

Aus der
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

**Pilotstudie zum Nachweis von Aneuploidien in der Frühgravidität
an transzervikal gewonnenen Trophoblasten
mittels Array-CGH-Analyse**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Julia Patrizia Zaccaria
aus Garmisch-Partenkirchen

2018

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatlerin: Priv. Doz. Dr. med. Tina Buchholz

Mitberichterstatler: PD Dr. Tim-Matthias Willi Strom
Prof. Dr. Roland Kappler

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. Elisabeth Maier

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hicel

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2018



3.5.4 Auswahl der zu dissezierenden Zellen.....	31
3.5.5 Dissektionsvorgang	32
3.6 Gesamtgenomamplifikation (WGA)	34
3.6.1 Funktionsprinzip	34
3.6.2 Material und Vorbereitung	35
3.6.3 Durchführung.....	37
3.6.3.1 Zellyse.....	37
3.6.3.2 Prä-Amplifikation	38
3.6.3.3 Amplifikation.....	39
3.6.3.4 Evaluation der Amplifikation mittels Elektrophorese.....	40
3.7 Array-basierte vergleichende Genomhybridisierung (Array-CGH).....	42
3.7.1 Funktionsprinzip	42
3.7.2 Material und Durchführung	45
3.7.2.1 Labelling.....	45
3.7.2.2 Probenvereinigung und Volumenreduktion	46
3.7.2.3 Hybridisierung	46
3.7.2.4 Waschen	47
3.7.2.5 Scannen.....	48
3.7.2.6 Beurteilung der Ergebnisse mittels Qualitätsparameter	49
3.7.3 Validierung der Methoden.....	51
4 Ergebnisse	52
4.1 ThinPrep®-Bürstenabstrich	52
4.2 Identifizierung der Trophoblasten	52
4.2.1 Ergebnisse des morphologischen Ansatzes	52
4.2.2 Ergebnisse der Immunzytofluoreszenz	53
4.2.3 Analyse des Zellmaterials.....	55
4.3 Lasermikrodissektion	58
4.4 Gesamtgenomamplifikation	62
4.5 Auswertung der Array-CGH-Ergebnisse	65
4.5.1 Array-CGH-Profile	66
4.5.2 Qualitätsparameter der Array-CGH-Analysen	69
5 Diskussion.....	70



5.1 Strategien für das experimentelle Vorgehen.....	70
5.1.1 Transzervikale Gewinnung von Trophoblasten	70
5.1.2 Identifizierung von Trophoblasten	71
5.1.3 Isolierung von Trophoblasten.....	72
5.1.4 Alternativen zur Routinepräparation von fetaler DNA.....	73
5.2 Diskussion der Methoden und Ergebnisse	73
5.2.1 Bürstenabstrich.....	73
5.2.2 Zellweiterverarbeitung	76
5.2.3 Morphologischer Ansatz der Trophoblastenidentifikation	76
5.2.4 Immunzytofluoreszenz.....	77
5.2.4.1 Blocken unspezifischer Bindungsstellen	77
5.2.4.2 Hintergrundfärbung.....	77
5.2.4.3 Diskussion der Immunfluoreszenz-Bilder.....	79
5.2.5 Lasermikrodissektion	80
5.2.6 Gesamtgenomamplifikation	81
5.2.7 Interpretation der Array-CGH-Ergebnisse	81
5.2.8 Kompatibilität der Immunzytofluoreszenz mit WGA und Array-CGH	84
5.3 Fazit und Ausblick	85
6 Zusammenfassung	89
7 Literaturverzeichnis.....	91
8 Abbildungsverzeichnis	98
9 Tabellenverzeichnis.....	99
10 Danksagung	100
11 Eidesstattliche Versicherung	101



Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
A max	Absorptionsmaximum
a. e.	am ehesten
AC	AdhesiveCap
AK	Antikörper
Array-CGH	Array-basierte vergleichende Genomhybridisierung
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CEB	Cell Extraction Buffer (Zellextraktionspuffer)
cffDNA	Cell-Free Fetal DNA (zellfreie fetale DNA)
CGH	Comparative Genomic Hybridization (vergleichende Genomhybridisierung)
CVS	Chorionic Villus Sampling (Chorionzottenbiopsie)
Cy3	Cyaninfarbstoff 3
Cy5	Cyaninfarbstoff 5
d. h.	das heißt
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dest.	destilliert
DLR	Derivative Log Ratio
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
E max	Emissionsmaximum
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
Et al.	Et alii
EZL	Endozervikale Lavage
Fa.	Firma
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
g	Gramm
h	Stunde
HCG	Humanes Choriongonadotropin
HLA-G	Humanes Leukozytenantigen G
HPL	Humanes Plazentares Laktogen
HPV	Humanes Papillomavirus
HSV	Herpes-Simplex-Virus
ID	Identifikationsnummer
IgG	Immunglobulin G
IUL	Intrauterine Lavage
IZF	Immunzytofluoreszenz
k. A.	keine Angabe
l	Liter
m	männlich



m. E.	mit Einschränkung
mAb	Monoklonarer Antikörper
Mb	Mega-Basenpaare (1.000.000 Basenpaare)
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MM	Mastermix
mm	Millimeter
mV	Millivolt
MVZ	Medizinisches Versorgungszentrum
NGS	Next-Generation-Sequencing
nm	Nanometer
NS	nicht-schwanger
o. g.	oben genannt
OT	Objektträger
PAP	Papanicolao
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEN	Polyethylen-Naphthalen
PET	Polyethylen-Terephthalat
pg	Pikogramm
PID	Präimplantationsdiagnostik
PKD	Polkörperdiagnostik
PLAP	Plazentare Alkalische Phosphatase
PND	Pränataldiagnostik
Prot.	Protokoll
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
S.	Seite
SBR	Signal to Background Ratio
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
sec	Sekunde(n)
SSC	Saline-Sodium Citrate (-Puffer)
SSW	Schwangerschaftswoche
ST	Synzytiotrophoblast
STR	Short Tandem Repeat
TBS	Tris Buffered Saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
TU	Technische Universität
TZT	Transzervikale Trophoblasten
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
w	weiblich
WGA	Whole Genome Amplification (Gesamtgenomamplifikation)
ZT	Zytotrophoblast



1 Einführung

1.1 Aneuploidie und aktuelle pränataldiagnostische Methoden

Der menschliche Chromosomensatz besteht aus insgesamt 46 Chromosomen, die aus 22 Autosomenpaaren (1-22) und einem Gonosomenpaar (XX oder XY) zusammengesetzt sind. Ist die Chromosomenanzahl korrekt, spricht man von Euploidie. Als Aneuploidie wird eine Abweichung vom physiologischen Chromosomensatz bezeichnet, die durch Zugewinn oder Verlust von Chromosomen charakterisiert ist (numerische Chromosomenaberration) [1]. Davon abzugrenzen ist die strukturelle Chromosomenaberration, bei der ein veränderter Chromosomenaufbau vorliegt, die Chromosomenanzahl jedoch normal sein kann [2].

Ursächlich für Aneuploidien sind zumeist Non-Disjunction-Prozesse, also Chromosomen-Fehlsegregationen während der Meiose. Bei Verlust eines Chromosoms kommt es zur Monosomie, während es bei Zugewinn eines Chromosoms zur Trisomie kommt. Dabei können sowohl die Autosomen, als auch die Gonosomen betroffen sein. Bekannte Beispiele sind die Trisomie 21, bei der das Chromosom 21 – ein Autosom – in dreifacher Ausführung vorliegt und die klinisch dem Down-Syndrom entspricht, oder die Monosomie X, mit dem phänotypischen Korrelat des Ullrich-Turner-Syndroms, bei der das X-Chromosom – ein Gonosom – nur einfach vorhanden ist. Die meisten Aneuploidien führen jedoch zu nicht lebensfähigen Individuen und stellen oftmals die Ursache für Spontanaborte in der Frühschwangerschaft dar [3].

Das Risiko für Aneuploidien, beispielsweise ein Kind mit Down-Syndrom zu tragen, korreliert stark mit dem Alter der Mutter. Dabei zeigt sich bis zum etwa 30. Lebensjahr zunächst ein linearer und anschließend bis zum Alter von 45 Jahren ein exponentieller Anstieg dieses Risikos. Heutzutage wird daher mit den meisten werdenden Müttern, insbesondere Frauen über 35 mit erhöhtem Risiko für Schwangerschaften mit chromosomalen Fehlverteilungen sowie bei rezidivierenden Spontanaborten, eine pränatale Diagnostik besprochen [4-6]. Zu den Methoden der Pränataldiagnostik (PND) werden nicht-invasive und invasive Verfahren gezählt. Im Folgenden sollen diese näher erläutert werden.



1.1.1 Invasive pränataldiagnostische Methoden

Zu den invasiven pränataldiagnostischen Methoden gehören die Amniozentese, die Chorionzottenbiopsie (CVS) und die Cordozentese. Dabei wird jeweils Gewebe mit kindlicher Erbinformation durch transabdominelle Punktion gewonnen und steht damit einer direkten Untersuchung zur Verfügung oder wird für eine Anreicherung der Zellen kultiviert. Die invasiv gewonnene DNA des Fetus kann einer umfangreichen Diagnostik zur Verfügung gestellt werden, allerdings bergen die invasiven Verfahren ein eingriffsassoziiertes Risiko für eine Fehlgeburt von bis zu 3,5% [7]. Sie stehen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Schwangerschaft zur Verfügung.

Die Amniozentese ist die Fruchtwasserpunktion zur Gewinnung von kindlichen Zellen in Form von Amniozyten (Zellen der inneren Eihülle) und beispielsweise Hautzellen, die sich im Fruchtwasser befinden. Sie steht circa ab der 16. Schwangerschaftswoche (SSW) zur Verfügung. Es besteht hier ein Risiko für eine Fehlgeburt durch Infektion, Blutung oder Fruchtwasserabgang von 0,5%. Wird die Amniozentese früher durchgeführt (Frühamniozentese, 11.-14. Woche), ist das Risiko höher [7]. Die Amniozentese erlaubt nach Langzeitkultur der Zellen durch Beurteilung von Struktur und Anzahl der Chromosomen eine Bestimmung des Karyotyps [8]. In einem schnelleren Verfahren können unkultivierte Zellen einer Untersuchung mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung unterzogen werden, bei der einige Chromosomen auf ihre Zahl hin untersucht werden, zum Beispiel zur Abklärung der Trisomien 21 (Down-Syndrom), 18 (Edwards-Syndrom) und 13 (Patau-Syndrom) [7, 9].

Die Chorionzottenbiopsie (CVS) entspricht der Entnahme von plazentaren Zellen, die sich an den Plazentazotten befinden und kindliches Erbgut enthalten. Sie steht bereits ab der 11.-12. Schwangerschaftswoche und damit früher als die Amniozentese zur Verfügung. Das eingriffsassoziierte Fehlgeburtenrisiko liegt hier mit sehr unterschiedlichen Angaben von 0,5%-3,5% insgesamt über dem bei der Amniozentese [7, 10]. Bei der CVS erfolgt die Diagnostik zweizeitig. In einem schnellen Untersuchungsverfahren bietet die Kurzzeit-Zellkultur nach ein bis zwei Tagen die Möglichkeit einer mikroskopischen Untersuchung der Chromosomen (Direktpräparation). Die Langzeitkultur über 14 Tage erlaubt dann eine sichere Diagnostik bezüglich der chromosomalen Struktur [7].

Die Cordozentese ist die Nabelschnurpunktion. Sie wird erst ab der 19. Schwangerschaftswoche und damit später als die zuvor genannten Verfahren



eingesetzt. Dabei wird fetales Blut durch Punktion der Vena umbilicalis gewonnen. Dies steht anschließend diversen Untersuchungen zur Verfügung. Zum einen können unklare Befunde, die zuvor in Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie erstellt wurden, bestätigt oder verworfen werden. Zum anderen dient das Blut für Laboruntersuchungen, z. B. zur Anämiediagnostik. Des Weiteren kann der Zugang für Transfusionen oder die Verabreichung von Medikamenten genutzt werden. Das Risiko für eine Fehlgeburt beträgt hier zwischen 0,5% und 2,5% und ist höher, je früher die Untersuchung durchgeführt wird [7].

1.1.2 Nicht-invasive pränataldiagnostische Methoden

Die nicht-invasiven pränataldiagnostischen Methoden sind in den letzten Jahren weiterentwickelt worden und beinhalten zunächst die Ultraschalluntersuchung mit Messung der kindlichen Nackenfalte, die Bestimmung einiger Hormone im mütterlichen Blut sowie die Kombination beider im Rahmen des Ersttrimester-Screenings. Sie dienen allerdings im Allgemeinen nur der Erstellung eines individuellen Risikoprofils. Es kann keine eindeutige Diagnose von Aneuploidien gestellt werden [9, 11].

Seit einigen Jahren steht ein weiteres nicht-invasives Verfahren, die Untersuchung zellfreier fetaler DNA (cffDNA) im mütterlichen Blut, zur Verfügung (z. B. PraenaTest®) [12]. Der Arbeitsgruppe von Lo et al. gelang es 1997 erstmals fetale DNA von menschlichen Feten aus Blut von Schwangeren zu extrahieren [13]. Die DNA liegt dabei frei, also nicht innerhalb einer Zelle vor. Hierbei können bestimmte Aneuploidien festgestellt werden. Die Methode erlaubt allerdings aufgrund nur sehr geringer DNA-Mengen bisher nur die Untersuchung von einigen wenigen Chromosomen. Dazu gehören die Chromosomen 21, 18, 13 und die Geschlechtschromosomen [12].

1.2 Plazentare Trophoblasten

Vor einigen Jahren ist nachgewiesen worden, dass Zellen mit fetaler Erbinformation in Form von plazentaren Trophoblasten hauptsächlich im ersten Schwangerschaftstrimenon (ab SSW 5) geringfügig im Zervixkanal bzw. Zervixschleim des Uterus zu finden sind [14-19]. Ihre Verwendung für weitere Untersuchungen wurde im Rahmen verschiedener Studien getestet (s. Kapitel 1.2.2).



1.2.1 Embryonale Entwicklung der Trophoblasten

Nach der Befruchtung der Eizelle und Teilung der Zellen entwickeln sich die Blastomere und anschließend die Blastozyste. In dem Stadium, in dem durch Zellteilung die Zellzahl auf ca. 50 gestiegen ist, entwickelt sich eine Blastozystenhöhle. Dabei bildet sich eine innere Zellmasse, der Embryoblast, an die sich eine äußere Schicht aus Trophoblasten anlagert. Nachdem sich die Blastozyste an die Uteruswand angelegt hat, dringen die Trophoblasten in die Schleimhaut (Endometrium) ein und führen so zur Implantation des Embryos. Das Endometrium ist zweischichtig aufgebaut und lässt sich in ein Stratum functionale (lumenwärts) und ein Stratum basale einteilen. Das Stratum functionale besteht wiederum aus einer Zona compacta (lumenwärts) und einer Zona spongiosa, in der sich viele Drüsen befinden und die an das Stratum basale grenzt. Die Trophoblasten dringen bis zur Zona compacta aktiv in das Endometrium ein und lysieren dabei die Deziduazellen, um an Proteine, Zucker und Fette zu gelangen. Dabei phagozytieren sie Zellreste und zerstören Drüsengänge. Nach der Einnistung in das Endometrium treten die Trophoblasten mit mütterlichen Kapillargefäßen in Kontakt. Es bilden sich Lakunen, in die das mütterliche Blut über Arteriolen hinein- und über Venolen wieder abfließt. Somit ist die Grundlage der uteroplazentaren Zirkulation geschaffen.

Die Trophoblasten, die mit der Schleimhaut in Kontakt stehen, fusionieren zu mehrkernigen Riesenzellen, während jene Zellen ohne Kontakt zur Schleimhaut ihre epitheliale Morphologie beibehalten. Die Riesenzellen sind zunächst unregelmäßig verteilt und bilden schlussendlich eine kontinuierliche Zellschicht zur Schleimhaut hin. Man nennt sie nun Synzytiotrophoblasten [20]. Diese Differenzierung bringt nicht nur morphologische, sondern auch biochemische Veränderungen mit sich, und zwar v. a. die Hormonproduktion von HCG (Humanes Choriongonadotropin) und HPL (Humanes Plazentares Laktogen) [21]. Die embryowärts gelegenen Trophoblasten dagegen werden Zytotrophoblasten genannt. Sie allein sind in der Lage Zellteilung zu betreiben und werden durch Fusion der Zellmembranen in das Synzytium aufgenommen. Das Synzytium breitet sich stetig weiter aus und es bilden sich Lakunen darin [20]. Die essenzielle Funktion der Synzytiotrophoblasten wird dadurch deutlich, dass ihre Dysfunktion mit Schwangerschaftskomplikationen verbunden ist, beispielsweise der Präeklampsie und der fetalen Wachstumsretardierung [21]. Abbildung 1 zeigt die Differenzierung der Trophoblasten.

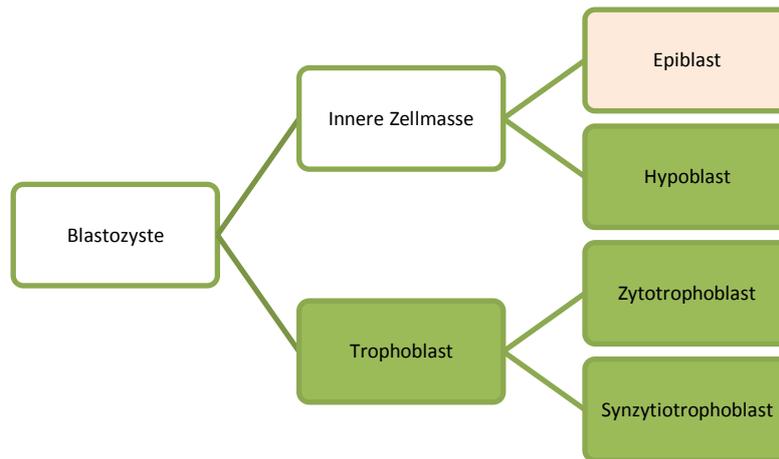


Abbildung 1 Zelldifferenzierung in embryonales und extraembryonales Gewebe

Aus der Blastozyste entwickelt sich eine innere Zellmasse (u. a. embryonales Gewebe), und eine äußere Zellmasse aus Trophoblasten (extraembryonales Gewebe; grünlich hinterlegt). Der Epiblast bildet den Embryo (embryonales Gewebe; rosa hinterlegt), während der Hypoblast den Dottersack bildet, der zum extraembryonalen Gewebe zählt. Die Trophoblasten differenzieren sich zu Zytotrophoblasten, wovon ein Teil wiederum zu Synzytiotrophoblasten fusioniert [20, 22, 23].

Es wird angenommen, dass die im Zervixschleim bzw. im Zervixkanal vorhandenen Trophoblasten, von sich zurückbildenden Chorionzotten in den unteren Pol der Gebärmutter ausgeschwemmt werden. Stimmt diese Annahme, dann ereignet sich dies vermutlich vor der Verschmelzung von Dezidua basalis und parietalis zwischen der 7. und 13. Schwangerschaftswoche. Die abgeschilferten Trophoblasten sammeln sich zunächst vor dem Zervixschleim und wandern dann dort ein [15, 16, 24-26].

Im Folgenden wird für plazentare Trophoblasten die Bezeichnung „fetale Zellen“ verwendet, obgleich sie nicht direkt fetaler Herkunft sind, sondern sich für die plazentare Versorgung des Embryoblasten differenziert haben. Allerdings kann von derselben DNA ausgegangen werden, sofern keine Veränderung dieser nach der Differenzierung zu Trophoblasten stattgefunden hat (postzygotische Veränderung) sowie keine Mosaikzellreihen vorliegen. Die Untersuchung von plazentarem Material (z. B. Chorionzotten) anstelle von echt fetaler DNA wird allerdings auch bei den bereits etablierten invasiven pränataldiagnostischen Verfahren praktiziert (s. Kapitel 1.1.1).

1.2.2 Transzervikale Gewinnung und Identifizierung von Trophoblasten in Studien

1971 gelang es Shettles et al. fetale Zellen im Zervixschleim durch Darstellung des Y-Chromosoms nachzuweisen [14]. Durch verschiedene Methoden (Bürstenabstrich, Aspiration, Lavage; s. u.) konnten diese Zellen im Rahmen diverser Studien seither geringfügig isoliert und identifiziert werden [27-29]. Allerdings zeigte sich dabei, dass



die Ausbeute dieser Zellen abhängig von der Zellentnahmemethode und der Studie stark variiert. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die in der Literatur aufgeführten Zellentnahmemethoden und ihre Ausbeute an Trophoblasten.

Arbeitsgruppe	Jahr	Methode	Ausbeute
Kingdom et al. [28]	1995	Lavage (IUL) Bürstenabstrich	4/11 (36,4%) 1/11 (9,1%)
Miller et al. [30]	1999	Lavage (IUL) Aspiration	31% (morphologisch) bzw. 68% (IZC) 28% (morphologisch) bzw. 50% (IZC)
ErgIn et al. [31]	2001	Lavage (IUL) Lavage (EZL)	12/13 (92,3%) 10/12 (83,3%)
Cioni et al. [29]	2005	Bürstenabstrich Lavage (IUL)	k. A.
Katz-Jaffe et al. [17]	2005	Aspiration	50%
Imudia et al. [32]	2009	Bürstenabstrich	35/37 (94,6%)
Mantzaris et al. [27]	2014	Aspiration	116/207 (56%)
Bolnick et al. [19]	2014	Bürstenabstrich (ThinPrep®-Pap-Test)	k.A. (56 Proben; durchschnittliche Trophoblastenzahl pro Probe: 1275+/-137)
Fritz et al. [33]	2015	Bürstenabstrich (ThinPrep®-Pap-Test)	k.A. (224 Proben, durchschnittliche Trophoblastenzahl pro Probe: 675)
Bolnick et al. [34]	2016	Bürstenabstrich (ThinPrep®-Pap-Test)	k.A. (Proben-Anzahl nicht angegeben. Insgesamt 1400 Trophoblasten)

Tabelle 1 Übersicht über transzervikale Zellentnahmemethoden in der Literatur

Die Trophoblasten-Ausbeute beruht auf der Anzahl der Proben, bei der durch die aufgeführte Zellentnahmemethode Trophoblasten nachgewiesen wurden, geteilt durch die Gesamtprobenanzahl (bzw. die Angaben in Prozent). IUL: intrauterine Lavage; IZC: immunzytochemisch; EZL: endozervikale Lavage; k. A.: keine Angabe.

Einige Arbeitsgruppen testeten eine rein morphologische Erkennung von Trophoblasten im Zervix-Abstrich. Synzytiotrophoblasten sind größere Zellen mit hyperchromatischen, unregelmäßigen Kernmustern und gelegentlich Zellkerneinschlüssen. Verglichen mit differentialdiagnostisch in Frage kommenden multinukleären Histiozyten weisen sie vermehrt Kernatypien und Pyknose auf. Im Vergleich mit bei Herpes simplex-Infektion vorkommenden Zellen haben Synzytiotrophoblasten nicht deren milchglasartiges Aussehen. Zytotrophoblasten entspringen einer reiferen Plazenta und können unterschiedliche Größen und Morphologien aufweisen. Obwohl sie meist als Einzelzellen zu finden sind, kommen sie zum Teil in lockeren Zellverbänden vor. Die Zellen sind rund und haben eine gut abgrenzbare Zellgrenze sowie einen hyperchromatischen unregelmäßigen Zellkern. Das zumeist basophile Zytoplasma weist eine unregelmäßige Dichte und perinukleäre Kondensationen auf. Zytotrophoblasten können schwierig von anderen Zellen im



Zervixabstrich, beispielsweise Endometrium- oder Deziduazellen, aber auch abnormen oder dysplastischen Zellen, abzugrenzen sein [35]. Tabelle 2 (modifiziert nach [35, 36]) zeigt die Differentialdiagnose multinukleärer Zellen, die von den Synzytiotrophoblasten unterschieden werden müssen.

Zelltyp	Charakteristika
Synzytiotrophoblast*	Multiple, häufig geklumpfte, hyperchromatische, gefaltete Kerne und prominente Kernmembranen
Deziduazellen	Leicht vergrößerte polygonale oder ovale Zellen mit 1-3 großen Kernen und teils prominenten Nukleoli
Multinukleäre Histozyten	Große Zellen mit vielen, kleinen, gleich großen, über das Zytoplasma verteilten Kernen
Multinukleäre Endozervixzellen	Hypertrophe Zellen mit reaktionsfreudigem Chromatin und basalen Kernen
HSV-Infektion	Leicht vergrößerte multinukleäre Zellen mit milchglasartigen charakteristisch geformten Kernen; teils Kerneinschlüsse
HPV-Infektion	Leicht vergrößerte multinukleäre Zellen mit großen, hyperchromatischen, rosinenartigen Kernen; keine Nukleoli
Fremdkörperriesenzelle	Große Zelle mit viel Zytoplasma und zahlreichen Nukleoli, die eine polare Verteilung aufweisen

Tabelle 2 Differentialdiagnose multinukleärer Zellen in der Zervix

Die Tabelle zeigt die verschiedenen Zelltypen, die differentialdiagnostisch bei einer rein morphologischen Identifizierung von Synzytiotrophoblasten in Frage kommen und die jeweiligen morphologischen Charakteristika.* Eine Darstellung eines Synzytiotrophoblasten liefert Abbildung 9, S. 52).

Unter den Methoden für die Identifizierung der Trophoblasten findet sich neben dem morphologischen Ansatz hauptsächlich der Nachweis durch immunzytochemische Verfahren bzw. Immunzytofluoreszenz. Antikörper gegen verschiedene Antigene auf Zyto- bzw. Synzytiotrophoblasten wurden von unterschiedlichen Arbeitsgruppen getestet. Am vielversprechendsten war darunter der Antikörper gegen das Humane Leukozyten-Antigen G (HLA-G). In Tabelle 3 sind die verschiedenen getesteten Antikörper aufgelistet.



Antikörper	Arbeitsgruppe (Jahr)
Anti-HLA-G *	Bulmer et al. (2003), Imudia et al. (2009), Bolnick et al. (2012/ 2014/ 2016), Fritz et al. (2015)
Anti-Zytokeratin 7	Bulmer et al. (1995), Miller et al. (1999), Katz-Jaffe et al. (2005)
FT141.1	Kingdom et al. (1995), Miller et al. (1999), Katz-Jaffe et al. (2005)
H315	Kingdom et al. (1995)
I03	Kingdom et al. (1995)
Anti-HCG	Fiorella et al. (1993), Kobayashi et al. (2000), Bolnick et al. (2016)
Anti-HPL	Fiorella et al. (1993)
NCL-PLAP	Miller et al. (1999)
NDOG-1	Miller et al. (1999), Mantzaris et al. (2015)
NDOG-5	Miller et al. (1999)
340	Miller et al. (1999)

Tabelle 3 Übersicht über die Antikörper für den Trophoblasten-Nachweis in Studien

Die Tabelle zeigt die Antikörper, die bisher von den verschiedenen oben aufgeführten Arbeitsgruppen getestet wurden. * Dieser Antikörper (Anti-HLA-G-AK) wurde in dieser Arbeit verwendet.

Das Humane Leukozyten-Antigen G gehört zu den HLA Klasse I-Molekülen und wird auf der Oberfläche von Trophoblasten exprimiert [37]. HLA-G trägt zur Invasion der Trophoblasten, zur Differenzierung von Deziduazellen und durch immunmodulatorische Aktivität zur Aufrechterhaltung eines lokalen immunsuppressiven Zustands bei [38-41]. Dadurch verhindert es die Abstoßung des Embryos durch das mütterliche Immunsystem mittels Inhibition der mütterlichen natürlichen Killerzellen [42]. Die immunmodulierende Funktion wird auch von Tumorzellen genutzt, denn HLA-G wird von einigen Tumoren exprimiert [43].



1.3 Einzell-DNA-Analyse mittels Array-CGH im Rahmen der Präimplantationsdiagnostik

Seit einigen Jahren gibt es die Möglichkeit, alle Chromosomen auf Aneuploidien bzw. unbalancierte Translokationen mit Hilfe der Array-basierten vergleichenden Genomhybridisierung (Array-based Comparative Genomic Hybridization (Array-CGH)) zu untersuchen. Damit kann selbst die DNA von Einzelzellen analysiert werden [44]. Dieses Verfahren wird zum Beispiel im Rahmen der Präimplantationsdiagnostik (PID) mit Untersuchung von Trophektodermzellen, bzw. der Präfertilisationsdiagnostik mit Untersuchung von Polkörpern (Polkörperdiagnostik (PKD)) angewendet [45]. Beide Verfahren setzen allerdings eine reproduktionsmedizinische Behandlung voraus. Im Rahmen eines kurzen gynäkologisch-operativen Eingriffs werden Eizellen entnommen. Bei der PKD werden vor der Befruchtung die Polkörper untersucht. Bei der PID werden die Eizellen befruchtet, kultiviert und anschließend Trophektodermzellen im Blastozystenstadium des Embryos (40-80-Zellstadium) entnommen. Die Zellen werden lysiert und ihre DNA mittels Gesamtgenomamplifikation (Whole Genome Amplification (WGA)) vervielfältigt. Somit steht ausreichend Ausgangsmaterial für die Chromosomenanalyse mittels Array-CGH zur Verfügung.

Die Array-CGH ist ein Verfahren, bei dem eine zu testende DNA (Probe) mit einer gesunden Referenz-DNA quantitativ verglichen wird. Dies wird farblich dargestellt und computergestützt ausgewertet [46]. Die Array-CGH wird bereits routinemäßig im Zentrum für Reproduktionsgenetik Gyn-Gen-Lehel MVZ in München angeboten, in dem diese Arbeit größtenteils durchgeführt wurde. Die genaue Funktionsweise der WGA und der Array-CGH werden in den Kapiteln 3.6 und 3.7 erklärt.



1.4 Problemstellung

Die derzeit zur Verfügung stehenden invasiven Methoden der pränatalen Diagnostik bieten zwar die Möglichkeit einer umfangreichen Diagnostik, bergen dabei allerdings das Risiko für eine Fehlgeburt von bis zu 3,5%. Deshalb muss nach Methoden gesucht werden, die genauso verlässlich und aussagekräftig sind, wie die aktuell angewendeten, dabei aber ein vernachlässigbares Risiko mit sich bringen.

Des Weiteren stehen die aktuellen Methoden mit der Chorionzottenbiopsie und der Amniozentese erst ab der 12. bzw. 17. Schwangerschaftswoche, mit der Untersuchung von zellfreier fetaler DNA aus dem mütterlichen Blut frühestens ab der 9. Schwangerschaftswoche zur Verfügung. Methoden für pränatale Diagnostik zu einem früheren Zeitpunkt wären wünschenswert.

Außerdem sind die analytischen Aussagen der früher verfügbaren nicht-invasiven pränataldiagnostischen Verfahren, wie oben beschrieben, begrenzt. Wünschenswert wäre hingegen die Möglichkeit einer umfassenden chromosomalen und genetischen Analyse zu einem frühen Zeitpunkt.

Die Kenntnis des frühen Vorkommens von transzervikalen Trophoblasten ab der 5. Schwangerschaftswoche und ihre nicht-invasive Gewinnung sind im Hinblick auf eine potenzielle Verwendung für die Pränataldiagnostik vielversprechend. Außerdem können mit Hilfe der Array-CGH selbst bei Einzelzellen alle Chromosomen untersucht werden, sodass eine umfassendere DNA-Analyse als bei der pränatalen Diagnostik aus mütterlichem Blut ermöglicht wird.

