

Hochdurchsatz-Sequenzierung – Anwendung in der Thrombozytendiagnostik

Zusammenfassung

Die neueren Verfahren der DNA-Sequenzierung (*Next Generation Sequencing*, NGS) beruhen auf der parallelen Analyse zahlreicher DNA-Abschnitte und werden auch als Hochdurchsatz-Sequenzierung bezeichnet. Die Anwendungsgebiete erstrecken sich zunehmend auf die Diagnostik von Erkrankungen mit komplexen Pathomechanismen. Sowohl genspezifische als auch ganz-genomische Analysen kommen dabei zum Einsatz. Erbliche Störungen der Thrombozytenfunktion oder Thrombozytenbildung werden durch zahlreiche verschiedene Gendefekte verursacht. In der Mehrzahl der Fälle können aufgrund des Phänotyps die beteiligten Gene eingegrenzt werden. Mittels NGS können sowohl bekannte als auch neue Genmutationen identifiziert werden. In diesem Übersichtsbeitrag werden die Möglichkeiten und Grenzen der NGS-Technologien in der Thrombozytendiagnostik zusammengefasst.

Summary

Next Generation Sequencing (NGS) is characterized by the parallel analysis of large numbers of DNA targets, also named 'massively parallel sequencing'. NGS started to be used in clinical diagnosis of diseases with complex pathomechanisms. Both, gene-specific and whole genome analyses are performed. Inherited disorders of platelet function and biosynthesis are caused by many different gene defects. In most of the cases the phenotype enables to focus on a limited number of involved genes and NGS enables the identification of known and novel gene mutations. In this review article the chances and limitations of NGS technologies in platelet diagnostics are summarized.

EINLEITUNG

Die DNA-Sequenzierung ist – neben der PCR – die wichtigste Methode in der Nukleinsäureanalytik. Mit diesem Laborverfahren wird die Abfolge (Sequenz) der Basen in einer DNA bestimmt. Die sogenannte Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger-Sequenzierung) war das erste Sequenzierverfahren und ist bis heute ein Standard sowohl in der molekulargenetischen Forschung als auch in der klinischen Diagnostik. Es ist insbesondere geeignet, um zielgerichtet die Sequenz ausgewählter Genabschnitte bei einer begrenzten Anzahl von Proben zu analysieren. Für die Sequenzierung größerer Genomabschnitte oder ganzer Genome war die Sanger-Sequenzierung nur mit enormem personellem und apparativem Aufwand möglich. So hat die „Entschlüsselung“ des ersten Humangenoms mit ca. drei Milliarden Basenpaaren über 20 Jahre gedauert und war nur durch die internationale Zusammenarbeit im Humangenomprojekt möglich¹. Während die Sanger-Sequenzierung gekennzeichnet ist durch die Analyse einzelner DNA-Abschnitte in einzelnen Proben in separaten Reaktionen, sind die Verfahren der nächsten Generation (*Next Generation Sequencing*, NGS) auf die parallele Analyse vieler DNA-Abschnitte in vielen Proben ausgelegt. Man bezeichnet diese Verfahren deshalb auch als Hochdurchsatz-Sequenzierung (*Massive Parallel Sequencing*, MPS).

Aus der modernen molekulargenetischen Forschung ist NGS nicht mehr wegzudenken. Mit fortschreitender Vereinfachung der Verfahren und Senkung der Kosten ist davon auszugehen, dass NGS auch in der klinischen Diagnostik zunehmend an Bedeutung gewinnen wird. Nicht nur die Analyse der für eine Erkrankung ursächlichen genetischen Merkmale, sondern insbesondere auch die Merkmale, die einen Einfluss auf die individuelle Therapie haben, werden dabei im Vordergrund stehen. Erkenntnisse aus NGS-Analysen werden einen wichtigen Beitrag in der Entwicklung der personalisierten Medizin leisten. Die meisten Erkrankungen und klinischen Syndrome werden von mehreren genetischen und nicht-genetischen Faktoren verursacht und beeinflusst. NGS-Analysen sind bei solchen komplexen Fragestellungen die optimalen Methoden, um in kurzer Zeit umfangreiche Erkenntnisse über mögliche genetische Faktoren zu gewinnen. Dies gilt auch für die Thrombozytendiagnostik, in welcher Störungen der Thrombozytenbildung (Thrombozytopenie oder Thrombozytose) und der Thrombozytenfunktion (Thrombozytopathie) sowohl phänotypisch als auch molekulargenetisch untersucht werden.

In diesem Beitrag werden nach einem kurzen Überblick über die wichtigsten NGS-Technologien und Methoden die Erkenntnisse über die verschiedenen Thrombozytenstörungen zusammengefasst. Es folgt die Darstellung der NGS-basierten Strategien in der Thrombozytendiag-

nostik einschließlich der nach heutigem Kenntnisstand zu berücksichtigenden Gene.

