

# Klinische Chemie & Hämatologie

## Vorlesung: Molekulare Diagnostik



Prof. Dr. med Paul Cullen

Gemeinschaftspraxis

Dr. Löer, Dr. Treder und Kollegen

Hafenweg 11

D-48155 Münster

Tel.: 0251 60916-0

Fax: 0251 60916-164

[cullen@uni-muenster.de](mailto:cullen@uni-muenster.de)

[zlab-lehre.uni-muenster.de](http://zlab-lehre.uni-muenster.de)

# Grundlagen

- Die Zelle
- Die DNA: Struktur und Organisation
- Bedeutung des Humangenomprojekts
- Erblehre

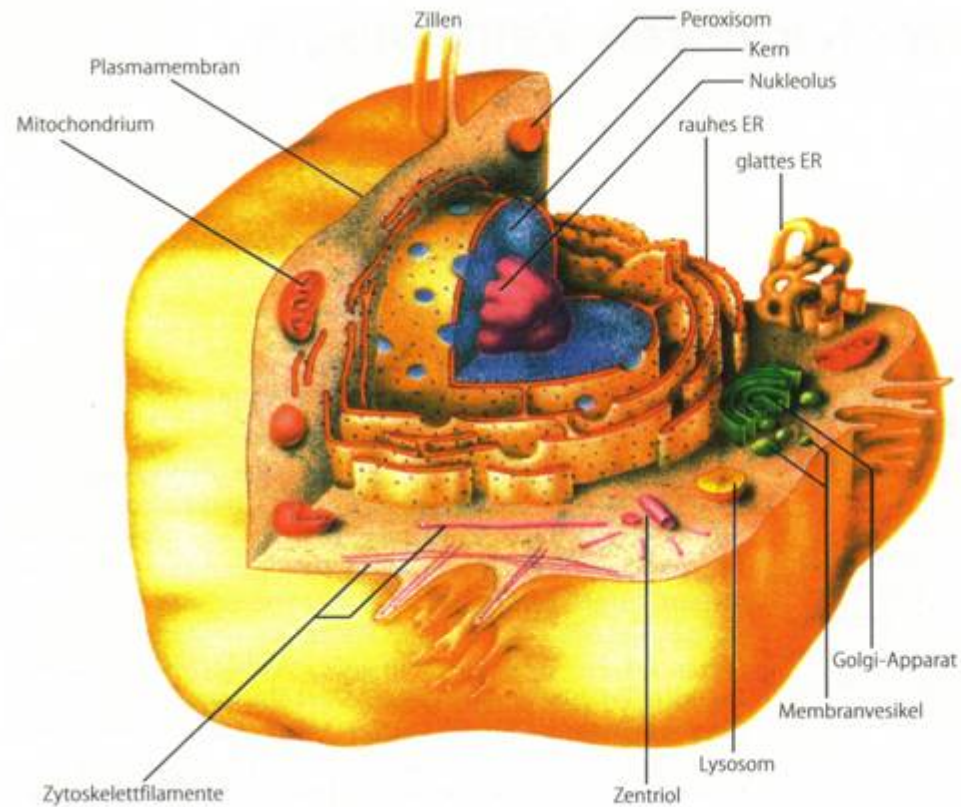
# Grundtechniken

- Isolierung von Nukleinsäuren
- Die Polymerasekettenreaktion (PCR)
- Gensequenzierung
- Array-basierte Methoden
- Bedeutung der Prä- und Postanalytik
- Anwendungsbeispiele

# Grundlagen

- **Die Zelle**
- Die DNA: Struktur und Organisation
- Bedeutung des Humangenomprojekts
- Erblehre

# Aufbau der eukaryotischen Zelle

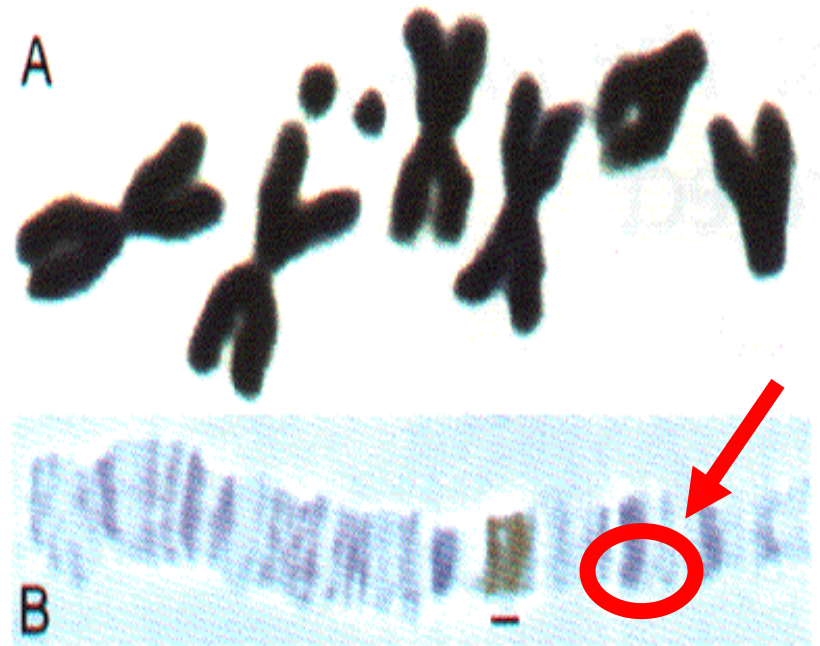
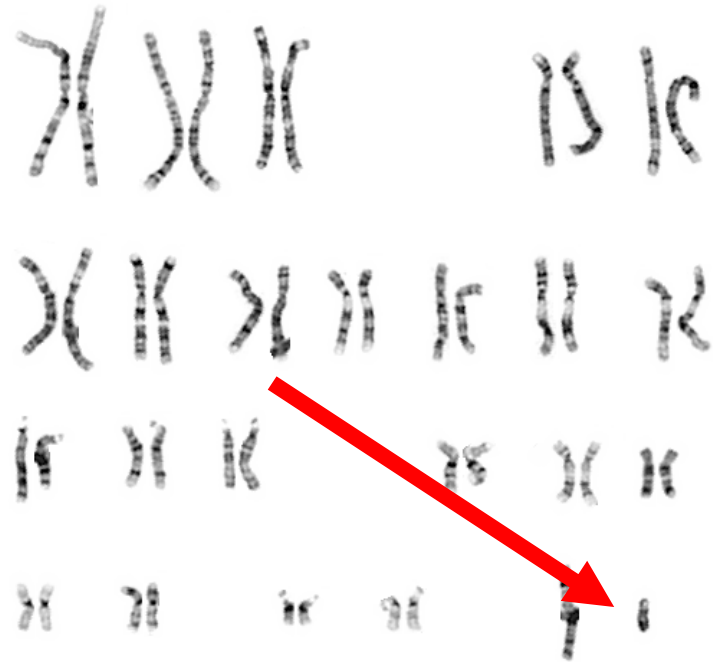


**Abb. 1.1.1.** Struktur tierischer Zellen, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 145

# Grundlagen

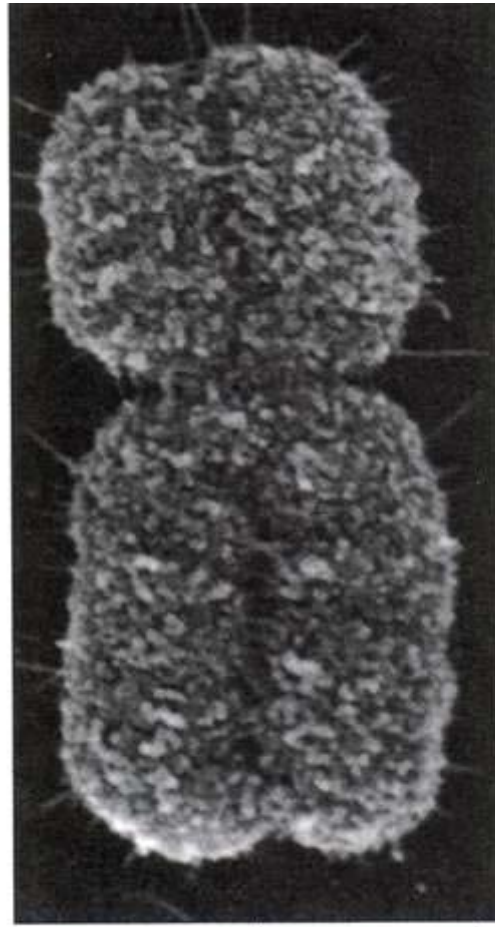
- Die Zelle
- **Die DNA: Struktur und Organisation**
- Bedeutung des Humangenomprojekts
- Erblehre

# Menschliches Genom = 46 Chromosomen (DNA)



Träger der Erbinformation

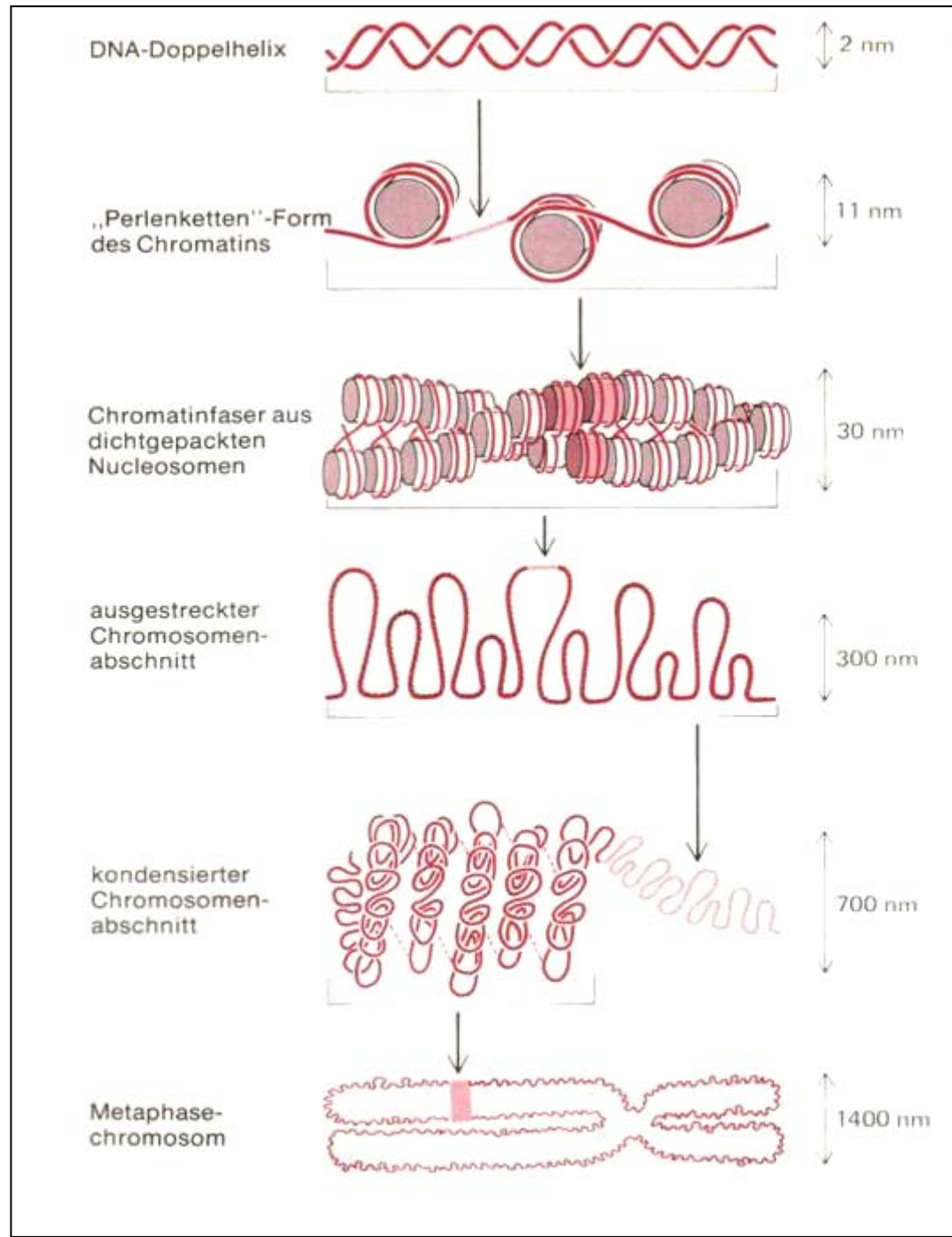
# Die Verpackung der DNA



(B)

1 μm

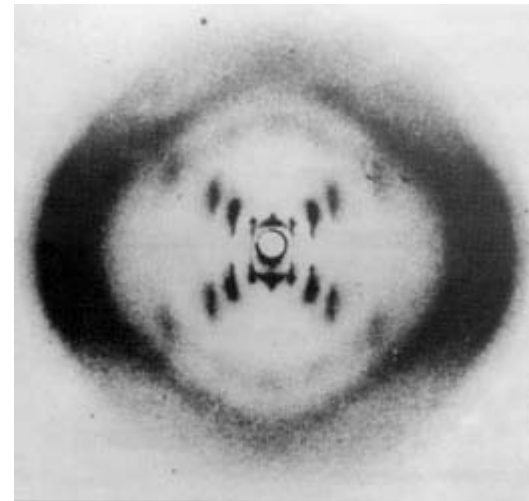
# Verpackung der DNA „coiled coil“



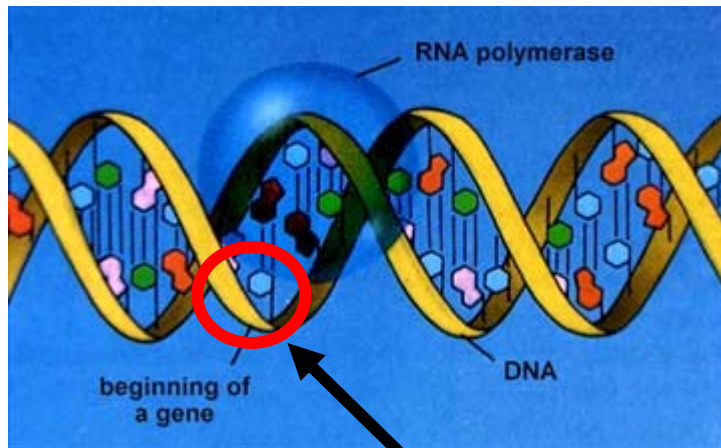
# DNA-Doppelhelix



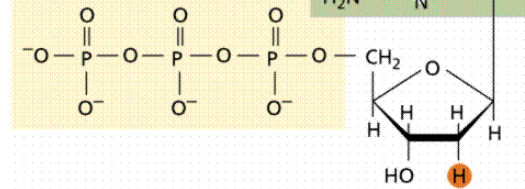
- Struktur 1953 durch Watson, Crick und Franklin aufgeklärt
- universell in (fast) allen Organismen



# Aufbau der DNA



Deoxy-GTP  
(deoxyguanosine  
triphosphate)

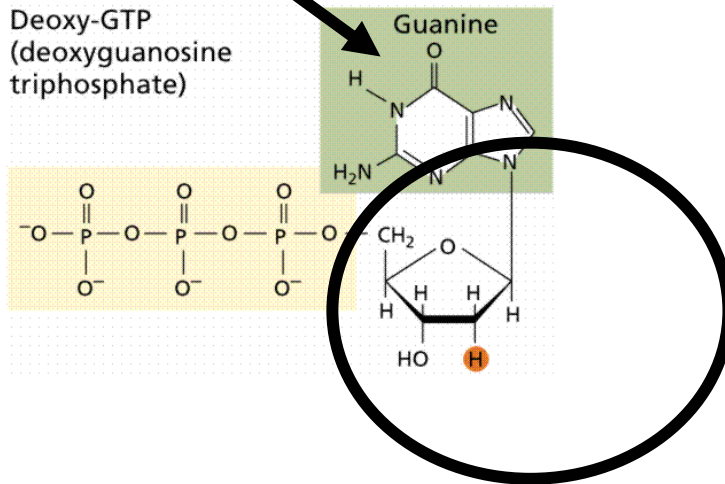


- DNA
  - zwei Trägerketten
  - Basenpaare
    - Schlüssel/Schloss
- Permutation:  $4^n$ 
  - bei 10 Basen = 1 Mio

