

Pränatale Diagnostik und Therapie – dem Mikrochimärismus auf der Spur

W. Holzgreve, D. Surbek, S. Hahn

Einführung

Zwei Forschungsansätze, die zunächst unabhängig voneinander seit einigen Jahren in unserem Labor verfolgt und insbesondere vom Schweizerischen Nationalfonds sowie den National Institutes of Health, USA, grosszügig unterstützt werden, haben sich inzwischen getroffen, weil unerwartete Erkenntnisse gewonnen werden konnten, die nun eine Brücke zwischen beiden Forschungsgebieten schlagen, wobei jeweils die Plazenta im Mittelpunkt steht (Abb. 1).

So hat unser Bemühen, Techniken zur nicht-invasiven Pränatal-Diagnostik durch Isolation fetaler Zellen ($1:10^6$) bzw. DNA im mütterlichen Blut zu entwickeln, gezeigt, dass der inzwischen bewiesene «Mikrochimärismus» bei und nach Schwangerschaften auch Konsequenzen für mütterliche Erkrankungen (Präeklampsie, Autoimmunerkrankungen) haben kann. Dieser Aspekt unserer Arbeit wurde gerade ausführlich im *Science* 2002;296:2169–72, besprochen.

Hämatopoietische Stammzellen können inzwischen auch bereits pränatal eingesetzt werden, nämlich bei solchen pränatal (z.B. durch Amniozentese bzw. Chorionzottenbiopsie) erfassten genetischen Erkrankungen, bei denen das Kind sonst bereits zum Geburtszeitpunkt irreversibel geschädigt oder gefährdet wäre. Wir haben hierzu erfolgreiche Tierexperimente mit Mäusen zur Erzeugung eines stabilen therapeutischen Zell-Chimerismus durchgeführt (Abb. 2). Gleichzeitig sind wir mit der Entwicklung von Techniken zur Stammzell-Applikation in utero befasst, um die Stammzellen tatsächlich so früh wie möglich auch beim Menschen schon pränatal applizieren zu können.

Im folgenden sollen diese beiden Forschungsrichtungen unserer Gruppen dargestellt und die Ziele und potentiellen klinischen Anwendungen diskutiert werden.

kungen sind beim Kind mittels einer Transplantation hämatopoietischer Stammzellen aus Knochenmark oder Nabelschnurblut therapierbar; dazu gehören hämatologische und immunologische Erkrankungen und gewisse Stoffwechselstörungen [2, 3]. Die Stammzell-Transplantation bei diesen Kindern nach der Geburt und endgültiger Krankheitsdiagnose ist jedoch mit mehreren Problemen belastet: Für die Mehrheit der betroffenen Kinder findet sich kein HLA-kompatibler Spender; die notwendige Konditionierung der Patienten mittels Chemotherapie und Bestrahlung vor der Trans-

Abbildung 1.

Die Plazenta ist einerseits das «Organ», über welches der feto-maternale Zellverkehr stattfindet, der für die nicht-invasive Pränataldiagnostik genutzt werden soll. Andererseits ist das Restblut aus der Nabelschnur und Plazenta nach der Geburt heute eine wichtige Quelle für hämatopoietische Stammzellen geworden.



Abbildung 2.

Im Maus-Experiment werden Stammzellen in utero intraperitoneal injiziert, um dadurch einen stabilen Zellchimerismus zu erzeugen, welcher nach der Geburt der Mäuse ausreichend persistiert.



Universitäts-Frauenklinik Basel

Korrespondenz:
Prof. Dr. W. Holzgreve
Chefarzt Universitäts-Frauenklinik
Schanzenstrasse 45
CH-4031 Basel

wholzgreve@uhbs.ch

Pränatale Stammzell-Transplantation

Viele genetische Erkrankungen können heute früh in der Schwangerschaft mittels Chorionzottenbiopsie auf molekularer Ebene diagnostiziert werden [1]. Einige dieser Erkan-

plantation und die oft vorkommende akute bzw. chronische «graft-versus-host disease» (GvHD) führen zu einer hohen Morbidität; zudem besteht bei einigen Erkrankungen bereits bei Geburt eine Organschädigung, welche intrauterin entstanden ist. Viele betroffene Eltern entscheiden sich deshalb für einen frühzeitigen Abbruch der Schwangerschaft, wenn ein Wiederholungsfall dieser schweren und unheilbaren genetischen Erkrankungen beim Fetus diagnostiziert wird.