Aus der Kombination der Heranziehung plazentarer Trophoblasten und der Anwendung moderner molekularbiologischer Methoden auf diese ergeben sich folgende potentielle Vorteile für die Pränataldiagnostik:

- Nicht-invasive Pränataldiagnostik (Entnahme durch Bürstenabstrich)
- Sehr frühe Aneuploidie-Diagnostik (ab SSW 5)
- Umfassende Aneuploidie-Diagnostik (Array-CGH-Analyse); keine Beschränkung auf bestimmte Chromosomen



2 Fragestellung

- Welche Methode zur Identifikation von Trophoblasten aus dem Zervixkanal lässt sich zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Schwangerschaft reproduzierbar anwenden?
- Lässt sich die DNA der gewonnenen Zellen per Gesamtgenomamplifikation (WGA) vervielfältigen?
- Lässt sich die durch WGA amplifizierte DNA zum Einsatz für die Array-CGH verwenden und werden zuverlässige Ergebnisse erzielt?
- Lässt sich das Verfahren in den Routineablauf für Risikoschwangere integrieren, in Bezug auf den Zeitpunkt der Entnahme, Nebeneffekte und Menge der Zellen?



3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Machbarkeitsnachweisstudie (proof of principle study). In Anlehnung an die Literatur wurden Methoden gesucht und untersucht, um die im ersten Schwangerschaftstrimenon im Zervixabstrich vorkommenden fetalen Zellen zu gewinnen, sie zu identifizieren und zu isolieren und sie anschließend einer Gesamtgenomamplifikation mit vergleichender Genomhybridisierung zu unterziehen. Außerdem wurde die Durchführbarkeit einer Verkettung dieser Teilschritte im Rahmen einer gynäkologischen Praxistätigkeit geprüft, wobei die Gesamtgenomamplifikation und die vergleichende Genomhybridisierung bereits routinemäßig im Rahmen der Präfertilisationsdiagnostik (und Präimplantationsdiagnostik) im Labor für Reproduktionsgenetik (s. u.) angewendet werden. Vor Beginn der Studie wurde die Zustimmung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München eingeholt.

3.2 Patientinnenkollektiv und Probenbenennung

In der vorliegenden Studie wurden 33 Patientinnen im Alter von 20 bis 78 Jahren herangezogen, die sich im medizinischen Versorgungszentrum (MVZ) Gyn-Gen-Lehel und der gynäkologischen Praxis Dr. med. Elisabeth Maier in München zwischen Juni 2014 und Mai 2015 vorgestellt hatten. Dabei waren 16 schwangere Patientinnen (Alter 20-46 Jahre) zwischen der Schwangerschaftswoche 5+1 und 39+2, 15 nicht-schwangere Patientinnen (Alter 35-78 Jahre) sowie 2 Patientinnen mit frischem Spontanabort (Alter 36-39 Jahre) eingeschlossen. Unter den Patientinnen waren sowohl erstmals, als auch mehrmals Schwangere von Einlingen. Tabelle 4 gibt einen Überblick über das Patientinnenkollektiv.



Nr.	Alter	Schwangerschaft	SSW	Funktion
1	36	ja	22+0	Probe
2a 2b	38	ja	11+4 13+4	Probe
3	30	ja	8+3	Probe
4	36	ja	7+3	Probe
5	28	ja	5+1	Probe
6	37	ja	8+1	Probe
7	40	ja	6+0	Probe
8	38	ja	7+0	Probe
9	29	ja	14+0	Probe
10	27	ja	11+6	Probe
11	39	ja	6+3	Probe
12	46	ja	11+2	Probe
13	32	ja	6+1	Probe
14	20	ja	9+0	Probe
15	29	ja	31+2	Probe
16	37	ja	39+2	Probe
17	36	Abort	-	Positivkontrolle
18	39	Abort	-	Positivkontrolle
19	41	nein	-	Negativkontrolle
20	78	nein	-	Negativkontrolle
21	54	nein	-	Negativkontrolle
22	68	nein	-	Negativkontrolle
23	78	nein	-	Negativkontrolle
24	57	nein	-	Negativkontrolle
25	73	nein	-	Negativkontrolle
26	61	nein	-	Negativkontrolle
27	53	nein	-	Negativkontrolle
28	56	nein	-	Negativkontrolle
29	49	nein	-	Negativkontrolle
30	59	nein	-	Negativkontrolle
31	47	nein	-	Negativkontrolle
32	59	nein	-	Negativkontrolle
33	35	nein	-	Negativkontrolle

Tabelle 4 Übersicht über das Patientinnenkollektiv

Die Abstriche der 16 schwangeren Patientinnen dienten als Untersuchungsproben für die Immunzytofluoreszenz. 15 Abstriche von nicht-Schwangeren wurden für Negativkontrollen und die 2 Abortmaterialien als Positivkontrollen genutzt. Jede Patientin wird über die gesamte Arbeit mit der Nummer in dieser Tabelle bezeichnet. Eine Besonderheit bei der Nummernvergabe ist Patientin 2, von der zwei Abstriche zu verschiedenen Zeitpunkten in der Schwangerschaft entnommen wurden. Dabei bezieht sich die Nummer 2a auf die SSW 11+4 und die Nummer 2b auf die SSW 13+4.



Von der Studie ausgeschlossen wurden Schwangere mit Mehrlingen, Patientinnen mit am Untersuchungstermin bestehender vaginaler Blutung oder Kolpitis, bekannter HPV-Infektion der Zervix, Zervixzytologie ab PAP III oder sonstiger Zervixpathologien.

Um die einzelnen Zellen zweifelsfrei zuordnen zu können, wurde eine fünfstellige Proben-Identifikationsnummer (Proben-ID) erstellt, die sich aus den verschiedenen Anordnungen bei den Experimenten ableiten lässt. Die erste Ziffer bezieht sich auf die oben aufgeführte Patientenliste (Tabelle 4; Ziffer 1-33). Die zweite Ziffer bezieht sich auf die untersuchte Zelle (jeweils Zelle 1-x). Die dritte Ziffer beruht auf der Liste der durchgeführten Lasermikrodissektionen (Tabelle 25, S. 59; Ziffer 1-15). Die vierte Ziffer bezieht sich auf die Liste der WGA (Tabelle 26, S. 63; Ziffer 1-11). Die fünfte Ziffer lässt sich aus den durchgeführten Array-CGH-Analysen ableiten (Tabelle 30, S. 69; Ziffer 1-6). Beispielsweise bedeutet die Proben-ID „11.1.11.7.5“ Patientin Nr. 11, Zelle 1, Lasermikrodissektion Nr. 11., WGA Nr. 7 und Array-CGH Nr. 5. Die Ziffer „0“ gibt an, dass die jeweilige Methode nicht durchgeführt wurde. Beispielsweise bedeutet die Proben-ID „2b.1.3.2.0“, dass keine Array-CGH-Analyse durchgeführt wurde.

3.3 Zellgewinnung

Die Zellgewinnung erfolgte durch die Gynäkologinnen des Gyn-Gen-Lehel MVZs und der gynäkologischen Praxis Dr. med. E. Maier. Zellmaterial wurde mit Hilfe eines Bürstenabstrichs im Rahmen des routinemäßig durchgeführten Krebsvorsorgeabstrichs von der Zervix uteri entnommen [47]. Dazu wurden mit Hilfe des „ThinPrep®-Pap-Test“ die Zellen an der Portio durch mehrmaliges Drehen des Bürstchens gewonnen und anschließend in einen Plastikbehälter mit einem alkoholhaltigen Zellwasch- und Transportpuffer (Fa. Hologic [48]) gespült. In dieser Form konnten die Zellen für einige Wochen konserviert und in das zytologische Labor von Frau Dr. med. E. Maier in München zur weiteren Zellverarbeitung transportiert werden. Mit Hilfe des ThinPrep®-Prozessors wurde dort in einem automatisierten Programm die Zellsuspension bis zur vollständigen Benetzung einer etwa münzgroßen Membran durch einen Filter angesaugt und die der Membran aufliegenden Zellen auf einen Glas-Objektträger (OT) (ThinPrep®) gestempelt. Auf diese Weise wurden Schleim, Zelldebris (unvollständig) und kleinere Zellen durch die Membran gefiltert und verworfen, während die größeren Zervixzellen und Trophoblasten auf der Membran haften blieben und eine Dünnschichtzytologie zuließen. Anschließend wurde der Objektträger für etwa eine



Minute in Ethanol fixiert und daraufhin für den Transport in das Labor des Zentrums für Reproduktionsgenetik im Gyn-Gen-Lehel MVZ in München für etwa 30 Minuten luftgetrocknet.



Abbildung 2 ThinPrep®-Pap-Test-System

Links: ThinPrep®-Zellwasch- und Transportpuffer und Ennahmehbürstchen [49]. Rechts: Automatisierter Saug- und Stempelvorgang [50]. Die Zellsuspension wird aufgewirbelt (1) und angesaugt (2). Die Zellen, die die Filtermembran nicht passieren und ihr anhaften, werden auf einen Objektträger aufgestempelt (3).

3.4 Identifizierung der Trophoblasten

3.4.1 Morphologische Identifizierung

Zunächst wurde versucht, die Trophoblasten anhand ihrer Morphologie zu erkennen. Dazu wurden zunächst im Rahmen eines Vorversuchs Plazentazotten aus Abortmaterial, im Hinblick auf konzentrierteres Vorkommen der Trophoblasten, untersucht. Dieses Material befand sich zur zytogenetischen Diagnostik im Labor des Instituts für Humangenetik der Technischen Universität München. Das Plazentazottenmaterial wurde mit einem Skalpell zerhackt und in einen Behälter mit ThinPrep®-Zellwasch- und Transportpuffer gelöst. Anschließend erfolgte der oben beschriebene Transfer auf Glas-Objektträger im zytologischen Labor von Frau Dr. med. E. Maier. Die Zellen wurden mit einem automatisierten Objektträger-Färbeautomat (Shandon Varistain™ 24-4, Fa. Thermo Fisher Scientific™) einer Papanicolaou-Färbung [51] unterzogen (s. Tabelle 5).



Schritt	Lösung	Dauer
1	Isopropanol 96% (Fa. Honeywell)	30 sec
2	Isopropanol 80% (Fa. Honeywell)	30 sec
3	Isopropanol 70% (Fa. Honeywell)	30 sec
4	Isopropanol 50% (Fa. Honeywell)	30 sec
5	Aqua bidest. (Fa. ISG Intermed Service)	30 sec
6	Hämatoxylin (Fa. Merck)	5 sec
7	Leitungswasser	1 min
8	Leitungswasser	15 sec
9	Isopropanol 70% (Fa. Honeywell)	30 sec
10	Isopropanol 80% (Fa. Honeywell)	30 sec
11	Isopropanol 96% (Fa. Honeywell)	60 sec
12	Polychromlösung EA 50 (Fa. Merck)	1 min
13	Isopropanol 96% (Fa. Honeywell)	2 min
14	Isopropanol 96% (Fa. Honeywell)/ NeoClear® (Fa. Merck)	1,5 min
15	NeoClear® (Fa. Merck)	4 min

Tabelle 5 Protokoll für die Papanicolaou-Färbung

Anschließend wurden die Zellen unter einem Lichtmikroskop (Axiostar plus, Fa. Zeiss) betrachtet und mit einer an das Mikroskop angeschlossenen Fotokamera (DFC290, Fa. Leica) fotografiert. Nachdem die Morphologie der gesuchten Zellen durch den Vorversuch ersichtlich war, wurde versucht, Trophoblasten (also sowohl Synzytio- als auch Zytotrophoblasten) im Zervixabstrich von Patientinnen im ersten Schwangerschaftstrimenon zu finden. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Hilfe des ThinPrep®-Systems auf Objektträger gestempelt und nach Papanicolaou-Färbung unter dem Mikroskop betrachtet.

3.4.2 Identifizierung durch Immunzyt fluoreszenz

Die Immunfluoreszenzfärbung ist eine gängige labortechnische Methode, die sowohl in der Forschung, als auch in der klinischen Diagnostik von hoher Relevanz ist. Dabei können Zellen in Lösung, kultivierte Zellen, Gewebe oder Mikroarrays auf die Präsenz bestimmter Proteine getestet werden. Mit Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorophore) konjugierte Antikörper binden direkt oder indirekt an das Antigen von Interesse, wodurch Zellen auf dessen Vorhandensein getestet werden können. Die Fluoreszenz kann anschließend mit Hilfe von Durchflusszytometrie, Array-Scannern, automatisierten Bildsystemen, oder durch einfache Fluoreszenzmikroskopie



quantifiziert werden. Es wird zwischen der direkten und der indirekten Immunfluoreszenzfärbung unterschieden (s. Abbildung 3), wobei die direkte Methode seltener verwendet wird. Dabei ist der Fluorophor direkt an den Antikörper gekoppelt, der gegen das Antigen gerichtet ist. Bei der indirekten Methode ist der gegen das Antigen gerichtete Antikörper (primärer Antikörper) ungekoppelt, während der sekundäre Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, an einen Fluorophor gekoppelt ist. Vorteile der indirekten Methode sind geringere Kosten und bessere Verfügbarkeit der spezifischen primären und der vielseitig einsetzbaren sekundären Antikörpern, sowie eine höhere Sensitivität. Letztere kommt dadurch zustande, dass mehrere fluoreszierende sekundäre Antikörper an einen primären Antikörper binden können und somit die Leuchtintensität potenziert wird [52]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit bei geringer zu erwartender Trophoblastenzelldichte die indirekte Immunzytofluoreszenz angewendet. Für die Identifizierung der Trophoblasten wurde ein primärer Antikörper, der spezifisch gegen ein Antigen auf den gesuchten Zellen gerichtet ist, ausgewählt. Gegen diesen primären Antikörper, der von einer bestimmten Spezies stammt, wurde ein sekundärer Antikörper gegen Spezies-Antigene gesucht, der an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist.

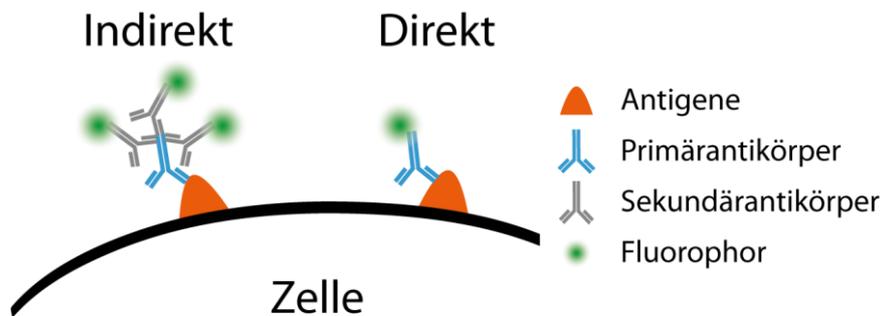


Abbildung 3 Schema der Immunfluoreszenzfärbung

Der Primärantikörper bindet an das von der Zelle exprimierte Antigen. Bei der direkten Immunfluoreszenzmethode (rechts) ist an den Primärantikörper ein Fluorophor gekoppelt. Bei der indirekten Methode (links) binden mehrere Fluorophor-gekoppelte Sekundärantikörper an den Primärantikörper. Dadurch kann das Signal potenziert werden.

In der vorliegenden Arbeit sind zwei spezifisch gegen das Antigen HLA-G gerichtete Antikörper getestet worden; ein primärer Maus-Antikörper G233 (Fa. Exbio) [32] sowie ein ebenfalls an HLA-G bindender Kaninchen-Antikörper (Fa. Abgent). Als sekundäre Antikörper dienten ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 594 gekoppelter Anti-Maus-Antikörper (Fa. Jackson Immuno Research) und ein an Texas Red gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper (Fa. Vector Laboratories), die beide in roter Farbe



fluoreszieren. Die nachfolgende Tabelle 6 gibt einen Überblick über die verwendeten Antikörper.

Antigen	Antikörper	Firma	Eigenschaft	Verdünnung*
HLA-G	Anti-HLA-G G233 aus Maus	Exbio, Tsch. Republik	monoklonal	1:50
Maus- Antigen	Anti-Maus-IgG Alexa Fluor 594 aus Kaninchen	Jackson Immuno Research, USA	rot Amax 591nm Emax 614nm	1:800
HLA-G	Anti-HLA-G aus Kaninchen	Abgent, USA	polyklonal	1:40
Kaninchen- Antigen	Anti-Kaninchen-IgG Texas Red aus Ziege	Vector Laboratories, USA	rot Amax 595nm Emax 615nm	1:100

Tabelle 6 Übersicht über die verwendeten Antikörper und deren Eigenschaften

Es wurden zwei Anti-HLA-G-Antikörper aus Maus (Fa. Exbio) und Kaninchen (Fa. Abgent) verwendet. Als Sekundärantikörper fungierten ein Anti-Maus-Antikörper (Alexa Fluor 594, Fa. Jackson Immuno Research) aus Kaninchen und ein Anti-Kaninchen-Antikörper (Texas Red, Fa. Vector Laboratories) aus Ziege. * Die Verdünnungsangaben beziehen sich auf die zuletzt angewendeten Verdünnungen (s. Kapitel 3.4.2.2).

3.4.2.1 Etablieren der Immunfärbung

Es wurden zunächst unterschiedliche Primärantikörper- sowie Sekundärantikörper-Konzentrationen getestet. Zusätzlich wurden unterschiedliche Wasch- und Blockinglösungen getestet, um die optimale Bindungsaffinität des jeweiligen Antikörpers auszuschöpfen. Um unspezifische Bindungen zwischen Primärantikörper und Nicht-Zielzellen zu verringern, wurde eine Blockinglösung verwendet. Die Blockinglösung dient dazu, die Hintergrundsignale zu reduzieren. Bei der Wahl der Blockinglösung ausschlaggebend war die Vorgabe des WGA-Kits, dass kein BSA (Bovines Serumalbumin) enthalten sein darf, welches die Reaktionen der WGA erheblich stören kann [64]. Daher wurde in dieser Arbeit hauptsächlich mit 1%-iger Gelatine und 5%-iger Magermilch gearbeitet sowie vergleichsweise auf wenigen Proben auch mit dem in der Regel häufiger verwendeten 1%-igen BSA, um herauszufinden, ob dieses als Blockinglösung sichtbar bessere Erfolge erzielt. Tabelle 7 liefert einen Überblick über die verschiedenen Immunzytofluoreszenz-Protokolle, die getestet wurden. Nachfolgend wird in Kapitel 3.4.2.2 das sich letztlich etablierte Protokoll beschrieben.



Prot.	Blocken	Waschen*	Prim. AK	Sek. AK	DAPI
P 01	1% Gelatine, 37°C 1h (RT)	3x 5 min (RT)	G233 (Exbio) 1:100 1h (37°C)	AF 594 1:400 1h (RT)	-
P 02	1% Gelatine, 37°C 0,1% Tween 20 1h (RT)	3x 5 min (RT)	G233 (Exbio) 1:100 ü. N. (4°C)	AF 594 1:800 30 min (37°C)	-
P 03	1% Gelatine, 37°C 1h (RT)	3x 10 min (RT)	G233 (Exbio) 1:100 1h (37°C)	AF 594 1:800 30 min (37°C)	ja
P 04	1% Gelatine, 37°C 1h (RT)	3x 10 min (37°C)	G233 (Exbio) 1:50 1h (37°C)	AF 594 1:800 30 min (37°C)	-
P 05	1% Gelatine, 37°C 1h (RT)	3x 10 min (37°C)	Fa. Exbio 1:50 1h (37°C)	AF 594 1:800 30 min (37°C)	ja
P 06	1% Gelatine, RT 1h (RT)	1x kurz 1x 10 min (RT)	Fa. Exbio 1:50 ü. N. (4°C)	AF 594 1:800 1h (RT)	ja
P 07	5% Magermilch, RT 1h (RT)	1x kurz 1x 10 min (RT)	Fa. Exbio 1:50 ü. N. (4°C)	AF 594 1:800 1h (RT)	ja
P 08	5% Magermilch, RT 1h (RT)	1x kurz 1x 10 min (RT)	Fa. Abgent 1:30 ü. N. (4°C)	TR 1:100 1h (RT)	ja
P 09	1% Gelatine, RT 1h (RT)	1x kurz 1x 10 min (37°C)	Fa. Exbio 1:50 ü. N. (4°C)	AF 594 1:800 1h (RT)	ja
P 10	1% Gelatine, RT 1h (RT)	1x kurz 1x 10 min (RT)	Fa. Abgent 1:30 ü. N. (4°C)	TR 1:100 1h (RT)	ja
P 11	1% Gelatine, RT 1h (RT)	1x kurz 1x 10 min (RT)	Fa. Abgent 1:40 ü. N. (4°C)	TR 1:100 1h (RT)	ja
P 12	5% Magermilch, RT 1h (RT)	1x kurz 2x 10 min (RT)	Fa. Abgent 1:40 ü. N.(4°C)	TR 1:100 1h (RT)	ja
P 13	1% BSA, RT 1h (RT)	1x kurz 2x 10 min (RT)	Fa. Abgent 1:40 ü. N.(4°C)	TR 1:100 1h (RT)	-
P 14	1% Gelatine, RT 1h (RT)	1x kurz 2x 10 min (RT)	Fa. Abgent 1:40 ü. N.(4°C)	TR 1:100 1h (RT)	-
P 15	5% Magermilch, RT 1h (RT)	1x kurz 2x 10 min (RT)	Fa. Abgent 1:40 ü. N.(4°C)	TR 1:100 1h (RT)	-

Tabelle 7 Überblick über die Entwicklung des Immunfluoreszenz-Protokolls

Es wurden 15 verschiedene Versionen des Immunfluoreszenz-Protokolls getestet (P01-15). Dabei kamen jeweils verschiedene Blockinglösungen, Temperaturen und Inkubationszeiten sowie Antikörper-Paare zum Einsatz. Eine Kernfärbung mit DAPI wurde ebenso getestet. * Der Waschvorgang erfolgte mit 1xPBS.



3.4.2.2 Endgültiges Protokoll für die Immunzytofluoreszenz-Färbung

Zunächst wurden unspezifische Bindungstellen geblockt. Dazu wurde Magermilchpulver (Fa. Heirler) mit 1xPBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) bei Raumtemperatur (RT) zu 5%-iger Magermilchlösung angemischt (Blockinglösung). Die Objektträger wurden in Objektträgerwaschkammern (quadriPERM®) gegeben und mit je 4 ml Blockinglösung eine Stunde bei RT inkubiert. Es folgte ein Waschvorgang. Für die Waschlösung wurde 10xPBS (RT) auf 1xPBS mit destilliertem Wasser (RT) verdünnt. Die Objektträgerwaschkammern wurden einmal mit 5 ml 1xPBS kurz geschwenkt und die Lösung abgegossen. Dann wurde zweimal je 10 min mit 3 ml 1xPBS gewaschen und anschließend die Lösung abgegossen. Der primäre Antikörper wurde mit Blockinglösung bei RT 40-fach verdünnt (1:40) und 50 µl davon auf jeden Objektträger gegeben. Ein Deckglas wurde luftfrei darauf gesetzt. Die Objektträger wurden in eine Feuchtkammer gelegt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurde das Deckglas entfernt. Die Objektträger wurden in Objektträgerwaschkammern gegeben und wie oben beschrieben gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde mit Blockinglösung bei RT und unter Lichtschutz 100-fach (1:100) verdünnt und davon je 50 µl auf die Objektträger gegeben. Das Deckglas wurde luftfrei darauf gesetzt. Die Objektträger wurden in eine Feuchtkammer gelegt und eine Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde das Deckglas entfernt. Es folgte ein weiterer Waschvorgang (wie oben beschrieben). Zuletzt wurden die Objektträger entweder mit 5 µl DAPI in Antifade-Lösung (dient zur blauen Hintergrundfärbung aller Zellkerne) gegengefärbt und Deckgläser darauf gesetzt oder an der Luft getrocknet. Die Lagerung erfolgte waagrecht im Kühlschrank bis zur Mikroskopie. Tabelle 8 zeigt das vereinfachte Schema des Immunzytofluoreszenz-Protokolls.

Schritt	Vorgang	Temperatur	Dauer
1	Blocken unspezifischer Bindungen	RT	1 h
2	Waschen	RT	20 min
3	Inkubation mit 1. Antikörper	4°C	über Nacht
4	Waschen	RT	20 min
5	Inkubation mit 2. Antikörper	RT	1 h
6	Waschen	RT	20 min
7	DAPI-Färbung/ Trocknung	RT	
8	Lagern	4°C	

Tabelle 8 Protokoll der Immunfluoreszenz-Färbung

Die Tabelle zeigt den schematischen Ablauf des Immunzytofluoreszenz-Protokolls. Schritt 7 (Kernfärbung mit DAPI) wurde im Verlauf nicht mehr durchgeführt, da eine negative Auswirkung auf die WGA befürchtet wurde.



3.4.2.3 Fluoreszenz-Mikroskopie

Im Anschluss an den Färbeprozess wurden die Objektträger lichtgeschützt in das zytogenetische Labor im Institut für Humangenetik an der Technischen Universität München transportiert. Dort wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2 Imaging, Fa. Zeiss) betrachtet. Beurteilt wurden Zellintegrität (Ganzheit der Zelle, inklusive Zellmembran und Zellkern), Fluoreszenz der Zellen, Hintergrundfluoreszenz und, da es sich um Zellen eines vaginalen Abstrichs handelte, auch die Fluoreszenz von Schmutzpartikeln und Zelldebris. Die Belichtung wurde so eingestellt, dass die intensiver leuchtenden Zellen gerade noch leuchteten, um eine Hintergrundfluoreszenz zu minimieren. Es wurden verschiedene Fluoreszenzfilter verwendet, u. a. DAPI-Filter bei DAPI-Kernfärbung und Texas Red-Filter für die gesuchten Zellen. Um zu vermeiden, dass die Fluoreszenzkraft der Zellen rasch nachlässt, wurde auf eine Lichtmikroskopie weitgehend verzichtet. Um dennoch einen Überblick über die Zellverteilung auf dem Objektträger zu erhalten, wurde mit einem Aqua-Filter mikroskopiert. Hier war trotz Abwesenheit eines Aqua-fluoreszierenden Agens eine Beurteilung der Zellgesamtheit möglich. Eine mögliche Erklärung dafür ist eine Autofluoreszenz der Zellen bei Anregung durch kurzwelliges Licht, welches auch dem Anregungsbereich von Aqua-Fluorophoren nahe kommt und somit durch o. g. Filter sichtbar wird [53, 54].

Mögliche Zellen für die nachfolgende Lasermikrodissektion wurden bei intensiver Fluoreszenz im Texas Red-Filter ausgewählt.



3.5 Gewinnung von Einzelzellen durch Lasermikrodissektion

Die Lasermikrodissektion ist eine laserunterstützte Methode zur gezielten und kontaminationsfreien Gewinnung von Einzelzellen oder Gewebearealen. Mit ihr können Zellen von einem Objektträger abgehoben und direkt in den Deckel eines Mikroreaktionsgefäßes transferiert (katapultiert) werden. Die Zellen stehen anschließend für weitere Untersuchungen, wie beispielsweise DNA-, RNA- oder Proteinanalysen zur Verfügung [55]. In dieser Arbeit wurde der PALM MicroBeam der Firma Zeiss verwendet.

3.5.1 Funktionsprinzip

Ein an ein Mikroskop gekoppelter UV-A-Laserstrahl mit einem Durchmesser von unter 1 μm ist in der Lage biologisches Material zu durchtrennen, ohne das umliegende Gewebe zu zerstören [56]. Mit demselben Laser können die ausgewählten Zellen oder Gewebeareale vom Objektträger abgehoben und in Mikroreaktionsgefäße, bzw. bevorzugt deren Deckel („Cap“; s. u.), katapultiert werden (Laser Pressure Catapulting). Dieser Vorgang findet vollkommen berührungslos statt, da nur der fokussierte Laserstrahl für die Katapultation verwendet wird. Da bei der Dissektion keine Wärme ins umliegende Gewebe übertragen wird (kalte Ablation), bleiben DNA und RNA von isolierten Zellen intakt und stehen für weitere Untersuchungen zur Verfügung [56, 57].

3.5.2 Auswahl des Objektträgers

Für die Lasermikrodissektion können sowohl herkömmliche Glas-Objektträger, als auch Membran-beschichtete Objektträger verwendet werden. Die Membran auf letzteren sorgt für eine bessere Erhaltung der Zellmorphologie während des Katapultationsvorgangs, insbesondere wenn ganze Zellverbände mikrodisseziert werden sollen. Sie besteht aus Polyethylen-Naphthalen (PEN) oder Polyethylen-Terephthalat (PET), wobei letzteres durch seine geringere Autofluoreszenz für die Fluoreszenzfärbung im Speziellen besser geeignet ist [58]. In dieser Arbeit wurden PET-beschichtete sowie ThinPrep®-Objektträger aus Glas verwendet.



3.5.3 Auswahl des Auffangbehälters (Cap)

Die Firma Zeiss empfiehlt für die Katapultation der Zielzellen die Verwendung von Mikroreaktionsgefäßen (Eppendorf-Reaktionsgefäßen (ERG)) mit sogenannten „AdhesiveCaps“ als Auffangbehälter. Diese sind silikonbeschichtete Deckel, an denen die Zellen irreversibel haften bleiben. Somit wird zwar das Risiko eines Verlustes der Zielzelle während der weiteren Verarbeitung verringert; eine Zentrifugation der Zelle in das Mikroreaktionsgefäß selbst wird jedoch unmöglich gemacht. Die Firma Zeiss empfiehlt daher den Zellyse-Schritt, d. h. den ersten Teilschritt der anschließenden WGA, im Deckel („Cap“) des Mikroreaktionsgefäßes. Nach laborinternem Protokoll – an das sich in dieser Arbeit so gut wie möglich gehalten werden sollte, um das Risiko potenziellen Misslingens zu reduzieren – läuft der Zellyse-Schritt jedoch im Mikroreaktionsgefäß selbst ab und dieses muss dafür senkrecht in einen Thermocycler gestellt werden. Daher erwies sich die Katapultation der Zielzellen in den Deckel des Mikroreaktionsgefäßes und ihre dortige irreversible Anhaftung zunächst als Problem. Daher wurde zusätzlich zum Einsatz der empfohlenen Mikroreaktionsgefäße mit AdhesiveCaps auch eine Verwendung von Mikroreaktionsgefäßen mit gewöhnlichen Deckeln in Betracht gezogen, um zwei verschiedene Varianten zu testen. Die Verwendung letzterer stellte jedoch vor eine weitere Herausforderung. Damit der Deckel des Mikroreaktionsgefäßes vollständig mit Flüssigkeit (PBS) benetzt ist, um die hinein katapultierte Zelle in jedem Fall aufzufangen, wurde eine Flüssigkeitsmenge von 10 µl gefordert. Allerdings erlaubte das WGA-Protokoll nur eine maximale Flüssigkeitsmenge für die Einzelzellsuspension von 2,5 µl. Außerdem bestand hier – im Gegensatz zur Variante mit AdhesiveCaps – das Risiko, die Zelle bei der Zentrifugation aus dem Deckel in das Gefäß zu verlieren. Daher ergaben sich zwei zu testende Varianten, mit dem Ziel, den geeigneteren Auffangbehälter für die anschließende WGA zu finden.

- (A): Katapultation in AdhesiveCaps (von der Firma Zeiss empfohlen)
- (B): Katapultation in mit PBS versetzte Deckel (von gewöhnlichen ERG)

Variante A, bei der die Zellen in AdhesiveCaps geschossen wurden, machte – aufgrund der irreversiblen Anhaftung der Zelle im Deckel – die Durchführung des Zellyse-Schritts im auf dem Deckel stehenden Mikroreaktionsgefäß notwendig (s. o.). Da die Mikroreaktionsgefäße für die Zellyse normalerweise mit dem Deckel nach oben im Thermocycler stehen müssen und eine Verarbeitung über Kopf im Thermocycler nicht möglich ist, musste ein alternatives Verfahren für diesen Teilschritt gefunden



werden. Die Mikroreaktionsgefäße wurden dafür in einer verschließbaren Metallbox auf den Deckel gestellt und diese in ein Wasserbad gesetzt.

