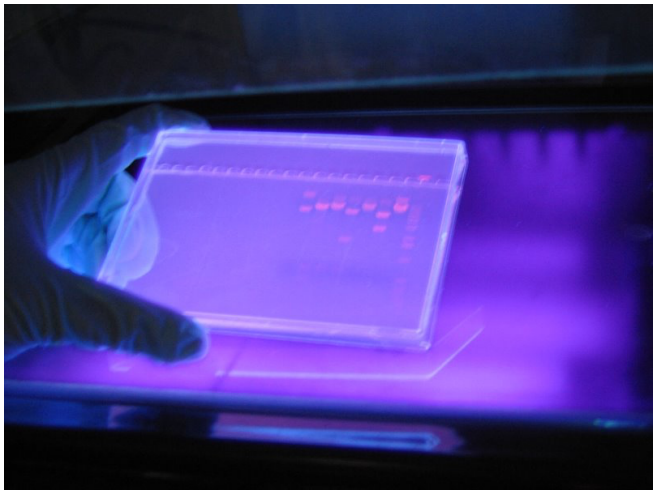
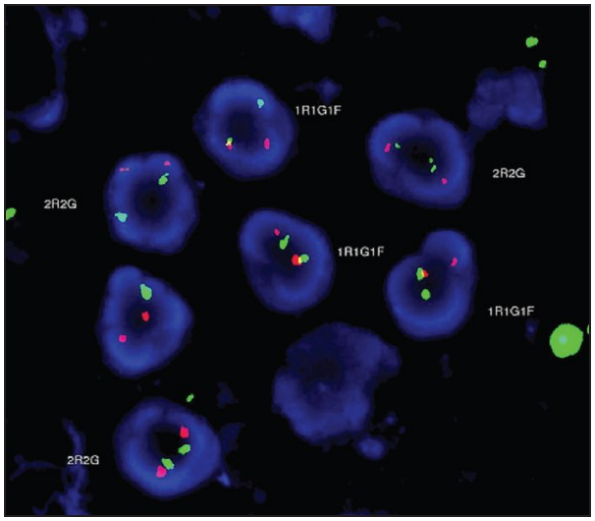
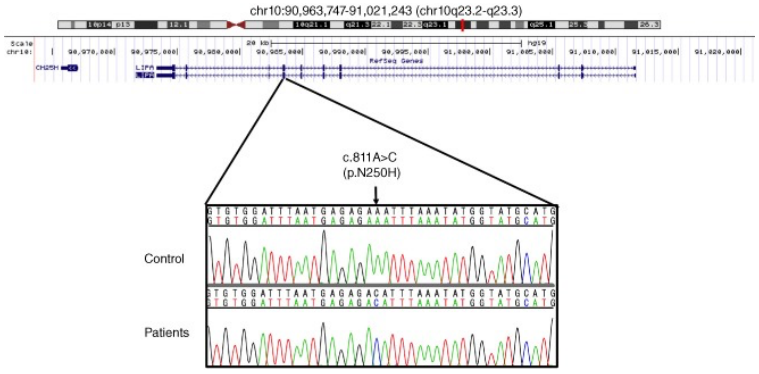
Molekularbiologische Laboruntersuchungen







Labormedizinvorlesung

23.04.2019

Krisztina Káldi

Ziel der molekularbiologischen Laboruntersuchungen

Untersuchungen der DNA-Struktur und der Expression von RNA

3,2 Milliarden Basenpaare in 2 x 23 Chromosomen

~ 30 000 Gene machen 25 % des Genoms aus.

Die Variabilität betrifft nur 0,1 % des Genoms.

Gezielte, gut definierte Untersuchungen können nur durchgeführt werden!

Ziel der Molekularbiologischen Laboruntersuchungen

Indikationen:

- Verdacht auf monogene Krankheiten oder auf Mutation ohne Symptome

  Genaue Diagnose - Prognose - Therapie

  Risikoerkennung - Vorbeugeuntersuchungen

  Familienplanung

- Nachweis von Infektionen

- Pharmakogenetik – Wirksamkeit oder Metabolismus von Medikamenten kann prognostiziert werden

  z.B. Toxizität von Irinotecan (7-10 %)

- Personenidentifizierung

Chromosomenuntersuchungen

Ziel:

Untersuchung der Zahl und der Struktur der Chromosomen

- Bestimmung des Kariotyps

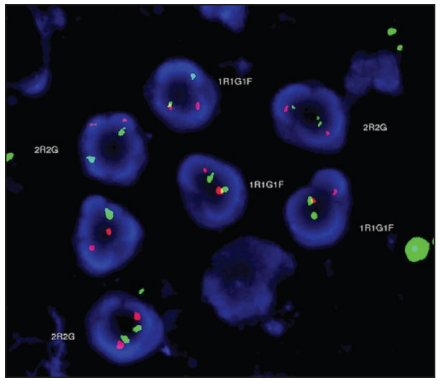
Häufige Indikationen:

Vorbeugeuntersuchung – Chromosomenanalyse in fetalen Zellen (Amniozentese oder mütterliches Blut)

Erkenneung von Mißbildungszeichen (Down-Syndrom (21), Edwards-Syndrom (18), Patau-Syndrom (13), Turner-Syndrom (X0))

Analyse von Tumorzellen - Prognose

Therapie



Chromosomenuntersuchungen – Zytogenetische Analyse

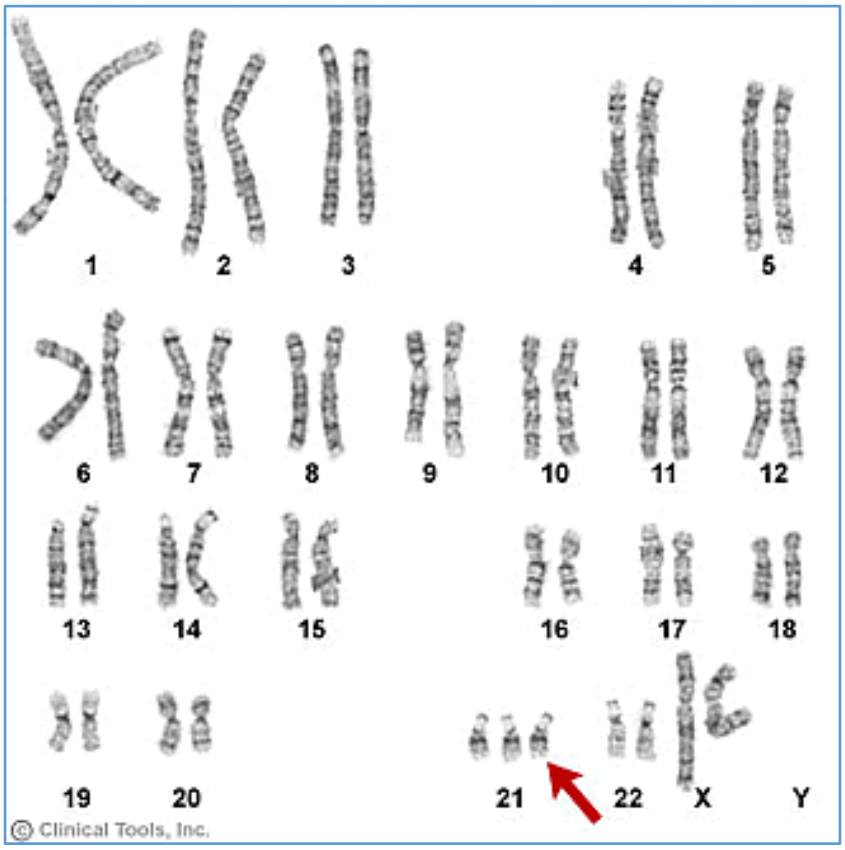
Methode:

