

## Klinische Chemie & Laboratoriumsdiagnostik

### Vorlesung: Molekulare Diagnostik



**Dr. rer. nat. Hartmut Schmidt**

Centrum für Laboratoriumsmedizin  
 – Zentrallaboratorium –  
 Universitätsklinikum Münster  
 Albert-Schweitzer-Campus 1  
 D-48149 Münster  
 Tel.: 0251 83-47226  
 Fax: 0251 83-47225  
 zlab-lehre.uni-muenster.de  
 Hartmut.Schmidt-ZL@ukmuenster.de



- 1 -

## "Omics"-Ansatz: die molekulare Biologie der Zelle

- 2 -

## Aufklärung der DNA-Doppelhelix Struktur 1953



**Nobelpreis 1962**


Die Röntgenbeugungsdiagramme der DNA durch Franklin und Wilkins und deren mathematische Analyse trugen wesentlich zur Aufklärung der DNA-Doppelhelixstruktur bei und bestätigten das theoretische Modell von James Watson und Francis Crick.



- 3 -

## Der humane genetische Code ist endlich entschlüsselt!

2000  
Die postgenomische Zeit



**Venter/Collins**  
Celera Diagnostics

Über 99,9% der 3,2 Milliarden Bp sind nun bekannt!

- 4 -

## Probenmaterial für die Molekulardiagnostik

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

- 5 -

## DNA-Isolation magnetic-beads Verfahren

- 6 -

## Das PCR-Labor

- 7 -

## Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

- 8 -

## Agarose-Gelelektrophorese

- 9 -

## Realtime-PCR mit SYBR Green

- 10 -

## LightCycler: Mutationsanalyse

- 11 -

## Quantifizierung von Bakterien oder Viren mittels Realtime-PCR

- 12 -

## PCR und Realtime-PCR Eine Vielzahl von Anwendungen

**Infektionsdiagnostik (Viren, Pilze, Bakterien)**

- Virusdiagnostik: HIV, HBV, HCV, BKV, EBV, CMV, HSV1+2, VZV
- Subtypen-Bestimmung – z.B. Influenza A/B „Schweinegrippe“
- In Kultur langsam wachsende Erreger (z.B. Chlamydien)

**Genetischer Fingerabdruck**

- 10-150 Bp lange, polymorphe, repetitive, tandemartige DNA-Sequenzen
- Variable number of tandem repeats (VTPR), 10-15 Loci werden untersucht
- Short tandem repeats (STR), Unterscheidung naher Verwandte
- Lebensmittelüberwachung (z.B. Nachweis von Pferdefleisch)
- Vater- oder Mutterschaft

- 13 -

## PCR – Vielzahl von Anwendungen

M= Mutter  
K= Kind  
F = Vater

- 14 -

## PCR und Realtime-PCR Eine Vielzahl von Anwendungen

**Genetische Störungen des Menschen**

- Humangenetik (Erbkrankheiten)
- Tumorgenetik
- Immungenetik, HLA-Typisierung
- Prädispositionsdiagnostik (Thrombose-, KHK-Risiko)
- Pharmakogenetik

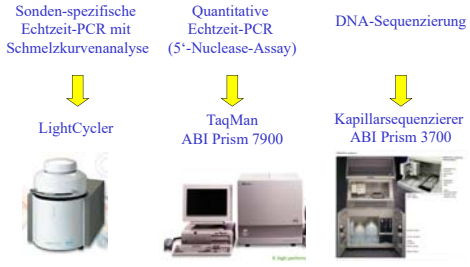
- 15 -

## Absolute Quantifizierung – mittels Realtime-PCR

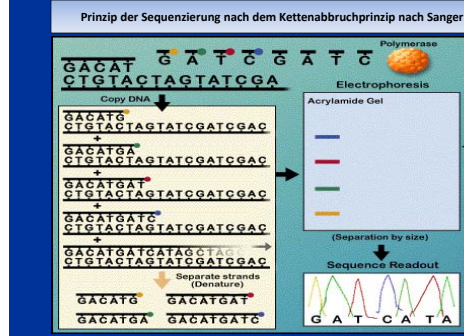
Ermittlung der chromosomalen Genkopiezahl am Beispiel von CYP2D6 in der Pharmakogenetik

