

Universität Ulm
Institut für Humangenetik
Leiter: Prof. Dr. med. Walther Vogel

**Mosaik-Untersuchungen
bei Neurofibromatose Typ 1 mit der
Multiplex Ligation- dependant Probe Amplifikation**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Sarah Colak
aus Waiblingen

2009

Amtierender Dekan:
1. Berichterstatter:
2. Berichterstatter:
Tag der Promotion:

Prof. Dr. Thomas Wirth
Prof. Dr. Kehrer-Sawatzki
PD Dr. Melzer
14.6.2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Die Erkrankung Neurofibromatose	1
1.1.1 Krankheitsbild der Neurofibromatose Typ 1	1
1.1.2 Mutationsspektrum des <i>NF1</i> -Gens	1
1.1.3 Mosaizismus der Neurofibromatose Typ 1	4
1.2 Das Verfahren der Multiplex Ligation- dependant Probe Amplifikation	5
1.3 Zielsetzung der Doktorarbeit	8
2 Material und Methoden	10
2.1 Material	10
2.1.1 Chemikalien	10
2.1.2 Lösungen, Puffer und Kulturmedien	11
2.1.3 Standards und Enzyme	12
2.1.4 Reagentsysteme und Kits	12
2.1.5 Laborgeräte und Hilfsmittel	12
2.1.6 Herkunft der untersuchten DNA-Proben	13
2.1.7 Elektronische Datenbanken und Software	13
2.2 Methoden	13
2.2.1 Herstellung der Zellmischungen (Mosaik)	13
2.2.2 Durchführung der Multiplex Ligation- dependant Probe Amplifikation (MLPA)	16
2.2.3 Statistik	22
3 Ergebnisse	23
3.1 Analyse der Schwankungen innerhalb des Versuchsaufbaus	24
3.1.1 Analyse der Schwankungen der einzusetzenden Zellzahlen für die Herstellung von Zellmischungen zur Mosaik-Analyse bedingt durch Ungenauigkeiten bei der Zellzählung	24
3.1.2 Analyse der Schwankungen der MLPA-Ergebnisse bedingt durch die elektrophoretische Auftrennung der MLPA-Proben im ABI Analyser	28

3.1.3	Analyse der Reproduzierbarkeit der hergestellten Zellmischungen für die Mosaik-Untersuchungen	29
3.2	Ergebnisse der Untersuchung des individuellen Verhaltens der MLPA-Sonden im Deletionsbereich	33
3.2.1	Erläuterungen zur Auswertung des MLPA-Ergebnis als graphische Darstellung der einzelnen MLPA-Werte der MLPA-Sonden	33
3.2.2	Graphische Darstellung der 15 MLPA-Sonden im Deletionsbereich	34
3.2.3	Doppelbestimmungen der MLPA-Werte im ABI-Analyser innerhalb eines MLPA-Versuchsansatzes zur Eruierung zusätzlicher sondenabhängiger Schwankungen	46
3.3	Auswirkungen der unterschiedlichen Mosaikanteile auf die MLPA Werte	49
4	Diskussion	54
4.1	Erkennen eines Mosaikstatus aus nicht-deletierten Zellen und solchen mit einer <i>NF1</i> Deletion anhand des MLPA-Ergebnisses	54
4.2	Stabilität und Zuverlässigkeit der MLPA-Werte der einzelnen MLPA-Sonden	57
4.3	Unterscheidung der verschiedenen Deletionstypen durch den MLPA-Kit P122 Version C1	61
4.3.1	Unterscheidung der Typ-I und Typ-II Deletion	61
4.3.2	Unterscheidung der Typ-I Deletion und atypischen Deletion	65
5	Zusammenfassung	66
6	Literaturverzeichnis	68

Abkürzungsverzeichnis

ATAD 5	ATPase family AAA domain containing 5
ATP	Adenosintriphosphat
BLMH	Bleomycin Hydrolase
bp	Basenpaare
C17orf42	Chromosome 17 open reading frame 42
C17orf75	Chromosome 17 open reading frame 75
cDNA	Kompletetäre Desoxyribonukleinsäure
CENTA 2	Centaurin-alpha-2
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPD	Carboxypeptidase D
CRLF 3	Cytokine receptor-like factor 3
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EBV	Epstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alteres
EtOH	Ethanol
EVI2A	Ecotropic viral integration site 2A
EVI2B	Ecotropic viral integration site 2B
FCS	fetales Kälberserum
FDA	Fluorescein-di-acetat
FISH	Fluoreszens-in-situ-Hybridisierung
GOSR1	Golgi SNAP receptor complex member 1
HPLC	High pressure liquid chromatography
Kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
LRRC37B	Leucine rich repeat containing 37 member B
LRRC37B2	Leucine rich repeat containing 37 member B2
MgCl	Magnesiumchlorid
MPNST	maligner peripherer Nervenscheidentumor
NaCl	Natriumchlorid

NAHR	nicht-allelische homologe Rekombination
NF 1	Neurofibromatose Typ 1
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PRS	paraloge Rekombinationsstelle
PSMD11	26S Proteasome non-ATPase regulatory subunit 11
RAB11FIP4	RAB11 family interacting protein 4 (class II)
REP	Repeat
RHBDL3	Rhomboid, veinlet-like 3 (Drosophila)
RNF 135	Ring finger protein 135
RPM	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RHOT1	Ras homolog gene family member T1
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSH2	Protein phosphatase slingshot homolog 2 (Drosophila)
SUZ12	Homo sapiens suppressor of zeste 12 homolog (Drosophila)
SUZ12P	Homo sapiens suppressor of zeste 12 homolog (Drosophila) - Pseudogen
TBC	Tuberkulose
TBC1D29	TBC1 domain family member 29
TE	TRIS-EDTA
TM	Trademark
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF 4	TNF receptor-associated factor 4
TRIS	Trishydroxymethylaminoethan
UTP 6	U3 small nucleolar RNA-associated protein 6 homolog
Mb	Megabasen
MLPA	Multiplex Ligation- dependant Probe Amplifikation
MYO1D	Myosin 1d
OMG	Oligodendrocyte myelin glycoprotein
ZNF 207	Zinc finger protein 207

1 Einleitung

1.1 Die Erkrankung Neurofibromatose

Unter dem Begriff der Neurofibromatose wird eine Gruppe von Erbkrankheiten zusammengefasst. Hauptsächlich werden 2 Formen der Neurofibromatose, Typ 1 und Typ 2 unterschieden, die beide autosomal-dominant vererbt werden, wobei es sich in 50% der Fälle um Neumutation handelt.

