



# Invasionsfreie Pränataldiagnostik auf Einzelzellbasis

Claudia Holzhauser<sup>2</sup>, Zeno v. Guttenberg<sup>2</sup>, Udo Markert<sup>1</sup>, Marianna Alunni-Fabroni<sup>2</sup>

1. Placenta-Labor, Abteilung für Geburtshilfe, Universitätsklinikum der FSUJ, Bachstr. 18, 07743 Jena  
2. Beckman Coulter Biomedical GmbH, Sauerbruchstrasse 50, 81377 München

**Advalytix**  
Part of Beckman Coulter

## Zusammenfassung

Eine pränatale Analyse bezüglich Erbkrankheiten und Abweichungen bei der Chromosomenzahl wie z.B. Down-Syndrom (Trisomie 21) erreicht man bisher nur durch invasive Untersuchungen wie Amniozentese und Chorionzottenbiopsie ab der 10. Schwangerschaftswoche. Dabei werden fetale Zellen aus der Fruchtblase bzw. der Plazenta entnommen und einer DNA- und Chromosomenanalyse unterzogen. Nachteil der *invasiven* Methoden sind die Risiken wie z.B. Früh- oder Fehlgeburten bei ca. 1% der Fälle.

Es ist deshalb ein Ziel diese durch weniger riskante Verfahren zu ersetzen. Hilfreich dabei ist, dass sich im mütterlichen Blut während der Schwangerschaft auch eine geringe Konzentration fetaler Zellen ( $1:10^{5-7}$ ) befindet. Gelingt es diese anzureichern und einer DNA-Analyse zu unterziehen, werden sehr viele invasive Untersuchungen überflüssig werden und darüber hinaus die Analyse des fetalen Genoms bereits ab der 6. Schwangerschaftswoche möglich.

In dem geplanten Vorhaben soll eine neuartige Methode zur invasionsfreien Pränataldiagnostik auf Einzelzellbasis entwickelt werden. Sie besteht im wesentlichen aus 2 Teilen:

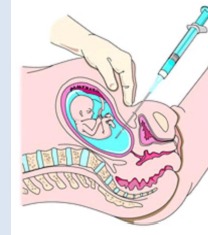
1.) Fetale Zellen werden in einem zweistufigen Verfahren aus mütterlichem Blut gewonnen. Das Aufkonzentrieren der fetalen Zellen wird durch herkömmliche Methoden wie einem Dichtegradienten erfolgen. Für die Gewinnung von Einzelzellen aus der angereicherten Lösung wird ein Verfahren entwickelt werden, das auf dem Pumpen und Fokussieren mit akustischen Oberflächenwellen (SAW) beruht. Die Zellen werden dabei mit der SAW durch einen kreisförmigen mikrofluidischen Kanal gepumpt und in einem Teil des Kanals perlschnurartig hintereinander im Flüssigkeitsstrom aufgereiht. Mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors kann der fokussierte Strom an einer definierten Stelle gestoppt und die gewünschte fetale Zelle mit einem Mikromanipulator auf die PCR Plattform transferiert werden.

2.) Anschließend erfolgt eine Einzelzell PCR (Polymerase Kettenreaktion) auf der von OLRE entwickelten Amplifikationsplattform (Ampligridd). Das Ergebnis einer Multiplex-PCR wird mittels eines statistischen Verfahrens, dem sogenannten Digital Counting (DigC), so ausgewertet, dass abnormale Chromosomenanzahlen sicher analysiert werden können.

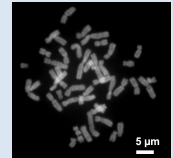
## Herkömmliche Methoden

### Amniozentese und Chorionzottenbiopsie

Mit diesen Methoden können chromosomale Abweichungen beim Fetus mit 99%iger Sicherheit detektiert werden. Diese beinhalten jedoch ein zwar geringes, aber signifikantes Risiko verschiedener Komplikationen, die zu einer Fehlgeburt führen können. Darüber hinaus erfordern sie ein hohes Maß an technischen Kenntnissen und können erst verhältnismäßig spät in der Schwangerschaft eingesetzt werden.