Die intrauterine Stammzell-Transplantation ist ein neues Verfahren zur früh- und rechtzeitigen Behandlung genetischer Krankheiten [4]. Sie bietet gegenüber der Transplantation beim geborenen Kind mehrere Vorteile, welche teilweise durch Eigenheiten der physiologischen fetalen Entwicklung begründet werden: Vor dem zweiten Trimester der Schwangerschaft ist der Fetus immunologisch unreif, weshalb

Stammzellen eines HLA-nichtidentischen Spenders ohne die Gefahr der Abstossung durch das Immunsystem des Empfängers transplantiert werden können. Aus der ontogenetischen Migration des hämatopoietischen Systems beim Fetus ergibt sich, dass sich die Hämatopoese zu diesem Zeitpunkt noch in der fetalen Leber (Abb. 3) befindet, wodurch das fetale Knochenmark zunächst noch leer und empfänglich für transplantierte Zellen eines Spenders ist und sich eine Konditionierung erübrigt. Zudem könnten die transplantierten Stammzellen früh die aus dem Gendefekt resultierende defiziente Funktion kompensieren und bereits vor der Geburt Organschäden vermeiden. Die pränatale Stammzell-Transplantation könnte demnach auch einfacher, effektiver und kostengünstiger sein. Kandidaten für diese Behandlung sind im Prinzip sämtliche genetischen Krankheiten, welche pränatal diagnostizierbar und durch eine postnatale Stammzell-Transplantation therapierbar sind.

Abbildung 3.

Embryoskopische Aufnahme in der elften Schwangerschaftswoche lässt die wegen der dort vorrangig lokalisierten Hämatopoese noch relativ grosse Leber erkennen.

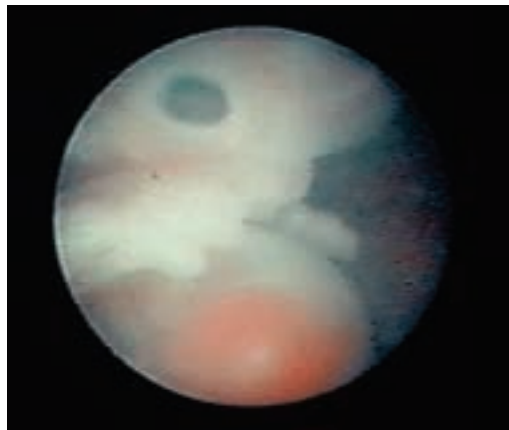


Abbildung 4.

Intraperitoneale Stammzell-Applikation beim ungeborenen Schaf unter kontinuierlicher Ultraschall-Kontrolle.



Evidenz aus präklinischer Forschung und klinischer Erfahrung

Die intrauterine Stammzell-Transplantation wurde von anderen Gruppen und uns anhand verschiedener Tiermodelle bei Schafen (Abb. 4), Mäusen und Primaten entwickelt, wobei das Schaf-Modell eine zentrale Rolle spielte. Beim Menschen wurden bisher weltweit insgesamt etwa 40 solcher Transplantationen bei Feten mit verschiedenen Krankheiten durchgeführt, die meisten davon bei schweren Immundefizienzen oder Hämoglobinopathien [5], andere aber auch bei Rhesus-Isoimmunisation oder Speicherkrankheiten wie z.B. Morbus Hurler. Es wurden dabei unterschiedliche Spender-Stammzellen verwendet, teilweise aus dem Knochenmark des Vaters oder der Mutter, teilweise fetale Leberzellen. Die Transplantationen wurden in unterschiedlichem Schwangerschaftsalter durchgeführt.

