

Applicability and universality of formulae for chimerism monitoring considering stutter PCR products

Natalia S. Kostritsa¹, Natalya V. Risinskaya², Andrey B. Sudarikov², Elena N. Parovichnikova², Valery G. Savchenko²

¹School of Medicine, Lomonosov Moscow State University

²National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Contact: Dr. Natalia Kostritsa

E-mail: nataliakostritsaffm@gmail.com

Introduction

Analysis of genetic chimerism is one of the main methods to monitor the bone marrow engraftment after stem cells transplantation. PCR amplification of short tandem repeats (STR) utilizing the differences in the STRs length between donor and recipient is used as a routine test for chimerism. However, chimerism estimation is often complicated by “stutter” PCR peaks appearing due to irregular DNA polymerase activity. Generally, these sequences are 4 nucleotides shorter than a specific marker and may concur with a specific sequence of recipient’s DNA, thus hindering chimerism estimation based on that locus. In our previous work, we showed that percentage of the stutter peaks in total DNA product is a locus- and patient-specific constant. Therefore, we have derived a formula for the mixed chimerism cal-

culation in the presence of stutter peaks. It was also shown that the results of chimerism estimation by means of the formulae proposed were similar for “stutter-complicated” and “stutter-free” markers ($p < 0.05$). The aim of our study was to validate these formulas for different allelic statuses, including cases with heterozygous uninformative donor allele that overlay an informative allele of the recipient (Fig.1). The formulas should be considered valid if the ratios of the stutter 1 to both peak 1 and peak 2 of the heterozygous STR allele are constant. We expect this to be true, since the stutter peaks are caused by irregular DNA polymerase activity and depend on the product length and nucleotide sequence of the STR.

Materials and methods

The study was done with 20 DNA samples. Genomic DNAs of donors and patients were isolated from bone marrow specimens. Genetic chimerism was assessed by the STR-PCR analysis with COReDIS Plus multiplex kit for amplification of 19 polymorphic STR-markers and amelogenin loci. The fragment analysis was performed on a 3130 Genetic Analyzer. The data processing was accomplished using GeneMapper v.4-0 software. The informative loci were chosen in advance by comparing pre-transplant patient DNA and donor DNA. The ratios stutter-peak 1/peak 1 and the stutter-1/peak 2 in heterozygotes were calculated using standard formulae. The variances of these ratios for each locus and patient were then compared with respect to contribution of stutter components to the total amount of the product.

Results

In twenty transplant cases at seven time points, we analyzed the variances for the locus and patient in repeated measurements (Fig. 2). The following mean variances were obtained: 0.01 for the ratio of a stutter-peak 1 to peak 1 in heterozygote, and 0.014 for the ratio of stutter-peak to another heterozygote peak (peak 2). The variance for the contribution

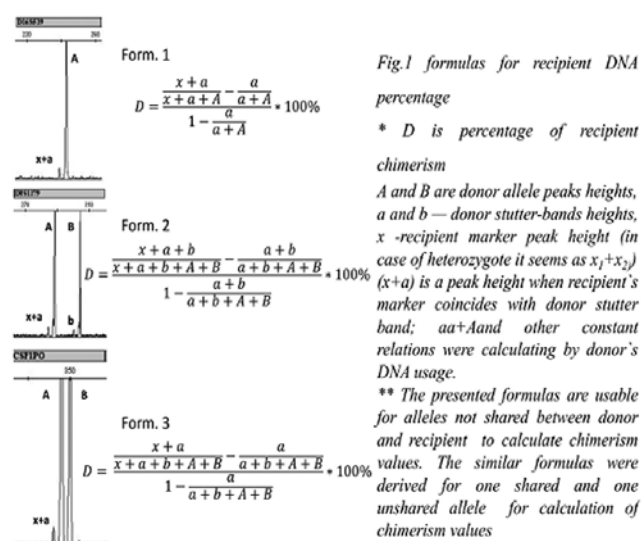


Figure 1. Formulas proposed for calculation of recipient-to-donor DNA ratio in presence of stutter peaks (From: Kostritsa N., EHA Congress, 2017)

of the stutters to the total DNA from the previous study is 0.01. Thus, not only contribution of the stutters to the total DNA amounts, but also the ratio of stutter to any heterozygous peak can be considered an individual constant for each locus and patient. Therefore, it can be used in the chimerism calculation. However, in case of using stutter 1 and peak 2, it is necessary to increase sensitivity to 1.5%. In cases of low mixed chimerism, these loci are not recommended for the chimerism calculation. The calculations for case A (Fig. 2) will be made according to the formula 2 (Fig. 1), and, for cases 2 and 3, according to the formula 1 as for the homozygote, since the coinciding peak in this case may not be taken into account.

