

Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy

Y. M. Dennis Lo, Fiona M. F. Lun, K. C. Allen Chan, Nancy B. Y. Tsui, Ka C. Chong, Tze K. Lau, Tak Y. Leung, Benny C. Y. Zee, Charles R. Cantor, and Rossa W. K. Chiu

PNAS, August 7, 2007 vol. 104 no. 32

TRISOOMIA 21

Downi sündroom (DS) on teada juba 150 a., kuid tema molekulaarsest patogeneesist teatakse siiani suhteliselt vähe.

DS sai nime briti arsti John Langdon Down järgi, kes kirjeldas seda 1866 a.

Prantsuse arst ja geneetik Jerome Lejeune tuvastas 1959 a., et seda haigust põhjustab 21 kromosoomi trisoomia (T21).

DS keskmine sagedus 1: 800 elus sündidest.

(Hook EB, Lancet 1981)

Kromosoom 21 kriitilise piirkonna duplikatsioon (the Down Syndrome Critical Region- DSCR (21q22.2) põhjustab samuti täielikku või osalist kliinilist pilti.

(Korenberg JR et al, 1996; Sinet PM et al, 1996)

T21 prenataalne diagnostika

Trisoomia 21 kahtlus on üks sagedasemaid põhjusi raseda suunamiseks prenataalse diagnostika protseduurile.

Rasedatele tehakse esmaselt:

1. ultraheli uuring
2. ema seerumi biokeemiliste markerite uuring.
MSAFP α - fetoproteiin \downarrow ,
hCG β - inimese koorioni gonadotropiin β \uparrow ,
uOE - konjugeerumata östriool uOE \downarrow ,
Inhibin- A \uparrow

Prenataalse diagnostika invasiivsete meetodid:

1. Amniotsentees
2. koorioni hattude biopsia

Rakuvaba loote DNA ema plasmas

Rakuvaba loote DNA avastamine ema veres 1997 a., avas uued võimalused mitteinvasiivseks prenataalseks diagnostikaks.

Teatud edusamme on saavutatud loote-spetsiifiliste nukleiinhapete detekteerimisel:

1. platsenta-spetsiifiliste DNA fragmentide metülatsiooni mustreid (Tong et al, 2006)
2. platsentas ekspresseeruvate RNA molekulide polümorfsete alleelide suhet (Lo YMD et al, 2007).

Lote DNA hulk ema plasmas

Euploidse raseduse korral sisaldub

1 ml ema plasmas totaalse DNA 50 genoomse ekvivalendi (GE) kohta 5 genoomset ekvivalenti lote DNAd s.t 10 % lote DNAd.

1 ml ema plasmas sisaldub 100 koopiat kr21 järjestust:
90 ema ja 10 lote koopiat.

T21 lote korral: lote iga GE annab 3 kr21 koopiat, kokku 105 koopiat (90 ema ja 15 lote koopiat 1ml ema plasma kohta).

Seega 10 % lote DNA konts juures on kr21 järjestust trisoomse lote korral 1,05X rohkem võrreldes euploidse lotega.

Real-time PCRi tundlikuse min on 1,5X konts erinevus, mistõttu nad proovivad kasutada Digital PCRi, mis teoreetiliselt võimaldaks veelgi väiksemaid kontsentratsioonide erinevusi tuvastada.

Loote kromosomaalse aneupoidia tuvastamiseks kasutatavad Digital PCRi meetodid

1. Digital RNA SNP strateegia

Platsentas ekspresseerivas transkriptis- *PLAC4* mRNAs- kirjeldatud SNPi (rs8130833, A/G) alleelse tasakaalustamatuse tuvastamine T21 lootel.

2. Digital Relative Chromosome Dosage (RCD) method.

Otsene kromosoomi koopia arvu muutuse detekteerimine võrreldes referentskromosoomiga.

Digital PCR

Digital PCRi meetodi töötasid välja 1999 a Vogelstein ja Kinzler, tuvastamaks teadaolevaid mutatsioone raku populatsiooni minoorses fraktsioonis.

