

# Gentests

---

## Analyse von Mutationen

### Praktische Beispiele der Gendiagnostik

# Inhaltsangabe

---

- Strategien der Mutationsanalyse
- Beispiel PCR zur Diagnostik von männlicher Infertilität
- Beispiel Sequenzierung
- Beispiel Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) zur Diagnostik von Prader-Willi-Syndrom
- Beispiel Southern Blot zur Diagnostik von Duchenne Muskeldystrophie
- Genchips - Grundsätzliches

# Wie werden Mutationen analysiert (1)?

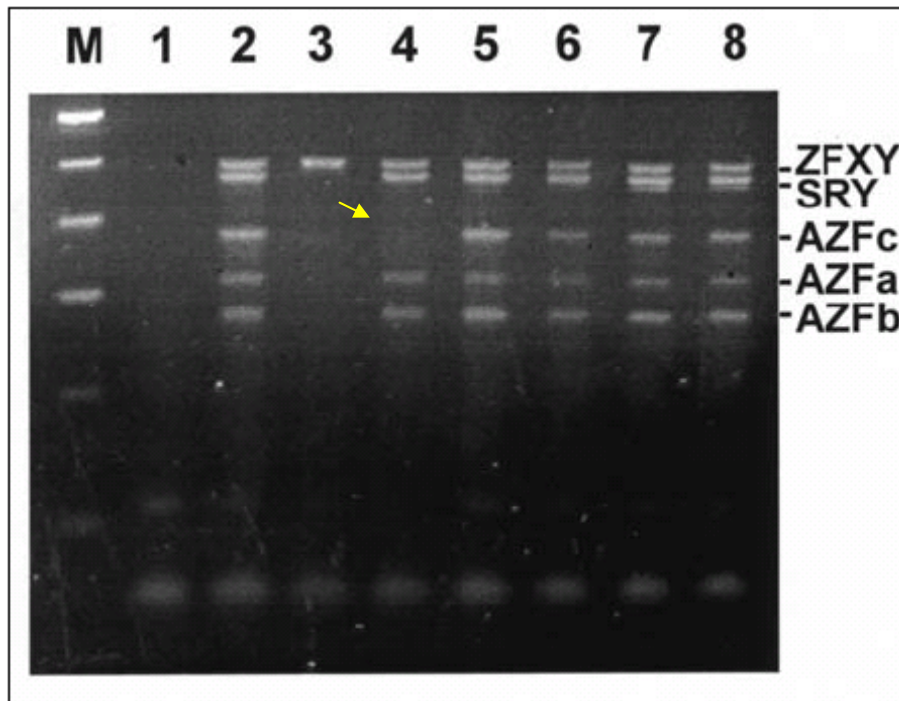
---

Ist das krankheitsverursachende Gen bekannt und handelt es sich um Punktmutationen oder kleine Deletionen/Duplikationen wird routinemäßig DNA aus den Körperzellen des Menschen gewonnen und das betroffene DNA-Stück mittels **PCR** (Polymerase Kettenreaktion) vermehrt

Das PCR-Produkt wird entweder mittels

- **Gelelektrophorese** analysiert oder
- für eine Bestimmung der **DNA-Sequenz** verwendet

# PCR und Gelelektrophorese zur Diagnostik von männlicher Infertilität



M: Marker

1: Leerkontrolle

2: männliche Kontrolle

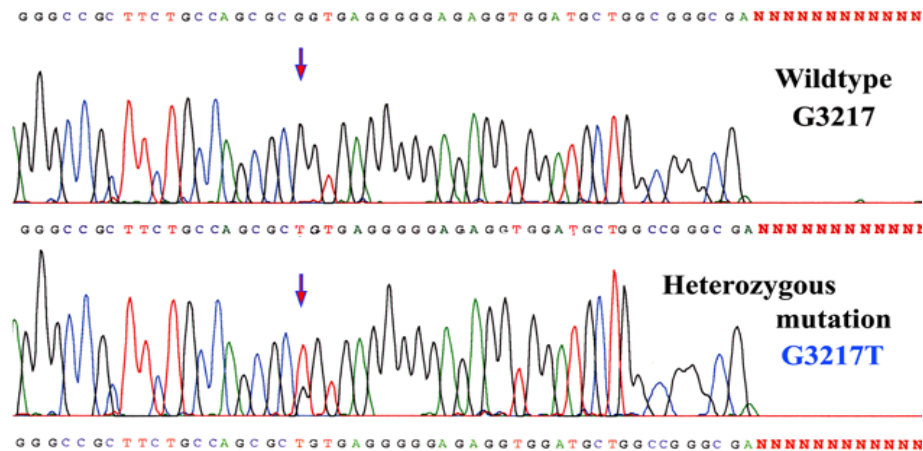
3: weibliche Kontrolle

4-8: infertile Männer mit Oligo-  
oder Azoospermie

Bei Patient 4 fehlt der **Azoospermie-Faktor c (AZFc)** auf dem Y-Chromosom (gelber Pfeil) – eine Deletion liegt vor

