

Script zum Wahlfach Humangenetik

Prof. Dr. med. J. Lemke
Universitätsklinikum Leipzig AÖR
Institut für Humangenetik
Phillip-Rosenthal-Str. 55
04103 Leipzig

Inhalt

1. Zeitplan.....	2
2. Einleitung.....	4
3. Humangenetische Beratung.....	5
3.1. Definition (American Society of Human Genetics, 1974)	5
3.2. Regelung des Ablaufs („S2-Leitlinie Humangenetische Diagnostik“ des Berufsverbandes Deutscher Humangenetiker, 2011)	5
3.3. Qualifikation des humangenetischen Beraters.....	5
3.4. Anlässe für humangenetische Beratung mit Beispielen	5
3.5. Ein Beispiel	6
4. Laboranalysen und Laborbefunde.....	8
4.1. Molekulargenetik	8
4.1.1. DNA-Extraktion	8
4.1.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	9
4.1.3. Agarose-Gel-Elektrophorese	11
4.1.4. Sequenzierung mittels Kettenabbruchmethode nach Sanger	12
4.1.5. Fragmentanalyse zur Bestimmung der Elternschaft	13
4.1.6. Next-Generation-Sequencing (Laborteil, nur theoretisch)	14
4.1.7. Next-Generation-Sequencing (Bioinformatik, Variantenanalyse)	15
4.1.8. Molekulargenetische Befunde (nach S2-Leitlinie)	15
4.2. Zytogenetik.....	17
4.2.1. Karyotypisieren	17
4.2.2. Terminologie:	17
4.2.3. Zuordnung zu den Gruppen A-G:	17
4.3. Molekulare Zytogenetik (Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung - FisH)	18
4.3.1. Prinzip.....	18
4.3.2. Arten von FisH-Sonden	18
4.4. Array	19
4.4.1. Grundprinzip	19
4.4.2. SNP-Array	19

1. Zeitplan

Woche 1 (6 Studierende) 19.07.-23.07.2021

	Montag		Dienstag		Mittwoch		
					1	2	3
08 ⁰⁰	Einleitung		Zytogenetik		Auswertung NGS		
09 ⁰⁰	Beratung, Stammbaum				PAUSE		
10 ⁰⁰							
11 ⁰⁰	PAUSE		PAUSE		Theorie PCR und Sanger		
			Theorie NGS		PCR-Ansatz Sanger	Gel gießen	PCR-Ansatz Fingerprint
12 ⁰⁰	DNA-Isolierung				ExoSAP-Reinigung	Gel beladen und starten	Sequenzer beladen
	Theorie DNA-Isolierung				PCR-Ansatz Fingerprint	PCR-Ansatz Sanger	Gel gießen
13 ⁰⁰	DNA-Messung			Beratung (1 Studierender)	Sequenzer beladen	ExoSAP-Reinigung	Gel beladen und starten

	Donnerstag				Freitag
	1	2	3		
08 ⁰⁰					Journal Club (online)
	Gel gießen	PCR-Ansatz Fingerprint	PCR-Ansatz Sanger		
09 ⁰⁰	Gel beladen und starten	Sequenzer beladen	ExoSAP-Reinigung	Beratung (1 Studierender)	NGS Befunde
	Seq-PCR ansetzen	Gel fotografieren	Daten Fingerprint		
10 ⁰⁰	Daten Fingerprint	Seq-PCR ansetzen	Gel fotografieren	Beratung (1 Studierender)	
	Gel fotografieren	Daten Fingerprint	Seq-PCR ansetzen		
11 ⁰⁰	PAUSE				PAUSE
	Auswertung Sanger/Fingerprint			Beratung (1 Studierender)	Abschluss, Benotung, Feedback
12 ⁰⁰					
	Fragen				
13 ⁰⁰	Protokoll				

Gelb /Blau = Seminarraum (Dr. K. Platzer)

Grün = Labor Molekulargenetik und Seminarraum (Dr. J. Hentschel und MOL-Team)

Rosa = Zytogenetik/Array, Seminarraum (Dr. S. Schubert)

Orange = Semmelweisstr. 14 DG (Dr. V. Strehlow)

Woche 2 (3 Studierende) 26.07.-30.07.2021

	Montag	Dienstag		Mittwoch	Donnerstag		Freitag
08 ⁰⁰							Journal Club (online)
	Einleitung	Zytogenetik		Auswertung NGS	ExoSAP-Reinigung		
09 ⁰⁰	Beratung, Stammbaum				Seq-PCR ansetzen	Beratung (1 Studiender)	
					PCR-Ansatz Fingerprint		NGS Befunde
10 ⁰⁰					Sequenz beladen	Beratung (1 Studiender)	
				PAUSE	Daten Fingerprint		
11 ⁰⁰		PAUSE		Theorie PCR und Sanger	PAUSE		PAUSE
	PAUSE	Theorie NGS		PCR-Ansatz Sanger	Auswertung Sanger/Fingerprint		Abschluss, Benotung, Feedback
12 ⁰⁰	DNA-Isolierung			Gel gießen			
	Theorie DNA-Isolierung			Gel beladen und starten	Fragen		
13 ⁰⁰	DNA-Messung		Beratung (1 Studiender)	Gel fotografieren	Protokoll		

Gelb /Blau = Seminarraum (Dr. Popp, Dr. Jamra, Dr. Hentschel)

Grün = Labor Molekulargenetik und Seminarraum (Dr. J. Hentschel und MOL-Team)

Rosa = Zytogenetik/Array, Seminarraum (Dr. S. Schubert)

Orange = Semmelweisstr. 14 DG (Dr. V. Strehlow)

2. Einleitung

Liebe WahlfachteilnehmerInnen,

Das Fach Humangenetik ist eine verhältnismäßig junge und ausgesprochen interaktive Teildisziplin der Medizin. Da erblich bedingte Erkrankungen jedes Organsystem betreffen können, bestehen Berührungspunkte zu quasi allen medizinischen Fachrichtungen. Im Gegensatz zu den meisten anderen vorrangig diagnostischen Fächern ist der direkte Patientenkontakt im Rahmen genetischer Beratungen ein wichtiger Bestandteil der humangenetischen Patientenversorgung. Die ärztliche Tätigkeit eines Humangenetikers umfasst somit das Beurteilen und die Interpretation molekulargenetischer und zytogenetischer Laborresultate, das Erstellen der dazugehörigen medizinischen Befunde sowie das Abhalten von Sprechstunden, in welchen u.a. diese Befunde den Patienten bzw. Ratsuchenden mitgeteilt und erläutert werden.

In der Wahlfachveranstaltung möchten wir nun einen etwas genaueren Einblick in das Tätigkeitsspektrum eines Humangenetikers geben. Dabei sollen einerseits verschiedene ärztliche Aspekte der konkreten Patientenversorgung näher gebracht werden. Andererseits sollen verschiedene Tätigkeiten und Analysen im molekulargenetischen und im zytogenetischen Labor einen Eindruck des Spektrums der humangenetischen Labordiagnostik vermitteln. Da die Humangenetik in den letzten Jahren eine rasante technische Weiterentwicklung in der molekularen Diagnostik erlebte, möchten wir in der Wahlfachveranstaltung auch explizit auf diese Neuerungen eingehen und z. Bsp. die Methodik des *Next Generation Sequencing* (bzw. Hochdurchsatzsequenzierung) genauer erklären. Hiermit ist es bereits heute möglich, sehr große Bereiche des menschlichen Erbguts in sehr kurzer Zeit routinemäßig zu analysieren, und es ist zu erwarten, dass diese Methodik in den kommenden Jahren noch weiter an Bedeutung gewinnen wird.

