

Non invasive prenatal diagnosis using cell free fetal DNA and RNA in maternal circulation

포천중문의대 강남차병원 산부인과학교실

차 동 현

서 론

임신 중 산모와 태아간의 양방향의 교류 (bidirectional transfer)가 이루어지고 있다는 보고는 임신한 산모의 혈액 내에 존재하는 태아의 세포 (fetal cell)와 세포유리 태아 DNA와 RNA들 (cell free fetal DNA and RNA)이 존재한다는 사실로 밝혀졌으며 이러한 보고는 장벽 역할을 하리라는 과거 태반에 대한 인식의 변화를 초래하고 있다 (de la Cruz et al. 1998; Bianchi 1999; Bianchi et al. 2002; Lo et al. 1997). 양수천자나 용모막용모 샘플과 같은 침습적 산전진단에 대한 대안으로 산모 혈액에서 태아세포를 분리하는 연구가 광범위하게 진행되고 개발되고 있으나, 태아세포의 경우에는 기본적으로 산모혈액에 존재하는 작은 수의 태아세포 - 평균 모체 혈액 1 ml 당 하나의 태아세포 - 로 인하여 임상적 용을 위한 연구에 큰 장애요인이 되고 있다.

이 분야의 새로운 발견은 모체 혈액 내에 상당히 많은 양의 태아 DNA가 존재한다는 사실이다. Lo 등 (1997)은 최초로 모체 혈장 (plasma)과 혈청 (serum) 내에 태아 DNA의 존재를 보고하였으며, 같은 그룹에 의해 상당히 많은 양의 DNA가 존재한다는 사실이 보고되었다 (Lo et al. 1997; Lo et al. 1998-a; Lo et al. 2000b). 그 이후 많은 연구자들에 의해 이 기술의 임상적 적용을 위한 노력이 시도되어 왔다. 현재 이 연구의 가장 기본적인 한계점은 모체의 혈액 내에 존재하는 확실한 태아 DNA인 male DNA외에 gender independent fetal DNA marker를 개발하는 것인데, 최근 이루어지고 있는 연구 성과들을 고찰하고자 한다.

본 론

1) 최초의 세포 유리 DNA

1947년 Mandel과 Metais가 혈장과 혈청에서 DNA를 측정하였고, Stroun과 Anker는 식물 종양에서 이 세포유리 DNA가 전이에 관련하고 있다는 사실을 보고하였다 (Stroun et al. 1977; Stroun et al. 2000). 1977년 Leon 등은 아주 미세한 양의 세포 유리 DNA가 암환자에서 발견된다는 사실을 보고하였다. 1996년 Chen 등과 Nawroz 등은 암환자의 혈청과 혈장에서 tumor specific DNA sequence를 발견하였다. 이 보고들은 과거 식물의 암에서 있을 수 있다는 세포 유리 DNA에 대한 생각을 인간에게로 옮긴 획기적인 보고가 되었다. Anker 등은 암환자의 혈장에서 추출된 DNA로부터 tumor DNA의 특성, specific oncogene 및 tumor suppressor gene의 존재, ras 유전자의 point mutation에 대해서 보고하였다.

2) 임신 산모의 혈장 및 혈청에서 태아 DNA

Lo 등은 위의 결과를 접하고 이런 물음을 던지게 된다. 빠르게 성장하는 태아와 태반이 종양과 성질이 비슷하므로 산모의 혈액 내에도 태어나 태반과 관련된 DNA가 존재할지 모른다는 질문을 던지게 된다. 이러한 판단에 근거하여 모체의 혈청과 혈장에서 태아 DNA가 존재함을 1997년 최초로 보고하였다. 태아 DNA는 여성인 산모에 존재할 수 없는 Y-specific DNA가 male fetus를 임신한 산모의 혈액 내에서 검출함으로써 증명하였다.

모체 혈장 및 혈청에 존재하는 fetal DNA를 일반적으로 검출하게 된 것은 실시간 정량 중합효소 분석법 (real time quantitative polymerase chain reaction)의 개발에 의해서 가능하였다 (Fig. 1). 과거의 중합효소 분석법이 '3과 5'의 primer를 제조하여 gel에서의 electrophoresis를 필요로 하고, 또한 질적 즉, DNA나 RNA가 존재하는지를 확인하는 검사였다면, real time PCR은 primer에 형광을 띤 probe를 첨가하여 정확하게 양을 측정할 수 있을 뿐 아니라 amplified product의 gel transfer, radioactivity 및 phosphorimaging을 필요로 하지 않는 장점을 갖는다 (Lo et al. 1997; 1998b).

모체의 혈액 내에 존재하는 태아 DNA의 양은 혈청과 혈장에 따라 약간 다르지만, Table 1과 같다. 즉, 임신에 따라 증가하며, 혈청보다는 혈장에 더 풍부하고, 상대적으로 매우 많은 양이고, 분만 후에는 급격하게 사라진다 (Lo et al. 1998b; Lee et al. 2001; Lee et al. 2002; Lo et al. 1999c).

