

# Begleittext zum Foliensatz „Gentests – Analyse von Mutationen Praktische Beispiele“

---

**Achtung: aufbauend auf Foliensatz „Genetische Analysen in der Medizin“! Grundkenntnisse der molekularbiologischen Methoden PCR, Sequenzierung und Gelelektrophorese werden vorausgesetzt.**

## **Folie 1 – Wie werden Mutationen analysiert?**

Die Strategie der Mutationssuche hängt von der Art der Mutation ab, die man bei einer bestimmten Erkrankung erwartet. Danach richtet sich auch die Wahl der Methode.

Zunächst wird immer DNA aus den Körperzellen des Betroffenen isoliert. Wenn das, die Krankheit verursachende, Gen bekannt ist, und es sich um kleine Deletionen oder Duplikationen handelt, wird eine PCR (Polymerasekettenreaktion) zur Vermehrung des betroffenen DNA-Stückes im Genom durchgeführt. Dieses PCR-Produkt wird für die weitere Untersuchung verwendet.

In bestimmten Fällen reicht die Analyse der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese aus, um festzustellen, ob eine Krankheit durch genetische Veränderungen verursacht wird (siehe Folie 2). Mit Hilfe der Sequenzanalyse kann man verschiedene Mutationen genau im Genom identifizieren, meistens handelt es sich dabei um Punktmutationen bzw. „kleine“ Deletionen bzw. Duplikationen (10-20 Basenpaare, unter Umständen 100-200 Basenpaare). Die Sequenzanalyse setzt eine PCR voraus.

Wenn große Deletionen bzw. Duplikationen vorliegen, ist eine direkte Sequenzanalyse nicht geeignet, diese Veränderungen festzustellen.

## **Folie 2 – PCR zur Diagnostik von männlicher Infertilität**

Dieses Beispiel zeigt, dass in manchen Fällen bereits eine PCR ausreichende Informationen für das Auffinden einer Mutation liefert.

Bei Azoospermie fehlen im Ejakulat des Mannes reife Samen- und Samenvorläuferzellen, eine Unfruchtbarkeit liegt vor. Sie kann (muss aber nicht) genetisch bedingt sein als Folge einer Mutation im Azoospermie-Faktor-Gen (AZF-Gen). Dieses wird in drei Bereiche eingeteilt, AZFa, AZFb und AZFc.

Fehlt z.B. ein Bereich im Azoospermie-Faktor-Gen (Deletion), dann kann dies die Ursache der Unfruchtbarkeit sein. Eine solche Deletion kann mittels PCR und anschließender Gelelektrophorese festgestellt werden (siehe dargestelltes Gel).

Auf dem Gel wurden die PCR Reaktionen fünf verschiedener Männer mit Verdacht auf genetisch bedingter Azoospermie elektrophoretisch aufgetrennt. Der Marker (M) in der ersten Spur besteht aus DNA-Bruchstücken (so genannten „Fragmenten“) von ganz bestimmter Länge und ermöglicht somit eine Abschätzung der Fragmentlängen in den Testreaktionen. Die Kontrollen einer Frau und eines gesunden Mannes in Spur 2 bzw. 3 zeigen jeweils ein bestimmtes Bandenmuster. Bei Patient 4 (in der 4. Spur) fehlt die charakteristische Bande für AZFc, eine Deletion liegt vor. Dieser Patient leidet an genetisch bedingter Unfruchtbarkeit. Bei den anderen Patienten (Spuren 5-8) ist die Unfruchtbarkeit durch andere Gründe bedingt.

## **Folie 3 – Sequenzierung**

Unter Sequenzierung versteht man die Bestimmung der Abfolge der Nukleotide in der DNA. Somit können einzelne Veränderungen im Erbgut sichtbar und genau lokalisiert werden.

Im Bild sieht man das Ergebnis einer Sequenzierung in Form eines Chromatogrammes. Jede der vier in der DNA vorkommenden Basen ist darin mit einer anderen Farbe dargestellt. Aus der Abfolge der Signale kann die Sequenz abgelesen werden (in Form von Buchstaben darüber dargestellt).