(Vogelstein B. and Kinzler K.W., 1999)

Seda meetodit on rakendatud mutatsioonide analüüsimiseks ja heterosügootsuse kadumise uurimiseks vähi rakkudes ja vähi haigete plasmas.

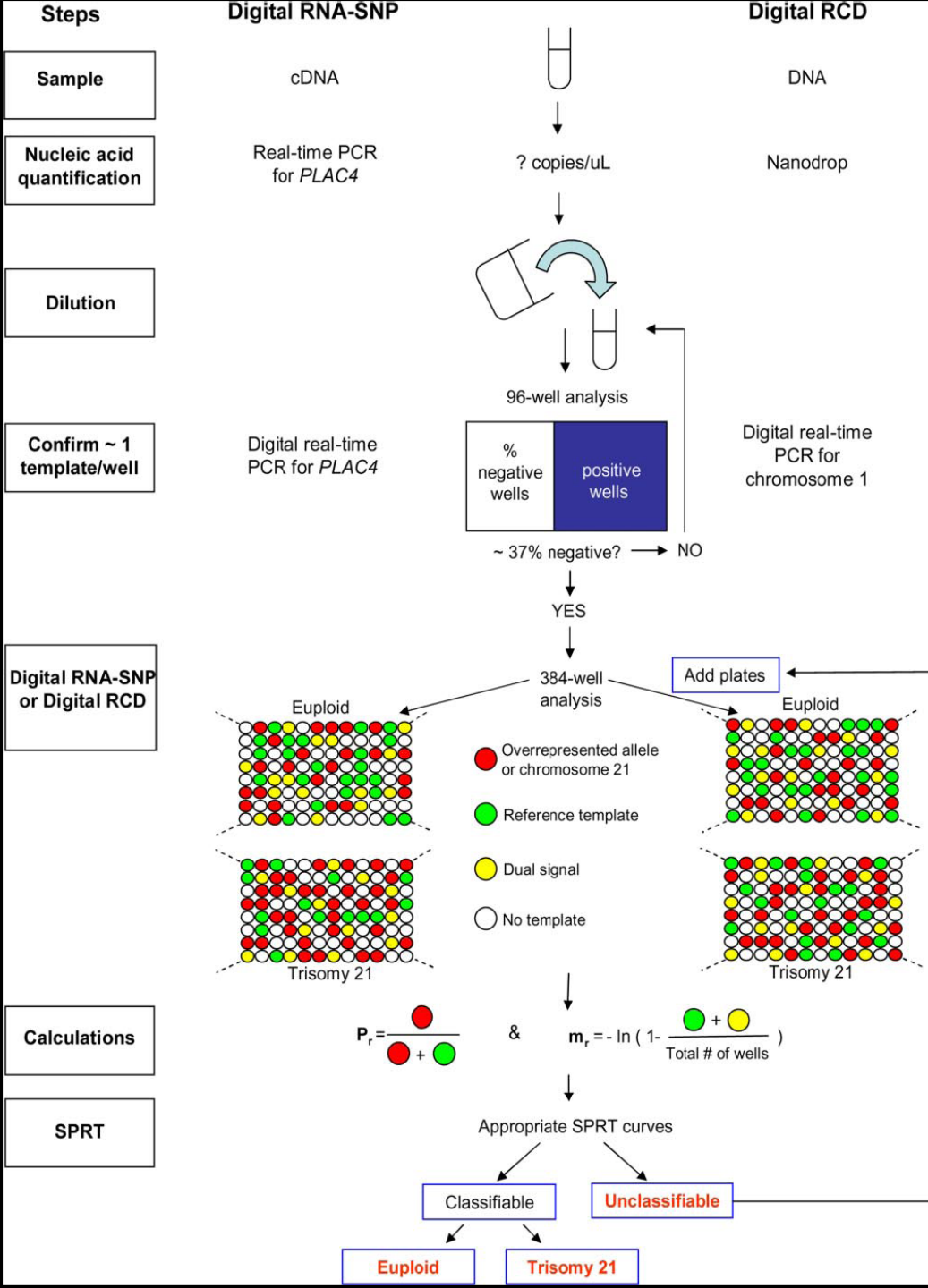


Fig. 1. Illustration of the analytical steps in digital RNA SNP and digital RCD analyses for T21 detection.