Wir freuen uns auf die bevorstehende Woche und hoffen, hierdurch das Interesse an unserem Fach bei dem Einen oder Anderen wecken oder gar vertiefen zu können.

Das Team des Instituts für Humangenetik

3. Humangenetische Beratung

Die Humangenetik nimmt durch die genetische Beratung eine Schlüsselstelle für die verantwortungsvolle Anwendung genetischen Wissens in der klinischen Praxis ein. Das Ziel der angewandten Humangenetik ist die individuelle Entscheidungshilfe, d.h. die genetische Beratung ist nichtdirektiv.

3.1. Definition (American Society of Human Genetics, 1974)

Die Genetische Beratung ist ein Kommunikationsprozess, in dem menschliche Probleme behandelt werden, die mit dem Auftreten oder der Möglichkeit des Auftretens einer Erbkrankheit in einer Familie zusammenhängen. Dieser Prozess beinhaltet das Bemühen einer oder mehrerer entsprechend ausgebildeter Personen [humangenetische Berater], einem einzelnen oder einer Familie [Ratsuchende] dazu zu verhelfen,

- medizinische Fakten einschließlich Diagnose, Krankheitsverlauf und Behandlungsmöglichkeiten zu verstehen;
- die Bedeutung von Erbfaktoren in der Ätiologie einer Erkrankung zu verstehen und Erkrankungsrisiken für bestimmte Verwandte richtig einzuschätzen;
- die Entscheidungsmöglichkeiten bei der Verarbeitung von Erkrankungsrisiken zu verstehen (Entscheidungsalternation);
- eine individuell angemessene Verhaltensweise zu wählen;
- die bestmögliche Einstellung zu der Erkrankung eines betroffenen Familienmitgliedes beziehungsweise zu der Möglichkeit des Wiederauftretens einer Erkrankung zu gewinnen.

3.2. Regelung des Ablaufs („S2-Leitlinie Humangenetische Diagnostik“ des Berufsverbandes Deutscher Humangenetiker, 2011)

- Die Beratung ist freiwillig.
- Die Ratsuchenden sollen nach Vorabinformation über Ziele und Vorgehensweise der Beratung ihr Einverständnis zur Durchführung der Beratung schriftlich geben.
- Es gelten Rahmenbedingungen wie für ärztliche Maßnahmen (Datenschutz, Schweigepflicht, Aufklärungspflicht).
- Informationen sollten auch schriftlich gegeben werden (individueller Beratungsbrief).

3.3. Qualifikation des humangenetischen Beraters

Die Voraussetzung für die selbstständige und verantwortungsvolle Durchführung humangenetischer Beratung haben:

- Fachärzte für Humangenetik
- Ärzte mit der Zusatzbezeichnung „Medizinische Genetik“

3.4. Anlässe für humangenetische Beratung mit Beispielen

Geburt eines Kindes mit einer angeborenen Erkrankung oder Entwicklungsstörung

z.B. der erste Sohn eines Paares hat ein Smith-Lemli-Opitz-Syndrom. Das ratsuchende Paar möchte sich danach erkundigen, wie hoch das Wiederholungsrisiko für weitere Kinder ist bzw. was die Möglichkeiten der Pränataldiagnostik in weiteren Schwangerschaften sind.

z.B. ein 3-jähriger Junge hat eine starke psychomotorische Entwicklungsverzögerung, Mikrozephalie und weitere Auffälligkeiten. Die Eltern möchten sich danach erkundigen, ob die Auffälligkeiten einem gemeinsamen Syndrom zugeordnet werden können und wie das Wiederholungsrisiko für weitere geplante Kinder ist. Syndrome sind in einer geschlossenen Einheit gemeinsam auftretende („zusammen laufende“) pathologische Phänomene. Der Begriff wird in der Medizin unterschiedlich verwendet

Erkrankungen oder Entwicklungsstörungen bei Verwandten

z.B. eine 42-Jährige Patientin hat folgende Familiengeschichte: Ihr älterer Bruder verstarb mit 35 Jahren an Darmkrebs, ihr jüngerer Bruder erkrankte mit 32 Jahren an Darmkrebs. Ihre Mutter erkrankte mit 43 Jahren an Darmkrebs und verstarb daran mit 46 Jahren. Ihr Großvater mütterlicherseits erkrankte mit 52 Jahren an Darmkrebs. Ihr Großvater väterlicherseits erkrankte mit 69 Jahren an Darmkrebs. Die Ratsuchende erkundigt sich danach, ob in ihrer Familie eine erbliche Neigung zu Darmkrebs vorliegt und wie ihr eigenes Darmkrebsrisiko einzuschätzen ist.

z. B. das 5-jährige Kind des Bruders eines 25-jährigen Ratsuchenden hat eine zystische Fibrose. Die Ratsuchenden fragen für weitere Kinder nach dem Wiederholungsrisiko.

Altersbedingte Risiken

z.B. eine 42-jährige Ratsuchende ist schwanger und möchte sich danach erkundigen, ob sie erhöhte Risiken für ein Kind mit Down-Syndrom hat bzw. ob eine Pränataldiagnostik durchgeführt werden kann.

Blutsverwandtschaft

z.B. eine Gynäkologin überweist ein aus dem Libanon stammendes Ehepaar zur humangenetischen Beratung. Die junge Frau befindet sich in der 8. Schwangerschaftswoche ihrer ersten Schwangerschaft. Sie ist doppelt mit ihrem Ehemann verwandt (Cousin und Cousine ersten Grades sowie Cousin und Cousine zweiten Grades). Den Eheleuten sollen die erhöhten Risiken erläutert werden, die sich aus ihrer Verwandtschaft ergeben.

Habituelle Aborte, Totgeburten

z.B. eine 33-Jährige hat Kinderwunsch. Sie hatte bereits zwei Aborte, auch in der mütterlichen Familie sind Aborte aufgetreten. Der Ratsuchenden werden mögliche genetisch bedingte Ursachen der Aborte erläutert und eine Chromosomenanalyse angeboten.

Pränatal diagnostizierte Auffälligkeiten

z.B. bei einer 38-jährigen Schwangeren wurde aus Altersindikation eine Amniozentese durchgeführt. Es ergab sich der Karyotyp 47,XXX. Die Schwangere und ihr Partner möchten sich nach der Bedeutung dieses Befundes für das werdende Kind erkundigen.

Störungen der Fertilität

z.B. ein Ehepaar wird in der Fertilitätssprechstunde betreut, da die Eheleute seit 3 Jahren unerfüllten Kinderwunsch haben. Im Rahmen der Abklärung wurde beim Ehemann der Karyotyp 47,XXY diagnostiziert. Die Ratsuchenden möchten sich in einer humangenetischen Beratung nach der Bedeutung dieses Befundes für die Gesundheit des Ehemannes und die weitere Familienplanung erkundigen.

Teratogene und mutagene Einflüsse

z.B. Eine Ratsuchende hat in Unkenntnis einer bei ihr bestehenden Schwangerschaft eine Röteln-Auffrischimpfung durchführen lassen. Sie erkundigt sich nach (teratogenen) Risiken für das werdende Kind.

z.B. bei einem 36-Jährigen wurden in der Vergangenheit aufgrund eines Morbus Hodgkin eine Strahlentherapie und Chemotherapie durchgeführt. Er hat Kinderwunsch und erkundigt sich nach evtl. (mutagenen) Risiken, die sich aus der Behandlung ergeben.