Durchschlagende Erfolge konnten jedoch erst in jüngster Zeit erreicht werden, bei Feten mit schwerer kombinierter Immundefizienz [6]. Nach intrauteriner Stammzell-Transplantation hatten diese Kinder eine funktionierende Immunabwehr und benötigten keine Behandlung mehr. Im Gegensatz dazu konnten allerdings bei Erkrankungen, welche nicht zu schwerer Beeinträchtigung des Immunsystems führen, wie beispielsweise bei den Hämoglobinopathien, bisher keine gleichartigen Erfolge erzielt werden. Trotz Mikrochimärismus (<1% Spenderzellen) oder immunologischer Toleranz gegenüber dem Spender zeigten die Neugeborenen das klinische Vollbild der Erkrankung.

Aktuelle und zukünftige Forschungsstrategien

Basierend auf einem verbesserten Verständnis der biologischen Mechanismen der intrauterinen Stammzell-Transplantation werden nun verschiedene Strategien zur Verbesserung des Erfolgs mittels verschiedenen Tiermodellen entwickelt. Wir selbst verwenden dazu das immundefiziente NOD/SCID-Maus-Modell und das fetale Schaf-Modell. Im Maus-Modell haben wir beispielsweise mittels vergleichender Kinetik-Studien die Abhängigkeit intrauterin transplantiert Donorzellen vom Empfängerstroma im Vergleich xenogen (human) – allogenen zeigen können. Die Co-Transplantation von Stromaelementen des Spenders lässt somit einen verbesserten Erfolg erwarten. Weitere Ansätze sind der frühe Zeitpunkt der intrauterinen Transplantation mit Hilfe von dünnen, noch in der Erprobung befindlichen Endoskopen (Abb. 5) kombiniert mit verbessertem Applikationsweg [7], die Verwendung von Stammzellen aus dem Nabelschnurblut [8], die minimale Konditionierung des Fetus zur Suppression des fetalen hämatopoietischen Systems des Empfängers [9], oder die Toleranzinduktion durch intrauterine Stammzell-Transplantation für die postnatale Booster-Transplantation vom gleichen Spender ohne Myeloablation oder Immunsuppression. Diese Bemühungen zielen insgesamt darauf ab, das «Angehen» der transplantierten, allogenen Stammzellen zu unterstützen und diesen Zellen einen Vorteil bei der Konkurrenz gegen die eigenen Stammzellen des Feten zu geben.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der intrauterinen Gen-Therapie, wobei *autologe* Stammzellen des Fetus verwendet werden, welche genetisch modifiziert werden [10]. Damit könnten die Barrieren der allogenen Transplantation überwunden werden. Hierbei wird das defekte Gen der eigenen Stammzellen durch ein «gesundes» Gen ersetzt. Mit Hilfe eines Vektors

Abbildung 5.

Bei der Embryoskopie zeigt sich auf dem Monitor die Hand des ungeborenen Kindes in der 12. SSW. Es kommen experimentelle dünne Endoskope zum Einsatz.



wird das Gen in die Stammzellen gebracht, welche so genetisch verändert werden. Kürzlich hat die postnatale Gen-Therapie erstmals einen entscheidenden Erfolg gezeigt [11]. Zudem sind äusserst effektive Vektoren entwickelt worden; wir selbst haben beispielsweise die hohe Effizienz der Transduktion fetaler Stammzellen mittels lentiviraler HIV-Vektoren zeigen können [12]. Obwohl die pränatale Gen-Therapie effektiv und erfolgversprechend scheint [13, 14], sind einige offene Fragen zur Sicherheit dieses Vorgehens, wie beispielsweise das Risiko der Transduktion fetaler Keimzellen, noch zu lösen. Bevor diese Therapie beim Menschen eingesetzt werden kann, müssen nicht nur diese Fragen auf tierexperimenteller Ebene geklärt, sondern es müssen auch die begleitenden ethischen Probleme angegangen werden [15]. In jüngster Zeit hat die Grundlagenforschung im Bereich der Stammzellen neue Erkenntnisse hervorgebracht. Auch diese Entwicklungen im Bereich der embryonalen Stammzellen [16] und der neu entdeckten Plastizität adulter Stammzellen [17] werden auf das Gebiet der pränatalen zellulären Therapie in Zukunft eine wichtige Bedeutung erlangen. Bereits heute zeichnet sich ab, dass die Stammzell-Plastizität neue Möglichkeiten der pränatalen Behandlung genetischer Erkrankungen erschliessen wird, welche bisher der Transplantation hämatopoietischer Stammzellen nicht zugänglich waren. Als Beispiel sei die Transplantation mesenchymaler Stammzellen, welche sich in verschiedene Gewebe wie Knochen, Knorpel, Fettgewebe oder Bindegewebe differenzieren können und somit auch bei genetischen Erkrankungen des Skeletts und des Bewegungsapparates – wie z.B. bei der Osteogenesis imperfecta – eingesetzt werden können, genannt [18]. In diesem Bereich dürfte in Zukunft noch einiges aus der Forschung zu erwarten sein.