Amniozentese



Chromosomenbild

## 1. Gewinnung der Einzelzellen

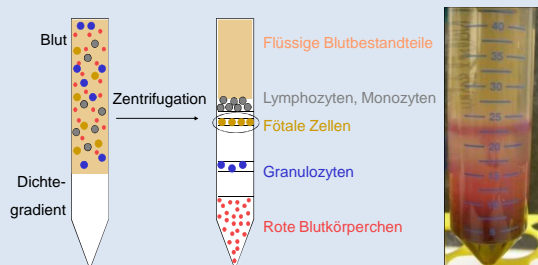


Blutabnahme aus der Armvene

### Vorteile des geplanten Verfahrens gegenüber herkömmlichen Methoden:

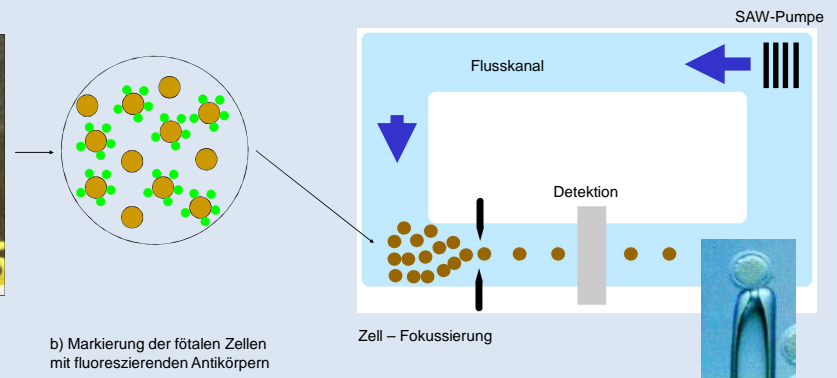
- Sehr schnelles Verfahren, Ergebnisse innerhalb eines Tages
- Deutlich preisgünstiger als herkömmliche Verfahren
- Kein invasiver Eingriff notwendig, es reicht ein risikoloses Abnehmen von Blut
- Untersuchungsbereits in der 6. Schwangerschaftswoche, statt ab der 10. Woche
- Aussage über Trisomien oder andere Aneuploidien ist u.U. exakter
- Kein umfangreiches technisches Wissen für die Durchführung notwendig
- Zellauswahl und das Ablegen auf dem Ampligridd kann vollständig automatisiert werden

### A. Aufkonzentrierung der fötalen Blutzellen



a) Anreicherung der fetalen Zellen aufgrund ihrer speziellen Dichteigenschaften

### B. Fluidische Sortierung und Entnahme von einzelnen fötalen Zellen



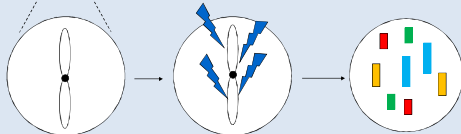
Zell - Fokussierung

Einzelzell - Entnahme

## 2. Bestimmung der Chromosomenzahl mit der „Digital Counting“ Methode

Ampligridd	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

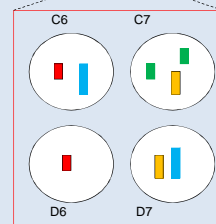
Ampligridd	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○



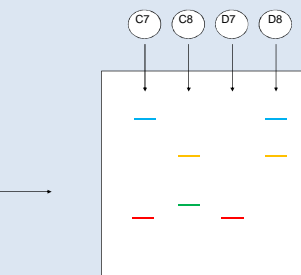
a.) Eine Einzelzelle wird auf dem Ampligridd abgelegt

b.) Die DNA der Zelle wird durch Restriktionsenzyme in Fragmente geschnitten

c.) Zugabe von PCR Reagenzien und Aufteilung auf mehrere Reaktionspunkte



d.) Amplifikation verschiedener spezifischer Chromosomenabschnitte durch PCR



e.) Analyse mit Gelelektrophorese

f.) Statistische Analyse