Variante B, bei der die Zellen in mit PBS benetzte Deckel katapultiert wurden, machte sowohl die Katapultation, als auch die Zentrifugation zu einem kritischen Schritt (s. o.). Die vom WGA-Protokoll geforderte Flüssigkeitsmenge für die Einzelzellsuspension von 2,5 µl 1xPBS wurde erreicht, in dem zunächst 10 µl 0,25xPBS in den Deckel gegeben wurden. In einer anschließenden Vakuumkonzentration wurde durch Evaporation von reinem Wasser das Volumen auf 2,5 µl und daraus resultierendem 1xPBS reduziert.

3.5.4 Auswahl der zu dissezierenden Zellen

Da sich die Immunfluoreszenz-Färbung des Zellmaterials als technisch-methodisch schwierig und schwer reproduzierbar darstellte und eine sichere Identifizierung der Trophoblasten in kürzerer Zeit nicht in Aussicht stand, wurde beschlossen, dennoch die weiteren Schritte der geplanten Experimentenfolge auf ihre Durchführbarkeit zu testen. Für die Lasermikrodissektion wurden die Zellen wenn möglich nach folgenden Gesichtspunkten ausgewählt:

- Zellintegrität (Zelle intakt, kein Zelldebris)
- Fluoreszenzintensität (Zelle leuchtet) bei durchgeführter Immunzytofluoreszenz

Da außerdem zu testen war, ob die nachfolgende WGA durch die Immunfluoreszenz-Färbung gestört würde, wurden auch ungefärbte Zellen (von nicht-Schwangeren) mikrodisseziert.

Ebenso war zu testen, ob die Lasermikrodissektion und die anschließenden Methoden (WGA und Array-CGH) sowohl mit Zellen von ThinPrep®-OT als auch von Membranbeschichteten-OT möglich sind.

Des Weiteren galt es herauszufinden, mit welchem Auffangbehälter (Cap) die Durchführung der Experimentenfolge möglich ist.

Um alle diese Variablen zu testen und auch aufgrund von Schwierigkeiten bezüglich der sicheren Trophoblasten-Identifikation, wurden neben Zellen von Schwangeren mit männlichen Feten (Zielobjekt) auch Zellen von Schwangeren mit weiblichen Feten, von Schwangeren in weit fortgeschrittenen Schwangerschaftswochen sowie von nicht-



Schwangeren (s. o.) für die Lasermikrodissektion herangezogen. Es entstanden durch Testung aller o. g. Variablen insgesamt acht Kombinationsmöglichkeiten, die auf ihre Durchführbarkeit geprüft wurden. Tabelle 9 zeigt eine Übersicht über diese Kombinationen.

Kombination	Färbung	Objektträger	Cap
1	ja	ThinPrep®	AdhesiveCap
2	ja	ThinPrep®	PBS-benetztes Cap
3	ja	PET-Membran	AdhesiveCap
4	ja	PET-Membran	PBS-benetztes Cap
5	nein	ThinPrep®	AdhesiveCap
6	nein	ThinPrep®	PBS-benetztes Cap
7	nein	PET-Membran	AdhesiveCap
8	nein	PET-Membran	PBS-benetztes Cap

Tabelle 9 Übersicht über die möglichen Kombinationen der zu testenden Variablen bei der Lasermikrodissektion

Die Tabelle zeigt alle 8 möglichen Kombinationen die für das Outcome der WGA und Array-CGH relevant sein konnten. Durch Veränderung immer nur einer Variablen hätte im Fall des Misslingens der WGA oder Array-CGH auf eine hindernde Variable geschlossen werden können.

3.5.5 Dissektionsvorgang

Der zu untersuchende Objektträger wurde auf dem Objektträgertisch des Mikrodissektionssystems eingespannt, nach der gewünschten Zelle abgesucht und der Fokus auf die ausgewählte Zelle gesetzt. Es folgte die Markierung des auszuschneidenden Bereiches (Dissektionslinie, s. Abbildung 5). Die weiteren Schritte unterschieden sich in Abhängigkeit vom Objektträger.

Bei Verwendung von Membran-beschichteten Objektträgern wurde durch ein automatisiertes System ein Punkt auf der Dissektionslinie ausgewählt, an dem die Laserenergie für den Katapultationsvorgang appliziert wurde. Die Zelle wurde Morphologie-erhaltend in den Deckel (Cap) eines 200 µl-Mikroreaktionsgefäßes geschossen.

Bei Verwendung von Glas-Objektträgern wurde der Laserfokus auf die Ebene des Glases eingestellt und mehrere Katapultpunkte auf die gesuchte Zelle gesetzt. Somit wurde die Zelle fragmentiert in den Deckel transferiert.



Im Cap konnte die Zelle in beiden Fällen (intakt bzw. fragmentiert) mit der Kamera aufgefunden werden. Das Mikroreaktionsgefäß wurde verschlossen und bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank bei 4°C gelagert.



Abbildung 4 Übersicht über die Lasermikrodissektion

Links: PALM Microbeam Lasermikrodissektionsgerät (Fa. Zeiss) [59]. Rechts: Schematische Darstellung der lasergestützten kontaminations- und kontaktfreien Katapultation des gewünschten Objekts vom Objektträger in den Deckel eines Mikroreaktionsgefäßes [55].

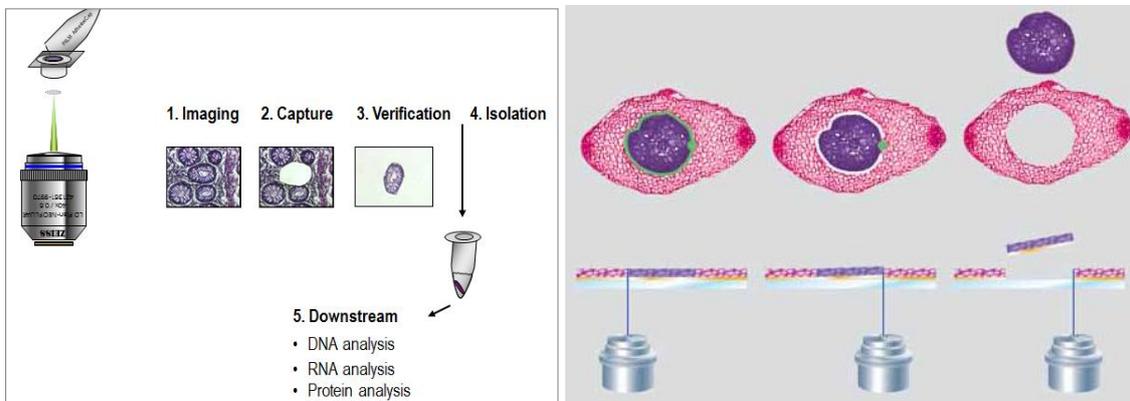


Abbildung 5 Ablauf der Lasermikrodissektion

Links: Der Dissektionsvorgang umfasst die Mikroskopie der gesuchten Zelle (1), die Zellgewinnung durch Laserkatapultation (2), die Mikroskopie der katapultierten Zelle im Auffangbehälter zur Überprüfung der Katapultation (3), die Extraktion (4) und Analyse von DNA, RNA oder Proteinen (5) [55]. Rechts: Dissektionsvorgang (Links im Bild: Einzeichnen der Dissektionslinie um das gewünschte Zellmaterial, mittig im Bild: Setzen des Laserfokus auf die Dissektionslinie (bei Membran-beschichteten OT), rechts im Bild: Katapultation des gewünschten Zellmaterials und Verbleiben des Restgewebes) [59].



3.6 Gesamtgenomamplifikation (WGA)

3.6.1 Funktionsprinzip

Die Gesamtgenomamplifikation (Whole Genome Amplification (WGA)) wurde 1992 entwickelt, um die Menge an nur limitiert vorhandener DNA zu erhöhen [60]. Eine menschliche Zelle besitzt normalerweise etwa 6 pg DNA. Diese Menge reicht nicht für eine Analyse des Genoms aus. Dafür ist die hundert- bis tausendfache Vervielfältigung der DNA ein essenzieller Schritt [61, 62]. Die Technik wird vor allem in der Forensik und Genetik angewendet und ist auch für die Array-CGH-Analyse (s. Kapitel 3.7) unabdingbar. Bei der WGA werden (Einzel-)Zellen lysiert und ihre DNA vervielfältigt. Dafür wurden verschiedene WGA-Techniken entwickelt, auf die hier nicht im Detail eingegangen werden soll. Die zwei Hauptprinzipien sind die Temperature Cycled (PCR-basierte) WGA und die (isothermale) Multiple Displacement Amplification (MDA) [63]. In dieser Arbeit wurde das PicoPlex®-WGA-Kit der Firma Rubicon Genomics verwendet, das für die Amplifizierung von Einzelzell-DNA dient und speziell bei Blastomeren, Polkörpern, Trophoblasten und Amniozyten anwendbar ist [64]. Es handelt sich dabei um ein PCR-basiertes Kit, welches einen vorgeschalteten MDA-Pre-Amplifikationsschritt enthält – was die WGA gerade im Bereich hoher Amplifikationsraten weniger störanfällig macht – und es daher für die Detektion von Kopienzahlveränderungen besonders gut eignet [63]. Die DNA-Menge kann bis zu einer Million-fach vervielfältigt werden, um eine Endmenge von ca. 2-5 µg zu erhalten [65]. Abbildung 6 zeigt die einzelnen Schritte der Methode.

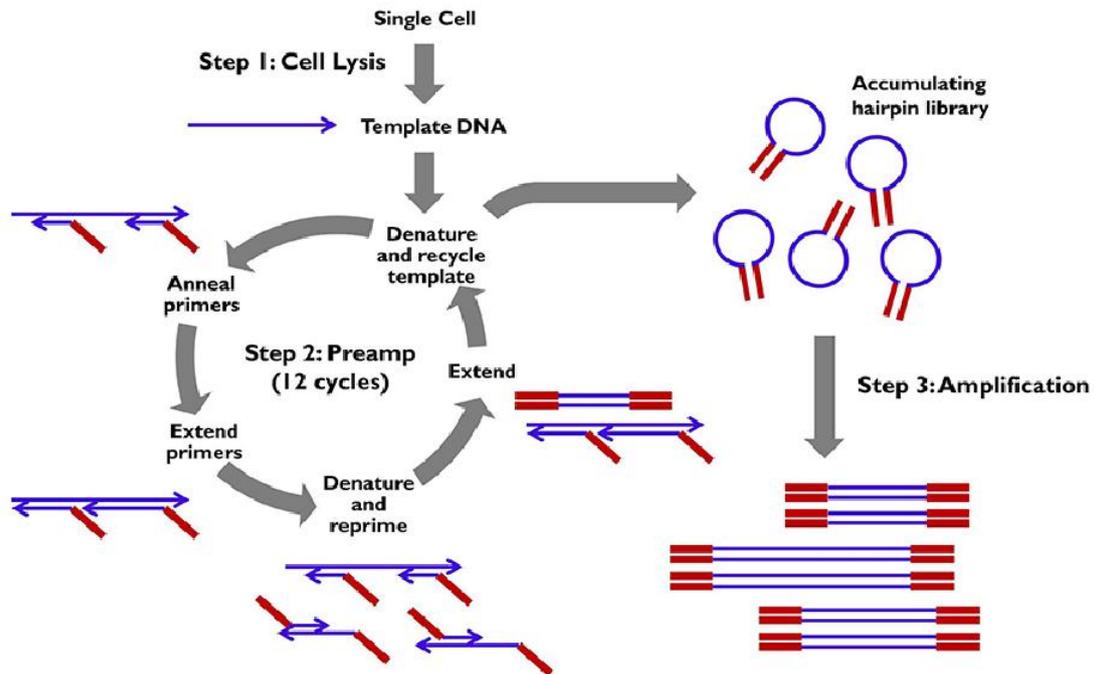


Abbildung 6 PicoPlex®-WGA-Kit-Technologie

Für die WGA wird eine Einzelzelle lysiert und ihre DNA extrahiert (Step 1). Es folgt die Prä-Amplifikation in 12 Zyklen (Step 2) (Denaturierung der Proben-DNA, Primer-Anlagerung, Primer-Extension, Denaturierung und neue Primer-Anlagerung, Wiederholung der Primer-Extension, Denaturierung usw.) sowie die Kumulation von Haarnadelstruktur-bildenden DNA-Abschnitten. Zuletzt erfolgt die eigentliche Amplifikationsreaktion (Step 3) [64].

3.6.2 Material und Vorbereitung

Kapitel	Vorgang
3.6.3.1	Zellyse
3.6.3.2	Prä-Amplifikation
3.6.3.3	Amplifikation

Tabelle 10 Schema für die Durchführung der WGA

Die Reagenzien für die Einzelzell-WGA stammten aus dem PicoPlex®-WGA-Kit der Firma Rubicon Genomics (s. Tabelle 11).



Reagenzien (PicoPlex®-WGA-Kit, Fa. Rubicon Genomics)
Cell Extraction Buffer
Extraction Enzyme Dilution Buffer
Cell Extraction Enzyme
Pre-Amp Buffer
Pre-Amp Enzyme
Amplification Buffer
Amplification Enzyme
Nuclease-Free Water

Tabelle 11 Reagenzien für die Gesamtgenomamplifikation

Für die Gesamtgenomamplifikation (WGA) wurde stets auf Eis, sowie in einer Sterilkammer gearbeitet, die dem Schutz der Proben vor Kontamination dient. Außerdem wurde darauf geachtet, die Reagenzien nicht direkt in die Lösung zu geben, sondern sie an die Innenwand des Mikroreaktionsgefäßes zu pipettieren. Je nach Art der Zellasservierung wurde auf zwei unterschiedliche Arten vorgegangen.

Bei den Proben, bei welchen die Einzelzellen in AdhesiveCaps katapultiert worden waren (A), wurden die Reagenzien in den Deckel pipettiert. Nach Ablauf des Zellyse-Schritts konnte das Zellysat in das Gefäß selbst abzentrifugiert werden und die Proben richtig herum (Deckel nach oben) weiter verarbeitet werden.

Die Proben, welche in den mit 10 µl 0,25xPBS benetzten Deckel eines Mikroreaktionsgefäßes katapultiert worden waren (B), wurden nach gründlichem Abzentrifugieren der Einzelzellsuspension vom Deckel in das Mikroreaktionsgefäß mit Hilfe eines Thermokonzentrators auf ein Volumen von 2,5 µl reduziert. Durch Evaporation von Wasser entstand dadurch das vom WGA-Protokoll geforderte Volumen von 2,5 µl 1xPBS. Diese Proben konnten daher noch vor Beginn des Zellyse-Schritts richtig herum (Deckel nach oben) verarbeitet werden.

Für den Versuch wurden zusätzlich zu den Proben (Einzelzellen) eine Positivkontrolle (männliche Referenz-DNA) sowie eine Negativkontrolle mit angesetzt. In jedes Proben-Reaktionsgefäß der Variante A, sowie in das Reaktionsgefäß für die Negativkontrolle wurden je 2,5 µl steriles 1xPBS gegeben. Somit ergab sich ein Ausgangsvolumen in jedem Reaktionsgefäß von 2,5 µl, da die Proben der Variante B bereits nach der Einengung dieses Volumen enthielten. Im Folgenden wird für das (Mikro-) Reaktionsgefäß die Abkürzung ERG (Eppendorf-Reaktionsgefäß) verwendet.



3.6.3 Durchführung

3.6.3.1 Zellyse

In jedes ERG wurden anschließend 2,5 µl Cell Extraction Buffer (CEB) pipettiert, mit Ausnahme der Positivkontrolle, für welche 4 µl CEB sowie 1 µl einer 30 pg/µl-konzentrierten männlichen Referenz-DNA in ein ERG gegeben wurden. Aus dem Extraction Enzyme Dilution Buffer (4,8 µl pro Probe) und dem Cell Extraction Enzyme (0,2 µl pro Probe) wurde ein Mastermix 1 (MM 1) hergestellt, von dem nach kurzem Schnippen und Abzentrifugieren jeweils 5 µl zu jedem 200 µl-ERG gegeben wurden. Somit ergab sich ein Gesamtvolumen pro ERG von 10 µl (s. Tabelle 12). Nach Zugabe dieses Mastermix, wurde kurz abzentrifugiert und die Reaktion gestartet.

Proben-ID	Variante	1xPBS	CEB	Referenz-DNA	MM 1	Gesamt
1.1.1.1.1	A	2,5 µl	2,5 µl	-	5 µl	10 µl
2b.1.3.2.0	A	2,5 µl	2,5 µl	-	5 µl	10 µl
16.1.2.3.2	B	-	2,5 µl	-	5 µl	10 µl
14.1.7.4.3	B	-	2,5 µl	-	5 µl	10 µl
19.1.9.5.4	B	-	2,5 µl	-	5 µl	10 µl
19.2.10.6.0	B	-	2,5 µl	-	5 µl	10 µl
11.1.11.7.5	A	2,5 µl	2,5 µl	-	5 µl	10 µl
11.2.12.8.0	A	2,5 µl	2,5 µl	-	5 µl	10 µl
11.3.13.9.0	A	2,5 µl	2,5 µl	-	5 µl	10 µl
11.4.14.10.6	A	2,5 µl	2,5 µl	-	5 µl	10 µl
2a.1.15.11.0	A	2,5 µl	2,5 µl	-	5 µl	10 µl
NK	-	2,5 µl	2,5 µl	-	5 µl	10 µl
PK	-	-	4 µl	1 µl	5 µl	10 µl

Tabelle 12 Übersicht über die Pipettierolumina für die WGA

A: Variante in AdhesiveCaps: Zugabe von 2,5 µl 1xPBS; B: Variante in normalen Mikroreaktionsgefäßen, Zelle bereits in 2,5 µl 1xPBS (nach Volumenreduktion), keine weitere Zugabe von 1xPBS nötig. CEB: Cell Extraction Buffer; PBS: Phosphat buffered Saline; MM: Mastermix; NK: Negativkontrolle; PK: Positivkontrolle.



Für Variante A erfolgte die Inkubation für 10 Minuten bei 75°C. Dafür wurden die Zellen auf dem Deckel stehend in eine Metallbox gestellt, welche in ein Wasserbad bei 75°C gesetzt wurde. Der Deckel der Metallbox, sowie der Deckel des Wasserbades wurden verschlossen, um den Wärmeverlust zu verringern. Parallel dazu wurde im Thermocycler (PCR-Block) das Programm für die DNA-Extraktion gestartet, bei dem die aufrecht gelagerte Negativ- und die Positivkontrolle sowie die Proben der Variante B inkubiert wurden. Tabelle 13 zeigt das Programm für die DNA-Extraktion.

Anzahl Zyklen	Temperatur	Dauer	Thermocycler	Wasserbad
1	75°C	10 min	Proben B, NK, PK	Proben A
1	95°C	4 min	alle Proben	-

Tabelle 13 Programm für die DNA-Extraktion

Die Tabelle zeigt die Reaktionsbedingungen für die DNA-Extraktion. Der erste Schritt findet für die Proben der Variante A im Wasserbad, für die restlichen Proben im Thermocycler statt. Der zweite Schritt findet für alle Proben im Thermocycler statt.

Der Thermocycler wurde nach den ersten 10 Minuten pausiert, um die über Kopf stehenden Proben (A) nach 20 Sekunden Abzentrifugieren für die 4-minütige Enzymdeaktivierung bei 95°C in aufrechter Position mitlaufen zu lassen. Für die Proben der Variante B erfolgte die Zelllyse von Anfang an in aufrechter Position im Thermocycler bei identischem Programm für die DNA-Extraktion (s. o.).

3.6.3.2 Prä-Amplifikation

Die Proben wurden nach Ablauf der Zelllyse wieder auf Eis gestellt und in der Sterilkammer weiter bearbeitet. Ein Master-Mix 2 wurde aus dem Pre-Amp-Buffer (4,8 µl pro Probe), sowie dem Pre-Amp-Enzyme (0,2 µl pro Probe) angesetzt. Nach kurzem Schnippen und Abzentrifugieren wurden davon je 5 µl zu jedem ERG gegeben. Die ERG wurden nach Zugabe des Master-Mix ebenfalls kurz durch Schnippen gemischt und abzentrifugiert. Anschließend wurden alle Proben in den Thermocycler gestellt und die Prä-Amplifikation gestartet. Tabelle 14 zeigt das Programm für die Prä-Amplifikation.



Anzahl Zyklen	Temperatur	Dauer
1	95°C	2 min
12	95°C	15 sec
	15°C	50 sec
	25°C	40 sec
	35°C	30 sec
	65°C	40 sec
	75°C	40 sec

Tabelle 14 Programm für die Prä-Amplifikationsreaktion

3.6.3.3 Amplifikation

Die Proben wurden nach Ablauf der Prä-Amplifikation wieder auf Eis gestellt und in der Sterilkammer weiter bearbeitet. Ein Master-Mix 3 wurde aus Nuklease-freiem Wasser (34,2 µl pro Probe), dem Amplification Buffer (25 µl pro Probe), sowie dem Amplification Enzyme (0,8 µl pro Probe) angesetzt. Nach kurzem Schnippen und Abzentrifugieren wurden je 60 µl davon in jedes ERG gegeben. Wieder wurde das fertige Reaktionsgemisch durch Schnippen gemischt, abzentrifugiert und in den Thermocycler für die Amplifikationsreaktion transferiert. Tabelle 15 zeigt das Programm für die Amplifikationsreaktion.

Anzahl Zyklen	Temperatur	Dauer
1	95°C	2 min
16	95°C	15 sec
	65°C	60 sec
	75°C	60 sec

Tabelle 15 Programm für die Amplifikationsreaktion

Nachfolgend gibt Tabelle 16 eine Übersicht über die Reaktionsbedingungen der drei Teilschritte der WGA.



Schritt	Reaktion	Zyklen	Temperatur	Dauer
1	Zellyse	1	75°C 95°C	10 min 4 min
2	Prä-Amplifikation	1	95°C	2 min
		12	95°C 15°C 25°C 35°C 65°C 75°C	15 sec 50 sec 40 sec 30 sec 40 sec 40 sec
3	Amplifikation	1	95°C	2 min
		16	95°C 65°C 75°C	15 sec 60 sec 60 sec

Tabelle 16 Übersicht über die Reaktionsbedingungen der WGA

Nach Ende der Amplifikation wurden die Proben sofort wieder auf Eis gestellt. In der Sterilkammer wurden je 8 µl der amplifizierten DNA-Lösung für eine Gel-Elektrophorese aliquotiert, die der Überprüfung der WGA dienen sollte. Die restliche DNA wurde unverzüglich eingefroren und bis zur Array-CGH-Analyse im Gefrierschrank bei -20°C gelagert.

3.6.3.4 Evaluation der Amplifikation mittels Elektrophorese

Um das Ergebnis der WGA zu überprüfen und die Amplifikate sichtbar zu machen, wurde eine Gel-Elektrophorese durchgeführt. Die Elektrophorese ist ein Verfahren, bei dem geladene Moleküle nach ihrer relativen Molmasse aufgetrennt werden können. Dabei wandern, wie in diesem Fall, z. B. DNA-Fragmente (negativ geladen) über ein elektrisches Feld vom Minus- zum Pluspol, z. B. durch ein Agarosegel, über das eine Gleichspannung angelegt wird. Je nach Molekülradius und Masse sowie abhängig von der Höhe der angelegten Spannung und dem Dichtegrad des Gels, wandern diese schneller oder sind träger und können somit aufgetrennt werden. Dabei werden die Moleküle mit einem Farbstoff markiert, um sie sichtbar zu machen [66].

Für die Herstellung von 1%-Agarosegel wurden zunächst 500 ml 1xTBS (Tris Buffered Saline) als Laufpuffer angemischt. Davon wurden 80 ml für die Herstellung des Gels verwendet und der Rest in eine Elektrophorese-Kammer gegossen. In einen Erlenmeyerkolben wurden 0,8 g Agarose, sowie die 80 ml Laufpuffer gegeben und die Mischung in der Mikrowelle bei 800 Watt für 2 Minuten unter intermittierendem Schwenken erhitzt. Zum heißen, homogenen Gel wurden 1,5 µl des DNA-



Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid gegeben und alles durch Schwenken gemischt, bevor es in die Gelkammer gefüllt wurde. Luftblasen wurden entfernt und die Kämmen zur Erzeugung der Probenkammern eingesetzt. Nach Abkühlung und Erhärtung des Gels wurde eine Kammer mit 7 μ l einer 100 bp DNA-Ladder (molekularer Massenindikator) inklusive 6x Dye (Farbstoff) und die Probenkammern jeweils mit 8 μ l der amplifizierten DNA sowie 2 μ l 6x Dye beladen. Bei einer Spannung von 100 V lief die Elektrophorese für ca. 50 Minuten.

Als positiv wurde ein Amplifikationsergebnis gewertet, wenn eine deutlich sichtbare gleichmäßige Massenverteilung der Amplifikate zwischen ca. 100 und 1000 bp Länge (erkennbar mit Hilfe der Ladder) auftrat.



3.7 Array-basierte vergleichende Genomhybridisierung (Array-CGH)

3.7.1 Funktionsprinzip

Die vergleichende Genomhybridisierung (Comparative Genomic Hybridization (CGH)) ist eine molekularzytogenetische Untersuchungsmethode, die zur Detektion von Kopienzahlveränderungen in einem zu testenden Genom dient [67]. Dabei wird ein Testgenom mit einem Referenzgenom auf das Vorkommen von chromosomalen Imbalancen verglichen. Die Methode beruht auf Färbung der zu vergleichenden Nukleinsäuren mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, deren Intensität hinterher gemessen werden kann. Bei der konventionellen CGH werden die Test-DNA und die Referenz-DNA im Mengenverhältnis 1:1 gemischt und für die konsekutive Hybridisierung auf Metaphase-Präparate eines Individuums mit nicht-aberrantem Genom gegeben. Die DNA-Fragmente konkurrieren nun um die komplementären Bindungsstellen. Liegt eine unauffällige Test-DNA vor, so ergibt sich ein Mischfarbstoff (gelb). Sind in der zu testenden DNA Verluste im Sinne von Deletionen oder Zugewinne an genetischer Information, im Sinne von Insertionen, Duplikationen oder Amplifikationen zu verzeichnen, so ergibt sich ein relativer Überschuss einer der beiden verwendeten Farbstoffe. Beispielsweise erscheint ein Überschuss an Test-DNA (Insertion, Duplikation, Amplifikation) in roter Farbe, während ein Verlust in der Test-DNA (Deletion) im relativen Überschuss der Referenz-DNA resultiert, welcher dann in grüner Farbe fluoresziert. Durch Zugabe von nicht-markierter sogenannter Cot I Human DNA werden hochrepetitive Sequenzen zuvor geblockt. Die Fluoreszenzintensität beider Farbstoffe wird im Anschluss durch computergestützte Bildverarbeitung gemessen und bildlich dargestellt [46]. Bei der konventionellen CGH liegt die Auflösung, mit der genomische Kopienzahlveränderungen gemessen werden können, bei 7 bis 10 Mb, was circa einer Chromosomenbande nach G-Bänderungsmuster entspricht [68]).

Die Array-basierte Variante der CGH stellt eine Weiterentwicklung der CGH dar. Dabei werden, anstatt der Metaphase-Präparate, auf Glas-Objektträgern fixierte DNA-Fragmente zur Hybridisierung verwendet, die jedoch das ganze Genom abdecken [69-72]. Dadurch kann die Auflösung um ein Vielfaches erhöht werden. Die DNA-Fragmente können aus modifizierten Bakterien (meist E. coli) hergestellt werden



(Bacterial Artificial Chromosome-Array (BAC-Array)) [73]. Abbildung 7 zeigt schematisch den Ablauf eines Array-CGH-Experiments.

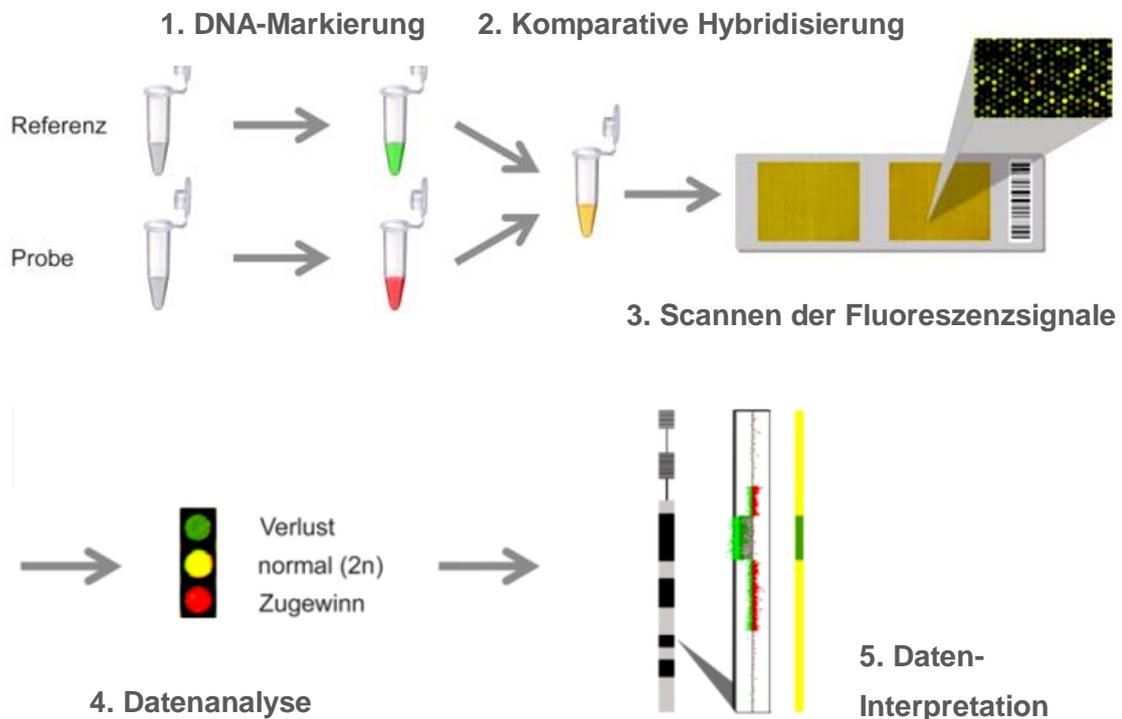


Abbildung 7 Schema der Array-CGH

Die Proben- und Referenz-DNA werden zunächst mit zwei verschiedenen Fluorophoren markiert (Cy3 und Cy5, hier rot und grün dargestellt) (1) und anschließend mit auf dem Array-Objektträger fixierten DNA-Fragmenten komparativ hybridisiert (2). Es folgt das Scannen der Fluoreszenzsignale mit einem Microarray-Scanner (bei unauffälliger Proben-DNA entsteht eine gelbe Fluoreszenz) (3), die Datenanalyse mittels Analysesoftware, bei der die Signalintensitäten gemessen werden, (4) und die nachfolgende Interpretation der Ergebnisse (5). Abbildung modifiziert nach [74].

Die Array-CGH-Analyse findet zum Beispiel in der Tumordiagnostik sowie im Rahmen der molekularen Syndromologie, der Pränatal- und der Präimplantationsdiagnostik (PID) Anwendung. Sie bietet – verglichen mit der konventionellen Karyotypisierung – einige Vorteile. Zum einen ist sie bestens zur DNA-Analyse geeignet, wenn wenig Probenmaterial, beispielsweise nur eine bis wenige Zellen, vorliegen. Zum anderen sind zeitintensive Zellkulturen nicht nötig [67]. Dadurch besteht auch nicht das – wenn auch sehr kleine – Risiko in der Kultur für chromosomale Störungen während der Mitose. Auch der Informationszugewinn durch die Array-CGH, basierend auf der Möglichkeit, selbst submikroskopische Zugewinne und Verluste zu detektieren, ist von großem Vorteil. Bei Vorliegen von weiteren (Mosaik-) Zelllinien ist die Array-CGH bei deren Detektion der Karyotypisierung (mit Einschränkungen) überlegen. Dies beruht vermutlich auf einem Wachstumsnachteil der abnormen Zelllinie in der Zellkultur [67, 75].