1. Kultivierung der Zellen
2. Unterbrechung der Zellteilung in der Metaphase (stark kondensierte Form)
3. Fixation und Färbung
4. Mikroskopische Analyse

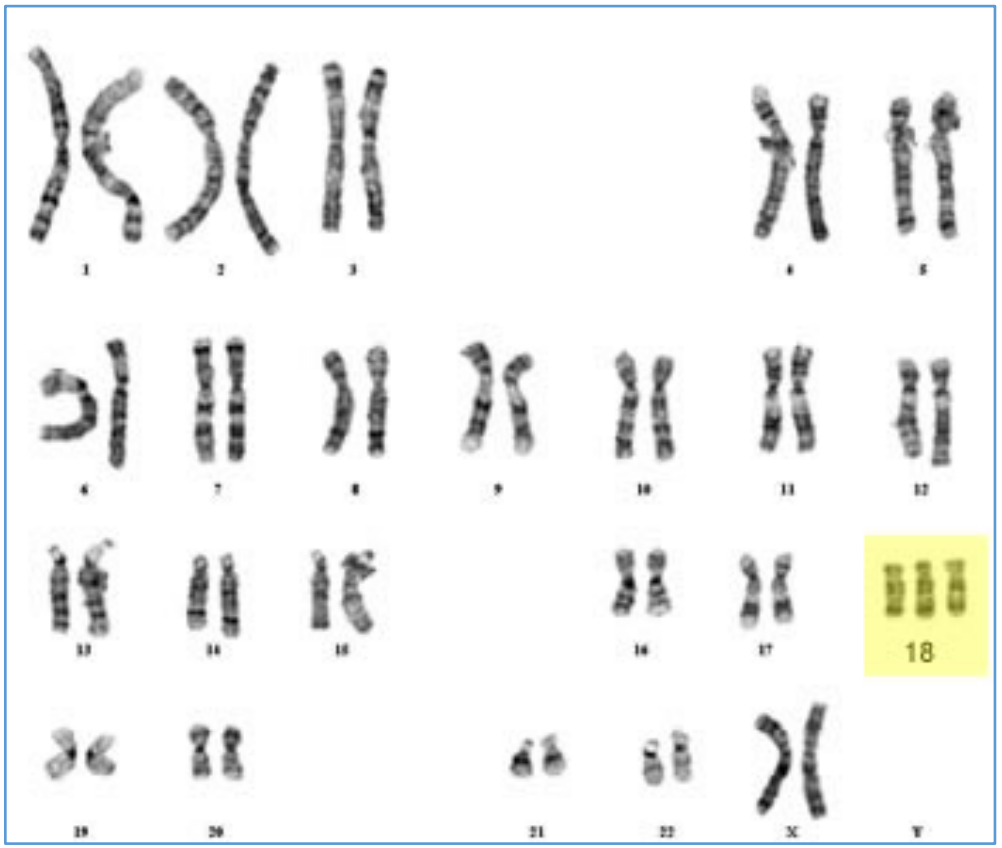
Chromosomenuntersuchungen – Zytogenetische Analyse

Vorbeugeuntersuchung – fetale Chromosomen

Down-Syndrom



Edwards-Syndrom



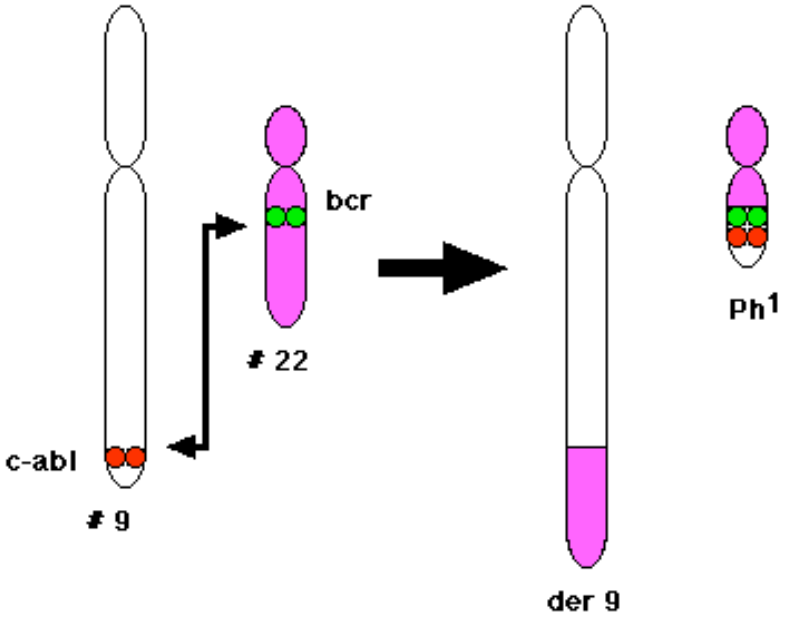
Chromosomenuntersuchungen - FISH

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Untersuchung der Deletion oder Lokalisation von bestimmten Genen

Spezifische Bindung von Fluoreszenz-markierten DNA-Sonden (Komplementärstruktur)

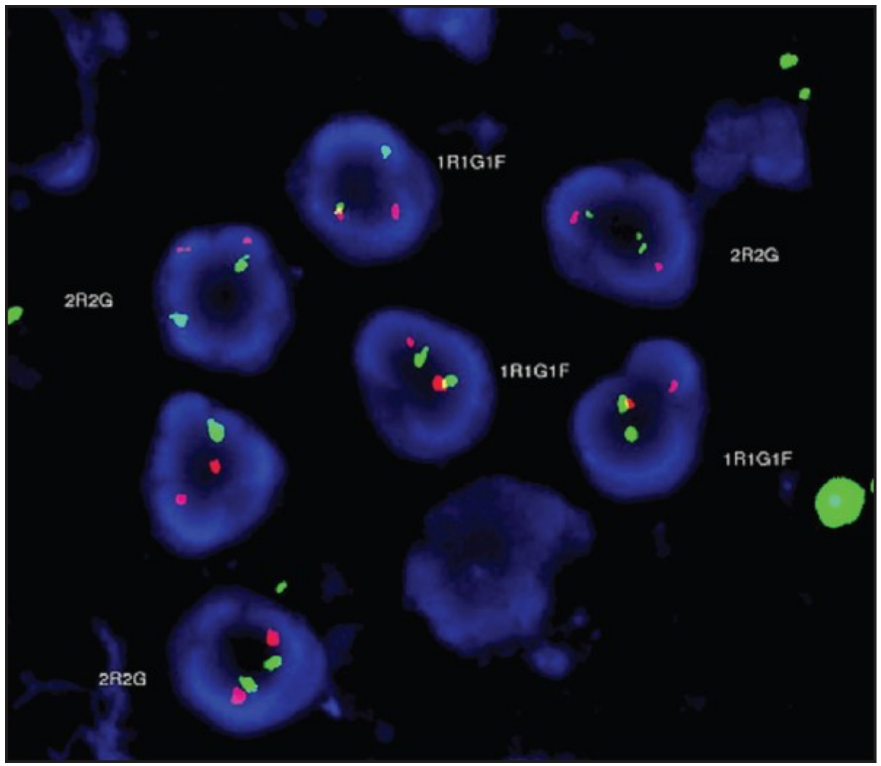
Analyse von Tumorzellen - Leukämiediagnostik!