1.1.1 Krankheitsbild der Neurofibromatose Typ 1

Die Neurofibromatose Typ 1 (NF1) ist eine der häufigsten genetisch bedingten Tumorerkrankungen und wird autosomal-dominant über das Chromosom 17q11.2 vererbt. Die Inzidenz beträgt weltweit 1:3000-4000 (Friedman 1999; Lammert et al., 2005). Das Krankheitsbild ist komplex. Neben multiplen Tumoren der Haut und des Nervensystems können psychomotorische Retardierung, Skelettveränderungen wie Skoliose und Pseudarthrose, Gefäßveränderungen, Pigmentstörungen wie Cafe-au-lait Flecken, axilläre und inguinale Hautsprekelung sowie Irishamartome (Lisch-Knötchen) vorliegen. Für die meisten Patienten stellen die zahlreichen dermalen Neurofibrome, die Ausbildung von oft entstellenden plexiformen Neurofibromen und pilozytische Astrozytome des Nervus optikus (Optikusgliome) sehr belastende Symptome dar. Während bei dermalen Neurofibromen, die bei fast allen NF1 Patienten auftreten, keine maligne Entartung auftritt (Huson et al., 1988), machen 4-5% der plexiformen Neurofibrome, die bei 30% der Patienten auftreten, eine Transformation in maligne periphere Nervenscheidentumoren (MPNSTs) durch (Ducatman et al., 1986; Korf 1999; Tucker et al., 2005). Kinder mit NF1 unter 5 Jahren haben ein 200-500fach erhöhtes Risiko, maligne myeloische Leukämien auszubilden (Bader und Miller, 1978; Stiller et al., 1994).

1.1.2 Mutationsspektrum des *NF1*-Gens

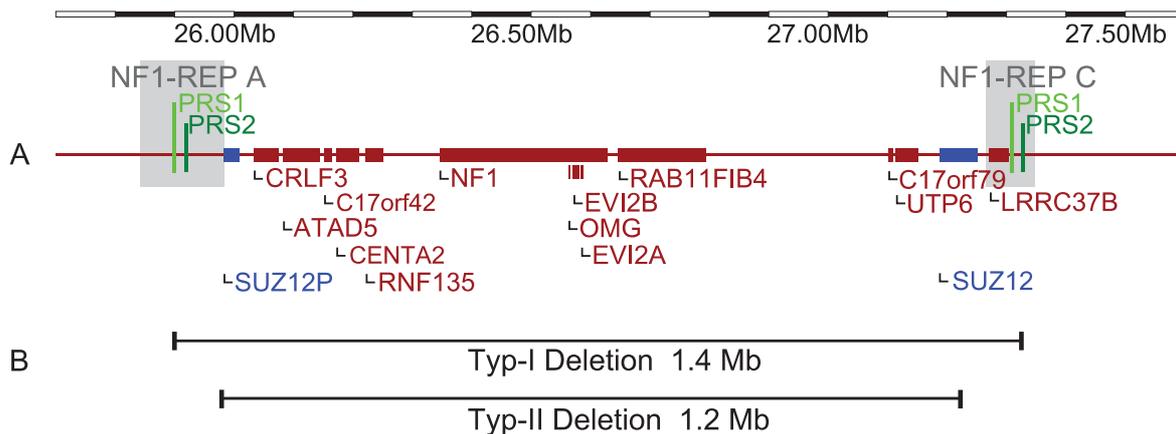
Das *NF1*-Gen weist mit $3,1-6,5 * 10^5$ eine der höchsten Mutationsraten im menschlichen Genom auf (Huson et al., 1989). Daher verwundert es nicht, dass 50% der Neurofibromatose - Erkrankungen aufgrund Neumutation entstehen

(Borberg 1951, Huson et al., 1989). Da die Ausprägung des Phänotyps sowohl inter- als auch intrafamiliär variabel ausgeprägt sein kann, werden zusätzliche modifizierende Gene für den unterschiedlichen Manifestationsgrad diskutiert (Akesson et al., 1983; Riccardi und Lewis, 1988). Die Mehrzahl der an Neurofibromatose Typ 1 leidenden Patienten weist kleine intragenetische Mutationen im *NF1*-Gen auf (Ars et al. 2000; Fahsold et al. 2000; Messiaen et al. 2000). Dabei sind alle Mutationstypen wie Intron-Mutation, Exon-Deletion, Missense-Mutation, Insertion oder Punktmutation anzutreffen, wobei translationale Stoppmutationen mit 80% am häufigsten vorkommen. Nur ca. 5 % der Neurofibromatose Typ 1 Patienten haben große Deletionen in der *NF1*-Genregion (Cnossen et al., 1997; Rasmussen et al., 1998; Kluwe et al., 2004). Im Gegensatz zu den Patienten mit intragenetischen Mutationen im *NF1*-Gen, zeigen *NF1*-Mikrodeletionspatienten häufig eine schwerere und atypische Manifestation der Erkrankung. *NF1*-Deletionspatienten leiden häufig unter einer hohen Anzahl an Neurofibromen bereits im präpubertären Alter. Daneben kommt es zu Entwicklungsverzögerungen, fazialen Dismorphiezeichen sowie zu einem erhöhten Lebenszeitrisiko für die Entwicklung maligner peripherer Nervenscheidentumoren (Upadhyaya et al., 1998; Wu et al., 1997; DeRaedt et al. 2003; Descheemaker et al. 2004). Die häufigsten und rekurrenten Deletionstypen bei Neurofibromatose Typ 1 werden als Mikrodeletion Typ-I bzw. Typ-II bezeichnet. Ungefähr 60-70% aller *NF1*-Mikrodeletionen betreffen den Typ-I Deletionstyp (Lopéz-Correa et al., 2001; De Raedt et al. 2006; Kehrer-Sawatzki et al., 2004). Daneben sind noch atypische *NF1* Deletionen zu unterscheiden, die allerdings sehr selten vorkommen und keine rekurrenten Bruchpunkte aufweisen (Cnossen et al., 1997; Venturin et al., 2004; Dorschner et al., 2000; Kehrer-Sawatzki und Cooper, 2008).