Ein Nachteil der Array-CGH-Analyse ist das Unvermögen, strukturelle Veränderungen ohne Verlust oder Zugewinn an genetischer Information, wie z.B. bei balancierten Translokationen oder Inversionen, zu detektieren. Das ist damit zu erklären, dass die genetische Information im Gesamten im Vergleich zur Kontroll-DNA weder vermehrt noch verringert ist. Lediglich die Anordnung der Chromosomenabschnitte ist verändert, die jedoch nicht berücksichtigt wird. Allerdings liegen bei den meisten phänotypisch auffälligen Individuen unbalancierte Translokationen vor [76]. Auch eine Polyploidie, also eine Vervielfältigung des gesamten Chromosomensatzes, wird nicht erkannt [67]. In dieser Arbeit wurde die im Zentrum für Reproduktionsgenetik im Gyn-Gen-Lehel MVZ etablierte Single Channel-Methode angewendet. Hier werden pro Versuchsreihe (Batch) insgesamt zwei Referenz-DNA (männlich und weiblich) verwendet. Diese werden jeweils einmal mit Cy3 und Cy5 farbmarkiert und dann auf ein Arrayfeld zueinander ins Verhältnis gesetzt, so dass die beiden weiblichen unterschiedlich markierten DNA und die beiden männlichen unterschiedlich markierten DNA auf einem Arrayfeld aufgetragen sind. Dazu können dann mehrere Proben-DNA mit analysiert werden, wobei jeweils zwei Proben-DNA zueinander auf ein Feld gegeben werden (s. Abbildung 8, S.47). Computergestützt können eventuelle Imbalancen der Proben-DNA sowohl im Vergleich zur weiblichen, als auch zur männlichen Referenz-DNA dann jeweils detektiert werden. Daher bietet die Single-Channel-Methode eine Kostenersparnis, da nicht auf jedes Arrayfeld die Referenz-DNA gegeben werden muss [77]. Außerdem hat sie den Vorteil, dass die Gonosomen besser beurteilt werden können. Auch die Qualität des Experiments kann bei der Single-Channel-Methode unter anderem über die Betrachtung der Gonosomen abgeschätzt werden [78].

In dieser Arbeit wurde der 1 Mb BAC-Array der Firma Illumina/BlueGnome (24sure, HG 19) verwendet. Dieser Array besteht aus 2900 BAC-Klonen, deren Abstand im Mittel zueinander ca. 1 Mb beträgt. Ausgelesen wurde der Array mit dem NimbleGen MS 200 Microarray Scanner (Auflösung 10 μ m). Die Analyse erfolgte unter Zuhilfenahme der Auswertesoftware BlueFuse Multi 4.1 (Fa. Illumina/ BlueGnome).



3.7.2 Material und Durchführung

Kapitel	Vorgang
3.7.2.1	Labelling
3.7.2.2	Probenvereinigung und Volumenreduktion
3.7.2.3	Hybridisierung
3.7.2.4	Waschen
3.7.2.5	Scannen

Tabelle 17 Schema für die Durchführung der Array-CGH

Reagenzien (24sure+ Pack, Fa. Illumina/Bluegnome)
male/female DNA
Reaction Buffer
dCTP-labelling mix
Cy3 dCTP
Cy5 dCTP
Klenow Enzyme
Primer Solution
Hybridization Buffer
COT Human DNA

Tabelle 18 Reagenzien für die Array-CGH-Analyse

Für die Durchführung der nächsten Schritte wurde stets auf Eis sowie in der Sterilkammer und bei Schutz vor UV-Licht gearbeitet.

3.7.2.1 Labelling

Die Reagenzien außer dem Klenow-Enzym wurden aufgetaut, kurz gemischt und abzentrifugiert und anschließend auf Eis gestellt. In jedes ERG wurden 5 µl Primer Solution sowie jeweils 8 µl Proben-DNA pipettiert. Für die Denaturierung der DNA wurden die Proben für 5 Minuten bei 94°C in den Thermocycler gestellt. Die Proben wurden anschließend für 5 Minuten auf Eis herunter gekühlt. In der Zwischenzeit wurden die Mastermixe für Cy3 und Cy5 für das Labelling (Farbmarkieren der DNA) vorbereitet. Zusammen mit den gekühlten DNA-Röhrchen wurden die Mastermixe kurz abzentrifugiert und anschließend jeweils 12 µl des Cy3-Labelling-Mix oder 12 µl des Cy5-Labelling-Mix in die 13 µl des jeweiligen ERG pipettiert. Nach kurzem Schnippen und Abzentrifugieren der Proben wurden diese für 4 Stunden bei 37°C im



Thermocycler platziert. Dieser Schritt kann bei Bedarf auf bis zu 18 Stunden verlängert werden.

3.7.2.2 Probenvereinigung und Volumenreduktion

Unterdessen wurde ca. 30 Minuten vor Ende der 4 Stunden Inkubationszeit ein Vakuumkonzentrator (SpeedVac) auf 60°C erhitzt. Die ERG wurden abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Für die nachfolgende Probenvereinigung und Einengung mittels Vakuumkonzentrator wurden je Probe ein Aliquot von 25 µl COT Human DNA aufgetaut. Diese 25 µl-Aliquots wurden nun mit dem Cy5-markierten und dem Cy3-markierten Genom zu einem Gesamtvolumen von 75 µl vereint und mit der Pipette gemischt. Die ERG wurden mit geöffnetem Deckel in den vorgewärmten Vakuumkonzentrator transferiert und das Volumen anschließend für ca. 45-60 Minuten auf ca. 3 µl reduziert. Etwa 10-15 Minuten vor Ende der Volumenreduktion wurde der Hybridization Buffer auf 75°C vorgewärmt. Aufgrund der Viskosität der Lösung wurde für die Pipettiervorgänge eine spezielle GILSON-Pipette verwendet.

3.7.2.3 Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurden jeweils 21 µl des vorgewärmten Puffers zu den ca. 3 µl des vereinten Proben-Referenz-COT-Gemisches hinzugegeben und solange geschöpft, bis die Lösung homogen und frei von Schwebeteilchen erschien. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden die ERG in den Thermocycler für die Denaturierung bei 75°C für 10 Minuten inkubiert. Die Röhrchen wurden anschließend für 20 Sekunden abzentrifugiert sowie auf Raumtemperatur abgekühlt und die Hybridisierungsplatte (HyBrite) auf 47°C vorgewärmt. Für die nächsten Schritte wurde unter größter Vorsicht jeder Array-Objektträger einzeln bearbeitet. Ein Array-Objektträger besitzt eine eigene Array-ID und zwei Array-Felder für je zwei DNA-Proben (je nach Experiment: Probe-Referenz, s. Abbildung 8 links; oder Probe-Probe bzw. Referenz-Referenz, s. Abbildung 8 rechts). Es wurden jeweils zwei Deckgläschen (22 x 22 mm) nach Prüfung auf Unversehrtheit und Sauberkeit auf eine Array-Schablone gelegt, wobei ein Deckglas oben und eines unten angebracht wurde. Je 18 µl der fluoreszenzmarkierten DNA wurden auf jedes Deckgläschen gegeben und der Array-Objektträger mit dem Chip zur Deckglasfläche hin darauf gelegt. Zum Abdichten wurde Fixogum-Kleber am Rand der Deckgläschen aufgetragen und im Dunkeln für max. 10 Minuten getrocknet. Im Anschluss wurden die Objektträger in den vorgewärmten HyBrite gelegt und für 3 bis 16 Stunden bei 47°C (über Nacht) hybridisiert.

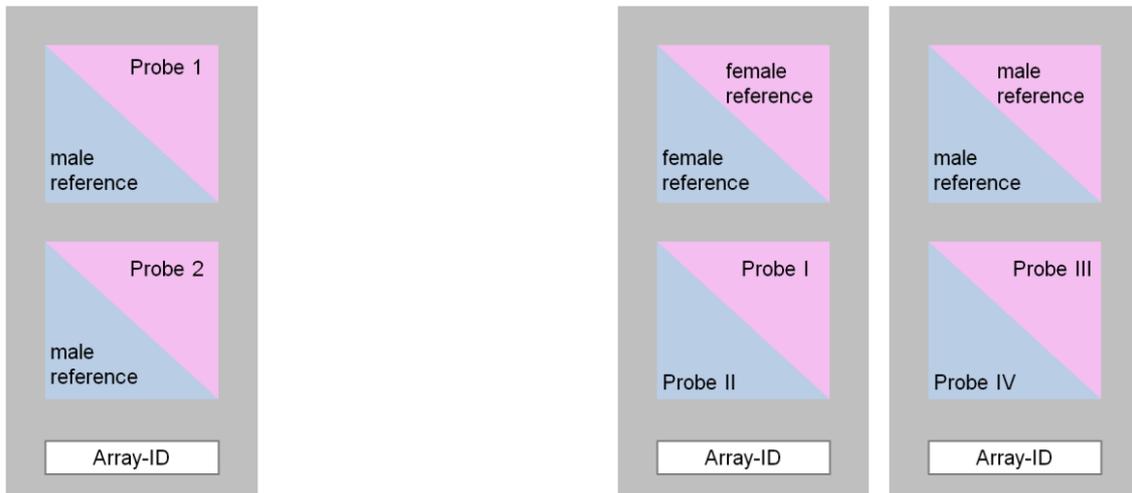


Abbildung 8 Anordnung der Proben- und Referenz-DNA auf dem Array-Objektträger

Links: Anordnung der Proben- und Referenz-DNA beim Dual Channel-Experiment. Es wird jeweils eine Proben-DNA (Probe 1 bzw. 2) zur männlichen Referenz-DNA ins Verhältnis gesetzt. Rechts: Anordnung der Proben- und Referenz-DNA beim Single Channel-Experiment. Es gibt zwei Referenz-DNA (männlich und weiblich), die mit verschiedenen Fluorophoren markiert zueinander ins Verhältnis gesetzt werden. Ebenso werden je zwei verschiedene Proben-DNA (Probe I und II bzw. III und IV) zusammen auf ein Array-Feld gegeben. Farblich dargestellt sind die Fluoreszenzmarkierung der DNA mit Cy3 (rosa) und Cy5 (blau).

3.7.2.4 Waschen

Reagenzien und Materialien
20x SSC
Tween 20
Aqua bidestillata
500 ml-Schott-Flasche
Magnetrührfisch
Magnetrührer
Einwegpipette und Pipettierhilfe
Messzylinder
Küvetten

Tabelle 19 Reagenzien und Materialien für die Herstellung der Waschlösung

Für die Herstellung der Waschlösung 1 wurden 40 ml 20xSSC-Lösung sowie 0,2 ml Tween 20 mit der Gilson-Pipette in eine Schott-Flasche gegeben und diese mit bidestilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 400 ml aufgefüllt. Mittels Rührfisch wurde die Lösung durchgemischt. Für die Herstellung der Waschlösung 2 wurden 285 ml bidestilliertes Wasser in die Schott-Flasche gegeben, 15 ml 20xSSC-Lösung dazu pipettiert und mit dem Rührfisch durchgemischt. Für die Herstellung der Waschlösung 3 wurden 3 ml 20xSSC-Lösung in eine Schott-Flasche gegeben, diese mit



bidestilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 600 ml aufgefüllt und mit dem Rührfisch durchgemischt. Tabelle 20 zeigt das Waschprotokoll.

Schritt	Waschlösung	Puffer	Temperatur	Zeit	Rühren
1	1	2xSSC 0,05% Tween 20	RT	1-2 min	nein
2	1	2xSSC 0,05% Tween 20	RT	10 min	ja
3	2	1xSSC	RT	10 min	ja
4	3	0,1xSSC	60°C	5 min	nein
5	3	0,1xSSC	RT	1 min	ja

Tabelle 20 Waschprotokoll

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über das Waschprotokoll. Es beinhaltet 5 Waschschrte (Schritt 1-5) mit 3 Waschlösungen (Waschlösung 1-3) mit unterschiedlicher Zusammensetzung (s. Spalte Puffer). Teilweise wurde ein Rührfisch zum Durchmischen der Lösungen genutzt.

Die Waschlösungen wurden in die Küvetten gefüllt und die Küvette mit der Waschlösung 3 in einem Wasserbad auf 60°C erhitzt. Nach Ende der Hybridisierungszeit wurden die Array-Objektträger vorsichtig mit einer Pinzette vom Fixogum-Kleber befreit – ohne die Deckgläser dabei zu lösen – und in eine Küvette mit Waschlösung 1 gegeben (Schritt 1). Nach etwa 1-2 Minuten lösten sich die Deckgläschen von selbst oder wurden – wenn nötig – mit einer Pinzette entfernt ohne den Objektträger dabei aus der Flüssigkeit zu heben. Die Array-Objektträger wurden anschließend in die zweite Küvette mit Waschlösung 1 gegeben und diese für 10 Minuten mittels Rührfisch durchmischt (Schritt 2). Dann wurden die Objektträger in die Küvette mit Waschlösung 2 transferiert und diese ebenfalls für 10 Minuten gerührt (Schritt 3). Anschließend wurden die Objektträger in die Küvette mit Waschlösung 3 gegeben und bei 60°C für 5 Minuten stehen gelassen (Schritt 4). Für den letzten Waschschrte wurden die Objektträger für 1 Minute in eine vierte Küvette mit Waschlösung 3 gegeben und diese gerührt (Schritt 5). Während die übrigen Objektträger in der Waschlösung 3 verbleiben konnten, wurde ein Objektträger nach dem anderen in einer Microarray-Zentrifuge für 30-60 Sekunden getrocknet und lichtgeschützt in einem Behälter aufbewahrt.

3.7.2.5 Scannen

Der Scanvorgang wurde nach Transport der Objektträger im Dunkeln und bei Raumtemperatur zügig im Anschluss am Institut für Humangenetik der TU München durchgeführt. Dafür wurde der NimbleGen MS 200 Microarray Scanner (Fa. Roche)



verwendet. Mit dem Zwei-Kanal-Scanner wurden die Fluorophore (Cy3 und Cy5) spezifisch für ihre Absorptionswellenlänge angeregt. Dabei regte ein grüner Laser (Wellenlänge 532 nm) das Cy3-Signal und ein roter Laser (Wellenlänge 635 nm) das Cy5-Signal an. In einem Pre-Scan-Schritt wurde der Array-Objektträger bei niedriger Auflösung vorgescannt, um das Hybridisierungsfeld einzugrenzen sowie den Array-Barcode zu lesen. Im eigentlichen Scan-Schritt wurde in einer höheren Auflösung (10 μm) aus beiden Fluoreszenz-Signalen ein Multi-TIFF-Bild erstellt und daraus ein Graustufenbild generiert (s. Abbildung 19, S. 65). Die Analyse erfolgte unter Zuhilfenahme der Auswertesoftware BlueFuse Multi 4.1 (Fa. Illumina/ BlueGnome) und der Qualitätsparameter, die im Folgenden näher erläutert werden sollen.

3.7.2.6 Beurteilung der Ergebnisse mittels Qualitätsparameter

Die Überprüfung der Datenqualität ist einer der wichtigsten Aspekte in Microarray-Experimenten. Sie erlaubt die Beurteilung der Ergebnisse und deren Einordnung in genomische Veränderungen und Artefakte [79]. Die von der Firma Illumina als Orientierungswerte herausgegebenen Qualitätsparameter setzen sich aus der Standardabweichung der Autosomen (SD Autosome), dem Prozentsatz einbezogener Klone (% Included Clones), dem Verhältnis des Fluoreszenzsignals zum Hintergrundsignal (Signal to Background Ratio (SBR)) sowie der Derivative Log Ratio (DLR) zusammen.

Der Wert SD Autosome gibt die Streuung der \log_2 -Ratio aller Klone auf dem Array an. Ein niedriger Wert (0,05-0,11; s. Tabelle 21) spricht für eine Verteilung nahe der Null, um die sich die \log_2 -Ratio-Werte der Autosomen verteilen sollen. Es werden alle Autosomen-Klone mit einberechnet; Ausreißer-Werte fern von der Null werden nicht ausgenommen. Ein zu niedriger Wert ($<0,02$; s. Tabelle 21) spricht für ein Problem beim Waschvorgang oder der Hybridisierung, was ein Verbleiben vieler nicht-spezifischer Signale auf dem Array zur Folge hat.

Der Parameter % Included Clones gibt den Prozentsatz aller Klone an, die für die Analyse herangezogen wurden. Ausgeschlossen werden Klone, die uneinheitliche Klonreplikate aufweisen. Dieser Wert wird nur bei BAC-Arrays verwendet, da nur hier Klone ausgeschlossen werden können. Ist der Wert niedrig, kann das für größere Artefakte auf dem Array sprechen.



Die Signal to Background Ratio zeigt an, wie klar die Fluoreszenzsignale der DNA-Klone über dem Hintergrundsignal detektiert werden können. Der Wert wird aus dem Quotient der Hintergrund-korrigierten Signalintensität der DNA-Klone und der bloßen Hintergrund-Signalintensität berechnet. Er zeigt die Qualität der Waschvorgänge und des Labelling an.

Die Derivative Log Ratio misst die Streuung der Differenzen der \log_2 -Ratios zwischen allen benachbarten Klon-Paaren (des Genoms). Bei einem einfachen Array-CGH-Profil ist dieser Wert dem SD Autosome-Wert sehr ähnlich. Bei einem komplexen Array-CGH-Profil mit mehreren Stufensprüngen würde der SD Autosome-Wert übermäßig ansteigen, während der DLR-Wert in dem Fall weniger empfindlich wäre [79].

Nicht direkt zu den Qualitätsparametern gehörend, aber dennoch für die Auswertbarkeit und Interpretation der Array-CGH-Profile unerlässlich, ist die Heranziehung der X-separation. Sie zeigt die \log_2 -Ratio der Proben-DNA im Vergleich zur männlichen bzw. weiblichen Referenz-DNA am X-Chromosom an. Je nach Geschlecht der Proben-DNA liegt ein Mismatch im Vergleich zu einer der beiden Referenz-DNA vor. Die Höhe des Mismatch kann im Experiment etwas vom natürlich zu erwartenden Betrag der \log_2 -Ratio vom Verhältnis 2:1 (weiblich zu männlich, $\log_2(2/1)= 1$) bzw. 1:2 (männlich zu weiblich, $\log_2(1/2)= -1$) abweichen. Sie dient jedoch als Orientierung, um Auffälligkeiten im Array-CGH-Profil als echte Kopienzahlveränderungen oder als Artefakte einzustufen und wurde in dieser Arbeit maßgeblich für die Beurteilung der Array-CGH-Profile eingesetzt [80].

Tabelle 21 zeigt die Vergleichswerte der Qualitätsparameter, die von der Firma Illumina zur Beurteilung herausgegeben wurden (modifiziert).



Parameter	Wert	Bewertung
SD Autosome	0,05-0,11	gut
	0,02-0,04	befriedigend
	<0,02	zu niedrig
	>0,17	zu hoch
% Included Clones	>95%	gut
	85-95%	eingeschränkt auswertbar
SBR	3-12	gut
	13-15	befriedigend
	<3	zu niedrig
	>15	zu hoch
DLR Fused	<0,2	gut
	<0,22	befriedigend
	>0,24	ausgefallen
X-separation	0,4-0,9	gut
	0,3-0,39	eingeschränkt auswertbar
	≤0,2	ausgefallen

Tabelle 21 Qualitätsparameter und Bewertung für die Array-CGH-Auswertung

Die Tabelle zeigt die Einordnung von Qualitätsparameterwerten in drei Kategorien. Sie dienen allerdings nur der Orientierung und definieren nicht die Auswertbarkeit der Array-CGH-Analysen. Die farbliche Markierung zeigt die o. g. Kategorien an (Werte gut; Werte befriedigend; Werte zu hoch/zu niedrig/Experiment mislungen). Gelbe und rote Werte zeigen eine potenziell eingeschränkte Auswertbarkeit an. Modifiziert nach [79].

3.7.3 Validierung der Methoden

Für die Validierung der Ergebnisse wurde sich die Tatsache zu Nutze gemacht, dass bei der Array-CGH die Geschlechtschromosomen mit bestimmt werden können. Es wurden u. a. Schwangerschaften mit männlichen Feten einer Array-CGH-Analyse unterzogen, um durch Nachweis des Y-Chromosoms die fetale Herkunft der mikrodisszierten fluoreszenzmarkierten Trophoblasten zu beweisen. Das Geschlecht des Feten war zum Zeitpunkt der Untersuchung in den meisten Fällen bereits bekannt, sei es durch Ultraschalldiagnostik oder Geburt des Kindes oder durch Analyse von Abortmaterial bei Spontanabort. Wenn bei einer Schwangerschaft mit männlichem Feten in der Array-CGH ein weiblicher Chromosomensatz resultierte, musste von der Analyse einer mütterlichen Zelle ausgegangen werden. Im Falle einer männlichen DNA könnte man von der Präsenz der Trophoblasten im Bürstenabstrich, der Spezifität des Antikörpers und einer sauberen Probenweiterverarbeitung ausgehen.



4 Ergebnisse

4.1 ThinPrep®-Bürstenabstrich

Mit Hilfe des Bürstenabstrichs und des ThinPrep®-Verfahrens wurden Zellen des Zervixkanals entnommen und standen somit für eine dünnschichtzytologische Untersuchung zur Verfügung. Es wurden insgesamt 33 ThinPrep®-Abstriche entnommen. Das Abstrichmaterial wurde auf insgesamt 103 Objektträger aufgestempelt. Davon waren 96 ThinPrep®-Objektträger und 7 PET-Membranbeschichtete Objektträger.

4.2 Identifizierung der Trophoblasten

4.2.1 Ergebnisse des morphologischen Ansatzes

In einem Vorversuch wurden die Zellen von Chorionzotten aus Abortpräparaten zum Erlernen der Morphologie von Trophoblasten nach Papanicolaou-Färbung mikroskopiert. Hier konnten überwiegend mutmaßliche Synzytiotrophoblasten gesichtet werden. Zytotrophoblasten waren nur vereinzelt sichtbar. Es wurde keine Validierung der Zellidentität durchgeführt, sodass ausschließlich der morphologische Vergleich zur in der Literatur aufgeführten Zellmorphologie der Trophoblasten erfolgte. In Abbildung 9 sind exemplarisch die selbst hergestellten Aufnahmen sowie im Vergleich das Beispiel aus der Literatur aufgeführt.

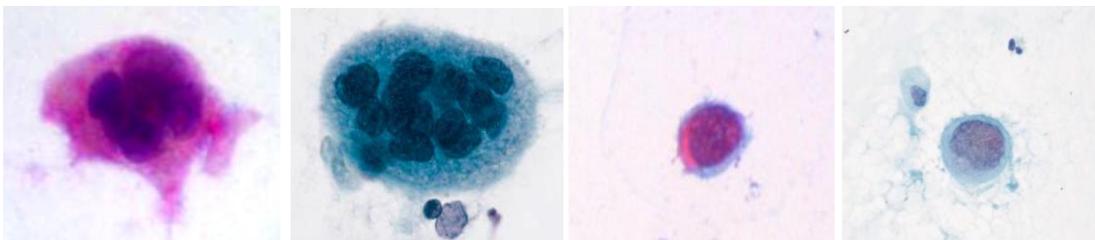


Abbildung 9 Vergleich zwischen Eigenaufnahmen und Literatur

Links: Exemplarische Aufnahme eines mutmaßlichen Synzytiotrophoblasten (Papanicolaou-Färbung, aufgenommen mit 40x Objektiv). Mitte-links: Beispielhafter Synzytiotrophoblast aus der Literatur [35]. Mitte-rechts: Exemplarische Aufnahme eines mutmaßlichen Zytotrophoblasten (Papanicolaou-Färbung, aufgenommen mit 40x Objektiv). Rechts: Beispielhafter Zytotrophoblast aus der Literatur [35].



Die angestrebte rein morphologische Identifizierung von den nur vereinzelt vorkommenden Trophoblasten im Zervixabstrich gelang auf diese Weise nicht. Trophoblasten konnten in verschiedenen Abstrichpräparaten morphologisch nicht sicher identifiziert werden. Da die rein morphologische Erkennung der Zellen nicht möglich erschien, wurde eine immunzytochemische Identifizierung der Zellen angestrebt.

4.2.2 Ergebnisse der Immunzytofluoreszenz

Es wurden insgesamt 103 Objektträger untersucht. Davon wurden 40 Objektträger als Untersuchungsproben (von Schwangeren), 48 Objektträger als Negativkontrollen und 15 Objektträger als Positivkontrollen verwendet (s. Tabelle 22). Als Positivkontrollen diente fetales Zellmaterial von Chorionzotten aus Abortmaterial.

Art der Probe	Anzahl der OT
Untersuchungsproben	40
Negativkontrollen	48
Positivkontrollen	15
Gesamt	103

Tabelle 22 Übersicht über die untersuchten Objektträger

Nach einigen Testversuchen lieferte letztlich das in Kapitel 3.4.2.2 aufgeführte Färbeprotokoll die besten Ergebnisse im Hinblick auf Hintergrundfärbung, Leuchtintensität und Kompatibilität mit WGA und Array-CGH. Somit können sowohl die Magermilch als Blockingreagenz als auch der primäre Anti-HLA-G-Antikörper der Firma Abgent sowie der sekundäre Antikörper der Firma Vector Laboratories als WGA-kompatible und Hintergrundleuchten-reduzierende Reagenzien genutzt werden. Abbildung 10 und Abbildung 11 zeigen exemplarisch Fluoreszenz-Mikroskopiebilder aus Zervixkanal-Abstrichen. Darauf sind Zellen nach dem in Kapitel 3.4.2.2 aufgeführten Protokoll angefärbt. Die Bilder wurden mit einer 100-fachen Vergrößerung aufgenommen (10x Objektiv, 10x Okular).

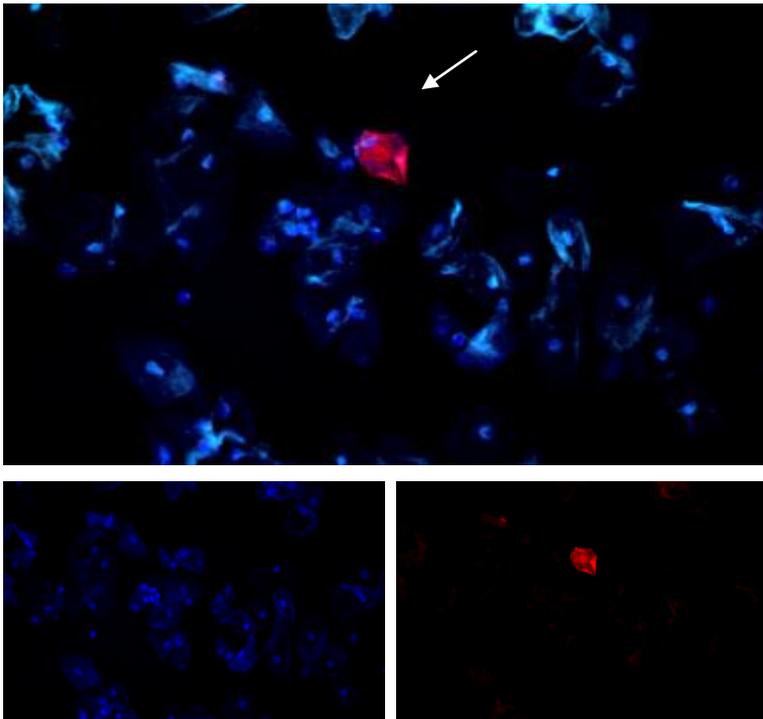


Abbildung 10 Ausschnitt einer Fluoreszenz-Mikroskopie von Zellen eines Zervix-Abstrichs
 Färbung nach in Kapitel 3.4.2.2 beschriebenem Protokoll. Anfärbung eines mutmaßlichen einzelnen plazentaren Zytotrophoblasten (s. Pfeil), umgeben von mütterlichen Plattenepithelzellen. 10x Objektiv. Oben: Kombiniertes DAPI-, Aqua- und Texas Red-Filter. Unten: links: DAPI-Filter, rechts: Texas Red-Filter.

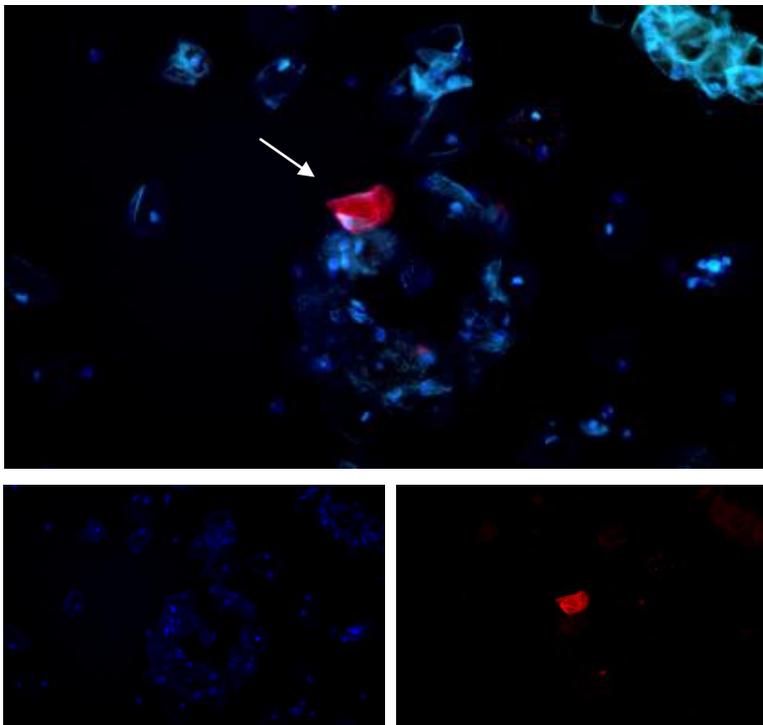


Abbildung 11 Ausschnitt einer Fluoreszenz-Mikroskopie von Zellen eines Zervix-Abstrichs
 Färbung nach in Kapitel 3.4.2.2 beschriebenem Protokoll. Anfärbung eines mutmaßlichen einzelnen plazentaren Zytotrophoblasten (s. Pfeil), umgeben von mütterlichen Plattenepithelzellen. 10x Objektiv. Oben: Kombiniertes DAPI-, Aqua- und Texas Red-Filter. Unten: links: DAPI-Filter, rechts: Texas Red-Filter.



Folgende Abbildung zeigt exemplarisch die Negativkontrolle für o. g. Zellen unter Anfärbung nur mit sekundärem Antikörper, der an den Fluorophor Texas Red gekoppelt ist. Durch Spezifität des sekundären Antikörpers für den primären Kaninchen-Antikörper, der hier nicht verwendet wurde, ergibt sich kaum Anfärbung.

