

VU Research Portal

Fetal mRNA in maternal plasma

Go, A.T.J.I.

2009

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Go, A. T. J. I. (2009). *Fetal mRNA in maternal plasma: Development of a non-invasive prenatal test for trisomy 21 A quest of a Holy Grail*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, S.I.]. s.n.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Samenvatting

In de Westerse wereld is prenatale diagnostiek een integraal onderdeel geworden van verloskundige zorg. Om chromosoom afwijkingen bij de foetus te kunnen vaststellen is een invasieve procedure, zoals vruchtwaterpunctie of vlokken test, nodig om foetale cellen te verkrijgen. Het nadeel van deze testen is dat er een kans bestaat op een iatrogene miskraam. Foetale trisomie 21, samenhangend met oudere leeftijd van de zwangere, is de meest gangbare reden voor vrouwen om voor een invasieve prenatale test te kiezen. Het zou ideaal zijn als een niet-invasieve diagnostische test met dezelfde mogelijkheden als de huidige diagnostische test beschikbaar zou zijn. Al tientallen jaren geldt de ontwikkeling van een dergelijke diagnostische test als een zeer uitdagend onderzoeksdoel.

Aanwezigheid van foetale cellen in de moederlijke circulatie is intensief bestudeerd, maar het is niet mogelijk gebleken een test te ontwikkelen die geschikt is voor grote groepen. In het bloed van zwangere vrouwen kan ook foetaal DNA en placenta mRNA gedetecteerd worden. Dit foetaal genetische materiaal blijkt een reservoir van mogelijke biomarkers, waarmee een niet-invasieve prenatale test ontwikkeld zou kunnen worden met diagnostisch potentieel. In dit proefschrift zijn de studies gericht op ontwikkeling van een robuuste, niet-invasieve prenatale test voor foetale trisomie 21, waarbij gebruik gemaakt wordt van moederlijk bloed (plasma) dat is afgenomen in het late eerste of vroege tweede trimester van de zwangerschap; bij voorkeur gemakkelijk te implementeren en tegen redelijke kosten.

Hoofdstuk 1 geeft een korte introductie over invasieve en niet-invasieve prenatale testen, met het accent op trisomie 21 en beschrijft de hoofdlijnen van het proefschrift.

In **hoofdstuk 2** worden de cellulaire oorsprong, biologische eigenschappen en klinische mogelijkheden van celvrije foetale nucleïne zuren, van zowel DNA als mRNA, aanwezig in moederlijk plasma en serum tijdens zwangerschap beschreven. Voor klinische toepassing van celvrij foetaal DNA in de moederlijke circulatie kunnen twee benaderingen worden onderscheiden, een geslacht afhankelijke en een polymorfisme afhankelijke benadering. Beide benaderingen hebben hun weg naar de kliniek reeds gevonden. Door gebruik te maken van niet-invasieve geslacht bepaling, bijvoorbeeld op indicatie van congenitaal bijnier hypertrofie, kan een invasieve procedure vermeden worden en zo kan het aantal zwangerschappen dat risico op een miskraam loopt verminderd worden. Een voorbeeld van een polymorfisme afhankelijke benadering is de bepaling van foetaal Rhesus D genotypering bij Rhesus D negatieve zwangere vrouwen.

In **hoofdstuk 3** worden de meest recente technische mogelijkheden voor niet-invasieve aneuploidie testen, gebaseerd op celvrij foetaal DNA en placenta mRNA in moederlijk plasma, besproken. In kleine studies en model systemen zijn strategieën en technieken met hun resultaten beschreven. De RNA-SNP allel ratio strategie lijkt op dit moment de meest haalbare test met de gewenste eigenschap dat de uitslag gebaseerd is op specifiek foetaal genetisch materiaal, maar met het nadeel dat de test polymorfisme afhankelijk is. Het combineren van verschillende markers kan helpen om de populatie dekking te bevorderen. Deep sequencing is veel belovend, maar op dit moment te arbeidsintensief voor klinische implementatie en bovendien zijn de kosten zeer hoog. Een groot voordeel echter is dat de test geslacht en polymorfisme onafhankelijk is en dat verschillende aneuploidieën tegelijkertijd getest kunnen worden.

