

Prírodovedecká fakulta Univerzity Karlovej v Prahe
Katedra genetiky a mikrobiológie

BAKALÁRSKA PRÁCA

**Neinvazívna prenatalna diagnostika s využitím
moderných molekulárno-genetických metód**



Lenka Veselovská

Školiteľ: doc. RNDr. Ilona Hromadníková, PhD.

Praha 2009

Pod'akovanie

Chcela by som sa poďakovať svojej školiteľke doc. RNDr. Ilone Hromadníkovej, PhD. z Oddelenia molekulárnej biológie a patológie bunky 3. lekárskej fakulty UK za cenné rady a pripomienky, ktoré mi pomohli pri písaní tejto práce, a tiež Mgr. Lenke Žejškovej z tohto oddelenia za pomoc pri získavaní potrebných informácií.

Abstrakt

Fetálne extracelulárne nukleové kyseliny nachádzajúce sa v materskej periférnej krvi predstavujú perspektívny zdroj fetálneho genetického materiálu pre neinvazívnu prenatalnú diagnostiku. Môžu byť využité na rôzne diagnostické účely, v klinickej praxi sa už používajú na determináciu pohlavia a fetálneho *RHD* genotypu. Ďalšími aplikáciami sú detekcia komplikácií v tehotenstve, monogénnych porúch plodu a fetálnych chromozomálnych aneuploidií. MALDI-TOF hmotnostná spektrometria, digitálna PCR a „shotgun“ sekvenovanie sú moderné molekulárno-genetické metódy testované z hľadiska ich uplatnenia v neinvazívnej prenatalnej diagnostike genetických abnormalít plodu. Analýza pomocou MALDI-TOF hmotnostnej spektrometrie sa zameriava na detekciu fetálnych aneuploidií z nukleových kyselín špecifických pre plod, ktoré sa dajú odlíšiť od materskej extracelulárnej DNA a RNA nachádzajúcej sa v krvnej plazme – je to mRNA génov exprimovaných výhradne v bunkách placenty a fetálne-špecificky metylovaná DNA. Stanovuje sa pomer množstva dvoch alel toho istého génu nachádzajúceho sa na sledovanom chromozóme odlišných na základe SNP, preto je tento postup obmedzený na plody heterozygotné pre daný SNP. Meranie relatívnej chromozomálnej dávky na detekciu aneuploidií využívajúce digitálnu PCR je nezávislé na polymorfizmoch a zároveň nevyžaduje rozlíšenie materskej a fetálnej DNA. Je stanovený pomer celkovej extracelulárnej DNA (materskej aj fetálnej) daných lokusov z potenciálne trizomického a referenčného chromozómu. Na detekciu monogénne dedičných porúch môžu slúžiť analogické postupy využívajúce MALDI-TOF hmotnostnú spektrometriu a digitálnu PCR. Aneuploidie môžu byť tiež detegované metódou „shotgun“ sekvenovanie, nezávislou na akomkoľvek lokuse a využívajúcou teoreticky všetky sekvencie pochádzajúce zo študovaného chromozómu. Žiadny z týchto postupov zatiaľ nie je vhodný na aplikáciu v klinickej praxi, ale za predpokladu navrhovaných vylepšení a testovaní na väčšom počte vzoriek by ich aplikácia mohla byť v budúcnosti možná. Invazívne metódy predstavujúce riziko pre plod by tak mohli byť nahradené bezpečnejšou neinvazívnou prenatalnou diagnostikou.

Kľúčové slová

neinvazívna prenatalná diagnostika, fetálna extracelulárna DNA, fetálna extracelulárna RNA, trizomia, monogénne dedičná porucha, MALDI-TOF hmotnostná spektrometria, digitálna PCR, „shotgun“ sekvenovanie

Abstract

Cell-free fetal nucleic acids in maternal blood circulation constitute a perspective source of fetal genetic material for noninvasive prenatal diagnosis. It can be used for various diagnostic purposes, for example tests for fetal sex determination and fetal RhD status prediction are already being used in clinical practice. Other possible applications are detection of pregnancy-related disorders, fetal monogenic diseases and fetal chromosomal aneuploidies. MALDI-TOF mass spectrometry, digital PCR and shotgun sequencing are modern molecular genetic methods being tested for their potential use in noninvasive prenatal diagnosis of fetal genetic abnormalities. Analysis through the use of MALDI-TOF mass spectrometry targets a fetal-specific subset of nucleic acids in maternal plasma background, e.g. placental mRNA and DNA with fetal-specific methylation pattern, to detect fetal aneuploidy. This approach assesses allelic ratio using SNPs in a locus within analyzed chromosome therefore it can be used only for fetuses heterozygous for the analyzed SNPs. Detection of fetal aneuploidies by measurement of relative chromosome dosage through the use of digital PCR is polymorphism-independent and furthermore does not require determination of fetal-specific sequences. It measures total amount of cell-free DNA (maternal and fetal) of specific locus on a potentially aneuploid chromosome and compares it to that on a reference chromosome. Analogous approaches using MALDI-TOF mass spectrometry and digital PCR can be applied for detection of monogenic diseases. Shotgun sequencing is a locus-independent approach also suitable for detection of aneuploidies. Amount of potentially aneuploid chromosome can be determined by measurement of all sequences originating from that chromosome. None of these methods is applicable for clinical practice yet, but their future application is possible after proposed improvements are done and tested on adequate number of samples. It would lead to replacement of invasive methods that constitute a finite risk for fetus by safer noninvasive prenatal diagnosis.

Key words

noninvasive prenatal diagnosis, cell-free fetal DNA, cell-free fetal RNA, trisomy, monogenic diseases, MALDI-TOF mass spectrometry, digital PCR, shotgun sequencing

Zoznam skratiek

AR	allelic ratio (alelický pomer - pomer množstva odlišných alel jedného lokusu)
cffDNA, cffRNA	cell-free fetal DNA, RNA (extracelulárna fetálna DNA, RNA)
dNTP, dGTP	deoxynukleozidtrifosfát, deoxyguanozíntrifosfát
ddT, ddA	dideoxytymín, dideoxyadenín
ddNTP	dideoxynukleozidtrifosfát
ddATP	dideoxyadenozíntrifosfát
ddCTP	dideoxycytidíntrifosfát
ddGTP	dideoxyguanozíntrifosfát
ddTTP	dideoxytymidíntrifosfát
EAR	epigenetic allelic ratio (epigenetický alelický pomer - determinácia AR na základe SNPs za predpokladu epigenetického odlíšenia fetálnej a materskej extracelulárnej DNA)
hME assay	homogenous MassEXTEND assay (typ PEA)
MALDI-TOF MS	matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF hmotnostná spektrometria)
NASS	nucleic acid size selection (selekcia nukleových kyselín podľa veľkosti - metóda na zvýšenie frakcie cffDNA)
NIPD	noninvasive prenatal diagnosis (neinvazívna prenatálna diagnostika)
PEA	primer extension assay (postup, kedy dochádza k predĺžovaniu primeru)
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová reťazová reakcia)
RCD	relative chromosome dosage (relatívna chromozomálna dávka - porovnanie množstva sekvencií DNA študovaného a referenčného chromozómu)
RhD, <i>RHD</i>	Rhesus D faktor, gén (určujúci typ krvnej skupiny)
RMD	relative mutation dosage (relatívna mutačná dávka - pomer množstva normálnej a mutovanej alely jedného lokusu)
RNA-SNP AR	RNA-SNP allelic ratio (RNA-SNP alelický pomer - pomer množstva mRNA transkribovaných z alel jedného lokusu rozlíšených na základe rozdielnych SNPs)
SABER assay	single-allele base extension reaction assay (typ PEA)
SNP	single nucleotide polymorphism (jednonukleotidový polymorfizmus)
SPRT	sequential probability ratio test (test pomeru sekvenčnej pravdepodobnosti)
STD	sequence tag density (hustota sekvenčných značiek)
STR	short tandem repeat (krátka tandemová repetícia)
ZFX, ZFY	zinc-finger protein viazaný na chromozóm X, Y

Obsah

Úvod.....	6
1. Extracelulárne fetálne nukleové kyseliny.....	7
1.1 Základná charakteristika cffDNA.....	7
1.1.1 Množstvo cffDNA v krvnej plazme a sére.....	8
1.1.2 Zdroj cffDNA.....	10
1.2 Základná charakteristika cffRNA.....	11
2. Využitie extracelulárnych fetálnych nukleových kyselín v prenatalnej diagnostike.....	11
2.1 Determinácia pohlavia plodu.....	12
2.2 Determinácia <i>RHD</i> genotypu plodu.....	13
2.3 Detekcia komplikácií v tehotenstve.....	13
2.4 Detekcia monogénne dedičných porúch plodu.....	14
2.5 Detekcia fetálnych chromozomálnych aneuploidií.....	14
3. MALDI-TOF MS a jej využitie v neinvazívnej prenatalnej diagnostike.....	15
3.1 Základná charakteristika metódy MALDI-TOF MS.....	15
3.2 Využitie MALDI-TOF MS na analýzu nukleových kyselín.....	16
3.2.1 Analýza SNPs.....	17
3.3 Neinvazívna prenatalná diagnostika s využitím MALDI-TOF MS.....	20
3.3.1 Diagnostika fetálnych chromozomálnych aneuploidií pomocou merania RNA-SNP AR.....	20
3.3.2 Diagnostika fetálnych chromozomálnych aneuploidií pomocou merania EAR.....	23
3.3.3 Diagnostika fetálnych monogénne dedičných porúch kvalitatívnu analýzou SNPs.....	24
4. Digitálna PCR a jej využitie v neinvazívnej prenatalnej diagnostike.....	25
4.1 Základná charakteristika metódy digitálna PCR.....	25
4.2 Neinvazívna prenatalná diagnostika s využitím digitálnej PCR.....	26
4.2.1 Diagnostika fetálnych chromozomálnych aneuploidií meraním digitálneho RNA-SNP AR.....	27
4.2.2 Diagnostika fetálnych chromozomálnych aneuploidií meraním digitálneho RCD.....	28
4.2.3 Diagnostika fetálnych monogénne dedičných porúch stanovením RMD.....	30
5. „Shotgun“ sekvenovanie a jeho využitie v neinvazívnej prenatalnej diagnostike.....	31
5.1 Základná charakteristika metódy „shotgun“ sekvenovanie	31
5.2 Neinvazívna prenatalná diagnostika s využitím metódy „shotgun“ sekvenovanie.....	32
6. Záver.....	34
Zoznam použitej literatúry.....	36

Úvod

Prenatálna diagnostika je v súčasnosti nevyhnutnou súčasťou lekárskej praxe v oblasti starostlivosti o plod počas tehotenstva. Jej úlohou je detekcia vrodených chorôb ešte pred narodením dieťaťa. Ide o súbor rôznych vyšetrení, ktoré sa rozdeľujú na štandardný skrining absolvovaný každou gravidnou ženou a pravú prenatálnu diagnostiku odporúčanú v prípade zvýšeného rizika abnormalít u plodu. Slúži na definitívne stanovenie diagnózy z fetálneho genetického materiálu. Medzi najčastejšie rizikové situácie sa zaraďuje vek matky 35 a viac rokov v čase koncepcie, genetické abnormality u rodičov alebo predchádzajúcich potomkov, ultrasonograficky zistené morfológické anomálie plodu a suspektné výsledky vyšetrenia biochemických markerov zo séra matky. Na odber genetického materiálu plodu sú v súčasnosti využívané dve hlavné metódy – biopsia choriových klkov a amniocentéza. Obidva tieto postupy sú spojené s jednopercenťným rizikom potratu, preto sa kladie dôraz na vývoj a aplikáciu neinvazívnych metód prenatálnej diagnostiky.

Ako najperspektívnejšia metóda diagnostiky genetických porúch plodu sa javí analýza extracelulárnych fetálnych nukleových kyselín cirkulujúcich v materskom krvnom obeh. Diagnóza plodu by tak mohla byť stanovená z niekoľkých mililitrov periférnej materskej krvi bez akýchkoľvek invazívnych zásahov predstavujúcich riziko pre plod. V súčasnosti sa už v klinickej praxi využíva neinvazívna detekcia pohlavia plodu a jeho *RHD* genotypu, ale rutinná diagnostika fetálnych monogénne dedičných porúch a fetálnych chromozomálnych aneuploidí z extracelulárnych fetálnych nukleových kyselín doteraz nebola možná. Avšak veľký potenciál v tejto oblasti diagnostiky majú tri moderné molekulárno-genetické metódy – MALDI-TOF hmotnostná spektrometria, digitálna PCR a „shotgun“ sekvenovanie, preto som sa rozhodla vo svojej bakalárskej práci popísať a zhodnotiť ich perspektívne využitie.

V prvej kapitole sú popísané základné vlastnosti extracelulárnej fetálnej DNA a RNA v materskej krvi a v druhej kapitole sú zhrnuté možnosti využitia analýzy týchto nukleových kyselín na rôzne diagnostické účely. Nasledujúce tri kapitoly sú zamerané na uvedené metódy, ich základnú charakteristiku a výskumné projekty testujúce ich aplikáciu na diagnostiku chromozomálnych aneuploidí a monogénnych porúch plodu. Priestor je venovaný aj možnostiam vylepšenia týchto metód pre ich uplatnenie v klinickej praxi. Všetky tri uvedené metódy sú zatiaľ v štádiu vývoja a experimentálneho testovania, ale za predpokladu splnenia všetkých podmienok na praktickú aplikáciu by bolo prvýkrát možné rutinne neinvazívne detegovať fetálne genetické abnormality priamo z fetálnych nukleových kyselín prítomných v materskej cirkulácii.

1. Extracelulárne fetálne nukleové kyseliny

Prvá zmienka o prítomnosti extracelulárnych nukleových kyselín v ľudskej krvi pochádza z roku 1948 (Mandel *et Metais*, 1948). Tomuto objavu nebola venovaná takmer žiadna pozornosť až do roku 1989, kedy boli detegované tumor-špecifické sekvencie DNA v krvnej plazme a sére pacientov s rakovinou (Stroun *et al.*, 1989). Ďalšie výskumy počas nasledujúcich rokov potvrdili, že tumor-špecifická DNA sa nachádza v nezanedbateľnom množstve v krvnej plazme pacientov s rôznymi formami rakoviny (Sorenson *et al.*, 1994; Vasioukhin *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1996; Nawroz *et al.*, 1996). Tieto poznatky spolu s podobnosťou medzi rastúcim plodom a nádorom viedli k objavu prítomnosti extracelulárnej fetálnej DNA v krvnej plazme a sére zdravých gravidných žien na základe detekcie prítomnosti fetálnych DNA sekvencií špecifických pre chromozóm Y. Y-špecifická DNA bola detegovaná v krvnej plazme v 80 % a v krvnom sére v 70 % prípadov gravidity s plodom mužského pohlavia. V krvi žien s plodom ženského pohlavia a u žien, ktoré neboli tehotné, tieto sekvencie neboli prítomné (Lo *et al.*, 1997). Neskôr bola v materskej krvi detegovaná aj fetálna mRNA (Poon *et al.*, 2000).

Extracelulárna fetálna DNA (cffDNA – cell-free fetal DNA) a RNA (cffRNA – cell-free fetal RNA) predstavujú v súčasnosti najperspektívnejší zdroj fetálneho genetického materiálu pre neinvazívnu prenatalnú diagnostiku (NIPD). Ďalšie dva možné zdroje sú intaktné fetálne bunky v materskej krvi a fetálne bunky trofoblastu získané zo spodnej časti maternice alebo z cervikálneho hlienu. Fetálne bunky predstavujú len veľmi malú frakciu zo všetkých buniek materskej krvi (približne 1 bunka na 1 ml materskej krvi v prípade gravidity s euploidným plodom) a preto sa ich nedarí izolovať v dostatočnej kvantite pre úspešnú diagnostiku. Ak je plod aneuploidný, množstvo fetálnych buniek môže byť až 6-krát väčšie (Bianchi *et al.*, 1997). Výskum v tejto oblasti však zatiaľ nevedie k vhodnej metóde NIPD s potenciálnym využitím v lekárskej praxi. Je to spôsobené aj tým, že fetálne bunky s výnimkou erytroblastov môžu pretrvávajúť v materskom krvnom obehú aj desiatky rokov po pôrode, čo môže ovplyvniť výsledky diagnózy plodov v nasledujúcich tehotenstvách (Bianchi *et al.*, 1996). Analýza fetálnych trofoblastických buniek z cervikálneho hlienu pre účely NIPD zatiaľ tiež nedosahuje dostatočné výsledky pre uplatnenie v klinickej praxi.