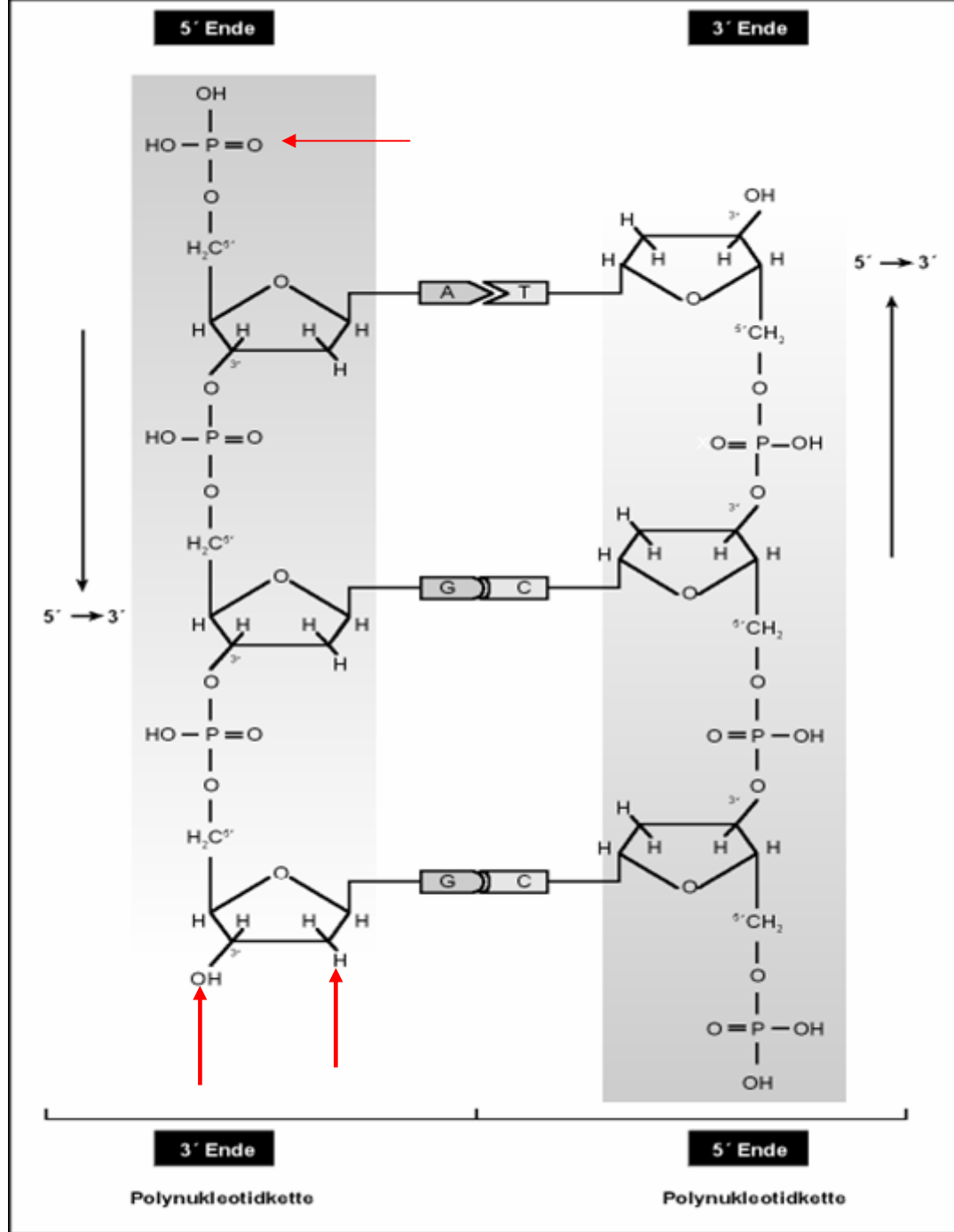
# 4 DNA-Bausteine ATCG



Deoxy-GTP  
(deoxyguanosine  
triphosphate)



- Bausteine: **Purine** und Pyrimidine
  - - **Adenin** – Thymin
  - - **Guanin** - Cytosin
    - Zucker
    - Phosphat
    - Base



# Die DNA

Watson-Crick  
 Basenpaarung: „Schlüssel  
 und Schloss“

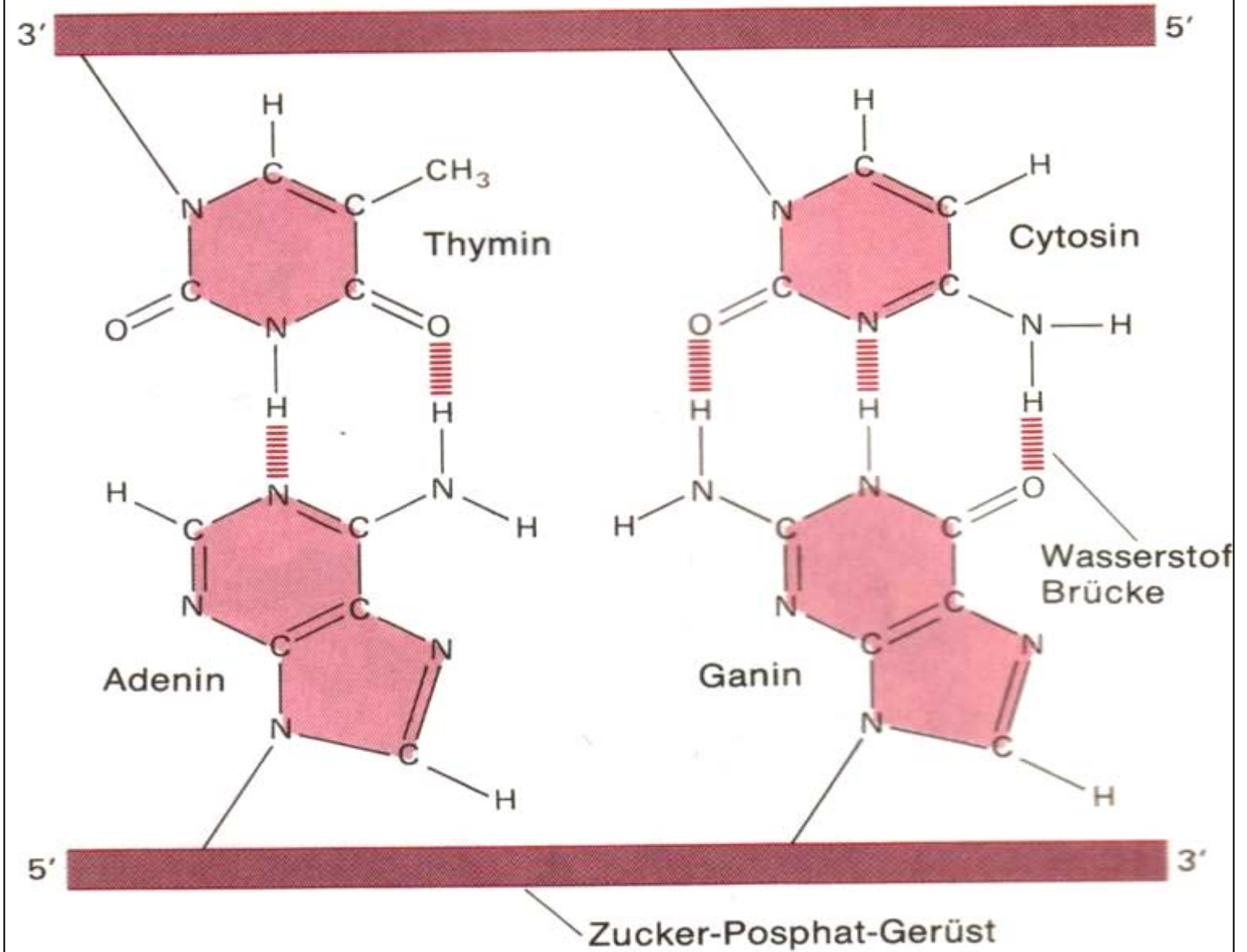
„It has not escaped our notice  
 that the specific pairing that we  
 have postulated immediately  
 suggests a possible copying  
 mechanism for the genetic  
 material.“

Watson J, Crick F *Nature* 171, 737–738  
 (1953)

Abb. 1.1a: DNA- Doppelstrang

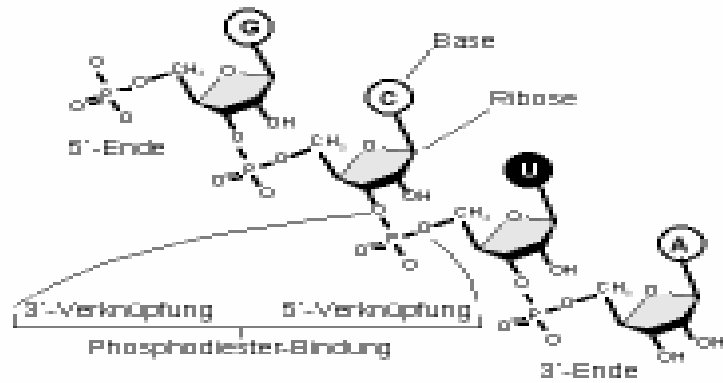
# VIER BASEN ALS BASENPAARE IN DNA

Die DNA

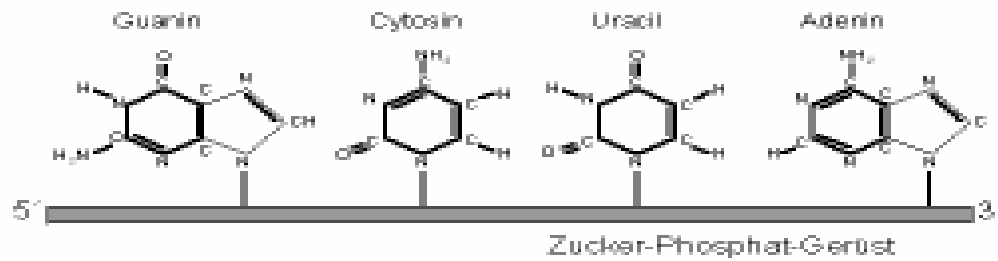


# RNA

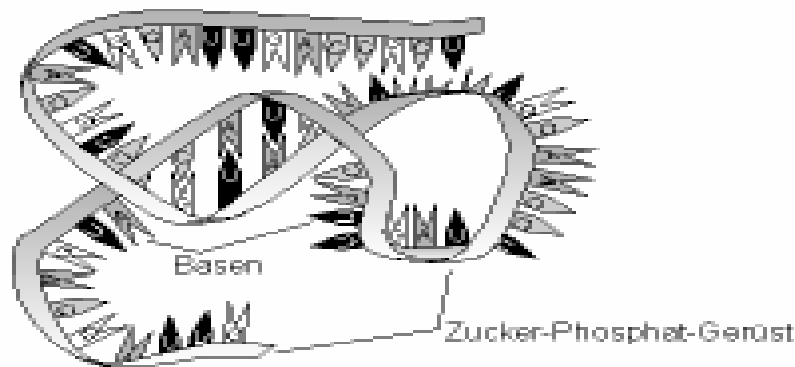
**A**



**B**

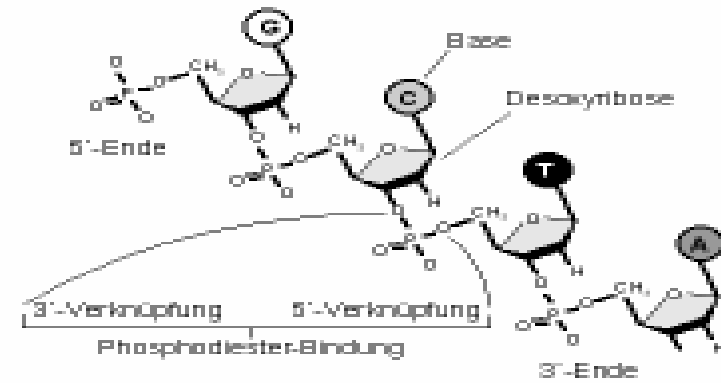


**C**

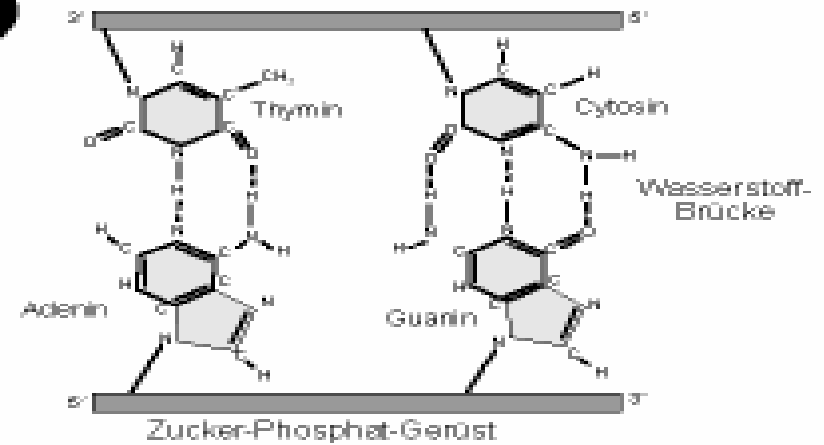


# DNA

**A**



**B**



**C**

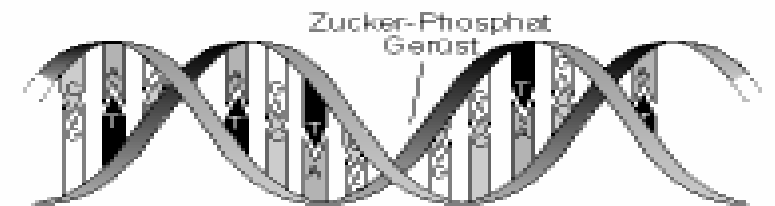
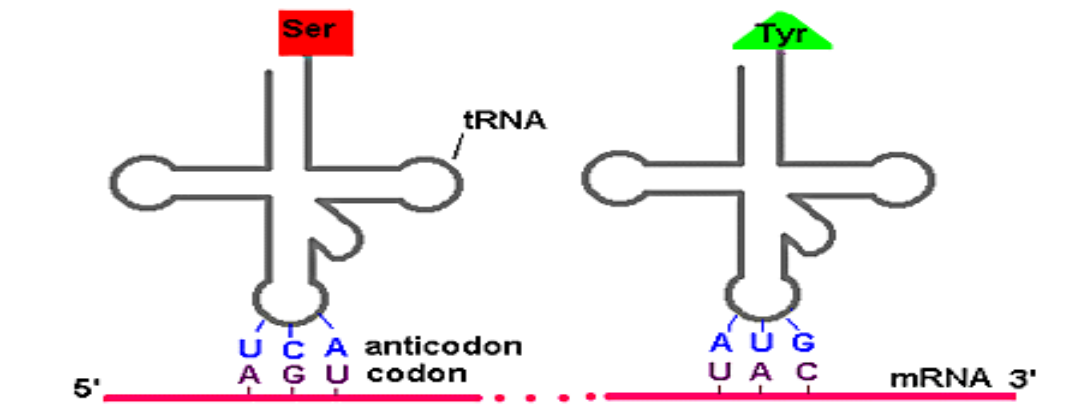


Abb. 2.1: RNA / DNA Vergleich



2nd base in codon

	<b>U</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>G</b>		
1st base in codon	<b>U</b>	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr <b>STOP</b> <b>STOP</b>	Cys Cys <b>STOP</b> Trp	3rd base in codon
	<b>C</b>	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	<b>U</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b>
	<b>A</b>	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	<b>U</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b>
	<b>G</b>	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	<b>U</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b>

## The Genetic Code

# Grundlagen

- Die Zelle
- Die DNA: Struktur und Organisation
- **Bedeutung des Humangenomprojekts**
- Erblehre

