

Genoomdiagnostiek bij congenitale trombocytenstoornissen

Genome diagnostics for inherited platelet disorders

drs. J.L. Saes¹, dr. S.A. de Munnik², dr. A. Simons³, dr. M.C. Jongmans^{2,4,5}, dr. P.P. Brons⁶, dr. W.L. van Heerde⁷, dr. B. Laros⁸, dr. S.E.M. Schols⁸ en dr. B.A. van der Reijden⁹

SAMENVATTING

Congenitale trombocytenstoornissen zijn zeldzame aandoeningen van de bloedplaatjes, bestaande uit trombocytopenie, trombocytopathie of combinaties hiervan. Het stellen van de diagnose congenitale trombocytenstoornis in het geval van trombocytopathie wordt bemoeilijkt door de lage specificiteit en gebrek aan validatie van de huidige hematologische laboratoriumtesten. Genoomdiagnostiek is een veelbelovende aanvulling op de conventionele laboratoriumdiagnostiek en kan tevens leiden tot beter inzicht in de pathologie en in de toekomst mogelijk tot geïndividualiseerde therapie. 'Sanger sequencing' van een enkel gen is met name geschikt indien er een duidelijk kandidaatgen is, zoals bij een familielid met een bekende mutatie of een specifiek klinisch fenotype.

SUMMARY

Inherited platelet disorders are rare disorders, consisting of thrombocytopenia, thrombocytopathy or a combination of these. Diagnosis is hampered by the lack of specificity and correct validation of current hematological laboratory assays. Genome diagnostics are promising tools in addition to the conventional laboratory diagnostics, and can lead to better insights into the pathology of platelet disorders, and pave the way towards more individualized therapy. Sanger sequencing of a single gene is advised when

'Next generation sequencing' (NGS)-technieken bieden de mogelijkheid om een grote hoeveelheid genen tegelijk te beoordelen. Hiervoor kan 'targeted enrichment', 'whole exome sequencing' (WES) of 'whole genome sequencing' (WGS) worden gebruikt. In het Radboudumc wordt gebruikgemaakt van WES met vervolgens analyse van een panel van 133 genen die een rol spelen in trombose en hemostase. Voor de interpretatie van bevindingen is het van belang deze te bespreken in een multidisciplinair overleg met (kinder)hematologen, laboratoriumspecialisten en klinisch genetici. Door laagdrempelige toepassing van NGS-technieken zal het aantal bekende genmutaties en percentage vastgestelde diagnoses bij patiënten met congenitale trombocytenstoornissen toenemen. (NED TIJDSCHR HEMATOL 2018;15:158-66)

there is a clear candidate gene based on a family member with known gene mutation or a specific phenotype. Next generation sequencing (NGS) techniques offer the possibility to investigate a large amount of genes. Targeted enrichment, whole exome sequencing (WES) or whole genome sequencing (WGS) are available techniques to use. The Radboud university medical center provides WES with subsequent analysis of a panel of 133 genes known to be involved in thrombosis and hemostasis. It is important to classify the observed variants and discuss the results in a

¹arts-onderzoeker en internist in opleiding, afdeling Hematologie, Radboudumc, ²klinisch geneticus, afdeling Genetica, Radboudumc, ³laboratoriumspecialist, afdeling Genetica, Radboudumc, ⁴klinisch geneticus, afdeling Medische Genetica, UMCU, ⁵klinisch geneticus, Prinses Máxima Centrum voor kinderoncologie, ⁶kinderhematoloog-oncoloog, afdeling Kinderhematologie-oncologie, Amalia kinderverziekenhuis, Radboudumc, ⁷stollingsfysioloog, Hemofiliebehandelcentrum Nijmegen – Eindhoven – Maastricht, ⁸internist-hematoloog, afdeling Hematologie, Radboudumc, ⁹moleculair bioloog, afdeling Laboratoriumgeneeskunde, Laboratorium voor Hematologie, Radboudumc. Correspondentie graag richten aan mw. drs. J.L. Saes, afdeling Hematologie, Radboudumc, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen, tel.: 024 309 39 48, e-mailadres: joline.saes@radboudumc.nl

Belangenconflict: geen gemeld. Financiële ondersteuning: geen gemeld.

Trefwoorden: exoom, genoom, trombocytopathie, trombocytopenie

Keywords: exome, genome, platelet disorders, thrombocytopenia

multidisciplinary meeting with (pediatric) hematologists, laboratory specialists and clinical geneticists. Increased use of NGS techniques will enlarge the

number of known gene mutations and increase the percentage of diagnoses in patients with inherited platelet disorders.

INLEIDING

Congenitale trombocytostörungen vormen een zeldzame groep stoornissen die bestaan uit een verminderd aantal trombocyten (trombocytopenie), een verminderde functie van de trombocyten (trombocytopathie) of een combinatie van beide. *Tabel 1* geeft een overzicht van de bekende congenitale trombocytopenieën en trombocytopathieën.¹⁻⁵ Diverse

klinische beelden kunnen leiden tot een milde tot matig ernstige bloedingsneiging. Het defect speelt zich af in de primaire hemostase, en de bijbehorende kliniek bestaat voornamelijk uit doorbloeden van kleine wondjes, moeizame bloedstolling tijdens operaties of trauma, tandvleesbloedingen en bij vrouwen menorrhagie. Informatie over de prevalentie is schaars door de onbekendheid van het ziektebeeld en

TABEL 1. Overzicht van de congenitale trombocytopenieën en -pathieën.

