

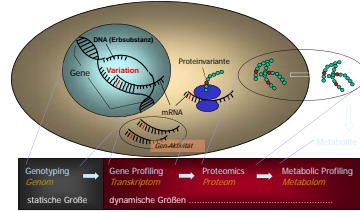


Dr. rer. nat. Hartmut Schmidt
Centrum für Laboratoriumsmedizin
– Zentrallaboratorium –
Universitätsklinikum Münster
Albert-Schweitzer-Campus 1
48149 Münster
Tel.: 0251 83-47226
Fax: 0251 83-47225
schmidt@uni-muenster.de
www.klchi.uni-muenster.de

Sommersemester 2014

- 1 -

"Omics"-Ansatz: die molekulare Biologie der Zelle



- 2 -

Probenmaterial für die Molekulardiagnostik

- | | | |
|--|--|--|
| Geeignet | Bedingt geeignet | Nicht geeignet |
| <ul style="list-style-type: none"> • Vollblut • Plasma • Serum • buffy coat • Knochenmark • Punktionen • Lymphozyten • Zellkulturen • Geweben • forensische Proben • Cerebrospinalflüssigkeit | <ul style="list-style-type: none"> • Getrocknetes Material (Auflösung in PBS) | <ul style="list-style-type: none"> • Heparin-Blut |

- 3 -

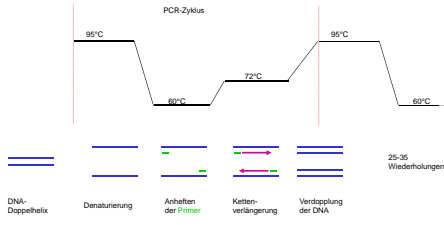
DNA-Isolation Säulensystem



Ausbeute: 200 µl Blut: 4-12 µg DNA
= ~ 20 ng/µl

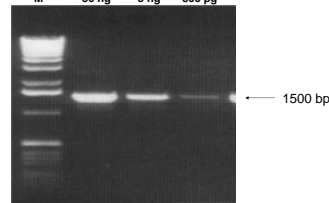
- 4 -

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

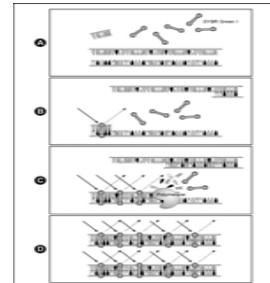


- 5 -

Agarose-Gelelektrophorese

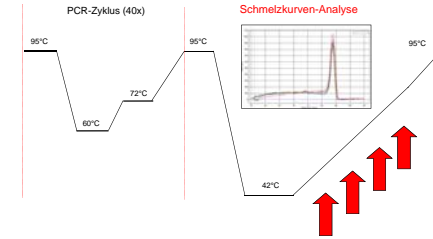


- 6 -



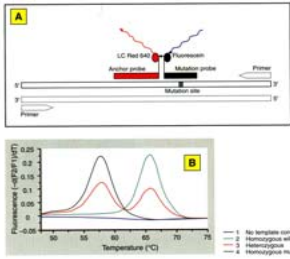
Real-time PCR mit SYBR Green

- 7 -



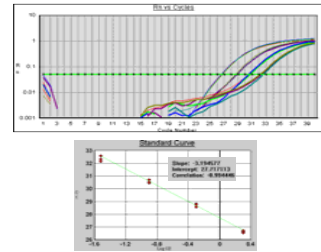
- 8 -

LightCycler: Mutationsanalyse



- 9 -

Quantifizierung von Bakterien oder Viren



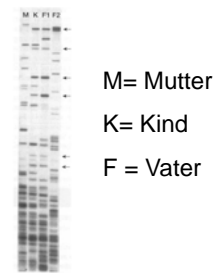
- 10 -

PCR – Vielzahl von Anwendungen

- Infektionsdiagnostik (Viren, Pilze, Bakterien)**
- Virusdiagnostik, z.B. HIV, HBV, HCV, EBV, CMV (hohe Sensitivität, hohe Spezifität, Bestätigungsanalytik, Kontamination von Blutprodukten)
 - Subtypen-Bestimmung – z.B. Influenza A/B für Impfstoff, Erreger, die eine mehrheitliche Anzucht auf Nährböden erfordern (z.B. Chlamydien) schnelle Abklärung durch PCR
- Genetischer Fingerabdruck**
- 10-150 Bp lange, polymorphe, repetitive DNA-Sequenzen, die tandemartig wiederholt werden, die Anzahl der Wiederholungen hat hohe individuelle Variabilität
 - Variable number of tandem repeats (VTPR), 10-15 Loci werden untersucht
 - Short tandem repeats (STR), Unterscheidung naher Verwandte
 - Vater- oder Mutterschaft

