten Proben (21,1 %) sank. Somit konnte eine Reduktion nachweisbarer

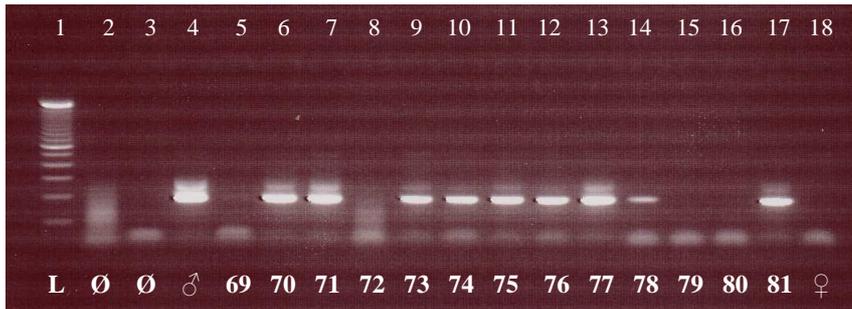
fetaler DNA im mütterlichen Blut von 23,5 % bis zum ersten Tag, weiteren 22,6 % bis zum zweiten Tag nach Entbindung und zwischen Tag 2 und 3. bis 6. Tag ein Abfall von 3,9 % gezeigt werden. Die Ergebnisse sind in **Tab. 3.4** sowie in Auszügen in **Abb. 3.2** bis **Abb. 3.4** dargestellt. Mithilfe des exakten Tests nach Fisher ließ sich eine signifikante Reduktion der mittels der angewandten Methode detektierbaren fetalen Erbsubstanz im mütterlichen Blut zwischen den Entnahmezeitpunkten 5 (bis 24 h vor) und 8 (3.–6. Tag nach Entbindung) nachweisen ( $p=0,0003$ ). Alle nach der Geburt untersuchten Proben stammten von Probandinnen, die vaginal entbunden worden waren und bei zwei von ihnen waren Komplikationen im Schwangerschaftsverlauf aufgetreten (vorzeitige Wehentätigkeit bzw. vorzeitiger Blasensprung).



**Abb. 3.2:** Ergebnisse der Studiennummern 4 bis 6 (Blutentnahme um den Zeitpunkt der Geburt): Spur 1: 100 bp Längenstandard, Spur 2: Leerwert (sek. PCR), Spur 3: Leerwert aus prim. PCR, Spur 4: Positivkontrolle, Spuren 5-13: Probanden-Proben, Spur 14: Negativkontrolle; DYS14-positive Proben: 6-1 (erster Tag postpartal), 6-2 (zweiter Tag postpartal) und 6-3 (dritter Tag postpartal)



**Abb. 3.3:** Ergebnisse der Studiennummern 23 bis 25 (Blutentnahme im Verlauf der Schwangerschaft) sowie 26 und 27 (Blutentnahme um den Zeitpunkt der Geburt): Spur 1: 100 bp Längenstandard, Spur 2: Leerwert (sek. PCR), Spur 3: Leerwert aus prim. PCR, Spur 4: Positivkontrolle, Spuren 5-12: Probanden-Proben, Spur 13: Negativkontrolle; DYS14-positive Proben: 23-1 und 24-1 (innerhalb von 24 Stunden vor Entbindung), 24-2 (erster Tag postpartal), 26 (38. SSW)



**Abb. 3.4: Ergebnisse der Studiennummern 69 bis 81 (Blutentnahme innerhalb von 24 Stunden vor der Geburt):** Spur 1: 100-bp-Längenstandard, Spur 2: Leerwert (sek. PCR), Spur 3: Leerwert aus prim. PCR, Spur 4: Positivkontrolle, Spuren 5-17: Probanden-Proben, Spur 18: Negativkontrolle; *DYS14*-positive Proben: 70, 71, 73, 74, 75, 76, 77, 78 und 81, (Die Probandin mit der Studiennummer 73 wurde wegen eines Abortes in der Anamnese aus der Studie ausgeschlossen.)

**Tab. 3.4: Ergebnisse – Blutentnahme um den Zeitpunkt der Geburt**

	Zeitpunkt der Probenentnahme			
	5	6	7	8
	-24 h	Tag 1	Tag 2	Tag 3-6
<i>Pos. PCR-Ergebnis</i>	32	10	3	4
<i>Neg. PCR-Ergebnis</i>	13	11	9	15
$\Sigma$	45	21	12	19
% pos.	71,1	47,6	25	21,1

Von den 45 Probandinnen, bei denen eine Probenentnahme innerhalb von 24 Stunden vor der Geburt erfolgte, hatte bei 34 bereits Wehentätigkeit eingesetzt, während 11 Frauen zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Wehen hatten. Bei diesen Patientinnen erfolgte eine künstliche Geburtseinleitung oder eine Schnittentbindung aufgrund von Terminüberschreitung (n=5), Gestationsdiabetes (n=2), vorzeitigem Blasensprung (n=2) oder Lageanomalien (n=2). Bei den Probandinnen mit Wehentätigkeit erfolgte die Probenentnahme im Mittel nach  $39,4 \pm 1,6$  SSW, bei den Probandinnen ohne Wehentätigkeit nach  $40,5$  SSW  $\pm 1,5$ . Fetales Erbgut konnte in 24 Proben (70,6 %) der 34 Probandinnen mit Wehentätigkeit und in 8 Fällen (72,7 %) der untersuchten Gruppe ohne Wehen nachgewiesen werden. Somit unterscheiden sich beide Gruppen hinsichtlich des Anteils positiver *PCR*-Ergebnisse für fetale *DNA* nicht signifikant voneinander ( $p=1$ ) (s. **Abb. 3.5**).

	mit Wehen	ohne Wehen	$\Sigma$
pos. PCR-Ergebnis	<b>24</b>	<b>8</b>	32
neg. PCR-Ergebnis	<b>10</b>	<b>3</b>	13
$\Sigma$	34	11	45

Fisher-Test:  $p=1$ ; keine Signifikanz

**Abb. 3.5: Ergebnisse – Blutentnahme innerhalb 24 Stunden vor Entbindung**

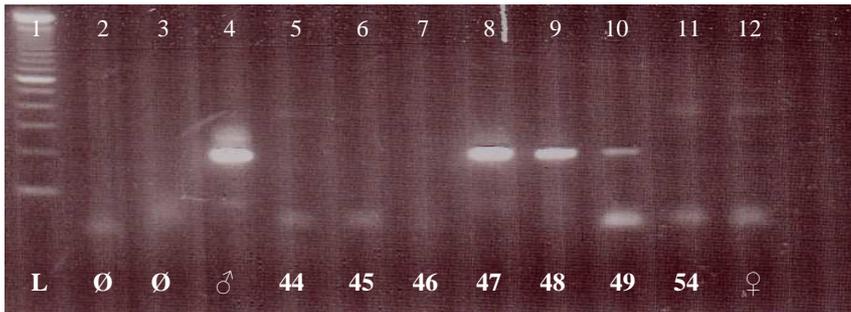
Schwangerschaftskomplikationen wie Frühgeburten, vorzeitige Wehentätigkeit, vorzeitiger Blasensprung, Gestationsdiabetes, Terminüberschreitungen und Lageanomalien waren in insgesamt 21 Fällen aufgetreten. Zum Entnahmezeitpunkt 5 (innerhalb von 24 Stunden vor Geburt) lässt sich hinsichtlich der Nachweisrate männlicher *DNA* kein signifikanter Unterschied zwischen normalen (20 von 26, 76,9 % positiv) und komplizierten Schwangerschaftsverläufen (12 von 19, 63,2 % positiv) feststellen ( $p=0,341$ ).

Eine signifikante Abhängigkeit der Nachweisrate fetaler *DNA* vom Alter der Mutter konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. In der Untergruppe mit Blutentnahme 24 Stunden vor der Geburt lag bei 80 % (16/20) der älter als 28 jährigen und bei 64,0 % (16/25) der weniger als 28 Jahre alten Probandinnen ein positives *PCR*-Ergebnis vor ( $p=0,327$ ).

Ebenso wenig fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen *PCR*-Ergebnis und Gestationsalter zum Zeitpunkt der Geburt, bei lediglich leichtem Trend zu niedrigeren Nachweisraten bei Entbindungen vor der 40. SSW zu allen Zeitpunkten der Probenentnahme (s. **Tab. 3.5**).

**Tab. 3.5: Abhängigkeit der Nachweisrate Y-chromosomaler DNA im um den Entbindungszeitpunkt gewonnenen mütterlichen Blut vom Gestationsalter bei Geburt**

Gestationsalter bei Geburt	Rate <i>DYS14</i> -positiver Proben			
	-24 h	Tag 1	Tag 2	Tag 3-6
$\geq 40$ . SSW	21/28 (75 %)	5/10 (50 %)	2/7 (28,6 %)	2/8 (25 %)
$< 40$ . SSW	11/17 (64 %)	5/11 (45,5 %)	1/5 (20 %)	2/11 (15,4 %)



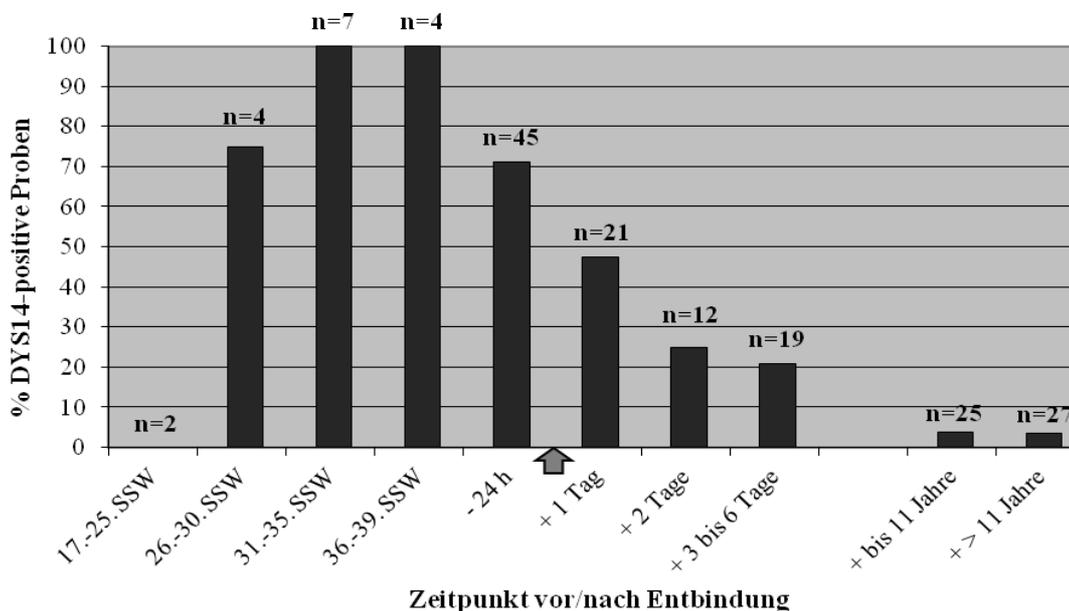
**Abb. 3.6:** Ergebnisse der Studiennummern 44, 45 und 49 (Blutentnahme Jahre nach der Geburt), 46 und 54 (Blutentnahme innerhalb von 24 Stunden vor der Geburt) sowie 47 und 48 (Blutentnahme im Verlauf der Schwangerschaft): Spur 1: 100-bp-Längenstandard, Spur 2: Leerwert (sek. PCR), Spur 3: Leerwert (aus prim. PCR), Spur 4: Positivkontrolle, Spuren 5-11: Probanden-Proben, Spur 12: Negativkontrolle; *DYS14*-positive Proben: 47 (35. SSW), 48 (39. SSW) und 49 (36 Jahre nach Geburt eines Sohnes)

### 3.4.3 Blutentnahme Wochen bis Jahre nach der Geburt eines Sohnes

Mit dieser dritten Gruppe wurden 52 Frauen untersucht, bei denen die Geburt ihres jüngsten Sohnes zum Zeitpunkt der Blutentnahme zwischen 20 Tagen und 36 Jahren zurücklag. Bei 27 von ihnen war der jüngste Sohn älter als 11 und bei 25 Probandinnen jünger als 11 Jahre alt. Sieben der Teilnehmerinnen hatten ihren Sohn per Kaiserschnitt zur Welt gebracht, acht gaben Aborte in der Anamnese an und fünf litten unter chronischen Erkrankungen (Autoimmunthyreoiditis, Fibromyalgie, Asthma bronchiale, Hepatitis B, chronische Arthritis). Lediglich einen Sohn hatten 25 Mütter, sieben hatten zwei Söhne und 22 hatten auch Töchter geboren. Im Blut zweier Probandinnen (3,8 %) gelang der Nachweis männlicher *DNA* mittels *nested PCR*. Die erste der beiden hatte ihren Sohn 10 Monate vor der Blutentnahme in der 39. Schwangerschaftswoche zur Welt gebracht (Studiennummer 6, Probennummer 6-4, s. **Abb. 3.1**). Der Sohn der zweiten Probandin mit positivem *PCR*-Ergebnis (Studiennummer 49, s. **Abb. 3.6**) war zum Untersuchungszeitpunkt 36 Jahre alt und war in der 40. SSW geboren worden. Beide Frauen hatten jeweils nur einen Sohn geboren. Die Probandin mit der Studiennummer 49 hatte außerdem noch eine Tochter zur Welt gebracht. In beiden Fällen gelang der *DNA*-Nachweis jeweils nur in einem Versuchsansatz. Die Entbindung beider Söhne war im Rahmen einer Spontangeburt erfolgt und komplikationslos verlaufen und bei keiner der beiden Probandinnen war eine chronische Erkrankung bekannt. Das Blut der Probandin mit der Studiennummer 6 war bereits an den ersten drei Tagen nach der Geburt ihres Sohnes untersucht worden. Alle drei Proben (6-1 bis 6-3) erwiesen sich jeweils in beiden Versuchsreihen als *DYS14*-positiv (s. **Abb. 3.2**).