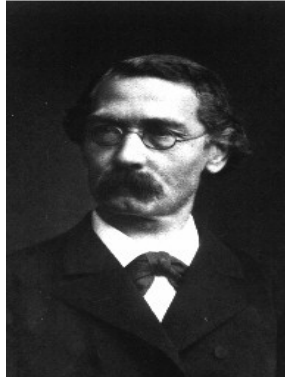
# Entwicklung der Labordiagnostik

**19. Jahrhundert**  
Klinische  
Diagnostik



**Virchow**

**Frühes 20. JH**  
Qualitative chemische  
Diagnostik



**Hoppe-Seyler**

**1920-1940**  
Quantitative chemische  
Diagnostik



**Fischer**

**1940-1970**  
Biochemische Diagnostik  
(Colorimetrie)



**Krebs**

**1970-1985**  
Immunchemische  
Diagnostik



**Milstein**

**1985-2000**  
DNA-Diagnostik



**Mullis**

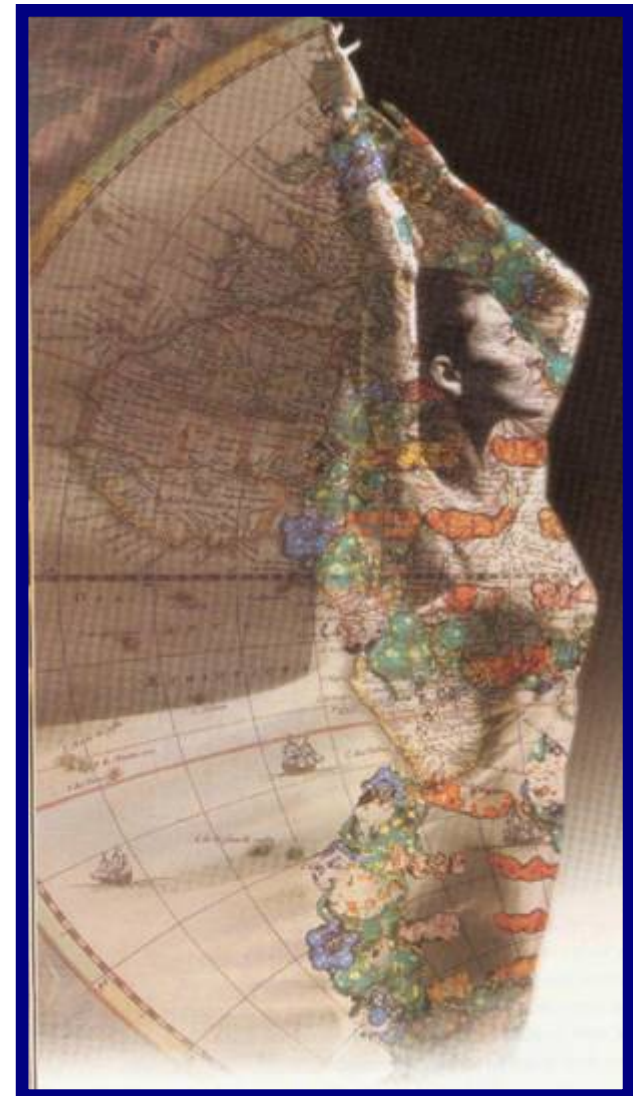
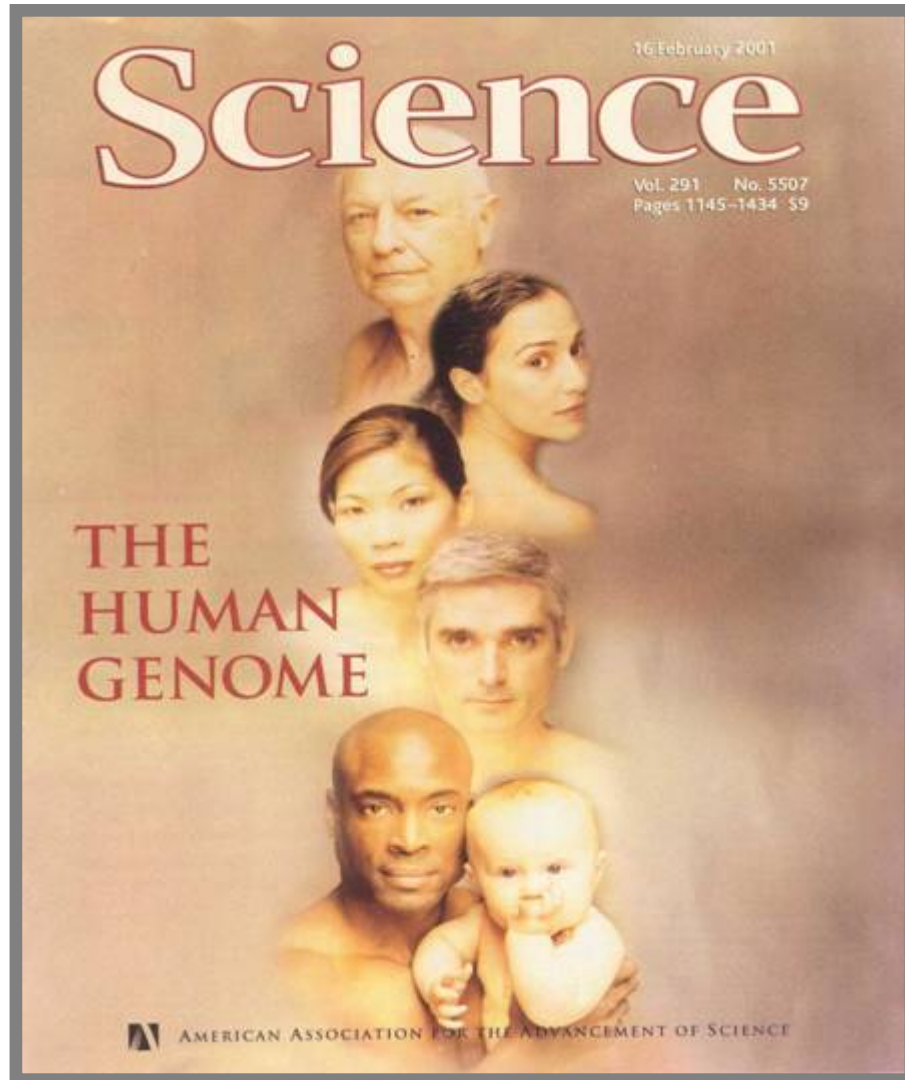
**2000**  
Die postgenomische Zeit



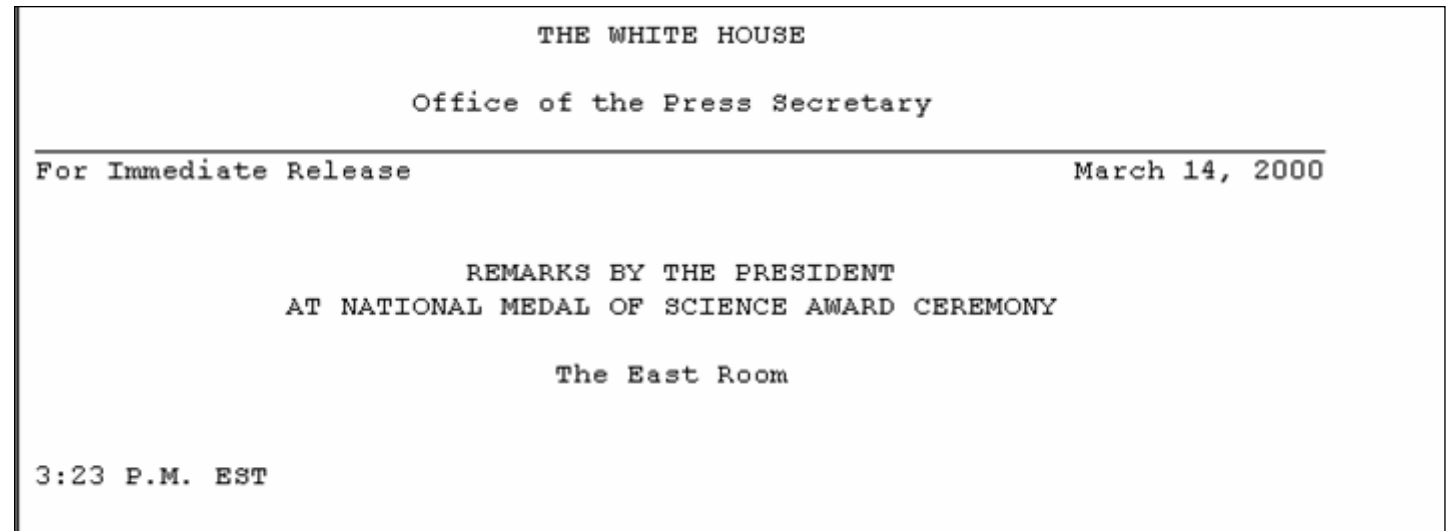
**Venter/Collins**

**ab 2000**  
Transcriptomics  
Proteomics  
(„Metabolomics“  
„Interactomics“  
usw.)  
Arraybasierte  
Diagnostik

# Das Humangenom-Projekt

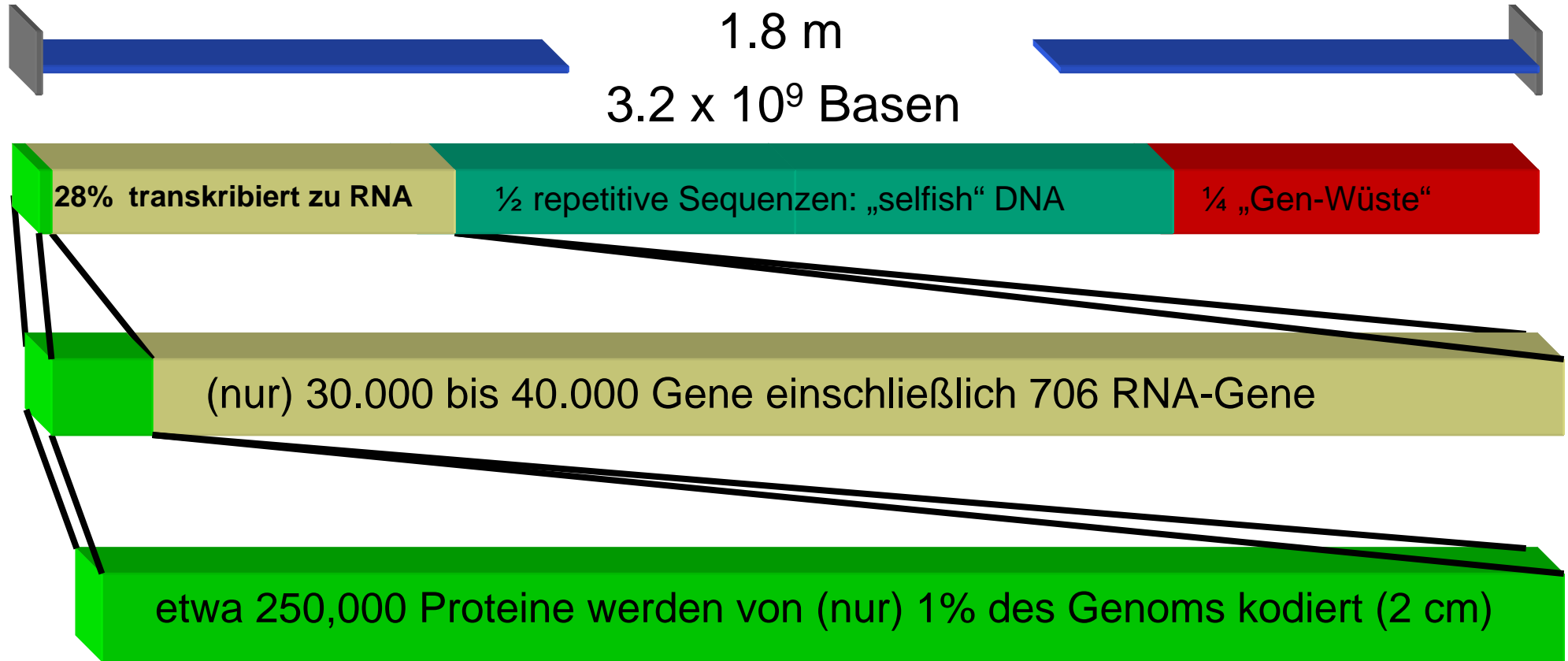


# Die Rohdaten aus dem Humangenomprojekt sind frei verfügbar



“Today, we [pledge] to lead a global effort to make the raw data from DNA sequencing available to scientists everywhere, to benefit people everywhere.”

# Hauptergebnisse des Humangenomprojekts



Das menschliche Genom: ein „Museum viraler Infektionen“

# „Paradise lost“: nicht so unterschiedlich wie wir es gerne hätten



*Caenorhabditis elegans*  
46% Homologie  
des Proteoms



*Drosophila melanogaster*  
61% Homologie  
des Proteoms



Gleichheit zum Schimpansen auf  
DNA-Ebene: etwa 99%

# Alle Menschen sind eng miteinander verwandt



Unterschied  
zwischen  
diesen beiden  
Personen < 1  
von 1.000  
Basen



Ca. 90% der genetischen Unterschiede zwischen Menschen werden durch ca. 60,000 Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) in kodierenden Regionen verursacht

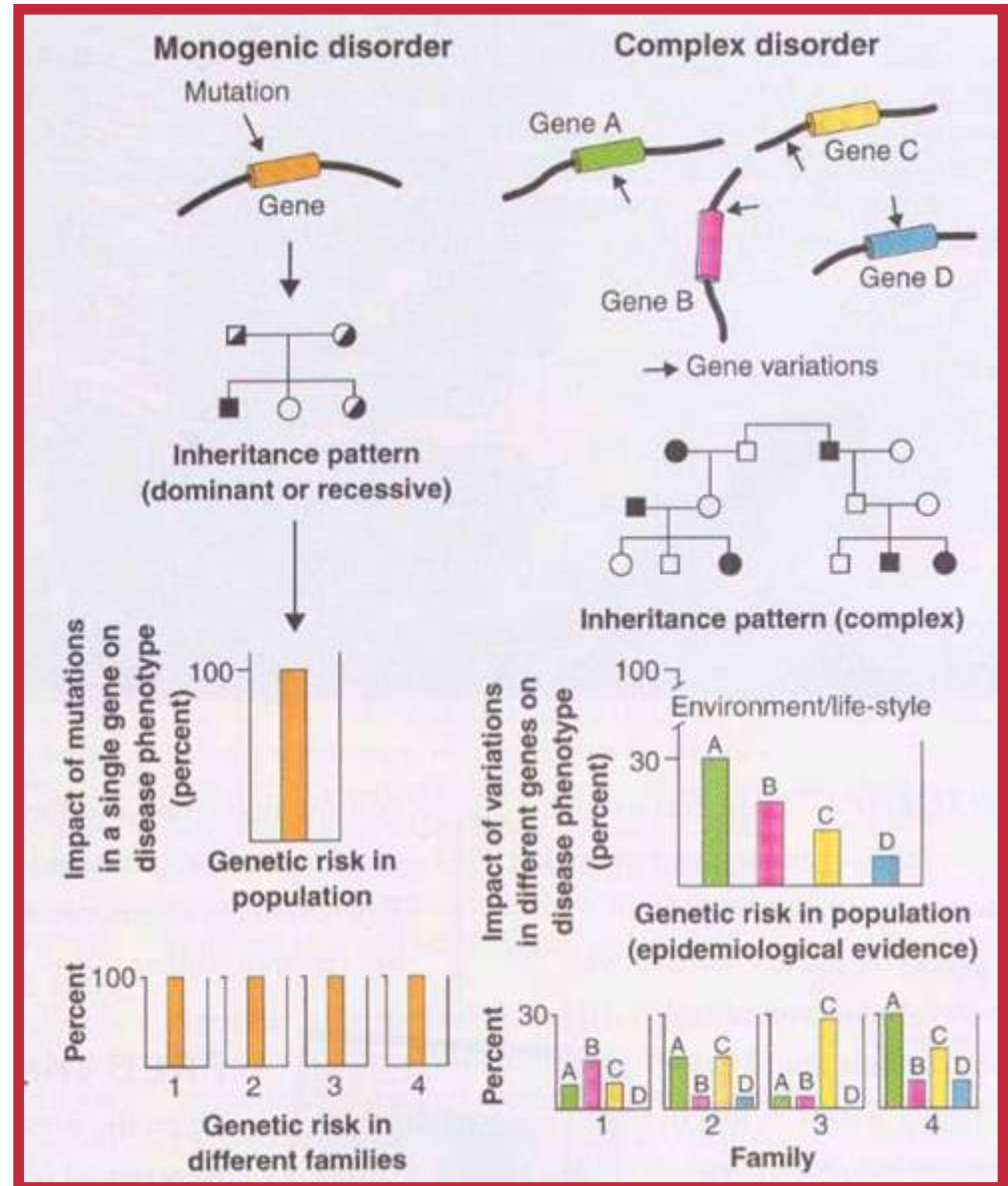
# Grundlagen

- Die Zelle
- Die DNA: Struktur und Organisation
- Bedeutung des Humangenomprojekts
- **Erblehre**

# Gene and Erkrankungen

- **Einzelne Gene mit großer Wirkung (monogen)**
- **Wenige Gene mit großer Wirkung (oligogen)**
- **Viele Gene mit kleiner Wirkung (polygen)**