## Begleittext zum Foliensatz „Gentests – Analyse von Mutationen Praktische Beispiele“

---

Das Beispiel zeigt, dass der Wildtyp an Position 3217 des Gens ein Guanin enthält. In der Sequenzreaktion darunter findet man an dieser Position ein Thymin (ein roter statt schwarzer „peak“). Eine Punktmutation hat somit stattgefunden.

### **Folie 4 – Wie werden Mutationen analysiert (2)**

Liegen große Genveränderungen (Deletionen/Duplikationen oder chromosomale Rearrangements) vor, ist eine direkte Sequenzanalyse nicht geeignet, diese Veränderungen festzustellen. In diesem Fall wird in der Praxis eine FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) bzw. eine Southern-Blot-Analyse verwendet.

Diesen beiden Hybridisierungstechniken liegt zugrunde, dass zuerst mittels PCR eine markierte „Sonde“ (ein kurzes synthetisches RNA- oder DNA Stück) hergestellt wird, die die gesuchte DNA-Veränderung enthält. Markiert heißt, dass die Sonde mit Radioaktivität oder Fluoreszenzfarbstoffen versehen wird und somit sichtbar gemacht werden kann (durch Auflegen auf einen Röntgenfilm bzw. Untersuchung im Fluoreszenzmikroskop). Die Sonde ist in ihrer Sequenz komplementär zur zu untersuchenden DNA und bindet daher an die gesuchte Stelle in der DNA (sie bildet Wasserstoffbrücken zwischen den jeweils komplementären Basen).

Mithilfe dieser Sonde kann DNA angefärbt werden, die

- sich in Chromosomen befindet (FISH) oder
- sich auf der Oberfläche von Membranen befindet (Southern Blot) oder
- auf Genchips (Kunststoff- oder Glasträger, auf dem sich eine große Anzahl von zu untersuchenden DNA-Stücken befindet) vorhanden ist.

Dieses „Färben“ wird als Hybridisierung bezeichnet.

### **Folie 5 – FISH zur Diagnostik von Prader-Willi-Syndrom (PWS)**

Beim Prader-Willi-Syndrom liegt ein Funktionsverlust von väterlichen Genen am langen Arm des Chromosoms 15 vor. In ca. 70% der Fälle liegt eine Deletion vor. 1 von 10.000 – 15.000 Kindern ist betroffen. Hauptmerkmale sind Ernährungsschwierigkeiten und Muskelschwäche im Neugeborenenalter, verzögerte motorische und intellektuelle Entwicklung, fehlendes Sättigungsgefühl, massives Übergewicht, Sprech- und Sprachprobleme und Verhaltensauffälligkeiten.

Im Bild ist eine Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH) von Chromosomen eines Menschen mit Verdacht auf Prader-Willi-Syndrom dargestellt. Dafür wurden die Chromosomen (sie müssen sich in der Metaphase des Zellzyklus befinden) aus Körperzellen präpariert und mit verschiedenen Sonden gefärbt. Für die Hybridisierung wurden drei verschiedene Sonden verwendet. Zwei Sonden binden an die beiden Enden des Chromosoms 15 und ermöglichen somit die Unterscheidung von den anderen Chromosomen. Um eine mögliche Deletion im Chromosom 15 nachzuweisen, die PWS (Prader-Willi-Syndrom) bestätigen würde, wurde eine PWS-spezifische Sonde verwendet. Sie bindet als pinkes Signal in der Mitte des Chromosoms in eine DNA-Region, in der sich die bei PWS vorkommende Deletion befindet (gelber Pfeil). Das Ergebnis zeigt, dass der untersuchte Mensch eine Deletion in einem der beiden Chromosomen 15 enthält und bestätigt die PWS-Diagnose auf genetischer Basis.

### **Folie 6 – Southern Blot – Prinzip**

Diese molekularbiologische Untersuchungsmethode ermöglicht den Nachweis einer Gensequenz in einem komplexen DNA-Gemisch (z.B. dem gesamten Genom eines Organismus) innerhalb kurzer Zeit, ohne dass das ganze Genom entschlüsselt werden muss.