3.5. Ein Beispiel

- Ein junges Ehepaar kommt zur humangenetischen Beratung.
- Klärung des Beratungsziels: Kind mit Entwicklungsverzögerung (sprachlich und motorisch) und Mikrozephalie
- Erhebung der persönlichen Anamnese und der Familienanamnese
- Bewertung vorliegender ärztlicher Befunde/Befundberichte
- Ausführliche Information über die in Frage kommenden Erkrankungen oder Behinderungen
- Abschätzung genetischer Risiken
- Ggf. körperliche Untersuchung
- Ggf. Untersuchungen an Blut oder anderen Geweben

- Ausführliche Beratung über die möglichen Bedeutungen der Untersuchungsergebnisse
- Beratung über allgemeine genetische Risiken
- Pränatale und Prä-Implantationsdiagnostik
- Beratungsbrief

4. Laboranalysen und Laborbefunde

4.1. Molekulargenetik

4.1.1. DNA-Extraktion

Hintergrund:

Zunächst werden die Zellen aufgeschlossen und Proteine verdaut (Lyse, Proteinase K). Für die Extraktion der DNA nutzt man z.B. die Bindung der DNA an Silica-Oberflächen (Membranen oder Beads) unter bestimmten pH-Bedingungen (Abb. 1). Mit verschiedenen Waschpuffern, die z.T. auch Ethanol enthalten, werden Verunreinigungen entfernt. Abschließend wird die DNA durch pH-Sprung eluiert. Die Qualität/Ausbeute der DNA-Extraktion lässt sich photometrisch bestimmen (z.B. Nanodrop, Photometer). Nukleinsäuren haben ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm, Proteine bei 280 nm. Man bestimmt so die Gesamtmenge aller Nukleinsäuren. Um die Menge an doppelsträngiger DNA zu messen, verwendet man DNA-bindende Farbstoffe wie SYBR-Green und spezielle Messgeräte (Qubit).

Aufgabe:

Extrahieren Sie die DNA aus Ihrer Blutprobe. Dazu steht Ihnen ein Extraktionsgerät (MagCore) bzw. ein Säulchenkit zur Verfügung. Messen Sie anschließend die Ausbeute und Reinheit mittels Nanodrop und Qubit. Vergleichen und diskutieren Sie die Ergebnisse!

Durchführung:

s. SOP DNA-Extraktion

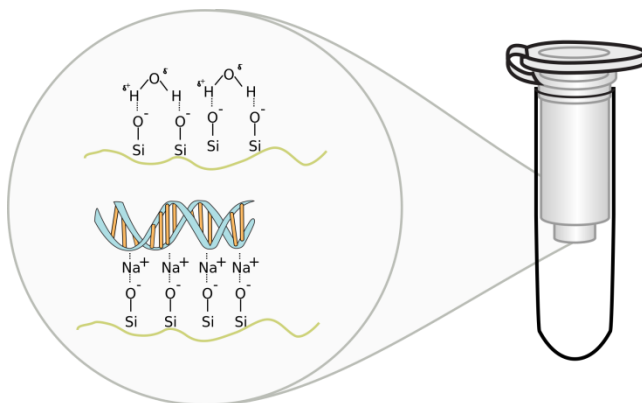


Abb. 1: Schematische Darstellung der DNA-Bindung an eine Silica-Membran (Qiagen)

Ergebnisse:

Probennummer	MagCore	
	Nanodrop	Qubit

4.1.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Hintergrund:

Für die meisten Analysen muss die Zielregion der DNA zunächst vervielfältigt werden. Dazu nutzt man die PCR. Man benötigt die Ausgangs-DNA, Primer (20-25 bp lange einzelsträngige DNA-Stücke, die an die Zielregion binden), dNTPs (Bausteine), Polymerase (Enzym, welches die Bausteine einbaut) und geeignete Pufferbedingungen.

Die PCR läuft in 3 immer wiederkehrenden Temperaturschritten (Zyklen) ab, s. Abb. 2:

1. Denaturierung bei 95-98 °C (doppelsträngige DNA wird in Einzelstränge aufgeschmolzen)
2. Annealing bei 55-65 °C (Primer binden an die Zielregion)
3. Extension bei 72 °C (Polymerase baut dNTPs ein)

Pro Zyklus wird die DNA verdoppelt. Es erfolgt eine exponentielle Amplifikation der Ausgangsregion (Abb. 3).

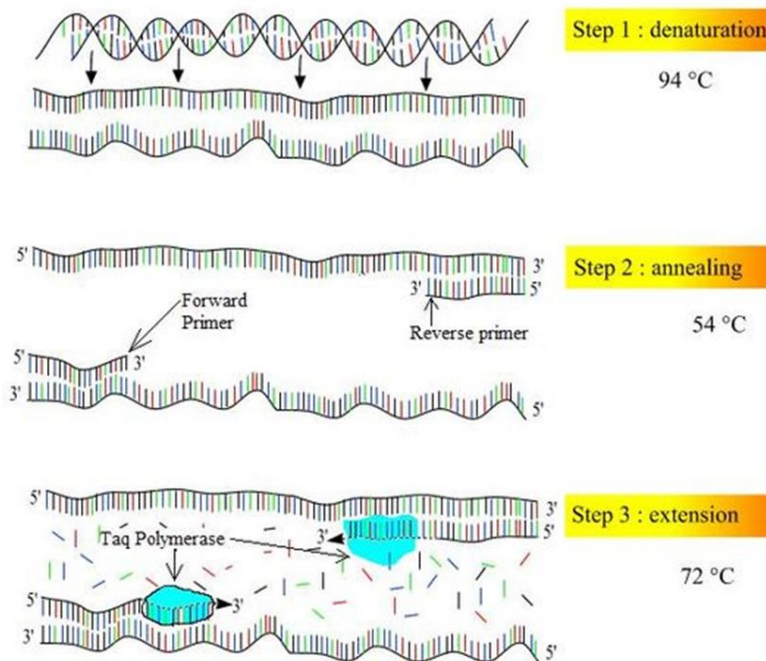


Abb. 2: Ablauf eines PCR-Zyklus (Abb. A. Vierstraete, 1999)

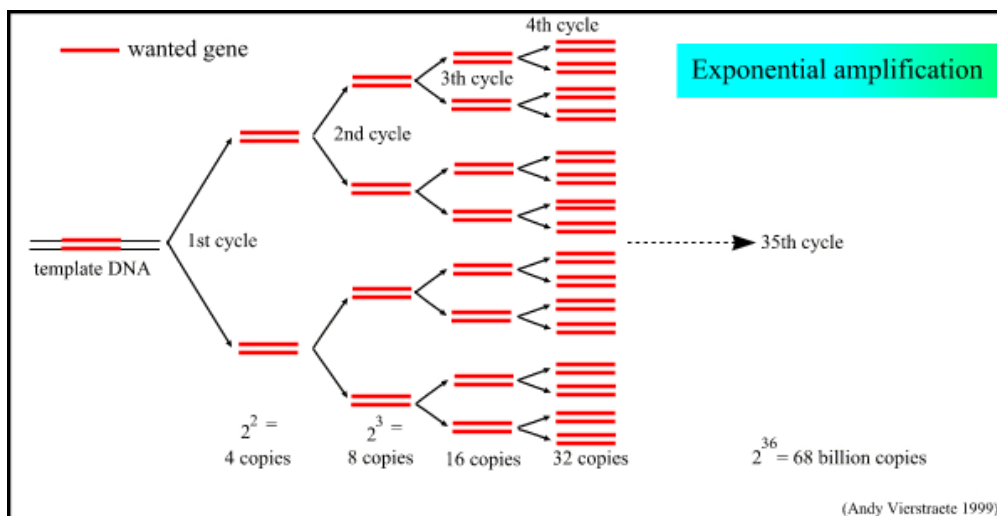


Abb.3: Darstellung der exponentiellen Amplifikation (Abb. A. Vierstraete, 1999)

