

Inhaltsverzeichnis

Vorwort zur 1. Auflage XIII

Vorwort zur 2. Auflage XV

Autorenliste XVII

Glossar XXI

Einführung 1

Teil I Allgemeine Grundlagen und Präanalytik 3

1	Grundlagen der molekularen Diagnostik 5
1.1	Die DNA 5
1.2	Die RNA 9
1.3	DNA-Replikation 12
1.4	Das Gen 13
1.5	Genomorganisation bei Prokaryonten 14
1.6	Genomorganisation bei Eukaryonten 14
1.7	Die Proteinbiosynthese 16
1.7.1	Die Transkription 16
1.7.1.1	Die 5'-Cap-Struktur (Capping) 19
1.7.1.2	Der Poly(A)-Schwanz 20
1.7.1.3	Spleißen von RNA 21
1.7.2	Die Translation 21
1.7.2.1	Der genetische Code 24
1.7.2.2	Transfer-RNA 24
1.7.2.3	Die Ribosomen 25
1.7.2.4	Der Beginn der Proteinsynthese 26
1.7.2.5	Das Protein entsteht 28
1.7.2.6	Das Ende der Translation 28
1.8	Grundbegriffe in der molekularen Diagnostik 30
1.8.1	Inzidenz 30

1.8.2	Prävalenz	30
1.8.3	Mortalität	31
1.8.4	Letalität	31
1.8.5	Goldstandard	31
1.8.6	Richtigkeit und Präzision	31
1.8.7	Sensitivität und Spezifität	32
1.8.7.1	Klinische Sensitivität	33
1.8.7.2	Analytische Sensitivität	33
1.8.7.3	Klinische Spezifität	34
1.8.7.4	Analytische Spezifität	34
1.8.8	Prädiktiver Wert	34
2	Präanalytik in der molekularen Diagnostik	37
2.1	Administrative Maßnahmen	37
2.2	Probengewinnung	38
2.2.1	Zeitpunkt der Probengewinnung	39
2.2.2	Proben- und Transportröhrchen	41
2.3	Hinweise zu Transport und Verpackung	45
2.3.1	Kategorie A UN 2814	45
2.3.2	Kategorie B UN 3373	46
2.3.3	Freigestellte medizinische Proben	46
2.4	Präanalytische Schritte im Labor	46
2.4.1	Räumliche Voraussetzungen	47
2.4.2	Vollautomatische Analysesysteme	48
Teil II	Methoden	51
3	Isolierung von Nukleinsäuren	53
3.1	Einleitung	53
3.2	Die Probenvorbereitung	53
3.3	Der Zellaufschluss in Abhängigkeit des Probenmaterials und der zu isolierenden Nukleinsäure	55
3.4	Isolierung von DNA	56
3.4.1	Phenol/Chloroform-Extraktion	56
3.4.2	Silikatmembranen oder mit Silika beschichtete Oberflächen (magnetische Partikel)	57
3.4.3	Anionenaustauscher-Säulen	61
3.5	Isolierung von RNA	63
3.5.1	Isolierung von Virus-RNA	63
3.5.2	Isolierung von zellulärer RNA	64
3.6	Manuelle und automatisierte Systeme zur Nukleinsäureisolierung in der molekularen Diagnostik	65
3.6.1	Manuelle Extraktionssysteme	66
3.6.2	Automatisierte Extraktionssysteme	68
3.6.2.1	Magnetische Beads	68

3.7	Überprüfung der Menge, Reinheit und Qualität von RNA und DNA	72
3.7.1	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure [Menge/(Reinheit)]	73
3.7.2	Abschätzung der DNA-Menge durch Gelektrophorese und Anfärbung mit Ethidiumbromid oder anderen Farbstoffen [Menge/(Qualität)]	73
3.7.3	Bioanalyzer [Menge/Qualität]	74
3.7.4	Spotmethode [Menge]	75
3.7.5	DNA/Zellzahlbestimmung durch PCR genomischer Sequenzen [Menge]	76
3.8	Lagerung der isolierten RNA/DNA	77
3.8.1	Lagerung von Standards	78
4	Amplifikation und Detektion von Nukleinsäuren	79
4.1	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	79
4.1.1	Geschichtlicher Hintergrund	79
4.1.2	Das Prinzip der PCR	80
4.1.3	Die Komponenten der PCR	85
4.1.3.1	Die DNA-Polymerasen	85
4.1.3.2	Die Nukleotide	88
4.1.3.3	Der PCR-Puffer	88
4.1.3.4	Die Primer und ihr Design	88
4.1.4	Anforderungen an das Ausgangsmaterial	89
4.1.5	PCR-Zusätze	91
4.1.6	Weitere PCR-Methoden	92
4.1.6.1	RT-PCR: Die Amplifikation von RNA mittels PCR	92
4.1.6.2	Die Nested-PCR: Erhöhen der Sensitivität der PCR	97
4.1.6.3	Touchdown-PCR: Vermeiden der Amplifikation von Nebenprodukten	98
4.2	Entwicklung (Design) von Real time-PCR Assays: Primerauswahl und Sonden	99
4.2.1	Grundsätze	100
4.2.2	Primer	100
4.2.3	Sonden	102
4.2.4	Farbstoffe und Multiplex-PCR	103
4.2.5	Kriterien der Leistungsbewertung	103
4.3	Detektion von PCR-Produkten	106
4.3.1	Agarosegelektrophorese	106
4.3.2	Chip-Elektronphorese (Lab-on-a-Chip)	109
4.3.3	PCR-ELISA und partikelbasierte Detektion	110
4.3.4	Reverse Hybridisierung	114
4.3.4.1	Prinzip	115
4.3.4.2	Anwendung	117
4.3.4.3	Qualitätssicherung	118