Digital PCRi põhimõte

I etapp

Uuritava nukleiinhappe lahjendamine

Igas *well*is oleks keskmiselt 1 template molekul. Neis tingimustes jaotub template molekulide tegelik arv *well*i kohta Poissoni jaotuse järgi.

Seega võib iga reaktsiooni *well* sisaldada 0, 1 või rohkem *proovi* molekuli. Oodatav mitte *proovi* sisaldavate *well*ide arv on e^{-m} , kus m on keskmine molekulide arv *well*i kohta. Nt., kui keskmine molekulide konts. *well*i kohta on 1, siis oodatav *well*ide osakaal, kus ei ole template molekuli on e^{-1} , ehk 0,37 (37%). Ülejäänud 63% *well*idest sisaldab 1 või rohkemat template molekuli.

II etapp

Iga *well* analüüsitakse, kas tekkis PCR produkt või mitte

PNAS, August 7, 2007 vol. 104 no. 32

Digital RNA SNP põhimõte

Detekteeritakse võimalikku *PLAC4* mRNA -s paikneva SNP-i (**rs8130833**, **A/G**) alleelset tasakaalustamatust T21 korral.

Heterosügootse euploidse loote puhul on A ja G alleel võrdselt esindatud (1:1). T21 puhul annab ühe alleeli lisa koopia 2:1 suhte.

Peale digital real-time PCR-i 384 plaadis, loetakse kokku informatiivsed *well*'id, need, mis on positiivsed kas A või G alleeli suhtes, mitte mõlema.

Alleel, mille suhtes positiivseid *well*'e loeti kokku rohkem, nimetatakse suurema osakaaluga alleeliks (*overrepresented allele*) ja arvutatakse välja tema osa kõikidest informatiivsetest *well*'idest

P_r - suurema osakaaluga alleelide hulk kõikide informatiivsete *well*'ide suhtes.

Seejärel rakendatakse SPRT (Sequential Probability Ratio Test) tegemaks kindlaks kas P_r osutab sellise alleelse tasakaalustamatuse tasemele, mida eeldaks T21 proovi puhul.

Digital RCD põhimõte

Determineeritakse kromosoomi doosi, võrreldes mittepolumorfset kr21 lookust referents kromosoomi- kr1 -ga.

Eeldades, et kr 21 ja kr1 suhe on euploidse loote korral 2:2, siis T21 loote korral muutub suhe 3:2.

Siin loetakse informatiivseteks *well*'ideks neid, mis annavad positiivse signaali kas kr1 või kr21 suhtes, mitte mõlema.

Euploidse loote korral peaks informatiivsete *well*'ide hulk, mis on positiivsed kas kr1 ja kr21 suhtes, olema võrdne.

T21 korral peaks kr21 suhtes positiivsete *well*'ide hulk olema kõrgem.

Nt., kui analüüsitakse platsenta DNAd, peaks T21 loote genoomis teoreetiline RCD suhe olema 3:2, st 1,5X erinevus.

Analüüsides aga ema plasma proovi, mis sisaldab 10% loote DNAd, väheneb teoreetiline RCD suhe 1,05X.

P_r saadakse, jagades ainult kr21 lookuse suhtes positiivsed *well*'id informatiivsete *well*'ide koguarvuga.

Seejärel tehakse saadud P_r väärtusele SPRT analüüs haiguse määramiseks.

Alleelse või kromosomaalse tasakaalustamatuse määramine Digital PCRiga

Teoreetiline RNA SNP suhe on 2:1 ja RCD suhe 3:2 puhtas T21 proovis.

