Detection of Cell-Free Fetal DNA in Plasma of Pregnant Women Using Multiplex Quantitative Fluorescent - Polymerase Chain Reaction

Thesis

Submitted To the Faculty of Medicine, Ain Shams University,

In Partial Fulfillment of

M.D. Of Obstetrics & Gynecology

By

Eman Mohamed Galal Mohamed Kamel Shahin
M.B. B.Ch – Cairo University
M.Sc.O. &G. – Cairo University
Assistant researcher of Gynecology and Obstetrics
Community Medicine Department
Medical Division
National Research Center

Supervised by

Prof. Dr.\ Mahmoud Ali Ahmed Alshorbagy
Professor of Obstetrics & Gynecology
Faculty of medicine
Ain Shams University

Prof. Dr.\ Maged Ramadan Abo Seeda
Professor of Obstetrics & Gynecology
Faculty of medicine
Ain Shams University

Assistant Prof. Dr.\ Waleed Hitler El-Tantawy
Assist. Professor of Obstetrics & Gynecology
Faculty of medicine
Ain Shams University

Assistant Prof. Dr.\ Osama Mahmoud Azmy
Assist. Professor of Obstetrics & Gynecology
Community Medicine Department
Medical Division
National Research Center (NRC)

Dr.\ Wa'el Tharwat Algarf
Lecturer of molecular genetics
Medical Biotechnology Department
Genetic Engineering and Biotechnology Division
National Research Center (NRC)

Department of Gynecology and Obstetrics
Faculty of Medicine
Ain Shams University
2006

INTRODUCTION

Most chromosomal anomalies with congenital defects at birth are trisomy 21, 18, 13 or monosomy X (1). As a composite and complete treatment of multiple anomalies is virtually impossible, the best way to manage such defects is by a prenatal diagnosis of the problem. However, conventional methods of obtaining fetal tissues for genetic analysis, including amniocentesis, chorionic villus sampling and cordocentesis, are invasive and all encompass a potential danger of fetal injury, infection and pregnancy failure (2). Furthermore, culture and analysis of fetal cells is time consuming (the results are available about two weeks after invasive testing) and labour intensive (3).

The multiple marker combination with the highest screening performance currently available is alpha-fetoprotein (AFP), unconjugated estriol (uE3), human chorionic gonadotropin (hCG), and inhibin A, together with maternal age (so-called quad marker test). With this combination, a detection rate of 80% at a 5% false positive rate is achieved (4). For these reasons, there is a need for a non-invasive, accurate, and fast method for a prenatal diagnosis, and the importance of a prenatal diagnosis using fetal cells in the maternal peripheral blood has attracted a great deal of attention(5).

It has been a long-sought goal in human genetics to develop methods of obtaining fetal genetic materials for analysis. One approach that has been extensively investigated over the past few decades is the isolation of fetal cells from maternal blood (6). However, the rarity of such circulating fetal cells has limited the development and practical use of this approach (7).

In 1997, Lo et al. discovered that cell-free fetal DNA is present in the plasma and serum of pregnant women (8). Fetal DNA is present in maternal plasma from the first trimester onwards, with concentrations that increase with progressing gestational age (9). After delivery, fetal DNA is cleared very rapidly from the maternal plasma (10). Fetal DNA is present in maternal plasma in a much higher fractional concentration than fetal DNA in the cellular fraction of maternal blood (9). This important feature has made the robust detection of fetal DNA possible, even without special enrichment procedures (11).

The first marker that was developed for fetal DNA detection in maternal plasma was the Y chromosome, which is present in male fetuses. The robustness of Y chromosomal markers has been reproduced by many workers in the field. This approach constitutes a highly accurate method for the determination of fetal gender, which is useful for the prenatal investigation of sex-linked diseases.

Maternal plasma DNA analysis is also useful for the noninvasive prenatal determination of fetal RhD blood group status in RhD-negative pregnant women. This approach has been shown by many groups to be highly accurate, and has been introduced as a routine service by the British National Blood Service since 2001. The latter development is important because this is the first routine use of noninvasive DNA-based prenatal diagnosis.

More recently, maternal plasma DNA analysis has been shown to be useful for the noninvasive prenatal exclusion of fetal ß-thalassemia major. A similar approach has also been used for prenatal detection of the HbE gene.

