

# Reif für die Praxis? – die nicht invasive Pränataldiagnostik aus dem Blut Schwangerer

Wolfgang Holzgreve

Nach 20 Jahren Forschung ist es gelungen, einen Test zu entwickeln, mit dem ohne Risiken für das Ungeborene bestimmt werden kann, ob genetische oder chromosomale Störungen vorliegen.

Der Traum von einer nicht invasiven Pränataldiagnostik (NIPD) existierte schon lange vor der Einführung der Amniozentese in den 70er-Jahren. Was wäre, wenn mit kindlichem Material im Blut der Schwangeren eine Pränataldiagnostik möglich wäre und auf die Amniozentese und Chorionbiopsie verzichtet werden könnte, die für das ungeborene Kind immer ein Risiko darstellen?

Der Traum ist wahr geworden: Seit Anfang 2012 ist der von der Firma Sequenom entwickelte Test in den USA auf den Markt. In Deutschland ist der Test des Herstellers LifeCodexx, der von der amerikanischen Firma Lizenznehmer ist, seit August 2012 erhältlich. Der Test analysiert anhand des Blutes der schwangeren Frau, ob das Ungeborene ein 3- statt 2-fach vorhandenes Chromosom 21 besitzt und somit das Down-Syndrom hat.

## Ethischer Diskurs

Die Pränataldiagnostik ist seit der Einführung der Amniozentese ethisch umstritten. Denn durch diese Untersuchung ist es auch möglich, nicht therapierbare chromosomale Aneuploidien zu diagnostizieren, die zu der Entscheidung führen können, eine Schwangerschaft abzubrechen.

Jedoch sind die meisten Untersuchungen unauffällig und dienen oft mehr der Beruhigung von ängstlichen Schwangeren, z. B. mit höherem Lebensalter. In einer klassischen Studie untersuchten Ferguson-Smith et al. die Ergebnisse von 52 965 Amniozentesen, die wegen der lange akzeptierten sogenannten Altersindikation



Symbolbild, Quelle: ccvision

durchgeführt wurden [1], 97,7% aller Fruchtwasseruntersuchungen ergaben keinen auffälligen Karyotyp.

Die Pränataldiagnostik führt grundsätzlich zu einem ethischen Dilemma: Einerseits ist die Autonomie der ratsuchenden Schwangeren zu respektieren. Andererseits hat jeder Mensch das Recht auf Leben. Entscheidet sich eine Schwangere nach gründlicher Abwägung aller rechtlichen und ethischen Güter für einen Abbruch, wird das Lebensrecht in der Frühschwangerschaft außer Kraft gesetzt. Dieses Dilemma ist kaum zu lösen. Der Gesetzgeber hat einen Kompromiss gefunden: Die Schwangere muss sich vor einem Abbruch beraten lassen – so sollen sowohl die Autonomie der Schwangeren als auch der Schutz des Lebens geachtet werden.

Die Durchführung einer Amniozentese, Chorionbiopsie und in seltenen Fällen

einer Chordozentese sind für Frauen, aber auch für Mediziner, die diese Eingriffe durchführen, belastend. Denn es besteht die Gefahr, dass durch den Eingriff ein Schwangerschaftsverlust ausgelöst wird. Auch wenn dies selten ist, geschieht es doch noch bei bis zu 1% der Fälle. Weltweit wurden und werden Millionen von Fruchtwasserpunktionen und Chorionbiopsien durchgeführt. Gerade deswegen müssten diejenigen, die den Schutz des ungeborenen Lebens in den Vordergrund stellen (z. B. die sog. Pro-Life-Bewegung in den USA), die nicht invasive Diagnostik eigentlich begrüßen. Denn dadurch können wenigstens unbeabsichtigte Schwangerschaftsverluste als Folge der Eingriffe sicher vermieden werden.