Die Typ-I Mikrodeletion umfaßt 1.4 Mb und führt zu einem Verlust von 14 Genen, einschließlich dem *NF1*-Gen. Verursacht werden Typ-I Deletionen durch nicht-allelische homologe Rekombination (NAHR) zwischen sogenannten low-copy-repeats (*NF1*-REPs A und C), die die *NF1*-Genregion flankieren (Lopéz-Correa et al. 2001; Dorschner et al. 2000; Jenne et al. 2001). Die nicht-allelische homologe Rekombination findet während der mütterlichen Meiose I statt (Lopéz-Correa et al., 2000). Die *NF1*-REPs zeigen eine komplizierte Struktur von homologen

Blöcken unterbrochen von nicht-homologen Sequenzabschnitten (Jenne et al., 2001; Lopéz-Correa et al., 2001; Forbes et al. 2004). Der NF1-REP A umspannt 131 Kb, während der NF1-REP C 75 Kb umfasst. Der längste Homologieblock der NF1-REPs, dessen Sequenzhomologie bei 97,5% liegt, umspannt 51 Kb (Forbes et al., 2004). In diesem Homologieblock konnten zwei hotspot-Regionen, die paraloge Rekombinationsstellen PRS1 und PRS2, identifiziert werden, in denen bevorzugt NAHR stattfinden (Jenne et al. 2001; Lopéz-Correa et al. 2001; Forbes et al., 2004). Von bislang 60 erforschten Typ-I Deletionen wiesen 40 ihren Bruchpunkt innerhalb einer 3.4 Kb großen Region um PRS2 auf, bei 13 weiteren Typ-I Deletionen konnte der Bruchpunkt innerhalb der 1.8 Kb großen PRS1 Region identifiziert werden (De Raedt et al., 2006).

Die Typ-II Mikrodeletion umfaßt 1.2 Mb und führt zum Verlust von 13 Genen, einschließlich dem *NF1*-Gen. Im Gegensatz zu den Typ-I Deletionen ist das *LRRC37B*-Gen von den Typ-II Deletionen ausgeschlossen. Verursacht werden Typ-II Deletionen durch nicht-allelische homologe Rekombination (NAHR) innerhalb des *SUZ12* Gens und dessen Pseudogen *SUZ12P*, die beide nahe der NF1-REPs liegen. Das *SUZ12*-Gen liegt ca. 30 Kb proximal des NF1-REP C, während das *SUZ12P*-Pseudogen 4 Kb mit dem NF1-REP A überlappt (Steinmann et al., 2007). Die nicht-allelische homologe Rekombination findet im Gegensatz zu den Typ-I Deletionen bei den Typ-II Deletionen während der Mitose statt. Das *SUZ12*-Gen und dessen *SUZ12P*-Pseudogen sind in direkter Orientierung zueinander lokalisiert und weisen eine Sequenzhomologie von 96,2% über eine Länge von 45 Kb auf. Bisher konnten für die Typ-II Deletionen keine hotspot-Regionen rekurrenter Deletionsbruchpunkte gefunden werden (Steinmann et al., 2007). Die folgende Abbildung veranschaulicht die Position der Bruchstellen der Typ-I und Typ-II Deletion.



A Position der Gene der *NF1*-Region (rot, allerdings *SUZ12P*- und *SUZ12*-Gen blau), sowie Position der paralogen Rekombinationsstellen PRS1 und PRS2 (grün) innerhalb der low-copy-repeats NF1-REP A und C (grau); Mb = Megabasen

B Umfang der Typ-I und Typ-II Deletion

Abbildung 1: Schematische Darstellung der *NF1*-Region, NF1 = Neurofibromatose Typ 1

1.1.3 Mosaizismus der Neurofibromatose Typ 1

Ein Mosaizismus bei Neurofibromatose Patienten beschreibt das Vorhandensein einer Mutation oder Mikrodeletion in der *NF1*-Region in einer Zell-Subpopulation aller Zellen des Organismus, die aus einer homogenen Zygote hervorgegangen sind.

In einer der ersten Analysen über Mosaikbildungen aus normalen Zellen und solchen mit *NF1* Deletion bei Neurofibromatose Patienten mit großen *NF1* Deletionen konnte ein unerwartet hoher Anteil von 40% (8/20) mit somatischen Mosaiken gefunden werden (Kehrer-Sawatzki et al., 2004). Bei diesen Fällen mit somatischem Mosaik handelte es sich um Typ-II *NF1*-Mikrodeletion oder atypische Deletion. Die Ursache für eine Typ-II Mikrodeletion findet sich in der mitotischen intrachromosomalen nicht-allelischen Rekombination während der Embryogenese. Erfolgt diese Deletion erst spät in der Embryogenese kann sich die klinische Symptomatik auf nur ein Körpersegment beschränken (Ruggieri und Huson, 2001; Schultz et al., 2002; Listernick et al., 2003). Bei früh erfolgter somatischer Mutation kann sich ein Vollbild der NF1 entwickeln, welches klinisch schwer von einer geerbten *NF1*-Mutation zu unterscheiden ist. Generell gilt es allerdings zu betonen, dass bei Vorliegen eines Mosaiks mit normalen Zellen Neurofibromatose Patienten häufig eine mildere klinische Manifestation zeigen (Petek et al., 2003; Steinmann et al. 2007). Bisher wurden erst 26 Neurofibromatose Patienten mit Mosaikstatus untersucht. Bei allen Deletionspatienten dieser Gruppe handelte es

sich um eine Typ-II Deletion oder atypische Deletion (zusammengefasst in: Kehrer-Sawatzki und Cooper, 2008).

Um die großen Deletionen der *NF1*-Region zu diagnostizieren stehen hauptsächlich das Verfahren der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und die Multiplex Ligation dependant Probe Amplifikation (MLPA) zur Verfügung. Für die FISH-Auswertung werden etwa 30 Zellen benötigt, die sich in Mitose befinden und FISH-Signale zeigen. Die MLPA ist nicht auf Mitosezellen angewiesen und kann an geringen Mengen genomischer DNA (100 ng) durchgeführt werden. Ein weiterer Vorteil der MLPA ist die Möglichkeit der Unterscheidung zwischen *NF1* Typ-I und Typ-II Deletionen.

