

**Non-invasive, pränatale Bestimmung fetaler
Blutgruppenmerkmale an Thrombozyten (HPA-Merkmale) aus
mütterlichem Plasma mittels
„*Next-Generation-Sequencing*“ (NGS)**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Fröhner, Vanessa Lara
aus Freiburg im Breisgau

Gießen 2019

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin des
Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Leitung: Prof. Dr. Gregor Bein

Gutachter: Prof. Dr. Bein

Gutachter: Prof. Dr. Bräuninger

Tag der Disputation: 06.11.2020

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Thrombozyten | 1 |
| 1.2 Thrombozytäre Alloantigene..... | 2 |
| 1.2.1 Klinische Bedeutung..... | 3 |
| 1.2.1.1 Refraktärzustand gegenüber Thrombozytentransfusionen..... | 3 |
| 1.2.1.2 Posttransfusionelle Purpura..... | 3 |
| 1.2.1.3 Fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie | 4 |
| 1.3 Humane Plättchenantigene (HPA)..... | 4 |
| 1.3.1 HPA-1-System | 6 |
| 1.3.2 HPA-2-System | 6 |
| 1.3.3 HPA-3-System | 6 |
| 1.3.4 HPA-4-System | 7 |
| 1.3.5 HPA-5-System | 8 |
| 1.3.6 HPA-15-System | 8 |
| 1.4 Fetale/neonatale Alloimmunzytopenien | 8 |
| 1.4.1 Hämolytische Erkrankung des Fetus und Neugeborenen (HDFN) | 9 |
| 1.4.2 Neonatale Alloimmunneutropenie (NAIN) | 10 |
| 1.4.3 Fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT) | 10 |
| 1.5 Pathogenese der FNAIT | 11 |
| 1.5.1 Immunisierung | 11 |
| 1.5.1.1 Genetische Komponente | 11 |
| 1.5.1.2 Diaplazentarer IgG-Transport | 11 |
| 1.5.1.3 Antikörperspezifität und Assoziation zum klinischen Verlauf..... | 12 |
| 1.6 Symptomatik der FNAIT | 12 |
| 1.7 Diagnostik der FNAIT | 13 |
| 1.7.1 Serologische Diagnostik..... | 13 |
| 1.7.1.1 Schwierigkeiten beim Nachweis plättchenspezifischer Antikörper | 14 |
| 1.7.2 Genotypisierung der fetalen, humanen Plättchenantigene | 14 |
| 1.8 Pränatale Therapie der FNAIT..... | 15 |
| 1.9 Herausforderungen der non-invasiven, fetalen HPA-Genotypisierung | 16 |
| 1.9.1 Hoher Anteil maternaler DNA..... | 17 |
| 1.9.2 Geringe fetale DNA-Konzentration | 17 |
| 1.9.3 Interne Kontrolle für das Vorhandensein fetaler DNA | 17 |
| 1.10 Zielsetzung und Hypothese | 19 |

| | |
|---|----|
| 2. Material | 21 |
| 2.1 Geräte | 21 |
| 2.2 Verbrauchsmaterialien..... | 22 |
| 2.3 Chemikalien | 24 |
| 2.4 Gebrauchsfertige Reagenzien, Lösungen, Puffer und Kits | 25 |
| 2.4.1 Reagenzien, Lösungen, Puffer..... | 25 |
| 2.4.2 Kits | 29 |
| 3. Methoden | 31 |
| I Non-invasive, pränatale, fetale <i>RHD</i>-Bestimmung aus maternalem Plasma mittels <i>Real-time</i>-PCR (TaqMan®) | 31 |
| 3.1 Prinzip <i>Real-time</i> -PCR (TaqMan®) | 31 |
| 3.2 Patientinnen und Proband/-innen | 32 |
| 3.3 Probenentnahme und -aufbereitung | 34 |
| 3.4 DNA-Isolation aus zellfreiem Plasma..... | 34 |
| 3.4.1 Lösen der Nukleinsäuren | 34 |
| 3.4.2 Adsorption der Nukleinsäuren | 34 |
| 3.4.3 Entfernung von Verunreinigungen..... | 35 |
| 3.4.4 Elution der Nukleinsäuren | 36 |
| 3.5 <i>Real-time</i> -PCR (TaqMan®) | 36 |
| 3.5.1 Auswahl der zu vervielfältigenden DNA-Abschnitte..... | 36 |
| 3.5.2 Primer und Sonden | 37 |
| 3.5.3 Durchführung der <i>Real-time</i> -PCR (TaqMan®) | 38 |
| 3.5.4 Auswertung der Ergebnisse | 40 |
| II Non-invasive, pränatale Bestimmung fetaler, humaner Plättchenantigene aus maternalem Plasma mittels „<i>Next-Generation-Sequencing</i>“ (NGS) | 41 |
| 3.6 Prinzip Ionen-Halbleiter-Sequenzierung (<i>massively parallel sequencing</i>) | 41 |
| 3.7 Patientinnen und Proband/-innen | 43 |
| 3.8 Probenentnahme und -aufbereitung | 43 |
| 3.9 DNA-Isolation | 43 |
| 3.10 Erstellung der Bibliothek..... | 43 |
| 3.10.1 Amplifikation der Zielregionen | 44 |
| 3.10.2 Partielle Verdauung der Primer-Sequenzen und Adapter-Ligation | 47 |
| 3.10.3 Aufreinigung der Bibliothek | 47 |
| 3.10.4 Anreicherung der Bibliothek | 50 |
| 3.10.5 Erneute Aufreinigung der Bibliothek..... | 50 |

| | |
|---|-----------|
| 3.10.6 Quantifizierung mittels <i>Qubit® 2.0 Fluorometer</i> und <i>Agilent 2100 Bioanalyzer™ instrument</i> | 51 |
| 3.11 Klonale Amplifikation und Anreicherung | 51 |
| 3.11.1 Vorbereitung der Amplifikationslösung | 52 |
| 3.11.2 Befüllen des <i>Ion PGM™ OneTouch Plus Reaction Filter Assembly</i> | 54 |
| 3.11.3 Klonale Amplifikation mittels Emulsions-PCR..... | 54 |
| 3.11.4 Wiedergewinnung der <i>Template</i> -positiven <i>Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ Particles</i> | 56 |
| 3.11.5 Anreicherung der <i>Template</i> -positiven <i>Ion Sphere™ Particles</i> | 57 |
| 3.12 Ionen-Halbleiter-Sequenzierung | 59 |
| 3.12.1 Vorbereitung der angereicherten, <i>Template</i> -positiven <i>Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ Particles</i> | 60 |
| 3.12.2 Anlagerung der Sequenzierungsprimer und der Polymerase | 60 |
| 3.12.3 Beladung des Chips | 61 |
| 3.12.4 Durchführung der Sequenzierung | 62 |
| 3.12.5 Auswertung der Daten | 63 |
| 3.12.5.1 Definitionen | 63 |
| 3.13 Ethikvotum..... | 64 |
| 4. Ergebnisse | 65 |
| I Non-invasive, pränatale, fetale RHD-Bestimmung aus maternalem Plasma mittels <i>Real-time-PCR (TaqMan®)</i> | 65 |
| 4.1 Genotypisierung von <i>RHD</i> aus dem Blutplasma von RhD-positiven und -negativen Blutspender/-innen..... | 65 |
| 4.1.1 Intra- und Inter-Assay Variabilität | 67 |
| 4.2 Titration von Plasma einer männlichen, RhD-positiven Person in Plasma einer weiblichen, RhD-negativen Person..... | 70 |
| 4.3 Fetale <i>RHD</i> -Genotypisierung aus dem Blutplasma von RhD-negativen Schwangeren | 72 |
| II Non-invasive, pränatale Bestimmung fetaler, humaner Plättchenantigene aus maternalem Plasma mittels „<i>Next-Generation-Sequencing</i>“ (NGS) | 77 |
| 4.4 Patientinnen | 77 |
| 4.5 Qualität..... | 77 |
| 4.5.1 <i>Primer Panel I</i> | 78 |
| 4.5.2 <i>Primer Panel II</i> | 79 |
| 4.6 Ermittelte <i>Reads</i> | 79 |
| 4.6.1 <i>Primer Panel I</i> | 79 |
| 4.6.2 <i>Primer Panel II</i> | 80 |
| 4.7 Unerwartete <i>Base Calls</i> | 80 |

| | |
|---|------------|
| 4.7.1 <i>Primer Panel I</i> | 80 |
| 4.7.2 <i>Primer Panel II</i> | 81 |
| 4.8 Interne Kontrolle für das Vorhandensein fetaler DNA in zellfreiem, maternalem Plasma..... | 83 |
| 4.8.1 <i>Primer Panel I</i> | 83 |
| 4.8.2 <i>Primer Panel II</i> | 83 |
| 4.9 Genotypisierung der fetalen, humanen Plättchenantigene: <i>ITGB3</i> (HPA-1), <i>ITGA2B</i> (HPA-3), <i>ITGA2</i> (HPA-5), <i>CD109</i> (HPA-15) aus maternalem Plasma..... | 86 |
| 4.9.1 <i>Primer Panel I</i> | 86 |
| 4.9.2 <i>Primer Panel II</i> | 86 |
| 4.9.3 Genotypisierung von fetalem, humanem Plättchenantigen (HPA) -1..... | 87 |
| 4.9.3.1 <i>Primer Panel I</i> | 87 |
| 4.9.3.2 <i>Primer Panel II</i> | 87 |
| 4.9.4 Genotypisierung von fetalem, humanem Plättchenantigen (HPA) -3..... | 89 |
| 4.9.4.1 <i>Primer Panel I</i> | 89 |
| 4.9.4.2 <i>Primer Panel II</i> | 89 |
| 4.9.5 Genotypisierung von fetalem, humanem Plättchenantigen (HPA) -5..... | 91 |
| 4.9.5.1 <i>Primer Panel I</i> | 91 |
| 4.9.5.2 <i>Primer Panel II</i> | 92 |
| 4.9.6 Genotypisierung von fetalem, humanem Plättchenantigen (HPA) -15..... | 94 |
| 4.9.6.1 <i>Primer Panel I</i> | 94 |
| 4.9.6.2 <i>Primer Panel II</i> | 94 |
| 5. Diskussion | 97 |
| I Validierung der non-invasiven, pränatalen, fetalen <i>RHD</i>-Bestimmung aus maternalem Plasma mittels <i>Real-time-PCR</i> (TaqMan®) | 99 |
| 5.1 Genotypisierung von <i>RHD</i> aus dem Blutplasma von RhD-positiven und -negativen Blutspender/-innen..... | 99 |
| 5.2 Intra- und Inter-Assay Variabilität..... | 99 |
| 5.3 Titration von Plasma einer männlichen, RhD-positiven Person in Plasma einer weiblichen, RhD-negativen Person..... | 100 |
| 5.4 Fetale <i>RHD</i> -Genotypisierung aus dem Blutplasma von RhD-negativen Schwangeren..... | 100 |
| II Etablierung der non-invasiven, pränatalen Bestimmung fetaler, humaner Plättchenantigene aus maternalem Plasma mittels „<i>Next-Generation-Sequencing</i>“ (NGS) | 103 |
| 5.5 Qualität und ermittelte <i>Reads</i> | 105 |
| 5.5.1 Ausschluss von Systemen..... | 105 |
| 5.6 Unerwartete <i>Base Calls</i> | 105 |

| | |
|---|-----|
| 5.7 Interne Kontrolle für das Vorhandensein fetaler DNA in zellfreiem, maternalem Plasma | 106 |
| 5.8 Genotypisierung der fetalen, humanen Plättchenantigene: <i>ITGB3</i> (HPA-1), <i>ITGA2B</i> (HPA-3), <i>ITGA2</i> (HPA-5), <i>CD109</i> (HPA-15) aus maternalem Plasma .. | 107 |
| 5.8.1 Vordefinierter Grenzwert für das Vorhandensein fetaler, paternaler Allele | 107 |
| 5.8.1.1 Fall #4 | 107 |
| 5.8.1.2 Fall #6 | 107 |
| 5.8.1.3 Fall #13 | 108 |
| 5.8.2 Genotypisierung von fetalem, humanem Plättchenantigen (HPA) -1 | 108 |
| 5.8.3 Genotypisierung von fetalem, humanem Plättchenantigen (HPA) -3 | 108 |
| 5.8.4 Genotypisierung von fetalem, humanem Plättchenantigen (HPA) -5 | 109 |
| 5.8.5 Genotypisierung von fetalem, humanem Plättchenantigen (HPA) -15 | 110 |
| 5.9 Limitationen der non-invasiven, pränatalen, fetalen Genotypisierung mittels „ <i>Next-Generation-Sequencing</i> “ (Ionen-Halbleiter-Prinzip)..... | 110 |
| 5.9.1 Vergleich zur Sequenzierung mit der Illumina-Technologie | 111 |
| 5.10 Publikationen zur pränatalen, nicht-invasiven Bestimmung fetaler Blutgruppenmerkmale | 111 |
| 5.10.1 Bisherige Verfahren ohne interne Kontrolle für das Vorhandensein fetaler DNA..... | 111 |
| 5.10.2 Bisherige Verfahren mit positivem Nachweis für das Vorhandensein fetaler DNA und deren Limitationen | 112 |
| 5.11 Fazit | 113 |
| 5.12 Ausblick..... | 115 |
| 6. Zusammenfassung | 117 |
| 7. Summary | 119 |
| 8. Abbildungsverzeichnis..... | 121 |
| 9. Tabellenverzeichnis..... | 123 |
| 10. Abkürzungsverzeichnis..... | 125 |
| 11. Literaturverzeichnis | 127 |
| 12. Anhang..... | 137 |
| 12.1 Aufklärungsbogen | 137 |
| 12.2 Einverständniserklärung | 138 |
| 13. Publikationsverzeichnis | 139 |
| 13.1 Publikation..... | 139 |
| 13.2 Kongressbeiträge | 139 |
| 13.3 Präsentation | 139 |

| | |
|---|-----|
| 14. Ehrenwörtliche Erklärung | 141 |
| 15. Danksagung | 143 |

1. Einleitung

1.1 Thrombozyten

Die Thrombozyten werden beim Erwachsenen, wie alle anderen Zellen des Blutes, im Rahmen der Hämatopoese im Knochenmark gebildet. Sie entstehen aus den Megakaryozyten (myeloische Reihe), indem diese lange, kernlose Zytoplasmaanteile abschnüren, in welchen die sogenannten Prothrombozyten aufgereiht sind. Durch Fragmentierung der Prothrombozytenketten entstehen die endgültigen Thrombozyten. Täglich werden auf diese Weise ca. 15000 Thrombozyten/ μ l gebildet, wobei die Synthese durch das frei zirkulierende Thrombopoetin reguliert wird. Die Lebenszeit beträgt ca. 7 - 10 Tage. Die Elimination der „gealterten“ Thrombozyten erfolgt hauptsächlich in der Milz im retikuloendothelialen System (Greinacher, 2011).

Die Thrombozyten spielen eine elementare Rolle in der primären Hämostase. Bei einem Defekt der Endothelbarriere im Rahmen einer Verletzung wird die subendotheliale Matrix freigelegt, an welche die Thrombozyten über den von Willebrand-Faktor binden. Dies erfolgt mittels des Glykoproteinkomplexes Ib/IX, auch von Willebrand-Faktor-Rezeptor genannt. Die Adhäsion an die subendotheliale Matrix wird durch die Kollagenrezeptoren GPVI und GPIa/IIa weiter verstärkt. Durch deren Quervernetzung, welche eine Signaltransduktion induziert, werden die Thrombozyten aktiviert. Die Aktivierung führt zu einer Reorganisation des Zytoskeletts, zur Freisetzung von Granula, sowie zur Konformationsänderung des Fibrinogenrezeptors, dem GPIIb/IIIa-Komplex. Durch die Änderung der Konformation bzw. Aktivierung kann Fibrinogen gebunden werden, worüber eine Vernetzung zwischen benachbarten Thrombozyten erfolgt, und es zur Ausbildung eines Thrombozytengerinnsels kommt (Greinacher, 2011). Die freigesetzte Granula enthält Faktoren der plasmatischen Gerinnung, v.a. den von Willebrand-Faktor, Fibrinogen und Faktor V, sowie Botenstoffe, wie ADP und Serotonin, die weitere Thrombozyten aktivieren. Durch die Reorganisation des Zytoskeletts wird die negativ geladene Innenseite der Zellmembran nach außen gestülpt („Flip-Flop“), was als Katalysator für die Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade fungiert. Auf diese Weise entsteht zwischen den vernetzten Thrombozyten ein Fibringerinnsel. Zuletzt kommt es zur Kontraktion des thrombozytären Zytoskeletts über Aktin- und Myosinfilamente, was in einer Verfestigung des Gefäßthrombus, dem Zusammenziehen und Verschließen der Gefäßverletzung resultiert (Greinacher, 2011).

Die eben genannten, bei der primären Hämostase relevanten Glykoproteinkomplexe der Thrombozyten können zur Zielstruktur von Auto- oder Alloantikörpern werden. Dies kann

zu einer Erniedrigung der Thrombozytenzahl (Thrombozytopenie) und/oder zu einer thrombozytären Funktionsstörung (Thrombozytopathie) führen, was sich in einer Störung der primären Hämostase und einer damit einhergehenden erhöhten Blutungsneigung widerspiegelt. Diese ist vor allem gekennzeichnet durch petechiale Blutungen, welche besonders an der Haut sichtbar werden (Kiefel, 2011).

Das Immunsystem kann sich zum einen durch Bildung von autoreaktiven, thrombozytären Antikörpern gegen körpereigene Thrombozyten richten (immunpathologische Reaktion Typ-II nach Coombs und Gell), wobei die Ätiologie noch unklar ist, zum anderen kann es nach Transfusionen von Blutprodukten und während der Schwangerschaft zur Immunisierung gegen thrombozytäre Alloantigene kommen (Kiefel, 2011).

1.2 Thrombozytäre Alloantigene

Thrombozytäre Alloantigene sind genetisch determinierte, immunogene Varianten von Molekülen der Thrombozytenmembran. Sie induzieren in Individuen, denen die implizierte Variante fehlt, eine humorale Immunantwort mit Bildung von Alloantikörpern (Metcalf, 2003). Die thrombozytären Alloantigene können anhand ihrer Gewebeverteilung klassifiziert werden. Zu den sogenannten Typ-I-Antigenen zählen die ABH- und HLA-Klasse-I-Antigene, welche neben den Thrombozyten auch auf anderen Blut- und Gewebezellen zu finden sind. Bei den Typ-II-Antigenen handelt es sich um immunogene, genetische Varianten der Glykoproteinkomplexe (GP) IIb/IIIa (α IIb β 3-Integrin), Ib/IX, Ia/IIa (α 2 β 1-Integrin), welche für die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten bei der primären Hämostase von Bedeutung sind (siehe oben), und CD109 (Santoso, 2001). Es bestand die Annahme, dass diese Antigene „plättchenspezifisch“ sind und ausschließlich auf Thrombozyten und Megakaryozyten exprimiert werden. Inzwischen wurden sie jedoch auch auf anderen Zellen und Geweben nachgewiesen. Antigene auf dem β 3-Integrin (GPIIIa) wurden auch auf Endothelzellen, glatter Muskulatur und Fibroblasten nachgewiesen (Giltay, 1989a). Antigene auf dem α 2-Integrin (GPIa) wurden auf aktivierten T-Lymphozyten (Santoso, 1989a) und Endothelzellen (Giltay, 1989b) identifiziert. CD109 findet sich ebenfalls auf aktivierten T-Lymphoblasten (Sutherland, 1991).

1.2.1 Klinische Bedeutung

Die thrombozytären Alloantigene spielen pathogenetisch eine wichtige Rolle bei den folgenden immunologisch bedingten Krankheitsentitäten (Kroll, 1998):

1.2.1.1 Refraktärzustand gegenüber Thrombozytentransfusionen

Unter einem Refraktärzustand versteht man den fehlenden Anstieg der Thrombozytenzahl im peripheren Blut (Inkrement) nach mehrfacher Transfusion frischer, funktionsfähiger ABO-kompatibler Thrombozyten, wobei jedoch keine einheitliche Definition existiert (Kroll, 2011). Zur Beurteilung des Therapieerfolgs dient die Bestimmung des korrigierten Inkrements (Körperoberfläche und Anzahl der transfundierten Thrombozyten berücksichtigt) innerhalb 1 h (1 h-Inkrement) oder 16 h - 24 h nach Transfusion. Ätiologisch kommen sowohl nicht-immunologische (bspw. Splenomegalie und Sepsis), als auch immunologische Faktoren in Frage (Kroll, 2011). Voraussetzung für einen immunologisch bedingten Refraktärzustand ist die Immunisierung gegen thrombozytäre Alloantigene, weshalb die Betroffenen meist mehrere Thrombozytentransfusionen hinter sich haben (Kroll, 2011). Die größte Rolle spielen hierbei Alloantikörper gegen HLA-Klasse-I-Antigene (Warkentin, 1997), aber auch humane Plättchenantigene, v.a. HPA-1b und HPA-5b (Kiefel, 2001) können ursächlich beteiligt sein. Die Therapie der Wahl ist die Gabe von kompatiblen Thrombozytenkonzentraten, abgestimmt auf die Spezifität der Antikörper (Kroll, 2011).

1.2.1.2 Posttransfusionelle Purpura

Das relativ seltene Krankheitsbild ist durch einen plötzlichen Abfall der Thrombozytenzahl gekennzeichnet, welcher ca. eine Woche nach Transfusion auftritt (Kiefel, 2011). Am häufigsten immunisieren sich die hauptsächlich weiblichen Betroffenen gegen thrombozytäre Alloantigene auf dem Glykoproteinkomplex IIb/IIIa im Rahmen einer Schwangerschaft oder durch Transfusionen, wobei die überwiegende Zahl der Fälle durch Anti-HPA-1a-Antikörper ausgelöst wird (Mueller-Eckhardt, 1986; Kroll, 1993). Antikörper gegen die Merkmale HPA-3a (Kickler, 1988), -3b (Kiefel, 1989a), sowie HPA-5a (Anolik, 2001) werden auch beobachtet. Obwohl die körpereigenen Thrombozyten das Antigen, gegen welches sich die Alloantikörper richten, nicht tragen, kommt es zu einer schweren Thrombozytopenie. Die Pathogenese ist nicht vollständig geklärt (Kiefel, 2011). Eine Hypothese geht davon aus, dass Immunkomplexe,

bestehend aus den gebildeten Alloantikörpern und dem nach der Transfusion im Empfänger verbleibenden zirkulierenden, antigenhaltigen Material, an die autologen Thrombozyten binden, und zu einem beschleunigten Abbau führen (Shulman, 1961). 1966 wurde von Morrison und Mollison postuliert, dass es im Rahmen einer sekundären Immunantwort zur Bildung von kreuzreagierenden, pseudospezifischen Antikörpern kommt, welche auch mit Alloantigen-negativen Thrombozyten reagieren (Morrison, 1966). Diese Hypothese wird dadurch untermauert, dass von den autologen Thrombozyten die Alloantikörper eluiert werden können (Kroll, 1993). Nach einer weiteren Hypothese werden die von der Transfusion stammenden Alloantigene von den autologen Thrombozyten adsorbiert. Dies resultiert in einer Änderung des Phänotyps, wodurch ein Angriffspunkt für Alloantikörper geschaffen wird (Kickler, 1986). Die effektive Therapie der posttransfusionellen Purpura besteht in der Infusion von hochdosierten Immunglobulinen (IgG) (Hamblin, 1985; Mueller-Eckhardt, 1988).

1.2.1.3 Fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie

Siehe Abschnitt „Fetale/neonatale Alloimmunzytopenien“ Punkt 1.4.3.

1.3 Humane Plättchenantigene (HPA)

Zunächst wurden die „plättchenspezifischen“ Antigene nach den Kurzformen der Namen von Patient/-innen, bei welchen zuerst eine Immunisierung gegen ein Allel des entsprechenden Systems beschrieben wurde, benannt. Aufgrund von Mehrfachbenennungen identischer Antigene (z.B. Zw/PIA-System) durch zeitgleiche Publikationen von verschiedenen Arbeitsgruppen kam es zu Verwechslungen und Unklarheiten, weshalb 1990 von von dem Borne und Décary eine neue, systematische Nomenklatur eingeführt wurde: das HPA (human platelet antigen) - System. Hierbei werden alle Antigen-systeme in der Reihenfolge ihrer Erstentdeckung beziffert, wobei das häufigere Allel mit „a“ und das antithetische Allel mit der niedrigeren Frequenz mit „b“ gekennzeichnet wird (von dem Borne AE, 1990). Als humane Plättchenantigene werden demnach alle plättchenspezifischen Antigene bezeichnet, von welchen die molekulare Basis aufgeklärt worden ist. Falls das antithetische Allel eines Systems noch nicht bekannt ist, wird das erste definierte Antigen mit „w“ gekennzeichnet (Metcalfe, 2003). Momentan gibt es 39 humane Plättchenantigene, wovon 12 in 6 verschiedene biallelische Systeme unterteilt werden (HPA-1, -2, -3, -4, -5, -15) (*European*

Bioinformatics Institute (2009) *The immuno polymorphism database – HPA database*; <http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/> (Tab. 1.1).

| Humane Plättchenantigene (HPA) | | | | | | |
|--------------------------------|--|--------------|--------|--------------|--------------------|---------------------|
| Antigen | Synonym | Glykoprotein | HGNC | dbSNP | Nukleotidaustausch | Aminosäureaustausch |
| HPA-1a | Zw ^a , Pl ^{A1} | GPIIIa | ITGB3 | rs5918 | T176 | Leu33 |
| HPA-1b | Zw ^b , Pl ^{A2} | | | | C176 | Pro33 |
| HPA-2a | Ko ^b | GPIIb | GP1BA | rs6065 | C482 | Thr145 |
| HPA-2b | Ko ^a , Sib ^a | | | | T482 | Met145 |
| HPA-3a | Bak ^a , Lek ^a | GPIIIb | ITGA2B | rs5911 | T2621 | Ile184 |
| HPA-3b | Bak ^b | | | | G2621 | Ser184 |
| HPA-4a | Yuk ^b , Pen ^a | GPIIIa | ITGB3 | rs5917 | G506 | Arg143 |
| HPA-4b | Yuk ^a , Pen ^b | | | | A506 | Gln143 |
| HPA-5a | Br ^b , Zav ^b | GPIa | ITGA2 | rs1801106 | G1600 | Glu505 |
| HPA-5b | Br ^a , Zav ^a , Hc ^a | | | | A1600 | Lys505 |
| HPA-6bw | Ca ^a , Tu ^a | GPIIIa | ITGB3 | rs13306487 | 1544G>A | Arg489Gln |
| HPA-7bw | Mo ^a | GPIIIa | ITGB3 | | 1297C>G | Pro407Ala |
| HPA-8bw | Sr ^a | GPIIIa | ITGB3 | | 1984C>T | Arg636Cys |
| HPA-9bw | Max ^a | GPIIb | ITGA2B | | 2602G>A | Val740Leu |
| HPA10bw | La ^a | GPIIIa | ITGB3 | | 263G>A | Arg62Gln |
| HPA11bw | Gro ^a | GPIIIa | ITGB3 | | 1976G>A | Arg633His |
| HPA12bw | Iy ^a | GPIIb | GP1BB | | 119G>A | Gly15Glu |
| HPA13bw | Sit ^a | GPIa | ITGA2 | | 2483C>T | Thr799Met |
| HPA14bw | Oe ^a | GPIIIa | ITGB3 | | 1909_1911delAAG | Lys611del |
| HPA-15a | Gov ^b | CD109 | CD109 | rs10455097 | C2108 | Ser682 |
| HPA-15b | Gov ^a | | | | A2108 | Tyr682 |
| HPA-16bw | Duv ^a | GPIIIa | ITGB3 | | 497C>T | Thr140Ile |
| HPA-17bw | Va ^a | GPIIIa | ITGB3 | | 662C>T | Thr195Met |
| HPA-18bw | Cab ^a | GP1a | ITGA2 | | 2235G>T | Gln716His |
| HPA-19bw | Sta | GPIIIa | ITGB3 | ss120032848 | 487A>C | Lys137Gln |
| HPA-20bw | Kno | GPIIb | ITGA2B | ss120032852 | 1949C>T | Thr619Met |
| HPA-21bw | Nos | GPIIIa | ITGB3 | ss120032849 | 1960G>A | Glu628Lys |
| HPA-22bw | Sey | GPIIb | ITGA2B | rs142811900 | 584A>C | Lys164Thr |
| HPA-23bw | Hug | GPIIIa | ITGB3 | rs139166528 | 1942C>T | Arg622Trp |
| HPA-24bw | Cab2 ^{a+} | GPIIb | ITGA2B | | 1508G>A | Ser472Asn |
| HPA-25bw | Swi ^a | GPIa | ITGA2 | | 3347C>T | Thr1087Met |
| HPA-26bw | Sec ^a | GPIIIa | ITGB3 | | 1818G>T | Lys580Asn |
| HPA-27bw | Cab3 ^{a+} | GPIIb | ITGA2B | rs149468422 | 2614C>A | Leu841Met |
| HPA-28bw | War | GPIIb | ITGA2B | ss550827881 | 2311G>T | Val740Leu |
| HPA-29bw | Kha ^b | GPIIIa | ITGB3 | ss1221285311 | 98C>T | Thr7Met |

HGNC: Human Genome Organisation (HUGO) Gene Nomenclature Committee

Tab. 1.1 Übersicht der humanen Plättchenantigene.

Modifiziert nach: *European Bioinformatics Institute: The immuno polymorphism database - HPA database*; <http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/> (zuletzt abgerufen am 26.03.2019; zu diesem Zeitpunkt war diese Datenbank nicht aktuell, da bereits HPA-30bw bis HPA-33bw publiziert waren).

Die humanen Plättchenantigene entstehen durch Polymorphismen in Genen, welche die relevanten membranständigen, thrombozytären Glykoproteine kodieren. Dabei handelt es sich um *Single Nucleotide* Polymorphismen (SNPs), das heißt es kommt zum Austausch eines einzigen Nukleotids, weshalb sich beide möglichen Allele lediglich durch einen singulären Aminosäureaustausch unterscheiden (Metcalf, 2003). Nur HPA-14w wird durch eine Aminosäuredeletion (Lys611) des β 3-Integrins gebildet (Santoso, 2002).

1.3.1 HPA-1-System

Die humanen Plättchenantigene, HPA-1a und -1b, sind auf dem Glykoprotein (GP) IIIa lokalisiert (Kunicki, 1979). Ein Austausch der Basen T>C an Position 176 im *ITGB3*-Gen liegt dem Polymorphismus des HPA-1-Antigensystems zugrunde, welcher von Newman et al. charakterisiert wurde. Dieser führt zu einem Austausch der Aminosäuren Leucin → Prolin an Position 33 des Glykoproteins IIIa (Newman, 1989) (Abb. 1.1). 1959 wurde der erste Antikörper gegen HPA-1a im Serum einer Patientin identifiziert. Diese war laut den beschriebenen Symptomen in der veröffentlichten Krankengeschichte an einer posttransfusionellen Purpura erkrankt (van Loghem, 1959). Im Serum einer polytransfunden Patientin wurde erstmals 1963 ein Anti-HPA-1b-Antikörper gefunden (van der Weerd, 1963). Das humane Plättchenantigen, HPA-1a, löst am häufigsten eine FNAIT aus (Ghevaert, 2007; Kroll, 2005; Davoren, 2004).

1.3.2 HPA-2-System

Das HPA-2-Antigensystem wurde erstmals 1961 von van der Weerd beschrieben (1961). Die HPA-2-Antigene befinden sich auf dem Glykoprotein Ib (Kuijpers, 1992b) und beruhen auf dem Basenaustausch C>T an Position 482 im *GP1BA*-Gen, was in einem Aminosäureaustausch Threonin → Methionin an Position 145 resultiert (Kuijpers, 1992a) (Abb. 1.1).

1.3.3 HPA-3-System

Das auf dem Glykoprotein IIb (GPIIb) lokalisierte HPA-3-Antigensystem (van der Schoot, 1986) wird durch den Basenaustausch 2621T>G im *ITGA2B*-Gen, der mit einem Dimorphismus der Aminosäuren Isoleucin → Serin an Position 184 einhergeht, definiert (Lyman, 1990) (Abb. 1.1). Der erste, gegen das Antigen HPA-3a, gerichtete Antikörper,

1.3.5 HPA-5-System

Antikörper gegen das Merkmal HPA-5b wurden erstmalig 1988 im Serum von Müttern nachgewiesen, deren Kinder an einer FNAIT litten (Kiefel, 1988). Der erste Nachweis von Anti-HPA-5a-Antikörpern erfolgte ein Jahr später im Serum von polytransfunden Patient/-innen (Kiefel, 1989b). Die Antigene des HPA-5-Systems wurden 1989 immunhistochemisch auf dem Glykoprotein Ia lokalisiert (Santoso, 1989b). Der dem HPA-5-Antigensystem zugrundeliegende Polymorphismus im *ITGA2*-Gen besteht in einem Austausch der Basen G>A an Position 1600, was in einem Aminosäureaustausch Glutaminsäure → Lysin an Position 505 resultiert (Santoso, 1993) (Abb. 1.1).

1.3.6 HPA-15-System

Die Antigene HPA-15a und -15b wurden erstmals von Kelton et al. beschrieben (Kelton, 1990). Anti-HPA-15b-Antikörper wurden bei einer Patientin mit einer posttransfusionellen Purpura, Antikörper gegen das Merkmal HPA-15a bei einem Patienten, der nach multiplen Thrombozytentransfusionen einen Refraktärzustand entwickelt hatte, gefunden. Das HPA-15-Antigensystem wurde auf einem Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-verknüpften Glykoprotein, dem CD109 lokalisiert (Smith, 1995). 2002 definierte Schuh et. al den zugrundeliegenden Polymorphismus, ein Austausch der Basen C>A an Position 2108 im Gen *CD109*, was zu einem Austausch der Aminosäuren Serin → Tyrosin an Position 682 führt (Schuh, 2002) (Abb. 1.1).

1.4 Fetale/neonatale Alloimmunzytopenien

Fetale/neonatale Alloimmunzytopenien beruhen auf einer Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind. Diese kommt dadurch zustande, dass das Kind ein Merkmal vom Vater erbt, welches die Mutter nicht besitzt. Dies führt nach der Immunisierung der Schwangeren gegen Blutgruppenmerkmale des Kindes zur Bildung von plazentagängigen, maternalen Alloantikörpern der Klasse IgG, welche zur Eliminierung fetaler Blutzellen führen können. Zu dieser Krankheitsgruppe werden die hämolytische Erkrankung des Fetus und Neugeborenen (früher: Morbus haemolyticus neonatorum), die fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT), sowie die neonatale Alloimmunneutropenie (NAIN) gezählt (Kroll, 2011).

1.4.1 Hämolytische Erkrankung des Fetus und Neugeborenen (HDFN)

Bei der hämolytischen Erkrankung des Fetus und Neugeborenen richten sich die maternalen Alloantikörper gegen fetale, erythrozytäre Antigene. Die opsonierten Erythrozyten werden hauptsächlich in der fetalen Milz abgebaut. Die klinischen Folgen der extravasalen Hämolyse reichen pränatal von einer mäßigen Anämie bis zum Hydrops fetalis, welcher unbehandelt innerhalb von wenigen Tagen zum Exitus letalis führen kann (Kroll, 2011). Eine Hyperbilirubinämie tritt lediglich postnatal auf, da pränatal das freigesetzte unkonjugierte Bilirubin über die Plazenta in den mütterlichen Blutkreislauf gelangt und nach Glucuronidierung in der mütterlichen Leber ausgeschieden wird (Axt-Fliedner, 2018b). Das Krankheitsbild mit der größten klinischen Relevanz ist die durch Anti-D-Antikörper ausgelöste hämolytische Erkrankung des Fetus und Neugeborenen (HDFN) (Mutter: RhD-negativ, Kind: RhD-positiv). Auch nach Einführung der prä- und postpartalen Anti-D-Prophylaxe Ende der 60er Jahre sind Anti-D-Antikörper nach wie vor die wichtigste Ursache schwerer Verlaufsformen (Axt-Fliedner, 2018a). Bei den Antikörperspezifitäten, welche neben Anti-D am häufigsten mit einer hämolytischen Erkrankung des Fetus und Neugeborenen assoziiert sind, handelt es sich um Anti-K, Anti-c, Anti-E sowie andere Rhesusantikörper, wobei insbesondere Anti-K-Antikörper eine schwere hämolytische Erkrankung auslösen können. Auch Anti-A, -B, -Jk, -Fy, -M, -N, -s, und -S können in die HDFN involviert sein, hierbei kommt es jedoch meist zu milden Verläufen (Axt-Fliedner, 2018a).

Die hämolytische Erkrankung des Fetus und Neugeborenen tritt in der Mehrzahl der Fälle erst in der zweiten Schwangerschaft auf. Eine Ausnahme stellt die durch eine ABO-Inkompatibilität hervorgerufene HDFN dar, welche in 50 % der Fälle bereits das erstgeborene Kind betrifft, da aufgrund der bei jedem Individuum mit der Blutgruppe 0 vorkommenden Isoagglutinine bereits präformierte IgG-Antikörper vorliegen können (Kroll, 2011).

Therapie der Wahl bei dem Vorliegen einer Hyperbilirubinämie beim Neugeborenen ist die Fototherapie mit dem Ziel das unkonjugierte Bilirubin in ein wasserlösliches Isomer umzuwandeln. Ist diese Maßnahme zur Senkung des Bilirubinspiegels nicht ausreichend, besteht die Indikation zur Austauschtransfusion, wodurch die maternalen Alloantikörper aus dem fetalen Kreislauf eliminiert, der meist erniedrigte Hämatokrit ohne Volumenbelastung angehoben als auch das neurotoxische Bilirubin entfernt werden können (Axt-Fliedner, 2018b). Präpartal stellt die intrauterine Erythrozytentransfusion die einzige effiziente Methode dar, um die abgebauten, fetalen Erythrozyten zu ersetzen und einen Hydrops fetalis zu verhindern (Axt-Fliedner, 2018a).

1.4.2 Neonatale Alloimmunneutropenie (NAIN)

Bei diesem seltenen Krankheitsbild bildet die Mutter granulozytenspezifische Alloantikörper. Am häufigsten sind die Granulozytenantigene HNA-1a, -1b und -2a betroffen. In etwa der Hälfte der Fälle erkranken bereits die Erstgeborenen. Klinisch präsentiert sich die Krankheit mit bakteriellen Infektionen, insbesondere an der Haut. Es können ebenso Infektionen der oberen Luftwege oder Septikämien auftreten. Therapeutisch ist in der Regel eine antibiotische Behandlung bei Bedarf ausreichend (Kroll, 2011).

1.4.3 Fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT)

Der fetalen/neonatalen Alloimmunthrombozytopenie liegt eine Immunisierung der Schwangeren gegen humane Plättchenantigene (HPA) des Fetus zugrunde, welche zur Bildung thrombozytärer Alloantikörper führt. Diese Antikörper gehören der Klasse IgG an und besitzen daher die Fähigkeit die Plazentaschranke zu durchqueren, was eine Eliminierung der fetalen Thrombozyten zur Folge hat (Mueller-Eckhardt, 1989). Die FNAIT ist die häufigste Ursache einer schweren neonatalen Thrombozytopenie (Thrombozytenzahl $<50 \times 10^9/l$) bei ansonsten gesunden Feten und Neugeborenen (Knight, 2011) mit einer Inzidenz von ca. 1/1000 bis 1/2000 Neugeborenen (Kamphuis, 2014; Kamphuis, 2010; Kjeldsen-Kragh, 2007; Williamson, 1998). Die betroffenen Feten haben dadurch ein erhöhtes Risiko für Blutungskomplikationen, im schwerwiegendsten Fall kann es zu intrazerebralen Blutungen kommen (Tiller, 2013). Die effektive Therapie der FNAIT besteht in der Transfusion von kompatiblen Thrombozytenkonzentraten, welche bei einem Abfall der Thrombozytenzahl unter 30 G/l indiziert ist, vorausgesetzt es liegen keine Blutungsereignisse vor. Bei Auftreten von Blutungen besteht bereits bei einer Thrombozytenzahl von 50 G/l eine Indikation zur Transfusion von Thrombozyten (Bertrand, 2014; Chakravorty, 2012; Bussel, 2009; Kroll, 2011). Idealerweise sollten kompatible Thrombozyten transfundiert werden, stehen diese jedoch im Notfall nicht zur Verfügung ist auch eine temporäre Gabe von unausgewählten, inkompatiblen Thrombozyten möglich (Bakchoul, 2008; Kiefel, 2006).

1.5 Pathogenese der FNAIT

1.5.1 Immunisierung

Grundlage der FNAIT ist die fetomaternale Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind, die dadurch entsteht, dass das Kind humane Plättchenantigene vom Vater geerbt hat, welche die Mutter nicht besitzt. Wodurch die Immunisierung ausgelöst wird, ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass Mikropartikel des Synzytiotrophoblasten zur Immunisierung der Mutter führen können (Kumpel, 2012b; Kumpel, 2008). Das Glykoprotein GPIIIa, als Träger des Merkmals HPA-1a, gegen welches in 75 % der Fälle Antikörper gebildet werden (Sachs, 2012a), befindet sich nicht nur auf den fetalen Thrombozyten, sondern auch auf den Mikrovilli des Synzytiotrophoblasten, wo es bereits im 1. Trimenon exprimiert wird. Die Mikropartikel gelangen bereits in der Frühschwangerschaft in den mütterlichen Blutkreislauf und können im Gegensatz zur hämolytischen Erkrankung des Fetus und Neugeborenen bereits in der ersten Schwangerschaft eine FNAIT auslösen (Kumpel, 2008; Mueller-Eckhardt, 1989).

1.5.1.1 Genetische Komponente

Es besteht eine Assoziation zwischen der Immunisierung gegen das Merkmal HPA-1a und dem Allel HLA-DRB3*01:01 (DR52a) (Reznikoff-Etievant, 1983; Mueller-Eckhardt, 1985; Wienzek-Lischka, 2017). Dieses Allel tragen ca. 90 % der immunisierten Frauen (Kjeldsen-Kragh, 2007), jedoch eignet sich HLA-DRB3*01:01 nicht als Screening-Parameter, um eine FNAIT zu diagnostizieren, da der positive prädiktive Wert mit ca. 30 - 35 % gering ist (Williamson, 1998; Maslanka, 2003). Es kann auch keine Vorhersage über den Verlauf der FNAIT in Bezug auf den Schweregrad getroffen werden (Wienzek-Lischka, 2017).

1.5.1.2 Diaplazentarer IgG-Transport

Die von der Mutter gebildeten thrombozytären Alloantikörper gehören der Klasse IgG an, weshalb diese die Plazentaschranke durchqueren und in den fetalen Kreislauf gelangen können. Dies geschieht aktiv mithilfe des neonatalen Fc-Rezeptors (FcRn), welcher auf dem Synzytiotrophoblasten exprimiert wird (Kumpel, 2012a; Leach, 1996; Simister, 1996). Die Antikörper gelangen bereits vor der 20. SSW in den fetalen

Blutkreislauf (Bussel, 1997) und können früh eine FNAIT auslösen, da thrombozytäre Antigene schon in der 16. SSW exprimiert werden (Gruel, 1986).

1.5.1.3 Antikörperspezifität und Assoziation zum klinischen Verlauf

Antikörper gegen das Merkmal HPA-1a lösen am häufigsten eine FNAIT aus (ca. 75 % der Fälle) (Sachs, 2012a). Auch schwerwiegende Komplikationen wie intrazerebrale Blutungen werden am häufigsten durch diesen Antikörper verursacht (Tiller, 2013). Ein ursächlicher Faktor ist die Fähigkeit der Anti-HPA-1a-Antikörper, neben der Eliminierung der Thrombozyten, die Funktion der vaskulären Endothelzellen zu hemmen, was in einer verminderten Barrierefunktion der Endothelzellschicht und einer Hemmung der fetalen Angiogenese resultiert (van Gils, 2009; Santoso, 2016). Die β 3-Integrinkette wird als $\alpha\beta$ 3-Komplex auch auf Endothelzellen exprimiert, so dass vermutlich Komplex-spezifische Anti-HPA-1a-Antikörper, die an Endothelzellen binden, fetale intrakranielle Blutungen auslösen können (Santoso, 2016).

Anti-HPA-5b-Antikörper verursachen ca. 15 % aller FNAIT-Fälle (Sachs, 2012a), wobei sich jedoch, im Gegensatz zu den durch HPA-1a-AK ausgelösten Fällen, in Screening-Studien keine Assoziation zu der neonatalen Thrombozytenzahl nachweisen lässt (Panzer, 1995). Es wird vermutet, dass diese Antikörper eher zu einer Thrombozytopathie führen (Ghevaert, 2007), da Fälle beschrieben wurden, in denen Anti-HPA-5b-Antikörper mit intrazerebralen Blutungen assoziiert waren (Kaplan, 1991; Ghevaert, 2007). Eine durch HPA-3a Inkompatibilität induzierte FNAIT steht an dritter Stelle. Sie ist für ca. 1 - 2 % aller FNAIT-Fälle verantwortlich (Sachs, 2012a) und kann ebenfalls eine schwere Thrombozytopenie beim Feten auslösen (Glade-Bender, 2001). Des Weiteren können Antikörper gegen HPA-15 eine FNAIT verursachen (Ghevaert, 2007). Bei Kaukasiern lösen Antikörper gegen weitere Antigene nur in Einzelfällen eine FNAIT aus (Sachs, 2012a).

1.6 Symptomatik der FNAIT

Die plättchenspezifischen Alloantikörper führen zur Destruktion von fetalen Thrombozyten (Bakchoul, 2011). Klinisch präsentiert sich die FNAIT daher durch eine erhöhte Blutungsneigung. Betroffene Neugeborene zeigen vor allem Petechien und Hämatome. Es kann aber auch der Gastrointestinaltrakt, welches sich in Melaena und Hämatemesis äußert, betroffen sein. In seltenen Fällen kann es zu Hämoptysen, Hämaturie und retinalen Blutungen kommen (Mueller-Eckhardt, 1989). Eine der

schwerwiegendsten Komplikationen stellt die intrazerebrale Blutung dar. In der von Mueller-Eckhardt et al. durchgeführten retrospektiven Studie (n=348) waren 14 % (12 von 88 Kindern mit FNAIT) betroffen (Mueller-Eckhardt, 1989). Sie verursacht entweder schwere neurologische Folgeschäden, wie zerebrale Lähmung, schwere mentale Retardierung, Epilepsie und Blindheit, oder sie führt zum intrauterinen Fruchttod. Nur in wenigen Fällen kommen die Neugeborenen gesund auf die Welt. Die meisten intrazerebralen Blutungen treten vor dem Ende des zweiten Trimenons (vor der 28. SSW) auf und betreffen häufig bereits das Erstgeborene (Tiller, 2013).

1.7 Diagnostik der FNAIT

Bei dem Auftreten einer fetalen/neonatalen Thrombozytopenie, ist es von essentieller Bedeutung die richtige Diagnose zu stellen, um zum einen Blutungskomplikationen des Neugeborenen zu verhindern und zum anderen bei dem Vorliegen einer FNAIT Präventivmaßnahmen bei einer Folgeschwangerschaft durchführen zu können. Liegt eine isolierte Thrombozytopenie bei einem ansonsten gesunden Feten/Neugeborenen vor, ist die Verdachtsdiagnose FNAIT sehr wahrscheinlich (Knight, 2011), wobei andere Differenzialdiagnosen, wie bspw. Sepsis, disseminierte intravasale Gerinnung und Plazentainsuffizienz, auszuschließen sind. Für die Diagnosesicherung ist der Nachweis maternalen, gegen die humanen Plättchenantigene gerichteten Alloantikörper, sowie die genetische Bestätigung der fetomaternalen Inkompatibilität notwendig (Sachs, 2013).