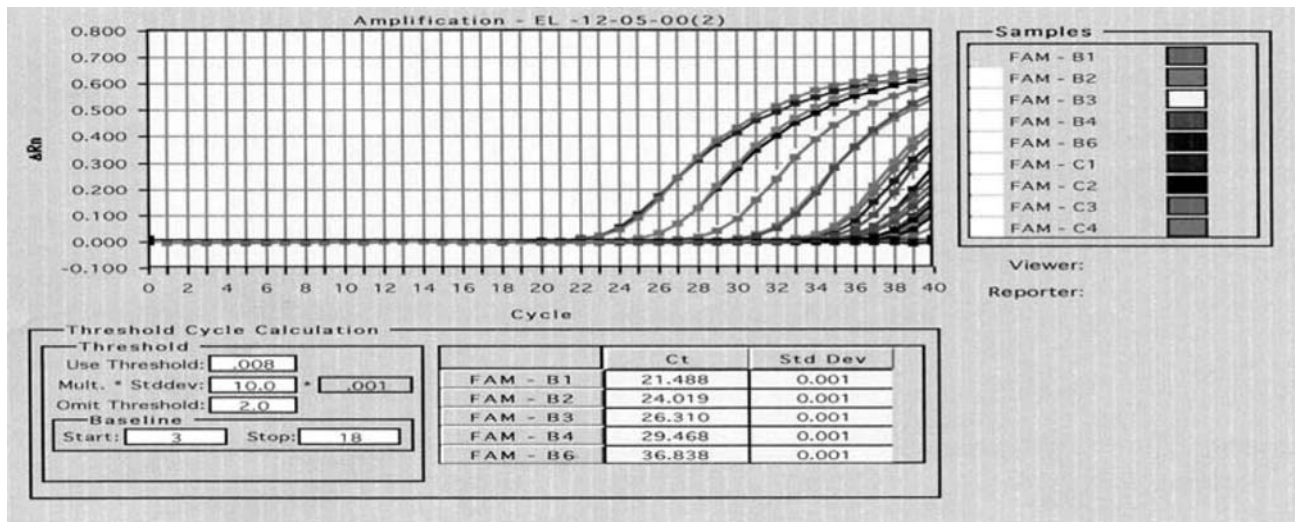


Fig. 1. Real time PCR is efficient because product amplification and detection steps are combined with optical system.

Table 1. The amount of fetal DNA in maternal plasma

	mean concentration of fetal DNA	
	serum	plasma
early pregnancy (11-17 weeks)	0.13%	3.4%
late pregnancy (37-43 weeks)	1.0%	6.2%

(Lo et al. Am J Hum Genetics 1998)

3) 태아 DNA는 어디로부터 오는가?

Lo 등은 Taq polymerase의 5'-3' exonuclease 활성도를 이용하는 실시간 정량 중합효소 분석법에 의해서 태아 DNA를 측정하여 임신 중 모체 혈청과 혈액에 태아 DNA가 다량 존재함을 보고하였다. Fetal DNA의 양은 임신초기에는 약 3.4%, 임신후기에는 약 6.2%로 많은 양이 존재하였고, 혈청에 비해 혈장에 더 많은 양이 있었다. 임신 중 모체의 혈액에 순환하는 태아세포가 약 1 ml의 모체혈액 당 1개라고 생각할 때 매우 많은 양의 태아 DNA가 존재함을 알 수 있다. 처음에는 모체 혈액 내에 들어온 태아 세포가 태아 DNA의 기원 (source)이라고 생각하였다. 사실 혈장내의 DNA는 세포사 (cell death)의 marker라고 설명되었기 때문에, 많은 연구자들이 모체 혈액에 순환하는 태아 세포가 모체의 면역계에 의해 파괴가 되고, 이 후 태아 DNA가 방출된다고 생각하였다. 임신중독증이나 태아 염색체이상과 같은 임신 합병증에서 모체 혈액내의 태아 세포와 태아 DNA가 모두 증가하기 때문에, Zhong 등은 남아를 임신한 정상 산모와 여러 가지 비정상 산모의 혈액을 얻어 태아 세포의 수와 태아 DNA 양과의 상관관계를 조사하였다. 태아 세포의 수는 X와 Y 특이 probe를 가지고 FISH (fluorescent in situ hybridization)를 이용하여 측정하였다. 측정 결과 정상 임신에서 태아 세포의 수와 태아 DNA의 양간에 상관관계가 없었으며, 임신중독증이나 조기진통을 가진 산모 그룹에서 세포와 DNA 간에 상관관계가 없었다. 특히, 조기진통 그룹에서는 태아 세포의 증가는 없었지만, 태아 DNA의 양은 현저히 증가하여 태아 세포의 수와 태아 DNA는 상관관계가 전혀 없었다 (Zhong et al. 2000a; 2000b). 최근 Guibert 등은 ART (Assisted Reproductive Technology)에 의해 임신이 된 산모의 혈액에서 배아이식 (embryo transfer) 후 18일부터 태아의 DNA가 발견됨을 보고하였고, 이것은 시기적으로 태아 DNA가 조혈모세포 같은 다른 태아세포들보다는 태반에서 유래한 영양배엽세포와 관련됨을 보여주는 것이었다. 한편, 태아 DNA는 양수를 비롯하여 (Bianchi et al. 2001), 산모의 소변, 산모의 척수, 산모의 복막액에서도 발견되어, 태아 자체로부터 직접 이동하였을 가능성도 보여 주었다 (Botezatu et al. 2000). 종합해보면, 임신 중 모체혈액에 존재하는 태아 DNA는 대부분 태반으로부터 기원하였고, 부분적으로 태아 조혈모세포 등의 apoptosis와 태아로부터 직접 이동에 의해 기원할 수 있다.

