

Dr. rer. nat. Marita Führer; Dr. biol. hum. Rebekka Waldmann; Annika Vogt, M.Sc.; Vincent Kramer, M.Sc.;
Timo Dinse, B.Sc.; Dr. med. Christof Weinstock; Prof. Dr. med. David Messerer, MME, MHBA

Third-Generation-Sequencing: Chancen für die Transfusionsmedizin

ZUSAMMENFASSUNG Third-Generation-Sequencing (TGS) eröffnet neue Perspektiven für die molekulargenetische Diagnostik in der Transfusionsmedizin. Im Vergleich zu klassischen serologischen und molekulargenetischen Technologien ermöglicht TGS eine genauere Blutgruppen- und HLA-Typisierung sowie die Identifizierung komplexer Haplotypen und struktureller Varianten. In der Pathogendetektion erlaubt TGS perspektivisch eine umfassende, weitgehend biasfreie Analyse mikrobieller Genome und die verbesserte Rückverfolgung transfusionsassoziierter Infektionen mit spannenden Anwendungsfällen im Bereich der Resilienz gegenüber Pandemien und Bioterrorismus. Dieser Beitrag skizziert TGS als zukunftsweisende Plattformtechnologie, erläutert Funktionsweise, Vorteile, Limitationen und zentrale Herausforderungen.

SUMMARY Third-generation-sequencing (TGS) opens new perspectives for molecular genetic diagnostics in transfusion medicine. Compared to classical serological and molecular genetic technologies, TGS enables more accurate blood group and HLA typing as well as the identification of complex haplotypes and structural variants. In pathogen detection, TGS offers the potential for comprehensive, mostly bias-free analysis of microbial genomes and improved tracing of transfusion-associated infections, with exciting applications in the context of resilience to pandemics and bioterrorism. This article outlines TGS as a forward-looking platform technology, highlighting its mechanisms, advantages, limitations, and key challenges.

Abkürzungen:

ATMPs Advanced Therapy Medicinal Products

bp Basenpaare

DNA Desoxyribonukleinsäure

FGS Sequenziertechnologien der ersten Generation,
First-Generation Sequencing, auch Sangersequenzierung

kb Kilobase

NGS Next-Generation Sequencing

ONT Oxford Nanopore Technologies

PCR Polymerasekettenreaktion

RNA Ribonukleinsäure

SGS Sequenziertechnologien der zweiten Generation,
Second-Generation Sequencing, auch Next-Generation
Sequencing (NGS)

SNP Einzelnukleotid-Polymorphismus
(Single-nucleotide polymorphism)

T2T Telomer zu Telomer

TGS Sequenziertechnologien der dritten Generation,
Third-Generation Sequencing

1. Third-Generation-Sequencing – neue Möglichkeiten durch Adaptive Sampling und Long-Read-Sequencing

1.1. Einleitung und Begrifflichkeiten

Bereits 1977 legten Sanger und Kollegen¹ mit der Einführung der Didesoxy-Kettenabbruchmethode den Grundstein für die Sequenzierung von DNA (Sequenzier-technologien der ersten Generation, First-Generation-Sequencing, nachfolgend FGS). Mit hoher Genauigkeit, aber vergleichsweise geringer Geschwindigkeit und hohem Arbeitsaufwand war diese Methode lange der Goldstandard und ermöglichte etwa das Human Genome Project^{2,3}. Die darauffolgenden Entwicklungen, dargestellt in **Abbildung 1**, führten im frühen 21. Jahrhundert zu Sequenzier-technologien der zweiten Generation (Second-Generation-Sequencing, nachfolgend SGS, auch Next-Generation-Sequencing, NGS), mit Plattformen von Illumina, Thermo Fisher (Ion Torrent) und Weiteren^{4,5}. SGS führte durch drastisch reduzierte Kosten pro Base und hohen Durchsatzraten zu einem Durchbruch in vielen Anwendungsfeldern. Jedoch blieben manche Fragestellungen, etwa die Identifikation struktureller Varianten oder vollständiger Haplotypen, schwierig umzusetzen^{5,6}. Genau hier setzen Sequenzier-technologien der dritten Generation (Third-Generation-Sequencing, nachfolgend TGS)

an. Während FGS und SGS mittlerweile etablierte Methoden darstellen, eröffnet TGS völlig neue Perspektiven – sowohl in der Forschung als auch in der klinischen Anwendung, beispielsweise in der Transfusionsmedizin^{6–8}.

In dieser Übersicht geben die Autoren einen Einblick in die Möglichkeiten von TGS für den Blutspendedienst. Im Folgenden werden die Funktionsweise von TGS und die aktuell verfügbaren Plattformen vorgestellt. Anschließend wird der Nutzen von TGS für die Blutgruppendiagnostik und die Pathogendetektion erläutert, bevor abschließend zukünftige Potenziale und Herausforderungen diskutiert werden.

1.2. Funktionsweise der TGS-Plattformen

Nachfolgend stellen wir kurz die Funktionsprinzipien der wichtigsten TGS-Plattformen vor. Weiterführende Informationen zur zeitlichen Entwicklung, zu aktuellen Geräteplattformen mit quantitativen und ökonomischen Kennzahlen können beispielsweise aus⁹ entnommen werden.

Die Plattformen der amerikanischen Firma PacBio nutzen das Single-Molecule-Real-Time-Sequencing-Verfahren, bei dem eine Silizium-Scheibe – die SMRT-Zelle – Millionen sogenannter Zero-Mode-Waveguides (ZMWs) enthält^{9,10}. Jede ZMW ist ein nanometergroßes Reaktionsgefäß, in dem eine einzelne zirkularisierte DNA immo-

