

Christoph Gassner<sup>1</sup>, Stefan Meyer<sup>1</sup>, Caren Vollmert<sup>2</sup>, Beat M. Frey<sup>1</sup>

# MALDI-TOF MS und Genomik in der Transfusionspraxis

**Praktisch alle erblichen Veranlagungen von Blutgruppen sind punktuelle Variationen der genomischen DNS und werden von Molekularbiologen «Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)» genannt. Z.B. unterscheidet sich die Veranlagung für die zwei Varianten der Blutgruppe Kidd nur durch eine einzige kodierende Base voneinander. Dies führt zu einer Aminosäure-Variation in den zwei unterschiedlichen Kidd-Peptiden, Jk<sup>a</sup> und Jk<sup>b</sup>, welche, entsprechend Mendel, homo- oder heterozygot in verschiedenen Menschen vorliegen können. Kidd ist ein Transmembran-Peptid und der Unterschied erscheint auf der Erythrozyten-Aussenseite. Das Immunsystem einer Kidd-homozygoten Blutempfängerin, oder Schwangeren, kann dann, falls gegeben, ein ihr fremdes Kidd-Antigen erkennen, Antikörper bilden und die bekannten Transfusions-, oder Schwangerschafts-relevanten Konsequenzen auslösen.**

Tatsächlich sind die allermeisten Blutgruppen-Antigene paarartig veranlagt und werden oft mit Variante «a» und «b» bezeichnet. Üblicherweise werden diese beiden Antigene von den zwei verschiedenen Nukleotiden des betreffenden SNPs kodiert und sind für die allermeisten Antigene bereits erforscht und beschrieben. Gendiagnostik von Blutgruppen fusst also auf SNP-Diagnostik. Matrix-assisted laser desorption/ionisation, time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) ist eine Variante der MS. Der Analyt wird hierbei in eine Matrix eingebettet, die auf einem metallischen Träger vorliegt, und mittels Laserbeschuss ionisiert. Die gemessene «time of flight» (TOF) ist dabei der Masse und Ladung der ionisierten Moleküle proportional und erlaubt eine exakte Massenbestimmung. Populärwissenschaftlich könnte man MS auch mit «Elektrophorese im Vakuum» umschreiben. Als Analyten eignen sich vor allem chemische Verbindungen (pharmazeutische Wirkstoffe), Proteine und Peptide (Proteomics), und eben niedermolekulare Oligonukleotide (Primer). Für die genetischen Untersuchungen werden heutzutage spezialisierte MALDI-TOF-MS-Geräte verwendet, welche gegenwärtig ausschliesslich von Agena Bioscience (San Diego, Kalifornien, bis Mitte 2014 «Sequenom») hergestellt werden.

Das Prinzip der genetischen Analyse von SNPs mittels MALDI-TOF MS beinhaltet wenige Zwischenschritte, und ist deshalb direkt, sehr genau, robust und reproduzierbar. Trotzdem dauert eine durchgehende Analyse zwischen 6 bis 8 Stunden und ist deshalb für die Untersuchung von zeitsensitiven Patienten-Proben und wegen des idealerweise hohen Durchsatzes (96-, oder 384-Mikrotiter-Platten-Format) wenig geeignet. Auf klassischen PCR-Amplifikaten wird direkt vor dem interessierenden SNP ein Elongations-Primer platziert. Dessen 3'-enzymatische Verlängerung um exakt ein Nukleotid ist der eigentliche diagnostische Schritt, und es entstehen die Analyte, die sich je nach angehängtem Nukleotid und untersuchter SNP-Kodierung in ihrem molekularen Gewicht unterscheiden. Die Analyte von Homozygoten haben jeweils eine definierte Masse, Heterozygote beide diese Massen. Das molekulare Gewicht dieser verlängerten Elongations-Primer (Analyte) wird nun mittels MALDI-TOF MS bestimmt und erlaubt schlussendlich die Auskunft, welche Nukleotide am untersuchten SNP vorliegen. Die Resultate werden in Form von «peaks» optisch und numerisch dokumentiert, und die Blutgruppen-Phänotypen aus den Genotypen abgeleitet. Besonders interessant ist, dass die einzelnen Amplifikationen und auch Elongationen in sog. «Multiplexe», also in ein Reaktionsgefäss, zusammengeführt werden