1.2 Das Verfahren der Multiplex Ligation- dependant Probe Amplifikation (MLPA)

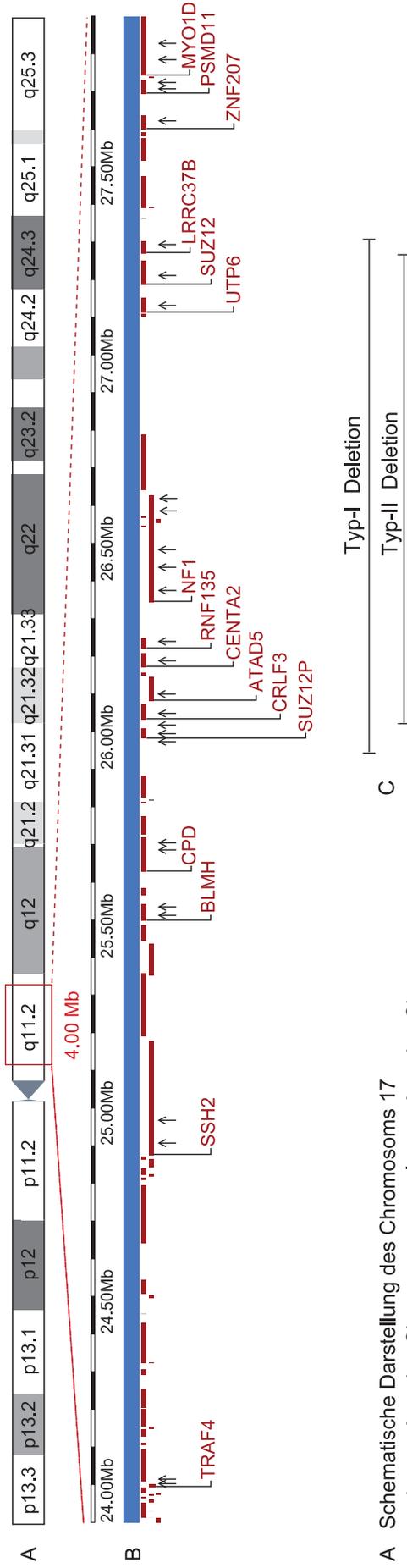
Das seit 2002 bekannte Verfahren der Multiplex Ligation- dependant Probe Amplifikation (MLPA) ermöglicht eine relative Quantifizierung von bis zu 45 verschiedenen DNA-Sequenzen in einem Arbeitsschritt (Schouten et al 2002). Mit ihr lassen sich schon anhand kleinster DNA-Mengen (20ng) größere genomische Rearrangements nachweisen. Dazu zählen Deletionen und Duplikationen einzelner Genabschnitte (Exons) bzw. ganzer Gene. Bei dieser Methode kommen mehrere MLPA-Sonden, die auf bestimmte Genregionen z.B. des Chromosoms 17 gerichtet sind, zur Anwendung. Gelingt die Hybridisierung dieser Sonden an die Zielsequenz, kommt es zur Polymerase Kettenreaktion. Das amplifizierte PCR Produkt wird mittels Elektrophorese aufgetrennt. Das Ergebnis des MLPA-Verfahrens zeigt entsprechend der Signalintensität der Bande einen Peak. Dieser Peak wird in Relation zu mehreren Kontrollpeaks gesetzt. Die Kontrollpeaks entstammen der DNA gesunder Probanden ohne genomische Veränderung auf Chromosom 17. Die so entstehende Ratio aus Kontrollpeakhöhen und Probenpeakhöhe kann beurteilt werden und wird auch MLPA-Wert genannt. Da es sich bei den großen *NF1* Deletionen vom Typ-I um heterozygote Deletionen handelt, sollte bei Vorliegen einer Deletion der Zielsequenz die Probenpeakhöhe der Hälfte der Kontrollpeakhöhe entsprechen und einen MLPA-Wert (eine Ratio) von 0,5 ergeben. Liegt keine Deletion vor, entspricht die Probenpeakhöhe der Kontrollpeakhöhe und ergibt einen MLPA-Wert von 1,0. Bei einem MLPA-Wert von

1,3 oder darüber liegt der Verdacht eines triploiden oder duplizierten Genabschnitts nahe. Sollte der MLPA-Wert 0 ergeben, kann von einer homozygoten Deletion der Zielsequenz, auf der die entsprechende MLPA-Sonde bindet, ausgegangen werden.

Die MLPA-Methode zur Detektion intragenetischer Deletionen und Duplikationen bei Neurofibromatose Typ 1 wurde schon von verschiedenen Arbeitsgruppen angewendet. Die Effektivität und Genauigkeit der MLPA-Methode konnte durch das korrekte Detektieren von 13 Single- und Multiexon Deletionen aus einer Kohorte von 1050 NF1 Patienten bestätigt werden, deren Deletionen zuvor aufgrund von long-range RT-PCR und cDNA Sequenz Analysen bekannt waren (Wimmer et al., 2006). Zusätzlich konnten durch das MLPA-Verfahren 12 weitere Single- und Multiexon Deletionen in einer Kohorte von 55 NF1 Patienten ausfindig gemacht werden, deren vorherige Untersuchungen keine *NF1* Mutation aufzeigen konnte (Wimmer et al., 2006).

In einer anderen Untersuchung von 63 NF1 Fällen, bei denen zuvor intragenetische Punktmutationen ausgeschlossen wurden, konnte die MLPA-Methode 14 Single- und Multiexon Deletionen sowie 9 große, die *NF1*-Region umspannende Deletionen ausfindig machen, die durch real-time PCR bestätigt werden konnten. Mithilfe des MLPA Verfahrens konnten weiterhin die 9 großen Deletionen in 6 Typ-I Deletionen und 3 Typ-II Deletionen unterschieden werden (De Luca et al., 2007). Allerdings ist noch unklar, wie effektiv die MLPA-Methode bei vorliegendem Mosaik von Zellen mit *NF1* Deletion und ohne *NF1* Deletion angewendet werden kann.

Mittlerweile sind 2 MLPA SALSA Kits für die *NF1*-Region bei der Firma MRC Holland zu erwerben. Ein Kit (P081/082) beschränkt sich auf 28 Exons innerhalb des *NF1*-Gens, der andere Kit (P122) umspannt auch umliegende Gene der *NF1*-Region, um gezielt große Deletionen wie die Typ-I und Typ-II Mikrodeletion unterscheidbar zu machen. Für die Analysen im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der MLPA-Kit P122 Version C1 angewandt, der insgesamt 28 MLPA-Sonden enthält. Davon binden 5 MLPA-Sonden innerhalb des *NF1*-Gens, 15 MLPA-Sonden binden zentromerisch und 8 MLPA-Sonden telomerisch des *NF1*-Gens (Abbildung 2). Zusätzlich enthält der Kit 11 Referenzsonden, die größtenteils auf anderen Chromosomen binden.



A Schematische Darstellung des Chromosoms 17
 p = kurzer Arm des Chromosoms, q = langer Arm des Chromosoms

B Namentliche Bezeichnung der Zielgene der 28 MLPA-Sonden (rot) innerhalb eines 4,00 Mb großen Ausschnitts der Bande q11.2
 Pfeile (↑) repräsentieren die Position der MLPA-Sonden
 MLPA = Multiplex Ligation dependant Probe Amplifikation
 Mb = Megabasen

C Schematischer Umfang der Typ-I und Typ-II Deletion in der NF1-Region
 NF1 = Neurofibromatose Typ 1