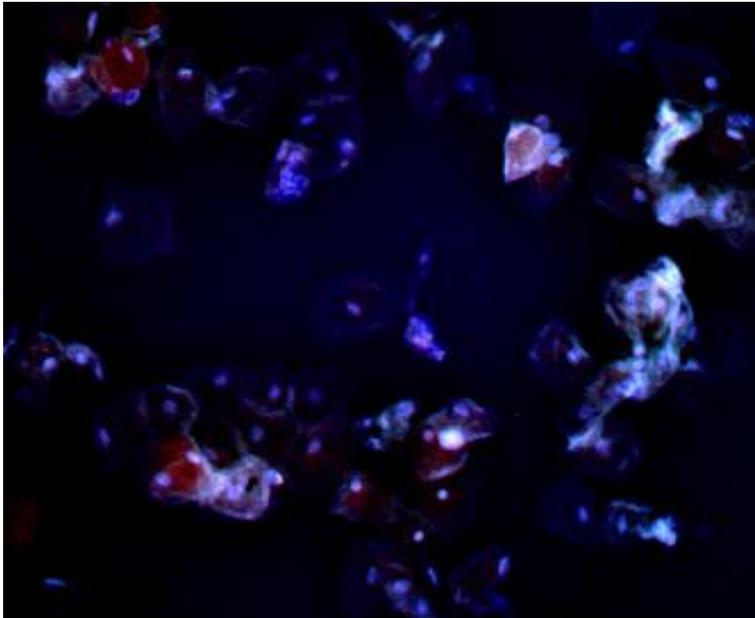


Abbildung 12 Negativkontrolle. Ausschnitt einer Fluoreszenz-Mikroskopie von Zellen eines Zervixkanal-Abstrichs

Färbung nach in Kapitel 3.4.2.2 beschriebenem Protokoll, aber ohne Verwendung des primären Antikörpers. 10x Objektiv. Kombinerter DAPI-, Aqua- und Texas Red-Filter.

4.2.3 Analyse des Zellmaterials

Das Zellmaterial wurde nach der Immunfluoreszenzfärbung unter dem Mikroskop betrachtet. Es stellte sich sehr häufig Zelldebris dar, der laut Herstellerangabe durch die Filtermembran abgesaugt werden sollte [81]. Der Zelldebris wies ein starkes Fluoreszenzsignal auf. Dadurch erschwerte er eine Differenzierung zu fluoreszierenden „echt positiven“ Zellen. Um die Häufigkeit von Zelldebris auf den Objektträgern zu verdeutlichen, wurden die Objektträger in drei Kategorien eingeteilt. Dabei war entscheidend, ob Zelldebris oder intakte Zellen über 50% des Materials auf dem Objektträger ausmachten. Kategorisiert wurden diejenigen Objektträger, auf die Abstrichmaterial aus der Zervix aufgestempelt worden war und bei welchen eindeutig Zelldebris bzw. intakte Zellen überwogen. Nicht kategorisierbar waren Objektträger, die weder in die eine noch in die andere Kategorie fielen. Dazu gehörten auch die Objektträger, auf die Abortmaterial gestempelt wurde. Auf 39 von insgesamt 103 Objektträgern (37,9%) bestand über 50% des Zellmaterials aus Zelldebris, also aus Zellfragmenten. Diese wiesen stets ein hohes Fluoreszenzsignal auf. Nur auf 24 von



103 Objektträgern (23,3%) war das Zellbild überwiegend durch intakte Zellen geprägt. 40 Objektträger konnten nicht in eine der beiden Kategorien eingeteilt werden. Zieht man diese von der Gesamtanzahl der Objektträger ab, so bleiben 63 kategorisierbare Objektträger übrig, von welchen 39 (61,9%) überwiegend Zelldebris und 24 (38,1%) überwiegend intakte Zellen aufwiesen. Tabelle 23 zeigt eine Einteilung dieser Objektträger.

Einteilung	Anzahl	Anteil
überwiegend Zelldebris	39	37,9%
überwiegend intakte Zellen	24	23,3%
nicht kategorisiert	40	38,8%
gesamt	103	100%

Tabelle 23 Übersicht über die Zellqualität auf den Objektträgern

Auf 39 von insgesamt 103 OT (37,9%) bestand über 50% des Zellmaterials aus Zelldebris. Auf 24 von 103 OT (23,3%) war das Zellbild überwiegend durch intakte Zellen geprägt. 40 OT konnten nicht in eine der beiden Kategorien eingeteilt werden (nicht kategorisierbar).

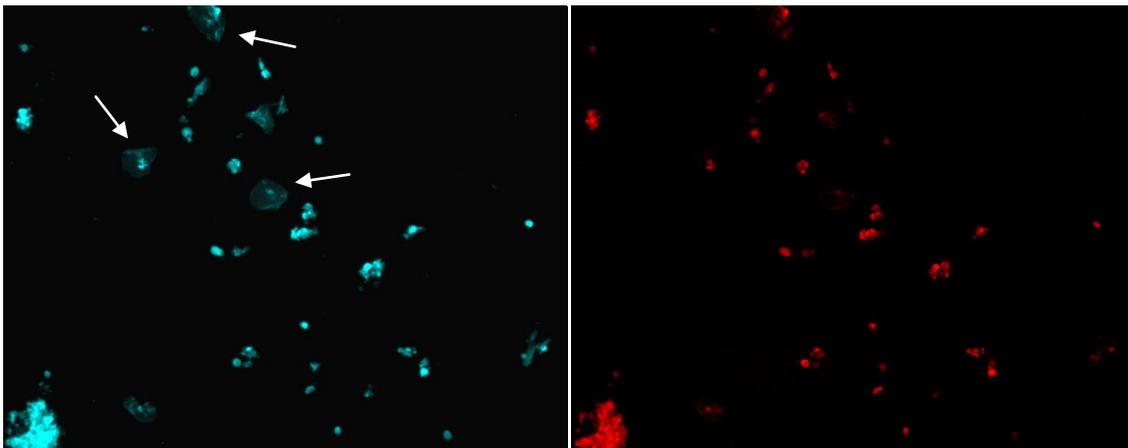


Abbildung 13 Zellbild mit überwiegend Zelldebris

Links: Die Abbildung zeigt ein typisches Zellbild eines Abstrichs mit über 50% Zelldebris. Es sind nur vereinzelt intakte Zellen zu sehen (s. Pfeile; Aqua-Filter). Rechts: Es besteht eine hohe Signalintensität des Zelldebris (Red-Filter). 10x Objektiv.

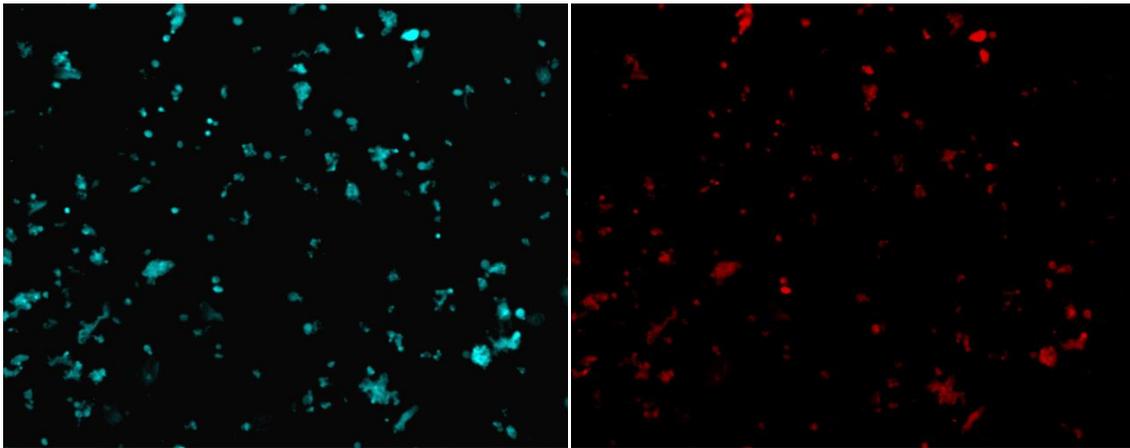


Abbildung 14 Zellbild mit ausschließlich Zelldebris

Links: Die Abbildung zeigt ein Zellbild eines Abstrichs mit ausschließlich Zelldebris. Es sind keine intakten Zellen zu sehen (Aqua-Filter). Rechts: Es besteht eine hohe Signalintensität des Zelldebris (Red-Filter). 10x Objektiv.



4.3 Lasermikrodissektion

Für den Mikrodissektionsvorgang wurden die Zellen nach Leuchtintensität und Zellintegrität ausgewählt. Es wurden sowohl ThinPrep®- als auch PET-Membranbeschichtete Objektträger verwendet. Beide ließen sich erfolgreich für die Lasermikrodissektion verwenden. Die WGA und Array-CGH ließen sich problemlos mit beiden Objektträgern durchführen. Der Vorteil der ThinPrep®-Objektträger war eine bessere Haftung der aufgestempelten Zellen und somit eine höhere Zellausbeute. Insgesamt wurden 15 Einzelzellen per Lasermikrodissektion gewonnen. Davon waren 9 Zellen auf PET-Membran-Objektträgern und 6 Zellen auf ThinPrep®-Objektträgern. 10 Zellen wurden in AdhesiveCaps und 5 Zellen in PBS-benetzte Caps katapultiert. Tabelle 24 zeigt die möglichen Kombinationen o. g. Variablen und die Anzahl auf diese Weise dissezierter Zellen an.

Kombi	Färbung	Objektträger	Cap	Anzahl dissezierter Zellen
1	ja	ThinPrep®	AdhesiveCap	5
2	ja	ThinPrep®	PBS-benetztes Cap	1
3	ja	PET-Membran	AdhesiveCap	5
4	ja	PET-Membran	PBS-benetztes Cap	2
5	nein	ThinPrep®	AdhesiveCap	0
6	nein	ThinPrep®	PBS-benetztes Cap	0
7	nein	PET-Membran	AdhesiveCap	0
8	nein	PET-Membran	PBS-benetztes Cap	2

Tabelle 24 Übersicht über die möglichen bzw. getesteten Kombinationen der einzelnen Variablen bei der Lasermikrodissektion

Die Tabelle zeigt alle 8 möglichen Kombinationen die für das Outcome der WGA und Array-CGH relevant hätten sein können. Durch Veränderung immer nur einer Variablen konnte im Fall des Misslingens der WGA oder Array-CGH auf eine hindernde Variable geschlossen werden. Die Kombinationen 1-4 und 8 wurden getestet, 5-7 nicht.

Tabelle 25 gibt einen Überblick über die einzelnen dissezierten Zellen. Um oben aufgeführte Variablenkombination zu testen und aufgrund der Schwierigkeiten bezüglich einer sicheren Trophoblasten-Identifikation wurden neben Zellen von Schwangeren mit männlichen Feten (Zielobjekt) auch Zellen von Schwangeren mit weiblichen Feten, Zellen von Schwangeren in fortgeschrittenen Schwangerschaftswochen sowie Zellen von nicht-Schwangeren (ungefärbte Proben) für die Lasermikrodissektion verwendet. Diese konnten im Anschluss nur für das Ergebnis der Durchführbarkeit der Methodenkombination, von vornherein aber nicht für



den Nachweis fetalen Ursprungs von potenziellen Trophoblasten herangezogen werden.

LMD	Proben-ID	SSW	Fetus	Objektträger	Färbung	Cap
1	1.1.1.1.1	22+0	m	PET	ja	AC
2	16.1.2.3.2	39+0	w	ThinPrep®	ja	PBS
3	2b.1.3.2.0	13+4	w	PET	ja	AC
4	2b.2.4.0.0	13+4	w	PET	ja	AC
5	2b.3.5.0.0	13+4	w	PET	ja	AC
6	2b.4.6.0.0	13+4	w	PET	ja	AC
7	14.1.7.4.3	9+0	w	PET	ja	PBS
8	14.2.8.0.0	9+0	w	PET	ja	PBS
9	19.1.9.5.4	NS	-	PET	-	PBS
10	19.2.10.6.0	NS	-	PET	-	PBS
11	11.1.11.7.5	6+3	m	ThinPrep®	ja	AC
12	11.2.12.8.0	6+3	m	ThinPrep®	ja	AC
13	11.3.13.9.0	6+3	m	ThinPrep®	ja	AC
14	11.4.14.10.6	6+3	m	ThinPrep®	ja	AC
15	2a.1.15.11.0	11+4	w	ThinPrep®	ja	AC

Tabelle 25 Überblick über die Proben, die der Lasermikrodissektion unterzogen wurden

Insgesamt 15 Zellen wurden disseziert. Davon waren 13 mit Immunzytofluoreszenz gefärbt (LMD 1-8 und 11-15). Die Proben 9 und 10 stammten von nicht-schwangeren Patientinnen und wurden nicht angefärbt. Es wurde von 9 PET-Membran- und von 6 ThinPrep®-Objektträgern disseziert. Diese wurden in 10 AdhesiveCaps und 5 PBS-benetzte Caps katapultiert. LMD: Lasermikrodissektion; PET: Polyethylen-Terephthalat; AC: AdhesiveCap; PBS: Phosphat buffered Saline; NS: nicht-schwanger.

Im Folgenden sind beispielhaft die Schritte des Laservorgangs dargestellt (s. Abbildungen 15, 16 und 17).

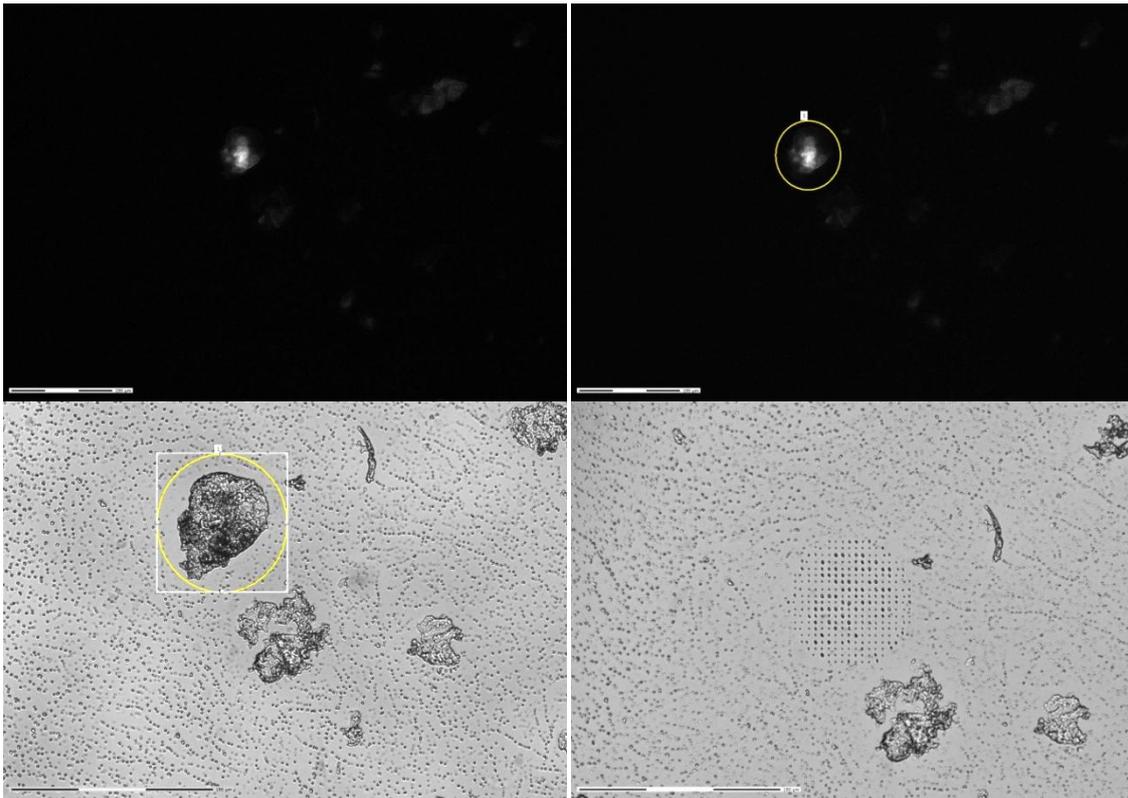


Abbildung 15 Darstellung der einzelnen Dissektionsschritte

Oben links: Auswahl der leuchtenden Zelle (Fluoreszenzintensitätsmikroskopie, 10x Objektiv). Oben rechts: Einzeichnen der Laserschnittlinie (Fluoreszenzintensitätsmikroskopie, 10x Objektiv). Unten links: Ansicht der Zielzelle (Durchlichtmikroskopie, 20x Objektiv). Unten rechts: Ansicht des Mikroskopierfeldes nach der Dissektion und Katapultation (Durchlichtmikroskopie, 20x Objektiv). Messbalken 150 μm .

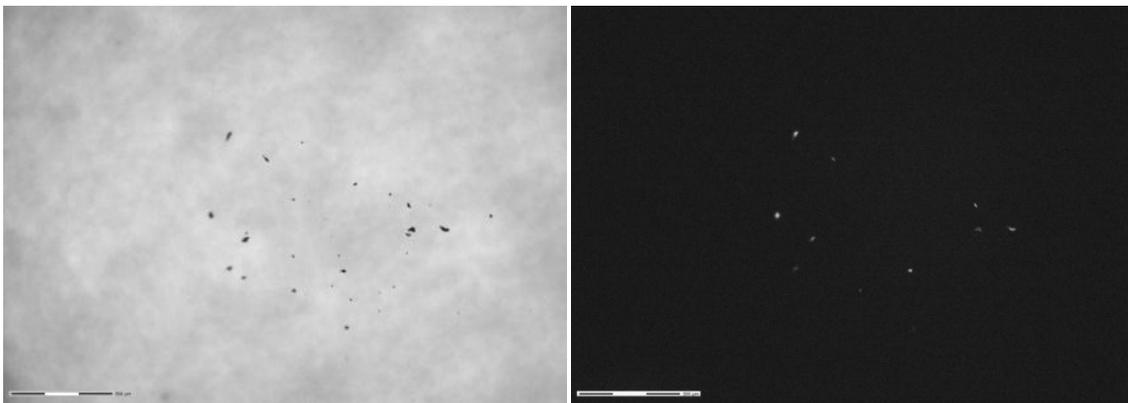


Abbildung 16 Darstellung der dissezierten und katapultierten Zellfragmente im Cap eines Mikroreaktionsgefäßes

Die Zellen, die von Glas-OT disseziert wurden, fragmentierten bei der Katapultation durch das Setzen mehrerer Katapultpunkte. Die Membran-beschichteten OT gewährleisteten dagegen eine Morphologie-erhaltende Katapultation (nicht im Bild). Links: dunkle Zellfragmente (Durchlichtmikroskopie, 5x Objektiv). Rechts: helle Zellfragmente (Fluoreszenzintensitätsmikroskopie, 5x Objektiv).

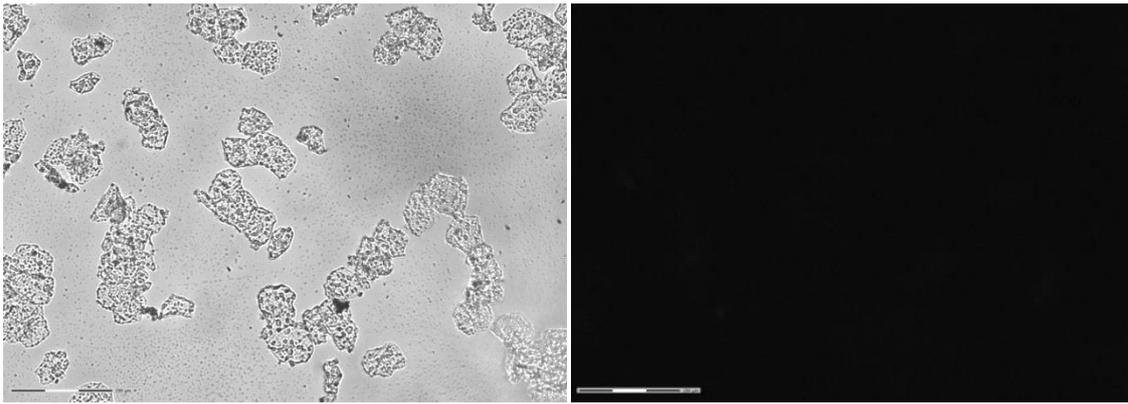


Abbildung 17 Darstellung einer Negativkontrolle (nicht-schwangere Patientin) nach Immunfluoreszenzfärbung

Links: mehrere Zellen (Durchlichtmikroskopie, 10x Objektiv). Rechts: keine leuchtenden Zellen sichtbar (Fluoreszenzintensitätsmikroskopie, 10x Objektiv).



4.4 Gesamtgenomamplifikation

Für die WGA wurden 11 der 15 mikrodisszezierten Zellen, bei welchen die Zellqualität und -integrität gut und daher das Ergebnis erfolgsversprechend war, ausgesucht. Die Gesamtgenomamplifikation konnte bei 9 von insgesamt 11 amplifizierten Proben erfolgreich durchgeführt werden (81,8%). Es wurden 9 Proben von schwangeren und 2 Proben von nicht-schwangeren Patientinnen amplifiziert. Um das Amplifikationsergebnis zu evaluieren, wurden die amplifizierten DNA-Proben samt einer DNA-Ladder (100 bp) sowie Positiv- und Negativkontrolle in Agarosegelkammern gegeben und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Als positiv wurde eine deutlich sichtbare gleichmäßige Massenverteilung der Amplifikate zwischen ca. 100 und 1000 bp Länge gewertet [82]. Abbildung 18 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Gelelektrophorese.

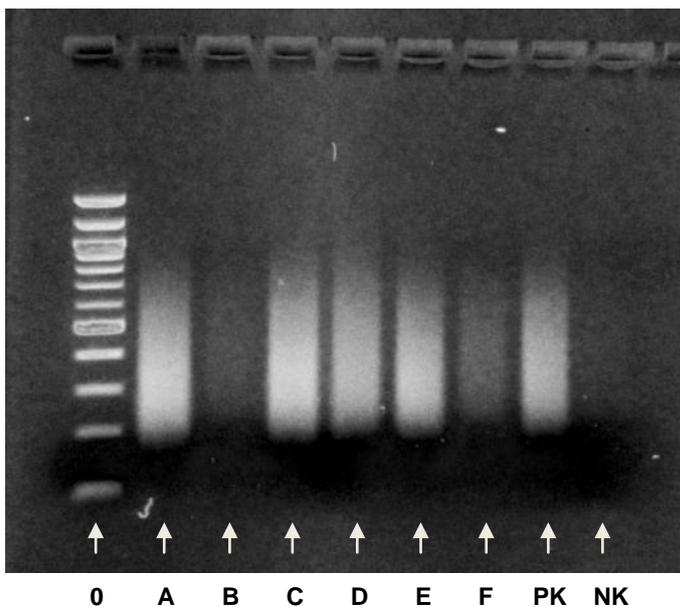


Abbildung 18 Agarose-Gelelektrophorese-Bild

Von links nach rechts: 0: 100 bp-Ladder, A: Probe 1.1.1.1.1, B: Probe 2b.1.3.2.0, C: Probe 16.1.2.3.2, D: Probe 14.1.7.4.3, E: Probe 19.1.9.5.4, F: Probe 19.2.10.6.0, PK: Positivkontrolle, NK: Negativkontrolle

Tabelle 26 gibt einen Überblick über die amplifizierten Proben und das Ergebnis der WGA.



WGA	Proben-ID	Amplifikations- ergebnis	SSW	Fet	OT	Färb.	Cap	DAPI
1 (A)	1.1.1.1.1	positiv	22+0	m	PET	ja	AC	nein
2 (B)	2b.1.3.2.0	negativ	13+4	w	PET	ja	AC	nein
3 (C)	16.1.2.3.2	positiv	39+2	w	ThinPrep®	ja	PBS	nein
4 (D)	14.1.7.4.3	positiv	9+0	w	PET	ja	PBS	nein
5 (E)	19.1.9.5.4	positiv	NS	-	PET	nein	PBS	nein
6 (F)	19.2.10.6.0	negativ	NS	-	PET	nein	PBS	nein
7*	11.1.11.7.5	positiv	6+3	m	ThinPrep®	ja	AC	nein
8*	11.2.12.8.0	positiv	6+3	m	ThinPrep®	ja	AC	nein
9*	11.3.13.9.0	positiv	6+3	m	ThinPrep®	ja	AC	nein
10*	11.4.14.10.6	positiv	6+3	m	ThinPrep®	ja	AC	nein
11*	2a.1.15.11.0	positiv	11+4	w	ThinPrep®	ja	AC	ja

Tabelle 26 Ergebnisse der WGA

Von 11 Proben sind 9 erfolgreich amplifiziert worden (Ergebnis positiv; WGA 1, 3-5, 7-11). Zwei der 11 Proben sind nicht amplifiziert worden (Ergebnis negativ; WGA 2 und 6). Die Buchstaben in Klammern bei WGA 1-6 weisen auf die Banden in Abbildung 18 (A-F). * nicht im Gelbild (Abbildung 18) dargestellt. OT: Objektträger; Färb.: Färbung; DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol-Färbung; PET: Polyethylen-Terephthalat-Membran; AC: AdhesiveCap; PBS: PBS-benetzt Cap.

Die Ergebnisse der WGA zeigen, dass die getesteten unterschiedlichen Variablen alle eine Gesamtgenomamplifikation prinzipiell zulassen. Zu diesen Variablen gehören die Immunzytofluoreszenz- sowie die DAPI-Färbung (ja/ nein) der Zellen, die Objektträger (PET/ ThinPrep®) und die Caps (AdhesiveCap/ PBS-benetzt Cap).

Variable	Amplifizierbarkeit	Amplifizierbare Proben/ alle Proben
IZF-Färbung	ja	8/9 (88,9%)
ungefärbt	ja	1/2 (50%)
PET-Membran-OT	ja	3/5 (60%)
ThinPrep®-OT	ja	6/6 (100%)
AdhesiveCap	ja	6/7 (85,7%)
PBS-benetzt Cap	ja	3/4 (75%)
DAPI-Färbung	ja	1/1 (100%)

Tabelle 27 Darstellung der DNA-Amplifizierbarkeit von unterschiedlich bearbeiteten Zellen

Die Tabelle zeigt, dass alle sieben getesteten Variablen eine Amplifizierung der DNA zuließen. In der rechten Spalte werden die Anzahl der erfolgreich amplifizierten Proben anteilig an den mit der jeweiligen Variablen der WGA unterzogenen Proben aufgeführt.

Die folgenden in Tabelle 28 aufgeführten Kombinationen dieser Variablen sind möglich.



Kombination	Färbung	Objektträger	Cap	Amplifizierbarkeit
1	ja	ThinPrep®	AdhesiveCap	ja, 5/5 (100%)
2	ja	ThinPrep®	PBS-benetztes Cap	ja, 1/1 (100%)
3	ja	PET-Membran	AdhesiveCap	ja, 1/2 (50%)
4	ja	PET-Membran	PBS-benetztes Cap	ja, 1/1 (100%)
5	nein	ThinPrep®	AdhesiveCap	n.g.
6	nein	ThinPrep®	PBS-benetztes Cap	n.g.
7	nein	PET-Membran	AdhesiveCap	n.g.
8	nein	PET-Membran	PBS-benetztes Cap	ja, 1/2 (50%)

Tabelle 28 Ergebnis der getesteten Kombinationen der verschiedenen Zellpräparationen in Hinblick auf die Amplifizierbarkeit der DNA

Die Tabelle zeigt die Amplifizierbarkeit aller getesteten Kombinationen mit ihrer absoluten und relativen Amplifizierbarkeitsrate an. Die Kombinationen 5-7 wurden nicht getestet (n. g.).

Um die Proben von AdhesiveCaps und PBS-benetzten Caps zu amplifizieren, mussten die ersten Schritte des störanfälligen WGA-Protokolls modifiziert werden. Das Ergebnis dieser Modifikation ist im Folgenden dargestellt (s. Tabelle 29).

Variante	Cap	Zelllagerung	Volumenreduktion	Zellyse
A	AdhesiveCap	trocken	nein	auf dem Deckel stehend
B	normal	in PBS	ja	senkrecht stehend

Tabelle 29 Varianten der Probenverarbeitung

Bei Variante A wurden die Zellen in AdhesiveCaps katapultiert. Dort haften die Zellen irreversibel an. Die Zellyse musste auf dem Deckel stehend stattfinden. Bei Variante B wurden die Zellen in mit 10 µl PBS benetzte Deckel gewöhnlicher Mikroreaktionsgefäße katapultiert. Für die anschließende WGA musste eine Volumenreduktion auf 2,5 µl durchgeführt werden. Dafür konnte die Zellyse nach Zentrifugation der Zellsuspension in das Mikroreaktionsgefäß senkrecht stattfinden.



4.5 Auswertung der Array-CGH-Ergebnisse

Für die Array-CGH-Analyse wurden die Proben gewählt, bei welchen die Gesamtgenomamplifikation nach Beurteilung der Gel-Elektrophorese erfolgreich war. Die Array-CGH-Analyse konnte in jedem (6 von 6 (100%)) durchgeführten Fall (mit geringer Einschränkung in 2 Fällen) ausgewertet werden. Es fiel keine Probenanalyse aus. Abbildung 19 zeigt exemplarisch ein Graustufenbild der Array-CGH, das beim Scannen (s. Kapitel 3.7.2.5) generiert wird.

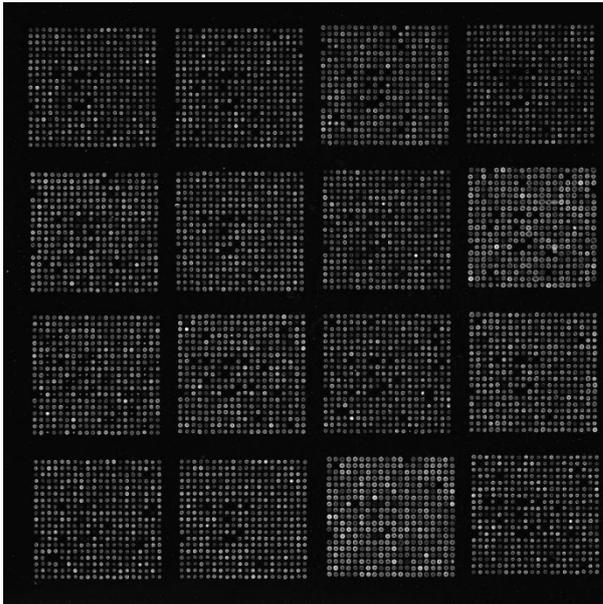


Abbildung 19 Graustufenbild der Array-CGH

Das Graustufenbild wird nach dem Scannen der Fluoreszenzsignale mit dem Array-Scanner generiert. Es zeigt die Signalintensitäten der hybridisierten Referenz- und Proben-DNA-Verhältnisse. Diese werden computergestützt ausgewertet.



4.5.1 Array-CGH-Profile

Abbildung 20 zeigt das **Array-CGH-Profil 1** der Probe 1.1.1.1.1. Es ist ein unauffälliger weiblicher Karyotyp zu sehen.

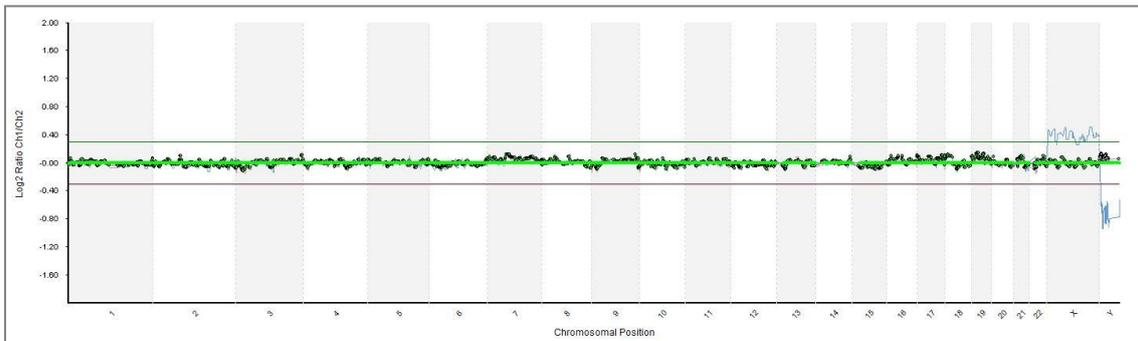


Abbildung 20 Array-CGH-Profil der Probe 1.1.1.1.1

Y-Achse: Darstellung der Fluoreszenzverhältnisse von Cy3 zu Cy5 eines jeden BAC-Klons in dem zur Basis logarithmierten Quotienten (\log_2) in einem sogenannten Array-CGH-Profil. X-Achse: Lokalisierung eines jeden BAC-Klons auf dem jeweiligen Chromosom. Von links nach rechts die Autosomen von 1-22 sowie die Gonosomen

Abbildung 21 zeigt das **Array-CGH-Profil 2** der Probe 16.1.2.3.2. Es ist ein unauffälliger weiblicher Karyotyp zu sehen.