TECHNOLOGIEN UND METHODEN DER HOCHDURCHSATZ-SEQUENZIERUNG

Im Vergleich zur ursprünglichen Kettenabbruchmethode unter Verwendung von Terminatorkleotiden sind die Verfahren der Hochdurchsatz-Sequenzierung durch spezielle chemische und physikalische Methoden gekennzeichnet, die beispielsweise eine Sequenzierung während der DNA-Synthese (*Sequencing-by-Synthesis*, SBS) oder durch Strukturanalyse der DNA-Moleküle (*Sequencing-without-Synthesis*, SWS) ermöglichen. Generell können die Technologien anhand der in der Sequenzierung erzeugten Sequenzlängen in *short read*- und *long read*-Verfahren eingeteilt werden (**Tabelle 1**)². Die beiden am häufigsten in Forschung und Diagnostik angewandten Technologien, Illumina- und Ion-Torrent, sind *short read* SBS-Verfahren mit unterschiedlichen Nachweisprinzipien. Während die Illumina-Technologie mit chemisch modifizierten, reversiblen Terminatorkleotiden arbeitet, handelt es sich bei der Ion-Torrent Technologie um den elektronischen Nachweis von Protonen (Halbleiter-Sequenzierung), die beim Einbau von Nukleotiden während der DNA-Synthese freigesetzt werden. Die *Single Molecule Real-Time* (SMRT)-Sequenzierung ist ein *long read* SBS-Verfahren, das mit Einzelmolekülen sehr lange Sequenzen erzeugen kann. Zurzeit ist die Nanoporen-Sequenzierung das einzige SWS-Verfahren. Dabei werden einzelne DNA-Moleküle durch Nanoporen transportiert und je nachdem, welche Basen sich in den Poren befinden, verändert sich die Leitfähigkeit. Die DNA-Sequenz wird aus der Echtzeitmessung der Leitfähigkeit mit Hilfe von Algorithmen bestimmt.

Die Fehlerrate und die Kapazität sind wichtige Qualitätsmerkmale der verschiedenen Technologien. Die Fehlerrate der *short read*-Technologien sind mit <0,1 % sehr niedrig. Auch für die *long read* SMRT-Sequenzierung wird mit dem neuesten System (Sequel IIe) eine niedrige Fehlerrate von 0,2 % erreicht. Hingegen ist bei der Nanoporen-Sequenzierung die Fehlerrate mit 2–15 % am höchsten. Durch kontinuierliche Anpassung und Optimierung der Algorithmen wird die Fehlerrate noch verbessert werden können. Die Kapazität bzw. Datenmenge pro Analyse ist größtenteils von der apparativen Ausstattung abhängig. Die kleinsten *short read*-Systeme (iSeq™, Illumina; Ion PGM™ Dx, Thermo Fisher Scientific) liefern etwa 1 Gigabasen (Gb; 10⁹ Basen) Sequenzinformation pro Analyse. Mit dem größten Illumina-System (NovaSeq 6000) können bis zu 6.000 Gb pro Analyse erreicht werden.

Unabhängig von der jeweils verwendeten Technologie lassen sich verschiedene Strategien bei der Sequenzierung unterscheiden. Die Sequenzierung ganzer Genome oder Exome (*Whole Genome Sequencing*, WGS; *Whole Exome Sequencing*, WES) kommt häufig dann zum Einsatz, wenn bei komplexen Erkrankungen neue Gene identifiziert werden sollen. Hingegen wird die zielgerichtete Sequenzierung bereits bekannter krankheitsrelevanter Gene (Panelsequenzierung) zur Identifizierung bekannter und neuer Varianten angewendet. Neue Gene oder Varianten im Zusammenhang mit Erkrankungen stellen eine besondere Herausforderung dar, da ihre Krankheitsrelevanz zunächst unklar ist und nur auf dem Ergebnis der Sequenzierung beruht. Sie werden deshalb als *Gene of Unknown Significance* (GUS) oder *Variant of Unknown Significance* (VUS) bezeichnet bis durch weitere laborexperimentelle Analysen oder im Rahmen von Familienanalysen bei erblichen Erkrankungen der Zusammenhang mit der Erkrankung belegt wird³.

