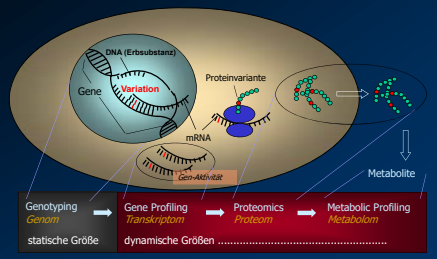
Klinische Chemie & Laboratoriumsdiagnostik
Vorlesung: Molekulare Diagnostik

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

Wintersemester 2019/20

"Omics"-Ansatz: die molekulare Biologie der Zelle



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 .

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!

Probenmaterial für die Molekulardiagnostik

Geeignet
- Vollblut
- Plasma
- Serum
- *buffy* coat
- Knochenmark
- Punktaten
- Lymphozyten
- Zellkulturen
- Geweben
- forensische Proben
- Cerebrospinalflüssigkeit

Bedingt geeignet
Getrocknetes Material (Auflösung in PBS)

Nicht geeignet
Heparin-Blut

DNA-Isolation magnetic-beads Verfahren

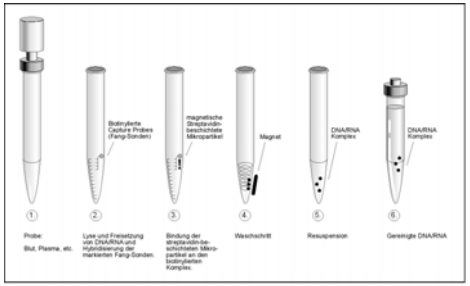


Abb. 1.3b: Beispiel für eine automatisierte Probenaufbereitung

Das PCR-Labor

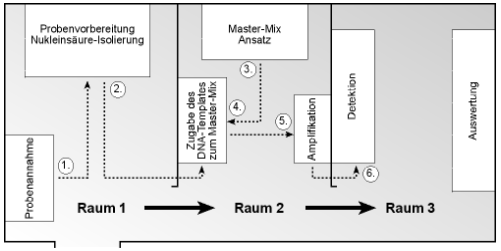
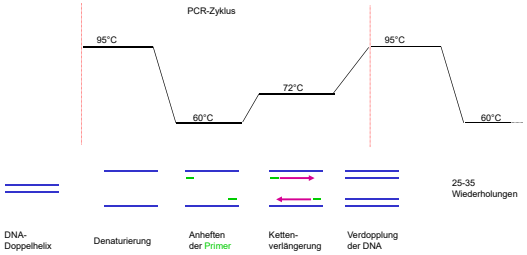
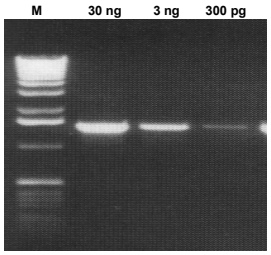


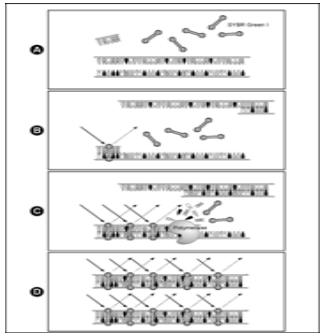
Abb. 1.2: PCR-Labor

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)