1.1 Základná charakteristika cffDNA

Fetálna extracelulárna DNA je predstavovaná fragmentami DNA nachádzajúcimi sa v materskej periférnej krvi. Nie sú to celé chromozómy, ale naopak najmä krátke fragmenty,

z ktorých 80 % je kratších ako 193 bp (Chan *et al.*, 2004). Najviac fragmentov sa nachádza vo frakcii veľkosti 100 – 300 bp, ojedinele aj vo frakciách 500 – 700 a 700 – 900 bp (Hromadnikova *et al.*, 2006) Je v krvi detegovateľná od 4. týždňa tehotenstva (Illanes *et al.*, 2007).

1.1.1 Množstvo cffDNA v krvnej plazme a sére

Hlavnou výhodou cffDNA pre využitie v NIPD v porovnaní s intaktnými fetálnymi bunkami je väčšie množstvo DNA získané z rovnakého objemu materskej krvi. Na prvé merania množstva cffDNA a celkovej extracelulárnej DNA v materskej krvi bola použitá kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia (PCR – polymerase chain reaction) v reálnom čase (metóda popísaná v Heid *et al.*, 1996). Na zistenie množstva celkovej extracelulárnej DNA (fetálnej aj materskej) bola meraná koncentrácia β -globínových sekvencií (Lo *et al.*, 1998). Vzorky krvi boli odoberané gravidným ženám v 11.-17. týždni a v 37.-43. týždni gravidity. V krvnej plazme všetkých gravidných žien bolo nameraných priemerne 3 466 kópií, resp. genómových ekvivalentov β -globínových sekvencií v 1 ml materinskej krvi (medián 1 594 kópií/ml, rozsah 356 - 31 875 kópií/ml) zatiaľ čo krvné sérum obsahuje väčšie množstvo extracelulárnej DNA – priemerne až 50 651 kópií/ml (medián 34 688 kópií/ml, rozsah 5 813 – 243 750 kópií/ml). V krvnej plazme žien v 11. až 17. týždni gravidity bolo nameraných priemerne 986 kópií/ml a u žien v 37. až 43. týždni gravidity priemerne 5 945 kópií/ml, čo poukazuje na štatisticky významný nárast množstva extracelulárnej DNA v priebehu tehotenstva (všetky uvedené hodnoty podľa Lo *et al.*, 1998).

Na zistenie množstva cffDNA bolo použité meranie koncentrácie sekvencií špecifických pre SRY gén na chromozóme Y v krvi žien s plodom mužského pohlavia (Lo *et al.*, 1998). Všetky vzorky krvnej plazmy a séra žien s plodom mužského pohlavia vykazovali pozitívny signál, zatiaľ čo všetky vzorky krvi žien s plodom ženského pohlavia nevykazovali žiadny signál pre detegované sekvencie. Namerané výsledky sú v tabuľke č.1. Priemerné množstvo sekvencií špecifických pre SRY gén bolo 25,4 kópií/ml v krvnej plazme a 28,7 kópií/ml v sére vo vzorkách odobratých v 11. až 17. týždni gravidity a 292,2 kópií/ml v krvnej plazme a 342,1 v sére vo vzorkách odobratých v 37. až 43. týždni gravidity. Výsledky ukazujú, že rovnako ako množstvo celkovej extracelulárnej DNA, aj množstvo cffDNA štatisticky významne stúpa v priebehu tehotenstva. Priemerná frakčná koncentrácia cffDNA z celkovej extracelulárnej DNA v materskej krvi je v 11.-17. týždni tehotenstva v krvnej

plazme 3,4% a v krvnom sére 0,13%, v 37.-43. týždni v krvnej plazme 6,2% a v sére 1,0% (všetky uvedené hodnoty podľa Lo *et al.*, 1998).

	11.-17. týždeň gravidity		37.-43. týždeň gravidity	
	Plazma (k/ml)	Sérum (k/ml)	Plazma (k/ml)	Sérum (k/ml)
Rozsah	3,3 – 69,4	4,0 – 58,1	76,9 - 769	33,8 - 900
Priemer	25,4	28,7	292,2	342,1
Medián	20,6	19,5	244,0	286,0

Tabuľka č.1 – Množstvo sekvencií špecifických pre *SRY* gén v materskej krvi vyjadrené v počte kópií na 1 ml (k/ml) materskej krvi (podľa Lo *et al.*, 1998)

Iná skupina tiež zaznamenala pozitívnu koreláciu medzi množstvom cffDNA (merané na základe koncentrácie sekvencií génu *SRY*) a dĺžkou tehotenstva v rozmedzí 5. až 41. týždňa. Nimi stanovené hodnoty boli v prvom trimestri 16,36, v druhom trimestri 21,06 a v treťom trimestri 79,40 kópií na 1 ml materskej krvi (Birch *et al.*, 2005).

V novších výskumoch bolo porovnávané množstvo cffDNA zistené kvantitatívnou PCR v reálnom čase a mikrofluidnou digitálnou PCR. V prvom prípade bola meraná koncentrácia sekvencií *β-globínu* a génu *SRY*, v druhom prípade bolo množstvo cffDNA a celkovej extracelulárnej DNA zisťované na základe koncentrácie sekvencií génov *ZFX* (gén pre X-viazaný zinc-finger proteín) a *ZFY* (gén pre Y-viazaný zinc-finger proteín). Merania boli robené v prvom (12.-14. týždeň), druhom (17.-22. týždeň) a treťom trimestri (38.-39. týždeň) tehotenstva. Pomocou mikrofluidnej digitálnej PCR bola priemerná hodnota frakčnej koncentrácie cffDNA v prvom trimestri 9,7 %, v druhom trimestri 9,0 % a v treťom trimestri 20,4 %. Odpovedajúce hodnoty stanovené kvantitatívnou PCR v reálnom čase sú 4,8 % v prvom, 4,1 % v druhom a 7,6 % v treťom trimestri. Výsledky ukazujú, že v každom trimestri je frakčná koncentrácia cffDNA signifikantne vyššia (v prvom trimestri 2,0-krát, v druhom trimestri 2,2-krát a v treťom trimestri 2,7-krát) pri stanovení mikrofluidnou digitálnou PCR ako pri klasickom stanovení kvantitatívnou PCR v reálnom čase. Pri porovnaní týchto dvoch metód pomocou 20 meraní umelo vytvorenej vzorky obsahujúcej 7 % mužskej DNA a 93% ženskej DNA vyšlo, že meranie koncentrácie pomocou mikrofluidnej digitálnej PCR je 3,1-krát presnejšie ako s použitím kvantitatívnej PCR v reálnom čase (Lun *et al.*, 2008a).

Viacero výskumných skupín sa zaoberalo hypotézou zvýšenia hladiny celkovej extracelulárnej DNA aj cffDNA v materskej krvi pri chromozomálnych aneuploidách plodu a komplikáciách pri tehotenstve, ako napríklad preeklampsia alebo predčasný pôrod (tejto

problematike sa venujú kapitoly 2.3 a 2.5). Koncentrácia celkovej extracelulárnej DNA aj cffDNA ale môže výrazne fluktuovať aj v krátkodobom časovom horizonte. U tehotných žien bol rozdiel medzi najnižšou a najvyššou nameranou hodnotou koncentrácie celkovej extracelulárnej DNA počas troch za sebou idúcich dní 1,3-130,5-násobný (priemerne 13,5-násobný). Rozdiel v koncentrácii cffDNA bol v rovnakom časovom úseku priemerne 2,2-násobný, v rozsahu od 1,4-násobku po 4,5-násobok (Zhong *et al.*, 2000a). Výsledky tejto štúdie boli spochybnené analýzou vplyvu rôznych metód spracovania vzorky krvi na výslednú koncentráciu celkovej extracelulárnej DNA. Zhong *et al.* použili metódu, ktorá nie je schopná odstrániť všetky bunky z krvnej plazmy a preto je výsledná fluktuácia nielen výsledkom fluktuácie koncentrácie extracelulárnej DNA, ale aj množstva buniek, ktoré z plazmy neboli odstránené. Fluktuácia koncentrácie cffDNA by ale nemala byť ovplyvnená, pretože ide o DNA takmer výlučne extracelulárnu, fetálnych buniek je v materskej krvi z tohto hľadiska zanedbateľné množstvo (Chiu *et al.*, 2001).

1.1.2 Zdroj cffDNA

Zdrojom väčšiny cffDNA v materskej krvi sú pravdepodobne placentárne bunky trofoblastu podliehajúce apoptóze (Alberry *et al.*, 2007). Pri porovnaní koncentrácie cffDNA pri normálnej a anembryonálnej gravidite, kedy je v maternici prítomný len gestačný vak s placentou bez embrya, nebol zistený štatisticky významný rozdiel. cffDNA preto musí pochádzať z buniek trofoblastu. Ďalšie potenciálne zdroje sú fetálne hematopoetické bunky v materskej krvi a priamy prenos DNA. Pre placentárny pôvod cffDNA svedčí aj prítomnosť cffDNA pred ustanovením fetomaternálnej cirkulácie, čiže skôr, ako sa do materskej krvi dostanú fetálne bunky (Illanes *et al.*, 2007) a jeden prípad plodu s mozaikou 45X/46XY, kedy bunky trofoblastu boli karyotypicky výlučne 45X a v materskom sére nebola detegovaná žiadna extracelulárna DNA špecifická pre chromozóm Y (Flori *et al.*, 2004).

Dve hodiny po pôrode už väčšina žien nemá v krvnej plazme detegovateľné množstvo cffDNA, polovica molekúl je degradovaná za 16,3 minúty. Rýchly obrat a pomerne rýchla degradácia cffDNA po pôrode tiež poukazujú na placentu ako jej pravdepodobný zdroj (Lo *et al.*, 1999a). Fetálnych buniek je v materskej krvi príliš málo na vysvetlenie stanoveného množstva cffDNA a jej rýchleho obratu (Alberry *et al.*, 2007). Taktiež nebola pozorovaná korelácia v koncentrácii fetálnych hematopoetických buniek a cffDNA v materskej krvi, takže tieto bunky sú pravdepodobne len minoritným zdrojom cffDNA (Zhong *et al.*, 2002), rovnako ako priamy prenos cffDNA do materskej krvi. Ten je predpokladaný na základe výskytu

cffDNA aj v iných materských tekutinách ako je krv, napr. v plodovej vode je jej koncentrácia 200-krát vyššia ako v krvnej plazme (Bianchi *et al.*, 2001).

1.2 Základná charakteristika cffRNA

cffRNA je súbor mRNA transkriptov fetálneho pôvodu nachádzajúcich sa v extracelulárnom prostredí. Zdrojom tejto mRNA sú pravdepodobne fetálne hematopoetické bunky (Watananara *et al.*, 2004) a hlavne placenta – v materskej krvi bola zistená prítomnosť fetálnych mRNA transkriptov génov exprimovaných v placente (Ng *et al.*, 2003). V materskej krvnej plazme boli tiež zistené mRNA rôznych génov dominantne alebo výlučne exprimovaných vyvíjajúcim sa embryom, resp. plodom (Maron *et al.*, 2007). Fetálna mRNA môže byť v materskej krvi detegovaná od 4. týždňa tehotenstva s mediánom polčasu života 14 minút. Na rozdiel od cffDNA sa množstvo cffRNA s postupom tehotenstva nezvyšuje, avšak mení sa koncentrácia mRNA transkriptov individuálnych génov (Chiu *et al.*, 2006). Napríklad koncentrácia mRNA humánneho placentárneho laktogénu sa počas tehotenstva zvyšuje (v prvom trimestri bol nameraný medián koncentrácie 2 671 kópií/ml, v druhom trimestri 4 784 kópií/ml a v treťom trimestri 13 869 kópií/ml) a naopak koncentrácia mRNA β -podjednotky humánneho chorionového gonádotropínu sa znižuje (v prvom trimestri bol zistený medián koncentrácie 1 205 kópií/ml, v druhom a treťom trimestri 0 kópií/ml). Fetálna mRNA je v krvnej plazme nezvyčajne stabilná, predpokladá sa, že je stabilizovaná väzbou na membránové nebunkové partikuly a rovnako ako cffDNA je prítomná v apoptotických telieskach placentárneho trofoblastu (Ng *et al.*, 2002).

2. Využitie extracelulárnych fetálnych nukleových kyselín v prenatalnej diagnostike

Na využitie extracelulárnych fetálnych nukleových kyselín na diagnostické účely je často nevyhnutné ich odlíšiť od výrazne prevažujúcich materských extracelulárnych nukleových kyselín. Navyše, plod zdedil polovicu svojho genómu od matky a tieto materské a fetálne fragmenty sú preto sekvenčne identické. Najjednoduchšie je preto detegovať paternálne zdedené úseky DNA, ktoré sa nevyskytujú v genóme matky, napríklad sekvencie špecifické pre chromozóm Y. Na odlíšenie paternálnych autozomálnych sekvencií od maternálnych môžu slúžiť jednonukleotidové polymorfizmy (SNPs), rôzne mutácie a krátke tandemové repetície (STRs).

Na identifikáciu fetálnych nukleových kyselín a ich rozlíšenie od materských fragmentov môžu byť tiež využité epigenetické modifikácie, napríklad rozdiely v metylácii promótorov tých istých génov u matky a plodu. Gény, ktorých produkty sú dôležité pre rast a vývoj plodu môžu byť metylované a tým umlčané u dospelých, zatiaľ čo u plodu (aj v bunkách placenty fetálneho pôvodu) sú aktívne a preto metylované nie sú. Môže to byť aj naopak, kedy materské gény sú hypometylované a fetálne hypermetylované. Takéto gény boli zistené napr. na chromozóme 3 (Chan *et al.*, 2006), 18 (Chim *et al.*, 2005) a 21 (Chim *et al.*, 2008). Ďalšou možnosťou je detekcia mRNA transkribovanej z génov špecificky aktívnych v bunkách placenty alebo plodu, pretože táto mRNA nie je produkovaná materskými bunkami. Príkladom takejto mRNA je *PLAC4* mRNA transkribovaná výlučne v placentárnych bunkách fetálneho pôvodu z génu na chromozóme 21 (Lo *et al.*, 2007a).

Analýza fetálnych extracelulárnych nukleových kyselín môže byť aplikovaná na niekoľko hlavných diagnostických účelov – determinácia pohlavia a Rhesus D (*RHD*) genotypu plodu, detekcia monogénnych porúch, komplikácií v tehotenstve a fetálnych chromozomálnych aneuploidií. Využitie v klinickej praxi zatiaľ nachádza len predikcia fetálneho *RHD* genotypu a pohlavia. Najčastejšie používanou metódou je kvantitatívna PCR v reálnom čase, ktorá je dostačujúca na spomínané dva účely, ale nespĺňa podmienky umožňujúce jej uplatnenie v klinickej diagnostike monogénnych porúch a chromozomálnych aneuploidií. Perspektívne sa javia iné molekulárno-genetické metódy – matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) hmotnostná spektrometria (MS), digitálna PCR a „shotgun“ sekvenovanie. Týmto trom metódam budú venované samostatné kapitoly.

2.1 Determinácia pohlavia plodu

Táto diagnostická aplikácia je pomerne jednoduchá, pretože vyžaduje len detekciu prítomnosti, resp. neprítomnosti, fetálnych sekvencií špecifických pre chromozóm Y. Pokiaľ sú Y-špecifické sekvencie prítomné, plod je mužského pohlavia, ak prítomné nie sú, plod je pohlavia ženského alebo ide o falošne negatívny výsledok spôsobený nedetegovateľnou koncentráciou cffDNA. Tento problém sa dá vyriešiť napríklad súčasným testovaním prítomnosti univerzálneho fetálneho autozomálneho markeru, nachádzajúceho sa v cffDNA plodov mužského aj ženského pohlavia.