1.7.1 Serologische Diagnostik

Der monoklonale antikörper-spezifische Immobilisationstest für plättchenspezifische Antigene (MAIPA) hat sich aufgrund seiner Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit als Testverfahren, um thrombozytäre Alloantikörper der Mutter nachzuweisen, in der serologischen Diagnostik etabliert (Kiefel, 1992; Kiefel, 1987; Campbell, 2007). Dabei werden Thrombozyten mit bekanntem Antigenmuster mit dem zu untersuchenden Serum inkubiert. Durch den Einsatz von monoklonalen, plättchenspezifischen Antikörpern, werden die Glykoproteine, welche die relevanten humanen Plättchenantigene tragen, immobilisiert. Der maternale, thrombozytäre Alloantikörper, welcher mit dem monoklonalen Antikörper und dem Glykoprotein einen trimolekularen Komplex bildet, wird mit einem Peroxidase-markierten Antihuman-IgG nachgewiesen (Kiefel, 1987). Zudem kann mittels MAIPA eine Verträglichkeitsprobe (*Crossmatch*) zwischen maternalem Serum und Zellen des Kindsvaters durchgeführt werden, wodurch

eine Detektion von seltenen thrombozytären Antigenen möglich ist (Sachs, 2012b; Kroll, 2011).

Ältere Testverfahren, wie z.B. die indirekte Plättchenimmunfluoreszenz (von dem Borne AE, 1978; Schneider, 1981), wurden aufgrund ihrer mangelnden Spezifität weitgehend verdrängt. Schwangere bilden sehr häufig Antikörper gegen paternale HLA-Klasse-I-Antigene, welche das Ergebnis von nicht-glykoproteinspezifischen Testverfahren verfälschen können (Taaning E, 2000).

1.7.1.1 Schwierigkeiten beim Nachweis plättchenspezifischer Antikörper

Bei der typischen Konstellation (Mutter: HPA-1bb, Kind: HPA-1ab), welche am häufigsten eine FNAIT auslöst, sind die thrombozytären Antikörper in ca. 10 % der Verdachtsfälle mit Standardmethoden nicht nachweisbar, da zunächst niedrig-affine Antikörper gebildet werden (Bakchoul, 2011; Socher, 2009; Mueller-Eckhardt, 1989; Kjeldsen-Kragh, 2007; Ghevaert, 2007). Durch ihre schwache Bindung an das Zielantigen gehen sie durch die mehrfach wiederholten Waschschriffe verloren. In solchen Fällen gelingt ein Nachweis unter Umständen nur mit sehr empfindlichen Methoden, wie der Oberflächenplasmonenresonanz-Technologie (Socher, 2009). Trotz des fehlenden Nachweises mittels Standardverfahren besitzen sie die Fähigkeit Thrombozyten zu zerstören und schwere Verläufe einer FNAIT auszulösen (Bakchoul, 2011). Auch Antikörper gegen das Merkmal HPA-3 sind nicht immer nachweisbar. Falsch negative Ergebnisse können durch eine lange Lagerung der Test-Thrombozyten vor Durchführung des MAIPA bedingt sein, wobei v.a. der enzymatische Abbau des Zielantigens eine Rolle spielt (Socher, 2008). Des Weiteren können Schwierigkeiten beim Nachweis von gegen HPA-15 gerichteten Antikörpern auftreten. Grund hierfür ist die schwache Expression von CD109, als Träger des HPA-15-Antigensystems, auf den Thrombozyten, wodurch beim MAIPA ebenfalls falsch negative Ergebnisse auftreten können (Ertel, 2005).

1.7.2 Genotypisierung der fetalen, humanen Plättchenantigene

Der genetische Nachweis einer fetomaternalen Inkompatibilität bzw. der wichtigsten humanen Plättchenantigene, welche in die FNAIT involviert sind (HPA-1, -3, -5, -15), hat aus o.g. Gründen (unsicherer Ausschluss einer FNAIT bei dem fehlenden Nachweis thrombozytärer Alloantikörper) in der diagnostischen Abklärung der FNAIT eine hohe Bedeutung erlangt, v.a. auch im Hinblick auf spätere Schwangerschaften. Die HPA-

Merkmale der Mutter und des geborenen Kindes lassen sich einfach und schnell mittels PCR mit sequenz-spezifischen Primern (PCR-SSP) (Cavanagh, 1997) oder *Real-time-PCR* (TaqMan®-Technologie) (Ficko, 2004) nachweisen. Bei dem Vorliegen einer Antigennegativität bei der Mutter (z.B. HPA-1bb) und dem Nachweis des korrespondierenden Antigens beim Kind (z.B. HPA-1ab) kann von einer Immunisierung ausgegangen werden, wodurch die Folgeschwangerschaft mit dem Risiko behaftet ist, dass erneut eine FNAIT auftritt, vorausgesetzt der Fetus trägt das Merkmal, gegen welches sich der maternale Antikörper richtet.

Aus diesem Grund ist es notwendig festzustellen, ob in der darauffolgenden Schwangerschaft der Fetus Antigenträger ist. Der Nachweis sollte früh, idealerweise vor der 20. SSW erfolgen, um rechtzeitig pränatale Interventionen zur Prophylaxe fetaler Blutungskomplikationen durchführen zu können. Die Genotypisierung des Fetus ist jedoch nur dann sinnvoll, wenn der Kindsvater das Merkmal trägt, gegen welches sich die maternalen Antikörper richten. Bei Heterozygotie (z.B. HPA-1ab) beträgt die Wahrscheinlichkeit 50 %, dass der Fetus das Zielantigen trägt, bei Homozygotie (z.B. HPA-1aa) ist der Fetus mit einer Wahrscheinlichkeit von 100 % Merkmalsträger. Ist der Kindsvater jedoch homozygot für das Merkmal HPA-1b, besitzt der Fetus das Zielantigen nicht, wodurch weitere diagnostische und therapeutische Maßnahmen nicht erforderlich sind.

Zunächst konnten die fetalen Blutgruppenmerkmale nur durch invasive Methoden, wie die Entnahme von Chorionzottengewebe (Chorionzottenbiopsie) oder Fruchtwasser (Amniozentese), bestimmt werden, welche mit einer erhöhten Komplikationsrate bis zum Eintreten eines Aborts einhergehen (Alfirevic, 2003; Bettelheim, 2002).

Im Jahre 1997 wurde erstmals fetale DNA in zellfreiem, maternalem Plasma nachgewiesen, wodurch die Möglichkeit für eine nicht-invasive Diagnostik geschaffen worden ist (Lo, 1997; Lo, 1998b). Daraufhin wurden Verfahren zur non-invasiven Bestimmung des fetalen *RHD*-Gens als auch des HPA-1-Status aus maternalem Plasma entwickelt (Lo, 1998a; Faas, 1998; Scheffer, 2011a; Le Toriellec, 2013).

1.8 Pränatale Therapie der FNAIT

Bei dem Vorliegen einer fetomaternalen HPA-Inkompatibilität und dem dadurch bedingten Risiko einer FNAIT besteht die Möglichkeit, die Schwangere mit intravenös verabreichten Immunglobulinen zu behandeln, wodurch das Wiederauftreten einer schweren FNAIT erfolgreich verhindert werden kann (Bussel, 1996; van den Akker, 2007).

Die Prophylaxe fetaler Blutungskomplikationen mit i.v. Immunglobulin wurde erstmals 1988 von Bussel et. al publiziert (Bussel, 1988). Durch den Einsatz der Immunglobuline konnten ausgeprägte Thrombozytopenien und intrakranielle Blutungen erfolgreich verhindert werden. Der Wirkmechanismus ist noch unklar. Diskutiert werden die Blockade des neonatalen Fc-Rezeptors (FcRn) (Simister, 1996), welcher an dem transplazentaren IgG-Transport beteiligt ist, die Hemmung der fetalen Phagozytose opsonierter Thrombozyten, sowie die Hemmung der maternalen Antikörperproduktion (Ni, 2006).

Intrauterine Thrombozytentransfusionen werden aufgrund ihrer Invasivität und der damit verbundenen Risiken meist nur noch in Ausnahmefällen eingesetzt, wenn nicht-invasive Therapieverfahren versagen (Kamphuis, 2011). Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Früh- oder Fehlgeburt beträgt ca. 1 % - 2 % je intrauteriner Transfusion, was einer kumulativen Wahrscheinlichkeit von 5 % - 8 % pro Schwangerschaft entspricht (Birchall, 2003; Rayment, 2011).

Die Prophylaxe mit i.v. Immunglobulin erfolgt bei Standardrisiko, d.h. keine intrakranielle Blutung in der Vorgeschichte, in der 20. SSW. Bei intrakranieller Blutung in der Vorgeschichte sollte die Behandlung ab der 12. - 16. SSW erfolgen. Die i.v. Immunglobulin Gabe wird wöchentlich bis zum Ende der Schwangerschaft fortgesetzt (Winkelhorst, 2017).

1.9 Herausforderungen der non-invasiven, fetalen HPA-Genotypisierung

Im Gegensatz zum nicht-invasiven Nachweis des fetalen *RHD*-Gens aus maternalem Plasma, welcher bereits in spezialisierten Laboratorien als Standardverfahren etabliert ist (Clausen, 2012; Wikman, 2012; Scheffer, 2011c), hat die non-invasive HPA-Genotypisierung des Fetus noch keinen verbreiteten Eingang in die reguläre Diagnostik gefunden. Bei einer RhD-negativen Frau kaukasischer Abstammung ist das *RHD*-Gen in der Regel nicht vorhanden (Wagner, 2000). Daher lässt sich relativ einfach der fetale *RHD*-Status auch vor dem Hintergrund eines Überschusses mütterlicher DNA im Plasma bestimmen. Die HPA-Systeme sind dagegen nur durch eine Punktmutation (*Single Nucleotide* Polymorphismus) charakterisiert (Metcalfe, 2003). Der nicht-invasive Nachweis von Punktmutationen im fetalen Genom aus maternalem Plasma ist mit den bisher beschriebenen Verfahren (z.B. TaqMan®) noch unsicher.

1.9.1 Hoher Anteil maternaler DNA

Die überwiegende Zahl, ca. 90 %, der im Plasma zirkulierenden DNA-Fragmente ist maternalen Ursprungs (Lo, 1998b; Lun, 2008). Beispielsweise stammen von insgesamt 100 Genkopien 90 Genkopien von der Mutter ab. Von den restlichen 10 fetalen Genkopien tragen 5 das mütterliche Allel und nur 5 das väterliche Allel. Die Herausforderung besteht demnach darin, die 5 Allele paternalen Ursprungs vor dem „Hintergrund“ aus 95 maternalen Allelen nachzuweisen.

1.9.2 Geringe fetale DNA-Konzentration

Die Konzentration fetaler DNA-Fragmente ist im mütterlichen Plasma sehr gering (ca. 25 - 300 Genkopien/ml) (Lo, 1998b). In manchen Fällen, insbesondere vor der 12. SSW ist fetale DNA nicht sicher nachweisbar (Daniels, 2010). Nach der Geburt verschwindet fetale DNA aus der mütterlichen Zirkulation innerhalb weniger Stunden (Lo, 1999).

1.9.3 Interne Kontrolle für das Vorhandensein fetaler DNA

Eine interne Kontrolle ist notwendig, um sicherzustellen, dass in der Plasmaprobe eine ausreichende Konzentration fetaler DNA vorhanden ist. Dies ist im Fall eines negativen Befundes wichtig: das implizierte paternale Allel könnte tatsächlich im fetalen Genom nicht vorhanden sein oder die Konzentration fetaler DNA in zellfreiem, maternalem Plasma könnte unter der Nachweisgrenze liegen. Für männliche Feten kann über den Nachweis Y-chromosomaler Sequenzen das Vorhandensein fetaler DNA zuverlässig nachgewiesen werden (Lo, 1997). Für weibliche Feten ist dies bisher nicht sicher möglich. Die bisher beschriebenen Verfahren, welche eine Kontrolle für das Vorhandensein fetaler DNA in maternalem Plasma vorstellen, sind störanfällig. Ein Schwachpunkt des von Chan et. al vorgestellten Verfahrens, bei welchem die Hypermethylierung im Promotor des Tumorsuppressorgens *RASSF1A* als Kontrolle für das Vorhandensein fetaler DNA nachgewiesen wird, besteht in einer inkompletten Verdauung der maternalen, hypomethylierten Promotorsequenzen, welche zu falsch positiven Ergebnissen führen können (Chan, 2006). Bei einem Verfahren, bei welchem biallelische Insertion/Deletion Polymorphismen als Nachweis für das Vorhandensein fetaler DNA in maternalem Plasma genutzt werden, kann eine unspezifische "Hintergrund"-Amplifikation maternaler DNA zu einem unklaren Ergebnis führen, wodurch invasive Methoden zur Klärung eingesetzt werden müssen (Page-Christiaens,

2006). Dasselbe Problem tritt bei dem Einsatz von *Short Tandem Repeats* auf (Liu, 2007). Viele publizierte Protokolle zum nicht-invasiven Nachweis des fetalen *RHD*-Gens verzichten auf den Positivnachweis fetaler DNA und nehmen eine geringe Rate falsch negativer Befunde in Kauf (Scheffer, 2011b).

1.10 Zielsetzung und Hypothese

Die FNAIT ist ein Krankheitsbild, welches schwerwiegende Folgen, wie eine intrakranielle Blutung, nach sich ziehen kann. Intrakranielle Blutungen treten in der Mehrzahl der Fälle vor der 28. SSW auf. Darüber hinaus betrifft die FNAIT im Gegensatz zur hämolytischen Erkrankung des Fetus und Neugeborenen in der Regel das Erstgeborene, wobei die Diagnosestellung nicht immer sicher gelingt (siehe oben). Diese ist allerdings von immenser Bedeutung, besonders im Hinblick auf Folgeschwangerschaften, da diese mit dem Risiko behaftet sind, dass erneut eine FNAIT auftritt, sofern der Fetus Antigenträger ist. Da der sichere Nachweis der maternalen Alloantikörper nicht immer möglich ist, hat die Genotypisierung in der diagnostischen Abklärung der FNAIT eine hohe Bedeutung erlangt. Zudem ist diese notwendig, um in der Folgeschwangerschaft nicht-invasiv, respektive ohne Risiken den fetalen HPA-Status feststellen zu können. Trägt der Fetus ein Antigen, gegen welches sich der maternale Antikörper richtet, kann durch die frühzeitige, maternale Gabe von Immunglobulinen das Auftreten einer ausgeprägten Thrombozytopenie und deren Komplikationen beim Kind erfolgreich verhindert werden. Die nicht-invasive, pränatale HPA-Genotypisierung des Fetus hat jedoch noch keinen verbreiteten Eingang in die reguläre Diagnostik gefunden. Darüber hinaus verzichten viele publizierte Protokolle auf eine positive interne Kontrolle für das Vorhandensein fetaler DNA. Die Verfahren, welche eine Positivkontrolle vorstellen, sind störanfällig (siehe oben).

Es ist daher notwendig, ein molekulargenetisches Verfahren zu etablieren, mit dem fetale Blutgruppenmerkmale mit hoher Sensitivität vor einem hohen „Hintergrund“ maternaler DNA nachgewiesen werden können. Außerdem muss sichergestellt sein, dass im Falle eines Nichtnachweises eines vom Vater vererbten Allels in der Plasmaprobe der Schwangeren die fetale DNA-Konzentration über einem definierten Schwellenwert lag.

Hypothese

Durch „*Next-Generation-Sequencing*“ ist eine zuverlässige Bestimmung fetaler Blutgruppen an Thrombozyten (HPA-Merkmale) aus mütterlichem Plasma möglich, da bei diesem Verfahren die vorhandenen DNA-Fragmente klonal amplifiziert und sequenziert werden. Dies ermöglicht ein quantitatives „Auszählen“ der vorhandenen Allele sowie eine Bestimmung der fraktionalen fetalen DNA-Konzentration im mütterlichen, zellfreien Plasma zur Vermeidung falsch negativer Befunde.

2. Material

2.1 Geräte

| | |
|---|--|
| Agilent 2100 Bioanalyzer TM Instrument | Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA |
| DynaMag TM -2 Magnet | Invitrogen / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion Chip TM Minifuge | Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion OneTouch TM 2 System <ul style="list-style-type: none">- Ion OneTouchTM 2 Instrument- Ion OneTouchTM ES | Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion Personal Genome Machine® (PGM TM) | Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Mikrozentrifuge | Heraeus Biofuge Pico, Thermo Electron Corporation/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Mastercycler® pro S | Eppendorf, Hamburg |
| QIAvac 24 Plus Vacuum manifold | Qiagen, Hilden |
| Qubit® 2.0 Fluorometer | Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Rainin® Pipet-Lite® XLS | Rainin/Mettler Toledo, Greifensee, Zürich, Schweiz |

| | |
|----------------------------------|--|
| StepOnePlus Real Time PCR System | Applied Biosystems / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Thermoblock | Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg |
| Torrent Server | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Vakuumpumpe | Integra Biosciences TM Vacusafe TM , Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz |
| Veriti® Thermal Cycler | Applied Biosystems / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Vortexgerät | RS - VA 10, Phoenix Instrument, Garbsen |

2.2 Verbrauchsmaterialien

| | |
|-----------------------|------------------------------|
| Cell-free DNA BCT® CE | Streck, Omaha, Nebraska, USA |
| Collection Tubes | Qiagen, Hilden |
| DNA LoBind Tubes | Eppendorf, Hamburg |
| Elution Tubes | Qiagen, Hilden |

| | |
|---|---|
| Ion OneTouch™ 2 Amplification Plates | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion OneTouch™ 2 Cleaning Adapters | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion OneTouch™ ES Supplies <ul style="list-style-type: none"> - 8-well strips - Eppendorf® LoRetention Dualfilter - 300 µl , PCR pipette tips | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion OneTouch™ Reagent Tubes | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion OneTouch™ Recovery Routers | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion OneTouch™ Recovery Tubes | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion OneTouch™ Sipper Tubes | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion PGM™ OneTouch Plus Reaction Filter Assembly | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| LoBind™ Tube | Eppendorf, Hamburg |
| MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate | Applied Biosystems / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |

| | |
|--|---|
| MicroAmp TM Fast Reaction Tube with Cap | Applied Biosystems / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| MicroAmp TM Optical Adhesive Film | Applied Biosystems / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| 0.2-mL PCR Tubes | Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| QIAGEN® Mini Columns | Qiagen, Hilden |
| Sequenzierchip | Ion 314 TM Chip v2, Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Tube Extenders | Qiagen, Hilden |
| VacConnectors | Qiagen, Hilden |

2.3 Chemikalien

| | |
|------------------------|---|
| Aqua ad iniectabilia | B.Braun, Melsungen |
| Ethanol 100 % p.a. | Sigma Aldrich, München |
| 1 M NaOH | Sigma Aldrich, München |
| Nuklease-freies Wasser | Ambion/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |

2-Propanol p.a.

Sigma Aldrich, München

2.4 Gebrauchsfertige Reagenzien, Lösungen, Puffer und Kits

2.4.1 Reagenzien, Lösungen, Puffer

Agencourt® AMPure® XP Reagent

Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA

Annealing Buffer

Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific,
Waltham, Massachusetts, USA

Control Ion Sphere™ Particles

Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific,
Waltham, Massachusetts, USA

DNA Ligase

Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific,
Waltham, Massachusetts, USA

DNA-Standard, human, genomisch
(aus dem Allele SEQR® HLA
Sequencing Kit)

Abbott Laboratories, Abbott Park, Chicago,
Illinois, USA

FuPa Reagent

Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific,
Waltham, Massachusetts, USA

5X Ion AmpliSeq™ Hifi Master Mix

Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific,
Waltham, Massachusetts, USA

| | |
|---|--|
| 2X Ion AmpliSeq™ Primer Pools | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion AmpliSeq™ Sample ID Panel | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion OneTouch™ Oil | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion OneTouch™ Reaction Oil | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion OneTouch™ Wash Solution | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion PGM™ Cleaning Tablet | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion PGM™ Enrichment Beads (Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads) | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion PGM™ OT2 Recovery Solution | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion PGM™ Sequencing 200 v2 1X W3 Solution | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion PGM™ Sequencing 200 v2 dATP | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion PGM™ Sequencing 200 v2 dCTP | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |

| | |
|--|--|
| Ion PGM TM Sequencing 200 v2 dGTP | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion PGM TM Sequencing 200 v2 dTTP | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion PGM TM Sequencing 200 v2 Polymerase | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion PGM TM Sequencing 200 v2 W2 Solution | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion PGM TM Template OT2 200 Enzyme Mix | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion PGM TM Template OT2 200 Ion Sphere TM Particles | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion PGM TM Template OT2 200 PCR Reagent B | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion PGM TM Template OT2 200 Reagent Mix | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Ion Xpress TM P1 Adapter | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Library Amplification Primer Mix | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Low TE | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |

| | |
|--------------------------------------|---|
| MyOne™ Beads Wash Solution | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Neutralisationslösung | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Platinum® PCR SuperMix High Fidelity | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Puffer ACB Konzentrat | Qiagen, Hilden |
| Puffer ACL | Qiagen, Hilden |
| Puffer ACW1 Konzentrat | Qiagen, Hilden |
| Puffer ACW2 Konzentrat | Qiagen, Hilden |
| Puffer AVE | Qiagen, Hilden |
| QIAGEN Proteinase K | Qiagen, Hilden |
| Sequencing Primer | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Switch Solution | Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| TaqMan® Primer | Applied Biosystems / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |

TaqMan® Probes Applied Biosystems / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

TaqMan® Universal PCR Master Mix Applied Biosystems / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Tween™ Solution Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.4.2 Kits

Agencourt® AMPure® XP Kit Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA

Agilent High Sensitivity DNA Kit Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA

Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Ion PGM™ Template OT2 200 Kit Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts , USA

- Ion PGM™ Template OT2 Reactions 200 Kit
- Ion PGM™ Template OT2 Supplies 200 Kit
- Ion PGM™ Template OT2 Reagents 200 Kit
- Ion PGM™ Template OT2 Solutions 200 Kit

Ion PGM™ Sequencing 200 Kit v2 Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

- Ion PGM™ Sequencing Supplies 200 v2
- Ion PGM™ Sequencing Reagents 200 v2

- Ion PGM™ Sequencing Solutions 200 v2

Ion Xpress™ Barcode Adapters 1–16 Kit

Ion Torrent / Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit

Qiagen, Hilden

Qubit® dsDNA HS Assay Kit

Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

3. Methoden

I Non-invasive, pränatale, fetale *RHD*-Bestimmung aus maternalem Plasma mittels *Real-time*-PCR (TaqMan®)

Vor der Bestimmung der fetalen HPA-Merkmale aus maternalem Plasma mittels „*Next-Generation-Sequencing*“ erfolgte zunächst eine Validierung des Nachweises fetaler DNA aus zellfreiem, maternalem Plasma von Schwangeren. Hierzu wurde ein bereits etabliertes Standardverfahren zur nicht-invasiven, pränatalen Detektion des fetalen *RHD*-Status herangezogen: die *Real-time*-PCR (TaqMan®).

3.1 Prinzip *Real-time*-PCR (TaqMan®)

Bei der *Real-time* quantitativen PCR ist es, im Gegensatz zur klassischen Polymerase-Kettenreaktion, möglich in Echtzeit die DNA-Vervielfältigung direkt zu messen. Hierbei macht man sich zum einen die 5'-3'-Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase und zum anderen den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen zwei Fluoreszenzfarbstoffen zunutze (Mülhardt, 2013). Ein Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) wird mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (A1) angeregt und strahlt daraufhin die aufgenommene Energie in Form von Licht einer anderen Wellenlänge (E1) wieder ab. Anregungs- und Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffs sind für diesen charakteristisch. Bringt man ein Fluorochrom (F1) in ausreichende Nähe zu einem anderen Fluorochrom (F2), dessen Anregungsspektrum (A2) dem Emissionsspektrum des ersten Fluorochroms (E1) entspricht, wird die Energie, statt als Licht der Wellenlänge E1 abgestrahlt zu werden, direkt an Fluorochrom 2 weitergegeben, welches daraus Licht der Wellenlänge E2 produziert (Abb. 3.1). Geht die räumliche Nähe zwischen beiden Fluoreszenzfarbstoffen verloren, wird wieder Licht der Wellenlänge E1 emittiert, welches während der *Real-time*-PCR gemessen werden kann. Dadurch kann direkt beurteilt werden, in welcher räumlichen Beziehung sich beide Fluoreszenzfarbstoffe befinden (Cardullo, 1988).

Bei dem TaqMan® Prinzip wird eine fluorogene Sonde verwendet, welche aus einem Oligonukleotid besteht, an dessen beiden Enden jeweils ein Fluorochrom sitzt. An dem 5'-Ende befindet sich der sog. *Reporter* (F1), an dem 3'-Ende der sog. *Quencher* (F2). Ist das Oligonukleotid intakt, das heißt es besteht eine räumliche Nähe zwischen F1 und F2, wird vor allem Licht der Wellenlänge E2 emittiert. Wird jedoch während der Elongationsphase das Oligonukleotid durch die Exonuclease-Aktivität der Taq-

Polymerase verdaut, geht die räumliche Beziehung und somit der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer zwischen *Reporter* und *Quencher* verloren, und es wird hauptsächlich nur noch Licht der Wellenlänge E1 abgeben (Abb. 3.2). Demzufolge steigt die Lichtstärke der Wellenlänge E1 (*Reporter*) mit jedem PCR-Zyklus proportional zur synthetisierten DNA-Menge an, welche dadurch direkt gemessen werden kann (Livak, 1995).

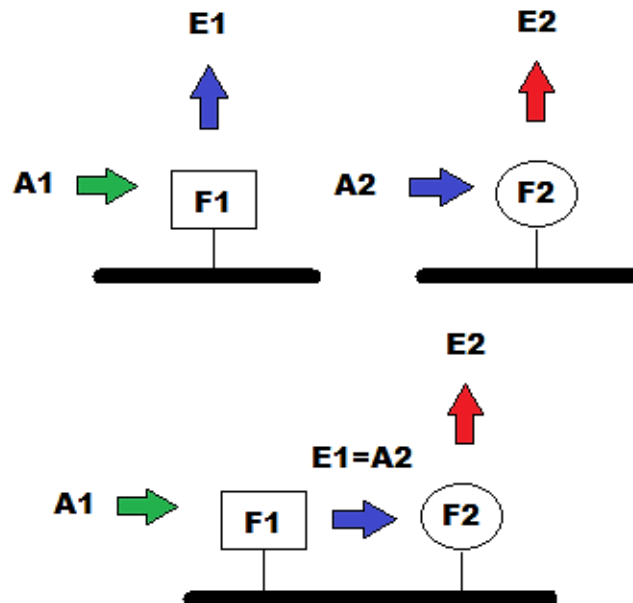


Abb. 3.1 Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET).

Das Fluorochrom 1 (F1) besitzt ein charakteristisches Anregungs- (A1) und Emissionsspektrum (E1), dasselbe gilt für das Fluorochrom 2 (F2). Entspricht das Emissionsspektrum von F1 dem Anregungsspektrum von F2 ($E1=A2$) wird die Energie von F1 direkt an F2 abgegeben, wodurch Licht der Wellenlänge E2 entsteht. Voraussetzung für diese Reaktion ist die räumliche Nähe zwischen beiden Fluorochromen. Regt man mit Licht der Wellenlänge A1 an, kann somit durch Messung von E1 direkt beurteilt werden, ob beide Fluoreszenzfarbstoffe voneinander getrennt oder benachbart sind.

3.2 Patientinnen und Proband/-innen

Für die Validierung des etablierten Testverfahrens (*Real-time-PCR* (TaqMan®)) zur fetalen *RHD*-Bestimmung aus maternalem Plasma wurde zunächst Blut von 18 RhD-positiven Blutspender/-innen (11 männlich, 7 weiblich) sowie von 5 RhD-negativen Blutspenderinnen analysiert. Im Anschluss wurden 29 RhD-negative Schwangere rekrutiert. Die Probensammlung der Schwangeren erfolgte in einer fortgeschrittenen Schwangerschaftswoche im Rahmen der Routineblutentnahme kurz vor einer elektiven

Sectio Caesarea. Der mittels *Real-time-PCR* bestimmte *RHD*-Status der Neugeborenen wurde post partum bestätigt (Tab. 4.2).

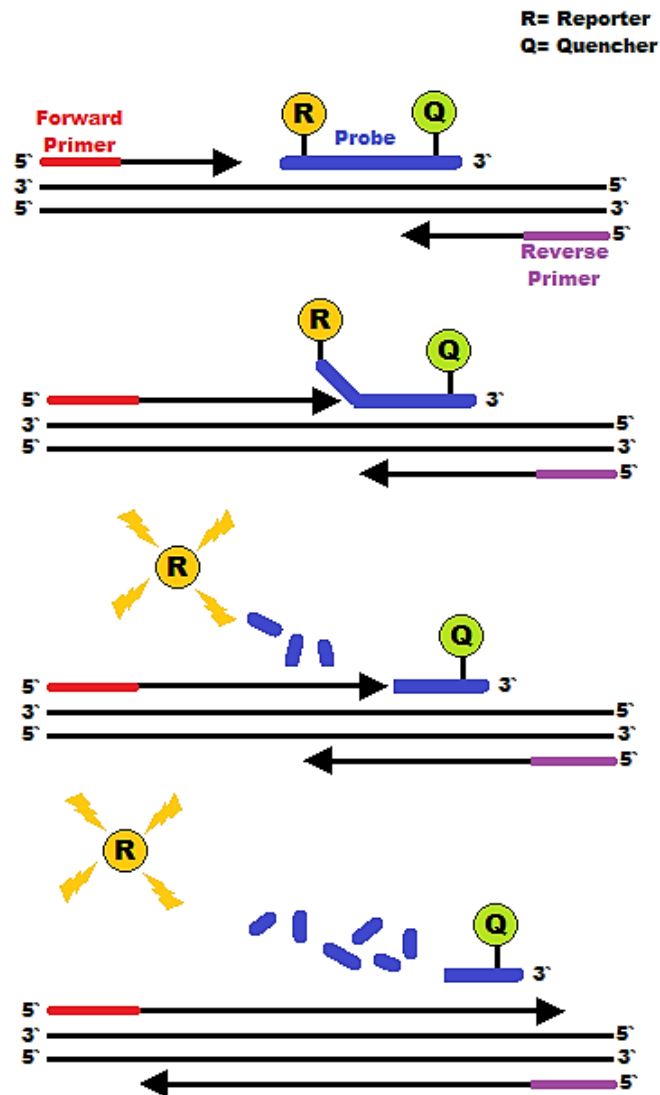


Abb. 3.2 Die TaqMan® *Real-time-PCR*.

Bei diesem Verfahren wird eine fluorogene Sonde (*Probe*) eingesetzt, welche an dem 5'-Ende einen *Reporter* und an dem 3'-Ende einen *Quencher* trägt. Sie lagert sich wie die Primer an den zu vervielfältigenden DNA-Strang an. Solange die Sonde intakt ist, wird, trotz eines gewissen Anregungsspektrums, kein Licht emittiert, da dieses von dem *Quencher* absorbiert wird. Wird jedoch das Oligonukleotid durch die 5'-3'-Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase verdaut, und der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer zwischen *Reporter* und *Quencher* verloren geht, wird Licht einer bestimmten Wellenlänge abgegeben. Die Lichtstärke steigt dabei proportional zur synthetisierten DNA-Menge an, welche dadurch direkt gemessen werden kann.

Für folgende Arbeitsschritte, von der Plasmaentnahme bis zur DNA-Amplifikation, diente die Methodik aus Scheffer et al. als Vorlage (Scheffer, 2011c).

3.3 Probenentnahme und -aufbereitung

Die Blutentnahme erfolgte mittels EDTA-Röhrchen. Die Blutproben wurden ungekühlt über den Botendienst an das Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig-Universität geliefert und innerhalb von 48 Stunden verarbeitet. Sie wurden zunächst bei Raumtemperatur für 10 min bei 1200 x g zentrifugiert. Nach Abnahme des Plasmas wurde dieses erneut für 20 min bei 2400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei - 70 °C eingefroren.

3.4 DNA-Isolation aus zellfreiem Plasma

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde die DNA unter einer *Benchtop Hood* unter Reinraumbedingungen aus dem Plasma isoliert. Es wurde das *QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit* verwendet. Dabei wurde das Protokoll „*Purification of Circulating Nucleic Acids from 1 ml, 2 ml, or 3 ml Serum or Plasma*“ befolgt. Das verwendete Plasmavolumen betrug pro Person 2 ml. Die freien, zirkulierenden DNA-Fragmente wurden dabei in vier Schritten aus dem maternalen Plasma mit Hilfe eines Vakuumsystems, dem *QIAvac 24 Plus vacuum manifold*, über eine Siliciumdioxidmembran aufgereinigt. Dadurch wurde eine parallele DNA-Isolation von bis zu 24 Proben ermöglicht. Nachfolgend wird die Aufreinigung einer Plasmaprobe mit einem Volumen von 2 ml beschrieben.

3.4.1 Lösen der Nukleinsäuren

Zu Beginn wurde das Plasma mit 200 µl QIAGEN Proteinase K (Kit) und 1,6 ml Puffer ACL (Kit) für 30 min bei 60 °C inkubiert. Durch die hohe Temperatur und die Anwesenheit der Proteinase und des Puffers wurden die DNasen und RNasen inaktiviert, sowie die an Proteine, Lipide oder Vesikel gebundenen Nukleinsäuren gelöst.

3.4.2 Adsorption der Nukleinsäuren

Dem Lysat wurde zur Optimierung der Bindungskonditionen der DNA-Fragmente 3,6 ml Puffer ACB (Gemisch von 300 ml Puffer ACB Konzentrat [Kit] und 200 ml Isopropanol) hinzugefügt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Plasmagemisch auf

eine Vakuumsäule, bestehend aus *VacConnector*, *QIAamp Mini Column* und *Tube Extender* (Kit), des *QIAvac 24 Plus vacuum manifolds* übertragen (Abb. 3.3).

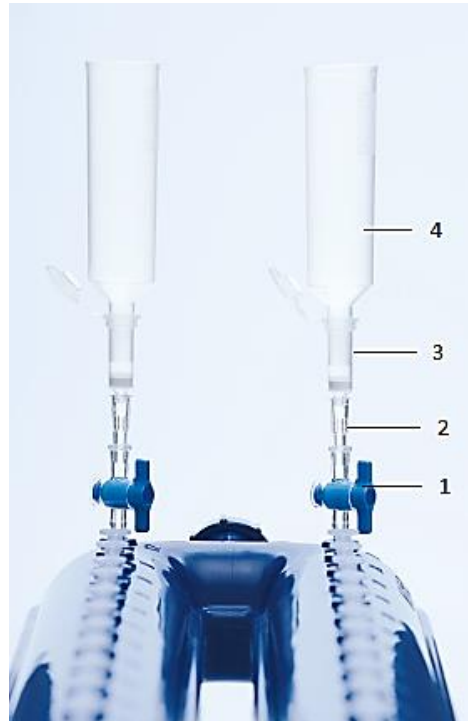


Abb. 3.3 QIAvac 24 Plus vacuum manifold.

mit Vakuumsäule, bestehend aus *VacConnector* (2), *QIAamp Mini Column* (3) und *Tube Extender* (4) (*VacValves* (1) nicht verwendet). Aus dem *QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit* Handbuch.

Mit freundlicher Genehmigung von Qiagen, © QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

Dort wurden die freien Nukleinsäuren aus dem Plasma-Puffer-Gemisch mittels Unterdruck von einer Siliciumdioxidmembran adsorbiert. Durch Salze und den erzeugten pH-Wert wurde sichergestellt, dass keine Proteine oder andere Kontaminationen, welche die nachfolgende PCR behindern könnten, an der Membran haften bleiben.

3.4.3 Entfernung von Verunreinigungen

Um alle eventuell auf der Membran verbliebenen Verunreinigungen zu entfernen, wurden drei Waschungen, ebenfalls unter Vakuum, mittels 600 µl Puffer ACW1 (Gemisch von 19 ml Puffer ACW1 Konzentrat [Kit] und 25 ml Ethanol 100 %), 750 µl Puffer ACW2 (Gemisch von 13 ml Puffer ACW2 Konzentrat [Kit] und 30 ml Ethanol 100 %) und 750 µl Ethanol 100 % durchgeführt.

3.4.4 Elution der Nukleinsäuren

Die *QIAamp Mini Columns* (Kit) wurden in ein sauberes 2 ml Reaktionsgefäß (*Collection Tube*; Kit) übertragen und 3 min bei 14.000 Umdrehungen pro Minute (UPM) zentrifugiert. Um die Siliciumdioxidmembran komplett zu trocknen, wurde nochmals eine Inkubation von 10 min bei 56 °C durchgeführt. Letztendlich wurden die gebundenen Nukleinsäuren durch Zugabe von 65 µl Puffer AVE (Kit) von der Siliciumdioxidmembran gelöst und nach einer 3-minütigen Inkubation, aufgrund eines Totvolumens von 5 µl, mindestens 60 µl reine und gesäuberte DNA eluiert (*Elution Tube*; Kit). Das Elutionsvolumen wurde so gewählt, da bei der darauffolgenden *Real-time-PCR* eine Mindestmenge von 56 µl DNA benötigt wurde. Die isolierte DNA wurde zuletzt 1 min bei 14.000 UPM zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei - 70 °C eingefroren.

3.5 Real-time-PCR (TaqMan®)

Die im vorherigen Schritt isolierte DNA wurde mittels *Real-time* Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Dabei wurde das *StepOnePlus Real Time PCR System* verwendet.

3.5.1 Auswahl der zu vervielfältigenden DNA-Abschnitte

Für die *RHD*-Bestimmung wurden wie bei Scheffer et al. *RHD* Exon 5 (Finning, 2002) und *RHD* Exon 7 (Rijnders, 2004) analysiert (Scheffer, 2011c). Bei dem Vorhandensein eines intakten *RHD*-Gens werden beide Exone erfolgreich amplifiziert. Liegt ein *RHD*-Pseudogen (*RHDψ*) oder ein *RHD-CE-Ds*-Gen vor, findet keine DNA-Amplifikation von *RHD* Exon 5 statt. Beide Gene sind häufig bei Menschen mit afrikanischer Abstammung anzutreffen (Singleton, 2000; Faas, 1997). Die PCR für *RHD* Exon 7 fällt fast bei allen *RHD*-Genen positiv aus (inklusive *RHDψ*), lediglich bei dem *RHD-CE-Ds*-Gen entsteht kein regelrechtes PCR-Produkt (Abb. 3.4). Durch die Verwendung beider *RHD* Exone werden somit falsch positive Ergebnisse bei Feten verhindert, welche ein *RHD*-Pseudogen oder ein *RHD-CE-Ds*-Gen tragen. Gleichzeitig wird dadurch auch eine *RHD*-Genotypisierung bei RhD-negativen Müttern, welche Trägerinnen dieser Varianten sind, ermöglicht (Grootker-Tax, 2006). Als Kontrolle für das Vorhandensein fetaler DNA in maternalem Plasma wurde das *SRY*-Gen amplifiziert. Zusätzlich wurde als Kontrolle für eine erfolgreiche DNA-Isolation und -Amplifikation ein Teil des *ALB*-Gens bestimmt (Scheffer, 2011c).

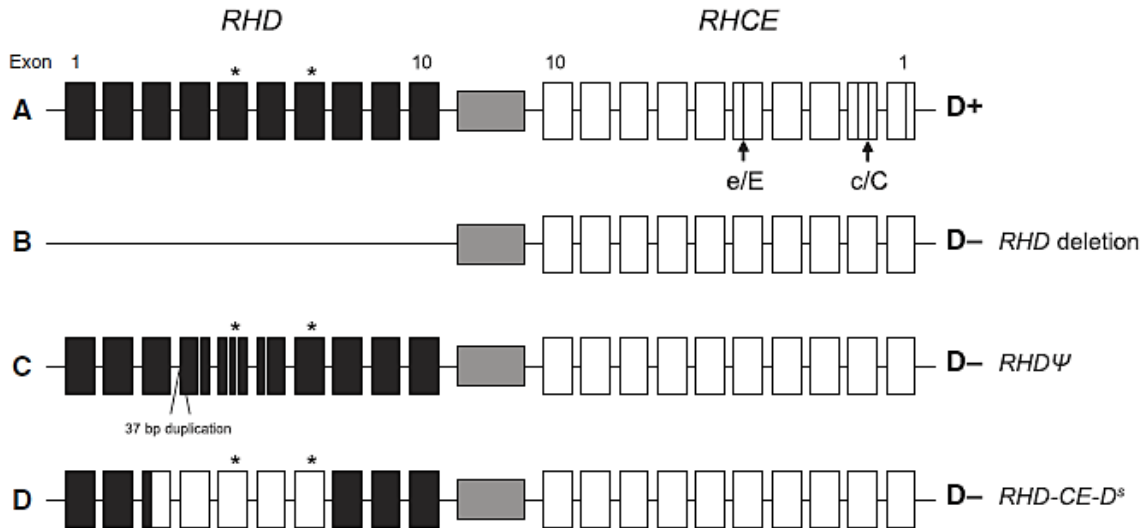


Abb. 3.4 Schematische Darstellung von vier Haplotypen des *RHD*- und *RHCE*-Gens.

(A) Bei dem Vorliegen eines intakten *RHD*-Gens werden sowohl *RHD* Exon 5 als auch *RHD* Exon 7 erfolgreich amplifiziert. (B) Bei der kompletten Deletion oder Abwesenheit des *RHD*-Gens findet keine Amplifikation statt. (C) Bei dem *RHD*-Pseudogen (*RHD* Ψ), entstanden durch Mutationen (weiße Streifen) in den Exonen 4, 5 und 6, wird nur *RHD* Exon 7 amplifiziert. (D) Bei dem *RHD*-*CE*-*D*-Hybridgen werden weder *RHD* Exon 5 noch *RHD* Exon 7 amplifiziert. Die Sternchen markieren die Exone 5 und 7. Die schwarzen Streifen im *RHCE*-Gen entsprechen *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs). Die *RHD* Exone sind als schwarze Kästchen, die *RHCE* Exone als weiße Kästchen dargestellt. Aus Scheffer, 2011c.

Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons: BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology; PG Scheffer, CE van der Schoot, GCML Page-Christiaens, et al. Noninvasive fetal blood group genotyping of rhesus D, c, E and of K in alloimmunised pregnant women: evaluation of a 7-year clinical experience; © 2011 The Authors BJOG An International Journal of Obstetrics and Gynaecology © 2011 RCOG.

3.5.2 Primer und Sonden

Für die *Real-time*-PCR (TaqMan®) wurden maßgeschneiderte TaqMan® Primer (jeweils zwei pro Zielregion, vorwärts und rückwärts) und TaqMan® Sonden (*Probes*) (Tab. 3.1) verwendet. Die TaqMan® Sonden wurden bereits markiert geliefert, wobei für alle Sonden TAMRA als *Quencher* verwendet wurde. Die fluorogene Sonde für *RHD* Exon 5 wurde mit dem *Reporter* „VIC“, die Sonde für *RHD* Exon 7 mit „FAM“ markiert, wodurch beide *RHD* Exone per Duplex-PCR analysiert werden konnten. Die *Albumin*- und *SRY*-Sonden wurden beide mit dem *Reporter* „FAM“ markiert und einzeln analysiert (Scheffer, 2011c; *Supplementary Information*).

3.5.3 Durchführung der Real-time-PCR (TaqMan®)

Alle Arbeiten wurden zur Vermeidung von Kontaminationen in einer PCR-Workstation durchgeführt, welche vor dem Gebrauch mit UV-Licht dekontaminiert wurde. Es wurden ausschließlich spezielle PCR-Verbrauchsmaterialien verwendet, wie die *MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate* und der *MicroAmp™ Optical Adhesive Film*.

Für *RHD* Exon 5 und Exon 7 wurde, wie bei Scheffer et al. (Scheffer, 2011c), ein Gesamtvolumen von 50 µl pro Well verwendet, welches 25 µl TaqMan® *Universal PCR Master Mix*, 10 µl extrahierte DNA, insg. 3 µl TaqMan® Primer und Sonden (jeweils 0,5 µl) und 12 µl Aqua ad iniectabilia beinhaltet.

| TaqMan® Primer und Sonden | | |
|---------------------------|---|----------------|
| Name | Sequenz von 5' nach 3' | Allel |
| RHDex5_F | CGC CCT CTT CTT GTG GAT G | <i>D, CE</i> |
| RHDex5_R | GAA CAC GGC ATT CTT CCT TTC | <i>D</i> |
| RHDex5_P | VIC-TCT GGC CAA GTT TCA ACT CTG CTC TGC T-TAMRA | <i>D</i> |
| RHDex7_F | GGG TGT TGT AAC CGA GTG CTG | <i>D</i> |
| RHDex7_R | CCG GCT CCG ACG GTA TC | <i>D</i> |
| RHDex7_P | FAM-CCC ACA GCT CCA TCA TGG GCT ACA A-TAMRA | <i>D</i> |
| SRY_F | TGG CGA TTA AGT CAA ATT CGC | <i>SRY</i> |
| SRY_R | CCC CCT AGT ACC CTG ACA ATG TAT T | <i>SRY</i> |
| SRY_P | FAM-AGC AGT AGA GCA GTC AGG GAG GCA GA-TAMRA | <i>SRY</i> |
| Alb_F | TGA AAC ATA CGT TCC CAA AGA GTT T | <i>Albumin</i> |
| Alb_R | CTC TCC TTC TCA GAA AGT GTG CAT AT | <i>Albumin</i> |
| Alb_P | FAM-TGC TGA AAC ATT CAC CTT CCA TGC AGA-TAMRA | <i>Albumin</i> |

F= Forward (vorwärts) Primer; R= Reverse (rückwärts) Primer; P= Probes (Sonden)

Tab. 3.1 TaqMan® Primer und Sonden.

Dargestellt sind die jeweiligen Sequenzen der verwendeten TaqMan® Primer und Sonden. Alle Sonden tragen den *Quencher* TAMRA. Die fluorogene Sonde für *RHD* Exon 5 ist mit dem *Reporter* „VIC“, die Sonde für *RHD* Exon 7 mit „FAM“ markiert, wodurch beide *RHD* Exone per Duplex-PCR analysiert werden können. Die *Albumin*- und *SRY*-Sonden sind beide mit dem *Reporter* „FAM“ markiert und werden einzeln analysiert. Modifiziert nach Scheffer, 2011c; *Supplementary Information*.

Mit freundlicher Genehmigung von M de Haas, Department of Immunohaematology Diagnostics, Sanquin Diagnostic Services, PO Box 9190, 1006 AD Amsterdam, the Netherlands.