Doch auch angesichts des ethischen Dilemmas ist es wichtig, bei Fortschritten der pränatalen Diagnostik die ethischen Diskussionen offen, rechtzeitig und respektvoll für unterschiedliche Auffassungen kontinuierlich zu führen, um dem technischen Fortschritt nicht nur nachzueilen [2].

## Der lange Weg zur NIPD

Der Weg bis zur nicht invasiven Diagnostik war ein langer. Schon vor 50 Jahren hatte der deutsche Pathologe Christian Schmorl Zellen im Blut von Schwangeren beobachtet, die er für Trophoblastzellen hielt. In den vergangenen 20 Jahren wurde auf diesem Gebiet intensiv geforscht. Die Entwicklung von Sonden, mit denen es Wissenschaftlern gelang, DNA-Material vom Y-Chromosom im Blut der Schwangeren zu untersuchen, haben diese Forschung deutlich weitergebracht.

Jahre später fanden Forscher heraus, dass tatsächlich aufgrund der Physiologie etwa 1 von 1 Mio. Zellen im Blut der Schwangeren von ihrem Kind stammen. Inzwischen wissen wir, dass es wohl kein Zufall war, dass diese fetalen Zellen zunächst bei Schwangeren mit schwerer Präeklampsie und Eklampsie gefunden wurden. Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Schwangeren charakteristischerweise viel mehr kindliches Material in ihrem Blut aufweisen als gesunde Schwangere [3].

### Diagnostik aus fetalen Zellen

Diese „seltenen Zellen“ galt es aus den vielen mütterlichen Zellen zu isolieren, um daraus Diagnosen stellen zu können [4]. Zunächst wurden Zellen vom Synzytiotrophoblasten als die idealen Zielzellen angesehen. Diese haben aber den Nachteil, oft multinukleär zu sein, und ein verlässlicher Antikörper zur Anreicherung steht bis heute nicht zur Verfügung. Lymphozyten, die nach der Geburt die am besten geeigneten Zellen für eine Karyotypisierung sind, finden sich im fetalen Blut nur zu einem sehr kleinen Prozentsatz – je früher, desto weniger.

Es war daher ein Fortschritt, die Aufmerksamkeit auf die nukleierten Erythrozyten als Zielzellen zu richten. Denn bei diesen ist eine Anreicherung durch entsprechende Antikörper (Anti-Transferrin, CD 71) und der Nachweis fetalen Hämoglobins möglich. Außerdem weist eine Schwangere selbst kaum solche Zellen, das Ungeborene in der Frühschwangerschaft hingegen einen hohen Prozentsatz auf. Ebenso wichtig ist, dass die Halbwertszeit dieser Erythroblasten nur wenige Tage beträgt, sodass bei einer aktuellen Schwangerschaft kein Problem mit Zellen aus früheren Schwangerschaften besteht.

### Studie zur nicht invasiven Diagnose

Mithilfe dieses Ansatzes konnte schon früh die fetale Trisomie aus dem Blut Schwangerer erfasst werden. Doch die 4 in diesem Bereich besonders aktiven Arbeitsgruppen an amerikanischen Universitäten sowie unsere Arbeitsgruppe am Universitätsspital Basel einigten sich darauf, dass diese Methode nicht einfach in der Praxis angewandt werden sollte. Vielmehr wurde mithilfe der National Institutes of Health eine groß angelegte Proof-of-Concept-Studie durchgeführt: Bei 3000 Frauen wurde die nicht invasive Diagnose unmittelbar vor einem geplanten invasiven Eingriff durchgeführt. Anschließend wurden die Ergebnisse verglichen. Das Er-

gebnis zeigte, dass die Methode nicht fehlerfrei genug war, um in der Pränataldiagnostik mit ihren so gravierenden Konsequenzen eingesetzt werden zu können [5]. Dieses vorsichtige Vorgehen bei Innovationen in der Medizin ist eher selten, doch so konnte verhindert werden, dass eine unausgereifte Technologie auf den Markt kam.

