



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Noninvasive Prenatal Genotyping for Human Platelet Alloantigens
(HPA) from Maternal Plasma or Serum**

Autor: Andréa Beth Lese
Institut / Klinik: Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie
Doktorvater: Dr. rer. nat. Peter Bugert

Neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT) occurs with alloimmunization of the homozygote mother against heterozygote fetal human platelet alloantigens (HPA), most often HPA-1a or -5b. Current diagnostic standards, cordocentesis and amniocentesis, are invasive and risky to the child. This project aimed to develop noninvasive tests for detection of fetal HPA alleles to reveal NAIT-relevant constellations. DNA was isolated from maternal and umbilical cord whole blood and maternal plasma or serum. HPA-1, -2, -3, and -5 genotyping using conventional PCR with sequence-specific primers (PCR-SSP) did not show sufficient sensitivity for the detection of fetal alleles. A fluorescent PCR-SSP technique was developed for HPA-1 and -5 with laser-assisted detection of amplification products. This sensitive technique enabled fetal HPA-1b and -5b genotyping in maternal plasma and serum, showing that this material represents a noninvasive fetal DNA source. Nonetheless, the overall DNA content and the percentage of fetal DNA was individually variable and may lead to negative results. Methods to estimate the total DNA content and the percentage of fetal DNA, such as the analysis of STR-Loci, represent important control investigations.

Bei der neonatalen Alloimmunthrombozytopenie (NAIT) handelt es sich um die Alloimmunisierung der homozygoten Mutter gegen heterozygote fetale humane thrombozytäre Alloantigene (HPA), meistens HPA-1a oder -5b. Die gängigen diagnostischen Methoden, Cordozentese und Amniozentese, sind invasive Methoden, die nicht völlig risikofrei sind. Ziel dieser Doktorarbeit war die Etablierung von Verfahren zur nicht-invasiven Genotypisierung von fetalen HPA-Allelen aus mütterlichem Plasma oder Serum. Dazu wurde DNA aus mütterlichem Vollblut, Plasma oder Serum und aus Nabelschnurblut isoliert. Die HPA-1, -2, -3 und -5 Genotypisierung mittels konventioneller PCR mit Sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP) erbrachte keine ausreichende Sensitivität zum Nachweis fetaler Allele. Unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Primern und dem Nachweis der Amplifikate mittels laserbasierter Detektion konnte für die HPA-1 und -5 Systeme ein sensitive Verfahren entwickelt werden, das eine Genotypisierung von fetalen HPA-1 und -5 Allelen aus mütterlichem Plasma und Serum ermöglichte. Es konnte darüber hinaus festgestellt werden, dass sowohl der Gesamtgehalt an DNA als auch der Anteil fetaler DNA im Plasma oder Serum individuell sehr verschieden ist und mitunter zu negativen Ergebnissen führen kann. Methoden zur Überprüfung von DNA-Gehalt und Anteil fetaler DNA, wie z.B. die Analyse von STR-Loci, sind daher wichtige Kontrolluntersuchungen.