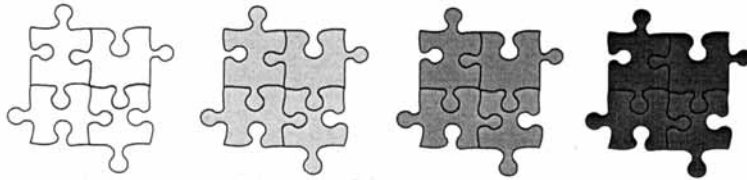


GRUPPENPUZZLE:

Hochdurchsatztechnologien in der Genomanalyse

Erste Lernphase: Aneignungsphase



→ Erarbeiten Sie in Ihrer Expertengruppe die Inhalte eines der vier Textabschnitte (2.1, 2.2, 3.1, 3.2). Ziehen Sie nach Bedarf weitere Informationsquellen heran (Schulbücher, Fachbücher, Internet).

*Leitfragen?
Hinweiskarte 1a*

→ Bereiten Sie die anschließende Phase vor, in der Sie den anderen Ihr Wissen vermitteln.

*Wie?
Hinweiskarte 1b*

Zweite Lernphase: Vermittlungsphase



→ Geben Sie Ihr jeweiliges Expertenwissen in den Puzzlegruppen weiter. Sichern Sie das Verständnis durch gegenseitige Fragen.

*Wie?
Hinweiskarte 1b*

→ Verknüpfen Sie das Wissen der verschiedenen Experten, indem Sie Bezüge zwischen den verschiedenen Methoden herstellen.

*Kriterien?
Hinweiskarte 2*

Dritte Lernphase: Verarbeitungsphase

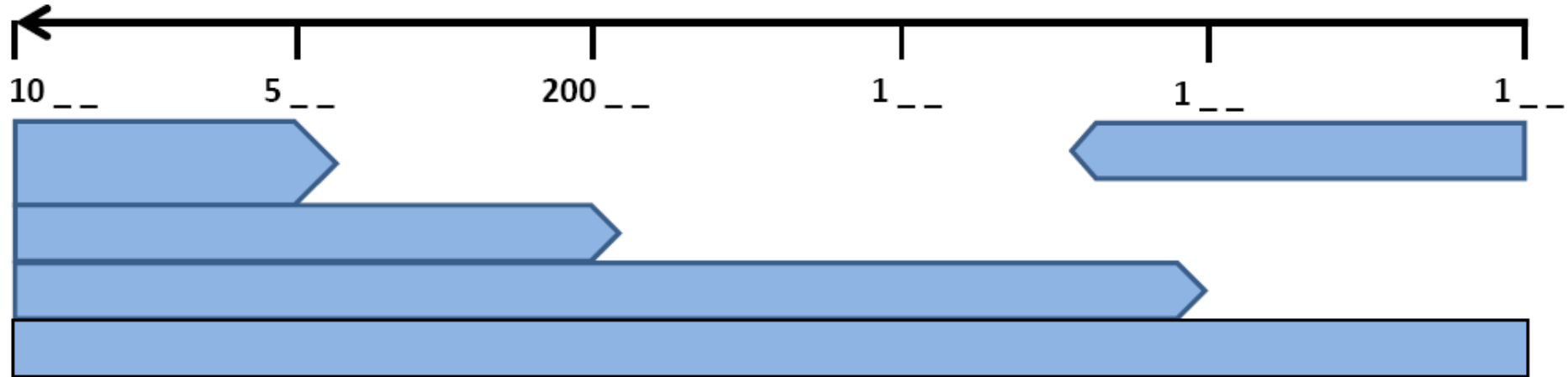


→ Bearbeiten Sie Material 1 und 2, und bringen Sie hierzu Ihr gemeinsames Wissen ein.