Fetale Zellen und DNA zur nichtinvasiven Pränatal-Diagnostik

Die Voraussetzung für jede Therapie, auch die intrauterine Stammzell-Therapie, ist eine gute Diagnostik. Wegen des Eingriffs-Risikos für die Mutter und insbesondere für das ungeborene Kind bei jeder invasiven Untersuchung ist ein lang ersehntes Ziel, eine sichere Methode für eine risikofreie pränatale Diagnose zu entwickeln.

Auf diesem langen Wege haben sich zwei verschiedene Ansätze etabliert:

- Die genetische Untersuchung mittels FISH (Abb. 6) oder PCR von fetalen Zellen, die aus dem Blut der Schwangeren angereichert werden.

- Die genetische Untersuchung mittels der PCR von zellfreier fetaler DNS im mütterlichen Plasma.

Die Effizienz dieser Methoden wird im Moment in einer gross angelegten Studie untersucht, die von der US-amerikanischen Gesundheits-

Abbildung 6.

Identifizierung eines Feten mit Edwards-Syndrom (47, xy, +18) mit 3-Farben-FISH.

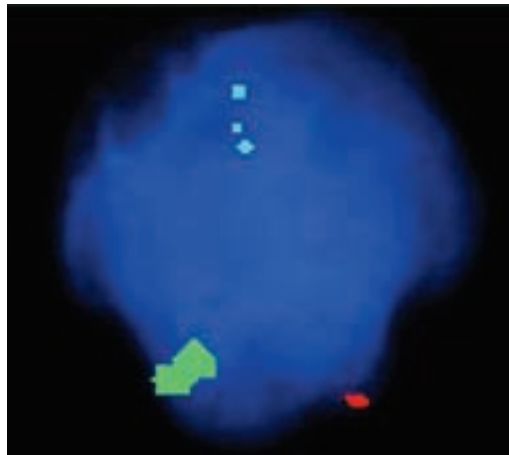


Abbildung 7.

Mit dem Ziel der nicht-invasiven Pränataldiagnostik erfolgt die Separierung fetaler nukleierter Erythrozyten mit dem Transferrin-Rezeptor-Antikörper (CD71) durch magnetische Zellsortierung, bei der mikromagnetische Partikel an die Antikörper gekoppelt sind.

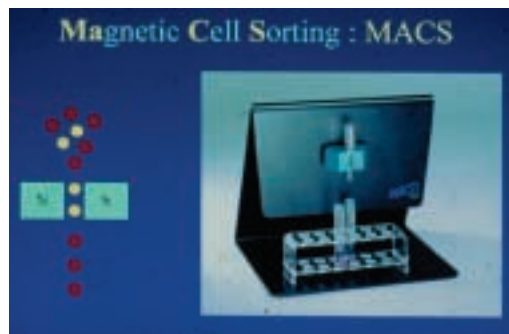
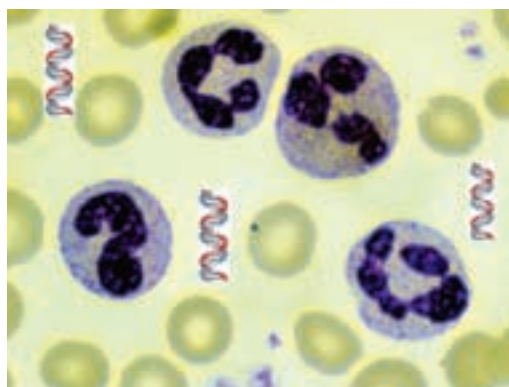


Abbildung 8.