- 16 -

## Geräte und Methoden in der Molekularen Diagnostik



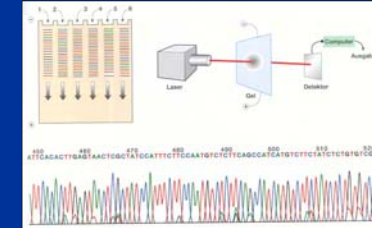
- 17 -



18

## DNA-Sequenzierung

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



- 19 -

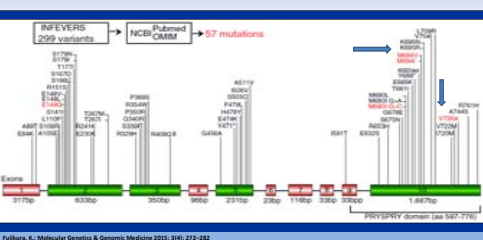
## Familiäres Mittelmeerfieber und andere vererbliche periodische Fiebersyndrome

Molekulargenetische Differenzialdiagnose seit März 2016 im Zentrallabor etabliert  
 Die Symptome sind:  
 Hohes periodisch auftretendes Fieber, Erythema, u.a. auch Bauch- und/oder Thoraxschmerzen  
 Die Therapie ist abhängig von dem betroffenen Gen bzw. der Erkrankung  
 Spätfolgen: z.B. Amyloidose

FMF: Familiäres Mittelmeerfieber  
 TRAPS: TRAF3-Defizienz-assoziiertes Syndrom  
 HIDS: HIDS-assoziiertes Syndrom  
 MWS/FCS: Muckle-Wells-Syndrom  
 HIDS: HIDS-assoziiertes Syndrom

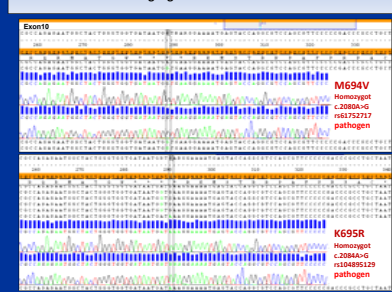
- 20 -

## Familiäres Mittelmeerfieber, genetische Varianten (SNPs) und Mutationen im MEFV-Gen



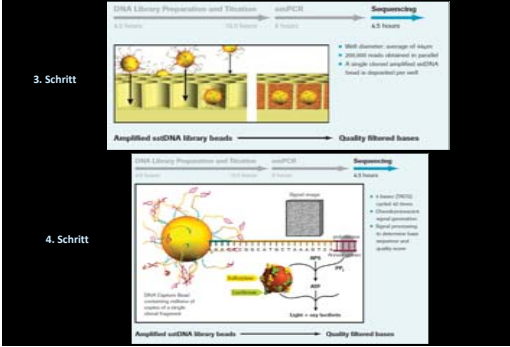
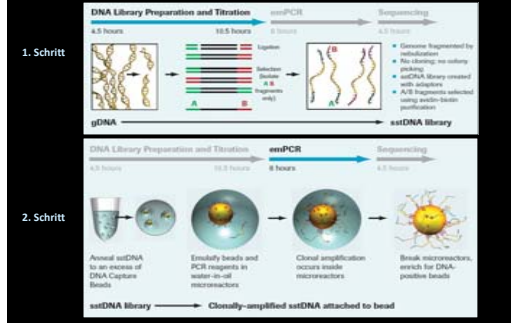
- 21 -

## Mutationsnachweis im MEFV-Gen mittels Sanger Sequenzierung



- 22 -

## Genomsequenzierung



## Next, Next Generation Sequencing, Stand Oktober 2014

Key applications	Small genome analysis and rapid gene sequencing	Whole genome, exome and targeted re-sequencing	Whole genome, exome and targeted re-sequencing	Whole genome, exome and targeted re-sequencing	Whole genome, exome and targeted re-sequencing
Read length	50-100 bp	100-150 bp	100-150 bp	100-150 bp	100-150 bp
Read depth	~100x	~30x	~30x	~30x	~30x
Run time	~1-2 hours	~1-2 days	~1-2 days	~1-2 days	~1-2 days
Cost per base	~\$0.10	~\$0.10	~\$0.10	~\$0.10	~\$0.10
Genome	Genpanel	Exome	Exome + Genom	Genom + „Populationsgenom“	

## NGS in der Routine Diagnostik im CfL seit März 2015 möglich

Beschluss vom 11. März 2016:  
 Im Einheitlichen Bewertungsmaßstab (EBM) der Gebührenordnung wird zum 01. Juli 2016 die Abrechnungsmöglichkeit von NGS ermöglicht

Flow Cell  
MiSeq

Bridged PCR + NGS

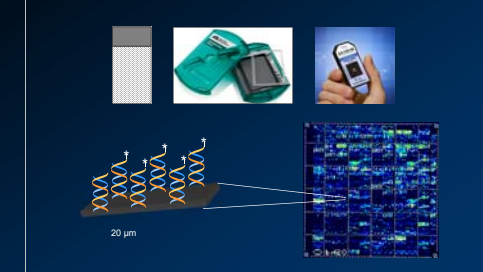
## Anwendungen der NGS-Methodik in der molekularen Routinediagnostik

