

## Inhaltsverzeichnis

**Vorwort zur 1. Auflage** XIII

**Vorwort zur 2. Auflage** XV

**Autorenliste** XVII

**Glossar** XXI

**Einführung** 1

### **Teil I Allgemeine Grundlagen und Präanalytik** 3

<b>1</b>	<b>Grundlagen der molekularen Diagnostik</b>	<b>5</b>
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
<b>2</b>	<b>Präanalytik in der molekularen Diagnostik</b>	<b>37</b>
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 Analysensysteme	48
<b>Teil II</b>	<b>Methoden</b>	<b>51</b>
<b>3</b>	<b>Isolierung von Nukleinsäuren</b>	<b>53</b>
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	Silikamembranen 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 Gelelektrophorese 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
<b>4</b>	<b>Amplifikation und Detektion von Nukleinsäuren</b>	<b>79</b>
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	Agarosegelelektrophorese	106
4.3.2	Chip-Elektrophorese (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 Amplifikation (SDA)	156
4.6.6	Loop Mediated Isothermal Amplifikation (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	<b>DNA-Sequenzierung</b>	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 Krankenhaushygiene 231
      - 6.3.4.1 Pulsfeldgelelektrophorese 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 Prädispositionsdiagnostik 250
    - 7.3.1 Prädispositionsdiagnostik 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 Hämochromatosedagnostik 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
<b>8</b>	<b>Immunogenetik und Transfusionsmedizin</b>	<b>291</b>
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
<b>9</b>	<b>Molekulare Onkologie und Pathologie</b>	<b>301</b>
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	Hereditäres 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 -organisatorische 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**