Für *SRY* wurden ebenfalls 50 µl pro Well verwendet, bestehend aus 25 µl TaqMan® *Universal PCR Master Mix*, 10 µl extrahierte DNA, insg. 1,5 µl TaqMan® Primer und Sonden (jeweils 0,5 µl) und 13,5 µl Aqua ad iniectabilia. Bei *Albumin* wurde mit einem Reaktionsvolumen von 25 µl gearbeitet, wofür 3 µl isolierte DNA, 12,5 µl TaqMan®

Universal PCR Master Mix, insg. 0,75 µl TaqMan® Primer und Sonden (jeweils 0,25 µl) sowie 8,75 µl Aqua ad iniectabilia benötigt wurden (Tab. 3.2). Die Primer für *RHD* und *ALB* wurden bis auf eine Konzentration von 300 nM, die Sonden auf eine Konzentration von 100nM verdünnt. Für *SRY* wurde eine Konzentration von 900 nM für die Primer und 150 nM für die Sonden benötigt. *RHD* Exon 5 und Exon 7 wurden in der PCR als Triplikate, *SRY* und *Albumin* als Duplikate bestimmt. Um den Anteil der zellfreien DNA in der Probe quantifizieren zu können, wurde zusätzlich noch ein humaner, genomischer DNA-Standard (aus dem *Allele SEQR® HLA Sequencing Kit*) mitbestimmt. Dieser wurde in der Albumin-PCR jeweils als Duplikat in einer Standardreihe (15.000, 1.500, 150 pg) analysiert.

| Reagenzien | | <i>RHD</i> (µl) | | <i>SRY</i> (µl) | <i>ALB</i> (µl) |
|----------------------------------|---------|-----------------|--------|-----------------|-----------------|
| | | Exon 5 | Exon 7 | | |
| TaqMan® Primer | Forward | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,25 |
| | Reverse | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,25 |
| TaqMan® Probes | | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,25 |
| Summe | | 3 | | 1,5 | 0,75 |
| TaqMan® Universal PCR Master Mix | | 25 | | 25 | 12,5 |
| extrahierte DNA | | 10 | | 10 | 3 |
| Aqua ad iniectabilia | | 12 | | 13,5 | 8,75 |
| Endsumme | | 50 | | 50 | 25 |

Tab. 3.2 Reagenzien der *Real-time*-PCR (TaqMan®).

Dargestellt sind die jeweiligen Volumina der Reagenzien pro Well.

Pro Analysenserie wurden auch regelhaft Negativkontrollen mit Aqua ad iniectabilia statt extrahierter DNA durchgeführt, wobei die *RHD* Exone 5 und 7 auch wieder als Triplikate, *SRY* und *ALB* als Duplikate bestimmt worden sind. Alle Reagenzien wurden nacheinander, begonnen mit der zu analysierenden DNA bzw. Aqua ad iniectabilia, in die *MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate* pipettiert und mit einem *MicroAmp™ Optical Adhesive Film* abgedeckt. Anschließend wurde die PCR in dem *StepOnePlus Real Time PCR System* gestartet. Zunächst wurden die Proben für 2 min auf 50 °C und für 10 min auf 95 °C erhitzt. Danach folgten 50 Zyklen, in denen jeweils die Denaturierung (15 sec bei 95 °C), Primeranlagerung und Elongation stattfand (1 min bei 60 °C) (Scheffer, 2011c).

3.5.4 Auswertung der Ergebnisse

Jedes Replikat wurde nach einem im Voraus definierten C_T -Wert (*Cycle Threshold*) beurteilt. Der C_T -Wert gibt die Zykluszahl an, bei der sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrund abhebt. Die Vermehrung ist zu diesem Zeitpunkt noch exponentiell (Mülhardt, 2013).

Es wurde von einer erfolgreichen DNA-Isolation und -Amplifikation ausgegangen, wenn der C_T -Wert beider Replikate des *ALB*-Gens zwischen 27 und 40 lag. Lag der C_T -Wert unter 27 bestand eine zu hohe Kontamination mit mütterlicher DNA bspw. durch Lyse der maternalen Leukozyten nach der Blutentnahme. Lag nur eines der Replikate im genannten Bereich, wurde die Probe nicht gewertet. Das Vorhandensein fetaler DNA in der Plasmaprobe wurde durch den Nachweis des *SRY*-Gens sichergestellt. Diese Kontrolle war allerdings nur bei männlichen Feten möglich. Dafür musste der C_T -Wert für beide Replikate zwischen 28 und 40 liegen. Lag der C_T -Wert nur eines Replikats im genannten Bereich, wurde die Probe nicht in die Auswertung miteinbezogen („Ergebnis indeterminiert“). Wurden keine Replikate erstellt (0/2) oder befand sich der C_T -Wert beider Replikate außerhalb dieses Bereichs lag die Konzentration fetaler DNA unter der Nachweisgrenze oder es handelte sich um einen weiblichen Fetus. Lagen die C_T -Werte von 2/3 bzw. 3/3 Replikaten bei *RHD* Exon 5 und *RHD* Exon 7 zwischen 28 und 40 wurde von einem RhD-positiven Fetus ausgegangen („Ergebnis positiv“). Lag der C_T -Wert nur bei einem Replikat (1/3) im genannten Bereich, wurde die Probe nicht gewertet („Ergebnis indeterminiert“). Wurden keine Replikate erstellt (0/3) oder befanden sich bei *RHD* Exon 5 und 7 die C_T -Werte aller drei Replikate außerhalb dieses Bereiches, wurde davon ausgegangen, dass kein *RHD*-Gen vorhanden oder ein *RHD-CE-Ds*-Gen vorlag („Ergebnis negativ“). Wichen die Ergebnisse von *RHD* Exon 5 und *RHD* Exon 7 voneinander ab, wurde die Probe nicht gewertet („Ergebnis indeterminiert“).

II Non-invasive, pränatale Bestimmung fetaler, humaner Plättchenantigene (HPA-1, -3, -5 und -15) aus maternalem Plasma mittels „Next-Generation-Sequencing“ (NGS)

3.6 Prinzip Ionen-Halbleiter-Sequenzierung (*massively parallel sequencing*)

Ein Halbleiter-basiertes Sequenzierungssystem wurde erstmals von Ion Torrent* vorgestellt, das sogenannte *Ion Personal Genome Machine® (PGM™) System*. Dieses Verfahren beruht auf folgendem Prinzip: Beim Anhängen eines Nukleotids an einen DNA-Strang wird neben Pyrophosphat auch immer ein Proton frei. Das freiwerdende Proton führt dabei zu einer pH-Änderung in der Umgebung, welche von einem Halbleiter-Chip gemessen wird (Abb. 3.5) (Rothberg, 2011). Die pH-Verschiebung ist direkt proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide. Werden bspw. zwei Nukleotide integriert, kommt es zur Freisetzung von zwei Protonen, was eine doppelt so starke pH-Verschiebung auslöst als bei dem Einbau eines einzigen Nukleotids (Abb. 3.6). Da bei einer Analysenserie die Nukleotide schrittweise bereitgestellt werden und bekannt sind, kann die Basenabfolge direkt bestimmt werden. Diese Methode wird auch *massively parallel sequencing* genannt, da nicht nur eine Sequenzierungsreaktion, sondern mehrere Millionen gleichzeitig ablaufen. Dies wird durch den Aufbau des Halbleiter-Chips ermöglicht. In seinem Inneren befinden sich Millionen Wells, deren Größe so gewählt ist, dass genau ein DNA-Fragment, gebunden an ein Kügelchen (*Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ Particle*), ein Well besetzen kann. Unter jedem Well befindet sich eine ionensensitive Schicht, sodass jede pH-Änderung eines einzelnen Wells separat wahrgenommen wird, wodurch eine parallele, massive Sequenzierung von Millionen unterschiedlicher DNA-Fragmente möglich ist. Durch den Einsatz von Barcodes ist es ebenfalls möglich, Merkmale von verschiedenen Personen gleichzeitig in einem Chip zu analysieren (Rothberg, 2011).

* gehört seit 2010 zu Life Technologies** (Carlsbad, Kalifornien, USA)

** gehört seit 2014 zu Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

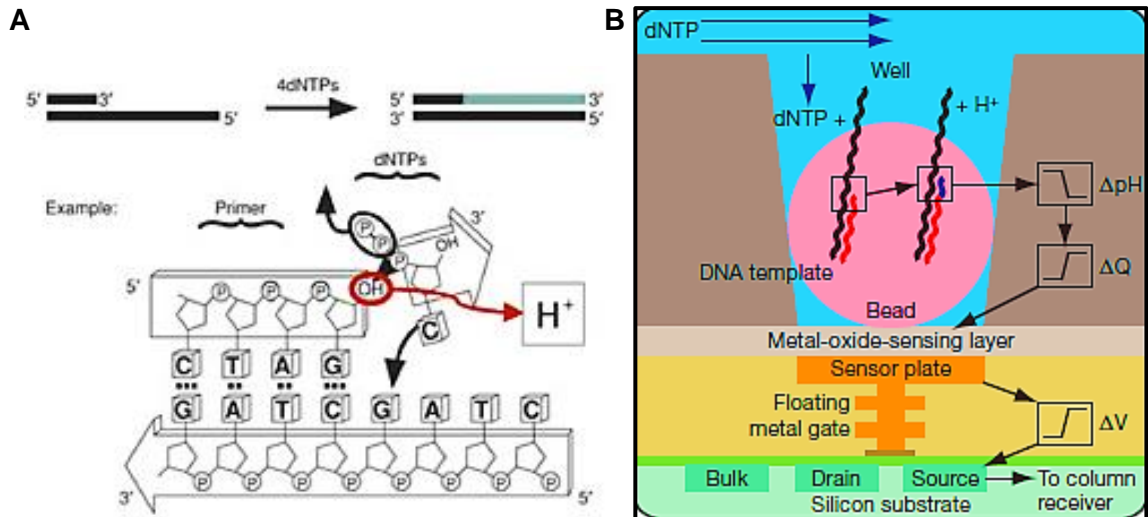


Abb. 3.5 Das Ionen-Halbleiter-Prinzip.

(A) Bei der Anlagerung eines Nucleotids an einen DNA-Strang werden immer ein Pyrophosphat und ein Proton freigesetzt. Aus Kohn, 2013. (B) Diese Tatsache macht man sich bei der Ionen-Halbleiter-Sequenzierung zunutze. Dargestellt ist ein Well, welches ein Kügelchen (*Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ Particle*) beinhaltet, an dem ein DNA-Template hängt. Das durch den Einbau eines Nucleotids freiwerdende Proton führt zu einer pH-Änderung der das Kügelchen umgebenden Lösung, welche von einer am Boden des Wells liegenden ionen-sensitiven Schicht wahrgenommen und durch eine Spannungsänderung in ein messbares Signal umgewandelt wird, wodurch die Basenabfolge direkt bestimmt werden kann. Aus Rothberg, 2011.

Mit freundlicher Genehmigung von

(A) RightsLink Permissions Springer Customer Service Centre GmbH: Springer Nature; Springer eBook: Tollefsbol T. (eds) *Biological Aging. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*; Kohn AB, Moroz TP, Barnes JP, et al. *Single-cell semiconductor sequencing*; © 2013, Springer Science Business Media, New York.

(B) Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, et al. *An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing*; CC BY-NC-SA; © 2011 Macmillan Publishers Limited, alle Rechte vorbehalten; © 2011, Springer Nature.

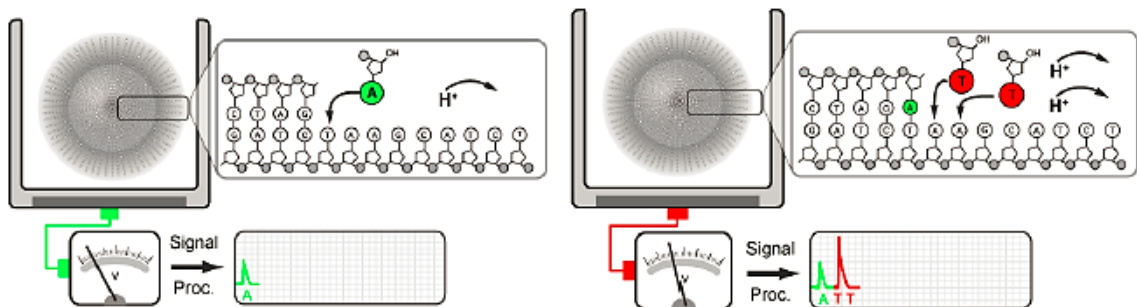


Abb. 3.6 Umwandlung der Spannungsänderung in eine Basenabfolge.

Gezeigt ist ein Kügelchen (*Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ Particle*) in einem Well, an welchem ein und dasselbe DNA-Fragment vervielfältigt gebunden ist. Während der Sequenzierung werden alle vier Nucleotide periodisch über die Wells geflutet. Bei einem erfolgreichen Einbau kommt es indirekt zu einer Spannungsänderung, welche direkt gemessen und in eine Basenabfolge übersetzt werden kann (siehe Abb. 3.5). Wie hier gezeigt, ist die Spannungsänderung abhängig von der Anzahl der angelagerten Nucleotide. Werden bspw. zwei Desoxythymidintriphosphate eingebaut (rechts), ist die Spannungsänderung doppelt so groß als bei dem Einbau eines einzigen Desoxyadenosintriphosphats (links). Nach jeder Nucleotidflutung findet eine Waschung statt, um sicherzustellen, dass alle nichtgebundenen Nucleotide entfernt werden. Aus Rothberg, 2011; *Supplementary Information*.

Mit freundlicher Genehmigung von JM Rothberg, *Ion Torrent by Life Technologies, Suite 100, 246 Goose Lane, Guilford, Connecticut 06437, USA*; CC BY-NC-SA, © 2011, Springer Nature.

3.7 Patientinnen und Proband/-innen

Für die Etablierung der non-invasiven, pränatalen Bestimmung fetaler, humaner Plättchenantigene (HPA-1, -3, -5 und -15) aus zellfreiem, maternalem Plasma mittels „Next-Generation-Sequencing“ (NGS) wurden Blutproben von 13 Schwangeren und 3 gesunden Blutspender/-innen aufbereitet.

3.8 Probenentnahme und -aufbereitung

Die Probenentnahme der Schwangeren erfolgte mittels Sammelröhrchen der Firma Streck (*Cell-free DNA BCT® CE*), welche besonders für die Entnahme, Stabilisierung sowie den Transport von zellfreier, plasmatischer DNA geeignet sind. Das *Cell-free DNA BCT® CE* enthält neben EDTA ein formaldehyd-freies, konservierendes Reagenz (Das, 2013), welches einerseits durch Stabilisierung der kernhaltigen Blutzellen ein Freiwerden von zellulärer, genomischer DNA verhindert, und andererseits den Nuklease-bedingten Abbau von zellfreier DNA inhibiert (Norton, 2013). Die Blutproben wurden ohne Kühlung über den Botendienst an das Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig-Universität geliefert und innerhalb von 24 h verarbeitet. Sie wurden, wie bei der *RHD*-Bestimmung, zunächst bei Raumtemperatur für 10 min bei 1200 x g zentrifugiert. Nach Abnahme des Plasmas wurde dieses erneut für 20 min bei 2400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei - 70 °C eingefroren.

3.9 DNA-Isolation

Die DNA-Isolation wurde wie unter Punkt 3.4 beschrieben, durchgeführt.

3.10 Erstellung der Bibliothek

Unsere gewählte Bibliothek schließt DNA-Sequenzen ein, welche humane Plättchenantigene und erythrozytäre Blutgruppenantigene kodieren. Dabei wurden zum einen die HPA-Merkmale, welche am häufigsten in die FNAIT involviert sind: *ITGB3* (HPA-1), *ITGA2B* (HPA-3), *ITGA2* (HPA-5), *CD109* (HPA-15); und zum anderen erythrozytäre Blutgruppenantigene, welche eine hämolytische Erkrankung des Fetus und Neugeborenen verursachen können: *RHD*, *RHCE*, *KEL*, *DARC*, *SLC14A1*, *GYP A*

sowie *GYPB* gewählt (Abb. 3.7). Des Weiteren wurden zusätzlich Y-chromosomale Sequenzen und 8 anonyme SNPs (*Ion AmpliSeq™ Sample ID Panel*) als interne Kontrolle für das Vorhandensein fetaler DNA miteinbezogen, um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden. Die 8 anonymen SNPs zeigen eine sehr hohe genetische Variabilität, wodurch die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Individuen, denselben Genotypus besitzen, sehr gering ist (Pakstis, 2010). Um die gewünschten DNA-Fragmente gezielt zu amplifizieren, wurde ein maßgeschneidertes *Primer Panel* (*Primer Panel I*) mittels dem *Ion AmpliSeq™ Designer* erstellt (Tab. 3.3). Mithilfe der spezifischen Primerpaare wurden die SNPs bzw. Exonsequenzen flankiert, sodass Amplikons mit einer Länge von bis zu 140 bp entstanden sind, welche nach der Amplifikation mit Adaptern versehen, angereichert und letztendlich quantifiziert worden sind. Es wurde das *Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0* verwendet und das Benutzerhandbuch '*Ion AmpliSeq™ DNA and RNA Library Preparation*' befolgt.

3.10.1 Amplifikation der Zielregionen

Um DNA-Kontaminationen zu vermeiden, wurde die Amplifikation der Zielregionen unter Reinraumbedingungen durchgeführt. Da die Kapazität des verwendeten Sequenzierungschips (*Ion 314™ Chip v2*) beschränkt ist, wurde DNA von maximal 2 Personen gleichzeitig aufbereitet. Aufgrund der Größe des *Primer Panel* war es notwendig zwei *Primer Pools* zu verwenden, wodurch pro Person immer zwei Ansätze vorbereitet wurden. Um die gewünschten DNA-Sequenzen zu amplifizieren, wurden pro Ansatz jeweils 4 µl *5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix* (Kit), 10 µl *2X Ion AmpliSeq™ Primer Pool 1* bzw. *2*, 6 µl isolierte DNA und 1 µl *20X Ion AmpliSeq™ Sample ID Panel* nacheinander in einem *MicroAmp™ Fast Reaction Tube with Cap* zusammengefügt. Das Gemisch wurde in dem *Veriti® Thermal Cycler* zunächst 2 min auf 99 °C erhitzt um die DNA-Polymerase zu aktivieren. Anschließend folgten 23 Zyklen, in denen die DNA-Denaturierung (15 sec, 99 °C), die Primeranlagerung und Elongation (4 min, 60 °C) stattfand. Die PCR-Produkte wurden bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C eingefroren.

| Humane Plättchenantigene (HPA) | | | | | | |
|--------------------------------|--------------|---------------|-----------|---------------------|------------|-----------|
| System | Glykoprotein | Gen | Phänotyp | Nukleotid austausch | dbSNP | Chromosom |
| HPA-1 | GP1IIa | <i>ITGB3</i> | HPA-1a/b | 1761>C | rs5918 | chr17 |
| HPA-3 | GP1Ib | <i>ITGA2B</i> | HPA-3a/b | 2621T>G | rs5911 | chr17 |
| HPA-5 | GP1a | <i>ITGA2</i> | HPA5-a/b | 1600G>A | rs1801106 | chr5 |
| HPA-15 | CD109 | <i>CD109</i> | HPA-15a/b | 2108C>A | rs10455097 | chr6 |

<http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/>

| Erythrozytäre Blutgruppenantigene | | | | | | |
|-----------------------------------|----------------|----------------------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------------|
| System | Gen | Phänotyp | Nukleotid austausch | dbSNP | Chromosom | Position (hg19) |
| RH | | | | | | |
| Exon 2 | <i>RHCE</i> | C/c | 307T>C | rs676785 | chr1 | 25735202 |
| Exon 5 | <i>RHCE</i> | E/e | 676C>G | rs609320 | chr1 | 25717365 |
| FY | <i>DARC</i> | Fy ^a /Fy ^b | 125G>A | rs12075 | chr1 | 159175354 |
| FY | <i>DARC</i> | Fy(a-b-) | -67T>C | rs2814778 | chr1 | 159174683 |
| MNS | <i>GYP A</i> | MIN | 59C>T | rs7682260 | chr4 | 145041720 |
| MNS | <i>GYP B</i> | S/s | 143T>C | rs7683365 | chr4 | 144920596 |
| KEL | <i>KEL</i> | K/k | 578T>C | rs8176058 | chr7 | 142655008 |
| JK | <i>SLC14A1</i> | JK ^a /JK ^b | 838G>A | rs1058396 | chr18 | 43319519 |
| RH | <i>RHD</i> | D | | | | |
| Exon 4 | | | | | chr1 | 25627459 |
| Exon 7 | | | | | chr1 | 25633133 |

<http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>

| SRY | | | |
|-----|-----------|-----------------|--|
| Gen | Chromosom | Position (hg19) | |
| SRY | chrY | 2655180 | |

| Ion AmpliSeq™ Sample ID Panel | | | | | |
|-------------------------------|----------------|---------------------|-----------|-----------|-----------------|
| SNP # | Gen | Nukleotid austausch | dbSNP | Chromosom | Position (hg19) |
| 1 | <i>ATP13A4</i> | C/T | rs6444724 | chr3 | 193207380 |
| 2 | <i>PALLD</i> | G/T | rs6811238 | chr4 | 169663615 |
| 3 | <i>ADAMTS2</i> | C/T | rs338882 | chr5 | 178690725 |
| 4 | <i>PTN</i> | C/T | rs321198 | chr7 | 137029838 |
| 5 | <i>TRDMT1</i> | C/T | rs3780962 | chr10 | 17193346 |
| 6 | <i>LEPREL2</i> | C/G | rs2269355 | chr12 | 6945914 |
| 7 | <i>RAB31</i> | A/G | rs9951171 | chr18 | 9749879 |
| 8 | <i>LARGE</i> | A/T | rs987640 | chr22 | 33559508 |

Abb. 3.7 Sequenzierte SNPs bzw. Exonsequenzen.

Dargestellt sind die SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) bzw. Exonsequenzen, welche sequenziert worden sind. Durch Verwendung eines maßgeschneiderten *Primer Panel (Single Panel (Primer Panel I))* wurden die gewünschten DNA-Sequenzen gezielt bei der Erstellung der Bibliothek amplifiziert. Die aufgeführten Zielregionen (Referenzgenom: hg19) kodieren zum einen die HPA-Merkmale, welche am häufigsten in die FNAIT (fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie) involviert sind, und zum anderen die erythrozytären Blutgruppenantigene, welche hämolytische Erkrankungen des Fetus und Neugeborenen verursachen können. Um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden, wurden zusätzlich, als interne Kontrolle für das Vorhandensein fetaler DNA, Y-chromosomale Sequenzen und 8 anonyme SNPs (*Ion AmpliSeq™ Sample ID Panel*) sequenziert.

| Primer Panel I | | |
|--|---|----------------------------------|
| Name | Sequenz von 5' nach 3' | Gen |
| SRY_F SRY_R | CATCTAGGTAGGTCTTTGTAGCCAAT CAGGTTGTACAGGGATGACTGT | <i>SRY</i> <i>SRY</i> |
| RHD_Ex7_F RHD_Ex7_R | CGGATACCAAGGGTGTGTGA CAGCAAGCTGAAGTTGTAGCC | <i>RHD</i> <i>RHD</i> |
| HPA3_rs5911_F HPA3_rs5911_R | CCTCTCCCTCCTCCCATCC GCCCTCCTCCCATTCAC | <i>ITGA2B</i> <i>ITGA2B</i> |
| RHCE E/e_Ex5_rs609320_F RHCE E/e_Ex5_rs609320_R | GCTCACCATGCTGATCTTCCT TGTGGATGTTCTGGCCAAGTG | <i>RHCE</i> <i>RHCE</i> |
| KEL_rs8176058_F KEL_rs8176058_R | CCAACTGTGTCTTCGCCAGT GCTGGCGCATCTCTGGTAAA | <i>KEL</i> <i>KEL</i> |
| JK_rs1058396_F JK_rs1058396_R | ACCCTCAGTTTCTTCCAGAAC AGGTGAGCGCCATGAACATT | <i>SLC14A1</i> <i>SLC14A1</i> |
| MNS M/N_rs7682260_F MNS M/N_rs7682260_R | ACTGAAGAAGAAGTTGAAGTGTGCAT GACTGGAGGGATGTGAGGGA | <i>GYP A</i> <i>GYP A</i> |
| MNS S/s_rs7683365_F MNS S/s_rs7683365_R | ACAATTTCTGTGAATAAAGTTAACAACA ACAACCTGTCCATCGTTTCACTGTA | <i>GYP B</i> <i>GYP B</i> |
| HPA15_rs10455097_F HPA15_rs10455097_R | TATTTTGGCTTATTTCAAATGTATCAGT GTCCTCAGAGATCACAAAACAGTAG | <i>CD109</i> <i>CD109</i> |
| RHCE C/c_Ex2_rs676785_F RHCE C/c_Ex2_rs676785_R | CAGCACTGGTCTAGACAG CCTCCTGGGAAGGTGGTCAT | <i>RHCE</i> <i>RHCE</i> |
| RHD_Ex4_F RHD_Ex4_R | AGCTCTGAACTTTCTCCAAGGACT TGCGAACACGTAGATGTGCAT | <i>RHD</i> <i>RHD</i> |
| HPA5_rs10471371_F HPA5_rs10471371_R | TTGGTAGTGTGCTGTGTTTCAGTT TGATAGTAAACAGGTAGACTCTTCCTTC | <i>ITGA2</i> <i>ITGA2</i> |
| HPA1_rs5918_F HPA1_rs5918_R | CCTGCAGGAGGTAGAGAGTC ACTCACTGGGAACCTCGATGGAT | <i>ITGB3</i> <i>ITGB3</i> |
| FY(a-b)_rs2814778_F FY(a-b)_rs2814778_R | GCCTGAGGCTTGTGCAG TTCCCCATGGCACCCTTT | <i>DARC</i> <i>DARC</i> |
| MNS S/s_rs7683365_F MNS S/s_rs7683365_R | GTTGTCCCCTTTCTCCTATAAAGCA ACTAGCTAGATGTTGAAAGTTGACCA | <i>GYP B</i> <i>GYP B</i> |
| MNS M/N_rs7682260_F MNS M/N_rs7682260_R | GATATTTCTCAGAGGCAAGAATTCCTCCAT AATTGTGGCTCCGAAATCATTITTTGT | <i>GYP A</i> <i>GYP A</i> |
| RHD_Ex4_F RHD_Ex4_R | GCAGACAGACTACCACATGAACA CTCACCCACCTTGTCTTAC | <i>RHD</i> <i>RHD</i> |
| HPA3_rs5911_F HPA3_rs5911_R | TGCGATCCCCTGTGTGAT GGTGAAGAAAGACCTGGGAAG | <i>ITGA2B</i> <i>ITGA2B</i> |
| MNS M/N_rs7682260_F MNS M/N_rs7682260_R | AACCATTGTCTGTGATGAGATGTAAC GCAATATGCTTTATGGTCCGCTCA | <i>GYP A</i> <i>GYP A</i> |
| MNS S/s_rs7683365_F MNS S/s_rs7683365_R | ACATACCTGGTACAGTGAACGATG CCGCAGAACAGTTTGATTCCAAAAT | <i>GYP B</i> <i>GYP B</i> |
| RHCE C/c_Ex2_rs676785_F RHCE C/c_Ex2_rs676785_R | CAGAAGTATCCAGCCACCA ACCTCAAATTTCCGGAGACACA | <i>RHCE</i> <i>RHCE</i> |
| KEL_rs8176058_F KEL_rs8176058_R | CGTTCCGGTTAAAGTTAAGGAAGTCCA GGCAGTAGCAGCTGTGTAAGAG | <i>KEL</i> <i>KEL</i> |
| RHD_Ex7_F RHD_Ex7_R | GATCCCCACAGCTCCATCAT CACACATTTCTTCTGAGTTGGA | <i>RHD</i> <i>RHD</i> |
| HPA5_rs10471371_F HPA5_rs10471371_R | ACCAATGTACATGAGTGACCTAAAGAAA AAATGCAAGTTAAATTACCAGTACTAAAG | <i>ITGA2</i> <i>ITGA2</i> |
| SRY_F SRY_R | TCTTGAGTGTGTGGCTTTCGT GCACAGAGAGAAATACCCGAATTATAAG | <i>SRY</i> <i>SRY</i> |
| RHCE E/e_Ex5_rs609320_F RHCE E/e_Ex5_rs609320_R | TGTTGAACATGGCATTCTTCCTTTG CTCAGACCTTTGGAGCAGGAG | <i>RHCE</i> <i>RHCE</i> |
| FY_rs12075_F FY_rs12075_R | TCCCCCTCAACTGAGAAGTCA GATGAAGAAGGGCAGTGCAGA | <i>DARC</i> <i>DARC</i> |
| MNS M/N_rs7682260_F MNS M/N_rs7682260_R | TGTGAGATATTTCTCAGAGGCAAGAATTC GGCTCCGAAATCATTITTTGTGATGTA | <i>GYP A</i> <i>GYP A</i> |

F= Forward (vorwärts) Primer; R= Reverse (rückwärts) Primer

Tab. 3.3 Primer Panel I.
Dargestellt sind die Sequenzen der maßgeschneiderten Primerpaare, welche die gewünschten SNPs bzw. Exonsequenzen flankieren, sodass Amplikons mit einer Länge von bis zu 140 bp entstehen (n=28). Einige Zielregionen (n=23) werden durch mehrere Amplikons abgedeckt.

Während der Analyse der ersten Blutproben, wurden die zu sequenzierenden Regionen noch um weitere 15 Zielregionen erweitert (Abb. 3.8), um die Wahrscheinlichkeit, fetale DNA zu detektieren, zu erhöhen. Trotz der Zunahme der zu amplifizierenden DNA-Sequenzen erhöhte sich die Anzahl der Amplikons durch technische Neuerungen nicht, sondern reduzierte sich sogar (n=27) (*Primer Panel II*, Tab. 3.4), weshalb bei der Erstellung der Bibliothek pro Person nur noch ein *Primer Pool* benötigt wurde und somit eine parallele Analyse von 4 Proben auf einem Sequenzierungschip ermöglicht wurde. Die Mengenangaben blieben unverändert, wie oben pro Ansatz beschrieben. Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden unter einer PCR-Workstation durchgeführt, welche vor dem Gebrauch mit UV-Licht dekontaminiert wurde. Es wurden ausschließlich spezielle PCR-Verbrauchsmaterialien verwendet, wie die *MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate* und der *MicroAmp™ Optical Adhesive Film*.

3.10.2 Partielle Verdauung der Primer-Sequenzen und Adapter-Ligation

Die Verwendung von Barcodes (*Ion Xpress™ Barcode Adapters 1–16 Kit*) ermöglicht eine parallele DNA-Sequenzierung von mehreren Personen in einem Chip. Vor der Barcodeligation ist es jedoch zunächst notwendig die Primer-Sequenzen teilweise zu verdauen. Jedem Ansatz wurden hierfür jeweils 2 µl *FuPa Reagent* (Kit) hinzugefügt und nach gutem Mischen in einem *Thermalcycler* (*Mastercycler® pro S*, Eppendorf™) erhitzt, zunächst auf 50 °C für 10 min, danach auf 55 °C für 10 min und letztendlich auf 65 °C für 20 min. Um anschließend die mit Barcodes versehenen Adapter an die Amplikons zu binden, wurde jedem Ansatz 4 µl *Switch Solution* (Kit), 2 µl verdünnter Barcode-Adapter-Mix und 2 µl DNA Ligase (Kit) zugegeben. Der Barcode-Adapter-Mix wurde im Voraus mit einer Verdünnung von 1:4 für jeden Adapter vorbereitet. Für zwei Ansätze wurden bspw. 1 µl *Ion Xpress™ P1 Adapter*, 1 µl *Ion Xpress™ Barcode X* (frei gewählt) und 2 µl Nuklease-freies Wasser verwendet, was eine Gesamtmenge von 4 µl ergab, und somit jeweils 2 µl pro Ansatz zur Verfügung stand. Das Gemisch wurde zur Durchführung der Ligation erneut in dem *Mastercycler® pro S*, 30 min auf 22 °C und 10 min auf 72 °C erhitzt. Die Bibliothek wurde bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C eingefroren.

3.10.3 Aufreinigung der Bibliothek

Die Aufreinigung dient dazu, die reine Bibliothek von Enzymen, wie die DNA-Polymerase oder DNA-Ligase, nicht-inkorporierten Nukleotiden und Primern, aus den Schritten zuvor zu befreien.

| Erythrozytäre Blutgruppenantigene II | | | | | |
|--------------------------------------|--------|----------------------------------|-------------|-----------|-----------------|
| System | Gen | Phänotyp | dbSNP | Chromosom | Position (hg19) |
| RH | | | | | |
| Exon 1 | RHCE | C/c | rs586178 | chr1 | 25747230 |
| DI | SLC4A1 | Wr ^s /Wr ^p | rs749883591 | chr17 | 42331947 |
| RH | RHCE | C ^w | rs138268848 | chr1 | 25747156 |
| RH | RHD | D | | | |
| Exon 4* | | | | chr1 | 25627544 |
| Exon 5 | | | | | |
| Pos. 674 [#] | | | | chr1 | 25628050 |
| Pos. 676 [#] | | | | chr1 | 25628052 |
| Pos. 697 [#] | | | | chr1 | 25628073 |
| Exon 7* | | | | chr1 | 25633172 |
| Exon 10 | | | | chr1 | 25655411 |

* andere Chromosomenposition als bei dem Primer Panel I
Basenposition

| Kontroll-SNPs | | | | | |
|---------------|------------|--------|-----------|-----------------|--|
| # | dbSNP | Gen | Chromosom | Position (hg19) | |
| 1 | rs993934 | | chr2 | 124109213 | |
| 2 | rs10092491 | FZD3 | chr8 | 28411072 | |
| 3 | rs7041158 | LINGO2 | chr9 | 27985938 | |
| 4 | rs10488710 | CADM1 | chr11 | 115207176 | |
| 5 | rs1821380 | | chr15 | 39313402 | |
| 6 | rs221956 | | chr21 | 43606997 | |

| Y-chromosomale Sequenzen | | |
|--------------------------|-----------|-----------------|
| Gen | Chromosom | Position (hg19) |
| DDX3Y | chrY | 15032232 |
| TTY2B | chrY | 9582540 |

Abb. 3.8 Ergänzung der sequenzierten SNPs bzw. Exonsequenzen.

Dargestellt sind die SNPs (Single Nucleotide Polymorphismen) bzw. Exonsequenzen, welche nachträglich mit in das Primer Design einbezogen worden sind. Durch die Zunahme der Anzahl der Zielsequenzen wurde die Wahrscheinlichkeit, paternale, fetale Allele zu detektieren, erhöht.

| Primer Panel II | | |
|--|---|----------------------------------|
| Name | Sequenz von 5' nach 3' | Gen |
| HPA3_rs5911_F HPA3_rs5911_R | TCTGCGATCCCGTTGTG GGTGGAAAGAAAGACCTGGGAAG | <i>ITGA2B</i> <i>ITGA2B</i> |
| KEL_rs8176058_F KEL_rs8176058_R | TCTGAAGAAAGGGAAATGGCCAT GTGTAAGAGCCGATCCAGACAA | <i>KEL</i> <i>KEL</i> |
| DI_rs749883591_F DI_rs749883591_R | TGTCTCTCACGTGGTGATCTGA CTTCAAGGTGTCCAACCTCTCA | <i>SLC4A1</i> <i>SLC4A1</i> |
| FY_rs12075_F FY_rs12075_R | CTCAACTGAGAAGTCAAGTCAGCT GACACTGGTGAGGATGAAGAAGG | <i>DARC</i> <i>DARC</i> |
| FY(a-b-)_rs2814778_F FY(a-b-)_rs2814778_R | CAGAACCTGATGGCCCTCATT CATACTCACCTGTGCAGACA | <i>DARC</i> <i>DARC</i> |
| HPA1_rs5918_F HPA1_rs5918_R | ACAACAATTTGTTTATGCTCCAATGTACG GCAGATTCTCCTTCAGTCCACA | <i>ITGB3</i> <i>ITGB3</i> |
| RHD_Ex4_F RHD_Ex4_R | CATCTACGTGTTCCGACGCCTAT CCATTCTGCTCAGCCCAAGTAG | <i>RHD</i> <i>RHD</i> |
| RHD_Ex5_F RHD_Ex5_R | CCTTTGGAGCAGGAGTGTGATT CGCTGACTGCTACAGCATAGTAG | <i>RHD</i> <i>RHD</i> |
| RHD_Ex7_F RHD_Ex7_R | GCTCCATCATGGGCTACAACCT TAAGGACTCTGCACACATTTCTTCC | <i>RHD</i> <i>RHD</i> |
| RHD_Ex10_F RHD_Ex10_R | GTCTTTGTAATGAGACATTTAGGCTGTTT GAGGAAGTTGCTTTGTTTTGAACAGG | <i>RHD</i> <i>RHD</i> |
| RHCE E/e_Ex5_rs609320_F RHCE E/e_Ex5_rs609320_R | CCTGCTCACCATGCTGATCTTC CGCCCTCTTCTTGTTGGATGTTT | <i>RHCE</i> <i>RHCE</i> |
| RHCE C/c_Ex2_rs676785_F RHCE C/c_Ex2_rs676785_R | GCCACCATCCCAATACCTGAAC CTTGGGCTTCTCACCCTCAAAT | <i>RHCE</i> <i>RHCE</i> |
| RHCE C/c_Ex1_rs586178_F RHCE C/c_Ex1_rs586178_R | TGTTCCAATGAACTCTCACCTTGATAG GACACAGGATGAGCTCTAAGTACC | <i>RHCE</i> <i>RHCE</i> |
| MNS S/s_rs7683365_F MNS S/s_rs7683365_R | AGTTTAAAATGGAATGACTTTTTATTCTTT GAAACCCGCAGAACAGTTTGATTTC | <i>GYPB</i> <i>GYPB</i> |
| MNS M/N_rs7682260_F MNS M/N_rs7682260_R | CGGAGCCACAATTTAAAATAAAATGAA CCTCGTTCTTAAATCCCTTTCTCAACTTC | <i>GYPB</i> <i>GYPB</i> |
| HPA5_rs10471371_F HPA5_rs10471371_R | GTTGATGTGGATAAAGACACCATTACAG AAATGCAAGTTAAATTACCAGTACTAAAG | <i>ITGA2</i> <i>ITGA2</i> |
| HPA15_rs10455097_F HPA15_rs10455097_R | GGCTTATTTCAAATGTATCAGTTCTTGG CCCAGGTCCTCAGAGATCACAA | <i>CD109</i> <i>CD109</i> |
| JK_rs1058396_F JK_rs1058396_R | TAACCTTCAATCCCACCCTCAGTTTC CATGAACATTCTCCCATTTGCAATG | <i>SLC14A1</i> <i>SLC14A1</i> |
| SRY_F SRY_R | CCATTCTTGAGTGTGTGGCTTTC ATGCACAGAGAGAAATACCCGAATTATA | <i>SRY</i> <i>SRY</i> |
| rs993934_F rs993934_R | TTGCTTTGTAAGGCAATAGAGCAAA TGGGCTAAAATTTGAATGACATTTCTTCA | |
| rs10092491_F rs10092491_R | GTGGCATTAGAAATCCAGATAGAGCT AATGACTGTTGGTTGGGAATCCA | <i>FZD3</i> <i>FZD3</i> |
| rs7041158_F rs7041158_R | AAAGGTGAATGAAGATATCAAGTGCAGA GTGAGAGTTTTCCAGTGAGAAGTGT | <i>LINGO2</i> <i>LINGO2</i> |
| rs10488710_F rs10488710_R | CAGTTTTTCATCTCATCGATCCCTCAA GTATTAGGAGTCCCACTTGTCTTTTTTC | <i>CADM1</i> <i>CADM1</i> |
| rs1821380_F rs1821380_R | GCAGAGAAGGAGCACTCTTTCC CAAGACAAGCGATTGAAAGAAGTGG | |
| rs221956_F rs221956_R | ACCCACATGGCCTTTGGTATTC GGGTCCATGCTAGAAAAGCTGAG | |
| TTY2B_F TTY2B_R | GTGTCAGCACACTGCTTACTG TTGAGGGTTATTTGGTGATAGGAACCT | <i>TTY2B</i> <i>TTY2B</i> |
| DDX3Y_F DDX3Y_R | GGTTATTTCTGTCAAGTACATTCG TCAGAATAAACAGAGCACATGCAGT | <i>DDX3Y</i> <i>DDX3Y</i> |

F= Forward (vorwärts) Primer; R= Reverse (rückwärts) Primer

Tab. 3.4 Primer Panel II.
Dargestellt sind die Sequenzen der Primerpaare des neuen Primer Designs, welches im Gegensatz zum *Primer Panel I* noch 15 weitere Zielregionen einschließt (n=38). Trotz der Zunahme der zu amplifizierenden DNA-Sequenzen erhöhte sich die Anzahl der Amplikons durch technische Neuerungen nicht, sondern reduzierte sich sogar (n=27).

Dies wurde mithilfe des *Agencourt® AMPure® XP Reagent* durchgeführt. Dieses Reagenz enthält paramagnetische Kügelchen, welche die benötigten DNA-Fragmente mithilfe eines Magnets in einem Pellet bindet. Jedem Ansatz wurde dafür jeweils 45 µl *Agencourt® AMPure® XP Reagent* hinzugefügt und nach gründlichem Mischen bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Daraufhin wurde das Gemisch in einem magnetischen Gestell (*DynaMag™-2 Magnet*) platziert, in welchem sich während einer Inkubation von 2 min, aufgrund der magnetischen Anziehungskraft, ein Pellet, welches die reine Bibliothek enthält, bildet. Nachdem der Überstand verworfen wurde, fand eine zweifache Waschung mit jeweils 150 µl eines 70 %igen Ethanols statt. Im Anschluss wurde das Pellet für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet.

3.10.4 Anreicherung der Bibliothek

Um die Bibliothek exakt quantifizieren zu können, war es zunächst notwendig diese anzureichern. Um die gewünschten DNA-Fragmente von den paramagnetischen Kügelchen zu lösen, wurde dem Pellet 50 µl *Platinum® PCR SuperMix High Fidelity* (Kit) und 2 µl *Library Amplification Primer Mix* (Kit) für die Amplifikation hinzugefügt. Nach gutem Mischen und einer erneuten 2-minütigen Inkubation in dem *DynaMag™-2 Magnet* wurden ca. 50 µl des Überstandes, welcher die gelöste Bibliothek enthält, entnommen und in einem *Thermalcycler (Mastercycler® pro S)* während 5 Zyklen, jeweils 15 sec bei 98 °C und 1 min bei 60 °C, angereichert.

3.10.5 Erneute Aufreinigung der Bibliothek

Nach der Anreicherung wurde die Bibliothek erneut in zwei Schritten gereinigt. In dem ersten Schritt wurde DNA mit hohem Molekulargewicht entfernt, sodass nur die Amplikons und Primer in der Lösung verbleiben. Für diesen Vorgang wurde jedem Ansatz 25 µl *Agencourt® AMPure® XP Reagent* hinzugefügt, eine Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur durchgeführt, und die nicht-benötigte, an die paramagnetischen Kügelchen gebundene DNA, mithilfe eines Magnets (*DynaMag™-2 Magnet*) in einem Pellet verdichtet. Um in dem zweiten Schritt die Amplikons von den Primern zu trennen, wurde dem entnommenen Überstand erneut 60 µl *Agencourt® AMPure® XP Reagent* hinzugefügt, während einer Inkubation von 5 min die gewünschten Amplikons an die paramagnetischen Kügelchen gebunden und erneut mithilfe magnetischer Anziehungskraft in einem Pellet verdichtet. Nach der Verwerfung des die Primer enthaltenden Überstandes, fand wie im vorherigen Schritt (3.10.3) eine zweifache

Waschung mit 70 %igen Ethanol statt. Nach einer Trocknung von 5 min bei Raumtemperatur wurde zuletzt, um die gewünschten Amplikons von den paramagnetischen Kügelchen zu lösen, 50 µl *Low TE* (Kit) hinzugegeben, wodurch ein Aliquot des Überstandes analysiert werden konnte.

3.10.6 Quantifizierung mittels Qubit® 2.0 Fluorometer und Agilent 2100 Bioanalyzer™ instrument

Es wurden 10 µl der angereicherten Bibliothek benötigt, um diese mit dem *Qubit® 2.0 Fluorometer* analysieren zu können. Für die Quantifizierung wurde das *Qubit® dsDNA HS Assay Kit* verwendet und die Bedienungsanleitung befolgt. Die Bibliothek wurde danach soweit verdünnt, um eine Konzentration von 100pM (pmol/l) zu erhalten. Bei der Quantifizierung mit dem *Agilent 2100 Bioanalyzer™ instrument* wurde nur 1 µl der amplifizierten Bibliothek benötigt, diese wurde im Anschluss ebenfalls bis auf eine Konzentration von 100 pM verdünnt. Hierbei wurde das *Agilent High Sensitivity DNA Kit* verwendet. Die verdünnte Bibliothek wurde anschließend bei 4 - 8 °C gelagert und innerhalb eines Monats weiterverarbeitet. Falls eine längere Lagerung von Nöten war, wurde die Bibliothek bei - 20 °C eingefroren.

3.11 Klonale Amplifikation und Anreicherung

Vor der Sequenzierung ist es notwendig die Amplikons zunächst mittels Emulsions-PCR zu amplifizieren. Die Amplifikation erfolgt in einer Öl-Emulsion, wobei ein DNA-Fragment, gebunden an ein *Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ Particle (ISP)*; ein Kügelchen, welches mit einem einzigen Primer beschichtet ist) klonal vervielfältigt wird, so dass nach der Amplifikation ein *ISP* ein und dasselbe vervielfältigte *DNA-Template* trägt (Abb. 3.9a) (Kohn, 2013). Durch die Verwendung des *Ion OneTouch™ 2 Instruments* (Abb. 3.12), ist es möglich Millionen von *DNA-Templates* gleichzeitig klonal zu amplifizieren. Ein integrierter Reaktionsfilter (Abb. 3.10) bildet Millionen von Mikroreaktoren, in denen die klonale Amplifikation stattfindet (Punkt 1 in Abb. 3.9). Dabei müssen die Mikroreaktoren nicht in einen separaten *Thermalcycler* gegeben werden, da sie automatisch auf eine eingebaute *in-line* PCR Amplifikationsplatte (Punkt 2 in Abb. 3.9) übertragen werden. Im Anschluss werden die *Template* tragenden *Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ Particles* durch eine Zentrifuge in zwei *Ion OneTouch™ Recovery Tubes* wiedergewonnen (Punkt 3 in Abb. 3.9) (Kohn, 2013). In einem zweiten Schritt erfolgt die Anreicherung der *Template*-positiven *ISPs* in dem *Ion OneTouch™ ES*

(*enrichment system*), indem diese magnetisch gebunden werden, wobei die *ISPs*, welche kein *Template* tragen, verloren gehen (Abb. 3.9b) (Kohn, 2013). Sowohl für die klonale Amplifikation als auch für die Anreicherung wurde das *Ion PGM™ Template OT2 200 Kit* verwendet und die Bedienungsanleitung befolgt.

3.11.1 Vorbereitung der Amplifikationslösung

Die in dem vorherigen Schritt pro Ansatz erstellten Bibliotheken mit einer Konzentration von 100pM wurden vor der weiteren Verwendung im gleichen Verhältnis zusammengefügt. Von dem „Bibliothek Mix“ wurden 2 µl entnommen und mit 23 µl Nuklease-freiem Wasser verdünnt, um ein Volumen von 25 µl zu erhalten. Nach einem Vortexen von 5 sec und Zentrifugieren von 2 sec wurde die verdünnte Bibliothek auf Eis gelegt. Nacheinander wurden folgende Komponenten in der vorgegebenen Reihenfolge in ein 1,5 mL *LoBind™ Tube* gegeben und mittels Pipette vermischt:

| Reihenfolge | Reagenz | Volumen |
|-------------|--|---------|
| 1 | Nuklease-freies Wasser | 25 µl |
| 2 | <i>Ion PGM™ Template OT2 200 Reagent Mix</i> | 500 µl |
| 3 | <i>Ion PGM™ Template OT2 200 PCR Reagent B</i> | 300 µl |
| 4 | <i>Ion PGM™ Template OT2 200 Enzyme Mix</i> | 50 µl |
| 5 | Verdünnte Bibliothek | 25 µl |
| - | Total | 900 µl |

Tab. 3.5 Pipettierschema klonale Amplifikation.