### 3.4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Hauptversuchen

Um einen Überblick über die Kinetik nachweisbarer fetaler Mikrochimärismen im Verlauf und nach der Schwangerschaft zu geben, sollen hier die Versuchsergebnisse der einzelnen Probandengruppen zusammengefasst werden. Diesen Verlauf gibt **Abb. 3.7** graphisch wieder. Es zeigte sich ein steiler Anstieg der Rate DYS14-positiver Proben zwischen dem zweiten und dritten Trimenon bis auf 100 %. Vergleicht man die Ergebnisse der 29. bis 39. Gestationswoche mit denen in einem Zeitfenster von 24 Stunden vor der Entbindung, so ergibt sich bereits vor der Entbindung eine signifikante Reduktion der Frequenz nachweisbarer Y-chromosomaler DNA um 28,9 % von 100 % auf 71,1 % (Fisher-Test:  $p=0,028$ ). Nach der Geburt sank die Nachweisrate schließlich kontinuierlich innerhalb von 3 bis 6 Tagen bis auf 21,1 % ab. Bis 11 Jahre nach der Entbindung eines männlichen Säuglings war noch in einem von 25 Fällen (4,0 %) und nach 11 bis 36 Jahren in einem von 27 Fällen (3,7 %) Y-chromosomale DNA im Blut der Mutter nachweisbar (Unterschied nicht signifikant, Fisher-Test:  $p=1$ )



**Abb. 3.7: Kinetik der Nachweisrate fetaler Erbsubstanz im mütterlichen Blut im Verlauf der Schwangerschaft und nach der Geburt:** Darstellung der Nachweisrate fetaler (Y-chromosomaler) DNA in den im Verlauf der Schwangerschaft (17. bis 25. SSW, 26.-30. SSW, 31.-35. SSW, 36.-39. SSW), den innerhalb von 24 Stunden vor (-24 h) und in den Tagen (+ 1 Tag, + 2 Tage, + 3 bis 6 Tage) und Wochen bis Jahren (+ bis 11 Jahre, + > 11 Jahre) nach Entbindung gewonnenen Blutproben; der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Geburt

## 4 Diskussion der Ergebnisse

Die Trennung zwischen mütterlichem und fetalem Blutkreislauf ist nicht komplett. Vielmehr findet im Rahmen jeder Schwangerschaft ein Zell- und Nukleinsäureaustausch zwischen beiden Individuen statt. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass fetale Zellen noch Jahre nach der Entbindung im mütterlichen Organismus persistieren können, ohne dass die Bedeutung dieser Mikrochimärismen endgültig geklärt werden konnte. Ziel der zahlreichen bisher veröffentlichten qualitativen und quantitativen Untersuchungen zum fetomaternalen Zell- und Nukleinsäuretransfer war neben der Erforschung des Phänomens fetomaternaler Mikrochimärismen vorwiegend die Entwicklung nichtinvasiver Methoden für die Pränataldiagnostik. Bisher finden sich jedoch kaum Studien, welche sich mit dem zeitlichen Verlauf des fetomaternalen Zell- und Nukleinsäuretransfers und des Phänomens fetomaternaler Mikrochimärismen über einen weit gefassten Zeitraum beschäftigen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe eines Verfahrens zur Amplifikation Y-chromosomaler *DNA* die Kinetik des Auftretens fetaler *DNA* im mütterlichen Blut während der Schwangerschaft sowie derer Elimination nach der Geburt darzustellen und das Vorkommen langzeitpersistenter fetomaternaler Mikrochimärismen bis mehrere Jahre nach der Entbindung zu erfassen. Hierzu wurden 166 Blutproben, welche zu verschiedenen Zeitpunkten während bzw. nach Schwangerschaften mit männlichen Feten entnommen worden waren, auf die Nachweisbarkeit männlicher Erbsubstanz geprüft.

### 4.1 Zur Methode der Arbeit

Es ist bekannt, dass Lagerungs- und Transportbedingungen ebenso wie Methoden der Probenaufarbeitung die Ausbeute an Ziel-*DNA* erheblich beeinflussen können. Deshalb wurden zunächst verschiedene Lagerungsbedingungen sowie die sofortige Probenaufarbeitung hinsichtlich ihres Einflusses auf das *PCR*-Ergebnis geprüft. Hierbei ergab sich bei verzögerter Probenaufarbeitung zwischen den untersuchten Lagerungsbedingungen (ein bzw. zwei Tage bei Raumtemperatur und ein Tag bei -20 °C nach einem Tag bei Raumtemperatur) kein nachweisbarer Unterschied im Bezug auf die Sensitivität der Methode.

Die Mehrheit der Forschungsgruppen wählte zur Detektion der fetalen *DNA* für das Y-Chromosom spezifische Zielsequenzen (*SRY*, *DYS14*, *DAZ*). Besonders häufig wurden

Sequenzen auf dem *SRY*-Gen verwendet. Für diese Arbeit wurde eine Zielsequenz des Gens *DYS14* zur Amplifikation gewählt, da dieses im Gegensatz zu *SRY* in multiplen Kopien im männlichen Genom vorkommt und der Methode somit eine höhere Empfindlichkeit verleiht [69, 153]. Desweiteren wurde hier zur Steigerung der Sensitivität das Verfahren der *nested PCR* eingesetzt. Dies garantiert um ein Vielfaches höhere Detektionsraten als einfache nichtquantitative *PCR*-Methoden, erfordert jedoch gleichzeitig große Sorgfalt und strenge Vorkehrungen zur Vermeidung von Kontaminationen.

Unter optimalen Versuchsbedingungen lag die sichere Nachweisgrenze Y-chromosomaler *DNA* für das angewandte Verfahren bei einer männlichen Zelle unter 48.000 weiblichen Zellen. Dies entspricht etwa 150 männlichen Zellen pro Milliliter weiblichen Blutes bzw. 0,5  $\mu$ l männlichen in 20 ml weiblichen Blutes. Zum Vergleich: ZHONG et al. gelang mittels *real-time PCR* einer *DYS14*-Sequenz in 2 von 20 Versuchen die Detektion einer männlichen Zelle in 2 ml weiblichen Blutes [151]. Ebenfalls mittels *nested PCR* einer *DYS14*-Sequenz erreichten LO et al. eine Nachweisgrenze von 1:300.000 (männliche unter weiblichen Zellen), SMID et al. sogar von 1:600.000 [98, 131]. Mögliche Erklärungen für die deutlich höhere Sensitivität der von beiden Gruppen verwendeten Methoden sind Unterschiede hinsichtlich der Probenaufarbeitung, aber auch die Verwendung anderer *Primer*-Sequenzen [99] und höherer Zyklenzahlen für die *PCR*.

#### **4.2 Nachweis fetaler DNA im mütterlichen Blut im Verlauf der Schwangerschaft**

Der früheste Nachweis Y-chromosomaler *DNA* mutmaßlich fetaler Herkunft im Blut Schwangerer gelang ILLANES et al. und ARIGA et al. in der 4. Gestationswoche über die Amplifikation einer *DYS14*- bzw. *SRY*-Sequenz mittels *rt-PCR* [9, 66]. Andere Forschungsgruppen berichten von der Detektion fetaler *DNA* mittels quantitativer *PCR*-Verfahren ab der 5. bis 7. SSW [55, 61, 100, 106, 128]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang der erste Nachweis fetaler *DNA* im mütterlichen Blut ab der 27. SSW. Betrachtet man die der Literatur entnehmbaren Mengenangaben fetaler Zellen in der mütterlichen Zirkulation für diesen Zeitraum und vergleicht diese mit der Nachweisgrenze der hier angewandten Methode, so scheint dieses Ergebnis plausibel. HAMADA et al. zeigten mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, dass das Verhältnis der fetalen zur maternalen Zellzahl im mütterlichen Blut während des ersten Trimenons weniger als 1:100.000 beträgt und erst zum Ende der Schwangerschaft bis auf etwa 1:10.000 an-

steigt [59]. SEKIZAWA *et al.* bestimmten mittels *rt-PCR* einer *DYS14*-Sequenz zwischen der 7. und 16. Gestationswoche eine mittlere fetale *DNA*-Konzentration im mütterlichen Plasma von 37,5 Genomäquivalenten je Milliliter [128]. Die Nachweisgrenze des für die vorliegende Arbeit verwendeten Verfahrens liegt dagegen bei einem Verhältnis von 1 männlichen zu 48.000 weiblichen Zellen bzw. 150 männlichen Zellen pro Milliliter weiblichen Blutes.

Korrespondierend zu dem in der Literatur beschriebenen Anstieg der Konzentration fetaler *DNA* im mütterlichen Blut mit zunehmender Schwangerschaftsdauer [9, 32, 44, 49, 100] erwiesen sich in der 27. Schwangerschaftswoche 1 von 2 untersuchten Blutproben als *DYS14*-positiv und zwischen der 29. und 39. SSW war männliche (fetale) *DNA* in allen 13 Proben nachweisbar. Dieses Resultat steht im Einklang mit den Ergebnissen von BIRCH *et al.*, welche einen steilen Anstieg der fetalen *DNA*-Konzentration im mütterlichen Blut im dritten Trimenon bei nur geringem Unterschied zwischen den ersten beiden Trimenen zeigen [23].

ARIGA *et al.* untersuchten im Jahre 2001 mittels *real-time PCR* einer *SRY*-Sequenz serielle Blutproben von 20 gesunden mit einem männlichen Feten schwangere Frauen zwischen der 4. Gestationswoche und 39 Tagen nach der Entbindung ihres Kindes. Zum Vergleich wurden sowohl zelluläre *DNA* als auch zellfreie *DNA* aus mütterlichem Plasma untersucht. Im ersten Trimenon gelang es ihnen, in 59 % (13/22) der Proben zellfreie fetale *DNA* im mütterlichen Plasma und in 36 % (8/22) der Proben Y-chromosomale *DNA* aus der Zellfraktion des mütterlichen Blutes zu detektieren. Mit zunehmender Schwangerschaftsdauer stieg die Frequenz *SRY*-positiver Proben bis zur 36. SSW auf 100 % an. In den meisten Fällen zeigte sich ein transienter Anstieg der fetalen *DNA*-Konzentration um die 12. SSW, gefolgt von einer starken Zunahme im 3. Trimenon. Die Kinetik zellfreier fetaler *DNA* im mütterlichen Plasma verhielt sich dabei ähnlich der zellgebundener *DNA*, wobei die Konzentration der zellfreien *DNA* im Verlauf der Schwangerschaft 3,3 bis 9,5-fach höher war [9].

CHAN *et al.* errechneten ab der 35. Schwangerschaftswoche einen durchschnittlichen Anstieg der Konzentration Y-chromosomaler *DNA* im mütterlichen Plasma um 29,3 % pro Woche [32].