Trombocytopenie	Trombocytopathie	Trombocytopenie/pathie
Congenitale amegakaryocytische trombocytopenie	Morbus Glanzmann	Bernard-Soulier-syndroom
TAR-syndroom	Artrogrypose-renale disfunctie-cholestase-syndroom	Gray-platelet-syndroom
Amegakaryocytische trombocytopenie met radioulaire synostose	Idiopathische α - en δ -granule storage pool disease'	Quebec-plaatjesstoornis
Fanconi-anemie	Scott-syndroom	Wiskott-Aldrich-syndroom
MYH9-gerelateerde ziekten	Hermansky-Pudlak-syndroom	Stormorken-syndroom
Trombocytopenie 2	Chediak-Higashi-syndroom	Paris-Trousseau/Jacobsen-syndroom
DYS-XLTT	Griscelli-syndroom	FPD/AML
Mediterrane stomatocytose/macrothrombocytemie	Receptordefecten	Noonan-syndroom
22q11-deletiesyndroom		
vWD type 2B		
Plaatjestype vWD		
Congenitale TTP		
X-gebonden trombocytopenie		
Periventriculaire nodulaire heterotopie/filamine A		

TAR-syndroom=Trombocytopenia Absent Radius-syndroom, MYH9=Myosin Heavy Chain 9, FPD/AML=Familial Platelet Disorder with predisposition to Acute Myeloid Leukemia, DYS-XLTT=X linked thrombocytopenia with beta-thalassemia, vWD=van Willebrand Disease, TTP=Thrombotic Thrombocytopenic Purpura.¹⁻⁵

de hieruit volgende onderdiagnostiek. Voorbeelden van congenitale trombocytopathieën zijn Bernard-Soulier-syndroom (deficiëntie van glycoproteïne Ib), 'storage pool disease' (deficiëntie van de dense granulae) en Morbus Glanzmann (deficiëntie/defect glycoproteïne IIb/IIIa). De diagnostiek van trombocytostörungen wordt bemoeilijkt door het gebrek aan goede functionele en makkelijk uit te voeren testen. Met name bij milde trombocytopathieën is de diagnostiek op dit moment vaak ontoereikend, hetgeen leidt tot een onderschatting van de werkelijke prevalentie.⁶ Voor patiënten is het van belang dat een correcte diagnose wordt gesteld, zodat een gerichte individuele behandeling kan worden opgesteld en duidelijkheid kan worden gegeven aan familieleden, evenals erfelijkheidsadvies. In het afgelopen decennium is genetisch onderzoek door middel van 'next generation sequencing' in opkomst gekomen voor de diagnostiek van met name zeldzame congenitale aandoeningen. Naast de rol in het primaire proces van de diagnostiek kan met genomonderzoek meer inzicht worden verkregen in de pathogenese van trombocytostörungen. Een stroomdiagram van de diagnostiek in het Radboudumc is weergegeven in *Figuur 1*, pagina 161.

In dit artikel bespreken we de huidige stand van zaken met betrekking tot genetische diagnostiek bij congenitale trombocytostörungen, de voor- en nadelen van verschillende methoden en geven we een vooruitblik op de toekomst met betrekking tot klinische implicaties.

LABORATORIUMDIAGNOSTIEK

De eerste stap in de diagnostiek van congenitale trombocytostörungen is het bepalen van de mate van trombocytopenie en de aanwezigheid van eventuele andere cytopeniën. De grootte van de trombocyten ('mean platelet volume') en de morfologie van de trombocyten (handmatig beoordeeld bloeduitstrijkje). Indien sprake is van een geïsoleerde trombocytopenie moeten eerst andere oorzaken worden uitgesloten voordat aan een congenitale trombocytopenie wordt gedacht. Dit is eerder beschreven door Brons et al. en valt buiten het bestek van dit artikel.³ Bij verdenking op trombocytopathie kan een screeningstest worden gebruikt, zoals de 'Platelet Function Analyzer'. De sensitiviteit en specificiteit van deze test is echter zeer beperkt en wordt niet meer in elk ziekenhuis verricht.⁷ Specifieke laboratoriumtesten die kunnen worden gebruikt voor het bepalen van de trombocytfunctie zijn lichttransmissieaggregometrie, flowcytometrie, 'Platelet Activation Test', elektronenmicroscopie, perfusietest en massaspectrometrie. Zie het overzichtsartikel van Blaauwgeers et al. voor de specifieke eigenschappen per individuele test.⁶ Veel van deze testen zijn niet betrouwbaar