Dennoch hat diese Forschung ein großes Wissen über die Ontogenese der Erythrozyten vor der Geburt gebracht. Wir wissen heute, dass die Kerne der Erythroblasten schon vor der eigentlichen Expulsion des Nukleus bereits eine so desintegrierte Kernstruktur haben, dass die Interphasen-Fluoreszenz nicht gut funktionieren kann.

### Wie aussagekräftig ist der Test?



Zwölf Jahre später gelang dem Chinesen Dennis Lo aus Hongkong, der damals an der Oxford University in England arbeitete, ein Durchbruch. Er erinnerte sich an die Publikationen von Anker und Stroun aus Genf, welche die zellfreie DNA (cfDNA) in der Flüssigkeit von Pflanzen beschrieben hatten. Daraufhin überprüfte er erfolgreich die Hypothese, ob auch Embryonen und Feten solche cfDNA in kleinen Spuren an das Blut Schwangerer abgeben. Somit brachte der Nachweis zellfreier DNA im Blut der Schwangeren die nicht invasive Diagnostik endlich vom Labor in die Praxis [6].

Zunächst wurde über Erfolge mit der sogenannten „digital size selection and relative mutation dosage“ an der DNA aus mütterlichem Blut berichtet [7]. Die Rhesuskonstellation war ein idealer Kandidat, um die Verlässlichkeit der neuen Methoden zu erproben. Mit dem Blut einer rhesusnegativen Schwangeren mit heterozygotem Partner sollte erfasst werden, ob das Kind rhesuspositiv ist, da dies natürlich erhebliche Konsequenzen hat (Angst der Schwangeren, Anti-D-Gabe in der Schwangerschaft, Überwachung der Schwangerschaft etc.). Unsere Arbeitsgruppe am Universitätsspital Basel [8] und andere konnten zeigen, dass diese Methode in deutlich über 99% der Fälle akkurat ist. Bei weit über 10000 nicht invasiv gewonnenen Diagnosen war das Ergebnis nicht weniger korrekt als wäre für die Diagnose das kindliche Blut verwendet worden.

Durch die Entdeckung von Einzelgen-Mutationen an kindlicher DNA aus mütterlichem Blut können unterschiedlich vererbte Erkrankungen und Merkmale bestimmt werden: u. a. Kell-Inkompatibilität, Beta-Thalassämie, Achondroplasie, Alpha-Thalassämie, Tay-Sachs-Syndrom, Mukoviszidose [9]. Auch zur Bestimmung der Trisomie 21 wurden die MALDI-TOF-Massenspektrometrie [10] sowie die spektrale Karyotypisierung [11] eingesetzt.

Den eigentlichen Durchbruch erbrachte aber die Anwendung des sogenannten „massive parallel sequencing“ mit sogenannten „Next-Generation-Sequenziergeräten“. Diese Methode nutzt die Gegebenheit, dass im Blut der Mutter ca. 10% der DNA-Fragmente vom Kind sind. Diese Aneuploidie-Untersuchungen an cfDNA zeigen, von welchem Chromosom die Fragmente kommen, aber noch nicht, ob diese von der Schwangeren oder dem Fetus stammen. Die quantitative Überrepräsentierung bestimmter Fragmente, z. B. bei Trisomie 21, kann jedoch mit hoher Präzision bestimmt werden. Es wird sozusagen das zusätzliche chromosomale Material identifiziert.

Mit dieser Methode konnte die Arbeitsgruppe der Firma Sequenom aus San Diego, Kalifornien, erstmals in einer Studie mit über 96 Probandinnen und 8 Trisomie-21-Fällen eine Sensitivität von 100% zeigen [12]. Das amerikanische Unternehmen besitzt die Dach-Patente zur cfDNA von Dennis Lo und unseres zur „size separation“ vom Baseler Universitätsspital.