# Gene und komplexe Erkrankungen



Peltonen and McKusick, Science 291:1224, 2001

# Klassifikation von Gentests

- **Untersuchung monogener Erkrankungen**
- **Untersuchung komplexer Erkrankungen**
  - **Untersuchung von Genexpressionsmustern**
  - **Untersuchung von Polymorphismen**

# Grundtechniken

- **Isolierung von Nukleinsäuren**
- Die Polymerasekettenreaktion (PCR)
- Gensequenzierung
- Array-basierte Methoden
- Bedeutung der Prä- und Postanalytik
- Anwendungsbeispiele

# Die Isolierung von Nukleinsäuren

## Prinzip

- Zellaufschluss
  - Detergenzien
  - Enzyme
  - Mechanisch
- „Selektion“ der Nukleinsäure:
  - Alkoholische Fällung
  - Bindung an Silika-Oberflächen  
(Membran oder Glasperlen)
  - Waschen
  - Elution

## Probenmaterial

Blut, Urin, Stuhl, Zellastriche, Haarwurzeln, Spermia, Liquor, Biopsien, Amnionflüssigkeit, Plazenta, Chorionzotten

## Hemmstoffe

SDS (Hemmung der Taq-Polymerase bei Konz. > 0,01% (w/v))

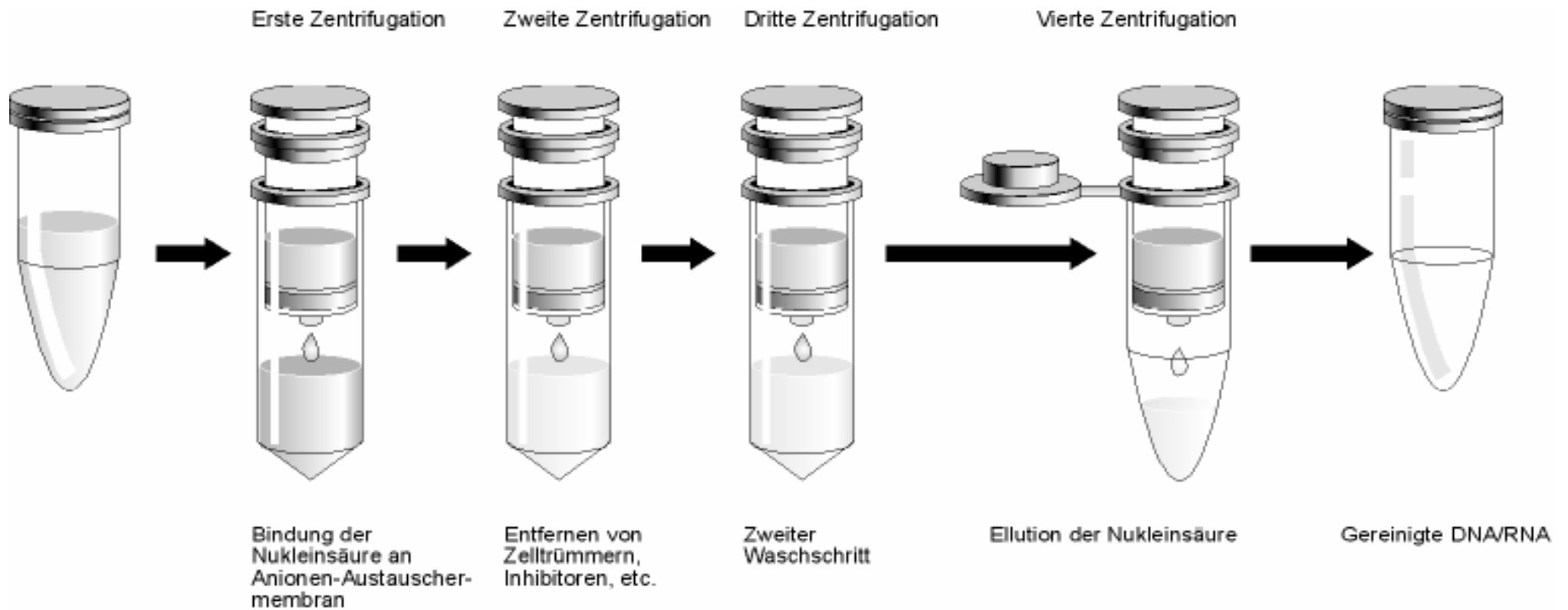
Triton X100, Tween 20, NonidetP40 (Konz. > 5% (w/v))->können Inhibition des SDS aufheben (Konz.: 0,5%)

Proteinase K

Porphyrinverbindungen

Heparin!!!

Unbekannte Hemmstoffe im Urin und Stuhl



**Ausbeute: 200  $\mu$ l Blut: 4-12  $\mu$ g DNA**

**= ~ 20 ng/ $\mu$ l**

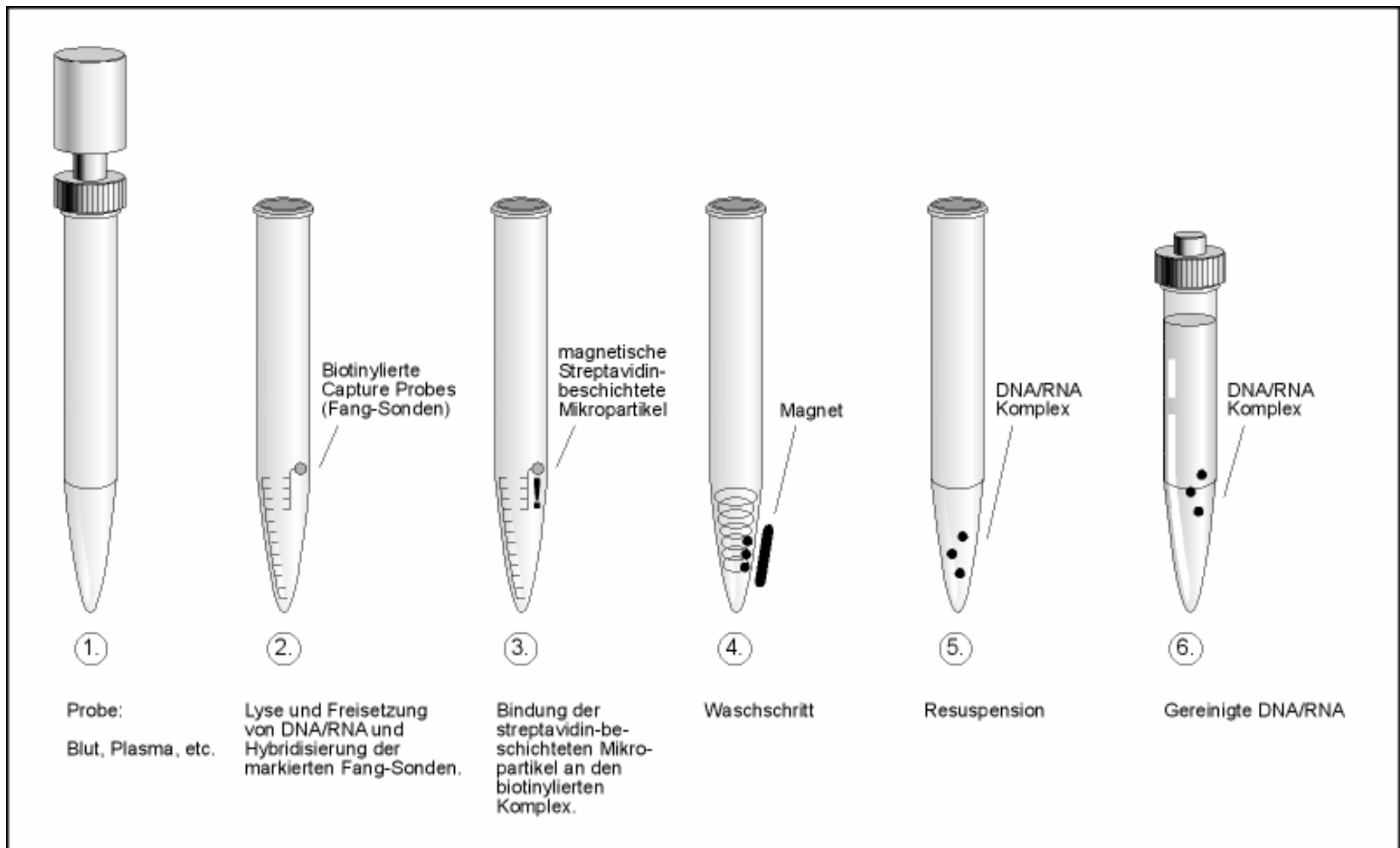


Abb. 1.3b: Beispiel für eine automatisierte Probenaufbereitung

# Cobas Ampliprep



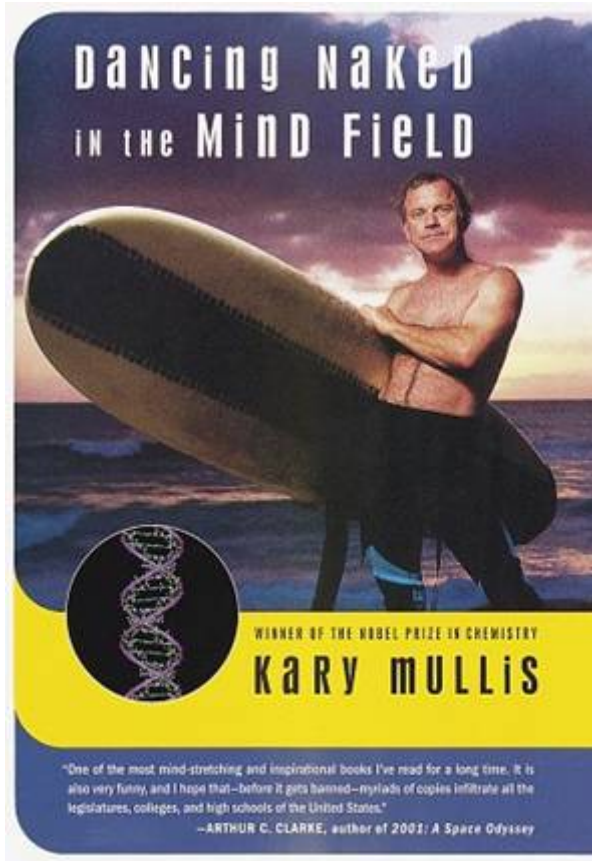
# Magna Pure



# Grundtechniken

- Isolierung von Nukleinsäuren
- **Die Polymerasekettenreaktion (PCR)**
- Gensequenzierung
- Array-basierte Methoden
- Bedeutung der Prä- und Postanalytik
- Anwendungsbeispiele

# Die Polymerase-Ketten-Reaktion: Zugpferd der Molekularbiologie



Nobelpris  
für Chemie  
1983



- Voraussetzungen
- Das Reaktionsprinzip
- Die einzelnen Komponenten
- Verschiedene PCR-Methoden
- Detektion von PCR-Produkten