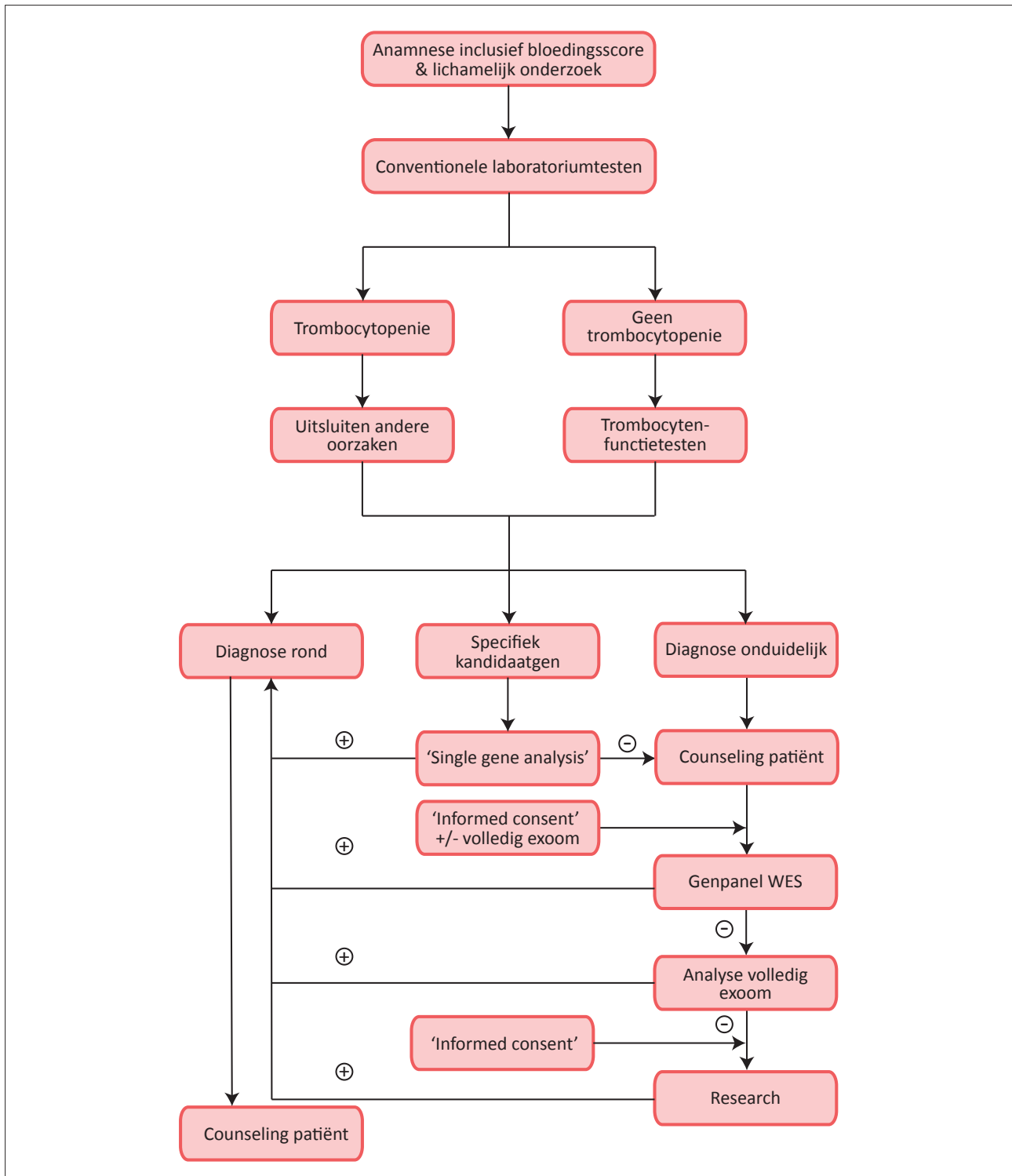
bij een trombocytentel $<100 \times 10^9/l$. Hierdoor is de diagnostiek bij gecombineerde trombocytopenie/pathie zoals bijvoorbeeld bij het 'gray platelet syndrome' nog lastiger. Concluderend kan worden gesteld dat met de huidige beschikbare testen een juiste diagnose van congenitale trombocytostörungen moeilijk is.