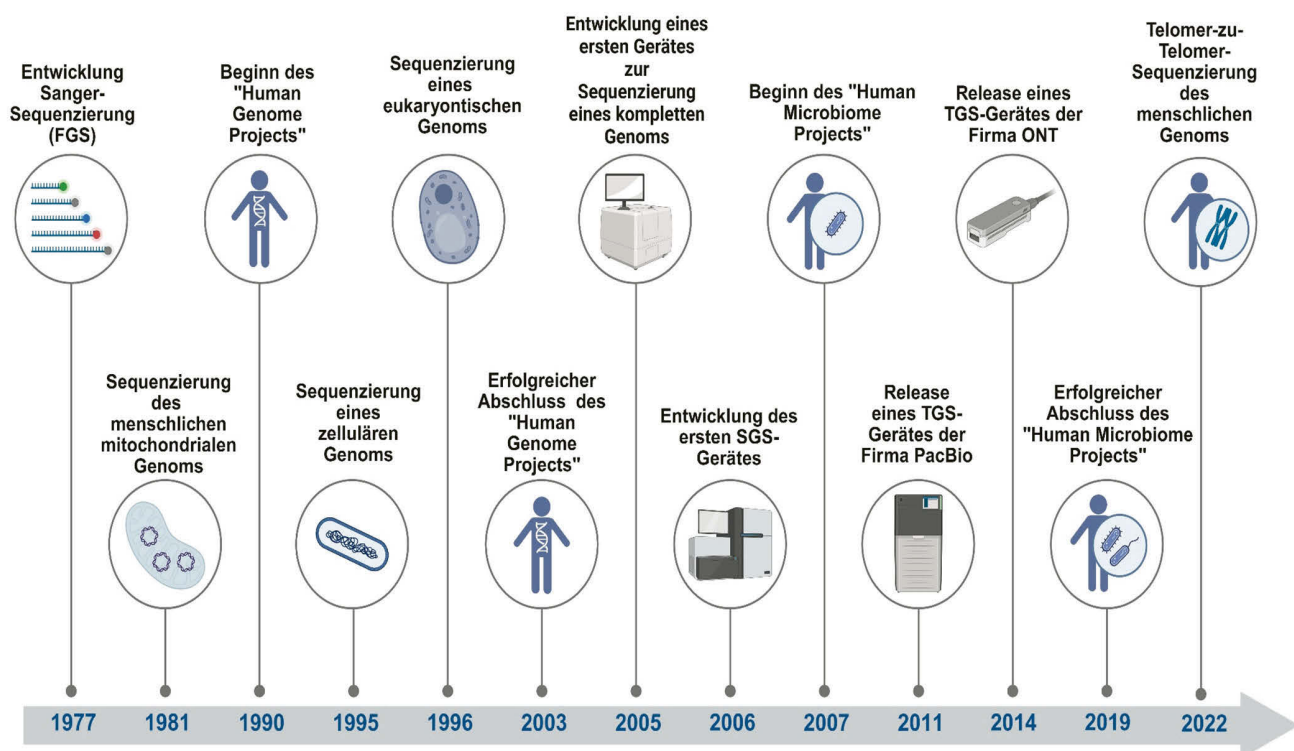


Abbildung 1: Meilensteine und Entwicklung der Sequenzier-technologien, modifiziert nach⁴.

Funktionsprinzip der Nanoporesequenzierung

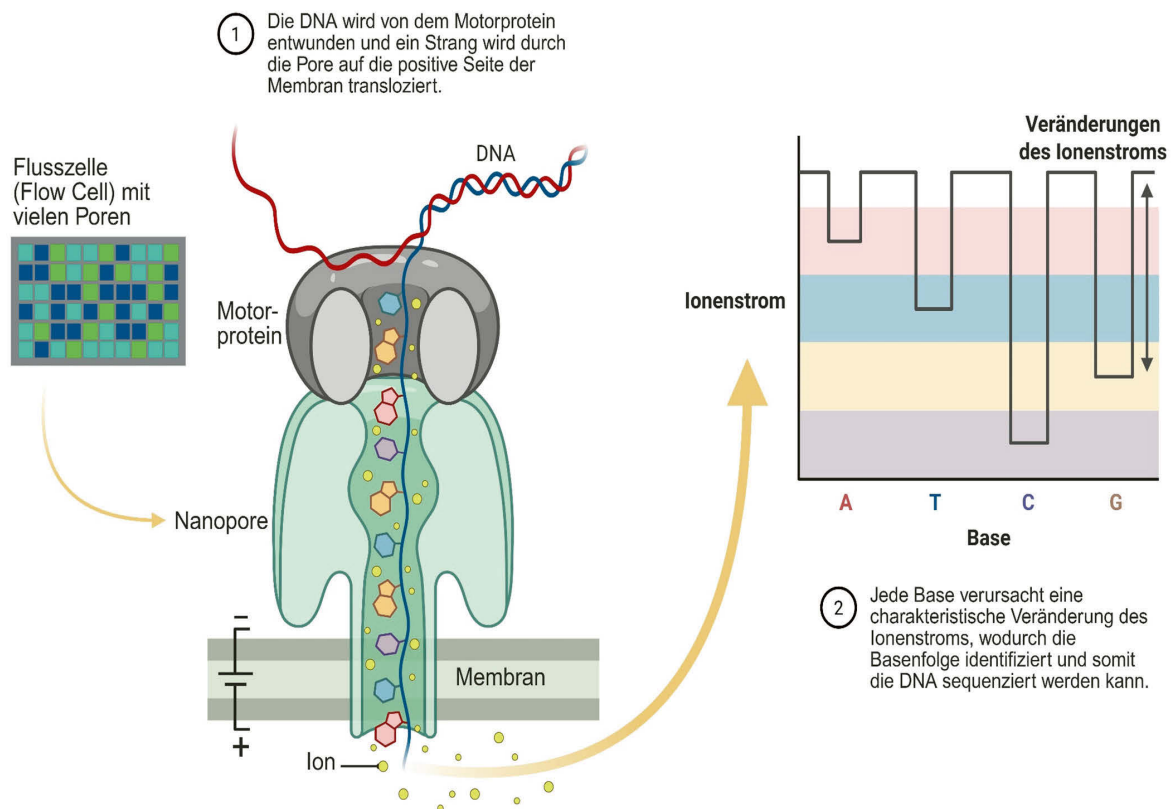


Abbildung 2: Funktionsprinzip der TGS-Plattform von ONT.

bilisiert wird. Während der Sequenzierung injiziert man fluoreszenzmarkierte Nukleotide; eine DNA-Polymerase repliziert das Template und baut bei jedem Schritt ein Nukleotid ein. Die während der Inkorporation freiwerdenden Fluoreszenzsignale werden in Echtzeit detektiert und den vier Basen zugeordnet.