# PCR und Sequenzierung

= Bestimmung der Nukleotidfolge der DNA, Veränderungen im Erbgut werden sichtbar und exakt lokalisiert



Guanin an Position 3217

Thymin statt Guanin an  
Position 3217; auf  
einem Allel

# Wie werden Mutationen analysiert (2)?

---

Liegen große Deletionen/Duplikationen oder chromosomale Rearrangements vor, wird

1. eine **markierte „Sonde“** (RNA oder DNA) hergestellt, die die gesuchte DNA-Veränderung enthält

2. anschließend eine von mehreren verschiedenen **Hybridisierungstechniken** verwendet

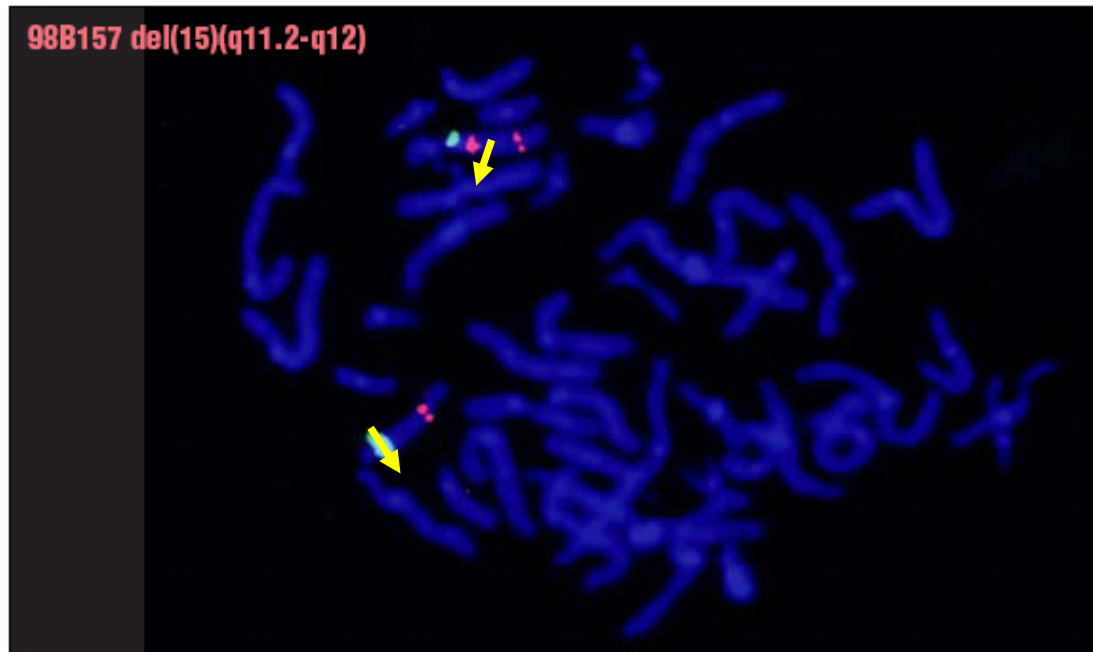
- auf Chromosomen („FISH“; Fluoreszenz in situ Hybridisierung)
- auf Membranen („Southern Blot“, sehr aufwändig)
- auf Genchips (nur für besondere Fragestellungen)

# FISH

## Diagnose von Prader-Willi-Syndrom (PWS)

1/10.000-15.000 Kinder; Deletion in Chromosom 15

### PWS-spezifische Sonde (mittleres rotes Signal)



**Chromosomen 15** sind jeweils durch zwei Kontrollsonden am linken und rechten Chromosomenrand (grünes und rotes Signal) markiert

Quelle: Peter F. Wieacker

Bei einem der beiden Chromosomen 15 fehlt das mittlere rote Signal (gelber Pfeil), eine Deletion liegt vor