Včasná determinácia pohlavia má význam najmä z hľadiska diagnostiky porúch viazaných na chromozóm X, pretože u plodov ženského pohlavia nie je potrebné následne aplikovať invazívne techniky na potvrdenie alebo vylúčenie genetickej poruchy. Ide napríklad

o choroby ako hemofília, Duchennova muskulárna dystrofia a X-viazaná mentálna retardácia. Vďaka skorej detekcii ženského pohlavia plodu v prípade fetálnej kongenitálnej adrenálnej hyperplázie môže byť rýchlo zahájená dexamethazónová terapia s cieľom minimalizovať maskulinizáciu plodu v dôsledku poruchy (zhrnuté vo Wright *et* Burton, 2009).

Metóda determinácie pohlavia je pomerne presná od 7. týždňa, kedy bola dosiahnutá senzitivita 97,2 % a špecificita 100 % (Sekizawa *et al.*, 2001), resp. od 8. týždňa, kedy bola senzitivita aj špecificita 100 % (Stanghellini *et al.*, 2006). Podľa ďalších výsledkov bolo pohlavie správne určené od 7. týždňa tehotenstva u 97,6 % plodov (Chitty *et al.*, 2007) a od 10. týždňa u 100 % plodov (Hromadnikova *et al.*, 2003). Na základe metódy detekcie Y-špecifických sekvencií z vysušenej vzorky materskej krvi (Bischoff *et al.*, 2003) je komerčne prístupný domáci test pohlavia dieťaťa, údajne fungujúci od 5. týždňa tehotenstva (Kaiser, 2005).

2.2 Determinácia *RHD* genotypu plodu

Determinácia RhD genotypu plodu je žiadaná ako indikácia pre podávanie anti-D protilátok aloimunizovaným matkám s RhD pozitívnym plodom a na minimalizáciu zbytočného podávania anti-D protilátok RhD negatívnym ženám s RhD negatívnym plodom, ktorý vďaka neprítomnosti RhD antigénu nie je v riziku hemolytickej choroby novorodencov. Určovanie fetálneho *RHD* genotypu z materskej plazmy alebo séra prebieha pomocou detekcie prítomnosti sekvencií *RHD* génu, ktorý je kompletne deletovaný u väčšiny RhD negatívnych matiek kaukazského pôvodu. Touto metódou bol *RHD* genotyp už v 10. týždni tehotenstva správne určený u 99,8 % plodov, zvyšných 0,2 % je predstavuje 1 falošne pozitívny výsledok v prípade príjemcu transplantovaného orgánu (Minon *et al.*, 2008). 100% úspešnosť bola dosiahnutá pri stanovovaní *RHD* genotypu plodu v 11. až 37., resp. 40. týždni tehotenstva (Hromadnikova *et al.*, 2005a,b). Problémom je, že u iných populácií ako kaukazských je negatívny fenotyp asociovaný s rôznymi menšími mutáciami *RHD* génu a preto sú aj u RhD negatívnej matky prítomné materské RhD sekvencie. Tento problém je čiastočne riešený testovaním pre mutovanú formu *RHD* génu (*RHD*Ψ pseudogén), ktorá je príčinou RhD negativity u 66% čiernych Afričanov (Finning *et al.*, 2008).

2.3 Detekcia komplikácií v tehotenstve

V prípade viacerých komplikácií v tehotenstve, často spojených s abnormálnym rastom alebo vývojom placenty, bola pozorovaná zvýšená koncentrácia cfDNA v materskej

krvi, prípadne zvýšená hladina celkovej (materskej aj fetálnej) extracelulárnej DNA. U žien s vyvinutými symptómami preeklampsie bolo pozorované 5-násobné zvýšenie koncentrácie cffDNA (Lo *et al.*, 1999b), zvýšenie koncentrácie je dokonca možné detegovať ešte pred nástupom symptómov (Levine *et al.*, 2004). Ďalšie problémy pravdepodobne asociované s nárastom cffDNA sú predčasný pôrod, hyperemesis gravidarum, invazívna placentácia, polyhydramnios a intrauterinná rastová retardácia plodu (zhrnuté vo Wright *et al.*, 2009).

2.4 Detekcia monogénne dedičných porúch plodu

Diagnostika monogénne dedičných porúch plodu je obmedzená na detekciu paternálne zdedených mutácií alebo mutácií *de novo* pomocou PCR v reálnom čase. U dominantne dedičných chorôb sú tieto mutované alely príčinou vzniku poruchy. Úspešne sa zatiaľ takto podarilo detegovať, prípadne vylúčiť Huntingtonovu choreu (Gonzalez-Gonzalez *et al.*, 2003), achondropláziu (Li *et al.*, 2004) a myotonickú dystrofiu (Amicucci *et al.*, 2000). U recesívne dedičných chorôb má diagnostika z cffDNA význam pre detekciu neprítomnosti paternálne zdedenej recesívnej mutovanej alely (a preto bude plod zdravý) alebo pre detekciu prítomnosti takejto alely v prípade, že matka je nositeľkou inej mutovanej recesívnej alely toho istého génu. Takto boli diagnostikované cystická fibróza (Gonzalez-Gonzalez *et al.*, 2002), β -thalassémia (Chiu *et al.*, 2002a) a kongenitálna adrenálna hyperplázia (Chiu *et al.*, 2002b). Zatiaľ je ale detekcia dominantne aj recesívne dedičných monogénnych porúch na úrovni ojedinelých prípadov a nesmeruje k využitiu v klinickej praxi. Určitú perspektívu ale ponúkajú metódy popísané v kapitolách 3 a 4.

2.5 Detekcia fetálnych chromozomálnych aneuploidii

Prvým spôsobom detekcie fetálnych chromozomálnych aneuploidii z cffDNA sa zdalo byť meranie koncentrácie cffDNA v materskej plazme alebo sére. Viacero skupín totiž detegovalo približne 2-násobné až 3-násobné štatisticky významné zvýšenie množstva cffDNA oproti kontrolám s euploidnými plodmi v prípade trizomií 21. chromozómu (Lo *et al.*, 1999c, Zhong *et al.*, 2000b). Iné skupiny však žiadny nárast koncentrácie cffDNA nepozorovali (Ohashi *et al.*, 2001; Hromadnikova *et al.*, 2002; Spencer *et al.*, 2003). Pri tehotenstve s plodom s trizomiou 13. chromozómu bola tiež detegovaná zvýšená koncentrácia cffDNA (Watanagana *et al.*, 2003), v prípade plodov s trizomiou 18. chromozómu nebol zistený štatisticky významný nárast množstva cffDNA (Zhong *et al.*, 2000b; Ohashi *et al.*, 2001; Watanagana *et al.*, 2003). Veľká štúdia zaoberajúca sa možným zvýšením koncentrácie

cffDNA v krvi matiek s plodmi s trizomiou 13., 18. a 21. chromozómu, s Turnerovým syndrómom a s triploidnými plodmi nezistila tiež žiadny štatisticky významný rozdiel pri ani jednej chromozomálnej abnormalite oproti kontrolám s euploidnými fetusmi (Gerovassili *et al.*, 2007).

Namiesto merania koncentrácie cffDNA by preto bolo vhodnejšie detegovať a kvantifikovať markery špecifické pre pozorovaný chromozóm za predpokladu odlišenia fetálnych a materských extracelulárnych nukleových kyselín, napr. na základe odlišnej metylácie, prípadne aj bez tohto rozlíšenia. Je možné porovnať množstvo sekvencií DNA daného chromozómu so sekvenciami z iného, referenčného chromozómu (tzv. RCD metóda – meranie relatívnej chromozomálnej dávky). Ďalšou možnosťou je porovnať pomer maternálne a paternálne zdedených alel (vo forme DNA sekvencií alebo mRNA transkriptov) toho istého génu nachádzajúceho sa na danom chromozóme, odlišujúcich sa napr. v SNPs (tzv. AR metóda – meranie alelického pomeru). Na tieto postupy sú zamerané molekulárno-genetické metódy, ktorým budú venované nasledujúce kapitoly.

3. MALDI-TOF MS a jej využitie v neinvazívnej prenatálnej diagnostike

3.1 Základná charakteristika metódy MALDI-TOF MS

Hmotnostná spektrometria (MS) je analytická technika slúžiaca na determináciu chemickej štruktúry zlúčenín. Celý proces sa rozdeľuje na tri hlavné časti. Najprv je vzorka ionizovaná - molekuly sú rozdelené na jednotlivé ióny. Generované ióny sú v hmotnostnom analyzéri roztriedené pôsobením elektrického, resp. elektromagnetického poľa podľa svojho pomeru hmotnosti k náboju (tento pomer sa označuje ako m/z , pričom m vyjadruje hmotnosť a z náboj). Detektor následne zaznamenáva relatívne množstvo jednotlivých typov iónov.

Základy matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) MS boli položené v roku 1988 (Karas *et Hillenkamp*, 1988; Tanaka *et al.*, 1988). Môže slúžiť na analýzu rôznych biomolekúl a organických molekúl ako napr. peptidy, proteíny, glykoproteíny, oligosacharidy, oligonukleotidy, lipidy, molekulárne agregáty viazané nekovalentnými interakciami, syntetické polyméry a komplexy biomolekúl s iónmi kovov.

MALDI je jednou z jemných ionizačných techník vhodných na ionizáciu molekúl rozpadajúcich sa na fragmenty pri použití iných metód. Molekuly analyzovanej vzorky v koncentrácii 10^{-4} - 10^{-7} M sú zmiešané s molekulami matrix s mnohonásobne vyššou koncentráciou 10^{-1} M. Po evaporácii rozpúšťadla molekuly matrix a vzorky spolu tzv. kokryštalizujú, pričom molekuly vzorky sú rozptýlené medzi kryštálmi matrix, ktoré tak

zabraňujú interakciám medzi jednotlivými molekulami analyzovanej vzorky. Matrix je tvorená molekulami s nízkou molekulárnou hmotnosťou, na analýzu peptidov a proteínov sa používa napr. 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (Strupat *et al.*, 1991), 3,5-dimetoxy-4-hydroxycinnamová kyselina (Beavis *et al.*, 1989) a α -cyano-4-hydroxycinnamová kyselina (Beavis *et al.*, 1991), na analýzu oligonukleotidov najčastejšie 3-hydroxypikolinová kyselina (Wu *et al.*, 1993) a zmes 2,3,4- a 2,4,6-trihydroxyacetofenónu s amónium citrátom (Zhu *et al.*, 1996).

Na kokryštály matrix a vzorky pôsobí pulz laserového lúču trvajúci niekoľko nanosekúnd. Energia lúču je absorbovaná molekulami matrix a spôsobí dekompozíciu kryštálov. Molekuly sa dostávajú do stavu vibračnej oscilácie a následne tak ionizujú molekuly vzorky. Z neutrálnych molekúl vznikajú zvyčajne jednomocné ióny. Presný priebeh tohto procesu doteraz nie je známy. Často sú používané ultrafialové lasery s vlnovou dĺžkou 266 nm, 337 nm alebo 355 nm, prípadne infračervené lasery.

Ióny sú následne urýchľované pomocou elektrického poľa, pričom ióny s rovnakým elektrickým potenciálom získajú rovnakú kinetickú energiu. Rýchlosť iónov závisí od ich pomeru hmotnosti k náboju (m/z) – teoreticky by všetky ióny s rovnakým pomerom hmotnosti k náboju mali mať rovnakú rýchlosť, je zrejmé, že ťažšie ióny budú pomalšie. Detektor meria čas, za ktorý častica (resp. súbor rovnakých častíc) prejde určitú vzdialenosť (meria sa tzv. time-of-flight, TOF) a na základe toho je stanovený m/z danej častice. Zloženie molekuly analyzovanej vzorky je vyhodnotené vo forme hmotnostného spektra, ktoré zobrazuje relatívne množstvo častíc (intenzitu signálu) s detegovaným m/z v podobe píku (spracované podľa Hillenkamp *et al.*, 1991; Gross *et al.*, 1998; Jurinke *et al.*, 2004).

3.2 Využitie MALDI-TOF MS na analýzu nukleových kyselín

Analýza nukleových kyselín pomocou metódy MALDI-TOF MS sa v porovnaní s analýzou peptidov javila problematickejšia kvôli negatívne nabitej cukor-fosfátovej kostre viažúcej na seba katióny solí a depurinácii počas ionizačného procesu. S vyriešením týchto komplikácií začala MALDI-TOF MS predstavovať perspektívnu metódu analýzy DNA a RNA. Výhodou MALDI-TOF MS je rýchlosť analýzy jednotlivých vzoriek (približne 10 sekúnd) spojená s možnosťou multiplexovej analýzy a automatizácie všetkých krokov a tiež fakt, že táto metóda pracuje priamo s m/z jednotlivých produktov a nie s druhotným signálom fluorescenčných alebo rádioaktívnych značiek na týchto produktoch (zhrnuté v Jurinke *et al.*, 2004). Nevýhodou je, že takto nemôžu byť analyzované ľubovoľne dlhé úseky nukleových

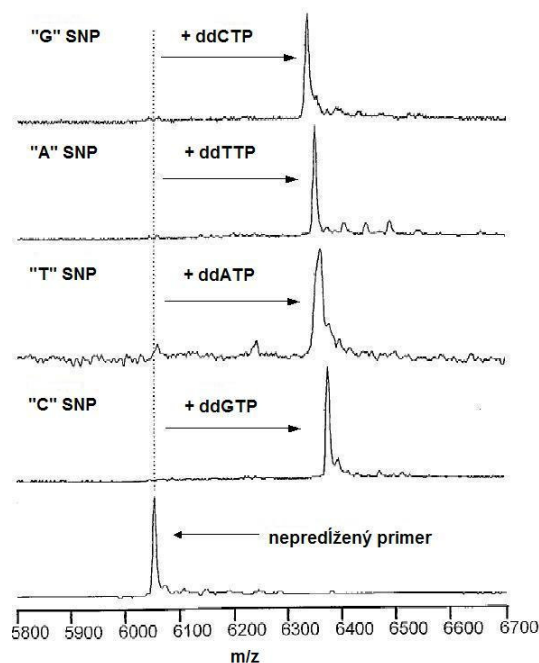
kyselín – horná hranica je pre DNA približne 90 kDa, resp. približne 300 nukleotidov (Ross *et al.*, 1997) a pre RNA 150 kDa, resp. približne 460 nukleotidov (Kirpekar *et al.*, 1994).

MALDI-TOF MS môže byť využitá na kvalitatívnu aj kvantitatívnu analýzu nukleových kyselín. Jej uplatnenie zahŕňa analýzu jednonukleotidových polymorfizmov (SNPs) a krátkych tandemových repetícií (STRs) z hľadiska detekcie prítomnosti určitého SNP alebo STR alebo na determináciu frekvencie alel, kedy sa alely líšia v SNP alebo STR. Kvalitatívna analýza SNPs a STRs má význam v detekcii genetických porúch a predispozícií na tieto poruchy a tiež vo forenznej genetike na identifikáciu osôb a analýzu príbuzenských vzťahov. Kvantitatívna analýza môže determinovať frekvenciu alel v populácii a tiež má svoje potenciálne využitie v neinvazívnej prenatalnej diagnostike, ako bude popísané ďalej. MALDI-TOF MS má svoje uplatnenie aj v sekvenovaní a v analýze génovej expresie (zhrnuté v Jurinke *et al.*, 2004).

