

Inhaltsverzeichnis

	Vorwort zur 1. Auflage	<i>XIII</i>
	Vorwort zur 2. Auflage	<i>XV</i>
	Autorenliste	<i>XVII</i>
	Glossar	<i>XXI</i>
	Einführung	<i>1</i>
Teil I	Allgemeine Grundlagen und Präanalytik	3
1	Grundlagen der molekularen Diagnostik	5
	<i>Frank Thiemann</i>	
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

VI | *Inhaltsverzeichnis*

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
	<i>Frank Thiemann</i>	
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	49
Teil II	Methoden	51
3	Isolierung von Nukleinsäuren	53
	<i>Edgar Setzke und Hans Nitschko</i>	
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 Bioanalyser [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**
Stefan Lorkowski, Ofert Landt, Carsten Tiemann, Michael Weizenegger, Ulrich Eigner, Charlotte Sager, Frank Thiemann und Paul M. Cullen
 - 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

VIII | *Inhaltsverzeichnis*

- 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	DNA-Sequenzierung	173
	<i>Andre Frontzek</i>	
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
	<i>Holger F. Rabenau, Udo Reischl, Uwe Lang, Matthias Aymanns, Tim Hagedorn, Kim Koop, Jana Schröder und Andreas Uekötter</i>	
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
	<i>Hanns-Georg Klein, Imma Rost, Christoph Marschall, Karin Mayer, Sebastian Eck, Ina Vogl, Christina Sofeso, Camilla Ladinig, Wolfgang Rupprecht, Paul M. Cullen, Brigitte Welling, Uwe Heinrich, Annett Wagner, Tanja Hinrichsen, Thomas Harasim und Birgit Busse</i>	
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

X | *Inhaltsverzeichnis*

- 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 Methylenetetrahydrofolatreduktase (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 Verstoffwechslung 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**
Hannah Rabenstein, Kristin Kipper, Barbara Bangol und Kaimo Hirv
 - 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
	<i>Tanja Hinrichsen, Stefanie Kühner, Oliver Wachter und Barbara Dockhorn-Dworniczak</i>	
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
	<i>Holger F. Rabenau und Udo Reischl</i>	
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
	<i>Paul M. Cullen und Michael Neumaier</i>	
	EU-Richtlinie 98/79/EG über <i>In vitro</i> -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