Advances in molecular technology have led to the introduction of quantitative fluorescent polymerase chain reaction (qf-PCR), which can provide diagnosis of the common autosomal aneuploidies—trisomies 21, 18, and 13; all sex chromosome aneuploidies; and triploidy within two days of sampling (12). Furthermore, one technician can examine up to 5000 samples a year.

In Feb. 2006, Lyn S Chitty et. al., provided supportive evidence for the recommendation of the UK National Screening Committee that, in newly established screening programmes for trisomy 21, rapid aneuploidy diagnosis alone may be offered (3). An advantage of replacing full karyotyping by qf-PCR is the substantially lower economic cost (13). Additionally, such a policy can have considerable benefits to women and their partners, as early availability of results reduces anxiety and allows for earlier decision making in cases in which the fetus has a significant abnormality (14).

Furthermore, the need for further investigations revealed by detecting chromosomal rearrangements of little or no clinical significance can be avoided, as can the anxiety this causes. In some of their cases the degree of anxiety was high enough for the parents to elect to terminate the pregnancy without waiting for the results of further investigations, which may have shown a normal karyotype. As shown in one study, about 10% of cases with an abnormal chorionic villous sampling karyotype result have no risk or only a small risk of a clinically significant fetal abnormality (3).

The discovery of cell-free fetal DNA and RNA in maternal plasma has opened up new possibilities for noninvasive prenatal diagnosis. Over the past 7 years significant progress has been made in our understanding of the biology and diagnostic implications of fetal nucleic acids in maternal plasma. It is hoped that further developments over the next few years will enable obstetricians to move even closer to the goal of widespread use of noninvasive nucleic acid-based prenatal diagnosis (11).

Aim of Work:

To test the sensitivity and specificity of retrieved fetal DNA from maternal circulation in the first and second trimester for future use in clinical practice as a safe non-invasive prenatal diagnostic tool.

Materials & Methods:

Peripheral blood samples will be taken from 25 pregnant women in the first and second trimester, Cell-free plasma samples are obtained by centrifugation of the whole blood at 1600*g* for 10 min. The supernatant is collected and centrifuged at 16000*g* for 10 min to remove all remaining cells. Finally, the plasma, free of blood cells, is removed from the micro-centrifuge tubes and stored at -80 °C.

DNA is extracted by use of the QIA-amp DNA Blood Kit (Qiagen) according to the manufacturer's "Blood and Body Fluid Spin Protocol".

QF-PCR assays are set up using selected highly polymorphic STR markers (two on each chromosome) for Chromosomes X, Y, 21, 18 and 13.

QF-PCR amplification is standardized for all reactions in a final volume of 25 ul containing 4 ul of extracted DNA, 200 umol/l dNTP, 4-35 pmol of each primer, 2 mmol/l MgCl2 in 1XTaq buffer and 1 U Taq Polymerase. PCR is performed on GeneAmp 9700 (ABI, Foster city, CA USA). After denaturation, capillary electrophoresis will be carried out in denaturing conditions using ABI 310 Genetic analyzer (ABI, Foster city, CA USA). Analysis of the results and calculation of peak areas are performed using GeneScan Software 3.2 (ABI, Foster city, CA USA).

References:

1 - Hook KB. Rates of chromosome abnormalities at different maternal ages. Obstet Gynecol 1981;58:282-5.

2 - Yang YH. Park Y\V, Clio JS. Chorionic villus Sampling: Clinical experience of the initial 750 cases. J Obstet Gvnaecol Res 1996;22:'143-9.

3 - Lyn S Chitty, Karl O Kagan, Francisca S Molina, Jonathan J Waters, Kypros H Nicolaides, Fetal nuchal translucency scan and early prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities by rapid aneuploidy screening: observational study. BMJ 2006; 332:452-455.

4 - Jacob A. Canick PhD, and Andrew R. MacRae PhD. Second Trimester Serum Markers. Seminars in Perinatology, Volume 29, Issue 4 , August 2005, Pages 203-208

5 - Yang YH, Kim SH, Yang ES, Kim SK, Kim IK, Park YW, Cho JS, Lee YH. Prenatal diagnosis of fetal trisomy 21 from maternal peripheral blood. Yonsei Med J. 2003 Apr 30; 44(2):181-6.

6 - Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF, Knoll JH, Latt SA Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87:3279–3283.