Hoofdstukken 4 tot 10 bevatten studies die gericht zijn op verschillende aspecten van het ontwikkelen van een klinische test voor de detectie van trisomie 21, gebruikmakend van mRNA in moederlijk plasma. Aan het begin van het onderzoek hebben we criteria gedefinieerd waaraan markers voor trisomie 21 detectie zouden moeten voldoen: een kandidaat gen moet:

1. Gelokaliseerd zijn op chromosoom 21.
2. gelokaliseerd zijn in de Down syndrome critical region (DSCR).
3. tot expressie komen in eerste trimester normaal placenta weefsel.
4. over-expressie vertonen in moederlijk plasma tijdens in de jonge zwangerschap.
5. afwezig zijn in plasma van niet-zwangere vrouwen.

Verwijderd: .

In **hoofdstuk 4** wordt detectie van chromosoom-21 coderend mRNA afkomstig van placenta weefsel onderzocht in plasma, afgenomen in het eerste trimester van de zwangerschap. Het doel was om potentiële markers te vinden, bruikbaar voor prenatale testen gericht op trisomie 21. Plasma samples werden verkregen door middel van bloedafname bij zwangere vrouwen tussen 9 en 13 weken zwangerschapsduur. RNA werd geïsoleerd uit 800 en 1600 µL plasma met behulp van DNA/RNA bindende silica kolommen, behandeld met DNase en met behulp van een gevoelige methode omgezet in een DNA kopie en miljoenvoudig geamplificeerd met behulp van een PCR reactie. Drie genen die voldeden aan de bovengenoemd criteria werden verder getest. Eén van deze chromosoom-21 coderende genen, LOC90625, vertoonde sterke expressie in eerste trimester placenta weefsel en werd geselecteerd voor verdere analyse in plasma. RNA van LOC90625 bleek aanwezig in eerste trimester plasma samples. Het kon worden gedetecteerd in 60% van de samples met moederlijk plasma indien 800 µL plasma werd gebruikt en in 100% van de samples indien 1600 µL plasma werd gebruikt.

Detectie van chromosoom-21 coderend mRNA afkomstig van placenta en aanwezig in moederlijk bloed tijdens het eerste trimester van de zwangerschap zou de ontwikkeling van een prenatale test voor foetale trisomie 21 detectie mogelijk kunnen maken. LOC90625 lijkt een goede kandidaat voor dit doel.

In **hoofdstuk 5** werd een groot panel van mogelijke markers met bewezen of verwachte expressie in de vroege placenta en verspreid gelokaliseerd op alle chromosomen behalve het Y chromosoom getest op aanwezigheid in vroeg placenta weefsel en detecteerbaarheid in plasma van zwangere en van niet-zwangere vrouwen. In deze set zijn genen opgenomen coderend voor transcriptie factoren, genen onderhevig aan genomisch imprinting, genen die wel RNA maar geen eiwit maken (niet-coderend RNA) and andere genen met lage of sterke expressie in trofoblast cellen. RNA werd geëxtraheerd uit 1600 µL moederlijk plasma door isolatie via binding aan silica kolommen gebruikmakend van het QIAamp MinElute Virus Vacuum systeem (Qiagen) met enige aanpassingen. De detectie werd uitgevoerd zoals eerder beschreven; voor een aantal groepen genen echter werd het aantal PCR cycli opgehoogd naar 50. Drie patronen werden onderscheiden. Patroon C werd gedefinieerd als de detecteerbaarheid in plasma van zwangere vrouwen en het niet detecteerbaar zijn in plasma van niet-zwangere vrouwen (positief/negatief). Dit was het gewenste patroon en werd bij acht genen gevonden. Twee van deze genen (GCM1 en ZDHHC1) coderen voor transcriptie factoren. In deze studie kon worden aangetoond dat met deze benadering snelle screening van een grote set van potentieel nieuwe markers mogelijk is en dat het tevens mogelijk is om markers op te sporen die niet zouden worden gedetecteerd met conventionele op antilichaam gebaseerde assays. Op deze wijze kan het aantal markers dat beschikbaar is voor niet-invasieve prenatale testen enorm worden uitgebreid. De zoektocht naar mogelijke markers wordt verder uitgebreid in **hoofdstuk 6**. Een nieuwe methode werd getest om syncytiotrophoblast afkomstige RNA producten in vitro te identificeren. RNA werd verkregen door middel van selectieve en gecontroleerde denudatie (chemisch afpellen) van syncytiotrophoblast cellen van vroeg tweede trimester placenta weefsel en vervolgens geanalyseerd door cDNA klonering en 'microarray profiling'. Wegens het overschot aan 5'mRNA fragmenten zonder poly A staart, werden de placenta RNA producten geamplificeerd middels polymerase gemedieerde 'tailing' waarbij een methode gebruikt werd die oorspronkelijk ontwikkeld was voor kleine microRNAs. Het RNA verkregen via denudatie is representatief voor het RNA dat tot expressie komt door en vrij wordt gemaakt uit placenta syncytiotrofoblast cellen zoals kan worden afgeleid uit de aanwezigheid van transcripten met hoge en lage expressie; zoals hPL en LOC90625 die betrouwbaar voor en na