Technologie (Hersteller)	Sequenzlängen	Prinzip ^a	Datenmenge pro Analyse ^b
Sequencing-by-Synthesis (Illumina)	150–300 Basen	SBS: Fluoreszenz-markierte, reversible Terminatorkleotide	1–3.000 Gb
Ion-Torrent-Halbleiter-Sequenzierung (Thermo Fisher Scientific)	200–600 Basen	SBS: H ⁺ Detektion bei Nukleotideinbau mittels Metalloxid-Halbleiter pH-Sensor	1–24 Gb
Single Molecule Real-Time (SMRT) Sequencing (Pacific Biosciences)	> 300.000 Basen	SBS: Echtzeitdetektion Fluoreszenz-markierter Nukleotide	75–600 Gb
Nanopore Single Molecule Sequencing (Oxford Nanopore Technology)	> 1.000.000 Basen	SWS: Echtzeitdetektion der Leitfähigkeit in Nanoporen	1–300 Gb

^a SBS, *Sequencing-by-Synthesis*; SWS: *Sequencing-without-Synthesis*; ^b abhängig vom System und der Methode

Tabelle 1: Prinzip und Eigenschaften von NGS-Technologien

Erkrankung	Gene	Thrombozyten-Phänotyp	weitere Phänotypen
Glanzmann Thrombastenie	ITGA2B, ITGB3	gestörte Agonisten-induzierte Aggregation; Zahl und Größe normal	
Bernard-Soulier-Syndrom	GP1BA, BP1BB, GP9	verminderte Adhäsion; Zahl vermindert; Größe erhöht	DiGeorge Syndrom (selten)
GP6-assoziierte Erkrankung	GP6	gestörte Collagen- und Convulxin-induzierte Aggregation; Zahl und Größe normal	
Hermansky-Pudlak-Syndrom	AP3B1, AP3D1, BLOC1S3, BLOC1S6, DTNBP1, HPS1, HPS3, HPS4, HPS5, HPS6	gestörte Collagen-induzierte Aggregation; Zahl und Größe normal; fehlende δ -Granula	Albinismus; Fibrose; Immundefekte
Chediak-Higashi-Syndrom	LYST	gestörte Collagen-induzierte Aggregation; Zahl und Größe normal; fehlende δ -Granula; große Einschlusskörper	verminderte Pigmentsynthese; Lymphohistiocytose
Gray Platelet-Syndrom	NBEAL2	fehlende α -Granula; Zahl vermindert; Größe erhöht; variable Aggregation	Myelofibrose
ARC-Syndrom	VPS33B	fehlende α -Granula; Zahl normal; Größe erhöht; variable Aggregation	Arthrogryposis; renale Dysfunktion; Cholestasis
Quebec Platelet	PLAU	fehlende α -Granula; Zahl moderat vermindert; Größe normal	
Wiskott-Aldrich-Syndrom	WAS	gestörte Aggregation und Sekretion; Zahl und Größe vermindert	Exzeme; Immundefizienz
MYH9-assoziierte Erkrankungen	MYH9	Zahl vermindert; Größe stark erhöht (Giant Platelets); Dohle-Körper in Leukozyten	Taubheit; Katarakt; renale Dysfunktion
P2Y12-assoziierte Erkrankung	P2Y12	gestörte ADP-induzierte Aggregation; Zahl und Größe normal	
Aspirin-like-Defekt	PLA2G4A, PTGS1, TBXAS1, TBXA2R	gestörte Arachidonsäure-induzierte Aggregation; Zahl und Größe normal	
Thrombocytopenia with absent radii (TAR)	RBM8A	Zahl vermindert; Größe normal	fehlender Radius im Unterarm; Daumen normal

Tabelle 2: Beispiele erblicher Thrombozytenstörungen mit unterschiedlichem Phänotyp und Genetik

ERBLICHE THROMBOZYTENSTÖRUNGEN

Thrombozyten können in ihrer Funktion und in ihrer Zahl im Blut pathologisch verändert sein. Erworbene Störungen sind häufig immunologisch bedingt, wie z. B. die Immuntrombozytopenie (ITP), und werden in diesem Beitrag nicht weiter berücksichtigt. Die erblichen Thrombozytenstörungen (*Inherited Platelet Disorders*, IPD) sind eher seltene Erkrankungen mit meist milden klinischen oder subklinischen Symptomen. Die Pathomechanismen sind sehr unterschiedlich, wodurch sich die IPD als sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen mit einer Vielzahl an beteiligten Genen darstellen (**Tabelle 2**). Die Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion (Thrombozytopathie) kann mit einer Veränderung der Größe der Thrombozyten (Makrothrombozyten) und der Zahl der Thrombozyten (Thrombozytopenie, Thrombozytose) einhergehen.

Gene, die im Zusammenhang stehen mit der Bildung (Megakaryopoese/Thrombopoese) und der Funktion der Thrombozyten, können in verschiedene funktionelle Kategorien eingeteilt werden (**Abbildung 1**)^{5,6}. Gene, die Transkriptionsfaktoren kodieren, haben in erster Linie Einfluss auf die frühe Megakaryopoese und Mutationen führen häufig zu erblichen Thrombozytopenien. Morphologische Veränderungen der Thrombozyten können auf das Fehlen von Granula oder auf Veränderungen des Zytoskeletts zurückzuführen sein. Mutationen in den ent-

sprechend beteiligten Genen wirken sich in der späten Megakaryopoese und der Proplättchenbildung aus. Glykoproteinkomplexe (GP) und G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) mit den damit verbundenen Signalmolekülen sind von zentraler Bedeutung für die Thrombozytenfunktion, sind zum Teil aber auch an der Proplättchenbildung beteiligt.