Lahjendatud proovi kontsentratsioon (m_r) = referents-proovi molekulide keskmise arvuga reaktsiooni kohta.

Digital RNA SNP analüüsis on referents *template*'iks alleel, mis ei ole suurema osakaaluga alleel.

RCD puhul on referents *template*'iks selleks kr1 lookus.

Euploidsel juhul võrdub 1 uuritava proovi molekuli lahjendus 1 *well* kohta 0,5ga ($m_r = 0,5$).

NT: T21 proovi Digital RNA SNP analüüsil, kui $m_r = 0,5$, saadi digital RNA SNP suhteks (suurema osakaaluga alleeli *well*'ide arv/ referents alleel *well*'ide arv) 2,65 (SI Tabel 3).

100% loote DNA sisaldusega proovi Digital RCD analüüsil, kui $m_r = 0,5$, saadi digital RCD suhteks (kr21 lookuse spetsiif. *well*'ide arv/ kr1 lookuse spetsiif. *well*'ide arv) 1,7. Kui loote DNA fraktsiooni konts väheneb, väheneb ka digital RCD suhe sama m_r juures.

Alleelse või kromosomaalse osakaalu suurenemine kasvab koos m_r .

Table 3. Expected allelic ratio and proportion of informative wells positive for the overrepresented allele, P_r , in digital RNA SNP analysis of trisomy 21 cases for a series of average reference template concentrations per well, m_r

m_r	Proportion of wells positive for					Proportion of informative wells	Digital RNA SNP allelic ratio (Overrepresented allele only/ Reference allele only)	P_r (Overrepresented allele only/ Proportion of informative wells)
	Reference allele	Overrepresented allele	Both alleles	Reference allele only	Overrepresented allele only			
0.1	0.0952	0.1813	0.0173	0.0779	0.1640	0.2419	2.11	0.68
0.5	0.3935	0.6321	0.2487	0.1448	0.3834	0.5282	2.65	0.73
0.6	0.4512	0.6988	0.3153	0.1359	0.3835	0.5194	2.82	0.74
1.8	0.8347	0.9727	0.8119	0.0228	0.1608	0.1836	7.05	0.88
1.9	0.8504	0.9776	0.8314	0.0190	0.1462	0.1652	7.69	0.88
2.0	0.8647	0.9817	0.8488	0.0158	0.1329	0.1487	8.39	0.89

Table 4. Expected proportion of informative wells positive for the chromosome 21 locus, P_r , for a series of average reference template concentrations per well, m_r , in trisomy 21 samples with fractional fetal DNA concentrations of 10%, 25%, 50%, and 100%

m_r	Percentage of fetal DNA in the sample, %							
	10		25		50		100	
	Proportion of informative wells	P_r	Proportion of informative wells	P_r	Proportion of informative wells	P_r	Proportion of informative wells	P_r
0.1	0.1759	0.51	0.1813	0.53	0.1903	0.56	0.2079	0.61
0.5	0.4805	0.52	0.4851	0.54	0.4925	0.57	0.5059	0.63
0.8	0.4931	0.52	0.4905	0.54	0.4866	0.58	0.4799	0.65
0.9	0.4792	0.52	0.4745	0.55	0.4672	0.59	0.4550	0.66
1.2	0.4140	0.52	0.4043	0.55	0.3899	0.60	0.3669	0.69
1.3	0.3887	0.52	0.3779	0.55	0.3621	0.60	0.3373	0.69
1.4	0.3631	0.52	0.3515	0.56	0.3347	0.61	0.3087	0.70
1.5	0.3378	0.52	0.3256	0.56	0.3080	0.61	0.2815	0.71

SPRT analüüs

Määramaks kas leitud *PLAC4* alleeli või kr21 lookuse osakaalu suurenemise määr on digital RNA SNP või digital RCD analüüsil statistiliselt oluline, kasutati SPRT analüüsi.