4) 임상 적용 (Clinical Application)

빠르고 쉽게 측정할 수 있는 태아 DNA는 또한 풍부하게 존재하므로 앞으로 비침습적 산전진단에 매우 유용하게 사용될 수 있다(Farina et al. 2002).

4-1) 태아성감별 (Gender detection)에 의한 산전검사

우선, 혈우병 A나 듀센형 근이영양증과 같은 X 염색체 열성 질환에서 linkage 분석과 같은 검사를 하기 전에 선별 검사로서 태아의 성을 쉽게 결정하는데 이용할 수 있다. 실시간 정량 중합효소반응법을 이용하면 임신 5주에 거의 100%에서 성을 결정할 수 있다 (Honda et al. 2002).

4-2) Fetal aneuploidy

다운증후군을 비롯한 염색체 이상을 조기에 진단할 수 있는 방법은 최대 관심사이다. 홍콩의 Lo 등과 보스턴의 Bianchi 등은 임신중기에 다운증후군을 임신한 산모와 정상 태아를 임신한 산모의 혈장에 존재하는 태아 DNA의 양을 측정하여 비교하였다. Lo 등은 다운 증후군에서 46.0 genome equivalents (GE)/ml, 정상 태아에서 23.3 GE/ml, Bianchi 등은 48.2 GE/ml와 16.3 GE/ml을 보고하여 다운증후군에서 태아 DNA가 산모의 혈장에서 약 2배 가량 더 많이 존재함을

보고하였다.

또한, Bianchi 등은 임신중기에 다운증후군 선별검사로 시행된 Quadruple test를 하고 남은 저장된 혈청을 가지고 태아 DNA를 측정하였다. 11예의 다운증후군 태아를 임신한 산모를 대상으로 하였고, 대조군으로 각각의 다운증후군 1예마다 산모의 임신주수와 혈청의 저장 기간 등을 맞추어 5쌍을 추출하여 실시간 정량 중합효소방법에 의해 태아 DNA의 양을 측정하여 비교한 결과, 다운증후군은 평균 41.2 GE/ml이었고, 정상산모는 평균 24.2 GE/ml였다. 다운증후군 그룹에서 P값이 0.005 이하로 유의있게 증가한 소견을 보였다. 이를 근거로 임신 중기에 산모의 혈청에서 시행하는 다운증후군 선별검사인 quadruple test (AFP, uE3, hCG, inhibin A)와 이 검사에 산모 혈청에서 태아 DNA의 양을 첨가하였을 때 각각에서 기대되는 태아 다운증후군 조기 진단율을 비교, 검토하였다. 5%의 위양성률을 고정시켰을 때, 약 5%의 진단율이 증가함을 보였다(81%에서 86%로). 앞으로 대규모 연구를 통해 유의있는 결과를 얻을 경우 태아 염색체 이상 조기 진단 선별 검사로서 태아 DNA가 중요한 역할을 할 수 있을 것이다 (Bianchi et al. 2002; Bianchi et al 1997; Chen et al. 2000; Frendo et al; 2000; Lo et al. 1999a; Ohashi et al. 2001; Zhong et al. 2001). 그 외에 trisomy 18과 13에 대한 보고도 있다 (Watananara et al. 2003).

4-3) 임신중독증의 위험을 가진 산모의 조기 검출

많은 연구는 임신중독증의 증상을 가진 산모가 정상 산모에 비해 약 5배 많은 태아 DNA를 가지고 있음을 보고하였다(381 GE/ml, 76 GE/ml). 또한, Lo 등은 태아 DNA가 임신중독증의 증상이 나타나기 전에 이미 증가되어 있음을 보고하여, 태아 DNA를 이용한 임신중독증 조기 발견 가능성을 제시한 바 있다. 최근, Levine과 Bianchi 등은 NICHD (National Institute of Child Health and Human Development)의 지원 하에 대규모 연구를 시행하였다. 임신 22주 전에 적어도 한 차례, 그리고 그 후 여러 차례 채혈을 통해 태아 DNA의 양을 측정하였다. 그 결과 임신 17주에, 그리고 임신 중독증의 증상이 나타나기 3주전에 정상 산모들에 비해 임신중독증을 가진 산모의 태아 DNA가 유의 있게 증가하는 것을 발견할 수 있었다. 즉, 임신중독증 산모에게서 2 단계에 걸쳐 태아 DNA가 증가하며, 이를 이용하여 임신중독증 조기 진단을 위한 선별검사를 개발할 수 있으리라 생각된다(Allaire et al. 2000; Diesch et al. 2006; Holzgreve et al. 1998; Holzgreve et al. 1999; Lo et al. 1999b).