amplificatie verkregen konden worden. Het geïsoleerde RNA kan toegepast worden voor cDNA synthese inclusief cDNA synthese van kleine RNAs. De 95bp microRNA voorloper van hsa-MiR-141 kan correct en consistent worden geïdentificeerd na cDNA synthese en klonering. Geconcludeerd kan worden dat deze opzet indien gecombineerd met brede screening middels de daarvoor beschikbare DNA technieken een nieuwe in vitro methode is om syncytiotrophoblast-afgeleide RNA producten representatief voor trisomie 21 placenta RNA, zoals aanwezig in vivo in moederlijk plasma, te screenen.

Het mRNA van LOC90625, tegenwoordig C21orf105 geheten, was als marker voor een niet-invasieve test voor trisomie 21 de meest veelbelovende kandidaat. In de studie die in **hoofdstuk 7** wordt beschreven werd C21orf105 getest in moederlijk plasma van vrouwen die zwanger waren van foetus met en zonder trisomy 21. Gebruikmakend van kwantitatieve RT-PCR werden de expressie en het niveau daarvan van het doelwit gen (C21orf105) en van het referentie gen (hPL) in eerste trimester plasma samples bepaald. Plasma werd verkregen uit EDTA bloed dat bij een zwangerschapsduur tussen 9 en 15 weken was afgenomen en na twee opeenvolgende centrifugatie stappen werd opgeslagen bij -70°C. Na RNA extractie werd kwantitatieve RT-PCR uitgevoerd gebruikmakend van Taqman probes. Van de 51 samples waren 43 samples conclusief. Vergelijking van de expressie in moederlijk plasma van C21orf105 in beide groepen vertoonde geen significante verschillen. Ook indien berekend als ratio, hPL/C21orf105, bleven de verschillen tussen trisomie 21 en normale zwangerschappen niet significant. Geconcludeerd werd dat de hoeveelheid C21orf105 mRNA in moederlijk plasma, ondanks het feit dat het in de Down syndrome critical region op chromosome 21 gelokaliseerd is en opgereguleerd in trisomie 21 placenta's, niet hoger was in plasma van vrouwen die een zwangerschap droegen met een foetus met trisomie 21.

In dezelfde tijd werd een andere strategie ontwikkeld en beschreven, de RNA 'single-nucleotide polymorphism' (SNP) allelic ratio strategie. Volgens deze strategie wordt door kwantitatieve vergelijking van de allel expressie ratio van een chromosoom-21 gecodeerd gen (die voldoet aan de eerder genoemde criteria voor een trisomie 21 marker) detectie van het verschil tussen 2 en 3 kopieën van chromosoom 21 mogelijk gemaakt. Vanwege het feit dat polymorfisme de essentie is van het onderscheidend vermogen, is de RNA-SNP allel ratio strategie alleen informatief bij een deel van de populatie met een heterozygotie voor de gebruikte SNP. Theoretisch kan populatie dekking worden vergroot door de resultaten van de verschillende markers te combineren. Om deze reden werd de beschikbaarheid van potentieel bruikbare SNPs bestudeerd. In **hoofdstuk 8** worden 44 SNPs zoals aanwezig op 7