SPRT lubab võrrelda samaaegselt andmete laekumisega 2 tõenäosuslikku hüpoteesi omavahel ning tagab keskmiselt väiksema arvu teste antud usaldusväärse taseme juures kui mõni teine meetod.

NT: I hüpotees oleks T21 detekteerimisel, et ei ole alleelset või kromosomaalset tasakaalustamatust (st ei detekteerita T21).

II hüpoteesi kohaselt esineb alleelne või kromosomaalne tasakaalustamatus (st detekteeritakse T21).

SPRT analüüs tehakse 2 SPRT kõvera abil, mis määravad ära tõenäosuslikud piirid aktsepteerimaks või tagasilükkamaks I hüpoteesi (Fig 2A).

SPRT analüüs

Iga digital PCRi andmed tuleb interpreteerida vastavalt selle eksperimendi m_r väärtustele.

Seega tuleb iga Digital RNA SNP või Digital RCD analüüsi järel välja arvutada m_r ja P_r väärtused. :

$$m_r = -\ln(1 - \text{reference template well} + \text{dual signal well} / \text{total No of wells})$$

$$P_r = (\text{overrepresented allele or ch21 well} / \text{overrepresented allele or ch21 well} + \text{reference template well})$$

Fig 2B nt SPRT kõverate erinevust kui m_r väärtus on 0,1, 0,5 või 1, Digital RNA SNP analüüsil.

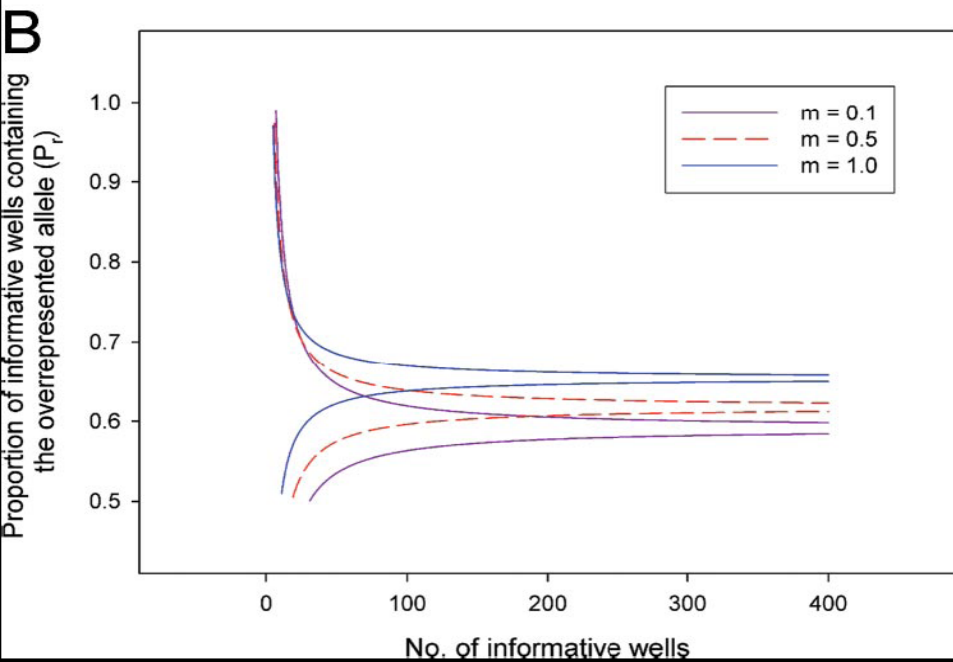
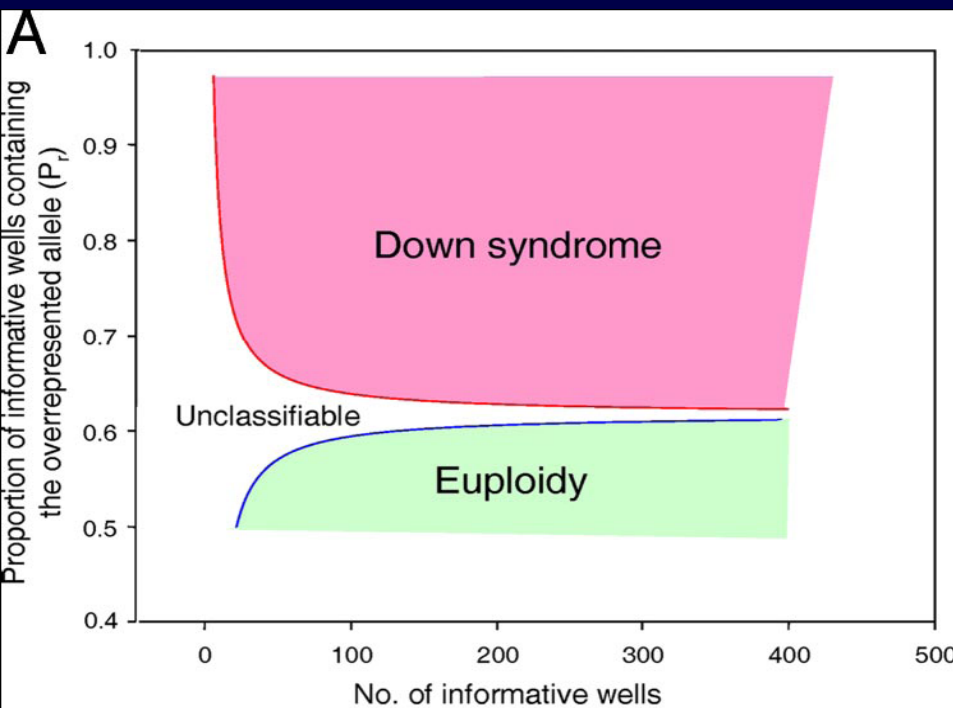