4-4) 다른 임신 합병증 (other complication of pregnancy)

이 외에 태아 DNA의 양은 조기 진통(Bauer et al. 2006; Farina et al. 2005; Leung et al. 1998), 전치태반 및 임신오조 산모에서도 유의 있는 증가를 보였다. 이러한 결과는 산모의 혈청 및 혈장에 존재하는 태아 DNA가 태반에서 분비되는 것이라는 것을 간접적으로 의미하며, 이 후 임신 중 산모의 합병증을 조기에 진단하는 데 유용하게 사용되리라 생각된다.

4-5) 단일유전자 질환 (Single gene disorders)

Rh (D) 음성 여성이 Rh (D) 양성 남성과 임신한 경우에 산모의 혈액을 가지고 태아의 Rh (D) 유전형을 쉽게 검출할 수 있다. 예를 들어, Rh (D) 특이 서열 (sequence)을 제조하여 산모의 혈액에 이 서열의 유무를 확인하여 Rh (D) 유전자가 없다면 태아가 Rh (D) 음성이므로 더 이상의 검사가 필요가 없게 되는 것이다 (Faas et al. 1998; Bischoff FZ et al. 1999; Finning et al. 2002). 유럽에서는 현재 산모의 혈장에 존재하는 태아 DNA를 이용하여 비침습적인 방법으로 태아 Rh (D)의 유전형을 검출하여 산전진찰에 이용하고 있다. 이 외에 뒤센근이영양증 (DMD), 근위축증 (myotonic dystrophy), achondroplasia, congenital adrenal hyperplasia 등 단일유전자 질환에 산모의 혈액에 존재하는 태아 DNA를 이용한 산전

진단 방법이 보고되고 있다 (Amicucci et al. 2000; Chiu et al. 2002; Lajic et al. 1998; Li et al. 2007; New et al. 2001; Rijnders et al. 2001; Saito et al. 2000).

5) 태아 DNA의 한계점 (Limitation of clinical application using fetal DNA)

비침습적 방법으로 다양한 임상 적용이 가능한 태아 DNA는 매우 유용하며 이 후 많은 임상적 가치를 가질 것이다. 그러나, 현재까지 이용되고 있는 태아 DNA의 양을 측정하는 방법은 Y 염색체에 특이한 서열을 이용하고 있으므로 산모의 태아가 남아인 경우에만 적용 가능하다는 문제점을 가지고 있다. 이 후 태아의 성에 무관한 marker의 개발이 매우 시급하다. 상염색체 DNA 다형성 (autosomal DNA polymorphism), DNA 메틸화 (fetal epigenetic marker), 그리고 태반에 존재하는 유전자에서 발현된 mRNA의 양을 이용한 연구가 현재 진행 중이다.

5-1) Epigenetic marker

과거의 Y-specific 유전자는 male fetus에게만 적용되는 DNA이기 때문에 모든 태아에 적용 가능한 marker의 개발이 지속되어 왔다. 최근, epigenetic marker들이 보고되고 있는데, 태반에서는 hypomethylation되어 있고, 즉 태아의 DNA는 hypomethylation되어 있고, 산모의 세포는 hypermethylation되어 있는 maspin (SERPINB5)에 대한 보고가 있었으며, 완전히 반대인 RASSF1A tumor suppressor gene은 경우는 태반과 태아 DNA에서는 hypermethylation되어 있고, 산모의 세포는 hypomethylation되어 있어서 이를 이용한 진단이 이용되고 있다 (Bianchi 2006; Chan et al. 2006; Chim et al. 2005; Chiu et al. 2007; Lo et al. 2007; Lun et al. 2007; Tong et al. 2006; Tong et al. 2006a).

5-2) 태아 RNA

2000년 Chen 등은 유방암 환자의 혈액 내에 세포유리 RNA가 존재한다고 보고하였고 그 이후 다른 보고자들에 의해 보고되었다 (Chen et al. 2000; Dasi et al. 2001; Kopreski et al. 1999; Silva et al. 2001). RNA는 DNA에 비해 많은 장점을 갖게 된다. 태아 DNA는 근본적으로 모체와 태아가 그들의 genomic DNA 서열 중에서 1/2을 공유하고 있다는 점에서 한계를 갖는다. 즉, Y 염색체 등과 같이 부계로부터 유전된 태아에게만 존재하는 DNA를 이용할 때만이 가능하다. 그러나, 태아 RNA는 이러한 태아 DNA의 한계를 극복할 수 있다. 2000년 Poon 등은 최초로 태아 mRNA가 산모의 혈장에 존재함을 보고 하였고, 2002년 Tsui 등은 태아 mRNA가 매우 안정되게 (stable) 존재한다고 설명하였다. 2003년 Ng 등은 태반에 존재하는 특이 유전자, hCG (human chorionic gonadotropin)과 hPL (human placental lactogen)의 mRNA를 산모의 혈장으로부터 증폭하였고, 또한 같은 해 Ng 등은 산모의 혈장에서 부신피질 분비 호르몬 (corticotropin releasing hormone) locus의 mRNA를 증폭하여 임신성 고혈압 산모의 산전 진단에 이용하여 산모 혈장에 존재하는 태아 RNA를 임상에 적용하려는 시도를 하였다. 이 후, 태아에 특이한 유전자 발현의 측정은 태반 병리 (placental pathology)를 조기에 진단하는데 있어서 큰 역할을 할 것이다 (Gross et al. 2002; Halicka et al. 2000; Hasselmann et al. 2000; Ng et al. 2002; Poon et al. 2000; Rainen et al. 2002; Reider et al. 2001; Tsui et al. 2002). 최근 Tsui 등 (2004)은 microarray를 이용하여 placental specific mRNA transcripts를 얻고 특이 임신 합병증에 특이한 mRNA sequence를 이용한 임신 합병증의 조기 진단을 시도 하는 trial를 제시하였다 (Fig. 2, Tsui et al. 2004). 2007년 Lo 등은 Nature in medicine에 염색체 aneuploidy의 산전 진단에 있어서 산모의 혈장에 존재하는 태아 RNA의 대립형질 비율을 이용한 RNA-SNP를 이용한 진단 방법을 보고하였다(Fig. 3, Lo et al. 2007).