GENOOMDIAGNOSTIEK

Genoomdiagnostiek kan een waardevolle aanvulling zijn op bestaande conventionele laboratoriumtesten. Het biedt de mogelijkheid om een verklaring voor het klinisch beeld en de laboratoriumafwijkingen te vinden waar conventionele laboratoriumdiagnostiek tekortschiet. Daarnaast kunnen mutaties worden gevonden in genen die betrokken zijn bij de hematopoëse en functie van de trombocyten die cumulatief een verklaring kunnen geven voor het gevonden klinisch beeld en laboratoriumafwijkingen. Patiënten bij wie genoomdiagnostiek wordt verricht, moeten zorgvuldig worden geselecteerd om ongewenste verwijzingen te voorkomen bij patiënten met een lage kans op een onderliggende genetische afwijking. Inmiddels is een groot aantal genen bekend waarin mutaties verantwoordelijk kunnen zijn voor trombocytostörungen. Er zijn verschillende methoden voor gendiagnostiek, die hieronder worden besproken. Genanalyse door middel van 'Sanger sequencing' wordt al enkele decennia toegepast, en de laatste jaren zijn met name 'next generation sequencing' (NGS)-technieken in opkomst.⁸⁻¹¹ De voor- en nadelen van de verschillende methoden voor genoomdiagnostiek zijn samengevat in *Tabel 2*, pagina 162. Door het gebruik van NGS zal de frequentie van het aantonen van pathogene mutaties toenemen, wat de kans op verklaring van de trombocytostörung verder vergroot. Conventionele laboratoriumtesten zijn ook bij de toepassing van genoomdiagnostiek nog steeds van waarde ter ondersteuning van de interpretatie van gevonden varianten.

GERICHTE DNA-DIAGNOSTIEK VAN ÉÉN GEN

Het typeren van specifieke genen door middel van 'Sanger sequencing' is goed toepasbaar bij een klinisch en laboratoriumfenotype dat sterk wijst op één bepaald genetisch syndroom of indien de mutatie reeds bekend is in een familie en verwanten getest willen worden. Een voorbeeld hiervan zijn de MYH9-gerelateerde aandoeningen, waarop meestal een hoge verdenking bestaat door de aanwezigheid van macrothrombocyten, lichaampjes van Döhle in de granulocyten en associatie met gehoorverlies, nierfalen en cataract. De diagnose kan dan door middel van 'Sanger sequencing' worden bevestigd. Het base voor base typeren van specifieke genen is echter inefficiënt bij patiënten met een specifiek fenotype.



FIGUUR 1. Stroomdiagram van de diagnostiek naar congenitale trombocytenstoornissen in het Radboudumc. De diagnostiek begint met een anamnese inclusief bloedingscore en lichamelijk onderzoek, gevolgd door screenende laboratoriumtesten: protrombinetijd (PT), geactiveerde partiële tromboplastinetijd (aPTT), fibrinogeen, von-Willebrand-factor-antigeen en -activiteit en Factor-VIII-activiteit. Indien trombocytopenie aanwezig is, dienen andere oorzaken te worden uitgesloten voordat aan een congenitale trombocytopenie kan worden gedacht. Indien geen trombocytopenie aanwezig is, worden trombocytenfunctietesten verricht. In geval van een specifiek kandidaatgen wordt 'single gene analysis' verricht, in alle andere gevallen WES. In een eerste gesprek met de klinisch geneticus wordt 'informed consent' gegeven voor alleen het genpanel of voor volledig exoom indien na het genpanel geen diagnose is gesteld. In een volgende stap kan 'informed consent' worden gegeven voor research indien na volledige exoomanalyse nog geen diagnose is gesteld.

TABEL 2. Voor- en nadelen van methoden voor gendiagnostiek.

	'Sanger sequencing'	'Next generation sequencing' (NGS)		
	'Single gene'	'Next generation sequencing' (NGS)	'Whole exome sequencing'	'Targeted next generation sequencing'
Voordelen	Snel	Minder tijdrovend ten opzichte van andere NGS-technieken, relatief goedkoop	Mogelijkheid ontdekken nieuwe relevante genen	Informatie over volledig genoom
	Geen risico op nevenbevindingen	Geen risico op nevenbevindingen	Nieuw gevonden genen kunnen direct aan het panel worden toegevoegd	Mogelijkheid ontdekken nieuwe relevante genen
		Goede dekking van de genen die gesequenced worden	Indien gebruik van een genpanel, geen risico op nevenbevindingen	Indien gebruik van een genpanel, geen risico op nevenbevindingen
Nadelen	Alleen mogelijk voor specifiek gen of klein aantal genen aan de hand van familie of fenotype	Geen mogelijkheid ontdekken nieuwe relevante genen	Alleen informatie over coderende deel genen	Enorme hoeveelheid informatie, sequentie-analyse (nog) niet gestandaardiseerd
	Niet meer snel en goedkoop als veel genen sequentieel worden getest	Nieuw gevonden genen kunnen niet gemakkelijk worden toegevoegd	10-20% van de exonen wordt niet correct geamplificeerd	
		Alleen informatie over coderende deel genen		