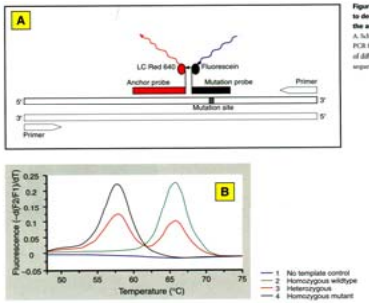
Agarose-Gelelektrophorese



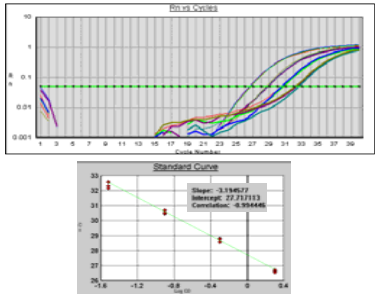


Realtime-PCR mit SYBR Green

LightCycler: Mutationsanalyse



Quantifizierung von Bakterien oder Viren mittels Realtime-PCR

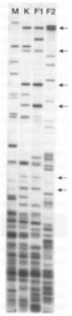


PCR und Realtime-PCR
Eine Vielzahl von Anwendungen

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

PCR – Vielzahl von Anwendungen



M= Mutter

K= Kind

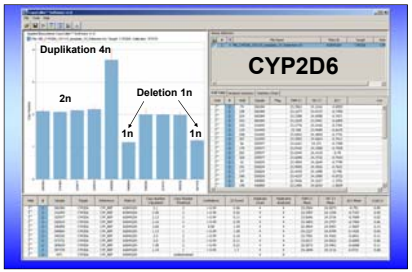
F = Vater

PCR und Realtime-PCR
Eine Vielzahl von Anwendungen

Genetische Störungen des Menschen
- Humangenetik (Erbkrankheiten)
- Tumorgenetik
- Immungenetik, HLA-Typisierung
- Prädispostionsdiagnostik (Thrombose-, KHK-Risiko)
- Pharmakogenetik

Absolute Quantifizierung – mittels Realtime-PCR

Ermittung der chromosomalen Genkopienzahl am Beispiel von CYP2D6 in der Pharmakogenetik



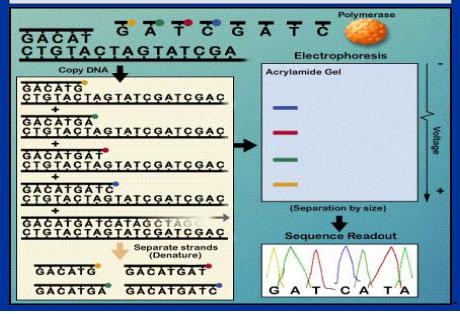
Geräte und Methoden in der Molekularen Diagnostik

Sonden-spezifische Echtzeit-PCR mit Schmelzkurvenanalyse → LightCycler

Quantitative Echtzeit-PCR (5'-Nuclease-Assay) → TaqMan ABI Prism 7900

DNA-Sequenzierung → Kapillarsequenzierer ABI Prism 3700

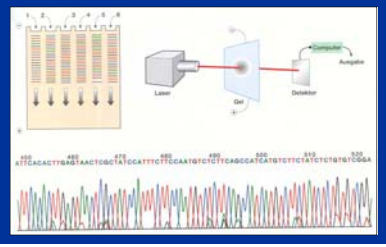
Prinzip der Sequenzierung nach dem Kettenabbruchprinzip nach Sanger



DNA-Sequenzierung

Kapillarelektrophorese + Bioinformatik: Heute Goldstandard

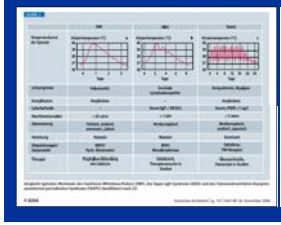
- Hohe Zuverlässigkeit
- Lange Sequenzabfolgen lesbar
- Automatisierbar



Familiäres Mittelmeerfieber und andere vererbliche periodische Fiebersyndrome

Molekulargenetische Differenzialdiagnose seit März 2016 im Zentrallabor etabliert

-Die Symptome sind:
Hohes periodisch auftretendes Fieber, Erytheme, u.a. auch Bauch- und/oder Thoraxschmerzen
-Die Therapie ist häufig abhängig von dem betroffenen Gen bzw. der Erkrankung
-Spätfolgen: z.B. Amyloidose

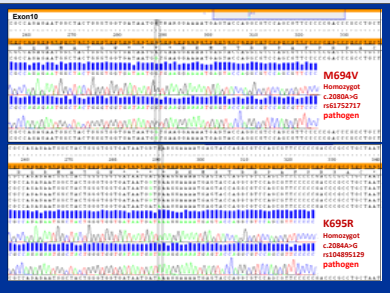


Familiäres Mittelmeerfieber, genetische Varianten (SNPs) und Mutationen im MEFV-Gen

