

UN NUOVO APPROCCIO NELLA DETERMINAZIONE DEL VALORE Cy_0 IN REAL TIME PCR.

Sisti Davide¹, Peluso Sara², Rocchi Ettore³.

¹ Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università degli Studi di Urbino Carlo Bo

² Dipartimento di Fisica e Astronomia, Università of Bologna

³ Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Bologna

Introduzione

La reazione a catena della polimerasi in real time (qPCR) è diventata uno strumento indispensabile per monitorare i cambiamenti nell'espressione genica. Il metodo Ct è il metodo più ampiamente utilizzato, anche se il suo calcolo è dipendente dall'utilizzatore. Il metodo Ct è abbastanza stabile, ma l'accuratezza delle stime è fortemente compromessa se l'efficienza non è uguale in tutte le reazioni. Infatti, l'efficienza uniforme della reazione è l'assunzione più importante del metodo Ct. Sono stati proposti vari metodi per superare le limitazioni del metodo Ct. Tra questi, uno dei metodi che ha ottenuto i migliori risultati in termini di accuratezza e precisione è il metodo Cy_0 [1, 2]. Il valore Cy_0 è stato definito come il punto di intersezione tra l'asse delle ascisse e la tangente del punto di flesso della curva di Richards ottenuta a partire dai dati grezzi [2]. Infatti, le forme delle curve di amplificazione in qPCR vanno da una classica sigmoide ad una fortemente asimmetrica, come ad esempio in presenza di inibitori [3]. Il metodo Cy_0 è un metodo basato su una soglia come il Ct, ma con la differenza fondamentale che il valore soglia dipende dalla cinetica di amplificazione. Si tratta di un metodo in cui la stabilità e l'affidabilità di un approccio basato su una curva standard vengono combinati con una procedura di fitting per superare il problema chiave della determinazione dell'efficienza della qPCR. Il metodo Cy_0 dipende criticamente dalla curva utilizzata per la regressione non lineare. Attualmente, viene utilizzata la curva di Richards. Essa è un'estensione della curva logistica e tiene conto dell'asimmetria della curva di amplificazione. Tuttavia, la curva di Richards non è idonea quando l'asimmetria ($asimmetria = 1 - \frac{2 \cdot Y_{flesso}}{Y_{plateau}}$) supera il valore critico di $1/e$; tale situazione si può ritrovare in casi specifici, soprattutto con marcate inibizioni della cinetica di amplificazione [4].

Obiettivi

In questo lavoro si propone di modellizzare l'andamento dei livelli di amplificazione in real time pcr, utilizzando una nuova funzione, tramite regressione non lineare. Tale funzione, derivante dalla soluzione di un'equazione differenziale, permette di modellizzare andamenti sigmoidali con asimmetria superiore al valore della curva di Richards.

Metodi

L'equazione di crescita logistica deriva dalla seguente equazione differenziale: $\frac{dy}{dx} = ay \left(1 - \frac{y}{k}\right)$, dove a è una costante approssimabile al tasso di crescita esponenziale relativo a valori molto bassi di y , e K è il valore massimo osservabile di y . Sebbene l'equazione di crescita logistica generi una curva che tende a una forma esponenziale a valori bassi, la sua massima pendenza (il punto di flesso), è sempre a metà del valore dell'asintoto superiore, cioè $K/2$. Introdurre un altro parametro nell'equazione consente che la forma della parte superiore della curva sia indipendente dalla forma della parte inferiore. Una opzione è l'equazione di crescita di Richards:

$$\frac{dy}{dx} = ay \left(1 - \frac{y}{k}\right)^b$$

dove b è una costante che consente di variare la forma della curva sigmoide. Quando $b = 1$, l'equazione di Richards diventa la consueta curva logistica. (3) Se l'equazione differenziale di un'equazione logistica viene risolta in funzione di t , si ottiene:

$$t - t_0 = \frac{\ln(y)}{a} - \frac{\ln(K - y)}{a}$$

dove t_0 è il tempo in cui $y = K/2$. Un modo per aumentare la flessibilità di questa equazione è quello di introdurre un nuovo parametro per ottenere [5]:

$$t - t_0 = \frac{\ln(y)}{a} - \frac{c \ln(K - y)}{a} + \frac{(c - 1)\ln(K/2)}{a}$$

dove c è un nuovo parametro di forma che regola l'importanza relativa dell'accelerazione della crescita al crescere di y da valori bassi e della decelerazione della crescita quando y si avvicina a K . La stretta relazione tra questa nuova equazione e l'equazione logistica originale significa che rappresenta un'equazione logistica generalizzata tanto quanto l'equazione di Richards. La forma differenziale di questa equazione è:

$$\frac{dy}{dx} = ay \left(1 - \frac{cy}{K - y + cy} \right)$$

L'unico svantaggio di questa equazione è che la soluzione non si può rendere in forma esplicita. Tuttavia, questo è un problema secondario; infatti, sono disponibili algoritmi non lineari di adattamento sia per le equazioni differenziali che per le funzioni implicite. L'adattamento dell'equazione di Richards e della nuova equazione proposta viene valutato su un database di riferimento utilizzato in numerosi studi per testare alcuni metodi proposti nella PCR in tempo reale [1]. La normalità della distribuzione dei residui è stata verificata con il test di Anderson-Darling, un test è stato utilizzato per verificare la casualità della distribuzione del segno degli scarti; inoltre è stata calcolata la matrice di varianza-covarianza per verificare l'interdipendenza tra i parametri stimati.

Risultati

La nuova funzione presenta un ottimo adattamento, sovrapponibile a quello ottenuto utilizzando la curva di Richards; all'aumentare dell'asimmetria, il parametro b della curva di Richards diverge verso valori superiori a qualunque vincolo superiore, quindi l'algoritmo di fitting deve essere bloccato a un valore predefinito a priori; inoltre, i parametri stimati sono fortemente correlati tra loro. La nuova funzione supera queste limitazioni, consentendo un ottimo fitting anche nei casi in cui la curva di Richards non è applicabile. Ciò ha permesso di calcolare il Cy_0 anche in quelle situazioni limite in cui l'approccio basato sulla curva di Richards produceva risultati con errori sistematici. Anche la distribuzione dei residui e i run test mostrano risultati migliori con l'uso della nuova curva.

Conclusioni

L'uso della nuova funzione corregge ed estende l'applicabilità del metodo Cy_0 nella quantificazione in real time degli acidi nucleici; ciò permette di quantificare in real time PCR mantenendo i vantaggi del metodo Cy_0 , riducendo al minimo gli errori derivanti dalle limitazioni intrinseche nel modello precedentemente utilizzato.

Bibliografia

- [1] Ruijter J.M., Pfaffl M.W., Zhao S. et al. Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision, and implications. *Methods*. 2013 Jan;59(1):32-46.
- [2] Guescini M., Sisti D., Rocchi M.B. et al. A new real-time PCR method to overcome significant quantitative inaccuracy due to slight amplification inhibition. *BMC Bioinformatics*. 2008 Jul 30;9:326..
- [3] Sisti D., Guescini M., Rocchi M.B. et al.. Shape based kinetic outlier detection in real-time PCR. *BMC Bioinformatics*. 2010 Apr 12;11:186.
- [4] Guescini M., Sisti D., Rocchi M.B. et al. Accurate and precise DNA quantification in the presence of different amplification efficiencies using an improved Cy_0 method. *PLoS One*. 2013 Jul 8;8(7):68481.
- [5] Birch P.D.B. A New Generalized Logistic Sigmoid Growth Equation Compared with the Richards Growth Equation. 1999 *Annals of Botany* 83: 713-723