Bei den IPD handelt es sich um seltene Erkrankungen mit einer Prävalenz von höchstens 1:2.000 (Definition in der Europäischen Union), also wenn nicht mehr als fünf von 10.000 Menschen betroffen sind. Die Prävalenz der Glanzmann-Thrombastenie (GT) oder des Bernard-Soulier-Syndroms (BSS) wird jeweils auf etwa 1:1.000.000 geschätzt. Bei vielen anderen IPD, wie z. B. dem Hermansky-Pudlak-Syndrom (HPS) ist die weltweite Prävalenz unbekannt. Die GT mit kausalen Mutationen im GPIIb/IIIa und das BSS mit Defekt im GPIb/IX sind Störungen der Thrombozytenfunktion, die sich in erster Linie durch fehlende oder verminderte Aggregation und Adhäsion der Thrombozyten auszeichnen. Erkrankungen, die die Biogenese und den Transport von Granula betreffen, werden auch als *Storage Pool-Defekte* bezeichnet. Beim HPS sind die betroffenen Gene an der Biogenese der δ -Granula beteiligt, während sich das Chediak-Higashi-Syndrom (CHS) ähnlich darstellt, die kausalen Mutationen aber im *LYST*-Gen liegen. Beim CHS sind in den Thrombozyten und anderen Granula-haltigen Zellen große Einschlusskörper (*Giant*

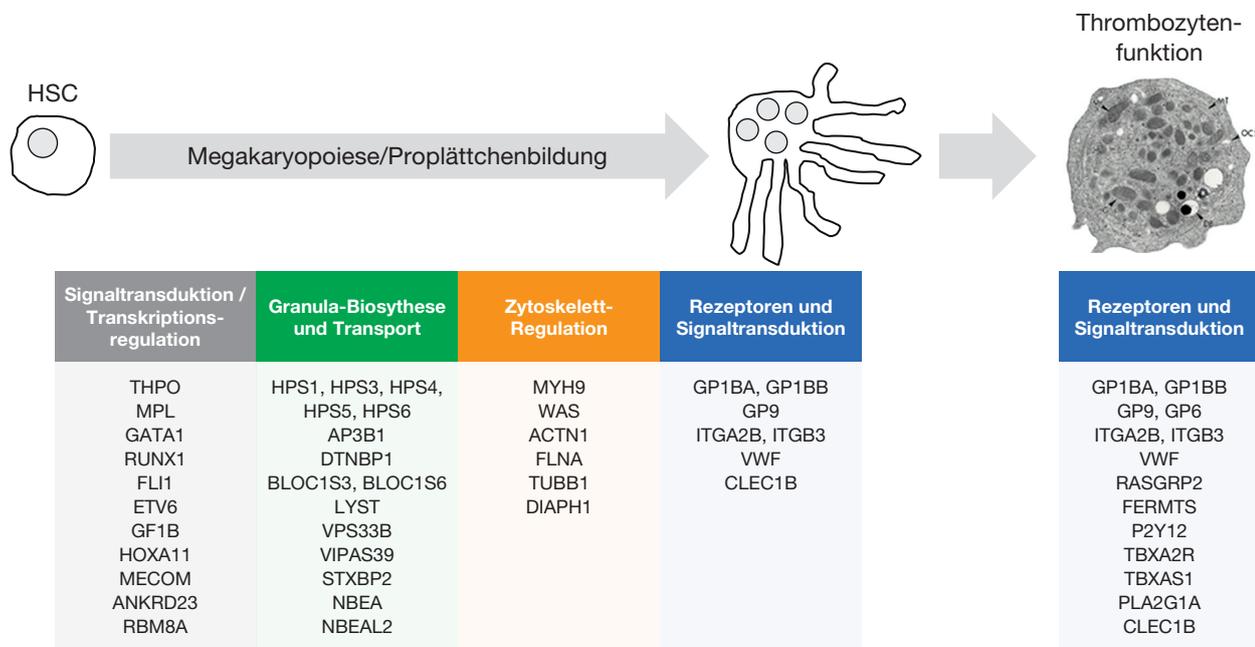


Abbildung 1: Gene der Megakaryopoese und der Thrombozytenfunktion. (Bild: aus 4).