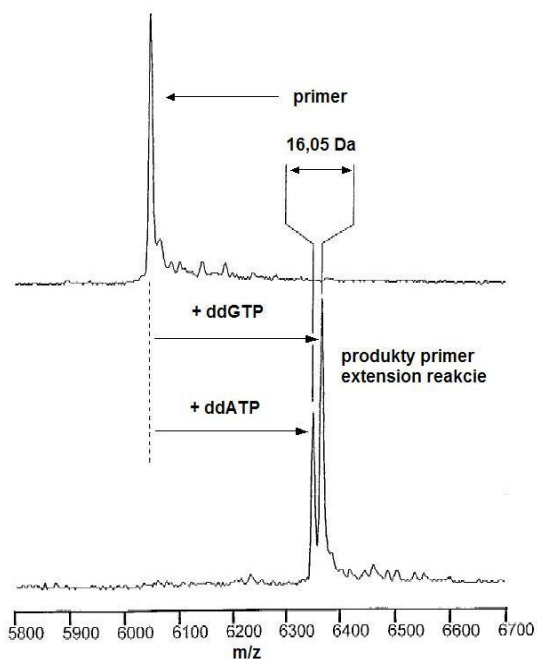
3.2.1 Analýza SNPs

Jednonukleotidové polymorfizmy (SNPs) sú bialelické varianty v populácii odlišujúce sa v jednom nukleotide, pričom frekvencia každej alely je aspoň 1 %. Na ich analýzu pomocou MALDI-TOF MS sa využívajú postupy založené na predlžovaní primeru (PEA). Analyzované sekvencie sú amplifikované pomocou PCR a voľné nukleotidy sú inaktivované pôsobením alkalickéj fosfatázy. Následne je k PCR produktom pridaný primer, ktorý je komplementárny k úseku nukleovej kyseliny upstream hneď vedľa miesta SNP, enzým termosekvenáza, zmes deoxyribonukleotidu (dNTP) s dideoxyribonukleotidmi (ddNTPs), prípadne samé ddNTPs, a ďalšie látky potrebné pre úspešný priebeh reakcie. Pôvodný produkt PCR slúži ako templát pre reakciu, počas ktorej je predlžovaný primer na svojom 3` konci. V prítomnosti jedného typu alely tvorí jeden produkt, v prítomnosti oboch foriem dva produkty odlišujúce sa v m/z . To je potom analyzované prostredníctvom MALDI-TOF MS.

Jedným typom PEA je PinPoint assay, nazývaný aj single base extension assay (Haff *et al.*, 1997). K PCR produktom sú pridané len ddNTPs a primer je preto predĺžený len o jeden určitý ddNTP, ktorý je komplementárny k danej variante SNP. Varianty SNPs sú rozlíšené na základe rozdielov v m/z jednotlivých ddNTPs (obr. 1) a v prípade vzorky s viacerými alelami je možné v hmotnostnom spektre rozlíšiť jednotlivé čiastočne oddelené píky (obr. 2), pričom každý predstavuje jednu variantu SNPs. Aj najmenší rozdiel predstavujúci 9 Da medzi dideoxytymínom (ddT) a dideoxyadenínom (ddA) je detegovateľný.



Obr. 1. Znáozornenie princípu metódy PinPoint assay – v závislosti na SNP je k primeru pridaný príslušný ddNTP, pričom cieľové produkty sú rozlíšené podľa svojho pomeru hmotnosti k náboju (m/z) (upravené podľa Haff *et Smirnov*, 1997)

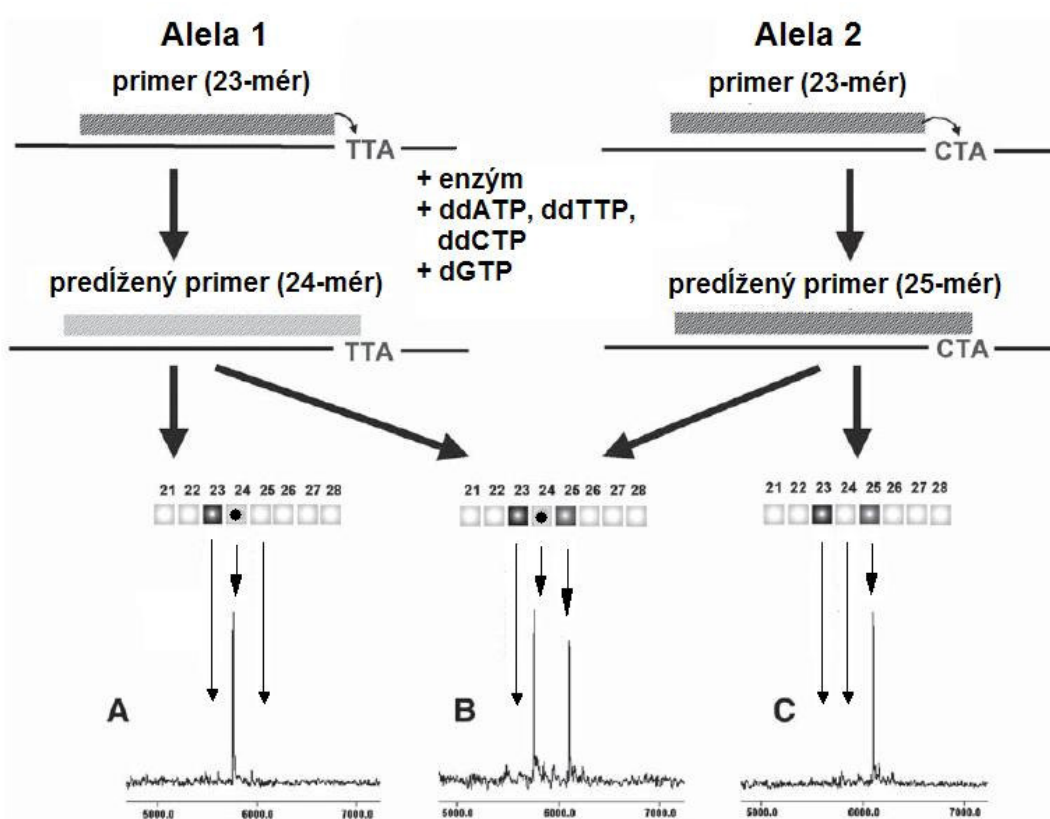


Obr. 2. PinPoint assay vo vzorke s dvomi rôznymi alelami líšiacimi sa v SNP – v hmotnostnom spektre sa dajú rozlíšiť dva píky (upravené podľa Haff *et Smirnov*, 1997)

Homogenous MassEXTEND (hME) assay (Sequenom) je ďalšou metódou na detekciu SNPs (Lo *et al.*, 2007a). Na rozdiel od PinPoint assay je k produktom PCR pridaná zmes jedného dNTP a troch ddNTPs, pričom dNTP obsahuje bázu, ktorú neobsahuje ani jeden z ddNTPs. Varianty alel s rozdielnymi SNPs sú rozlíšené podľa toho, že u jednej formy alely sa komplementárne k danému SNP za primerom pripojí ddNTP a v prípade druhej formy alely sa komplementárne k SNP pripojí dNTP a až za ním ddNTP. Predĺžením primeru v prítomnosti dvoch alelických variant teda vznikajú dva rôzne produkty líšiace sa v počte nukleotidov a preto majú v hmotnostnom spektre pomerne dobre rozlíšiteľnú hodnotu m/z a javia sa ako dva samostatné píky. Porovnaním intenzity píkov (hodnota na osi y hmotnostného spektra) je možné stanoviť pomer zastúpenia daných dvoch alel (tzv. alelický pomer, AR). Schematické vyjadrenie metódy je na obr. 3 a využitie merania AR pomocou tohto postupu na diagnostiku aneuploidií je na obr. 6.

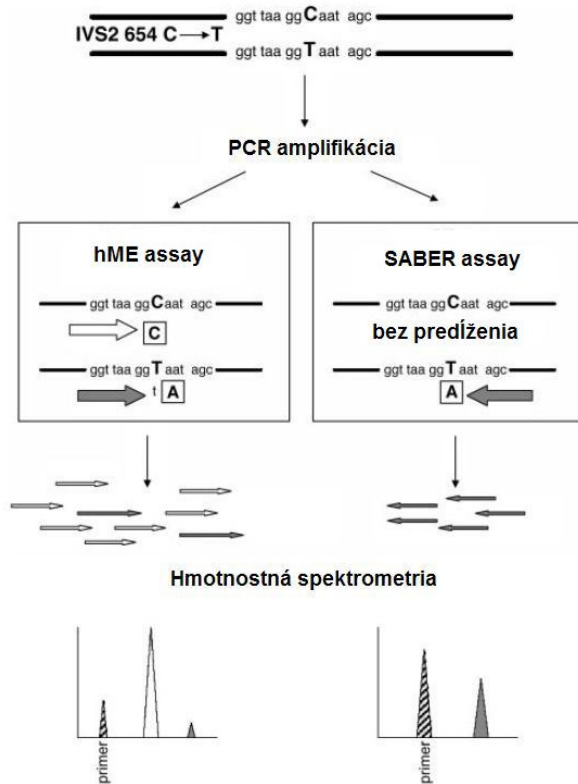
Na detekciu prítomnosti minoritne zastúpenej alely na pozadí majoritnej alely odlišujúcej sa od minoritnej v SNP alebo v bodovej mutácii je vhodná Single-allele base extension reaction (SABER) assay (Ding *et al.*, 2004). Na predĺženie primeru je pridaný len jeden ddNTP komplementárny k SNP alebo k mutovanému nukleotidu minoritnej alely a

preto v hmotnostnom spektre preto vytvára signál len minoritná alela. Primer pripojený k majoritnej alele nie je predĺžený, pretože sa tam nenachádza komplementárny ddNTP, resp. dNTP. Pri použití hME assay by sa v hmotnostnom spektre vytvoril veľký pík predstavujúci majoritne zastúpenú alelu a pík minoritnej alely s malou intenzitou by nemusel byť dostatočne zreteľný. Takto sa vytvorí len pík znázorňujúci minoritnú alelu, ktorý má väčšiu intenzitu ako pík minoritnej alely v hmotnostnom spektre pri hME assay, a je preto ľahšie detegovateľný. Na obr. 4 je schematicky znázornené porovnanie hME assay a SABER assay na detekciu prítomnosti mutovanej alely spôsobujúcej β -thalassémiu na pozadí nemutovanej alely.



Obr. 3. Schematické znázornenie metódy Homogenous MassEXTEND assay (Sequenom). V prípade alely 1 je k primeru tvorenému 23 nukleotidmi pridaný komplementárny ddATP a výsledný produkt má preto 24 nukleotidov. V prípade alely 2 je k primeru pridaný najprv komplementárny dGTP a následne tiež komplementárny ddATP, výsledný produkt je dlhý 25 nukleotidov. Pri homozygotnej vzorke (A,C) je v hmotnostnom spektre jeden pík s príslušnou mass, v heterozygotnej vzorke (B) dva píky predstavujúce obidve alelické varianty (upravené podľa Jurinke *et al.*, 2004).

Existujú aj ďalšie metódy detekcie SNP s využitím MALDI-TOF MS, napríklad GOOD assay alebo Invader assay, ale tie nie sú významné z hľadiska uplatnenia v neinvazívnej prenatalnej diagnostike.



Obr. 4. Schematické znázornenie porovnania hME a SABER assay na detekciu minoritne zastúpenej mutovanej alely s mutáciou IVS2 654 C→T spôsobujúcej β-thalassémiu na pozadí majoritne zastúpenej nemutovanej alely. Pri použití hME assay sa tvoria dva produkty, pričom produkt nemutovanej alely (prázdne šípky a prázdny pík) je vo veľkom nadbytku oproti produktu mutovanej alely (plné šípky a plný pík). Pri použití SABER assay sa vytvára len produkt mutovanej alely, ktorý môže byť dobre rozlíšiteľný na hmotnostnom spektre. Pásikavý pík na hmotnostnom spektre predstavuje nepredĺžený primer (upravené podľa Ding *et al.*, 2004)

3.3 Neinvazívna prenatalná diagnostika s využitím MALDI-TOF MS

Postupy využívajúce MALDI-TOF MS majú potenciálne uplatnenie v neinvazívnej prenatalnej diagnostike založenej na analýze extracelulárnych fetálnych nukleových kyselín v materskej krvnej plazme a sére. Nutným predpokladom je odlíšenie materských a fetálnych extracelulárnych nukleových kyselín. Boli vyvinuté postupy umožňujúce detekciu fetálnych chromozomálnych aneuploidíí na základe merania alelického pomeru (AR) fetálnych mRNA produkovaných bunkami placenty (RNA-SNP AR metóda). Perspektívne sa javí aj determinácia AR na základe SNPs nachádzajúcich sa na sledovanom chromozóme za predpokladu epigenetického odlíšenia fetálnej a materskej extracelulárnej DNA (EAR metóda). Detekcia monogénne dedičných porúch bola úspešne použitá na malé množstvo pacientov v prípade achondroplázie a β-thalassémie.

3.3.1 Diagnostika fetálnych chromozomálnych aneuploidíí pomocou merania RNA-SNP AR

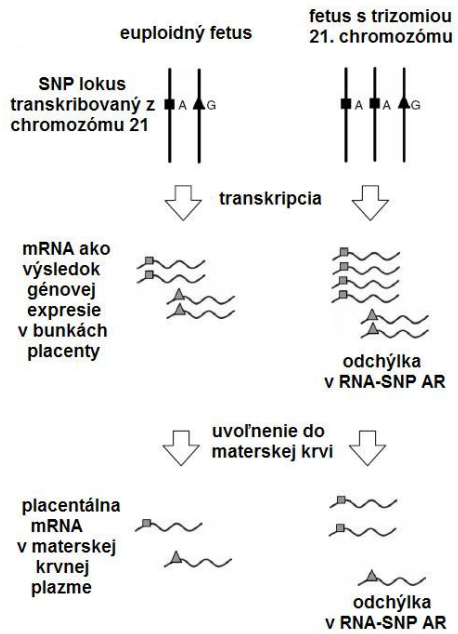
RNA-SNP AR (RNA-SNP alelický pomer) je pomer množstva mRNA z dvoch rozdielnych alel toho istého génu líšiacich sa v SNP u jedinca heterozygotného pre daný gén. Táto metóda bola s využitím hME assay aplikovaná na diagnostiku fetálnej trizómie 21. chromozómu (Downov syndróm) skupinou Lo *et al.* (2007a). Odlíšenie materskej a fetálnej

RNA je dosiahnuté použitím mRNA génu *PLAC4*, ktorý, ako dokázala spomínaná skupina, je exprimovaný výhradne v bunkách placenty odvodených z fetálneho trofoblastu, a preto všetka extracelulárna *PLAC4* mRNA v krvi matky je fetálneho pôvodu. V prípadoch, kedy bol plod homozygotný pre daný gén a matka heterozygotná, v materskej krvnej plazme ani v placentárnych tkanivách nebola detegovaná mRNA z alely, ktorá bola prítomná len u matky. Výhoda použitia mRNA oproti DNA je v prirodzenej amplifikácii signálu, pretože z jedného génu je transkribované veľké množstvo molekúl mRNA.

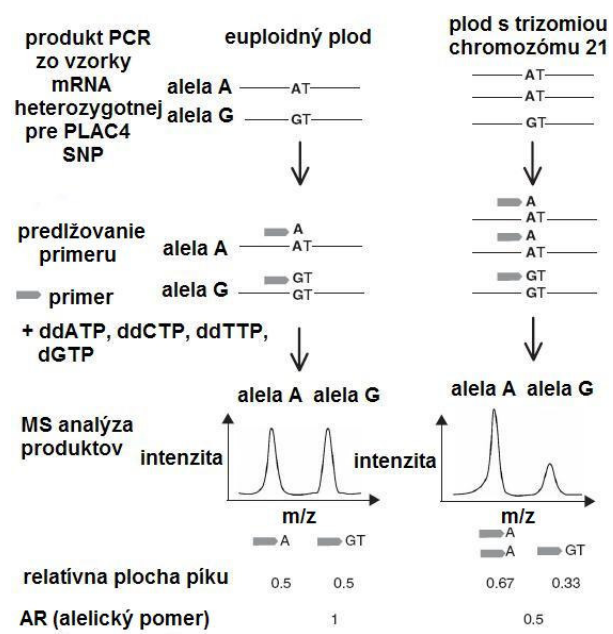
Gén *PLAC4* sa nachádza na chromozóme 21 a preto meranie AR mRNA transkribovanej z tohto génu môže byť použité na detekciu Downovho syndrómu za predpokladu, že pomer alelických variant v genóme odráža pomer mRNA transkribovaných z týchto alel v krvnej plazme (obr. 5). Tento predpoklad sa ukázal ako správny, pretože hmotnostné spektrá vytvorené analýzou placentárnej *PLAC4* DNA a placentárnej *PLAC4* mRNA si odpovedali a *PLAC4* RNA-SNP AR z placenty a materskej plazmy spolu štatisticky významne korelovali. Teoretický mRNA AR by mal byť pre euploidné fetusy 1:1, čiže pomer intenzity produktu mRNA jednej alely s druhej alely v hmotnostnom spektre by mal byť 1. Pre plody s Downovým syndrómom by pomer alel mal byť 1:2, resp. 2:1, takže intenzita produktu jednej mRNA vydelená intenzitou produktu druhej mRNA by mala byť 0,5, resp. 2 (obr. 6).