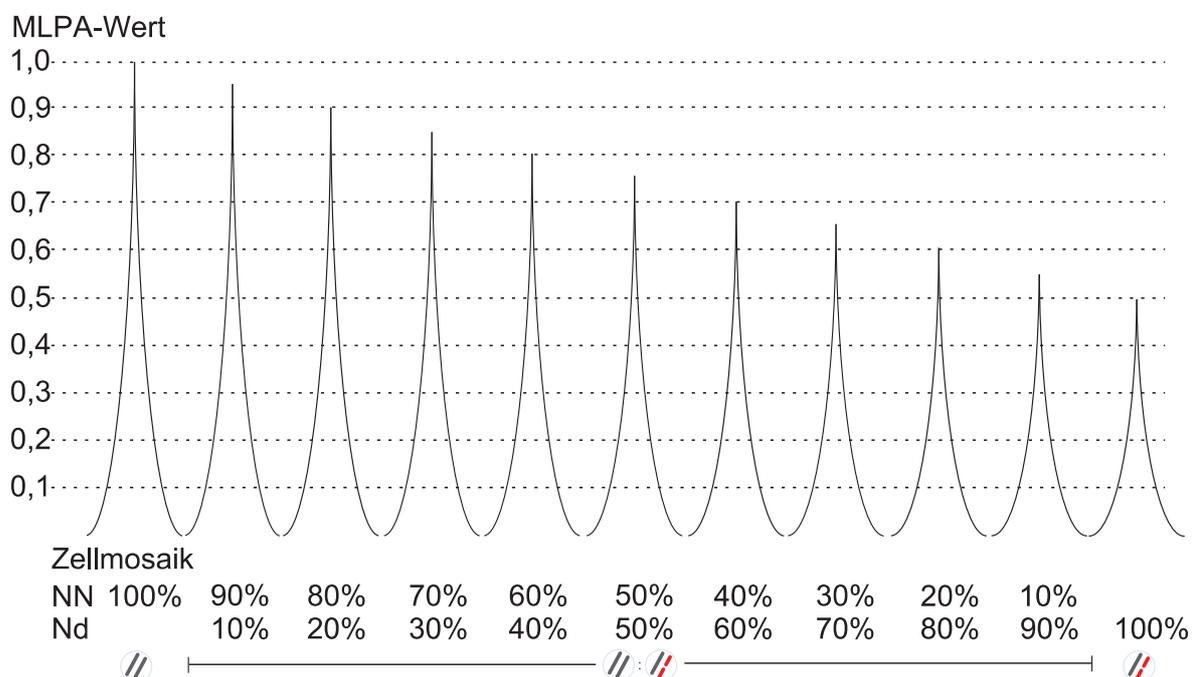
Ensembl Homo sapiens version 54.36p (NCBI36) Chromosome 17: 24,000,000 - 28,000,000

Abbildung 2 : Übersicht der 28 MLPA-Sonden des MLPA-Kit P122 Version C1

1.3 Zielsetzung der Doktorarbeit

Die Aufgabenstellung meiner Doktorarbeit ist es zu untersuchen, wie sich künstlich hergestellte Mosaik aus Zellen mit Typ-I *NF1* Deletion und Zellen ohne Deletion im Ergebnis des MLPA-Verfahrens darstellen.

Da es sich bei der Typ-I *NF1* Deletion um eine heterozygote Deletion handelt, sollten bei einer Zellmischung (Mosaik) aus Zellen mit *NF1* Deletion und ohne Deletion die MLPA-Werte der MLPA-Sonden, die im Deletionsbereich binden, zwischen 0,5 und 1,0 liegen. Rein rechnerisch wird eine Linearität zwischen Peakhöhe bzw. MLPA-Wert und Mosaik erwartet, wie folgende Abbildung zeigt:



NN = Normal-Normal; Zelle mit zwei Chromosomen 17 ohne Deletion in der *NF1*-Region
 Nd = Normal-deletiert; Zelle mit einem Chromosom 17 ohne Deletion und einem Chromosom 17 mit Deletion in der *NF1*-Region, *NF1* = Neurofibromatose Typ1
 MLPA = Multiplex Ligation- dependant Probe Amplifikation

Abbildung 3: Schematische Darstellung zwischen erwarteter Linearität der Peakhöhe bzw. MLPA-Wert bei gegebenem Mischungsverhältnis (Zellmosaik) eines Anteils von Zellen mit *NF1* Deletion und einem Anteil von Zellen ohne *NF1* Deletion.

Ziel der Doktorarbeit ist, zu untersuchen, wie sensitiv die MLPA-Methode unterschiedliche Mosaik unterscheiden kann. Es gilt herauszufinden, wie stark sich das Mosaikverhältnis in seinen Anteilen an Zellen ohne und mit *NF1* Deletion unterscheiden muß, um durch das Vergleichen der MLPA-Werte deutlich voneinander differenzierbar zu sein. Eine meiner wichtigsten Fragestellungen war, ob es möglich ist, einen Anteil von nur 20% oder 30% Zellen ohne Deletion eines

Mosaiks durch das MLPA-Verfahren zu detektieren. Auch das Verhalten der einzelnen MLPA-Sonden sollte näher untersucht werden, um die Stabilität und Zuverlässigkeit der sich ergebenden MLPA-Werte der MLPA-Sonden besser einschätzen zu können. Eine MLPA-Sonde, deren Peakhöhe und somit MLPA-Wert bei unterschiedlichen Mosaikverhältnissen der erwarteten Peakhöhe entspricht und der erwarteten Linearität folgt, gilt dabei als besonders zuverlässig und stabil. Darüber hinaus war es ein Ziel meiner Arbeit, generell versuchsinterne Schwankungen der MLPA-Resultate zu überprüfen und zu ermitteln, inwieweit der MLPA-Kit P122 Version C1 zwischen den beiden häufigsten, rekurrenten *NF1* Deletionen vom Typ-I und Typ-II sowie der atypischen Deletion unterscheiden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Ampuwa-H ₂ O	Braun, Melsungen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
Fötale Kälberserum (FCS)	ICN Biomedicals, Eschwege
Gentamycin (10 mg/ml)	Biochrom, Berlin
Desoxyribonukleosidtriphosphate	MBI, St. Leon-Rot
Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe
Ethanol (EtOH)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Fluorescein-di-acetat (FDA)	Merck, Darmstadt
Glycerin	Sigma, München
Glycerol	Merck, Darmstadt
HIDI-Formamid	Applied Biosystems, Foster City USA
HPLC-H ₂ O	Applied Bioscience
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	USB, Cleveland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin
RPMI 1640 + GlutaMAX TM I	GIBCO BRL, Neu-Isenburg
Tris-HCl	Serva, Heidelberg
Magnesiumchlorid (MgCl)	Roche, Mannheim
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg

2.1.2 Lösungen, Puffer und Kulturmedien

AE Puffer	10 mM Tris-HCl 0.5 mM EDTA pH 9.0
Ethidiumbromid-Stammlösung	200 µl/ml Ethidiumbromid
Einfriermedium für Zellen	500 µl RPMI 1640 Medium + GlutaMAX TM I 50 µl 10 % FCS 700 µl 7,5% DMSO
FDA-Stammlösung	5 mg Fluorescein-di-acetat (FDA) add Aceton auf 1 ml Endvolumen
RPMI-Medium	500 ml RPMI 1640 Medium + GlutaMAX TM I 50 ml 10% FCS 3 ml Gentamycin (10mg/ml)
TE-Puffer	10ml Tris-HCl (1 M) 2ml EDTA (0,5 M) add H ₂ O bidest. auf 1l Endvolumen pH 8.2
PCR-Puffer 1x	50 mM KCl 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 1,5 mM MgCl ₂
Ligasepuffer A	MRC Holland, Amsterdam