In der Megakaryopoese im Knochenmark differenzieren hämatopoietische Stammzellen (HSC) zu Megakaryozyten, aus denen Proplättchen gebildet und als Thrombozyten in die Blutzirkulation abgegeben werden. Die an diesem komplexen Prozess beteiligten Gene können funktionellen Kategorien zugeordnet werden (nach Lentaigne et al.⁵). Mutationen können einen Phänotyp hervorrufen, der auf den Verlust der Genfunktion zurückzuführen ist.

Inclusion Bodies) zu beobachten. Sind die α -Granula betroffen, kann es sich um das *Gray Platelet-Syndrom* (GPS), das *Arthrogryposis-Renal-Dysfunction-Cholestasis* (ARC)-Syndrom oder die *Quebec Platelet Disorder* (QPD) handeln. Diesen Störungen gemein ist das Fehlen der α -Granula und eine damit verbundene Einschränkung der Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten. Die jeweils verantwortlichen Gene sind in unterschiedlicher Form an der α -Granula-Biogenese beteiligt. Bei einer anderen Gruppe von Störungen liegen die molekularen Veränderungen in Genen, die GPCR und wichtige Komponenten der Signalübertragungswege kodieren. Ist der Arachidonsäure-Stoffwechsel mit der Bildung von Thromboxan A_2 und dessen Signalweg betroffen, handelt es sich um den Aspirin-like-Defekt (ALD). Neben den genannten Erkrankungen treten auch erbliche Thrombozytopenien auf, bei denen ausschließlich die Zahl vermindert ist, bei normaler Größe, Morphologie und Funktion. Beispiel hierfür ist

das *Thrombocytopenia with absent radii* (TAR)-Syndrom mit zusätzlichen skelettalen Fehlbildungen bei den Betroffenen. Auch andere IPD sind mit zusätzlichen Phänotypen assoziiert, wie z. B. der Albinismus beim HPS (**Tabelle 2**).

DIAGNOSTIK VON THROMBOZYTENSTÖRUNGEN

Die Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH) hat mit der ThromKid-Studiengruppe eine Leitlinie für die Diagnose von Thrombozytenfunktionsstörungen entwickelt^{7,8}. Der Diagnosealgorithmus besteht zunächst aus der anamnestischen Erfassung von Blutungsneigungen und Medikamenteneinnahmen sowie dem Vorliegen von Grund- und Begleiterkrankungen (**Abbildung 2**). Mit entsprechenden Laboranalysen werden plasmatische Gerinnungsstörungen als Ursache der