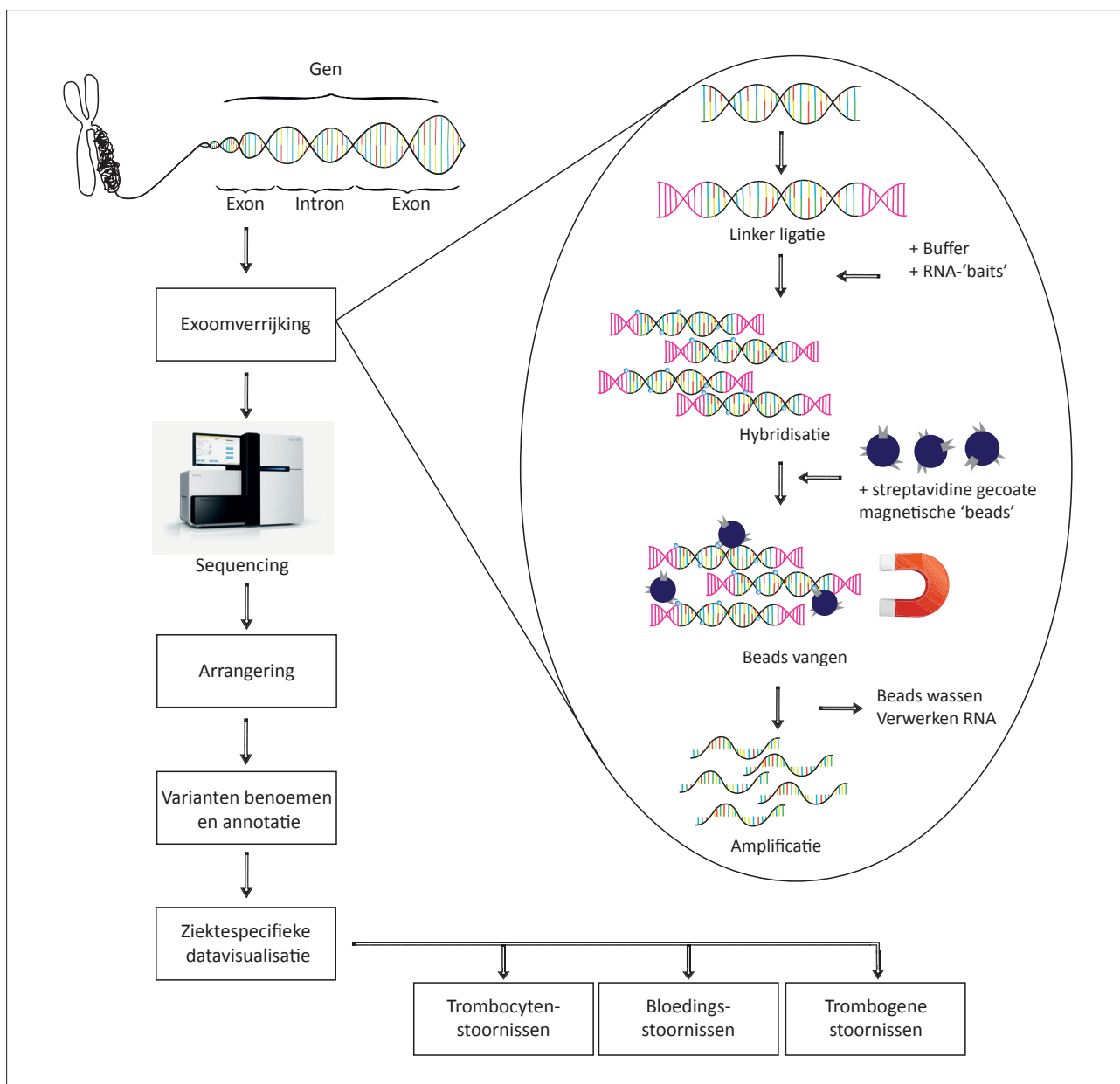
'TARGETED NEXT GENERATION SEQUENCING'

Bij deze techniek wordt eerst een platform gegenereerd met relevante genen. Vervolgens worden van alleen deze genen de relevante exonen geïsoleerd en daarop wordt NGS toegepast. Het ontwikkelen van het genpanel vergt een tijdsinvestering. Als dit eenmaal gedaan is, biedt het echter een eenvoudige, relatief goedkope, en toegankelijke manier van NGS. Toepassing bij patiënten met congenitale trombocytostoorntissen laat veelbelovende resultaten zien.⁸ Een nadeel van 'targeted' NGS is dat nieuwe genen moeilijk toe te voegen zijn aan het platform wanneer dit eenmaal is ontwikkeld. Dit is belangrijk, omdat het aantal genen waarin pathogene mutaties worden gevonden alleen maar toe zal nemen.

'WHOLE EXOME SEQUENCING'

Bij 'whole exome sequencing' (WES) worden eerst alle exonen geselecteerd uit het DNA, waarna de sequentie van al deze exonen wordt bepaald. Alle exonen samen worden het exoom genoemd. Deze techniek is weergegeven in *Figuur 2*,

pagina 163, met een uitgebreide beschrijving van de techniek. Na 'sequencing' van het volledige exoom wordt een bio-informatisch in silico filter toegepast. Het filter selecteert alleen de genen die in een vooraf opgesteld panel zitten, om het risico op nevenbevindingen te minimaliseren. In het Radboudumc is een panel genen samengesteld (zie *Tabel 3*, pagina 164), waarvan in de OMIM-database (Online Mendelian Inheritance in Man) vermeld staat dat mutaties in deze genen afwijkingen in de trombose en/of hemostase kunnen veroorzaken. Aanvankelijk (januari 2016) bestond dit panel uit 91 genen, waarna het stapsgewijs is uitgebreid tot 133 genen (januari 2018). Elke 3-6 maanden wordt geëvalueerd of er nieuwe genen moeten worden toegevoegd. Wanneer dit gewenst is, hoeft de WES-procedure niet te worden aangepast, omdat met deze benadering de exonen van alle genen worden bepaald. Het genpanel wordt geanalyseerd bij patiënten met verdenking op een congenitale trombocytostoorntis, evenals bij patiënten met een fibrinolysestoornis, onbegrepen bloedingsneiging of onbegrepen