Fig. 2. SPRT analysis.
 (A) A pair of SPRT curves delimits the decision boundaries for accepting or rejecting the hypotheses that the sample belonged to a euploid or aneuploid fetus.

(B) The decision boundaries of the SPRT curves would vary according to the template concentration. Curves applicable to digital RNA SNP analysis are shown.

Table 5. Comparison of the effectiveness of the new and old sequential probability ratio test (SPRT) algorithms for classifying euploid and trisomy 21 (T21) cases in 96-well digital RNA SNP analyses

m_r	Classification	New algorithm, %		Old algorithm, %		m_r	Classification	New algorithm, %		Old algorithm, %	
		Euploid	T21	Euploid	T21			Euploid	T21	Euploid	T21
0.5	Correct	64	85	20	38	1.5	Correct	92	90	2	32
	Incorrect	3	1	4	0		Incorrect	1	1	4	0
	Unclassified	33	14	76	62		Unclassified	8	9	93	68

The new algorithm refers to the selection of SPRT curves specific for the m_r derived from the digital PCR data. The old algorithm refers to the use of a fixed set of SPRT curves for all digital PCR runs.

Table 6. Comparison of the effectiveness of the new and old sequential probability ratio test (SPRT) algorithms for classifying euploid and trisomy 21 (T21) cases in 384-well digital RNA SNP analyses

m_r	Classification	New algorithm, %		Old algorithm, %		m_r	Classification	New algorithm, %		Old algorithm, %	
		<u>Euploid</u>	T21	<u>Euploid</u>	T21			<u>Euploid</u>	T21	<u>Euploid</u>	T21
0.5	Correct	100	100	94	90	1.5	Correct	100	100	85	90
	Incorrect	0	0	1	0		Incorrect	0	0	1	0
	Unclassified	0	0	6	10		Unclassified	0	0	13	10

The new algorithm refers to the selection of SPRT curves specific for the m_r derived from the digital PCR data. The old algorithm refers to the use of a fixed set of SPRT curves for all digital PCR runs.

T21 detekteerimise valideerimine *PLAC4* suhtes , kasutades Digital RNA SNP analüüsi.

2 euploidse ja 2 T21 SNP suhtes heterosügootse DNA ja RNA proove, mis olid võetud platsentast.