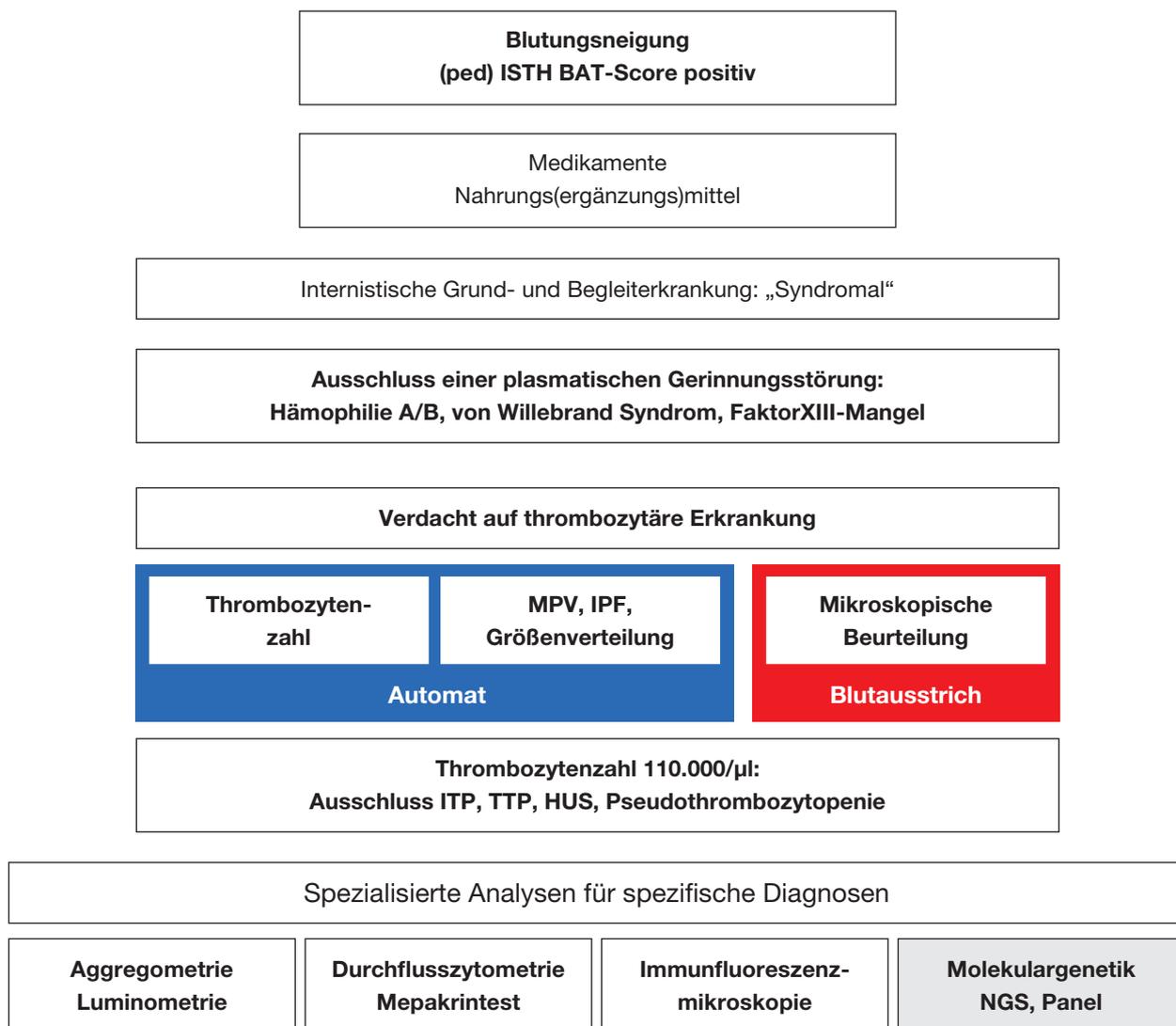


Abbildung 2: Algorithmus für die IPD-Diagnose aus den S2k-Leitlinien der GTH⁸

Neben anderen spezialisierten Untersuchungsmethoden ist die Molekulargenetik ein wichtiger Baustein in der spezifischen Krankheitsdiagnose.

Blutungsneigung ausgeschlossen. Bei Verdacht auf eine thrombozytäre Erkrankung folgt zunächst die Bestimmung grundlegender Parameter im Blutbildautomaten, wie die Thrombozytenzahl, das mittlere Plättchenvolumen (MPV) und die Größenverteilung. Zusätzlich wird die Morphologie der Thrombozyten im Blutaussstrich beurteilt. Hierdurch können bereits erste Hinweise auf die Art der Thrombozytenstörung gewonnen werden.

Für die spezifische Krankheitsdiagnose sind spezialisierte Analysen erforderlich, die mit unterschiedlichsten Methoden und Techniken durchgeführt werden. Die Aggregometrie ist eine wichtige Methode zur Beurteilung der Thrombozytenfunktion und die Verwendung verschiedener Agonisten ermöglicht die Eingrenzung von Defekten. Mit der Durchflusszytometrie kann die Expression von Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche analysiert werden. Auch funktionelle Analysen sind mit dieser Methode möglich, in dem z. B. die Agonisten-induzierte Aktivierung des Fibrinogenrezeptors (GP IIb/IIIa) gemessen wird. Auch Granula-Defekte lassen sich in der Durchflusszytometrie darstellen, wie z. B. mittels des für δ -Granula spezifischen Mepakrintests. In der Immunfluoreszenzmikroskopie werden mit Hilfe Fluoreszenz-markierter Antikörper bestimmte Proteine angefärbt. Sowohl das Vorliegen der Proteine als auch deren Lokalisation in den Thrombozyten wird damit untersucht. Veränderungen geben direkt Hinweise auf mögliche Mutationen in den entsprechenden Genen. Ein immer wichtiger werdender Beitrag zur spezifischen IPD-Diagnostik wird durch molekulargenetische Analysen geliefert. Liegt durch die genannten spezialisierten Analysen bereits eine Verdachtsdiagnose vor, kann die molekulargenetische Diagnostik nachgeordnet durch eine gezielte Sequenzierung der betreffenden Gene erfolgen. Ist keine klare Verdachtsdiagnose möglich oder handelt es sich um einen komplexen Phänotyp, ist die Panelsequenzierung unter Verwendung von NGS-Methoden sinnvoll.

GENPANELS FÜR DIE MOLEKULAR-GENETISCHE IPD-DIAGNOSE

Im Hinblick auf die Vielzahl der Gene im Zusammenhang mit IPD ist die Panelsequenzierung eine sinnvolle diagnostische Strategie. Das Britische ThromboGenomics-Konsortium hat 2016 ein erstes Panel mit 63 Genen entwickelt und dessen Anwendung in der IPD-Diagnostik veröffentlicht⁹. Das Panel wurde dann auf 74 Gene erweitert (IPD-TG) und umfasst auch Gene der plasmatischen Gerinnung¹⁰. Diese Gene wurden beim Genpanel der GTH-ThromKidPlus-Studiengruppe (IPD-GTH) nicht berücksichtigt, so dass dieses Panel 59 Gene umfasst¹¹. Das von einer spanischen Arbeitsgruppe veröffentlichte Genpanel (IPD-ES) beinhaltet insgesamt 68 Gene, wovon 39 auch im ThromboGenomics-Panel enthalten sind¹². Mit 90 Genen ist das an unserem Institut eingesetzte Panel (IPD-MA) das umfangreichste (**Tabelle 3**). Darin sind 18 Gene enthalten, die noch in keinem anderen publizierten Panel enthalten sind. Gene der plasmatischen Gerinnung sind nicht berücksichtigt.