Das in Großbritannien ansässige Unternehmen ONT verfolgt einen anderen Ansatz. DNA- oder RNA-Moleküle werden durch einen kleinen Kanal, die sogenannte Nanopore, gezogen, gemessen und analysiert (Abbildung 2). Die derzeit verwendeten Poren sind synthetische Proteine bakteriellen Ursprungs^{9,11} und sind in eine elektrische Membran eingebettet. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung entsteht ein konstanter Ionenstrom. Wenn ein Nukleotid die Nanopore passiert, wird der Stromfluss auf charakteristische Weise verändert. Diese Stromschwankungen werden aufgezeichnet und mithilfe von Maschinenlernalgorithmen in die zugrundeliegenden Basenfolgen übersetzt.

Wenn wir nachfolgend Aspekte von TGS beschreiben, so ist zu beachten, dass TGS sich allgemein meist durch die

Verwendung von langen Lesesequenzen (Reads) definiert. Aus der oben dargestellten, unterschiedlichen Funktionsweise der Plattformen von PacBio und ONT ergeben sich jedoch je nach Anwendungsszenario ein unterschiedliches Fähigkeitsprofil. Nachfolgend wird – basierend auf den persönlichen Erfahrungen der Autoren und ohne jede Wertung oder Empfehlung, wie in den Transparenzhinweisen erläutert – für TGS der Fokus auf Sequenzierplattformen der Firma Oxford Nanopore Technologies (ONT) gelegt.

1.3. Abgrenzung der Funktionsweise von TGS und SGS

TGS und SGS unterscheiden sich hinsichtlich mehrerer Aspekte, welche in Tabelle 1 zusammengefasst sind^{6, 9, 12–16}. TGS zeichnet sich durch vier vorteilhafte Prinzipien aus, die es von FGS- und NGS-Technologien unterscheidet. Erstens kann die Sequenzierung einzelner Moleküle ohne vorherige Amplifikation erfolgen. Nichtsdestotrotz ist eine vorherige Amplifikation je nach Einsatzszenario weiterhin möglich, beispielsweise zur Erhöhung der Sensitivität oder geringer Ausgangs-DNA-Konzentration. Die

Aspekt	SGS	(ONT-basiertes) TGS
Technologie	Short-Read-Sequencing by Synthesis	Long-Read-Nanopore-Sequencing
Read-Länge	75–600 bp	>10.000 bp, teils >1.000 kb möglich Kürzere Reads auch lesbar
Fehlerrate	Sehr niedrig	Niedrig, aber Korrektur durch hohe Coverage möglich
Technik	Sequencing by Synthesis, Daten nach Lauf verfügbar	Echtzeitanalyse während des Laufs möglich
Amplifikation	Amplifikation zwingend nötig → zusätzliche Geräte, Arbeitsschritte, Bias durch mögliches PCR-Versagen, z. B. bei un- bekannten Mutationen in Viren etc.	Vorherige Amplifikation möglich (z. B. zur Erhöhung der Sensitivität), aber nicht zwingend nötig (zur Vermeidung von Bias, beispielsweise zur Identifikation unbekannter Gene / Erreger per Adaptive Sampling)
Laufzeit (Zeit bis Ergebnis)	Stunden bis Tage	Minuten bis Stunden bis Tage, je nach Anwendungsfall
Analyse von epigenetischen Veränderungen	Nur indirekt möglich, daher potenziell fehlerbehaftet	Direkt möglich
Kosten pro Lauf	Günstig bei hohem Probendurchsatz	Höher, aber sinkend Vorteil: kein Batching nötig
Kosten pro Probe	Niedrig (bei hoher Probenzahl durch Multiplexing)	Etwas höher, hoher Kostenvorteil bei dringenden Einzelproben, falls kein Batching möglich
Bioinformatik- Infrastruktur	Weitgehend standardisiert, breitere Softwareunterstützung	Erfordert spezialisierte Pipelines und bioinformatische Kompetenz im Labor
Pathogendetektion	Gut für bekannte Keime, limitierte Metagenom-Assembly	Exzellent für komplexe Proben (z. B. polymikrobiell)
Genomassemblierung	Fragmentiert, viele Lücken	Nahezu vollständige Genome (Telomer zu Telomer möglich)
Blutgruppendiagnostik	Geeignet für SNP- und short-read-basierte Genotypisierung	Deckt komplexe Haplotypen und strukturelle Varianten ab
Pathogendetektion im Blut	Gut bei gezielten Panels	Weitgehend Bias-freie Detektion auch seltener Erreger, Vorteile bei Abgleich von Erregern, z. B. bei Rückverfolgungsverfahren
Mobilität	Stationäre Laborsysteme	Mobil und stationär möglich (z. B. in Krisenszenarien)

Tabelle 1: Übersicht über verschiedene Aspekte von Second- und Third-Generation-Sequencing (SGS bzw. TGS).

Möglichkeit zur amplifikationsfreien DNA-Analytik erlaubt die direkte Analyse aus Ausgangsmaterial, beispielsweise aus Blut, Blutbestandteilen oder anderen Probenmatrizen, ohne dass Amplifikationsartefakte (z. B. auch ein möglicher Bias durch Fehler bei der Amplifikation) auftreten. Zweitens entstehen deutlich längere Reads (Lesefragmente), welche die Grundlage für die Zusammensetzung der kompletten gesuchten genetischen Sequenz bilden. TGS kann Sequenzen über 10 kb messen und analysieren, auch Leselängen im Mega- bis Gigabasenbereich sind möglich¹⁷. Drittens ermöglichen die Technologien ein "Real-Time-Sequencing", bei dem Daten während des Laufes generiert und sofort ausgewertet werden können. Viertens lassen sich epigenetische Modifikationen und weitere chemische Veränderungen der DNA direkt detektieren, da weder PCR-Schritte noch chemische Konvertierungen, wie etwa beim Bisulfit-Sequenzieren, notwendig werden.

Für die praktische Anwendung in Forschung und Routinediagnostik sei auf einige strategische Aspekte hingewiesen, welche in **Tabelle 1** dargestellt sind und nachfolgend sowohl allgemein als auch bei den Anwendungsbeispielen im Speziellen besprochen werden. Dabei ist zu beachten, dass sich deren Relevanz je nach Anwendungsgebiet deutlich unterscheiden kann:

I) Bei SGS, der derzeit vorherrschenden Sequenzier-technologie, besteht ein (Quasi-)Monopol^{18,19} einer US-amerikanischen Firma mit Implikationen für Verhandlungsmöglichkeiten auf Kundenseite, Datenschutz und Lieferkettensicherheit.