Die vorliegende Studie war nicht dafür ausgelegt quantitative Daten zur fetalen *DNA*-Konzentration in der mütterlichen Zirkulation zu liefern, sondern vielmehr dafür, die

Kinetik des Auftretens fetaler *DNA* im mütterlichen Blut mithilfe der Frequenz ihrer Nachweisbarkeit darzustellen. Da in allen ab der 29. SSW und mehr als 24 Stunden vor der Geburt untersuchten Blutproben Y-chromosomale *DNA* nachgewiesen werden konnte, können in diesem Zeitfenster Aussagen hinsichtlich der Kinetik nur getroffen werden, indem man die Einzelergebnisse aller Testansätze (zwei je Probe) betrachtet. Zwischen der 29. und 34. SSW waren in 3 von 7 Fällen, zwischen der 35. und 39. SSW in 5 von 6 Fällen beide Testansätze *DYS14*-positiv. Dieser Trend ist gut mit dem in der Literatur beschriebenen steilen Anstieg der Konzentration fetaler Erbsubstanz im mütterlichen Blut gegen Ende der Schwangerschaft vereinbar.

Als mögliche Ursache für diesen Verlauf lässt sich eine vermehrte fetomaternalen Transfusion aufgrund des allmählichen Zusammenbruchs der plazentaren Barriere gegen Ende der Schwangerschaft vermuten. Die Tatsache, dass man bei spontanen Frühgeburten zwischen der 26. und 34. SSW kurz vor der Niederkunft signifikant erhöhte Konzentrationen fetaler *DNA* im mütterlichen Plasma im Vergleich zu normalen Schwangerschaftsverläufen bei gleichem Gestationsalter nachweisen konnte, unterstützt diese Hypothese [91]. Als weiterer Grund kann eine mit zunehmender Schwangerschaftsdauer steigende immunologische Toleranz des mütterlichen gegenüber dem fetalen Organismus angenommen werden. Diesen Zusammenhang wiesen BIRKELAND und KRISTOFFERSEN bereits 1980 mit der Untersuchung gemischter Lymphozytenkulturen mütterlicher und fetaler Zellen in korrespondierendem mütterlichen Serum zu unterschiedlichen Gestationszeitpunkten und postpartal nach [24].

### **4.3 Abfall der fetalen DNA-Konzentration im mütterlichen Blut unmittelbar vor der Geburt**

Interessanterweise zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine signifikante Reduktion der Rate nachweisbarer Y-chromosomaler *DNA* bereits vor der Geburt von 100 % zwischen der 29. und 39. SSW auf 71 % in einem Zeitfenster von 24 Stunden vor der Entbindung ohne signifikanten Zusammenhang mit dem Gestationsalter bei der Niederkunft. Dieses Phänomen ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden. Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse von ARIGA *et al.*. Sie detektierten in allen 19 zum Zeitpunkt der Geburt entnommenen Proben mütterlichen Blutes zelluläre fetale *DNA* mit einer mittleren Konzentration mehr als doppelt so hoch wie in der 36. SSW gemessen (15,1 vs. 31,8 Genomäquivalente/0,5 ml) [9]. Für eine ausreichende Ver-

gleichbarkeit mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit fehlen in ihrer Publikation allerdings Angaben über den exakten Zeitpunkt der Probenentnahme bei der Geburt sowie Messungen zwischen der 36. SSW und dem Entbindungszeitpunkt.

Die naheliegende Vermutung, im Zusammenhang mit der Wehentätigkeit könnte z.B. eine Aktivierung des maternalen Immunsystems für einen Abfall der fetalen *DNA*-Konzentration im mütterlichen Blut verantwortlich sein, musste verworfen werden. Es fand sich kein Unterschied hinsichtlich der Frequenz *DYS14*-positiver Blutproben zwischen Probandinnen, welche zur elektiven Geburtseinleitung bzw. primären *Sectio caesaria* in die Klinik kamen und zum Zeitpunkt der Blutentnahme innerhalb von 24 Stunden vor der Geburt ihres Kindes keine Wehen hatten (72,7 %) und solchen mit Wehentätigkeit (70,6 %). Unterstützt wird diese Erkenntnis durch die Beobachtungen von INGARGIOLA *et al.*, die mittels quantitativer *rt-PCR* bei Frauen mit elektiver Geburtseinleitung keine Veränderungen der Konzentration freier fetaler *DNA* im mütterlichen Plasma während der Wehentätigkeit nachweisen konnten [67].

Betrachtet man in der vorliegenden Arbeit die Gruppe der Probandinnen ohne Wehentätigkeit genauer, so fällt folgendes auf: Indikation für die Einleitung der Geburt vor dem Einsetzen von Wehen war in 5 Fällen eine Terminüberschreitung (durchschnittliches Gestationsalter zum Zeitpunkt der Blutentnahme  $41,8 \pm 0,5$  Wochen). In allen diesen Fällen konnte Y-chromosomale *DNA* im mütterlichen Blut nachgewiesen werden und zwar, betrachtet man jeweils beide Versuchsreihen, in 9 von 10 Ansätzen. Für die je 2 Fälle von Gestationsdiabetes, Beckenendlage und vorzeitigem Blasensprung (mittleres Gestationsalter bei der Blutentnahme  $39,3 \pm 1,0$  Wochen) gelang der Nachweis jeweils nur in einem Fall, insgesamt in 4 von 12 Versuchsansätzen. Man könnte daher spekulieren, dass die Reduktion der Nachweisrate fetaler *DNA* kurz vor der Geburt nicht mit dem Fortschreiten der Schwangerschaft an sich assoziiert ist, sondern vielmehr mit Veränderungen um den Geburtstermin, möglicherweise ausgelöst durch psychoemotionalen oder physischen Stress der Schwangeren.

#### **4.4 Nachweis fetaler DNA im mütterlichen Blut in den Tagen nach der Geburt**

Man nimmt an, dass unter der Geburt in größerem Umfang fetale Zellen in die mütterliche Zirkulation gelangen. In diesem Fall erwartet man direkt nach der Geburt einen Anstieg der gesamten fetalen Erbsubstanz im mütterlichen Blut. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten einen solchen *Peak* nicht. Statt dessen fiel die Nachweisrate

Y-chromosomaler *DNA* im mütterlichen Blut auch postpartal kontinuierlich auf 47,6 % am ersten, 25,0 % am zweiten und 21,1 % am dritten bis sechsten Tag nach der Entbindung ab. Entweder lässt sich dieser *Peak* nur in den ersten Stunden nach der Geburt nachweisen und wurde daher mit den Blutentnahmen am ersten Tag nach Entbindung nicht erfasst, oder das Ausmaß des Untergangs fetaler Zellen und der Desintegration fetaler *DNA* überschreitet zu diesem Zeitpunkt das der fetomaternalen Transfusion unter der Geburt. Der Abbau fetaler Zellen würde in einem Abfall der Konzentration zellgebundener *DNA* bei gleichzeitigem Anstieg der Konzentration freier fetaler *DNA* im mütterlichen Plasma resultieren. ANGERT *et al.* zeigten, dass sowohl nach Interruptiones im ersten Trimenon, als auch nach Blutentnahmen im dritten Trimenon die Konzentration freier fetaler *DNA* im mütterlichen Plasma bis zu 24 Stunden nach der Venenpunktion konstant bleibt. Sie postulierten daher, dass die fetalen Zellen in den ersten 24 h nicht in zugrunde gehen [1]. Angenommen, ein Untergang fetaler Zellen im mütterlichen Blut würde für den Abfall fetaler *DNA*-Konzentrationen innerhalb der ersten 24 Stunden nicht als Ursache in Frage kommen, so müsste man schlussfolgern, dass es sich hierbei hauptsächlich um einen Abbau freier fetaler *DNA* handelt. LO *et al.* zeigten, dass der größte Teil zellfreier fetaler *DNA* bereits innerhalb von zwei Stunden nach der Geburt aus dem mütterlichen Plasma eliminiert wird [101]. Im Rahmen der vorliegenden Studie zeigte sich jedoch ein allmählicher Abfall der Frequenz nachweisbarer fetaler *DNA* über mehrere Tage. Es müssten also beide Fraktionen, zelluläre sowie zellfreie, an der Reduktion der fetalen *DNA* im mütterlichen Blut in den Tagen nach der Geburt beteiligt sein. Möglicherweise kommt es am ersten Tag nach der Entbindung zu einer vollständigen Elimination zellfreier *DNA* und damit zu einer Reduktion der Frequenz der mittels der hier angewandten Methode nachweisbaren fetalen Erbsubstanz, während erst später ein Untergang fetaler Zellen stattfindet und zu einer weiteren Abnahme der Nachweisrate führt.

ARIGA *et al.* fanden postpartal einen raschen Abfall der Konzentration zellgebundener fetaler *DNA* im mütterlichen Blut von 31,8 Genomäquivalente (ge) pro 0,5 ml bei der Geburt auf 1,6 ge/0,5 ml am Tag 1-2, 0,6 ge/0,5 ml am Tag 4-7 und 0,4 ge/0,5 ml am Tag 25-36 nach Entbindung. Ihnen gelang der Nachweis Y-chromosomaler *DNA* am Tag 1-2 noch in 11 (61 %) von 18, am Tag 4-7 in 4 (11 %) von 19 und am Tag 25-36 nach der Geburt noch in 2 (14 %) von 14 Proben [9]. Trotz der höheren Sensitivität des

von ARIGA *et al.* angewandten *PCR*-Verfahrens unterscheiden sich diese Nachweisraten nicht wesentlich von denen der vorliegenden Arbeit.

Dagegen überraschen die Ergebnisse von THOMAS *et al.*. Ihnen gelang mithilfe einer *nested PCR*, ähnlich dem für diese Arbeit verwendeten Verfahren, der Nachweis *DYS14* positiver *DNA* in allen 17 untersuchten Vollblutproben 4 Wochen nach der Geburt, während 8 Wochen nach Entbindung in keinem Fall mehr ein positives *PCR*-Ergebnis vorlag.

#### **4.5 Langzeitpersistente fetomaternale Mikrochimärismen**

Nachdem BIANCHI *et al.* 1996 als erste Forschergruppe fetale kernhaltige Zellen in der mütterlichen Zirkulation bis 27 Jahre nach der Geburt nachgewiesen hatten, bestätigten zahlreiche weitere Studien die Existenz und Langzeitpersistenz fetomaternaler Mikrochimärismen [11, 42, 68, 84]. Mit der vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis Y-chromosomaler *DNA* unter 52 Frauen, bei denen die Geburt ihres letzten Sohnes zwischen 20 Tagen und 36 Jahren zurücklag in 2 Fällen. Beide waren bis zum Zeitpunkt der Untersuchung gesund und hatten jeweils nur einen Sohn zur Welt gebracht. Die Söhne waren zum Untersuchungszeitpunkt 10 Monate bzw. 36 Jahre alt. Der deutliche Unterschied hinsichtlich der Zeitintervalle zwischen Geburt des Sohnes und Blutentnahme in beiden positiv getesteten Fällen ist keineswegs ungewöhnlich, berücksichtigt man die Beobachtungen von INVERNIZZI *et al.*, nach denen keine Korrelation zwischen dem Alter des jüngsten Sohnes und der Rate nachweisbarer Y-chromosomaler *DNA* im mütterlichen Blut besteht [68]. Bei beiden Frauen waren Schwangerschaft und Geburt (jeweils Spontangeburt) komplikationslos verlaufen. Das Blut der Probandin, in dem noch 10 Monate nach Entbindung mutmaßlich fetale *DNA* nachgewiesen werden konnte, war bereits in den ersten drei Tagen nach der Geburt ihres Sohnes auf männliche Erbsubstanz untersucht worden. Interessant ist die Tatsache, dass diese Probandin die einzige von 27 in den ersten Tagen nach der Geburt untersuchten Frauen war, bei der in drei Proben (Tag 1-3 nach Entbindung) jeweils in beiden Versuchsreihen die männliche Zielsequenz nachgewiesen werden konnte. Es ist also davon auszugehen, dass in diesem Fall eine vergleichsweise hohe Konzentration fetaler *DNA* im mütterlichen Blut vorgelegen haben muss, möglicherweise bedingt durch eine vermehrte fetomaternale Transfusion im Laufe der Schwangerschaft bzw. unter der Geburt oder durch eine verminderte Elimination der fetalen Zellen bzw. *DNA* aus der mütterlichen Zirkulation. Im Falle von

Fehlgeburten und Schwangerschaftsunterbrechungen bei denen es ebenfalls häufig zu einer vermehrten fetomaternalen Transfusion kommt, ist das gehäufte Auftreten fetomaternaler Mikrochimärismen ebenso beschrieben worden wie bei HLA-Kompatibilität zwischen Mutter und Fetus [16, 26, 29, 30]. Wenn sich auch die Ursache für die vergleichsweise hohe Nachweisrate männlicher *DNA* in den Tagen nach der Geburt im hier diskutierten Fall nicht eruieren lässt, so ist doch ein Zusammenhang mit dem Nachweis der männlichen Zielsequenz noch 10 Monate nach Entbindung im Blut der Probandin zu vermuten.