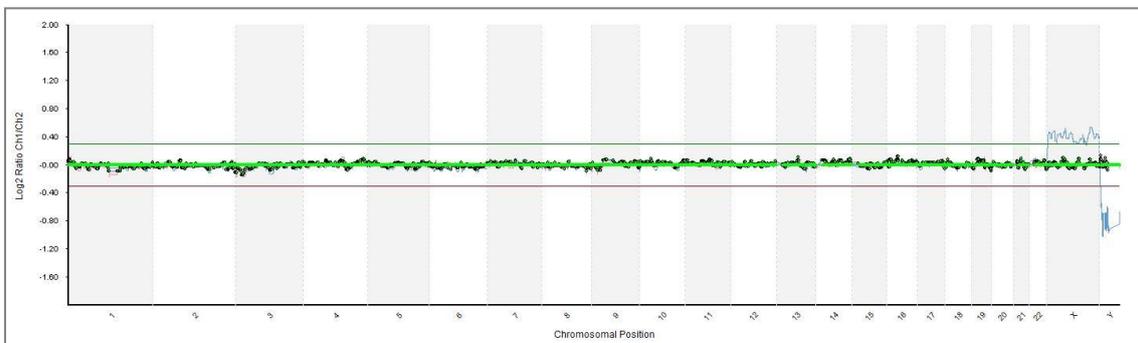


Abbildung 21 Array-CGH-Profil der Probe 16.1.2.3.2

Y-Achse: Darstellung der Fluoreszenzverhältnisse von Cy3 zu Cy5 eines jeden BAC-Klons in dem zur Basis logarithmierten Quotienten (\log_2) in einem sogenannten Array-CGH-Profil. X-Achse: Lokalisierung eines jeden BAC-Klons auf dem jeweiligen Chromosom. Von links nach rechts die Autosomen von 1-22 sowie die Gonosomen.



Abbildung 22 zeigt das **Array-CGH-Profil 3** der Probe 14.1.7.4.3. Es ist ein unauffälliger weiblicher Karyotyp bei deutlichem Rauschen des Profils zu sehen. Die Kriterien für eine Kopienzahlveränderung (s. Kapitel 3.7.2.6) sind dennoch nicht erfüllt.

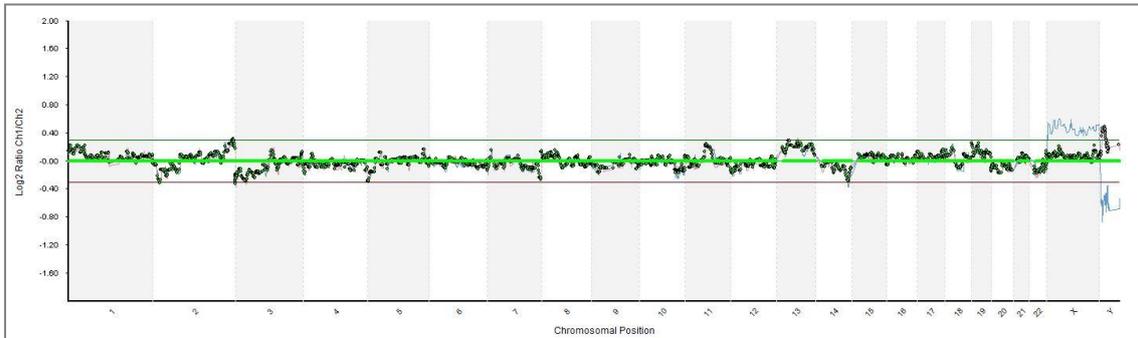


Abbildung 22 Array-CGH-Profil der Probe 14.1.7.4.3

Y-Achse: Darstellung der Fluoreszenzverhältnisse von Cy3 zu Cy5 eines jeden BAC-Klons in dem zur Basis logarithmierten Quotienten (\log_2) in einem sogenannten Array-CGH-Profil. X-Achse: Lokalisierung eines jeden BAC-Klons auf dem jeweiligen Chromosom. Von links nach rechts die Autosomen von 1-22 sowie die Gonosomen.

Abbildung 23 zeigt das **Array-CGH-Profil 4** der Probe 19.1.9.5.4. Es ist ein unauffälliger weiblicher Karyotyp des Profils zu sehen. Es zeigt sich ein sogenanntes „wave pattern“ (wellenartiges Profil), was auf Amplifikationsartefakte zurückzuführen ist und besonders bei Einzelzellen vorkommt [80].

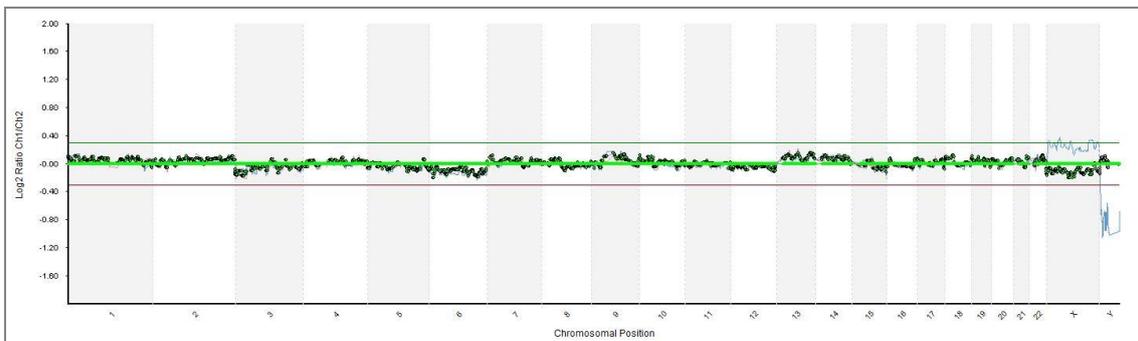


Abbildung 23 Array-CGH-Profil der Probe 19.1.9.5.4

Y-Achse: Darstellung der Fluoreszenzverhältnisse von Cy3 zu Cy5 eines jeden BAC-Klons in dem zur Basis logarithmierten Quotienten (\log_2) in einem sogenannten Array-CGH-Profil. X-Achse: Lokalisierung eines jeden BAC-Klons auf dem jeweiligen Chromosom. Von links nach rechts die Autosomen von 1-22 sowie die Gonosomen.



Abbildung 24 zeigt das **Array-CGH-Profil 5** der Probe 11.1.11.7.5. Das Profil ist bei sichtbarem Rauschen nur eingeschränkt auswertbar. Kriterien für Kopienzahlveränderungen sind hier ebenfalls nicht erfüllt; es ist auch hier ein unauffälliger weiblicher Karyotyp zu sehen.

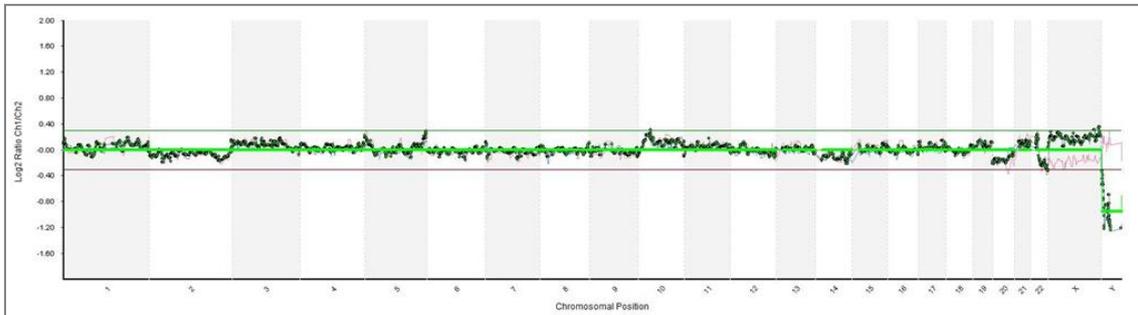


Abbildung 24 Array-CGH-Profil der Probe 11.1.11.7.5

Y-Achse: Darstellung der Fluoreszenzverhältnisse von Cy3 zu Cy5 eines jeden BAC-Klons in dem zur Basis logarithmierten Quotienten (\log_2) in einem sogenannten Array-CGH-Profil. X-Achse: Lokalisierung eines jeden BAC-Klons auf dem jeweiligen Chromosom. Von links nach rechts die Autosomen von 1-22 sowie die Gonosomen.

Abbildung 25 zeigt das **Array-CGH-Profil 6** der Probe 11.4.14.10.6. Es ist ein deutliches Rauschen zu sehen, das zu bedingter Auswertbarkeit führt. Dennoch sind die Kriterien für Kopienzahlveränderungen nicht erfüllt; es ist am ehesten ein unauffälliger weiblicher Karyotyp zu sehen.

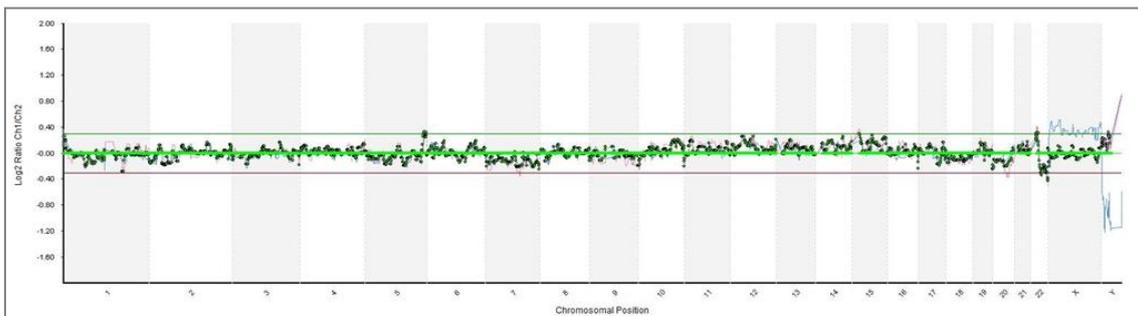


Abbildung 25 Array-CGH-Profil der Probe 11.4.14.10.6

Y-Achse: Darstellung der Fluoreszenzverhältnisse von Cy3 zu Cy5 eines jeden BAC-Klons in dem zur Basis logarithmierten Quotienten (\log_2) in einem sogenannten Array-CGH-Profil. X-Achse: Lokalisierung eines jeden BAC-Klons auf dem jeweiligen Chromosom. Von links nach rechts die Autosomen von 1-22 sowie die Gonosomen.

Angaben zu den Proben-DNA sowie die Ergebnisse der Array-CGH-Analyse sind im Folgenden zusammengefasst und tabellarisch aufgeführt (s. Tabelle 30).



Array	Proben-ID	Fetus	Rauschen	Ergebnis	Auswertbarkeit/ Beurteilung
1	1.1.1.1.1	m	nein	arr(1-22,X)x2	auswertbar; unauffälliger weiblicher Karyotyp
2	16.1.2.3.2	w	nein	arr(1-22,X)x2	auswertbar; unauffälliger weiblicher Karyotyp
3	14.1.7.4.3	w	ja	arr(1-22,X)x2	auswertbar; unauffälliger weiblicher Karyotyp
4	19.1.9.5.4	NS	ja, leicht	arr(1-22,X)x2	auswertbar; unauffälliger weiblicher Karyotyp
5	11.1.11.7.5	m	ja	arr(1-22,X)x2	m. E. auswertbar; unauffälliger weiblicher Karyotyp
6	11.4.14.10.6	m	ja	a. e. arr(1-22,X)x2	bedingt auswertbar; unauffälliger weiblicher Karyotyp

Tabelle 30 Übersicht über die Ergebnisse der Array-CGH-Analyse

Von insgesamt sechs Array-CGH-Experimenten konnten sechs erfolgreich durchgeführt werden. Bei drei Proben von Schwangerschaften mit männlichen Feten konnte kein männlicher Karyotyp nachgewiesen werden. Die Schreibweise in der Ergebnis-Spalte erfolgt nach dem „International System for Human Cytogenetic Nomenclature“ (ISCN) [83]. Dabei bezieht sich „arr(...)“ auf ein durch Array-CGH-Analyse erlangtes Ergebnis; die in Klammern stehenden Ziffern bzw. Buchstaben beziehen sich auf die Autosomen bzw. die Gonosomen, welche im n-fachen Satz (xn) vorhanden sind. NS: nicht-schwanger; m. E.: mit Einschränkung; a. e.: am ehesten.

4.5.2 Qualitätsparameter der Array-CGH-Analysen

Die Qualitätsparameter (s. Tabelle 31) dienen als Hilfestellung bei der Auswertung der Array-CGH-Profile und werden in Kapitel 3.7.2.6 näher erläutert. Sie korrelieren allerdings nicht mit der Auswertbarkeit, d. h. es können gute Werte vorliegen und das Array-CGH-Profil trotzdem nicht auswertbar sein (aufgrund von Protokollabweichungen, mangelhafter DNA-Qualität) und es können trotz schlechter Qualitätsparameterwerte auch gut auswertbare Array-CGH-Profile vorliegen.

Array	SD Autosome (combined)	% Included Clones (combined)	SBR	DLR Fused (combined)	X-sepa- ration
1	0,04	98,93	14,62	0,05	0,45
2	0,03	98,86	17,91	0,05	0,45
3	0,10	98,20	12,21	0,09	0,45
4	0,06	98,37	14,86	0,06	0,40
5	0,09	97,46	12,34	0,07	0,30
6	0,10	87,44	8,22	0,11	0,30

Tabelle 31 Qualitätsparameter für die Array-CGH-Analysen dieser Arbeit

Die farbliche Markierung zeigt die Einordnung der Werte in die verschiedenen Stufen der Versuchsqualität an und wird in Tabelle 21 (S. 51) näher erläutert (Werte gut; Werte befriedigend; Werte zu hoch/zuniedrig). Die Einordnung der Qualitätsparameter in die farblich markierten Bereiche dient nur als Orientierung.



5 Diskussion

5.1 Strategien für das experimentelle Vorgehen

5.1.1 Transzervikale Gewinnung von Trophoblasten

In der Literatur findet man neben den bereits diagnostisch angewendeten invasiven Methoden der Trophoblastengewinnung, wie der Chorionzottenbiopsie, auch nicht- oder minimal-invasive potenziell diagnostisch verwendbare Methoden, um an fetales Material zu gelangen. Dazu gehören sowohl die Zervixlavage und die kathetergestützte Aspiration von transzervikalen Trophoblasten, als auch ein Bürstenabstrich oder Abstrich der Zervix mittels Wattestäbchen. Die Gewinnung von transzervikalen Trophoblasten ist ab der 5. Schwangerschaftswoche möglich und damit um einiges früher, als die bisher in der Pränataldiagnostik praktizierte Untersuchung mütterlichen Bluts (ab SSW 9) oder Chorionzottenbiopsie (ab SSW 11-12) und Amniozentese (ab SSW 15-16) [33].

Laut Kingdom et al., 1995, wird eine etwas höhere Ausbeute an Trophoblasten bei der Zellentnahme durch Lavage (Vorhandensein von Trophoblasten in 4 von 11 Proben) gegenüber dem Bürstenabstrich (1 von 11 Proben) erzielt, aber trotzdem werden beide als adäquate Methoden zur Gewinnung von Trophoblasten beschrieben [28]. Miller et al. gewannen 1999 in ihrer Arbeit die Zellen via intrauteriner Lavage bzw. Aspiration mit einer morphologischen Detektionsrate an Synzytiotrophoblasten von 31% respektive 28% und einer immunozytochemischen Detektionsrate von 68% respektive 50% [30]. Unter anderem da laut Chou et al., 1997, die Zellentnahme via Aspiration oder Lavage nicht als risikoärmer als eine Chorionzottenbiopsie eingestuft werden kann, erfolgte in dieser Arbeit die Entnahme durch Bürstenabstrich [30, 84]. Der Bürstenabstrich wird als sichere Methode zur Gewinnung von transzervikalen Trophoblasten eingestuft, die kein höheres Risiko für eine Fehlgeburt, eine Infektion oder exzessive vaginale Blutung birgt, als ein routinemäßiger zytologischer Abstrich im ersten Trimenon [27, 32]. Fritz et al., 2015, zeigten, dass die Ausbeute der Zielzellen unabhängig ist vom mütterlichen Alter und der Parität, des mütterlichen BMI und des Gestationsalters [33]. Einen Überblick der angewandten Methoden zur transzervikalen Zellentnahme gibt Tabelle 1 auf Seite 13.



Mantzaris et al., 2014, testeten die Trophoblastenhäufigkeit im Zervixschleim nach Aspiration zu verschiedenen Zeitpunkten während der Schwangerschaft. Sie konnten keinen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit zwischen der 6., der 7. und der 8. SSW feststellen. Allerdings fanden sie eine signifikant niedrigere Zahl an Trophoblasten in der 9. SSW im Vergleich zu den früheren Zeitpunkten [27]. Diese Beobachtung wurde auch in mehreren Studien von Adinolfi et al, zwischen 1996 und 2001, gemacht, die das Vorhandensein von Trophoblasten im Zervixkanal zwischen der 5. und 7. SSW sowie dann wieder zwischen der 13. und 15. SSW zeigen konnten [85]. Eine Erklärung dafür wird in den Publikationen nicht geliefert. Bolnick et al., 2014, konnten Trophoblasten jedoch in jeder Woche zwischen der 5. und 20. SSW isolieren [19]. Daher wurden in dieser Arbeit auch Schwangere zwischen der 5. und 22. (bzw. versuchsweise 39.) SSW untersucht.

5.1.2 Identifizierung von Trophoblasten

Eine rein morphologische Identifizierung erschien auf den ersten Blick als kostengünstige (Material-) unaufwändige Methode. Verschiedene Arbeitsgruppen beschreiben diese Vorgehensweise (Tutschek et al., 1995, Sherlock et al., 1997, und Bussani et al., 2002, 2007) [28, 32]. Nachdem die eben genannte Methode zur routinemäßigen Identifizierung von Trophoblasten nach wenigen Versuchen bereits ungeeignet erschien, erfolgte eine Fokussierung auf in der Literatur häufiger dargestellte immunzytochemische Verfahren. Für die vorliegende Arbeit wurde in der Literatur nach bereits erfolgreich darstellbaren Antigenen auf Trophoblasten gesucht. Von Bulmer et al., 1995, Miller et al., 1999, und Katz-Jaffe et al., 2005, wurden Antikörper gegen diverse Antigene, besonders Zytokeratine getestet, wobei Konsens darüber herrscht, dass Zytokeratin 7 als Marker am besten geeignet sei [32, 33]. Des Weiteren sind die Antikörper FT141.1, H315 sowie I03 gegen nicht näher spezifizierte Trophoblastenantigene von Kingdom et al., 1995, verwendet worden [28]. Kobayashi et al., 2000, stellten einen Synzytiotrophoblasten mit Antikörpern gegen Humanes Choriongonadotropin (HCG) dar. Auch Fiorella et al., 1993, konnten Trophoblasten mit Anti-HCG und Anti-HPL (Humanes plazentares Laktogen) darstellen [35, 86]. Miller et al., 1999, testeten in ihrer Arbeit mehrere Antikörper gegen plazentare Antigene. Darunter sind FT1.41.1, NCL-PLAP, NDOG-1, NDOG-5 und 340 zu nennen, wobei die höchste Detektionsrate vom monoklonalen Antikörper mAb 340, gefolgt von mAb NCL-PLAP zu erreichen war [30]. In einer Arbeit von Mantzaris et al., 2014, wurde ebenfalls die Spezifität von NDOG-1 für Synzytiotrophoblasten nachgewiesen [27].



Unter all diesen Markern war das von Bulmer et al., 2003, Imudia et al., 2009 sowie von Bolnick et al., 2012, und Fritz et al., 2015, verwendete Antigen HLA-G und dessen Antikörper G233 - auch aufgrund rezenterer Anwendung - der für diese Arbeit Vielversprechendste. Tabelle 3 auf S. 15 zeigt eine Übersicht über die in einigen Studien verwendeten Antikörper.

5.1.3 Isolierung von Trophoblasten

Bolnick et al., 2014 und 2016, und Fritz et al., 2015, gelang eine Anreicherung der Trophoblasten aus transzervikalen Proben, indem sie zunächst einen an magnetische Nanopartikel gebundenen Sekundärantikörper an einen Anti-HLA-G-Primärantikörper binden ließen, um die gesuchten Trophoblasten mit Hilfe eines Magneten während des Waschvorgangs zu immobilisieren und somit von mütterlichen Zellen zu reinigen. Im Anschluss daran wurden die Trophoblasten mittels Immunzytofluoreszenz (Antigen HLA-G, 2014, sowie Antigen β -HCG, 2016 und 2015) identifiziert [19, 34]. Diese Methode stand zum Zeitpunkt der Planung dieser Arbeit aufgrund späterer Veröffentlichung allerdings noch nicht zur Diskussion. Eine weitere Methode zur Detektion und Vereinzelung von Trophoblasten ist die ISET (isolation by size of epithelial tumour/trophoblastic cells), bei der Trophoblasten aus mütterlichem Blut über einen Filter nach der Größe aufgetrennt werden [87-90]. Auch eine durchflusszytometrische Gewinnung der mit Immunzytofluoreszenz vorbehandelten Zellen (FACS) wurde diskutiert.

Vorbild für die in dieser Arbeit angestrebte Versuchsanordnung war mitunter eine Veröffentlichung von Geigl et al., 2007, bei der eine Einzelzell-DNA-Analyse mittels Lasermikrodissektion und anschließender WGA und Array-CGH durchgeführt wurde [91]. Auch Mantzaris et al., 2005 und 2014, verwendeten die Lasermikrodissektion, um die mittels Immunzytofluoreszenz identifizierten Trophoblasten zu isolieren [18, 27]. Von Geigl et al. (s. o.) wird neben der Lasermikrodissektion auch die Mikromanipulation als gleichwertige Methode zur Gewinnung von Einzelzellen beschrieben [91]. Für letztere sind allerdings manuelle Fertigkeit und Übung notwendig, sodass in dieser Arbeit die Lasermikrodissektion zur Anwendung kam.



5.1.4 Alternativen zur Routinepräparation von fetaler DNA

Bereits 1992 waren Griffith-Jones et al. in der Lage durch Nachweis von Y-spezifischen DNA-Sequenzen mithilfe von PCR und Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) in 25 von 26 Fällen fetale Zellen nachzuweisen [92]. Dies wurde auch in späteren Studien praktiziert [93]. Im Rahmen einer auf dieser Arbeit basierenden Studie könnte gerade im Hinblick auf die hohen Kosten in Verbindung mit der Array-CGH der Nachweis von Y-spezifischen DNA-Sequenzen eine zugänglichere Methode zum Nachweis fetaler DNA sein. Alternativ besteht die Möglichkeit einer Untersuchung von Short Tandem Repeat (STR)-Markern mit dem Ziel, väterliche STR-Muster [28, 87] oder nur ein Allel eines mütterlichen STR-Musters zu erkennen [27]. Allerdings erscheint dies ausschließlich für den Prozess der Optimierung der Trophoblastenidentifikation (Kostenfaktor) sinnvoll, da die Array-CGH den fetalen Ursprung durch Erkennung des Y-Chromosoms bei männlichen Individuen in jedem Fall nachweisen kann. Die Detektion von Y-spezifischen DNA-Sequenzen mittels FISH wurde in dieser Arbeit ebenfalls für den Trophoblastennachweis (bei Schwangerschaft mit männlichen Feten) diskutiert. Allerdings wurde letztlich davon abgesehen, da die Methode insofern beschränkt ist, als dass die Fluoreszenzmarkierung der männlichen Trophoblasten dann nur punktuell erfolgen würde (einzig die Y-spezifischen DNA-Sequenzen würden leuchten), sodass gerade eine Unterscheidung von fluoreszierendem Zelldebris nur sehr schwierig wäre. Letztlich stand die Methode zur DNA-Analyse in dieser Arbeit mit der Array-CGH von Anfang an fest, da damit alle Chromosomen untersucht werden können.

5.2 Diskussion der Methoden und Ergebnisse

5.2.1 Bürstenabstrich

In dieser Arbeit wurde das Bürstchen aus Sorge vor Infektionen und kleineren Verletzungen der Zervix nur an die Portio herangeführt, wie bei einem routinemäßigen zytologischen Abstrich, ohne dabei den Zervixkanal tief zu penetrieren. Insgesamt wurden jeweils nur wenige Zellen als Trophoblasten identifiziert. Daraus kann geschlossen werden, dass zu wenige oder keine Trophoblasten mittels Abstrich entnommen wurden. Vermutlich müsste man in einer nächsten Versuchsreihe die Abstrichmethode korrigieren, um die Ausbeute an Trophoblasten zu erhöhen. Dafür



sollte das Entnahmebürstchen tiefer in den Zervixkanal eingeführt werden, um an Zervixschleim zu gelangen. Wirft man einen Blick auf Tabelle 1 (S. 13), bei der die in der Literatur angewandten Entnahmetechniken zeitlich aufgeführt sind, lässt sich eine Tendenz in den letzten Jahren in Richtung Bürstenabstrich und weg von Lavage und Aspiration erkennen. Arbeitsgruppen wie die von Bolnick et al. und Fritz et al. (2014-2016) verwendeten – wie in dieser Arbeit durchgeführt und ebenfalls nach Vorbild von Imudia et al., 2009, – den Bürstenabstrich für die Zellentnahme. Sie verzeichnen eine hohe Trophoblastenrate (s. o.), obwohl sie angeben, einen gewöhnlichen zytologischen Abstrich (ThinPrep®-Pap-Test) durchgeführt zu haben, bei dem die Zellentnahme ja maximal am portio-zervikalen Übergang und nicht im Zervixkanal selbst stattfindet. Auch in dieser Arbeit wurde die Zellentnahme auf dieselbe Weise ausgeführt, nur dass noch keine Trophoblasten (durch Nachweis männlicher DNA) sicher identifiziert werden konnten. Allerdings bleibt unklar, wie die Entnahme bei o. g. Arbeitsgruppen genau durchgeführt wurde. Insbesondere über die Eindringtiefe äußern sie sich nicht und verweisen lediglich auf die Quelle Imudia et al., 2009. Imudia et al. entnahmen Zervixschleim durch 2 cm tiefes Einführen eines Bürstchens in den Zervixkanal, wobei dabei die Zervixwand so wenig wie möglich berührt wurde, um mütterliche Kontamination zu verringern. Wenn beim ersten Versuch kein Schleim gewonnen werden konnte, wurde das Bürstchen wiederholt eingeführt [32]. Zu vermuten ist, dass auch Bolnick et al. und Fritz et al. das Bürstchen einige Zentimeter in den Zervixkanal einführten.

Somit ist die Identifikation einer adäquaten, Untersucher-unabhängigen Abstrich-Methode nach festem Protokoll zur weiteren Etablierung dieser Methode von eminenter Bedeutung. Ein solches Protokoll sollte die Art des Entnahmeinstruments (Bürstchen oder Aspirations- bzw. Lavageschlauch), die Eindringtiefe ab der Portio, sowie den geeignetsten Entnahmezeitraum in der Schwangerschaft beinhalten. Weitere Untersuchungen sollten zum Vergleich dieser variablen Entnahmetechniken mit einer größeren Patientenzahl durchgeführt werden.

Es stellt sich darüber hinaus die Frage, weshalb die aufgestempelten Zellen so viel Zelldebris enthielten. Laut Firma Hologic soll dieser durch das automatisierte Filtersystem abgesaugt werden [81]. Die entnommenen Zellen hätten außerdem im Zellwasch- und Transportpuffer eine Haltbarkeit von mehreren Monaten [94]. Auch Kingdom et al., 1995, beschreiben in ihrer Arbeit ein höheres Auftreten von Zelldebris bei durch Bürstenabstrich entnommene Zellen als mittels Lavage erhaltene [28]. Eine These für das häufige Vorkommen von Zelldebris könnte sein, dass die Trophoblasten



auf ihrem Weg zur Zervix bereits am Absterben sind. Der Debris besteht somit aus bereits abgestorbenen Zellen. Eine möglichst frühe Probenentnahme in der Schwangerschaft könnte demnach theoretisch mehr noch intakte Zellen enthalten. Auch andere Studien zeigten, dass fetales Material häufiger in Form von Zellkernen oder freier DNA als in Form von intakten Zellen in die untere Zervix abgeschilfert werden [30]. Möglicherweise führt auch eine längere Probenasservation zu gehäuftem Auftreten von Zelldebris. Die Entnahme durch Lavage dürfte die Integrität der Zellen besser erhalten, da dabei vermutlich geringere Scherkräfte auf die Zellen ausgeübt werden.

Ein generelles Problem für die Gewinnung transzervikaler Trophoblasten ist die geringe Zelldichte dieser Zellen in der Zervix per se. In verschiedenen Studien sind unterschiedliche Angaben dazu gemacht worden. Overton et al. verzeichneten 1996 eine Zelldichte von transzervikalen Trophoblasten im Abstrichmaterial von 0,7% - 3,4% [95]. Imudia et al. fanden in einer Pilotstudie im Jahr 2009 eine Häufigkeit von HLA G-positiven Zellen in transzervikalen Proben von 1: 2000 [32].

Neben der Zelldichte ist auch von Bedeutung, wie hoch der Anteil an transzervikalen Proben ist, bei dem überhaupt Trophoblasten gefunden wurden und mit welcher Methode diese entnommen wurden. Mantzaris et al., 2014, fanden in 56% der transzervikalen Aspirationsproben Trophoblasten [27]. Weitere kleinere Studien konnten eine Trophoblastenpräsenz in 40-75% der transzervikalen Aspirationsproben feststellen [17, 27]. Während Kingdom et al., 1995, nur in 1 von 11 Fällen (9,1%) Trophoblasten aus per Bürstenabstrich gewonnenen Proben nachweisen konnten, gelang dies Imudia et al., 2009, in 35 von 37 Fällen (94,6%) [28, 32]. Insgesamt sind diese Zahlen noch zu gering und zu wenig reproduzierbar, so dass die Entnahmetechniken weiter verbessert werden müssen, um von Schwangeren mit zuverlässiger Standardmethode Trophoblasten gewinnen zu können. Schwankungen bei der Ausbeute an Trophoblasten sind auch seitens der Schwangeren in Bezug auf Länge und Anatomie der Zervix zu erwarten. In einer Veröffentlichung von Mantzaris et al. wird dafür ein zu entwickelndes Aspirationsgerät vorgeschlagen, das mit mehreren Löchern auf verschiedenen Höhen versehen ist, um eine umfassendere Aspiration des Zervixschleims zu erreichen [27].