7 - Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, Elias S, Holzgreve W, Evans MI, Dukes KA, et al. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. National Institute of Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study. Prenat Diagn., 2002; 22:609–615.

8 - 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.

9 - Lo YMD, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, Wainscoat JS, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. Am J Hum Genet., 1998; 62:768–775.

10 - Lo YMD, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. Am J Hum Genet., 1999; 64:218–224.

11 - Y.M. Dennis Lo. Recent Advances in Fetal Nucleic Acids in Maternal Plasma. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2005 Volume 53 (3): 293-296**.**

12- Levett LJ, Liddle S, Meredith R. A large-scale evaluation of amnio-PCR for the rapid prenatal diagnosis of fetal trisomy. *Ultrasound Obstet Gynecol,* 2001;17: 115-8.

13 – Grimshaw GM, Szczepura A, Hulten M, MacDonald F, Nevin NC, Sutton F, et al. Evaluation of molecular tests for prenatal diagnosis of chromosome abnormalities. *Health Technol Assess,* 2003; 7(10): 1-146.

14 – Leung WC, Lam YH, Wong Y, Lau ET, Tang MHY. The effect of fast reporting by amnio-PCR on anxiety levels in women with positive biochemical screening for Down syndrome—a randomized controlled trial. *Prenat Diagn*, 2002;22: 256-9.

كشف الحامض النووي الحر للجنين من بلازما السيدات الحوامل بوساطة التحليل الكمي الوامض التعددي – لسلسلة البوليمراز التفاعلية

رسالة

مقدمة لكلية الطب جامعة عين شمس إيفاءا جزئيا لشروط الحصول على درجة الدكتوراه في أمراض النساء والتوليد

من

إيمان محمد جلال محمد كامل شاهين
بكالوريوس الطب والجراحة – جامعة القاهرة
ماجستير أمراض النساء والتوليد – جامعة القاهرة
باحث مساعد بقسم طب المجتمع
الشعبة الطبية
المركز القومي للبحوث

تحت إشراف

الأستاذ الدكتور / محمود علي أحمد الشوربجي
أستاذ أمراض النساء والتوليد
كلية الطب – جامعة عين شمس

الأستاذ الدكتور/ ماجد رمضان أبو سعده
أستاذ أمراض النساء والتوليد
كلية الطب – جامعة عين شمس

الأستاذ الدكتور المساعد/ وليد ستار الطنطاوي
أستاذ أمراض النساء والتوليد المساعد
كلية الطب – جامعة عين شمس

الأستاذ الدكتور المساعد/ أسامة محمود عزمي
أستاذ أمراض النساء والتوليد المساعد
قسم بحوث طب المجتمع
الشعبة الطبية
المركز القومي للبحوث

الدكتور/ وائل ثروت الجرف
مدرس الوراثة الجزيئية
قسم التكنولوجيا الطبية الحيوية
شعبة الهندسة الوراثية والبيوتكنولوجي
المركز القومي للبحوث

قسم أمراض النساء والتوليد
كلية الطب
جامعة عين شمس
٢٠٠٦

كشف الحامض النووي الحر للجنين من بلازما السيدات الحوامل
بوساطة التحليل الكمي الوامض التعددي – لسلسلة البوليمراز التفاعلية

مقدمة البحث:

تشكل حالات تثلث الصبغيات ١٣,١٨,٢١ مع أحادية الصبغيات X معظم حالات اختلال الصبغيات في العيوب الخلقية عند الولادة.وبما أن العلاج المركب والكامل للانحرافات المتعددة عمليا مستحيل ,فإن الطريق الأمثل لترويض مثل هذه العيوب يكون بتشخيص المشكلة قبل الولادة. ومن ناحية أخرى, فإن الطرق التقليدية للحصول على الأنسجة الجنينية للتحليل الجيني شاملة بزل السائل الأمنيوسي, وعينة من الزغابة المشيمية, وبزل للحبل السري كلها طرق غزوية وتنطوي على خطورة كامنة لإيذاء الجنين وتلوث السائل الأمنيوسي وأيضا فشل الحمل. علاوة على ذلك فإن استنبات وتحليل خلايا الجنين يستهلك الكثير من الوقت والجهد.