Ligasepuffer B MRC Holland, Amsterdam

Zellfärbelösung 1,2 ml 1xPBS
50 µl Ethidiumbromid-Stammlösung
7,5 µl FDA-Stammlösung

2.1.3 Standards und Enzyme

Standard GeneScan500Rox Applied Biosystems, Foster City, USA

Ligase 65 MRC-Holland, Amsterdam

SALSA-Polymerase MRC-Holland, Amsterdam

Proteinase K Qiagen, Hilden

2.1.4 Reagentiensysteme und Kits

DNeasy Tissue Kit Qiagen, Hilden

SALSA MLPA KIT P122 C NF1 AREA MRC-Holland, Amsterdam

2.1.5 Laborgeräte und Hilfsmittel

ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer Applied Biosystems

AxioPlan Mikroskop Zeiss, Göttingen

Cellcounter 871 AL Systeme, Karlsruhe

Photometer Gene Quant, Pharmacia

Thermoblock Eppendorf, Hamburg

Thermocycler GeneAmp PCR System 9600,
Perkin&Elmer

Vortex Genie 2 Bendert Hobein AG, Zürich, Schweiz

Wasserbad GFL, Burgwedel

Zentrifugen Eppendorf, Heraeus

2.1.6 Herkunft der untersuchten DNA-Proben

Zur Verfügung standen EBV-immortalisierte Lymphozyten zweier Patienten. Die NF1 Patientin K weist eine Typ-I *NF1* Deletion in 100% der Zellen auf, wie in Vorversuchen der Arbeitsgruppe mittels FISH ermittelt werden konnte. Der NF1 Patient E weist keine große Deletion in 100% der Zellen auf. Zusätzlich wurde DNA der NF1 Patientin D, die eine Typ-II *NF1* Deletion in 100% der Zellen aufweist, zur MLPA-Analyse herangezogen. Die Zelllinien stammen aus der Abteilung für Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf. Ein positives Votum der Ethikkommission Ulm und Hamburg liegt für diese Untersuchungen vor.

2.1.7 Elektronische Datenbanken und Software

Ensembl-Datenbank <http://www.ensembl.org>

Aus dieser Datenbank bekam ich die Sequenzen der für mich relevanten genomischen Bereiche sowie die exakte Position der MLPA-Sonden. Außerdem war es mir möglich, mit Hilfe der Software alle dieser Arbeit zugrunde liegenden Abbildungen der *NF1*-Region zu erstellen.

GeneScan Analysis 3.7 (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Mit Hilfe dieses Programms ist es möglich, elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente auf ihre Peakhöhe hin zu untersuchen. Dieses Programm wurde für die Auswertung der MLPA-Analysen angewandt.

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung der Zellmischungen (Mosaik)

Um bei der Herstellung der Zellmischungen aus den Zellen der Patientin K, entspricht 100% Zellen mit heterozygoter *NF1* Deletion und Zellen des Patienten E, entspricht 100% Zellen ohne *NF1* Deletion, das gewünschte Zellmischungsverhältnis zu erreichen, wurde folgende standardisierte Vorgehensweise festgelegt:

- Vorbehandlung der Zellkultur
- Vitalitätsmessung der Zelllinien
- Zellzählung mit dem Cellcounter

- DNA-Präparation mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit
- DNA-Messung mit dem Nano-Photometer

2.2.1.1 Vorbehandlung der Zellkultur

Die Zelllinien der Patienten K und E wurden 24 Stunden vor der Zellzählung in frisches Medium RPMI + Glutamin versetzt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Vor jeder Zellzählung wurden die Zellen in 1xPBS bei 1000 RPM (rounds per minute) 5 Minuten gewaschen und abzentrifugiert, um tote Zellen, die im Überstand verbleiben, zu verwerfen. Das Zellpellet wurde anschließend in 2-4 ml Medium RPMI 1640 + Glutamin gelöst.

2.2.1.2 Vitalitätsmessung durch Zellfärbung mit Fluorescein-di-acetat (FDA)

Um eine annähernd gleich hohe Vitalität der beiden Zelllinien sicherzustellen wurde mit einem repräsentativen Anteil von 50.000 Zellen eine Zellfärbung mit Fluorescein-di-acetat (FDA) durchgeführt. Dabei konnte jeweils gezeigt werden, dass beide Zelllinien einen gleich hohen Anteil gesunder bzw. toter Zellen tragen. Dies mußte gewährleistet sein, da die anschließende Zellzählung mit dem Cellcounter erfolgte, der imstande ist Partikel zu zählen, jedoch nicht zwischen vitalen und toten Zellen unterscheiden kann.

Die Färbelösung bestand zu 1,2 ml aus 1xPBS, in die 50 µl einer 200 µg/ml Ethidiumbromidlösung sowie 7,5 µl der FDA-Lösung hinzupipettiert wurden. Um die FDA-Lösung herzustellen, wurden 5 mg FDA in 1 ml Aceton gelöst. Diese Färbelösung wurde 1:1 mit der Zellsuspension, in der sich ca 50.000 Zellen in Medium RPMI 1640 + Glutamin befinden, gemischt. Nach einer 3-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die angefärbten Zellen auf einen Objektträger übertragen und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Vitale Zellen können Fluorescein-di-acetat aufnehmen und hydrolysieren es zu dem nicht-membrangängigen Fluorescein. Somit fluoreszieren vitale Zellen bei Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge (450 nm) im Gegensatz zu nicht-vitalen Zellen grün. Der nicht-membrangängige rot-fluoreszierende Farbstoff Ethidiumbromid wird hingegen von vitalen Zellen nicht aufgenommen. Tote Zellen, deren Membranen permeabler sind, nehmen den Farbstoff auf und fluoreszieren somit bei Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge (488 nm) rot. Bei beiden Zelllinien konnte jedesmal eine annähernd gleich hohe Vitalität von 80-90% festgestellt werden.

2.2.1.3 Zellzählung mit dem Cellcounter

Anschließend erfolgte die Zellzählung. Durch Vorversuche konnte gezeigt werden, dass das Messoptimum des Cellcounters mit einer höchstmöglichen Schwankung von 30 Zellen/ μ l bei einem Messwert von 200 bis 800 Zellen/ μ l liegt. Dabei sollten die zu zählenden Zellen in nicht mehr als einem ml Medium gelöst sein, da sich bei höheren Volumina größere Schwankungen des Cellcounters ergeben. Aus dieser 1 ml Zellsuspension benötigt der Cellcounter zur Zellzählung 50 μ l Zellsuspension, die in 10 ml Natriumchlorid-Lösung gelöst werden. Sollte der Messwert des Cellcounters zwischen 200 bis 800 Zellen/ μ l betragen, befinden sich in der 1 ml Zellsuspension zwischen 200.000 bis 800.000 Zellen.

