

Humangenetik heute – Möglichkeiten und Grenzen

Teil 2: Molekulargenetische Untersuchungen - Gendiagnostik

Prof. Dr. Sabina Gallati, Abteilung für Humangenetik, Universitätsklinik für Kinderheilkunde, Inselspital, 3010 Bern

Früher wurde die Anzahl menschlicher Gene auf ca. 100'000 geschätzt. Das Humangenomprojekt hat jedoch gezeigt, dass der Mensch 20'000-25'000 proteinkodierende Gene besitzt, was ihn darin nicht wesentlich von anderen höheren Lebewesen unterscheidet. Es ist somit nicht nur die Zahl der Gene, welche eine Spezies bestimmt, sondern deren Interaktion sowie die Regulation ihrer Expression.

Molekulare Grundlagen:

Träger der genetischen Information ist die Desoxyribonukleinsäure (**DNA**), welche als um eine gemeinsame Achse gewundene Doppelhelix bestehend aus zwei komplementären Nukleotidketten vorliegt. Ein **Nukleotid** beinhaltet eine Phosphatgruppe, einen Zucker (**Desoxyribose**) und eine Base, wobei Zucker und Phosphatgruppe dem DNA-Molekül die Struktur geben und die Purinbasen **Adenin (A)** und **Guanin (G)** sowie die Pyrimidinbasen **Thymin (T)** und **Cytosin (C)** anhand ihrer Abfolge die genetische Information übermitteln (Abb. a.). Als funktionelle Einheiten des Genoms (Gesamtheit der genetischen Information) gelten die Gene, welche für ein oder mehrere Genprodukte kodieren. Ein typisches menschliches Gen besteht aus einem Promotor (regulatorische Sequenz), Exons (kodierende Sequenzen) und Introns (nicht-kodierende Sequenzen), die während der Transkription eliminiert werden (Abb. b.).

Abb. a.

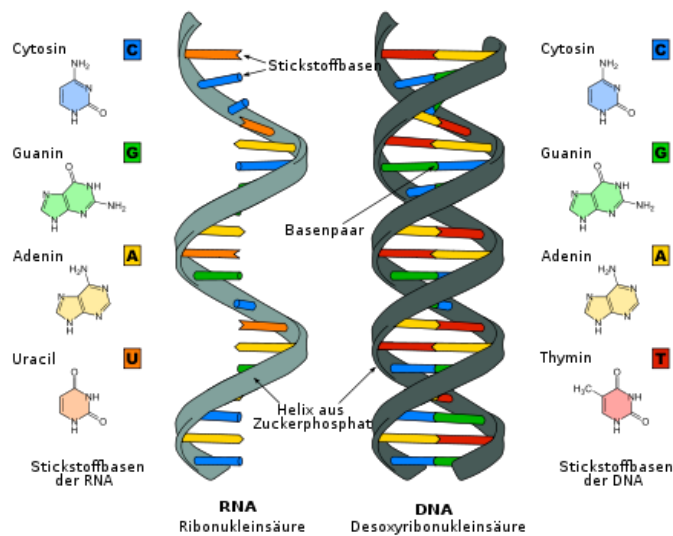
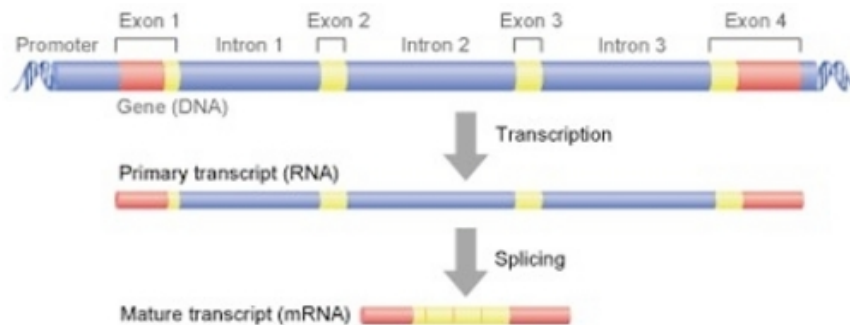