- 11 -

PCR – Vielzahl von Anwendungen



- 12 -

PCR – Vielzahl von Anwendungen

- Genetische Störungen des Menschen**
- Humangenetik (Erbkrankheiten)
 - Zytogenetik
 - Tumorzytogenetik
 - Immunogenetik
 - Immunogenetik
 - MHC-Komplex
 - HLA-System
 - Prädispositionsdiagnostik (Thrombose-, KHK-Risiko)
 - Pharmakogenetik
- Lebensmittelüberwachung**
- (Allergene, pathogene Keime, gentechn. veränderte Organismen (GVO), Beimengungen von anderen Spezies)

- 13 -

Vorgefertigte Kits

Gram (-) Bakterien	Gram (+) Bakterien	Pilze
<ul style="list-style-type: none"> • Escherichia coli • Klebsiella (pneumoniae/ oxytoca) • Serratia marcescens • Enterobacter (cloacae/ aerogenes) • Proteus mirabilis • Pseudomonas aeruginosa • Acinetobacter baumannii • Streptophomonas maltophilia 	<ul style="list-style-type: none"> • Staphylococcus aureus • CoNS (Coagulase negative Staphylococci) • Streptococcus pneumoniae • Streptococcus spp • Enterococcus faecium • Enterococcus faecalis 	<ul style="list-style-type: none"> • Candida albicans • Candida tropicalis • Candida parapsilosis • Candida lusitana • Candida glabrata • Aspergillus fumigatus

90 Keime in 6h aus 1,5 ml Blut

- 14 -

Geräte und Methoden in der Molekularen Diagnostik

Sonden-spezifische Echtzeit-PCR mit Schmelzkurvenanalyse

Quantitative Echtzeit-PCR (5'-Nuclease-Assay)

DNA-Sequenzierung

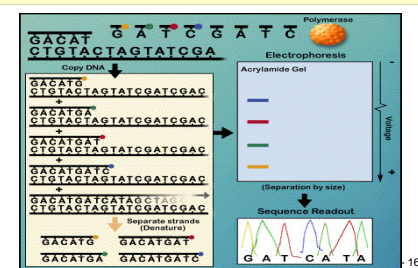
LightCycler

TaqMan ABI Prism 7900

Kapillarsequenzierer ABI Prism 3700

- 15 -

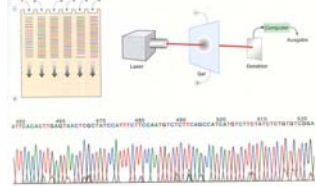
Prinzip der Sequenzierung nach dem Kettenabbruchprinzip nach Sanger



- 16 -

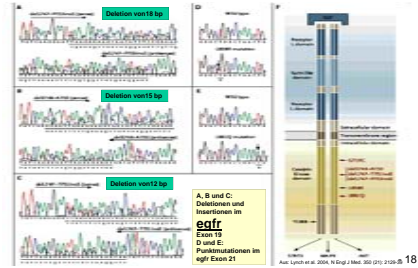
DNA-Sequenzierung

Kapillarelektrophorese + Bioinformatik: Heute Goldstandard
 ➤ Hohe Zuverlässigkeit
 ➤ Lange Sequenzabfolgen lesbar
 ➤ Automatisierbar