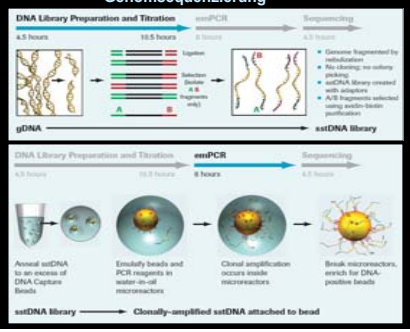
Fujikura, K.: Molecular Genetics & Genomic Medicine 2015; 3(4): 272–282

Mutationsnachweis im MEFV-Gen mittels Sanger Sequenzierung

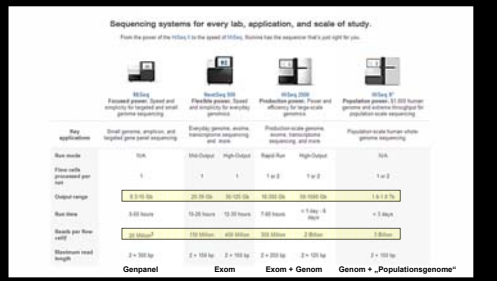
Erbgang: autosomal rezessiv



Genomsequenzierung



Next, Next Generation Sequencing, Stand Oktober 2014

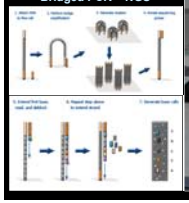


NGS in der Routine Diagnostik im CfL seit März 2015 möglich

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

Flow Cell MiSeq

Bridged PCR + NGS



Anwendungen der NGS-Methodik in der molekularen Routinediagnostik

1. „Long Range PCR" bis ca. 80 KB
   Allelspezifische HLA Typisierung mehrerer Patienten in einer Analyse (max. 384 Patienten)
2. Analyse von Virus- und Bakteriengenomen:
   Hygiene Nachweis von resistenten Krankenhauskeimen aus vielen verschiedenen Proben
   HIV-Genotypisierung „Deep Sequencing" frühe Erkennung neuer resistenter Stämme
3. Paneldiagnostik
   Neurogenetik: 12 Patienten x 200 Gene pro Run (MiSeq)
   Humangenetik: 40 Gene des hereditären Mammakarzinoms
   Molekularpathologie: „Cancer Panel" therapierelevante Gene
4. Exomsequenzierung
   Humangenetik: Mutationsanalyse bei unbekannter Verdachtsdiagnose
5. 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

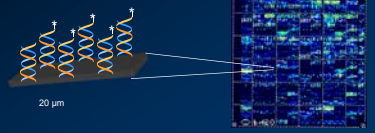
nach RICHARDS et al (2015) ACMG Standards and Guidelines, Interpretation of sequence variants

1. **Nicht pathogen oder keine klinische Signifikanz**
   SNPs ohne Effekt auf die Funktionalität des Proteins
2. **Wahrscheinlich nicht pathogen oder von geringer klinischer Signifikanz**
   SNP oder häufige Mutation mit Aminosäureaustausch mit fraglicher Auswirkung auf die Funktionalität
3. **Mutationen unklarer klinischer Signifikanz**
   Mutationen mit geringer Auswirkung auf die Funktionalität , häufig „Low Penetrance Mutationen"
4. **Mutationsnachweis mit hoher klinischer Signifikanz**
   wahrscheinlich für die Erkrankung ursächliche Mutation/en mit Veränderung der Funktionalität des Proteins
5. **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?



GeneChip® Process Flow

Hybridization Oven 640

Hybridize (16-18 hours)

Fluidics Station 450

Wash & Stain

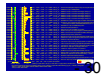
Scanner 3000

Scan

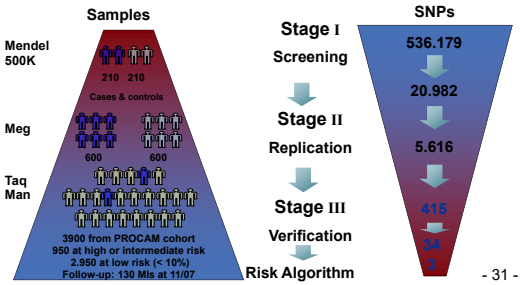
Analysis

Data Analysis I and Quality Control

Data Analysis II



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



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