*Aufgabe?
Hinweiskarte 3*

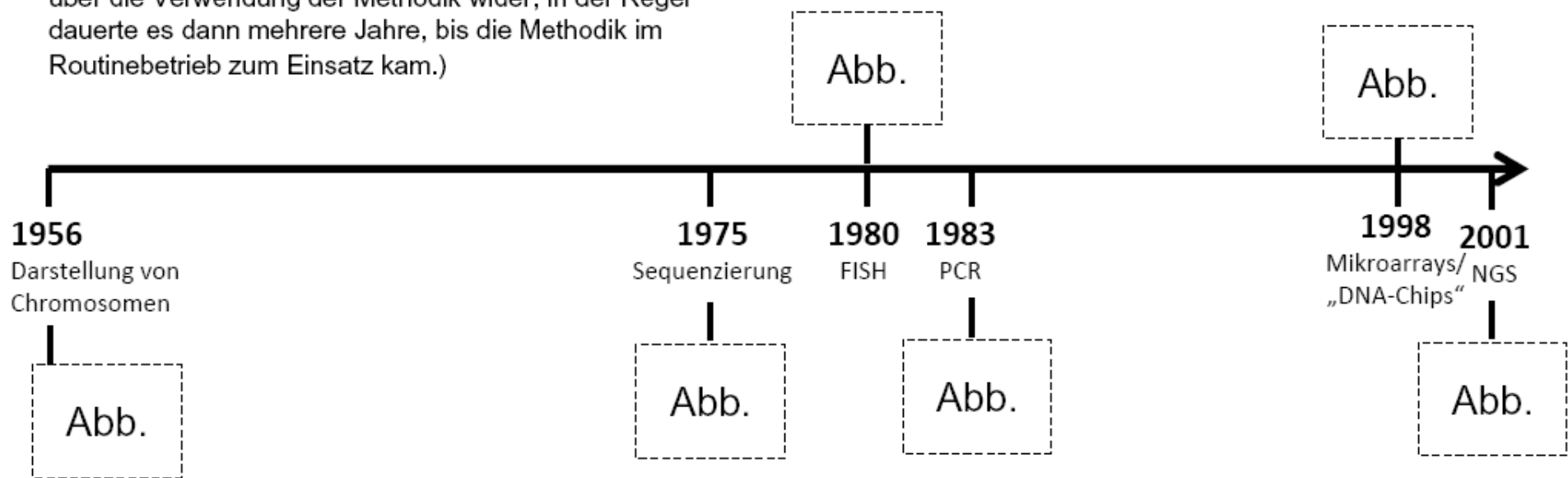
<p>Hinweiskarte 1a: <i>Leitfragen für die Erarbeitung des Lernstoffs in der Aneignungsphase</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Wie heißt/heißen die in unserem Abschnitt genannte/n Methode/n? • Wie werden sie durchgeführt? • Was kann man damit untersuchen? Was nicht? Warum? • Welche Vor- und Nachteile hat/haben die jeweiligen Methoden? • Welche Bedeutung hat/haben die Methode/n in der humangenetischen Diagnostik - aktuell und zukünftig? 	<p>Hinweiskarte 1b: <i>Vorschläge für die Vorbereitung der Vermittlungsphase</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Wählen Sie geeignete Abbildungen aus (ggf. auch selbst erstellen), anhand derer Sie Ihr erarbeitetes Wissen erläutern können. • Halten Sie wichtige Begriffe und Aspekte auf Kärtchen fest (nur einzelne Stichworte aufschreiben, Inhalte strukturieren: verschiedene Kärtchen verwenden, ggf. Vorder- und Rückseite nutzen). • Formulieren Sie Kontrollfragen, anhand derer Sie das Verständnis der anderen überprüfen können. • Notieren Sie Fragen, die Sie nicht oder nur teilweise selbst klären konnten.
<p>Hinweiskarte 2: <i>Mögliche Fragen für den Methodenvergleich in der Vermittlungsphase</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Bei welchen Methoden kommen Chromosomen als Untersuchungsmaterial zum Einsatz, bei welchen DNA? • Was versteht man unter Denaturierung und Hybridisierung? Bei welchen Methoden wird dies durchgeführt? • Was versteht man unter Amplifizierung? Bei welchen Methoden wird dies durchgeführt? • Bei welchen Methoden kommen Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz? Was „sieht“ man jeweils im Ergebnis? • Welches sind „klassische“, welches „neue“ Verfahren der Genomanalyse? Worin besteht jeweils die Weiterentwicklung? 	<p>Hinweiskarte 3: <i>Aufgabenstellung für die gemeinsame Bearbeitung in der Verarbeitungsphase</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Vervollständigen Sie die Übersicht (Material 1), indem Sie Einheiten und Begriffe ergänzen (a) sowie die Abbildungen ausschneiden und zuordnen (b). • Zeigen Sie auf, welche Methoden zum Nachweis der im Fallbeispiel dargestellten Mikrodeletion geeignet sind, indem Sie die Tabelle vervollständigen (Material 2). • Informationen zum DiGeorge-Syndrom, insbesondere zum Phänotyp und zur Bedeutung der Erkrankung für die Betroffenen und ihre Angehörigen finden Sie z.B. unter www.kids-22q11.de.