V skutočnosti to ale tak nie je, pretože intenzita produktu reakcie predlžovania primeru u jednej z mRNA je atenuovaná, čiže ani u euploidných vzoriek nie je AR rovný 1. Preto bol podľa euploidných vzoriek vypracovaný referenčný interval (priemer \pm 1,96 x smerodajná odchýlka) hodnoty RNA-SNP AR vypočítanej ako intenzita, príp. plocha píku alely s vyššou hodnotou *m/z* (alela G – pretože v mieste SNP obsahuje nukleotid s guanínom) vydelená intenzitou, príp. plochou píku alely s nižšou hodnotou *m/z* (alela A – v mieste SNP obsahuje nukleotid s adenínom). Teoreticky by AR vzoriek krvnej plazmy matiek s euploidným fetusom mali spadať do tohto intervalu, zatiaľ čo hodnoty vzoriek matiek s aneuploidným fetusom by mali byť pod spodnou alebo nad vrchnou hranicou intervalu.

Referenčný interval RNA-SNP AR bol skupinou Lo *et al.* (2007a) stanovený na základe 57 vzoriek krvnej plazmy žien s euploidným plodom v 11. až 14., priemerne 13. týždni tehotenstva na 0,461 až 0,841. Dve euploidné vzorky nespádali do tohto intervalu. Z 10 vzoriek krvnej plazmy žien s plodom s Downovým syndrómom v 12. až 20., priemerne 15. týždni tehotenstva všetky okrem jednej mali AR mimo referenčný interval. Bola tak dosiahnutá senzitivita metódy 90 % a špecificita 96,5 % s použitím len jedného markeru, čo sú výsledky porovnateľné s inými skriningovými metódami na detekciu trizomií.



Obr.5. Schematické znázornenie predpokladu pre úspešnú aplikáciu RNA-SNP AR postupu pomocou relatívnej kvantifikácie mRNA transkribovaných z dvoch alelických foriem génu *PLAC4* na chromozóme 21. Pomer alel v placentárnej DNA odpovedá pomeru mRNA v krvnej plazme (upravené podľa Lo et al., 2007a).



Obr.6. Schematické znázornenie postupu determinácie RNA-SNP AR u euploidných a aneuploidných fetusov. Zvýšená koncentrácia mRNA jednej alely v porovnaní s druhou u aneuploidných plodov je viditeľná na hmotnostnom spektre vo forme zvýšenej intenzity (upravené podľa Lo et al., 2007a).

Pri porovnaní *PLAC4* RNA-SNP AR vo vzorkách krvnej plazmy žien s euploidným fetusom v prvom, druhom a treťom trimestri nebol zistený signifikantný rozdiel medzi jednotlivými trimestrami, takže táto analýza by nemala byť ovplyvnená dĺžkou tehotenstva. Zistená koncentrácia *PLAC4* mRNA je vo všetkých troch trimestroch postačujúca pre analýzu, avšak príliš nízka koncentrácia môže viesť k falošne pozitívnym alebo falošne negatívnym výsledkom (Lo et al., 2007a)

Nevýhodou tejto metódy je jej obmedzenie pre heterozygotné plody - v študovanom SNP génu *PLAC4* je pomer heterozygotov 45 %. Riešením by bolo testovanie pre ďalšie SNP v transkribovanej časti génu *PLAC4* alebo v ďalších génoch na 21. chromozóme (*COL6A1*, *COL6A2*). Autori (Lo et al., 2007a) uvádzajú, že testovaním 7 SNPs v týchto troch génoch by sa uplatnenie metódy rozšírilo na 90 % čínskej a 95 % kaukazskej populácie. Ďalší autori tiež demonštrovali prítomnosť SNPs na chromozóme 21 vhodných na detekciu Downovho syndrómu pomocou RNA-SNP allelic ratio (napr. Go et al., 2007) a dosiahli senzitivitu a špecificitu diagnostiky Downovho syndrómu 100 % v 8. týždni tehotenstva s uplatnením pre 93 % populácie USA (Yang et al., 2008). Sequenom, Inc. plánuje podľa informácií z tlačovej správy (Sequenom, 2008) v prvej polovici roku 2009 zaviesť detekciu trizómie 21.

chromozómu pomocou tejto metódy s využitím viacerých SNP do klinickej praxe v Spojených štátoch amerických. Detekcia vhodných SNP markerov na mRNA transkribovaných z génov na chromozómoch 13 a 18 exprimovaných výlučne v bunkách placenty fetálneho pôvodu umožnila potenciálne uplatnenie RNA-SNP AR metódy na testovanie trizomií týchto chromozómov (Tang *et al.*, 2008).

3.3.2 Diagnostika fetálnych chromozomálnych aneuploidíí pomocou merania EAR

EAR metóda (meranie epigenetického alelického pomeru) je založená na rovnakom princípe ako RNA-SNP AR metóda, meria sa tiež pomer koncentrácií dvoch alel u heterozygotického jedinca pre daný gén líšiacich sa v SNP, s tým rozdielom, že pomer je determinovaný z DNA a nie z RNA. Fetálna DNA je od materskej odlišená na základe epigenetickej informácie, konkrétne podľa odlišnej metylácie. Ako takýto univerzálny fetálny marker môže slúžiť napr. *maspin* (*SERPINB5*) gén (Chim *et al.*, 2005). V materskej krvi cirkulujú fragmenty placentárnej DNA fetálneho pôvodu s nemetylovaným maspínovým promótorom (*U-maspin*), ktoré sú od metylovanej materskej DNA odlišené pomocou metódy bisulfátová konverzia s následnou metylačno-špecifickou PCR. Keďže sa *maspin* gén nachádza na chromozóme 18, determinácia EAR alelických variácií tohto génu má potenciálne využitie v detekcii fetálnej trizómie 18. chromozómu, nazývanej Edwardsov syndróm (Tong *et al.*, 2006).

Autori stanovili EAR produktov po predĺžení primeru pomocou hME assay u bialelických vzoriek čistej placentárnej DNA, zmesi placentárnej DNA (5 %) a DNA materských krvných buniek (95 %) a materskej krvnej plazmy obsahujúcej materskú aj fetálnu extracelulárnu DNA a zistené EAR porovnali medzi vzorkami s euploidnou a trizomickou DNA. Detegované SNP bola variácia adenínu (alela A) a cytozínu (alela C) v 156. nukleotide *maspin* génu, v prípade alely s adenínom bol k primeru pridaný ddTTP a v prípade alely s cytozínom dGTP a ddCTP a tieto produkty boli analyzované MALDI-TOF MS. Na základe EAR euploidných vzoriek bol stanovený referenčný interval ako pri metóde merajúcej RNA-SNP AR a bolo testované, či EAR euploidných vzoriek spadajú do intervalu a či EAR aneuploidných vzoriek sú mimo stanovený interval.

Pri analýze zmesi placentárnej DNA (5 %), ktorá mohla byť euploidná alebo aneuploidná, a euploidnej DNA materských krvných buniek (95 %) bola dosiahnutá senzitivita 100 %. Pri analýze vzoriek materskej krvnej plazmy dosiahnutá senzitivita aj špecificita detekcie trizómie 100 %, avšak tieto výsledky boli získané len na veľmi malom

množstve vzoriek. Referenčný interval stanovený na základe EAR 8 euploidných vzoriek bol veľmi široký (0,330-3,044), hodnoty EAR všetkých vzoriek boli z tohto intervalu. EAR obidvoch aneuploidných vzoriek ležala mimo stanoveného intervalu (3,412 a 0,255). Avšak na potvrdenie senzitivity a špecificity tejto metódy na diagnostiku Edwardsovho syndrómu by bolo nutné metódu testovať na väčšom počte vzoriek. Na to by pravdepodobne bolo potrebné detegovať iné SNP markery na chromozóme 18 s odlišnou metyláciou v materských krvných bunkách a placentе, pretože aj pri tejto štúdií bolo malé množstvo vzoriek zapríčinené nízkou frekvenciou výskytu alely C.

Obdobné epigenetické markery boli detegované aj na chromozóme 21 (Chim *et al.*, 2008), čím sa otvára možnosť využitia determinácie EAR na diagnostiku Downovho syndrómu. Ale nevýhodou merania EAR oproti RNA-SNP AR je potreba väčšieho množstva DNA a teda aj väčšieho objemu krvi, pretože počas metódy bisulfátovej konverzie využívanej pri stanovení EAR je degradovaných 84-96 % hypometylovanej DNA (Grunau *et al.*, 2001). V prípade *maspin* génu je takto degradovaná práve fetálna DNA. Hypermetylovaná DNA degradovaná nie je, preto sa výskum v tejto oblasti sústreďuje na hľadanie hypermetylovaných fetálnych markerov. Východiskom môže byť tiež použitie inej metódy na odlišenie rozdielnej metylácie materskej a fetálnej DNA (Tong *et al.*, 2007). Tiež nie je možné využívať prirodzenú amplifikáciu signálu transkribovaním veľkého množstva mRNA z jedného DNA lokusu.

3.3.3 Diagnostika fetálnych monogénne dedičných porúch kvalitatívnou analýzou SNPs

Diagnostika fetálnych monogénne dedičných porúch na základe detekcie prítomnosti, resp. neprítomnosti paternálne zdedenej mutovanej alely alebo mutácie *de novo* pomocou MALDI-TOF MS bola študovaná na príklade β -thalassémie (Ding *et al.*, 2004) a achondroplázie (Li *et al.*, 2007). V obidvoch prípadoch boli na detekciu použité a porovnané hME assay a SABER assay. Obidva tieto postupy sú obmedzené nutnosťou znalosti sekvencie mutovanej alely, resp. znalosťou sekvencie najčastejších mutácií spôsobujúcich danú poruchu a ich detekciou. Preto je takáto diagnostická metóda vhodná najmä na detekciu porúch spôsobených jednou, prípadne niekoľkými majoritne zastúpenými mutáciami.

Na detekciu paternálne zdedených alel spôsobujúcich β -thalassémiu boli zvolené 4 najčastejšie mutácie vyskytujúce sa v juhovýchodnej Ázii – tri bodové mutácie (IVS2 654 C→T, nt -28 A→G, CD 17 A→T) a jedna štvornukleotidová delícia (CD 41/42 -CTTT). Podmienkou detekcie bolo, že paternálne a maternálne mutované alely budú odlišné, resp. že

aspoň jeden z rodičov nebude mať mutovanú alelu, pretože inak by nebolo možné odlíšiť fetálnu paternálne zdedenú alelu od pozadia materskej a maternálne zdedenej alely a nedalo by sa určiť, či paternálne zdedená alela je alebo nie je prítomná. Keďže na prejav β -thalassémie major je potrebná prítomnosť dvoch mutovaných alel, negatívna detekcia paternálne zdedenej alely v materskej krvnej plazme znamená vylúčenie β -thalassémie plodu.

Detekcia paternálne zdedenej fetálnej alely bola v súlade s fetálnym genotypom pomocou SABER assay u všetkých 11 prípadov v 7. až 21. týždni tehotenstva, zatiaľ čo s použitím hME assay boli dosiahnuté dva falošne negatívne výsledky. V prípade, kedy otec a matka niesli rovnakú mutáciu, bola prítomnosť fetálnej paternálne zdedenej alely detegovaná pomocou SNP viažúceho sa k mutovanej alele (Ding *et al.*, 2004) Tento postup má význam pri detekcii autozomálne recesívnych porúch ako napríklad cystická fibróza, kedy je porucha často spôsobená prítomnosťou dvoch rovnakých mutovaných majoritne zastúpených alel, jednej od matky a druhej od otca. Potvrdenie alebo vylúčenie prítomnosti paternálne zdedenej alely pomocou SNP odlišného u matky a otca viažuceho sa k tejto alele by diagnostikovalo, či plod bude mať danú poruchu alebo nie.

Achondroplázia je dominantne dedičná porucha spôsobená mutáciou génu *FGFR3*, najčastejšou mutáciou je G1138A. Autori (Li *et al.*, 2007) správne diagnostikovali achondropláziu u dvoch prípadov – v jednom bola detegovaná paternálne zdedená mutácia, u druhého išlo o mutáciu *de novo* pomocou SABER assay. Prostredníctvom hME assay nebola detegovaná *de novo* mutácia u druhého prípadu. Po aplikácii elektroforetickej metódy zvyšujúcej frakciu cffDNA v porovnaní s materskou extracelulárnou DNA na základe poznatku, že cffDNA je tvorená kratšími úsekmi ako materská extracelulárna DNA (Chan *et al.*, 2004) boli mutované alely detegované použitím obidvoch assays. To nasvedčuje tomu, že úspešnosť kvalitatívnej analýzy SNPs a mutácií zvyšuje zväčšenie frakcie cffDNA, čo potvrdzujú aj ďalší autori (napr. Li *et al.*, 2006). Pri diagnostike oboch porúch sa tiež ukázalo, že aplikácia SABER assay dáva v hmotnostnom spektre jasnejší signál umožňujúci detekciu mutovanej alely (Ding *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007).

4. Digitálna PCR a jej využitie v neinvazívnej prenatalnej diagnostike

4.1 Základná charakteristika metódy digitálna PCR

Digitálna polymerázová reťazová reakcia (PCR) prebieha na platničkách s veľkým počtom jamiek (tzv. multi-well plates) a pozostáva z 3 hlavných krokov (zhrnuté vo Vogelstein *et Kinzler*, 1999). Prvým je zriedenie extrahovaných nukleových kyselín na

koncentráciu, aby v každej reakčnej jamke bola približne jedna templátová molekula (Lo *et al.*, 2007b) alebo jedna molekula na dve jamky (Vogelstein *et Kinzler*, 1999). Ďalším krokom je samotná PCR, pričom ide o veľké množstvo oddelených PCR reakcií, ktoré sú v ideálnom prípade pôvodne každá z jednej templátovej molekuly. Na záver je fluorescenčne detegovaná prítomnosť (tzv. pozitívna jamka) či neprítomnosť (tzv. negatívna jamka) PCR produktov v jednotlivých jamkách, prípadne sú fluorescenčne rozlíšené rôzne typy PCR produktov (v prípade multiplexovej PCR) a môže byť vyhodnotený pomer rozdielnych templátových molekúl odpovedajúci ich pomeru v pôvodnej vzorke.

Počet templátových molekúl v jednotlivých reakčných jamkách odpovedá Poissonovmu rozdeleniu a je zrejmé, že v každej jamke bude žiadna, jedna alebo viac templátových DNA. Frakcia jamiek bez templátovej molekuly je určená e^{-m} , kde m predstavuje priemerný počet templátových molekúl na 1 jamku. Hodnota m môže byť upravená v závislosti na približnom počte informatívnych jamiek, ktorý chceme dosiahnuť a akého charakteru tieto informatívne jamky sú. To závisí na tom, aké informácie sa chceme prostredníctvom digitálnej PCR dozvedieť (Lo *et al.*, 2007b). V dostatočne zriedenej vzorke, kde sa v jamke nachádza buď jedna alebo žiadna molekula, odpovedá počet pozitívnych jamiek pôvodnému počtu templátových molekúl DNA.

Pri klasickej digitálnej PCR platničky pozostávajú z 96 alebo 368 jamiek. Na zvýšenie presnosti metódy je výhodné zvýšiť počet jamiek a tým aj počet informatívnych jamiek. Toto je možné pomocou emulznej PCR spojenej s BEAMing metódou alebo pomocou mikrofluidnej digitálnej PCR, kde môže prebehnúť niekoľko stoviek až tisíc paralelných PCR reakcií. Mikrofluidná digitálna PCR je nazývaná aj digitálna PCR na mikrofluidnom chipe a umožňuje previesť napr. až 9180 samostatných PCR reakcií, každú v objeme len 6 nl. Chip je rozdelený na 12 samostatných panelov, čo umožňuje analyzovať naraz 12 vzoriek, každú pomocou 765 reakcií (Dube *et al.*, 2008).