## Begleittext zum Foliensatz „Gentests – Analyse von Mutationen Praktische Beispiele“

---

Im ersten Schritt wird die DNA aus Zellen eines Menschen isoliert, mit Restriktionsenzymen in Bruchstücke zerlegt und mittels Gelelektrophorese auf einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. Die DNA wird vom Agarosegel auf eine Membran (Nitrocellulose oder Nylon) übertragen („geblottet“).

Im zweiten Schritt werden Membran (die nun die DNA an ihrer Oberfläche trägt) und wiederum markierte Sonde (deren Sequenz komplementär zur gesuchten Sequenz ist) zusammengebracht, die Sonde bindet an die gesuchte Sequenz.

Danach ist es wichtig, die ungebundene, überschüssige Sonde zu entfernen, um in einem letzten Schritt die richtig (spezifisch) gebundene Sonde sichtbar zu machen, z.B. durch Auflegen eines Röntgenfilms bei Verwendung einer radioaktiven Sonde.

### **Folie 7 – Southern Blot zur Diagnostik von DMD**

Duchenne Muskeldystrophie ist eine degenerative Muskelerkrankung, Details zur Erkrankung siehe Begleittext „Genetische Analysen in der Medizin“.

Das Dystrophin-Gen ist aus zahlreichen „Exons“ aufgebaut. Exons sind codierende Bereiche in der DNA, die genetische Information zur Herstellung des Dystrophin-Proteins tragen.

In der Abbildung ist ein Southern Blot zu sehen. Die Zahlen auf der rechten Seite des Bildes verweisen auf verschiedene Exons im Dystrophin-Gen (z.B. 52, 49, 47, 48, 51\*) und ermöglichen das Feststellen und Zuordnen der Mutation. Fehlt eine Bande (ein Signal) im Southern Blot, so liegt eine Deletion vor.

In den Spalten 1,2 und 5 wurde DNA von Frauen verwendet bzw. in Spalte 4 DNA eines gesunden Mannes. Diese spezifischen Bandenmuster dienen als Kontrolle, da Frauen nicht von der Mutation betroffen sind bzw. es sich um einen gesunden Mann handelt. Sie werden mit dem Bandenmuster eines Menschen, bei dem Verdacht auf DMD vorliegt, verglichen.

In unserem Beispiel handelt es sich in Spalte 3 um die DNA eines Mannes mit DMD. Das Exon 47 fehlt, eine Deletion liegt vor. Exon 48 ist im „junction fragment“ (JF) enthalten – eine zusätzliche Bande, die nur im Patienten vorkommt. Sie entstand durch die Deletion.

### **Folie 10 – Gendiagnostik der Zukunft – Genchips**

Eine bis jetzt nur für besondere Fragestellungen in der Genanalyse verwendete Technologie ist die Mikrochip-Technologie (auch als Genchip oder DNA-Array bezeichnet). Ein Genchip ist ein mit verschiedenen, genau positionierten DNA- oder RNA- Molekülen beladener Kunststoff- oder Glasträger. Es gibt viele verschiedene Arten von Genchips. Genchips werden beispielsweise mit der DNA einer Zelle/eines Gewebes hybridisiert, um Mutationen zu finden. Sie können auch mit der in einer Zelle/einem Gewebe vorhandenen mRNA (messenger-RNA) hybridisiert werden, um die Aktivität der Genexpression zu messen (Gibt es z.B. eine verstärkte Expression von Genen, die mit der Bildung von Tumoren einhergehen?). Chip-Technologien werden derzeit stark beforscht, routinemäßig im Bereich der genetischen Analysen werden sie bis jetzt jedoch kaum eingesetzt.

Im Bild ist die Auswertung eines Genchips zu sehen, aus den veränderten Farbmustern der einzelnen Positionen (Kreise) können Rückschlüsse auf Veränderungen im Genom geschlossen werden.