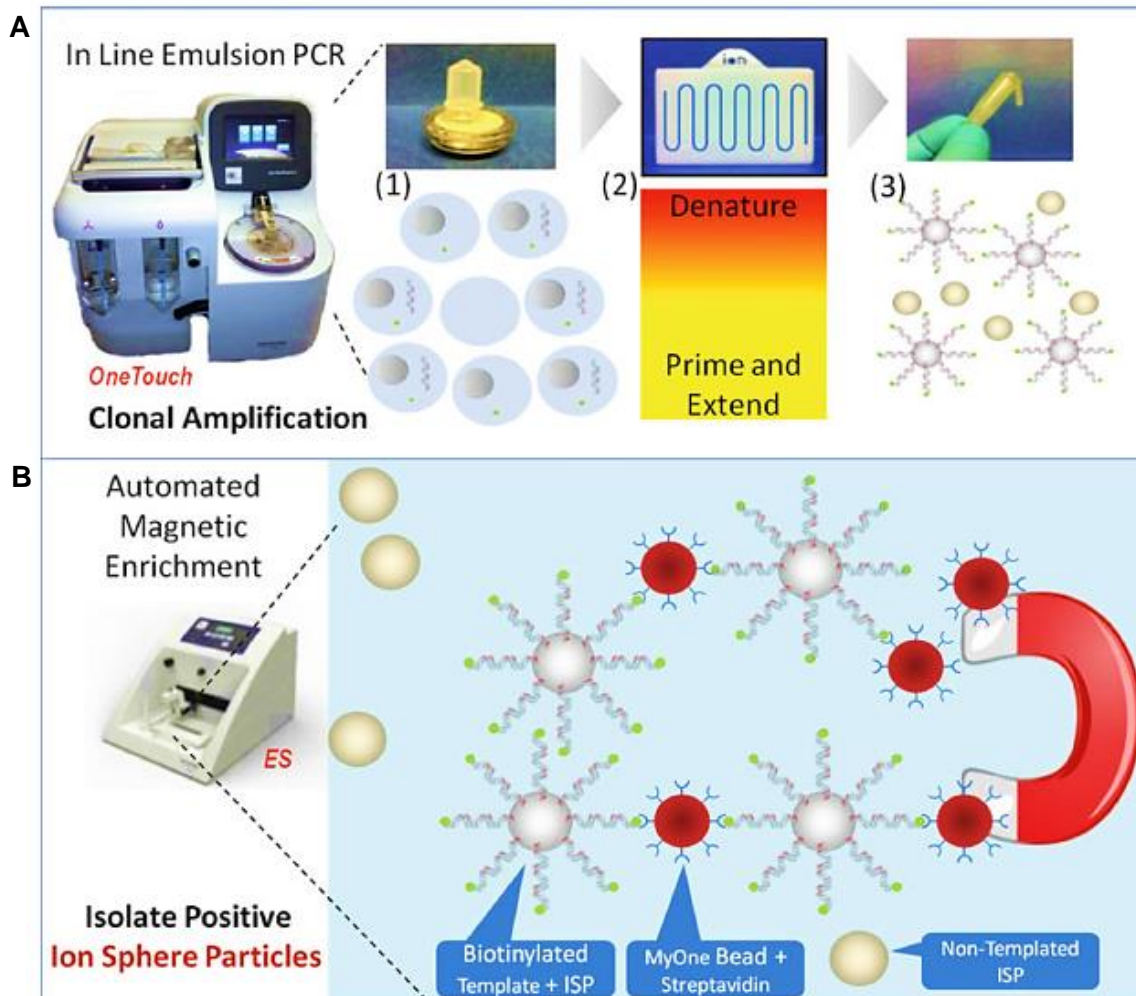


Abb. 3.9 Klonale Amplifikation und Anreicherung der Bibliothek.

(A) Die adaptergebundene Bibliothek wird mittels Emulsions-PCR klonal amplifiziert. Dabei bindet ein DNA-Fragment an ein *Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ Particle (ISP)*, so dass nach der Amplifikation ein *ISP* ein und dasselbe vervielfältigte DNA-Template trägt. Dargestellt sind die einzelnen Schritte, welche in dem *Ion OneTouch™ 2 Instrument* ablaufen. (1) Zunächst werden durch einen Reaktionsfilter Millionen von Mikroreaktoren gebildet, in welchen parallel die klonale Amplifikation stattfindet. (2) Die *In-Line* Emulsions-PCR läuft direkt im Anschluss auf einer integrierten PCR-Amplifikationsplatte ab. (3) Die *Template* tragenden *ISPs* werden am Ende durch eine ebenfalls integrierte Zentrifuge in zwei *Ion OneTouch™ Recovery Tubes* wiedergewonnen. Die grünen Punkte stellen Biotin dar, welches während der Emulsions-PCR an das 5'-Ende der DNA-Templates inkorporiert wird.

(B) In dem *Ion OneTouch™ ES* erfolgt die Anreicherung der *Template* tragenden *ISPs* mithilfe von paramagnetischen Kügelchen (große rote Punkte), an welche Streptavidin (blaue Rezeptoren) gekoppelt ist (*Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads*). Das Streptavidin bindet das Biotin, wodurch nur die *ISPs*, welche ein *Template* tragen, aussortiert werden. Die unbeladenen *Ion Sphere™ Particles* werden nicht gebunden und gehen verloren. Aus Kohn, 2013.

Mit freundlicher Genehmigung von RightsLink Permissions Springer Customer Service Centre GmbH: Springer Nature; Springer eBook: Tollefsbol T. (eds) *Biological Aging. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*; Kohn AB, Moroz TP, Barnes JP, et al. *Single-cell semiconductor sequencing*; ©2013, Springer Science Business Media, New York.

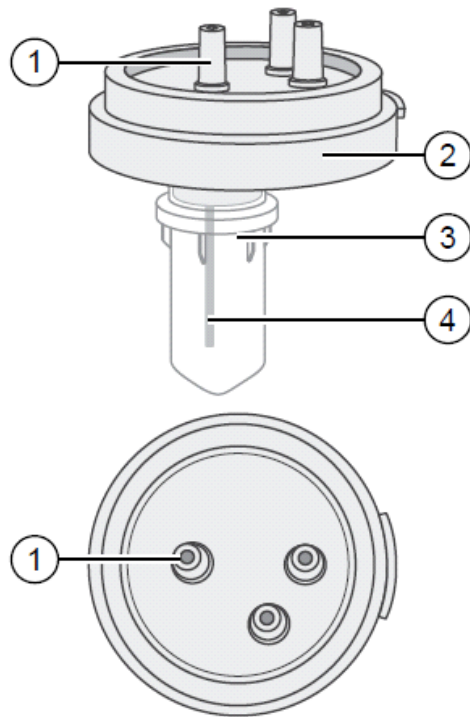
Im Anschluss wurden nach erneutem Vortexen (5 sec auf maximaler Stufe) und Zentrifugieren von 2 sec 100 µl *Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ Particles (ISPs)*, auf welchen die klonale Amplifikation stattfindet, der Amplifikationslösung hinzugefügt und auf maximaler Stufe für 5 sec gevortext. Vor der Verwendung der *ISPs* wurden diese, um die Partikel zu resuspendieren, 1 min auf maximaler Stufe gevortext, 2 sec zentrifugiert und mittels Pipette vermischt.

3.11.2 Befüllen des *Ion PGM™ OneTouch Plus Reaction Filter Assembly*

Zunächst wurde das *Ion PGM™ OneTouch Plus Reaction Filter Assembly* in einem Gestell platziert, sodass jede der drei Öffnungen nach oben zeigt (Abb. 3.10). Anschließend wurden 1000 µl der Amplifikationslösung, welche zuvor erneut für 5 sec auf maximaler Stufe gevortext, für 2 sec zentrifugiert und mittels Pipette vermischt wurde, vorsichtig senkrecht in den *Sample Port* des *Ion PGM™ OneTouch Plus Reaction Filter Assembly* pipettiert. Danach wurde auf dieselbe Weise 1,5 ml *Ion OneTouch™ Reaction Oil* hinzugegeben, welches als Öl-Emulsion für die nachfolgende Emulsions-PCR dient. Wie in Abbildung 3.11 dargestellt, wurde der Reaktionsfilter nach dem Befüllen von links nach rechts um 180° gedreht, so dass die drei Öffnungen am Ende der Drehung nach unten zeigen. Der *Sample Port* befindet sich zu Beginn auf der linken Seite (Blick von oben). In dieser Position wurde der Reaktionsfilter auf das *Ion OneTouch™ 2 Instrument* gesteckt (Punkt 1 in Abb. 3.12).

3.11.3 Klonale Amplifikation mittels Emulsions-PCR

Die klonale Vervielfältigung der *DNA-Templates* erfolgte im Anschluss auf der eingebauten *in-line* PCR Amplifikationsplatte des *Ion OneTouch™ 2 Instruments*.



- ① Sample port
- ② Ion PGM™ OneTouch Plus Reaction Filter Assembly
- ③ Ion OneTouch™ Reaction Tube
- ④ Short tubing from sample port to Ion OneTouch™ Reaction Tube

Abb. 3.10 Ion PGM™ OneTouch Plus Reaction Filter Assembly.

Darstellung des Reaktionsfilters, in welchem Millionen von Mikroreaktoren gebildet werden, wodurch eine parallele Amplifikation verschiedener DNA-Fragmente möglich ist. Aus der Bedienungsanleitung des *Ion PGM™ Template OT2 200 Kits*.

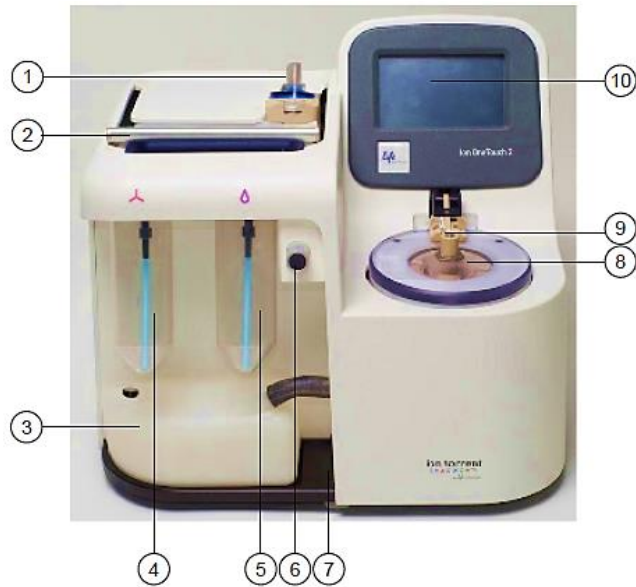
Mit freundlicher Genehmigung von Thermo Fisher Scientific; ©2015 Thermo Fisher Scientific Inc. Alle Rechte vorbehalten.



Abb. 3.11 Umdrehung des Ion PGM™ OneTouch Plus Reaction Filter Assembly.

Aus der Bedienungsanleitung des *Ion PGM™ Template OT2 200 Kits*.

Mit freundlicher Genehmigung von Thermo Fisher Scientific; ©2015 Thermo Fisher Scientific Inc. Alle Rechte vorbehalten.




- | | |
|--|---|
| ① Ion PGM™ OneTouch Plus Reaction Filter Assembly | ⑥ Pinch valve to hold disposable tubing |
| ② Clamp handle to access the Amplification Plate in the heat block | ⑦ Oil waste tray |
| ③ Waste Container | ⑧ Centrifuge to spin the Recovery Tubes and Recovery Router |
| ④ Ion OneTouch™ Oil  | ⑨ Ion OneTouch™ DL Injector Hub |
| ⑤ Ion PGM™ OT2 Recovery Solution  | ⑩ Instrument display |

Abb. 3.12 Das Ion OneTouch™ 2 Instrument.

Aus der Bedienungsanleitung des Ion PGM™ Template OT2 200 Kits.

Mit freundlicher Genehmigung von Thermo Fisher Scientific; ©2015 Thermo Fisher Scientific Inc. Alle Rechte vorbehalten.

3.11.4 Wiedergewinnung der Template-positiven Ion PGM™ Template OT2 200 ISPs

Um die Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ Particles nach der Amplifikation wieder zu erhalten, wurden diese im Ion OneTouch™ 2 Instrument (OT2 Instrument) zentrifugiert und in zwei Ion OneTouch™ Recovery Tubes aufgefangen. Anschließend wurden die Recovery Tubes mit der darin enthaltenen Ion PGM™ OT2 Recovery Lösung aus dem OT2 Instrument entfernt und in einem Gestell platziert. Jedem Recovery Tube wurde bis auf ein Volumen von jeweils 50 µl Recovery Lösung entnommen und verworfen. Um das ISP Pellet nicht zu zerstören, wurde der Überstand auf der gegenüberliegenden Seite des Pellets vorsichtig von der Oberfläche entfernt. In der restlichen Recovery Lösung wurde das ISP Pellet mittels Pipette wieder aufgelöst. Falls die gelösten ISPs beider Recovery Tubes nicht sofort weiterverarbeitet wurden, wurden diese für maximal drei Tage bei 2 °C - 8 °C gelagert. Dazu war es notwendig die gelösten ISPs in ein neues 1,5 mL LoBind™ Tube zu geben und 1 ml Ion OneTouch™ Wash

Solution hinzuzufügen. Vor der weiteren Verwendung wurden die *Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ Particles* für 2,5 min bei 15500 x g zentrifugiert und den Überstand bis auf eine Restmenge von insgesamt 100 µl entnommen. Danach wurden die *ISPs* erneut resuspendiert.

3.11.5 Anreicherung der *Template-positiven Ion Sphere™ Particles*

Die Anreicherung wurde durchgeführt, um die *Template-positiven Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ Particles* von den *ISPs* zu trennen, welche kein *Template* tragen. Dazu wurde eine 8-Well-Leiste (Abb. 3.13) mit den in Tabelle 3.6 aufgeführten Reagenzien befüllt:

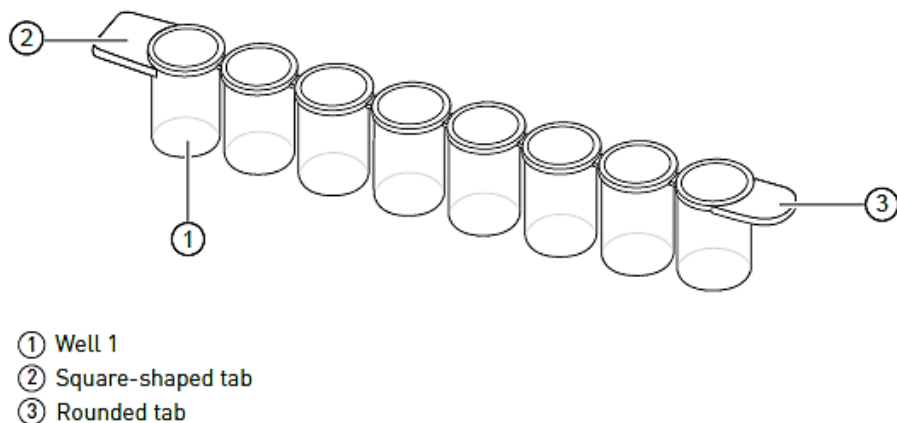


Abb. 3.13 8-Well-Leiste.

Aus der Bedienungsanleitung des *Ion PGM™ Template OT2 200 Kits*.

Mit freundlicher Genehmigung von Thermo Fisher Scientific; ©2015 Thermo Fisher Scientific Inc. Alle Rechte vorbehalten.

| | |
|--------|---|
| Well 1 | 100 µl wiedergewonnene <i>Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ Particles</i> |
| Well 2 | 130 µl resuspendierte <i>Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads</i> |
| Well 3 | 300 µl <i>Ion OneTouch™ Wash Solution</i> |
| Well 4 | 300 µl <i>Ion OneTouch™ Wash Solution</i> |
| Well 5 | 300 µl <i>Ion OneTouch™ Wash Solution</i> |
| Well 6 | Leer |
| Well 7 | 300 µl <i>Melt-Off Lösung</i> |
| Well 8 | Leer |

Tab. 3.6 Reagenzien für die Anreicherung der *Template*-positiven *Ion Sphere™ Particles*.

Die im vorherigen Schritt wiedergewonnenen *ISPs* wurden vor der Übertragung auf Well 1 mittels Pipette erneut resuspendiert.

Die *Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads* (Abb. 3.9), welche die *Template-positiven ISPs* binden, wurden vor Verwendung 30 sec gevortext, 2 sec zentrifugiert und mittels Pipette aus dem Pellet gelöst. Davon wurden 13 µl in ein neues 1,5 mL *Eppendorf LoBind™ Tube* pipettiert und in einem magnetischen Gestell (*DynaMag™-2 Magnet*) platziert, in welchem sich während einer Inkubation von 2 min aufgrund der magnetischen Anziehungskraft, erneut ein Pellet gebildet hat. Nach dem Verwerfen des Überstandes und der Zugabe von 130 µl *MyOne™ Beads Wash Solution*, wurde das Gemisch nochmals für 30 sec gevortext und 2 sec zentrifugiert. Nun wurden die in der Waschlösung resuspendierten *Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads* auf Well 2 übertragen.

Als Nächstes wurden 300 µl einer frisch zubereiteten *Melt-Off Lösung*, bestehend aus 125 mM NaOH und 0.1 % *Tween™ 20* Detergens, auf Well 7 übertragen.

Well 3,4,5 wurden mit jeweils 300 µl *Ion OneTouch™ Wash Solution* befüllt, die restlichen Wells (6 und 8) blieben unbefüllt. Nach dem Befüllen wurde die 8-Well-Leiste in dem *Ion*

OneTouch™ ES platziert. Vor dem Starten des Geräts wurden noch 10 µl Neutralisationslösung in ein 0,2 mL PCR *Tube* pipettiert, welches geöffnet in die Vertiefung des *Tip Loaders* des *Ion OneTouch™ ES* gestellt wurde (Abb. 3.14).

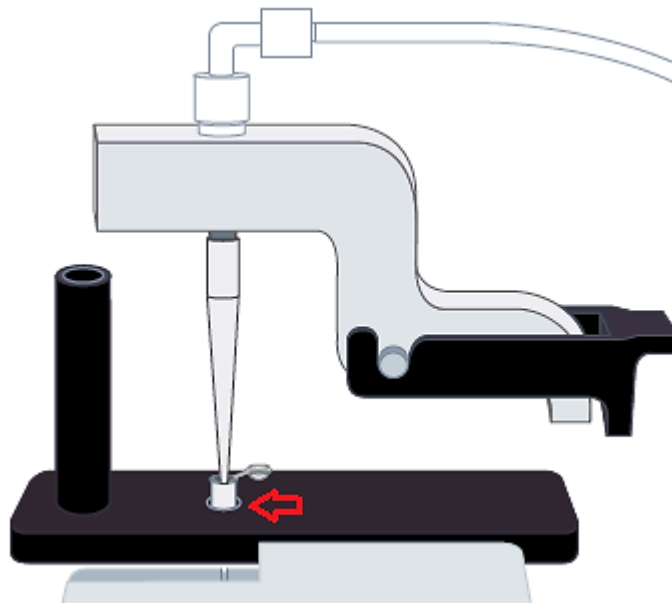


Abb. 3.14 Tip Loader (schwarz) und Tip Arm (grau) des *Ion OneTouch™ ES*.

Der Pfeil markiert die Vertiefung, in welche das mit Neutralisationslösung gefüllte 0,2 ml PCR *Tube* gestellt wird. Aus der Bedienungsanleitung des *Ion PGM™ Template OT2 200 Kits*.

Mit freundlicher Genehmigung von Thermo Fisher Scientific; ©2015 Thermo Fisher Scientific Inc. Alle Rechte vorbehalten.

In diesem 0,2 ml PCR *Tube* wurden nach der Anreicherung ausschließlich die *Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ Particles*, welche ein vervielfältigtes *Template* tragen, gesammelt. Falls nicht sofort mit der Sequenzierung fortgefahren wurde, wurden die angereicherten *ISPs* für maximal 3 Tage bei 2 °C bis 8 °C gelagert.

3.12 Ionen-Halbleiter-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde mittels der *Ion Personal Genome Machine® (PGM™)* durchgeführt, wobei das *Ion PGM™ Sequencing 200 Kit v2* verwendet und die Bedienungsanleitung befolgt wurde. Nachfolgend wird die Verwendung der Chipvariante 314™ Chip v2 (Abb. 3.15) beschrieben.

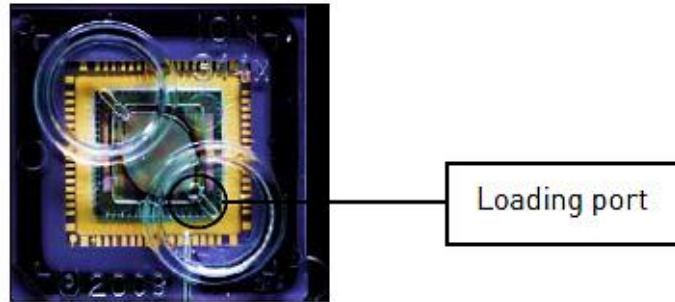


Abb. 3.15 Ion 314™ Chip v2.

Dargestellt ist der Ion 314™ Chip v2, in welchem die Ionen-Halbleiter-Sequenzierung stattfindet (*massively parallel sequencing*). Aus der Bedienungsanleitung des *Ion PGM™ Sequencing 200 Kits v2*.

Mit freundlicher Genehmigung von Thermo Fisher Scientific; © 2013 Life Technologies Corporation. Alle Rechte vorbehalten.

3.12.1 Vorbereitung der angereicherten, Template-positiven Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ Particles

Vor Beginn der Sequenzierung ist es notwendig den angereicherten *Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ Particles* noch *Control Ion Sphere™ Particles (Control ISPs)* hinzuzufügen. Der Hälfte des Volumens der im vorherigen Schritt angereicherten *ISPs*, wurden 5 µl *Control ISPs*, welche zuvor gevortext und für 2 sec zentrifugiert wurden, hinzugefügt*.

3.12.2 Anlagerung der Sequenzierungsprimer und der Polymerase

Zunächst wurde das Gemisch in dem 0,2 ml PCR *Tube* mittels Pipette vermischt und für 2 min bei 15500 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand, ohne das Pellet zu zerstören, entnommen, so dass eine Menge von 3 µl im *Tube* verblieb. Im Anschluss wurden 3 µl Sequenzierungsprimer hinzugefügt. Nach dem Auflösen des Pellets mittels Pipette, wurde das Gemisch in einem *Thermalcycler (Mastercycler® pro S)* für jeweils 2 min auf 95 °C und 37 °C erhitzt. Daraufhin wurden 1 µl *Ion PGM™ Sequencing 200 v2 Polymerase* hinzugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

*Bei Verwendung der Chipvariante 314™ Chip v2 wird nur die Hälfte des Volumens der im vorherigen Schritt angereicherten *Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ Particles* benötigt.

3.12.3 Beladung des Chips

Nach der Überprüfung der Funktionstüchtigkeit, wurde der Chip um 45° geneigt, sodass der *Loading Port* nach unten zeigt. Anschließend wurde mittels Pipette so viel Flüssigkeit, wie möglich, entfernt und verworfen. Um den Chip, vor der Beladung, komplett zu entleeren, wurde er kopfüber, wie in Abbildung 3.16 dargestellt, für 5 sec in einer *Ion Chip MiniFuge* zentrifugiert. Schließlich wurde die in Schritt 3.12.2 vorbereitete Probe (ca. 7 µl) mittels Rainin® Pipette (*Rainin® Pipet-Lite® XLS*) vorsichtig senkrecht mit einer Rate von 1 µl/sec über den *Loading Port* in den Chip pipettiert (Abb. 3.17).

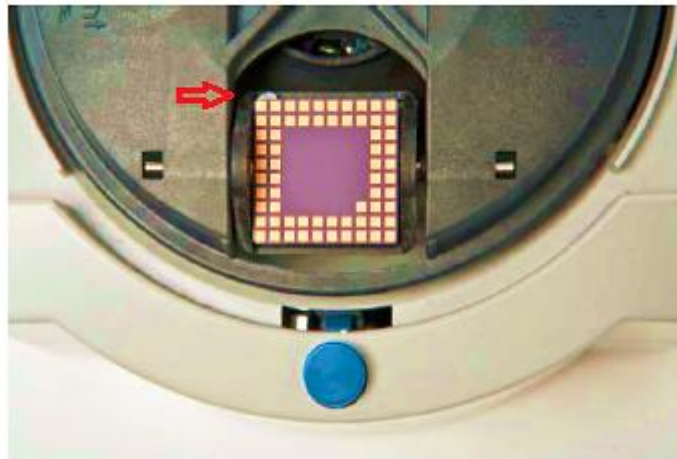


Abb. 3.16 Position des Chips in der MiniFuge.

Zur kompletten Entleerung des Chips wurde die Oberseite nach unten gedreht, so dass die Schlaufe nach innen zeigt (roter Pfeil). Aus der Bedienungsanleitung des *Ion PGM™ Sequencing 200 Kits v2*.

Mit freundlicher Genehmigung von Thermo Fisher Scientific; © 2013 Life Technologies Corporation. Alle Rechte vorbehalten.

Nach dem Beladen wurde der Chip mit der Schlaufe nach innen zeigend (nicht kopfüber) für 30 sec in der *Ion Chip MiniFuge* zentrifugiert, danach um 45° geneigt und den Inhalt mittels Pipette über den *Loading Port* drei Mal langsam auf und ab pipettiert und gemischt. Im Anschluss wurde der Chip erneut zentrifugiert, diesmal jedoch mit der Schlaufe nach außen zeigend. Das Auf- und Abpipettieren des Inhalts, sowie das Zentrifugieren (diesmal wieder mit der Schlaufe nach innen zeigend) wurden wiederholt. Um so viel Flüssigkeit, wie nur möglich zu entfernen, wurde der Chip ein weiteres Mal um 45° geneigt und den Inhalt mittels Pipette über den *Loading Port* entfernt. Bei

Verbleiben von Flüssigkeit in dem Chip, wurde er kurz, mit der Schlaufe nach außen zeigend, für 5 sec zentrifugiert und die restliche Flüssigkeit mittels Pipette entfernt.

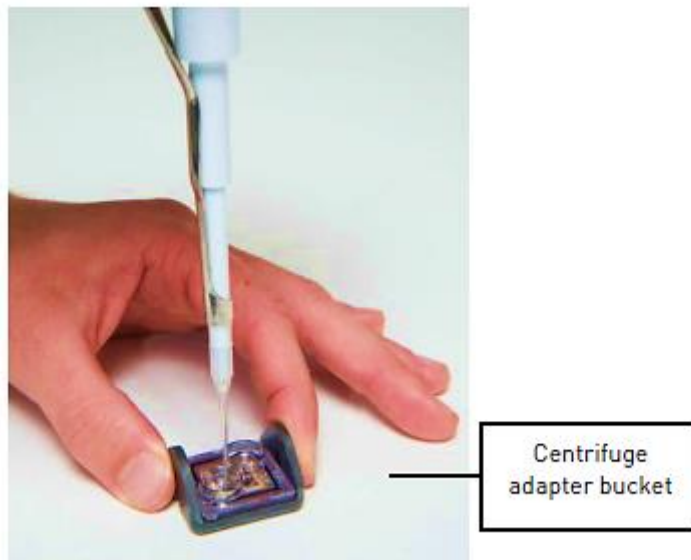


Abb. 3.17 Beladung des Chips.

Mit freundlicher Genehmigung von Thermo Fisher Scientific; © 2013 Life Technologies Corporation. Alle Rechte vorbehalten.

3.12.4 Durchführung der Sequenzierung

Um die Sequenzierung gezielt durchführen zu können, war es notwendig vor dem Ablauf folgende Einstellungen zu tätigen: Als erstes musste die Auswahl des DNA-*Templates* erfolgen, in unserem Falle wurde „Ion AmpliSeq™“ ausgewählt, da, wie unter Punkt 3.10 beschrieben, ein maßgeschneidertes *Primer Panel* mittels *Ion AmpliSeq™ Designer* erstellt wurde, wodurch eine gezielte Amplifikation der gewünschten DNA-Sequenzen möglich war. Danach wurden die verwendeten Reagenzien ausgewählt: das *Ion PGM™ Template OT2 200 Kit*, welches für die klonale Amplifikation und Anreicherung verwendet wurde, das *Ion PGM™ Sequencing 200 Kit v2* zur Vorbereitung der Sequenzierungslösung, das *Ion AmpliSeq™ Sample ID Panel*, welches als interne Kontrolle für das Vorhandensein fetaler DNA dient sowie das Barcode Set „IonXpress“, damit eine Analyse mehrerer Proben gleichzeitig möglich war. Des Weiteren war es notwendig die Anzahl der *Flows* (500), das Referenzgenom (hg19) und die verwendete Chipvariante (Ion 314™ Chip v2) festzulegen. Um eine genaue Auswertung zu gewährleisten, war es ebenfalls notwendig die gewünschten Zielregionen zu hinterlegen.

Dies erfolgte mittels den sog. *BED-Files*. Die eben genannten Einstellungen wurden auf dem Torrent Browser getätigt und gespeichert, so dass sie auf dem Bildschirm des *Ion Personal Genome Machine® (PGM™) Systems* aufgerufen werden konnten. Nach einer Überprüfung und dem Einsetzen des Chips erfolgte eine automatische Kalibrierung bevor die Sequenzierung gestartet wurde.

3.12.5 Auswertung der Daten

In dem *Ion Variant Caller*, wurden alle Zielregionen aufgeführt, bei welchen das antithetische Allel (Variante) gegenüber dem Referenzgenom (hg19) bestimmt worden ist. Hierbei konnte jedoch nur bestimmt werden, ob eine Hetero- oder Homozygotie vorliegt. Feinere Abweichungen bzw. paternale, fetale Allele konnten auf diese Weise nicht detektiert werden. Dazu war es notwendig die einzelnen *Reads* (gelesenen Sequenzen) der jeweiligen Zielregionen im *Integrative Genome Viewer* gezielt bei der Chromosomen-Position des SNPs nachzuschauen (Thorvaldsdottir, 2012) (Abb. 3.18).

3.12.5.1 Definitionen

Als *Reads* werden die bei der Sequenzierung bei einem SNP bzw. einer Exonsequenz gelesenen Sequenzen bezeichnet. Beziehen sich die *Reads* nur auf eine gelesene Base, werden sie „A Reads“, „T Reads“, „G Reads“ bzw. „C Reads“ genannt. Als unerwartete *Base Calls* werden alle gelesenen Basen bezeichnet, welche nicht dem biallelischen System eines SNPs angehören. Sie werden prozentual in Bezug auf die erreichte Gesamtanzahl der *Reads* angegeben. Es wurde angenommen, dass Sequenzen fetalen Ursprungs sind, wenn das antithetische Allel, bei Homozygotie der Mutter, mit einer Frequenz von $\geq 2\%$ der Gesamtanzahl der *Reads* bestimmt worden ist. Bei den Exonsequenzen *RHD* Exon 4, 5 und 7 wurden jegliche *Reads* unabhängig von der Anzahl als fetal interpretiert, da diese Zielregionen im Genom von RhD-negativen Schwangeren nicht präsent sind. Das Gleiche gilt für die Y-chromosomalen Sequenzen.

Der prozentuale Anteil fetaler DNA (fetale Fraktion) in maternalem Plasma lässt sich mithilfe folgender Gleichung berechnen:

$$f = \frac{2p}{p + q}$$

wobei p die Anzahl der Reads des paternalen, fetalen Allels und q die Anzahl der Reads des antithetischen Allels der Mutter, welches im Genom der Mutter und des Kindes präsent ist, darstellt (Lo, 2010).

Bei dem Nichtvorliegen einer fetomaternalen Inkompatibilität werden alle bei dem antithetischen Allel bestimmten Basen als falsch positive *Base Calls* deklariert.

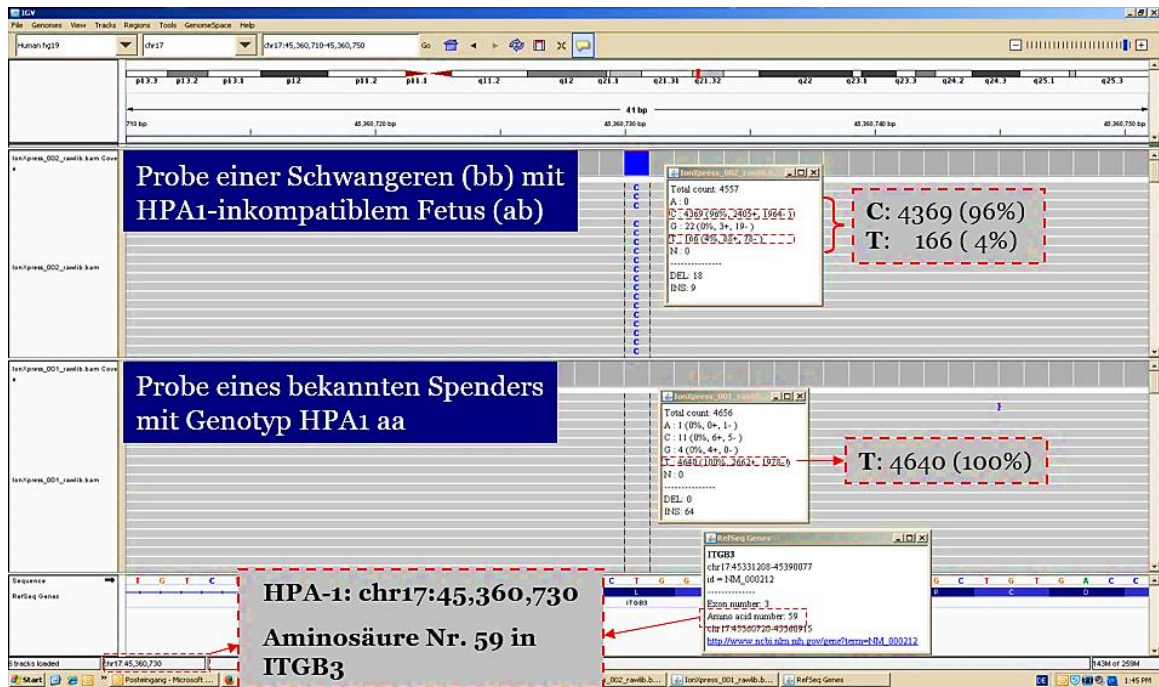


Abb. 3.18 Integrative Genome Viewer (IGV).

Dargestellt ist die Auswertung der Daten im IGV bei dem Merkmal HPA-1. Zunächst wird die Chromosomenposition des SNPs eingegeben, in diesem Fall chr17:45,360,730 (siehe Abb. 3.7). Danach werden die einzelnen Reads, welche bei der Sequenzierung bestimmt worden sind, abgelesen. Bei einer Kontrolle mit dem Genotypus HPA1aa betragen die Reads bei dem „T“ 4640 (ca. 100% der Gesamtanzahl der Reads). Bei der DNA, welche aus maternalem Plasma isoliert wurde (Mutter-Kind-Konstellation mit bestehender Inkompatibilität), betragen die bestimmten Reads bei dem „T“ lediglich 166 (ca. 4% der Gesamtanzahl der Reads), weshalb diese Sequenzen als fetal interpretiert werden (Frequenz des antithetischen Allels $\geq 2\%$ der Gesamtanzahl der Reads bei Homozygotie der Mutter). Da die im IGV angegebenen Prozentangaben gerundet sind, wurde der genaue prozentuale Anteil der Reads an der Gesamtanzahl manuell berechnet.

3.13 Ethikvotum

Diese Studie wurde von der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen genehmigt (Aktenzeichen: 178/13, 05/00). Alle beteiligten Schwangeren willigten schriftlich in die Teilnahme ein (Aufklärungsbogen und Einverständniserklärung befinden sich im Anhang).

4. Ergebnisse

I Non-invasive, pränatale, fetale *RHD*-Bestimmung aus maternalem Plasma mittels *Real-time*-PCR (TaqMan®)

4.1 Genotypisierung von *RHD* aus dem Blutplasma von RhD-positiven und -negativen Blutspender/-innen

Für die Validierung der *RHD*-Bestimmung aus dem Blutplasma mittels *Real-time*-PCR wurden zunächst 67 Proben aus dem Blutplasma von 18 RhD-positiven Personen (11 männlich und 7 weiblich) und 5 RhD-negativen Blutspenderinnen analysiert. Neun Plasmaproben konnten nicht ausgewertet werden, da die Menge der jeweils isolierten DNA für die darauffolgende Amplifikation nicht ausreichte. In zwei Fällen war die Amplifikation nicht erfolgreich, in einem Fall wurde nur eines von zwei Replikaten bei Albumin amplifiziert. Bei den restlichen Plasmaproben (n=55) wurde die DNA erfolgreich isoliert und amplifiziert.

In 51 von 55 Fällen wurde der *RHD*-Status aus zellfreier DNA mittels *Real-time*-PCR (TaqMan®) richtig positiv bzw. negativ bestimmt (Tab. 4.1).

In 46 von 49 Fällen (RhD-positive Personen) war die Amplifikation der *RHD* Exone 5 und 7 richtig positiv. Bei drei Plasmaproben eines männlichen RhD-positiven Spenders wurde nur *RHD* Exon 5 richtig positiv amplifiziert, bei *RHD* Exon 7 erfolgte entweder falsch negativ keine Amplifikation (n=2) oder es wurde nur eines von drei Replikaten amplifiziert (n=1), weshalb diese Proben nicht in die Auswertung miteinbezogen wurden („Ergebnis indeterminiert“).

In 5 von 6 Fällen (RhD-negative Personen) war die Amplifikation der *RHD* Exone 5 und 7 richtig negativ. Bei der Plasmaprobe einer RhD-negativen Spenderin war die Amplifikation der *RHD* Exone 5 und 7 falsch positiv (Tab. 4.1).

Im Falle einer Person mit weiblichem Geschlecht war die Amplifikation des *SRY*-Gens richtig negativ (n=20 Plasmaproben). Bei den Plasmaproben männlicher Spender (n=35 Plasmaproben) war in zwei Fällen die Amplifikation des *SRY*-Gens falsch negativ. In zwei weiteren Fällen wurde jeweils nur eines von zwei Replikaten des *SRY*-Gens amplifiziert, weshalb diese Proben ebenfalls nicht in die Auswertung miteinbezogen wurden (Tab. 4.1). Bei den restlichen Plasmaproben männlicher Spender (n=31 Plasmaproben) war die Amplifikation des *SRY*-Gens richtig positiv.

| Amplifikation der <i>RHD</i> Exone 5 und 7 | | | | |
|--|------------|-----------------|----------------|----------------|
| <i>RHD</i> -Status | Geschlecht | | | |
| | | Richtig Positiv | Falsch Negativ | Indeterminiert |
| RhD positiv (n=49) | w (n=14) | 14 | 0 | 0 |
| | m (n=35) | 32# | 0 | 3* |
| RhD negativ (n=6) | | Richtig Negativ | Falsch Positiv | Indeterminiert |
| | w (n=6) | 5 | 1 | 0 |
| | m (n=0) | 0 | 0 | 0 |

#: *SRY*: 1/2 Replikate, n=1
 *: *RHD Exon 7*: 0/3 Replikate, n=2; 1/3 Replikate, n=1; *SRY*: 1/2 Replikate, n=1; 0/2 Replikate, n=2

Tab. 4.1 Amplifikation der *RHD* Exone 5 und 7 aus dem Blutplasma von RhD-positiven und -negativen Blutspender/-innen.

In 46 von 49 Fällen (RhD-positive Personen) war die Amplifikation der *RHD* Exone 5 und 7 richtig positiv. Bei drei Plasmaproben eines männlichen RhD-positiven Spenders wurde nur *RHD* Exon 5 richtig positiv amplifiziert, bei *RHD* Exon 7 erfolgte entweder falsch negativ keine Amplifikation (0/3 Replikate, n=2) oder es wurde nur eines von drei Replikaten amplifiziert (n=1) („Ergebnis indeterminiert“). In den eben genannten drei Fällen wurde ebenfalls *SRY* nicht erfolgreich amplifiziert (1/2 Replikate, n=1; 0/2 Replikate, n=2) (mit * markiert). Bei einer weiteren Plasmaprobe eines männlichen RhD-positiven Spenders wurde nur eines von zwei Replikaten des *SRY*-Gens amplifiziert (mit # markiert). In 5 von 6 Fällen (RhD-negative Personen) war die Amplifikation der *RHD* Exone 5 und 7 richtig negativ. Bei allen Plasmaproben von weiblichen Spenderinnen (n=20) war die Amplifikation des *SRY*-Gens richtig negativ.

Die C_T -Werte betragen durchschnittlich 30,84 (Mittelwert, SD: 1,51, Spannweite: 28,26 - 35,90; n=45) bei *RHD* Exon 5; 32,34 (Mittelwert, SD: 1,76, Spannweite: 28,40 - 36,90; n=45) bei *RHD* Exon 7; 33,35 (Mittelwert, SD: 1,16, Spannweite: 32,10 - 36,96; n=31) bei *SRY* und 32,97 (Mittelwert, SD: 1,08, Spannweite: 30,62 - 36,85; n=50) bei Albumin. In diese Statistik wurden nur valide Werte miteinbezogen (n=50), Proben mit falsch negativer bzw. falsch positiver Amplifikation von *RHD* Exon 5 und 7 sowie *SRY* bzw. mit indeterminiertem Ergebnis wurden ausgeschlossen (Abb. 4.1).

Nachweis der DNA-Fragmente *RHD* Exon 5, *RHD* Exon 7 sowie *SRY*

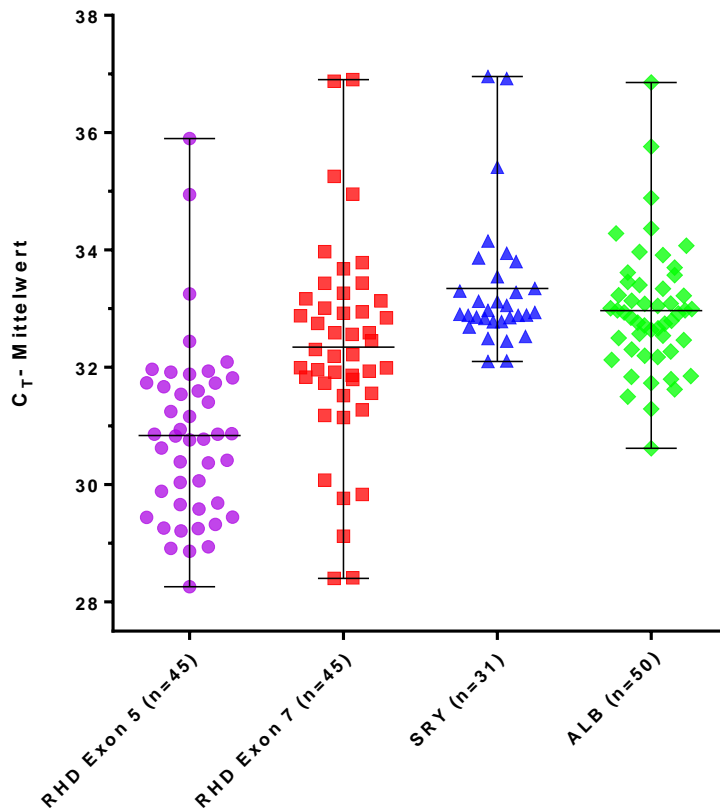


Abb. 4.1 Nachweis der DNA-Fragmente *RHD* Exon 5, *RHD* Exon 7 sowie *SRY*.

Dargestellt sind die C_T -Mittelwerte, welche aus insg. 50 Proben aus dem Blutplasma von 18 RhD-positiven Personen (11 männlich und 7 weiblich) und 5 RhD-negativen Blutspenderinnen mittels *Real-time-PCR* bestimmt worden sind. Als Kontrolle für eine erfolgreiche DNA-Isolation und Amplifikation wurde ein Teil des *ALB*-Gens bestimmt. Die DNA jeder hier aufgeführten Plasmaprobe wurde erfolgreich isoliert und amplifiziert. Im Falle einer RhD-negativen Person war die Amplifikation der *RHD* Exone 5 und 7 richtig negativ (n=5). Bei Plasmaproben von weiblichen Personen war die Amplifikation des *SRY* Gens richtig negativ (n=19). Darstellung mit dem jeweils dazugehörigen Mittelwert und der Spannweite.

4.1.1 Intra- und Inter-Assay Variabilität

Zur Bestimmung der Intra- und Inter-Assay Variabilität wurde eine Analysenserie durchgeführt. Dazu wurde die DNA aus dem Plasma jeweils einer männlichen, RhD-positiven Person 3x nacheinander am selben Tag (Intra-Assay-Variabilität) sowie an 3 verschiedenen Tagen (Inter-Assay-Variabilität) mittels *Real-time-PCR* aufbereitet. In allen Fällen wurde die DNA erfolgreich isoliert und amplifiziert. Beide *RHD* Exone 5 und

7 sowie *SRY* wurden richtig positiv amplifiziert. Der Intra-Assay Variationskoeffizient der bestimmten C_T -Mittelwerte betrug bei *RHD Exon 5* 0,07 %, bei *RHD Exon 7* 0,09 %, bei *SRY* 0,07 % und bei *Albumin* 1,51 %. Der Inter-Assay Variationskoeffizient der bestimmten C_T -Mittelwerte betrug bei *RHD Exon 5* 0,07 %, bei *RHD Exon 7* 0,28 %, bei *SRY* 2,23 % und bei *Albumin* 0,73 % (Abb. 4.2).