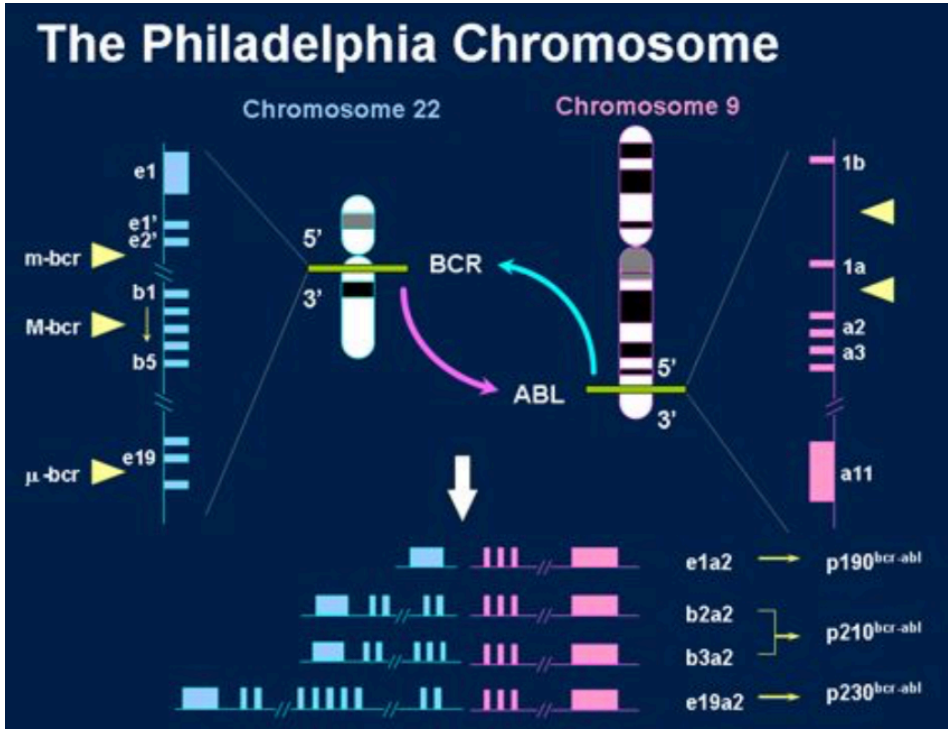


http://www.biology-pages.info/C/CML.html

http://www.wikiwand.com/en/Chromogenic_in_situ_hybridization

Chromosomenuntersuchungen - FISH





https://es.pinterest.com/explore/chromosomal-translocation/

Weitere Unterschiede in der feineren DNA-Struktur

Unterschiede in der DNA ≠ Unterschiede in der Funktion

Mutation: betrifft < 1 % der Population

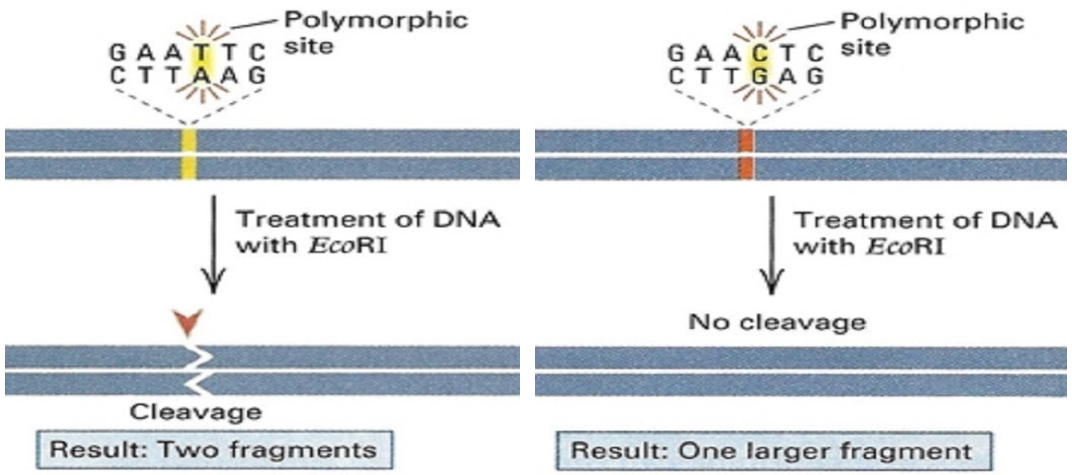
Polymorphismus: betrifft > 6 % der Population

Genvarianten: betreffen 1 % - 6 % der Population

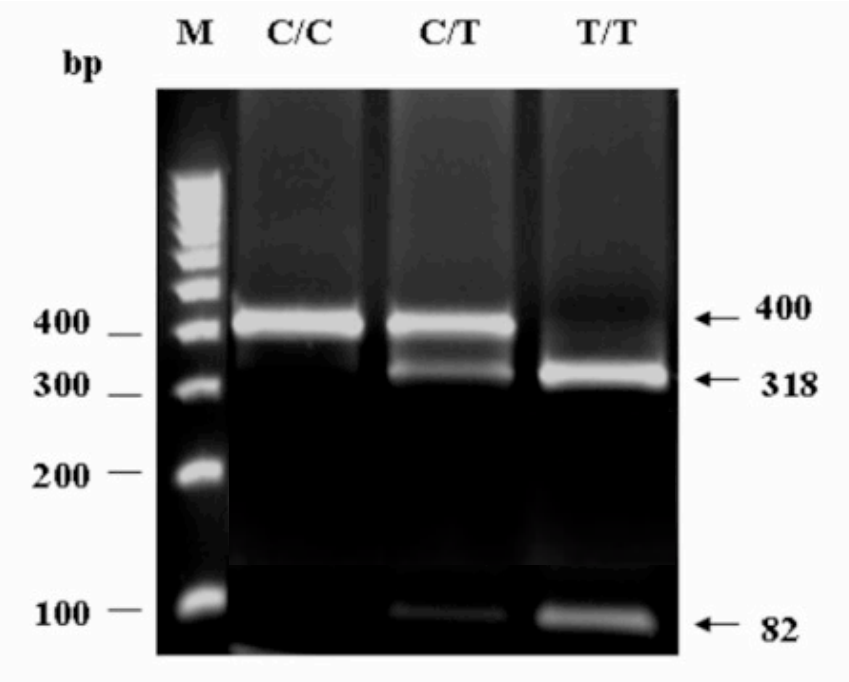
Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

1. DNA-Extraktion und PCR-Amplifikation des Genabschnitts

2. Restriktionsverdau mit Endonukleasen und Analyse durch Gelelektrophorese
   (Trennung nach Größe und Analyse mit DNA-Färbung)



Mutante *wt*



Färbung mit Ethidiumbromid (UV)

https://www.youtube.com/watch?v=UcA9W7BbacQ

Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

Beispiel:

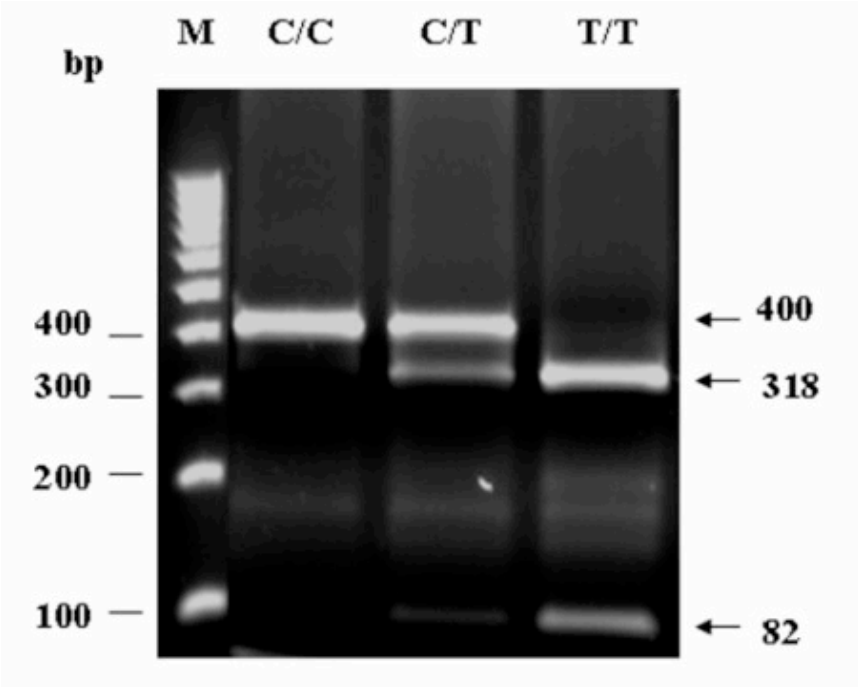
MTHFR-Varianten (Polymorphismus)

(Methyltetrahydrofolatreduktase)

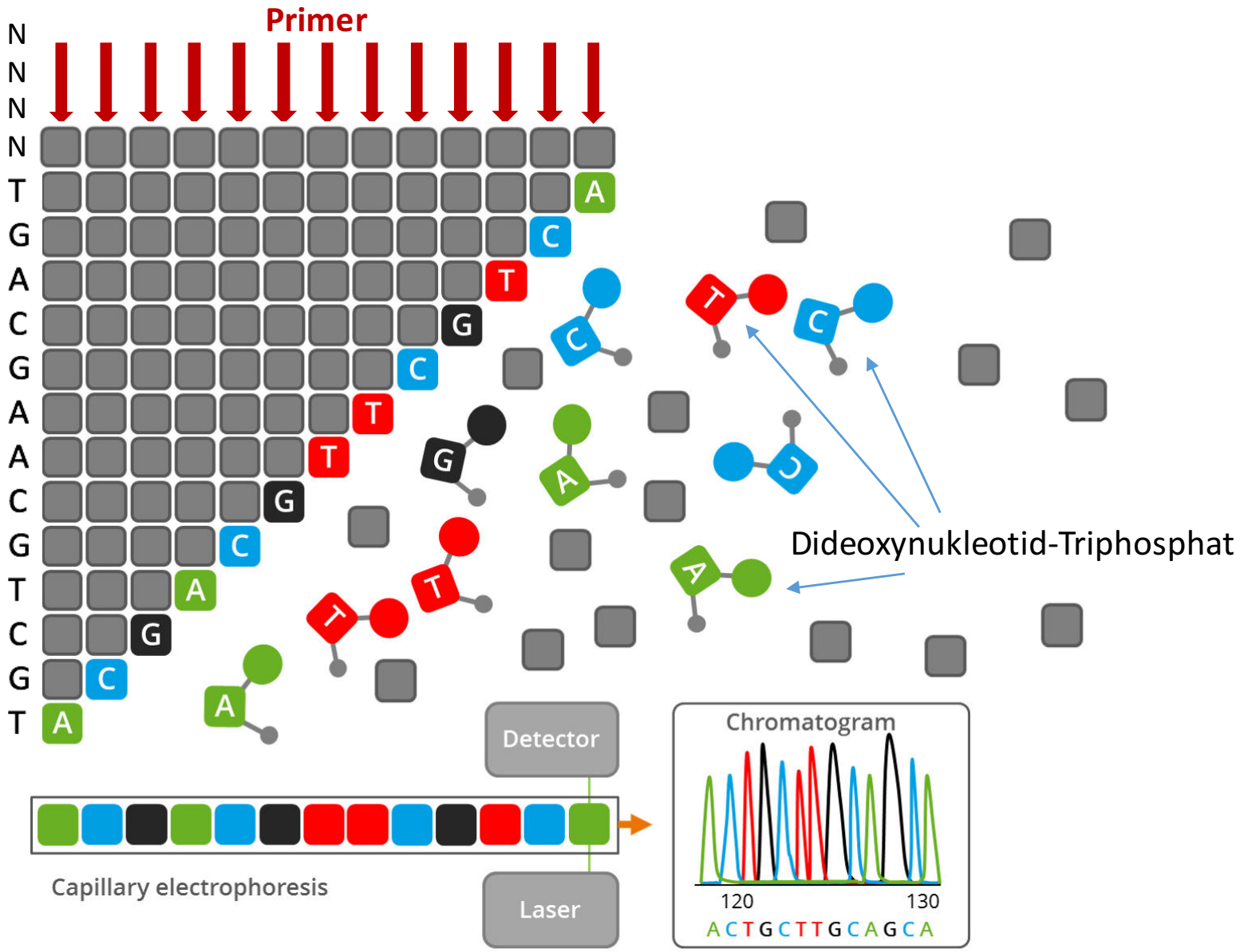
Hohes Thrombose-Risiko

Arteriosclerose

Homozygot: 4 – 10 % in Europa



Sequenzierung der DNA – Sanger-Methode



Sequenzierung der DNA

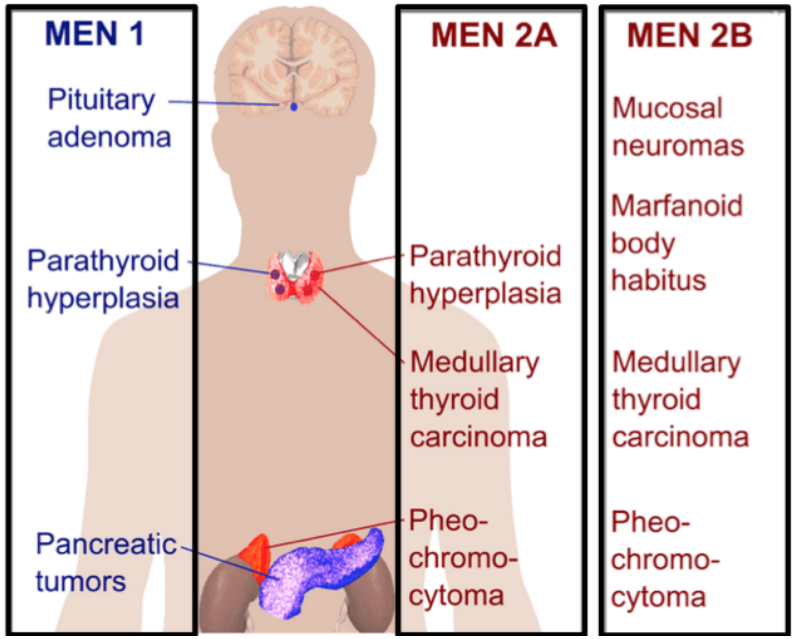
Beispiele:

1. Kontrolle der CFTR-Sequenz im Fetus

   1 : 3000 in Europa

   25 häufige Mutationen

2. Identifizierung der Mutationen in MEN1 und MEN2 (Multiple endocrine neoplasia type 1 and 2)



http://www.medical-institution.com/multiple-endocrine-neoplasia-men-mnemonic/

Sequenzierung der DNA

3. Identifizierung der Mutationen in BRCA1 und 2 (Breast Cancer Gene 1 und 2)

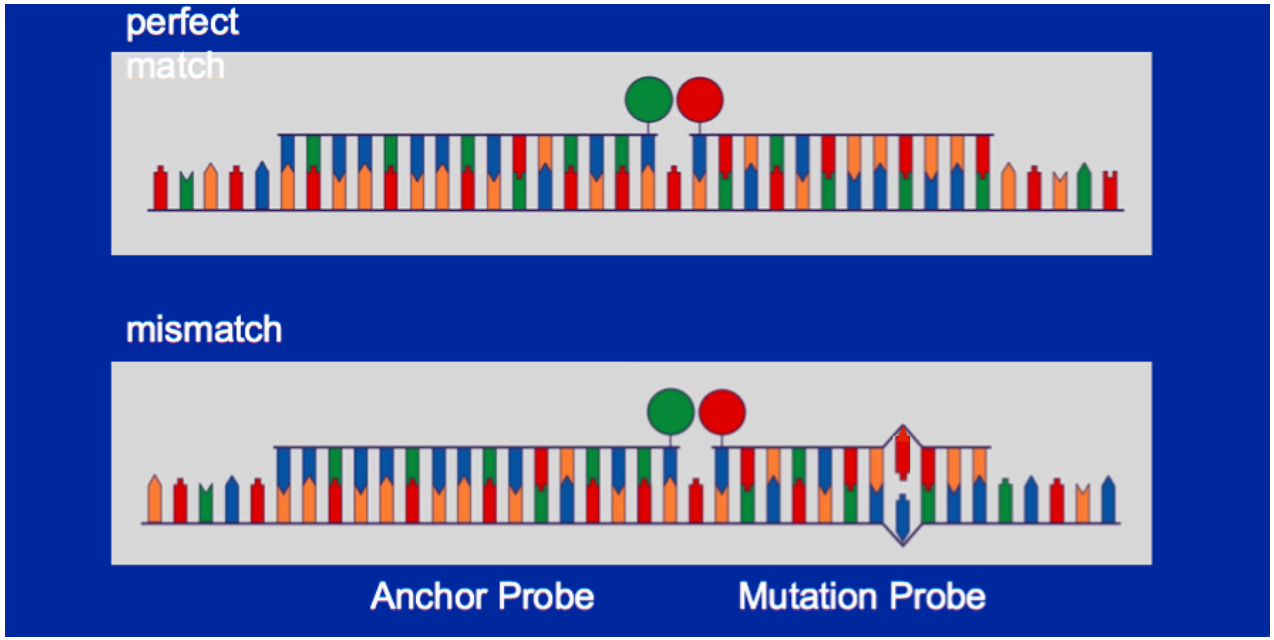
Wahrscheinlichkeit der Krebsentwicklung in der Brust und im Ovarium:

16– 85 %

Schmelztemperaturanalyse zur Mutationenidentifizierung

1. Amplifikation des Gensegments

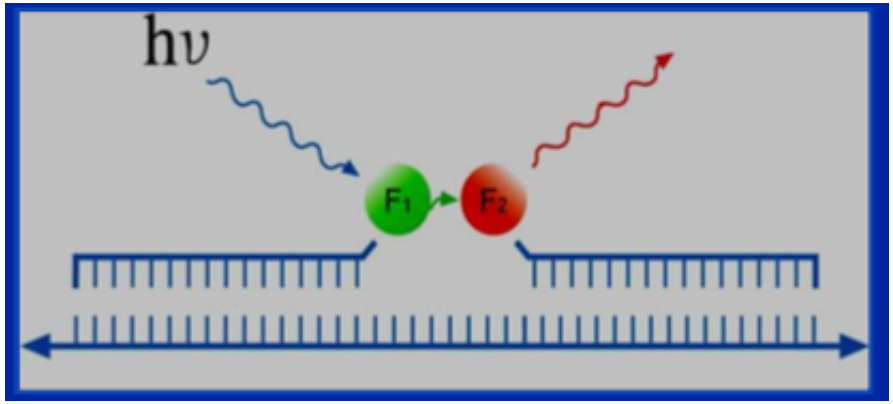
2. Probenhybridisierung:

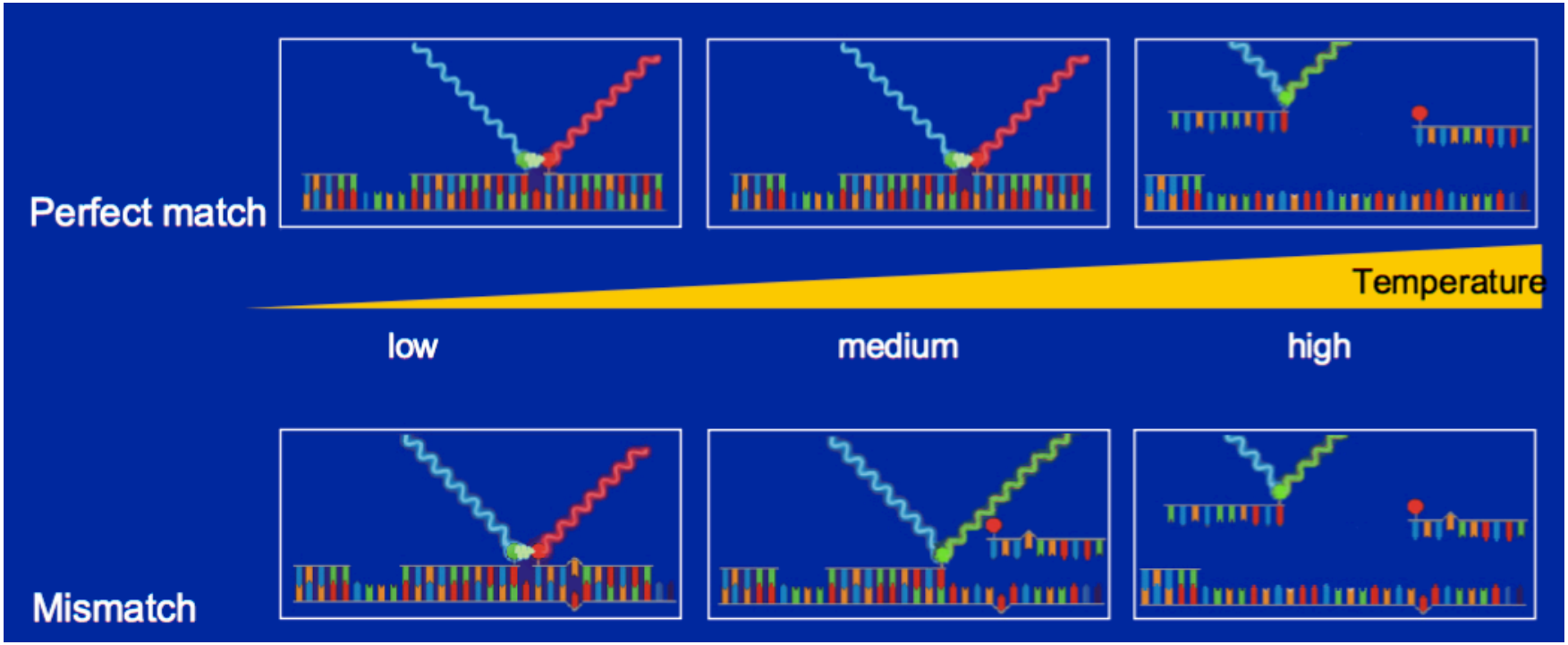


http://core.nhri.org.tw/userfiles/file/Roche%20SNP%20genotyping.pdf

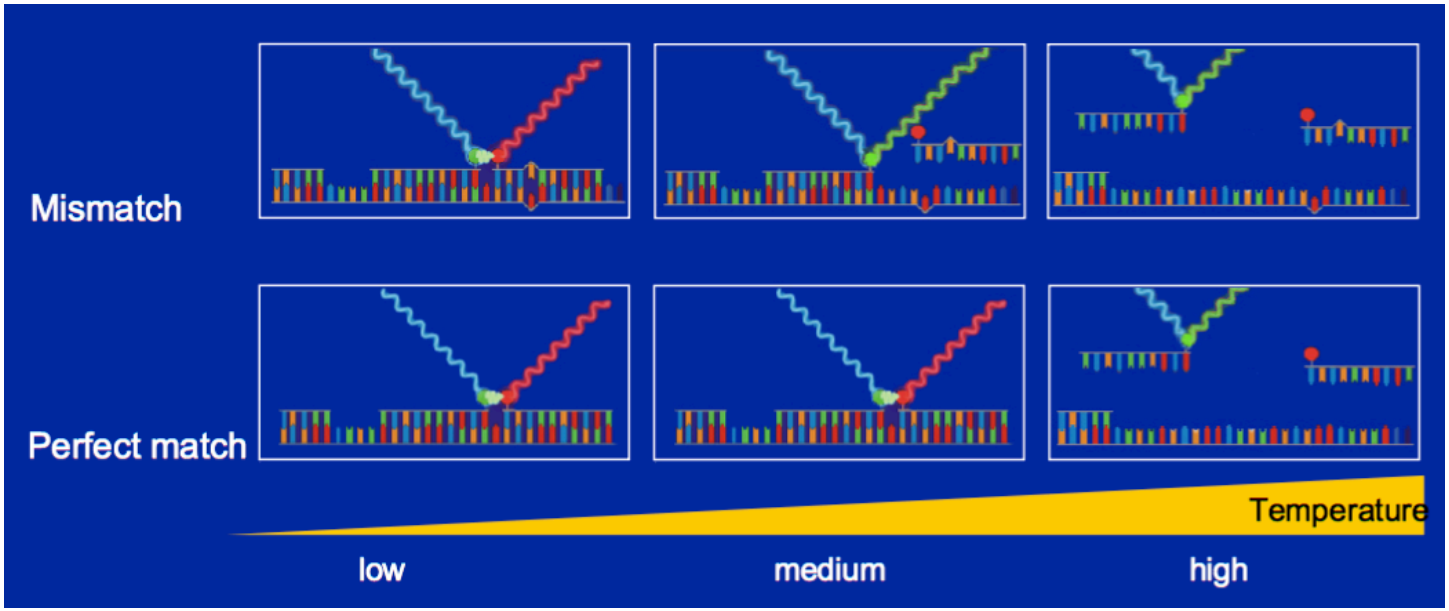
Schmelztemperaturanalyse zur Mutationenidentifizierung

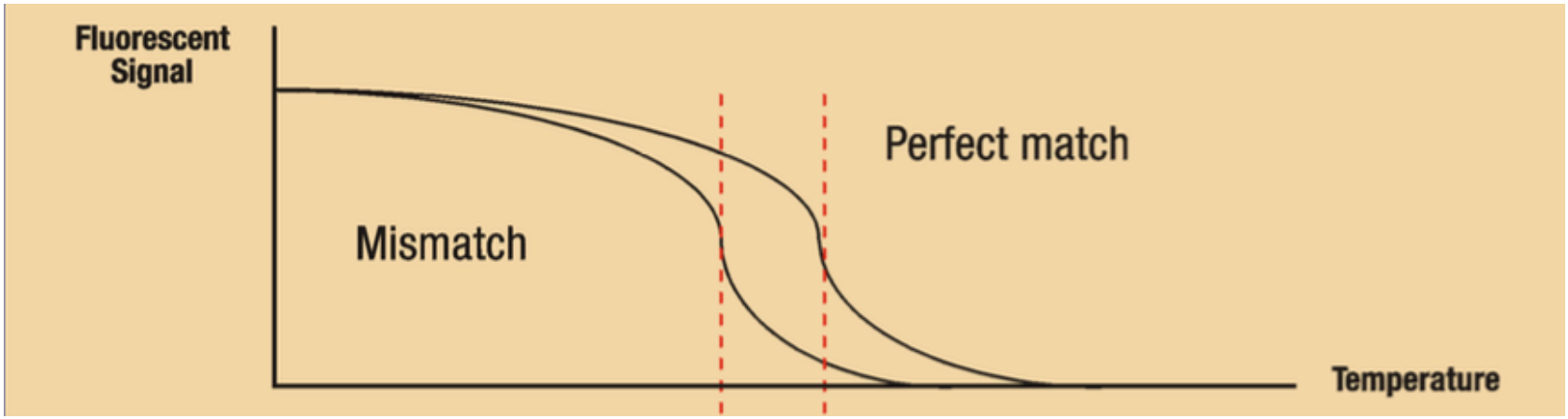
3. FRET-Analyse:





Schmelztemperaturanalyse zur Mutationenidentifizierung





Schmelztemperaturanalyse zur Mutationenidentifizierung

Beispiele:

1. MTHFR-Mutation

2. Leiden-Mutation

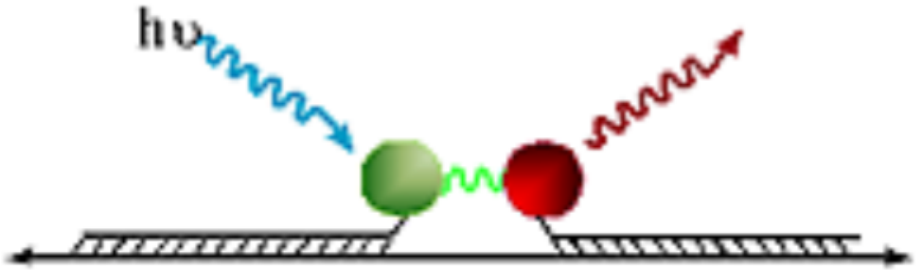
   betrifft 8 % der Population in Ungarn

   bei Heterozygoten ist das Thromboserisiko 5 x

   bei Homozygoten 50 x

Nachweis spezifischer DNA durch FRET-Analyse

1. Amplifikation von spezifischen DNA-Segmenten
2. Hybridisierung von DNA-Sonden mit Fluorophoren
3. Fluorszenz-Analyse bei verschiedenen Wellenlängen



Keine spezifische Bindung der Sonden → grünes Licht wird detektiert

Nachweis spezifischer DNA durch FRET-Analyse

Beispiel:

Mikrobenidentifizierung aus Blutproben in Sepsis (Sepsispanel)

ermöglicht eine spezifische Therapie in 2-3 Stunden

Gram-negativ	*Gram-positiv*	*Pilz*
Escherichia coli	*Staphylococcus aureus*	*Candida albicans*
Klebsiella (pneumoniae/oxytoca)	CoNS[1]	*Candida tropicalis*
Serratia marcescens	*Streptococcus pneumoniae*	*Candida parapsilosis*
Enterobacter (cloacae/aerogenes)	*Streptococcus spp.*[2]	*Candida glabrata*
Proteus mirabilis	*Enterococcus faecium*	*Candida krusei*
Pseudomonas aeruginosa	*Enterococcus faecalis*	*Aspergillus fumigatus*
Acinetobacter baumannii [3]		
Stenotrophomonas maltophilia		

Bestimmung der Transkriptmengen durch real-time PCR

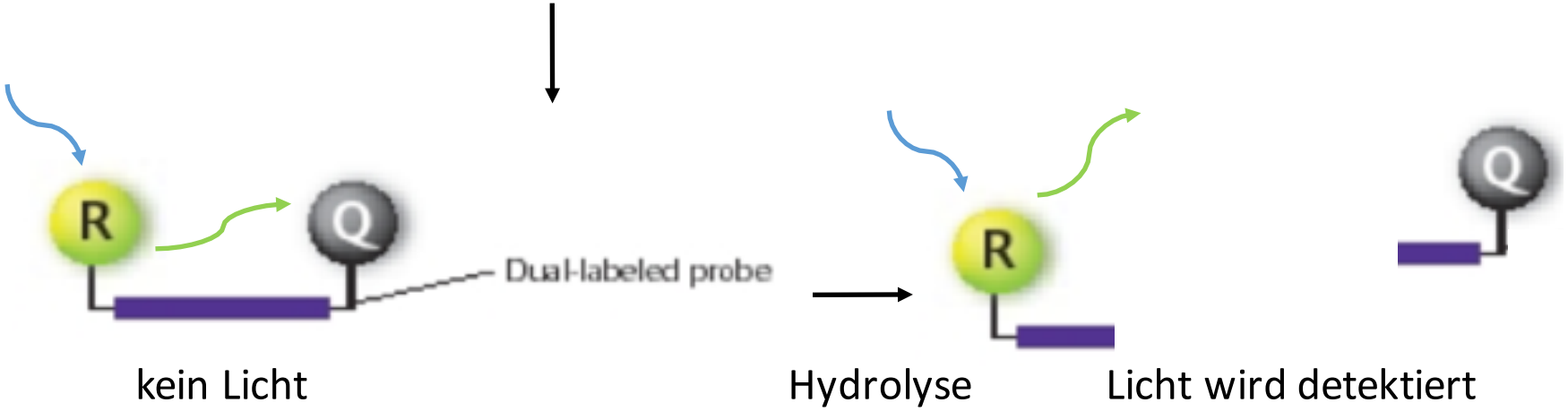
Methode:

1. RNA extraktion aus den Patientenzellen

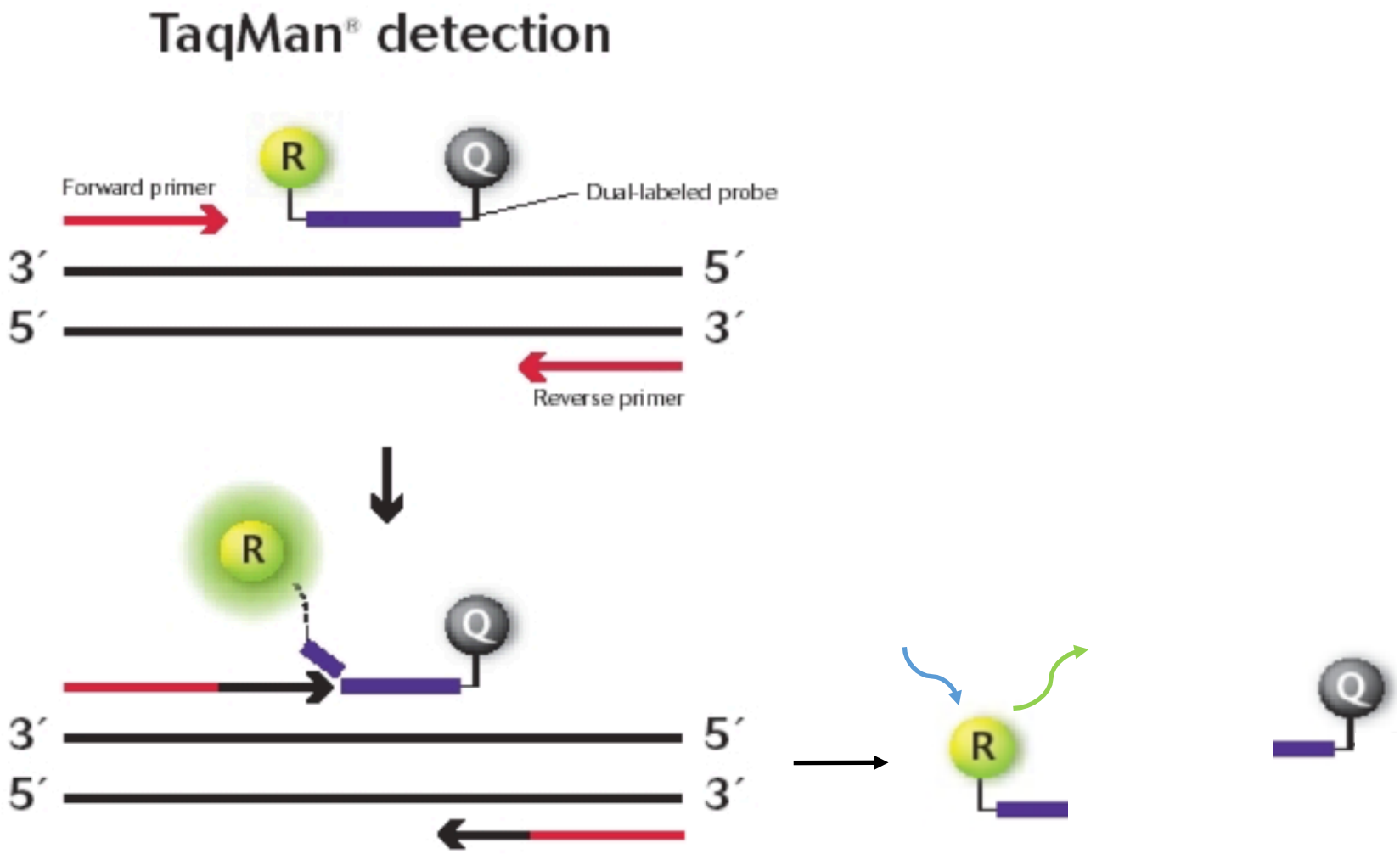
2. cDNA-Synthese

3. Real-time PCR

2 Primer + 1 TaqMan-Probe

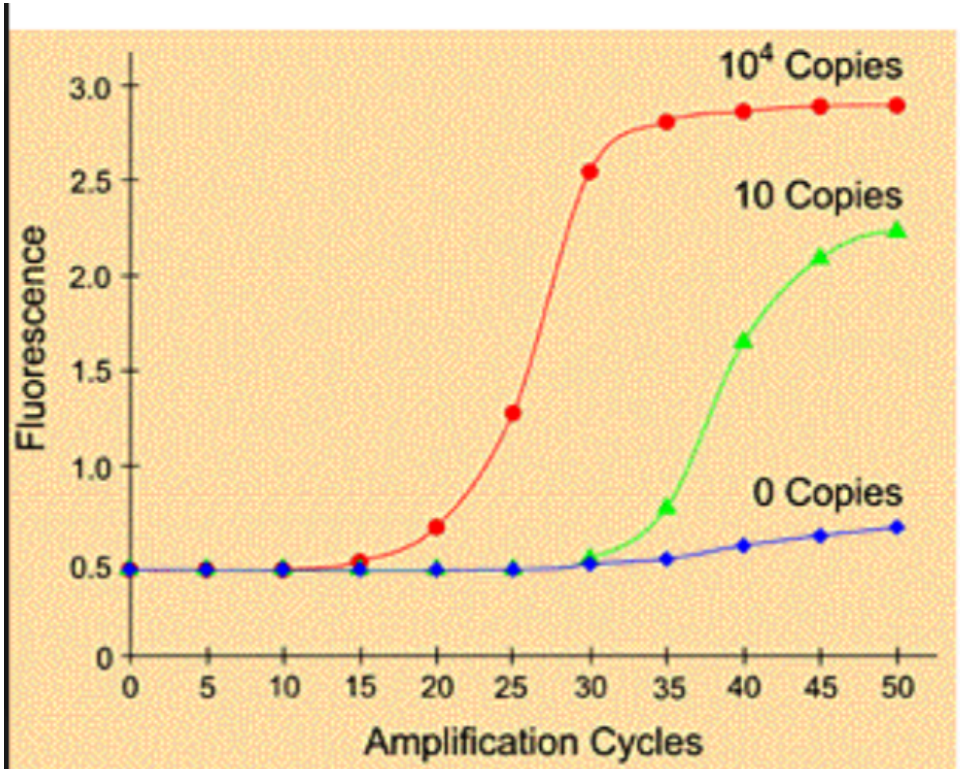


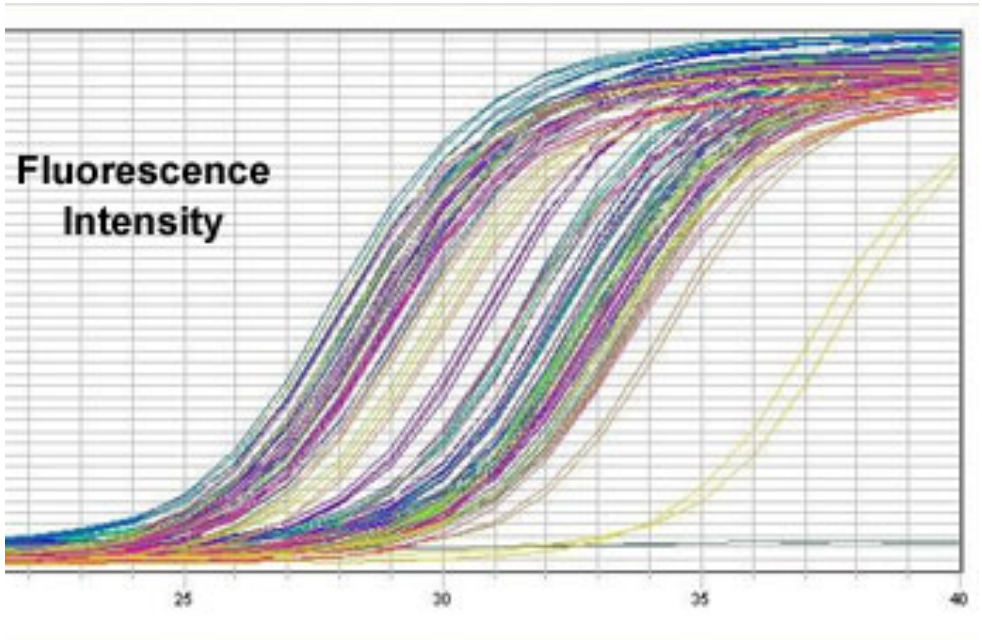
Bestimmung der Transkriptmengen durch real-time PCR



Polymerase spaltet

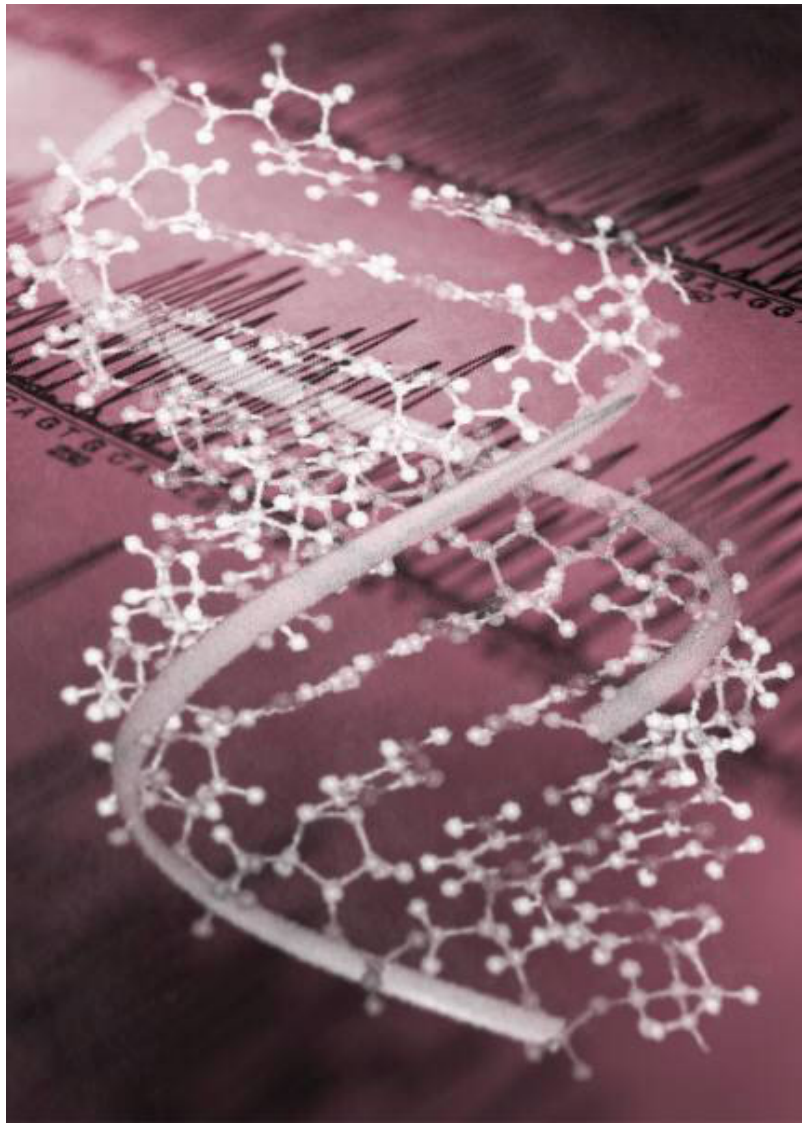
Bestimmung der Transkriptmengen durch real-time PCR





größere Templatmenge → Fluorszenzzunahme früher (weniger Zyklen)

Beispiel: Messung der Transkriptmenge vom BCR-ABL-Fusionsgen

Monitorisierung der Wirksamkeit der Therapie in ALL und CML

Vielen Dank!