# Das PCR-Labor: Vermeidung der Kontamination

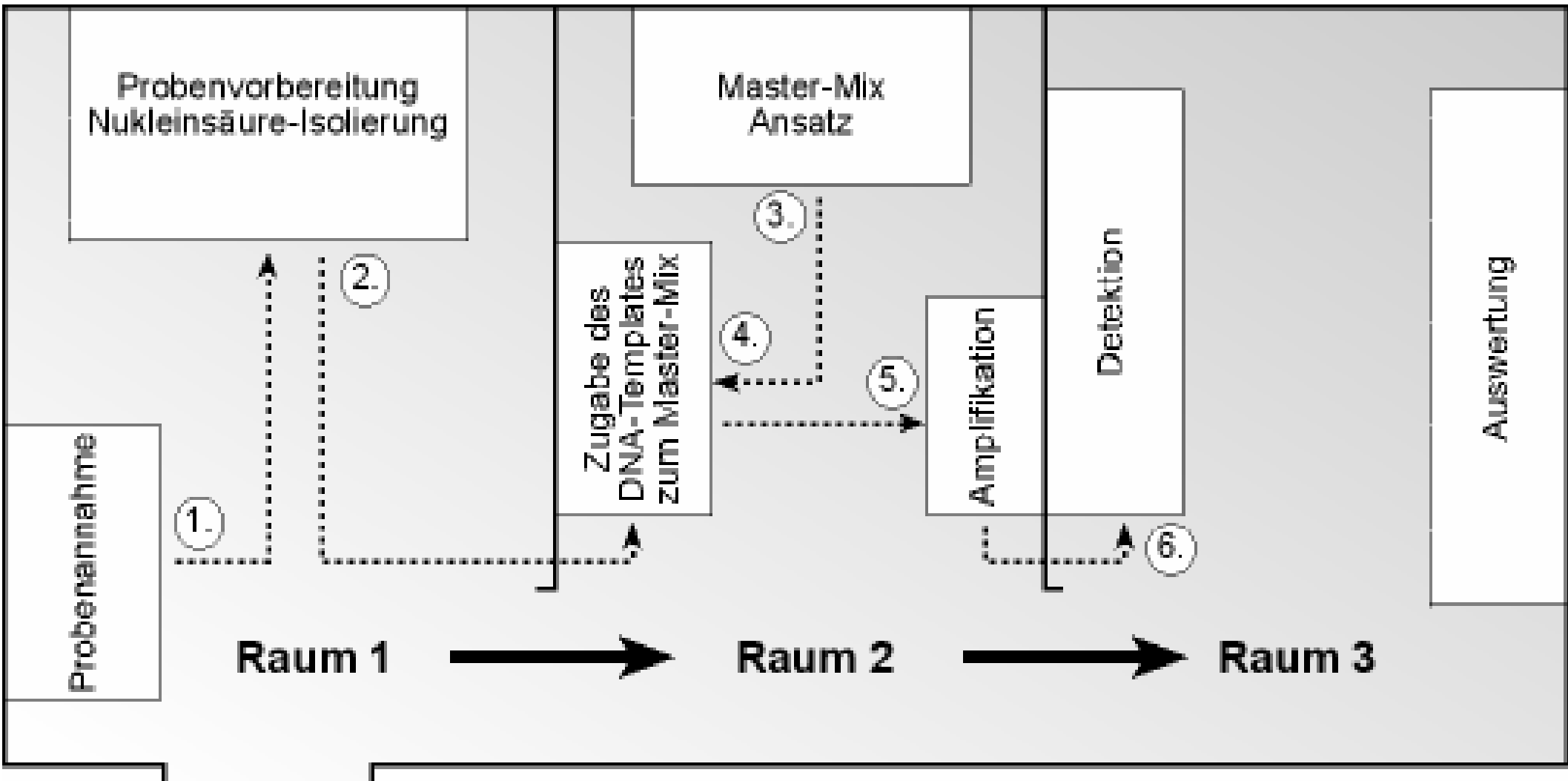


Abb. 1.2: PCR-Labor

# Wie funktioniert die PCR-Reaktion?

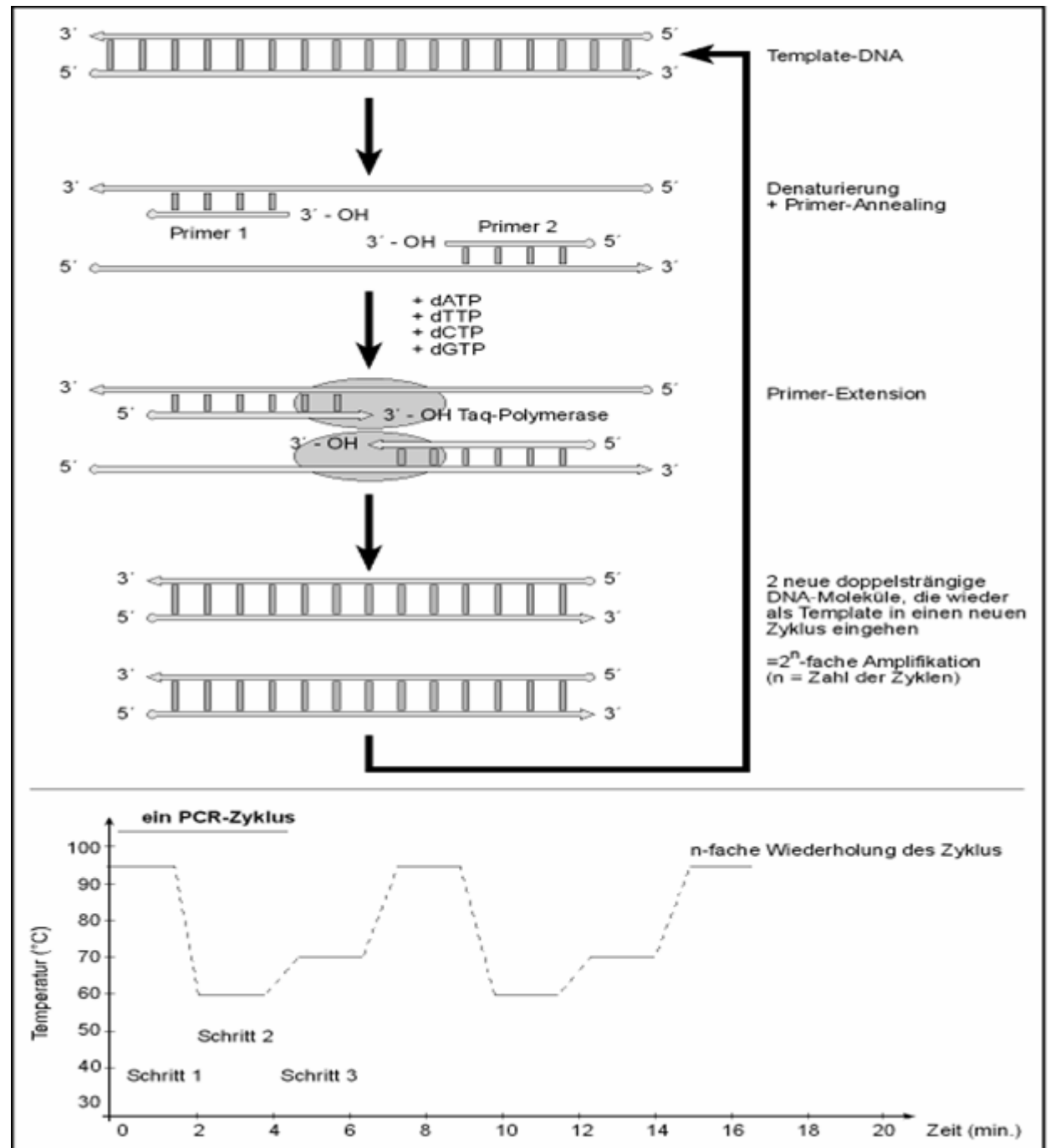
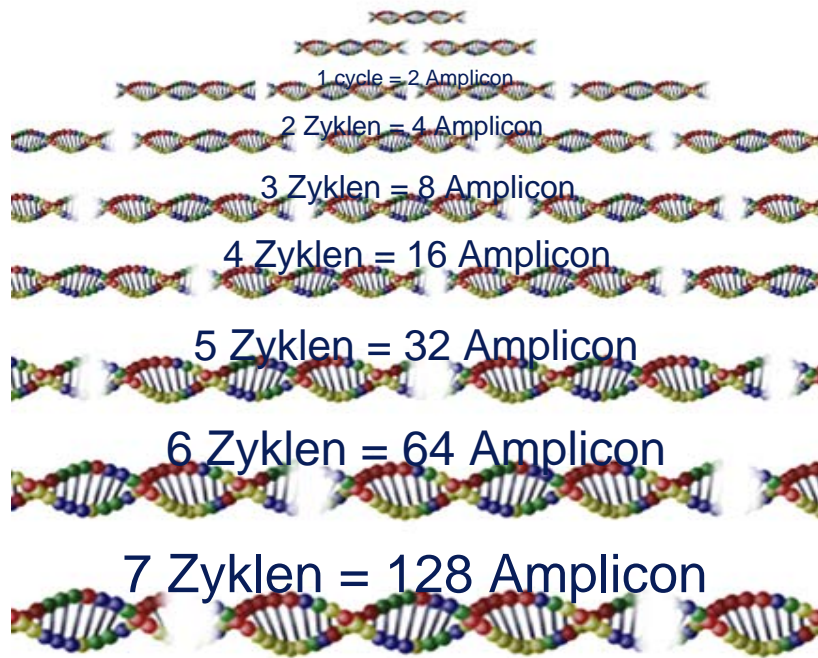


Abb. 1.4: Die Polymerase-Kettenreaktion

# Die ungeheure Kraft der PCR-Reaktion



Zahl der Zyklen	Zahl Amplicon Kopien vom Target
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
20	1,048,576
30	1,073,741,824

# Die Komponenten der PCR

- Template-DNA
- Polymerasen
- Primer/Sequenz/Design/Konzentration
- Schmelztemperatur
- Puffer und Ionen
- Nukleotide
- PCR-Zusätze

# Template

## Qualität

Template-DNA/RNA darf **keine Verunreinigungen** enthalten (Salze, Detergenzien, Chloroform/Phenol, Ethanol)

## Quantität

- Zuwenig DNA im Ansatz: Primer finden Bindungsstellen nicht.
- Zuviel DNA führt zu „mispriming“
- Menge der Target-DNA abhängig von ihrer Komplexität. Beispiel: 1 kb Gen nur 0,00003 % der zugegebenen genomischen DNA ( $3,3 \times 10^9$  bp)

# Template

## Leitlinie

- starten mit > 10.000 Kopien der Ziel-Sequenz bei 25 – 30 Zyklen
- Endkonzentration der DNA/Reaktion < 10 ng/μl (< 1 μg/μl)

Die Konzentration kann photometrisch bestimmt werden:

<b>1 A<sub>260</sub>-Einheit:</b>	<b>dsDNA:</b>	<b>50 μg/ml</b>
	<b>ssDNA:</b>	<b>33 μg/ml</b>
	<b>ssRNA:</b>	<b>40 μg/ml</b>

Genomische menschliche DNA:

$$3,3 \times 10^9 \text{ bp} = 4,7 \times 10^{-7} \text{ pmol/}\mu\text{g} = 2,8 \times 10^5 \text{ Molek\"{u}le/}\mu\text{g}$$

# Primer

## Primerkonstruktion

Primer: kurze (18-30 nt) künstliche Einzelstrang-DNA-Moleküle. Binden sehr spezifisch an Template DNA.

## Schmelztemperatur ( $T_m$ )

Temperatur, bei der 50% der Primermoleküle nicht an die Template-DNA gebunden sind.

Berechnung nach der **Wallace-Regel** (bis 20 nt Länge):

$$T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C})$$

Optimale Bindungstemperaturen können 3-12°C über dem errechneten Wert liegen! → empirische Ermittlung der optimalen Temperatur!

→ **Hot-start-PCR**: Zugabe von Enzym erst nach erster Denaturierung oder Enzymaktivierung erst bei 95°C

→ **Touch-Down-PCR**: Start der Zyklen deutlich über  $T_m$ , dann sukzessiver Erniedrigung der Temp. Um 1-2°C nach jedem Zyklus

# Primer

## Primersequenz

- Vermeidung von 3 G oder C am Primerende
- Am 3'-Ende sollte kein T vorhanden sein
- keine komplementären Bereiche zwischen den Primerpaaren zur Vermeidung von Primer-Dimere
- keine längeren Abschnitte einzelner Base
- keine Palindrome und Sekundärstrukturen

## Primerkonzentration

Optimal: 0,1- 0,5  $\mu\text{M}$  für jeden Primer

# Puffer und Mg<sup>2+</sup> -Konzentration

Verschiedene Polymerasen benötigen verschiedene Puffer. Von Herstellern mitgeliefert.

## **Mg<sup>2+</sup> zum enzymatischen Einbau der Nukleotide**

**Optimale Konzentration:** 1,5-5,0 mM;

**Zu wenig (< 0,5 mM):** keine effiziente Strang-Synthese

**Zu viel:** Stabilisierung der dsDNA mit Erhöhung der Schmelztemperatur: geringe Produktspezifität

# Nukleotide und Zusätze

## Standard-Konzentration der dNTPs

200  $\mu\text{M}$

## Taq-Polymerase

Bei niedrigen Konzentrationen baut Taq-Polymerase weniger fehlerhafte Nukleotide ein: erhöhte Spezifität

## PCR-Zusätze zur Denaturierung

- 5% Formamid
- 2 – 5% DMSO
- 7-Deaza-dGTP

# Polymerasen

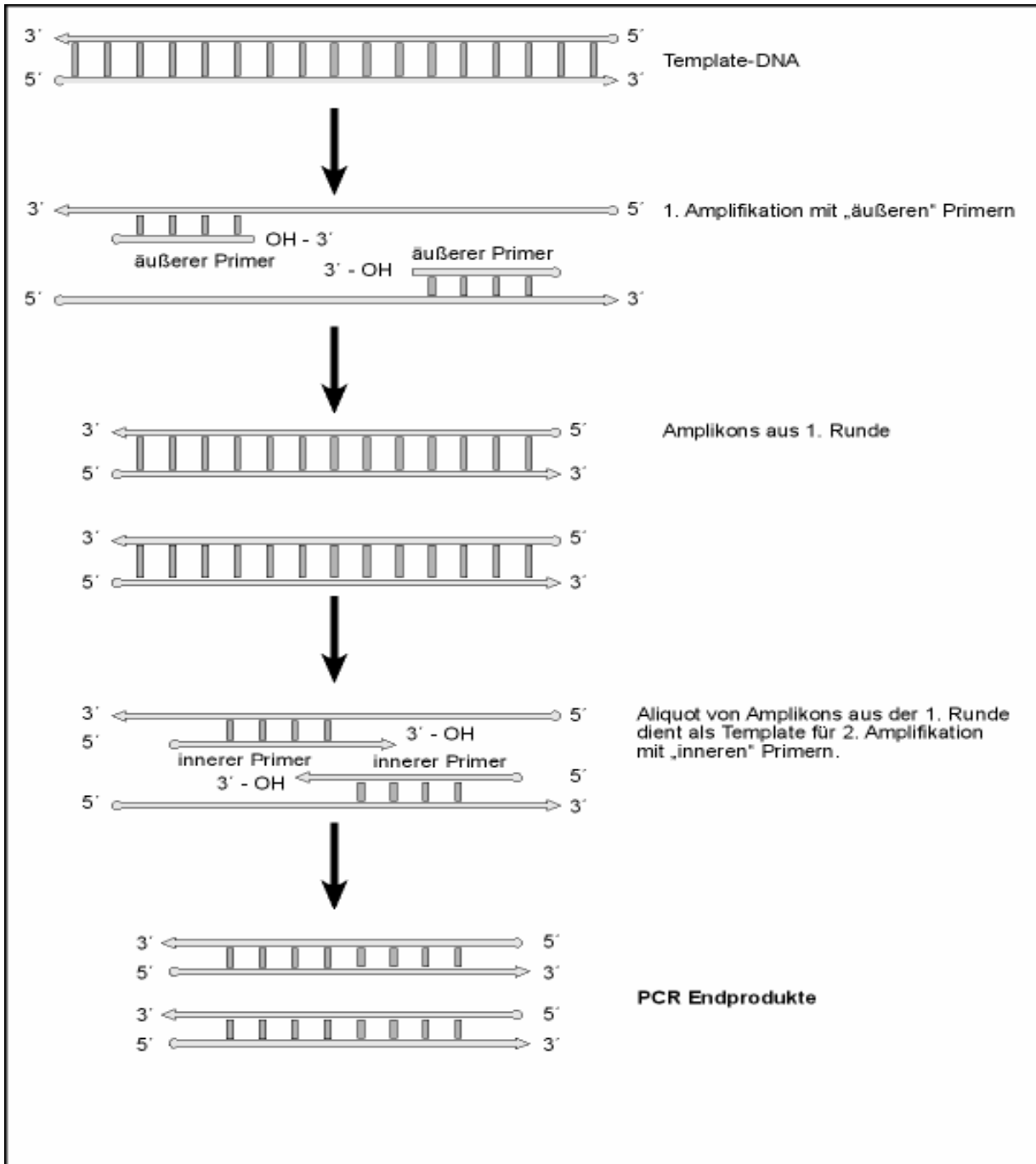
DNA-Polymerase	Organismus	Anwendung	Besonderheiten
<b>Taq-Polymerase</b>	<i>Thermus aquaticus</i>	PCR	5'→3'-Exonuklease-Aktivität <sup>+</sup>
<b>Pfu-Polymerase</b>	<i>Pyrococcus furiosus</i>	z. B. zyklische Sequenzierung	5'→3'-Exonuklease-Aktivität <sup>+</sup> 3'→5'-Exonuklease-Aktivität <sup>++</sup>
<b>Vent<sup>TM</sup>-Polymerase</b>	<i>Thermococcus litoralis</i> (gentechnisch hergestellt)	PCR und anschließende Klonierung der Amplikons	3'→5'-Exonuklease-Aktivität <sup>++</sup> hitzestabiler als <i>Taq-Polymerase</i>
<b>Tth-Polymerase</b>	<i>Thermus thermophilus</i> (gentechnisch hergestellt)	RT-PCR*, PCR	schreibt RNA in DNA um

**Tab. 1.: Beispiele und Anwendungsmöglichkeiten einiger DNA-Polymerasen**

<sup>+</sup> 5'→3'-Exonuklease-Aktivität: Nukleotide, die in Syntheserichtung vor der Polymerase liegen, werden von dem Enzym abgebaut

<sup>++</sup> 3'→5'-Exonuklease-Aktivität: sog. „Proofreading“-Aktivität; falsch eingebaute Nukleotide werden von der Polymerase wieder entfernt. Die Präzision der DNA-Synthese wird durch die Proofreading-Aktivität gesteigert.

\*RT-PCR: Reverse Transkriptase-PCR: Ausgangsmaterial bei einer RT-PCR ist RNA. Diese muß erst durch das Enzym in DNA „umgeschrieben“ werden, bevor eine PCR durchgeführt werden kann.



# „nested“-PCR

Abb. 2.2: „nested“-PCR

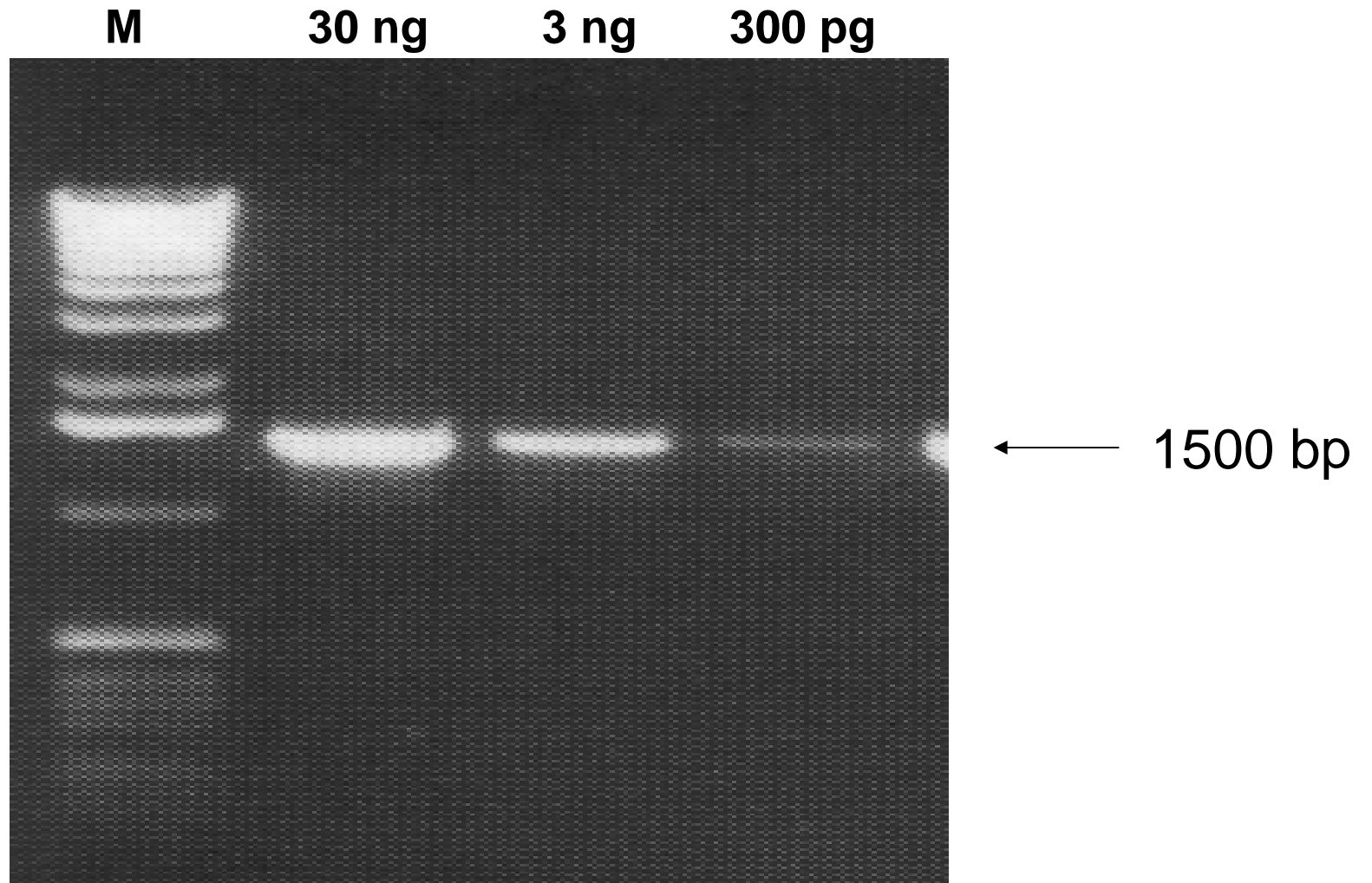
# RNA PCR

- **Erster Vorgang: Reverse Transkription**
  - RNA wird zu cDNA umgeschrieben
- **Zweiter Vorgang: PCR** -  
cDNA wird amplifiziert