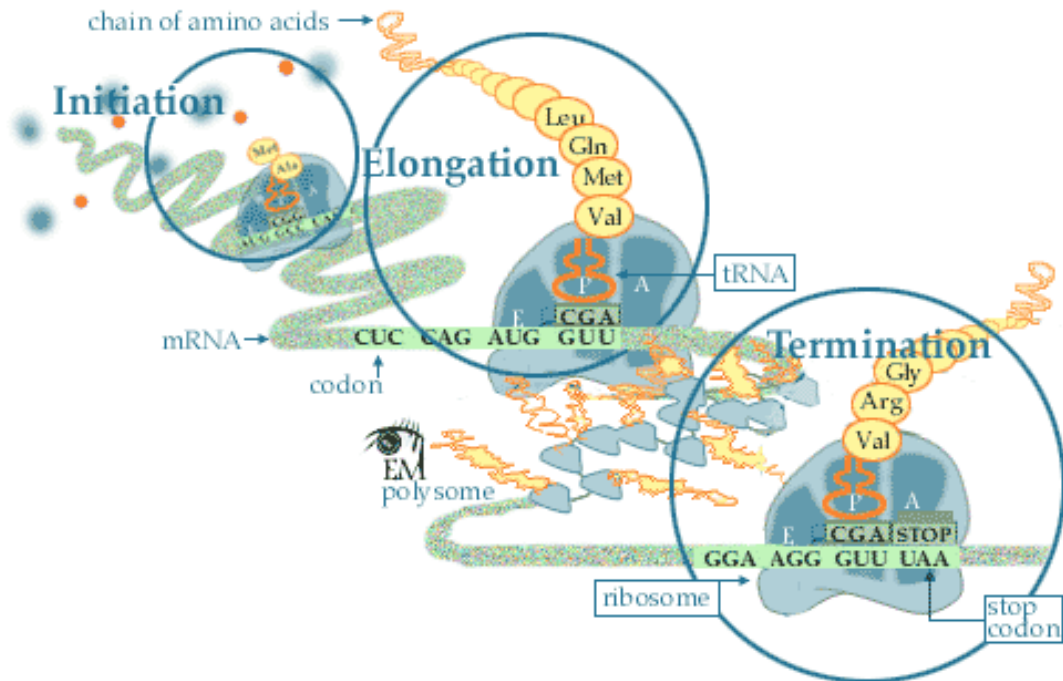
Abb. b.



Die kodierenden Sequenzen eines Gens werden in ein reifes Transkript (mRNA) und im Zytoplasma im Rahmen der **Translation** (Abb.c.) in ein Protein übersetzt. Jeweils 3 Basen der mRNA (**Codon**)

entsprechen einer Aminosäure, diese Verschlüsselung der Aminosäuresequenz wird als **genetischer Code** bezeichnet.

Abb. c.



Gen-Mutationen:

Innerhalb eines Gens können verschiedene Arten von Veränderungen auftreten. Man unterscheidet:

- Punktmutationen
 - Substitutionen (Basenaustausch)
 - Sense (gleiche AS), Missense (AS-Austausch), Nonsense (Stop-Codon)
 - Spleissmutationen (Exon-Verlust, Intron-Einschluss)
 - Promotermutationen (Veränderung der Genexpression/-regulation)
 - Deletionen und Insertionen einzelner Nukleotide (inframe, frameshift)
- Deletionen und Insertionen im Kilobasenbereich (kb)
- Deletionen und Insertionen im Megabasenbereich (Mb)
- Inversionen
- Dynamische Mutationen (Di- und Trinukleotid-Repeats)

Molekulargenetische Untersuchungen / Gentests

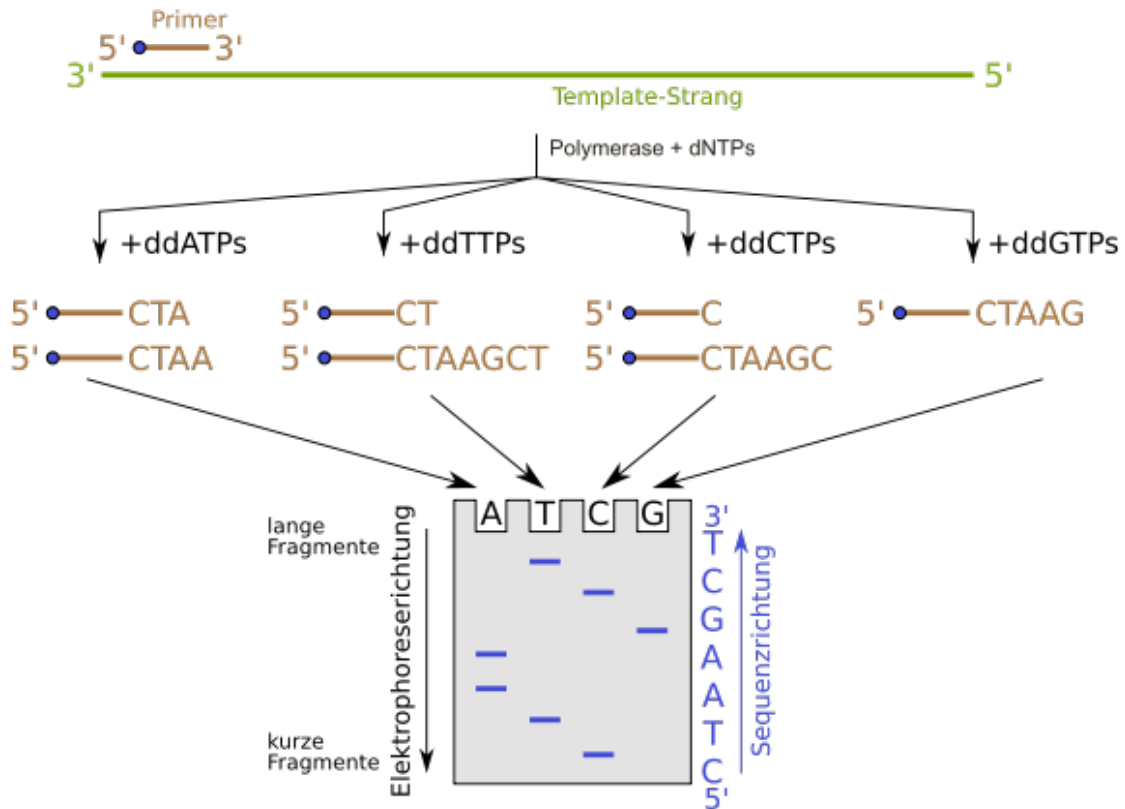
Genmutationen können sowohl auf DNA- wie auch auf RNA-Ebene nachgewiesen werden, wobei aber die Mehrheit der heute in der Diagnostik eingesetzten Tests auf DNA-Analysen basieren. Schlüssel-Methode ist die PCR (polymerase chain reaction), welche definierte DNA Bereiche (z.B. einzelne Exons) exponentiell amplifiziert, um diese in genügender Menge für eine genetische Untersuchung zur Verfügung zu stellen.