- „Long Range PCR“ bis ca. 80 KB  
 Allelspezifische HLA Typisierung mehrerer Patienten in einer Analyse (max. 384 Patienten)
  - Analyse von Virus- und Bakteriengenomen:  
 Hygiene Nachweis von resistenten Krankenhauskeimen aus vielen verschiedenen Proben  
 HIV-Genotypisierung „Deep Sequencing“ frühe Erkennung neuer resistenter Stämme
  - Paneldiagnostik  
 Neurogenetik: 12 Patienten x 200 Gene pro Run (MiSeq)  
 Humangenetik: 40 Gene des hereditären Mammakarzinoms  
 Molekularpathologie: „Cancer Panel“ therapierelevante Gene
  - Exomsequenzierung  
 Humangenetik: Mutationsanalyse bei unbekannter Verdachtsdiagnose
  - Genomsequenzierung  
 Humangenetik: Mutationsanalyse bei unbekannter Verdachtsdiagnose
- Exom: ca. 1% des Genoms – umfasst alle kodierende Genabschnitte  
 Deepsequencing: Nachweis von Mutationen und genetischen Varianten in wenigen Zellen oder Zellpopulationen

## Auswertung und Befunderstellung mit Hilfe von:

- Datenbanken (NCBI, HGMD, Infevers)
  - Vorhersageprogrammen (Mutation Taster, PolyPhen 2)
  - Einschlägiger Fachliteratur
- ### Klassifikation der nachgewiesenen Sequenzvarianten
- nach RICHARDS et al (2013) ACMG Standards and Guidelines, Interpretation of sequence variants
- Nicht pathogen oder keine klinische Signifikanz**  
 SNPs ohne Effekt auf die Funktionalität des Proteins
  - Wahrscheinlich nicht pathogen oder von geringer klinischer Signifikanz**  
 SNP oder häufige Mutation mit Aminosäureaustausch mit fraglicher Auswirkung auf die Funktionalität
  - Mutationen unklarer klinischer Signifikanz**  
 Mutationen mit geringer Auswirkung auf die Funktionalität, häufig „Low Penetrance Mutationen“
  - Mutationsnachweis mit hoher klinischer Signifikanz**  
 wahrscheinlich für die Erkrankung ursächliche Mutation/en mit Veränderung der Funktionalität des Proteins
  - Mutationsnachweis mit klarer klinischer Signifikanz**  
 ursächliche Mutation/en, mit starker Auswirkung auf die Funktion oder Funktionsverlust des Proteins
- Wildtyp: negativ (Kategorie 1 wird in der Regel zum Wildtyp gerechnet)
  - Fraglich: Kategorie 2 und 3
  - Positiv: Kategorie 4 und 5
- Single Nucleotide Polymorphism (SNP): MAF > 1%, Mutation: MAF < 1%

## Was ist ein Gen-Chip?



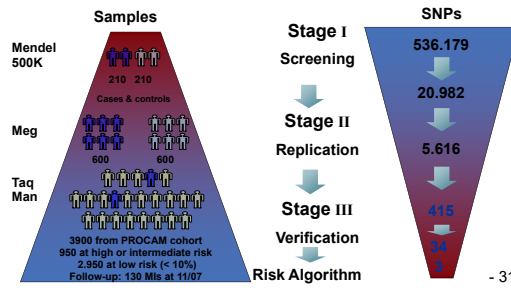
- 29 -

## GeneChip® Process Flow



- 30 -

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



- 31 -

Indikation	Gen	Analyse
Hypercholesterinämie	ApoB100, ApoE	Sonden spezifische Echtzeit PCR
Hypercholesterinämie	LDLR, PCSK9	Sequenzierung
Hämochromatose	HFE	Sequenzierung
Morbus Wilson	ATP7B	Sequenzierung
Familiäre adenomatöse Polyposis	APC	Sequenzierung
Solide Tumore	z.B. p53, BRAF, KRAS	Sequenzierung / NGS
Familiäres Mamma Carcinom	BRCA1, BRCA2	Sequenzierung / NGS
MEN2A, MEN2B, familiäres Schilddrüsenkarzinom	RET	Sequenzierung
Pharmakogenetik	Cytochrome (P450) NAT2, TPMT	Sonden spezifische Echtzeit PCR / Sequenzierung
HIV-Infektion	HIV-RNA	Sequenzierung / NGS

- 32 -