LAMBERT *et al.* ermittelten im Blut von 39 Probandinnen, die Jahre zuvor Söhne geboren hatten, ein Verhältnis von 0-12,5 männlichen Zellen pro Millionen mütterliche Zellen [84]. Somit lässt sich die niedrige Nachweisrate fetomaternaler Mikrochimärismen mit der hier angewandten Methode nachvollziehen. Andere Forschungsgruppen berichten in Ihren Arbeiten von erstaunlich hohen Inzidenzen fetomaternaler Mikrochimärismen. EVANS *et al.* detektierten mittels *nested PCR* einer *DYS14*-Sequenz männliche, mutmaßlich langzeitpersistente fetale Zellen unter mononukleären peripheren Blutzellen bei 33 % (16 von 48) gesunder Frauen [42], ARTLETT *et al.* in 63,6 % der Fälle (14 von 22) mithilfe von *Real-time PCR* [11].

Chimäre männliche, als fetalen Ursprungs deklarierte Zellen wurden nicht nur im peripheren Blut, sondern auch in verschiedenen Organen [72, 73, 76, 77, 87], und im Knochenmark [116] von Müttern nachgewiesen. Bei den mit der Methode der vorliegenden Arbeit detektierten Y-chromosomalen Sequenzen könnte es sich also zum einen um freie ins Plasma entlassene *DNA*, durch Lyse im mütterlichen Gewebe integrierter fetaler Zellen, zum anderen um das Erbmateriale zirkulierender fetaler Zellen handeln. Zur Beantwortung eben dieser Frage untersuchten LAMBERT *et al.* in den Blutproben von 48 gesunden Frauen und 43 Sklerodermie-Patientinnen mit Söhnen sowohl die Plasmafraktion, als auch extrahierte mononukleäre Zellen hinsichtlich des Vorhandenseins männlicher *DNA* [84]. Im Ergebnis detektierten sie nach Filtration des Plasmas zur Elimination apoptotischer Zellen in keiner Probe freie Y-chromosomale *DNA*. Dagegen gelang ihnen der Nachweis zellgebundener männlicher *DNA* in 51 % (Sklerodermie-Patientinnen) bzw. 31 % (gesunde Probandinnen) der Fälle.

INVERNIZZI *et al.* gelang der Nachweis „fetaler“ *DNA* mittels quantitativer *PCR* einer *SRY*-Sequenz bei 160 untersuchten gesunden Frauen, die 1 bis 60 Jahre zuvor einen Sohn geboren hatten, in 10 % der Fälle in der Zellfraktion des mütterlichen Blutes und

in 22 % der Fälle im Plasma [68]. Außerdem fanden sie wie es bereits mehrfach für den Verlauf der Schwangerschaft nachgewiesen wurde [9, 95], auch lange nach der Geburt im Vergleich zur zellulären Y-chromosomalen *DNA* deutlich höhere Konzentrationen „freier“ plasmatischer *DNA*. Mit annähernd derselben Methodik abgesehen von Unterschieden hinsichtlich des Zentrifugationsprotokolls bei der Probenaufarbeitung konnten SMID *et al.* bei 172 untersuchten Probandinnen nach mehr als zwei Tagen postpartal keine zellfreie fetale *DNA* mehr im mütterlichen Plasma nachweisen [130]. Insgesamt entsprechen die von INVERNIZZI *et al.* angegebenen *DNA*-Konzentrationen in etwa den Konzentrationen, die mit der gleichen Methode während der Schwangerschaft gemessen wurden [15, 130]. Davon ausgehend würde man eine hohe Rate an Fehlbestimmungen bei der pränatalen Geschlechtsdeterminierung erwarten. Dies ist jedoch bisher in keiner Arbeit beschrieben worden. Sowohl BENACHI *et al.* als auch SMID *et al.* postulierten daher, dass die von INVERNIZZI *et al.* im mütterlichen Plasma nachgewiesene *DNA* am ehesten aus aufgrund von unzureichender Zentrifugation in der Plasmafraktion verbliebenen apoptotischen fetalen Zellen stammt und somit als Artefakt zu werten ist [15, 130]. BENACHI *et al.* konnten auch in mütterlichen Serumproben keine langzeitpersistente fetale *DNA* nachweisen [15].

Es ist also anzunehmen, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit 10 Monate bzw. 36 Jahre nach der Geburt im mütterlichen Blut nachgewiesene Y-chromosomale *DNA* aus dort zirkulierenden fetalen Zellen stammt. Die bisher ungeklärte Frage, welche Bedeutung langzeitpersistente fetomaternalen Mikrochimärismen für die mütterliche Gesundheit haben, wird Anlass zu weiteren Forschungsprojekten auf diesem Gebiet geben.

#### 4.6 Fazit

Mit der vorgelegten Arbeit gelang eine gute Darstellung der Kinetik fetomaternaler Mikrochimärismen über einen weit gefassten Zeitraum im Verlauf der Schwangerschaft und nach der Entbindung. Der bereits von anderen Forschungsgruppen beschriebene steile Anstieg der Detektionsrate fetaler *DNA* im Blut der Mutter gegen Ende der Schwangerschaft konnte in dieser Arbeit ebenso dargestellt werden, wie der erwartete Abfall derselben nach der Geburt. Desweiteren gelang in 2 Fällen der Nachweis langzeitpersistenter fetomaternaler Mikrochimärismen. Die im Vergleich zu anderen publizierten Arbeiten relativ niedrige Sensitivität der für diese Arbeit angewandten *nested*

*PCR* erklärt die Schwäche der Methode während der Frühschwangerschaft und im Zeitraum Wochen bis Jahre nach der Geburt.

Die entscheidende neue Erkenntnis dieser Arbeit ist zweifelsohne der signifikante Abfall der Nachweisrate fetaler *DNA* im mütterlichen Blut bereits vor der Entbindung. Dies wurde bisher in keiner Arbeit beschrieben. Zur genaueren Erforschung dieses Phänomens wäre die Untersuchung einer größeren Gruppe Schwangerer im Zeitfenster 24 Stunden vor der Geburt sinnvoll, wobei Mütter mit und ohne Wehentätigkeit und mit unterschiedlichen Indikationen zur Geburtseinleitung sowie einer differenzierten Anamnese zum Schwangerschaftsverlauf verglichen werden sollten. Hierzu bietet sich der Einsatz quantitativer *PCR*-Methoden sowie eine getrennte Untersuchung von zellfreier und zellgebundener *DNA* an.

## 5 Zusammenfassung

Während jeder Schwangerschaft kommt es zu einem bidirektionalen Austausch von Blutzellen und Nukleinsäuren zwischen Mutter und Fetus. Insbesondere zur Entwicklung und Optimierung von Methoden für die nicht-invasive pränatale Diagnostik wurden in der Vergangenheit zahlreiche Studien zur Detektion und Analyse fetaler *DNA* und fetaler Zellen während unterschiedlicher Gestationsstadien im mütterlichen Blut durchgeführt. Bei einigen Frauen wurden noch Jahre nach der Geburt fetale *DNA* und fetale Zellen im peripheren Blut und in verschiedenen Organen nachgewiesen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Kinetik des Auftretens fetaler Erbsubstanz im mütterlichen Blut im Verlauf der Schwangerschaft und postpartal bis ins höhere Alter einer Frau, Jahre nach der Geburt eines Kindes, darzustellen.

Hierzu wurde 17 mit einem männlichen Feten schwangeren Frauen in der 17.-39. Schwangerschaftswoche einmalig, 56 Probandinnen zu 1 bis 3 Zeitpunkten im Zeitraum von 24 Stunden vor bis 6 Tage nach der Geburt eines Sohnes sowie 52 Probandinnen, welche 20 Tage bis 36 Jahre zuvor einen Sohn geboren hatten einmalig Blut entnommen. Die Proben wurden mittels *nested PCR* mit einer für das Y-Chromosom spezifischen Zielsequenz (DYS14) untersucht. Y-chromosomale, mutmaßlich fetale *DNA* konnte ab der 27. und in allen Fällen ab der 29. Schwangerschaftswoche (> 24 Stunden vor Entbindung) nachgewiesen werden. Ohne Zusammenhang mit dem Auftreten von Wehentätigkeit war bereits innerhalb von 24 Stunden vor der Geburt ein signifikanter Abfall der Nachweisrate Y-chromosomaler *DNA* auf 71,1 % zu verzeichnen, gefolgt von einer weiteren kontinuierlichen Reduktion DYS14-positiver Proben bis auf 21,1 % in den ersten sechs Tagen nach der Entbindung. Langzeitpersistente fetomaternale Mikrochimärismen wurden bei 2 Probandinnen 10 Monate bzw. 36 Jahre nach Geburt eines Sohnes nachgewiesen.

Die vorliegende Arbeit ist die erste, welche das Auftreten fetaler *DNA* in der mütterlichen Zirkulation ab dem zweiten Trimenon der Schwangerschaft bis Jahrzehnte nach der Geburt mit ein und derselben Methode untersucht hat. Ihre Ergebnisse decken sich gut mit den in verschiedenen Publikationen angegebenen Verläufen und quantitativen Daten. Bisher in keiner Arbeit beschrieben ist jedoch die hier gezeigte Reduktion der Nachweisrate fetaler *DNA* im mütterlichen Blut bereits unmittelbar vor der Geburt. Dieses Phänomen gilt es in weiteren Studien genauer zu untersuchen.

## Literaturverzeichnis

### a) Zeitschriften

1. AL NAKIB M, DESBRIERE R, BONELLO N, BRETTELLE F, BOUBLI L, GABERT J, LEVY-MOZZICONACCI A: Total and fetal cell-free DNA analysis in maternal blood as markers of placental insufficiency in intrauterine growth restriction; *Fetal Diagn Ther* 2009; 26: 24-28
2. ALBERRY M, MADDOCKS D, JONES M, ABDEL HADI M, ABDEL-FATTAH S, AVENT N, SOOTHILL PW: Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast; *Prenat Diagn* 2007; 27: 415-418
3. ALBERRY MS, MADDOCKS DG, HADI MA, METAWI H, HUNT LP, ABDEL-FATTAH SA, AVENT ND, SOOTHILL PW: Quantification of cell free fetal DNA in maternal plasma in normal pregnancies and in pregnancies with placental dysfunction; *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200: 98 e1-6
4. AL-MUFTI R, HAMBLEY H, ALBAIGES G, LEES C, NIKOLAIDES KH: Increased fetal erythroblasts in women who subsequently developed pre-eclampsia; *Hum Reprod* 2000; 15: 1624-1628
5. AL-YATAMA MK, MUSTAFA AS, AL-KANDARI FM, KHAJA N, ZOHRA K, MONEM RA, ABRAHAM S: Polymerase-chain-reaction-based detection of fetal rhesus D and Y-chromosome-specific DNA in the whole blood of pregnant women during different trimesters of pregnancy; *Med Princ Pract* 2007; 16: 327-332
6. AMICUCCI P, GENNARELLI M, NOVELLI G, DALLAPICCOLA B: Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma; *Clin Chem* 2000; 46: 301-302
7. ANGERT RM, LESHANE ES, LO YMD, CHAN LYS, DELLI-BOVI LC, BIANCHI DW: Fetal cell-free plasma DNA concentrations in maternal blood are stable 24 hours after collection: Analysis of first- and third-trimester samples; *Clin Chem* 2003; 49: 195-198
8. ARACTINGI S, SIBILIA J, MEIGNIN V, LAUNAY D, HACHULLA E, LE DANFF C, JANIN A, MARIETTE X: Presence of microchimerism in labial salivary glands in systemic sclerosis but not in Sjögren`s syndrome; *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1039-1043
9. ARIGA H, OHTO H, BUSCH MP, IMAMURA S, WATSON R, REED W, LEE TH: Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis; *Transfusion* 2001; 41: 1524-1530
10. ARNEMANN J, EPPLER JT, COOKE HJ, SAUERMAN U, ENGEL W, SCHMIDTKE J: A human Y-chromosomal DNA sequence expressed in testicular tissue; *Nucleic Acids Research* 1987; 15: 8713-8724
11. ARTLETT CM, COX LA, RAMOS RC, DENNIS TN, FORTUNATO RA, HUMMERS LK, JIMENEZ SA, SMITH JB: Increased microchimeric CD4+ T lymphocytes in peripheral blood from women with systemic sclerosis; *Clin Immunol* 2002; 103: 303-308