Die *International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) hat eine Liste veröffentlicht, die die sogenannten *TIER 1*-Gene für Gerinnungsstörungen (23), Thrombose- neigungen (11) und Thrombozytendefekte (66) umfasst¹³. Bei diesen Genen handelt es sich um eine von Experten geprüfte, sorgfältige Auswahl von Genen, die unter Berücksichtigung experimenteller und klinischer Daten als kausal für die betreffende Störung anzusehen sind. Bei 37 Genen besteht Einigkeit, d. h. diese sind in allen vier oben genannten Panels enthalten. Das IPD-MA-Panel enthält mit 60 der 66 Gene den höchsten Anteil (91 %) der *TIER 1*-Gene. Lediglich fünf Gene der ISTH-Liste sind in keinem der vier genannten Panels zu finden. Berücksichtigt man die vier Genpanels und die *TIER 1*-Gene für Thrombozytendefekte, umfasst die gesamte Liste derzeit 137 Gene (**Tabelle 3**).

Genliste für die IPD-Diagnose mittels Panelsequenzierung

Gen	IPD-TG	IPD-GTH	IPD-ES	IPD-MA	TIER 1 (ISTH)
A2M			✓		
ABCA1			✓		
ABCC4					✓
ABCG5			✓	✓	✓
ABCG8			✓	✓	✓
ACTB					✓
ACTN1	✓	✓	✓	✓	✓

Gen	IPD-TG	IPD-GTH	IPD-ES	IPD-MA	TIER 1 (ISTH)
ADRA2A			✓		
ANKRD26	✓	✓	✓	✓	✓
ANO6	✓	✓	✓	✓	✓
AP3B1	✓	✓	✓	✓	✓
AP3D1				✓	✓
ARPC1B				✓	✓
BLOC1S3	✓	✓	✓	✓	✓
BLOC1S6	✓	✓	✓	✓	✓
C6orf25				✓	
CD109				✓	
CD36		✓	✓	✓	
CDC42					✓
CHST14				✓	
CLEC1B		✓		✓	
COL13A1				✓	
COL1A1		✓		✓	
COL5A1				✓	
COL5A2				✓	
CYCS	✓	✓	✓	✓	✓
DHCR24			✓		
DIAPH1	✓	✓	✓	✓	✓
DPAGT1			✓		
DNM2		✓		✓	
DTNBP1		✓	✓	✓	✓
ETV6	✓			✓	✓
F10	✓				
F11	✓				
F13A1	✓				
F13B	✓				
F2	✓				
F5	✓				
F7	✓				
F8	✓				
F9	✓				
F2R		✓		✓	
FERMT3	✓	✓	✓	✓	✓
FGA	✓				
FGB	✓				
FGG	✓				
FLI1	✓	✓	✓	✓	✓
FLNA	✓	✓		✓	✓
FYB				✓	✓
GATA1	✓	✓	✓	✓	✓
GFI1B	✓	✓	✓	✓	✓
GGCX	✓			✓	
GNAI3			✓		

Gen	IPD-TG	IPD-GTH	IPD-ES	IPD-MA	TIER 1 (ISTH)
GNAQ			✓		
GNAS			✓		
GNE	✓			✓	✓
GP1BA	✓	✓		✓	✓
GP1BB	✓	✓	✓	✓	✓
GP5		✓	✓	✓	
GP6	✓	✓	✓	✓	✓
GP9	✓	✓	✓	✓	✓
HOXA11	✓	✓	✓	✓	✓
HPS1	✓	✓	✓	✓	✓
HPS3	✓	✓	✓	✓	✓
HPS4	✓	✓	✓	✓	✓
HPS5	✓	✓	✓	✓	✓
HPS6	✓	✓	✓	✓	✓
HRG	✓			✓	
IKZF5					✓
ITGA2			✓	✓	
ITGA2B	✓	✓		✓	✓
ITGB3	✓	✓	✓	✓	✓
JAK2		✓		✓	
KDSR				✓	✓
LMAN1	✓			✓	
LYST	✓	✓	✓	✓	✓
MASTL			✓		
MCFD2	✓			✓	
MECOM				✓	✓
MLPH			✓		
MPIG6B					✓
MPL	✓	✓	✓	✓	✓
MYH9	✓	✓	✓	✓	✓
MYO5A			✓		
NBEA	✓	✓		✓	✓
NBEAL2	✓	✓	✓	✓	✓
ORA1	✓	✓		✓	
P2RX1			✓		
P2RY1		✓	✓	✓	
P2RY12	✓	✓	✓	✓	✓
PFN1		✓		✓	
PLA2G4A	✓	✓	✓	✓	✓
PLAT	✓			✓	
PLAU	✓	✓	✓	✓	✓
PLAUR		✓		✓	
PLCB2			✓		
PLG	✓				
PRF1			✓		
PRKACG			✓		