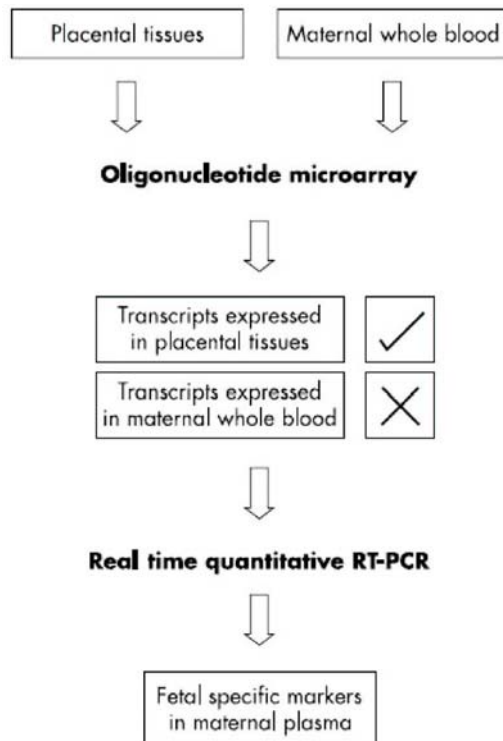


Fig. 2. Outline of the strategy used for the systematic identification of pregnancy specific placental expressed mRNA markers in maternal plasma. Paired placental tissues and maternal whole blood samples are collected and subjected to oligonucleotide microarray analysis. Transcripts with increased expression in the placental tissues relative to whole blood are selected and their detectability in maternal plasma and pregnancy specificity are evaluated by QRT-PCR on maternal plasma (Tsui et al. J Med Genet. 2004).

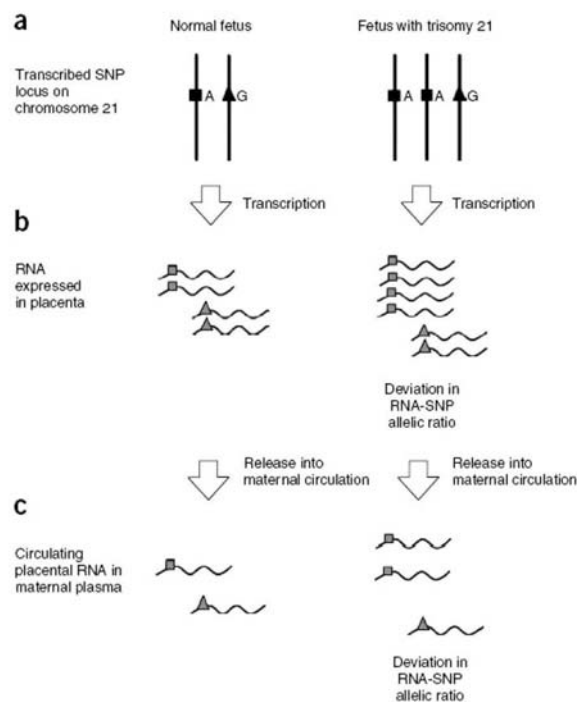


Fig. 3. Schematic of the RNA-SNP allelic ratio strategy for noninvasive detection of fetal trisomy 21 through maternal plasma analysis by the relative quantification of alleles of placenta-expressed transcripts located on chromosome 21. a) Normal and trisomy 21 fetuses heterozygous at the transcribed SNP locus of PLAC4. The fetus with trisomy 21 has an extra copy of the gene. "A" and "G" denote the respective alleles of the transcribed SNP. b) The gene is expressed in placental tissues and the resultant transcripts are allelic with respect to the SNP. The ratio of the two RNA alleles in a trisomy 21 placenta is expected to deviate from that of a normal placenta, as a result of the expression of an extra copy of the gene. c) The RNA transcripts are released into maternal blood and their relative abundance is reflective of that in the placenta. Thus, the plasma ratio of the two RNA alleles in a trisomy 21 pregnancy is expected to deviate from that of a normal pregnancy.