## Spectromètre de masse MALDI-TOF et dépistage génomique dans la pratique de la transfusion

Le spectromètre de masse MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionisation – time-of-flight) est destiné à l'analyse des composés chimiques et peptides, mais également – avec des instruments spécialisés – d'oligonucléotides de basse molécularité (amorces), donc l'ADN. Les amorces (ou primers) ici utilisées ont un effet de capteur en ceci qu'elles saisissent les génotypes SNP (polymorphisme nucléotidique), mémorisent ces informations et les restituent lors de l'analyse de leur masse moléculaire. Etant donné que presque tous les groupes sanguins sont naturellement codés dans nos gènes en tant que SNP, une option très efficace pour la détermination génétique des groupes sanguins s'offre à nous, en alternative à la sérologie classique. Au total, 37 000 donateurs venant de toute la Suisse ont été génotypés à Zurich lors du don du sang, et 333 donateurs ont été identifiés comme ayant des groupes sanguins (très) rares. Une sécurité renforcée des soins médicaux est ainsi garantie. Il s'est par ailleurs avéré que le génotypage réalisé au moyen d'un spectromètre de masse MALDI-TOF peut être au moins aussi précis et moins coûteux que la sérologie classique.

können, was den potentiellen Durchsatz um das ca. 20-fache erhöht und die Kosten pro einzelne SNP-Bestimmung beinahe um den gleichen Faktor reduziert.

### Historie

Bereits 1995 wurde das Prinzip der MALDI-TOF-MS-Gendiagnostik beschrieben, und in Basel erstmals 2006 für die Bestimmung väterlich ererbter fötaler Allele aus maternalem Plasma, analog 2008 für die pränatale Bestimmung der Blutgruppe Kell, und 2009 für die Bestimmung humaner Plättchen-Antigensysteme (HPA) eingesetzt [1–4]. Geringe Kosten, hohe Resultatqualität und Flexibilität, was eine schnelle Berücksichtigung laufend neu entdeckter Blutgruppen-SNPs betrifft, sind herausragende Stärken MALDI-TOF-MS-basierender Genotypisierung.

### Entwicklung der Module

Beginnend mit Sommer 2011 wurden an Blutspende Zürich mit finanzieller Unterstützung der Humanitären Stiftung des Schweizerischen Roten Kreuzes, der Hilfe der Dachorganisation Blutspende Schweiz (B-CH) und in Zusammenarbeit mit der Firma Sequenom Hamburg sechs Module bestehend aus 10 Multiplex-Reaktionen entwickelt. Diese Module waren in der

<sup>1</sup> Blutspende Zürich, SRK, Rütistrasse 19, CH-8952 Schlieren

<sup>2</sup> Agena Bioscience GmbH, Hamburg, Germany

Lage, 107 SNPs, somit 170 Blutgruppen-Allele und damit 101 Blutgruppen-Antigene zu diagnostizieren [5].

## Resultate

Drei Jahre später, im Sommer 2014, wurde das Projekt beendet und es konnten die ersten detaillierten Resultate berichtet werden [6]. Anhand eines Vergleichs serologischer Vorwerte der Blutgruppen K/k, Kp<sup>a/b</sup>, Jk<sup>a/b</sup> und Fy<sup>a/b</sup> mit den ermittelten Genotypen von 4000 Blutspendern zeigte sich, dass Serologien ca. 10-mal häufiger fehlerhaft waren als Genotypisierungen, nämlich 33 versus 3, unter insgesamt 32 000 bestimmten Antigenen (4 bi-allelische Antigene, n=4000) [6]. MS für MNSs an 5743 Blutspendern resultierte in 11 serologischen versus 10 genetischen Fehlbestimmungen unter 22 972 bestimmten Antigenen (2 bi-allelische Antigene, n=5743, MNSs-Manuskript in Vorbereitung). Alle Fehlbestimmungen wurden mittels Zweitproben serologisch und genetisch abgeklärt. Während serologische Fehler auf (sehr) schwach exprimierte Antigen-Varianten, Übertragungsfehler und auch auf echte Fehlbestimmungen zurückzuführen waren, handelte es sich bei den genetischen Fehlbestimmungen bisher ausnahmslos um neue genetische Allel-Varianten (1 Kp<sup>a</sup>, 1 Jk<sup>b</sup>, 1 Fy<sup>b</sup>, 3 S) oder Allele, die für die Gendiagnostik nicht explizit berücksichtigt worden waren (7 N) [6]. In