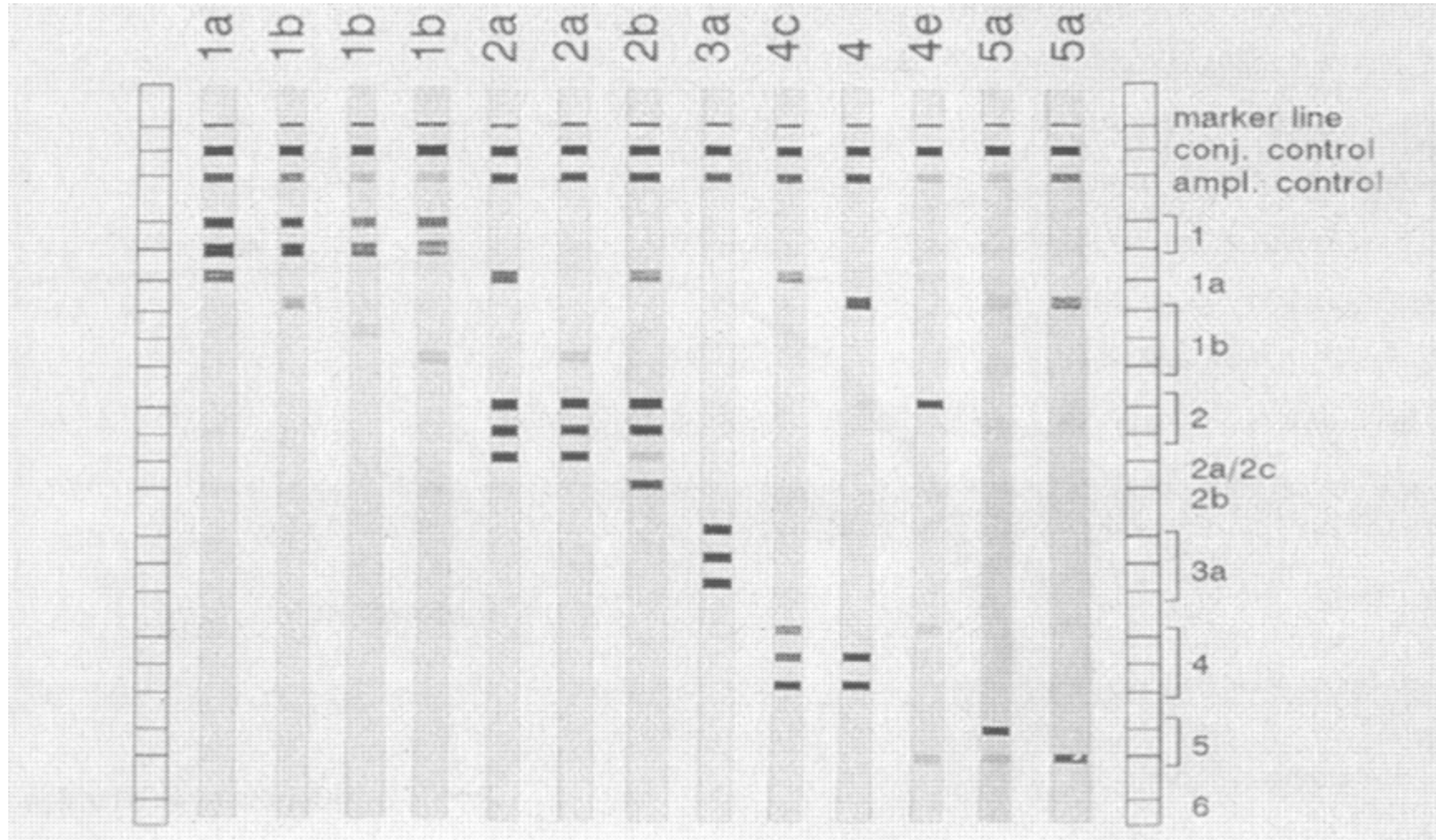
# Detektion von PCR-Produkten

- Agarose Gelelektrophorese
- PCR-ELISA
- Reverser Dot-Blot
- Real time-PCR
- Automatisierte Testsysteme