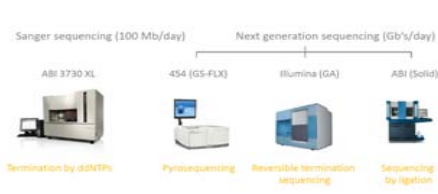
- 17 -

Mutationsanalysen im Gen der Rezeptortyrosinkinase egfr



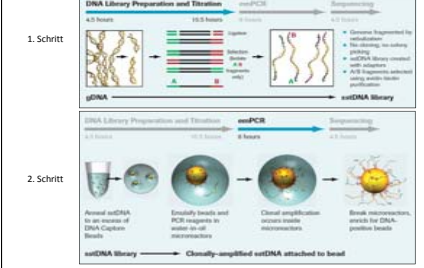
- 18 -

Sequenzierer verschiedener Hersteller



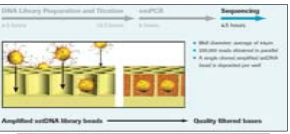
- 19 -

Genome Sequenzierung

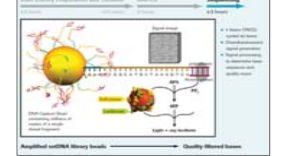


- 20 -

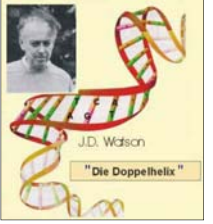
3. Schritt



4. Schritt



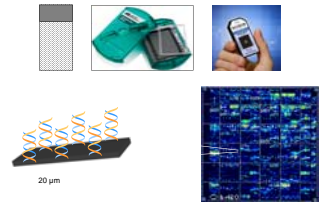
- 21 -



- 2 Monate für die Analyse des Watson Genoms
 - Derzeit läuft das 1000 x humane Gennomprojekt

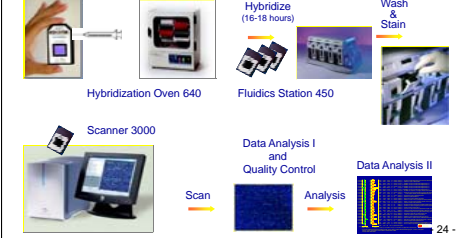
- 22 -

Was ist ein Gen-Chip?



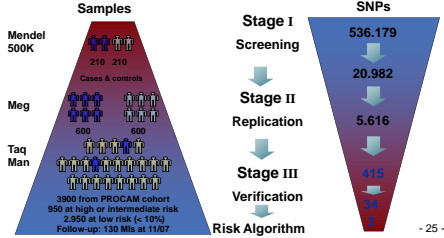
- 23 -

GeneChip® Process Flow



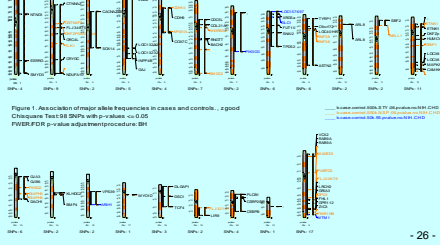
- 24 -

Multistage Design of the Whole Genome Association Study and SNP-Reduction



- 25 -

Significant SNPs from the combined 50K XBA and 500K Mendel NSP Case Control Set. From the 128 BH-corrected SNPs 30 failed to pass the SNP-Quality check. 98 are still remaining as high significant.



- 26 -

Indikation	Gen	Analyse
Hypercholesterinämie	Apo B, Apo E	Sondenspezifische-Echtzeit-PCR
Hämochromatose	HFE	Sequenzierung
M. Wilson	ATP7B	Sequenzierung
Familiäre adenomatöse Polyposis	APC	Sequenzierung
p53-assoziierte-Tumor-erkrankungen	p53	Sequenzierung
Mamma-Ca	c-erbB2	Quantitative Echtzeit-PCR
MEN 2A, MEN 2B, FMTC	RET	Sequenzierung
Pharmakogenetik	NAT2	Sondenspezifische-Echtzeit-PCR
Pharmakogenetik	TPMT	Sequenzierung
HIV-Infektion	HIV-RNA	Genotypisierung

- 27 -

Einverständniserklärung **Zwingend notwendig seit in Kraft treten des** **Genagnostikgesetzes am 01.02.2010**

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

auf Grund der bei Ihnen anstehenden Untersuchungen befinden Sie sich nach Einschätzung Ihrer behandelnden Ärzte möglich, dass eine Veränderung des Erbgutes besteht, die entweder bereits zu Krankheitserregern geführt hat oder möglicherweise in Zukunft eine Erkrankung begünstigen kann. Einige Veränderungen des Erbgutes können sich ebenfalls in der Entwicklung einer Krankheit manifestieren, die für Sie von erheblicher Bedeutung sein könnten. Diese Veränderungen des Erbgutes können auch die Entstehung einer Krankheit begünstigen, die für Sie von erheblicher Bedeutung sein könnten. Diese Veränderungen des Erbgutes können auch die Entstehung einer Krankheit begünstigen, die für Sie von erheblicher Bedeutung sein könnten.