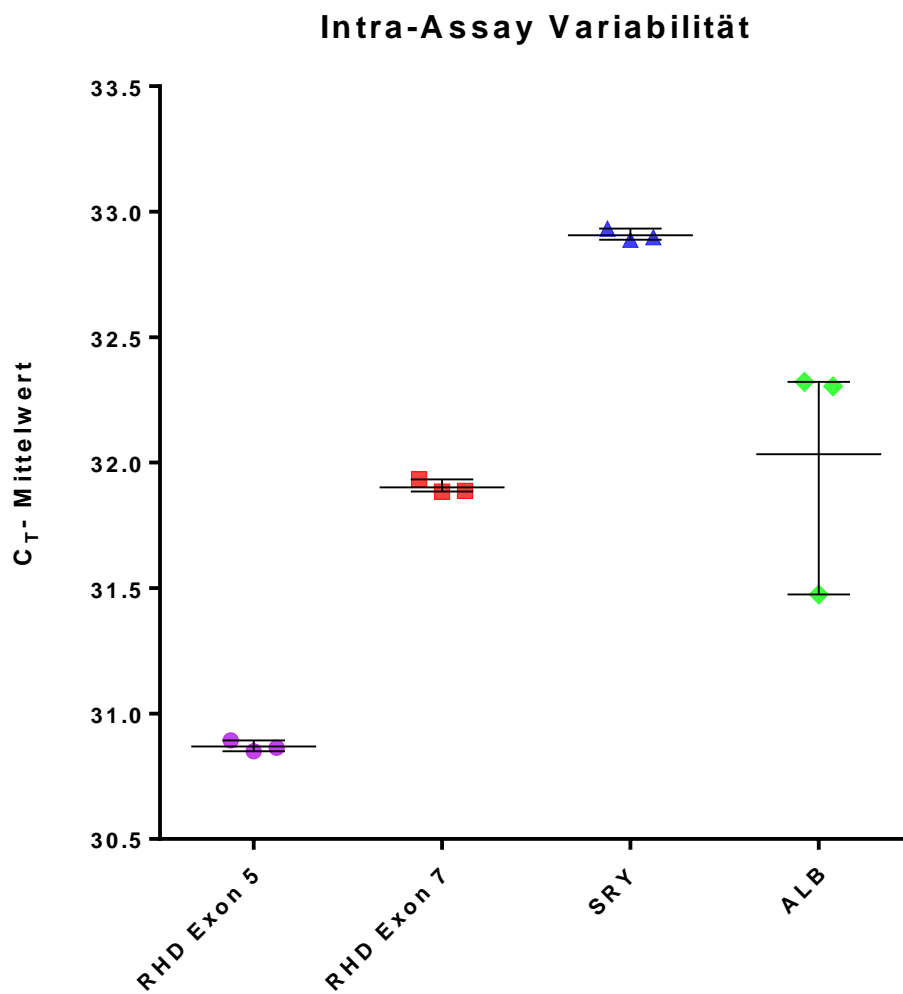


Abb. 4.2 a

Inter-Assay Variabilität

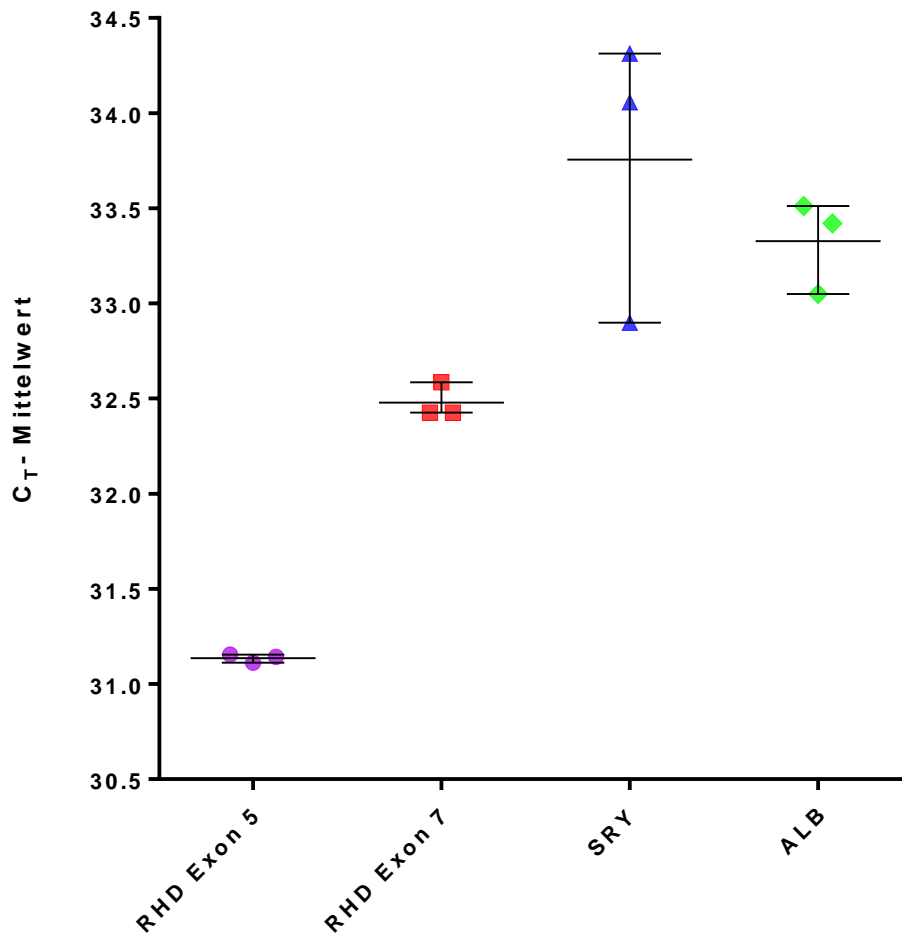


Abb. 4.2 b

Abb. 4.2 (a) Intra-Assay, (b) Inter-Assay Variabilität.

Dargestellt sind die C_T-Mittelwerte, welche aus dem Plasma jeweils einer männlichen, RhD-positiven Person mittels *Real-time-PCR* innerhalb einer Analysenserie ((a) 3 Messungen an einem Tag, (b) 3 Messungen verteilt auf 3 Tage, jeweils eine Messung pro Tag) bestimmt worden sind. Als Kontrolle für eine erfolgreiche DNA-Isolation und -Amplifikation wurde ein Teil des *ALB*-Gens bestimmt. Darstellung mit dem jeweils dazugehörigen Mittelwert und der Spannweite.

4.2 Titration von Plasma einer männlichen, RhD-positiven Person in Plasma einer weiblichen, RhD-negativen Person

Vor der Aufbereitung von maternalem Plasma wurde eine Titration von Plasma einer männlichen, RhD-positiven Person in Plasma einer weiblichen, RhD-negativen Person bis zu einer Verdünnung von 1:256 durchgeführt. Im Rahmen einer Analysenserie wurde an verschiedenen Tagen Plasmaproben von 4 RhD-positiven Spendern in Plasmaproben von 4 RhD-negativen Spenderinnen titriert. Die DNA-Isolation war in allen Fällen erfolgreich. Bis auf eine erfolglose Amplifikation bei einer Plasmamischung bei einer Verdünnung von 1:4 wurden die *RHD* Exone 5 und 7 sowie das *SRY*-Gen bis zu einer Verdünnung von 1:256 in allen Fällen richtig positiv amplifiziert (Abb. 4.3). Als Negativkontrolle diente jeweils das ungemischte Plasma einer weiblichen, RhD-negativen Person, wobei in allen Fällen die Amplifikation von *RHD* und *SRY* richtig negativ war.

Titration von Plasma einer männlichen, RhD-positiven Person in Plasma einer weiblichen, RhD-negativen Person (*RHD* Exon 5)

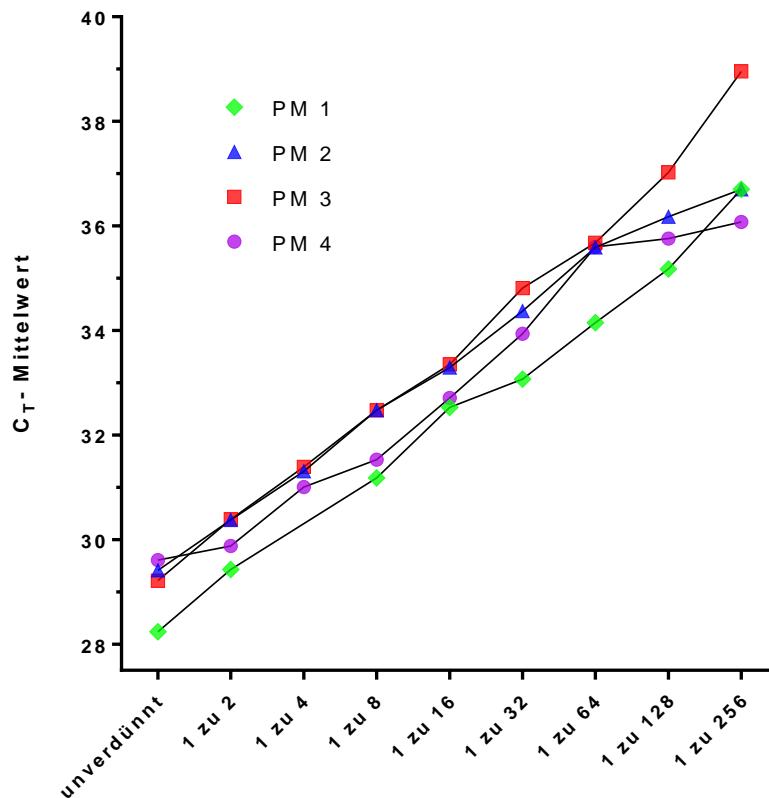


Abb. 4.3 a

Titration von Plasma einer männlichen, RhD-positiven Person in Plasma einer weiblichen, RhD-negativen Person (*RHD* Exon 7)

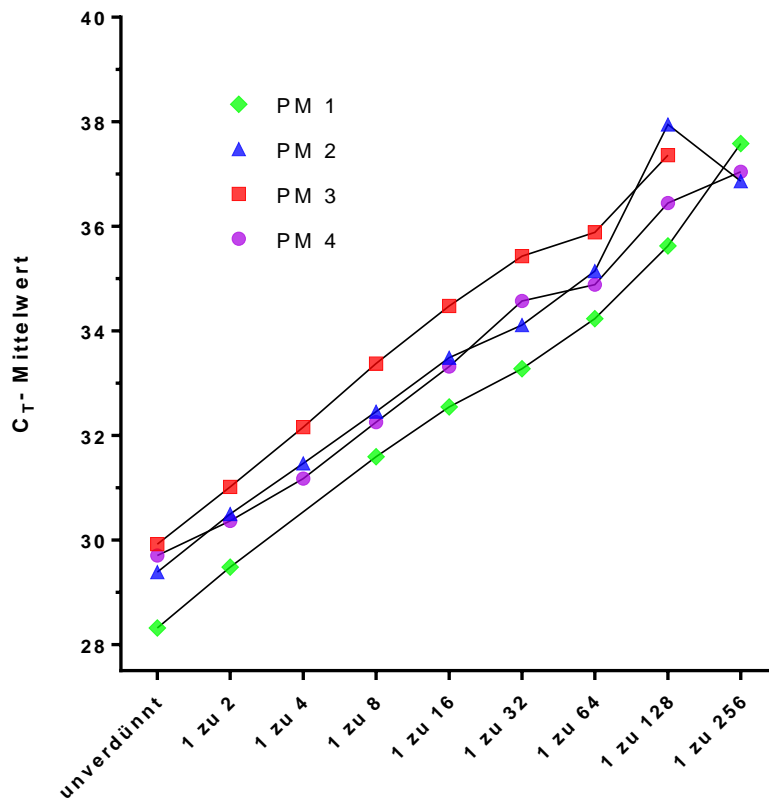


Abb. 4.3 b

Titration von Plasma einer männlichen, RhD-positiven Person in Plasma einer weiblichen, RhD-negativen Person (SRY)

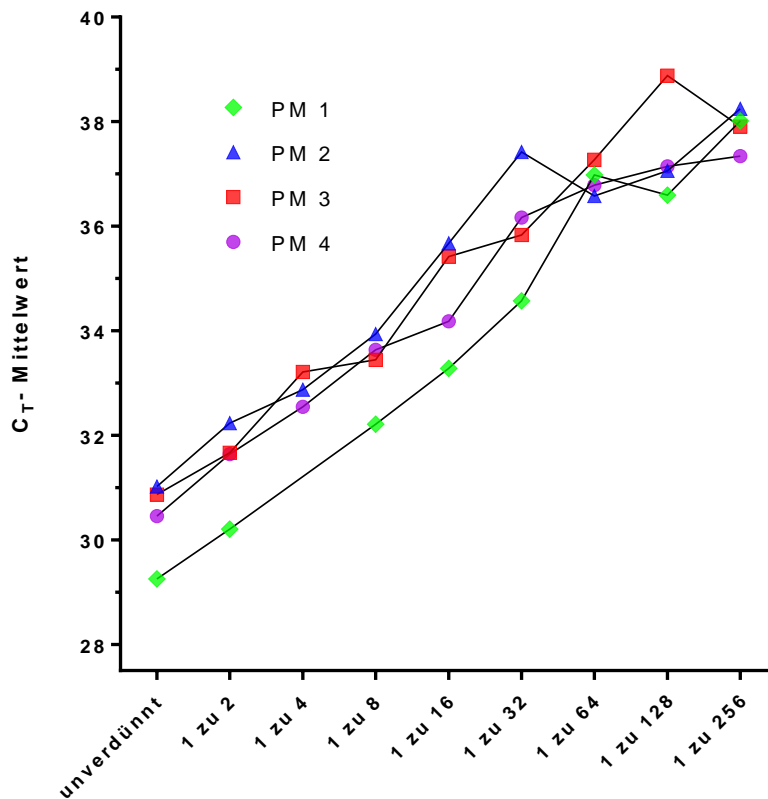


Abb. 4.3 c

Abb. 4.3 a, b, c Titration von Plasma einer männlichen, RhD-positiven Person in Plasma einer weiblichen, RhD-negativen Person bis zu einer Verdünnung von 1:256.

Dargestellt sind die C_T -Mittelwerte, welche bei (a) *RHD* Exon 5 (b) *RHD* Exon 7 und (c) *SRY* mittels *Real-time-PCR* bestimmt worden sind. Im Rahmen einer Analysenserie wurden an verschiedenen Tagen Plasmaproben von 4 RhD-positiven Spendern in Plasmaproben von 4 RhD-negativen Spenderinnen titriert (PM 1 - 4). Die DNA-Isolation war in allen Fällen erfolgreich. Bis auf eine erfolglose Amplifikation bei einer Plasmamischung bei einer Verdünnung von 1:4 wurden die *RHD* Exone 5 und 7 sowie das *SRY*-Gen bis zu einer Verdünnung von 1:256 in allen Fällen richtig positiv amplifiziert. Als Negativkontrolle diente jeweils das ungemischte Plasma einer weiblichen, RhD-negativen Person, wobei in allen Fällen die Amplifikation von *RHD* und *SRY* richtig negativ war. PM=Plasmamischung.

4.3 Fetale RHD-Genotypisierung aus dem Blutplasma von RhD-negativen Schwangeren

Eine Auswertung aller Proben der 29 rekrutierten RhD-negativen Schwangeren war leider nicht möglich, da die DNA aus dem Plasma von vier Schwangeren kontaminiert wurde (durch ein Verrutschen des *MicroAmpTM Optical Adhesive Film* während des

Beklebens der *MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate* kam es zu einer „Spritzkontamination“ durch benachbarte Proben). Die DNA der restlichen 25 Plasmaproben der Schwangeren mit RhD-negativem Status wurde erfolgreich isoliert und amplifiziert.

In 22 von 25 Fällen wurde der fetale *RHD*-Status aus dem zellfreien, maternalen Plasma mittels *Real-time*-PCR (TaqMan®) richtig positiv bzw. richtig negativ bestimmt (Tab. 4.3), sowie in 12 von 13 Fällen das Vorhandensein fetaler DNA in maternalem Plasma sichergestellt. Bei 11 von 12 Schwangeren mit bestätigten, weiblichen Feten fand richtig negativ keine Amplifikation des *SRY*-Gens statt (Übersicht fetaler *RHD*-Status und fetales Geschlecht siehe Tab. 4.2).

In 15 von 15 Fällen* wurden die *RHD*-Gene richtig positiv amplifiziert, wobei in 6 von 7 Fällen** mithilfe der Amplifikation des *SRY*-Gens das Vorhandensein fetaler DNA in der maternalen Plasmaprobe richtig positiv nachgewiesen werden konnte. Bei einem Fall wurde nur ein Replikat des *SRY*-Gens amplifiziert, weshalb diese Probe nicht in die Auswertung miteinbezogen wurde („Ergebnis indeterminiert“). Bei 7 der 8 bestätigten, weiblichen RhD-positiven Feten fand richtig negativ keine Amplifikation des *SRY*-Gens statt. Bei einer Schwangeren mit einem weiblichen RhD-positiven Fetus wurde ein Replikat des *SRY*-Gens amplifiziert, weshalb das Ergebnis dieser Probe nicht gewertet wurde („Ergebnis indeterminiert“). Bei den Plasmaproben von 10 Schwangeren mit bestätigten RhD-negativen Feten (davon 2 RhD-negative Zwillingspaare) war die Amplifikation der *RHD*-Gene in 7 Fällen richtig negativ. Die Ergebnisse der restlichen drei Fälle waren nicht eindeutig (Abweichung der Ergebnisse von *RHD* Exon 5 und 7), weshalb diese nicht gewertet wurden („Ergebnis indeterminiert“). Die Amplifikation von *RHD* Exon 7 war in allen drei Fällen richtig negativ. Von *RHD* Exon 5 wurde in zwei Fällen ein Replikat (1/3), sowie in einem Fall falsch positiv zwei Replikate amplifiziert (2/3) („Ergebnis indeterminiert“). Das Vorhandensein fetaler DNA in der maternalen Plasmaprobe wurde in 6 von 6 Fällen*** mittels der Detektion von *SRY* richtig positiv nachgewiesen. Bei 4 Schwangeren mit bestätigten weiblichen, RhD-negativen Feten fand richtig negativ keine Amplifikation des *SRY*-Gens statt (Tab. 4.3).

* Eine Schwangere trug ein RhD-positives Zwillingsspaar in sich.

** 7 Fälle: 8 bestätigte männliche, RhD-positive Feten, davon 1 männliches Zwillingsspaar.

*** 2 Schwangere trugen ein RhD-negatives Zwillingsspaar mit jeweils männlichem und weiblichem Geschlecht in sich.

| Mutter (RhD-negativ) | fetaler <i>RHD</i> -Status | Geschlecht Kind |
|----------------------|----------------------------|-----------------|
| #1 | positiv | m |
| #2 | negativ | m |
| #3 | negativ | w |
| #4 | negativ | w |
| #5 | negativ | m |
| #6 | positiv | m |
| #7 | negativ* | m w |
| #8 | positiv | w |
| #9 | positiv | w |
| #10 | negativ* | m w |
| #11 | positiv | m |
| #12 | negativ | w |
| #13 | positiv | m |
| #14 | negativ | m |
| #15 | positiv* | m m |
| #16 | negativ | m |
| #17 | positiv | w |
| #18 | positiv | w |
| #19 | positiv | w |
| #20 | negativ | w |
| #21 | positiv | w |
| #22 | positiv | m |
| #23 | negativ | w |
| #24 | negativ | m |
| #25 | negativ | w |
| #26 | positiv | w |
| #27 | negativ | m |
| #28 | positiv | w |
| #29 | positiv | m |

* Zwillinge

Tab. 4.2 Fetaler *RHD*-Status und Geschlecht des Kindes.

Postpartal wurde bei den 29 RhD-negativen Schwangeren, deren zellfreie, plasmatische DNA mittels *Real-time*-PCR analysiert wurde, fetales Blut aus der Nabelschnur entnommen um den fetalen *RHD*-Status zu bestätigen. 3 Schwangere trugen ein Zwillingsspaar in sich (mit * markiert).

| Amplifikation der <i>RHD</i> Exone 5 und 7 | | | | |
|--|--------------------|--------------------|----------------|----------------|
| fetaler <i>RHD</i> -Status | fetales Geschlecht | Richtig Positiv | Falsch Negativ | Indeterminiert |
| | | RhD positiv (n=15) | w (n=8) | 8# |
| | m (n=7) | 7# | 0 | 0 |
| | | Richtig Negativ | Falsch Positiv | Indeterminiert |
| RhD negativ (n=10) | w (n=4) | 4 | 0 | 0 |
| | m (n=6) | 3 | 0 | 3* |

#: *SRY*: 1/2 Replikate, n=1
*: *RHD* Exon 5: 2/3 Replikate, n=1; 1/3 Replikate, n=2

Tab. 4.3 Amplifikation der *RHD* Exone 5 und 7 aus dem Blutplasma von RhD-negativen Schwangeren.

In 15 von 15 Fällen wurden die *RHD*-Gene richtig positiv amplifiziert. In 13 von 15 Fällen war die Amplifikation des *SRY*-Gens richtig positiv bzw. richtig negativ. Bei zwei Schwangeren mit jeweils einem weiblichen und männlichen RhD-positiven Fetus war das Ergebnis indeterminiert, es wurde jeweils ein Replikat des *SRY*-Gens amplifiziert (mit # markiert). Bei den Plasmaproben von 10 Schwangeren mit RhD-negativen Feten war die Amplifikation der *RHD*-Gene in 7 Fällen richtig negativ. Die Ergebnisse der restlichen drei Fälle waren indeterminiert, da nur die Amplifikation von *RHD* Exon 7 in allen drei Fällen richtig negativ war. Von *RHD* Exon 5 wurde in zwei Fällen ein Replikat (1/3, n=2), sowie in einem Fall falsch positiv zwei Replikate amplifiziert (2/3, n=1). Das Vorhandensein fetaler DNA in der maternalen Plasmaprobe wurde in 6 von 6 Fällen mittels der Detektion von *SRY* richtig positiv nachgewiesen. Bei 4 Schwangeren mit bestätigten weiblichen, RhD-negativen Feten fand richtig negativ keine Amplifikation des *SRY*-Gens statt.

Die C_T -Werte betragen durchschnittlich 31,70 (Mittelwert, SD: 1,85, Spannweite: 28,51 - 34,51; n=13) bei *RHD* Exon 5; 33,41 (Mittelwert, SD: 1,94, Spannweite: 30,20 - 36,38; n=13) bei *RHD* Exon 7; 33,94 (Mittelwert, SD: 1,59, Spannweite: 31,33 - 36,49; n=9) bei *SRY* und 30,41 (Mittelwert, SD: 1,49, Spannweite: 27,45 - 33,30; n=20) bei *Albumin*. In diese Statistik wurden nur valide Werte miteinbezogen (n=20), Proben mit falsch negativer bzw. falsch positiver Amplifikation von *RHD* Exon 5 und 7 sowie *SRY* bzw. mit indeterminiertem Ergebnis wurden ausgeschlossen (Abb. 4.4).

Nachweis der DNA-Fragmente *RHD* Exon 5, *RHD* Exon 7 sowie *SRY* aus maternalem Plasma

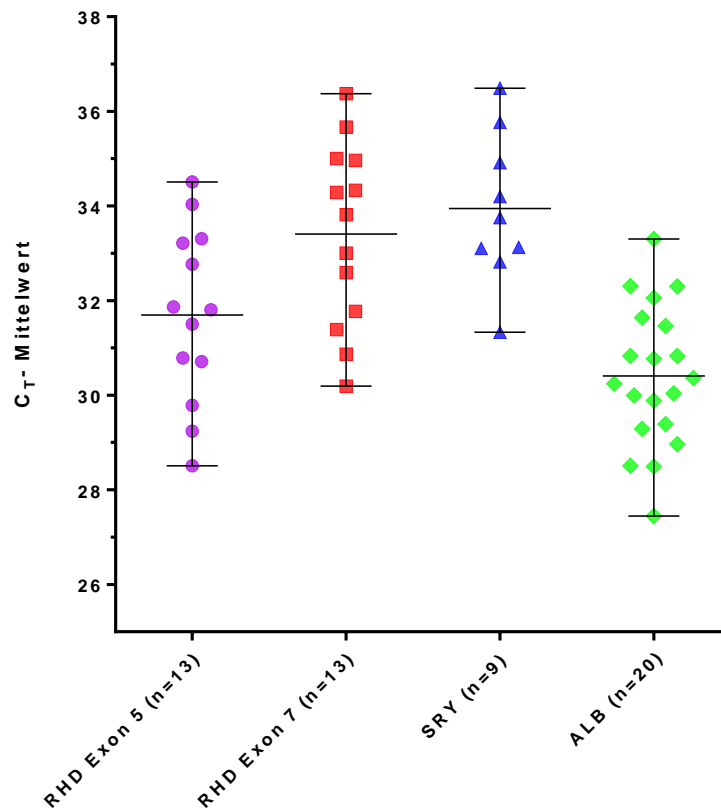


Abb. 4.4 Nachweis fetaler DNA-Fragmente *RHD* Exon 5, *RHD* Exon 7 sowie *SRY* aus maternalem Plasma.

Dargestellt sind die C_T -Mittelwerte, welche aus dem Blutplasma von 20 RhD-negativen Schwangeren mittels *Real-time*-PCR bestimmt worden sind. Um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden, wurde als Kontrolle für das Vorhandensein fetaler DNA das *SRY*-Gen amplifiziert. Zusätzlich wurde als Kontrolle für eine erfolgreiche DNA-Isolation und -Amplifikation ein Teil des *ALB*-Gens bestimmt. Bei allen Schwangeren wurde die DNA erfolgreich aus dem Blutplasma isoliert und amplifiziert. Im Falle eines RhD-negativen Feten war die Amplifikation der *RHD* Exone 5 und 7 richtig negativ ($n=7$). Bei Plasmaproben von Schwangeren mit weiblichem Fetus war die Amplifikation des *SRY*-Gens richtig negativ ($n=11$). Darstellung mit dem jeweils dazugehörigen Mittelwert und der Spannweite.

II Non-invasive, pränatale Bestimmung fetaler, humaner Plättchenantigene (HPA-1, -3, -5 und -15) aus maternalem Plasma mittels „Next-Generation-Sequencing“ (NGS)

4.4 Patientinnen

Den 13 Schwangeren wurde im Median in der 30. Schwangerschaftswoche (Spannweite: 14. - 41. SSW) Blut entnommen, 6 Schwangere befanden sich im 2. und 7 Schwangere im 3. Trimenon. Bei 5 Schwangeren trat aufgrund von thrombozytären Alloantikörpern gegen das Merkmal HPA-1a bereits in einer vorausgegangenen Schwangerschaft eine fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT) auf. Alle Väter der betroffenen Kinder wurden typisiert. In 3 Fällen waren die Väter homozygot für das Merkmal HPA-1a, wodurch dieses Merkmal mit 100 %iger Wahrscheinlichkeit weitervererbt worden ist (fetaler Genotyp HPA-1ab). Bei den anderen zwei Vätern, welche das Merkmal HPA-1ab trugen, betrug die Wahrscheinlichkeit, dass der Fetus ebenfalls das Merkmal HPA-1ab trägt, 50 %. Die fetalen HPA-Genotypen wurden nach der Geburt bestätigt (Tab. 4.4). Die Thrombozytenzahlen der Neugeborenen, deren Väter homozygot für das Merkmal HPA-1a waren (Fall #1, #2, #3), betragen nach der Geburt $70 \times 10^9/l$, $183 \times 10^9/l$ und $283 \times 10^9/l$. Blutungskomplikationen sind nicht aufgetreten.

4.5 Qualität

Nach der Sequenzierung wurde ein sog. *Run Report* erstellt, in dem die Beladung des Chips, die Qualität der Anreicherung, der klonalen Amplifikation und der Sequenzierung sowie die mittlere *Read*-Länge zur Darstellung kommen (Abb. 4.5). Polyklonale Sequenzen, Adapterdimere und *Reads* mit geringer Qualität werden ausgeschlossen.

* Q-Wert: Der Q-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der eine Base falsch „gelesen“ wird ($Q = -10 \log_{10} P$, wobei P die Auftretenswahrscheinlichkeit eines inkorrekten *Base Calls* darstellt) (Ewing, 1998). Ein Q-Wert von 20 (Q20) bedeutet, dass 99 % der *Base Calls* korrekt sind, lediglich in 1 von 100 Fällen wird während der Sequenzierung eine Base falsch bestimmt.

| Fall | | HPA-1 | HPA-3 | HPA-5 | HPA-15 |
|------|--------|-------|-------|-------|--------|
| #1* | Mutter | bb | ab | aa | ab |
| | Kind | ab | bb | aa | bb |
| #2* | Mutter | bb | ab | bb | bb |
| | Kind | ab | bb | ab | ab |
| #3* | Mutter | bb | ab | aa | ab |
| | Kind | ab | bb | aa | aa |
| #4* | Mutter | bb | aa | aa | aa |
| | Kind | bb | ab | aa | ab |
| #5 | Mutter | aa | aa | ab | ab |
| | Kind | aa | ab | ab | ab |
| #6 | Mutter | bb | bb | aa | ab |
| | Kind | ab | ab | aa | aa |
| #7 | Mutter | aa | ab | aa | bb |
| | Kind | aa | bb | ab | ab |
| #8 | Mutter | aa | bb | aa | ab |
| | Kind | aa | ab | aa | bb |
| #9 | Mutter | aa | aa | aa | aa |
| | Kind | aa | aa | aa | ab |
| #10 | Mutter | aa | bb | ab | aa |
| | Kind | ab | ab | aa | ab |
| #11 | Mutter | aa | ab | aa | aa |
| | Kind | aa | ab | aa | aa |
| #12 | Mutter | ab | aa | ab | bb |
| | Kind | aa | aa | ab | ab |
| #13* | Mutter | bb | aa | aa | aa |
| | Kind | bb | ab | aa | aa |

* FNAIT in der vorangegangenen Schwangerschaft

Tab. 4.4 Genotypen der Merkmale HPA-1, -3, -5, -15.

Dargestellt sind die HPA-Genotypen der analysierten Fälle (jeweils von Mutter und Kind). Bei Fall #1 - #4 und Fall #13 trat bereits in der vorangegangenen Schwangerschaft eine FNAIT auf. Die HPA-Inkompatibilitäten sind farbig hervorgehoben.

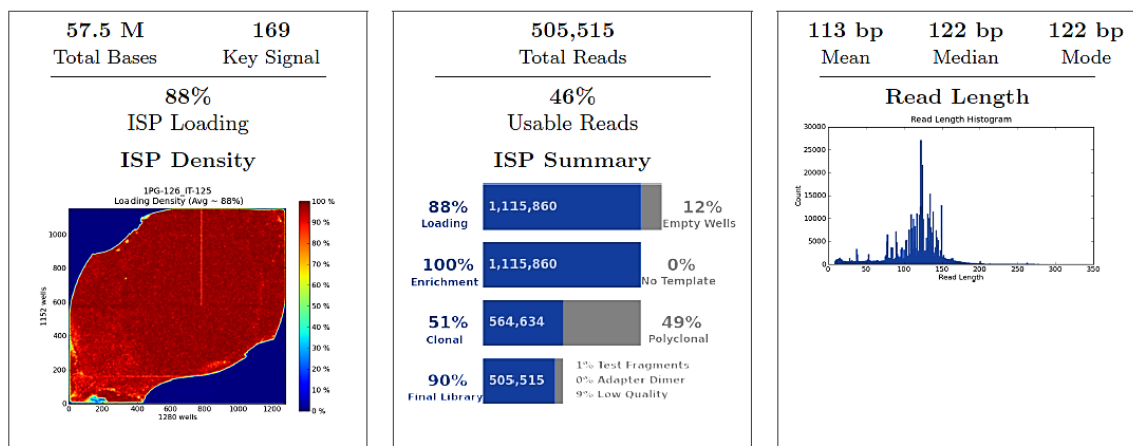


Abb. 4.5 Run-Report der Sequenzierung.

Dargestellt ist (Links) die Beladung des Chips, in diesem Beispiel sind 88% der Wells mit *Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ Particles (ISP)* besetzt; (Mitte) die Qualität der Anreicherung, der klonalen Amplifikation und Sequenzierung: prozentualer Anteil der verwertbaren Reads, der Wellbesetzung, der angereicherten ISPs, der monoklonalen Sequenzen sowie der verwertbaren Bibliothek nach dem Ausschluss von Testfragmenten, Adapterdimeren und Reads mit geringer Qualität. In diesem Fall sind 46 % der bestimmten Reads verwertbar; wie links angegeben 88 % der Wells besetzt, 100 % der ISPs tragen ein Template; 51 % der DNA-

Templates sind monoklonal; 10% der Bibliothek wurden exkludiert; (Rechts) die im Durchschnitt sequenzierte *Read-Länge* in Basenpaaren (bp), hier 113 bp.

4.5.1 Primer Panel I

Bei der Aufbereitung der Proben mit dem *Primer Panel I* zeigten die angelagerten Basen durchschnittlich in 90,67 % eine > Q20 Qualität. Pro Fall wurden im Mittel 255360 (Mittelwert; SD: 57796) *Reads* bestimmt, welche 53,17 % der Rohdaten nach dem Filtern darstellen. Die mittlere *Read-Länge* betrug 103 (Mittelwert; SD: 8,04) Basenpaare.

4.5.2 Primer Panel II

In durchschnittlich 90 % zeigten die angelagerten Basen bei den mit dem *Primer Panel II* aufbereiteten Proben eine > Q20 Qualität*. Es wurden im Durchschnitt 117978 (Mittelwert; SD: 49456) *Reads* pro Fall bestimmt (26 % der Rohdaten nach dem Filtern). Die *Read-Länge* betrug im Mittel 110 (Mittelwert; SD: 10,70) Basenpaare.

4.6 Ermittelte Reads

4.6.1 Primer Panel I

Für die Sequenzierung wurden zunächst 23 Zielregionen gewählt: *ITGB3* (HPA-1), *ITGA2B* (HPA-3), *ITGA2* (HPA-5), *CD109* (HPA-15), 8 SNPs, welche erythrozytäre Blutgruppenantigene kodieren, *RHD* Exon 4, *RHD* Exon 7, 8 anonyme SNPs (*Ion AmpliSeq™ Sample ID Panel*) und *SRY* (Abb. 3.7). 21 der 23 Zielregionen wurden aus dem zellfreien Plasma von 6 Schwangeren und 3 Kontrollen (2 männlich; 1 weiblich, nicht schwanger) erfolgreich klonal amplifiziert und sequenziert. Die Systeme MNS M/N (*GYPA*, rs7682260) und FY (Phänotyp: Fy(a-b-), *DARC*, rs2814778) wurden aufgrund einer zu geringen Gesamtanzahl an *Reads* von der weiteren Analyse exkludiert. Im späteren Verlauf wurde während der Analyse auch *RHCE* C/c Exon 2 (*RHCE*, rs676785) ausgeschlossen, da beide möglichen Allele nicht voneinander differenziert werden konnten.

Die detektierte Gesamtanzahl der *Reads* betrug pro Zielregion nach Exklusion der drei genannten Systeme im Durchschnitt 5624 (Mittelwert; SD: 3090, Spannweite: 585 - 14453, n=153 [9 Proben mit jeweils 17 Zielregionen]). *RHD* und *SRY* wurden nicht miteinbezogen, da sie nicht bei allen Fällen und Kontrollen im Genom präsent sind. Die

Gesamtanzahl der *Reads* betrug bei *RHD* Exon 4 durchschnittlich 6317 (Mittelwert; SD: 2329), bei *RHD* Exon 7 5348 (Mittelwert; SD: 2974) bei den 7 RhD-positiven Fällen (4 Schwangere, 3 Kontrollen). Aus dem zellfreien Plasma von 2 männlichen Kontrollen wurden 1667 bzw. 2989 *Reads* bei *SRY* bestimmt.

4.6.2 Primer Panel II

Wie in Material und Methoden beschrieben, wurden die zu sequenzierenden Regionen im Verlauf noch um weitere 15 Zielregionen erweitert (Abb. 3.8). Von den 38 Zielregionen wurden insgesamt 34 aus dem zellfreien Plasma von 12 Schwangeren (davon 5 Schwangere, deren Plasma bereits mit dem *Primer Panel I* aufbereitet wurde) und einer männlichen Kontrolle erfolgreich klonal amplifiziert und sequenziert. Die Systeme MNS M/N (*GYPA*, rs7682260), RHCE C/c Exon 1 (*RHCE*, rs586178), RHCE C/c Exon 2 (*RHCE*, rs676785) und RHCE C^w (*RHCE*, rs138268848) wurden aufgrund einer zu geringen Gesamtanzahl an *Reads* von der weiteren Analyse exkludiert. Im späteren Verlauf wurde ebenfalls *RHD* Exon 10 ausgeschlossen, da mithilfe dieser Exonsequenz keine Aussage über den *RHD*-Status möglich war.

Pro Zielregion betrug die Gesamtanzahl der *Reads* nach Ausschluss der Systeme MNS M/N, RHCE C/c Exon 1 und 2, RHCE C^w, *RHD* Exon 10 durchschnittlich 2720 (Mittelwert; SD: 1842, Spannweite: 321 - 11666, n=325 [13 Proben mit jeweils 25 Zielregionen]). Da die sequenzierten *RHD* Exone und Y-chromosomalen Sequenzen nicht im Genom aller Fälle vorhanden sind, wurden diese nicht in die Statistik miteinbezogen. Im Durchschnitt betrug die Gesamtanzahl der *Reads* bei den sequenzierten *RHD* Exonen 4014 (Mittelwert; SD:2659) bei den 10 RhD-positiven Fällen (9 Schwangere, eine männliche Kontrolle). Bei der einen männlichen Kontrolle wurden durchschnittlich 1129 *Reads* (Mittelwert; SD: 193) bei den Y-chromosomalen Sequenzen bestimmt.

4.7 Unerwartete Base Calls

4.7.1 Primer Panel I

Die unerwarteten *Base Calls* wurden bei den mit dem *Primer Panel I* aufbereiteten Proben im Durchschnitt mit einer Frequenz von 0,16 % (Mittelwert; SD: 0,26 %, Spannweite: 0 % - 2,18 %, n=306 [pro Zielregion 2 nicht dem biallelischen System

zugehörige Basen]) der Gesamtanzahl der *Reads* bestimmt. Auch hier wurde *RHD* und *SRY* nicht berücksichtigt (Abb. 4.6 a).

4.7.2 Primer Panel II

Bei den Proben, welche mit dem *Primer Panel II* aufbereitet wurden, wurden die unerwarteten *Base Calls* im Mittel mit einer Frequenz von 0,17 % (Mittelwert; SD: 0,37 %, Spannweite: 0 % - 3,47 %, n=650 [pro Zielregion 2 nicht dem biallelischen System zugehörige Basen]) der Gesamtanzahl der *Reads* detektiert (sequenzierte *RHD* Exone und Y-chromosomale Sequenzen nicht in dieser Kalkulation enthalten) (Abb. 4.6 b).

Abgrenzung der paternalen, fetalen Allele von den unerwarteten Base Calls

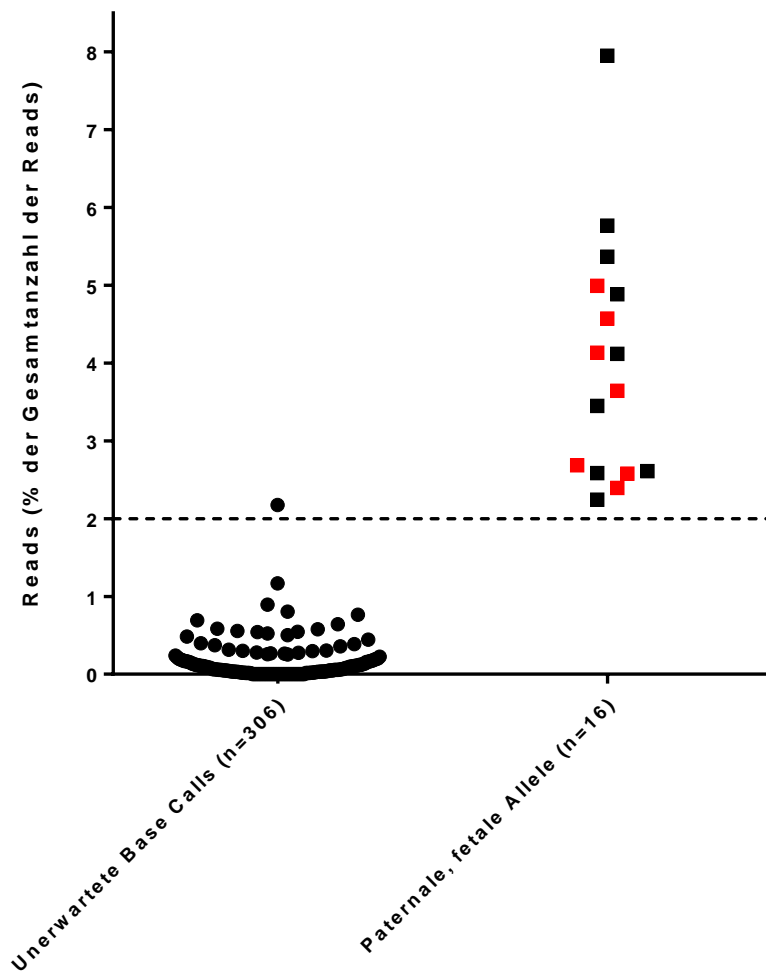


Abb. 4.6 a

Abgrenzung der paternalen, fetalen Allele von den unerwarteten Base Calls

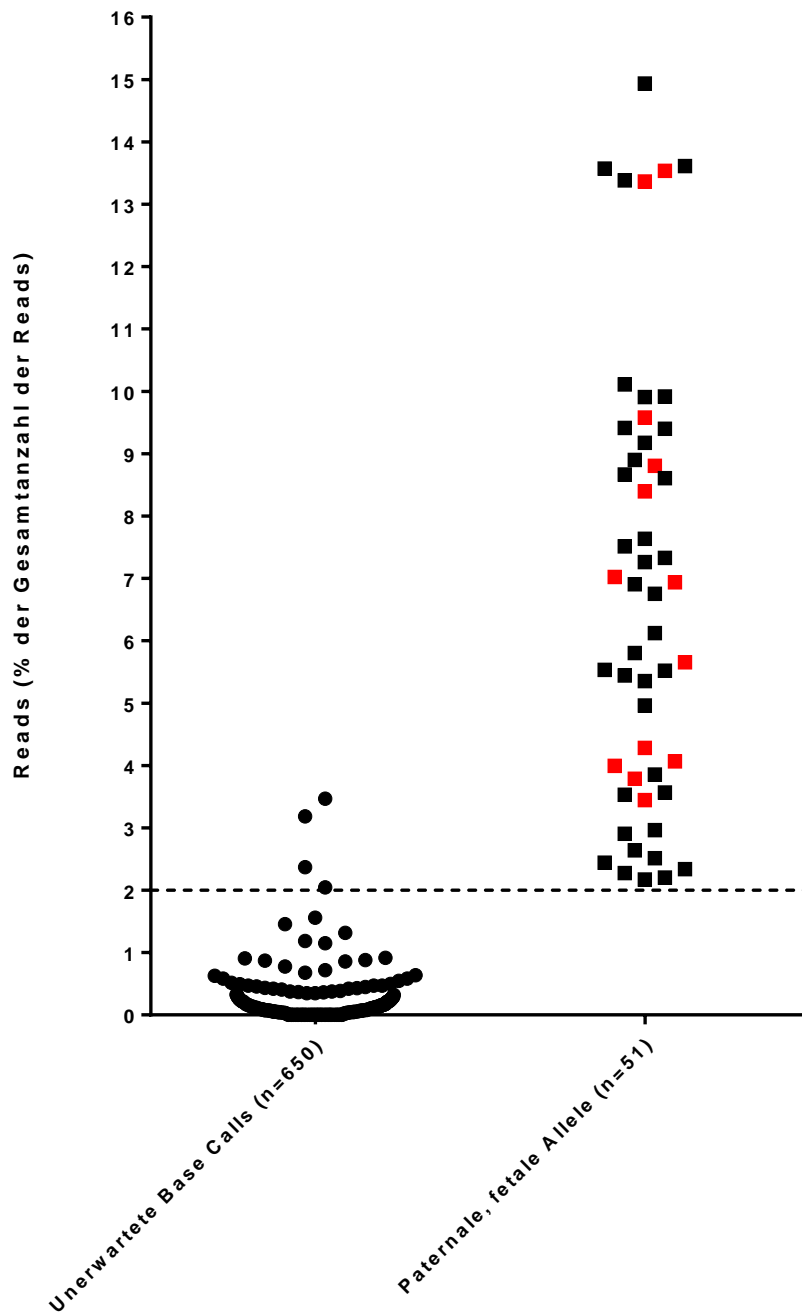


Abb. 4.6 b

Abb. 4.6 a, b Abgrenzung der paternalen, fetalen Allele von den unerwarteten *Base Calls*. Dargestellt sind die *Reads* der paternalen, fetalen Allele (die humanen Plättchenantigene sind farblich hervorgehoben), welche aus dem zellfreien Plasma von (a) 6 Schwangeren, (b) 12 Schwangeren mittels *Next-Generation-Sequencing* detektiert worden sind ([a] n=16; [b] n=51; ausgenommen *RHD* und *SRY*). Es wurde fetale DNA angenommen, wenn das antithetische Allel, bei Homozygotie der Mutter, mit einer Frequenz von $\geq 2\%$ der Gesamtanzahl der *Reads**

bestimmt worden ist. Sie werden den unerwarteten *Base Calls*** ([a] aus 9 Proben mit jeweils 17 Zielregionen; [b] aus 13 Proben mit jeweils 25 Zielregionen) gegenübergestellt. Die einzelnen *Reads* werden prozentual in Bezug auf die Gesamtanzahl der *Reads* angegeben. Bis auf (a) einen Ausreißer bei dem Kontroll-SNP #3, (b) vier Ausreißer bei dem Merkmal HPA-1 und dem Kontroll-SNP #3 wurden die unerwarteten *Base Calls* mit einer durchschnittlichen Frequenz von < 2 % der Gesamtanzahl der *Reads* bestimmt. Die analysierten Proben wurden mit dem (a) *Primer Panel I*, (b) *Primer Panel II* aufbereitet.

*Gesamtanzahl der *Reads*: alle ermittelten *Reads* pro SNP***

Unerwartete *Base Calls*: nicht dem biallelischen System eines SNPs* zugehörige Basen

***SNP: *Single Nucleotide Polymorphismus*

Gestrichelte Linie = im Voraus definierter Grenzwert für das Vorhandensein paternalen, fetalen Allele.

4.8 Interne Kontrolle für das Vorhandensein fetaler DNA in zellfreiem, maternalem Plasma

In 12 von 13 Fällen wurde das Vorhandensein zirkulierender, fetaler DNA in zellfreiem, maternalem Plasma mithilfe der neben den HPA-Merkmalen sequenzierten SNPs bzw. Exonsequenzen bestätigt (Tab. 4.5). Bei der Schwangeren mit der Fallnummer #4 konnte fetale DNA ausschließlich durch die Detektion des fetalen, paternalen Allels HPA-15b nachgewiesen werden.

4.8.1 Primer Panel I

Die Detektion von fetalen Sequenzen bei den Fällen 1 - 6, deren Proben mit dem *Primer Panel I* aufbereitet wurden, erfolgte neben den HPA-Merkmalen im Median bei 2,5 Loci (Spannweite: 0 - 5), inklusive *RHD* bei 2 RhD-negativen Schwangeren mit bestätigtem RhD-positiven Status der Feten und *SRY* bei bekanntem fetalen, männlichen Geschlecht. Die paternalen, fetalen Allele wurden mit einer durchschnittlichen Frequenz von 4,33 % (Mittelwert; SD: 1,86 %, Spannweite: 2,24 % - 7,95 %, n=9) der Gesamtanzahl der *Reads* detektiert, was einem prozentualen Anteil fetaler DNA in maternalem Plasma von 8,66 % entspricht (Tab. 4.5 a).