Eine spätere Studie der Arbeitsgruppe um Dennis Lo [13] der Chinese University Hong Kong mit 232 Probandinnen bei 86 Fällen von Trisomie 21 bestätigte die Sensitivität von 100% bei einer Spezifität von 97,9%. 2011 und 2012 erschienen dann 3 noch größer angelegte Studien [14–16]. Alle ebenfalls mit einer Sensitivität von 100%:

- ▶ Ehrlich et al. vom Sequenom Center for Molecular Medicine untersuchten 480 Proben mit 39 Trisomie-21-Fällen, bei 4,8% Fällen ohne Ergebnis mit einer Spezifität von 99,7%.
- ▶ Bianchi et al. testeten mit der Verinata Health Firma über 532 Proben mit 89 Trisomie-21-Fällen, bei 5,8% Fällen ohne Ergebnis mit einer Spezifität von 100%.
- ▶ Ashoor et al. von der Ariosa Diagnostics prüften über 400 Proben mit 50 Trisomie-21-Fällen, bei 6,6% Fällen ohne Ergebnis mit einer Spezifität von ebenfalls 100%.

Die zurzeit größte Serie ist die von Palomaki et al. [17] zusammen mit dem Sequenom Center for Molecular Medicine. 2011 publizierte diese Gruppe die Ergebnisse der Studie mit 1696 Proben und 212 Trisomie-21-Fällen mit nur noch 0,8% Fällen ohne Ergebnis, einer Sensitivität von 99,1% und einer Spezifität von 99,9%. Die von derselben Gruppe geleitete sogenannte Womens and Infants Hospital of Rhode Island (WIHRI) Brown University Study umfasst sogar 4664 Proben. Die Ergebnisse zu Trisomie 21, 18 und 13 wurden vor Kurzem publiziert [18], wobei die Sensitivitäten und Spezifitäten für die Trisomien 18 und 13 über 99,9 und 99,6% bzw. bei 91,7 und 99,7% lagen.

### Triumph der Grundlagenforschung und angewandten Wissenschaft

Zusammenfassend kann also gesagt werden: Das Sequenom Center for Molecular Medicine, dessen Lizenznehmer die Firma Lifecodexx in Deutschland ist, hat die Verlässlichkeit der neuen Technik für die nicht invasive Pränataldiagnostik der fetalen Trisomie 21 aus mütterlichem Blut überzeugend gezeigt. Die Ergebnisse für die Trisomien 18 und 13 lassen hoffen, dass auch diese in Zukunft mittels eines nicht invasiven Tests bestimmt werden können.

#### In der Praxis

Im Moment empfiehlt aber sowohl die Firma Sequenom in den USA als auch die deutsche Firma LifeCodexx, dass bei einer Chromosomenstörung bei nicht invasiver Diagnostik aus dem Blut Schwangerer das Ergebnis durch einen etablierten Eingriff bestätigt wird – ähnlich wie dies bei der Einführung der Chorionbiopsie Ende der 80er-Jahre empfohlen wurde. Die Indikationsstellungen, der Preis für den Eingriff und die Notwendigkeit einer Bestätigung hängen in erster Linie von einer weiteren guten Dokumentation der diagnostischen Sicherheit ab.

Es ist aber auch im deutschsprachigen Raum allen Verantwortlichen der Firma Lifecodexx, den in der Pränataldiagnostik verantwortlichen Fachgremien sowie dem Gesetzgeber klar: Die Anwendung des neuen Tests muss in eine sorgfältige Beratung eingebettet sein, ebenso wie an-

dere Methoden der vorgeburtlichen invasiven und nicht invasiven Untersuchungen, und hier gibt es immer noch einen gewissen Nachholbedarf [19].

Nach nun über 20-jähriger Forschung ist es gelungen, mithilfe der neuen nicht invasiven Diagnosemöglichkeiten Schwangerschaftsverluste durch invasive Eingriffe zu verhindern. Das ist ein großartiger Triumph der Grundlagenforschung und der angewandten Wissenschaft. Schon die nicht invasiven Screening-Methoden mit biochemischen Markern und sonografischer Messung der Nackentransparenz führten weltweit zu einem deutlichen Rückgang der Eingriffe in der pränatalen Diagnostik. Durch die Etablierung der NIPD aus mütterlichem Blut könnte der Prozentsatz der Eingriffe gegen Null gehen.