2.2.1.4 DNA-Präparation mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit

Die Gesamtzahl einer Zellmischung (Mosaik) wurde auf 2 Millionen Zellen festgelegt. Diese Zellzahl zeigte sich als besonders geeignet für die Gewinnung von genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNA) mit Hilfe des Säulensystems DNeasy Blood & Tissue Kit der Firma Qiagen, Hilden. Dabei wird die DNA durch kurzes Kochen in Einzelstränge überführt, um so in dem Säulensystem gebunden werden zu können. Die ebenfalls eingesetzte Proteinase K, eine unspezifische Proteinase mit großer Resistenz gegenüber Enzyminhibitoren, inaktiviert die bei der Verdauung freigesetzten störenden Proteine (z.B. Desoxy- und Ribonukleasen) in einem weiten Temperatur- und pH-Bereich.

Nachdem das gewünschte Verhältnis der Zellmischung (Mosaik) durch Zusammenpipettieren der einzelnen Zellsuspensionen und gründliches Durchmischen der Zellen erreicht wurde, wurden die Zellen abzentrifugiert.

Das Zellpellet wurde anschließend in 200 μ l 1xPBS gelöst und mit 20 μ l Proteinase K und 200 μ l des Puffers AL (Bestandteil des Kit) versetzt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei 56°C wurde die Zellsuspension zusammen mit 200 μ l 70% Ethanol auf die Quiagen Kit Säule übertragen. Anschließend erfolgt eine einminütige Zentrifugation bei 8000 RPM, wobei der Durchfluß verworfen wird. Auf die Säule, die in ein neues Collection Tube überführt wurde, werden nun 500 μ l des Puffers AW1 (Bestandteil des Kit) gegeben und erneut 1 Minute bei 8000 RPM zentrifugiert. Nachdem der Durchfluß wieder verworfen wurde und die Säule in ein neues Collection Tube überführt wurde, werden 500 μ l des Puffers AW2 (Bestandteil des Kit) auf die Säule gegeben. Daraufhin erfolgt eine

dreiminütige Zentrifugation bei 13000 RPM. Nachdem der Durchfluß wieder verworfen wurde, wird die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und 100 µl des Puffers AE (Bestandteil des Kit) hinzupipettiert. Nach einer einminütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgt eine einminütige Zentrifugation bei 8000 RPM. Im Durchfluß befindet sich nun die gelöste DNA. Um die DNA Ausbeute zu verbessern, wird dieser Schritt wiederholt, indem das Eluat nochmals auf die Säule gegeben wird und nach einer einminütigen Inkubation bei Raumtemperatur nochmals 1 Minute bei 8000 RPM abzentrifugiert wird. Im Eluat befindet sich nun die präparierte DNA.

2.2.1.5 DNA-Messung mit dem Nano-Photometer

Nach der Durchführung der DNA-Präparation ergab sich eine DNA-Ausbeute der jeweiligen Zellmischungen (Mosaik) von 90-120 ng/µl bzw. 9-12 µg insgesamt. Die Messung der DNA Menge wurde mit dem Nano-Photometer Implen® nach dem Lambert Beer'schen Gesetz bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm densitometrisch durchgeführt. Die Extinktion bei dieser Wellenlänge wird durch RNA, DNA und Oligonukleotide verursacht, während Proteine für die Abschwächung bei $\lambda=280$ nm verantwortlich sind. So kann über Berechnung des Quotienten OD260 nm/OD280 nm auf die Reinheit der Probe geschlossen werden. Im Idealfall liegt der Wert zwischen 1,8 und 2,0. Werte unter 1,6 geben Hinweis auf eine Kontamination mit Proteinen, Ergebnisse über 2,0 auf einzelsträngige Nukleinsäuren.

2.2.2 Durchführung der Multiplex Ligation- dependant Probe Amplifikation (MLPA)

2.2.2.1 Prinzip der MLPA-Methode

Bei dem MLPA-Verfahren kommen sogenannte MLPA-Sonden zur Anwendung, welche in Abhängigkeit vom Status der zu untersuchenden Zielsequenz, z.B. eines Exons amplifiziert werden. Jede dieser MLPA-Sonden besteht aus einem kurzen synthetisch hergestelltem und einem langen, durch M13-Phagen synthetisiertem Oligonukleotid. Das kurze, synthetisch hergestellte Oligonukleotid trägt am 3'-Ende eine Hälfte der Zielsequenz des Exons und am 5'-Ende eine universelle Sequenz X zur späteren Amplifikation der MLPA-Sonde. Das lange Oligonukleotid trägt am 5'-Ende die andere Hälfte der Zielsequenz des Exons,

welche sich direkt neben der Bindungsstelle des kurzen Oligonukleotids an die DNA anlagert. Neben der Bindungsstelle für die PCR-Amplifikation am 3'-Ende Y zeichnet sich das lange Oligonukleotid noch durch eine Füllsequenz mit einer Größe von 19 bis 370 Nukleotiden zwischen dem 3' und 5'-Ende aus.

