

Molekulargenetische Methoden

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt eine essenzielle Methode zur Amplifikation definierter DNA-Sequenzen dar und ist integraler Bestandteil molekulargenetischer Analysen. Für die Durchführung der PCR werden folgende Reagenzien eingesetzt:

- Ein Paar komplementärer, sequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer; Vorwärts- und Rückwärtsprimer)
- Eine thermostabile DNA-Polymerase (z. B. Taq-Polymerase)
- Ein Nukleotidgemisch bestehend aus dATP, dGTP, dCTP und dTTP

Die Primer (Länge: ca. 18- 25 bp) flankieren die Zielsequenz und müssen mit hoher Spezifität ausgewählt werden, um die Amplifikation von Pseudogenen oder unspezifischen Produkten zu vermeiden. Pseudogene weisen hohe Sequenzhomologie zu funktionellen Genen auf, können jedoch zu falsch-positiven Resultaten führen.

Die Amplifikation erfolgt in einem Thermocycler, der schnelle Temperaturwechsel ermöglicht. Ein typischer PCR-Zyklus umfasst folgende Schritte:

1. **Denaturierung** der doppelsträngigen DNA bei ca. 95 °C
2. **Annealing** der Primer bei 50 - 65 °C (Die Temperatur ist primerabhängig)
3. **Elongation** durch die DNA-Polymerase bei 72 °C

Dieser Zyklus wird in der Regel 30 - 40 Mal wiederholt. Die Amplifikation erfolgt exponentiell, wobei sich die Zielsequenz mit jedem Zyklus idealerweise verdoppelt. Die Gesamtreaktionszeit beträgt etwa 2 - 3 Stunden.

Die PCR zeichnet sich durch hohe analytische Sensitivität und Spezifität aus und erlaubt den Nachweis geringster Mengen genomischer DNA. Aufgrund dieser hohen Empfindlichkeit besteht jedoch ein erhöhtes Risiko für Kreuzkontaminationen. Daher sind strikte Maßnahmen zur Vermeidung von DNA-Kontaminationen essenziell, einschließlich räumlicher Trennung von Prä- und Post-PCR-Bereichen sowie der Verwendung von Negativkontrollen in jedem Ansatz.

DNA-Sequenzanalyse nach Sanger (Sanger-Sequenzierung)

Die Sanger-Sequenzierung dient der Bestimmung der Primärstruktur von DNA und stellt trotz moderner Hochdurchsatzverfahren weiterhin einen etablierten Standard in der gezielten genetischen Diagnostik dar.

Insbesondere bei der Analyse einzelner Exons oder kleinerer genomischer Abschnitte bleibt die klassische Sanger-Methode - nach vorheriger Amplifikation mittels PCR - aufgrund ihrer hohen Genauigkeit und Zuverlässigkeit der Goldstandard. Sie eignet sich besonders für die Bestätigung von Varianten, die zuvor durch Next Generation Sequencing (NGS) identifiziert wurden, sowie für die gezielte Untersuchung definierter Genregionen.

Die Methode basiert auf der von Frederick Sanger entwickelten Kettenabbruch-Synthese. Dabei wird, unter Verwendung des spezifischen PCR-Produkts als Template, eine enzymatische DNA-Synthese durchgeführt, bei der neben der DNA-Polymerase und einem Gemisch aus Desoxynukleotiden (dNTPs) auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTPs) eingesetzt werden. Der Einbau eines ddNTPs führt zum Abbruch der Synthese, da diese Moleküle keine 3'-OH-Gruppe besitzen, die für die Verlängerung des DNA-Strangs erforderlich wäre.

Die resultierenden DNA-Fragmente unterscheiden sich in ihrer Länge und enden jeweils an einer Position, an der ein ddNTP eingebaut wurde. Diese Fragmente werden mittels Kapillarelektrophorese in einem Polyacrylamid-Gel nach Größe aufgetrennt und durch Laseranregung detektiert. Die fluoreszenzbasierte Auswertung erlaubt eine präzise Basenbestimmung entlang der amplifizierten Sequenz.