II) Überdies ist zu bedenken, dass viele Analyselösungen (Hardware, Software) im Bereich TGS nur für Forschungszwecke freigegeben sind, was für Labore u. a. erhebliche Anstrengungen im Hinblick auf Akkreditierung und Zertifizierung, beispielsweise auch in der Umsetzung der IVDR-Verordnung, erfordert.

III) Damit ist eng verbunden, dass geeignetes Personal, Ringversuche und weitere Aspekte (z. B. standardisierte Softwarelösungen zur Interpretierung der Daten, Qualitätskriterien) dieser neuen Technologie in der Routinediagnostik noch nicht breit verfügbar sind verglichen mit FGS/SGS.

IV) Die Kostenstruktur von TGS ist, auch aus den hier genannten Gründen, oft deutlich komplexer darzustellen als bei SGS. Bei der Wahl der Anwendungsgebiete bietet TGS jedoch einige Vorteile. Das ist darauf zurückzuführen, dass die Geräte in deutlich unterschiedlichen Kapazitätsstufen verfügbar sind und bereits ab einem niedrigen vierstelligen Eurobetrag, je nach Kapazitätsanforderungen, erhältlich sind. Zu beachten ist jedoch die dazugehörige mitzubeschaffende bioinformatische Infrastruktur sowie

die erwähnten regulatorischen Aspekte, welche diesen Kostenvorteil oft relativ erscheinen lassen.

V) In diesem Zusammenhang ist auch zu bedenken, dass viele der Vorteile durch TGS bisher in der Routinediagnostik wenig oder keine Vergütungsmöglichkeit bieten.

VI) TGS bietet spürbare Geschwindigkeitsvorteile durch mehrere Faktoren: Die Analyse ist parallel zum Sequenzierlauf möglich (Echtzeitmodus), in vielen Fällen entfällt die PCR-basierte DNA-Amplifikation, und Einzelproben lassen sich problemlos – sogar während laufender Sequenzierungen – nachladen, was insbesondere bei zeitkritischen Fällen hilfreich ist. Allerdings bringt dies auch methodische Unsicherheiten mit sich: Für Anwendungen wie Pathogendetektion oder die Diagnostik von minimalen Resterkrankungen existieren derzeit oftmals keine standardisierten Schwellenwerte (z. B. Anzahl der Reads), ab denen eine Probe zuverlässig als negativ klassifiziert werden kann.

Dies, in Verbindung mit der Möglichkeit des PCR-freien-Sequenzierens, ermöglicht eine hohe potenzielle Mobilität der molekulargenetischen Analytik und eröffnet neue Anwendungsmöglichkeiten, beispielsweise in Krisenszenarien.

1.4. Epigenetische Analysen, T2T-Sequenzierung, strukturelle Varianten und Adaptive Sampling

Basierend auf der Funktionsweise von TGS eröffnen sich einige neue Analysemöglichkeiten, von denen die wichtigsten nachfolgend aus Perspektive der Transfusionsmedizin erläutert werden. Epigenetische Modifikationen steuern die Genexpression, beispielsweise auch im Bereich des Immunsystems, der Erythropoese und der Hämostase. Im Gegensatz zu SGS, das epigenetische Markierungen meist nur indirekt erfasst, erlaubt TGS die direkte Detektion von DNA-Modifikationen wie 5-Methylcytosin oder 6-Methyladenin, ohne dass eine chemische Vorbehandlung (z. B. Bisulfitkonversion, potenziell fehleranfälliger Zusatzschritt) notwendig ist^{14,15}. Grundlage ist ebenfalls die Analyse der elektrischen Signale, die während des Durchtritts von Nukleotidsträngen durch die Nanopore entstehen (**Abbildung 2**). Modifizierte und unmodifizierte Basen unterscheiden sich hinsichtlich des Ionenstroms, sodass Algorithmen wie Guppy oder Dorado diese Signaturen erkennen und präzise zuordnen können. Die Durchführung epigenetischer Analysen mit ONT folgt einem Workflow, der dem herkömmlichen Long-Read-Sequencing ähnelt, aber durch spezielle Basecalling-Modelle ergänzt wird²⁰. Nach der DNA-Extraktion und Library-Vorbereitung wird das native DNA-Molekül ohne Amplifikation sequenziert, wodurch epigeneti-

sche Informationen unverändert erhalten bleiben. Für die Transfusionsmedizin und darüber hinaus bieten epigenetische Analysen neue Perspektiven, beispielsweise im Hinblick auf die Charakterisierung von Alterungsprozessen DNA-haltiger Blutzellen⁸. Darüber hinaus könnte die Untersuchung des Methyloms bei Stammzellpräparaten helfen, das Potenzial und die Differenzierungsfähigkeit von Zellprodukten für die allogene Transplantation zu bewerten. Auch bei der Charakterisierung von Advanced Therapy Medicinal Products (ATMPs) könnte die direkte Erfassung von epigenetischen Veränderungen dazu beitragen, die genomische Stabilität und Sicherheit von Zelltherapien zu gewährleisten.

Eine weitere Besonderheit von TGS ist außerdem die Möglichkeit zur Sequenzierung des kompletten Genoms, von Telomer zu Telomer (T2T)³. TGS ermöglichte dabei auch die Analyse schwer zugänglicher Genombereiche, beispielsweise aller Zentromerbereiche, Segmentduplikationen und die kurzen Arme der fünf akrozentrischen Chromosomen³.