Freie fetale DNA in mütterlichem Plasma.



behörde NIH (National Institutes of Health) veranlasst wurde. An dieser sogenannten «NIFTY-Studie» nimmt auch unser Labor an der Universität Basel als einziges nicht amerikanisches teil.

Im ersten Teil diese Studie sind fast 3000 Proben von Schwangeren mit erhöhtem Risiko für eine fetale Chromosomen-Störung untersucht worden. Die Ergebnisse, die gerade veröffentlicht worden sind [19], haben eindeutig gezeigt, dass die jetzige Technologie noch nicht genügend ausgereift ist, um einen klinischen Einsatz zu ermöglichen. Die fetalen Zellen wurden nur mit einer Sensitivität von knapp 40% gefunden. Trotzdem hat diese Studie demonstriert, dass fetale Zellen mittels der von uns in dieses Feld eingeführten MACS-Methode (magnetische Anreicherung) mit einer signifikant höheren Sensitivität und Spezifität erfasst werden können als mit dem Durchfluss-Zytometer. Da ausserdem etwa doppelt so viele Proben mittels MACS als mit FACS untersucht worden sind, hat diese Studie auch belegt, dass die MACS-Methode (Abb. 7) einfacher zu handhaben ist und einen höheren Durchsatz ermöglicht als die FACS-Methode, indem mit MACS mehr Proben gleichzeitig verarbeitet werden können als mit dem FACS.

In unserem Labor haben wir uns zusätzlich auch intensiv mit der Analyse einzelner fetaler Zellen mittels Einzel-Zellen-PCR beschäftigt [20]. Diese Methode ist zwar auch vielversprechend, jedoch momentan technisch zu aufwendig (da jede Zelle einzeln unter dem Mikroskop isoliert werden muss), um sie als eine ernsthafte Alternative für die etablierte Pränatal-Diagnostik in Betracht zu ziehen. Unsere Studie von 19 Fällen ist aber noch immer die grösste in der Fachliteratur [21].

Im Gegensatz zu den klinisch noch nicht befriedigenden Ergebnissen mit fetalen Zellen hat sich die neue Beobachtung von zellfreier fetaler DNS im mütterlichen Plasma (Abb. 8) als ein Durchbruch erwiesen, da sie relativ einfach in der Lage ist, gewisse fetale genetische Merkmale untersuchen zu können [22]. Somit konnten wir in verschiedenen Studien belegen, in denen mehrere hundert Proben untersucht worden sind, dass einfache fetale genetische Merkmale wie z.B. das fetale Rhesus-Gen (Abb. 9) mit fast 100prozentiger Genauigkeit bestimmt werden können ([23]; Abb. 10). Daher ist diese Methode auch die erste, die den Transfer vom Labor zur Klinik erfolgreich gemeistert hat.

Ein weiterer Aspekt, der uns wissenschaftlich und klinisch sehr beschäftigt, ist die Rolle des erhöhten Zelltransfers und der Freisetzung fetaler DNS bei gewissen Schwangerschaftsstörungen wie der Präeklampsie [24]. Hier haben wir Pionier-Beobachtungen gemacht, in dem wir festgestellt haben, dass die Zahl feta-

Abbildung 9.
RhD and RHCc/Ee Locus.

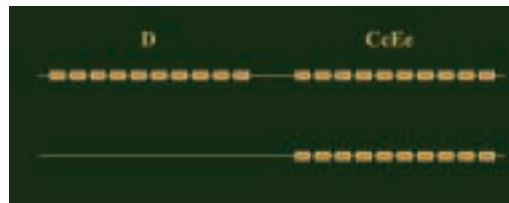


Abbildung 10.
RhD und Y-Nachweis aus fetaler DNA.