a) Auflösungsvermögen (die schematische Darstellung ist nicht maßstabsgetreu)



b) Historie

(Die jeweiligen Jahreszahlen geben die ersten Berichte über die Verwendung der Methodik wieder, in der Regel dauerte es dann mehrere Jahre, bis die Methodik im Routinebetrieb zum Einsatz kam.)



a) Auflösungsvermögen

(bitte Einheiten und Begriffe in das Schema eintragen)

bp (Basenpaare)

kb (Kilobasenpaare = 1000 Basenpaare)

Mb (Megabasenpaare = 1000000 Basenpaare)

Einzelgenanalysen

Konventionelle Zytogenetik

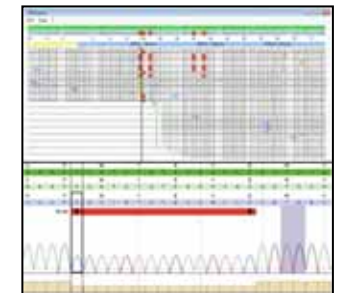
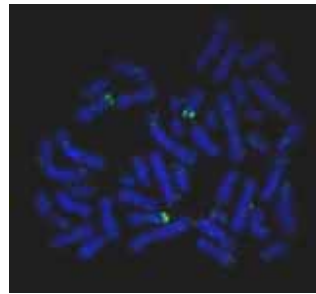
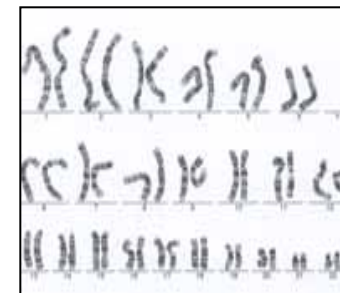
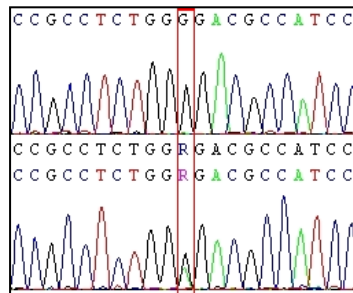
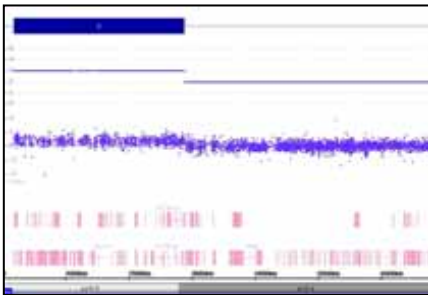
Molekulare Karyotypisierung

NextGenerationSequencing (NGS)

Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH)

b) Historie

(bitte Abbildungen ausschneiden und in das Schema einkleben)



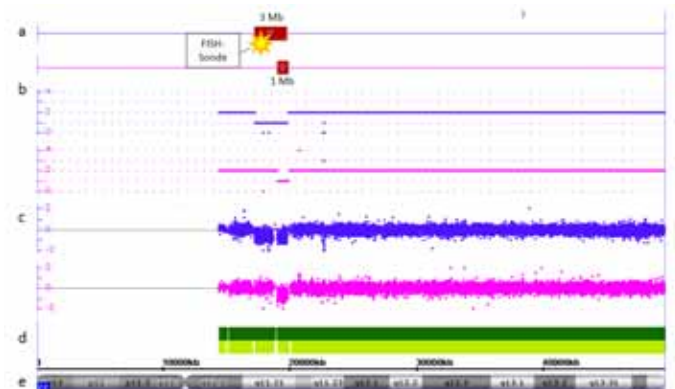
Fallbeispiel: DiGeorge-Syndrom (Deletion 22q11)