# Southern Blot - Prinzip

---

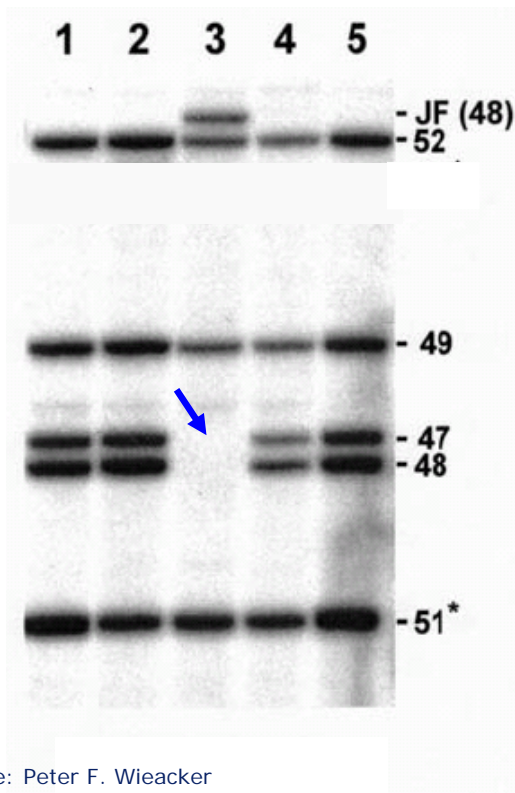
- 1) **DNA des Patienten** wird isoliert, mit Restriktionsenzymen zerstückelt, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und an eine **Membran** gebunden
- 2) **Membran und Sonde** werden zusammengebracht, Sonde versucht an die Patienten-DNA zu binden
- 3) Waschen der Membran, um ungebundene Sonde zu entfernen
- 4) **Sichtbarmachen der Sonde**, z.B. bei einer radioaktiv markierten Sonde einen Röntgenfilm auflegen



# Southern Blot zur Diagnostik von DMD

DMD = Duchenne Muskeldystrophie, 1/3000 neugeborenen Knaben; Mutation im Dystrophin-Gen

## Hybridisierung mit Sonde des Dystrophin-Gens



Zahlen auf der rechten Seite bezeichnen unterschiedliche Exons des Dystrophin Gens

1,2,5: weibliche Kontrollen

4: männliche Kontrolle

### 3: Patient mit DMD:

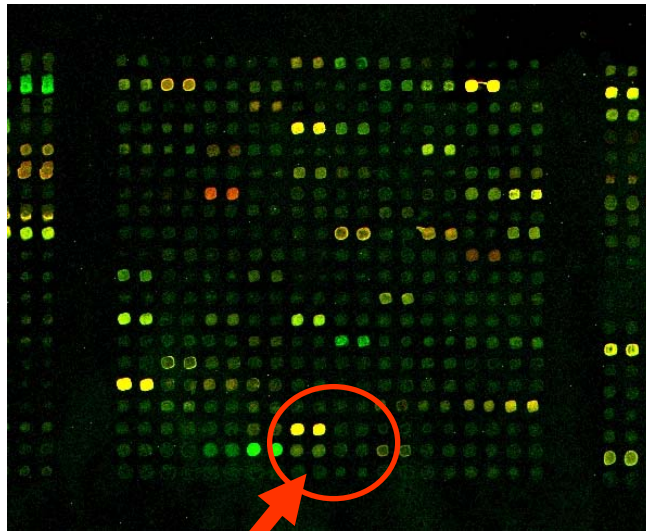
Exon 47 fehlt (blauer Pfeil)

Exon 48 ist im „junction fragment“ (JF) enthalten, das durch die Deletion entstanden ist

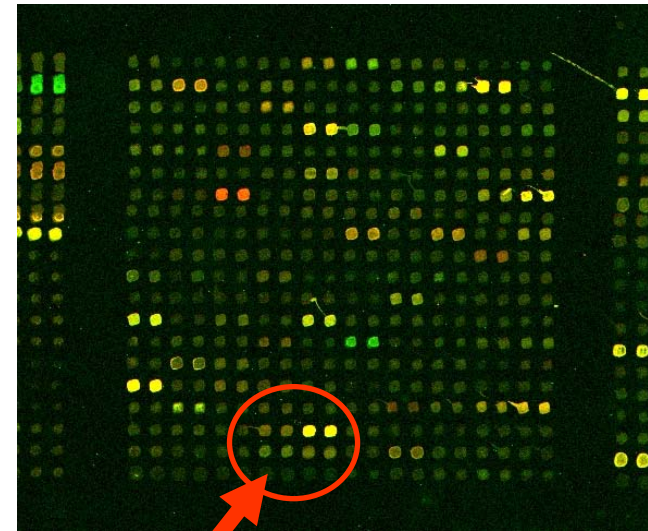
Quelle: Peter F. Wieacker

# Gendiagnostik der Zukunft - Genchips

Wildtyp



Genveränderung



- Glas- oder Kunststoffträger, der viele Proben enthält
- großer Vorteil: viele Infos über genetische Veränderungen in kurzer Zeit erhalten
- Technik stark beforscht, (noch) teuer
- routinemäßig für Gendiagnostik nicht im Einsatz