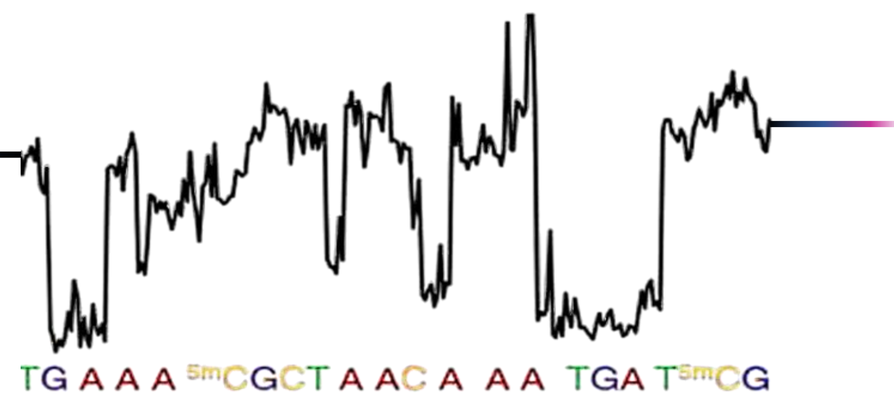
Evaluation des NanoTYPE MONOall™ Kits zur HLA-A Einzeltypisierung mittels MinION™ Mk1B Oxford Nanopore Sequenzierungstechnologie



Zahira Šaipi, BMA 22-25

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Inselspital Bern, Zentrum für Labormedizin (ZLM) Spezialdiagnostik;
Fachbereich Transplantations- und molekulare Immundiagnostik

1. Zusammenfassung

Das Typisierungslabor des Zentrums für Labormedizin (ZLM) am Inselspital Bern führt HLA-Typisierungen zur immunologischen Abklärung vor Organtransplantationen durch. Nebst Transplantationsabklärungen steigt die Nachfrage nach gezielten HLA-Typisierungen, beispielsweise für das HLA-A*02:01-Allel, welches entscheidend für die Anwendung von Tebentafusp bei Patient:innen mit metastasiertem Aderhautmelanom ist. Bisher wurde dafür die zeit- und kostenintensive Sequencing-by-Synthesis-(SBS)-Methode eingesetzt, deren Ergebnisse erst nach drei Tagen vorliegen. Das Labor plant die Nanopore Sequenzierungstechnologie von Oxford Nanopore Technologies (ONT) zu evaluieren und in den Routinebetrieb einzuführen. Ein Vorteil dieser Methode ist die schnelle Verfügbarkeit der Ergebnisse innerhalb eines Tages, was bei dringlichen Analysen von grossem Nutzen ist. Ziel der Diplomarbeit war die Eignung der Nanopore-Methode zur HLA-A Einzeltypisierung mit dem NanoTYPE MONOall™ Kit von Omixon zu testen. Dabei wurden 20 Proben untersucht. Diese zeigten eine vollständige Übereinstimmung mit der SBS-Methode. Zudem überzeugte die Nanopore-Methode durch eine verkürzte Turnaround Time, die Möglichkeit zur Einzellokusbestimmung, keine Mindestprobenanforderung und ihre einfache Handhabung. Die Nanopore-Methode eignet sich somit als primäre, hochauflösende Typisierungsmethode für gezielte HLA-A Einzellokusbestimmungen.

2. Einleitung

Das Humane Leukozyten-Antigen-(HLA)-System ist Teil des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) und spielt eine zentrale Rolle in der Immunantwort. Dieser Komplex umfasst hochpolymorphe HLA-Gene, welche auf Chromosom 6 positioniert sind. Ihre Hauptfunktion besteht darin, die Antigenpeptide den T-Lymphozyten zur Erkennung zu präsentieren. Der MHC-Komplex kann in zwei Hauptregionen unterteilt werden: MHC-Klasse I und MHC-Klasse II. Die MHC-Klasse I enthält die HLA-Gene HLA-A/-B/-C während die MHC Klasse II HLA-DP/-DQ/-DR umfasst. Da die HLA-Gene ein polymorphes Muster in der Bevölkerung aufweisen [1], wurde eine standardisierte Nomenklatur entwickelt [2]. Die Nomenklatur der HLA-Gene basiert auf bis zu vier numerischen Feldern, die durch Doppelpunkte getrennt sind (z.B. HLA-A*02:01). Die Zahlen nach dem Doppelpunkt liefern genauere Informationen über das jeweilige Allel [3].