مجموعة الدلالات المتعددة ذات أعلى أداء مسحي المتاحة هي
Alpha-Fetoprotein (AFP), unconjugated estriol (uE3), human chorionic gonadotropin (hCG), and inhibin A
معا بالإضافة إلى سن الأم (ما يسمى باختبار الدلالات الرباعية). مع هذه المجموعة يكون معدل الكشف حوالي ٨٠% مع ٥% معدل إيجابي زائف. لهذه الأسباب مجتمعة يزداد الاحتياج إلى وسيلة سريعة دقيقة وأيضا غير غزوية للتشخيص قبل الولادة. وأهمية التشخيص قبل الولادة قد جذبت الاهتمام بشكل مؤثر.

كان إنماء طرق الحصول على عينات الوراثة الجنينية للتحليل هدفا بعيدا للوراثة البشرية. في البضعة عقود الأخيرة هناك وسيلة وضعت نصب البحث الواسع وهي عزل الخلايا الجنينية من دم الأم. ولكن من ناحية أخرى وقفت ندرة هذه الخلايا حائلا دون التطور والاستخدام العملي لهذه الوسيلة.

في عام ١٩٩٧ اكتشف لو وزملائه أن الحامض النووي الجنيني الحر متواجد بالبلازما والسيرم للأم الحامل. يتواجد الحامض النووي الجنيني في بلازما الأم بدءا من الثلاثة أشهر الأولى للحمل وذلك بتركيزات تتزايد مع تقدم عمر الحمل. تقل هذه التركيزات إلى أن ينعدم وجود الحامض النووي الجنيني في بلازما الأم بعد الولادة بسرعة. يتواجد الحامض النووي الجنيني في بلازما الأم بتركيزات أعلى كثيرا منه في الجزء الخلوي من دم الأم. جعلت هذه السمة الهامة من كشف الحامض النووي الجنيني ممكنا وحتى بدون تقنيات إنمائية خاصة.

كانت الدلالة الأولى في تطور كشف الحامض النووي الجنيني في بلازما الأم هي صبغية Y التي تتواجد في الأجنة الذكور. تكاثرت قوة دلالات الصبغية Y بوساطة العديد من العاملين في هذا المجال. تؤلف هذه الوسيلة طريقة عالية الدقة لتحديد جنس الجنين مما يساعد في تحري الأمراض المرتبطة بالجنس فيما قبل الولادة.

يفيد تحليل الحامض النووي الجنيني الموجود ببلازما الأم أيضا في تحديد فصيلة دم الجنين من حيث عامل الريزس في حالة كون الأم سلبية الفصيلة بطريقة غير غزوية. وقد أوضحت العديد من مجموعات العمل أن هذه الوسيلة عالية الدقة وقدمت كخدمة روتينية في المركز البريطاني لخدمات الدم منذ عام ٢٠٠١. تكمن أهمية ذلك التطور الأخير في أنه أول استخدام روتيني للتشخيص المعتمد على الحامض النووي الجنيني قبل الولادة.

أظهر تحليل الحامض النووي الجنيني من بلازما الأم حديثا أنه مفيد في استثناء وجود مرض
fetal ß-thalassemia major
بطريقة غير غزوية. وبوسيلة مشابهة استخدم أيضا في كشف جين HbE قبل الولادة.

قاد التقدم في التكنولوجيا الجزيئية إلى تقديم التحليل الكمي الوامض – لسلسلة البوليمراز التفاعلية الذي يمكن أن يمدنا بتشخيص اختلال الصبغيات الجسمية المعتادة _ تثلث الصبغيات ٢١ و ١٨و١٣ وكل اختلالات الصبغيات المرتبطة بالجنس والتثلث في خلال يومين من أخذ العينة. علاوة على ذلك فإن الفني الواحد يمكنه فحص ٥٠٠٠ عينة في السنة.

دعم لين وزملائه في عام ٢٠٠٦ دليلا لتوصية لجنة المسح القومي بالمملكة المتحدة في برامج المسح الجديدة للتثلث ٢١ أن التشخيص السريع لاختلال الصبغيات يمكن أن يستخدم وحده. ومن فوائد استبدال تحليل الكروموسومات الكامل ب التحليل الكمي الوامض – لسلسلة البوليمراز التفاعلية أنها أقل تكلفة. بالإضافة إلى ذلك, فإن مثل هذه السياسة لها فوائد جمة للسيدات وأزواجهن حيث أن سرعة الحصول على النتائج تحد من حدة التوتر العصبي وتتيح الفرصة لاتخاذ القرار مبكرا في حالات وجود اختلالات شديدة.