with a definite probability of DNA polymerase error, constant for each particular sequence. However, due to random fluctuations in the product quantity for the stutter 1/peak 2 ratio, the error is larger than for the stutter 1/peak 1 ratio. Thus, the stutter-peaks are not an obstacle to a correct calculation of gene chimerism. The stutter contribution to the total amount of the product in a given locus may be considered constant for the chimerism calculations. Alternatively, one may use a ratio of stutter-to-allele product at which it was obtained due to DNA polymerase errors.

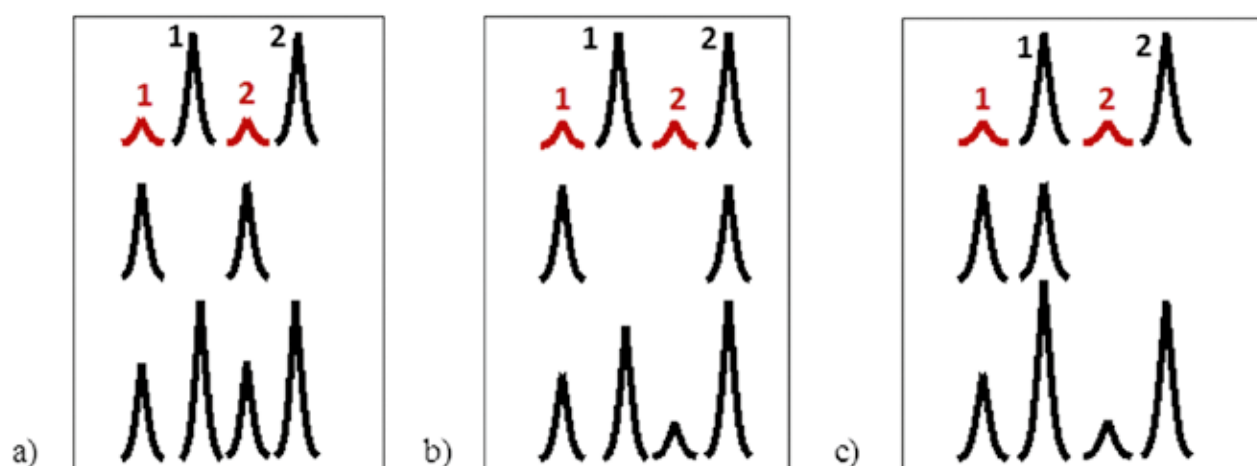


Fig. 2. Variants of donor's stutter-peaks (red) and informative peakes (second row) overlay for heterozygous STR-alleles and mixed chimerism (third row, bottom): a) overlay of two stutter-peaks with two informative peaks (for this case the validity of a formulae derived for the mixed chimerism calculation has been already proved previously; Kostritsa N., EHA congress 2017); b) overlay of the first recipient's peak with the donor's stutter-peak, and another one recipient's peak with donor's peak 2. In this case considering concurring peaks is not necessary for calculation and formula for homozygous Case might be used. However, permanence of stutter-peak 1 to peak 1 ratio still has to be proved for this case; c) concurring of the first recipient's peak with the donor's stutter-peak 1, and the second recipient's peak – with the donor's peak 1. In this case concurring peaks are also may not be considered for calculation and the formula for homozygote might be used, however the ratio of the stutter-peak to the peak 2 of the heterozygote also should be proved to be constant.

Conclusion

The resulting formulae shown in Fig. 1 are valid for different allelic combinations, since the ratio of any stutter to any major peak in the heterozygote is a constant, which is associated

Keywords

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, chimerism, short tandem repeats, stutter-band.

