



Implementierung der Oxford Nanopore Technologie in die pharmakogenetische Routinediagnostik

Jennica Frances Cortez, BMA 20-23

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Inselspital Bern AG Universitätsspital Bern



1. Zusammenfassung

Die Pharmacogenomics untersucht die genetische Veranlagung einer Person und deren Einfluss auf die individuellen Reaktionen des Körpers auf bestimmte Medikamente. Diese werden mit der TaqMan Allelic Discrimination Methode oder Sanger Sequenzierung untersucht. Sie analysieren bestimmte kleine Regionen des Genstrangs und Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP's). Mit der neuen Oxford Nanopore Sequenzierungsmethode kann der ganze Genstrang inklusiv beider Allele einzeln bestimmt werden, um eine cis- und trans-Konformation zu bestätigen.

Das Ziel ist die Gene *Thiopurin-Methyltransferase (TPMT)* und *Nudix Hydrolase 15 (NUDT15)* korrekt zu sequenzieren und die cis- und trans-Konformation herauszufinden, sowie ob sich die Kosten durchs Multiplexing verringern lassen.

Die Ergebnisse vom *TPMT* und *NUDT15* sind in einer Vierfelder-Tafel dargestellt und zeigen eine hohe Übereinstimmung mit den Resultaten der aktuell verwendeten Methoden. Des Weiteren kann die cis- oder trans-Konformation detektiert werden. Die Kosten der Reagenzien sind untereinander summiert und verglichen worden. Die Oxford Nanopore Sequenzierungsmethode zeigt eine hohe Zuverlässigkeit, um die gesuchten Variationen zu bestätigen, dennoch würden sich die Anschaffungskosten steigern. Der bioinformatische Teil der Auswertung sollte für die Routineanalytik noch optimiert werden, da dieser zu aufwändig ist.

2. Einleitung

Das Oxford Nanopore ist eine Weiterentwicklung von Next Generation Sequencing (NGS). Diese Technologie ermöglicht die Aufschlüsselung von compound heterozygoten Proben, indem mehrere SNP's einem bestimmten Allel zugeordnet werden und so deren cis- oder trans-Konformation dargestellt werden. Bei der Sequenzierung werden Änderung des Ionenstroms gemessen. Die Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Stränge wandern durch Protein-Nanopore in einer isolierten Membran. Während der Translokation blockieren die Basen innerhalb eines DNS-Stranges den Ionenfluss mit ihren unterschiedlichen Massen, wodurch sich der Strom verändert und Signaturprofile erzeugt werden können. Diese werden elektronisch erfasst und in spezifischen Basenrufen ersetzt, siehe dazu Abb. 2. [1]

Bei einer cis-Konformation kann die unveränderten Allel-Eigenschaften die negativen Auswirkungen des veränderten Allels ausgleichen, um somit ein Intermediate Protein herzustellen.

Bei der trans-Konformation fehlt die Kompensation und es wird ein völlig verändertes Protein hergestellt. Für die Behandlung der Patienten und Patientinnen ist die Unterscheidung ein lebenswichtiger Punkt der Therapiedosis.

Die Technologie hat mehrere Vorteile gegenüber den anderen Sequenzierungstechnologien, darunter eine lange Lesezeit, Tragbarkeit und schnelle Echtzeitanalyse. [2]

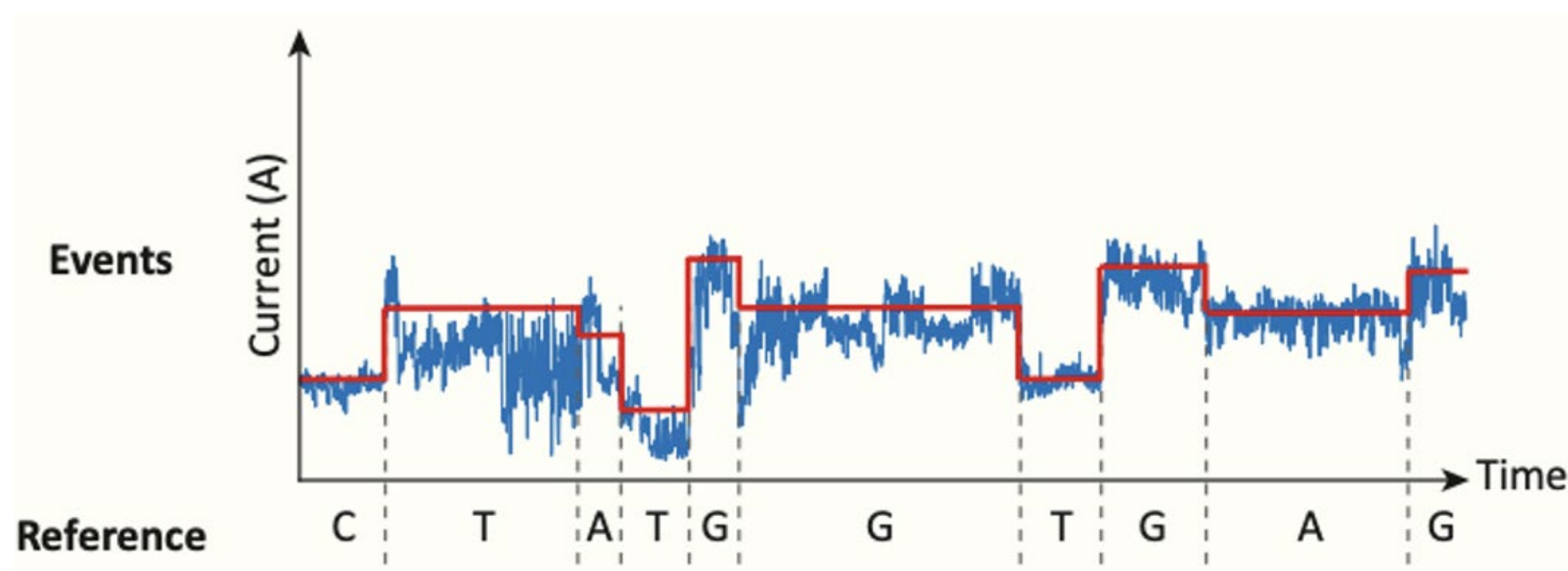


Abb. 2: Simulation of Nanopore Sequencing (Mekovski, 2022)