	Schwanger alter	Sensitivität	Spezifität
PCR for SRY*	13-34.6	94% (n=189)	100% (n=82)
PCR for RhD*	13-37	96% (n=23)	100% (n=9)
SRI-RhD*	13-17	92.6% (n=27)	100% (n=7)

* Zhang et al. Lancet, 357, 310-311, 2001
* Zhang et al. SMO 131; 70-74, 2001

ler Zellen im Kreislauf der Schwangeren bei Schwangerschaften erhöht ist, die von einer Präeklampsie betroffen sind. Wir konnten zudem zeigen, dass dieser erhöhte Zelltransfer schon früh in der Schwangerschaft vorhanden ist, schon lange vor dem Eintreten der Symptome einer manifesten Präeklampsie. Es besteht also die Möglichkeit, dass diese Beobachtung zu einem neuen Test führen kann, um Risikoschwangerschaften schon früh zu erfassen. Wir haben uns aber nicht nur mit klinischen

Anwendungen beschäftigt, sondern auch versucht, grundlegende biologische Fragen zu beantworten, z.B. der Frage nach dem Ursprung der zellfreien fetalen DNS? Stammt sie von fetalen Zellen ab, die im Kreislauf der Schwangeren von deren Immun-Effektor-Zellen zerstört werden oder wird die DNS von der Plazenta freigesetzt. Neue Daten aus unserem Labor haben ganz eindeutig zeigen können, dass die zellfreie fetale DNS nicht von fetalen Zellen stammt, welche die Plazenta durchquert haben, sondern dass diese in aller Wahrscheinlichkeit von der Plazenta stammen und zwar vom Synzytiotrophoblasten [25]. Da sich ein Grossteil unserer Arbeit mit Erythroblasten beschäftigt, untersuchen wir auch die Entwicklung und Differenzierung dieses Zelltyps. Diese Untersuchungen haben kürzlich gezeigt, dass die Entdifferenzierung, bei welcher der Erythroblast seinen Zellkern verliert, gewisse Apoptose-Merkmale besitzt, in dem die Zelle die DNS im Zellkern zerschneidet, dadurch aber nicht stirbt, sondern sich in den kernlosen Erythrozyten weiter entwickelt [26]. Diese Kenntnisse können dann wiederum genutzt werden, gezielt nach fetalen Erythroblasten im mütterlichen Kreislauf zu suchen [27]. Das Ziel der Forschung unseres Labors ist also einerseits, den natürlich vorkommenden Mikrochimärismus fetaler Zellen im mütterlichen Blut diagnostisch zu nutzen und andererseits, durch intrauterine Stammzell-Therapie einen therapeutischen Zell-Chimärismus zur rechtzeitigen und nachhaltigen Therapie genetischer Erkrankungen zu erreichen.

Literatur

- 1 Surbek DV, Holzgreve W. Why do we need non-invasive prenatal diagnosis? In: Hahn S, Holzgreve W, eds. Fetal Cells and Fetal DNA in Maternal Blood. New Developments for a New Millenium. Basel-New York: Karger; 2001. p. 21-7.
- 2 Buckley RH, Schiff SE, Schiff RI, Markert ML, Williams LW, Roberts JL, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency syndrome. New Engl J Med 1999;340:508-16.
- 3 Shapiro E, Krivit W, Lockman L, Jambaqué I, Peters C, Cowan M, et al. Long-term effect of bone-marrow transplantation for childhood-onset cerebral X-linked adrenoleukodystrophy. Lancet 2000;356: 713-8.
- 4 Surbek DV, Holzgreve W, Nicolaidis KH. Hematopoietic stem cell transplantation and gene therapy in the fetus: ready for clinical use? Hum Reprod Update 2001;7:85-91.
- 5 Flake AW, Zanjani ED. In utero hematopoietic stem cell transplantation: ontogenetic opportunities and biologic barriers. Blood 1999; 94:2179-91.
- 6 Flake AW, Roncarolo MG, Puck JM, et al. Treatment of X-linked severe combined immunodeficiency by in utero transplantation of paternal bone marrow. New Engl J Med 1996;335:1806-10.
- 7 Surbek DV, Tercanli S, Holzgreve W. Transabdominal first trimester embryofetoscopy as potential approach to early in utero stem cell transplantation and gene therapy. Ultrasound Obstet Gynecol 2000; 15:302-7.
- 8 Surbek DV, Holzgreve W, Jansen W, et al. Quantitative immunophenotypic characterization, cryopreservation, and enrichment of second and third trimester human fetal cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. Am J Obstet Gynecol 1998;179:1228-33.
- 9 Shields LE, Gaur L, Andrews R. Fetal immune suppression as adjunctive therapy for in utero hematopoietic stem cell transplantation in non-human primates. Am J Obstet Gynecol 2001;185:578.
- 10 Zanjani ED, Anderson WF. Prospects for in utero human gene therapy. Science 1999;285:084-8.
- 11 Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, et al.: Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. Science 2000;288 669-72.
- 12 Luther-Wyrsh A, Costello E, Thali M, Buetti E, Nissen C, Surbek D, et al. Stable transduction with lentiviral vectors and amplification of immature hematopoietic progenitors from cord blood of preterm human fetuses. Hum Gene Ther 2001;12: 377-89.