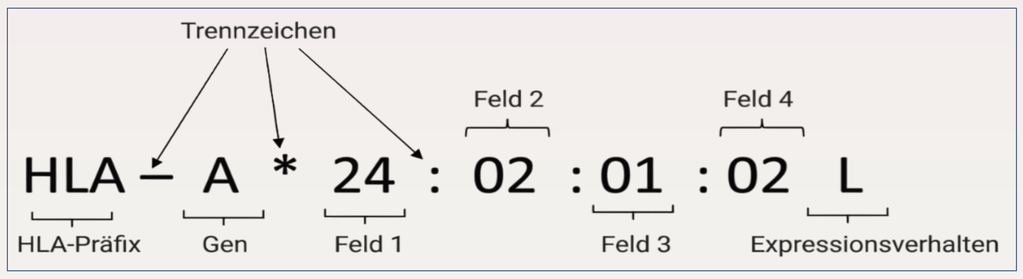


Abb. 1: HLA-Nomenklatur (Geo et al., 2024, S. 219). - adaptiert

Das Aderhautmelanom ist ein seltener Tumor des Auges, der vorwiegend bei Menschen kaukasischer Abstammung auftritt. Tebentafusp ist ein immunmodulierendes Medikament für erwachsene HLA-A*02:01-positive Patient:innen mit nicht-operablem oder metastasiertem Aderhautmelanom. Etwa 50 % der Weltbevölkerung exprimieren das MHC-Klasse-I-Molekül HLA-A*02:01. Patient:innen mit Aderhautmelanom, welche dieses Molekül exprimieren, sind für eine Behandlung mit Tebentafusp zugelassen. Dieser Allel-Nachweis besitzt daher eine hohe klinische Relevanz [4].

3. Ziele und Fragestellungen

Ziel 1: Validierung der Oxford Nanopore Sequenzierungstechnologie mittels MinION™ Mk1B Sequenzierungsgerät und NanoTYPE MONOall™ Kit von Omixon für die HLA-A Einzeltypisierungen.

Fragestellung 2 zu Ziel 1: Eignet sich die neue Nanopore-Methode unter Verwendung des NanoTYPE MONOall™ Kits zur Typisierung des HLA-A-Gens und als Back-up für die Bestätigung von einzelnen HLA-Loci (z.B. HLA-DQB1) zum aktuell verwendeten AllType™ FASTplex™ NGS-Assay?

Ziel 2: Evaluation der Oxford Nanopore Sequenzierungstechnologie und des NanoTYPE MONOall™ Kits von Omixon zur Anwendung in der Routinediagnostik für die HLA-A Einzeltypisierungen.

Fragestellung 1 zu Ziel 2: Wie ist das Kosten-Nutzen-Verhältnis der Typisierung von einzelnen HLA-Genen im Vergleich zur NGS-Volltypisierung unter Berücksichtigung der Turnaround Time (TAT), verwendeten Materialen, Einschränkungen und Vorteile der Assays sowie deren Kitkosten?

4. Methodik und Material

Die HLA-A Typisierungen von 20 isolierten DNA-Proben erfolgten mit dem NanoTYPE MONOall™ Kit und dem MinION™ Mk1B Sequenzierer, der auf Nanopore-Technologie basiert. Bei dieser Methode werden DNA-Stränge durch Nanoporen geleitet, wodurch gleichzeitig ein Ionenstrom erzeugt wird. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung über die Membran kommt es zu kurzen Modulationen im Ionenstrom, die durch Wechselwirkungen zwischen den DNA-Molekülen und der Nanopore verursacht werden. Diese Signale werden gemessen und ermöglichen eine präzise Identifikation der DNA-Moleküle mithilfe spezieller Software-Tools. MinKNOW™ steuert den Sequenzierer und führt eine Echtzeit-Analyse durch. Die daraus generierten Daten werden anschliessend im NanoTYPER™ verarbeitet und in verständliche Resultate überführt.

5. Ergebnisse/Resultate

Die hochauflösenden Typisierungsmethoden (Nanopore und NGS) zeigten in allen 20 Proben identische Ergebnisse bis zur 4-Feld-Auflösung. Die Nanopore-Methode (NanoTYPE MONOall™ Kit) wies eine Turnaround Time von 24h auf (NGS-Methode: 60h). Für eine gezielte HLA-A Einzellokusbestimmung lagen die Kosten bei der Nanopore-Methode bei CHF 69 (NGS-Methode: CHF 171.)

6. Diskussion/Schlussfolgerungen

Das NanoTYPE MONOall™ Kit zeigte bei der Typisierung des HLA-A-Gens eine 100% Übereinstimmung mit der NGS-Methode. Zusätzlich wurden Daten zu HLA-DQB1 erhoben: In 20 Proben traten sechs Diskrepanzen im 4. Feld auf. Aufgrund dieser Resultate validierte das Typisierungslabor das Kit bis zum 3. Feld. Unterschiede zwischen den Methoden zeigten sich somit nur im 4. Feld. Mutationen im 4. Feld liegen in den Introns und besitzen in den meisten Fällen keine klinische Relevanz. Zusammenfassend bietet das NanoTYPE MONOall™ Kit eine mögliche Back-up-Lösung zur Bestätigung einzelner HLA-Loci im Vergleich zum aktuell verwendeten Alltype™ Fastplex™ NGS-Assay. Die Long-Read-Technologie ermöglicht zudem ein besseres Phasing, was insbesondere bei hochpolymorphen Genen wie den HLA-Genen von Bedeutung ist. Die niedrigeren Gesamtkosten sowie die kürzere Turnaround Time sprechen insbesondere in Fällen, in denen nur ein HLA-Gen typisiert werden soll, klar für den Einsatz dieser Methode.

Referenzen

[1] Spierings et al., (2024). https://doi.org/10.1007/978-3-031-44080-9_9
[2] Hurley, C. K. (2021). https://doi.org/10.1016/j.humimm.2020.03.005
[3] Geo et al., (2024). https://doi.org/10.1159/000538176
[4] Wespiser et al., (2023). https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2023.102599

Abbildung

Abb. 1: Geo et al., (2024). - adaptiert https://doi.org/10.1159/000538176