Aufgabe:

- (A) Sie erhalten die DNA von einer Familie. Beim Kind war in der Hochdurchsatzanalyse (NGS) eine möglicherweise krankheitsrelevante Variante für eine dominante Erkrankung nachgewiesen worden. Sie haben nun die Primer für die entsprechende Zielregion erhalten und sollen prüfen, ob die Variante beim Kind neu entstanden ist (de novo).
- (B) Sie erhalten die DNA von einer Familie. Beim Index waren in der Hochdurchsatzanalyse (NGS) zwei möglicherweise krankheitsrelevante Varianten für eine rezessive Erkrankung nachgewiesen worden. Sie haben nun die Primer für die entsprechende Zielregion erhalten und sollen prüfen, wie die Variantenkonstellation bei den Eltern vorliegt, um Rückschlüsse zu erhalten, ob beim Kind eine compound-Heterozygotie vorliegt.

Durchführung der PCR:

s. Protokoll PCR

4.1.3. Agarose-Gel-Elektrophorese

Hintergrund:

DNA kann man aufgrund seiner elektrischen Ladung im elektrischen Feld auftrennen. Nutzt man dazu spezielle Matrices wie Agarose- oder Polyacrylamid-Gele, so wandern die DNA-Moleküle entsprechend ihrer Größe zum Plus-Pol (s. Abb. 4).

Aufgabe:

Überprüfen Sie in der Agarose-Gelelektrophorese das Ergebnis Ihrer PCR. Bewerten Sie die Größe anhand des mitgeführten Größenstandards und beurteilen Sie die Reinheit des PCR-Produktes sowie des Leerwertes. Dokumentieren Sie Ihre Ergebnisse anhand des beschrifteten Gelbildes!

Durchführung:

s. SOP

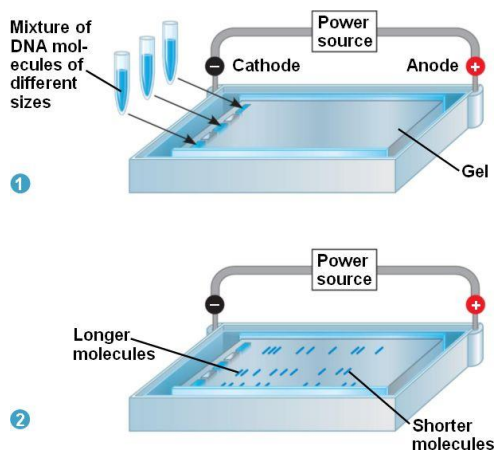


Abb. 4: Aufbau einer Gelelektrophorese

Dokumentation:

4.1.4. Sequenzierung mittels Kettenabbruchmethode nach Sanger

Hintergrund:

Die amplifizierte Fragmente der PCR werden nun aufgereinigt (ExoSAP) und einem zweiten PCR-Schritt unterzogen. Dabei verwendet man zusätzlich zu den dNTPs noch sogenannte Stoppnukleotide (ddNTPs, ja Base mit korrespondierendem Fluoreszenzfarbstoff markiert). Pro Zyklus werden nun zufällig dNTPs oder ddNTPs eingebaut. Wird ein ddNTP eingebaut, kann die Kette nachfolgend nicht mehr verlängert werden, das Fragment endet hier mit einem farbmarkierten Stoppnukleotid. Nach einer erneuten Aufreinigung (Fällung) können die Fragmente im elektrischen Feld aufgetrennt und durch eine CCD-Kamera sichtbar gemacht werden. Durch Farbkodierung und Lauflänge ergibt sich die Basenabfolge, die mittels spezieller Datenanalyse-Software (SeqPatient, JSI medical) abgelesen und mit der Referenzsequenz verglichen werden kann s. Abb. 5.

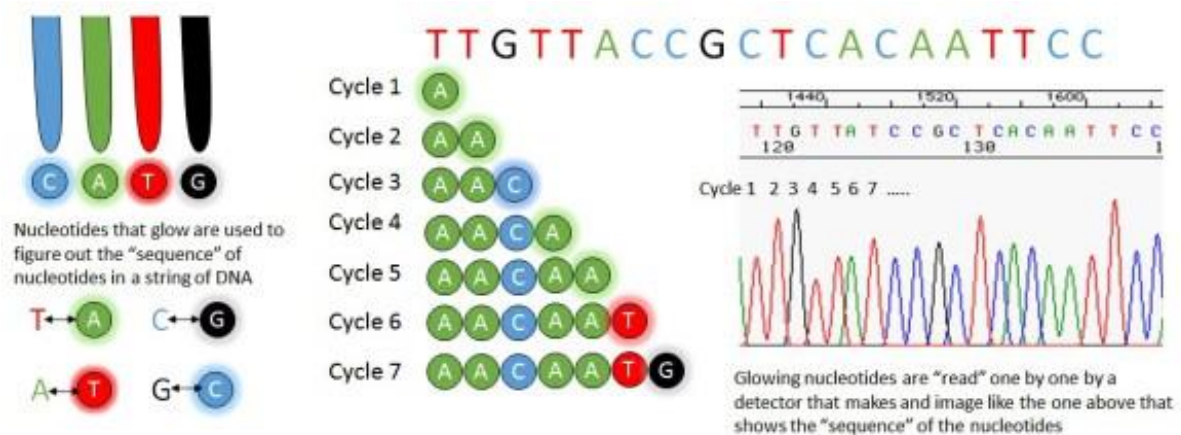


Abb. 5: Schema der Sanger-Sequenzierung

Aufgabe:

Sequenzieren Sie die in der PCR zuvor hergestellten PCR-Fragmente. Werten Sie die Ergebnisse im SeqPatient-Programm aus und dokumentieren Sie Ihre Ergebnisse. Beantworten Sie die Fragen (A) und (B) aus dem PCR-Teil!