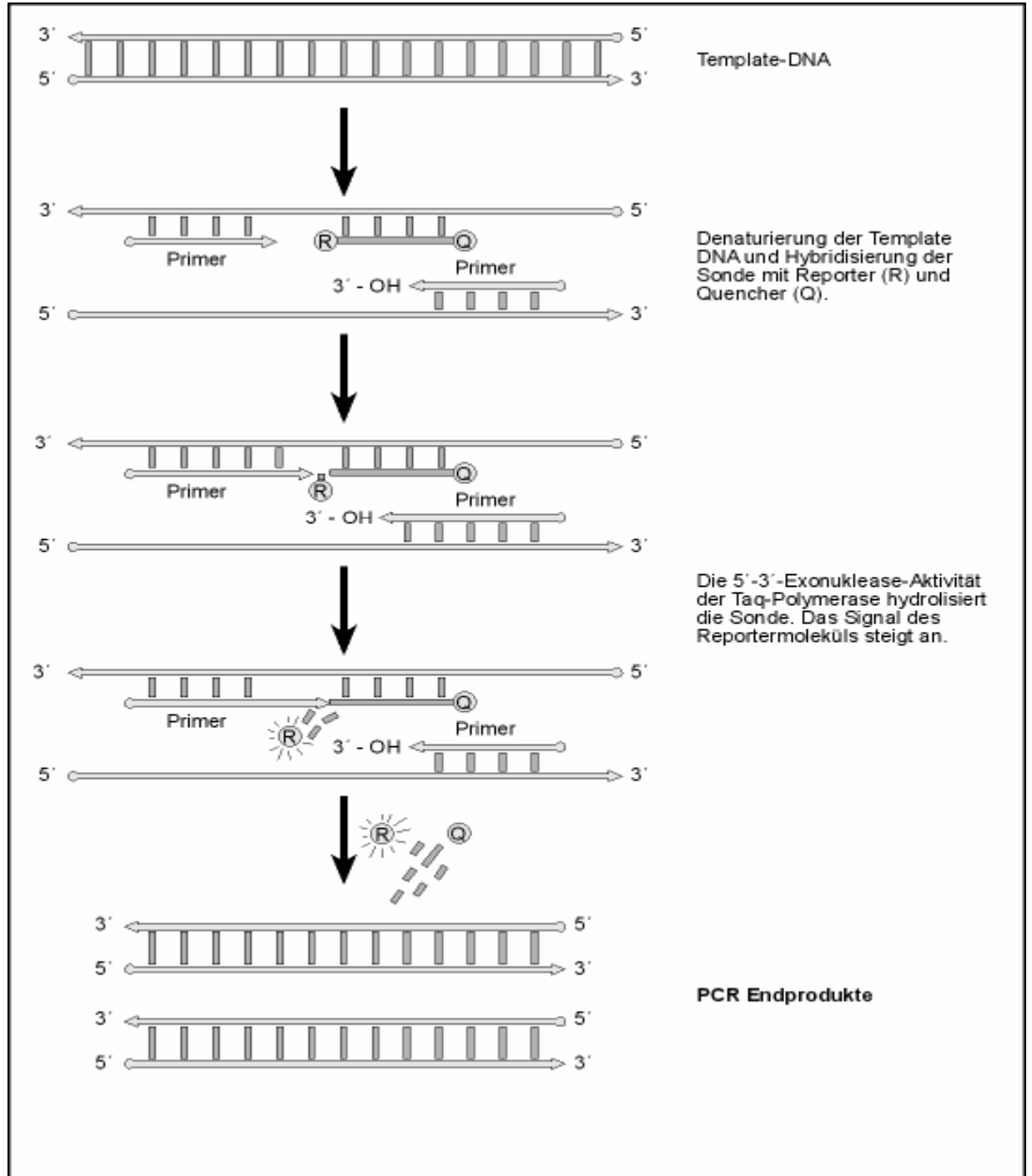
# Agarose-Gelelektrophorese



# Reverser Dot blot

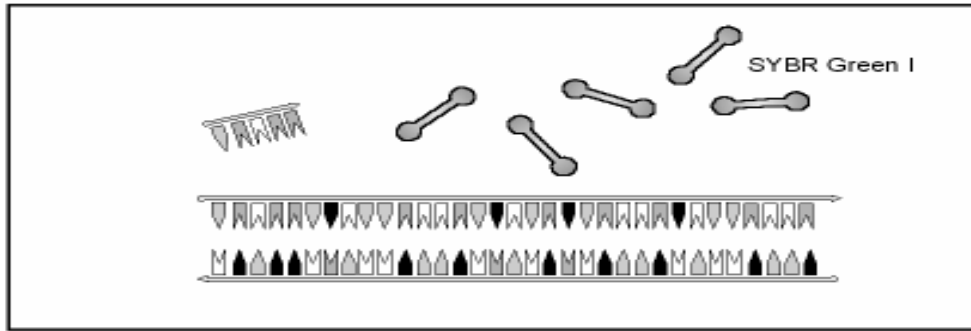


# Taq-Man-PCR

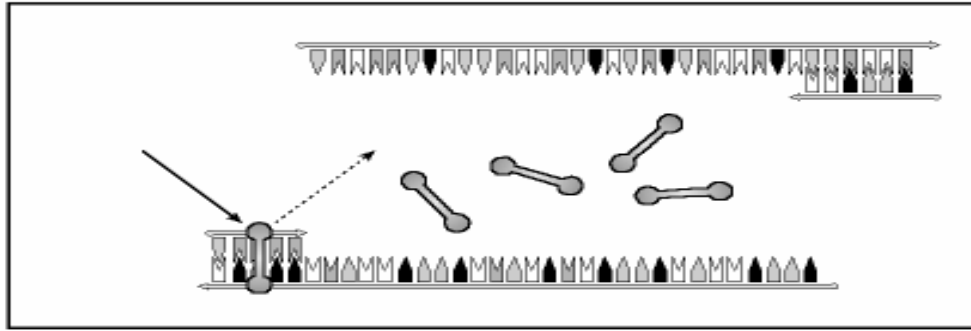


# Real time PCR SYBR Green

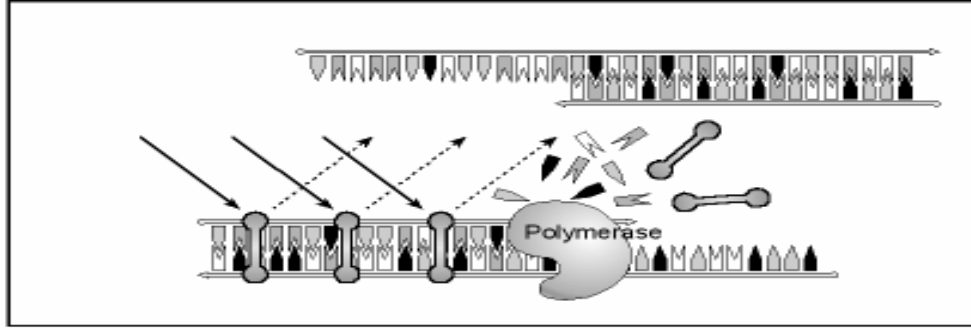
**A**



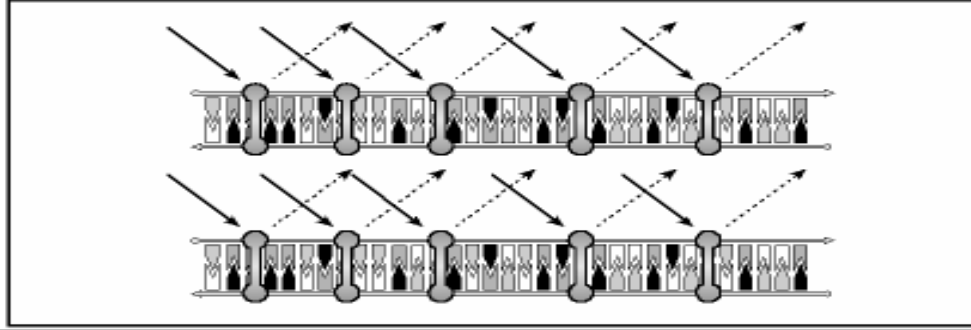
**B**



**C**



**D**



# Mutations-Analyse mit der Real time-PCR

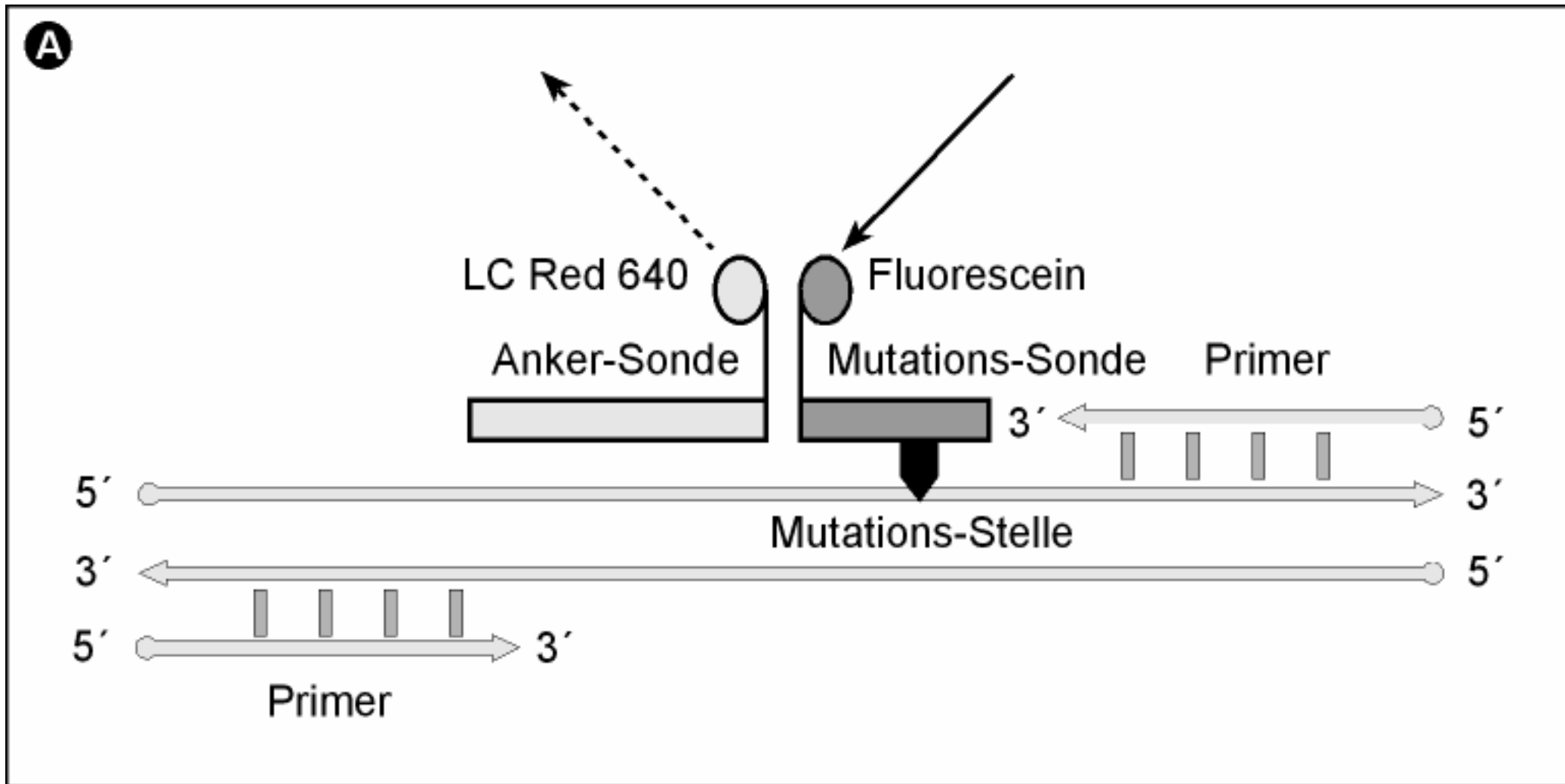


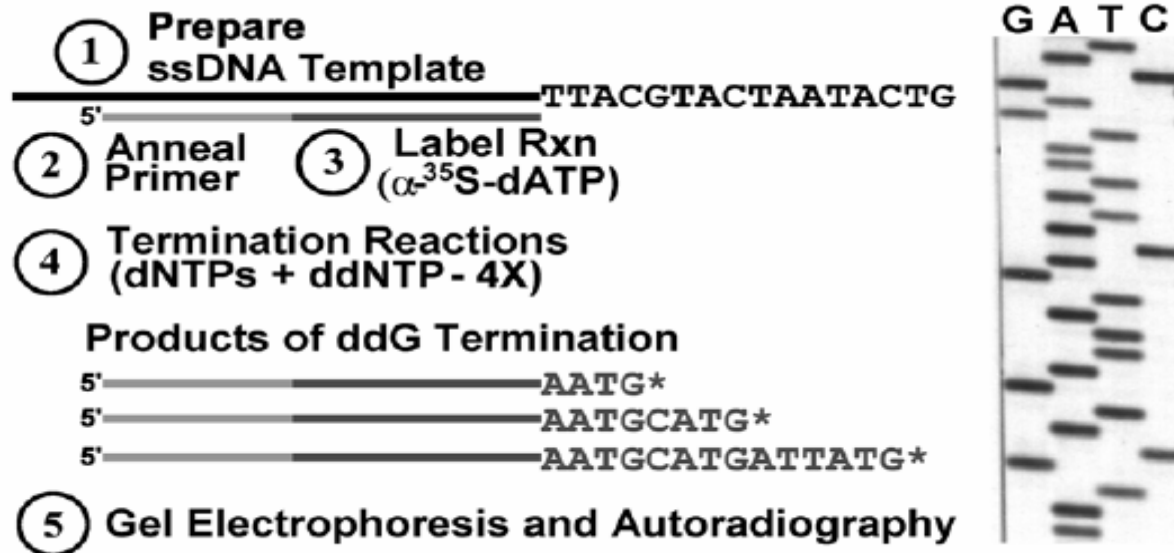
Abb. 2.7a: Detektion einer Punktmutation mit Hybridisierungs-Sonden

# Grundtechniken

- Isolierung von Nukleinsäuren
- Die Polymerasekettenreaktion (PCR)
- **Gensequenzierung**
- Array-basierte Methoden
- Bedeutung der Prä- und Postanalytik
- Anwendungsbeispiele

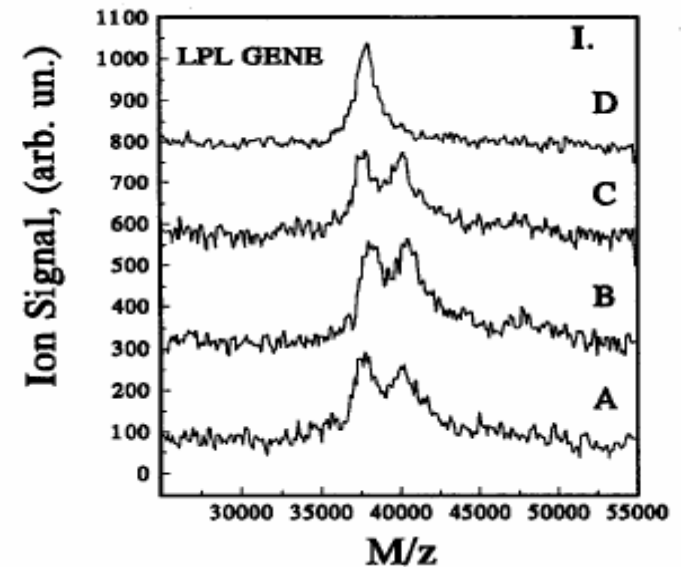
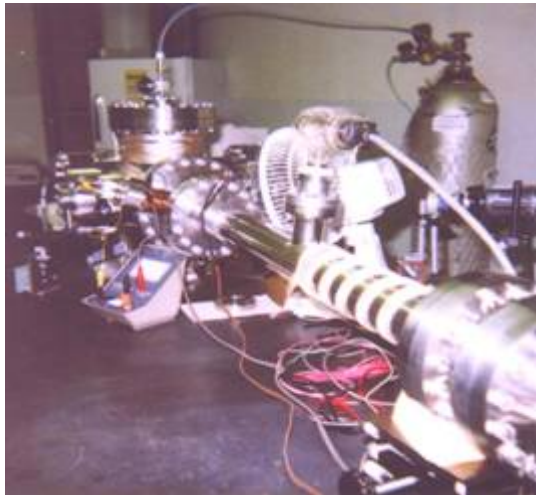
# DNA-Sequenzierung

- **Maxim & Gilbert** (historisch): Spaltung spezifischer Nukleotide durch Chemikalien. Wird für Oligonukleotide oder GC-reiche Regionen gelegentlich noch benutzt
- **Sanger**: Dideoxy-Nukleotide (heute Standard)



# Sequenzierung: MALDI-TOF

Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry  
(Matrix-assistierte Laser-Desorptions-Ionization Flugzeitmassenspektrometrie)

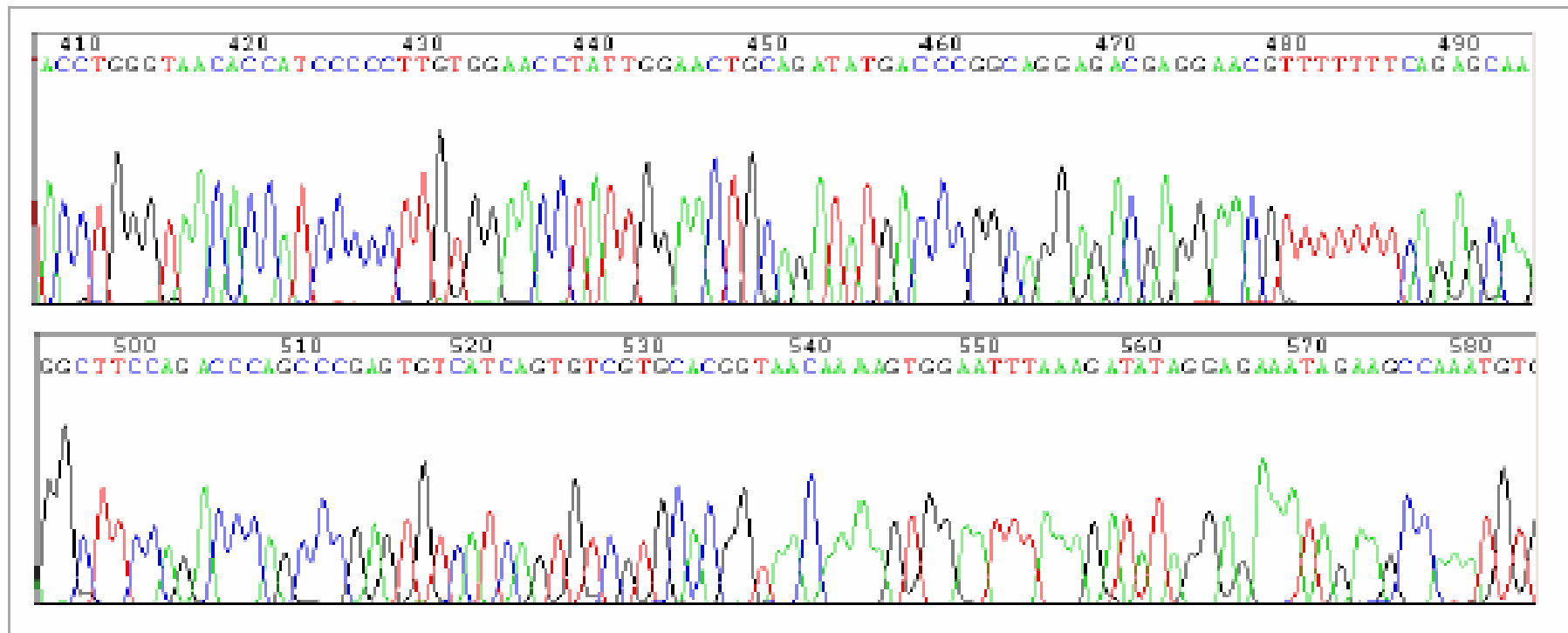


Vorteil: Hoch-Durchsatz SNP-Detektion  
Nachteil: Hohe Anschaffungskosten

# DNA-Sequenzierung

Kapillarelektrophorese + Bioinformatik: Heute Goldstandard

- Hohe Zuverlässigkeit
- Lange Sequenzabfolgen lesbar
- Automatisierbar



# Grundtechniken

- Isolierung von Nukleinsäuren
- Die Polymerasekettenreaktion (PCR)
- Gensequenzierung
- **Array-basierte Methoden**
- Bedeutung der Prä- und Postanalytik
- Anwendungsbeispiele

# Untersuchung von Genexpressionsmustern

- **Proteomics**
- **mRNA-Ebene**

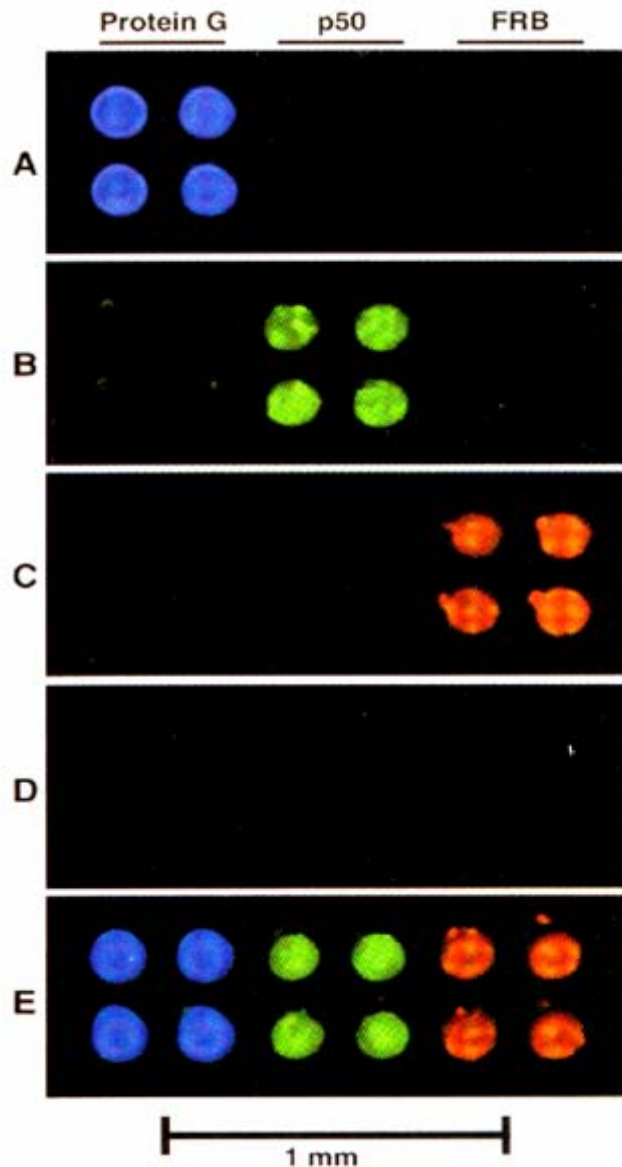
# Proteomics

## Bekannte Moleküle auf dem Chip

- **Antikörper**
- **Antikörper-Fragmente**
- **Aptamere**
- **Andere Bindungsmoleküle**