An die PCR schliessen sich verschiedene Screening-Methoden zum Nachweis von Punktmutationen, kleinen Deletionen und Duplikationen sowie SNPs (single nucleotide polymorphisms) an wie z.B. SSCP (single strand conformation polymorphism), DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) oder HRM (high resolution melting). Diese Screening-Methoden erlauben nur das Identifizieren von Sequenzen bzw. Amplifikationsprodukten, die von einer mitgeführten Kontrollsequenz abweichen, nicht aber die präzise Charakterisierung (Art und Ort) einer Mutation. Diese muss durch anschließende Sequenzierung des entsprechenden PCR-Produktes erfolgen.

Die klassische **Sanger-Sequenzierung** basiert ebenfalls auf einer PCR, indem auch hier eine DNA-Synthese, ausgehend von einem Primer, der an seine entsprechende Zielsequenz bindet, erfolgt. Dem PCR-Ansatz werden jedoch neben den üblichen vier Desoxyribonukleotiden (dNTPs) Adenin (A), Thymin (T), Guanosin (G) und Cytosin (C) auch fluoreszenzmarkierte Di-dNTPs (ddNTPs) beigegeben, welchen

die für die Ausbildung einer Esterbindung zum nächsten Nukleotid notwendige 3'OH-Gruppe fehlt, was zu einem Kettenabbruch führt. In der Folge entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt werden. Die ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragmentes leuchten entsprechend der eingebauten Base in unterschiedlicher Farbe und die Abfolge dieser Farbsignale, das sogenannte Chromatogramm, gibt direkt die Basensequenz des analysierten DNA-Stranges wieder (Abb. d.). Das Sanger-Sequenzieren ist der **Goldstandard** der molekulargenetischen Diagnostik.

Abb. d.



Eine neue Technologie, die sogenannte **Next-Generation-Sequenzierung (NGS)**, wird in Zukunft mehr und mehr eingesetzt werden, da sie zeitsparende und kostengünstige Anwendungen wie Ganz-Genom- oder Exom-Sequenzierung oder die Analyse einer ganzen Gruppe von Genen (*gene panels*) ermöglicht. Sie basiert auf der Sequenzierung vieler kurzer DNA-Fragmente, die dann überlappend zusammengesetzt werden. Je häufiger ein DNA-Abschnitt gelesen wird, also je mehr *reads*, um so zuverlässiger sind die Ergebnisse. Allerdings müssen NGS-Befunde immer mit einer zweiten, unabhängigen Methode, z.B. mit Sanger-Sequenzierung, bestätigt werden.

Indikationen für molekulargenetische Untersuchungen:

- Bei gezieltem Verdacht auf ein **monogenes** Krankheitsbild ist die Analyse des bzw. der ursächlichen Gene angezeigt. Bei sehr **heterogenen** Krankheitsbildern bzw. bei zahlreichen differentialdiagnostisch relevanten Genen sind die moderneren NGS-Techniken dem klassischen Sanger-Sequenzieren überlegen.
- Bei bekannter molekularer Ursache einer Erbkrankheit in einer Familie, kann auf Wunsch die Klärung des **Trägerstatus** bei Angehörigen durch Nachweis bzw. Ausschluss der familiären Mutation erfolgen.
- **Pränatale** molekulargenetische Abklärungen sind indiziert bei eindeutigen bzw. spezifischen fetalen Auffälligkeiten sowie zum Nachweis bzw. Ausschluss einer familiär bekannten Mutation, sofern diese für die kindliche Entwicklung von Bedeutung ist.