der Tat also keine «eigentlichen Fehlbestimmungen», sondern hoch spezifische Indikatoren für das Vorliegen sehr seltener Blutgruppen-Varianten. Generell erlaubt Blutgruppen-Genotypisierung auch die Bestimmung von Blutgruppen, für die es keine kommerziell erhältlichen Antiseren gibt. Beispiele hierfür sind Js<sup>a/b</sup> des Kell-Systems, oder auch Co<sup>a/b</sup> [7]. In vielen Fällen sind genau diese Blutgruppensysteme jene, bei denen einer der beiden homozygoten Genotypen nur (sehr) selten in der Bevölkerung vorkommt. Entsprechende Blut-Spender, bzw. Empfänger werden auch als «Hoch-Frequenz-Antigen-(HFA-)Negative» bezeichnet, wie z.B. Kp<sup>b</sup> Negative, oder Vel Negative, und stellen als solche immer wieder Herausforderungen für die Blutversorgung dar. Aufgrund des immensen Durchsatzes, theoretisch nämlich ca. 100 000 SNP-Genotypen pro Tag, erlaubt MALDI-TOF MS faktisch eine echte Suche nach diesen Spendern mit seltenen Blutgruppen. Die Teilnahme der Blutspender und Blutspendedienste von 11 der insgesamt 13 Schweizer Blutspendedienste ermöglichte im abgeschlossenen Projekt die Untersuchung von mehr als 37 000 Schweizern auf 22 verschiedene HFA-Negativitäten. Erfreulicherweise konnten zu den bereits ca. 600 registrierten weitere 333 neu entdeckte Blutspender mit (sehr) seltenen Blutgruppen an das (inter-)nationale Rare

Donor File der Blutspende Schweiz gemeldet werden (Tabelle 1). Damit sollte eine für die nächsten Jahre um die Hälfte verbesserte Versorgungssicherheit, nicht nur für Schweizer, garantiert sein.

## Fazit

Insgesamt waren die bestandenen Ringversuche, die Qualität aller bisher erzielten Resultate und die im Vergleich zur Serologie günstigeren Gesteungskosten derart überzeugend, dass Blutspende Zürich nun einen routinemässigen Einsatz dieser Technologie praktiziert. Gegenwärtig wird eine auf alle relevanten SNPs kondensierte Variante, nur noch bestehend aus 2 Multiplex-Reaktionen, als erste Methode für die Bestimmung der transfusionsrelevanten Allele verwendet. Mittels unserer zweiten Methode, der Serologie, werden die Genotypisierungen ausgewählter Blutspender dann verifiziert und erlauben damit den praktisch risikolosen Einsatz dieser neuen und sehr vielversprechenden Technologie: MALDI-TOF-MS-basierte Hochdurchsatz-Blutgruppen-Genotypisierung von Blutspendern.

Korrespondenz:  
C.Gassner@zhbsd.ch

## Referenzen

Sie finden die vollständigen Referenzen online unter: [www.sulm.ch/d/pipette](http://www.sulm.ch/d/pipette) → Aktuelle Ausgabe (Nr. 1-2015).

	Genève	Vaud, Lausanne	Neuchâtel - Jura	Valais, Sion	Beider Basel	Aargau - Solothurn, Aarau	Zentralschweiz, Luzern	Zürich	Ostschweiz, St.Gallen	Graubünden, Chur	Svizzera Italiana, Lugano	ALL
Untersuchte:	1'348	1'526	1'029	760	1'222	855	2'770	24'058	1'476	1'441	768	37'253
<b>Homozygote</b>												
K	1		2	2	3	1	4	50		1	4	68
Kp <sup>a</sup>	1	1					1	4				7
Lu <sup>a</sup>	1	1		1			6	29	2	2		42
LU14			1	1				5				7
Di <sup>a</sup>								1				1
Yt <sup>b</sup>	7	5	1	2	3	2	12	92	6	7	6	143
Co <sup>b</sup>	1	3	4	1	1	2	3	31	2	2	2	52
Hy neg	2	1						4				7
LW <sup>b</sup>								1				1
Vel neg	1							3			1	5
<b>«seltene» total</b>	<b>14</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>26</b>	<b>220</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>333</b>

Tabelle 1: Die Untersuchung von 37 253 Schweizer Blutspendern mittels MALDI-TOF-MS-Blutgruppen-Genotypisierung identifizierte 333 mit (sehr) seltener Blutgruppe.