

Nicht-invasive molekulargenetische Pränataldiagnostik

Dr. rer. medic. Wera Hofmann
Medical Director
LifeCodexx AG

Einleitung

non invasive prenatal diagnosis = **NIPD**

Pränataldiagnostik (PND)

Nicht-invasive PND

- sonografisch
- biochemisch
- **NEU:** molekulargenetisch

+ keine Gefährdung von Mutter und Kind

- Risikoeinschätzungen

Invasive PND

- Chorionzottenbiopsie
- Amniozentese
- Cordozentese

+ direkte Diagnostik

- Komplikationen
(Fehlgeburten bei 0,2-1%)

Grundlage für NIPD – Fetale Zellen

- 1893** Obduktion schwangerer Frauen:
Trophoblastenzellen in der Lunge (Pathologe Schmorl)
 - 1969** fetale Lymphozyten in mütterlichem Blut (Walknowska et al.)
 - ab 1990** Anreicherungsstrategien für fetale Erythroblasten (Holzgreve et al.)
 - 1994** Nachweis fetaler Chromosomenstörungen mittels FISH an fetalen Erythroblasten (Bianchi et al.)
- Nachweis ab ca. 7 SSW
 - Anteil 1-6 fetale Zellen pro ml Serum
 - Stabilität >27 Jahre
 - derzeit kein Assay anwendbar,
da geringe Sensitivität/hohe falsch-positiv Rate



Grundlage für NIPD – Zellfreie fetale Nukleinsäuren (cffNA)

1997 Nachweis cffDNA-Fragmente im mütterlichen Serum und Plasma (Lo et. al.)

- Nachweis ab 4. SSW
- Anteil 2-40%
- Stabilität < 2 Stunden
- Physikalische Eigenschaften kurze Fragmente, 80% < 200bp
Trophoblasten (Plazenta) durch Apoptose / Nekrose-Prozesse freigesetzt



Klinische Anwendung cffNA

Genetische Erkrankungen

Autosomale Einzelgenerkrankungen

- wenige Fälle beschrieben
- Nachweis paternal vererbter Mutation
- autosomal dominant: Chorea Huntington
- autosomal rezessiv: Cystische Fibrose

Geschlechtsbestimmung

- bei bekannter geschlechtsgebundener Erbkrankheit
- X-chromosomal: Muskeldystrophie
- Adrenogenitales Syndrom
- Anwendung ab 7. SSW

Chromosomenstörungen

- Autosomale Aneuploidien
- Gonosomale Aneuploidien
- Anwendung ab 10. SSW



Klinische Anwendung cffNA

Schwangerschaftskomplikationen

RhD-Diagnostik

Präeklampsie

Intrauterine Wachstumsstörungen

- RhD-negative Frauen
- keine Anti-RhD-Immunglobulin Prophylaxe bei RhD-negativem Fet
- kommerzieller Kit
- UK: Routine; falsch-negativ Rate bei ca. 0,2%

- noch Forschung
- potentielle Biomarker für Früherkennung



Nicht-invasiver Nachweis fetaler Chromosomenstörungen

Next Generation Sequencing (NGS) = massively parallel (shotgun) sequencing

1. Blutabnahme

2. Plasmagewinnung

3. Extraktion zellfreier DNA

4. Erstellung genomischer
Bibliothek

5. Amplifizierung/Quantifizierung
Bibliothek



6. Next Generation Sequencing

7. Bio-IT Datenanalyse

8. z-score Berechnung

Next Generation Sequencing (NGS) für nicht-invasiven Nachweis fetaler Trisomie 21

Studie	Fallzahl	Fetale T21	Sensitivität (Falsch neg.)	Spezifität (Falsch pos.)
proof-of-concept				
Fan et al. 2008	18	9	100%	100%
Chiu et al. 2008	18	14	100%	100%
Chiu et al. 2010	15	5	100%	100%
Sehnert et al. 2011	47	13	100%	100%
Sparks et al. 2012	298	89	100%	100%
Stumm et al. 2012 <i>in press</i>	43	8	100%	100%
clinical setting				
Chiu et al. <i>BMJ</i> 2011	2322-plex	86	100%	97,9% (3)
Ehrich et al. <i>AJOG</i> 2011	449	39	100%	99,7% (1)
Palomaki et al. 2011	1696GC	212	99,1% (2)	99,9% (1)
Bianchi et al. 2012	493	39	100%	100%



NGS für nicht-invasiven Nachweis fetaler Trisomie 18

Studie	Fallzahl	Fetale T18	Sensitivität (Falsch neg.)	Spezifität (Falsch pos.)
Fan et al. <i>PNAS</i> 2008	18	2	100%	100%
Sehnert et al. 2011	47	8	100%	100%
Chen et al. 2011	392	37	91,9%% (3)	98,0% (5)
Sparks et al. 2012	298	7	100%	100%
Palomaki et al. 2012	1971	59	100%	99,7% (5)
Bianchi et al. 2012	499	36	97,2% (1)	100%