FIGUUR 2. 'Whole exome sequencing'. Na selectie van alle exonen, worden de exonen verrijkt. Vervolgens worden de linkers hieraan geligeerd en buffer- en RNA-'baits' toegevoegd. Deze 'baits' binden zich aan de DNA-strengen (dehybridisatie). Vervolgens worden magnetische 'beads' toegevoegd, die zich aan de 'baits' binden. Deze kunnen door middel van een magneet worden gevangen. Vervolgens worden de DNA-strengen geamplificeerd, waarna 'sequencing' kan plaatsvinden. Na de 'sequencing' start een bio-informatisch traject van arrangering, het annoteren van varianten en visualiseren van ziektespecifieke gegevens.

trombocytose. In het geval van een onbegrepen bloedingsneiging wordt WES in principe alleen verricht bij een score van ≥ 10 op een 'Bleeding Assessment Tool', waarbij het gaat om een klinisch relevante bloedingsneiging. Indien een variant wordt gevonden, wordt deze geclassificeerd van 'niet pathoog' tot 'zeker pathoog' volgens de classificatie in Tabel 4, pagina 165. Deze classificatie komt tot stand door verschillende factoren te analyseren met behulp van in silico

predictieprogramma's. Het type variant wordt beoordeeld, bijvoorbeeld 'missense', 'nonsense'- of 'frameshift'-variant, en of deze variant in een functioneel domein ligt. Tevens wordt bepaald wat het voorspelde effect van deze variant is op de eiwitvorming, en of de variant al eerder bij mensen of in diermodellen is beschreven en zo ja, wat voor fenotype dit heeft veroorzaakt. Al deze factoren samen bepalen hoe een variant zal worden geclassificeerd. Indien bijvoorbeeld een

variant hoog scoort op pathogeniciteit in de predictieprogramma's en al eerder is beschreven in de literatuur inclusief functioneel bewijs, dan is dit een klasse 5-mutatie. Een variant met een hoge score die nog nooit is beschreven in de literatuur, is een klasse 3-variant. In het Radboudumc wordt na classificatie van gevonden varianten elke casus besproken in een multidisciplinair overleg met (kinder)hematologen, laboratoriumspecialisten en klinisch genetici.

Een juiste interpretatie van resultaten is onontbeerlijk. Zo kunnen ook 'silent' mutaties (een mutatie waarbij het nieuwe codon voor hetzelfde aminozuur codeert) bijdragen aan het ontstaan van trombocytopenie. Een voorbeeld hiervan is een 'silent' variant in het *GFI1B*-gen, waardoor het betreffende exon niet goed wordt gespliced. Dit leidt tot een *GFI1B*-isoform die de megakaryopoëse minder goed stimuleert, resulterend in een lager trombocytenaantal.¹² Anderzijds is er het gevaar van overinterpretatie van onschuldige varianten. In het geval van een variant met onbekende pathogeniciteit (klasse 3), wordt indien mogelijk en in overleg met patiënt en familie segregatieanalyse ingezet. Hierbij wordt bij familieleden bepaald of zij drager zijn van dezelfde variant en of het fenotype overeenkomt, om te bepalen of de variant associeert met de bloedingsneiging of trombocytenstoornis. Een voorbeeld van het belang van segregatieanalyse is een patiënt met een bloedingsneiging met onbekende oorzaak waarbij twee klasse 3-varianten in het *NBEAL2*-gen werden gevonden, waarbij werd vermoed dat deze varianten biallelisch waren. Hierdoor ontstond de verdenking op het 'gray platelet syndrome'. Segregatieanalyse toonde echter dat de gevonden varianten op één allel lagen en de patiënt dus enkel mogelijk drager is van deze autosomaal recessieve aandoening. De gevonden varianten kunnen dan ook geen verklaring zijn voor het klinisch fenotype. Naast segregatieanalyse wordt indien mogelijk ook op functioneel niveau het effect van de gevonden variant getoetst. Het is belangrijk om voorzichtig te zijn in de rapportage van klasse 3-varianten, omdat nog onduidelijk is of de gevonden variant klinische consequenties heeft. Dit vergt een gedegen counseling van de patiënt en familie.

Indien in het geselecteerde genpanel geen verklaring voor het klinisch fenotype wordt gevonden, kan naar het volledige exoom worden gekeken. Het open exoom kan in het Radboudumc alleen worden aangevraagd door de klinisch geneticus na consultatie. In dat geval is er een kans op nevenbevindingen, maar ontstaat ook de mogelijkheid om nieuwe relevante genen te ontdekken. Deze kunnen dan ook weer gemakkelijk aan het panel (het filter) worden toegevoegd, evenals nieuwe genen die in de literatuur zijn gerapporteerd. Ook kunnen deze genen retrospectief worden geanalyseerd bij patiënten bij wie eerder geen genetische verklaring voor

TABEL 3. Genen in exoompakket trombose-hemostase van het Radboudumc.