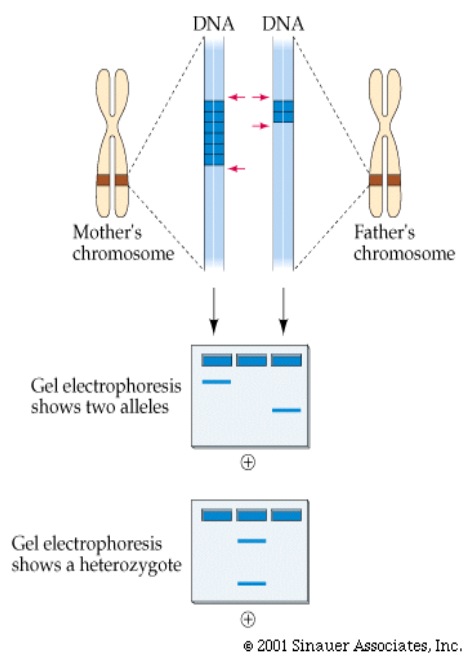
Durchführung:

s. Protokoll Sanger-Sequenzierung

4.1.5. Fragmentanalyse zur Bestimmung der Elternschaft

Hintergrund:

Mittels Short Tandem Repeats (STR), also kurzen, sich wiederholenden DNA-Abschnitten (Abb. 6), die überall im menschlichen Genom vorkommen, kann man einen genetischen Fingerabdruck erstellen. Dieser kann für viele verschiedene Fragestellungen verwendet werden, z.B. können Spuren-DNAs mit Täterprofilen verglichen werden, Vaterschaftstests durchgeführt werden oder eben in der Humangenetik Proben von Kindern auf Familienzugehörigkeit getestet werden bzw. Gewebearten auf Kontaminationen untersucht werden. Da die Repeatanzahl für die verschiedenen Loci bei jedem Menschen verschieden sind, kann man über die Kombination von mehreren Markern eine sichere Aussage treffen. Dazu amplifiziert man die gewünschten Stellen via PCR und analysiert die PCR-Produkte mittels hochauflösender Kapillarelektrophorese (in Abb. 7 wird ein Gelbild dargestellt).



www.biologie.uni-regensburg.de/Zoologie/Schneuwly/Explab/genfinger.htm

Abb. 7: STRs auf dem mütterlichen und dem väterlichen Chromosom (=Allel) und anschließende Gelelektrophorese des PCR-Produktes

Aufgabe:

Führen Sie eine PCR und anschließende Elektrophorese mit der DNA einer Familie durch. Beurteilen Sie anschließend die Mikrosatellitenspektren hinsichtlich der Familienzugehörigkeit.

Durchführung:

s. Protokoll

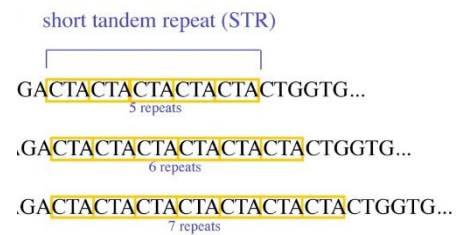


Abb. 6: Aufbau eines STRs.

4.1.6. Next-Generation-Sequencing (Laborteil, nur theoretisch)

Mittels Next-Generation-Sequencing (NGS) ist es möglich, parallel nicht nur sehr viele Genabschnitte (bis hin zu ganzen Genomen) anzureichern, man kann dies auch bei mehreren Patientenproben in einem Arbeitsschritt tun (Multiplexing durch molekulare Barcodes).

Zunächst fragmentiert man die Ausgangsproben (hier genomische DNA) enzymatisch oder mechanisch auf ca. 200-250 bp lange Stücke. Die Bruchstücke werden repariert und mit kleinen A-Schwänzen versehen. An diese werden Adapter und die o.g. Barcodes (Indices) ligiert. Nach einer Aufreinigung werden diese Ligationsprodukte erstmalig amplifiziert und anschließend quantifiziert. Die Produkte der verschiedenen Patientenproben werden äquimolar gepoolt (also alle zusammengefasst) und nun werden die Zielsequenzen in einem Capture-Schritt angereichert. Dazu gibt man einen Pool von biotinylierten Sonden zu dem Probengemisch und hybridisiert diese über Nacht mit der fragmentierten und Adapter-ligierten Proben-DNA. Die biotinylierten Sonden mit den daran hybridisierten Zielsequenzen werden mit magnetischen Streptavidin-Beads aus der Lösung gezogen, mehrfach gewaschen und am Ende nochmals amplifiziert. Der ganze Prozess dauert 1-3 Tage. Die angereicherten Zielsequenzen werden dann auf eine Flowcell gegeben. Dort binden sie über den ligierten Adapter an die Glasoberfläche. Es erfolgt eine Bridge-Amplifikation und eine Clusterbildung. Anschließend bindet der Sequenzierprimer und pro Zyklus wird ein farbmarkiertes Stoppnukleotid eingebaut und fotografiert. Je nach gewünschter Fragmentlänge wird dies bis zu 150 Mal wiederholt. Anschließend wird der Gegenstrang sequenziert. Bei 2x150 Zyklen dauert dieser Vorgang ca. 26-29 h.

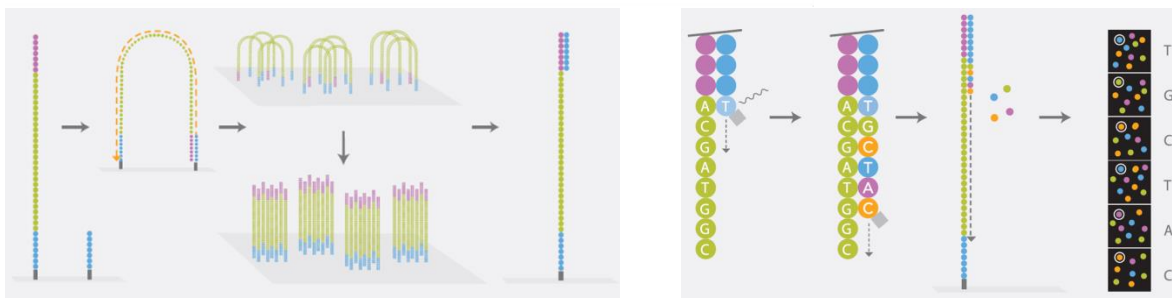
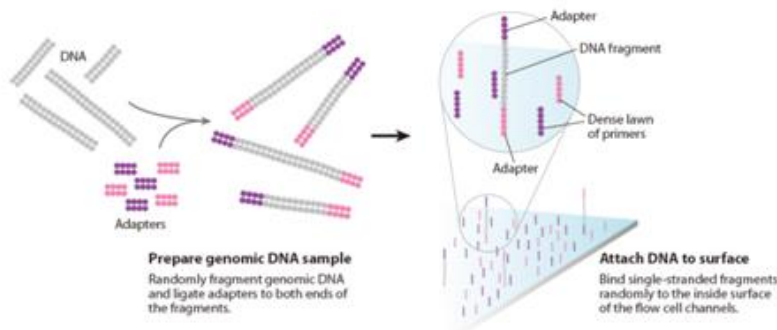
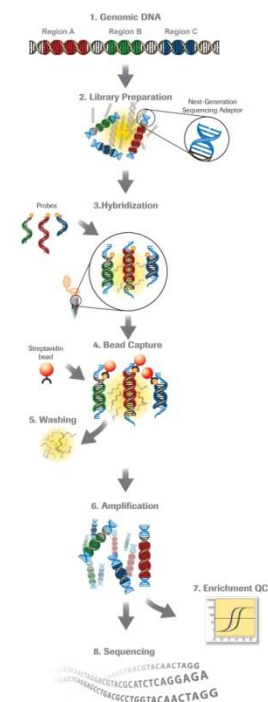


Abb. 7: Ablauf einer Library-Präparation, Capture, Bridge amplifikation und massive parallel sequencing (Quelle: Illumina und Roche)

4.1.7. Next-Generation-Sequencing (Bioinformatik, Variantenanalyse)

Bioinformatik

- Massive parallele Sequenzierung
- Mit oder ohne Anreicherung; Panel vs. Exom, Exom vs. Genom
- Bioinformatische Analysen
 - Reads alignment into contigs
 - Varianten „calling“
 - Varianten Annotation

Datengröße und Datenumfang

Exom: ca. 50Mb Sequenz, ca. 40 000 Punktvarianten, möglich sind auch CNV-Analysen

Genom: ca. 3000 Mb Sequenz, 3-10 Millionen Punktvarianten, möglich sind auch CNV-Analysen

Auswertung

Die identifizierten Varianten werden in Form von annotierten Tabellen dargestellt. Annotiert bedeutet hier, dass den Varianten Eigenschaften zugeschrieben werden. Diese Beschreibung ist umfasst u.a.:

- Position (genomische Position, ob im kodierenden Bereich eines Gens)
- Zygote (heterozygot, homozygot, Mosaik, ...)
- Qualität der Sequenzierung
- Einfluss auf ein Protein (missense Variante, nonsense, frameshift, splice, still, ...)
- Krankheitsassoziation des Gens/Proteins (z.B. OMIM-Datenbank)
- Häufigkeit in der Bevölkerung
- Einträge in Datenbanken zur Pathogenität (z.B. ist diese Variante bekannt krankheitsverursachend)
- Vererbung in der Familie (vom Elternteil vererbt, *de novo*, ...)