3. Ziele und Fragestellungen

Erste Ziel: Verwendung des Oxford Nanopore in der pharmakogenetischen Routinediagnostik für die Gene *TPMT* und *NUDT15*.

- Lassen sich die Genotypen korrekt analysieren im Vergleich zu den alten Methoden?

- Liefert der Oxford Nanopore die Aufschlüsselung der cis- oder trans-Konformation der einzelnen Varianten eines Allels?

Zweites Ziel: Die Kosteneffizienz mittels Multiplexing der 3 Gene *TPMT*-, *NUDT15*- und *CYP2D6* sowie weitere Gene (*UGT1A1*).

- Lassen sich die Kosten in einem Multiplex-Ansatz ohne Verlust der analytischen Sensitivität pro Probe verringern?

4. Material, Methodik, Vorgehen

Material: 11 Proben sequenziert, davon waren 3 *TPMT* und 2 *NUDT15*. Rest sind *CYP2D6* Proben.

Methodik: Die Spannungsänderung einzelner Basen, die ein Raw Signal ergeben und in Basen umwandeln, siehe Abb. 2, diese werden mit der Datenbank dann abgeglichen.

Vorgehen: Das Vorgehen wurde schematisch in Abb. 1 dargestellt



Abb. 1: Schematische Aufstellung des Vorgehens (Cortez, 2023)

5. Ergebnisse/ Resultate

Die Sensitivität, Spezifität, PPW und NPW liegen bei beiden bei 100%.

Tabelle 1: Vierfelder-Tafel für das Gen *TPMT* (Cortez, 2023)

<i>TPMT</i>	Alternative Variante - TaqMan	Wildtyp - Variante	Total
Oxford Nanopore -> positiv angezeigt (mögliche Variante)	5	0	5
Oxford Nanopore -> negativ angezeigt (Wildtyp)	0	5	5
Total	5	5	10

Tabelle 2: Vierfelder-Tafel für das Gen *NUDT15* (Cortez, 2023)

<i>NUDT15</i>	Alternative Variante - TaqMan	Wildtyp - Variante	Total
Oxford Nanopore -> positiv angezeigt (mögliche Variante)	2	0	2
Oxford Nanopore -> negativ angezeigt (Wildtyp)	0	6	6
Total	2	6	8

Tabelle 3: Direktvergleich der Kosten für die Analyse mit jeweils ein Patient:in und Kits (Cortez, 2023)

	<i>TPMT</i>	<i>NUDT15</i>	Nanopore
	1 Run mit 1 Patient:in und Kits	1 Run mit 1 Patient:in und Kits	1 Run Multiplex (<i>TPMT</i> und <i>NUDT15</i>) mit 1 Patient:in und Kits
Total Kosten 1 Ansatz	CHF 91.44	CHF 28.28	CHF 915.81

6. Diskussion

Die zwei Genotypen lassen sich mit der neuen Sequenzierungsmethode korrekt analysieren in einer Einzelanalyse sowie im Multiplex-Ansatz. Dennoch muss bedenkelt werden, dass die Probenzahl nicht sehr gross war. Die Kosten mit der Oxford Nanopore Technologie würden eher höher ausfallen als mit den alten Methoden aber die Sensitivität, Aufschlüsselung der Konformationen, sowie eine Einheitlichkeit der Analysen wäre von klinischer Bedeutung.

Referenzen

- [1] Deschamps, S., Mudge, J., Cameron, C., Ramaraj, T., Anand, A., Fengler, K., Hayes, K., Llaca, V., Jones, T. J., & May, G. (2016). Characterization, correction and de novo assembly of an Oxford Nanopore genomic dataset from *Agrobacterium tumefaciens*. *Scientific Reports*, 6(1), Article 1. Absatz 1. <https://doi.org/10.1038/srep28625>
- [2] Pomerantz, A., Peñañiel, N., Arteaga, A., Bustamante, L., Pichardo, F., Coloma, L. A., Barrio-Amorós, C. L., Salazar-Valenzuela, D., & Probst, S. (2018). Real-time DNA barcoding in a rainforest using nanopore sequencing: Opportunities for rapid biodiversity assessments and local capacity building. *GigaScience*, 7(4), Seite 1-2. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giy033>

Abbildungen

- Abb. 1: Cortez, J. F. (2023). *Schematische Aufstellung des Vorgehens*. Medi
- Abb. 2: Menovski, V. (2022). *Simulation of Nanopore Sequencing*. Blog. Abgerufen am 08.09.2023 von <https://vlamen.github.io/mscproject/nanopore/>

Tabellen

- Tabelle 1: Cortez, J. F. (2023). *Vierfelder-Tafel für das Gen TPMT*. medi
- Tabelle 2: Cortez, J. F. (2023). *Vierfelder-Tafel für das Gen NUDT15*. medi
- Tabelle 3: Cortez, J. F. (2023). *Direktvergleich der Kosten für die Analyse mit jeweils ein Patient:in und Kits*. medi