12. ARTLETT CM, SMITH JB, JIMENEZ SA: Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis; *N Engl J Med* 1998; 338: 1186-1191
13. AVENT ND, CHITTY LS: Non-invasive diagnosis of fetal sex; utilisation of free fetal DNA in maternal plasma and ultrasound; *Prenat Diagn* 2006; 26: 598-603
14. BAYES-GENIS A, BELLOSILLO B, DE LA CALLE O, SALIDO M, ROURA S, RISTOL FS, SOLER C, MARTINEZ M, ESPINET B, SERRANO S, BAYES DE LUNA A, CINCA J: Identification of male cardiomyocytes of extracardiac origin in the hearts of women with male progeny: male fetal cell microchimerism of the heart; *J Heart Lung Transplant* 2005; 24: 2179-2183
15. BENACHI A, STEFFMANN J, GAUTIER E, ERNAULT P, OLIVI M, DUMEZ Y, COSTA JM: Fetal DNA in maternal serum: does it persist after pregnancy?; *Hum Genet* 2003; 113: 76-79
16. BIANCHI DW, FARINA A, WEBER W, DELLI-BOVI LC, DERISO M, WILLIAMS JM, KLINGER KW: Significant fetal-maternal hemorrhage after termination of pregnancy: Implications for development of fetal cell microchimerism; *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184: 703-706
17. BIANCHI DW, FLINT AF, PIZZIMENTI MF, KNOLL JH, LATT SA: Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood; *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 3279-83
18. BIANCHI DW, SIMPSON JL, JACKSON LG, ELIAS S, HOLZGREVE W, EVANS MI, DUKES KA, SULLIVAN LM, KLINGER KW, BISCHOFF FZ, HAHN S, JOHNSON KL, LEWIS D, WAPNER RJ, DE LA CRUZ F: Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. National Institute of Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study; *Prenat Diagn* 2002; 22: 609-615
19. BIANCHI DW, WILLIAMS JM, SULLIVAN LM, HANSON FW, KLINGER KW, SHUBER AP: PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies; *Am J Hum Genet* 1997; 61: 822-829
20. BIANCHI DW, ZICKWOLF GK, WEIL GJ, SYLVESTER S, DE-MARIA MA: Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum; *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 705-708
21. BIANCHI DW: Fetal DNA in maternal plasma: the plot thickens and the placental barrier thins; *Am J Hum Genet* 1998; 62: 763-764
22. BIANCHI DW: Fetomaternal cell trafficking: a story that begins with prenatal diagnosis and may end with stem cell therapy; *J Pediatr Surg* 2007; 42: 12-18
23. BIRCH L, ENGLISH CA, O'DONOGHUE K, BARIGYE O, FISK NM, KEER JT: Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation; *Clin Chem* 2005; 51: 312-320
24. BIRKELAND SA, KRISTOFFERSEN K: The fetus as an allograft: A longitudinal study of normal human pregnancies studied with mixed lymphocyte cultures between mother-father and mother-child; *Scand J Immunol* 1980; 11: 311-319
25. BISCHOFF FZ, LEWIS DE, SIMPSON JL: Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure; *Hum Reprod Update* 2005; 11: 59-67

26. BONNEY EA, MATZINGER P: The maternal immune system's interacting with circulating fetal cells; *J Immunol* 1997; 158: 40-47
27. BÜLOW PEDERSEN I, LAURBERG P, KNUDSEN N, JORGENSEN T, PERRILD H, OVESEN L, RASMUSSEN LB: Lack of association between thyroid autoantibodies and parity in a population study argues against microchimerism as a trigger of thyroid autoimmunity; *Eur J Endocrinol* 2006; 154: 39-45
28. BUSTAMANTE-ARAGONES A, TRUJILLO-TIEBAS MJ, GALLEGU-MERLO J, RODRIGUEZ DE ALBA M, GONZALES-GONZALES C, CANTALAPIEDRA D, AYUSO C, RAMOS C: Prenatal diagnosis of Huntington disease in maternal plasma: direct and indirect study; *Eur J Neurol* 2008; 15: 1338-1344
29. CAMPAGNOLI C, FISK NM, OVERTON T, BENNETT PR, WATTS T, ROBERTS IA: Circulating hematopoietic progenitor cells in first trimester fetal blood; *Blood* 2000; 95: 1967-1972
30. CAMPAGNOLI C, ROBERTS IA, KUMAR S, BENNETT PR, BELLANTUONO I, FISK NM: Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow; *Blood* 2001; 98: 2396-2402
31. CHA D, KHOSROTEHRANI K, KIM Y, STROH H, BIANCHI DW, JOHNSON KL: Cervical cancer and microchimerism; *Obstet Gynecol* 2003; 102: 774-781
32. CHAN K, YAM I, LEUNG KY, TANG M, CHAN TK, CHAN V: Detection of paternal alleles in maternal plasma for non-invasive prenatal diagnosis of beta-thalassemia: a feasibility study in southern Chinese; *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010; 150: 28-33
33. CHAN LY, LEUNG TN, CHAN KC, TAI HL, LAU TK, WONG EM, LO YM: Serial analysis of fetal DNA concentrations in maternal plasma in late pregnancy; *Clin Chem* 2003; 49: 678-680
34. CHIU RW, LAU TK, CHEUNG PT, GONG ZQ, LEUNG TN, LO YM: Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: A feasibility study; *Clin Chem* 2002; 48: 778-780
35. CHIU RW, SUN H, AKOLEKAR R, CLOUSER C, LEE C, MCKERNAN K, ZHOU D, NICOLAIDES KH, LO YM: Maternal plasma DNA analysis with massively parallel sequencing by ligation for noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21; *Clin Chem* 2010; 56: 459-463
36. CIRELLO V, PERRINO M, COLOMBO C, MUZZA M, FILOPANTI M, VICENTINI L, BECK-PECCOZ P, FUGAZZOLA L: Fetal cell microchimerism in papillary thyroid cancer: studies in peripheral blood and tissues; *Int J Cancer* 2010; 126: 2874-2878
37. CIRELLO V, RECALCATI MP, MUZZA M, ROSSI S, PERRINO M, VICENTINI L, BECK-PECCOZ P, FINELLI P, FUGAZZOLA L: Fetal cell microchimerism in papillary thyroid cancer: A possible role in tumor damage and tissue repair; *Cancer Res* 2008; 68: 8482-8488
38. CORPECHOT C, BARBU V, CHAZOUILLÈRES O, POUPON R: Fetal microchimerism in primary biliary cirrhosis; *J Hepatol* 2000; 33: 696-700
39. DESAI RG, CREGER W: Maternofetal passage of leukocytes and platelets in man; *Blood* 1963; 21: 665-673

40. DREXLER C, WAGNER T: Blood group chimerism; *Curr Opin Hematol* 2006; 13: 484-489
41. ENDO Y, NEGISHI I, ISHIKAWA O: Possible contribution of microchimerism to the pathogenesis of Sjögren`s syndrome; *Rheumatology* 2002; 41: 490-495
42. EVANS P, LAMBERT N, MALONEY S, FURST DE, MOORE JM, NELSON JL: Long – term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy woman and women with scleroderma; *Blood* 1999; 93: 2033-2037
43. FARINA A, LESHANE ES, LAMBERT-MESSERLIAN GM, CANICK JA, LEE T, NEVEUX LM, PALOMAKI GE, BIANCHI DW: Evaluation of cell-free DNA as a second-trimester maternal serum marker of Down syndrome pregnancy; *Clin Chem* 2003; 49: 239-242
44. FINNING K, MARTIN P, DANIELS G: The use of maternal plasma for prenatal RhD blood group genotyping; *Methods Mol Biol* 2009; 496: 143-157
45. FINNING KM, MARTIN PG, SOOTHILL PW, AVENT ND: Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service; *Transfusion* 2002; 42: 1079-1085
46. FLORI E, DORAY B, GAUTIER E, KOHLER M, ERNAULT P, FLORI J, COSTA JM: circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto- and syncytio-trophoblastic cells. Case report; *Hum Reprod* 2004; 19: 723-724
47. GADI VK, MALONE KE, GUTHRIE KA, PORTER PL, NELSON JL: Case-control study of fetal microchimerism and breast cancer; *PloS One* 2008; 3: e1706
48. GADI VK: Fetal microchimerism in breast from women with and without breast cancer; *Breast Cancer Res Treat* 2010; 121: 241-244
49. GALBIATI S, SMID M, GAMBINI D, FERRARI A, RESTAGNO G, VIORA E, CAMPOGRANDE M, BASTONERO S, PAGLIANO M, CALZA S, FERRARI M, CREMONESI L: Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation; *Hum Genet* 2005; 117: 243-248
50. GAMMILL HS, GUTHRIE KA, AYDELOTTE TM, ADAMS WALDORF KM, NELSON JL: Effect of parity on fetal and maternal microchimerism: interaction of grafts within a host; *Blood* 2010 [Epub ahead of print]
51. GAMMILL HS, NELSON JL: Naturally acquired microchimerism; *Int J Dev Biol* 2010; 54: 531-543
52. GILMORE GL, HAQ B, SHADDUCK RK, JASTHY SL, LISTER J: Fetal-maternal microchimerism in normal parous females and parous female cancer patients; *Exp Hematol* 2008; 36: 1073-1077
53. GONZALEZ-GONZALEZ MC, GARCIA-HOYOS M, TRUJILLO MJ, RODRIGUEZ DE ALBA M, LORDA-SANCHEZ I, DIAZ-RECASENS J, GALLARDO E, AYUSO C, RAMOS C: Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma; *Prenat Diagn* 2002; 22: 946-948
54. GUETTA E, GORDON D, SIMCHEN MJ, GOLDMAN B, BARKAI G: Hematopoietic progenitor cells as targets for non-invasive prenatal diagnosis: detection of fetal CD34+ cells and assessment of post-delivery persistence in the maternal circulation; *Blood Cells Mol Dis* 2003; 30: 13-21

55. GUIBERT J, BENACHI A, GREBILLE AG, ERNAULT, ZORN JR, COSTA JM: Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique; *Human Reproduction* 2003; 18: 1733-1736
56. GULERIA I, SAYEGH MH: Maternal Acceptance of Fetus: True Human Tolerance; *J Immunol* 2007; 178: 3345-3351
57. HALL JM, LINGENFELTER P, ADAMS SL, LASSER D, HANSEN JA, BEAN MA: Detection of maternal cells in human umbilical cord blood using fluorescence in situ hybridisation; *Blood* 1995; 86: 2829-2832
58. HAMADA H, ARINAMI T, HAMAGUCHI H, KUBO T: Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood after delivery; *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 1188-1193
59. HAMADA H, ARINAMI T, KUBO T, HAMAGUCHI H, IWASAKI H: Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age; *Hum Genet* 1993; 91: 427-432
60. HO SS, CHONG SS, KOAY ES, PONNUSAMY S, CHIU L, CHAN YH, RAUFF M, BAIG S, CHAN J, SU LL, BISWAS A, HAHN S, CHOOLANI M: Noninvasive prenatal exclusion of haemoglobin Bart's using foetal DNA from maternal plasma; *Prenat Diagn* 2010; 30: 65-73
61. HONDA H, MIHARU N, OHASHI Y, SAMURA O, KINUTANI M, HARA T, OHAMI K: Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum; *Hum Genet* 2002; 110: 75-79
62. HORINEK A, KORABECNA M, PANCZAK A, GALLOVA ZU, NOUZOVA K, CALDA P, HANCAROVA M: Cell-free fetal DNA in maternal plasma during physiological single male pregnancies: methodology issues and kinetics; *Fetal Diagn Ther* 2008; 24: 15-21
63. HUI L, VAUGHAN JI, NELSON M: Effect of labor on postpartum clearance of cell-free fetal DNA from the maternal circulation; *Prenat Diagn* 2008; 28: 304-308
64. HUU SN, DUBERNARD G, ARACTINGI S, KHOSROTEHRANI K: Feto-maternal cell trafficking: A transfer of pregnancy associated progenitor cells; *Stem Cell Reviews* 2006; 2: 111-116
65. HYODO M, SAMURA O, FUJITO N, TANIGAWA M, MIYOSHI H, FUJIWRA H, MIHARU N, KUDO Y: No correlation between the number of fetal nucleated cells and the amount of cell-free fetal DNA in maternal circulation either before or after delivery; *Prenat Diagn* 2007; 27: 717-721
66. ILLANES S, DENBOW M, KAILASAM C, FINNING K, SOOTHILL PW: Early detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma; *Early Human Development* 2007; 83: 563-566
67. INGARGIOLA I, VAERMAN JL, DEBIÈVE F, PALGEN G, VERELLEN-DUMOULIN C, HUBINONT C: Free fetal DNA concentration in maternal plasma during normal labour at term; *Prenat Diagn* 2003; 23: 1077-1082
68. INVERNIZZI P, BIONDI ML, BATTEZZATI PM, PEREGO F, SELMI C, CECCHINI F, PODDA M, SIMONI G: Presence of fetal DNA in maternal plasma decades after pregnancy; *Hum Genet* 2002; 110: 587-591