chromosoom 21- coderende, placentaspecifieke genen getest op hun mogelijke toepasbaarheid voor niet-invasieve prenatale diagnostiek. Bloed monsters werden verzameld in EDTA en PAX gene buizen. In de beoogde transcriptie gebieden werden 44 SNPs geïdentificeerd. Nagestreefd werd om de primers benodigd voor deze SNPs op gelijke thermodynamische eigenschappen uit te kiezen opdat RT-PCR in een enkele run kon worden uitgevoerd. Alle primers zijn intron spanning, behoudens de primers van PLAC4. Gebruikmakend van gevoelige, betrouwbare methode werd de marker set getest in placenta weefsel, plasma van zwangere en van niet-zwangere vrouwen. Van het RNA dat geïsoleerd werd uit volbloed, afgenomen in de PAX gene buizen, voldeed geen enkele SNP aan het criterium afwezig in bloed van niet-zwangere vrouwen. Door middel van identieke analyse van hPL RNA kon fout-positiviteit uitgesloten worden; in RNA verkregen uit volbloed in PAXgene buizen, bleek deze marker duidelijk aanwezig en afwezig in monsters afgenomen bij respectievelijk zwangere en niet-zwangere vrouwen. Gebruik van PAX gene buizen in prenatale diagnostiek lijkt beperkt te zijn tot genen met grote verschillen in relatieve expressie tussen placenta weefsel en moederlijke bloed cellen. Gebruik makend van RNA geïsoleerd uit het plasma afgenomen in EDTA buizen, waren 5 van de 44 SNP markers detecteerbaar in moederlijk plasma en afwezig in niet zwanger plasma. Dit resultaat maakt een specifiekere op bewijs gebaseerde meer evidence-based keuze van kandidaat genen (markers) mogelijk met het doel populatie dekking te verhogen.

In de RNA-SNP allel ratio studie van Lo *et al* is de gebruikte assay gebaseerd op verlenging van de polymorfe plaats om een klein maar zeer specifiek allel afhankelijk verschil in grootte te bewerkstelligen. Voor deze benadering is zeer gespecialiseerde techniek en apparatuur nodig, die implementatie op grote schaal voor de dagelijkse diagnostische routine bemoeilijkt. In **hoofdstuk 9** passen we de Transgenomic WAVE System en de quencher extension (QEXT) techniek toe om heterozygotie en allel ratio van placenta transcripts te bepalen. SNP (rs217247) in exon 2 van het in placenta weefsel tot expressie komende, chromosoom 21- coderende C21orf105 gen werd getest in een trisomie 21 model systeem. Hiertoe werd RNA, selectief verkregen uit syncytiotrophoblast van normaal en trisomie 21 placenta weefsel, bevestigd door middel van karyotypering, verzameld in het late eerste trimester. Een exacte overeenkomst werd gevonden tussen de resultaten van identificatie van heterozygote samples gebaseerd zowel op sequencing als van de WAVE System. Wat betreft de benodigde tijd om de test uit te voeren, was het WAVE systeem beter. Ten tweede, na optimalisatie en validatie met behulp van ijklijnen bestaande uit cDNA fragmenten (262 bp) van C21orf105, was de real-time QEXT zeer accuraat in bepaling van allel ratios na optimalisatie van de zuivering

stappen, hoeveelheid benodigd DNA, concentraties van labels, en computer analyse. Ten derde onderscheid de geoptimaliseerde en gevalideerde QEXT assay correct normale van trisomie 21 placenta's zoals werd getest in klinisch relevante combinaties: diploid homozygoot (CC), diploid heterozygoot (AC), triploid homozygoot (AAA), triploid heterozygoot (ACC of AAC). Concluderend: de QEXT methode, die direct toegepast kan worden op de huidige real-time PCR apparatuur, gecombineerd met snelle identificatie van informatieve monsters door middel van de WAVE system, kan implementatie van de RNA-SNP strategie voor niet-invasieve, aneuploidie diagnostiek in de dagelijkse praktijk vergemakkelijken.

Ten slotte wordt in **hoofdstuk 10** de quencher extension techniek uitgetest in klinische samples om trisomie 21 plasma samples van controle samples te onderscheiden. Ondanks het feit dat het geteste aantal laag is, kon als 'proof of principle' aangetoond worden dat de allel ratio strategie ook uitgevoerd kan worden met een minder bewerkelijke assay.