Die Entwicklung der NIPD zeigt, dass langjährige Forschung und echte Innovationen die Medizin somit langfristig und nachhaltig kosteneffektiver machen können. Kostensenkung bei gleichzeitig deutlicher Verbesserung des medizinischen Angebots sind für die Solidargemeinschaft ein großer Fortschritt, v.a. für ratsuchende Frauen.

### Interessenkonflikt

Der Autor ist im Scientific Advisory Board der Firma Sequenom tätig und gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

### Literatur

- 1 Ferguson-Smith MA, Yates JWR. Maternal age-specific rates for chromosomal aberrations and factors influencing them: Report of a collaborative European study on 52965 amniocenteses. *Prenat Diagn (Special Issue)* 1984; 4: 5–44
- 2 Holzgreve W. Ethik in der pränatalen Medizin – geht sie voran oder läuft sie hinterher? *Editorial. Ther Umschau* 2006; 63: 681–682
- 3 Hahn S, Holzgreve W. Fetal cells and cell free DNA in maternal blood: new insights into preeclampsia. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 501–508
- 4 Holzgreve W, Hahn S, Zhong XY et al. Genetic communication between fetus and mother: short- and long-term consequences. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196: 372–381
- 5 Bischoff FZ, Hahn S, Johanson KL et al. Intact fetal cells in maternal plasma. *Lancet* 2003; 361: 139–140
- 6 Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485–487
- 7 Lun FMF, Tsui NB, Chan KC et al. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on maternal DNA in maternal plasma. *PNAS* 2008; 105: 19920–19925

- 8 Zhong XY, Hahn S, Holzgreve W. Prenatal identification of fetal genetic traits. *Lancet* 2001; 357: 310–311
- 9 Li Y, Hahn S, Holzgreve W. Recent developments in the detection of fetal single gene differences in maternal plasma and the role of size fractionation. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1092: 285–292
- 10 Huang DJ, Nelson MR, Holzgreve W. MALDI-TOF-Mass spectrometry for trisomy detection. *Methods Mol Biol* 2008; 444: 123–132
- 11 Mergenthaler-Gatfield S, Holzgreve W, Hahn S. Spectral karyotyping (SKY) applications in prenatal diagnostics. *Methods Mol Biol* 2008; 444: 3–26
- 12 Zweifelhofer T, Tynan J, Cagasan I et al. Multiplexed massively parallel sequencing for the prenatal detection of fetal aneuploidy from maternal plasma. SCMM optimization study. Poster presented at the 2010 Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASHG), Washington DC
- 13 Chiu RWK, Akolehar R, Zheng YWL et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ* 2011; 342: 7401
- 14 Ehrich M, Deciu C, Zweifelhofer T et al. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 204: 205.e1–205.e11
- 15 Bianchi D, Platt L, Goldberg J et al. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 206: 322.e1–322.e15
- 16 Ashoor A, Syndelaki A, Wagner M et al. Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 206: 322.e1–322.e5
- 17 Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down's syndrome: an international clinical validation. *Genet Med* 2011; 13: 913–920
- 18 Palomaki G, Deciu C, Kloza EM et al. DNA Sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genet Med* 2012; 14: 296–305
- 19 Tschudin S, Holzgreve W, Conde N et al. Pregnant women's assessment and level of knowledge of prenatal counseling. *Ultraschall Med* 2009; 30: 157–162

### Hinweis

Erstpublikation: Holzgreve W. *XX* 2012; 1: 264–268



### Korrespondenz

Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Wolfgang Holzgreve, MBA, FRCOG, FACOG  
 Ärztlicher Direktor und Vorstandsvorsitzender des Universitätsklinikums Bonn  
 wolfgang.holzgreve@ukb.uni-bonn.de