- 13 Tran ND, Porada CD, Almeida-Porada G, Glimp HA, Anderson WF, Zanjani ED. Induction of stable prenatal tolerance to beta-galactosidase by in utero gene transfer into preimmune sheep fetuses. *Blood* 2001;97:3417-23.
- 14 Surbek DV, Young A, Danzer E, Schoeberlein A, Dudler L, Holzgreve W. Ultrasound-guided stem cell sampling from the early ovine fetus for prenatal ex-vivo gene therapy. *Am J Obstet Gynecol* 2002 (in press).
- 15 Caplan AL, Wilson JM: The ethical challenges of in utero gene therapy. *Nat Genet* 2000;24:107.
- 16 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145-7.
- 17 Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105: 369-77.
- 18 Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AMB, Deans R, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation. *Nat Med* 2000;6:1282-6.
- 19 Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, Elias S, Holzgreve W, Evans MI, et al. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. *Prenat Diagn* 2002;22:609-15.
- 20 Hahn S, Zhong XY, Troeger C, Burgemeister R, Gloning K, Holzgreve W. Current applications of single-cell PCR. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:96-105.
- 21 Troeger C, Zhong XY, Burgemeister R, Minderer S, Tercanli S, Holzgreve W, Hahn S. Approximately half of the erythroblasts in maternal blood are of fetal origin. *Mol Hum Reprod* 1999;5:1162-5.
- 22 Chiu RW, Lo YM. Application of fetal DNA in maternal plasma for noninvasive prenatal diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2002;2:32-40.
- 23 Zhong XY, Hahn S, Holzgreve W. Prenatal identification of fetal genetic traits. *Lancet* 2001;357: 310-1.
- 24 Hahn S, Holzgreve W. Fetal cells and cell free fetal DNA in maternal blood: new insights into preeclampsia. *Human Reprod Update* 2002; 8:1-8.
- 25 Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Cell free fetal DNA in the maternal circulation does not stem from the trans-placental passage of fetal erythroblasts. *Mol Hum Reprod* 2002;8:864-70.
- 26 Hristoskova S, Holzgreve W, Hahn S. More than one-half of the erythroblasts in the fetal circulation and cord blood are TUNEL positive. *Clin Chem* 2001;47:1870-1.
- 27 Holzgreve W, Hahn S. Prenatal diagnosis using fetal cells and free fetal DNA in maternal blood. *Clin Perinatol* 2001;28:353-65.

Anmerkung des Verlages: siehe zu dieser Thematik auch die Arbeit: «Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Risk-free simultaneous prenatal identification of fetal Rhesus D status and sex by multiplex real-time PCR using cell free fetal DNA in maternal plasma. *Swiss Med Wkly* 2001;131:70-4», die mit dem Swiss Medical Weekly Young Investigator's Award 2001 ausgezeichnet wurde. Internet: http://www.smw.ch/set_award.html