4.2 Neinvazívna prenatalná diagnostika s využitím digitálnej PCR

Digitálna PCR, resp. jej forma mikrofluidná digitálna PCR, môže byť rovnako ako MALDI-TOF MS využitá na diagnostiku fetálnych chromozomálnych aneuploidií aj monogénne dedičných porúch. Diagnostika aneuploidií je možná prostredníctvom merania RNA-SNP AR ako v predchádzajúcom prípade, čo je metóda závislá na odlíšení fetálnych a materských nukleových kyselín, a pomocou merania relatívnej chromozomálnej dávky (RCD), kedy je možné fetálnu aneuploidiu detegovať aj na pozadí materských

extracelulárnych DNA sekvencií, bez nutnosti ich odlíšenia. Bola tiež demonštrovaná diagnostika monogénne dedičnej hemoglobínopatie pomocou metódy relatívna mutačná dávka (RMD) za súčasného predpokladu zvýšenia frakcie fetálnej DNA oproti materskej.

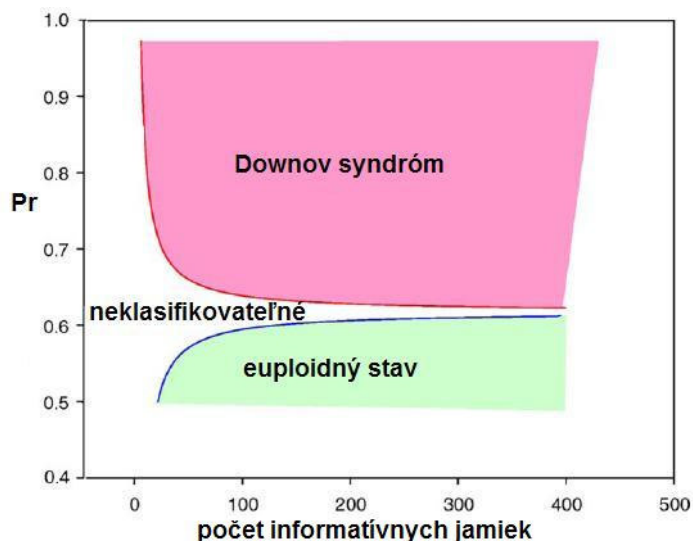
4.2.1 Diagnostika fetálnych chromozomálnych aneuploidií meraním digitálneho RNA-SNP AR

Meranie RNA-SNP AR prostredníctvom digitálnej PCR (Lo *et al.*, 2007b) predstavuje alternatívu k meraniu RNA-SNP AR pomocou MALDI-TOF MS (kapitola 3.3.1). Je meraný pomer mRNA transkribovaných z alely A a alely G polymorfného lokusu génu *PLAC4* exprimovaného v placentе bunkami fetálneho pôvodu s cieľom detekcie trizómie 21. chromozómu. Ako templátové molekuly pre digitálnu PCR slúžia mRNA obidvoch alel a informatívne jamky, ktoré sú pozitívne pre jednu z alel (ale nie pre obidve naraz).

RNA-SNP AR je určené pomerom počtu A-pozitívnych a G-pozitívnych jamiek, v tomto prípade je ale výhodnejšie pracovať s hodnotou P_r , ktorá je určená pomerom počtu jamiek pozitívnych pre alelu s vyšším zastúpením jamiek a počtu všetkých informatívnych jamiek. To, či stanovená hodnota P_r odpovedá euploidnej alebo aneuploidnej vzorke je určené pomocou testu pomeru sekvenčnej pravdepodobnosti (SPRT). Ten je graficky predstavovaný dvomi krivkami v grafe, kde je na osi x počet informatívnych jamiek a na osi y hodnota P_r , pričom umiestnenie kriviek závisí od priemerného počtu templátových molekúl alely s menším množstvom pozitívnych jamiek (tzv. referenčná alela) na jednu jamku. Tieto dve krivky rozdeľujú plochu grafu na tri časti určujúce, či vzorka bude na základe hodnoty P_r a počtu informatívnych jamiek klasifikovaná ako euploidná, aneuploidná alebo neklasifikovateľná (obr. 7).

Autori (Lo *et al.*, 2007b) pomocou tejto metódy analyzovali 13 vzoriek materskej krvnej plazmy – 9 vzoriek pochádzalo od žien s euploidným plodom a 4 od žien s plodom s Downovým syndrómom. Použitá bola platnička s 384 jamkami, iba v jednom prípade bol výsledok pôvodne neklasifikovateľný a preto bola vzorka analyzovaná ešte raz, čo spolu vytváralo 768 jamiek. Všetky prípady boli správne klasifikované – bola dosiahnutá 100 % senzitivita aj špecificita. Obmedzením tejto techniky je rovnako ako u merania SNP-RNA AR prostredníctvom MALDI-TOF MS možnosť aplikácie len pre plody heterozygotné v danom SNP (podrobnejší popis v kapitole 3.3.1). Zvýšenie presnosti by bolo možné dosiahnuť použitím mikrofluidnej digitálnej PCR umožňujúcej testovanie vo väčšom počte

informatívnych jamiiek, čo by pomohlo znížiť rozsah hodnôt determinujúcich vzorku ako neklasifikovateľnú.



Obr. 7. Grafické znázornenie SPTR analýzy. Na základe počtu informatívnych jamiiek a hodnoty P_r je vzorka klasifikovaná ako euploidná, trizomická (v tomto prípade s Downovým syndrómom) alebo neklasifikovateľná (upravené podľa Lo *et al.*, 2007b)

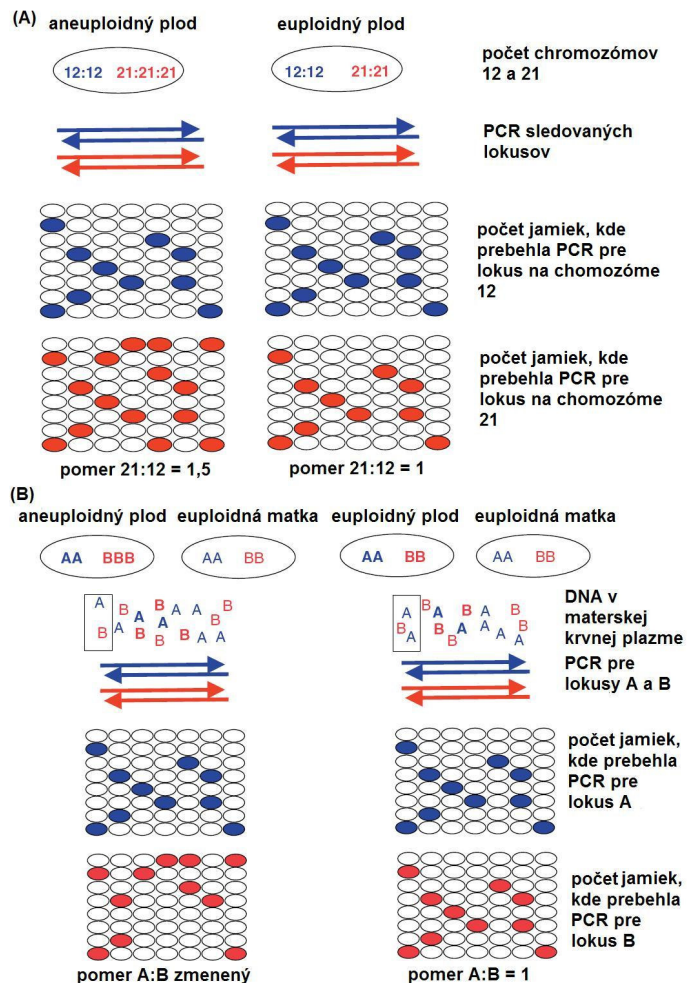
4.2.2 Diagnostika fetálnych chromozomálnych aneuploidí meraním digitálneho RCD

Meranie relatívnej chromozomálnej dávky (RCD) má oproti RNA-SNP AR jednu veľkú výhodu – nie je obmedzené na polymorfne lokusy, čiže sa dá aplikovať bez nutnosti heterozygotnosti plodu pre určitý lokus. Taktiež je táto metóda teoreticky schopná detegovať trizomiu aj bez odlíšenia fetálnej DNA od materskej DNA vo vzorke materskej krvnej plazmy. Zatiaľ ale bola testovaná len na čistej placentárnej DNA (Lo *et al.*, 2007b) a na zmesiach euploidnej a aneuploidnej DNA s rôznou koncentráciou aneuploidnej DNA (Lo *et al.*, 2007b; Fan *et Quake*, 2007), nebola aplikovaná na vzorky materskej krvnej plazmy.

Princíp RCD metódy spočíva v stanovení pomeru sekvencií určitého lokusu potenciálne trizomického chromozómu a referenčného chromozómu. V čistej fetálnej DNA by tento pomer u euploidného fetusu mal byť 2:2, čiže 1, a u aneuploidného 2:3, čiže 1,5. V zmesi materskej a fetálnej DNA, ako napríklad v materskej krvnej plazme, by mal byť tento pomer v prípade euploidného fetusu tiež 1 a v prípade aneuploidného vychýlený od 1, v závislosti od frakcie fetálnej aneuploidnej DNA (obr. 8). Napr. ak je fetálnej DNA 10%, bude tento pomer 1,05. P_r je stanovené ako počet jamiiek pozitívnych pre potenciálne trizomický chromozóm vydelený počtom všetkých informatívnych jamiiek a vzorka je následne klasifikovaná SPRT analýzou.

Lo *et al.* (2007b) správne detegovali prítomnosť alebo neprítomnosť trizómie 21. chromozómu u všetkých zmesí s 50 % a 25 % potenciálne trizomickej DNA. Je zrejmé, že

čím je menšia frakcia potencionalne trizomickej DNA (ako napr. fetálnej DNA), tým je nutné použiť väčší počet informatívnych jamiek. V prípade frakcie 25 % bol stanovený počet informatívnych jamiek na 7 680 pri správnosti klasifikácie 97 %, čo je možné s použitím mikrofluidného chipu alebo veľkého počtu klasických platničiek s 384 jamkami.



Obr. 8. Schematické znázornenie RCD metódy pre detekciu trizómie 21. chromozómu s použitím chromozómu 12 ako referenčného chromozómu. V (A) je na detekciu použitá čistá fetálna DNA a v (B) zmes materskej a fetálnej DNA (upravené podľa Zimmermann *et al.*, 2008).

Fan *et Quake* (2007) ukázali, že s využitím jedného panelu mikrofluidného chipu so 765 jamkami je možné detegovať trizómiu pri frakcii trizomickej DNA 40-100 %. Na detekciu trizómie pri frakcii 10 % je podľa týchto autorov nutných približne 4000 jamiek pri správnosti klasifikácie 95 %. Z hľadiska detekcie fetálnej trizómie z fetálnej cfDNA predstavujúcej v prvom trimestri tehotenstva (kedy by bola diagnostika žiadaná) len 3 % z celkovej extracelulárnej DNA (Lo *et al.*, 1998) by táto metóda vyžadujúca niekoľko mikrofluidných chipov bola príliš náročná. Určitú nádej ponúka výsledok stanovenia frakcie cfDNA z celkovej extracelulárnej DNA v materskej plazme pomocou mikrofluidnej digitálnej PCR na 9,7 % (Lun *et al.*, 2008a), ale stále by bolo pravdepodobne nutné zvýšiť

frakciu cffDNA, napr. pomocou frakcionácie podľa veľkosti (kapitola 3.3.3) prostredníctvom elektroforézy. Niektorí autori túto metódu nepokladajú za vhodnú pre rutinné účely kvôli pomerne nízkej efektivite a veľkému riziku kontaminácie (Hromadnikova *et al.*, 2006). Druhou možnosťou je odlíšiť fetálnu DNA od materskej pomocou rozdielnej metylácie a stanoviť RCD pre fetálne markery na potenciálne trizomickom a referenčnom chromozóme (Lo *et al.*, 2007b).

S použitím väčšieho množstva jamiiek stúpa aj počet potrebných templátových molekúl a tým aj objem krvi, ktorý treba odobrať. V rutinej lekárskej praxi sa nezvykne odberať viac ako 15 ml a to môže byť tiež limitujúci faktor pre možný počet informatívnych jamiiek. Riešením by mohlo byť využitie viacerých lokusov na potenciálne trizomickom a referenčnom chromozóme. S použitím 5 dvojíc takýchto lokusov namiesto 1 dvojice by bolo potrebné množstvo krvnej plazmy (pri frakcii cffDNA 25 %) redukované z 8 ml na 1,6 ml (Lo *et al.*, 2007b).

4.2.3 Diagnostika fetálnych monogénne dedičných porúch stanovením RMD

Stanovenie relatívnej mutačnej dávky (RMD) je analógiou metódy stanovenia RCD aplikovanej na detekciu fetálnych monogénne dedičných porúch (Lun *et al.*, 2008b). Nie je obmedzená na detekciu prítomnosti paternálne zdedenej alely a preto je vhodná na diagnostiku monogénnych porúch u všetkých tehotenstiev, nezávisle na tom, či plod je v riziku zdedenia mutovanej alely od matky, otca alebo oboch rodičov. Predpokladom je heterozygotnosť matky pre daný lokus (jedna alela je normálna, tzv. wild-type, označená N a druhá je mutovaná, označená M) – matka je buď prenášačkou autozomálne recesívnej poruchy alebo nositeľkou autozomálne dominantnej poruchy. Jej genotyp pre daný lokus je MN a fetálny genotyp môže byť NN (plod je zdravý), MN (plod je prenášač autozomálne recesívnej alebo nositeľ autozomálne dominantnej poruchy) a MM (plod má monogénnu poruchu).

Hodnota RMD je stanovená ako pomer koncentrácie M a N alely v celkovej extracelulárnej DNA bez nutnosti odlíšenia materskej a fetálnej DNA. Pokiaľ sa rovná 1, plod je rovnako ako matka heterozygot MN. Ak je od hodnoty 1 vychýlená, genotyp plodu je MM alebo NN. Miera odchýlky závisí na frakcii cffDNA s odlišným genotypom ako je materský – čím je proporcia cffDNA vyššia, tým je zreteľnejšia.

Táto metóda bola aplikovaná na detekciu dvoch mutácií zapríčínujúcich hemoglobínopatie (mutácia v hemoglobíne E a mutácia spôsobujúca β -thalassémiu)

vo vzorkách zmesí majoritnej heterozygotnej DNA a minoritnej DNA s rôznym genotypom predstavujúcej 5-50 % a tiež vo vzorkách materskej krvnej plazmy odobratých v 18. až 20. týždni tehotenstva. Klasifikácia vzorky bola stanovená na základe SPRT analýzy. Vzorky zmesí boli správne klasifikované až na jednu, kde bola frakcia minoritnej DNA menšia ako 10 %. Zo vzoriek materskej krvnej plazmy bolo správne klasifikovaných len 5 z celkového počtu 10 použitím 12 až 24 mikrofluidných panelov (1 až 2 mikrofluidných chipov). Jedna vzorka bola klasifikovaná nesprávne a 4 boli neklasifikovateľné, pričom vo všetkých týchto vzorkách bola proporcia cffDNA menšia ako 10 %. Počítačová simulácia ukázala, že pri frakcii cffDNA 10 % ostane 22,9 % homozygotných a 50,8 % heterozygotných plodov neklasifikovaných s použitím 7650 jamiiek.