A2M	ABCG5	ABCG8	ACTN1	ACVRL 1	ADAMTS1 3	ANKRD2 6	ANO6
AP3B1	BLOC1S 3	BLOC1S 6	BRAF	C3	CALR	CBL	CD36
CD46	CFB	CFH	CFHR1	CFHR3	CFI	COL3A1	CTLA4
CYCS	DGKE	DIAPH1	DNASE1	DTNBP 1	ENG	ETV6	F10
F11	F12	F13A1	F13B	F2	F2RL3	F5	F7
F8	F9	FCGR2 A	FCGR2 B	FCGR2 C	FERMT3	FGA	FGB
FGG	FLII	FLNA	GATA1	GFI1B	GGCX	GP1BA	GP1BB
GP6	GP9	HABP2	HCF2	HOXA1 1	HPS1	HPS3	HPS4
HPS5	HPS6	HRG	ITGA2	ITGA2B	ITGB3	JAK2	KLKB1
KNG1	KRAS	LMAN1	LYST	LZTR1	MASTL	MCFD2	MECOM
MLPH	MPL	MTHFR	MYH9	MYO5A	NBEA	NBEAL2	NRAS
NS2	P2RX1	P2RY12	PLA2G4 A	PLA2G7	PLAT	PLAU	PLG
PRKACG	PROC	PROS1	PROZ	PTGS1	PTPN11	PTPN22	RAB27A
RAF1	RASGRP 2	RBMSA	RIT1	RUNX1	SELP	SERPINC 1	SERPIND 1
SERPINE 1	SERPINF 2	SH2B3	SLFN14	SOS1	SOS2	SRC	STIMI
STXBP2	TALDO1	TBX1	TBXA2R	TBXAS1	THBD	THPO	TREX1
TUBB1	VPIAS39	VKORC 1	VPS33B	VWF	WAS	WIPF1	

Updates van dit panel vindt u hier:
<http://www.radboudumc.nl/patientenzorg/onderzoeken/erfelijkheidsonderzoek-exoomsequencing-wes>.

Geel=bloedingsgen, roze=trombocyten, blauw=trombose, geel/roze=gen dat zowel een bloedingsstoornis als trombocytenstoornis kan veroorzaken, geel/blauw=gen dat zowel een bloedingsstoornis als trombosestoornis kan veroorzaken.

de bloedingsneiging werd gevonden. Indien ook na analyse van het open exoom geen verklaring voor het fenotype is gevonden, bestaat nog de mogelijkheid om in een researchsetting verder te zoeken naar een mogelijke verklaring in de beschikbare gegevens. Een beperking van WES is dat alleen varianten in het coderende deel van het genoom (het exoom) worden uitgelezen. Dit betreft ongeveer 1% van het genoom, echter hier bevinden zich ongeveer 85% van de ziekteveroorzakende mutaties.¹³

Het gebruik van WES is wereldwijd in opkomst, onder andere bij patiënten met een bloedingsneiging. De diagnostische opbrengst is bij patiënten met een trombocytenstoornis het hoogst (ongeveer 30%) ten opzichte van andere stoornissen in de hemostase.⁹ In het Radboudumc vinden wij een vergelijkbaar percentage mutaties bij patiënten met een trombocytenstoornis. Naar onze ervaring is de opbrengst bij patiënten met een bloedingsneiging van onbekende oorzaak nog zeer laag.

TABEL 4. Classificatie van coderende varianten gevonden met 'sequencing'.¹⁴

Klasse 1	Niet pathogeen
Klasse 2	Waarschijnlijk niet pathogeen
Klasse 3	Variant met onbekende pathogeniciteit
Klasse 4	Waarschijnlijk pathogeen
Klasse 5	Pathogeen

TABEL 5. Lijst van gebruikte afkortingen.

BAT	Bleeding Assessment Tool
DYS-XLTT	X linked thrombocytopenia with beta-thalassemia
FDP/AML	Familial Platelet Disorder with predisposition to Acute Myeloid Leukemia
MYH9	Myosin Heavy Chain 9
NGS	Next generation sequencing
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
TAR-syndroom	Thrombocytopenia Absent Radius-syndroom
TTP	Thrombotic Thrombocytopenic Purpura
vWD	Von Willebrand Disease
WES	Whole exome sequencing
WGS	Whole genome sequencing

'WHOLE GENOME SEQUENCING'

'Whole genome sequencing' (WGS) geeft de meest complete weergave van de genetische varianten van een individu. Hierbij wordt de sequentie van het hele genoom, inclusief alle genen, bepaald. Een nadeel is de enorme hoeveelheid informatie die hierbij wordt gegenereerd, waarvan de klinische relevantie op dit moment onbekend is. Toepassing van een panel van bekende genen, geanalyseerd met WGS, heeft reeds zijn waarde laten zien in een researchsetting bij patiënten met een bloedingsneiging of trombose, waaronder patiënten met trombocytopenie.¹⁰ Deze vorm van diagnostiek wordt momenteel echter niet routinematig toegepast, onder andere vanwege de relatief hoge kosten en de complexiteit van de analyse en interpretaties.