Ich bestätige hiermit, dass ich die oben genannten Informationen gelesen und verstanden habe und dass ich die Durchführung der Untersuchung sowie der Aufbereitung des Untersuchungsmaterials für eine Übertragung der Ergebnisse und Weitergabe der Untersuchungsergebnisse an Dritte einverstanden bin. Ich bestätige hiermit, dass ich die oben genannten Informationen gelesen und verstanden habe und dass ich die Durchführung der Untersuchung sowie der Aufbereitung des Untersuchungsmaterials für eine Übertragung der Ergebnisse und Weitergabe der Untersuchungsergebnisse an Dritte einverstanden bin.

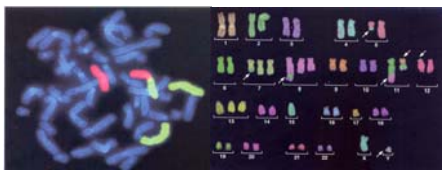
Ort, Datum: _____

Einverständnis der Patientin/der Patient: _____

einverstanden ist

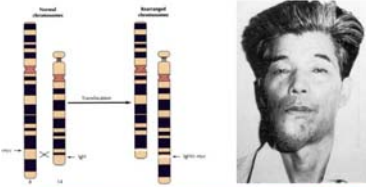
- 28 -

FISH (Fluoreszenz-in situ Hybridisierung)



- 29 -

Chromosomale Translokation (Burkitt-Lymphom)



Transkriptionsfaktor Myc gerät unter die Kontrolle des Igh-Promotors unkontrollierte Überexpression

- 30 -

Chimäre Gene

Tumor	Ursprungschromosom	Chimäres Gen	Art des chimeren Produkts
CMV	(15;22)(q24;q13)	BCR-ABL	Transkriptionsfaktor
Knochenmark	(12;22)(p13;q13)	EWS-FLI1	Transkriptionsfaktor
Knochenmark (Mantle)	(12;22)(q13;q13)	EWS-ERG	Transkriptionsfaktor
Blasenepitheliale Tumore	(12;22)(q13;q13)	EWS-WT1	Transkriptionsfaktor
Epithelkarzinom	(12;16)(q13;p11)	FUS-CHOP	Transkriptionsfaktor
AML	(16;21)(p13;q21)	FUS-ERG	Transkriptionsfaktor
Epitheliale Thyrokarzinom	(12;17)(p13;q11)	MYB1-TRAF3 (TMR-Gen)gen	Transkriptionsfaktor
Ph-9-Zell-ALL	(11;19)(q23;p13.3)	E2A-PBX1	Transkriptionsfaktor
ALL	(10;11)(q23;q20)	MLL-APK3	Transkriptionsfaktor
ALL	(14;11)(q21;q23)	MLL-AP4	Transkriptionsfaktor
ALL	(10;11)(q23;q20)	MLL-AP9	Transkriptionsfaktor
ALL	(10;11)(q23;q20)	MLL-ENL	Transkriptionsfaktor
Akute promyelozytäre Leukämie	(15;17)(q22;q12)	PML-RARA	Transkriptionsfaktor + Retinoidrezeptor
Alveolares Rhabdomyosarkom	(12;13)(q15;q14)	PAX3-PFOX	Transkriptionsfaktor

- 31 -

Gene, die für mehr als eine Krankheit verantwortlich sind

Gen	Position	Krankheiten	Synonym
PAX3	2q35	Waldenborg-Syndrom Typ 1 Alveoläres Rhabdomyosarkom	WS1 RVL2
CFTR	7p31.2	Zystische Fibrose Bedingungsloses Fehlen des Selenbindens	CF
RET	10q11.2	Multipler endokriner Neoplasie Typ 2A Multiple endokrine Neoplasie Typ 2B	MEN2A MEN2B
MSH2	2p16.3	Hereditäre Nicht-Polypose Kolorektale Karzinome Neurofibromatose	HNPCC NF1
PCSK9	17q11.2	Chanclos-Marie-Tooth-Hoffmann-Krankheit	CMT1A
HNF1B	17q11.2	Tourette-Syndrom	HNF1B
SNCA	17q21.31-q11.31	Paraneuronales Syndrom Hyperalgesische paraneuronale Paralyse	PAC HMP
PRNP	20q13.2	Arztanamn. rezessive Myotonia congenita	GM1
SNCA	20q13.2	Idiopathische Familiäre Braunkörper Erbliche Alzheimer-Charakteristika	FR AD
SNCA	20q13.2	Erbliche Alzheimer-Charakteristika	AD
AR	Xq28	McAuer-Albinismus Tourette-Syndrom Sporadische Muskeldystrophie	PKC TM SMA

- 32 -