علاوة على ذلك فإن الاحتياج إلى بحث آخر بسبب كشف اعادة ترتيب الصبغيات ليس له قيمة أو أنه ذو قيمة محدودة يمكن تجنبها قدر ما يتسبب فيه التوتر.ففي بعض حالات هذه الدراسة كانت درجة التوتر من الكم بحيث دفعت الأبوين إلى إنهاء الحمل بدون انتظار نتائج الفحوص الأخرى والتي ربما قد تشير إلى وصف جيني طبيعي. كما أشارت هذه الدراسة إلى أن ١٠% من الحالات التي أظهرت عينة الزغابة المشيمية صورة غير طبيعية إن تحليلها الكروموسومي كان بلا خطورة تذكر أو بخطورة إكلينيكية ضئيلة على الجنين.

فتح اكتشاف الحامض النووي الجنيني في بلازما الأم آفاق جديدة للتشخيص الغير غزوي قبل الولادة. خلال السبع سنوات الماضية حدث تقدم ملحوظ في مدى استيعابنا للبيولوجي وتشخيص الحامض النووي الجنيني في بلازما الأم. ويؤمل في تقدم إضافي على مدى السنوات القليلة القادمة تتيح لنا الاقتراب من التشخيص الغير غزوي فيما قبل الولادة كهدف.

هدف البحث:

اختبار مدى حساسية وخصوصية الحامض النووي الجنيني المستخلص من دم الأم في الثلاثة أشهر الأولى والوسطى من الحمل لاستخدامه في المستقبل في الممارسة الإكلينيكية كوسيلة تشخيص آمنة.

خطوات البحث:

تؤخذ عينات من الدم من ٢٥ حامل في الثلاثة أشهر الأولى والوسطى من الحمل. تستخلص البلازما الخالية من الخلايا بواسطة الطرد المركزي بسرعة ١٦٠٠٠/د لمدة ١٠ دقائق. يعرض الناتج للطرد المركزي مرة أخرى بنفس السرعة ولنفس المدة للتخلص من الخلايا المتبقية. وأخيرا تحفظ البلازما الخالية من الخلايا في درجة -٨٠ْ بعد نقلها من أنابيب الطرد المركزي الدقيقة.

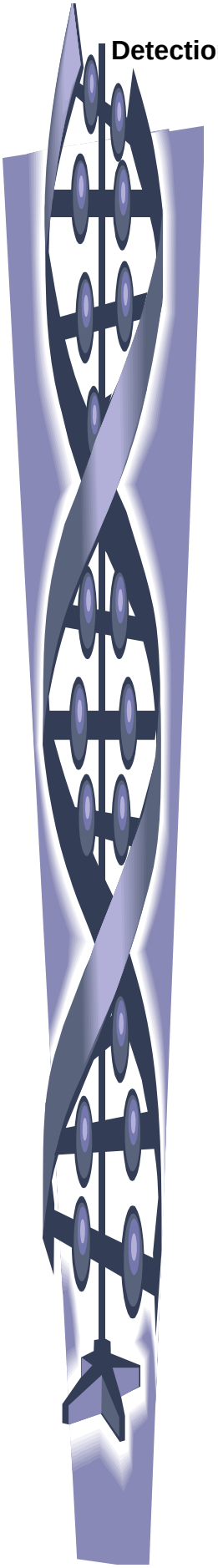
يستخلص الحامض النووي الجنيني باستخدام QIA-amp DNA Blood Kit (Qiagen) تبعا للمؤسسة المنتجة "Blood and Body Fluid Spin Protocol" .

يتم التحليل الكمي الوامض – لسلسلة البوليمراز التفاعلية باستخدام دلالات STR متعددة الأشكال (اثنان لكل صبغي) للصبغيات ١٨ و١٣ و٢١و Y و X .

يعاير تضخيم التحليل الكمي الوامض – لسلسلة البوليمراز التفاعلية لكل التفاعلات في حجم نهائي يساوي ٢٥ul يحتوي على:
٤ul من الحامض النووي المستخلص
200 umol/l dNTP,
4-35 pmol of each primer,
2 mmol/l MgCl2 in 1XTaq buffer and 1 U Taq Polymerase

يتم التحليل الكمي الوامض – لسلسلة البوليمراز التفاعلية على GeneAmp 9700 (ABI, Foster city, CA USA). وبعد المسخ يستخدم التحليل الكهربي في عمليات التحول باستخدام ABI 310 Genetic analyzer (ABI, Foster city, CA USA).