CONCLUSIE

Bij een groot deel van de patiënten met een congenitale trombocytopenie blijft de oorzaak onbekend. Genoomdiagnostiek met NGS neemt een steeds belangrijkere plaats

in bij de diagnostiek van zeldzame congenitale stoornissen en dit geldt ook voor de diagnostiek van congenitale trombocytopenie. In het Radboudumc wordt WES gebruikt, waarbij in eerste instantie een panel van 133 genen wordt toegepast die alle een pathogene rol kunnen spelen in de trombose en hemostase. Het gebruik van NGS zal de identificatie van nieuwe pathogene mutaties doen toenemen en de diagnostische opbrengst vergroten. Naar verwachting zullen NGS-technieken steeds breder beschikbaar worden en hun toepassing in de diagnostiek vinden.

REFERENTIES

1. Bolton-Maggs PH, Chalmers EA, Collins PW, et al. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *Br J Haematol* 2006;135(5):603-33.
2. Nurden AT, Freson K, Seligsohn U. Inherited platelet disorders. *Haemophilia* 2012;18(Suppl 4):154-60.
3. Brons PPT, Van der Linde AA, Van Heerde WL. Diagnostiek van congenitale trombocytopenie. *Ned Tijdschr Hematol* 2013;10:260-7.

AANWIJZINGEN VOOR DE PRAKTIJK

- 1 De diagnostiek van congenitale trombocytenstoornissen begint met een anamnese, lichamelijk onderzoek en conventioneel laboratoriumonderzoek.**
- 2 Indien geen definitieve diagnose kan worden gesteld door middel van conventionele diagnostiek, kan genomdiagnostiek een verklaring voor het ziektebeeld geven.**
- 3 Indien een hoge verdenking bestaat op een mutatie in één specifiek gen op basis van familiegeschiedenis of een specifiek fenotype, kan ‘Sanger sequencing’ worden verricht. Bij het ontbreken van een specifiek genotype of familieanamnese kunnen bij verdenking op een congenitale trombocytenstoornis ‘next generation sequencing’-technieken zoals ‘whole exome sequencing’ worden toegepast.**
- 4 Gevonden genetische varianten moeten zorgvuldig worden geanalyseerd en besproken in een multidisciplinair overleg. Daarnaast is goede counseling van patiënt en familie van belang.**

4. Diz-Kucukkaya R. Inherited platelet disorders including Glanzmann thrombasthenia and Bernard-Soulier syndrome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013;2013:268-75.

5. Singer ST, Hurst D, Addiego JE, Jr. Bleeding disorders in Noonan syndrome: three case reports and review of the literature. *J Pediatr Hematol Oncol.* 1997; 19(2):130-4.

6. Blaauwgeers MW, Huisman AI, Urbanus RT, et al. Congenitale trombocytopathie: huidige diagnostiek en toekomstperspectief. *Ned Tijdschr Hematol* 2016;13:332-40.

7. Podda GM, Bucciarelli P, Lussana F, et al. Usefulness of PFA-100 testing in the diagnostic screening of patients with suspected abnormalities of hemostasis: comparison with the bleeding time. *J Thromb Haemost* 2007;5(12):2393-8.

8. Bastida JM, Lozano ML, Benito R, et al. Introducing high-throughput sequencing into mainstream of genetic diagnosis practice in inherited platelet disorders. *Haematologica* 2018;103(1):148-62.

9. Leinoe E, Zetterberg E, Kinalis S, et al. Application of whole-exome sequencing to direct the specific functional testing and diagnosis of rare inherited bleeding disorders in patients from the Oresund Region, Scandinavia. *Br J Haematol*

2017;179(2):308-22.

10. Simeoni I, Stephens JC, Hu F, et al. A high-throughput sequencing test for diagnosing inherited bleeding, thrombotic, and platelet disorders. *Blood* 2016; 127(23):2791-803.

11. Nurden AT, Nurden P. High-throughput sequencing for rapid diagnosis of inherited platelet disorders: a case for a European consensus. *Haematologica* 2018;103(1):6-8.

12. Polfus LM, Khajuria RK, Schick UM, et al. Whole-exome sequencing identifies loci associated with blood cell traits and reveals a role for alternative GF1B splice variants in human hematopoiesis. *Am J Hum Genet* 2016;99(2):481-8.

13. Choi M, Scholl UI, Ji W, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(45):19096-101.

14. Wallis Y, McAnulty C, Bodmer D, et al. Practice guidelines for the evaluation of pathogenicity and the reporting of sequence variants in clinical molecular genetics. *ACGS*, 2013.

ONTVANGEN 18 JANUARI 2018, GEACEPTEERD 29 MAART 2018.