Beispiel aus dem Auswerteprogramm:

Gene	OMIM	Chr	Pos	Transcript	cDNA	AAChange	Impact	Qual	Genotype	AltAF	Reads
AGRN	103320	1	981,931	NM_198576.3	c.3066A>G	p.(Ser1022=)	LOW	4404	1/1	1.00	151
PER3	603427	1	7,880,683	NM_016831.2	c.1916T>G	p.(Val639Gly)	MODERATE	6212	0/1	0.49	569
ALMS1	606844	2	73,829,372	NM_015120.4	c.12172A>T	p.(Lys4058*)	HIGH	2572	0/1	0.45	289
ABI3BP	606279	3	100,489,692 - 100,489,693	NM_015429.3	c.2502del	p.(Ser835Alafs*30)	HIGH	9916	0/1	0.56	559
CDK11A	116951	1	1,647,753	NM_024011.3	c.488+32G> A	p.(=)	LOW	2981	0/1	0.38	213

4.1.8. Molekulargenetische Befunde (nach S2-Leitlinie)

Die Befundung dient der Übermittlung des Ergebnisses einer labordiagnostischen Untersuchung an den Auftraggeber. Die Befunderstellung einer molekulargenetischen Diagnostik bedarf einer wissenschaftlich begründeten genetischen Beurteilung. Dabei soll eine Interpretation des Ergebnisses erfolgen, die sich an der diagnostischen Fragestellung des Einzelfalls orientiert und eine Stellungnahme zu seiner klinischen Bedeutung enthält. Die schriftliche humangenetische oder fachgebundene Beurteilung eines molekulargenetischen Befundes soll auch für Ärzte ohne humangenetisches Spezialwissen verständlich sein. Der Befund selbst und die Schlussfolgerungen sollen klar hervorgehoben sein und die diagnostische Fragestellung soll beantwortet werden. Gegebenenfalls soll im Befundbericht auf die Notwendigkeit einer Genetischen Beratung und ihre Bedeutung im Hinblick auf die Konsequenzen des erhobenen Befundes für den Untersuchten und dessen Familie hingewiesen werden.

Molekulargenetische Befunde müssen unbedingt enthalten:

- Seitenzahl und Gesamtseitenzahl (z. B. 1 von 2)
- Name und Adresse des untersuchenden Labors sowie Name des verantwortlichen Laborleiters
- Name und Adresse des anfordernden Arztes, der Klinik, des Instituts etc.
- Befunddatum
- Name, Geburtsdatum und Geschlecht der untersuchten Person, gegebenenfalls deren ethnische Zugehörigkeit (wenn es für die Bewertung relevant ist, z. B. aufgrund unterschiedlicher Mutationshäufigkeiten in verschiedenen ethnischen Gruppen)
- Labornummer oder Aktenzeichen zur eindeutigen Identifizierung der untersuchten Person bzw. Probe
- Art des eingesandten Untersuchungsmaterials (z. B. EDTA-Blut, Amnionzellen, Chorionzotten, DNA etc.)
- Eingangsdatum
- Angabe der Diagnose oder Verdachtsdiagnose und der Indikation bzw. diagnostischen Fragestellung
- Eigenanamnese, soweit bekannt und erforderlich – Familienanamnese, soweit bekannt und erforderlich
- Kennzeichnung auswärtig erhobener Vorbefunde mit Angabe des entsprechenden Labors
- Angewandte Methode(n) und Untersuchungsumfang [Benennung der untersuchten Gene, verwendete Datenbankeinträge, z. B. Referenzsequenzen mit Identifikationsbezeichnung (z. B. Genbank-Accession-No., Transkripte) untersuchte Mutationen, Detektionsrate unter Berücksichtigung der Ethnizität]
- Kurze und eindeutige Angabe des Untersuchungsergebnisses als Genotyp in der international gültigen Nomenklatur (HGVS, siehe <http://www.hgvs.org/mutnomen/>)
- Angabe von Polymorphismen nur dann, wenn dies zur Erfüllung des Untersuchungsauftrags erforderlich ist oder wenn zur Abklärung des Befundes nach dem Stand der Wissenschaft auch die Untersuchung verwandter Personen erforderlich war
- An der diagnostischen Fragestellung des Einzelfalls orientierte Interpretation des Befundes und eine Stellungnahme zur klinischen Bedeutung des Befundes
- Angabe von Referenzen, wenn sie maßgeblich zur Befundinterpretation herangezogen wurden
- Gegebenenfalls Empfehlung zu weiteren Untersuchungen oder Untersuchungen von Familienangehörigen oder des Partners
- Gegebenenfalls Hinweis auf die eingeschränkte Aussagekraft des Befundes sowie eine Bewertung der Notwendigkeit und Erfolgsaussichten weiterführender Untersuchungen
- Im Befund soll ein Hinweis auf einen eventuell telefonisch bereits durchgegeben Befund (Erstergbnisse) und eine evtl. Korrektur dieser enthalten sein
- Unterschrift des/der verantwortlichen Arztes/Ärzte sowie aller maßgeblich an der Befunderstellung beteiligten Ärzte/Naturwissenschaftler.

4.2. Zytogenetik

4.2.1. Karyotypisieren

Einteilung/Zuordnung der Chromosomen erfolgt nach dem Denver Schema von 1960 und dem Pariser Übereinkommen. Die Klassifizierung geschieht nach

- Größe,
- Lage des Zentromers und
- Bandenmuster.

Danach können die Chromosomen in 7 Gruppen eingeteilt werden (A-G). Es gibt 22 Paare von Autosomen (1-22) und die Geschlechtschromosomen X und Y, insgesamt 46 Chromosomen. Das X-Chromosom gehört zur C-Gruppe, das Y-Chromosom zur G-Gruppe.