Damit eng verbunden sind die erweiterten Möglichkeiten zur Erkennung von strukturellen Varianten mittels TGS. Strukturelle Varianten umfassen Deletionen, Duplikationen, Inversionen, Translokationen und Tandemwiederholungen mit einer Länge von >50 bp. Aufgrund ihrer Größe sind strukturelle Varianten nur schwer zugänglich mittels SGS mit typischen Leselängen von 75–600 bp^{21–23}. Strukturelle Varianten stellen eine relevante Quelle genetischer Variabilität im menschlichen Genom dar und haben einen ausgeprägten Einfluss auf Phänotypen. Die bisher angewandten Verfahren, darunter Microarray-basierte Methoden und PCR-basierte Techniken, konnten viele strukturelle Varianten nicht erfassen, insbesondere wenn sie in repetitiven Regionen liegen. Mit TGS-basierter Sequenzierung von langen Reads können strukturelle Varianten nun analysiert werden, wenn die Reads diese vollständig überspannen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass rund zwei von drei strukturellen Varianten per NGS-basierter Sequenzierung übersehen werden, was in TGS-basierter Long-Read-Sequenzierung nicht der Fall ist^{21, 22}. Das Erstellen von langen Reads mittels TGS bietet daher bei strukturellen Varianten sowie auch bei der Auflösung von Haplotypen entscheidende Vorteile, was transfusionsmedizinisch beispielsweise bei der HLA-Typisierung oder im Rhesus-Blutgruppensystem vorteilhaft ist.

Ein weiterer interessanter technischer Aspekt von (ONT-basiertem) TGS ist das sogenannte Adaptive Sampling, welches eine Software-gesteuerte Zielanreicherung er-

möglicht²⁴. Dabei werden die ersten Basen eines DNA-Moleküls beim Eintritt in die Pore sequenziert und in Echtzeit analysiert. Diese Echtzeitanalyse umfasst unter anderem den direkten Abgleich mit einer Referenzdatenbank oder zuvor definierten Zielsequenzen, um relevante von irrelevanten Fragmenten zu unterscheiden. Die Software entscheidet, ob das Molekül zum Sequenzieren behalten oder durch Umkehrung der Stromrichtung aus der Pore ausgeworfen wird. Auf diese Weise lassen sich Zielregionen selektiv anreichern oder unerwünschte Sequenzen depletieren, ohne dass eine aufwändige Anreicherung nötig ist. Die Möglichkeit, während des Laufes zu entscheiden, welche Sequenzen weitergelesen werden, ermöglicht auch, de-novo-Genome effizienter zu erzeugen, da Bereiche mit bereits ausreichender Sequenziertiefe übersprungen werden können. Adaptive Sampling ist ein Beispiel für die Echtzeit-Interaktivität von TGS, welche FGS und SGS nicht bieten.

2. Anwendungsfälle Blutgruppen-diagnostik und Pathogendetektion

Aufgrund der beschriebenen technischen Vorteile und strategischen Aspekte erweist sich TGS als zunehmend attraktiv für transfusionsmedizinische Fragestellungen²⁵. Die klinische Implementierung ist, wie oben erläutert, jedoch komplex: Regulatorische Anforderungen, Validierungen und Erstattungsstrukturen stellen erhebliche Hürden dar. Erfahrungen zeigen, dass neue Sequenzierungsmethoden meist zunächst in spezialisierten Anwendungsfeldern eingesetzt werden, bevor sie breit in die Routinediagnostik integriert werden. Zudem bestehen gegenwärtig nur teilweise konkurrenzfähige Alternativen zu SGS für viele Routineaufgaben. Folglich erwarten wir eine stufenweise Translation von TGS in die Routinediagnostik. Nachfolgend skizzieren wir aus unserer Sicht wichtige Aspekte der Translation von TGS, technische Vorteile und Herausforderungen anhand der transfusionsmedizinisch relevanten Beispiele Blutgruppendiagnostik und Pathogendetektion. Die hier dargestellten Vorteile von TGS treffen über die beiden nachfolgenden Beispiele hinaus selbstverständlich auch auf weitere humangenetische Fragestellungen zu, beispielsweise bei der Aufklärung von genetischen Varianten des Immunsystems und des blutbildenden Systems, welche teilweise durch Stammzelltransplantation behandelt werden und somit direkt die Transfusionsmedizin und daran angrenzende Fachgebiete betrifft.

2.1. Blutgruppendiagnostik

Die zuverlässige Bestimmung der Blutgruppen von Spendern und Empfängern ist eine der wichtigsten Sicherheitsmaßnahmen bei der Durchführung von Bluttransfusionen. Die Bestimmung von Blutgruppen basiert bislang schwerpunktmäßig auf der serologischen Testung. Diese immunphänotypische Untersuchung kann jedoch nicht immer eindeutige, klinisch relevante Antworten liefern^{25–27}. Ergänzend hierzu ist die molekulargenetische Blutgruppenbestimmung ein zentrales Element der modernen Transfusionsmedizin^{7, 25, 28}. Sie erweitert die Grundlage für die gezielte Auswahl von Spenderblut und reduziert

das Risiko immunologischer Komplikationen. Neben dem ABO- und dem RH-System sind inzwischen über 45 Blutgruppensysteme mit mehr als 350 Antigenen bekannt. Molekulargenetische Typisierungsmethoden gewinnen daher zunehmend an Bedeutung und sind insbesondere dann wichtig, wenn serologische Tests unklare Ergebnisse liefern oder aufgrund von Bluttransfusionen, Schwangerschaften oder Autoimmunkrankheiten nicht durchführbar sind^{7, 28}.

Nachdem die genetischen Polymorphismen für fast alle Blutgruppenantigene bekannt sind, lassen sich viele diagnostische Fragestellungen auf molekulargenetischer