5.2.2 Zellweiterverarbeitung

Wie bereits erwähnt, bestand das beim Zervixabstrich entnommene Zellmaterial häufig aus Zelldebris. Für die Zellweiterverarbeitung werden im Folgenden einige Handlungsvorschläge gegeben. Hinsichtlich des Vorkommens von Zelldebris und zur Verringerung von Lagerungsschäden der Zellen, sollte möglichst am Tag des Abstrichs noch die weitere Zellverarbeitung durchgeführt werden. Der Becher, der das im Zellwasch- und Transportpuffer gelöste Abstrichmaterial enthält, sollte vollständig auf Objektträger aufgestempelt werden, um die Ausbeute an Trophoblasten insgesamt so hoch wie möglich zu halten. Die Wahl des Objektträgers sollte auf die Original ThinPrep®-Objektträger fallen, da die Haftung der Zellen dort – verglichen mit den Membran-beschichteten Objektträgern – optimal ist. In dieser Arbeit wurden PET (Polyethylentheraphthalat)-beschichtete Objektträger getestet, die durch geringe Autofluoreszenz besonders für die Immunfluoreszenzmikroskopie und durch Erhaltung der Zellmorphologie auch ideal für die Lasermikrodissektion geeignet sind [59, 96]. Außerdem ist die Mikrodissektion von Membran-Objektträgern einfacher und schonender für das Zellmaterial. Sie zeigten beim Aufstempeln der Zellen allerdings eine weitaus schlechtere Anhaftung der Zellen als die ThinPrep®-Objektträger.

5.2.3 Morphologischer Ansatz der Trophoblastenidentifikation

Wie im Ergebnisteil beschrieben, konnten die Trophoblasten rein morphologisch nicht sicher identifiziert werden. Es besteht die Möglichkeit, dass die Zellen im Abstrich nicht vorhanden waren, oder schlicht nicht erkannt worden sind. Differentialdiagnostisch gibt es verschiedene Zellen, die mit Trophoblasten verwechselt werden können (s. Tabelle 2, S. 14). Kobayashi et al. konnten erstmals 1980 mit Immunzytofluoreszenz-Methoden zwischen Deziduazellen und Trophoblasten unterscheiden. Anzunehmen ist, dass für die verlässliche morphologische Identifizierung von Trophoblasten, die Erfahrung des Untersuchers eine maßgebliche Rolle spielt. Auch Kingdom et al., 1995, ist es nicht zweifelsfrei gelungen, die Trophoblasten mit einer konventionellen Färbung (Leishman-Färbung) rein morphologisch zu erkennen. Selbst die Morphologie der mit Antikörpern detektierten „positiven“ Zellen variiere stark [28].



5.2.4 Immunzytofluoreszenz

5.2.4.1 Blocken unspezifischer Bindungsstellen

Die Wahl der Reagenzien zur Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen war anfangs nicht eindeutig. In der Anleitung des WGA-Kits wurde von einer Verwendung von BSA (bovines Serumalbumin) eindeutig abgeraten, da es zu Störungen der WGA kommen könne [64]. Daher wurde auf die Verwendung von BSA verzichtet und alternative Blockinglösungen gesucht. Zunächst wurde 1%-Gelatine verwendet, welche jedoch die unspezifischen Bindungsstellen nicht ausreichend zu blocken schien. Später erfolgte die Blockierung mit 5%-Magermilch, mit der bessere Ergebnisse erzielt werden konnten. Geringe Mengen an BSA waren dennoch als Stabilisator in der Antikörperlösung des AlexaFluor-594-gekoppelten sekundären Antikörpers enthalten. Die damit gefärbten Zellen in den ersten Versuchsreihen wurden keiner WGA unterzogen, sodass keine Aussage über eine Störung der WGA dadurch getroffen werden kann. Eine Permeabilisierung der Zellmembran im Zuge der Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen mittels Tween 20 wurde anfangs durchgeführt, allerdings erschien sie, angesichts der Tatsache, dass es sich bei HLA-G um ein Oberflächenantigen handelt, nicht nötig.

5.2.4.2 Hintergrundfärbung

Die Immunzytofluoreszenz ist eine gängige Methode, um Zellen spezifisch zu identifizieren [52]. Sie erscheint als geeignetes Verfahren, um die schwer rein morphologisch identifizierbaren Trophoblasten aufgrund ihrer spezifischen Antigene anzufärben. Ein Problem bei dieser Arbeit war eine allgemeine starke Hintergrundfluoreszenz der Gesamtheit der Zellen. Da es sich bei dem Abstrichmaterial um ein Gemisch aus verschiedenen Zellen, Zelldebris, Schleim und Bakterien handelte, musste – trotz ThinPrep®-Filterungsverfahren – mit Strukturen auf dem Objektträger gerechnet werden, die den Fluoreszenzfarbstoff unspezifisch anlagerten und beim Waschvorgang schlecht gereinigt werden konnten. Diese Strukturen leuchteten dann in der Fluoreszenzmikroskopie, obwohl sie höchstwahrscheinlich kein HLA-G-Antigen besitzen, welches den Fluoreszenzfarbstoff eigentlich ausschließlich binden sollte. Dies erschwerte die Identifizierung von „echt positiven“ Zellen erheblich. Eventuell ist eine Unterscheidung gar nicht möglich, denn es könnte sich bei dem Hintergrund auch um HLA-G-exprimierende Trophoblasten handeln, die zum Zeitpunkt der Fluoreszenzmikroskopie nur noch als Zelldebris



vorhanden sind. Diese These ist allerdings sehr unwahrscheinlich, da die Gesamtheit des Zelldebris fluoreszierte und bei einer geringen Trophoblastendichte nur eine geringe punktuelle Fluoreszenz zu erwarten wäre. Solange im Zelldebris kernhaltige Teile enthalten wären, könnte man sie eventuell noch weiterverarbeiten und auf fetalen Ursprung untersuchen. Allerdings wurden in dieser Arbeit nur intakte Zellen als potenziell „positive“ Zellen gewertet. Es stellte sich auch die Frage, ob ein noch intensiveres Waschprotokoll die Anlagerung des Fluorophors an ungewünschte Strukturen weiter reduzieren kann. Mehrere Waschintensitäten wurden in dieser Arbeit getestet und es wurde keine subjektive Verbesserung des Differenzbildes festgestellt. Das in Kapitel 3.4.2.2 aufgeführte Waschprotokoll stellte sich im Hinblick auf Zeit und Nutzen als das Beste heraus. Weiteres Waschen könnte möglicherweise auch die fixierten Zielzellen abtragen. Ein weiterer Grund für ein Anfärben von Strukturen, die kein HLA-G-Antigen exprimieren, ist eine potenziell ungenügende Blockierung unspezifischer Bindungsstellen, aufgrund der Limitierung auf 1%-Gelatine bzw. 5%-Magermilch als Blockinglösungen.

Für die Interpretation der Immunzytofluoreszenz-Bilder ist die Abwesenheit einer Positivkontrolle in dieser Arbeit nicht zu vernachlässigen. Eine sinnvolle Weise, die Hintergrundfärbung von der Färbung „echt positiver“ Zellen zu unterscheiden, wäre eine Einstellung auf eine minimale Belichtungszeit, bei der die Positivkontrolle gerade noch leuchtet. Somit könnten Zellen, die weniger stark leuchten, als negativ gewertet werden. Bei dieser Arbeit lagen keine HLA-G-exprimierenden Zellen vor, die als Positivkontrolle hätten fungieren können. Zeitweise wurde mit Chorionzotten aus Abortmaterial gearbeitet, die als Positivkontrolle dienen sollten, allerdings im Verlauf als ungeeignet erschienen, da bei der Probenpräparation morphologisch zwar gut, aber nicht hundertprozentig sicher zwischen den fetalen und den mütterlichen Zellen der Chorionzotten unterschieden werden kann. Somit bestand nicht das sichere Vorliegen einer reinen Positivkontrolle.

Als eigentliche Schwierigkeit erwies sich das Erkennen der vermeintlich positiven Zellen. Auch hierfür ist vermutlich die Erfahrung des Untersuchers von enormer Wichtigkeit. Ein computergestütztes automatisiertes Scan-Verfahren könnte das Auffinden der gesuchten Zellen erleichtern und die Effizienz dieses Prozesses erhöhen [97, 98].

Nicht ausgeschlossen werden darf trotz oben Aufgeführtem, dass die gesuchten Trophoblasten zwar in den Proben enthalten, aber die Antikörper nicht spezifisch



waren. Allerdings widerspricht diese Vermutung den Erfahrungen von Imudia et al., 2009, die ebenfalls einen Anti-HLA-G-Antikörper der Firma Exbio (erster hier getesteter AK) für die Identifizierung der Trophoblasten verwendeten und dessen Spezifität beschreiben [32]. Als Fazit konnten demnach die Ergebnisse von Imudia et al., 2009, nicht reproduziert werden.

5.2.4.3 Diskussion der Immunfluoreszenz-Bilder

Die im Ergebnisteil aufgeführten Immunzytofluoreszenz-Bilder (Abbildung 10 und Abbildung 11) zeigen einen Ausschnitt eines ThinPrep®-Abstrichs in der Fluoreszenzmikroskopie. Darauf ist jeweils eine rot fluoreszierende Zelle inmitten von vielen nicht rot-gefärbten Zellen zu sehen. Die DAPI-Färbung zeigt an, wo sich kernhaltige Zellen befinden. Unter der Annahme, dass der Antikörper spezifisch HLA-G-exprimierende Zellen anfärbt, kann von einem positiven Ergebnis und damit einem Trophoblasten ausgegangen werden. Nimmt man die Negativkontrolle des Experiments dazu (s. Abbildung 12, S. 55), bei welcher nur der sekundäre Antikörper, nicht aber der primäre Antikörper verwendet wurde, stellt sich allenfalls eine deutlich schwächere Rot-Färbung des Zellbildes dar. Es ist darin keine hervorstechende als positiv zu wertende Zelle sichtbar. Die schwache Hintergrundfärbung einiger Zellen, kann dennoch nicht gänzlich geleugnet werden und wurde weiter oben im Text bereits intensiver diskutiert. Die beiden als positiv gewerteten Zellen konnten zu dem Zeitpunkt der Mikroskopie noch nicht disseziert und analysiert werden, so dass weder der Beweis der fetalen Herkunft, noch der Beweis des Gegenteils vorliegt.

Betrachtet man die Bilder, auf welchen beispielhaft der Zelldebris dargestellt wurde (Abbildung 13, S. 56, und Abbildung 14, S. 57), kann eine deutliche Rot-Färbung der Zellfragmente erkannt werden. Die einzelnen intakten Zellen in Abbildung 13 sind im Aqua-Filter zu sehen, nicht aber im Red-Filter. Dagegen fluoreszieren die Zellfragmente stark. Diese Fluoreszenz ist vermutlich auf eine weiter oben im Text bereits erwähnte Anhaftung des sekundären Antikörpers an die unebene Fläche des Zelldebris und schlechten Zugang beim Waschvorgang zurückzuführen. Diese Tatsache erschwerte erheblich die Identifizierung echt HLA-G-positiver Zellen.



5.2.5 Lasermikrodissektion

Die Lasermikrodissektion als Verfahren zur Einzelzell-Gewinnung kann nach Verwendung in dieser Arbeit für weitere Studien uneingeschränkt weiterempfohlen werden. Beide in dieser Arbeit verwendeten Objektträger (ThinPrep®- und PET-Membran-Objektträger) ließen eine Lasermikrodissektion zu. Da in dieser Arbeit ausschließlich Einzelzellen und keine Zellverbände disseziert wurden, fiel die Erhaltung der Morphologie des Zielobjekts, wie sie bei den Membran-beschichteten Objektträgern möglich ist, weniger stark ins Gewicht. Viel bedeutsamer erschien die Tatsache, dass die Anhaftung der Zellen auf den PET-Membran-Objektträgern deutlich schlechter war, als auf den ThinPrep®-Objektträgern. Betrachtet man die Zahl der erfolgreich amplifizierten Proben, spricht ebenfalls mehr für die ThinPrep®-Objektträger, mit 6 von 6 Proben (100%), im Vergleich zu 3 von 5 Proben (60%) bei den PET-Membran-Objektträgern.

Nach Behebung einiger Schwierigkeiten durch Abänderung des störanfälligen WGA-Protokolls, konnten auch beide Varianten der Zellasservierung (Katapultation in AdhesiveCaps und Katapultation in PBS-benetzte Caps) angewandt werden. Die Variante mit AdhesiveCaps stellte zwar durch den obligatorischen Lyseschritt auf dem Deckel stehend im Wasserbad eine unkonventionelle Methode dar, bestach aber durch die Anhaftung der Zelle im Cap, sodass nicht die Gefahr eines Zellverlustes bestand. Somit konnten 6 von 7 Proben aus AdhesiveCaps erfolgreich amplifiziert werden (85,7%). Aber auch die Katapultation in PBS-benetzte Caps brachte amplifizierbare Zellen in 3 von 4 Fällen (75%) hervor und kann als geeignet angesehen werden. Hier bestand die Gefahr, dass die Zelle bei der Zentrifugation aus dem Deckel in das Gefäß an der Gefäßwand hängen bleibt und weiteren Analysen nicht mehr zur Verfügung steht. Außerdem wurde hier eine Volumenreduktion notwendig (s. Kapitel 3.6.2), die zu leicht schwankenden Endvolumina führen konnte. Allerdings war nach erfolgreichem Transfer des Zelllysats vom Deckel in das Gefäß das WGA-Protokoll standardmäßig durchführbar.

Die oben aufgeführten Zahlen haben sicherlich eine eingeschränkte Aussagekraft und müssten in weiteren Studien mit weitaus größerer Probenanzahl überprüft werden. Dennoch zeigen sie die für diese Arbeit zum Ziel gesetzte Durchführbarkeit der Methoden auf.



5.2.6 Gesamtgenomamplifikation

Die Gesamtgenomamplifikation wurde mit 11 Proben durchgeführt. Davon konnten 9 Proben erfolgreich amplifiziert werden, 2 Proben ließen sich nicht amplifizieren. Die zwei Proben, die nicht erfolgreich amplifiziert werden konnten (WGA 2 und 6), besitzen jeweils eine Variablenkombination, wie die von zwei anderen erfolgreich amplifizierten Proben (WGA 1 bzw. WGA 5). Somit spricht das Misslingen der WGA nicht für eine bestimmte Variablenkombination, sondern muss anders begründet werden. Genauer gesagt wurde Probe 2b.1.3.2.0 genauso wie Probe 1.1.1.1.1 gefärbt, von PET-Membran-Objektträgern disseziert und in AdhesiveCaps katapultiert. Probe 1.1.1.1.1 konnte allerdings im Unterschied erfolgreich amplifiziert werden. Ebenso wurde Probe 19.2.10.6.0 genauso wie Probe 19.1.9.5.4 nicht gefärbt, von PET-Membran-Objektträgern disseziert und in PBS-benetzte Caps katapultiert. Auch in diesem Fall konnte eine Probe (19.1.9.5.4) erfolgreich amplifiziert werden. Insgesamt sind auch hier größere Fallzahlen in einer Folgestudie nötig, um einen klaren Vorteil der Objektträger- und Zellasservierungs-Varianten für die nachfolgende WGA herauszuarbeiten. Nichtsdestotrotz konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die WGA prinzipiell mit per Immunzytofluoreszenz behandelten Zellen erfolgreich durchgeführt und somit eine der Fragestellungen positiv beantwortet werden kann.

5.2.7 Interpretation der Array-CGH-Ergebnisse

Insgesamt wurde mit 6 Proben eine Array-CGH-Analyse durchgeführt. Von diesen 6 Proben, waren 4 Array-CGH-Profile uneingeschränkt und 2 Array-CGH-Profile mit Einschränkungen auswertbar. Die Auswertbarkeit hängt von verschiedenen Faktoren ab. Dazu gehören die Werte der Qualitätsparameter zur Orientierung, das Rauschen und die Erfahrung des auswertenden Experten. Kann eine Auffälligkeit im Array-CGH-Profil weder für euploid erklärt, noch einer Aneuploidie zugeordnet werden, muss im Zweifelsfall das Experiment als gescheitert angesehen und gegebenenfalls wiederholt werden. Zugrunde liegen kann einem Rauschen (noise) eine unzureichende DNA-Amplifikation, Experiment-abhängige Probleme oder eine degenerierte Qualität der DNA. Eine nicht ausreichende Qualität der WGA kann meist in der Agarose-Gelelektrophorese erkannt werden. Kam es allerdings zu einer Amplifikation von nicht-humaner DNA, kann dies unter Umständen erst im Array-CGH-Profil u. a. durch starkes Rauschen erkannt werden. Protokollabweichungen können ebenfalls die Qualität der Array-CGH-Profile beeinflussen, letztere bleiben allerdings meist trotzdem



auswertbar. Eine schlechte DNA-Qualität kann durch eine inkomplette Zelllyse, Apoptosevorgänge der Zelle oder PCR-inhibierende Substanzen hervorgerufen werden. Sie kommt häufiger bei Einzelzell-Analysen vor und kann zu Rauschen führen, das für vermeintliche Chromosomenveränderungen gehalten werden kann [80].

Bei Probe 1.1.1.1.1 handelte es sich um die Zelle einer Schwangerschaft (SSW 22) mit männlichem Fetus. Die Array-CGH lieferte einen unauffälligen weiblichen Karyotyp. Es bestand bei schlechter Zellqualität und viel Zelldebris auf dem Objektträger eine nur geringe Gesamtzellzahl. Daher war die gelaserte Zelle eher eine mäßig stark leuchtende Zelle, die verglichen zu den wenigen anderen integren Zellen etwas stärker leuchtete (Thema Hintergrundfärbung). Allerdings muss diese Leuchtintensität in Frage gestellt werden. Höchstwahrscheinlich handelt es sich bei dieser Zelle um eine mütterliche Zelle.

Probe 16.1.2.3.2 war eine Zelle einer fortgeschrittenen Schwangerschaft (SSW 39+2) mit weiblichem Fetus. Das Geschlecht war bei den Experimenten bereits bekannt. Die Schwangerschaftswoche liegt auch über dem Zeitraum, in dem die transzervikalen Trophoblasten zu erwarten sind. Der Grund für die Durchführung der WGA und der Array-CGH war in diesem Fall vielmehr der Test, ob sich Zellen auf ThinPrep®-Objektträgern nach der Lasermikrodissektion für die WGA und die Array-CGH nutzen lassen. Außerdem konnte hierbei auch gezeigt werden, dass die Variante B der Cap-Auswahl (PBS-benetztes Cap) sich ebenso für die WGA und die Array-CGH eignet. Ob es sich trotz der oben angegebenen hohen Schwangerschaftswoche dennoch um eine fetale Zelle handelt, bleibt ungewiss. Ein Abgleich der DNA mit einer sicher mütterlichen bzw. sicher kindlichen Zelle wurde nicht durchgeführt und eine Differenzierung zwischen mütterlichem und kindlichem Genom ist hier bei Fehlen von Aneuploidien ad hoc nicht möglich. Die Tatsache, dass es sich um eine Schwangerschaft über der 20. Woche handelt (und die Plazenta daher vermutlich weniger durchlässig ist), spricht stark für das Vorliegen einer mütterlichen Zelle. Auf eine aufwendige Untersuchung zur Unterscheidung zwischen kindlicher und mütterlicher DNA wurde hier auch deshalb verzichtet. Vielmehr konnten wertvolle Erkenntnisse über die praktische Durchführbarkeit der experimentellen Teilschritte im Hinblick auf die Objektträger- und die Cap-Wahl gewonnen werden.

Probe 14.1.7.4.3 stammte von einer Schwangeren mit weiblichem Fetus (SSW 9+0). Das Geschlecht des Feten war allerdings zum Zeitpunkt der Array-CGH-Analyse noch unbekannt. Die Analyse ergab einen unauffälligen weiblichen Karyotyp. Das Array-



CGH-Profil ist geprägt durch das Vorhandensein von Rauschen. Wie bei vorhergehender Probe wurde auch hier auf eine aufwendige Untersuchung zur Unterscheidung zwischen mütterlicher und fetaler DNA verzichtet.

Probe 19.1.9.5.4 stammte von einer nicht-schwangeren Patientin und wurde keiner Färbung unterzogen. Das Ergebnis der Array-CGH-Analyse war - wie zu erwarten - ein gesunder weiblicher Chromosomensatz mit leichtem Rauschen im Arrayprofil. Die Probe diente im Wesentlichen der Beurteilung über die Durchführbarkeit der Teilerfahrungen WGA und Array-CGH mit einer ungefärbten Probe. Im Falle einer Störung der WGA oder der Array-CGH durch die Fluoreszenzfärbung hätte diese Probe als Positivkontrolle gedient. Des Weiteren ließen sich damit auch die Variablen Objektträgerwahl (in diesem Fall PET-Membran-OT) und Cap-Wahl (in diesem Fall PBS-benetztes Cap) als geeignet einstufen.

Die Proben 11.1.11.7.5 und 11.4.14.10.6 stammten von einer Patientin in SSW 6+3 mit männlichem Fetus. Die Array-CGH-Profile waren bei Rauschen nur mit Einschränkungen auswertbar. Die Kriterien für eine Kopienzahlveränderung waren unter Zuhilfenahme der X-separation nicht erfüllt. Daher waren beide Profile a. e. mit einem unauffälligen weiblichen Karyotyp vereinbar. Vermutlich wurden hier Zellen ausgewählt, die bei leichter Fluoreszenz in der Mikroskopie als positiv gewertet werden konnten, allerdings bei oben genannten Schwierigkeiten mit der Immunzytofluoreszenz mütterlicher Herkunft waren. Das rauschende Profil kann auf die Qualität der Zellen oder des Experiments zurückzuführen sein.

Wichtig bei der Hinzunahme der Qualitätsparameter der Array-CGH-Experimente für die Interpretation der Ergebnisse ist, dass die Kategorisierung der Werte anhand der Referenz-Qualitätsparameter keine endgültigen und absoluten Ausschluss-Referenzwerte hervorbringt, da viele Faktoren die Werte beeinflussen können. Die Firma Illumina legt sich bei der Auswertbarkeit der Array-CGH-Profile unter Zuhilfenahme der Qualitätsparameter nicht fest [79]. Beispielsweise ist Array 2 trotz eines hohen SBR-Wert bei einem musterhaften Array-CGH-Profil dennoch gut auswertbar. Im Gegensatz dazu sind bei Array 3 die Qualitätsparameter allesamt im gewünschten Bereich, das Array-CGH-Profil zeigt jedoch ein deutliches Rauschen und führt daher zu einer schwierigeren Auswertung. Zu den beeinflussenden Faktoren zählen u. a. die Art und Menge des Ausgangsmaterials, die Menge des Amplifikats sowie die Dauer des Labelling und der Hybridisierung. Da das in dieser Arbeit verwendete Array-CGH-Experiment zum Zweck der Aneuploidie-Diagnostik diente,



waren hoch-auflösende Ergebnisse (z. B. für die Diagnostik von Gendefekten) nicht möglich. Häufig können die Ergebnisse sogar aus mangelhaften Experimenten interpretiert werden. Zu den Faktoren, die ein Rauschen verursachen können, gehören eine geringe Zellanzahl (gerade Einzelzellen), eine kürzere Labelling-Dauer, eine kürzere Hybridisierungsdauer und falsche Waschttemperaturen (zu niedrig bzw. zu hoch) [79].

5.2.8 Kompatibilität der Immunzytofluoreszenz mit WGA und Array-CGH

Bei der Literaturrecherche zum Zeitpunkt der Doktorarbeit (August 2016) konnte keine Veröffentlichung gefunden werden, bei der die DNA-Analyse transzervikal gewonnener Trophoblasten mittels Array-CGH durchgeführt wurde. Ein Ziel dieser Arbeit war es, transzervikal identifizierte Trophoblasten einer WGA und einer Array-CGH-Analyse zu unterziehen, um deren Kompatibilität mit den getesteten Methoden zur Probengewinnung und Zellidentifikation zu überprüfen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die vorhergehende Immunfluoreszenzmarkierung weder die WGA noch die Array-CGH stört und somit mit diesen beiden Methoden kompatibel ist. Die Amplifizierung der Proben-DNA war in 8 von 9 Fällen (88,9%) nach Immunzytofluoreszenz und in 1 von 2 Fällen (50%) ohne Immunzytofluoreszenz erfolgreich. Die Array-CGH konnte in jedem der 6 Fälle (100%) erfolgreich durchgeführt werden. Somit stellt die Kombination aus Lasermikrodissektion, WGA und Array-CGH eine erfolgversprechende Methodik dar, mit der Einzelzellen analysiert werden können. Auch die Wahl des Cap, also des Auffangbehälters für die dissezierten Zellen, und die teilweise damit einhergehende Modifikation des WGA-Protokolls, beeinflusste die WGA nicht. In dieser Arbeit gelang jedoch die sichere Identifizierung der transzervikalen Trophoblasten bisher nicht. Da einige Arbeitsgruppen [19, 32-34] die Identifizierung von Trophoblasten mit der in dieser Arbeit vorgeschlagenen Methodik (Bürstenabstrich, Anti-HLA-G-Antikörper) erfolgreich durchführen konnten, liegt die Annahme nahe, dass diese Identifizierung nach Optimierung einiger methodischer Probleme reproduzierbar sein sollte. Unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit gezeigten Kompatibilität der Immunzytofluoreszenz mit der WGA und der Array-CGH erscheint es plausibel, dass eine DNA-Analyse von transzervikalen Trophoblasten mittels Array-CGH möglich ist.

Während der Niederschrift dieser Arbeit konnte eine neue Publikation aus dem Jahr 2016 gefunden werden, die Trophoblasten aus mütterlichem Blut einer Array-CGH-



Analyse unterzieht [99]. Ebenfalls wurde eine Studie im Jahr 2016 veröffentlicht, in der transzervikale Trophoblasten mit Hilfe einer anderen DNA-Analyse-Methode (s. Kapitel 5.3) untersucht wurden [100]. Die hier vorliegende Dissertation ist dabei – nach unserem Wissensstand – jedoch die erste Arbeit, in der versucht wurde, transzervikal gewonnene Trophoblasten mittels WGA und Array-CGH auf Aneuploidien zu untersuchen.

5.3 Fazit und Ausblick

Die Aufgabe dieser Studie war es, eine Methode zur Identifikation von transzervikalen Trophoblasten zu finden, die sich zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Frühschwangerschaft reproduzierbar anwenden und die Zellen einer Gesamtgenomamplifikation zuführen lässt.

Die morphologische Betrachtung von Trophoblasten aus dem Bürstenabstrich erscheint für die sichere Routine-Identifizierung der Zellen ungeeignet, da sie stark Untersucher-abhängig ist und Trophoblasten leicht mit anderen Zellen verwechselt werden können. Die immunzytochemische Färbung der Zellen aus dem Bürstenabstrich erscheint durch Spezifität des Antikörpers für Trophoblastenantigene für deren Identifizierung – auch durch Unabhängigkeit vom Untersucher – weitaus geeigneter. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der fetale Ursprung und damit die sichere Identifizierung der Trophoblasten durch Immunzytofluoreszenz, am ehesten aufgrund nicht vorhandener Trophoblasten im Abstrichmaterial, noch nicht nachgewiesen werden. Vermutlich muss die Zellentnahmetechnik und Eindringtiefe verbessert werden, um die Wahrscheinlichkeit der Präsenz von fetalen Zellen im Abstrichmaterial zu erhöhen. Somit ließen sich im Rahmen dieser Arbeit Trophoblasten noch nicht reproduzierbar identifizieren. Da aktuelle Studien eine zielführende Zellentnahme mittels ThinPrep®-Bürstenabstrich und eine erfolgreiche Identifizierung von transzervikalen Trophoblasten mittels Immunzytofluoreszenz beschreiben, ist diese auch in dieser Arbeit getestete Methode dennoch prinzipiell als erfolgversprechend einzustufen.

Zudem galt es herauszufinden, ob sich die DNA der mittels verschiedener Nachweismethoden behandelten Zellen amplifizieren lässt.



Die DNA der Zellen, die der oben genannten Färbeprozedur unterzogen wurden, ließ sich in 8 von 9 Fällen (88,9%) amplifizieren. Somit erwies sich die in dieser Arbeit angewendete Immunfluoreszenz-Färbung im Hinblick auf die Gesamtgenomamplifikation (WGA) insofern als geeignet, als dass letztere durch die Immunfluoreszenz-Färbung nicht gestört bzw. verhindert wurde. Auch für weitere Variablen (s. Tabelle 27, S. 63, und Tabelle 28, S. 64) konnte nachgewiesen werden, dass diese eine nachfolgende WGA zulassen.

Des Weiteren war die Frage, ob sich die amplifizierte DNA der gefärbten Zellen zum Einsatz für die Array-CGH-Analyse verwenden lässt und zuverlässige Ergebnisse erzielt werden können.

Die amplifizierte DNA der zuvor gefärbten Zellen, ließ sich in 6 von 6 Fällen (100%) für die Analyse mittels Array-CGH verwenden. Die Immunzytofluoreszenz erwies sich somit auch hinsichtlich der Array-CGH als grundsätzlich geeignetes Färbeverfahren. Die Zuverlässigkeit der Ergebnisse durch die Array-CGH ließ sich im Hinblick auf die fehlende fetale Zellidentifikation nicht testen. Durch die geringe Probenzahl konnte noch keine quantitative Aussage über die Zuverlässigkeit dieser Methodenkombination getroffen werden.

Es stellte sich ferner die Frage, ob sich das Verfahren in den Routineablauf für Hochrisikoschwangere, im Hinblick auf Zeitpunkt der Entnahme, Nebeneffekte und Menge der Zellen integrieren lässt.

Nach der Ausräumung der noch bestehenden methodischen Hürden ist die Integration dieses Verfahrens in den diagnostischen Routineablauf für Hochrisikoschwangere gut vorstellbar. Für die Bestimmung eines idealen Zeitraums für die Zellentnahme sind dann weitere Studien auf der Grundlage einer breiteren Datenbasis notwendig.

Die in dieser Arbeit beschriebene Kompatibilität per Immunfluoreszenz angefärbter Zellen mit den Methoden der Gesamtgenomamplifikation und der Array-CGH lässt die Möglichkeit einer nicht-invasiven, umfassenden und frühen Pränataldiagnostik plausibel erscheinen. Die Daten für die Verlässlichkeit der Zellentnahme und der Immunzytofluoreszenz liefern aktuelle Studien. Die Kompatibilität der Immunfluoreszenz mit der Gesamtgenomamplifikation und der Array-CGH konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Es sind nun weitere Studien notwendig, um die veröffentlichten Daten zur Identifikation von transzervikalen Trophoblasten mit den



zuvor erwähnten Verbesserungsvorschlägen zu verifizieren und den fetalen Ursprung der Zellen durch Nachweis des Y-Chromosoms in der Array-CGH-Analyse zu beweisen. Dafür ist es meiner Meinung nach von essentieller Bedeutung, an der Zellentnahmetechnik – insbesondere der Eindringtiefe des Bürstenabstrichs – zu arbeiten.

Tabelle 32 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit vorgeschlagene Methode (Aneuploidienachweis an transzervikalen Trophoblasten mittels Array-CGH-Analyse) und die bereits vorhandenen Methoden im Vergleich.

	Invasive PND (Chorionzottenbiopsie, Amniozentese, Cordozentese)	Zellfreie fetale DNA (z. B. PraenaTest®)	Aneuploidienachweis an transzervikalen Trophoblasten (TZT) mittels Array-CGH
Invasivität	invasiv	nicht-invasiv	nicht-invasiv
Zeitpunkt der Diagnostik	ab SSW 12	ab SSW 9	ab SSW 5
Beschränkung auf bestimmte Chromosomen	unbeschränkt	beschränkt auf Chromosomen 13, 18, 21, (X,Y)	unbeschränkt
Dauer bis Ergebnis	3-7 Tage (Direktpräparation, CVS); bis zu 3 Wochen (Kultur)	8-10 Tage (Express: 4-6 Tage)	3-4 Tage

Tabelle 32 Vergleich des in dieser Arbeit vorgeschlagenen nicht-invasiven Aneuploidienachweises mit den bereits etablierten invasiven Verfahren

Die Tabelle zeigt die bereits etablierten pränataldiagnostischen Methoden, wie die Chorionzottenbiopsie und die Amniozentese (invasive PND) sowie die Untersuchung der zellfreien fetalen DNA aus mütterlichem Blut (PraenaTest®) im Vergleich zu der in dieser Arbeit vorgeschlagenen Array-CGH-Analyse von transzervikal gewonnenen Trophoblasten. Letztere besticht durch nicht-invasive Zellgewinnung, sehr frühe Verfügbarkeit ab SSW 5, umfassende DNA-Analyse ohne Beschränkung auf bestimmte Chromosomen und frühe Ergebnisse (bereits nach 3-4 Tagen) [10, 12]. Dies wird farblich dargestellt (ungünstig, neutral, sehr gut). PND: Pränataldiagnostik; TZT: transzervikale Trophoblasten; CVS: Chorionzottenbiopsie.