4.2.2. Terminologie:

p-Arm – kurzer Arm (*p*=petit), oberhalb des Zentromers

q-Arm – langer Arm, unterhalb des Zentromers

Zentromer – Einschnürung zwischen -p und q-Arm

Metazentrisch – p- und q-Arm sind annähernd gleich lang, das Zentromer befindet sich im mittleren Bereich

Submetazentrisch – p- und q-Arm sind ungleich groß, das Zentromer befindet sich näher beim kurzen Arm

Akrozentrisch – der p-Arm ist sehr kurz („rudimentär“), das Zentromer befindet sich sehr nahe am oberen Ende des Chromosoms. Gelegentlich treten am kurzen Arm unterschiedlich stark ausgeprägte Satelliten auf

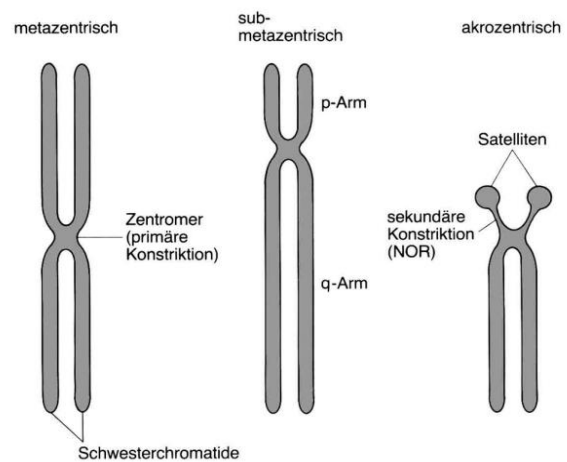


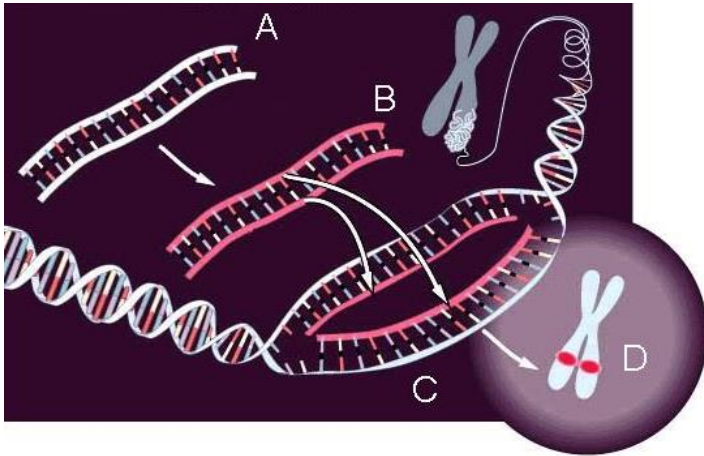
Abbildung 1 - (Hirsch-Kauffmann et al., 1992, S.193)

4.2.3. Zuordnung zu den Gruppen A-G:

Gruppe	Anzahl an Chromosomen	Zugehörige Chromosomen	Merkmale
A	3	1,2,3	Groß, Chr. 1 + 3 metazentrisch, 2 leicht submetazentrisch
B	2	4,5	Groß, submetazentrisch $\frac{1}{4}$ zu $\frac{3}{4}$
C	7	6,7,8,9,10,11,12,X	Mittel, submetazentrisch
D	3	13,14,15	Mittel, akrozentrisch
E	3	16,17,18	Klein, 16 metazentrisch, 17 + 18 submetazentrisch, 18 kürzester p Arm
F	2	19,20	Klein, metazentrisch
G	3	21,22,Y	Sehr klein, 21 + 22 akrozentrisch, Y submetazentrisch mit sehr kurzem p Arm

4.3. Molekulare Zytogenetik (Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung - FISH)

4.3.1. Prinzip



Auswertung von Metaphase-Chromosomen und/oder Interphase-zellkernen

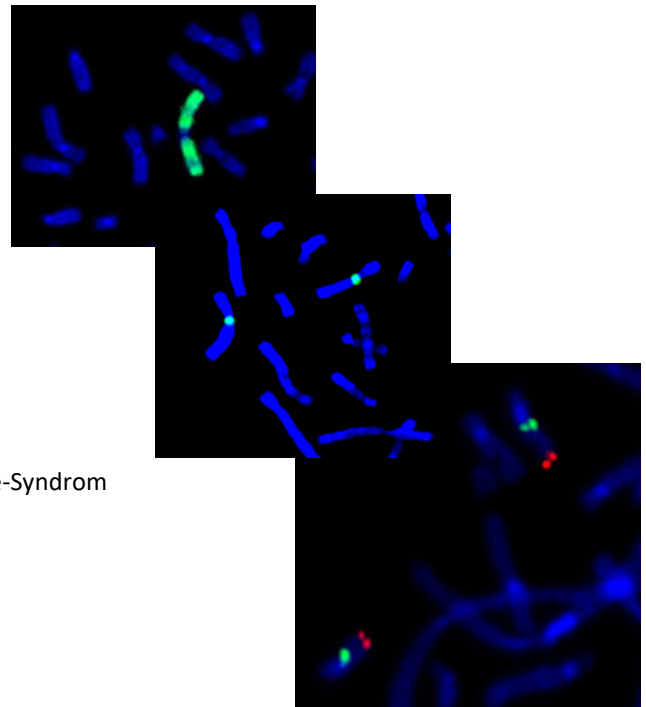
Denaturierung
(ds-DNA → ss-DNA)

Hybridisierung
(komplementäre Bindung)

Detektion
(Fluoreszenz-)

4.3.2. Arten von FISH-Sonden

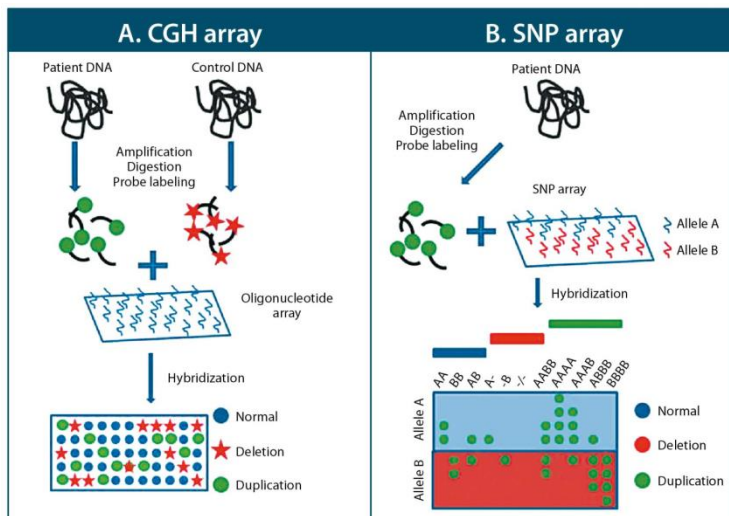
- Chromosomensonden
 - wcp (whole chromosome paint)
 - pcp (partial chromosome paint)
- Repetitive Sonden
 - Zentromer
 - Telomer
 - Heterochromatin
- Lokus-spezifische Sonden (100-300 kb)
 - z.B.: LSI 13 (RB1), LSI 21 (21q22.13-q22.2)
 - Prader-Willi/Angelman-Syndrom, DiGeorge-Syndrom
 - BAC (RP11-520K18 in 18q21.3)