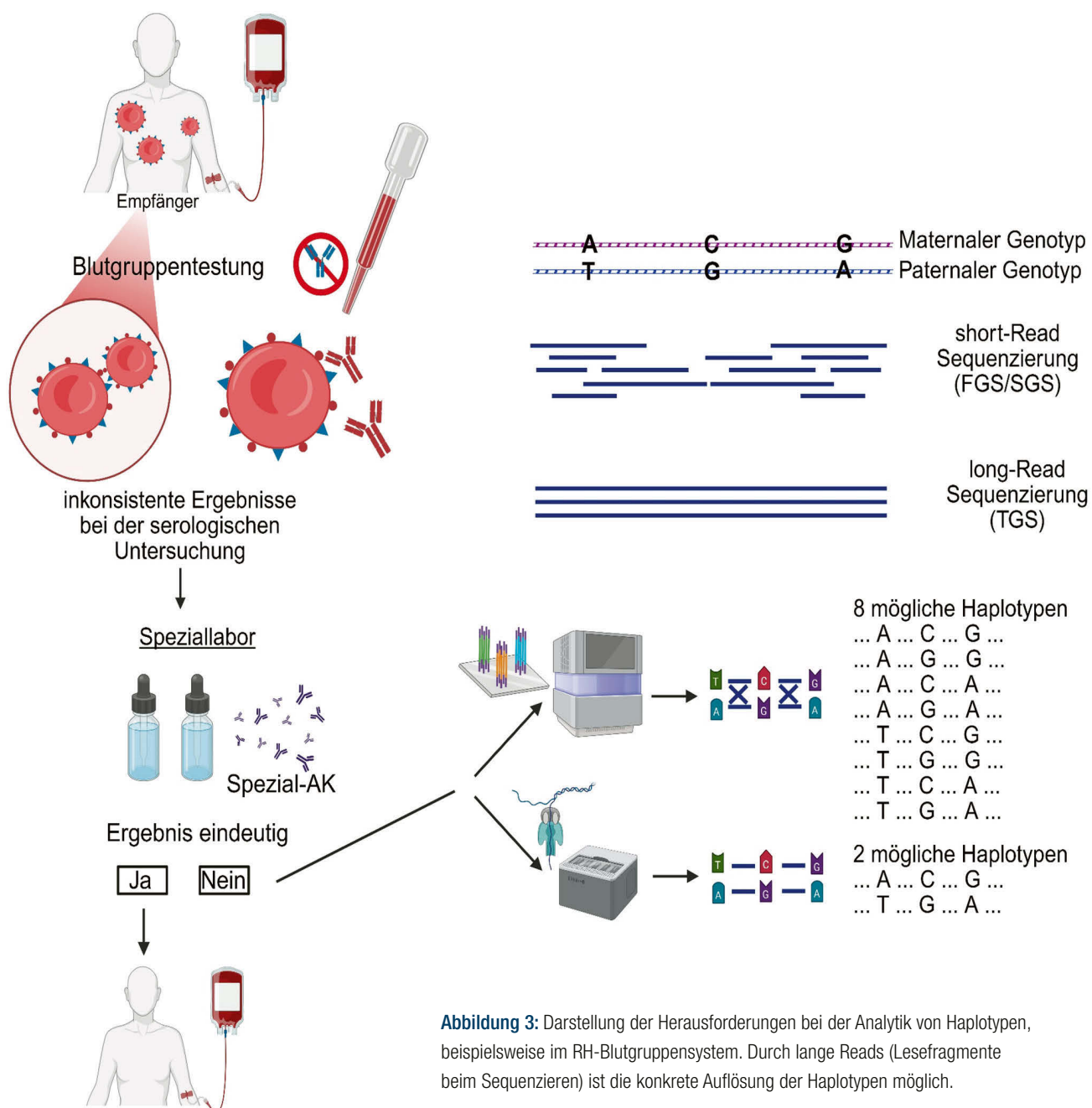


Abbildung 3: Darstellung der Herausforderungen bei der Analytik von Haplotypen, beispielsweise im RH-Blutgruppensystem. Durch lange Reads (Lesefragmente beim Sequenzieren) ist die konkrete Auflösung der Haplotypen möglich.

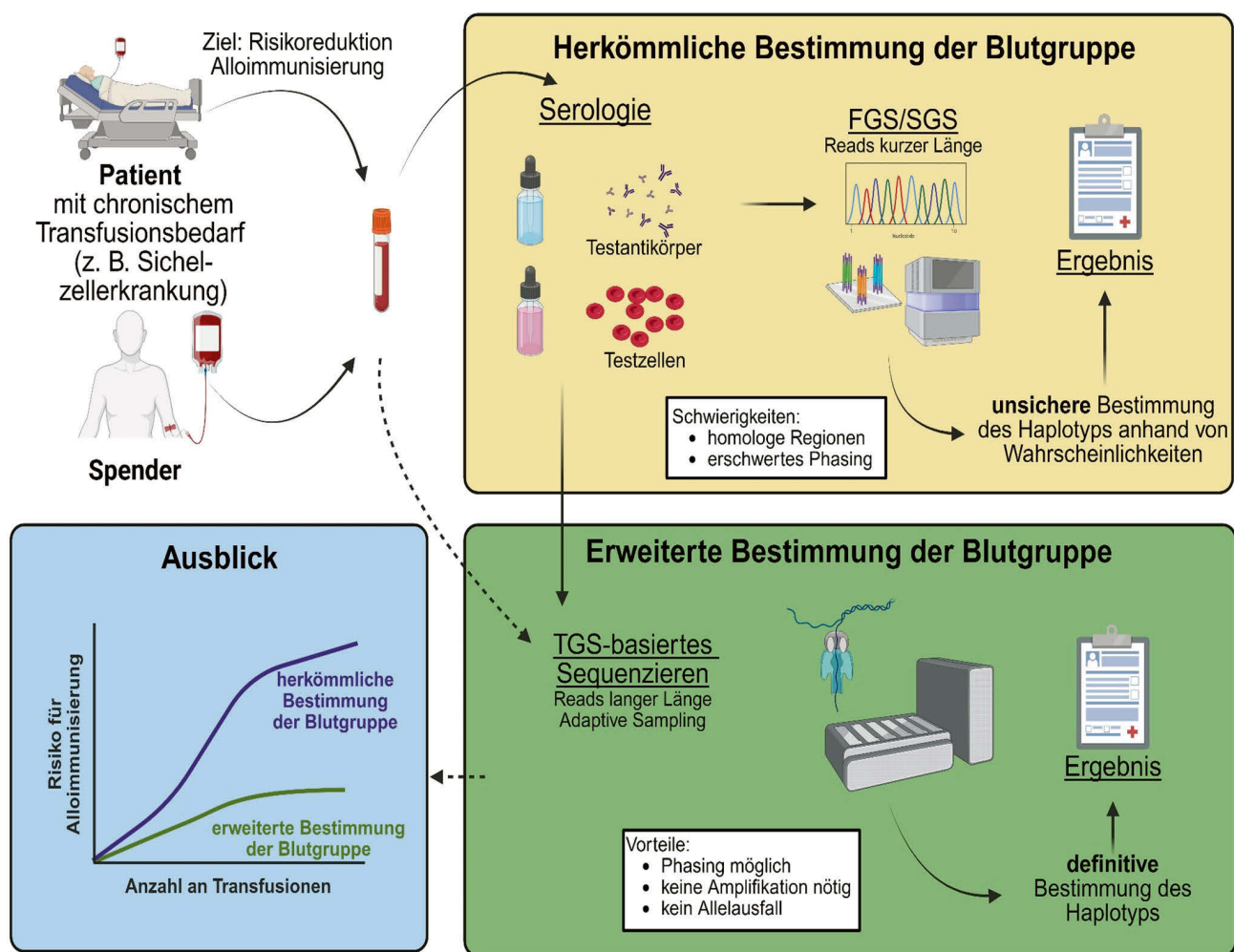


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Anwendung von TGS als Ergänzung zu herkömmlichen Methoden der Blutgruppenbestimmung mit dem Ziel, die klinische Versorgung von Patienten mit chronischem Transfusionsbedarf zu verbessern.