1. RNA konverteeriti reverse transkriptsiooni etapi abil DNA -ks. Nad lahjendasid proovid, et arvestuslikult oleks 1 alleel ühes well'is, 96 - plaadi digital PCR analüüs (Fig 1).
2. Järgnes 384- plaadiga digital RNA SNP eksperiment. Andmete interpreteerimiseks arvutati välja P_r ja m_r ja SPRT kõver saadud m_r väärtuse kohta (Tabel 1).

The no. of wells for all samples was 384. Genotypes were determined by mass spectrometric assay. The m_r value indicates the average no. of reference molecules per reaction well. The P_r values were calculated by using the following equation: no. of wells positive for the overrepresented allele/(no. of wells positive for A only + no. of wells positive for G only). The unclassifiable region for the corresponding m_r is shown. Euploid was assigned when the P_r was below the unclassifiable region; T21 was assigned when the P_r was above the unclassifiable region.

Table 1. Digital RNA SNP analysis in placental tissues of euploid and T21 pregnancies

Sample	Genotype	No. of wells positive for individual alleles				m_r	SPRT result		
		A only	G only	AG	All negative		P_r	Unclassifiable region	Classification
Placental DNA									
N677	AG	85	83	126	90	0.79	0.51	0.63–0.65	Euploid
N710	AG	102	83	73	126	0.52	0.55	0.61–0.63	Euploid
N435	AGG	49	157	130	48	0.63	0.76	0.62–0.64	T21
N981	AAG	135	69	82	98	0.50	0.66	0.61–0.63	T21
Placental RNA									
V533	AG	103	93	71	117	0.56	0.53	0.61–0.63	Euploid
V943	AG	89	100	74	121	0.55	0.53	0.61–0.63	Euploid
N435	AGG	52	138	95	99	0.48	0.73	0.61–0.63	T21
T215	AAG	146	58	138	42	0.71	0.72	0.62–0.64	T21

T21 detekterimise valideerimine kasutades Digital RCD meetodit.

Selleks kasutati 2 euploidse ja 2 T21 platsentast eraldatud DNA proove

1. Proovid lahjendati ligikaudu 1 target template'ini kromosoomi kohta ühes well'is ja tehti 96-plaadis digital PCR analüüs.
2. Iga proov analüüsiti seejärel 384- plaadiga digital RCD eksperiment ja arvutati välja P_r ja m_r väärtused.

digital RCD analüüsis kasutati referents proovina chr1 paraloogi.

Selle m_r väärtust kasutati SPRT kõvera valikuks.

Kõik platsenta proovid klassifitseeriti õigesti (Fig 3A).