4.4. Array

4.4.1. Grundprinzip

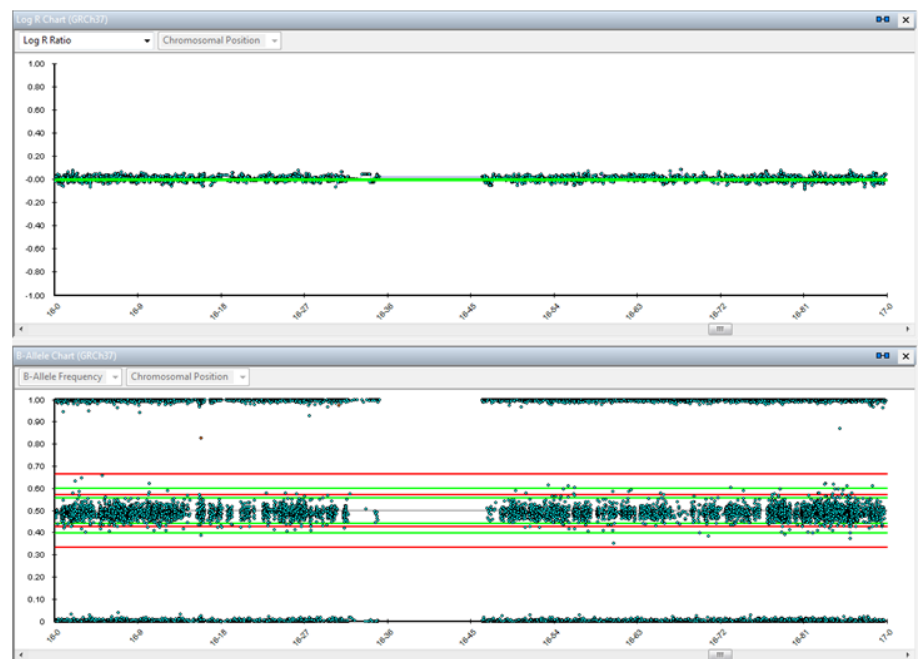
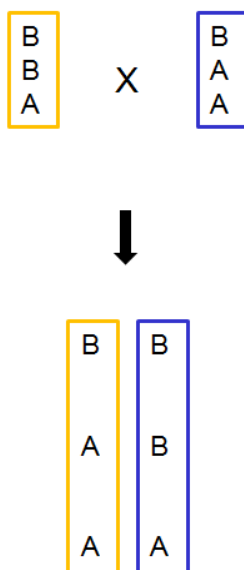
Intensitätsänderung durch Verlust bzw. Zugewinn von chromosomalem Material im Vergleich zur Referenz



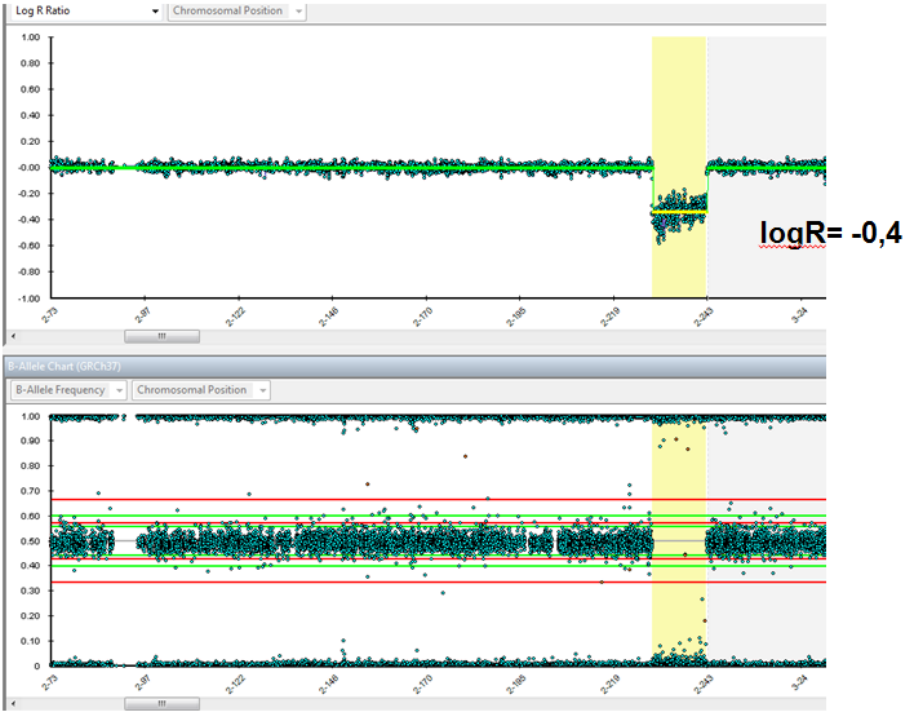
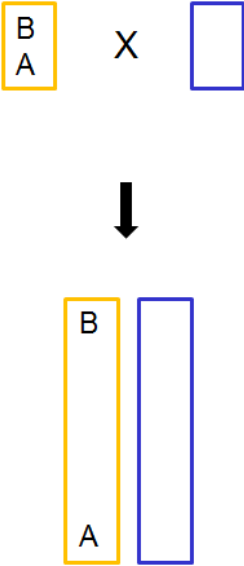
4.4.2. SNP-Array

- Beinhaltet ca. 850.000 SNPs, über gesamtes Genom verteilt
- Angereicherte Abdeckung für 3.262 Gene mit klinischer Relevanz
- Auflösung: 18 kb (alle 1,8 kb im Durchschnitt ein SNP, ab 10 aufeinanderfolgenden SNPs wird CNV detektiert)

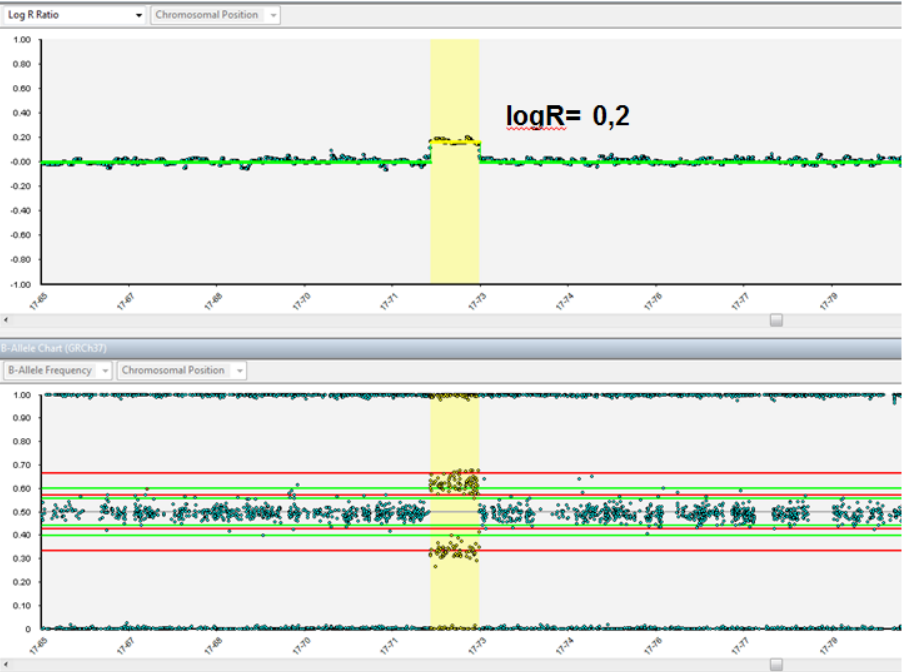
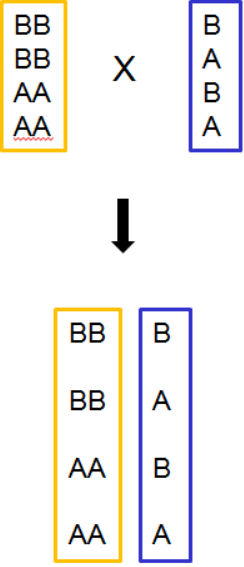
Heterodisomie



Heterozygote Deletion



Duplikation



Datenbanken für die Beurteilung von CNVs

- Decipher
- ISCA Database
- ClinVar
- HGMD
- Pubmed