Verifizierung und Einführung des E-Gel™ Power Snap Plus Electrophoresis System von Invitrogen™ für die KIR- und HLA-C-Typisierung

Vanessa Dietrich, BMA 21-24

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Labormedizinisches Zentrum Dr. Risch, Genetik

1. Zusammenfassung

Die Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIR) auf den uterinen natürlichen Killerzellen spielen gemäss Literatur eine wichtige Rolle bei Spontanaborten und Implantationsversagen, wenn der mütterliche KIR-Genotyp AA in Kombination mit einem «fremden» embryonalen HLA-C2-Allel vorliegt [1]. Der Versuch des Labors, die Analyse mittels konventioneller Gelelektrophorese mit selbstgegossenen Gelen einzuführen, entsprach nicht ihren Qualitätsansprüchen. Daraufhin entschied sich das Labor für den Kauf des E-Gel™ Power Snap Plus Electrophoresis System von Invitrogen™, welches mit gebrauchsfertigen E-Gele™ kompatibel ist. Die Ziele dieser Diplomarbeit umfassten die Verifizierung der KIR- und HLA-C-Typisierung mittels des neuen Systems und dessen Einführung in die Routine. Dabei wurde unter anderem überprüft, ob die erzielten Resultate mit den Referenzresultaten übereinstimmen. Die Verifizierung erfolgte mit bereits extrahierten DNA-Proben aus EDTA-Vollblut unter Verwendung der Kits «KIR-TYPE» und «HISTO-TYPE C low» von BAG Diagnostics für die Polymerase-Kettenreaktion mit sequenzspezifischen Primern (SSP-PCR). Die erzielten Resultate stimmten vollständig mit den Referenzresultaten überein. Der Verifizierungsprozess zeigte, dass die KIR- und HLA-C-Typisierung aufwändig und herausfordernd ist, besonders bei der Interpretation der Gele. Trotzdem gelang es der Genetik-Abteilung des Labors Dr. Risch, die Analyse als erstes Labor in der Schweiz im April 2024 erfolgreich in die Routine einzuführen.

2. Einleitung

Die Genetik-Abteilung des Labors Dr. Risch verfolgt das Ziel, ihr Analysespektrum im Bereich Kinderwunsch und Infertilität zu erweitern. Ein Projekt wurde gestartet, um die KIR- und HLA-C-Typisierung intern anzubieten, da diese bisher extern durchgeführt wurden: KIR-Proben gingen ans MVZ-Martinsried in Deutschland, HLA-C-Proben ans Inselspital Bern. Die Typisierungen bei Dr. Risch wurden mittels konventioneller Gelelektrophorese mit selbstgegossenen Gelen durchgeführt. Aufgrund mangelnder Qualität der Ergebnisse und nicht bestandener externen Qualitätskontrollen entschied sich das Labor für die Anschaffung des E-Gel™ Power Snap Plus Electrophoresis System von Invitrogen™, welches kompatibel mit gebrauchsfertigen Gelen ist.

KIRs werden unter anderem auf den uterinen natürlichen Killerzellen (uNK-Zellen) exprimiert [1]. Die uNK-Zellen setzen Wachstumsfaktoren und Zytokine frei, die die Entwicklung der Plazenta und die Umbildung der Spiralarterien unterstützen [2]. Studien zeigen, dass Frauen mit dem KIR-Genotyp AA und einem Embryo mit zusätzlichem «fremden» HLA-C2-Allel (vom Vater oder von gespendeter Eizelle) ein erhöhtes Risiko für Schwangerschaftsstörungen haben. Wie in der Abbildung 1 dargestellt, bindet dabei der Rezeptor vom Gen *KIR2DL1* stark an HLA-C2 und die für die Embryonalentwicklung notwendigen Zytokine und Wachstumsfaktoren werden daraufhin stark gehemmt. Der KIR B-Haplotyp bietet im Gegensatz zum A-Haplotyp einen Schutz, indem die aktiven Gene die hemmende Wirkung ausgleichen, was zu einer besseren Trophoblasteninvasion führt. Zum Beispiel kann anstelle des von *KIR2DL1* codierten Rezeptors der von *KIR2DS1* codierte Rezeptor an das HLA-C2-Molekül binden [1, 2 & 3].

