

Carolin Hartmann  
Dr. med.

## **Genomische Quantifizierung mittels Multiplex-Amplifikation ligierter Sonden**

Geboren am 22. 05. 1980 in Mannheim

Reifeprüfung am 22. 06. 1999 in Neustadt a.d.Weinstr.

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1999/2000 bis SS 2006

Physikum am 30. 08. 2001 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium am Karolinska Institut, Stockholm, Schweden (8/02-1/03); Rest in  
Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg (Innere Medizin, Chirurgie) sowie Red Cross Childrens  
Hospital, University of Cape Town, South Africa (Pädiatrie)

Staatsexamen am 08. 05. 2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Humangenetik

Doktorvater: Prof. Dr. med. J. Zschocke, Ph. D.

Für die Erkennung von kleineren, mittels Chromosomenanalyse nicht nachweisbaren genomischen Rearrangements standen am Institut für Humangenetik bisher die FISH-Analyse sowie die Quantitative Multiplex-PCR zur Verfügung: zeit- und kostenintensive bzw. begrenzt einsetzbare Verfahren.

Nach der Veröffentlichung der MLPA-Methode 2002, einer neuen Alternative in der genomischen Quantifizierung, die auf der Hybridisierung und Multiplex-Amplifikation ligationsabhängiger Sonden beruht, war ein erstes Ziel dieser Arbeit die Etablierung der Methode an unserem Institut. Die Laufbedingungen wurden optimiert und ein standardisiertes Auswertungsprogramm entwickelt. Anschließend wurde die Methode anhand verschiedener Krankheiten für einen Einsatz in der molekulargenetischen Diagnostik validiert und spezifische Forschungsschwerpunkte bearbeitet.

Die Studie zur Aneuploidie-Diagnostik brachte die Erkenntnis, dass die MLPA-Methode bei entsprechender Aufarbeitung der DNA zuverlässig auch zur pränatalen Diagnostik an nativem Fruchtwasser eingesetzt werden kann. Triploide Proben und maternale Kontaminationen müssen jedoch weiterhin mit FISH oder Karyotypisierung ausgeschlossen werden. Ein Einsatz der MLPA-Methode ist vor allem für das Screening einer großen Anzahl von Proben geeignet.

Nach der Validierung des *BRCA1*-Kits zur Diagnostik hereditärer Brustkrebserkrankungen wurden 75 für Mutationen im *BRCA1*- und *BRCA2*-Gen zuvor negativ getestete Hochrisiko-Patienten mit MLPA untersucht, um die Prävalenz größerer Rearrangements in deutschen Hochrisiko-Familien näher zu bestimmen. Hierbei konnten Deletionen in insgesamt vier Fällen nachgewiesen werden. Bei zwei Familien handelte es sich um eine Deletion von Exon 1A, 1B und 2, bei zwei anderen Familien um eine Deletion von Exon 17. Größere Rearrangements machen bezogen auf alle *BRCA1*-Mutationen 8 % aus, eine Zahl, die mit zuvor veröffentlichten Daten aus Deutschland und Frankreich übereinstimmt. In der Diagnostik kann MLPA aufgrund der einfachen und schnellen Technik zeit- und kostengünstig noch vor einer aufwendigen Punktmutationssuche eingesetzt werden.

Desweiteren wurde MLPA für die DMD- und BMD-Diagnostik evaluiert. Die Zuverlässigkeit der Methode bestätigte sich, und eine Studie über das Auftreten und die Verteilung von Mutationen im *Dystrophin*-Gen wurde durchgeführt. Im retrospektiven Teil der Studie entdeckten wir bei vier aus insgesamt 90 zuvor mit Multiplex-PCR negativ getesteten Proben jeweils eine Deletion und bei 11 weiteren Proben eine Duplikation. Im prospektiven Teil der Studie fanden sich bei 29 von insgesamt 73 Ratsuchenden Deletionen, bei 5 weiteren Proben Duplikationen. Es fand sich ein komplexes Rearrangement mit einer Duplikation von Exons 45—48 und Exons 54—55. Die Häufigkeit von Duplikationen liegt mit 7 % (retrospektiv) bzw. 12 % (prospektiv) höher als in früheren Publikationen. Allerdings zeigte diese Studie auch die Grenzen von MLPA auf, bedingt durch das Auftreten zweier falsch-positiver Befunde aufgrund eines zuvor nicht beschriebenen Polymorphismus respektive einer Stop-Mutation im Bereich der Ligationstelle. MLPA bietet als erste Methode die Möglichkeit, alle 79 Exons des *Dystrophin*-Gens simultan zu untersuchen und wird heute in unserem Labor routinemäßig zur DMD- und BMD-Diagnostik (auch pränatal) eingesetzt. Bei Vorliegen von Einzeldelationen wird das Ergebnis zum Ausschluß von falsch-positiven Befunden mit der Multiplex-PCR bestätigt.

In Zusammenarbeit mit der Firma MRC-Holland, Amsterdam, haben wir ein neues MLPA-PAH-Kit für einen Einsatz in der PKU-Diagnostik entwickelt und evaluiert. Im Anschluss daran wurde in Kooperation mit Instituten für Humangenetik in Bristol, Großbritannien, und Glostrup, Dänemark, eine Studie zur Verteilung größerer Rearrangements an 38 zuvor negativ getesteten PKU-Proben durchgeführt. Bei sieben der 21 Proben aus Heidelberg (7/21 = 33 %) wurden Deletionen in unterschiedlichen

Bereichen des *PAH*-Gens entdeckt. Auch wenn auf > 98 % der PKU-Allele krankheitsauslösende Punktmutationen mittels PCR-Methoden nachweisbar sind, kann die MLPA-Methode bei solchen Proben zur Klärung des Genotyps beitragen, bei denen nach DGGE und Sequenzierung kein abschließender Befund gestellt werden kann.

Aus der eigenen Entwicklung eines MLPA-Kits auf der Basis von synthetisch hergestellten Oligonukleotid-Primerpaaren, wie wir sie anhand der *OTC*-Analytik durchgeführt haben, ergibt sich eine Vielzahl neuer Anwendungsmöglichkeiten. Diese Weiterentwicklung der MLPA-Methode verspricht Unabhängigkeit von der Herstellerfirma und Flexibilität bei der Erstellung neuer Kits für spezifische wissenschaftliche oder diagnostische Fragestellungen. Bei der Evaluation konnten positive und negative Kontrollproben zuverlässig erfasst werden, so dass eine Anwendung dieses Kits im Rahmen einer größeren *OTC*-Studie möglich ist.

Mit der MLPA-Technik steht am Institut für Humangenetik nun eine Methode zur genomischen Quantifizierung zur Verfügung, die durch ein hohes Maß an Wirtschaftlichkeit geprägt ist, wobei sie die diagnostischen Möglichkeiten bisher angewandter Methoden zum Teil übertrifft. Durch die nun mögliche eigene Herstellung der Sonden eröffnen sich gleichzeitig neue Wege für Wissenschaft und Diagnostik in der Molekulargenetik.