**Technisch sehr anspruchsvoll**

# Protein Arrays



## Detektion mittels

**BODIPY-FL-IgG gegen Protein G**

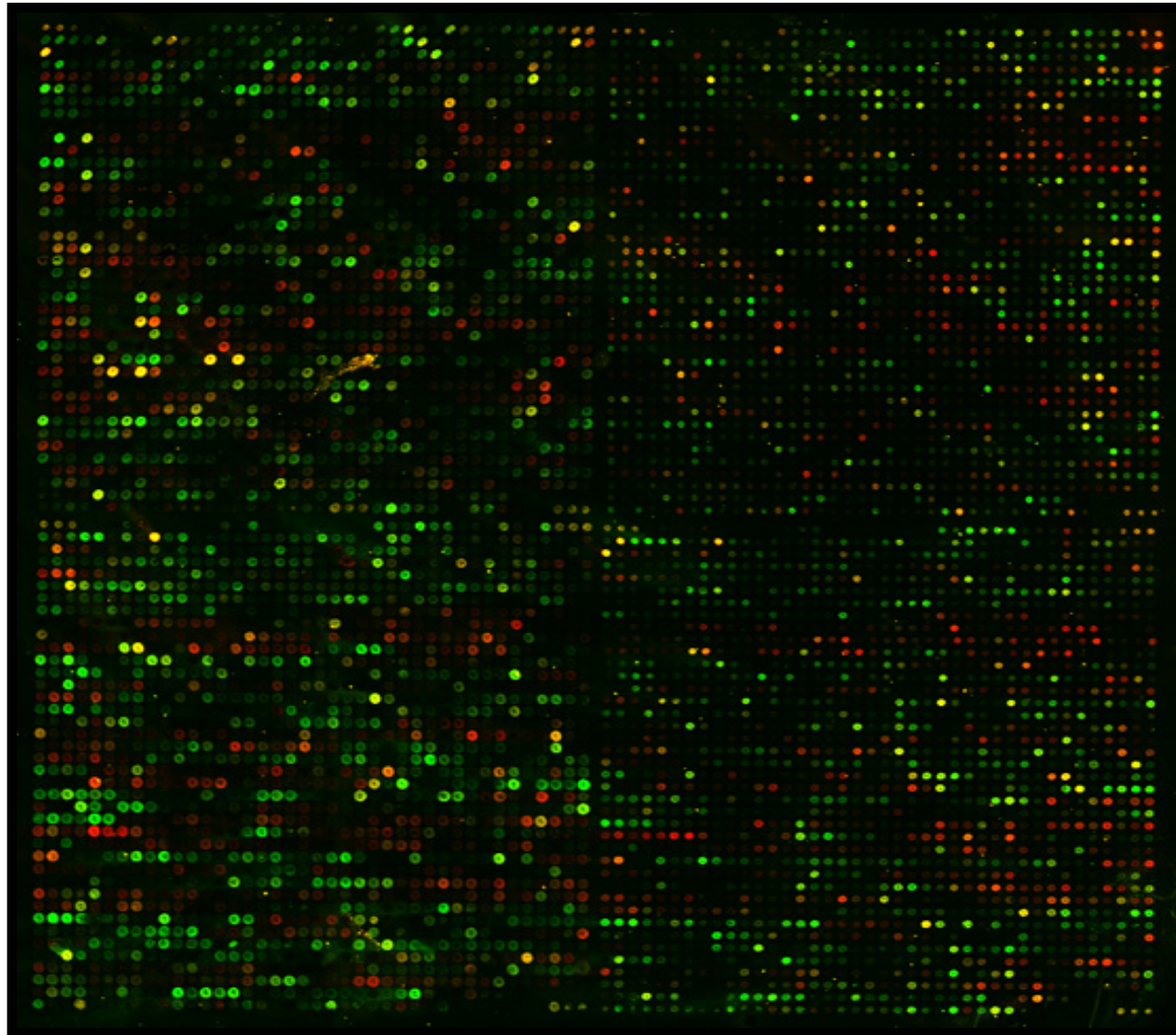
**Cy3-I $\kappa$ B $\alpha$**

**Cy5-FKBP12 mit Rapamycin**

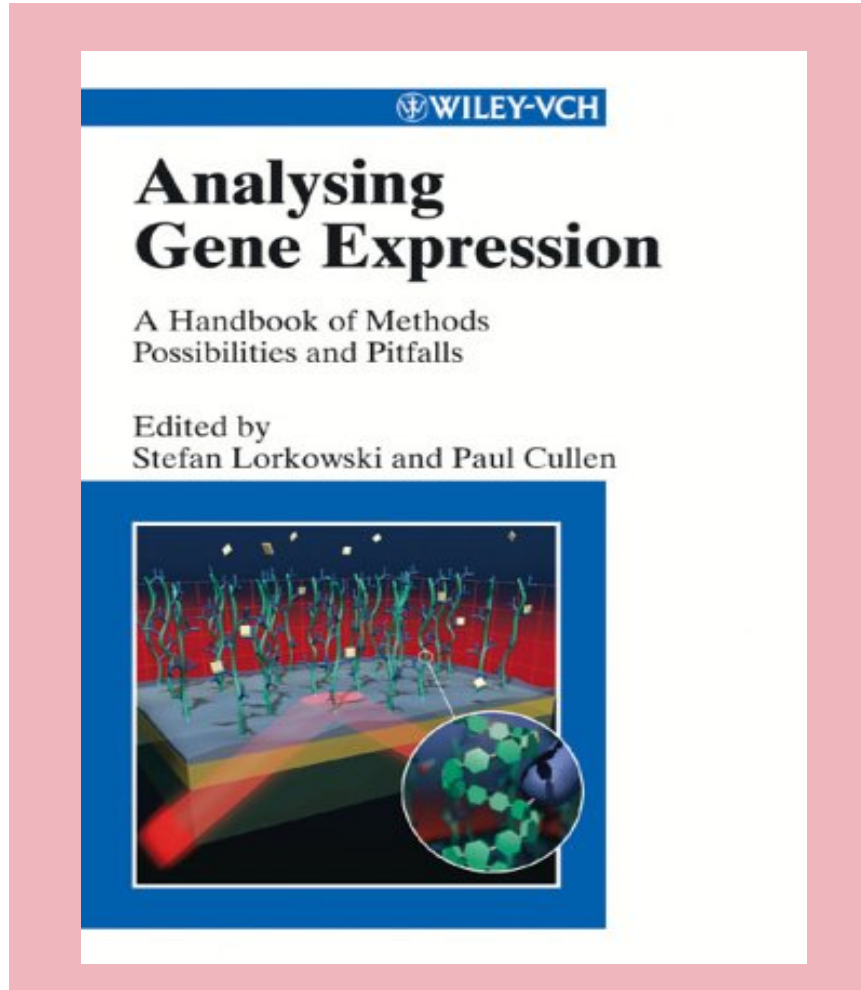
**Cy5-FKBP12 ohne Rapamycin**

**alle Fluorophore wie oben**

# Untersuchung der Genexpression



# Methoden zur Untersuchung der Genexpression

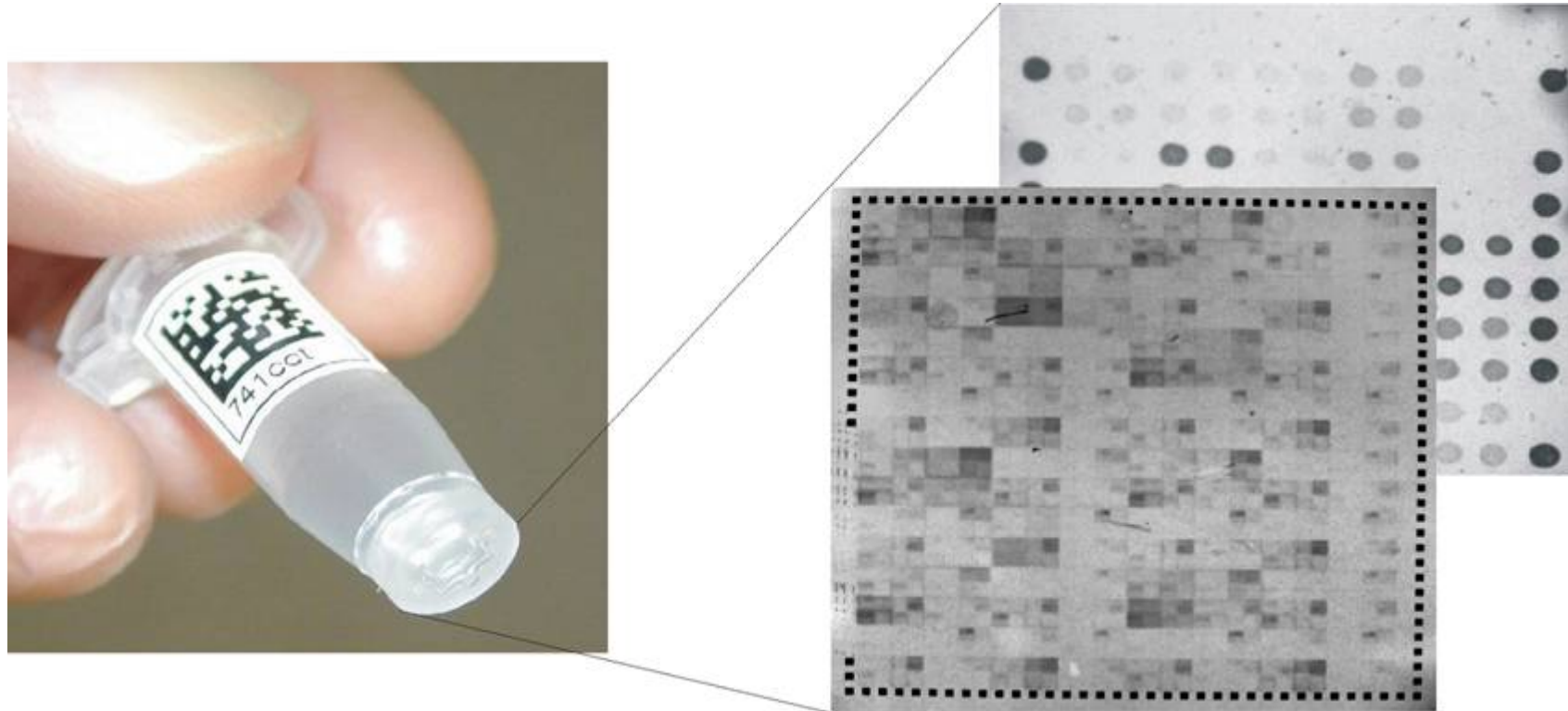


- **Hardcover:** 900 pages ; Dimensions (in inches): 2.28 x 9.58 x 7.12
- **Publisher:** Wiley-VCH; (March 7, 2003)
- **ISBN:** 3527304886
- **Amazon.com Sales Rank:** 892,708
  
- **Northern Blot**
- **DNA Microarrays**
- Oligonucleotide Fingerprinting
- Quantakine® mRNA Assay
- Amplified Differential Gene Expression
- Digital Expression Pattern Display
- Fluorescent Differential Display
- Introduced Amplified Fragment Length Polymorphism
- Rapid Analysis of Gene Expression
- Restriction Enzyme Analysis of Differential Sequences
- Total Gene Expression Analysis
- **Massively Parallel Signature Sequencing**
- **Serial Analysis of Gene Expression**
- Open Reading Frame Expressed Sequence Tags
- Tandem Arranged Ligation of Expressed Sequence Tags
- **Subtractive Hybridization**
- **Differential Display**
- Ribonuclease Protection Assay
- ...

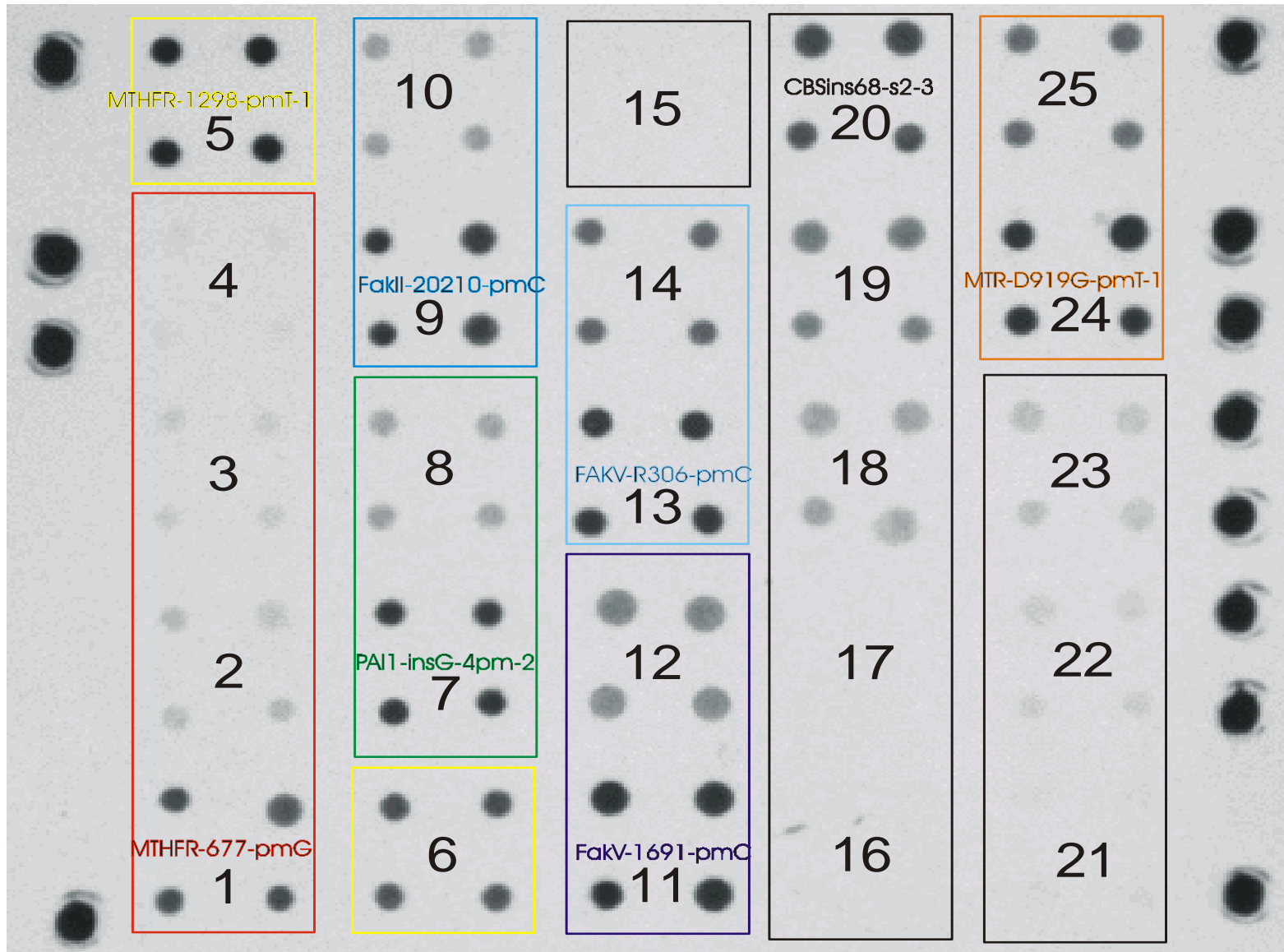
# Multiparametrische Genanalytik

- **Geringe Anzahl an Allelen**
  - Gensequenzierung: Dideoxy, Maxim u. Gilbert
  - Allelspezifische PCR
  - Multiplex-PCR
  - Real-Time PCR (TaqMan<sup>®</sup>-Technologie z.B. ABI Prism<sup>®</sup>, LightCycler<sup>®</sup>)
  - Filtermembran
- **Vielzahl an Allelen**
  - **DNA-Mikroarrays**

# SNP-Mikroarray

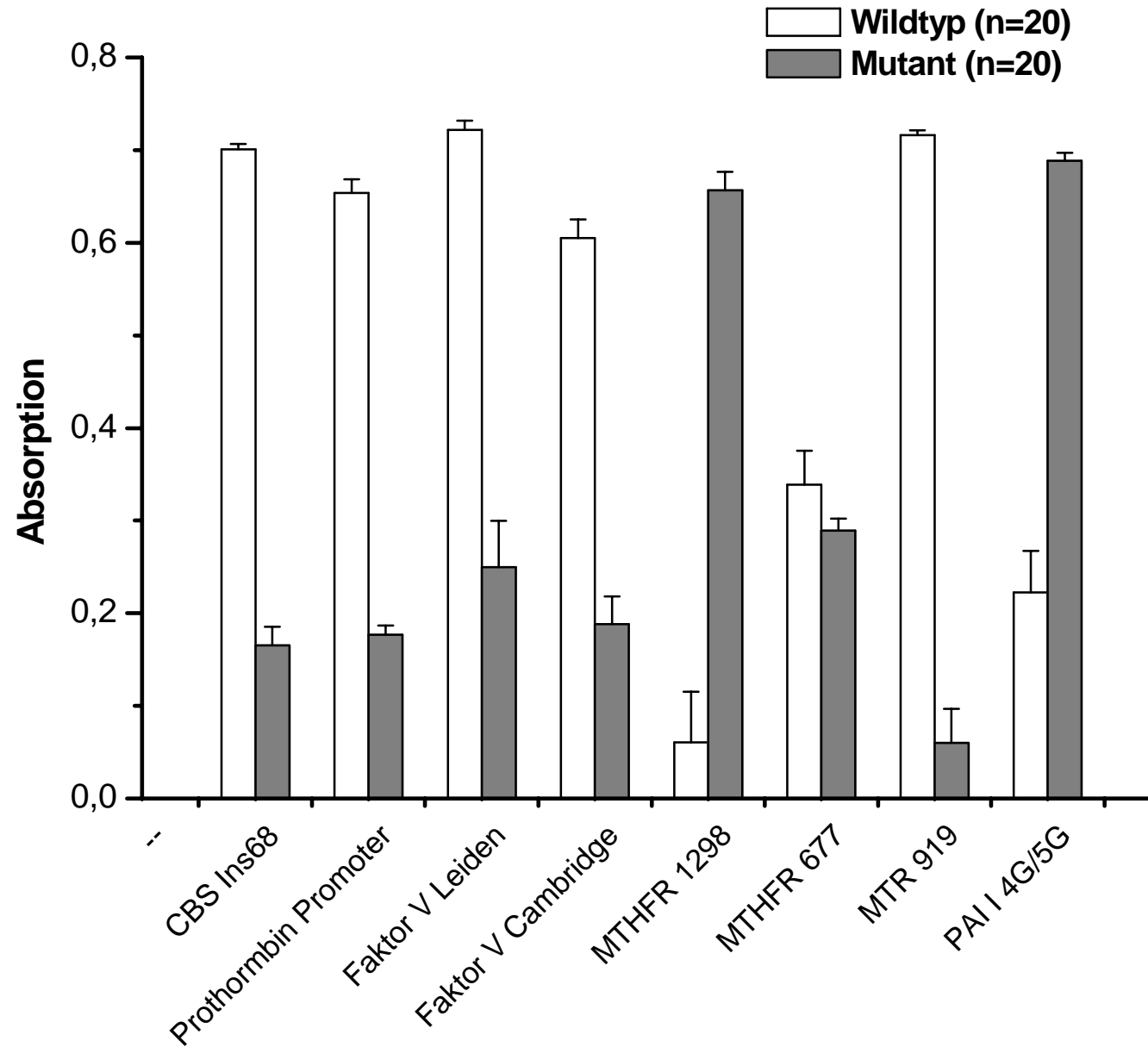


# SNP-Mikroarray: typischer Befund



20 min  
50°C  
Silber

# SNP-Mikroarray: typischer Befund



# Grundtechniken

- Isolierung von Nukleinsäuren
- Die Polymerasekettenreaktion (PCR)
- Gensequenzierung
- Array-basierte Methoden
- **Bedeutung der Prä- und Postanalytik**
- Anwendungsbeispiele



# **Richtiges Material ins Labor schicken!**

PCR-Methoden sind direkte  
Nachweismethoden: daher richtiges Material  
ins Labor schicken

# Grundtechniken

- Isolierung von Nukleinsäuren
- Die Polymerasekettenreaktion (PCR)
- Gensequenzierung
- Array-basierte Methoden
- Bedeutung der Prä- und Postanalytik
- **Anwendungsbeispiele**

# Derzeitige PCR-Tests in der Routine

- **Polymorphismus-Diagnostik**
  - Faktor V Leiden
  - Faktor II-Mutation
  - MTHFR
- **Genetische Diagnostik**
  - Hereditäre Hämochromatose
- **Genetische Risikofaktoren-Analyse**
  - Osteoporose
  - Koronare Herzkrankheit
- **Infektionsdiagnostik**
  - Hepatitis B
  - Hepatitis C
  - Humanes Papilloma-Virus
- **Pharmacogenomik**
  - Zytochrom P (Cyp21)-Mutationen
  - Dihydropyrimidin-Dehydrogenase