Gen	IPD-TG	IPD-GTH	IPD-ES	IPD-MA	TIER 1 (ISTH)
PROC	✓				
PROS1	✓				
PTGIR				✓	
PTGS1				✓	✓
PTPN11				✓	
PTS			✓		
RAB27A			✓		
RASA3				✓	
RASGRP2	✓		✓	✓	✓
RBM8A	✓	✓	✓	✓	✓
RGS2			✓		
RNU4ATAC				✓	✓
ROCK1		✓		✓	
RUNX1	✓	✓	✓	✓	✓
SERPINC1	✓				
SERPIND1	✓				
SERPINE1	✓				
SERPINF2	✓				
SLC45A2				✓	
SLFN14				✓	✓
SRC		✓		✓	✓
STIM1	✓	✓	✓	✓	✓
STX11			✓		
STXBP2	✓	✓	✓	✓	✓
SYK		✓		✓	
TBXA2R	✓	✓	✓	✓	✓
TBXAS1	✓		✓	✓	✓
THBD	✓			✓	
THPO	✓	✓		✓	✓
TPM4		✓		✓	✓
TUBB1		✓	✓	✓	✓
UNC13D			✓		
USF1			✓		
VIPAS39	✓	✓	✓	✓	✓
VKORC1	✓				
VPS33B	✓	✓	✓	✓	✓
VWF	✓				✓
WAS	✓	✓	✓	✓	✓

Tabelle 3: Genliste für die IPD-Diagnose mittels Panelsequenzierung

IPD-TG, ThromboGenomics Panel; IPD-GTH, GHT-ThromKidPlus Panel; IPD-ES, Panel von Bastida et al.¹⁰; IPD-MA, Panel des Instituts für Transfusionsmedizin und Immunologie Mannheim; TIER 1, kuratierte Gene der ISTH.

AUSBLICK: NUTZEN UND GRENZEN DER HOCHDURCHSATZ-SEQUENZIERUNG IN DER THROMBOZYTENDIAGNOSTIK

Die Erkenntnisse über die molekularen Pathomechanismen der IPD nehmen kontinuierlich zu und ermöglichen eine ständige Erweiterung der Genpanels für die Sequenzierung. Dennoch kann für einen erheblichen Anteil an Betroffenen keine eindeutige Diagnose gestellt werden. Mit dem ThromboGenomics-Genpanel war bei nur 894 von 2.396 (37,3 %) Indexpatienten eine eindeutige Diagnose möglich. Mit dem Genpanel der ThromKidPlus-Studiengruppe wurden sogar nur 26 % erreicht. Dadurch wird deutlich, dass die molekularen Mechanismen vieler Thrombozytenstörungen noch unbekannt sind. Neue Erkenntnisse können gewonnen werden, wenn man Familien mit mehreren Betroffenen in einer oder mehrere Generationen oder mehrere unverwandte Betroffene mit vergleichbarem Thrombozytenphänotyp mittels WGS oder WES untersucht^{14,15}. Die bioinformatische Verarbeitung der sehr großen Datenmengen stellt dabei eine besondere Herausforderung dar. Aus den vielen genetischen Variationen müssen die identifiziert werden, die möglicherweise kausal für den Phänotyp sind. Auf diesem Weg konnten bereits neue GUS identifiziert werden, deren Kausalität für die Thrombozytenstörung durch weitere Untersuchungen noch bestätigt werden muss. Es ist also davon auszugehen, dass bei Vorliegen der entsprechenden Daten die Liste der *TIER 1*-Gene erweitert wird und die Genpanels für die IPD-Diagnose angepasst werden. So sollte es möglich sein den Anteil der Patienten mit einer spezifischen Diagnose zu erhöhen.

Der Autor



Prof. (apl) Dr. rer. nat. Peter Bugert
Abteilungsleiter Molekulare Diagnostik und
Forschungsgruppe Thrombozytenimmunologie/
-funktion, Institut für Transfusionsmedizin und
Immunologie Mannheim
DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg –
Hessen gemeinnützige GmbH
p.bugert@blutspende.de

Die Literaturhinweise zu diesem Artikel finden Sie im Internet zum
Download unter: www.drk-haemotherapie.de