결 론

산모의 혈장 및 혈청 내에 존재하는 세포 유리화 태아 DNA 및 RNA를 이용한 새로운 산전 진단의 임상적인 적용이 가능하다. 특히, 임신중독증, 조기 진통, 조기 양수 파막과 같은 합병증이나, 다운증후군과 같은 염색체 이상을 조기에 발견 및 진단하는 진단용 kit를 개발하는 것에 이용될 것이다. 이러한 작업을 효과적으로 진행하기 위해서는

첫째로, 태아 DNA의 양이 실제로 정상 분만한 산모의 혈액과 합병증을 가진 산모의 혈액에서 다른지, 그리고 어느 임신시기부터 다르게 나타나는 것인가를 분석함으로써 두 그룹 간 차이를 보이는 태아 DNA의 값과 MoM 분석, 이후 Kaplan-Meier 생존 분석을 통하여 각 임신 산모의 임신중독증 및 조기진통 위험도를 구하는 시도가 이루어져야 한다.

둘째로, 최근 개발이 된 epigenic DNA marker와 mass spectrometry (Chow et al. 2007; Ding et al. 2006; Huang et al. 2006; Li et al. 2006)를 이용한 방법들에 대한 대규모 연구가 필요하며, 이러한 marker들과 임신 합병증과의 관련성이 규명되어야 한다.

셋째로, 대부분의 임신 합병증은 태반을 비롯한 모체와 태아의 복잡한 유전 변이가 관련되어 있을 것으로 생각되며, 특히 단일 유전자 변이보다는 다양한 유전자 변이가 병의 유발에 관련 되어 있는 것으로 추정된다. 이는 다양한 유전자 변이를 동시에 모니터할 수 있는 microarray 방법의 효과적 적용을 가능하게 하였고, 이 작업을 통해 얻어진 다양한 candidate 유전자들의 변화 양상을 임신 주기별로 측정하여 조기 진단에 이용할 수 있어야 하며, 이러한 노력들이 시도되어야 한다.

참고문헌

1. Allaire AD, Ballenger KA, Wells SR, McMahon MJ, Lessey BA. Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 271-276.
2. 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.
3. Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* 1999; 18: 65-73.
4. Bauer M, Hutterer G, Eder M, Majer S, Leshane E, Johnson KL, Peter I, Bianchi DW, Pertl B. A prospective analysis of cell-free fetal DNA concentration in maternal plasma as an indicator for adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn.* 2006 Sep; 26(9): 831-836.
5. Bianchi DW. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol* 1999; 105: 574-583.
6. Bianchi DW. Fetal DNA in maternal plasma: The plot thickens and the placental barrier thins. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 763-764.
7. Bianchi DW. Prenatal exclusion of recessively inherited disorders: should maternal plasma analysis precede invasive techniques? *Clin Chem* 2002; 48: 689-690.
8. Bianchi DW, Le Shane ES, Cowan JM. Large amounts of cell-free fetal DNA are present in amniotic fluid. *Clin Chem* 2001; 47: 1867-1869.
9. Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, Elias S, Holzgreve W, Evans MI, Dukes KA, Sullivan LM, Klinger KW, Bischoff FZ, Hahn S, Johnson KL, Lewis D, Wapner RJ, de la Cruz F. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: Analysis of NIFTY I data. *Prenat Diagn* 2002; 22: 609-615.
10. 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.
11. Bianchi DW. Will epigenetic allelic ratio analysis turn prenatal diagnosis of trisomy 18 on its EAR? *Clin Chem.* 2006 Dec; 52(12): 2182-2183.
12. Bischoff FZ, Nguyen DD, Marquez-Do D, Moise KF Jr, Simpson JL, Elias S. Noninvasive determination of fetal Rh (D) status using fetal DNA in maternal serum and PCR. *J Soc Gynecol Investig* 1999; 6: 64-69.

13. Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, Shelepov V, Alechina R, Molyaka Y, et al. Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. *Clin Chem* 2000; 46: 1078-1084.
14. Chan KC, Ding C, Gerovassili A, Yeung SW, Chiu RW, Leung TN, Lau TK, Chim SS, Chung GT, Nicolaides KH, Lo YM. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin Chem*. 2006 Dec; 52(12): 2211-2218. Epub 2006 Oct 26.
15. Chen CP, Chern SR, Wang W. Fetal DNA in maternal plasma: the prenatal detection of a paternally inherited fetal aneuploidy. *Prenat Diagn* 2000; 20: 353-357.
16. Chen XQ, Bonnefoi H, Pelte MF, Lyautey J, Lederrey C, Movarekhi S, et al. Telomerase mRNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3823-3826.
17. Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautey J, et al. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med* 1996; 2: 1033-1035.
18. Chim SS, Tong YK, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LY, Oudejans CB, Ding C, Lo YM. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 11; 102(41): 14753-14758.
19. Chiu RW, Lau TK, Cheung PT, Gong ZQ, Leung TN, Lo YM. Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study. *Clin Chem* 2002; 48: 778-780.
20. Chiu RW, Chim SS, Wong IH, Wong CS, Lee WS, To KF, Tong JH, Yuen RK, Shum AS, Chan JK, Chan LY, Yuen JW, Tong YK, Weier JF, Ferlatte C, Leung TN, Lau TK, Lo KW, Lo YM. Hypermethylation of RASSF1A in human and rhesus placentas. *Am J Pathol*. 2007 Mar; 170(3): 941-950.
21. Chow KC, Chiu RW, Tsui NB, Ding C, Lau TK, Leung TN, Lo YM. Mass spectrometric detection of an SNP panel as an internal positive control for fetal DNA analysis in maternal plasma. *Clin Chem*. 2007 Jan; 53(1): 141-142.
22. Dasi F, Lledo S, Garcia-Granero E, Ripoli R, Marugan M, Tormo M, et al. Real-time quantification in plasma of human telomerase reverse-transcriptase (hTERT) mRNA: a simple blood test to monitor disease in cancer patients. *Lab Invest* 2001; 81: 767-769.
23. de la Cruz F, Shifrin H, Elias S, Bianchi DW, Jackson L, Evans ML, et al. Low false-positive rate of aneuploidy detection using fetal cells isolated from maternal blood. *Fetal Diagn Ther* 1998; 13: 380.
24. Diesch CH, Holzgreve W, Hahn S, Zhong XY. Comparison of activin A and cell-free fetal DNA levels in maternal plasma from patients at high risk for preeclampsia. *Prenat Diagn*. 2006 Dec; 26(13): 1267-1270.
25. Ding C, Lo YM. MALDI-TOF mass spectrometry for quantitative, specific, and sensitive analysis of DNA and RNA. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Sep; 1075: 282-287.
26. Faas BHW, Beuling EA, Christiaens GCML, Von dem Borne AEGK, Van der Schoot CE. Detection of fetal Rh (D)-specific sequences in maternal plasma. *Lancet* 1998; 352: 1196.
27. Farina A, Caramelli E, Concu M, Sekizawa A, Ruggeri R, Bovicelli L, Rizzo N, Carinci P. Testing normality of fetal DNA concentration in maternal plasma at 10-12 completed weeks' gestation: a preliminary approach to a new marker for genetic screening. *Prenat Diagn* 2002; 22: 148-152.
28. Farina A, LeShane ES, Lambert-Messerlian GM, Canick JA, Lee T, Neveux LM, Palomaki GE, Bianchi DW. Evaluation of cell-free fetal DNA as a second trimester maternal serum marker of Down syndrome pregnancy. *Clin Chem* 2003; 49: 239-242.
29. Farina A, LeShane ES, Romero R, Gomez R, Chaiworapongsa T, Rizzo N, Bianchi DW. High levels of fetal cell-free DNA in maternal serum: a risk factor for spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol*. 2005 Aug; 193(2): 421-425.
30. Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 2002; 42: 1079-1085.
31. Frendo JL, Vidaud M, Guibourdenche J, Luton D, Muller F, Bellet D, Giovagrandi Y, Tarrade A, Porquet D, Blot P, Evain-Brion D. Defect of villous cytotrophoblast differentiation into syncytiotrophoblast in Down's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3700-3707.
32. Gross SJ, Ferreira JC, Morrow B, Dar P, Funke B, Khabele D, Merkatz I. Gene expression profile of trisomy 21 placentas: a potential approach for designing noninvasive techniques of prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 457-462.
33. Halicka HD, Bedner E, Darzynkiewicz Z. Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Exp Cell Res* 2000; 260: 248-256.
34. Hasselmann DO, Rapp G, Tilgen W, Reinhold U. Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum. *Clin Chem* 2001; 47: 1488-1489.
35. Holzgreve W, Ghezzi F, Di Naro E, Maymon E, Ganshirt D, Hahn S. Disturbed fetomaternal cell traffic in preeclampsia. *Obstet Gynecol*