تحليل النتائج وإحصاء المناطق المرتفعة تتم باستخدام GeneScan Software 3.2 (ABI, Foster city, CA USA).



Detection of Cell-Free Fetal DNA in Plasma of Pregnant Women Using Multiplex Quantitative Fluorescent - Polymerase Chain Reaction

Thesis

Submitted To the Faculty of Medicine, Ain Shams University,

In Partial Fulfillment of

M.D. Of Obstetrics & Gynecology

By

Eman Mohamed Galal Mohamed Kamel Shahin
M.B. B.Ch – Cairo University
M.Sc.O. &G. – Cairo University
Assistant researcher of Gynecology and Obstetrics
Reproductive Health & Family Planning Research Department
Medical Division
National Research Center

Supervised by

Prof. Dr.\ Mahmoud Ali Ahmed Alshourbagy
Professor of Obstetrics & Gynecology
Faculty of medicine
Ain Shams University

Prof. Dr.\ Maged Ramadan Abo Seeda
Professor of Obstetrics & Gynecology
Faculty of medicine
Ain Shams University

Prof. Dr.\ Waleed Hitler El-Tantawy
Professor of Obstetrics & Gynecology
Faculty of medicine
Ain Shams University

Assistant Prof. Dr.\ Osama Mahmoud Azmy
Assist. Professor of Obstetrics & Gynecology
Reproductive Health & Family Planning Research Department
Medical Division
National Research Center (NRC)

Assistant Prof. Dr.\ Wa'el Tharwat Algarf
Assist. Professor of molecular genetics
Biomedical Technology Department
Genetic Engineering and Biotechnology Division
National Research Center (NRC)

Department of Gynecology and Obstetrics
Faculty of Medicine
Ain Shams University
2010

بسم الله الرحمن الرحيم

"سَنُرِيهِمْ آيَاتِنَا فِي الْآفَاقِ وَفِي أَنْفُسِهِمْ حَتَّى يَتَبَيَّنَ لَهُمْ أَنَّهُ الْحَقُّ
أَوَلَمْ يَكْفِ بِرَبِّكَ أَنَّهُ عَلَى كُلِّ شَيْءٍ شَهِيدٌ"

صدق الله العظيم

(القرآن الكريم, سورة فصلت, الآية ٥٣)

Acknowledgment

It has been an honor and privilege to work under the supervision of *Prof. Dr. \ Mahmoud Ali Ahmed Alshourbagy* Professor of Obstetrics & Gynecology, Faculty of medicine, Ain Shams University. I would like to express my deepest thanks for his valuable advice, precious time and kind supervision.

I am honored to express my deep gratitude to *Prof. Dr. \ Maged Ramadan Abo Seeda*, Professor of Obstetrics & Gynecology, Faculty of medicine, Ain Shams University for his great support, valuable time and careful supervision.

Also, I would like to express my sincere thanks to *Prof. Dr. \ Waleed Hitler El-Tantawy*, Professor of Obstetrics & Gynecology, Faculty of medicine, Ain Shams University for his precious time, encouragement and great support.

I would like to extend my gratitude and express my deepest thanks to *Assistant Prof. Dr. \ Osama Mahmoud Azmy*, Assist. Professor of Obstetrics & Gynecology, Head of Reproductive Health & Family Planning Research Department, Medical Division, National Research Center for the continuous encouragement and support he gave me throughout the whole work.

I feel deeply grateful for *Assistant Prof. Dr. \ Wa'el Tharwat Algarf,* Assist. Professor of molecular genetics, Biomedical Technology Department, Genetic Engineering and Biotechnology Division, National Research Center for lots of things I owe him and will always appreciate, among which, setting a wonderful example of a brilliant and kind human being and giving a totally different mindset… thank you.

My deepest gratitude to *my parents* for the help and support they have generously given me since the early years of my study. Without their help this study would have never been completed.