Ebene lösen^{7,28}. Für viele Blutgruppensysteme genügt eine SNV-basierte Genotypisierung. Systeme mit paralogenen Genen (z. B. RH, MNS, FY) können jedoch komplexe strukturelle Variationen aufweisen, die sich nur durch lange Reads sicher erfassen und auswerten lassen. SGS wird für die Blutgruppendiagnostik bereits eingesetzt, bietet jedoch aufgrund der kurzen Leselängen entsprechende Einschränkungen. Komplexe Fragestellungen wie die Allelzuordnung entfernter Polymorphismen oder die Unterscheidung hoch homologer Gene, beispielsweise im RH-Blutgruppensystem. RHD und RHCE stellen Paradebeispiele für komplexe Blutgruppengene dar. Sie liegen in einer Tail-to-Tail-Konfiguration auf Chromosom 1 und weisen eine hohe Sequenzhomologie auf. Rekombinationsereignisse zwischen beiden Genen erzeugen Hybridallele und strukturelle Varianten, die für serologische Besonderheiten verantwortlich sind. Die definitive Analytik von RHD und RHCE sowie die Auflösung der dazu-

gehörigen Haplotypen ist mit kurzen Reads schwierig oder unmöglich (**Abbildung 3**). Darüber hinaus können strukturelle Varianten, wie Translokationen, Inversionen oder Deletionen, nur eingeschränkt erfasst werden^{7,29}.

Der klinische Mehrwert soll anhand eines Beispiels aus der Perspektive des chronisch transfusionsbedürftigen Patienten, beispielsweise mit Sichelzellerkrankung, verdeutlicht werden. Chronisch transfusionsbedürftige Patienten haben ein erhöhtes Risiko zur Alloimmunisierung. Wie oben dargestellt, ist die Auflösung der RHD und RHCE-Gene mit serologischen oder SGS-Methoden nicht vollständig möglich. TGS bietet durch lange Reads und Adaptive Sampling-Technologien eine präzise Haplotyp-Bestimmung ohne langwierige Amplifikationsschritte. Dadurch lassen sich klinisch relevante Varianten zuverlässig identifizieren, was langfristig das Risiko der Alloimmunisierung reduzieren und die Transfusionssicherheit für chro-

nisch transfusionsbedürftige Patienten verbessern kann (Abbildung 4).

2.2. Pathogendetektion

TGS bietet Vorteile sowohl aus der Perspektive der Blutspender und der Versorgungssicherheit als auch der Transfusionsempfänger. Die Bereitstellung von sicheren Blutprodukten erfordert eine zuverlässige Erkennung transfusionsrelevanter Erreger. Klassische Methoden wie serologische Tests und PCR-basierte Nachweise stoßen dabei an Grenzen^{30–32}, da sie in der Regel auf bekannte Zielsequenzen ausgelegt sind und nur eine begrenzte Breite potenzieller Erreger erfassen. TGS ermöglicht hingegen die Analyse des gesamten Spektrums der Sequenzinformationen einer Probe ohne Vorwissen über mögliche Zielorganismen und eröffnet somit eine weitgehend biasfreie mikrobielle Diagnostik^{31,33}. Neben einer hohen Geschwindigkeit bietet TGS die umfassende Charakterisierung mikrobieller Genome und Metagenome. Ein entscheidender Vorteil liegt in der Fähigkeit, vollständige Genome mikrobieller Pathogene zu sequenzieren. Dieser Aspekt ist für die Resilienz des Blutspendedienstes gegenüber Pandemien und Bioterrorismus von zentraler Bedeutung. Während konventionelle PCR-Systeme bei Varianten in den Primerbindungsstellen potenziell für jede neue Variante angepasst werden müssen, erfasst TGS neu auftretende Pathogene ohne Anpassung des Workflows^{9,16,24,33,34}. Spezielle technische Aspekte, beispielsweise die Kombination von TGS mit vorhergehender Amplifikation, der Einsatz von Adaptive Sampling und / oder Detektionsgrenzen sind Gegenstand derzeitiger Forschungsvorhaben.

Auch aus Sicht der Transfusionsempfänger bietet TGS wertvolle Anwendungsmöglichkeiten. Insbesondere bei Patienten mit eingeschränkter Funktion des Immunsystems, z. B. bei hämatologischen Erkrankungen und / oder Patienten mit Stammzelltransplantation, ist eine rasche und präzise Identifizierung von Infektionserregern essenziell. Hieraus ergeben sich potenziell folgende Herausforderungen: a) klassische Kulturmethoden sind oft zu langsam oder gar erfolglos, b) durch vorherige antimikrobielle Therapie ist die Aussagekraft wachstumsbasierter Methoden eingeschränkt und / oder c) es liegen atypische Erreger vor^{32,35}. Über TGS-basierte amplifikationsfreie Sequenzierung lassen sich diese klinisch komplexen Situationen lösen. Ein weiterer Vorteil der TGS-basierten Infektionsdiagnostik ist die gleichzeitige Detektion von Resistenz- und Virulenzgenen, was die gezielte Anpassung antimikrobieller Therapien bei immunsupprimierten Patienten deutlich beschleunigen kann^{13,33,35–37}.

Darüber hinaus eröffnet TGS neue Möglichkeiten zur Rückverfolgung transfusionsassoziiierter Infektionen. Durch die Sequenzierung vollständiger mikrobieller Genome lassen sich Übertragungswege rekonstruieren und epidemiologische Zusammenhänge zwischen Spender- und Empfängerproben aufklären³⁸. Darüber hinaus wäre die systematische Überwachung von molekulargenetischen Sequenzen blutübertragener Viren ein entscheidendes Mittel zur Verbesserung der Transfusionssicherheit³⁹. Daher bietet sich perspektivisch der Einsatz von TGS nicht nur zur Diagnostik, sondern auch zur epidemiologischen Überwachung, zur Verbesserung der Versorgungssicherheit und zur Rückverfolgung transfusionsassoziiierter Infektionsketten an^{38,39}.