Der nachfolgend abgebildete Zeitstrahl zeigt die bisher etablierten bzw. potenziell verfügbaren pränataldiagnostischen Methoden chronologisch angeordnet.



Abbildung 26 Übersicht über die chronologisch (potenziell) zur Verfügung stehenden pränataldiagnostischen Methoden

Zeitstrahl zur schematischen Darstellung der Schwangerschaftsdauer; angegeben in Wochen. Angezeigt wird jeweils der frühestmögliche Zeitpunkt der Verfügbarkeit.



Eine neue Veröffentlichung von Jain et al., 2016, bestätigt die in dieser Studie postulierte Möglichkeit der Verwendung von transzervikal gewonnenen Trophoblasten für eine frühe und umfassende Aneuploidiediagnostik. Im Gegensatz zu der hier getesteten Array-CGH-Analyse wurde dort das Next-Generation-Sequencing (NGS) verwendet, auf das hier nicht näher eingegangen werden soll. Für die Identifizierung der Trophoblasten diente eine bereits zuvor in dieser Arbeit erwähnte Aufreinigung mit magnetischen Nanopartikeln und Immunzytochemie [100]. Die Nutzung von Trophoblasten (allerdings aus mütterlichem Blut) für eine umfassende Aneuploidie-Diagnostik mittels Array-CGH-Analyse oder NGS wird neuerdings auch von einigen anderen Arbeitsgruppen für möglich gehalten [99, 101].



6 Zusammenfassung

Das stetig steigende Alter bei schwangeren Frauen in den Industrieländern und ein damit verbundenes erhöhtes Risiko für Aneuploidien beim Fetus führen zu einer steigenden Inanspruchnahme von Pränataldiagnostik. Die konventionellen Methoden wie die Chorionzottenbiopsie und Amniozentese bergen das Risiko für eine Fehlgeburt von bis zu 3,5%. Die seit einigen Jahren zur Verfügung stehende nicht-invasive Analyse fetaler DNA aus mütterlichem Blut hat durch Limitierung auf wenige Chromosomen bisher eine begrenzte Aussagekraft.

Daher muss nach geeigneten Methoden gesucht werden, die genauso aussagekräftig wie die invasiven Verfahren, dabei aber risikoärmer sind. Hierzu wurden bereits Studien durchgeführt, in welchen gezeigt werden konnte, dass plazentare Trophoblasten im ersten Trimenon in die Zervix uteri abgeschilfert werden. Diese konnten dann für anschließende Untersuchungen gewonnen werden.

Im Rahmen der Präimplantationsdiagnostik werden Einzelzellen mit Hilfe einer Array-basierten vergleichenden Genomhybridisierung (Array-CGH) auf Aneuploidien untersucht. Dafür muss in einem Vorschritt die geringe DNA-Menge der Einzelzelle durch eine Gesamtgenomamplifikation (WGA) vervielfacht werden.

Ziel dieser Arbeit war es, geeignete Methoden für die nicht-invasive pränatale Diagnostik über die gesamte Prozesskette hinweg zu finden und hinsichtlich Kompatibilität zu überprüfen. Dies implizierte die transzervikale Gewinnung der Trophoblasten, deren Identifizierung und Isolierung sowie anschließende WGA und Array-CGH-Analyse.

Von 16 Schwangeren zwischen Schwangerschaftswoche 5+1 und 39+2 wurden Zellen mittels zytologischem (ThinPrep®-) Abstrich vom portio-zervikalen Übergang entnommen und morphologisch bzw. mittels Immunzytofluoreszenz auf das Vorhandensein von Trophoblasten untersucht. Für relevant gehaltene Zellen wurden per Lasermikrodissektion isoliert und ihre DNA mittels WGA vervielfältigt. Diese wurde im Falle eines männlichen Fetus durch eine Array-CGH-Analyse primär auf das Vorhandensein eines Y-Chromosoms zum Nachweis des fetalen Ursprungs und sekundär auf Aneuploidien untersucht. Es wurden ein Immunzytofluoreszenz-Protokoll



etabliert und dessen Kompatibilität mit der WGA und der Array-CGH-Analyse sowie kleinere methodische Ergebnisse gezeigt.

Die fetale Herkunft der untersuchten Zellen konnte durch Nachweis des Y-Chromosoms in keinem der drei bei männlichen Feten getesteten Fälle bewiesen werden, da es sich mutmaßlich nicht um fetale Zellen bei den gewonnenen Zellen handelte. Anzunehmen sind falsch positive Ergebnisse der Immunzytofluoreszenz durch unspezifische Anfärbung sowie eine unzureichende Eindringtiefe bei der Zellentnahme, sodass die gesuchten Trophoblasten vermutlich nicht im Abstrichmaterial enthalten waren. Bei Einsicht aktueller Studienergebnisse ist die in dieser Arbeit vorgeschlagene Zellentnahme- und Identifikationstechnik dennoch als geeignet zu erachten.

Die in dieser Arbeit gezeigte Kompatibilität der Immunfluoreszenz-Färbung mit einer Gesamtgenomamplifikation zur Vervielfältigung von Einzelzell-DNA und die anschließende DNA-Analyse mittels Array-CGH erlaubt eine durchgehende Methodenverkettung und lässt eine nicht-invasive, frühzeitige und umfassende Pränataldiagnostik möglich erscheinen.



7 Literaturverzeichnis

1. Pschyrembel Online. *Aneuploidie*. [cited 9 Dec 2016]; Available from: <https://www.pschyrembel.de/Aneuploidie/K02C8>.
2. Pschyrembel Online. *Chromosomenaberration*. [cited 17 May 2017]; Available from: <https://www.pschyrembel.de/Chromosomenaberration/K04WS/doc/>.
3. Spektrum der Wissenschaft. *Aneuploidie*. Kompaktlexikon der Biologie 2001 [cited 1 Jun 2015]; Available from: <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/aneuploidie/640>.
4. Morris, J.K., D.E. Mutton, and E. Alberman, *Revised estimates of the maternal age specific live birth prevalence of Down's syndrome*. J Med Screen, 2002. 9(1): p. 2-6.
5. Morris, J.K., et al., *Comparison of models of maternal age-specific risk for Down syndrome live births*. Prenat Diagn, 2003. 23(3): p. 252-8.
6. Egan, J.F., et al., *Demographic differences in Down syndrome livebirths in the US from 1989 to 2006*. Prenat Diagn, 2011. 31(4): p. 389-94.
7. Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung and A. Heßling. *Methoden der Pränataldiagnostik*. [cited 1 Jun 2016]; Available from: <http://www.pnd-online.de/index.php?docid=87>.
8. Institut für Humangenetik am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München. *Amniozentese*. [cited 9 Dec 2016]; Available from: <http://www.mri.tum.de/kliniken/amniozentese>.
9. Benn, P., H. Cuckle, and E. Pergament, *Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2013. 42(1): p. 15-33.
10. Institut für Humangenetik am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München. *Chorionzottenbiopsie*. [cited 3 Aug 2016]; Available from: <http://www.mri.tum.de/node/195>.
11. Benn, P., et al., *Position statement from the Aneuploidy Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis*. Prenat Diagn, 2013. 33(7): p. 622-9.
12. *PraenaTest® Methode & klinische Anwendung, Information für Fachkreise*. 2014, LifeCodexx AG.
13. Lo, Y.M., et al., *Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum*. Lancet, 1997. 350(9076): p. 485-7.
14. Shettles, L.B., *Use of the Y chromosome in prenatal sex determination*. Nature, 1971. 230(5288): p. 52-3.



15. Bulmer, J.N., C. Rodeck, and M. Adinolfi, *Immunohistochemical characterization of cells retrieved by transcervical sampling in early pregnancy*. Prenat Diagn, 1995. 15(12): p. 1143-53.
16. Bischoff, F.Z. and J.L. Simpson, *Endocervical fetal trophoblast for prenatal genetic diagnosis*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2006. 18(2): p. 216-20.
17. Katz-Jaffe, M.G., D. Mantzaris, and D.S. Cram, *DNA identification of fetal cells isolated from cervical mucus: potential for early non-invasive prenatal diagnosis*. Bjog, 2005. 112(5): p. 595-600.
18. Mantzaris, D., et al., *Preliminary report: Correct diagnosis of sex in fetal cells isolated from cervical mucus during early pregnancy*. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2005. 45(6): p. 529-32.
19. Bolnick, J.M., et al., *Trophoblast retrieval and isolation from the cervix (TRIC) for noninvasive prenatal screening at 5 to 20 weeks of gestation*. Fertil Steril, 2014. 102(1): p. 135-142.e6.
20. Drews, U., *Color Atlas of Embryology*. 1995, New York: Thieme Medical Publishers.
21. Li, L. and D.J. Schust, *Isolation, purification and in vitro differentiation of cytotrophoblast cells from human term placenta*. Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E, 2015. 13: p. 71.
22. Carlson, B.M., MD, PhD, *Formation of Germ Layers and Early Derivatives, in Human Embryology and Developmental Biology*. 2014, Elsevier.
23. Parolini O, S.M., *Human Placenta: a Source of Progenitor/Stem Cells?* Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology, 2006. 3((2)): p. 117-126.
24. Adinolfi, M., et al., *Molecular evidence of fetal-derived chromosome 21 markers (STRs) in transcervical samples*. Prenat Diagn, 1995. 15(1): p. 35-9.
25. Rhine, S.A., et al., *Prenatal sex detection with endocervical smears: successful results utilizing Y-bodyfluorescence*. Am J Obstet Gynecol, 1975. 122(2): p. 155-60.
26. Adinolfi, M. and J. Sherlock, *First trimester prenatal diagnosis using transcervical cells: an evaluation*. Hum Reprod Update, 1997. 3(4): p. 383-92.
27. Mantzaris, D. and D.S. Cram, *Potential of syncytiotrophoblasts isolated from the cervical mucus for early non-invasive prenatal diagnosis: Evidence of a vanishing twin*. Clin Chim Acta, 2014. 438c: p. 309-315.
28. Kingdom, J., et al., *Detection of trophoblast cells in transcervical samples collected by lavage or cytobrush*. Obstet Gynecol, 1995. 86(2): p. 283-8.
29. Cioni, R., et al., *Comparison of two techniques for transcervical cell sampling performed in the same study population*. Prenat Diagn, 2005. 25(3): p. 198-202.
30. Miller, D., et al., *Transcervical recovery of fetal cells from the lower uterine pole: reliability of recovery and histological/immunocytochemical analysis of recovered cell populations*. Hum Reprod, 1999. 14(2): p. 521-31.



31. Ergln, T., et al., *Non-invasive early prenatal diagnosis using fluorescent in situ hybridization on transcervical cells: comparison of two different methods for retrieval*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2001. 95(1): p. 37-41.
32. Imudia, A.N., et al., *Retrieval of trophoblast cells from the cervical canal for prediction of abnormal pregnancy: a pilot study*. Hum Reprod, 2009. 24(9): p. 2086-92.
33. Fritz, R., et al., *Trophoblast Retrieval and Isolation from the Cervix (TRIC) is unaffected by early gestational age or maternal obesity*. Prenat Diagn, 2015.
34. Bolnick, A.D., et al., *Trophoblast Retrieval and Isolation From the Cervix for Noninvasive, First Trimester, Fetal Gender Determination in a Carrier of Congenital Adrenal Hyperplasia*. Reprod Sci, 2016. 23(6): p. 717-22.
35. Kobayashi, T.K. and H. Okamoto, *Cytopathology of pregnancy-induced cell patterns in cervicovaginal smears*. Am J Clin Pathol, 2000. 114 Suppl: p. S6-20.
36. Michael, C.E., FM, *Pregnancy-related changes: a retrospective review of 278 cervical smears*. Diagn Cytopathol, 1997. 17: p. 99-107.
37. Kovats, S., et al., *A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts*. Science, 1990. 248(4952): p. 220-3.
38. Verloes, A., et al., *HLA-G expression in human embryonic stem cells and preimplantation embryos*. J Immunol, 2011. 186(4): p. 2663-71.
39. Gregori, S., et al., *HLA-G Orchestrates the Early Interaction of Human Trophoblasts with the Maternal Niche*. Front Immunol, 2015. 6: p. 128.
40. Le Bouteiller, P., et al., *Placental expression of HLA class I genes*. Am J Reprod Immunol, 1996. 35(3): p. 216-25.
41. Le Bouteiller, P. and A. Blaschitz, *The functionality of HLA-G is emerging*. Immunol Rev, 1999. 167: p. 233-44.
42. Carosella, E.D., et al., *HLA-G: from biology to clinical benefits*. Trends in Immunology, 2008. 29(3): p. 125-132.
43. Curigliano, G., et al., *Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G)*. Clin Cancer Res, 2013. 19(20): p. 5564-71.
44. Hu, D.G., G. Webb, and N. Hussey, *Aneuploidy detection in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridization*. Mol Hum Reprod, 2004. 10(4): p. 283-9.
45. Simpson, J.L., *Preimplantation genetic diagnosis at 20 years*. Prenat Diagn, 2010. 30(7): p. 682-95.
46. Storkel, S., et al., *[Comparative genomic hybridization in pathology. A new molecular cytogenetic method]*. Pathologe, 1996. 17(3): p. 189-94.



47. Medizinischer Dienst des Spitzenverbandes Bund der Krankenkassen e.V. and P. Pick. *IGeL-Monitor, Individuelle Gesundheitsleistungen auf dem Prüfstand*. 22.03.2013 [cited 25 Oct 2014]; Available from: http://www.igel-monitor.de/IGeL_A_Z.php?action=view&id=51.
48. HOLOGIC INC. *ThinPrep Pap test, Brush/Spatula Protocol*. [cited 5 Dec 2016]; Available from: http://www.thinprep.com/hcp/specimen_collection/brush_spatula.html.
49. HOLOGIC INC. *ThinPrep Pap test*. [cited 5 Dec 2016]; Available from: <http://www.hologic.com/products/clinical-diagnostics-and-blood-screening/assays-and-tests/thinprep-pap-test>.
50. HOLOGIC INC., *ThinPrep® 2000 System Operator's Manual*. 2014. p. 2.
51. Papanicolaou, G.N., *A survey of the actualities and potentialities of exfoliative cytology in cancer diagnosis*. *Ann Intern Med*, 1949. 31(4): p. 661-74.
52. Kumar, G.L. and L. Rudbeck, *Immunohistochemical Staining Methods, in Pathology*, Dako, Editor. 2009: Carpinteria, California. p. 61.
53. Schaeue, D., J.A. Ratikan, and K.S. Iwamoto, *Cellular Autofluorescence following Ionizing Radiation*. *PLoS ONE*, 2012. 7(2): p. e32062.
54. Scordato, A. and S. Schwartz. *Violet Excitation Filter Sets*. [cited 20 Jul 2017]; Available from: <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/nikon-fluorescence-filter-sets/violet-excitation-filter-sets>.
55. Burgemeister, R., *An alternative method in (live) cell sampling*, in *Laser Microdissection from Carl Zeiss*. 2008.
56. Schutze, K., et al., *Noncontact laser microdissection and catapulting for pure sample capture*. *Methods Cell Biol*, 2007. 82: p. 649-73.
57. Burgemeister, R., *New aspects of laser microdissection in research and routine*. *J Histochem Cytochem*, 2005. 53(3): p. 409-12.
58. Niyaz, Y., et al., *Noncontact laser microdissection and pressure catapulting: sample preparation for genomic, transcriptomic, and proteomic analysis*. *Methods Mol Med*, 2005. 114: p. 1-24.
59. Carl Zeiss MicroImaging GmbH, *PALM MicroBeam - Brücken schlagen, Vom Mikrodisektionssystem zur Forschungsplattform – der neue Standard moderner Life Science-Forschung*. 2010.
60. Qiagen. *Overview on Whole Genome Amplification*. [cited 29 Jul 2016]; Available from: <https://www.qiagen.com/us/resources/technologies/wga/overview-on-wga/>.
61. Zhang, X., et al., *Single-Cell Sequencing for Precise Cancer Research: Progress and Prospects*. *Cancer Res*, 2016. 76(6): p. 1305-12.
62. Van Loo, P. and T. Voet, *Single cell analysis of cancer genomes*. *Curr Opin Genet Dev*, 2014. 24: p. 82-91.



63. de Bourcy, C., et al., *A Quantitative Comparison of Single-Cell Whole Genome Amplification Methods*. PLoS ONE, 2014. 9(8).
64. Rubicon Genomics Inc. *PicoPLEX® WGA Kit, Whole Genome Amplification from Single Cells*. [cited 30 Jun 2014]; Available from: <http://rubicongenomics.com/products/picoplex/>.
65. New England Biolabs Inc. *PicoPLEX™ WGA Kit*. [cited 29 Jul 2016]; Available from: <https://www.neb.com/products/e2620-picoplex-wga-kit>.
66. Berg, J., J. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemistry, The Purification of Proteins Is an Essential First Step in Understanding Their Function*. 5th ed. 2002, New York: W H Freeman.
67. Lichtenbelt, K.D., N.V. Knoers, and G.H. Schuring-Blom, *From karyotyping to array-CGH in prenatal diagnosis*. Cytogenet Genome Res, 2011. 135(3-4): p. 241-50.
68. Coe, B.P., et al., *Resolving the resolution of array CGH*. Genomics, 2007. 89(5): p. 647-53.
69. Kallioniemi, A., et al., *Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors*. Science, 1992. 258(5083): p. 818-21.
70. du Manoir, S., et al., *Quantitative analysis of comparative genomic hybridization*. Cytometry, 1995. 19(1): p. 27-41.
71. Jeuken, J.W., S.H. Sprenger, and P. Wesseling, *Comparative genomic hybridization: practical guidelines*. Diagn Mol Pathol, 2002. 11(4): p. 193-203.
72. Bejjani, B.A. and L.G. Shaffer, *Application of array-based comparative genomic hybridization to clinical diagnostics*. J Mol Diagn, 2006. 8(5): p. 528-33.
73. Coe, B.P., et al., *Comparative genomic hybridization on BAC arrays*. Methods Mol Biol, 2009. 556: p. 7-19.
74. Institut für Humangenetik der Medizinischen Hochschule Hannover and D. Steinemann. *Array-CGH (array-basierte Comparative Genom-Hybridisierung)*. [cited 28 Jul 2016]; Available from: <https://www.mh-hannover.de/23971.html>.
75. Schaeffer, A.J., et al., *Comparative genomic hybridization-array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages*. Am J Hum Genet, 2004. 74(6): p. 1168-74.
76. Tachdjian, G., et al., *Cytogenetic analysis from DNA by comparative genomic hybridization*. Ann Genet, 2000. 43(3-4): p. 147-54.
77. Buffart, T.E., et al., *Across array comparative genomic hybridization: A strategy to reduce reference channel hybridizations*. Genes, Chromosomes and Cancer, 2008. 47(11): p. 994-1004.
78. Goldmann, K.-J., *Single-Channel vs Dual-Channel Experiments*, J. Zaccaria, Editor. 28 Sep 2016.
79. Illumina, *Quality Measures for 24sure Microarrays*. 2014.



80. BlueGnome, *A technical guide to aneuploidy calling with 24sure V3*, in *24sure calling*. 2012. p. 9.
81. HOLOGIC INC. *ThinPrep 2000 system*. [cited 22 Sep 2016]; Available from: <http://www.hologic.com/products/clinical-diagnostics-and-blood-screening/instrument-systems/thinprep-2000-system>.
82. BlueGnome, *Setting new Standards in IVF, 24sure V3 reference manual*. 2013.
83. Simons, A., L.G. Shaffer, and R.J. Hastings, *Cytogenetic Nomenclature: Changes in the ISCN 2013 Compared to the 2009 Edition*. Cytogenetic and Genome Research, 2013. 141(1): p. 1-6.
84. Chou, M.M., S.K. Lin, and E.S. Ho, *Severe limb reduction defects after uterine lavage at 7-8 weeks' gestation*. Prenat Diagn, 1997. 17(1): p. 77-80.
85. Adinolfi, M. and J. Sherlock, *Fetal cells in transcervical samples at an early stage of gestation*. J Hum Genet, 2001. 46(3): p. 99-104.
86. Fiorella, R.M., J. Cheng, and P.J. Kragel, *Papanicolaou smears in pregnancy. Positivity of exfoliated cells for human chorionic gonadotropin and human placental lactogen*. Acta cytologica, 1993. 37(4): p. 451-456.
87. Mouawia, H., et al., *Circulating trophoblastic cells provide genetic diagnosis in 63 fetuses at risk for cystic fibrosis or spinal muscular atrophy*. Reprod Biomed Online, 2012. 25(5): p. 508-20.
88. Saker, A., et al., *Genetic characterisation of circulating fetal cells allows non-invasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis*. Prenat Diagn, 2006. 26(10): p. 906-16.
89. Vona, G., et al., *Enrichment, immunomorphological, and genetic characterization of fetal cells circulating in maternal blood*. Am J Pathol, 2002. 160(1): p. 51-8.
90. Beroud, C., et al., *Prenatal diagnosis of spinal muscular atrophy by genetic analysis of circulating fetal cells*. Lancet, 2003. 361(9362): p. 1013-4.
91. Geigl, J.B. and M.R. Speicher, *Single-cell isolation from cell suspensions and whole genome amplification from single cells to provide templates for CGH analysis*. Nat Protoc, 2007. 2(12): p. 3173-84.
92. Griffith-Jones, M.D., et al., *Detection of fetal DNA in trans-cervical swabs from first trimester pregnancies by gene amplification: a new route to prenatal diagnosis?* Br J Obstet Gynaecol, 1992. 99(6): p. 508-11.
93. Hatt, L., et al., *A new marker set that identifies fetal cells in maternal circulation with high specificity*. Prenat Diagn, 2014. 34(11): p. 1066-72.
94. Kim, Y., et al., *Stability of DNA, RNA, cytomorphology, and immunoantigenicity in Residual ThinPrep Specimens*. Apmis, 2013. 121(11): p. 1064-72.
95. Overton, T.G., et al., *Prenatal diagnosis by minimally invasive first-trimester transcervical sampling is unreliable*. Am J Obstet Gynecol, 1996. 175(2): p. 382-7.



-
96. Vandewoestyne, M., et al., *Laser capture microdissection: should an ultraviolet or infrared laser be used?* Anal Biochem, 2013. 439(2): p. 88-98.
 97. Emad, A., et al., *Validation of automatic scanning of microscope slides in recovering rare cellular events: application for detection of fetal cells in maternal blood.* Prenat Diagn, 2014. 34(6): p. 538-46.
 98. Campton, D.E., et al., *High-recovery visual identification and single-cell retrieval of circulating tumor cells for genomic analysis using a dual-technology platform integrated with automated immunofluorescence staining.* BMC Cancer, 2015. 15: p. 360.
 99. Breman, A.M., et al., *Evidence for feasibility of fetal trophoblastic cell-based noninvasive prenatal testing.* Prenat Diagn, 2016.
 100. Jain, C.V., et al., *Fetal genome profiling at 5 weeks of gestation after noninvasive isolation of trophoblast cells from the endocervical canal.* Science Translational Medicine, 2016. 8(363): p. 363re4-363re4.
 101. Beaudet, A.L., *Using fetal cells for prenatal diagnosis: History and recent progress.* Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2016. 172(2): p. 123-7.



8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Zelldifferenzierung in embryonales und extraembryonales Gewebe	12
Abbildung 2	ThinPrep®-Pap-Test-System.....	22
Abbildung 3	Schema der Immunfluoreszenzfärbung.....	24
Abbildung 4	Übersicht über die Lasermikrodissektion	33
Abbildung 5	Ablauf der Lasermikrodissektion	33
Abbildung 6	PicoPlex®-WGA-Kit-Technologie.....	35
Abbildung 7	Schema der Array-CGH	43
Abbildung 8	Anordnung der Proben- und Referenz-DNA auf dem Array-Objekträger	47
Abbildung 9	Vergleich zwischen Eigenaufnahmen und Literatur.....	52
Abbildung 10	Ausschnitt einer Fluoreszenz-Mikroskopie von Zellen eines Zervix-Abstrichs	54
Abbildung 11	Ausschnitt einer Fluoreszenz-Mikroskopie von Zellen eines Zervix-Abstrichs	54
Abbildung 12	Negativkontrolle. Ausschnitt einer Fluoreszenz-Mikroskopie von Zellen eines Zervixkanal- Abstrichs.....	55
Abbildung 13	Zellbild mit überwiegend Zelldebris	56
Abbildung 14	Zellbild mit ausschließlich Zelldebris	57
Abbildung 15	Darstellung der einzelnen Dissektionsschritte.....	60
Abbildung 16	Darstellung der dissezierten und katapultierten Zellfragmente im Cap eines Mikroreaktionsgefäßes	60
Abbildung 17	Darstellung einer Negativkontrolle (nicht-schwangere Patientin) nach Immunfluoreszenzfärbung	61
Abbildung 18	Agarose-Gelelektrophorese-Bild	62
Abbildung 19	Graustufenbild der Array-CGH.....	65
Abbildung 20	Array-CGH-Profil der Probe 1.1.1.1.....	66
Abbildung 21	Array-CGH-Profil der Probe 16.1.2.3.2.....	66
Abbildung 22	Array-CGH-Profil der Probe 14.1.7.4.3.....	67
Abbildung 23	Array-CGH-Profil der Probe 19.1.9.5.4.....	67
Abbildung 24	Array-CGH-Profil der Probe 11.1.11.7.5.....	68
Abbildung 25	Array-CGH-Profil der Probe 11.4.14.10.6	68
Abbildung 26	Übersicht über die chronologisch (potenziell) zur Verfügung stehenden pränataldiagnostischen Methoden	87



9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Übersicht über transzervikale Zellentnahmemethoden in der Literatur.....	13
Tabelle 2	Differentialdiagnose multinukleärer Zellen in der Zervix	14
Tabelle 3	Übersicht über die Antikörper für den Trophoblasten-Nachweis in Studien	15
Tabelle 4	Übersicht über das Patientinnenkollektiv	20
Tabelle 5	Protokoll für die Papanicolao-Färbung	23
Tabelle 6	Übersicht über die verwendeten Antikörper und deren Eigenschaften	25
Tabelle 7	Überblick über die Entwicklung des Immunfluoreszenz-Protokolls.....	26
Tabelle 8	Protokoll der Immunfluoreszenz-Färbung.....	27
Tabelle 9	Übersicht über die möglichen Kombinationen der zu testenden Variablen bei der Lasermikrodissektion.....	32
Tabelle 10	Schema für die Durchführung der WGA	35
Tabelle 11	Reagenzien für die Gesamtgenomamplifikation.....	36
Tabelle 12	Übersicht über die Pipettierolumina für die WGA	37
Tabelle 13	Programm für die DNA-Extraktion	38
Tabelle 14	Programm für die Prä-Amplifikationsreaktion.....	39
Tabelle 15	Programm für die Amplifikationsreaktion	39
Tabelle 16	Übersicht über die Reaktionsbedingungen der WGA	40
Tabelle 17	Schema für die Durchführung der Array-CGH	45
Tabelle 18	Reagenzien für die Array-CGH-Analyse.....	45
Tabelle 19	Reagenzien und Materialien für die Herstellung der Waschpuffer.....	47
Tabelle 20	Waschprotokoll	48
Tabelle 21	Qualitätsparameter und Bewertung für die Array-CGH-Auswertung	51
Tabelle 22	Übersicht über die untersuchten Objektträger.....	53
Tabelle 23	Übersicht über die Zellqualität auf den Objektträgern.....	56
Tabelle 24	Übersicht über die möglichen bzw. getesteten Kombinationen der einzelnen Variablen bei der Lasermikrodissektion.....	58
Tabelle 25	Überblick über die Proben, die der Lasermikrodissektion unterzogen wurden	59
Tabelle 26	Ergebnisse der WGA.....	63
Tabelle 27	Darstellung der DNA-Amplifizierbarkeit von unterschiedlich bearbeiteten Zellen	63
Tabelle 28	Ergebnis der getesteten Kombinationen der verschiedenen Zellpräparationen in Hinblick auf die Amplifizierbarkeit der DNA	64
Tabelle 29	Varianten der Probenverarbeitung	64
Tabelle 30	Übersicht über die Ergebnisse der Array-CGH-Analyse.....	69
Tabelle 31	Qualitätsparameter für die Array-CGH-Analysen dieser Arbeit	69
Tabelle 32	Vergleich des in dieser Arbeit vorgeschlagenen nicht-invasiven Aneuploidienachweises mit den bereits etablierten invasiven Verfahren	87



10 Danksagung

Allen voran bedanke ich mich bei meiner Doktormutter PD Dr. med. Tina Buchholz für die Überlassung des überaus interessanten Themas und die zahlreichen herzlichen und professionellen Besprechungen, in denen sie mich stets ermutigt hat, an die Durchführbarkeit der Arbeit zu glauben.

Auch bei Dr. med. Elisabeth Maier, die großzügig ihr zytologisches Labor für die Arbeit zur Verfügung gestellt hat, möchte ich mich herzlich bedanken.

Im Speziellen danke ich Dr. rer. biol. hum. Katrin-Janine Goldmann, die mir bei der Durchführung und Auswertung der Array-CGH-Analyse enorm geholfen hat sowie Dr. rer. nat. Gabriele Friedemann von der Firma Zeiss und Dr. rer. nat. Sabine Langer-Freitag des Instituts für Humangenetik am Klinikum rechts der Isar für ihre große Unterstützung bei der Lasermikrodissektion. Bei Dr. rer. nat. Sonja Weiß und Dr. rer. nat. Caroline Adelfalk möchte ich mich für die Heranführung an die Arbeit im Labor und die Unterstützung bei der Immunzytofluoreszenz bedanken.

Vielen Dank an die Mitarbeiter des Placenta-Labors der Klinik für Geburtshilfe des Universitätsklinikums Jena, allen voran Maja Weber und Prof. Dr. med. Udo Markert für die Anregungen zur Immunzytofluoreszenz.

Mein Dank geht auch an die MTAs des Instituts für Humangenetik am Klinikum rechts der Isar und die MFAs des Gyn-Gen-Lehel MVZs sowie die MTAs und Zytologieassistentinnen des zytologischen Labors für die stets heitere und freundliche Atmosphäre und die Hilfe beim Erlernen verschiedenster Techniken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Michael Lehnerer bedanken, der sich die Zeit genommen hat, meine Arbeit auf Inhalt und Formatierung bis ins kleinste Detail zu korrigieren und mich damit ein ganzes Stück näher ans Ziel gebracht hat. Herzlichen Dank auch an Walter Ehret für seine sehr hilfreichen Ratschläge.

Das größte Dankeschön gilt jedoch den wichtigsten Menschen in meinem Leben: meinem Verlobten, meiner wunderbaren Familie und meinen Freunden, die immer für mich da waren, mir den Druck genommen und mich immer ermutigt haben, diese Arbeit fertigzustellen.



11 Eidesstattliche Versicherung

Zaccaria, Julia Patrizia

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Pilotstudie zum Nachweis von Aneuploidien in der Frühgravidität an
transzervikal gewonnenen Trophoblasten mittels Array-CGH-Analyse**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 21.12.2018

Julia Zaccaria

Unterschrift Doktorandin