List of Contents:

Item	Page
Review of Literature	
HISTORICAL BACKGROUND	**1**
INTRODUCTION	**3**
HUMAN GENOME	**5**
DNA Structure:	**6**
Primary structure	**6**
Secondary structure of nucleic acids	**7**
DNA polymorphism and microsatellites	**7**
Selection of STR markers	**10**
CELL-FREE CIRCULATING NUCLIEC ACIDS	**12**
Origin of Circulating DNA:	**13**
Tumor Necrosis	**14**
Apoptosis:	**14**
Spontaneous and Active Release of DNA	**15**
Circulating RNA	**16**
Immunological Aspects of Circulating DNA	**18**
FETAL CELLS IN MATERNAL BLOOD	**19**
FETAL DNA IN MATERNAL PLASMA AND SERUM	**21**
Non-invasive fetal gender determination and rhesus blood group genotyping	**22**
Non-invasive prenatal diagnosis of Mendelian diseases	**23**
Quantitative plasma fetal DNA analysis and pregnancy	**24**
In the search for a universal fetal specific marker	**25**
FETAL DNA IN MATERNAL BODY FLUIDS	**27**
Fetal DNA in amniotic fluid	**27**
Cell-Free Nuleic Acids in Urine	**28**
Fetal DNA in Cerebrospinal Fluid	**29**
BIOLOGY AND TISSUE ORIGIN OF FETAL DNA	**30**
Arguments in Favor of a Blood Cell Origin:	**30**

Arguments in Favor of a Placental Origin 31

BIOPHYSICAL PROPERTIES OF CELL-FREE FETAL DNA 34

CLINICAL APPLICATIONS OF FETAL CELLS IN MATERNAL BLOOD 36

CLINICAL APPLICATION OF FETAL DNA IN MATERNAL PLASMA 39

Antenatal Screening for Fetal Aneuploidies 40

Circulating Fetal DNA and Other Complications of Pregnancy 42

Circulating Fetal DNA and Preeclampsia 42

Circulating Fetal DNA and Twin-Twin Transfusion Syndrome 43

RHD genotyping 44

Detection of Fetal Point Mutations 45

Thalassemia 45

Achrondroplasia 46

FETAL CELLS IN MATERNAL BLOO D VERSUS CELL FREE DNA IN MATERNAL PLASMA 47

PROGRESS THROUGH EPIGENETIC MARKERS 51

Patients and Methods 54

Results 70

Discussion 93

Summary 98

Conclusion 100

References 102

Arabic Summary

List of Tables:

Table 1: Comparison between fetal cells in maternal blood and cell free fetal DNA in maternal plasma 49

Table 2: showing locus designation, location & dye label. 62

Table 3: Contents of the AmpFlSTR Identifiler PCR Amplification Kit 63

Table 4: showing steps of reagents' preparation. 64

Table 5: showing samples' preparation 65

Table 6: showing samples' amplification 66

Table7: shows number of cases, mean, median, standard deviation, variance, standard error of mean & range values for each marker in cff-DNA samples. 89

Table 8: shows number of cases, mean, median, standard deviation, variance, standard error of mean & range values for each marker in neonatal DNA samples. 90

List of Figures:

Figure 1: The chemical structures of the principal bases in nucleic acids 6

Figure 2: Schematic presentation of various pathways by which nucleic acids are released into circulation 12

Figure 3: Pie chart showing percentage of cases accordind to the 1st & 2nd trimesters. 70

Figure 4 : Bar graph showing age distribution between cases 71

Figure 5 : Pie chart showing classification of cases according to parity. 72

Figure 6: Shows different alleles distribution of D8S1179, D21S11, D7S820 & CSF1PO markers between mother & fetus (Case I) 74

Figure 7: Shows different alleles distribution of D3S1358, THO1, D13S317, D16S539 & D2S1338markers between mother & fetus (Case I) 75

Figure 8: Shows different alleles distribution of D19S433, vWA , TPOX & D18S51markers between mother & fetus (Case I) 76

Figure 9: Shows distribution of different alleles of Amelogenin, D5S818 & FGA markers between mother & fetus (Case I) 77

Figure 10: Shows different alleles distribution of D8S1179, D21S11, D7S820 & CSF1PO markers between mother & fetus (Case II) 78

Figure 11: Shows different alleles distribution of D3S1358, THO1, D13S317, D16S539 & D2S1338markers between mother & fetus (Case II) 79

Figure 12: Shows different alleles distribution of D19S433, vWA , TPOX & D18S51markers between mother & fetus (Case II) 80

Figure 13: Shows distribution of different alleles of Amelogenin, D5S818 & FGA markers between mother & fetus (Case II) 81