4.3.4.4	Ausblick 118
4.3.5	HyBeacon-Technologie 118
4.3.5.1	Allgemeines 118
4.3.5.2	Verfahren 119
4.3.5.3	Anwendungen 120
4.4	Real time-PCR 121
4.4.1	Interkalierende Farbstoffe (SYBR) 121
4.4.2	TaqMan-Sonden 122
4.4.3	Dark Quencher (BHQ, black hole quencher) 123
4.4.4	MGB-Sonden (minor groove binder) 123
4.4.5	Molecular Beacons 124
4.4.6	Modifizierte Oligonukleotidbausteine 124
4.4.7	Hybridisierungsproben 125
4.4.8	Scorpion-Primer 126
4.4.9	Schmelzpunktanalytik 127
4.4.10	High Resolution Melt (HRM) 128
4.4.11	Miniaturisierte Technik 129
4.4.12	Quantitative PCR 129
4.4.13	Absolute Quantifizierung 130
4.4.14	Relative Quantifizierung 132
4.4.15	Dual Target 133
4.4.16	Digitale PCR (dPCR) 134
4.5	Multiplex-PCR 135
4.5.1	Mit „Dual Priming“-Oligonukleotiden der Multiplex-PCR auf die Sprünge helfen 137
4.5.2	MLPA als Werkzeug für die Multiplex-PCR 140
4.5.3	Wenn es etwas mehr sein soll: Multiplex-PCR mit Luminex 144
4.5.4	Multiplex-PCR: Die Qual der Wahl 149
4.6	Weitere Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren 149
4.6.1	DNA-Sonden-Assays (Gensonden) 150
4.6.2	Transcription-Mediated Amplifikation (TMA) 150
4.6.3	Hybridization Protection Assay (HPA) 153
4.6.4	Nucleic Acid Sequence based Amplifikation (NASBA) 154
4.6.5	Strand-Displacement Amplification (SDA) 156
4.6.6	Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 158
4.6.7	Massenspektrometrie als neue Option 158
4.6.8	Das Prinzip 162
4.6.9	Massenspektrometrie im PCR-Labor 164
4.6.10	Die Target-Regionen und ihre Analyse 167
4.6.10.1	Der Einsatz im Routinelabor 169
4.7	DNA-Mikroarrays 170
5	DNA-Sequenzierung 173
5.1	DNA-Sequenzierung nach Sanger 173
5.2	Pyrosequenzierung 180

5.3	Minisequenzierung	183
5.4	Sequenzierung mit Mikroarrays	185
5.5	Sequenzierung – die nächste Generation	186
5.6	Die Zukunft der Sequenzierung	191
Teil III	Indikationen	193
6	Indikationen für die molekulare Diagnostik	195
6.1	Erkrankungen durch Viren	198
6.2	Erkrankungen durch Bakterien, Pilze und Parasiten	221
6.3	Molekulare Methoden in der Krankenhaushygiene	227
6.3.1	Bedeutung der Krankenhaushygiene in Deutschland	227
6.3.2	Gesetzliche Rahmenbedingungen	228
6.3.3	Molekularbiologische Erregersuchtests	229
6.3.3.1	MRSA-Screening	229
6.3.3.2	MRGN-Screening	230
6.3.4	Molekulare Typisierungsmethoden in der Krankenaushygiene	231
6.3.4.1	Pulsfeldgelektrophorese	231
6.3.4.2	Spa-Typisierung	232
6.3.4.3	Charakteristika genotypischer Typisierungsverfahren	233
7	Humangenetik	235
7.1	Klinische Genetik	236
7.1.1	Gesetzliche Rahmenbedingungen	236
7.1.2	Genetische Beratung	237
7.1.3	Erbgänge	239
7.1.3.1	Autosomal-dominanter Erbgang	239
7.1.3.2	Autosomal-rezessiver Erbgang	239
7.1.3.3	X-chromosomal-rezessiver Erbgang	240
7.1.3.4	Weitere Erbgänge	240
7.2	Molekulargenetik	241
7.2.1	Monogene Erkrankungen	241
7.2.2	Next Generation Sequencing in der Diagnostik	247
7.3	Prädispositionsdagnostik	250
7.3.1	Prädispositionsdagnostik für polygene Erkrankungen	251
7.3.1.1	Faktor V-Leiden	252
7.3.1.2	Die G20120A-Mutation in Faktor II (Prothrombin)-Gen	254
7.3.1.3	C677T-Polymorphismus im Gen für Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR)	254
7.3.1.4	4G/5G-Polymorphismus im Promoter des Plasminogen Aktivator Inhibitor 1-Gens	255
7.3.1.5	Hämochromatosediagnostik	257
7.3.1.6	Polymorphismusdiagnostik bei arteriosklerotischen Erkrankungen	258