69. JAKUBICZKA S: TSPY-(Testis specific Protein Y-encoded) verwandte Sequenzen im Rindergenom; Dissertation, Fachbereich Biologie der Universität Hannover
70. JOHNSON KL, NELSON JL, FURST DE, MCSWEENEY PA, ROBERTS DJ, ZHEN DK, BIANCHI DW: Fetal cell microchimerism in tissue from multiple sites in women with systemic sclerosis; *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1848-1854
71. JOHNSON KL, DUKES KA, VIDAVER J, LESHANE ES, RAMIREZ I, WEBER WD, BISCHOFF FZ, HAHN S, SHARMA A, DANG DX, HIRE LM, BIANCHI DW, SIMPSON JL, HOLZGREVE W, ELIAS S, KLINGER KW: Interlaboratory comparison of fetal male DNA detection from common maternal plasma samples by real-time PCR; *Clin Chem* 2004; 50: 516-521
72. JOHNSON KL, SAMURA O, NELSON JL, MCDONNELL M, BIANCHI DW: Significant fetal cell microchimerism in a nontransfused woman with hepatitis C: Evidence of long-term survival and expansion; *Hepatology* 2002; 36: 1295-1297
73. KHOSROTEHRANI K, JOHNSON KL, CHA DH, SALOMON RN, BIANCHI DW: Transfer of fetal cells with multilineage potential to maternal tissue; *JAMA* 2004; 292: 75-80
74. KHOSROTEHRANI K, JOHNSON KL, LAU J, DUPUY A, CHA DH, BIANCHI DW: The influence of fetal loss on the presence of fetal cell microchimerism: a systematic review; *Arthritis Rheum* 2003; 48: 3237-3241
75. KHOSROTEHRANI K, MERY L, ARACTINGI S, BIANCHI DW, JOHNSON KL: Absence of fetal cell microchimerism in cutaneous lesions of lupus erythematosus; *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 159-160
76. KLINTSCHAR M, IMMEL UD, KEHLEN A, SCHWAIGER P, MUSTAFA T, MANNWEILER S, REGAUER S, KLEIBER M, HOANG-VU C: Fetal microchimerism in Hashimoto's thyroiditis: a quantitative approach; *Eur J Endocrinol* 2006; 154: 237-241
77. KOOPMANS M, KREMER HOVINGA IC, BAELDE HJ, FERNANDES RJ, DE HEER E, BRUIJN JA, BAJEMA IM: Chimerism in Kidney, Livers and Hearts of Normal Women: Implications for Transplantation Studies; *Am J Transplant* 2005; 5: 1495-1502
78. KRABCHI K, GADJI M, FOREST JC, DROUIN R: Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood in different cases of aneuploidies; *Clin Genet* 2006; 69: 145-154
79. KRABCHI K, GROS-LOUIS F, BRONSARD M, MASSÉ J, FOREST JC, DROUIN R: Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18<sup>th</sup> and 22<sup>nd</sup> weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques; *Clin Genet* 2001; 60: 145-150
80. KREMER HOVINGA IC, KOOPMANS M, DE HEER E, BRUIJN A, BAJEMA IM: Chimerism in systemic lupus erythematosus—three hypotheses; *Rheumatology* 2007; 46: 200-208
81. KUO PL: Frequencies of fetal nucleated red blood cells in maternal blood during different stages of gestation; *Fetal Diagn Ther* 1998; 13: 375-379
82. LAMBERT NC, ERICKSON TD, YAN Z, Pang JM, Guthrie KA, Furst DE, Nelson JL: Quantification of maternal microchimerism by HLA-specific real-time po-

- lymerase chain reaction: studies of healthy women and women with scleroderma; *Arthritis Rheum* 2004; 50: 906-914
83. LAMBERT NC, EVANS PC, HASHIZUMI TL, MALONEY S, GOOLEY T, FURST DE, NELSON JL: Cutting edge: Persistent fetal microchimerism in T lymphocytes is associated with HLA-DQA1\*0501: implications in autoimmunity; *J Immunol* 2000; 164: 5545-5548
  84. LAMBERT NC, LO YM, ERICKSON TD, TYLEE TS, GUTHRIE KA, FURST DE, NELSON JL: Male microchimerism in healthy women and woman with scleroderma: cells or circulating DNA? A quantitative answer; *Blood* 2002; 100: 2845-2851
  85. LAPAIRE O, HOLZGREVE W, OOSTERWIJK JC, BRINKHAUS R, BIANCHI DW: Georg Schmorl on trophoblasts in the maternal circulation; *Placenta* 2007; 28: 1-5
  86. LEDUC M, ARACTINGI S, KHOSROTEHRANI K: Fetal-cell microchimerism, lymphopoiesis, and autoimmunity; *Arch Immunol Ther Exp* 2009; 57: 325-329
  87. LEE ES, BOU-GHARIOS G, SEPPANEN E, KHOSROTEHRANI K, FISK NM: Fetal stem cell microchimerism: Natural born healers or killers; *Mol Hum Reprod* 2010 [Epub ahead of print]
  88. LEE T, LESHANE ES, MESSERLIAN GM, GANICK JA, FARINA A, HEBER WW, BIANCHI DW: Down syndrome and cell free fetal DNA in archived maternal serum; *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 1217-1221
  89. LEE TH, PAGLIERONI T, OHTO H, HOLLAND PV, BUSCH MP: Survival of donor leukocyte subpopulations in immunocompetent transfusion recipients: frequent long-term microchimerism in severe trauma patients; *Blood* 1999; 93: 3127-3139
  90. LEE TH, MONTALVO L, CHREBTOW V, BUSCH MP: Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma; *Transfusion* 2001; 41: 276-282
  91. LEUNG TN, ZHANG J, LAU TK, HJELM NM, LO YM: Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour; *Lancet* 1998; 352: 1904-1905
  92. LI Y, PAGE-CHRISTIAENS GC, GILLE JJ, HOLZGREVE W, HAHN S: Non-invasive prenatal detection of achondroplasia in size-fractionated cell-free DNA by MALDI-TOF-MS-assay; *Prenat Diagn* 2007; 27: 11-17
  93. LITTLE MT, LANGLOIS S, WILSON RD, LANSDORP PM: Frequency of fetal cells in sorted subpopulations of nucleated erythroid and CD34+ hematopoietic progenitor cells from maternal peripheral blood; *Blood* 1997; 89: 2347-58
  94. LO YM, CORBETTA N, CHAMBERLAIN PF, RAI V, SARGENT IL, REDMAN CW, WAINSCOAT JS: Presence of fetal DNA in plasma and serum; *Lancet* 1997; 350: 485-487
  95. LO YM, LAU TK, CHAN LY, LEUNG TN, CHANG AM: Quantitative analysis of the bidirectional transfer of nucleated cells and plasma DNA; *Clin Chem* 2000; 46: 1301-1309

96. LO YM, LEUNG TN, TEIN MS, SARGENT IL, ZHANG J, LAU TK, HAINES CJ, REDMAN CW: Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia; *Clin Chem* 1999; 45: 184-188
97. LO YM, LO ES, WATSON N, NOAKES L, SARGENT IL, THILAGANATHAN B, WAINSCOT JS: Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications; *Blood* 1996; 88: 4390-4395
98. LO YM, PATEL P, BAIGENT CN, GILLMER MD, CHAMBERLAIN P, TRAVI M, SAMPIETRO M, WAINSCOT JS, FLEMING KA: Prenatal sex determination from maternal peripheral blood using the polymerase chain reaction; *Hum Genet* 1993; 90: 483-488
99. LO YM, PATEL P, SAMPIETRO M, GILLMER MD, FLEMING KA, WAINSCOT JS: Detection of single-copy fetal DNA sequence from maternal blood; *Lancet* 1990; 335: 1463-1464
100. LO YM, TEIN MS, LAU TK, HAINES CJ, LEUNG TN, POON PM, WAINSCOT JS, JOHNSON PJ, CHANG AM, HJELM NM.: Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis; *Am J Hum Genet* 1998; 62: 768-775
101. LO YM, ZHANG J, LEUNG TN, LAU TK, CHANG AM, HJELM NM: Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma; *Am J Hum Genet* 1999; 64: 218-224
102. LO YM: Fetal nucleic acids in maternal plasma: Toward the development of noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidies; *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1137: 140-143
103. LOUBIERE LS, LAMBERT NC, FLINN LJ, ERICKSON TD, YAN Z, GUTHRIE KA, VICKERS KT, NELSON JL: Maternal microchimerism in healthy adults in lymphocytes, monocyte/macrophages and NK cells; *Lab Invest* 2006; 86: 1185-1192
104. MALONEY S, SMITH A, FURST DE, MYERSON D, RUPERT K, EVANS P, NELSON JL: Microchimerism of maternal origin persists into adult life; *J Clin Invest* 1999; 104: 41-47
105. MANZ E, SCHNIEDERS F, MÜLLER BRECHLIN A, SCHMIDTKE J: TSPY-related sequences represent a microheterogeneous gene family organized as constitutive elements in DYZ5 tandem repeat units on the human Y chromosome; *Genomics* 1993; 17: 726-731
106. MARON JL, BIANCHI DW: Prenatal diagnosis using cell-free nucleic acids in maternal body fluids: a decade of progress; *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 2007; 145C: 5-17
107. MAVROU A, KOLIALEXI A, SOUKA A, PILALIS A, KAVALAKIS Y, ANTSAKLIS P, KANAVAKIS E, ANTSAKLIS A: First-trimester NRBC Count in Maternal Circulation: Correlation with Doppler Ultrasound Studies; *J Histochem Cytochem* 2005; 53: 315-317
108. MAVROU A, KOUVIDI E, ANTSAKLIS A, SOUKA A, KITSIOU TZELI S, KOLIALEXI A: Identification of red blood cells in maternal circulation: A second step in screening for fetal aneuploidies and pregnancy complications; *Prenat Diagn* 2007; 27: 150-153
109. MIKKOLA HK, GEKAS C, ORKIN SH, DIETERLEN-LIEVRE F: Placenta as a site for hematopoietic stem cell development; *Exp Hematol* 2005; 33: 1048-54

110. MILLER SA, DYKES, DD, POLESKY HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells; *Nucleic Acids Research* 1988; 16: 1215
111. MUELLER UW, HAWES CS, WRIGHT AE, DEBONI E, JONES WR, FIRGAIRA FA, MORLEY AA, TURNER DR: Isolation of fetal trophoblast cells from peripheral blood of pregnant women; *Lancet* 1990; 336: 197-200
112. MULLIS K, FALOONA F, SCHARF S, SAIKI R, HORN G, ERLICH H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction; *Cold-Spring-Harb-Quant-Biol* 1986; 51: 263-273
113. NELSON JL, FURST DE, MALONEY S, GOOLEY T, EVANS P, SMITH A, BEAN MA, OBER C, BIANCHI DW: Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma; *Lancet* 1998; 351: 559-562
114. NELSON JL: HLA relationships of pregnancy, microchimerism and autoimmune disease; *J Reprod Immunol* 2001; 52: 77-84
115. NELSON JL: Maternal-fetal immunology and autoimmune disease: Is some autoimmune disease auto-alloimmune or allo-autoimmune?; *Arthritis Rheum* 1996; 39: 191-194
116. O'DONOGHUE K, CHAN J, DE LA FUENTE J, KENNEA N, SANDISON A, ANDERSON JR, ROBERTS IA, FISK NM: Microchimerism in female bone marrow and bone decades after fetal mesenchymal stem-cell trafficking in pregnancy; *Lancet* 2004; 364: 179-182
117. O'DONOGHUE K, CHOOANI M, CHAN J, DE LA FUENTE J, KUMAR S, CAMPAGNOLI C, BENNETT PR, ROBERTS IA, FISK NM: Identification of fetal mesenchymal stem cells in maternal blood: implications for non-invasive prenatal diagnosis; *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 497-502
118. O'DONOGHUE K: Fetal microchimerism and maternal health during and after pregnancy; *Obstet Med* 2008; 1: 56-64
119. OSADA H, DOI S, FUKUSHIMA T, NAKAUCHI H, SEKI K, SEKIYA S: Detection of fetal HPCs in maternal circulation after delivery; *Transfusion* 2001; 41: 499-503
120. PARANT O, DUBERNARD G, CHALLIER JC, OSTER M, UZAN S, ARACTINGI S, KHOSROTEHRANI K: CD34+ cells in maternal placental blood are mainly fetal in origin and express endothelial markers; *Lab Invest* 2009; 89: 915-923
121. POLLACK MS, KIRKPATRICK D, KAPOOR N, DUPONT B, O'REILLY RJ: Identification by HLA typing of intrauterine-derived maternal T cells in four patients with severe combined immunodeficiency; *N England J Med* 1982; 307: 662-666
122. RIJNDERS RJ, VAN DER LUIJT RB, PETERS ED, GOEREE JK, VAN DER SCHOOT CE, PLOOS VAN AMSTEL JK, CHRISTIAENS GC: Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma; *Prenat Diagn* 2003; 23: 1042-1044
123. RUJIWETPONGSTORN J, TONGSONG T, WANAPIRAK C, PIYAMONGKOL W, SIRICHOTIYAKUL S, CHANPRAPAPH P, TONGPRASERT F: Feto-maternal hemorrhage after cordocentesis at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital; *J Med Assoc Thai* 2005; 88: 145-149