Najväčšou prekážkou využitia tejto metódy v neinvazívnej diagnostike je preto nízka frakcia cffDNA v porovnaní s materskou extracelulárnou DNA v krvnej plazme. Lun *et al.* (2008b) preto ako čiastočné riešenie navrhli lokus-špecifickú metódu na zvýšenie frakcie cffDNA nazývanú digitálna selekcia nukleových kyselín podľa veľkosti (digitálna NASS) a poukázali na zvýšenie presnosti RMD metódy s využitím digitálnej NASS. Tento postup využíva duplexovú digitálnu PCR, pričom v jednotlivé jamky sú po PCR reakcii rozlíšené podľa toho, či sa v nich nachádzal pôvodne kratší alebo dlhší templátový fragment. Následne sa pracuje už len s kratšími fragmentami, pretože sa predpokladá, že medzi kratšími fragmentami je väčšia frakcia fetálnych molekúl v porovnaní s materskými ako medzi dlhšími fragmentami. Tento postup môže mať uplatnenie aj pri iných metódach neinvazívnej prenatalnej diagnostiky vyžadujúcich zvýšenie frakcie cffDNA, ako napríklad detekcia aneuploidíí meraním digitálneho RCD popisovaná v kapitole 4.2.2. RMD metóda je teoreticky vhodná na diagnostiku akejkoľvek monogénnej poruchy z cffDNA, avšak zatiaľ nedosahuje dostatočnú presnosť pri primeranom počte jamiiek, ktorý by bol vhodný na uplatnenie metódy v klinickej praxi.

5. „Shotgun“ sekvenovanie a jeho využitie v neinvazívnej prenatalnej diagnostike

5.1 Základná charakteristika metódy „shotgun“ sekvenovanie

„Shotgun“ sekvenovanie s použitím Solexa/Illumina platformy je jednou z moderných sekvenovacích metód. Ide o paralelné sekvenovanie celého genómu, pričom sú sekvenované obrovské množstvá krátkych úsekov. Genómová templátová DNA je fragmentovaná na úseky

dlhé niekoľko stoviek nukleotidov, v prípade cfDNA už nie je potrebná žiadna ďalšia fragmentácia. K 3`koncom jednoreťazcových fragmentov DNA sú ligované oligonukleotidové adaptéry. Tieto adaptéry sú komplementárne k oligonukleotidovým kotvám, ktoré sú pripojené na platničku nazývanú „flow cell“, kde sa odohráva sekvenácia.

Jednoreťazcové templátové fragmenty s adaptérmi sú viazané na náhodné miesta na platničku a následne začne tzv. mostíková amplifikácia, kedy adaptér na 3`konci templátu prichytenom 5`koncom k platničke hybridizuje s kotvou. Táto kotva je na svojom 3`konci predlžovaná a vytvorí sa fragment komplementárny k templátovému fragmentu. Amplifikačná reakcia je mnohokrát opakovaná, až sa vytvoria clustery fragmentov DNA totožných s pôvodnou templátovou molekulou. Každý cluster obsahuje približne 1000 molekúl a na jednej platničke môže byť až 50×10^6 samostatných clusterov. Následne sú clustery denaturované a na platničke sú ponechané len „forward“ vlákna prichytené svojím 5`koncom k platničke.

Na iniciáciu sekvenácie sú na platničku pridané primery komplementárne k adaptérom, DNA polymeráza a 4 typy rôzne fluorescenčne značených terminačných nukleotidov. Tie sa viažu za primer komplementárne k prvému nukleotidu ideálne každého reťazca každého clusteru a následne je zaznamenaná fluorescencia clusterov, podľa ktorej je determinovaný prvý nukleotid. Pred začatím každého ďalšieho sekvenačného cyklu je odstránená fluorescenčná značka a 3`koniec terminačného nukleotidu je odblokovaný, aby sa k nemu mohol pripojiť ďalší nukleotid. Tak je postupne sekvenovaný celý fragment DNA v každom clusteri (zhrnuté vo Voelkerding *et al.*, 2009).

5.2 Neinvazívna prenatálna diagnostika s využitím metódy „shotgun“ sekvenovanie

Metóda „shotgun“ sekvenovanie bola len nedávno popísaná v súvislosti s diagnostikou fetálnych chromozomálnych aberácií (Chiu *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2008). Na rozdiel od postupov využívajúcich MALDI-TOF MS a digitálnu PCR ide o metódu nezávislú na polymorfizmoch a akýchkoľvek špecifických lokusoch nevyžadujúcu odlišenie materskej a fetálnej extracelulárnej DNA. Produktom sekvenácie sú milióny osekvenovaných krátkych fragmentov, ktoré sú následne rozdelené do skupín podľa toho, z akého chromozómu pochádzajú. Podľa počtu sekvencií z jednotlivých chromozómov je možné stanoviť, či niektorý chromozóm pôvodom z fetálnej cfDNA nie je trizomický (alebo teoreticky aj monozomický).

Fan *et al.* (2008) touto metódou úspešne detegovali fetálnu trizomiu chromozómov 21, 18 a 13 vo všetkých 12 vzorkách materskej krvnej plazmy. Po sekvenácii získali z každej vzorky približne 10 miliónov fragmentov, z ktorých priemerne 154 000 pochádzalo z chromozómu 13, 135 000 z chromozómu 18 a 65 700 z chromozómu 21. Pre každý chromozóm bola stanovená tzv. hustota sekvenčných značiek (STD), ktorej hodnota je vyjadrená mediánom počtu detegovaných sekvencií v pohyblivom okne veľkosti 50 kb a bola vypočítaná jej relatívna hodnota vzhľadom k STD daného chromozómu z referenčnej genómovej DNA. Pre chromozómy 13, 18 a 21 boli stanovené konfidenčné intervaly tejto relatívnej STD odpovedajúce euploidným vzorkám. Hodnota relatívnej STD trizomickej vzorky by mala byť nad hornou hranicou konfidenčného intervalu pre príslušný chromozóm a na základe tejto podmienky môžu byť vzorky klasifikované na euploidné a aneuploidné.

Chiu *et al.* (2008) použili iný matematický postup na rozlíšenie vzoriek materskej krvnej plazmy s euploidným plodom a s plodom s Downovým syndrómom. Pre potenciálne trizomický chromozóm (v tomto prípade chromozóm 21) je najprv vypočítaná hodnota N ako počet unikátnych sekvencií z daného chromozómu v sledovanej vzorke vydelený celkovým počtom unikátnych sekvencií pre všetky chromozómy danej vzorky. Z tejto hodnoty N je vypočítané z-skóre, ktoré vyjadruje počet smerodajných odchýlok, ktorými sa hodnota N daného chromozómu študovanej vzorky odlišuje od referenčnej hodnoty pre daný chromozóm. Táto referenčná hodnota je vypočítaná z hodnôt N pre daný chromozóm z euploidných vzoriek. Z-skóre aneuploidných vzoriek je výrazne vyššie ako euploidných a ako hranica pre klasifikáciu slúži hodnota z-skóre 3. Všetkých 14 euploidných vzoriek malo hodnotu z-skóre menšiu ako 3 a všetkých 14 aneuploidných vzoriek väčšiu ako 3 (rozsah 5,03-25,11), takže na základe tejto metódy boli všetky vzorky klasifikované správne.

Metóda „shotgun“ sekvenovanie je vhodná na detekciu fetálnych chromozomálnych trizomií. Podľa uvedených výsledkov má vysokú presnosť a je dostatočne robustná a prevyšuje tak postupy spojené s MALDI-TOF MS a mikrofluidnou digitálnou PCR. Obidve skupiny (Chiu *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2008) boli schopné správne diagnostikovať trizomiu chromozómu 21 už v 14. týždni tehotenstva. Predpokladá sa, že táto metóda by bola dostatočne presná aj na detekciu menších chromozomálnych aberácií, kedy chyba len časť chromozómu. Najväčšou limitáciou je pravdepodobne vysoká cena spojená s analýzou každej vzorky – len sekvenačná zmes pre jednotlivú vzorku stojí 700\$, a to zabraňuje uplatneniu tejto metódy neinvazívnej prenatalnej diagnostiky v rutinej praxi (Chiu *et al.*, 2008).

6. Záver

Vo svojej bakalárskej práci som sa pokúsila zhrnúť aktuálne perspektívne možnosti neinvazívnej prenatalnej diagnostiky fetálnych monogénne dedičných porúch a chromozomálnych aneuploidí s využitím moderných molekulárno-genetických metód. Popisované postupy majú potenciál nahradiť súčasne používané invazívne metódy ako bezpečnejšia alternatíva nepredstavujúca žiadne riziko pre matku a plod. Diagnóza plodu by tak mohla byť stanovená z extracelulárnej fetálnej DNA a RNA prítomnej v malom množstve materskej krvi.

Analýza fetálnych extracelulárnych nukleových kyselín môže slúžiť na viacero diagnostických účelov. V klinickej praxi je využívaná zatiaľ len na determináciu pohlavia a *RHD* genotypu plodu prostredníctvom detekcie fetálnych paternálne zdedených sekvencií DNA, ktoré nie sú prítomné v materskom genóme. Ide o sekvencie špecifické pre chromozóm Y v prípade určovania pohlavia a sekvencie *RHD* génu deletované u väčšiny RhD negatívnych matiek kaukazského pôvodu v prípade stanovovania *RHD* genotypu plodu. Medzi ďalšie možné aplikácie sa zaraďuje detekcia komplikácií v tehotenstve, monogénne dedičných porúch plodu a fetálnych chromozomálnych aneuploidí.

Vývoj postupov využívajúcich popísané moderné metódy MALDI-TOF MS, digitálna PCR a „shotgun“ sekvenovanie sa sústreďuje na potenciálnu diagnostiku fetálnych chromozomálnych aneuploidí a v menšej miere aj monogénne dedičných porúch. Analýza pomocou MALDI-TOF MS je podmienená odlíšením materských a fetálnych extracelulárnych nukleových kyselín, napr. prostredníctvom rozdielnej metylácie. Druhou možnosťou je štúdium mRNA exprimovanej výhradne bunkami placenty fetálneho pôvodu. Chromozomálna aneuploidia je diagnostikovaná na základe stanovenia pomeru alel vo forme DNA alebo mRNA určitého lokusu na študovanom chromozóme.

Obe tieto metódy boli na sledovaných vzorkách úspešné, avšak ich nevýhodou je obmedzenie na plody heterozygotné pre SNP v danom lokuse. Riešením by mohlo byť rozšírenie počtu lokusov na danom chromozóme s alelami s rozdielnymi SNPs. Postup využívajúci mRNA bol študovaný na príklade trizómie 21. chromozómu, ale obdobné markerové mRNA boli nájdené aj na chromozómoch 13 a 18, a postup zameraný na rozdielne metylovanú DNA bol vyskúšaný na príklade trizómie 18. chromozómu, pričom takéto fetálne špecifické markery sa nachádzajú aj na chromozóme 21. Nevýhodou postupu s DNA je potreba väčšieho množstva DNA a následne aj krvi, pretože na rozlíšenie rozdielnej metylácie je zvyčajne používaná metóda, počas ktorej dochádza k veľkým stratám DNA. Na diagnostiku

fetálnej monogénne dedičnej poruchy prostredníctvom MALDI-TOF MS je detegovaná prítomnosť, resp. neprítomnosť paternálne zdedenej mutovanej alely alebo mutácie *de novo*.

Diagnostika aneuploidíí s využitím digitálnej PCR, resp. mikrofluidnej digitálnej PCR, je možná pomocou merania pomeru alel z fetálne špecifickej DNA a stanovením relatívnej chromozomálnej dávky, kedy nie je nutné odlíšiť materskú a fetálnu DNA. Je to tiež metóda nezávislá na polymorfizmoch stanovujúca pomer sekvencií určitého lokusu potenciálne trizomického chromozómu a referenčného chromozómu. Je podmienená dostatočne veľkou frakciou cffDNA a tiež množstvom celkovej extracelulárnej DNA a preto doteraz nebola aplikovaná na analýzu vzoriek materskej krvnej plazmy. Riešením potreby veľkého množstva DNA a preto aj krvi by mohlo byť využitie viacerých lokusov na potenciálne trizomickom a referenčnom chromozóme alebo zvýšenie frakcie cffDNA. Digitálna PCR je vhodná aj na diagnostiku monogénne dedičných porúch pomocou merania relatívnej mutačnej dávky za súčasného predpokladu zvýšenia frakcie cffDNA oproti materskej extracelulárnej DNA.

Postupy využívajúce MALDI-TOF MS a digitálnu PCR sú vždy zamerané na určitý špecifický lokus a preto je pre ne limitujúce množstvo či frakcia cffDNA. „Shotgun“ sekvenovanie je naproti tomu nezávislé na akomkoľvek lokuse a na detekciu aneuploidie sa stanovuje množstvo všetkých sekvencií pochádzajúcich z potenciálne trizomického chromozómu. Nie je tak potrebné zvyšovať frakciu cffDNA a zároveň je to metóda vhodná pre celú populáciu, pretože nie je obmedzená na heterozygotov pre nejaký lokus. Je aj pomerne presná a robustná, ale nevýhodou je vysoká cena spracovania a vyhodnotenia jednej vzorky. Dá sa však očakávať, že táto cena by mohla s postupom času klesnúť.

Aby ktorákoľvek s týchto metód mohla byť zavedená do klinickej praxe, musí byť otestovaná na dostatočne veľkom počte vzoriek materskej krvnej plazmy a následne dostatočne presná, vhodná pre celú alebo takmer celú populáciu a čo najjednoduchšia a najlacnejšia. Teoreticky sa ako najvhodnejšia metóda javí „shotgun“ sekvenovanie, ale veľkou prekážkou je pomerne vysoká cena potrebná na diagnostiku jednej vzorky. Táto metóda by ale mohla byť skombinovaná s postupom stanovovania pomeru alel mRNA – ak by bol plod heterozygotný pre určitý lokus, uplatnila by sa lacnejšia metóda využívajúca mRNA, a ak nie, použilo by sa „shotgun“ sekvenovanie. V prípade úspešného uplatnenia niektorej z metód v neinvazívnej prenatalnej diagnostike by bolo možné hodnoverne detegovať chromozomálne aneuploidie už v 1. trimestri tehotenstva a táto metóda by mohla byť analogicky využitá na detekciu rakoviny z tumor-špecifickej extracelulárnej DNA v krvnej plazme a sére.

Zoznam použitej literatúry

- ALBERRY M, MADDOCKS D, JONES M, ABDEL HADI M, ABDEL-FATTAH S, AVENT N, SOOTHILL PW. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is trophoblast. *Prenat Diagn* 2007; 27:415-418
- AMICUCCI P, GENNARELLI M, NOVELLI G, DALLAPICCOLA B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem* 2000; 46:301-302
- BEAVIS RC, CHAIT BT, FALES HM. Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1989; 3:432-435
- BEAVIS RC, CHAUDHARY T, CHAIT BT. α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Org Mass Spectrom* 1991; 27:156-158
- BIANCHI DW, ZICKWOLF GK, WEIL GJ, SYLVESTER S, DEMARIA MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:705-708
- BIANCHI DW, WILLIAMS JM, SULLIVAN LM, HANSON FW, KLINGER KW, SHUBER AP. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet* 1997; 61:822-829
- BIANCHI DW, LESHANE ES, COWAN JM. Large amounts of cell-free fetal DNA are present in amniotic fluid. *Clin Chem* 2004; 50:88-92
- BIRCH L, ENGLISH CA, O'DONOGHUE K, BARIGYE O, FISK NM, KEER JT. Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. *Clin Chem* 2005; 51:312-320
- BISCHOFF FZ, DANG DX, MARQUEZ-DO D, MARTINEZ D, HORNE C, LEWIS DE, SIMPSON JL. Detecting fetal DNA from dried maternal blood spots: Another step towards broad scale non-invasive prenatal genetic screening and feasible testing. *Repro BioMed Online* 2003; 76:349-351
- CHAN KCA, ZHANG J, HUI ABY, WONG N, LAU TK, LEUNG TN, LO KW, HUANG DWS, LO YMD. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2004; 50:88-92
- CHAN KCA, DING C, GEROVASSILI A, YEUNG SW, CHIU RWK, LEUNG TN, LAU TK, CHIM SSC, CHUNG GTY, NICOLAIDES KH, LO YMD. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: a universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin Chem* 2006; 52:2211-2218
- CHEN XQ, STROUN M, MAGNENAT JL, NICOD LP, KURT AM, LYAUTEY J, LEDERREY C, ANKER P. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med* 1996; 2:1033-1035
- CHIM SSC, TONG YK, CHIU RWK, LAU TK, LEUNG TN, CHAN LYS, OUDEJANS CBM, DING C, LO YMD. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:14753-14758
- CHIM SSC, JIN S, LEE TYM, LUN FMF, LEE WS, CHAN LYS, JIN Y, YANG N, TONG YK, LEUNG TY, LAU TK, DING C, CHIU RWK, LO YMD. Systematic search for placental DNA-methylation markers on chromosome 21: toward a maternal plasma-based epigenetic test for fetal trisomy 21. *Clin Chem* 2008; 54:500-511
- CHITTY L, MISTRY B, HOGG J, MEANEY C, THOMASSON L, NORBURY G, DANIELS G, FINNING K, MARTIN P. Prospective register of outcomes of free-fetal DNA testing (PROOF) – results of the first year's audit. *Newsletter of the British Society for Human Genetics* 2007; 37:8-9
- CHIU RWK, POON LLM, LAU TK, LEUNG TN, WONG EMC, LO YMD. Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma. *Clin Chem* 2001; 47:1607-1613
- CHIU RWK, LAU TK, LEUNG TN, CHOW KCK, CHIU DH, LO YMD. Prenatal exclusion of β -thalassemia major by examination of maternal plasma. *Lancet* 2002a; 360:998-1000
- CHIU RWK, LAU TK, CHEUNG PT, GONG ZQ, LEUNG TN, LO YMD. Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study. *Clin Chem* 2002b; 48:778-780
- CHIU RWK, LUI WB, CHEUNG MC, KUMTA N, FARINA A, BANZOLA I, GROTTI S, RIZZO N, HAINES CJ, LO YMD. Time profile of appearance and disappearance of circulating placenta-derived mRNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2006; 52:313-316
- CHIU RWK, CHAN KCA, GAO Y, LAU VYM, ZHENG W, LEUNG TY, FOO CHF, XIE B, TSIU NBY, LUN FMF, ZEE BCY, LAU TK, CANTOR CR, LO YMD. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:20458-20463
- DING C, CHIU RWK, LAU TK, LEUNG TN, CHAN LC, CHAN AYY, CHAROENKWAN P, NG ISL, LAW H, MA ESK, XU X, WANAPIRAK C, SANGUANSEMSRI T, LIAO C, AI MATJ, CHUI DHK, CANTOR CR, LO YMD. MS analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: Application to noninvasive prenatal diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:10762-10767