4.8.2 Primer Panel II

Bei den mit dem *Primer Panel II* aufbereiteten Proben (Fall 1 - 13; Probe von der Schwangeren mit der Fallnummer #5 wurde nur mit dem *Primer Panel I* aufbereitet) wurden neben den HPA-Merkmalen fetale Sequenzen im Median bei 7 Loci (Spannweite: 0 - 10) detektiert (inklusive der *RHD* Exone und Y-chromosomalen

Sequenzen). Die durchschnittliche Frequenz der detektierten paternalen, fetalen Allele betrug 6,71 % der Gesamtanzahl der Reads (Mittelwert; SD: 3,58 %, Spannweite: 2,17 % - 14,93 %, n=38), was einem prozentualen Anteil fetaler DNA in maternalem Plasma von 13,42 % entspricht (Tab. 4.5 b).

| Nachweis paternaler, fetaler Allele aus zellfreiem, maternalem Plasma* | | | | | | | |
|--|------------|----------------------|--------------|---------|--------------|------------|------------------------------|
| Fall | System | Reads (Gesamtanzahl) | A Reads | C Reads | G Reads | T Reads | paternale, fetale Allele (%) |
| 1 | SNP #7 | 8436 | 412# | 0 | 8012 | 3 | 412/8436 (4,88%) |
| | RHCE E/e | 10722 | 1 | 10439 | 280# | 2 | 280/10722 (2,61%) |
| 2 | FY | 6405 | 6182 | 0 | 221# | 2 | 221/6405 (3,45%) |
| | SNP #3 | 10205 | 264# | 0 | 9940 | 0 | 264/10205 (2,59%) |
| | RHD Exon 4 | 545 | 0 | 0 | 0 | 545# | 545/545 (100%) |
| | RHD Exon 7 | 249 | 0 | 0 | 249# | 0 | 249/249 (100%) |
| 3 | MNS S/s | 5237 | 281# | 2 | 4940 | 14 | 281/5237 (5,37%) |
| | SNP #2 | 7481 | 1 | 7 | 308# | 7165 | 308/7481 (4,12%) |
| | SNP #3 | 5132 | 408# | 1 | 4722 | 0 | 408/5132 (7,95%) |
| | SNP #5 | 5306 | 306# | 1 | 4998 | 0 | 306/5306 (5,77%) |
| | SRY | 172 | 0 | 0 | 172# | 0 | 172/172 (100%) |
| 5 | FY | 6598 | 6446 | 1 | 148# | 3 | 148/6598 (2,24%) |
| | SRY | 118 | 0 | 0 | 118# | 0 | 118/118 (100%) |
| 6 | RHCE E/e | 9904 | 1 | 9761 | 135 (1,36%)± | 7 | |
| | SNP #4 | 4126 | 0 | 4119 | 5 | 2 (0,05%)± | |
| | SNP #8 | 10605 | 107 (1,01%)± | 18 | 2 | 10478 | |
| | RHD Exon 4 | 145 | 0 | 0 | 0 | 145# | 145/145 (100%) |
| | RHD Exon 7 | 83 | 0 | 0 | 83# | 0 | 83/83 (100%) |
| | SRY | 22 | 0 | 0 | 22# | 0 | 22/22 (100%) |

* Die Genotypen von Mutter und Kind bekannt.
paternale, fetale Allele
± falsch negativ (Frequenz des antithetischen Allels <2% der Gesamtanzahl der Reads bei Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind)

Tab 4.5 a

Nachweis paternaler, fetaler Allele aus zellfreiem, maternalem Plasma*

| Fall | System | Reads (Gesamtanzahl) | A Reads | C Reads | G Reads | T Reads | paternale, fetale Allele (%) |
|------|-----------------------|----------------------|-------------|---------|-------------|---------|------------------------------|
| 1 | SNP #7 | 2096 | 104# | 0 | 1992 | 0 | 104/2096 (4,96%) |
| | rs10092491 | 1874 | 0 | 1770 | 2 | 102# | 102/1874 (5,44%) |
| | RHCE E/e | 5783 | 0 | 5610 | 168# | 5 | 168/5783 (2,91%) |
| | FY | 3245 | 3192 | 1 | 51 (1,57%)± | 1 | |
| 2 | SNP #3 | 4428 | 156# | 17 | 4253 | 0 | 158/4428 (3,57%) |
| | rs10488710 | 2294 | 0 | 2237 | 56# | 1 | 56/2294 (2,44%) |
| | RHD Exon 4 | 96 | 95# | 0 | 1 | 0 | 95/96 (98,96%) |
| | RHD Exon 7 | 109 | 0 | 0 | 0 | 109# | 109/109 (100%) |
| | RHD Exon 5 (Pos. 674) | 399 | 0 | 399# | 0 | 0 | 399/399 (100%) |
| | RHD Exon 5 (Pos. 676) | 397 | 1 | 0 | 396# | 0 | 396/397 (99,75%) |
| | RHD Exon 5 (Pos. 697) | 374 | 0 | 0 | 374# | 0 | 374/374 (100%) |
| 3 | MNS S/s | 1496 | 18 (1,20%)± | 0 | 1474 | 4 | |
| | SNP #2 | 2681 | 0 | 2 | 61# | 2618 | 61/2681 (2,28%) |
| | SNP #3 | 2802 | 74# | 5 | 2723 | 0 | 74/2802 (2,64%) |
| | SNP #5 | 1661 | 64# | 0 | 1597 | 0 | 64/1661 (3,85%) |
| | rs993934 | 2636 | 2458 | 0 | 178# | 0 | 178/2636 (6,75%) |
| | rs10092491 | 3335 | 0 | 289# | 4 | 3042 | 289/3335 (8,67%) |
| | rs1821380 | 2516 | 0 | 2369 | 146# | 1 | 146/2516 (5,80%) |
| | SRY | 151 | 0 | 0 | 151# | 0 | 151/151 (100%) |
| | DDX3Y | 118 | 118# | 0 | 0 | 0 | 118/118 (100%) |
| | TTY2B | 111 | 0 | 111# | 0 | 0 | 111/111 (100%) |
| | RHCE E/e | 11575 | 2 | 11484 | 82 (0,71%)± | 7 | |
| | SNP #4 | 5721 | 2 | 5588 | 5 | 126# | 126/5721 (2,20%) |
| | SNP #8 | 11666 | 273# | 30 | 0 | 11363 | 273/11666 (2,34%) |
| 6 | RHD Exon 4 | 93 | 93# | 0 | 0 | 0 | 93/93 (100%) |
| | RHD Exon 7 | 79 | 0 | 0 | 0 | 79# | 79/79 (100%) |
| | RHD Exon 5 (Pos 674) | 128 | 0 | 128# | 0 | 0 | 128/128 (100%) |
| | RHD Exon 5 (Pos 676) | 129 | 0 | 0 | 129# | 0 | 129/129 (100%) |
| | RHD Exon 5 (Pos 697) | 129 | 0 | 0 | 129# | 0 | 129/129 (100%) |
| | SRY | 22 | 0 | 0 | 22# | 0 | 22/22 (100%) |
| | DDX3Y | 43 | 43# | 0 | 0 | 0 | 43/43 (100%) |
| 7 | TTY2B | 30 | 0 | 30# | 0 | 0 | 30/30 (100%) |
| | SRY | 96 | 0 | 0 | 96# | 0 | 96/96 (100%) |
| | DDX3Y | 52 | 52# | 0 | 0 | 0 | 52/52 (100%) |
| 8 | TTY2B | 15 | 0 | 15# | 0 | 0 | 15/15 (100%) |
| | RHCE E/e | 2987 | 1 | 2682 | 302# | 2 | 302/2987 (10,11%) |
| | MNS S/s | 1031 | 878 | 4 | 138# | 11 | 138/1031 (13,39%) |
| | SNP #7 | 1506 | 205# | 1 | 1300 | 0 | 205/1506 (13,61%) |
| | rs7041158 | 1299 | 0 | 194# | 0 | 1105 | 194/1299 (14,93%) |
| | SRY | 256 | 0 | 0 | 256# | 0 | 256/256 (100%) |
| | DDX3Y | 221 | 221# | 0 | 0 | 0 | 221/221 (100%) |
| | TTY2B | 197 | 0 | 197# | 0 | 0 | 197/197 (100%) |
| | SNP #1 | 2674 | 9 | 2424 | 3 | 238# | 238/2674 (8,90%) |
| | SNP #2 | 2906 | 0 | 1 | 2617 | 288# | 288/2906 (9,91%) |
| 9 | SNP #3 | 2500 | 2226 | 38 | 235# | 1 | 235/2500 (9,40%) |
| | SNP #6 | 2446 | 4 | 332# | 2104 | 6 | 332/2446 (13,57%) |
| | RHD Exon 4 | 265 | 265# | 0 | 0 | 0 | 265/265 (100%) |
| | RHD Exon 7 | 266 | 0 | 0 | 0 | 266# | 266/266 (100%) |
| | RHD Exon 5 (Pos 674) | 836 | 0 | 834# | 0 | 2 | 834/836 (99,76%) |
| | RHD Exon 5 (Pos 676) | 829 | 1 | 0 | 828# | 0 | 828/829 (99,88%) |
| | RHD Exon 5 (Pos 697) | 802 | 0 | 0 | 802# | 0 | 802/802 (100%) |
| 10 | SNP #3 | 2042 | 125# | 1 | 1916 | 0 | 125/2042 (6,12%) |
| | SNP #6 | 1355 | 1 | 75# | 1279 | 0 | 75/1355 (5,54%) |
| | SNP #7 | 1537 | 141# | 0 | 1394 | 2 | 141/1537 (9,17%) |
| | SNP #8 | 3543 | 3232 | 1 | 5 | 305# | 305/3543 (8,61%) |
| | rs10092491 | 1855 | 2 | 1712 | 5 | 136# | 136/1855 (7,33%) |
| | rs7041158 | 1121 | 0 | 60# | 0 | 1061 | 60/1121 (5,35%) |
| | rs1821380 | 3056 | 0 | 2845 | 211# | 0 | 211/3056 (6,90%) |
| 11 | KEL | 786 | 60# | 0 | 724 | 2 | 60/786 (7,63%) |
| | SNP #4 | 996 | 0 | 55# | 0 | 941 | 55/996 (5,52%) |
| | SRY | 162 | 0 | 0 | 162# | 0 | 162/162 (100%) |
| | DDX3Y | 93 | 92# | 0 | 0 | 1 | 92/93 (98,92%) |
| 12 | TTY2B | 106 | 0 | 106# | 0 | 0 | 106/106 (100%) |
| | JK | 1198 | 90# | 0 | 1108 | 0 | 90/1198 (7,51%) |
| | SNP #1 | 1381 | 3 | 1247 | 1 | 130# | 130/1381 (9,41%) |
| 13 | SNP #3 | 2349 | 233# | 9 | 2105 | 2 | 233/2349 (9,92%) |
| | rs10092491 | 895 | 1 | 829 | 0 | 65# | 65/895 (7,26%) |
| | SNP #1 | 4279 | 6 | 4176 | 4 | 93# | 93/4279 (2,17%) |
| 13 | SNP #2 | 2664 | 0 | 1 | 67# | 2596 | 67/2664 (2,52%) |
| | rs993934 | 3001 | 106# | 0 | 2892 | 3 | 106/3001 (3,53%) |
| | rs10092491 | 2667 | 0 | 2588 | 0 | 79# | 79/2667 (2,96%) |
| | SRY | 65 | 0 | 0 | 65# | 0 | 65/65 (100%) |
| | DDX3Y | 70 | 70# | 0 | 0 | 0 | 70/70 (100%) |
| | TTY2B | 45 | 0 | 45# | 0 | 0 | 45/45 (100%) |

* Die Genotypen von Mutter und Kind sind bekannt.

paternale, fetale Allele

± falsch negativ (Frequenz des antithetischen Allels <2% der Gesamtanzahl der Reads bei Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind)

Tab 4.5 b

Tab. 4.5 a, b Nachweis von paternalen, fetalen Allelen aus zellfreiem, maternalem Plasma mittels *Next-Generation-Sequencing*.

Dargestellt sind die *Reads* der SNPs* bzw. Exonsequenzen, welche neben den HPA-Merkmalen sequenziert worden sind. Pro Fall sind die Systeme aufgeführt, bei welchen paternale, fetale Sequenzen detektiert worden sind. Es wurde fetale DNA angenommen, wenn das antithetische Allel eines Merkmals, bei Homozygotie der Mutter, mit einer Frequenz von $\geq 2\%$ der Gesamtanzahl der *Reads*** bestimmt worden ist (farblich hervorgehoben). Bei den Zielregionen *RHD* und den Y-chromosomalen Sequenzen wurden jegliche *Reads* unabhängig von der Anzahl als fetal interpretiert, da Y-chromosomale Sequenzen sowie die *RHD* Exone bei RhD-negativen Schwangeren nicht im mütterlichen Genom präsent sind. Des Weiteren wurden auch Systeme in die Tabelle aufgenommen, bei welchen der prozentuale Anteil der *Reads* an der Gesamtanzahl falsch negativ bei bestehender Inkompatibilität unter dem im Voraus definierten Grenzwert von 2 % lag. Bei Fall #4 konnte das Vorhandensein fetaler DNA ausschließlich durch die Detektion des fetalen, paternalen Allels HPA-15b bestätigt werden, weshalb diese Probe nicht aufgeführt ist. Die Aufbereitung der Proben der aufgelisteten Fälle erfolgte (a) mit dem *Primer Panel I*, (b) mit dem *Primer Panel II*, bei welchem Fall #5 nicht aufgeführt ist, da diese Probe ausschließlich mit dem *Primer Panel I* aufbereitet wurde.

*SNP: *Single Nucleotide* Polymorphismus

**Gesamtanzahl der *Reads*: alle ermittelten *Reads* pro SNP

4.9 Genotypisierung der fetalen, humanen Plättchenantigene: *ITGB3* (HPA-1), *ITGA2B* (HPA-3), *ITGA2* (HPA-5), *CD109* (HPA-15) aus maternalem Plasma

4.9.1 Primer Panel I

7 der 10 vorliegenden Inkompatibilitäten bei den SNPs *ITGB3* (HPA-1), *ITGA2B* (HPA-3), *ITGA2* (HPA-5) und *CD109* (HPA-15) bei den 6 Schwangeren, deren Proben mit dem *Primer Panel I* aufbereitet wurden, wurden richtig positiv detektiert. Bei den restlichen drei Inkompatibilitäten lag der prozentuale Anteil der *Reads* an der Gesamtanzahl unter dem im Voraus definierten Grenzwert von 2 %.

4.9.2 Primer Panel II

Von den 18 vorliegenden Inkompatibilitäten bei den SNPs *ITGB3* (HPA-1), *ITGA2B* (HPA-3), *ITGA2* (HPA-5) und *CD109* (HPA-15) bei den 12 Schwangeren, deren Proben mit dem *Primer Panel II* aufbereitet wurden, wurden 13 richtig positiv detektiert. Bei den restlichen fünf Inkompatibilitäten lag der prozentuale Anteil der *Reads* an der Gesamtanzahl unter dem im Voraus definierten Grenzwert von 2 %.

4.9.3 Genotypisierung von fetalem, humanem Plättchenantigen (HPA) -1

4.9.3.1 Primer Panel I

Die bei dem Merkmal HPA-1 bestimmte Gesamtanzahl der *Reads* betragen bei den mit dem *Primer Panel I* aufbereiteten Proben im Durchschnitt 4677 (Mittelwert; SD: 2872, Spannweite: 1669 - 11010, n=9). Bei 3 von 4 Schwangeren wurden richtig positiv paternale, fetale Allele detektiert mit einer durchschnittlichen Frequenz von 3,68 % (Mittelwert; SD: 1,30 %, Spannweite: 2,40 % - 4,99 %) der Gesamtanzahl der *Reads*, was einem prozentualen Anteil fetaler DNA in maternalem Plasma von 7,36 % entspricht (Tab. 4.6 a). Bei der Schwangeren mit der Fallnummer #6 lag der Anteil der *Reads* an der Gesamtanzahl bei dem paternalen, fetalen Allel mit 1,37 % falsch negativ unter dem im Voraus definierten Grenzwert. Die Anzahl der bei dem antithetischen Allel bestimmten, falsch positiven *Base Calls* bei dem SNP *ITGB3* betrug bei den homozygoten Schwangeren, bei welchen keine fetomaternale Inkompatibilität vorlag, 1 (0,03 % der Gesamtanzahl der *Reads*) und 3 (0,18 % der Gesamtanzahl der *Reads*) (Tab. 4.6 a), sowie bei zwei für dieses Merkmal homozygoten Kontrollen 16 (0,15 % der Gesamtanzahl der *Reads*) und 2 (0,05 % der Gesamtanzahl der *Reads*) (Tab. 4.10 a). Die unerwarteten *Base Calls* wurden im Mittel mit einer Frequenz von 0,45 % (Mittelwert; SD: 0,20 %, Spannweite: 0,05 % - 0,76 %, n=18) der Gesamtanzahl der *Reads* bestimmt.

4.9.3.2 Primer Panel II

Bei den Proben, welche mit dem *Primer Panel II* aufbereitet wurden, lag die Gesamtanzahl der *Reads* durchschnittlich bei 2455 (Mittelwert; SD: 1124, Spannweite: 1185 - 5496, n=13). Paternale, fetale Allele wurden richtig positiv bei 4 von 5 Schwangeren mit einer mittleren Frequenz von 4,98 % (Mittelwert; SD: 1,67 %, Spannweite: 3,45 % - 7,02 %) der Gesamtanzahl der *Reads* bestimmt, was einem prozentualen Anteil fetaler DNA in maternalem Plasma von 9,96 % entspricht (Tab. 4.6 b). Bei der Schwangeren mit der Fallnummer #6 lag der Anteil der *Reads* an der Gesamtanzahl bei dem paternalen, fetalen Allel mit 1,00 % falsch negativ unter dem im Voraus definierten Grenzwert. Die Frequenz der bei dem antithetischen Allel bestimmten, falsch positiven *Base Calls* bei dem SNP *ITGB3* betrug bei den homozygoten Schwangeren, bei welchen keine fetomaternale Inkompatibilität vorlag, im Mittel 0,16 % der Gesamtanzahl der *Reads* (Mittelwert; SD: 0,07 %, Spannweite: 0,09 % - 0,25 %, n=6) (Tab. 4.6 b). Die Frequenz der im Durchschnitt gelesenen unerwarteten

Base Calls betrug 0,95 % der Gesamtanzahl der Reads (Mittelwert; SD: 0,99 %, Spannweite: 0 % - 3,19 %, n=26), wobei in drei Fällen der Anteil an der Gesamtanzahl der Reads ≥ 2 % war.

| Nachweis paternaler, fetaler Allele aus zellfreiem, maternalem Plasma bei Position c.176T>C (ITGB3)* | | | | | | |
|---|----------------------|---------|------------------|---------|------------------|------------------------------|
| Fall | Reads (Gesamtanzahl) | A Reads | C Reads (HPA-1b) | G Reads | T Reads (HPA-1a) | paternale, fetale Allele (%) |
| 1. HPA-1ab (Ki) | 4557 | 0 | 4369 | 22 | 166# | 166/4557 (3,64%) |
| HPA-1bb (Mu) | | | | | | |
| 2. HPA-1ab (Ki) | 7346 | 0 | 7133 | 37 | 176# | 176/7346 (2,40%) |
| HPA-1bb (Mu) | | | | | | |
| 3. HPA-1ab (Ki) | 3924 | 0 | 3698 | 30 | 196# | 196/3924 (4,99%) |
| HPA-1bb (Mu) | | | | | | |
| 4. HPA-1bb (Ki) | 2930 | 0 | 2913 | 16 | 1 | |
| HPA-1bb (Mu) | | | | | | |
| 5. HPA-1aa (Ki) | 1669 | 0 | 3 | 5 | 1661 | |
| HPA-1aa (Mu) | | | | | | |
| 6. HPA-1ab (Ki) | 2331 | 0 | 2286 | 13 | 32 (1,37%) \pm | |
| HPA-1bb (Mu) | | | | | | |

* Die Genotypen von Mutter und Kind sind bekannt: Ki = Kind; Mu = Mutter.
paternale, fetale Allele
 \pm falsch negativ (Frequenz des antithetischen Allels <2% der Gesamtanzahl der Reads bei Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind)

Tab. 4.6 a

| Nachweis paternaler, fetaler Allele aus zellfreiem, maternalem Plasma bei Position c.176T>C (ITGB3)* | | | | | | |
|---|----------------------|---------|------------------|---------|------------------|------------------------------|
| Fall | Reads (Gesamtanzahl) | A Reads | C Reads (HPA-1b) | G Reads | T Reads (HPA-1a) | paternale, fetale Allele (%) |
| 1. HPA-1ab (Ki) | 1538 | 0 | 1436 | 49 | 53# | 53/1538 (3,45%) |
| HPA-1bb (Mu) | | | | | | |
| 2. HPA-1ab (Ki) | 3036 | 1 | 2849 | 71 | 115# | 115/3036 (3,79%) |
| HPA-1bb (Mu) | | | | | | |
| 3. HPA-1ab (Ki) | 2592 | 0 | 2357 | 53 | 182# | 182/2592 (7,02%) |
| HPA-1bb (Mu) | | | | | | |
| 4. HPA-1bb (Ki) | 3537 | 1 | 3496 | 31 | 9 | |
| HPA-1bb (Mu) | | | | | | |
| 6. HPA-1ab (Ki) | 5496 | 0 | 5409 | 32 | 55 (1,00%) \pm | |
| HPA-1bb (Mu) | | | | | | |
| 7. HPA-1aa (Ki) | 2053 | 0 | 4 | 2 | 2047 | |
| HPA-1aa (Mu) | | | | | | |
| 8. HPA-1aa (Ki) | 1868 | 0 | 2 | 0 | 1866 | |
| HPA-1aa (Mu) | | | | | | |
| 9. HPA-1aa (Ki) | 2707 | 0 | 3 | 1 | 2703 | |
| HPA-1aa (Mu) | | | | | | |
| 10. HPA-1ab (Ki) | 1185 | 0 | 67# | 5 | 1113 | 67/1185 (5,65%) |
| HPA-1aa (Mu) | | | | | | |
| 11. HPA-1aa (Ki) | 2146 | 1 | 2 | 1 | 2142 | |
| HPA-1aa (Mu) | | | | | | |
| 12. HPA-1aa (Ki) | 1528 | 0 | 611 | 14 | 903 | |
| HPA-1ab (Mu) | | | | | | |
| 13. HPA-1bb (Ki) | 1820 | 0 | 1800 | 16 | 4 | |
| HPA-1bb (Mu) | | | | | | |

* Die Genotypen von Mutter und Kind sind bekannt: Ki = Kind; Mu = Mutter.
paternale, fetale Allele
 \pm falsch negativ (Frequenz des antithetischen Allels <2% der Gesamtanzahl der Reads bei Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind)

Tab. 4.6 b

Tab. 4.6 a, b Nachweis von paternalen, fetalen Allelen bei dem Merkmal HPA-1.

Dargestellt sind die einzelnen *Reads*, welche pro Fall bei dem SNP* *ITGB3* (HPA-1) ermittelt worden sind. Es wurde fetale DNA angenommen, wenn das antithetische Allel, bei Homozygotie der Mutter, mit einer Frequenz von $\geq 2\%$ der Gesamtanzahl der *Reads*** bestimmt worden ist. (a) In 3 von 4 Fällen wurden richtig positiv nicht-maternale, fetale Sequenzen detektiert (farblich hervorgehoben). Bei Fall #6 lag der Anteil der *Reads* an der Gesamtanzahl bei dem paternalen, fetalen Allel $< 2\%$. (b) In 4 von 5 Fällen wurden richtig positiv nicht-maternale, fetale Sequenzen detektiert (farblich hervorgehoben). Erneut wurde bei Fall #6 kein paternales, fetales Allel nachgewiesen (*Reads* $< 2\%$ der Gesamtanzahl der *Reads*). Die Aufbereitung der Proben der aufgelisteten Fälle erfolgte (a) mit dem *Primer Panel I*, (b) mit dem *Primer Panel II*, bei welchem Fall #5 nicht aufgeführt ist, da diese Probe ausschließlich mit dem *Primer Panel I* aufbereitet wurde.

*SNP: *Single Nucleotide Polymorphismus*

**Gesamtanzahl der *Reads*: alle ermittelten *Reads* pro SNP

4.9.4 Genotypisierung von fetalem, humanem Plättchenantigen (HPA) -3**4.9.4.1 Primer Panel I**

Die Sequenzierung mittels dem *Primer Panel I* ergab bei dem Merkmal HPA-3 im Durchschnitt 2501 *Reads* (Mittelwert; SD: 1059, Spannweite: 585 - 4244, n=9). Bei einer von drei Schwangeren wurden paternale, fetale Allele richtig positiv detektiert mit einer Frequenz von 2,69 % der Gesamtanzahl der *Reads*, was einem prozentualen Anteil fetaler DNA in maternalem Plasma von 5,38 % entspricht (Tab. 4.7 a). Bei den Schwangeren mit der Fallnummer #4 und #6 lag der Anteil der *Reads* an der Gesamtanzahl bei dem paternalen, fetalen Allel mit 0,61 % bzw. 0,86 % falsch negativ unter dem im Voraus definierten Grenzwert. Bei der Sequenzierung von DNA aus dem zellfreien Plasma von 3 Kontrollen (2 männlich; 1 weiblich, nicht schwanger) wurden bei dem SNP *ITGA2B* richtig negativ keine *Base Calls* bei dem antithetischen Allel bei Homozygotie bestimmt (Tab. 4.10 a). Die Frequenz der unerwarteten *Base Calls* betrug im Mittel 0,37 % (Mittelwert; SD: 0,26 %, Spannweite: 0,13 % - 0,89 %, n=18) der Gesamtanzahl der *Reads*.

4.9.4.2 Primer Panel II

Bei den mit dem *Primer Panel II* aufbereiteten Proben betrug die Gesamtanzahl der *Reads* durchschnittlich 1021 (Mittelwert; SD: 395, Spannweite: 477 - 1816, n=13). Bei 2 von 5 Schwangeren wurden die paternalen, fetalen Allele richtig positiv mit einer Frequenz von jeweils 3,99 % und 8,40 % der Gesamtanzahl der *Reads* detektiert, was

einem prozentualen Anteil fetaler DNA in maternalem Plasma von 7,98 % bzw. 16,80 % entspricht (Tab. 4.7 b). Bei den Schwangeren mit der Fallnummer #4, #6 und #13 lag der Anteil der *Reads* an der Gesamtanzahl bei dem paternalen, fetalen Allel mit 0,76 %, 0,11 % bzw. 0,77 % falsch negativ unter dem im Voraus definierten Grenzwert. Bei homozygoten Schwangeren, bei welchen keine fetomaternale Inkompatibilität vorlag (Tab. 4.7 b), sowie bei einer homozygoten männlichen Kontrolle, deren DNA aus dem zellfreien Plasma sequenziert worden ist, wurden richtig negativ keine falsch positiven *Base Calls* bei dem antithetischen Allel detektiert (Tab. 4.10 b). Die unerwarteten *Base Calls* wurden im Durchschnitt mit einer Frequenz von 0,35 % (Mittelwert; SD: 0,31 %, Spannweite: 0,10 % - 1,18 %, n=26) der Gesamtanzahl der *Reads* bestimmt.

| Nachweis paternaler, fetaler Allele aus zellfreiem, maternalem Plasma bei Position c.2621T>G (<i>ITGA2B</i>)* | | | | | | |
|--|----------------------|------------------|------------------|---------|---------|------------------------------|
| Fall | Reads (Gesamtanzahl) | A Reads (HPA-3a) | C Reads (HPA-3b) | G Reads | T Reads | paternale, fetale Allele (%) |
| 1. HPA-3bb (Ki) | 2293 | 1045 | 1245 | 2 | 1 | |
| HPA-3ab (Mu) | | | | | | |
| 2. HPA-3bb (Ki) | 585 | 306 | 278 | 1 | 0 | |
| HPA-3ab (Mu) | | | | | | |
| 3. HPA-3bb (Ki) | 1830 | 751 | 1075 | 2 | 2 | |
| HPA-3ab (Mu) | | | | | | |
| 4. HPA-3ab (Ki) | 4244 | 4195 | 26 (0,61%)± | 23 | 0 | |
| HPA-3aa (Mu) | | | | | | |
| 5. HPA-3ab (Ki) | 2643 | 2567 | 71# | 4 | 1 | 71/2643 (2,69%) |
| HPA-3aa (Mu) | | | | | | |
| 6. HPA-3ab (Ki) | 3584 | 31 (0,86%)± | 3530 | 7 | 16 | |
| HPA-3bb (Mu) | | | | | | |

* Die Genotypen von Mutter und Kind sind bekannt: Ki = Kind; Mu = Mutter.
paternale, fetale Allele
± falsch negativ (Frequenz des antithetischen Allels <2% der Gesamtanzahl der Reads bei Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind)

Tab. 4.7 a

| Nachweis paternalen, fetaler Allele aus zellfreiem, maternalem Plasma bei Position c.2621T>G (<i>ITGA2B</i>)* | | | | | | |
|--|----------------------|------------------|------------------|---------|---------|------------------------------|
| Fall | Reads (Gesamtanzahl) | A Reads (HPA-3a) | C Reads (HPA-3b) | G Reads | T Reads | paternale, fetale Allele (%) |
| 1. HPA-3bb (Ki) | 477 | 230 | 245 | 1 | 1 | |
| HPA-3ab (Mu) | | | | | | |
| 2. HPA-3bb (Ki) | 1157 | 542 | 613 | 2 | 0 | |
| HPA-3ab (Mu) | | | | | | |
| 3. HPA-3bb (Ki) | 1161 | 553 | 606 | 1 | 1 | |
| HPA-3ab (Mu) | | | | | | |
| 4. HPA-3ab (Ki) | 1576 | 1562 | 12 (0,76%)± | 2 | 0 | |
| HPA-3aa (Mu) | | | | | | |
| 6. HPA-3ab (Ki) | 1816 | 2 (0,11%)± | 1812 | 0 | 2 | |
| HPA-3bb (Mu) | | | | | | |
| 7. HPA-3bb (Ki) | 805 | 295 | 509 | 1 | 0 | |
| HPA-3ab (Mu) | | | | | | |
| 8. HPA-3ab (Ki) | 929 | 78# | 840 | 3 | 8 | 78/929 (8,40%) |
| HPA-3bb (Mu) | | | | | | |
| 9. HPA-3aa (Ki) | 1415 | 1412 | 0 | 3 | 0 | |
| HPA-3aa (Mu) | | | | | | |
| 10. HPA-3ab (Ki) | 626 | 25# | 597 | 2 | 2 | 25/626 (3,99%) |
| HPA-3bb (Mu) | | | | | | |
| 11. HPA-3ab (Ki) | 857 | 360 | 494 | 1 | 2 | |
| HPA-3ab (Mu) | | | | | | |
| 12. HPA-3aa (Ki) | 639 | 636 | 0 | 3 | 0 | |
| HPA-3aa (Mu) | | | | | | |
| 13. HPA-3ab (Ki) | 776 | 766 | 6 (0,77%)± | 3 | 1 | |
| HPA-3aa (Mu) | | | | | | |

* Die Genotypen von Mutter und Kind sind bekannt: Ki = Kind; Mu = Mutter.
paternale, fetale Allele
± falsch negativ (Frequenz des antithetischen Allels <2% der Gesamtanzahl der Reads bei Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind)

Tab. 4.7 b

Tab. 4.7 a, b Nachweis von paternalen, fetalen Allelen bei dem Merkmal HPA-3.

Dargestellt sind die einzelnen Reads, welche pro Fall bei dem SNP* *ITGA2B* (HPA-3) ermittelt worden sind. Es wurde fetale DNA angenommen, wenn das antithetische Allel, bei Homozygotie der Mutter, mit einer Frequenz von $\geq 2\%$ der Gesamtanzahl der Reads** bestimmt worden ist. (a) In einem von drei Fällen wurden richtig positiv nicht-maternale, fetale Sequenzen detektiert (farblich hervorgehoben). Bei Fall #4 und #6 lag der Anteil der Reads an der Gesamtanzahl bei dem paternalen, fetalen Allel < 2%. (b) In 2 von 5 Fällen wurden richtig positiv nicht-maternale, fetale Sequenzen detektiert (farblich hervorgehoben). Bei den Fällen #4, #6 und #13 wurden keine paternalen, fetalen Allele nachgewiesen (Reads < 2% der Gesamtanzahl der Reads). Die Aufbereitung der Proben der aufgelisteten Fälle erfolgte (a) mit dem *Primer Panel I*, (b) mit dem *Primer Panel II*, bei welchem Fall #5 nicht aufgeführt ist, da diese Probe ausschließlich mit dem *Primer Panel I* aufbereitet wurde.

*SNP: *Single Nucleotide Polymorphismus*

**Gesamtanzahl der Reads: alle ermittelten Reads pro SNP

4.9.5 Genotypisierung von fetalem, humanem Plättchenantigen (HPA) -5

4.9.5.1 Primer Panel I

Die Gesamtanzahl der Reads, welche bei dem Merkmal HPA-5 bei den mit dem *Primer Panel I* aufbereiteten Proben, bestimmt wurde, betrug im Durchschnitt 2861 (Mittelwert;

SD: 751, Spannweite: 1752 - 4220, n=9). Bei Fall #2 wurden richtig positiv nicht-maternale, fetale Sequenzen detektiert mit einer Frequenz von 4,57 % der Gesamtanzahl der *Reads*, was einem prozentualen Anteil fetaler DNA in maternalem Plasma von 9,14 % entspricht. Die Frequenz der bei dem antithetischen Allel bestimmten, falsch positiven *Base Calls* bei dem SNP *ITGA2* betrug bei den homozygoten Schwangeren, bei welchen keine fetomaternale Inkompatibilität vorlag, im Mittel 1,40 % der Gesamtanzahl der *Reads* (Mittelwert; SD: 1,68 %, Spannweite: 0,28 % - 3,90 %, n=4), wobei bei der Schwangeren mit der Fallnummer #4 die 2 % - Grenze überschritten worden ist (Tab. 4.8 a). Bei den homozygoten Kontrollen betrug die Anzahl der falsch positiven *Base Calls* 45 (1,28 % der Gesamtanzahl der *Reads*), 37 (1,51 % der Gesamtanzahl der *Reads*) und 7 (0,30 % der Gesamtanzahl der *Reads*) (Tab. 4.10 a). Die unerwarteten *Base Calls* wurden im Mittel mit einer Frequenz von 0,02 % (Mittelwert; SD: 0,02 %, Spannweite: 0 % - 0,04 %, n=18) der Gesamtanzahl der *Reads* bestimmt.

4.9.5.2 Primer Panel II

Bei den Proben, welche mit dem *Primer Panel II* aufbereitet wurden, lag die Gesamtanzahl der *Reads* durchschnittlich bei 1511 (Mittelwert; SD: 1101, Spannweite: 321 - 4310, n=13). Paternale, fetale Allele wurden richtig positiv bei einer von zwei Schwangeren mit einer Frequenz von 6,94 % der Gesamtanzahl der *Reads* bestimmt, was einem prozentualen Anteil fetaler DNA in maternalem Plasma von 13,88 % entspricht (Tab. 4.8 b). Bei der Schwangeren mit der Fallnummer #2 lag der Anteil der *Reads* an der Gesamtanzahl bei dem paternalen, fetalen Allel mit 1,98 % falsch negativ unter dem im Voraus definierten Grenzwert. Die Frequenz der bei dem antithetischen Allel bestimmten, falsch positiven *Base Calls* bei dem SNP *ITGA2* betrug bei den homozygoten Schwangeren, bei welchen keine fetomaternale Inkompatibilität vorlag, im Mittel 0,48 % der Gesamtanzahl der *Reads* (Mittelwert; SD: 0,16 %, Spannweite: 0,16 % - 0,62 %, n=8). Bei der männlichen homozygoten Kontrolle betrug die Anzahl der falsch positiven *Base Calls* bei dem SNP *ITGA2* bei dem antithetischen Allel bei Homozygotie 6 (0,42 % der Gesamtanzahl der *Reads*) (Tab. 4.10 b). Die Frequenz der im Durchschnitt gelesenen unerwarteten *Base Calls* betrug 0,03 % (Mittelwert; SD: 0,05 %, Spannweite: 0 % - 0,14 %, n=26) der Gesamtanzahl der *Reads*.

| Nachweis paternaler, fetaler Allele aus zellfreiem, maternalem Plasma bei Position c.1600G>A (<i>ITGA2</i>)* | | | | | | |
|---|----------------------|------------------|---------|------------------|---------|------------------------------|
| Fall | Reads (Gesamtanzahl) | A Reads (HPA-5b) | C Reads | G Reads (HPA-5a) | T Reads | paternale, fetale Allele (%) |
| 1. HPA-5aa (Ki) | 2878 | 8 | 1 | 2869 | 0 | |
| HPA-5aa (Mu) | | | | | | |
| 2. HPA-5ab (Ki) | 4220 | 4027 | 0 | 193# | 0 | 193/4220 (4,57%) |
| HPA-5bb (Mu) | | | | | | |
| 3. HPA-5aa (Ki) | 2924 | 17 | 0 | 2906 | 1 | |
| HPA-5aa (Mu) | | | | | | |
| 4. HPA-5aa (Ki) | 2333 | 91 (3,90%)# | 0 | 2241 | 1 | |
| HPA-5aa (Mu) | | | | | | |
| 5. HPA-5ab(Ki) | 3377 | 1638 | 0 | 1738 | 1 | |
| HPA-5ab (Mu) | | | | | | |
| 6. HPA-5aa (Ki) | 1752 | 15 | 0 | 1737 | 0 | |
| HPA-5aa (Mu) | | | | | | |

* Die Genotypen von Mutter und Kind sind bekannt: Ki = Kind; Mu = Mutter.
paternale, fetale Allele
falsch positiv (Frequenz des antithetischen Allels $\geq 2\%$ der Gesamtanzahl der Reads ohne das Vorliegen einer Inkompatibilität)

Tab. 4.8 a

| Nachweis paternaler, fetaler Allele aus zellfreiem, maternalem Plasma bei Position c.1600G>A (<i>ITGA2</i>)* | | | | | | |
|---|----------------------|------------------|---------|------------------|---------|------------------------------|
| Fall | Reads (Gesamtanzahl) | A Reads (HPA-5b) | C Reads | G Reads (HPA-5a) | T Reads | paternale, fetale Allele (%) |
| 1. HPA-5aa (Ki) | 628 | 1 | 0 | 627 | 0 | |
| HPA-5aa (Mu) | | | | | | |
| 2. HPA-5ab (Ki) | 2123 | 2081 | 0 | 42 (1,98%)± | 0 | |
| HPA-5bb (Mu) | | | | | | |
| 3. HPA-5aa (Ki) | 1671 | 8 | 0 | 1662 | 1 | |
| HPA-5aa (Mu) | | | | | | |
| 4. HPA-5aa (Ki) | 2934 | 18 | 0 | 2916 | 0 | |
| HPA-5aa (Mu) | | | | | | |
| 6. HPA-5aa (Ki) | 4310 | 26 | 0 | 4283 | 1 | |
| HPA-5aa (Mu) | | | | | | |
| 7. HPA-5ab (Ki) | 865 | 60# | 0 | 804 | 1 | 60/865 (6,94%) |
| HPA-5aa (Mu) | | | | | | |
| 8. HPA-5aa (Ki) | 1156 | 4 | 0 | 1152 | 0 | |
| HPA-5aa (Mu) | | | | | | |
| 9. HPA-5aa (Ki) | 1384 | 7 | 1 | 1376 | 0 | |
| HPA-5aa (Mu) | | | | | | |
| 10. HPA-5aa (Ki) | 939 | 432 | 0 | 507 | 0 | |
| HPA-5ab (Mu) | | | | | | |
| 11. HPA-5aa (Ki) | 420 | 2 | 0 | 418 | 0 | |
| HPA-5aa (Mu) | | | | | | |
| 12. HPA-5ab (Ki) | 321 | 170 | 0 | 151 | 0 | |
| HPA-5ab (Mu) | | | | | | |
| 13. HPA-5aa (Ki) | 1453 | 9 | 0 | 1442 | 2 | |
| HPA-5aa (Mu) | | | | | | |

* Die Genotypen von Mutter und Kind sind bekannt: Ki = Kind; Mu = Mutter.
paternale, fetale Allele
± falsch negativ (Frequenz des antithetischen Allels $< 2\%$ der Gesamtanzahl der Reads bei Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind)

Tab. 4.8 b

Tab 4.8 a, b Nachweis von paternalen, fetalen Allelen bei dem Merkmal HPA-5.

Dargestellt sind die einzelnen Reads, welche pro Fall bei dem SNP* *ITGA2* (HPA-5) ermittelt worden sind. Es wurde fetale DNA angenommen, wenn das antithetische Allel, bei Homozygotie der Mutter, mit einer Frequenz von $\geq 2\%$ der Gesamtanzahl der Reads** bestimmt worden ist. (a) Bei Fall #2 wurden richtig positiv nicht-maternale, fetale Sequenzen detektiert (farblich

hervorgehoben). Bei Fall #4 wurde das antithetische Allel falsch positiv mit einer Frequenz von $\geq 2\%$ der Gesamtanzahl der *Reads* gelesen. (b) In einem von zwei Fällen wurden richtig positiv nicht-maternale, fetale Sequenzen detektiert (farblich hervorgehoben). Bei Fall #2 lag der Anteil der *Reads* an der Gesamtanzahl bei dem paternalen, fetalen Allel $< 2\%$. Die Aufbereitung der Proben der aufgelisteten Fälle erfolgte (a) mit dem *Primer Panel I*, (b) mit dem *Primer Panel II*, bei welchem Fall #5 nicht aufgeführt ist, da diese Probe ausschließlich mit dem *Primer Panel I* aufbereitet wurde.

*SNP: *Single Nucleotide* Polymorphismus

**Gesamtanzahl der *Reads*: alle ermittelten *Reads* pro SNP

4.9.6 Genotypisierung von fetalem, humanem Plättchenantigen (HPA) -15

4.9.6.1 Primer Panel I

Bei dem Merkmal HPA-15 wurden bei den Proben, deren Aufbereitung mit dem *Primer Panel I* erfolgte, im Mittel 2326 *Reads* (Mittelwert; SD: 1302, Spannweite: 787 - 4328, n=9) bestimmt. Bei 2 von 2 Schwangeren wurden richtig positiv paternale, fetale Allele mit einer Frequenz von jeweils 2,58 % und 4,13 % der Gesamtanzahl der *Reads*, was einem prozentualen Anteil fetaler DNA in maternalem Plasma von 5,16 % bzw. 8,26 % entspricht (Tab. 4.9 a). Bei der Sequenzierung von DNA aus dem zellfreien Plasma von 3 Kontrollen (2 männlich; 1 weiblich, nicht schwanger) wurden bei dem SNP *CD109* richtig negativ keine *Base Calls* bei dem antithetischen Allel bei Homozygotie bestimmt (Tab. 4.10 a). Die Detektion der unerwarteten *Base Calls* erfolgte im Durchschnitt mit einer Frequenz von 0,08 % (Mittelwert; SD: 0,11 %, Spannweite: 0 % - 0,28 %, n=18).

4.9.6.2 Primer Panel II

Die Sequenzierung mittels dem *Primer Panel II* ergab im Durchschnitt 2719 *Reads* (Mittelwert; SD: 1504, Spannweite: 1227 - 6704, n=13). Bei 6 von 6 Schwangeren wurden paternale, fetale Allele richtig positiv detektiert mit einer durchschnittlichen Frequenz von 8,94 % (Mittelwert; SD: 4,16 %, Spannweite: 4,07 % - 13,54 %) der Gesamtanzahl der *Reads*, was einem prozentualen Anteil fetaler DNA in maternalem Plasma von 17,88 % entspricht (Tab. 4.9 b). Die Anzahl der bei dem antithetischen Allel bestimmten, falsch positiven *Base Calls* bei dem SNP *CD109* betrug bei den homozygoten Schwangeren, bei welchen keine fetomaternale Inkompatibilität vorlag, 0 und 3 (0,08 % der Gesamtanzahl der *Reads*). Die Frequenz der unerwarteten *Base Calls* betrug im Mittel 0,08 % (Mittelwert; SD: 0,07 %, Spannweite: 0 % - 0,23 %, n=26) der Gesamtanzahl der *Reads*.

| Nachweis paternalen, fetaler Allele aus zellfreiem, maternalem Plasma bei Position c.2108C>A (CD109)* | | | | | | |
|--|----------------------|-------------------|-------------------|---------|---------|------------------------------|
| Fall | Reads (Gesamtanzahl) | A Reads (HPA-15b) | C Reads (HPA-15a) | G Reads | T Reads | paternale, fetale Allele (%) |
| 1. HPA-15bb (Ki) HPA-15ab (Mu) | 2964 | 1436 | 1526 | 0 | 2 | |
| 2. HPA-15ab (Ki) HPA-15bb (Mu) | 4227 | 4118 | 109# | 0 | 0 | 109/4227 (2,58%) |
| 3. HPA-15aa (Ki) HPA-15ab (Mu) | 1691 | 885 | 806 | 0 | 0 | |
| 4. HPA-15ab (Ki) HPA-15aa (Mu) | 1186 | 49# | 1137 | 0 | 0 | 49/1186 (4,13%) |
| 5. HPA-15ab (Ki) HPA-15ab (Mu) | 787 | 332 | 455 | 0 | 0 | |
| 6. HPA-15aa (Ki) HPA-15ab (Mu) | 1166 | 542 | 621 | 1 | 2 | |

* Die Genotypen von Mutter und Kind sind bekannt: Ki = Kind; Mu = Mutter.
paternale, fetale Allele

Tab. 4.9 a

| Nachweis paternalen, fetaler Allele aus zellfreiem, maternalem Plasma bei Position c.2108C>A (CD109)* | | | | | | |
|--|----------------------|-------------------|-------------------|---------|---------|------------------------------|
| Fall | Reads (Gesamtanzahl) | A Reads (HPA-15b) | C Reads (HPA-15a) | G Reads | T Reads | paternale, fetale Allele (%) |
| 1. HPA-15bb (Ki) HPA-15ab (Mu) | 2107 | 1187 | 917 | 2 | 1 | |
| 2. HPA-15ab (Ki) HPA-15bb (Mu) | 3294 | 3157 | 134# | 3 | 0 | 134/3294 (4,07%) |
| 3. HPA-15aa (Ki) HPA-15ab (Mu) | 3026 | 1555 | 1470 | 0 | 1 | |
| 4. HPA-15ab (Ki) HPA-15aa (Mu) | 3853 | 165# | 3684 | 2 | 2 | 165/3853 (4,28%) |
| 6. HPA-15aa (Ki) HPA-15ab (Mu) | 6704 | 3148 | 3547 | 5 | 4 | |
| 7. HPA-15ab (Ki) HPA-15bb (Mu) | 1227 | 1063 | 164# | 0 | 0 | 164/1227 (13,37%) |
| 8. HPA-15bb (Ki) HPA-15ab (Mu) | 2192 | 1445 | 746 | 1 | 0 | |
| 9. HPA-15ab (Ki) HPA-15aa (Mu) | 2312 | 313# | 1998 | 1 | 0 | 313/2312 (13,54%) |
| 10. HPA-15ab (Ki) HPA-15aa (Mu) | 1885 | 166# | 1716 | 2 | 1 | 166/1885 (8,81%) |
| 11. HPA-15aa (Ki) HPA-15aa (Mu) | 1279 | 0 | 1279 | 0 | 0 | |
| 12. HPA-15ab (Ki) HPA-15bb (Mu) | 1336 | 1207 | 128# | 0 | 1 | 128/1336 (9,58%) |
| 13. HPA-15aa (Ki) HPA-15aa (Mu) | 3959 | 3 | 3947 | 4 | 5 | |

* Die Genotypen von Mutter und Kind sind bekannt: Ki = Kind; Mu = Mutter.
paternale, fetale Allele

Tab. 4.9 b

Tab. 4.9 a, b Nachweis von paternalen, fetalen Allelen bei dem Merkmal HPA-15.

Dargestellt sind die einzelnen Reads, welche pro Fall bei dem SNP* CD109 (HPA-15) ermittelt worden sind. Es wurde fetale DNA angenommen, wenn das antithetische Allel, bei Homozygotie der Mutter, mit einer Frequenz von $\geq 2\%$ der Gesamtanzahl der Reads** bestimmt worden ist. (a) In 2 von 2 Fällen wurden richtig positiv nicht-maternale, fetale Sequenzen detektiert (farblich hervorgehoben). (b) In 6 von 6 Fällen wurden richtig positiv paternale, fetale Sequenzen detektiert (farblich hervorgehoben). Die Aufbereitung der Proben der aufgelisteten Fälle erfolgte (a) mit dem

Primer Panel I, (b) mit dem Primer Panel II, bei welchem Fall #5 nicht aufgeführt ist, da diese Probe ausschließlich mit dem Primer Panel I aufbereitet wurde.