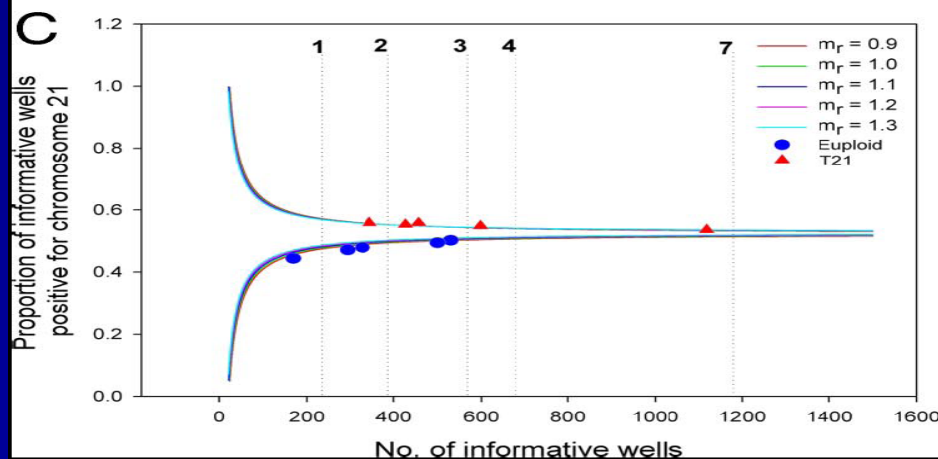
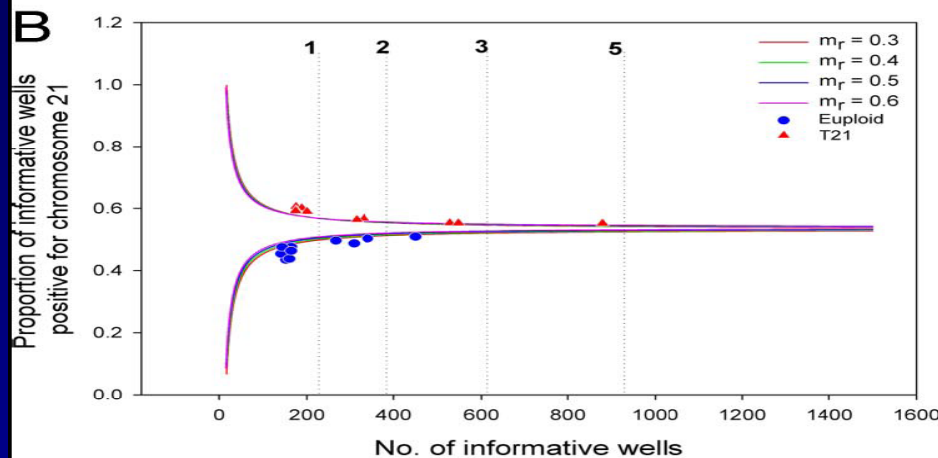
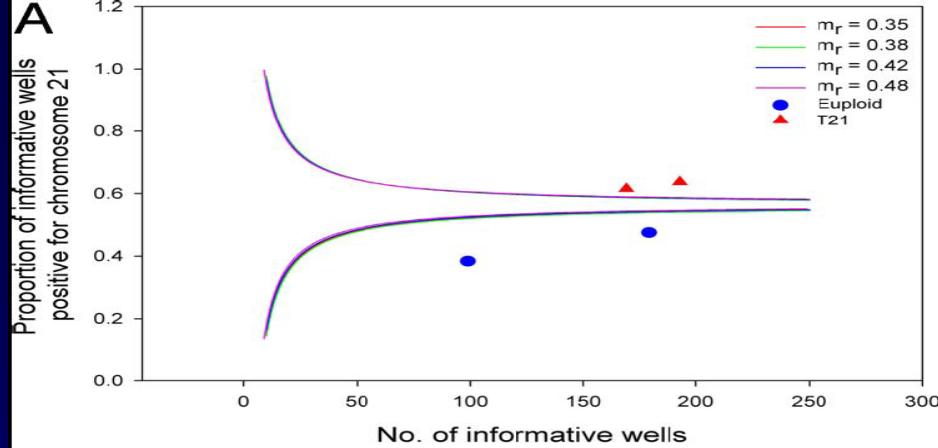


Fig. 3. SPRT interpretation of digital RCD analyses. (A) Placental DNA samples. (B) DNA mixtures of 50% placenta/maternal buffy coat.

(C) DNA mixtures of 25% placenta/maternal buffy coat. Numbers at the top of B and C indicate the number of 384-well plates required before the data set was classifiable for the cases delimited by the dotted lines surrounding each number.

TULEMUS

Artiklis kirjeldatud eksperimentaalne osa nt, et digital RNA SNP on efektiivne ja täpne meetod T21 detekteerimiseks.

Kuna *PLAC4* mRNA on ema plasmas ainult lootelist päritolu, siis läks iga 12 proovi analüüsimiseks üks 384 plaat.

Digital RCD arendati välja selleks, et ei peaks sõltuma proovi heterosügootsusest, ning võimaldab eristada T21 platsenta DNA proovi euploidsest DNA proovist, st puhtast loote DNA materjalist nagu amnioni vedelikust kui koorioni biopsiast.