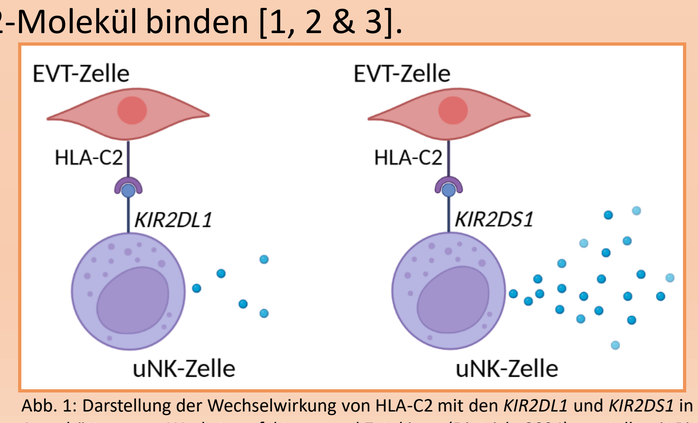


Abb. 1: Darstellung der Wechselwirkung von HLA-C2 mit den *KIR2DL1* und *KIR2DS1* in Bezug auf die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Dietrich, 2024) - erstellt mit BioRender.com

3. Ziele und Fragestellungen

Das **erste Ziel** dieser Arbeit ist die **Verifizierung** des Analysegerätes E-Gel™ Power Snap Plus Electrophoresis System von Invitrogen™ für die KIR- und HLA-C-Typisierung.

Fragestellung: Stimmen die mit dem E-Gel™ Power Snap Plus Electrophoresis System von Invitrogen™ erhaltenen Resultate mit den Referenzresultaten überein?

- Referenzresultate KIR: MVZ-Martinsried und UK NEQAS
- Referenzresultate HLA-C: Inselspital Bern

Das **zweite Ziel** ist, nach der erfolgreichen Verifizierung des E-Gel™ Power Snap Plus Electrophoresis System von Invitrogen™, dessen **Einführung in die Routine**.

Fragestellung: Kann das E-Gel™ Power Snap Plus Electrophoresis System von Invitrogen™ für die Routineanalytik von KIR und HLA-C eingeführt werden?

Referenzen

[1] Díaz-Hernández, I., Alecsandru, D., García-Velasco, J. A. & Domínguez, F. (2021). Uterine natural killer cells: from foe to friend in reproduction. *Human Reproduction Update, 2021/27(4)*, 720-746. https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa062

[2] Piekarska, K., Radwan, P., Tarnowska, A., Radwan, M., Wilczyński, J. R., Malinowski, A., & Nowak, I. (2022). ERAP/HLA-C and KIR Genetic Profile in Couples with Recurrent Implantation Failure. *International Journal of Molecular Sciences, 2022/23*(20), 1-15. https://doi.org/10.3390/ijms232012518

[3] Alecsandru, D., Barrio, A., Garrido, N., Aparicio, P., Pellicer, A., Moffett, A. & García-Velasco, J. A. (2020). Parental human leukocyte antigen-C allotypes are predictive of live birth rate and risk of poor placentation in assisted reproductive treatment. *Fertility and Sterility, 2020 Oct/114*(4), 809-817. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.05.008

4. Material, Methodik, Vorgehen

Material: Die Verifizierung beinhaltete insgesamt 15 anonymisierte DNA-Proben von Patientinnen und Patienten (10 für HLA-C und 5 für KIR), sowie 5 externe Qualitätskontrollen von UK NEQAS für KIR. Das verwendete Analysegerät E-Gel™ Power Snap Plus Electrophoresis System von Invitrogen™ ist mit gebrauchsfertigen E-Gelen™ kompatibel. Die verwendeten PCR-Kits «KIR-TYPE» und «HISTO-TYPE C low» von BAG Diagnostics enthalten Platten mit vorgetropften Reaktionssätzen, die allelspezifische Primer und interne Kontrollen beinhalten. Sie ermöglichen eine eindeutige Genotypisierung mittels sequenzspezifischer Primer-PCR-Methode.
Methodik: Nach Messung der DNA-Konzentration und -Reinheit der Proben und Berechnung des Master-Mixes wird die analysespezifische Platte pipettiert und anschliessend die Amplifikation nach Protokoll durchgeführt. Nach Beendigung wird ein gebrauchsfertiges E-Gel™ in das Gerät eingesetzt und die Proben nach einem laborinternen Pipettierschema pipettiert. Die Gelelektrophorese wird gestartet und nach dem Lauf wird das Gel direkt am Gerät fotografiert. Die Auswertung der KIR-Typisierung erfolgt mithilfe des KIR-TYPE Worksheets und der Spezifitätstabelle, während für die HLA-C-Typisierung die BAG HISTO MATCH Software sowie die Spezifitätstabelle verwendet werden.
Die Ergebnisse wurden durch den Vergleich mit den definierten Referenzlaboren überprüft, wobei eine vollständige Übereinstimmung angestrebt wurde. Zudem wurde die Integration des Analysegerätes in den Routinebetrieb durch ein offizielles Labordokument überwacht, das alle erforderlichen Schritte festlegte.