3. Ausblick

Angelehnt an die TGS-Technologie von ONT sei als Kurzausblick die Nanopore-gestützte Proteinsequenzierung genannt, welche das Nanopore-Prinzip auf die Analytik von Proteinen überträgt. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass einzelne Aminosäuren anhand spezifischer Signalprofile unterschieden und sogar posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen oder Glykosylierungen detektiert werden können^{40,41}. Für die Transfusionsmedizin eröffnet diese Technologie langfristig neue Perspektiven, beispielsweise bei der detaillierten Analyse von Blutproteinstrukturen, der Qualitätskontrolle von Blutprodukten oder der Identifizierung von Proteom-Biomarkern bei frühen Entzündungsreaktionen.

Wir antizipieren, dass TGS sich zunehmend als integraler Bestandteil einer umfassenden molekularen Diagnostik in der Transfusionsmedizin und darüber hinaus etabliert. TGS umfasst hierbei Anwendungsgebiete, die von der Blutgruppen- und Pathogendiagnostik bis hin zur Qualitätsbewertung von Blutprodukten reichen. Darüber hinaus bieten sich zusätzliche Anwendungen wie die umfassende HLA-Typisierung, die Charakterisierung komplexer Haplotypen im RH-System, die Erkennung seltener genetischer Varianten bei chronisch transfusionsbedürftigen Patienten oder die molekulargenetische Validierung von ATMPs an. Auch die Überwachung von Transfusionsketten sowie die Detektion neuer oder resistenter Pathogene kann mit TGS effizienter gestaltet werden. Der Weg dorthin setzt eine enge Verzahnung von Forschung, klinischer Validierung und regulatorischer Harmonisierung voraus. Entscheidend wird sein, die Kosten pro Analyse zu senken, die Automatisierung voranzutreiben und anwenderfreundliche Lösungen zu entwickeln. ■

Transparenzhinweise

Abbildung 1 ist modifiziert nach⁴. Abbildung 2 ist modifiziert nach⁴² sowie dem Template von Flo Glencross und Daid Ahmad. Abbildungen 1–4 sind erstellt in www.biorender.com. Bei der Erstellung dieses Artikels kam neben der orthografischen Kontrolle der Microsoft Office Suite künstliche Intelligenz (ChatGPT-4o, OpenAI) zum Einsatz. Ein beispielhafter Prompt: Kürze nachfolgenden Text auf xx Wörter. Achte darauf, dass kein inhaltlicher Aspekt verloren geht. Alle genannten Aspekte der Sequenzieretechnologien spiegeln nach bestem Wissen den Stand der Technik vom 28.07.2025 wider. In diesem Text wird aus Gründen des Leseflusses das generische Maskulinum verwendet, womit alle Menschen gemeint und angesprochen sind. Dieser Beitrag dient ausschließlich der wissenschaftlichen Information und stellt keine Werbung für bestimmte Produkte oder Hersteller dar. Die Auswahl und Darstellung von Technologien erfolgt rein beispielhaft und erhebt weder Anspruch auf Vollständigkeit noch auf abschließende Richtigkeit. Alle Angaben wurden sorgfältig recherchiert, können jedoch Irrtümern unterliegen. Die Nennung von Markennamen (z. B. Illumina, Oxford Nanopore Technologies) erfolgt ohne kommerzielle Interessen und ausschließlich zur technischen Differenzierung.

Interessenskonflikte

Alle Autoren sind Mitarbeiter des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen und des Universitätsklinikums Ulm bzw. deren Tochtergesellschaften. Im Rahmen dessen erbringen sie in Patientenversorgung, Forschung und Lehre diagnostische Leistungen, welche die hier vorgestellten Techniken berühren.

Die Autoren (I)



Dr. rer. nat. Marita Führer

Wissenschaftliche Mitarbeiterin

Abteilung für Molekulare Diagnostik, Molekulare Therapie und Experimentelle Transplantation, Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik (IKT) Ulm

Molekulare-Diagnostik@blutspende.de



Dr. biol. hum. Rebekka Waldmann

Wissenschaftliche Mitarbeiterin

Abteilung für Molekulare Diagnostik, Molekulare Therapie und Experimentelle Transplantation, Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik (IKT) Ulm

Molekulare-Diagnostik@blutspende.de



Annika Vogt, M.Sc.

Wissenschaftliche Mitarbeiterin

Abteilung für Molekulare Diagnostik, Molekulare Therapie und Experimentelle Transplantation, Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik (IKT) Ulm

Molekulare-Diagnostik@blutspende.de



Vincent Kramer, M.Sc.

Biotechnologe

Abteilung für Molekulare Diagnostik, Molekulare Therapie und Experimentelle Transplantation, Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik (IKT) Ulm

Molekulare-Diagnostik@blutspende.de

Die Autoren (II)



Timo Dinse, B.Sc.

Biotechnologe
Institut für Transfusionsmedizin,
Universitätsklinikum Ulm
Molekulare-Diagnostik@blutspende.de



Dr. med. Christof Weinstock

Abteilungsleiter
Abteilung für Immunhämatologie und Blutgruppen-
serologie, Institut für Klinische Transfusionsmedizin
und Immunogenetik (IKT) Ulm
c.weinstock@blutspende.de



Prof. Dr. med. David Messerer, MME, MHBA

Abteilungsleiter
Abteilung für Molekulare Diagnostik, Molekulare Therapie
und Experimentelle Transplantation, Institut für Klinische
Transfusionsmedizin und Immunogenetik (IKT) Ulm
sekretariat.messerer@blutspende.de

hämo
APP

Hilfreiche Downloads und weitere Informationen
zu diesem Beitrag finden Sie in der hämo-App, z. B.

-  Literaturhinweise
-  Weitere Beiträge zu diesem Thema
-  Weitere Infos zu den Autoren



Direkt zum Beitrag:

[www.drk-haemotherapie.de/
beitraege/45-tgs](http://www.drk-haemotherapie.de/beitraege/45-tgs)