- 1998; 91: 669-672.
36. Holzgreve W, Hahn S. Novel molecular biological approaches for the diagnosis of preeclampsia. *Clin Chem* 1999; 45: 451-452.
37. Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Samura O, Kinutani M, Hara T, Ohama K. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum Genet* 2002; 110: 75-79.
38. Huang DJ, Nelson MR, Zimmermann B, Dudarewicz L, Wenzel F, Spiegel R, Nagy B, Holzgreve W, Hahn S. Reliable detection of trisomy 21 using MALDI-TOF mass spectrometry. *Genet Med.* 2006 Nov; 8(11): 728-734.
39. Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1961-1965.
40. Lajic S, Wedell A, Bui TH, Ritzen EM, Holst M. Long-term somatic follow-up of prenatally treated children with Congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3872-3880.
41. Lee T, LeShane ES, Messerlian GM, Canick JA, Farina A, Heber WW, Bianchi DW. Down syndrome and cell-free fetal DNA in archived maternal serum. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 1217-1221.
42. Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion* 2001; 4: 276-282.
43. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37: 646-650.
44. Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, Lo YMD. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet* 1998; 352: 1904-1905.
45. Li Y, Page-Christiaens GC, Gille JJ, Holzgreve W, Hahn S. Non-invasive prenatal detection of achondroplasia in size-fractionated cell-free DNA by MALDI-TOF MS assay. *Prenat Diagn.* 2007 Jan; 27(1): 11-17.
46. 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 Oct; 27(19): 3889-3896.
47. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485-487.
48. Lo YMD, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, et al. Prenatal diagnosis of fetal Rh (D) status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 1998a; 339: 1734-1738.
49. Lo YMD, Lau TK, Chan LYS, Leung TN, Chang AMZ. Quantitative analysis of the bi-directional feto-maternal transfer of nucleated cells and plasma DNA. *Clin Chem* 2000b; 46: 1301-1309.
50. 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* 1999a; 45: 1747-1751.
51. Lo YMD, Leung TN, Tein MSC, Sargent IL, Zhang J, Lau TK, et al. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal plasma in pre-eclampsia. *Clin Chem* 1999b; 45: 184-188.
52. Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PMK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998b; 62: 768-775.
53. Lo YMD, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AMZ, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999c; 64: 218-224.
54. Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Heung MM, Gerovassili A, Jin Y, Nicolaides KH, Cantor CR, Ding C. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med.* 2007 Feb; 13(2): 218-223. Epub 2007 Jan 7.
55. Lun FM, Chiu RW, Leung TY, Leung TN, Lau TK, Lo YM. Epigenetic analysis of RASSF1A gene in cell-free DNA in amniotic fluid. *Clin Chem.* 2007 Apr; 53(4): 796-798.
56. Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C.R. Acad Sci Paris* 1948; 142: 241-243.
57. 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.
58. New MI, Carlson A, Obeid J, Marshall I, Cabrera MS, Goseco A., et al. Prenatal diagnosis for congenital adrenal hyperplasia in 532 pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5651-5657.
59. Ng EKO, Tsui NBY, Lam NYL, Chiu RWK, Yu SCH, et al. Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clin Chem* 2002; 48: 1212-1217.
60. 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.
61. Poon LLM, Leung TN, Lau TK, Lo YMD. Presence of fetal RNA in maternal plasma. Clin Chem 2000; 46: 1832-1834.
62. Rainen L, Oelmueller U, Jurgensen S, Wyrich R, Ballas C, Schram J, Herdman C, Bankaitis-Davis D, Nicholls N, Trollinger D, Tryon V. Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin Chem 2002; 48: 1883-1890.
63. Reimer T, Koczan D, Briesse V, Friesse K, Richter D, Thiesen HJ, Jeschke U. Absolute quantification of human chorionic gonadotropin beta mRNA with TaqMan detection. Mol Biotechnol 2000; 14: 47-57.
64. Rijnders RJ, van der Schoot CE, Bossers B, de Vroode MA, Christaens GC. Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. Obstet Gynecol 2001; 98: 374-378.
65. Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T. Prenatal DNA diagnosis from maternal plasma in the case of fetal achondroplasia. Lancet 2000; 356: 1170.
66. Silva JM, Dominguez G, Silva J, Garcia JM, Sanchez A, Rodriguez O, et al. detection of epithelial messenger RNA in the plasma of breast cancer patients is associated with poor prognosis tumor characteristics. Clin Cancer Res 2001; 7: 2821-2825.
67. Stroun M, Anker P, Maurice P, Gaban PB. Circulating nucleic acids in higher organisms. Int Rev Cytol 1977; 51: 1-48.
68. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, Rossier A, Chen XQ, Anker P. The origin and mechanism of circulating DNA. NY Acad Sci 2000; 906: 161-168.
69. Tong YK, Ding C, Chiu RW, Gerovassili A, Chim SS, Leung TY, Leung TN, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YM. Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: Theoretical and empirical considerations. Clin Chem. 2006 Dec; 52(12): 2194-2202. Epub 2006 Oct 13.
70. Tong YK, Lo YM. Plasma epigenetic markers for cancer detection and prenatal diagnosis. Front Biosci. 2006a Sep 1; 11: 2647-2656. Review.
71. Tsui NBY, Ng EKO, Lo YMD. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. Clin Chem 48: 1647-1653.
72. Tsui NB, Chim SS, Chiu RW, Lau TK, Ng EK, Leung TN, Tong YK, Chan KC, Lo YM. Systematic micro-array based identification of placental mRNA in maternal plasma: towards non-invasive prenatal gene expression profiling. J Med Genet. 2004 Jun; 41(6): 461-467.
73. Wataganara T, LeShane ES, Farina A, Messerlian GM, Lee T, Canick JA, Bianchi DW. Maternal cell-free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18. Hum Genet 2003; 112: 204-208.
74. Zhong XY, Burk MR, Troeger C, Jackson LR, Holzgreve W. Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. Prenat Diagn 2000a; 20: 795-798.
75. Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. Br J Obstet Gynaecol 2000b; 107: 766-769.
76. Zhong XY, Laivuori H, Livingston JC, Ylikorkala O, Sibai BM, Holzgreve W, Hahn S. Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia Am J Obstet Gynecol 2001; 184: 414-419.