124. SAIKI RK, GELFAND H, STOFFEL S, SCHARF J, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS B, EHRLICH HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA-polymerase; *Science* 1988; 239: 481-491
125. SAWAYA HH, JIMENEZ SA, ARTLETT CM: Quantification of fetal microchimeric cells in clinically affected and unaffected skin of patients with systemic sclerosis; *Rheumatology* 2004; 43: 965-968
126. SAWICKI JA: Fetal microchimerism and cancer; *Cancer Res* 2008; 68: 9567-9569
127. SCHÖNIGER-HEKELE M, MÜLLER C, ACKERMANN J, DRACH J, WRBA F, PENNER E, FERENCI P: Lack of evidence for involvement of fetal microchimerism in pathogenesis of primary biliary cirrhosis; *Dig Dis Sci* 2002; 47: 1909-1914
128. SEKIZAWA A, KONDO T, IWASAKI M, WATANABE A, JIMBO M, SAITO H, OKAI T: Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma; *Clin Chem* 2001; 47:1856-1858
129. SEKIZAWA A, PURWOSUNU Y, MATSUOKA R, KOIDE K, OKAZAKI S, FARINA A, SAITO H, OKAI T: Recent advances in non-invasive prenatal DNA diagnosis through analysis of maternal blood; *J Obstet Gynaecol Res* 2007; 33: 747-764
130. SMID M, GALBIATI S, VASSALLO A, GAMBINI D, FERRARI A, VIORA E, PAGLIANO M, RESTAGNO G, FERRARI M, CREMONESI L: No evidence of fetal DNA persistence in maternal plasma after pregnancy; *Hum Genet* 2003; 112: 617-618
131. SMID M, LAGONA F, PASPASERGIO N, FERRARI A, FERRARI M, CREMONESI L: Influence of gestational age on fetal deoxyribonucleic acid retrieval in maternal peripheral blood; *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 1517-1522
132. SRIVATSA B, SRIVATSA S, JOHNSON KL, SAMURA O, LEE SL, BIANCHI DW: Microchimerism of presumed fetal origin in thyroid specimens from women: a case-control study; *Lancet* 2001; 358: 2034-2038
133. STANGHELLINI I, BERTORELLI R, CAPONE L, MAZZA V, NERI C, PERCESEPE A, FORABOSCO A: Quantitation of fetal DNA in maternal serum during the first trimester of pregnancy by the use of a DAZ repetitive probe; *Mol Hum Reprod* 2006; 12: 587-591
134. STARZL TE, RAMOS H, ZEEVI A, RICORDI C, ILDSTAD S, MURASE N, DEMETRIS AJ, TRUCCO M, RUDERT WA, KOCOVA M: Systemic chimerism in human female recipients of male livers; *Lancet* 1998; 340: 876-877
135. STEVENS AM, HERMES HM, LAMBERT NC, NELSON JL, MERONI PL, CIMAZ R: Maternal and sibling microchimerism in twins and triplets discordant for neonatal lupus syndrome-congenital heart block; *Rheumatology* 2005; 44: 187-191
136. SUGITO Y, SEKIZAWA A, FARINA A, YUKIMOTO Y, SAITO H, IWASAKI M, RIZZO N, OKAI T: Relationship between Severity of Hyperemesis Gravidarum and Fetal DNA Concentration in Maternal Plasma; *Clin Chem* 2003; 49: 1667-1669
137. TANG NL, LEUNG TN, ZHANG J, LAU TK, LO YM: Detection of fetal-derived paternally inherited X-chromosome polymorphisms in maternal plasma; *Clin Chem* 1999; 45: 2033-2035

138. THOMAS MR, TUTSCHEK B, FROST A, RODECK CH, YAZDANI N, CRAFT I, WILLIAMSON R: The time of appearance and disappearance of fetal DNA from the maternal circulation; *Prenat Diagn* 1995; 15: 641-646
139. TODA I, KUWANA M, TSUBOTA K, KAWAKAMI Y: Lack of evidence for an increased microchimerism in the circulation of patients with Sjögren's syndrome; *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 248-253
140. TONG YK, DING C, CHIU RW, GEROVASSILI A, CHIM SS, LEUNG TY, LEUNG TN, LAU TK, NICOLAIDES KH, LO YM: Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: Theoretical and empirical considerations; *Clin Chem* 2006; 52: 2194-2202
141. TUNGWIWAT W, FUCHAROEN S, FUCHAROEN G, RATANASIRI T, SANCHAISURIYA K: Accuracy of fetal gender detection using a conventional nested PCR assay of maternal plasma in daily practice; *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2008; 48: 501-504
142. VAN DIJK BA, BOOMSMA DI, DE MAN AJ: Blood group chimerism in human multiple birth is not rare; *A J Med Genet* 1996; 61: 264-268
143. VAN WIJK IJ, DE HOON AC, JURHAWAN R, TJOA ML, GRIFFIOEN S, MULDER MA, VAN VUGT JM, OUDEJANS CB: Detection of apoptotic fetal cells in plasma of pregnant women; *Clin Chem* 2000; 46: 729-731
144. WACHTEL S, ELIAS S, PRICE J, WACHTEL G, PHILLIPS O, SHULMAN L, Meyers C, SIMPSON JL, DOCKTER M: Fetal cells in maternal circulation: isolation by multi-parameter flow cytometry and confirmation by polymerase chain reaction; *Hum Reprod* 1991; 6: 1466-1469
145. WACHTEL S, SAMMONS D, TWITTY G, UTERMOHLEN J, TOLLEY E, PHILLIPS O, SHULMAN LP: Charge flow separation: quantification of nucleated red blood cells in maternal blood during pregnancy; *Prenat Diagn* 1998; 18: 455-463
146. WALKER SP, MEAGHER S, WHITE SM: Confined blood chimerism in monozygotic dizygous (MCDZ) twins; *Prenat Diagn* 2007; 27: 369-72
147. WATAGANARA T, BIANCHI DW: Fetal cell-free nucleic acids in maternal circulation- New clinical applications; *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1022: 90-99
148. WEI C, SALLER DN, SUTHERLAND JW: Detection and quantification by homogeneous PCR of cell-free fetal DNA in maternal plasma; *Clin Chem* 2001; 47: 336-338
149. WESSMAN M, YLINEN K, KNUUTILA S: Fetal granulocytes in maternal venous blood detected by in situ hybridization; *Prenat Diagn* 1992; 12: 993-1000
150. WRIGHT CF, BURTON H: The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis; *Hum Reprod Update* 2009; 15: 139-151
151. ZHONG XY, HOLZGREVE W, HAHN S: Direct quantification of fetal cells in maternal blood by real-time PCR; *Prenat Diagn* 2006; 26: 850-854
152. ZHONG XY, HOLZGREVE W, HAHN S: The levels of circulatory fetal DNA in maternal plasma are elevated prior to the onset of preeclampsia; *Hypertens Pregn* 2002; 21: 77-83

153. ZIMMERMANN B, EL-SHEIKHAH A, NICOLAIDES K, HOLZGREVE W, HAHN S: Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma; *Clin Chem* 2005; 51: 1598-1604

**b) Bücher**

154. BENDER HG, DIEDRICH K, KÜNZEL W: Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe; pp. 13-16. *Urban & Fischer Verlag München Jena* 2000
155. DUDENHAUSEN JW, PSCHYREMBEL W: Praktische Geburtshilfe; pp. 1-10. *Walter de Gruyter Berlin New York* 2001
156. HOMER: Ilias; p. 98. *Hamburger Lesehefte Verlag Husum/Nordsee* 2005
157. KLEIHAUER E: Hämatologie; pp. 499-503. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York* 1978

## **Danksagung**

Bei Herrn PD Dr. med. Thomas Brune möchte ich mich für die Bereitstellung der interessanten Promotionsthematik und die Betreuung dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle allen Probandinnen, die an der Studie teilgenommen und diese somit überhaupt ermöglicht haben.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Sibylle Jakubiczka und Herrn PD Dr. med. Peter Vorwerk dafür bedanken, dass Sie mir die Arbeit in ihren Forschungslabors ermöglichten, mich geduldig in die Methodik einwiesen, mir bei allen methodischen Problemen zu Seite standen und mich immer wieder motivierten.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Humangenetik und des Forschungslabors der Universitätskinderklinik Magdeburg sei gedankt für die hilfreiche Unterstützung und die angenehme Zusammenarbeit.

Insbesondere möchte ich an dieser Stelle Beatrix Kramer danken, die mich von Anfang an in allen Schritten dieser Arbeit unterstützte.

Bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Universitätsfrauenklinik, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Dr. med. Sara Fill Malfertheiner danke ich sehr herzlich für die Rekrutierung der meisten Probandinnen einschließlich Gewinnung der Blutproben und für die hilfreichen Gespräche.

Nicht zuletzt bin ich meiner Familie und meinem Freund, deren Unterstützung ich mir stets sicher sein konnte, für das unermüdliche Verständnis und die stetige Motivation von ganzem Herzen dankbar.

## **Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**„Kinetik des Auftretens fetaler DNA im mütterlichen Blut während und nach der Schwangerschaft“**

in der Universitätskinderklinik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch Herrn PD Dr. med. Thomas Brune, Frau Dr. rer. nat. Sibylle Jakubiczka und Herrn PD Dr. med. Peter Vorwerk ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 25. Oktober 2010

Maria Barleben

## **Darstellung des Bildungsweges**

### **Persönliche Daten**

Name: Maria Barleben  
Geburtsdaten: 08.02.1982, Magdeburg

### **Schulbildung**

1988 – 1994 20. Grundschule in Berlin-Hohenschönhausen  
1994 – 1995 Stauffenberg-Gymnasium in Berlin-Hohenschönhausen  
1995 – 1998 Diesterweg-Gymnasium in Tangermünde  
1998 – 2001 Musikgymnasium Schloss Belvedere in Weimar, Abitur

### **Studium**

Oktober 2001 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der  
Otto-von-Guericke-Universität in Magdeburg  
August 2003 Ärztliche Vorprüfung  
August 2006 – Juli 2007 Praktisches Jahr  
Kliniken für Chirurgie und Innere Medizin am Hospital  
Civil der Universität Guadalajara (Mexiko)  
(Dr. L. Rodríguez Martínez, Dr. M. Robles Figueroa)  
Universitätsklinik für Neurologie Magdeburg  
(Prof. Dr. med. C.-W. Wallesch)  
November 2007 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Approbation

### **Facharztausbildung**

Seit Januar 2008 Universitätsklinik für Neurologie Magdeburg  
(Prof. Dr. med. H.-J. Heinze)