5. Ergebnisse/ Resultate

In der Tabelle 1 werden die KIR-Ergebnisse des E-Gels™ der externen Qualitätskontrollen mit den Referenzresultaten von UK NEQAS verglichen. «+» zeigt das Vorhandensein, «Neg» das Fehlen der Bande für das jeweilige Gen. Alle KIR-Proben stimmen vollständig mit den Referenzresultaten überein, einschliesslich der Patientenproben 1-5, die hier jedoch nicht dargestellt werden. Die Resultate der Gene *2DS2* und *2DS4* der Probe 7 sind aufgrund der stark reduzierten Bandenintensität in Klammern gesetzt. Die Tabelle 2 zeigt die HLA-C-Ergebnisse des E-Gels™ im Vergleich zu den Referenzen vom Inselspital Bern. Mit Ausnahme von Probe 16 stimmen alle Genotypbezeichnungen überein.

Tabelle 1: Vergleich der externen Qualitätskontrollen mit den Referenzresultaten von UK NEQAS (Dietrich, 2024)

	Probe 6		Probe 7		Probe 8		Probe 9		Probe 10	
Gene	**Referenz**	**E-Gel™**	**Referenz**	**E-Gel™**	**Referenz**	**E-Gel™**	**Referenz**	**E-Gel™**	**Referenz**	**E-Gel™**
2DL1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2DL2	+	+	+	+	+	+	Neg	Neg	Neg	Neg
2DL3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2DL4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2DL5	+	+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
2DS1	+	+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
2DS2	+	+	+	(+)	+	+	Neg	Neg	Neg	Neg
2DS3	+	+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
2DS4	Neg	Neg	+	(+)	+	+	+	+	+	+
2DS5	+	+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
3DL1	Neg	Neg	+	+	+	+	+	+	+	+
3DL2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3DL3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3DS1	+	+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
2DP1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3DP1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Übereinstimmung	JA		JA		JA		JA		JA	

Tabelle 2: Vergleich der HLA-C-Proben mit den Referenzresultaten des Inselspitals Bern (Dietrich, 2024)

Proben	**Referenz-Genotypen** (Inselspital Bern)	**Genotypen** E-Gel™ System	**Übereinstimmung**
Probe 11	C*04 C*16	C*04 C*16	JA
Probe 12	C*02 C*15	C*02 C*15	JA
Probe 13	C*03 C*04	C*03 C*04	JA
Probe 14	C*05 C*07	C*05 C*07	JA
Probe 15	C*06 C*15	C*06 C*15	JA
Probe 16	C*06 C*06	C*06, -	JA?*
Probe 17	C*03 C*06	C*03 C*06	JA
Probe 18	C*04 C*14	C*04 C*14	JA
Probe 19	C*03 C*12	C*03 C*12	JA
Probe 20	C*03 C*07	C*03 C*07	JA

Alle Schritte zur Integration des Analysegerätes in die Routine wurden erfolgreich im Labordokument abgearbeitet. Das Labor führte das neue Analysegerät zusammen mit der Analyse der KIR- und HLA-C-Typisierung am 11.04.2024 in die Routine ein.

6. Diskussion

Fragestellung zu Ziel 1: Die dargestellten Ergebnisse umfassten einen fachlichen Austausch mit Frank Lammers, Key Account Manager bei BAG Diagnostics, und Dr. Kristin Launhardt, Leiterin des Produktmanagements für HLA-Diagnostik bei BAG Diagnostics. Dieser Austausch bestätigte, dass die abweichende Genotypbezeichnung von Probe 16 aufgrund methodischer Einschränkungen als C*06,- angegeben wurde, das Ergebnis jedoch mit der Referenz übereinstimmt. Die deutlich reduzierten Bandenintensitäten bei der Probe 7 könnten auf die mangelnde Qualität der externen Qualitätskontrolle zurückzuführen sein. Weitere während der Verifizierung aufgetretene Schwierigkeiten, wie unspezifische Banden, wurden entweder korrekt bewertet oder führten bei Fehlinterpretationen nicht zu abweichenden Genotyp-Ergebnissen, sodass alle Resultate als übereinstimmend mit der Referenz angesehen werden können.
Fragestellung zu Ziel 2: Seit der Einführung am 11. April 2024 wird die Analyse wöchentlich ab zwei Proben durchgeführt. Das Labor versendet keine Proben mehr extern, da alle erforderlichen Schritte abgeschlossen sind und genügend Personal geschult wurde, um die Analyse routinemässig im Labor durchzuführen.

Abbildungen

Abb. 1 Dietrich, V. (2024). *Darstellung der Wechselwirkung von HLA-C2 mit den KIR2DL1 und KIR2DS1 in Bezug auf die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen.* medi.

Tabellen

Tabelle 1 Dietrich, V. (2024). *Vergleich der externen Qualitätskontrollen mit den Referenzresultaten von UK NEQAS.* medi.
Tabelle 2 Dietrich, V. (2024). *Vergleich der HLA-C-Proben mit den Referenzresultaten des Inselspitals Bern.* medi.