- DUBE S, QIN J, RAMAKRISHNAN R. Mathematical analysis of copy number variation in a DNA sample using digital PCR on a nanofluidic device. *PLOS ONE* 2008; 3:e2876
- FAN HC, QUAKE SR. Detection of aneuploidy with digital polymerase chain reaction. *Anal Chem* 2007; 79:7576-7579
- FAN HC, BLUMENFELD YJ, CHITKARA U, HUDGINS L, QUAKE SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:16266-16271
- FINNING K, MARTIN P, SUMMERS J, MASSEY E, POOLE G, DANIELS G. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *Br Med J* 2008; 336:816-818
- FLORI E, DORAY B, GAUTIER E, KOHLER M. Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto- and syncytio-trophoblastic cells. *Hum Reprod* 2004; 19:723-724
- GEROVASSILI A, GARNER C, NICOLAIDES KH, THEIN SL, REES DC. Free fetal DNA in maternal circulation: a potential prognostic marker for chromosomal abnormalities? *Prenat Diagn* 2007; 27:104-110
- GO AT, VISSER A, MULDER MA, BLANKENSTEIN MA, VAN VUGT JM, OUDEJANS CB. 44 single-nucleotide polymorphisms expressed by placental RNA: assesment for use in noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Clin Chem* 2007; 53:2223-2224
- GONZALEZ-GONZALEZ C, GARCIA-HOYOS M, TRUJILLO-TIEBAS MJ, RODRIGUEZ DE ALBA M, LORDA-SANCHEZ I, DIAZ-RECASENS J, GALLARDO E, AYUSO C, RAMOS C. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2002; 22:946-948
- GONZALEZ-GONZALEZ C, TRUJILLO-TIEBAS MJ, RODRIGUEZ DE ALBA M, GARCIA-HOYOS M, LORDA-SANCHEZ I, DIAZ-RECASENS J, AYUSO C, RAMOS C. Huntington disease – unaffected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn* 2003; 23:232-234
- GROSS J, STRUPAT K. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry applied to biological macromolecules. *Trends Anal Chem* 1998; 17:470-484
- GRUNAU C, CLARK SJ, ROSENTHAL A. Bisulphite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:E65
- HAFF LA, SMIRNOV IP. Single-nucleotide polymorphisms identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry. *Genome Res* 1997; 7:378-388
- HEID CA, STEVENS J, LIVAK KJ, WILLIAMS PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6:986-994
- HILLENKAMP F, KARAS M, BEAVIS RC, CHAIT BT. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem* 1991; 63:1193-1201
- HROMADNIKOVA I, HOUBOVA B, HRIDELOVA D, VOSLAROVA S, CALDA P, NEKOLAROVA K, KOFER J, STEJSKAL D, DOUCHA J, CINEK O, VAVRIREC J. Quantitative analysis of DNA levels in maternal plasma in normal and Down syndrome pregnancies. *BMC Pregnancy Childbirth* 2002; 2:4
- HROMADNIKOVA I, HOUBOVA B, HRIDELOVA D, VOSLAROVA S, KOFER J, KOMRSKA V, HABART D. Replicate real-time PCR testing of DNA in maternal plasma increases the sensitivity of non-invasive fetal sex determination. *Prenat Diagn* 2003; 23:235-238
- HROMADNIKOVA I, VESELA K, BENESOVA B, NEKOLAROVA K, DUSKOVA D, VLK R, SPALOVA I, GERYCHOVA R, HAKENOVA A, ROSENBAUMOVA Z, VLASIN P, VLACHOVA A, PALASEK V, ROZNAKOVA E, CALDA P. Non-invasive fetal RHD and RHCE genotyping from maternal plasma in alloimmunized pregnancies. *Prenat Diagn* 2005a; 25:1079-1083
- HROMADNIKOVA I, VECHETOVA L, DOUCHA J, VLK R. Non-invasive fetal RHD and RHCE genotyping using real-time PCR testing of maternal plasma in RhD-negative pregnancies. *J Histochem Cytochem* 2005b; 53:301-305
- HROMADNIKOVA I, ZEJSKOVA L, DOUCHA J, CODL D. Quantification of fetal and total circulatory DNA in maternal plasma samples before and after size fractionation by agarose gel electrophoresis. *DNA Cell Biol* 2006; 25:635-640
- ILLANES S, DENBOW M, KAILASAM C, FINNING K, SOOTHILL PW. Early detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Early Hum Dev* 2007; 83:563-566
- JURINKE C, OETH P, VAN DEN BOOM D. MALDI-TOF mass spectrometry: a versatile tool for high-performance DNA analysis. *Mol Biotechnol* 2004; 26:147-164
- KAISER J. An earlier look at baby's genes. *Science* 2005; 309:1476-1478
- KARAS M, HILLENKAMP F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10.000 daltons. *Anal Chem* 60:2299-2301
- KIRPEKAR F, NORDHOFF E, KRISTIANSEN K, ROEPSTORFF P, LEZIUS A, HAHNER S, KARAS M, HILLENKAMP F. Matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of enzymatically synthesized RNA up to 150 kDa. *Nucleic Acids Res* 1994; 22:3866-3870
- LEVINE RJ, QIAN C, LESHANE ES, YU KF, ENGLAND LJ, SCHISTERMAN EF, WATAGANARA T, ROMERA R, BIANCHI DW. Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190:707-713

- LI Y, HOLZGREVE W, PAGET-CHRISTIAENS LGC, GILLE JJP, HAHN S. Improved prenatal detection of a fetal point mutation for achondroplasia by the use of size-fractionated circulatory DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn* 2004a; 24:896-898
- LI Y, WENZEL F, HOLZGREVE W, HAHN S. Genotyping fetal paternally inherited SNPs by MALDI-TOF MS using cell-free fetal DNA in maternal plasma: influence of size fractionation. *Electrophoresis* 2006; 27:3889-3896
- LI Y, PAGE-CHRISTIAENS GCML, GILLE JJP, HOLZGREWE W, HAHN S. Non-invasive prenatal detection of achondroplasia in size-fractionated cell-free DNA by MALDI-TOF MS assay. *Prenat Diagn* 2007; 27:11-17
- LO YMD, CORBETTA N, CHAMBERLAIN PF, RAI V, SARGENT IL, REDMAN CW, WAINSCOAT JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350:485-487
- LO YMD, TEIN MSC, LAU TK, HAINES CJ, LEUNG TN, POON PMK, WAINSCOAT JS, JOHNSON PJ, CHANG AMZ, HJELM NM. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62:768-775
- LO YMD, ZHANG J, LEUNG TN, LAU TK, CHANG AMZ, HJELM NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999a; 64:218-224
- LO YMD, LEUNG TN, TEIN MSC, SARGENT IL, ZHANG J, LAU TK, HAINES CJ, REDMAN CWG. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 1999b; 45:184-188
- LO YMD, LAU TK, ZHANG J, LEUNG TN, CHANG AMZ, HJELM NM, ELMES RS, BIANCHI DW. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem* 1999c; 45:1747-1751
- LO YMD, TSUI NB, CHIU RWK, LAU TK, LEUNG TN, HEUNG MMS, GEROVASSILI A, JIN Y, NICOLAIDES KH, CANTOR CR, DING C. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med* 2007a; 13:218-223
- LO YMD, LUN FMF, CHAN KCA, TSUI NBY, CHONG KC, LAU TK, LEUNG TY, ZEE BCY, CANTOR CR, CHIU RWK. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007b; 104:13116-13121
- LUN FMF, CHIU RWK, CHAN KCA, LEUNG TY, LAU TK, LO YMD. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2008a; 54:1664-1672
- LUN FMF, TSUI NBY, CHAN KCA, LEUNG TY, LAU TK, CHAROENKWAN P, CHOW KCK, LO WYW, WANAPIRAK C, SANGUANSEMSRI T, CANTOR CR, CHIU RWK, LO YMD. Noninvasive prenatal diagnoses of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008b; 105:19920-19225
- MANDEL P, METAIS P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *CR Acad Sci Paris* 1948; 142:241-243
- MARON JL, JOHNSON KL, SLONIM D, LAI C, RAMONI M, ALTEROVITZ G, JARRAH Z, YANG Z, BIANCHI DW. Gene expression analysis in pregnant women and their infants identifies unique fetal biomarkers that circulate in maternal blood. *J Clin Invest* 2007; 117:3007-3019
- MINON JM, GERARD C, SENTERRE JM, SCHAAPS JP, FOIDART JM. Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. *Transfusion* 2008; 48:373-381
- NAWROZ H, KOCH W, ANKER P, STROUN M, SIDRANSKY D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med* 1996; 2:1035-1037
- NG EKO, TSUI NBY, LAM NYL, CHIU RWK, YU SCH, WONG SSC, LO ESF, RAINER H, JOHNSON PJ, LO YMD. Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clin Chem* 2002; 48:1212-1217
- NG EKO, TSUI NBY, LAU TK, LEUNG TN, CHIU RWK, PANESAR NS, LIT LCW, CHAN K, LO YMD. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:4360-4362
- OHASHI Y, MIHARU N, HONDA H, SAMURA O, OHAMA K. Quantitation of fetal DNA in maternal serum in normal and aneuploid pregnancies. *Hum Genet* 2001; 108:123-127
- POON LLM, LEUNG TN, LAU TK, LO YMD. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2000; 46:1832-1834
- ROSS PL, BELGRADER P. Analysis of short tandem repeat polymorphisms in human DNA by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 1997; 69:3966-3972
- SEKIZAWA A, KONDO T, IWASAKI M, WATANABE A, JIMBO M, SAITO H, OKAI T. Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2001; 47:1856-1858
- SEQUENOM, INC. Sequenom Announces Results of Screening Studies for Down Syndrome and Updates Development of Noninvasive Prenatal Diagnostics at Analyst and Investor Briefing – press release. 4/6/2008.
<http://phx.corporate-ir.net/phoenix.zhtml?c=84955&p=irol-newsArticle&ID=1162116&highlight=>

- SORENSEN GD, PRIBISH DM, VALONE FH, MEMOLI VA, BZIK DJ, YAO SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3:67-71
- SPENCER K, DE KOK JB, SWINKELS DW. Increased total cell-free DNA in the serum of pregnant women carrying a fetus affected by trisomy 21. *Prenat Diagn* 2003; 23:580-583
- STANGHELLINI I, BERTORELLI R, CAPONE L, MAZZA V, NERI C, PERCESEPE A, FORABOSCO A. Quantitation of fetal DNA in maternal serum during the first trimester of pregnancy by the use of a DAZ repetitive probe. *Mol Hum Reprod* 2006; 12:587-591
- STROUN M, ANKER P, MAURICE P, LYAUTEY J, LEDERREY C, BELJANSKI M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 1989; 46:318-322
- STRUPAT K, KARAS M, HILLENKAMP F. 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom Ion Processes* 1991; 111:89-102
- TANAKA K, WAKI H, IDO Y, AKITA S, YOSHIDA Y, YOSHIDA T. Protein and polymer analysis up to m/z 100.000 by laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1988; 2:151-153
- TANG M, LEE M, MOHSENIAN F, SHI T, DRAGON B, DING J, YANG Y. Identification of RNA-SNP markers for noninvasive prenatal diagnosis (NIPD) of T18 and T13. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199: 3163
- TONG YK, DING C, CHIU RWK, GEROVASSILI A, CHIM SSC, LEUNG TY, LEUNG TN, LAU TK, NICOLAIDES K, LO YMD. Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: theoretical and empirical considerations. *Clin Chem* 2006; 52: 2194-2202
- TONG YK, CHIU RWK, LEUNG TY, DING C, LAU TK, LEUNG TN, LO YMD. Detection of restriction enzyme-digested target DNA by PCR amplification using a stem-loop primer: application to the detection of hypomethylated fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2007; 53:1906-1914
- VASIOUKHIN V, ANKER P, MAURICE P, LYAUTEY J, LEDERREY C, STROUN M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1994; 86:774-779
- VOELKERDING KV, DAMES SA, DURTSCHI JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem* 2009; 55:641-658
- VOGELSTEIN B, KINZLER KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:9236-9241
- WATAGANARA T, LESHANE ES, FARINA A, MESSERLIAN GM, LEE T, CANICK JA, BIANCHI DW. Maternal serum cell-free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18. *Hum Genet* 2003; 112:204-208
- WATAGANARA T, LESHANE ES, CHEN AY, BORGATTA L, PETER I, JOHNSON KL, BIANCHI DW. Plasma γ -globin gene expression suggests that fetal hematopoietic cells contribute to the pool of circulating cell-free fetal nucleic acids during pregnancy. *Clin Chem* 2004; 50:689-693
- WRIGHT CF, BURTON H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update* 2009; 15:139-151
- WU KJ, STEDING A, BECKER CH. Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry of oligonucleotides using 3-hydroxypicolinic acid as an ultraviolet-sensitive matrix. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1993; 7:142-146
- YANG Y, DING JH, LEE MS, LORIA O, MOHSENIAN F, TANG M. Identification of mRNA-SNP markers for a noninvasive prenatal trisomy 21 (T21) test. *Prenat Diagn* 2008; 28:S12
- ZHONG XY, BURK MR, TROEGER C, KANG A, HOLZGREVE W, HAHN S. Fluctuation of maternal and fetal free extracellular circulatory DNA in maternal plasma. *Obstet Gynecol* 2000a; 96:991-996
- ZHONG XY, BURK MR, TROEGER C, JACKSON LR, HOLZGREVE W, HAHN S. Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. *Prenat Diagn* 2000b; 20:795-798
- ZHONG XY, HOLZGREVE W, HAHN S. Cell-free fetal DNA in the maternal circulation does not stem from the transplacental passage of fetal erythroblasts. *Mol Hum Reprod* 2002; 8:864-870
- ZHU YF, CHUNG CN, TARANENKO NI, ALLMAN SL, MARTIN SA, HAFF L, CHEN CH. The study of 2,3,4-trihydroxyacetophenone as matrices for DNA detection in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1996; 10:383-388
- ZIMMERMANN BG, GRILL S, HOLZGREVE W, ZHONG XY, JACKSON LG, HAHN S. Digital PCR: a powerful new tool for noninvasive prenatal diagnosis? *Prenat Diagn* 2008; 28:1087-1093