

Molekulargenetische Methoden

Material: EDTA-Blut mind. 500 µl

Präanalytik: Transport ungekühlt [wichtig: Einverständniserklärung gemäß GenDiagGes. erforderlich!)

Methode: (DNA-Extraktion)

Polymerase-Kettenreaktion

DNA-Sequenzanalyse nach Sanger (Sanger-Sequenzierung)

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA®)-Analyse

Dauer: Globingenetik (Stufendiagnostik): (2-)4-8 Wochen (abhängig von Umfang)

G6PD, PKLR, CYB5R3: 3-5 Monate

Durchführung: täglich

Akkreditiert: nein

Indikation: Verdacht auf

Quantitative Hämoglobinerkrankungen (z.B. Thalassämien, deletionale HPFH)

Qualitative Hämoglobinerkrankungen bzw. -Varianten (z.B. HbS=Sichelzellhämoglobin, instabile Hämoglobine, Hämoglobine mit veränderter Sauerstoffaffinität) – je nach Fragestellung auch bei unauffälliger Hb-Analyse notwendig

Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel (Spezifizierung bei bestätigtem Mangel)

Pyruvatkinasemangel (bei biochemischem V.a. auf PK-Mangel)

Hintergrund: Genetische Untersuchungen werden aufgrund verschiedener Indikationen durchgeführt. Für Erkrankungen, die sich über biochemische/funktionelle Untersuchungen nicht oder nicht ausreichend sicher diagnostizieren lassen, dienen sie der Diagnosestellung oder – bestätigung. Bei anderen Erkrankungen gibt die Spezifizierung Hinweise auf mögliche klinische Besonderheiten, u.a. durch Einordnung der Art der Variante und ihren Einfluss auf das Genprodukt, die Einstufung in Unterformen einer Erkrankung, die Eignung für spezifische Therapien u.a.m.. Darüber hinaus spielt die Kenntnis der genetischen Grundlagen einer hereditären Erkrankung eine wichtige Rolle für die humangenetische Beratung Betroffener und ggf. ihrer Angehörigen.

Ausgangspunkt der gezielten genetischen Diagnostik die die Extraktion der Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus kernhaltigen Zellen des Blutes des Patienten.

Beschreibung: 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.

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

Diese Schritte (Denaturierung, Annealing, Elongation) werden in mehreren Zyklen wiederholt, üblicherweise 20 bis 40 Zyklen. Die Amplifikation erfolgt exponentiell, wobei sich die Zielsequenz mit jedem Zyklus idealerweise verdoppelt.

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.

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.

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA®)-Analyse

Kopienzahlvariationen (engl. copy number variations, CNVs) sind eine wichtige Quelle genetischer Variationen in der menschlichen DNA und sind bei einer Vielzahl von Erkrankungen von Bedeutung. Im hämatologischen Labor ist diese Methode von besonderer Relevanz für die Diagnostik von Thalassämien, bei denen häufig

Deletionen, aber auch Duplikationen eine ursächliche Rolle spielen. Auch dem Pyruvatkinasemangel können Deletionen im Bereich des *PKLR*-Gens zugrunde liegen.

Die MLPA® ist eine semiquantitative, nicht-automatisierte Technik, mit der die relative Kopienzahl von bis zu 60 DNA-Sequenzen in einer einzelnen Multiplex-Reaktion auf PCR-Basis ermittelt wird. Pro Zielsequenz werden 2 (-3) teilweise überlappende Oligonukleotide (Sondenteile) eingesetzt, die nach Denaturierung der genomischen DNA spezifisch an benachbarte Bereiche hybridisieren. Eine DNA-Ligase verknüpft die Sondenteile nur bei vollständiger Bindung, so dass eine hohe Spezifität erreicht wird.

Alle ligierten Sonden tragen identische universelle Primerbindungsstellen und einen variablen Längensektor. In einer einzigen PCR werden sie mit fluoreszenzmarkierten Primern amplifiziert; die resultierenden Fragmente unterscheiden sich in ihrer Länge. Anschließend erfolgt die Kapillarelektrophorese, bei der für jedes Target ein Peak charakteristischer Länge und Peakhöhe entsteht.

Die Peakhöhe korreliert direkt mit der Kopienzahl der Zielsequenz. Durch den Vergleich mit internen Referenzsonden und externen Kontrollen lassen sich Deletionen oder Duplikationen zuverlässig identifizieren und quantifizieren. Fehlen beide Allele (homozygote Deletion), erscheint kein Peak. Bei heterozygoter Deletion ist eine Peakhöhe von etwa 50 % zu erwarten; im Fall einer heterozygoten Duplikation beträgt die Peakhöhe etwa 150 % im Vergleich zur Normalprobe. Sind mehrere Sonden betroffen, lässt sich anhand ihrer chromosomal Anordnung und der Position der jeweils nächstgelegenen unauffälligen Sonde die minimale bzw. maximale Größe der zugrunde liegenden Deletion oder Duplikation abschätzen.

Ergebnis: Jeder Zwischenschritt der molekulargenetischen Diagnostik wird hinsichtlich seines Ergebnisses kontrolliert. Das beinhaltet die photometrische Bestimmung des DNA-Gehalts nach deren Extraktion, die Untersuchung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese sowie abschließend die Überprüfung und Auswertung der Elektropherogramme nach der Sequenzanalyse bzw. der MLPA®. Die Auswertung erfolgt unter Nutzung geeigneter Softwareprogramme. Bei auffälligen Ergebnissen werden diese hinsichtlich ihrer Pathogenität mit verschiedenen weltweit genutzten Datenbanken abgeglichen (Ithanet, HbVar, LOVD, ClinVar, u.a.). Bei bisher nicht beschriebenen Varianten werden ggf. Programme wie MobiDetails® zur Beschreibung der Veränderungen herangezogen.

Analytische Leistungsdaten: Die Nachweisgrenze einer Mutation bei der Sanger-Sequenzierung liegt erfahrungsgemäß bei etwa 20 % VAF (Variant Allele Frequency; beschreibt den prozentualen Anteil des mutierten Allels am Gesamtignal). Darunter kann im Elektropherogramm kein Peak mehr detektiert werden. Da im hämatologischen Labor ausschließlich hereditäre Erkrankungen genetisch untersucht werden, beträgt der minimale Anteil einer Mutation in der Regel 50%. Dies wäre bei der Untersuchung somatischer Mutationen nicht der Fall.
Große Deletionen können mit der Sequenzierung nicht erfasst werden.
Für die insbesondere mit dieser Fragestellung besonders gut geeignete MLPA® wird herstellerseitig eine Sensitivität und Spezifität von jeweils ≥99% angegeben.