Magdeburg, 25. Oktober 2010

## Tabellenanhang

**Tab. I: Blutentnahme im Verlauf der Schwangerschaft**

Studiennr.	Alter	Zeitpunkt der Blutentnahme		frühere SS		Ergebnisse		
		SSW	SS-Komplik.	M	W	1. Ansatz	2. Ansatz	Σ
26	27	38	-	-	-	+	+	+
27	26	17	-	-	-	-	-	-
39	33	36	-	-	-	+	+	+
40	25	32	Vorz. WT	-	-	+	+	+
47	23	35	Vorz. WT	-	1	+	+	+
48	22	39	-	-	1	+	+	+
55	30	35	-	-	-	-	+	+
59	32	27	Vorz. WT	-	-	-	-	-
60	25	30	-	-	1	-	+	+
61	31	34	Vorz. WT	-	-	-	+	+
62	25	27	-	-	-	+	+	+
63	20	25	-	-	-	-	-	-
64	36	34	Vorz. WT	-	1	+	+	+
65	24	29	Zervixinsuff.	-	-	+	+	+
66	28	33	-	-	-	+	-	+
67	26	32	Gest.diab.	-	-	-	+	+
68	32	38	-	-	-	+	+	+

### Erläuterungen zur Tabellenbeschriftung

**Studiennr.** = Studiennummer; **Alter** = Alter der Probandin in Jahren zum Zeitpunkt der Blutentnahme; **Zeitpunkt der Blutentnahme: SSW** = erreichte Schwangerschaftswoche zum Zeitpunkt der Blutentnahme; **SS-Komplik.** = Komplikationen im Rahmen der Schwangerschaft (vorz. WT = vorzeitige Wehentätigkeit, Zervixinsuff. = Zervixinsuffizienz, Gest.diab. = Gestationsdiabetes); **frühere SS** = frühere Schwangerschaften (m = männlich, w = weiblich), (Probandinnen mit Aborten in der Anamnese von der Studie ausgeschlossen); **Ergebnisse** = PCR-Ergebnisse aus erstem und zweitem Ansatz (1. und 2. Versuchsreihe), Σ = Zusammenfassung beider Ansätze („+“ = positives Ergebnis, „-“ = negatives Ergebnis)

**Tab. II: Blutentnahmen um den Zeitpunkt der Geburt**

Stu- diennr.	Alter	Zeitpunkte der Blutentnahmen <sup>4</sup>			SSW	SS/Geb. - Komplik.	Geburt	Wehen	frühere SS	
		Vor Geburt	Nach Geburt						M	W
1	27	- 24 h	Tag 1	Tag 3	40	-	Vaginal	Ja	-	-
2	23	- 24 h	Tag 1	Tag 2	41	-	Vaginal	Ja	-	1
3	25	- 24 h	Tag 1	Tag 3	39	-	Vaginal	Ja	-	-
4	32	- 24 h	Tag 1	Tag 2	41	Vorz WT	Vaginal	Ja	-	-
5	22	- 24 h	Tag 1	Tag 2	40	-	Vaginal	Ja	-	-
6	30		Tag 1	Tag 2	Tag 3	39	-	Vaginal	Ja	-
7	25		Tag 1	Tag 2		39	-	Vaginal	Ja	-
8	34	- 24 h	Tag 1	Tag 3		41	-	Vaginal	Ja	-
9	36	- 24 h	Tag 1	Tag 3		41	-	Vaginal	Ja	-
10	34	- 24 h	Tag 1	Tag 3		41	-	Vaginal	Ja	1
11	26	- 24 h	Tag 1	Tag 3		38	Vorz. BS	Vaginal	Ja	-
12	29	- 24 h	Tag 1	Tag 3		37	-	Vaginal	Ja	-
13	18		Tag 1	Tag 3	Tag 5	39	-	Vaginal	Ja	-
14	21		Tag 1	Tag 3		40	-	Vaginal	Ja	-
15	22	- 24 h	Tag 1	Tag 2		40	-	Vaginal	Ja	-
16	29	- 24 h	Tag 2	Tag 3		41	-	Vaginal	Ja	1
17	29		Tag 1	Tag 2		40	-	Vaginal	Ja	2
18	28	- 24 h	Tag 2			40	-	Vaginal	Ja	-

### Erläuterungen zur Tabellenbeschriftung

**Studiennr.** = Studiennummer; **Alter** = Alter der Probandin in Jahren zum Zeitpunkt der Blutentnahmen; **Zeitpunkte der Blutentnahmen: -24 h** = innerhalb von 24 Stunden vor der Entbindung, **Tag 1** = erster Tag nach dem Tag der Entbindung; **SSW** = erreichte Schwangerschaftswoche zum Geburtstermin; **SS/Geb.-Komplik.** = Komplikationen im Rahmen der Schwangerschaft oder der Geburt (vorz. WT = vorzeitige Wehentätigkeit, vorz. BS = vorzeitiger Blasensprung, FG = Frühgeburt, BEL = Beckenendlage, TÜ = Terminüberschreitung, Gest.diab. = Gestationsdiabetes); **Geburt** = Geburtsmodus (vaginal, primäre/sekundäre Sectio caesaria), **Wehen** = Wehentätigkeit zum Zeitpunkt der Blutentnahme vor der Geburt; **frühere SS** = frühere Schwangerschaften (m = männlich, w = weiblich), (Probandinnen mit Aborten in der Anamnese von der Studie ausgeschlossen)

<sup>4</sup> entsprechend der PCR-Ergebnisse grau hinterlegt:

- 24 h      Beide Ansätze negativ
- 24 h      Ein Ansatz positiv
- 24 h      Beide Ansätze positiv

Fortsetzung Tab. II: Blutentnahmen um den Zeitpunkt der Geburt

Stu- diennr.	Alter	Zeitpunkte der Blutentnahmen			SSW	SS/Geb. – Komplik.	Geburt	Wehen	frühere SS	
		Vor Geburt	Nach Geburt						M	W
19	25		Tag 1	Tag 2	37	-	Vaginal	Ja	-	-
20	32		Tag 1	Tag 2	Tag 3	36	Frühgeb.	Vaginal	Ja	-
21	21		Tag 1	Tag 2		39	-	Vaginal	Ja	-
22	34	- 24 h	Tag 1	Tag 3		36	Frühgeb.	Vaginal	Ja	-
23	25	- 24 h	Tag 3			38	-	Vaginal	Ja	-
24	27	- 24 h	Tag 1	Tag 4		39	-	Vaginal	Ja	-
25	25		Tag 3			39	-	Vaginal	Ja	-
37	27		Tag 6			40	-	Vaginal	Ja	-
38	26		Tag 3			40	Vorz. WT	Vaginal	Ja	-
46	23	- 24 h		-		40	-	Vaginal	Ja	1
54	31	- 24 h		-		38	Vorz. BS	S. Sectio	Nein	-
58	29	- 24 h		-		42	TÜ	S. Sectio	Nein	-
69	25	- 24 h		-		39	Gest.diab.	Vaginal	Nein	-
70	23	- 24 h		-		39	BEL	P. Sectio	Nein	-
71	21	- 24 h		-		42	TÜ	Vaginal	Nein	1
72	25	- 24 h		-		40	Vorz. BS	Vaginal	Ja	-
74	35	- 24 h		-		38	-	Vaginal	Ja	2
75	30	- 24 h		-		40	-	Vaginal	Ja	-
76	25	- 24 h		-		41	-	Vaginal	Ja	1
77	29	- 24 h		-		40	-	Vaginal	Ja	-
78	28	- 24 h		-		39	-	Vaginal	Ja	1
79	27	- 24 h		-		42	TÜ	Vaginal	Ja	1
80	23	- 24 h		-		34	Vorz. BS, FG	Vaginal	Ja	-
81	34	- 24 h		-		38	-	Vaginal	Ja	-
82	28	- 24 h		-		39	-	Vaginal	Ja	-
84	34	- 24 h		-		42	TÜ	S. Sectio	Nein	-
86	19	- 24 h		-		40	Gest.diab.	Vaginal	Nein	-
87	21	- 24 h		-		42	TÜ	Vaginal	Nein	1
88	22	- 24 h		-		41	Vorz. BS,	S. Sectio	Nein	-
90	25	- 24 h		-		41	TÜ	Vaginal, VE	Nein	-
91	24	- 24 h		-		39	BEL	P. Sectio	Nein	-
92	32	- 24 h		-		41	-	Vaginal	Ja	-
93	24	- 24 h		-		39	Vorz. BS	S. Sectio	Ja	1
95	27	- 24 h		-		41	TÜ	Vaginal	Ja	-
96	33	- 24 h		-		40	-	Vaginal	Ja	1
97	27	- 24 h		-		40	-	Vaginal	Ja	1
98	31	- 24 h		-		39	-	Vaginal	Ja	1
99	17	- 24 h		-		40	-	Vaginal	Ja	-

**Tab. III: Blutentnahme Wochen bis Jahre nach der Entbindung**

Studiennr.	Alter jüngster Sohn <sup>5</sup>	SS/Geb.-Komplik.	Geburt	Schwangerschaften			Chron. Erkrankung
				M	W	Aborte	
6-4	10 Monate	-	Vaginal	1	-	-	-
28	25	-	Vaginal	1	-	-	Autoimmunthyreoiditis
29	4	-	Vaginal	1	-	-	-
30	23	-	Vaginal	1	1	-	-
31	27	-	Vaginal	1	1	-	-
32	22	Eklampsie	Sectio	1	-	-	-
33	27	-	Vaginal	2	-	-	-
34	5	-	Sectio	1	1	-	-
35	10	-	Vaginal	1	-	-	-
36	8	-	Vaginal	2	1	-	-
41	4	-	Vaginal	1	-	-	-
42	23	-	Vaginal	1	-	-	-
43	16	-	Vaginal	1	-	-	-
44	1	-	Vaginal	2	-	-	-
45	6	Gest.diab.	Vaginal	1	-	-	-
49	36	-	Vaginal	1	1	-	-
50	22	-	Vaginal	1	1	-	-
51	6	-	Sectio	1	1	-	-
52	9	Vorz. WT	Sectio (2. Sohn)	2	1	-	-
53	18	-	Vaginal	2	-	-	-
56	13	-	Vaginal	1	2	1	-
100	5	-	Sectio	1	1	1	-

### Erläuterungen zur Tabellenbeschriftung

**Studiennr.** = Studiennummer; **Alter jüngster Sohn** = Alter des jüngsten Sohnes in Jahren (so weit nicht anders gekennzeichnet) zum Zeitpunkt der Blutentnahme; **SS/Geb.-Komplik.** = Komplikationen im Rahmen der Schwangerschaft oder der Geburt (vorz. WT = vorzeitige Wehentätigkeit, Hyperem. grav. = Hyperemesis gravidarum, Gest.diab. = Gestationsdiabetes); **Geburt** = Geburtsmodus (vaginal, primäre/sekundäre Sectio caesaria); **Schwangerschaften** (m = männlich, w = weiblich), **Chron. Erkrankungen** = chronische Erkrankungen der Probandin

<sup>5</sup> entsprechend der PCR-Ergebnisse grau hinterlegt:

- 24 h    Beide Ansätze negativ
- 24 h    Ein Ansatz positiv
- 24 h    Beide Ansätze positiv

**Fortsetzung Tab. III: Blutentnahme Wochen bis Jahre nach der Entbindung**

Studiennr.	Alter jüngster Sohn	SS/Geb.-Komplik.	Geburt	Schwangerschaften			Chron. Erkrankung
				M	W	Aborte	
101	2	-	Sectio	1	-	-	-
102	13	-	Vaginal	1	1	-	-
103	2	-	Vaginal	1	-	-	-
106	12	-	Vaginal	1	-	1	-
107	10	-	Vaginal	1	-	-	-
108	21	-	Vaginal	1	-	-	-
109	6	-	Sectio	1	1	1	-
110	7	-	Vaginal	1	1	-	-
115	89 Tage	-	Vaginal	1	-	-	-
116	3	-	Vaginal	1	-	-	-
118	9 Monate	-	Vaginal	1	-	-	-
119	2	-	Vaginal	2	-	-	-
120	14	-	Vaginal	1	-	-	-
121	18	-	Vaginal	1	-	1	Fibromyalgie
122	37	-	Vaginal	1	1	-	-
123	23	-	Vaginal	1	1	-	-
124	7	-	Vaginal	1	1	-	-
125	24	-	Vaginal	1	1	-	-
126	22	-	Vaginal	1	-	2	-
127	9	-	Vaginal	2	-	-	-
128	8	-	Vaginal	1	-	1	-
129	29	-	Vaginal	1	1	-	Arthrose, Asthma bronch.
132	27	-	Vaginal	1	-	-	-
133	25	-	Vaginal	1	-	-	-
134	34	Hyperem. grav.	Vaginal	1	-	-	Hepatitis B
135	23	-	Vaginal	1	1	-	-
137	34	-	Vaginal	1	1	1	Chron. Arthritis
138	21	-	Vaginal	1	1	-	-
139	20 Tage	-	Vaginal	1	-	-	-
140	8	-	Vaginal	1	1	-	-