7.3.1.7	Laktoseintoleranz → -13910 C/T-Polymorphismus im Laktasegen	259
7.3.1.8	Hereditäre Fruktoseintoleranz	260
7.4	Klassische und molekulare Zytogenetik	261
7.4.1	Postnataldiagnostik	261
7.4.2	Pränataldiagnostik	267
7.4.3	Tumorzytogenetik	268
7.4.4	Molekulare Zytogenetik	271
7.4.4.1	Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH)	271
7.4.4.2	Molekulare Karyotypisierung (chromosomale Mikroarray-Analysen, CMA)	274
7.5	Nicht invasiver Pränataltest (NIPT)	276
7.6	Reproduktionsgenetik	278
7.6.1	Polkörperdiagnostik – Präimplantationsdiagnostik	278
7.6.1.1	Eizellbefruchtung und frühe Embryonalentwicklung	278
7.6.1.2	Indikationen für die Polkörperdiagnostik (PKD)	279
7.6.1.3	Indikationen für die Präimplantationsdiagnostik (PID)	281
7.6.1.4	Herausforderungen bei Durchführung einer PKD oder PID	282
7.7	Pharmakogenetik	282
7.7.1	Verstoffwechselung von Arzneimitteln	283
7.7.2	Transportproteine	285
7.7.3	Pharmakogenetik in der Routinediagnostik	285
7.8	Abstammungsanalysen	286
7.8.1	Gesetzliche Grundlagen	288
7.8.2	Weitere Anwendungen von Mikrosatellitenanalysen	288
8	Immungenetik und Transfusionsmedizin	291
8.1	MHC-Komplex und HLA-System	291
8.1.1	Klinische Bedeutung der HLA-Typisierung	292
8.1.2	Methodische Aspekte der HLA-Typisierung	295
8.1.2.1	SSP-Methode	296
8.1.2.2	SSO-Methode	297
8.1.2.3	DNA-Sequenzanalyse nach Sanger	297
8.1.2.4	Next Generation Sequencing (NGS)	298
8.2	Primäre Immundefekterkrankungen	298
8.3	Hereditäre periodische Fiebersyndrome	299
9	Molekulare Onkologie und Pathologie	301
9.1	Leukämien	302
9.1.1	Ablauf einer genetischen Diagnostik am Beispiel der chronischen myeloischen Leukämie (CML)	303
9.2	Solide Tumore	307
9.2.1	Kolorektales Karzinom (KRK)	308
9.2.1.1	Hereditärer nicht polypöses Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC)	309
9.2.1.2	Indikation HNPCC	309

Teil IV Qualität 313

- 10 Qualitätssicherung in der molekularen Diagnostik 315**
- 10.1 Präanalytik 317
- 10.1.1 Labortechnische und -organistische Voraussetzungen 317
- 10.1.2 Kontrollen 317
- 10.2 Validierungen von molekularbiologischen Verfahren 318
- 10.3 NAT-spezifische Aspekte der Qualitätssicherung –
RiLiBÄK 2013 321

**Gesetze und Normen zur Regelung der molekularen Labordiagnostik
im deutschsprachigen Raum 323**

- EU-Richtlinie 98/79/EG über *In vitro*-Diagnostik 323
- Besondere Bedeutung der EU-Richtlinie für die
Molekulardiagnostik 325
- Regelung von Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT) bei der
Diagnose von Infektionskrankheiten 325
- Das deutsche Gendiagnostikgesetz 325
- Aufbau und Inhalt des Gendiagnostikgesetzes 326
- Was vom Gendiagnostikgesetz nicht geregelt wird 326
- Was vom Gendiagnostikgesetz geregelt wird 326
- Anwendung des Gendiagnostikgesetzes – was in der täglichen
Praxis beachtet werden muss 327
- Gendiagnostikgesetz: Kritik, Interpretation und Modifikationen 333

Weiterführende Literatur 337

Index 341