Das DiGeorge-Syndrom (DGS) wird durch eine Mikrodeletion im langen Arm von Chromosom 22 hervorgerufen. Es handelt sich um die Bande 22q11. Man spricht daher auch vom Mikrodeletionssyndrom 22q11. In dieser Chromosomenregion befinden sich über 40 verschiedene Gene. Die Größe der Deletion liegt in der Regel bei maximal etwa 3 Mb und damit unterhalb des lichtmikroskopischen Auflösungsvermögens. Bei einer entsprechenden Verdachtsdiagnose, die aufgrund des klinischen Erscheinungsbilds (Phänotyps) gestellt wird, kann die Deletion mittels FISH nachgewiesen werden, wenn es sich um eine klassische Deletion von etwa 3 Mb handelt (s. Abbildung, a)-c), jeweils oben). Allerdings ist die Größe der Deletion variabel und kann auch nur 1 Mb umfassen (s. Abbildung, a)-c), jeweils unten). Dies illustriert die Limitationen und Potenziale der modernen Technologien in der humangenetischen Diagnostik:

Es handelt sich um einen Fall mit klinisch eindeutigem DiGeorge-Syndrom. Durch eine konventionell-zytogenetische Analyse kann die zugrunde liegende Deletion von 1 Mb nicht gefunden werden. Eine klassische nicht-quantitative PCR führt ebenfalls nicht zum Nachweis, da die Deletion nur eines der beiden homologen Chromosomen 22 betrifft: Der im unveränderten Chromosom vorhandene DNA-Abschnitt wird amplifiziert. Aber auch die klassische FISH-Sonde, die in der Routinediagnostik eingesetzt wird, detektiert die Deletion nicht. Hintergrund ist, dass diese FISH-Sonde in einer Region hybridisiert, die von der vorliegenden kleineren Deletion von 1 Mb nicht betroffen ist. Erst durch die durchgeführte Mikroarray-Analyse gelingt der Nachweis dieser kleineren Deletion. Eine vollständige Sequenzanalyse der betroffenen Region ist allerdings auf diese Weise nicht möglich: Die Verwendung eines Mikro-Arrays ist in methodischer Hinsicht eine simultane Hybridisierung mit einer Vielzahl von bzw. an Einzelsonden, die zwar in der entsprechenden Region verteilt sind, diese jedoch nicht vollständig abdecken. Eine exakte Bestimmung der Bruchpunkte der Deletion zur Beantwortung der Frage, welche Gene genau betroffen sind, ist nur mittels *NextGenerationSequencing* möglich. Für die herkömmliche Sanger-Sequenzierung ist diese Region zu groß.

Darstellung zweier unterschiedlicher Deletionen in 22q11.2 mittels DNA-Chip¹: Klassische Deletion von etwa 3 Mb und kleinere Deletion von etwa 1 Mb.

- a) Schematische Darstellung des betroffenen Segmentes mit Hybridisierungsstelle der FISH-Sonde.
- b) Darstellung der Kopienzahlsegmente des gesamten Chromosoms 22.
- c) Darstellung der Hybridisierungssignale der einzelnen DNA-Sonden.
- d) Sondenverteilung über das gesamte Chromosom 22 (das Zentromer und der kurze Arm des Chromosoms sind nicht durch Sonden abgedeckt).
- e) Physikalische Position und chromosomale Bänderung des Chromosoms 22.



¹„Affymetrix GenomeWideSNP_6.0 Array“

Methode	Eignung der Methode zum Nachweis der DGS-Deletion
GTG-Bänderung	
FISH	
PCR	
Sanger-Sequenzierung	
Mikro-Array	
NGS	

Musterlösung zur Tabelle (Material 2):

Methode	Eignung der Methode zum Nachweis der DGS-Deletion
GTG-Bänderung	<i>i.d.R. nicht darstellbar, da zu klein (< 5Mb)</i>
FISH	<i>nicht alle kommerziellen Sonden decken alle möglichen Deletionen ab</i>
PCR	<i>nur über quantitative PCR-Verfahren darstellbar, da Deletion heterozygot</i>
Sanger-Sequenzierung	<i>nicht darstellbar, da betroffene Region zu groß</i>
Mikro-Array	<i>darstellbar, allerdings keine vollständige Sondenabdeckung</i>
NGS	<i>darstellbar, präzise Bruchpunktcharakterisierung möglich</i>