*SNP: Single Nucleotide Polymorphismus

**Gesamtanzahl der Reads: alle ermittelten Reads pro SNP

| Next-Generation-Sequencing von DNA aus zellfreiem Plasma von 3 Kontrollen bei den Positionen c.176T>C (ITGB3), c.2621T>G (ITGA2B), c.1600G>A (ITGA2) und c.2108C>A (CD109) | | | | | | |
|---|------------|----------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| System | Kontrollen | Reads (Gesamtanzahl) | A Reads | C Reads | G Reads | T Reads |
| HPA-1 | HPA-1aa | 11010 | 3 | 16 (0,15%) | 3 | 10988 (99,80%) |
| | HPA-1ab | 4283 | 1 | 2331 (54,42%) | 16 | 1935 (45,18%) |
| | HPA1bb | 4043 | 0 | 4023 (99,51%) | 18 | 2 (0,05%) |
| HPA-3 | HPA-3ab | 2349 | 1227 (52,23%) | 1101 (46,87%) | 11 | 10 |
| | HPA-3aa | 1960 | 1955 (99,74%) | 0 (0,00%) | 4 | 1 |
| | HPA-3ab | 3018 | 1429 (47,35%) | 1581 (52,39%) | 5 | 3 |
| HPA-5 | HPA-5aa | 3504 | 45 (1,28%) | 0 | 3459 (98,72%) | 0 |
| | HPA-5aa | 2452 | 37 (1,51%) | 0 | 2415 (98,49%) | 0 |
| | HPA-5aa | 2305 | 7 (0,30%) | 0 | 2298 (99,70%) | 0 |
| HPA-15 | HPA-15ab | 4328 | 2153 (49,75%) | 2163 (49,98%) | 0 | 12 |
| | HPA-15ab | 2053 | 985 (47,98%) | 1067 (51,97%) | 1 | 0 |
| | HPA-15bb | 2529 | 2525 (99,84%) | 0 (0,00%) | 1 | 3 |

Tab. 4.10 a

| Next-Generation-Sequencing von DNA aus zellfreiem Plasma einer männlichen Kontrolle bei den Positionen c.176T>C (ITGB3), c.2621T>G (ITGA2B), c.1600G>A (ITGA2) und c.2108C>A (CD109) | | | | | |
|---|----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Kontrolle | Reads (Gesamtanzahl) | A Reads | C Reads | G Reads | T Reads |
| HPA-1ab | 2412 | 0 | 1071 (44,40%) | 21 | 1320 (54,73%) |
| HPA-3aa | 1039 | 1038 (99,90%) | 0 (0,00%) | 1 | 0 |
| HPA-5aa | 1442 | 6 (0,42%) | 0 | 1436 (99,58%) | 0 |
| HPA-15ab | 2171 | 1107 (50,99%) | 1064 (49,01%) | 0 | 0 |

Tab. 4.10 b

Tab. 4.10 a, b Next-Generation-Sequencing von zellfreier, plasmatischer DNA von männlichen bzw. weiblichen, nicht-schwangeren Kontrollen bei den SNPs* ITGB3 (HPA-1), ITGA2B (HPA-3), ITGA2 (HPA-5) und CD109 (HPA-15).

Dargestellt sind die einzelnen Reads, welche pro Kontrolle bei den humanen Plättchenantigenen ermittelt worden sind. Das antithetische Allel wurde in allen Fällen bei Homozygotie richtig negativ mit einer Frequenz von < 2% der Gesamtanzahl der Reads** bestimmt. Bei der Aufbereitung der Proben wurde (a) das Primer Panel I, (b) das Primer Panel II verwendet.

*SNP: Single Nucleotide Polymorphismus

**Gesamtanzahl der Reads: alle ermittelten Reads pro SNP

5. Diskussion

Die fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT) basiert auf einer Inkompatibilität der humanen Plättchenantigene (HPA-Merkmale) zwischen Mutter und Kind. Wenn der Fetus ein HPA-Merkmal vom Vater geerbt hat, welches die Mutter nicht besitzt, kann eine Schwangere gegen dieses immunisiert werden. Immunglobuline der Klasse IgG werden nach transientser Bindung an den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) des Synzytiotrophoblasten über die Plazenta in die fetale Zirkulation transportiert (Kumpel, 2012a; Leach, 1996; Simister, 1996). Die Immunisierung erfolgt in der Mehrzahl der Fälle in der ersten Schwangerschaft (Mueller-Eckhardt, 1989). Im Gegensatz zur hämolytischen Erkrankung des Fetus und Neugeborenen ist bei der FNAIT häufig bereits das Erstgeborene betroffen, wobei schon ab der 16. - 20. SSW schwerwiegende Folgen wie die intrakranielle Blutung mit möglichem letalem Ausgang auftreten können (Bussel, 1997; Gruel, 1986; Tiller, 2013). Eine Folgeschwangerschaft ist mit dem Risiko behaftet, dass erneut eine FNAIT auftritt, sofern der Fetus das Antigen trägt, gegen welches sich die maternalen Alloantikörper richten. Fetale und neonatale Blutungskomplikationen können in der Folgeschwangerschaft durch die hochdosierte Gabe von i.v. Immunglobulin (wöchentlich 1g/kg KG) an die Schwangere zuverlässig verhindert werden (Bussel, 1988; Wienzek-Lischka, 2018; Berkowitz, 2007; Winkelhorst, 2017). Bei heterozygotem Kindsvater ist es daher notwendig, den fetalen HPA-Status pränatal zu bestimmen. Lo et. al legte 1997 mit der Entdeckung zellfreier, fetaler DNA-Fragmente in maternalem Plasma den Grundstein für die nicht-invasive Diagnostik (Lo, 1997; Lo, 1998b). Der non-invasive Nachweis des fetalen *RHD*-Gens aus maternalem Plasma ist bereits als Standardverfahren etabliert (Lo, 1998a; Faas, 1998; Scheffer, 2011b). Die nicht-invasive HPA-Genotypisierung des Fetus hat hingegen noch keinen verbreiteten Eingang in die reguläre Diagnostik gefunden. Dies liegt daran, dass der fetale *RHD*-Status sich auch vor dem Hintergrund eines Überschusses mütterlicher DNA im Plasma relativ einfach bestimmen lässt, da bei einer RhD-negativen Frau kaukasischer Abstammung das *RHD*-Gen in der Regel nicht vorhanden ist (Wagner, 2000). Bei den humanen Plättchenantigenen handelt es sich jedoch um sogenannte *Single Nucleotide* Polymorphismen (SNPs) (Metcalfe, 2003), das heißt, beide Allele unterscheiden sich nur durch ein einziges Nukleotid. Dem HPA-1-System, welches am häufigsten in die FNAIT involviert ist (Ghevaert, 2007; Kroll, 2005; Davoren, 2004), liegt beispielsweise der Austausch der Basen T>C an Position 176 im *ITGB3*-Gen zugrunde, was in einem Austausch der Aminosäuren Leucin → Prolin bei Position 33 des Glykoproteins IIIa resultiert (Newman, 1989).

Darüber hinaus ist der Nachweis einer einzelnen Punktmutation dadurch erschwert, dass die überwiegende Zahl der im Plasma zirkulierenden DNA-Fragmente, ca. 90 %, maternalen Ursprungs ist (Lo, 1998b; Lun, 2008).

Aus den eben genannten Gründen ist daher im Rahmen der nicht-invasiven Pränataldiagnostik eine interne Kontrolle essentiell, um feststellen zu können, ob eine ausreichende Konzentration fetaler DNA (fetale Fraktion) in der maternalen Plasmaprobe vorhanden ist. Dies ist besonders wichtig, wenn kein paternales Allel nachgewiesen wird. Wenn die fetale Fraktion zellfreier Plasma-DNA unter der Nachweisgrenze liegt, könnte ein falsch negatives Ergebnis erzielt werden. Wird fälschlicherweise angenommen, dass keine Inkompatibilität vorliegt, kann dies, durch das Unterlassen von prophylaktischen Maßnahmen, zu fatalen Folgen beim Kind führen.

I Validierung der non-invasiven, pränatalen, fetalen *RHD*-Bestimmung aus maternalem Plasma mittels *Real-time*-PCR (TaqMan®)

5.1 Genotypisierung von *RHD* aus dem Blutplasma von *RhD*-positiven und -negativen Blutspender/-innen

Bei 32 der 35 Proben von *RhD*-positiven, männlichen Spendern wurde der *RHD*-Status mittels *Real-time*-PCR (TaqMan®) erfolgreich detektiert. Bei den restlichen drei Proben, welche alle von einem männlichen Spender stammen, konnten die Ergebnisse nicht gewertet werden, da die Amplifikation von *RHD* Exon 5 und 7 unterschiedliche Resultate lieferte. Gemäß Protokoll wurde das Ergebnis als indeterminiert klassifiziert. Durch die Analyse beider Exone wurde somit sichergestellt, dass keine falsch negativen Ergebnisse auftraten. In den eben genannten drei Fällen wurde ebenfalls *SRY* nicht erfolgreich amplifiziert (2x0/2, 1x1/2 Replikate), weshalb davon auszugehen ist, dass die entnommene Blutprobe eventuell bei der Aufbereitung kontaminiert wurde. Bei allen anderen Plasmaproben von männlichen Spendern (n=32) war die Amplifikation der Y-chromosomalen Sequenzen richtig positiv, lediglich bei einer Probe konnte das Ergebnis nicht gewertet werden, da nur 1/2 Replikaten von *SRY* amplifiziert worden ist („Ergebnis indeterminiert“).

Bei allen Proben weiblicher, *RhD*-positiven Spenderinnen (n=14) wurden die *RHD*-Exone 5 und 7 erfolgreich bestimmt. Bei der Analyse von Blutproben, welche *RhD*-negativen Personen entnommen worden sind (n=6; nur weibliche Spenderinnen), war die Amplifikation der *RHD* Exone 5 und 7, bis auf eine Ausnahme, richtig negativ. Die Amplifikation von *SRY* war ebenfalls bei allen Plasmaproben von weiblichen Spenderinnen (n=20) richtig negativ.

Zusammenfassend gesagt, traten unter Berücksichtigung des vorab definierten Algorithmus zur Interpretation der Untersuchungsergebnisse neben vier indeterminierten Ergebnissen lediglich ein falsch positives Ergebnis, jedoch keine falsch negativen Ergebnisse auf (Tab. 4.1).

5.2 Intra- und Inter-Assay Variabilität

Bei der Validierung der *RHD*-Bestimmung aus zellfreiem Plasma mittels *Real-time*-PCR (TaqMan®) erzielten wir eine hohe Wiederholgenauigkeit. Zur Bestimmung der Präzision wurden zwei Analysenserien durchgeführt. Hierzu wurde zum einen das Blutplasma einer männlichen *RhD*-positiven Person 3x an einem Tag analysiert (Intra-Assay

Variabilität). Die C_T -Mittelwerte, welche jeweils bei den Zielregionen *RHD* Exone 5, 7, *SRY* und *ALB* gemessen wurden, waren bis auf eine Ausnahme bei *Albumin* (VK: 1,51 %), nahezu identisch. Zum anderen wurden mehrere Analysenserien (n=3) verteilt auf drei Tage durchgeführt (Inter-Assay Variabilität). Auch hier gab es nur einen Ausreißer bei *SRY* (VK: 2,23 %), ansonsten waren die Abweichungen der bei allen Zielsequenzen gemessenen C_T -Mittelwerte sehr gering.

5.3 Titration von Plasma einer männlichen, RhD-positiven Person in Plasma einer weiblichen, RhD-negativen Person

Vor der Aufbereitung von maternalem Plasma wurde eine Titration von Plasma einer männlichen, RhD-positiven Person in Plasma einer weiblichen, RhD-negativen Person bis zu einer Verdünnung von 1:256 durchgeführt (insgesamt 4 Plasmamischversuche). In allen Fällen wurden die *RHD* Exone 5 und 7 sowie das *SRY*-Gen bis zu einer Verdünnung von 1:256 richtig positiv detektiert. Lediglich bei einer Plasmamischung erfolgte keine Amplifikation bei einer Verdünnung von 1:4. Hiermit wurde gezeigt, dass die *RHD*-Genotypisierung mittels *Real-time*-PCR (TaqMan®) eine sehr hohe Sensitivität aufweist.

5.4 Fetale RHD-Genotypisierung aus dem Blutplasma von RhD-negativen Schwangeren

Alle RhD-positiven Feten wurden erfolgreich mittels *Real-time*-PCR (TaqMan®) detektiert, wobei das Geschlecht mittels der Detektion von *SRY* in 13 von 15 Fällen erfolgreich bestimmt worden ist. In zwei Fällen war das Ergebnis nicht eindeutig, da nur 1/2 Replikate bei *SRY* amplifiziert worden ist („Ergebnis indeterminiert“). Es handelte sich dabei um einen weiblichen und einen männlichen Fetus.

Bei 7 von 10 Schwangeren mit RhD-negativem Fetus war die Amplifikation der *RHD* Exone 5 und 7 richtig negativ. Bei den restlichen drei Schwangeren waren die Ergebnisse nicht eindeutig, da die Amplifikation der *RHD*-Gene unterschiedliche Resultate lieferte. Gemäß Protokoll wurde das Ergebnis als indeterminiert klassifiziert. Durch die Analyse beider *RHD* Exone wurde somit sichergestellt, dass keine falsch negativen Ergebnisse auftraten. Bei allen Schwangeren mit einem männlichen RhD-negativen Fetus (n=6) wurden falsch negative Ergebnisse verhindert, da durch die Amplifikation der Y-chromosomalen Sequenzen gezeigt werden konnte, dass fetale DNA

in der maternalen Plasmaprobe vorlag. Im Falle eines weiblichen RhD-negativen Fetus war die Amplifikation von *SRY* richtig negativ (n=4).

Unter Berücksichtigung des vorab definierten Algorithmus zur Interpretation der Untersuchungsergebnisse traten somit neben fünf indeterminierten Ergebnissen keine falsch positiven oder falsch negativen Ergebnisse auf.

Zusammenfassend gesagt, wurde der fetale *RHD*-Status durch die parallele Amplifikation der *RHD* Exone 5 und 7 mittels *Real-time-PCR* (TaqMan®) sicher detektiert. Des Weiteren wurden falsch positive bzw. falsch negative Ergebnisse durch die Bestimmung der *RHD* Exone als Triplikate, sowie *SRY* und Albumin als Duplikate, erfolgreich verhindert. Bei einem „negativen Ergebnis“ (Fetus RhD-negativ) wurde das Vorhandensein fetaler DNA in der maternalen Plasmaprobe durch den Nachweis Y-chromosomaler Sequenzen sichergestellt. Dies war jedoch nur bei männlichen Feten möglich. Bei einem Kind mit weiblichem Geschlecht erfolgte keine interne Kontrolle, die Amplifikation von *SRY* war in diesen Fällen richtig negativ. Durch die Validierung dieser Methode wurde Routine im Umgang mit zellfreier, plasmatischer DNA gewonnen und dadurch eine valide Grundlage für die Etablierung der non-invasiven, pränatalen Bestimmung fetaler Blutgruppenmerkmale aus maternalem Plasma mittels *Next-Generation-Sequencing* (NGS) geschaffen.

II Etablierung der non-invasiven, pränatalen Bestimmung fetaler, humaner Plättchenantigene (HPA-1, -3, -5 und -15) aus maternalem Plasma mittels „Next-Generation-Sequencing“ (NGS)

Wir haben ein neues Verfahren zur nicht-invasiven, pränatalen Detektion fetaler humaner Plättchenantigene aus mütterlichem Plasma etabliert. Dabei haben wir eine Methode zur Sequenzierung klonal amplifizierter DNA-Fragmente, „Next-Generation-Sequencing“ (NGS) oder *massively parallel sequencing* genannt, eingesetzt (Voelkerding, 2009). Als NGS-Plattform wählten wir ein Halbleiter-basiertes Sequenzierungssystem, das *Ion Personal Genome Machine® (PGM™)*-System von Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific). Bei diesem Verfahren wird die Tatsache genutzt, dass beim Anhängen eines Nukleotids an einen DNA-Strang neben Pyrophosphat auch immer ein Proton frei wird. Das freiwerdende Proton führt dabei zu einer pH-Änderung in der Umgebung, welche von einem Halbleiter-Chip, durch Umwandlung in eine Spannungsänderung, gemessen werden kann (Rothberg, 2011). Diese Spannungsänderung ist direkt proportional zur Anzahl der einzeln zugeführten, bekannten, eingebauten Nukleotide. Durch Synthese der DNA an der komplementären, zuvor klonal amplifizierten Matrize, kann die Basenfolge abgelesen werden. Da der Halbleiter-Chip Millionen Wells enthält, ist eine parallele Sequenzierung von Millionen unterschiedlicher DNA-Fragmente möglich, deshalb auch der Name *massively parallel sequencing* (Rothberg, 2011). Eine weitere relevante Besonderheit von NGS ist die vor der eigentlichen Sequenzierung durchgeführte klonale Amplifikation der aus dem maternalen Plasma isolierten DNA-Fragmente. Durch diese klonale Vervielfältigung können die vorhandenen Allele quantitativ „ausgezählt“ werden, wodurch die Schwierigkeit, die niedrige Anzahl an paternalen, fetalen Genkopien vor dem hohen Hintergrund maternaler DNA zu detektieren, verringert wird. Nach interner Festlegung wurden Sequenzen als fetal interpretiert, wenn das antithetische Allel, bei Homozygotie der Mutter, mit einer Frequenz von $\geq 2\%$ der Gesamtanzahl der *Reads* (alle bei einem SNP bzw. einer Exonsequenz bestimmten *Reads*) bestimmt worden ist.

Des Weiteren wurde durch die Verwendung spezifischer Primerpaare die Detektionswahrscheinlichkeit erhöht, da diese die gewünschten SNPs bzw. Exonsequenzen so flankieren, dass kurze PCR-Amplikons (in unserem Fall mit einer Länge von bis zu 140 bp) entstehen (Sikora, 2010). Die erhöhte Wahrscheinlichkeit fetale Allele zu detektieren, ergibt sich durch die Tatsache, dass zellfreie, fetale DNA-Moleküle in der Regel kleiner als zellfreie, maternale DNA-Moleküle sind (Chan, 2004; Li, 2004).

Darüber hinaus wird bei dem hier entwickelten Verfahren durch die parallele Detektion mehrerer Polymorphismen gewährleistet, dass paternale Allele, unabhängig von dem implizierten HPA-Merkmal, das Vorhandensein fetaler DNA anzeigen. Das Ergebnis der Untersuchung wird hierbei nur gewertet, wenn die fetale Fraktion über dem vorab definierten Schwellenwert von 4 % liegt. Auf diese Weise können falsch negative Befunde weitgehend ausgeschlossen werden.

Als interne Kontrolle für das Vorhandensein fetaler DNA wählten wir neben Y-chromosomalen Sequenzen, 8 anonyme SNPs (*Ion AmpliSeq™ Sample ID Panel*), sowie erythrozytäre Blutgruppenantigene, welche in hämolytische Erkrankungen des Fetus und Neugeborenen involviert sind (*RHD, RHCE, KEL, DARC, SLC14A1, GYPA, GYPB*). Die 8 anonymen SNPs des *Ion AmpliSeq™ Sample ID Panels* zeigen eine Allelfrequenz von jeweils ca. 0,5 (Pakstis, 2010). Sie sind daher informativ für den Nachweis paternalen Allele sowie für die Bestimmung der fetalen Fraktion (siehe oben).

5.5 Qualität und ermittelte Reads

Bei der Verwendung des *Primer Panel II* war die Sequenzierung mit einer geringeren Qualität assoziiert als bei der Aufbereitung mit dem *Primer Panel I*. Es mussten deutlich mehr polyklonale Sequenzen, Adapterdimere sowie *Reads* mit geringer Qualität ausgeschlossen werden. Darüber hinaus betrug die verwertbaren *Reads* (alle bei einem SNP bzw. einer Exonsequenz bestimmten *Reads*) pro Fall im Durchschnitt ca. die Hälfte der *Reads*, welche bei den mit dem *Primer Panel I* aufbereiteten Proben bestimmt worden sind. Dieser Qualitätsunterschied ist am ehesten durch eine ungünstige Relation zwischen der Größe des Chips und der Anzahl der zu analysierenden Plasmaproben bedingt. Bei der Verwendung des *Primer Panel I* wurden nur 2 Proben pro Sequenzierungschip analysiert. Nach der Erhöhung der Anzahl der zu sequenzierenden SNPs bzw. Exonsequenzen (*Primer Panel II*) wurden 4 Plasmaproben parallel analysiert, da durch technische Neuerungen nur noch ein *Primer Pool* pro Person benötigt wurde. Bei der Verwendung einer nächstgrößeren Chipvariante (Ion 316TM Chip v2) war die Sequenzierung mit einer deutlich besseren Qualität assoziiert, auch die bestimmten *Reads* waren um ein Vielfaches höher (Ergebnisse in dieser Arbeit nicht dargestellt).

5.5.1 Ausschluss von Systemen

Aufgrund einer zu geringen Gesamtanzahl an *Reads* mussten einige sequenzierte Zielregionen (siehe Abschnitt 4.6) von der Auswertung ausgeschlossen werden. *RHCE C/c* musste ebenfalls exkludiert werden, da mit der hier vorgestellten Sequenzierstrategie der Polymorphismus nicht dargestellt werden konnte. Vermutlich infolge der hohen Homologie zwischen dem *RHD*- und dem *RHCE*-Gen.

Durch die Verwendung einer nächstgrößeren Chipvariante sowie durch die Änderung des Amplifikationsprotokolls (Erhöhung der Zykluszahl) bei der Erstellung der Bibliothek kam es zu einer deutlichen Erhöhung der Gesamtanzahl an *Reads*, sodass seitdem, bis auf *MNS M/N (GYPA, rs7682260)*, alle Zielregionen erfolgreich sequenziert wurden (Ergebnisse nicht dargestellt).

5.6 Unerwartete Base Calls

Die im Durchschnitt bestimmte Frequenz der detektierten unerwarteten *Base Calls* (nicht dem biallelischen System eines SNPs zugehörige Basen) konnte, bis auf vier Ausreißer,

von dem im Voraus definierten Grenzwert von 2 % für das Vorhandensein paternalen, fetaler Allele abgegrenzt werden. Bei den mit dem *Primer Panel I* aufbereiteten Proben lag der Anteil der unerwarteten *Base Calls* einmalig über der Nachweisgrenze von 2 %, bei der Verwendung des *Primer Panel II* war dies in vier Fällen der Fall. Die Ursache dieser im Einzelfall auftretenden hohen Frequenz der unerwarteten *Base Calls* blieb unklar. Auch hier wirkte sich die Verwendung eines nächstgrößeren Sequenzierungschips sowie die Erhöhung der Zykluszahl der Amplifikation bei der Erstellung der Bibliothek positiv aus, und zwar in dem Sinne, dass seitdem die 2 %-Grenze nicht mehr überschritten worden ist (Ergebnisse nicht dargestellt).

5.7 Interne Kontrolle für das Vorhandensein fetaler DNA in zellfreiem, maternalem Plasma

In 12 von 13 Fällen wurde fetale DNA erfolgreich in zellfreiem, maternalem Plasma mithilfe der neben den HPA-Merkmalen sequenzierten SNPs bzw. Exonsequenzen nachgewiesen. Somit konnte auch im Falle eines Nichtnachweises des implizierten, vom Vater vererbten Allels, sichergestellt werden, dass sich zirkulierende, fetale DNA-Fragmente in der Plasmaprobe befanden und dadurch falsch negative Ergebnisse vermieden werden. Lediglich bei Fall #4 konnte das Vorhandensein fetaler DNA ausschließlich durch die Detektion des fetalen, paternalen Allels HPA-15b bestätigt werden, weitere positive Kontrollen blieben aus bzw. lagen hier die detektierten *Reads* unter der Nachweisgrenze von 2 %. Dies ist am ehesten durch eine geringe Konzentration fetaler DNA in der Plasmaprobe bedingt, da die Blutentnahme bei dieser Schwangeren im Vergleich zu den anderen Proben bereits in der 14. SSW erfolgte. In diesem Fall würde eine Wiederholung der Blutentnahme nach 2 - 3 Wochen empfohlen, da die Konzentration fetaler DNA im Laufe der Schwangerschaft stetig ansteigt (Lo, 1998b). Bei alleinigem Nachweis einer HPA-Inkompatibilität ohne Nachweis eines weiteren paternalen Allels sollte jedoch ohne Zuzwarten bis zur nächsten Blutentnahme bereits mit der maternalen Immunglobulingabe begonnen werden, um schwerwiegende Komplikationen zu vermeiden.

5.8 Genotypisierung der fetalen, humanen Plättchenantigene: *ITGB3* (HPA-1), *ITGA2B* (HPA-3), *ITGA2* (HPA-5), *CD109* (HPA-15) aus maternalem Plasma

5.8.1 Vordefinierter Grenzwert für das Vorhandensein fetaler, paternaler Allele

Bei 3 von 13 maternalen Plasmaproben wurde der vordefinierte Schwellenwert für das Vorhandensein fetaler DNA (Frequenz paternaler Allele $\geq 2\%$; fetale Fraktion $\geq 4\%$) nicht erreicht. Diese Plasmaproben wurden daher von der nachfolgenden Analyse (Punkt 5.8.2 bis Punkt 5.8.5) ausgeschlossen. Die Schwangeren befanden sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme in der 14. SSW (Fall #4), 17. SSW (Fall #6) und in der 26. SSW (Fall #13). Wie bereits unter Punkt 5.7 erwähnt, empfehlen wir in solch einem Fall eine Wiederholung der Blutentnahme nach 2 - 3 Wochen.

5.8.1.1 Fall #4

Bei der Schwangeren mit der Fallnummer #4 lag eine fetomaternale HPA-3- und HPA-15-Inkompatibilität vor, wobei nur bei dem Merkmal HPA-15 die Frequenz des paternalen Allels über der Nachweisgrenze von 2 % lag. Wie bereits unter Punkt 5.7 erwähnt, ist das falsch negative Ergebnis am ehesten durch eine geringe fetale DNA-Konzentration in der Plasmaprobe bedingt, da die Blutentnahme in einer frühen Schwangerschaftswoche erfolgte. Des Weiteren konnte bei der Plasmaprobe dieser Patientin neben der Detektion von HPA-15b keine weitere positive Kontrolle bestimmt werden bzw. lag die Frequenz unter dem geforderten Schwellenwert, was die Vermutung der geringen Konzentration fetaler DNA-Fragmente bekräftigt.

5.8.1.2 Fall #6

Das Gleiche wird bei der Schwangeren mit der Fallnummer #6 vermutet, da mittels der Plasmaprobe dieser Patientin beide vorliegenden fetomaternalen HPA-Inkompatibilitäten (HPA-1, HPA-3) nicht detektiert wurden bzw. die Frequenz der paternalen Allele unter der 2 %-Grenze lag. Die positive interne Kontrolle für das Vorhandensein fetaler DNA erfolgte in diesem Fall ebenfalls über den Nachweis weniger SNPs und Exonsequenzen, hauptsächlich über *RHD* und *SRY*. Hierbei werden jegliche *Reads* unabhängig von der Anzahl als fetal interpretiert, da diese Zielregionen im

maternalen Genom nicht präsent sind. Bei den anderen Kontroll-SNPs und Exonsequenzen wurde die 2 % - Grenze in der Mehrzahl der Fälle nicht erreicht.

5.8.1.3 Fall #13

Die Mindestfrequenz von 2 % wurde auch bei der Schwangeren mit der Fallnummer #13 nicht erreicht. Die Patientin trug ein HPA-3-inkompatibles Kind in sich. Ein ursächlicher Faktor könnte hier die im Allgemeinen bei diesem SNP *ITGA2B* (besonders bei den mit dem *Primer Panel II* aufbereiteten Proben) im Vergleich zu den anderen HPA-Merkmalen sehr geringe Gesamtanzahl der *Reads* darstellen (Mittelwert 1021, SD: 395, Spannweite: 477 - 1816, n=13). Durch die Verwendung einer nächstgrößeren Chipvariante kam es zu einer deutlichen Erhöhung der Gesamtanzahl an *Reads* (Ergebnisse nicht dargestellt).

5.8.2 Genotypisierung von fetalem, humanem Plättchenantigen (HPA) -1

Die vorliegenden HPA-1-Inkompatibilitäten (n=4) wurden erfolgreich detektiert. Ebenso erfolgte bei identischem, homozygotem HPA-1-Genotypus von Mutter und Kind richtig negativ keine Detektion, wobei in allen Fällen (n=5) das Vorhandensein fetaler DNA in der Plasmaprobe durch die Sequenzierung weiterer HPA-Merkmale (HPA-3, -5 und -15) bzw. der ebenfalls in die *Primer Panel* inkludierten SNPs und Exonsequenzen bestätigt werden konnte. Auch bei der Analyse von DNA aus dem zellfreien Plasma von 2 homozygoten Kontrollen (männlich/nicht schwanger) lag die Frequenz der bei dem antithetischen Allel bestimmten *Reads* mit 0,15 % bzw. 0,05 % deutlich unter dem Grenzwert von 2 %. Die Frequenz der bei dem SNP *ITGB3* detektierten, unerwarteten *Base Calls* betrug, wie unter Punkt 5.6 bereits erwähnt, aus unerklärlichen Gründen bei drei Fällen ≥ 2 % der Gesamtanzahl der *Reads*. Trotz der Überschreitung des im Voraus definierten Grenzwertes für das Vorhandensein fetaler DNA, ist eine fälschliche Interpretation diesbezüglich nicht möglich, da diese Basen nicht dem bekannten biallelischen System des SNPs angehören. Auch hier führte die Verwendung einer nächstgrößeren Chipvariante zum Erfolg (Ergebnisse nicht dargestellt).

5.8.3 Genotypisierung von fetalem, humanem Plättchenantigen (HPA) -3

Das paternale, fetale Allel bei dem Merkmal HPA-3 wurde in allen Fällen (n=3) erfolgreich detektiert. Bei dem Nichtvorhandensein einer HPA-3-Inkompatibilität bei

homozygoten Schwangeren (n=2) wurden richtig negativ keine falsch positiven *Base Calls* detektiert, wobei mittels anderer Kontroll-SNPs bzw. Exonsequenzen fetale DNA in der Plasmaprobe nachgewiesen werden konnte. Ebenso wurde bei der männlichen, homozygoten Kontrolle das antithetische Allel kein einziges Mal sequenziert. Die unerwarteten *Base Calls* konnten bei diesem Merkmal klar von den bei dem paternalen, fetalen Allel bestimmten *Reads* abgegrenzt werden.

5.8.4 Genotypisierung von fetalem, humanem Plättchenantigen (HPA) -5

Insgesamt schloss unsere Studie zwei Schwangere mit einer fetomaternalen HPA-5-Inkompatibilität ein, welche in beiden Fällen erfolgreich detektiert worden ist. Bei einer Schwangeren wurde das Plasma mittels *Primer Panel I* und II aufbereitet, wobei nur bei der Verwendung des *Primer Panel I* die detektierten *Reads* anteilig $\geq 2\%$ der Gesamtanzahl der *Reads* ausmachten. Bei der Analyse der Probe mittels *Primer Panel II* lag die Frequenz der bestimmten Basen mit 1,98 % knapp unter der Nachweisgrenze. Dies ist am ehesten durch die, insgesamt bei diesem *Primer Panel*, niedrigere Gesamtanzahl an detektierten *Reads* bedingt.

Bei dem SNP *ITGA2* beobachteten wir, im Vergleich zu den SNPs *ITGB3*, *ITGA2B* und *CD109*, eine deutlich höhere Frequenz an falsch positiven *Base Calls*. Hierbei handelte es sich hauptsächlich um „A *Reads*“, welche die Grundlage für den HPA-5b Phänotyp darstellen. Bei der Aufbereitung der Proben mittels *Primer Panel I* lagen die falsch positiven *Base Calls* einmalig über der Nachweisgrenze von 2 %, wodurch diese fälschlicherweise als fetal interpretiert wurden. Auch bei der Sequenzierung von DNA aus dem zellfreien Plasma von homozygoten Kontrollen (HPA-5aa) überschritten die falsch positiven *Base Calls* zwar nicht die 2 %-Schwelle, sie waren jedoch überdurchschnittlich hoch (Mittelwert 0,88 %, SD: 0,61 %, Spannweite: 0,30 % - 1,51 %, n=4). Bei Betrachtung der flankierenden Basenabfolge des DNA-Abschnitts, welcher den SNP *ITGA2* umgibt, fiel auf, dass sich in einer Leserichtung, nur 5 Basenpositionen von der Punktmutation entfernt, eine Poly-A-Sequenz befindet. Wir gehen davon aus, dass dieser Abschnitt mit 13 Desoxyadenosintriphosphaten Ursache für die hohe Anzahl an falsch positiven *Base Calls* ist, da es bei Homopolymeren bei der DNA-Synthese zu Leserasterverschiebungen kommt bzw. die gemessene pH-Verschiebung keine präzise Aussage über die Anzahl der inkorporierten Nukleotide zulässt. Später konnten wir zeigen, dass falsch positive *Base Calls* lediglich in der Leserichtung über dem Homopolymer vorkommen. Wird nur die andere Leserichtung ausgewertet, sind falsch positive Signale daher vernachlässigbar (Ergebnisse nicht dargestellt).

Im Gegensatz zu den falsch positiven *Base Calls*, waren die unerwarteten *Base Calls* mit einer durchschnittlichen Frequenz von 0,02 % der Gesamtanzahl der *Reads* deutlich von den paternalen, fetalen Allelen abgrenzbar.

5.8.5 Genotypisierung von fetalem, humanem Plättchenantigen (HPA) -15

Die nicht-invasive, fetale Genotypisierung von HPA-15 war erfolgreich. In allen Fällen (n=5) erfolgte eine Detektion der paternalen, fetalen Allele. Ebenso wurde bei der einzigen homozygoten Schwangeren, bei welchen keine fetomaternalen Inkompatibilität vorlag, richtig negativ kein antithetisches Allel detektiert (n=1). Des Weiteren war eine deutliche Abgrenzung der unerwarteten *Base Calls* zu den paternalen, fetalen Allelen möglich.

5.9 Limitationen der non-invasiven, pränatalen, fetalen Genotypisierung mittels „Next-Generation-Sequencing“ (Ionen-Halbleiter-Prinzip)

Die Detektion fetaler DNA in einer frühen Schwangerschaftswoche ist auch bei Einsatz des *Next-Generation-Sequencing* erschwert. Liegt der Anteil paternalen, fetalen Allele unter der Nachweisgrenze von 2 % empfehlen wir eine erneute Blutentnahme nach 2 - 3 Wochen, da die zu Beginn sehr geringe Konzentration fetaler DNA-Fragmente im Laufe der Schwangerschaft stetig ansteigt (Lo, 1998b).

Eine weitere Limitation des halbleiterbasierten Sequenzierungssystems besteht in der Sequenzierung homopolymerer Abschnitte. Bei der Inkorporation von zwei gleichen Nukleotiden wird die doppelte Menge an Protonen freigesetzt, was durch die doppelt so starke pH-Verschiebung, im Vergleich zum Einbau eines einzigen Nukleotids, gut messbar ist. Werden jedoch mehrere identische Nukleotide eingebaut, ist anhand der pH-Verschiebung keine präzise Bestimmung der Basenanzahl möglich. Im Rahmen unserer Analysen zeigte sich diese Limitation bei der Genotypisierung von HPA-5. In enger Nachbarschaft zu diesem SNP befindet sich in einer Leserichtung eine Poly-A-Sequenz (n=13), weshalb bei diesem Merkmal eine erhöhte Frequenz an falsch positiven *Base Calls* bestimmt worden ist. Dieses Problem lässt sich umgehen, wenn nur diejenigen Sequenzen mit Leserichtung ohne Einschluss der Poly-A-Sequenz ausgewertet werden.

5.9.1 Vergleich zur Sequenzierung mit der Illumina-Technologie

Im Gegensatz zu der Ionen-Halbleiter-Sequenzierung mit der Ion Torrent-Technologie erfolgt bei der von Illumina angewandten Methode eine präzisere Bestimmung der Basenabfolge, insbesondere bei homopolymeren Abschnitten. Bei diesem Verfahren werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide eingesetzt, welche neben der Markierung zusätzlich an den 3`OH-Enden mit einer „Schutzgruppe“ versehen sind. Dadurch wird nach der Inkorporation eines passenden Nukleotids die weitere Elongation durch die Polymerase verhindert. Durch das charakteristische Fluoreszenzsignal kann die eingebaute Base und damit folglich die komplementäre Base des Matrizenstrangs identifiziert werden. In einem nächsten Schritt wird die Fluoreszenzmarkierung als auch die „Schutzkappe“ entfernt, wodurch wieder ein neues markiertes Nukleotid eingebaut werden kann. Nach Inkorporation und Wahrnehmung des Fluoreszenzsignals wird die Markierung und die Schutzkappe erneut entfernt, um den Einbau weiterer Nukleotide und somit die Sequenzierung fortzuführen. Auf diese Weise ist eine genaue Bestimmung der Basenabfolge möglich. Homopolymere Abschnitte können zuverlässiger sequenziert werden, da die Sequenzierung durch das schrittweise Einbauen einzelner Nukleotide mit charakteristischem Fluoreszenzsignal erfolgt (Ju, 2006).

5.10 Publikationen zur pränatalen, nicht-invasiven Bestimmung fetaler Blutgruppenmerkmale

5.10.1 Bisherige Verfahren ohne interne Kontrolle für das Vorhandensein fetaler DNA

Scheffer et al. publizierten 2011 eine Methode zur nicht-invasiven, pränatalen Bestimmung des fetalen HPA-1a-Merkmals mittels *Real-time*-PCR (TaqMan®-Technologie). Um eine unspezifische Amplifikation der maternalen „Hintergrund“-DNA zu verhindern, wurde bei diesem Verfahren vor der Durchführung der PCR das maternale HPA-1b-Allel mittels eines *MspI* Restriktionsenzym verdaut. Auf den Nachweis für das Vorhandensein fetaler DNA in der Plasmprobe beim Vorliegen eines HPA-1a-negativen Feten wurde jedoch verzichtet (Scheffer, 2011a). Auch Le Toriellet et al. verzichteten bei dem publizierten Verfahren (allelspezifische *Real-time*-PCR und darauffolgende Schmelzkurvenanalyse der Amplikons zur Differenzierung zwischen unspezifischer und spezifischer HPA-1a-Amplifikation) zur nicht-invasiven, pränatalen Detektion des fetalen humanen Plättchenantigens (HPA) -1 auf eine interne positive

Kontrolle (Le Toriellec, 2013). Rieneck et al. nutzen *Next-Generation-Sequencing* zur Genotypisierung des fetalen *KEL*-Status, jedoch ebenfalls ohne interne Kontrolle für das Vorhandensein fetaler DNA (Rieneck, 2013). Ebenso lassen viele publizierte Protokolle zum nicht-invasiven Nachweis des fetalen *RHD*-Gens den Positivnachweis fetaler DNA außer Acht und nehmen eine geringe Rate falsch negativer Befunde in Kauf (Scheffer, 2011b).

5.10.2 Bisherige Verfahren mit positivem Nachweis für das Vorhandensein fetaler DNA und deren Limitationen

Für den Nachweis fetaler DNA in zellfreiem maternalen Plasma sind verschiedene Verfahren vorgeschlagen worden. Über die Detektion Y-chromosomaler Sequenzen kann das Vorhandensein fetaler DNA zuverlässig nachgewiesen werden (Lo, 1997). Diese Methode ist jedoch nur bei männlichen Feten anwendbar, im Falle eines weiblichen Fetus ist kein Nachweis möglich. Chan et al. nutzt die Beobachtung, dass der fetale (plazentare) Promotor des Tumorsuppressorgens *RASSF1A*, im Gegensatz zu dem in maternalen Blutzellen, hypermethyliert vorliegt. Durch die Verwendung methylierungssensitiver Restriktionsenzyme, welche die maternalen, hypomethylierten Promotorsequenzen verdauen, dient die unverdaute, fetale hypermethylierte Promoterregion als Kontrolle für das Vorhandensein fetaler DNA (Chan, 2006). Ein Schwachpunkt dieses Verfahrens ist jedoch die inkomplette Verdauung der maternalen Promotorsequenzen, wodurch falsch positive Ergebnisse auftreten können. Des Weiteren wurden *variable Short Tandem Repeats*, aufgrund der allelspezifischen, unterschiedlichen Anzahl an sich wiederholenden Einheiten, als positive Kontrolle genutzt (Liu, 2007; Wang, 2009). Ein Problem hierbei besteht in der unspezifischen „Hintergrund“-Amplifikation der im Überschuss vorhandenen, maternalen DNA. Dies stellt auch bei dem Einsatz von biallelischen Insertion/Deletion Polymorphismen einen limitierenden Faktor dar, weshalb invasive Methoden zur Klärung eingesetzt werden müssen. Darüber hinaus müssen bei diesem Verfahren vor der Durchführung der *Real-time*-PCR die informativen Polymorphismen durch Typisierung leukozytärer DNA beider Eltern vorab identifiziert werden (Page-Christiaens, 2006).

5.11 Fazit

In der vorliegenden Arbeit wurde ein valides Verfahren zur nicht-invasiven, pränatalen Detektion fetaler humaner Plättchenantigene mittels *Next-Generation-Sequencing* etabliert. Das quantitative Auszählen der sequenzierten, paternalen Allele ermöglicht eine Konzentrationsbestimmung der fetalen DNA in zellfreiem, maternalem Plasma, durch die Sequenzierung von mindestens 20 SNPs kann daher die fetale DNA-Fraktion ermittelt werden. Der angestrebte Mindest-Wert für paternale Allele von 2 % (fetale Fraktion = 4 %) hat sich bewährt. Bei Schwangeren mit einer fetalen DNA-Fraktion in zellfreiem Plasma von < 4 % wird eine Wiederholung der Untersuchung empfohlen. Auf diese Weise können falsch negative Ergebnisse vermieden werden. Unter Einhaltung der hier etablierten Standards ist die zielgerichtete Sequenzierung zellfreier, plasmatischer DNA ein zuverlässiges Verfahren zur Bestimmung fetaler HPA-Merkmale. Bei bekannter Immunisierung der Schwangeren mit einer FNAIT in der Vorgeschichte kann zur Identifizierung einer Risikoschwangerschaft auf invasive Verfahren, wie z.B. eine Chorionzottenbiopsie, verzichtet werden. Ist der Fetus Merkmalsträger, können mittels i.v. Immunglobulingabe schwere Blutungsereignisse, wie eine intrakranielle Blutung, verhindert werden (Wienzek-Lischka, 2018). Da die FNAIT in der Mehrzahl der Fälle bereits das Erstgeborene betrifft (Mueller-Eckhardt, 1989), wird international die Etablierung von Screening-Programmen in der Mutterschaftsvorsorge diskutiert, damit die primäre Immunisierung einer Schwangeren gegen HPA-1a frühzeitig erkannt werden kann. Das hier etablierte Verfahren könnte auch zur Identifizierung von Risikoschwangerschaften im Rahmen der Primärprophylaxe fetaler Blutungen eingesetzt werden.

5.12 Ausblick

Next-Generation-Sequencing zeigte sich als ein geeignetes Verfahren zur nicht-invasiven, pränatalen Genotypisierung fetaler, humaner Plättchenantigene aus maternalem Plasma. Falsch negative Ergebnisse können durch Bestimmung der fetalen DNA-Fraktion, welche über 4 % liegen sollte, ausgeschlossen werden. Durch die Etablierung dieser Methode wurde der Weg geebnet, auch andere Blutgruppenantigene, welche eine fetale/neonatale Alloimmunzytopenie verursachen können, mittels NGS zu detektieren. Hierzu zählen, als potentielle Auslöser einer hämolytischen Erkrankung des Fetus und Neugeborenen (HDFN), vor allem die erythrozytären Blutgruppensysteme *RHD*, *RHCE*, *KEL*, *DARC*, *SLC14A1*, *GYPA* sowie *GYPB*, welche bei der hier vorgestellten Methode bereits als interne Kontrolle für das Vorhandensein fetaler DNA eingesetzt wurden. Das Krankheitsbild mit der größten klinischen Relevanz ist die durch Anti-D-Antikörper ausgelöste hämolytische Erkrankung des Fetus und Neugeborenen (Axt-Fliedner, 2018a). Erfolgt mithilfe des hier etablierten Verfahrens eine valide Bestimmung des fetalen *RHD*-Status, können auch hier Risikoschwangerschaften identifiziert und gezielt behandelt werden.

Künftig könnte durch die Wahl kürzerer Amplikons (z.B. 60 - 80 bp) bei der Erstellung der DNA-Bibliothek die Sensitivität der zielgerichteten Sequenzierung deutlich erhöht werden. Die Spezifität des Sequenzierverfahrens könnte durch den Einsatz von *unique molecular identifiers* erhöht werden. Bei diesem Verfahren werden einzelne DNA-Moleküle aus dem zellfreien Plasma mit einem molekularen „Etikett“ (*Tag*), bestehend aus einer zufälligen Basenabfolge, versehen. Da alle amplifizierten und sequenzierten Moleküle mit dem gleichen Etikett von demselben, einzelnen Ausgangsmolekül abstammen, darf die Sequenz dieser Moleküle nicht polymorph sein. Ist dies der Fall können PCR- oder Sequenzierfehler *in silico* gelöscht werden, indem Sequenzen mit dem gleichen Etikett auf eine Konsensus-Sequenz zurückgeführt werden (Kivioja, 2011; Islam, 2014; Hong, 2017).

Zusammenfassend gesagt, ist die zielgerichtete, massive parallele Sequenzierung Methode der Wahl zum nicht-invasiven Nachweis fetaler Blutgruppen aus zellfreier, maternaler Plasma-DNA. Eine Risikoschwangerschaft kann somit bei fetaler/neonataler Alloimmunzytopenie ohne Gefährdung der Schwangeren oder des werdenden Kindes erkannt werden.

6. Zusammenfassung

Hintergrund:

Die fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT) beruht auf einer fetomaternalen Inkompatibilität der humanen Plättchenantigene (HPA-Merkmale). Die Mutter bildet thrombozytäre Alloantikörper gegen fetale, vom Vater vererbte Antigene, welche, nach Transport über die Plazenta in die fetale Zirkulation, eine fetale/neonatale Thrombozytopenie auslösen können. Die schwerwiegendste Komplikation stellt die intrakranielle Blutung des Fetus dar. Eine Genotypisierung der fetalen HPA-Merkmale ist notwendig, wenn der Vater für das implizierte Merkmal heterozygot ist, um festzustellen, ob der Fetus das Risikoallel trägt und ob prophylaktische, pränatale Interventionen, wie die maternale Gabe von i.v. Immunglobulin, erforderlich sind. Die bisher beschriebenen Verfahren zur pränatalen, nicht-invasiven Genotypisierung fetaler humaner Plättchenantigene verzichten auf eine interne Kontrolle für das Vorhandensein fetaler DNA in der Plasmaprobe.

Patientinnen/Proband/-innen und Methoden:

Zunächst erfolgte eine Validierung der nicht-invasiven, fetalen *RHD*-Bestimmung aus zellfreiem, maternalem Plasma mittels *Real-time*-PCR. Hierzu wurden Blutproben von 23 gesunden, nicht-schwangeren Blutspender/-innen sowie von 29 RhD-negativen Schwangeren, welche bei der Blutentnahme kurz vor einer elektiven Sectio Caesarea standen, untersucht. Zur Etablierung des nicht-invasiven Nachweises fetaler HPA-Merkmale mittels massiv-paralleler Sequenzierung (*Next-Generation-Sequencing*) wurde von 13 Schwangeren (5 Fälle mit vorbekannter FNAIT) und 3 gesunden, nicht-schwangeren Blutspender/-innen zellfreie DNA aus dem Plasma isoliert. Die Blutentnahme der Schwangeren erfolgte im Median in der 30. Schwangerschaftswoche (Spannweite: 14. - 41. SSW). Mit Gen-spezifischen Primerpaaren wurden die *Single Nucleotide* Polymorphismen (SNPs) *ITGB3* (HPA-1), *ITGA2B* (HPA-3), *ITGA2* (HPA-5), sowie *CD109* (HPA-15) gezielt amplifiziert und mittels *Next-Generation-Sequencing* (Halbleitertechnologie) sequenziert. Als interne Positivkontrolle sowie zur Bestimmung der fetalen DNA-Fraktion dienten folgende SNPs bzw. Exonsequenzen: *RHD*, *RHCE*, *KEL*, *DARC*, *SLC14A1*, *GYPB*, *SLC4A1*, Y-chromosomale Sequenzen sowie 8 (*Primer Panel I* (PP I)) bzw. 14 (*Primer Panel II* (PP II)) autosomale, anonyme Polymorphismen.

Ergebnisse:

***Real-time*-PCR:** Alle RhD-positiven Feten (n=15) wurden erfolgreich detektiert. Bei den Plasmaproben von Schwangeren mit bestätigten RhD-negativen Feten (n=10) wurde in 7 von 10 Fällen das Nichtvorliegen einer fetomaternalen RhD-Inkompatibilität richtig

erkannt. In den anderen drei Fällen war das Ergebnis nach vorab definierten Kriterien indeterminiert. Vier Plasmaproben wurden aufgrund einer Verunreinigung exkludiert.