Применимость и универсальность формул для мониторинга химеризма с учетом статтер-пиков ПЦР

Наталья С. Кострица¹, Наталья В. Рисинская², Андрей Б. Судариков², Елена Н. Паровичникова², Валерий Г. Савченко²

¹Государственное учебно-научное учреждение Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова

²ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии МЗ России, г. Москва

Введение

Мониторинг химеризма – основной способ контроля процесса приживления трансплантата после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Амплификация коротких tandemных повторов (short tandem repeats, STR-ПЦР) используется в качестве рутинного метода определения химеризма и основывается на различной длине STR в геномах донора и реципиента. Образование более коротких, чем основной продукт (как правило, на 4 нуклеотида короче), побочных продуктов реакции (так называемых статтер-пиков), которые могут совпадать со специфическими метками реципиента – уменьшает количество информативных меток и осложняет подсчет химеризма. Ранее мы показали, что вклад статтер-пика в общее количество ДНК является индивидуальной константой в каждом аллеле для каждого пациента, в связи с чем были получены формулы для вычисления химеризма с учетом статтер-пиков (Кострица Н. и др., сборник тезисов к конференции «Ломоносов-2017»). Также была доказана корректность использования данных формул и их равнозначность классическим ($p < 0,05$). Цель исследования: проверка универсальности данных формул для разных аллельных статусов, в том числе для случая, когда в гетерозиготе статтер неинформативного аллеля донора совпадает с информативным аллелем реципиента. Формулы можно считать универсальными в том случае, если отношение статтера 1 как к пику 1, так и к пику 2 гетерозиготы является постоянным.

Материалы и методы

В исследование включены 20 образцов ДНК. Для STR-ПЦР геномной ДНК из костного мозга использовали COrDIS Plus – мультиплексный набор для амплификации 19 полиморфных STR-маркеров и локуса амелогенина человека. Фрагментный анализ проводили на анализаторе нуклеиновых кислот 3130 Genetic Analyzer. Обработку данных проводили с использованием программного обеспечения GeneMapper v.4-0. Информативные локусы были выбраны ранее путем сравнения ДНК пациента до трансплантации и ДНК донора. По стандартным формулам были вычислены отношения статтер 1/пик 1 и статтер 1/пик 2 в гетерозиготе. Дисперсию этого отношения для каждого локуса и пациента затем сравнивали с таковой для вклада статтера в общее количество продукта.

Результаты

На основе анализа 20 меток в 7 временных точках были получены индивидуальные дисперсии для каждого локуса и пациента при повторных измерениях, а затем посчитана средняя дисперсия: 0,01 для отношения статтер-пика к «своему» пику в гетерозиготе и 0,014 для отношения статтер-пика к другому пику гетерозиготы, при том, что дисперсия для вклада статтеров в общую ДНК по предыдущему исследованию составляет 0,01 (Рис. 2). Таким образом, не только вклад статтеров в общую ДНК, но и отношение статтера к любому из пиков гетерозиготы, можно считать индивидуальной константой для каждого локуса и пациента и использовать при расчете химеризма, однако в случае использования статтера 1 и пика 2 необходимо увеличить порог чувствительности до 1,5%. При небольших значениях смешанного химеризма использовать такие метки не рекомендуется. Расчет для случая А на Рис. 2 будет производиться по формуле 2 (Рис. 1), а для случаев 2 и 3 по формуле 1 (Рис. 1), как для гомозиготы, поскольку совпадающий пик в данном случае не учитывается.

Заключение

Полученные формулы (Рис. 1) универсальны для различных аллельных статусов, поскольку отношение любого статтера к любому основному пику в гетерозиготе является константой, что связано с определенной вероятностью ошибки ДНК-полимеразы, постоянной для каждой конкретной последовательности. Однако из-за случайных колебаний количества продукта для отношения статтер 1/пик 2 ошибка несколько больше, чем для отношения статтер 1/пик 1. Таким образом, статтер-пики не являются препятствием для корректного расчета химеризма. При расчетах в качестве константы рекомендуется использовать вклад статтеров в общее количество продукта в данном локусе или отношение статтера к продукту аллеля, на котором он был получен при ошибке ДНК-полимеразы.

Ключевые слова

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, химеризм, короткие tandemные повторы, статтер-пик.