NGS für nicht-invasiven Nachweis fetaler Trisomie 13 und Monosomie X

Studie	Fallzahl	Fetale T13	Sensitivität (Falsch neg.)	Spezifität (Falsch pos.)
Fan et al. <i>PNAS</i> 2008	18	1	100%	100%
Sehnert et al. 2011	47	1	0% (1)	100%
Chen et al. 2010	392	25	100%	98,9% (3)
Palomaki et al. 2012	1971	12	91,7% (1)	99,1% (16)
Bianchi et al. 2012	499	14	78,6% (3)	100%

- Monosomie X (Bianchi et al. 2012; Sehnert et al. 2011)



Kommerzielle Anbieter in USA

- Sequenom Inc. bietet MaterniT21-Test seit Okt. 2011 in USA an:
 - Risikoschwangere
 - ab 10.SSW
 - 1.900 USD
 - 3.500 Tests bislang
- weitere Anbieter 2012:
 - Verinata Health
 - Aria Diagnostics
 - LifeCodexx
- Lifecodexx: Patentlizenz von Sequenom



NGS für NIPD

Einschränkungen / Empfehlungen

der *International Society of Prenatal Diagnosis*

- Test sinnvoll für Einzelschwangerschaften mit Risiko für Trisomie 21
- Genetische Beratung erforderlich (in Deutschland über GenDG geregelt)
- Test wird als nicht vollständig diagnostischer Test angesehen, sondern als erweiterte Risikoanalyse (Aussage begrenzt, da cffDNA extraembryonal; keine Strukturanalysen)
 - Positives Testergebnis muss durch invasiven Test bestätigt werden
- Test derzeit nicht geeignet als NGS-basierte Risikoanalyse
- Test derzeit nicht geeignet für Mehrlingsschwangerschaften



LifeCodexx PraenaTest™

Nicht-invasive Diagnostik fetaler T21

- 2009** LifeCodexx und GATC Biotech beginnen mit NIPD Thematik
- 2010/
2011** Förderung durch BMBF und BMWi für Anwendungsentwicklung des Tests; erfolgreiche Pilotstudien; Kooperationen mit pränataldiagnostischen Zentren in Deutschland und Schweiz
- 2011/
2012** Analyse von > 500 Proben aus multizentrischer prospektiver Diagnostikstudie mit Pränatalzentren
- 2012** Auswertung Diagnostikstudie, CE-Zertifizierung für Bio-IT-Software als Voraussetzungen für **LifeCodexx PraenaTest™**



Anwendung LifeCodexx PraenaTest™

- diagnostischer Test für Schwangere mit erhöhtem Risiko für Trisomie 21 (mit Erweiterungsoption für T13 und T18)
- kein „stand alone“ Test, in Ergänzung zur bisherigen nicht-invasiven Risikoabschätzung (Ersttrimesterscreening)
- Entscheidungshilfe für oder gegen invasive PND:
 - bei unauffälligem Testergebnis: Entlastung der Schwangeren mit Verzicht auf invasive PND, ggf. weiterer Ultraschall
 - bei auffälligem Testergebnis: Empfehlung einer invasiven PND zur Sicherung der Diagnose
- invasive Eingriffe reduzieren
- birgt selbst kein Fehlgeburtsrisiko, Vermeidung methodisch bedingter Schwangerschaftsverluste durch invasive PND



Ausblick bis 2020

Next Generation Sequencing für NIPD von Chromosomenstörungen

- weitere große klinische Studien, die Testvalidität auch für low-risk Schwangerschaften, Zwillingsschwangerschaften und IVF Schwangerschaften zeigen
- große klinische Studien, die Aussagekraft von NGS in Kombination mit anderen Screeningtests untersuchen
- neue alternative NGS-Strategien, die schnelle und kostengünstige Analyse erlauben
- drastische Reduktion invasiver PND



Zukünftige Entwicklungen NIPD

- 2010** Sequenzierung des fetalen Genoms (Lo et al.)
- zellfreie DNA aus mütterlichem Blut mit 65-facher *coverage* sequenziert (3,931 Milliarden reads)
 - Mutationsstatus des Ungeborenen für β -Thalässämie bestimmt
- 2011** Nachweis genomischer Imbalancen, wie Mikrodeletionen (Peters et al.)
- 4,2 Mb Deletion auf Chromosom 12 (> 243 Millionen reads)

Next Generation Sequencing wird Technologie der Wahl werden, auch für andere klinische Anwendungen im Bereich NIPD.



Herzlichen Dank.

Dr. rer. medic. Wera Hofmann
w.hofmann@lifecodexx.com