Next-Generation-Sequencing: 15 von 19 vorliegenden fetomaternalen HPA-Inkompatibilitäten wurden erfolgreich detektiert, bei den anderen vier Fällen lag der Anteil paternaler, fetaler Allele unter dem vorab definiertem Schwellenwert von 2 %. Bei dem Nichtvorliegen einer fetomaternalen HPA-Inkompatibilität (n=33) erfolgte in allen Fällen, bis auf eine Ausnahme, richtig negativ keine Detektion des antithetischen Allels. Weitere non-maternale Sequenzen (neben den HPA-Merkmalen), welche als interne Kontrolle für das Vorhandensein fetaler DNA dienten, konnten bei Plasmaproben von 12 Schwangeren nachgewiesen werden. Die Gesamtanzahl der detektierten *Reads* betrug pro Zielregion im Durchschnitt 5624 (Mittelwert; SD: 3090, Spannweite: 585 - 14453, n=153; PP I), bzw. 2720 (Mittelwert; SD: 1842, Spannweite: 321 - 11666, n=325; PP II). Fetale DNA wurde im Median an 3 Loci (Spannweite: 1 - 8; PP I; 6 Schwangere) bzw. an 7,5 Loci (Spannweite: 1 - 10; PP II, 12 Schwangere) detektiert. Die durchschnittliche Konzentration der fraktionalen, fetalen DNA in maternalem Plasma betrug 8,00 % (Mittelwert; Spannweite: 4,49 % - 15,90 %; PP I), bzw. 13,65 % (Mittelwert; Spannweite: 4,35 % - 29,87 %; PP II).

Diskussion:

Die gezielte massiv-parallele Sequenzierung ist ein valides Verfahren zur nicht-invasiven, pränatalen Genotypisierung fetaler humaner Plättchenantigene aus maternalem, zellfreiem Plasma. Falsch negative Testergebnisse werden durch die Sequenzierung weiterer Polymorphismen sowie durch die Bestimmung der fetalen, fraktionalen DNA-Konzentration verhindert. Durch die Etablierung der neuen Methode wurde die Möglichkeit geschaffen, auch andere fetale Blutgruppenmerkmale, welche Zielstruktur maternalen Antikörper bei der hämolytischen Erkrankung des Fetus und Neugeborenen sind, pränatal und nicht-invasiv zu bestimmen.

7. Summary

Background:

Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia (FNAIT) results from fetomaternal incompatibility of human platelet antigens (HPA). The mother produces alloantibodies against paternally inherited fetal antigens present on fetal platelets. After transplacental transport, these alloantibodies can cause thrombocytopenia in the fetus or newborn. The most devastating consequence is intracranial hemorrhage of the fetus. Consequently, genotyping of HPA is required if the father is heterozygous for the implicated alloantigen to determine whether the fetus is at risk and whether prophylactic prenatal interventions, such as maternal IVIG therapy, are needed. However, previous published methods for prenatal, noninvasive genotyping of fetal human platelet antigens do lack an internal control to verify the presence of fetal DNA in the plasma sample.

Patients/Subjects and Methods:

First, noninvasive fetal genotyping of *RHD* via real-time PCR of cell-free DNA isolated from maternal plasma was validated. For this purpose, blood samples from 23 healthy, non-pregnant blood donors and 29 RhD-negative pregnant women were analysed. The blood was taken shortly before an elective caesarean section. To demonstrate the feasibility of noninvasive fetal genotyping of human platelet antigens using massively parallel sequencing (*Next-Generation-Sequencing*), cell-free DNA was isolated from the plasma of 13 pregnant women (5 with a history of FNAIT) and 3 healthy, non-pregnant blood donors. The median gestational age at the time of blood sampling was 30 weeks (range 14 - 41). Gen-specific primer pairs were used to amplify following single-nucleotide polymorphisms (SNPs): *ITGB3* (HPA-1), *ITGA2B* (HPA-3), *ITGA2* (HPA-5), and *CD109* (HPA-15). These SNPs were massively parallel sequenced using a semiconductor device. As an internal positive control as well as to determine the fetal DNA fraction we also sequenced *RHD*, *RHCE*, *KEL*, *DARC*, *SLC14A1*, *GYPB*, *GYPB*, *SLC4A1*, Y chromosome-specific sequences as well as 8 (Primer Panel I (PP I)) and 14 (Primer Panel II (PP II)) anonymous polymorphisms respectively.

Results:

Real-time PCR: All RhD-positive fetuses (n=15) were successfully detected. In 7 out of 10 cases the absence of a fetomaternal incompatibility of rhesus D was correctly identified (10 women carried a RhD-negative child), in the remaining three cases the results were inconclusive by predefined criteria. Four plasma samples were excluded due to contamination.

Next-Generation-Sequencing: 15 out of 19 existing HPA-incompatibilities were successfully detected, in the remaining four cases the number of sequence reads of the

paternally inherited fetal alleles was below the cutoff value of 2%. In case of the absence of a fetomaternal HPA-incompatibility (n=33), the number of base calls for the antithetical allele was correctly below the detection limit in all cases but one. Further non-maternal sequences (other than HPA), serving as an internal control to verify the presence of fetal DNA, could be determined in plasma samples from 12 pregnant women. We obtained a mean of 5,624 sequence reads (SD: 3,090, range: 585 - 14,453, n=153; PP I) and 2,720 sequence reads (SD: 1,842, range: 321 - 11,666, n=325; PP II) per target respectively. Sequences of fetal origin were detected at a median of 3 loci (range: 1 - 8; PP I; 6 pregnant women) and 7,5 loci (range: 1 - 10; PP II; 12 pregnant women) respectively. The mean fractional fetal DNA concentration in cell-free maternal plasma was 8.00% (range, 4.49% - 15.90%; PP I) and 13.65% (range, 4.35% - 29.87%; PP II) respectively.

Discussion:

Massively parallel sequencing is a valid method for noninvasive, prenatal genotyping of fetal human platelet antigens using cell-free maternal plasma. Furthermore, false negative results are prevented due to the inclusion of additional polymorphic loci and the determination of the fetal fractional DNA concentration. By establishing this new method, we paved the way for noninvasive, prenatal genotyping of other fetal blood group polymorphisms frequently involved in hemolytic diseases of the fetus and newborn.

8. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1.1 Schematische Darstellung wichtiger thrombozytärer Glykoproteine. | 7 |
| Abb. 3.1 Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)..... | 32 |
| Abb. 3.2 Die TaqMan® <i>Real-time</i> -PCR. | 33 |
| Abb. 3.3 <i>QIAvac 24 Plus vacuum manifold</i> | 35 |
| Abb. 3.4 Schematische Darstellung von vier Haplotypen des <i>RHD</i> - und <i>RHCE</i> -Gens. | 37 |
| Abb. 3.5 Das Ionen-Halbleiter-Prinzip..... | 42 |
| Abb. 3.6 Umwandlung der Spannungsänderung in eine Basenabfolge. | 42 |
| Abb. 3.7 Sequenzierte SNPs bzw. Exonsequenzen. | 45 |
| Abb. 3.8 Ergänzung der sequenzierten SNPs bzw. Exonsequenzen. | 48 |
| Abb. 3.9 Klonale Amplifikation und Anreicherung der Bibliothek..... | 53 |
| Abb. 3.10 <i>Ion PGM™ OneTouch Plus Reaction Filter Assembly</i> | 55 |
| Abb. 3.11 Umdrehung des <i>Ion PGM™ OneTouch Plus Reaction Filter Assembly</i> | 55 |
| Abb. 3.12 Das <i>Ion OneTouch™ 2 Instrument</i> | 56 |
| Abb. 3.13 8-Well-Leiste. | 57 |
| Abb. 3.14 <i>Tip Loader</i> und <i>Tip Arm</i> des <i>Ion OneTouch™ ES</i> | 59 |
| Abb. 3.15 <i>Ion 314™ Chip v2</i> | 60 |
| Abb. 3.16 Position des Chips in der <i>MiniFuge</i> | 61 |
| Abb. 3.17 Beladung des Chips. | 62 |
| Abb. 3.18 <i>Integrative Genome Viewer</i> (IGV)..... | 64 |
| Abb. 4.1 Nachweis der DNA-Fragmente <i>RHD</i> Exon 5, <i>RHD</i> Exon 7 sowie <i>SRY</i> | 67 |
| Abb. 4.2 (a) Intra-Assay- (b) Inter-Assay Variabilität. | 69 |
| Abb. 4.3 Titration von Plasma einer männlichen, RhD-positiven Person in Plasma einer weiblichen, RhD-negativen Person bis zu einer Verdünnung von 1:256. | 72 |
| Abb. 4.4 Nachweis fetaler DNA-Fragmente <i>RHD</i> Exon 5, <i>RHD</i> Exon 7 sowie <i>SRY</i> aus maternalem Plasma. | 76 |
| Abb. 4.5 <i>Run-Report</i> der Sequenzierung..... | 78 |
| Abb. 4.6 Abgrenzung der paternalen, fetalen Allele von den unerwarteten <i>Base Calls</i> | 82 |

9. Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tab. 1.1 Übersicht der humanen Plättchenantigene..... | 5 |
| Tab. 3.1 TaqMan® Primer und Sonden..... | 38 |
| Tab. 3.2 Reagenzien der <i>Real-time</i> -PCR (TaqMan®)..... | 39 |
| Tab. 3.3 <i>Primer Panel I</i> | 46 |
| Tab. 3.4 <i>Primer Panel II</i> | 49 |
| Tab. 3.5 Pipettierschema klonale Amplifikation..... | 52 |
| Tab. 3.6 Reagenzien für die Anreicherung der <i>Template</i> -positiven <i>Ion Sphere™</i> <i>Particles</i> | 58 |
| Tab. 4.1 Amplifikation der <i>RHD</i> Exone 5 und 7 aus dem Blutplasma von RhD-positiven und -negativen Blutspender/-innen..... | 66 |
| Tab. 4.2 Fetaler <i>RHD</i> -Status und Geschlecht des Kindes..... | 74 |
| Tab. 4.3 Amplifikation der <i>RHD</i> Exone 5 und 7 aus dem Blutplasma von RhD- negativen Schwangeren..... | 75 |
| Tab. 4.4 Genotypen der Merkmale HPA-1, -3, -5, -15..... | 78 |
| Tab. 4.5 Nachweis von paternalen, fetalen Allelen aus zellfreiem, maternalem Plasma mittels <i>Next-Generation-Sequencing</i> | 86 |
| Tab. 4.6 Nachweis von paternalen, fetalen Allelen bei dem Merkmal HPA-1..... | 89 |
| Tab. 4.7 Nachweis von paternalen, fetalen Allelen bei dem Merkmal HPA-3..... | 91 |
| Tab. 4.8 Nachweis von paternalen, fetalen Allelen bei dem Merkmal HPA-5..... | 93 |
| Tab. 4.9 Nachweis von paternalen, fetalen Allelen bei dem Merkmal HPA-15..... | 95 |
| Tab. 4.10 <i>Next-Generation-Sequencing</i> von zellfreier, plasmatischer DNA von männlichen bzw. weiblichen, nicht-schwangeren Kontrollen..... | 96 |

10. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| bp | Basenpaare |
| bspw. | beispielsweise |
| ca. | circa |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> |
| C _T | <i>Cycle Threshold</i> |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| FcRn | neonataler Fc-Rezeptor |
| FNAIT | Fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie |
| FRET | Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer |
| g | Erdbeschleunigung |
| GP | Glykoprotein |
| HDFN | hämolytische Erkrankung des Fetus und Neugeborenen |
| HLA | Humanes Leukozyten Antigen |
| HNA | Humanes Neutrophilen Antigen |
| HPA | Humanes Plättchenantigen |
| Ig | Immunglobulin |
| IGV | <i>Integrative Genome Viewer</i> |
| <i>ISP</i> | <i>Ion PGMTM Template OT2 200 Ion SphereTM Particle</i> |
| MAIPA | Monoklonaler, antikörper-spezifischer Immobilisationstest für plättchenspezifische Antigene |
| MHC | Major-Histokompatibilitäts-Komplex |
| NAIN | Neonatale Alloimmunneutropenie |
| NGS | <i>Next-Generation-Sequencing</i> |
| o.g. | oben genannt |

| | |
|-------------|---|
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PGM | <i>Ion Personal Genome Machine</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| SNP | <i>Single Nucleotide</i> Polymorphismus |
| sog. | sogenannt |
| SSP | sequenz-spezifische Primer |
| SSW | Schwangerschaftswoche |
| Tab. | Tabelle |
| UPM | Umdrehung pro Minute |
| v.a. | vor allem |

11. Literaturverzeichnis

1. Alfirevic Z, Sundberg K, Brigham S. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2003;CD003252.
2. Anolik JH, Blumberg N, Snider J, et al. Posttransfusion purpura secondary to an alloantibody reactive with HPA-5a (Brb). *Transfusion*, 2001;41:633–636.
3. Axt-Fliedner R, Wienzek-Lischka S, Sachs U, et al. Hämolytische Erkrankung des Fetus und Neugeborenen (Teil 1). *Transfusionsmedizin*, 2018a;8:1–18.
4. Axt-Fliedner R, Wienzek-Lischka S, Sachs U, et al. Hämolytische Erkrankung des Fetus und Neugeborenen (Teil 2). *Transfusionsmedizin*, 2018b;8:1–11.
5. Bakchoul T, Kubiak S, Krautwurst A, et al. Low-avidity anti-HPA-1a alloantibodies are capable of antigen-positive platelet destruction in the NOD/SCID mouse model of alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 2011;51:2455–2461.
6. Bakchoul T, Sachs UJ, Wittekindt B, et al. Treatment of fetomaternal neonatal alloimmune thrombocytopenia with random platelets. *Pediatr Blood Cancer*, 2008;50:1293–1294.
7. Berkowitz RL, Lesser ML, McFarland JG, et al. Antepartum treatment without early cordocentesis for standard-risk alloimmune thrombocytopenia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol*, 2007;110:249–255.
8. Bertrand G, Kaplan C. How do we treat fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia? *Transfusion*, 2014;54:1698–1703.
9. Bettelheim D, Kolinek B, Schaller A, et al. Zur Komplikationsrate bei invasiven, intrauterinen Eingriffen an einer pränataldiagnostischen Schwerpunktabteilung. *Ultraschall in der Medizin*, 2002;23:119–122.
10. Birchall JE, Murphy MF, Kaplan C, et al. European collaborative study of the antenatal management of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Br J Haematol*, 2003;122:275–288.
11. Bussel J. Diagnosis and management of the fetus and neonate with alloimmune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost*, 2009;7:253–257.
12. Bussel JB, Berkowitz RL, Lynch L, et al. Antenatal management of alloimmune thrombocytopenia with intravenous gamma-globulin: a randomized trial of the addition of low-dose steroid to intravenous gamma-globulin. *Am J Obstet Gynecol*, 1996;174:1414–1423.
13. Bussel JB, Berkowitz RL, McFarland JG, et al. Antenatal treatment of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *N Engl J Med*, 1988;319:1374–1378.
14. Bussel JB, Zabusky MR, Berkowitz RL, et al. Fetal alloimmune thrombocytopenia. *N Engl J Med*, 1997;337:22–26.
15. Campbell K, Rishi K, Howkins G, et al. A modified rapid monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigen assay for the detection of human platelet antigen (HPA) antibodies: a multicentre evaluation. *Vox Sang*, 2007;93:289–297.
16. Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, et al. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988;85:8790–8794.
17. Cavanagh G, Dunn AN, Chapman CE, et al. HPA genotyping by PCR sequence-specific priming (PCR-SSP): a streamlined method for rapid routine investigations. *Transfus Med*, 1997;7:41–45.

18. Chakravorty S, Roberts I. How I manage neonatal thrombocytopenia. *Br J Haematol*, 2012;156:155–162.
19. Chan KCA, Ding C, Gerovassili A, et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: a universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin Chem*, 2006;52:2211–2218.
20. Chan KCA, Zhang J, Hui ABY, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*, 2004;50:88–92.
21. Clausen FB, Christiansen M, Steffensen R, et al. Report of the first nationally implemented clinical routine screening for fetal RHD in D- pregnant women to ascertain the requirement for antenatal RhD prophylaxis. *Transfusion*, 2012;52:752–758.
22. Daniels G, Finning K, Martin P. Noninvasive fetal blood grouping: present and future. *Clin Lab Med*, 2010;30:431–442.
23. Das K, Dumais J, Basiaga S, et al. Carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of formaldehyde free preservatives. *Acta Histochem*, 2013;115:481–486.
24. Davoren A, Curtis BR, Aster RH, et al. Human platelet antigen-specific alloantibodies implicated in 1162 cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 2004;44:1220–1225.
25. Ertel K, Al-Tawil M, Santoso S, et al. Relevance of the HPA-15 (Gov) polymorphism on CD109 in alloimmune thrombocytopenic syndromes. *Transfusion*, 2005;45:366–373.
26. European Bioinformatics Institute (2009) The immuno polymorphism database – HPA database. <http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/>.
27. Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res*, 1998;8:186–194.
28. Faas BH, Beckers EA, Wildoer P, et al. Molecular background of VS and weak C expression in blacks. *Transfusion*, 1997;37:38–44.
29. Faas BH, Beuling EA, Christiaens GC, et al. Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *Lancet*, 1998;352:1196.
30. Ficko T, Galvani V, Ruprecht R, et al. Real-time PCR genotyping of human platelet alloantigens HPA-1, HPA-2, HPA-3 and HPA-5 is superior to the standard PCR-SSP method. *Transfus Med*, 2004;14:425–432.
31. Finning KM, Martin PG, Soothill PW, et al. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion*, 2002;42:1079–1085.
32. Friedman JM, Aster RH. Neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura and congenital porencephaly in two siblings associated with a "new" maternal antiplatelet antibody. *Blood*, 1985;65:1412–1415.
33. Ghevaert C, Campbell K, Walton J, et al. Management and outcome of 200 cases of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 2007;47:901–910.
34. Giltay JC, Brinkman HJ, dem Borne AE von, et al. Expression of the alloantigen Zwa (or P1A1) on human vascular smooth muscle cells and foreskin fibroblasts: a study on normal individuals and a patient with Glanzmann's thrombasthenia. *Blood*, 1989a;74:965–970.
35. Giltay JC, Brinkman HJ, Modderman PW, et al. Human vascular endothelial cells express a membrane protein complex immunochemically indistinguishable from the platelet VLA-2 (glycoprotein Ia-IIa) complex. *Blood*, 1989b;73:1235–1241.

36. Glade-Bender J, McFarland JG, Kaplan C, et al. Anti-HPA-3A induces severe neonatal alloimmune thrombocytopenia. *J Pediatr*, 2001;138:862–867.
37. Greinacher A. Physiologie des Hämostasesystems. In: Kiefel V, Hrsg. Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen - Therapie - Methodik. 4. überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin: Springer, 2011.
38. Grootker-Tax MGHM, Soussan AA, de Haas M., et al. Evaluation of prenatal RHD typing strategies on cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Transfusion*, 2006;46:2142–2148.
39. Gruel Y, Boizard B, Daffos F, et al. Determination of platelet antigens and glycoproteins in the human fetus. *Blood*, 1986;68:488–492.
40. Hamblin TJ, Naorose Abidi SM, Nee PA, et al. Successful treatment of post-transfusion purpura with high dose immunoglobulins after lack of response to plasma exchange. *Vox Sang*, 1985;49:164–167.
41. Hong J, Gresham D. Incorporation of unique molecular identifiers in TruSeq adapters improves the accuracy of quantitative sequencing. *BioTechniques*, 2017;63:221–226.
42. Islam S, Zeisel A, Joost S, et al. Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers. *Nat Methods*, 2014;11:163–166.
43. Ju J, Kim DH, Bi L, et al. Four-color DNA sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2006;103:19635–19640.
44. Kamphuis MM, Oepkes D. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: prenatal interventions. *Prenat Diagn*, 2011;31:712–719.
45. Kamphuis MM, Paridaans N, Porcelijn L, et al. Screening in pregnancy for fetal or neonatal alloimmune thrombocytopenia: systematic review. *BJOG*, 2010;117:1335–1343.
46. Kamphuis MM, Paridaans NP, Porcelijn L, et al. Incidence and consequences of neonatal alloimmune thrombocytopenia: a systematic review. *Pediatrics*, 2014;133:715–721.
47. Kaplan C, Morel-Kopp MC, Kroll H, et al. HPA-5b (Br(a)) neonatal alloimmune thrombocytopenia: clinical and immunological analysis of 39 cases. *Br J Haematol*, 1991;78:425–429.
48. Kelton JG, Smith JW, Horsewood P, et al. Gova/b alloantigen system on human platelets. *Blood*, 1990;75:2172–2176.
49. Kickler TS, Herman JH, Furihata K, et al. Identification of Bak(b), a new platelet-specific antigen associated with posttransfusion purpura. *Blood*, 1988;71:894–898.
50. Kickler TS, Ness PM, Herman JH, et al. Studies on the pathophysiology of posttransfusion purpura. *Blood*, 1986;68:347–350.
51. Kiefel V. Antigen-positive platelet transfusion in neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT). *Blood*, 2006;107:3761–3763.
52. Kiefel V. The MAIPA assay and its applications in immunohaematology. *Transfus Med*, 1992;2:181–188.
53. Kiefel V, König C, Kroll H, et al. Platelet alloantibodies in transfused patients. *Transfusion*, 2001;41:766–770.
54. Kiefel V, Kroll H, Bonnert J, et al. Platelet alloantigen frequencies in Caucasians: a serological study. *Transfus Med*, 1993;3:237–242.

55. Kiefel V, Santoso S, Glöckner WM, et al. Posttransfusion purpura associated with an anti-Bak. *Vox Sang*, 1989a;56:93–97.
56. Kiefel V, Santoso S, Katzmann B, et al. The Br(a)/Br(b) alloantigen system on human platelets. *Blood*, 1989b;73:2219–2223.
57. Kiefel V, Santoso S, Katzmann B, et al. A new platelet-specific alloantigen Br(a). Report of 4 cases with neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang*, 1988;54:101–106.
58. Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, et al. Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood*, 1987;70:1722–1726.
59. Kiefel V. Immunreaktionen gegen Thrombozyten. In: Kiefel V, Hrsg. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen - Therapie - Methodik*. 4. überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin: Springer, 2011.
60. Kiefel V. Nichtinfektiöse unerwünschte Wirkungen. In: Kiefel V, Hrsg. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen - Therapie - Methodik*. 4. überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin: Springer, 2011.
61. Kivioja T, Vähärautio A, Karlsson K, et al. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. *Nat Methods*, 2011;9:72–74.
62. Kjeldsen-Kragh J, Killie MK, Tomter G, et al. A screening and intervention program aimed to reduce mortality and serious morbidity associated with severe neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood*, 2007;110:833–839.
63. Knight M, Pierce M, Allen D, et al. The incidence and outcomes of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia: a UK national study using three data sources. *Br J Haematol*, 2011;152:460–468.
64. Kohn AB, Moroz TP, Barnes JP, et al. Single-cell semiconductor sequencing. In: Tollefsbol T. (eds) *Biological Aging: Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, 2nd edition. vol. 1048. Totowa, NJ: Humana Press, 2013.
65. Kroll H, Feldmann K, Zwingel C, et al. A new platelet alloantigen, Swia, located on glycoprotein Ia identified in a family with fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 2011;51:1745–1754.
66. Kroll H, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. Posttransfusionelle Purpura: Klinische und immunologische Untersuchungen bei 38 Patientinnen. *Infusionsther Transfusionsmed*, 1993;20:198–204.
67. Kroll H, Kiefel V, Santoso S. Clinical aspects and typing of platelet alloantigens. *Vox Sanguinis*, 1998;74 Suppl 2:345–354.
68. Kroll H, Yates J, Santoso S. Immunization against a low-frequency human platelet alloantigen in fetal alloimmune thrombocytopenia is not a single event: characterization by the combined use of reference DNA and novel allele-specific cell lines expressing recombinant antigens. *Transfusion*, 2005;45:353–358.
69. Kroll H, Kiefel V. Therapie mit Thrombozyten. In: Kiefel V, Hrsg. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen - Therapie - Methodik*. 4. überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin: Springer, 2011.
70. Kroll H, Maier RF. Perinatale und pädiatrische Transfusionsmedizin. In: Kiefel V, Hrsg. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen - Therapie - Methodik*. 4. überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin: Springer, 2011.
71. Kuijpers RW, Faber NM, Cuypers HT, et al. NH₂-terminal globular domain of human platelet glycoprotein Ib alpha has a methionine 145/threonine145 amino

- acid polymorphism, which is associated with the HPA-2 (Ko) alloantigens. *J Clin Invest*, 1992a;89:381–384.
72. Kuijpers RW, Ouwehand WH, Bleeker PM, et al. Localization of the platelet-specific HPA-2 (Ko) alloantigens on the N-terminal globular fragment of platelet glycoprotein Ib alpha. *Blood*, 1992b;79:283–288.
 73. Kumpel BM. Pregnancy immunology and maternal alloimmune responses. *ISBT Sci Ser*, 2012a;7:68–71.
 74. Kumpel BM, Manoussaka MS. Placental immunology and maternal alloimmune responses. *Vox Sang*, 2012b;102:2–12.
 75. Kumpel BM, Sibley K, Jackson DJ, et al. Ultrastructural localization of glycoprotein IIIa (GPIIIa, β 3 integrin) on placental syncytiotrophoblast microvilli: implications for platelet alloimmunization during pregnancy. *Transfusion*, 2008;48:2077–2086.
 76. Kunicki TJ, Aster RH. Isolation and immunologic characterization of the human platelet alloantigen, P1A1. *Mol Immunol*, 1979;16:353–360.
 77. Le Toriellec E, Chenet C, Kaplan C. Safe fetal platelet genotyping: new developments. *Transfusion*, 2013;53:1755–1762.
 78. Leach JL, Sedmak DD, Osborne JM, et al. Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: implications for maternal-fetal antibody transport. *J Immunol*, 1996;157:3317–3322.
 79. Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, et al. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin Chem*, 2004;50:1002–1011.
 80. Liu FM, Wang XY, Feng X, et al. Feasibility study of using fetal DNA in maternal plasma for non-invasive prenatal diagnosis. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2007;86:535–541.
 81. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Res*, 1995;4:357–362.
 82. Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med*, 1998a;339:1734–1738.
 83. Lo YMD, Chan KC, Sun H, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med*, 2010;2:61ra91.
 84. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 1997;350:485–487.
 85. Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*, 1998b;62:768–775.
 86. Lo YMD, Zhang J, Leung TN, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet*, 1999;64:218–224.
 87. Lun FMF, Chiu RWK, Chan KCA, et al. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*, 2008;54:1664–1672.
 88. Lyman S, Aster RH, Visentin GP, et al. Polymorphism of human platelet membrane glycoprotein IIb associated with the Bak(a)/Bak(b) alloantigen system. *Blood*, 1990;75:2343–2348.

89. Maslanka K, Guz K, Zupanska B. Antenatal screening of unselected pregnant women for HPA-1a antigen, antibody and alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang*, 2003;85:326–327.
90. McGrath K, Minchinton R, Cunningham I, et al. Platelet anti-Bak(b) antibody associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang*, 1989;57:182–184.
91. Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, et al. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang*, 2003;85:240–245.
92. Morrison FS, Mollison PL. Post-transfusion purpura. *N Engl J Med*, 1966;275:243–248.
93. Mueller-Eckhardt C, Kiefel V. High-dose IgG for post-transfusion purpura-revisited. *Blut*, 1988;57:163–167.
94. Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Grubert A, et al. 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Lancet*, 1989;1:363–366.
95. Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Mueller-Eckhardt G, et al. Posttransfusion purpura. A survey of 13 cases. *Klin Wochenschr*, 1986;64:1198–1203.
96. Mueller-Eckhardt C, Mueller-Eckhardt G, Willen-Ohff H, et al. Immunogenicity of and immune response to the human platelet antigen Zwa is strongly associated with HLA-B8 and DR3. *Tissue Antigens*, 1985;26:71–76.
97. Mülhardt C. Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. 7., aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum, 2013.
98. Newman PJ, Derbes RS, Aster RH. The human platelet alloantigens, PIA1 and PIA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest*, 1989;83:1778–1781.
99. Ni H, Chen P, Spring CM, et al. A novel murine model of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: response to intravenous IgG therapy. *Blood*, 2006;107:2976–2983.
100. Norton SE, Lechner JM, Williams T, et al. A stabilizing reagent prevents cell-free DNA contamination by cellular DNA in plasma during blood sample storage and shipping as determined by digital PCR. *Clin Biochem*, 2013;46:1561–1565.
101. Ohto H, Miura S, Ariga H, et al. The natural history of maternal immunization against foetal platelet alloantigens. *Transfus Med*, 2004;14:399–408.
102. Ouwehand WH, Stafford P, Gheveart C, et al. Platelet immunology, present and future. *ISBT Sci Ser*, 2006;1:96–102.
103. Page-Christiaens GCML, Bossers B, van der Schoot CE, et al. Use of bi-allelic insertion/deletion polymorphisms as a positive control for fetal genotyping in maternal blood: first clinical experience. *Ann N Y Acad Sci*, 2006;1075:123–129.
104. Pakstis AJ, Speed WC, Fang R, et al. SNPs for a universal individual identification panel. *Hum Genet*, 2010;127:315–324.
105. Panzer S, Auerbach L, Cechova E, et al. Maternal alloimmunization against fetal platelet antigens: a prospective study. *Br J Haematol*, 1995;90:655–660.
106. Rayment R, Brunskill SJ, Soothill PW, et al. Antenatal interventions for fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Cochrane Database Syst Rev*, 2011;5:CD004226.
107. Reznikoff-Etievant MF, Muller JY, Julien F, et al. An immune response gene linked to MHC in man. *Tissue Antigens*, 1983;22:312–314.

108. Rieneck K, Bak M, Jønson L, et al. Next-generation sequencing: proof of concept for antenatal prediction of the fetal Kell blood group phenotype from cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Transfusion*, 2013;53:2892–2898.
109. Rijnders RJP, Christiaens GCML, Bossers B, et al. Clinical applications of cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Obstet Gynecol*, 2004;103:157–164.
110. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 2011;475:348–352.
111. Sachs UJ. Fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Thromb Res*, 2013;131:S42-S46.
112. Sachs UJ, Bakchoul T, Bein G. Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie: Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie. *Transfusionsmedizin*, 2012a;2:77–89.
113. Sachs UJ, Bakchoul T, Eva O, et al. A point mutation in the EGF-4 domain of $\beta 3$ integrin is responsible for the formation of the Seca platelet alloantigen and affects receptor function. *Thromb Haemost*, 2012b;107:80–87.
114. Santoso S. A functional platelet fibrinogen receptor with a deletion in the cysteine-rich repeat region of the beta (3) integrin: the Oe(a) alloantigen in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood*, 2002;99:1205–1214.
115. Santoso S, Kalb R, Walka M, et al. The human platelet alloantigens Br(a) and Br(b) are associated with a single amino acid polymorphism on glycoprotein Ia (integrin subunit alpha 2). *J Clin Invest*, 1993;92:2427–2432.
116. Santoso S, Kiefel V. Human platelet alloantigens. *Wien Klin Wochenschr*, 2001;113:806–813.
117. Santoso S, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. Human platelet alloantigens Bra/Brb are expressed on the very late activation antigen 2 (VLA-2) of T lymphocytes. *Hum Immunol*, 1989a;25:237–246.
118. Santoso S, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. Immunochemical characterization of the new platelet alloantigen system Br(a)/Br(b). *Br J Haematol*, 1989b;72:191–198.
119. Santoso S, Shibata Y, Kiefel V, et al. Identification of the Yuk(b) allo-antigen on platelet glycoprotein IIIa. *Vox Sang*, 1987;53:48–51.
120. Santoso S, Wihadmadyatami H, Bakchoul T, et al. Antiendothelial $\alpha\beta 3$ antibodies are a major cause of intracranial bleeding in fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016;36:1517–1524.
121. Scheffer PG, Ait Soussan A, Verhagen O, et al. Noninvasive fetal genotyping of human platelet antigen-1a. *BJOG*, 2011a;118:1392–1395.
122. Scheffer PG, Haas M de, van der Schoot CE. The controversy about controls for fetal blood group genotyping by cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Curr Opin Hematol*, 2011b;18:467–473.
123. Scheffer PG, van der Schoot CE, Page-Christiaens G, et al. Noninvasive fetal blood group genotyping of rhesus D, c, E and of K in alloimmunised pregnant women: evaluation of a 7-year clinical experience. *BJOG*, 2011c;118:1340–1348.
124. Schneider W, Schnaidt M. The platelet adhesion immunofluorescence test: a modification of the platelet suspension immunofluorescence test. *Blut*, 1981;43:389–392.
125. Schuh AC, Watkins NA, Nguyen Q, et al. A tyrosine703serine polymorphism of CD109 defines the Gov platelet alloantigens. *Blood*, 2002;99:1692–1698.

126. Shibata Y, Mori H. A new platelet-specific alloantigen system, Yuk(a)/Yuk(b) is located on platelet membrane glycoprotein IIIa. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 1987;63:36–38.
127. Shulman NR, Aster RH, Leitner A, et al. Immunoreactions involving platelets. V. Post-transfusion purpura due to a complement-fixing antibody against a genetically controlled platelet antigen. A proposed mechanism for thrombocytopenia and its relevance in »autoimmunity«. *J Clin Invest*, 1961;40:1597–1620.
128. Sikora A, Zimmermann BG, Rusterholz C, et al. Detection of increased amounts of cell-free fetal DNA with short PCR amplicons. *Clin Chem*, 2010;56:136–138.
129. Simister NE, Story CM, Chen HL, et al. An IgG-transporting Fc receptor expressed in the syncytiotrophoblast of human placenta. *Eur J Immunol*, 1996;26:1527–1531.
130. Singleton BK, Green CA, Avent ND, et al. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood*, 2000;95:12–18.
131. Smith JW, Hayward CP, Horsewood P, et al. Characterization and localization of the Gova/b alloantigens to the glycosylphosphatidylinositol-anchored protein CDw109 on human platelets. *Blood*, 1995;86:2807–2814.
132. Socher I, Andrei-Selmer C, Bein G, et al. Low-avidity HPA-1a alloantibodies in severe neonatal alloimmune thrombocytopenia are detectable with surface plasmon resonance technology. *Transfusion*, 2009;49:943–952.
133. Socher I, Zwingel C, Santoso S, et al. Heterogeneity of HPA-3 alloantibodies: consequences for the diagnosis of alloimmune thrombocytopenic syndromes. *Transfusion*, 2008;48:463–472.
134. Sutherland DR, Yeo E, Ryan A, et al. Identification of a cell-surface antigen associated with activated T lymphoblasts and activated platelets. *Blood*, 1991;77:84–93.
135. Taaning E. HLA antibodies and fetomaternal alloimmune thrombocytopenia: Myth or meaningful? *Transfus Med Rev*, 2000;14:275–280.
136. Thorvaldsdottir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform*, 2012;14:178–192.
137. Tiller H, Kamphuis MM, Flodmark O, et al. Fetal intracranial haemorrhages caused by fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: an observational cohort study of 43 cases from an international multicentre registry. *BMJ Open*, 2013;3:e002490.
138. van den Akker ES, Oepkes D, Lopriore E, et al. Noninvasive antenatal management of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: safe and effective. *BJOG*, 2007;114:469–473.
139. van der Schoot CE, Wester M, von dem Borne AEGK, et al. Characterization of platelet-specific alloantigens by immunoblotting: localization of Zw and Bak antigens. *Br J Haematol*, 1986;64:715–723.
140. van der Weerdt et al, Proc. 8th congress european society of haematology, Vienna 1961. Karger, Basel, 379.
141. van der Weerdt CM, Veenhoven-von Riesz LE, Nijenhuis LE, et al. The Zw Blood Group System in Platelets. *Vox Sang*, 1963;8:513–530.
142. van Gils JM, Stutterheim J, van Duijn TJ, et al. HPA-1a alloantibodies reduce endothelial cell spreading and monolayer integrity. *Mol Immunol*, 2009;46:406–415.

143. van Loghem JJ, Dorfmeijer H, van der Hart M, et al. Serological and genetical studies on a platelet antigen (Zw). *Vox Sang*, 1959;4:161–169.
144. Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem*, 2009;55:641–658.
145. von dem Borne AE, Décary F. ICSH/ISBT working party on platelet serology. Nomenclature of platelet-specific antigens. *Vox Sang*, 1990;58:176.
146. von dem Borne AE, Verheugt FW, Oosterhof F, et al. A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. *Br J Haematol*, 1978;39:195–207.
147. von dem Borne AE, von Riesz E, Verheugt FW, et al. Bak(a), a new platelet-specific antigen involved in neonatal allo-immune thrombocytopenia. *Vox Sang*, 1980;39:113–120.
148. Wagner FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood*, 2000;95:3662–3668.
149. Wang R, Furihata K, McFarland JG, et al. An amino acid polymorphism within the RGD binding domain of platelet membrane glycoprotein IIIa is responsible for the formation of the Pena/Penb alloantigen system. *J Clin Invest*, 1992;90:2038–2043.
150. Wang XD, Wang BL, Ye SL, et al. Non-invasive foetal RHD genotyping via real-time PCR of foetal DNA from Chinese RhD-negative maternal plasma. *Eur J Clin Invest*, 2009;39:607–617.
151. Wang L, Juji T, Shibata Y, et al. Sequence Variation of Human Platelet Membrane Glycoprotein IIIa Associated with the Yuk(a)/Yuk(b) Alloantigen System. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 1991;67:102–106.
152. Warkentin TE, Smith JW. The alloimmune thrombocytopenic syndromes. *Transfus Med Rev*, 1997;11:296–307.
153. Wienzek-Lischka S, König IR, Papenkort E-M, et al. HLA-DRB3*01:01 is a predictor of immunization against human platelet antigen-1a but not of the severity of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 2017;57:533–540.
154. Wienzek-Lischka S, Krautwurst A, Fröhner V, et al. Konservatives, nicht-invasives Management der fetalen und neonatalen Alloimmunthrombozytopenie: Pränatale Genotypisierung mittels Next-Generation-Sequencing (Hochdurchsatzsequenzierung) sowie intravenöse Immunglobulin Therapie. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 2018;78:A44-A45.
155. Wikman AT, Tiblad E, Karlsson A, et al. Noninvasive single-exon fetal RHD determination in a routine screening program in early pregnancy. *Obstet Gynecol*, 2012;120:227–234.
156. Williamson LM, Hackett G, Rennie J, et al. The natural history of fetomaternal alloimmunization to the platelet-specific antigen HPA-1a (PIA1, Zwa) as determined by antenatal screening. *Blood*, 1998;92:2280–2287.
157. Winkelhorst D, Oepkes D, Lopriore E. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: evidence based antenatal and postnatal management strategies. *Expert Rev Hematol*, 2017;10:729–737.

12. Anhang

12.1 Aufklärungsbogen

Nicht-invasive vorgeburtliche Bestimmung kindlicher Blutgruppenmerkmale aus mütterlichem Plasma

Liebe Patientin,

Im Rahmen der Schwangerschaft kann es zu einer **Immunisierung der Schwangeren** gegen Blutgruppenmerkmale des werdenden Kindes kommen. Das bekannteste Krankheitsbild ist die **Blutgruppenunverträglichkeit im Rhesus System** (Morbus haemolyticus neonatorum). Dabei hat das Kind von seinem Vater die Blutgruppe „Rhesus D positiv“ geerbt. Die Schwangere besitzt dieses Merkmal nicht, sie hat die Blutgruppe „Rhesus negativ“. Wenn die Schwangere **Antikörper gegen Rhesus D** gebildet hat, kann dies zur Zerstörung der **roten Blutzellen** des werdenden Kindes führen. Es kommt zu einer **Blutarmut** (Anämie) beim Kind. Bei einem ähnlichen Krankheitsbild kommt es nach Immunisierung der Schwangeren zur Bildung von Antikörpern gegen Blutgruppenmerkmale an **Blutplättchen** (fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie (**NAIT**)). Die werdenden Kinder haben ein erhöhtes **Risiko für Blutungskomplikationen**.

Bei einer erneuten Schwangerschaft einer Frau, die zuvor ein Kind mit NAIT auf die Welt gebracht hat, kann die Erkrankung ebenfalls erneut auftreten, wenn das werdende Kind das entsprechende Blutgruppenmerkmal auf seinen Blutplättchen trägt.

Um **invasive Diagnostik** zu **vermeiden**, soll ein Verfahren entwickelt werden, um die **Blutgruppenmerkmale** des werdenden Kindes aus **mütterlichem Blut** zu bestimmen. Dies ist möglich, da im Blutplasma einer Schwangeren geringe Mengen kindlicher Erbsubstanz zirkulieren. Falls die Untersuchung zeigt, dass das werdende Kind Merkmalsträger ist, kann durch Behandlung der Schwangeren und/oder des Kindes das Wiederauftreten von schweren Komplikationen erfolgreich verhindert werden.

Die bisher beschriebenen Verfahren zur Bestimmung der kindlichen Blutgruppe aus mütterlichem Plasma eignen sich für die Bestimmung des Rhesus-Faktors, jedoch nicht für die zahlreichen Blutgruppenmerkmale an Blutplättchen. Daher wollen wir eine neue, hochsensitive Untersuchungsmethode für diesen Zweck (*Next-Generation-Sequencing*) etablieren.

Zur Durchführung der Untersuchung benötigen wir einmalig **20 ml Blut** im **Rahmen der Routineblutentnahme** zur **Schwangeren-Vorsorge** bzw. im Rahmen der **Vorbereitung eines Kaiserschnittes** vor geplanter Entbindung. **Nach der Geburt** soll aus **Blutresten des Nabelschnurblutes** des Neugeborenen, das im Rahmen der Standardversorgung abgenommen wird, eine Überprüfung der Befunde vorgenommen werden.

Sie selbst haben keinen Nutzen durch die Teilnahme an der Studie. Das Risiko der Studie beschränkt sich auf die Entnahme einer zusätzlichen Blutprobe von 20 ml im Rahmen einer Routineblutentnahme.

Alle an der Studie beteiligten Mitarbeiter unterliegen der **Schweigepflicht**. Ihre Daten sowie die Daten des/der Neugeborenen werden vertraulich behandelt und unterliegen dem **Datenschutz**. Eine **Aushändigung von Untersuchungsergebnissen** an Sie ist nur dann vorgesehen, wenn Sie selbst wegen eines der genannten Krankheitsbilder behandelt werden. Die Daten werden anonymisiert aufbewahrt und nach 10 Jahren gelöscht. Sie können die Teilnahme an der Studie jederzeit widerrufen, Einsicht in die Daten erhalten und die Löschung der Daten verlangen.

Mit Ihrem Einverständnis zur Teilnahme an der Untersuchung helfen Sie sehr, die künftige Behandlung von Schwangeren und den werdenden Kindern deutlich zu verbessern.

Prof. G. Bein

Prof. Dr. Dr. h.c. Tinneberg

12.2 Einverständniserklärung

Nicht-invasive vorgeburtliche Bestimmung kindlicher Blutgruppenmerkmale aus mütterlichem Plasma

| |
|--------------------|
| Patientenaufkleber |
|--------------------|

Herr/Frau Dr. med. hat mir anhand des Aufklärungsbogens die Durchführung der geplanten Studie erläutert. Ich hatte die Gelegenheit Fragen zur Studie zu stellen.

Ich habe keine weiteren Fragen mehr und willige hiermit in die o.g. Untersuchung ein.

Gießen, den _____

Unterschrift der Patientin: _____

Unterschrift des Aufklärenden: _____

13. Publikationsverzeichnis

13.1 Publikation

Wienzek-Lischka S, Krautwurst A, **Fröhner V**, Hackstein H, Gattenlöhner S, Bräuninger A, Axt-Flidner R, Degenhardt J, Deisting C, Santoso S, Sachs UJ, Bein G. Noninvasive fetal genotyping of human platelet antigen-1a using targeted massively parallel sequencing. *Transfusion*, 2015;55:1538–1544.

13.2 Kongressbeiträge

Wienzek-Lischka S, Dehl J, Krautwurst A, **Fröhner V**, Hackstein H, Gattenlöhner S, Bräuninger A, Deisting C, Axt-Flidner R, Degenhardt J, Santoso S, Sachs UJ, Bein G. Nicht invasive, pränatale Genotypisierung erythrozytärer und thrombozytärer Blutgruppenmerkmale aus zellfreier, fetaler DNA mittels Hochdurchsatzsequenzierung (Next-Generation-Sequencing, NGS). *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 2016;76.

Wienzek-Lischka S, Krautwurst A, **Fröhner V**, Gattenlöhner S, Bräuninger A, Sawazki A, Enzensberger C, Deisting C, Axt-Flidner R, Santoso S, Sachs UJ, Bein G. Konservatives, nicht-invasives Management der fetalen und neonatalen Alloimmunthrombozytopenie: Pränatale Genotypisierung mittels Next-Generation-Sequencing (Hochdurchsatzsequenzierung) sowie intravenöse Immunglobulin Therapie. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 2018;78:A44-A45.

13.3 Präsentation

09/2014: "Noninvasive fetal platelet blood grouping with the use of targeted massively parallel sequencing of maternal plasma cell-free DNA", 47. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e. V. (DGTI), Dresden

14. Ehrenwörtliche Erklärung

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Berlin, den 22.11.2020

Ort, Datum

Unterschrift

15. Danksagung

An erster Stelle möchte ich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Gregor Bein für die Überlassung des interessanten und relevanten Themas meiner Dissertation und für die Bereitstellung der besten Voraussetzungen zu deren Durchführung am Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen sowie für die Durchsicht dieser Arbeit, bedanken.

Außerdem gilt mein Dank meiner Betreuerin Dr. Sandra Wienzek-Lischka für die freundliche, zuverlässige und kompetente Betreuung während der gesamten Promotionszeit sowie für die Unterstützung bei jeglichen Fragen und für die Durchsicht dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt zwei Personen, die mir wirklich immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Annika Krautwurst und Jeannine Dehl, ohne Euch hätte ich das nicht geschafft! Vielen Dank für Eure Unterstützung, Euer Verständnis, Eure konstruktive Kritik, für die motivierenden Worte sowie für alles, was hier nicht gesagt werden kann, da es sonst den Rahmen sprengen würde.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei allen Mitarbeiter/-innen des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin für die stets freundliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken.

Ich danke allen Mitarbeiter/-innen der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe (UKGM), insbesondere Dr. Christina Deisting, Prof. Dr. Roland Axt-Fliedner sowie Dr. Jan Degenhardt, und der Gerinnungsambulanz (UKGM) unter der Leitung von Prof. Dr. Bettina Kemkes-Matthes, für die tatkräftige Unterstützung bei der Probensammlung. Auch den Mitarbeiter/-innen des Instituts für Pathologie (UKGM), insbesondere Prof. Dr. Stefan Gattenlöhner, Prof. Dr. Andreas Bräuninger, Dr. Kristin Hartung, Cindy Arnold und Kirsten Bommersheim, danke ich für die Kooperation und unterstützende Mitarbeit.

Bedanken möchte ich mich bei allen Personen, welche an dieser Studie teilgenommen und dadurch die Durchführung dieser Arbeit erst ermöglicht haben.

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen Freund/-innen bedanken, jedoch vor allem bei Ina, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und mich stets motivierte, aber auch für eine erholsame Ablenkung sorgte.

Zuletzt wende ich mich an meine Mutter Roberta und meinen Stiefvater Bernhard, der leider die Fertigstellung meiner Dissertation nicht mehr miterleben konnte. Vielen Dank für Eure unerlässliche Unterstützung, Eure Liebe, Eure Ermutigung nie das Ziel aus den Augen zu verlieren sowie dafür, dass Ihr immer an mich geglaubt habt!