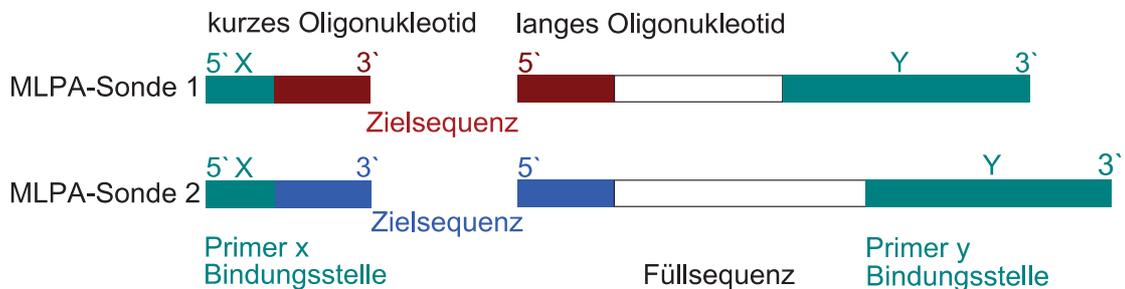
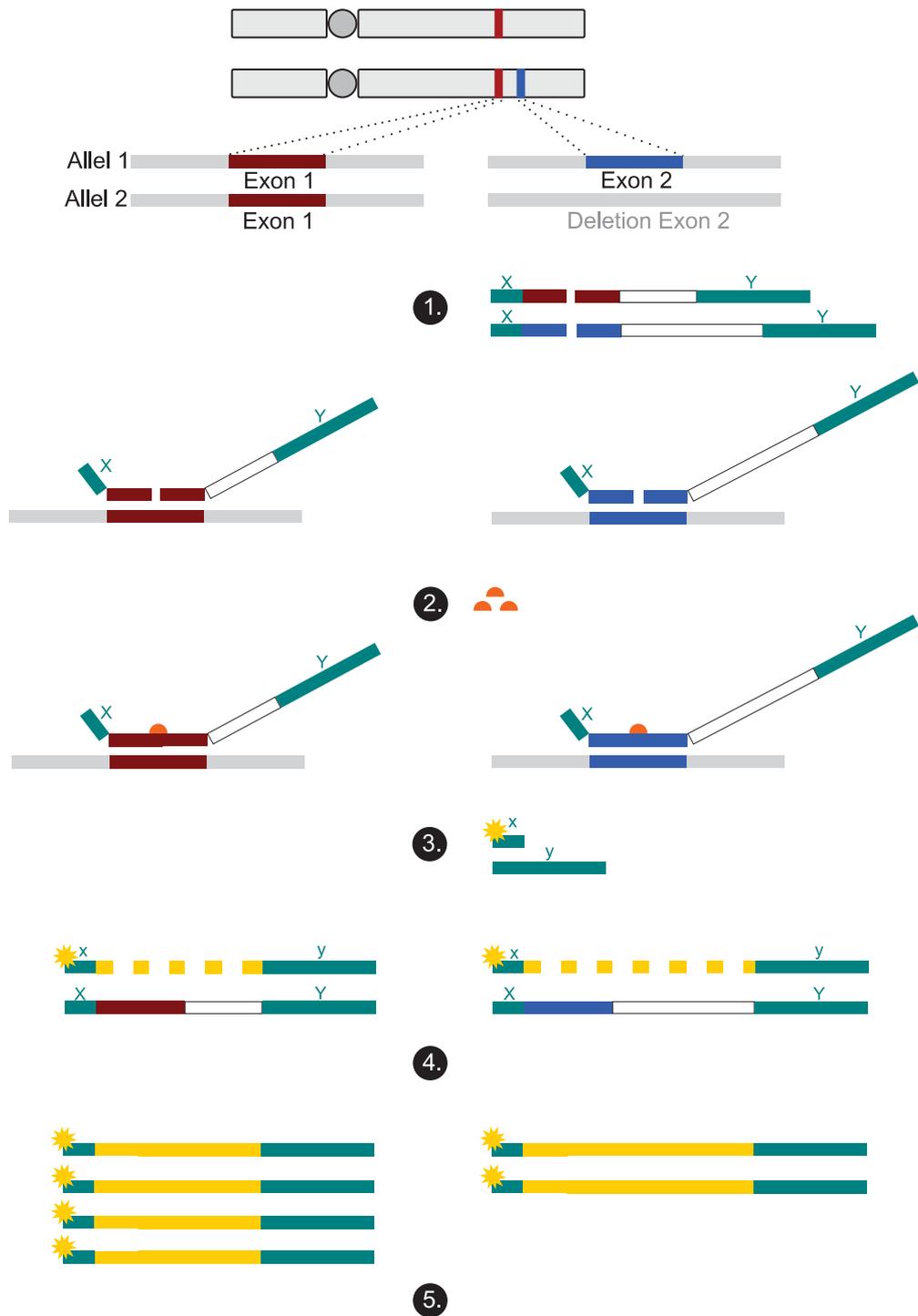


Abbildung 4: Graphische Darstellung zweier MLPA-Sonden; MLPA = Multiplex Ligation-dependant Probe Amplifikation

Nach der Denaturierung der DNA und Zugabe der MLPA-Sonden erfolgt die Bindung und Hybridisierung der beiden Oligonukleotide an ihre Zielsequenz im Exon. Durch eine Ligase erfolgt anschließend die Ligation der beiden Zielsequenzen. Da alle MLPA-Sonden in einer MLPA-Reaktion identische Sequenzen X und Y an ihren 5' und 3'-Enden tragen, ist anschließend eine simultane Amplifikation durch ein einzelnes Primer-Paar x und y möglich. Der Forward Primer x ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, der bei der späteren Bandenstärkeanalyse durch Laser angeregt wird. Die entstehenden PCR-Produkte besitzen eine Größe zwischen 130 und 480 Basenpaaren mit einer jeweiligen Längendifferenz ihrer Zielsequenz von 6 bis 9 Basenpaaren. Die Größendifferenz der einzelnen Füllsequenzen der MLPA-Sonden ermöglicht die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. Die Bandenstärkeanalyse ergibt je nach Kopienanzahl der amplifizierten MLPA-Sonden eine bestimmte Peakhöhe. Diese wird zu der Peakhöhe normaler Kontrollproben, entspricht DNA ohne Deletion eines Exons in Relation gesetzt. Bei Vorliegen der Zielsequenzen auf beiden Chromosomen sollte die sich ergebende Ratio aus Peakhöhe zu Kontrollpeakhöhe 1,0 ergeben. Diese Ratio wird auch MLPA-Wert genannt. Bei einer heterozygoten Deletion einer Zielsequenz kann eine Ratio (MLPA-Wert) von 0,5 erwartet werden.



1. Hybridisierung der MLPA Sonden an die DNA Zielsequenz
2. Ligation durch Ligase
3. Zugabe des Primer Paares
4. PCR-Amplifikation
5. Peakhöhenanalyse

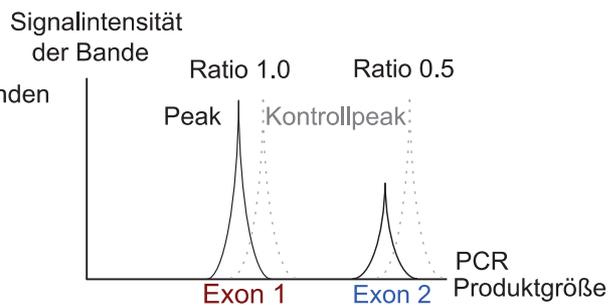


Abbildung 5: Graphische Darstellung des chronologischen Ablaufs der MLPA-Reaktion
 MLPA = Multiplex Ligation- dependant Probe Amplifikation, PCR = Polymerase Kettenreaktion, DNA = Desoxyribonukleinsäure

2.2.2.2 Ablauf der MLPA-Methode

Es wurde der MLPA-Kit P122 Version C1 angewendet, der insgesamt 28 MLPA-Sonden enthält. Davon binden 5 MLPA-Sonden innerhalb des *NF1*-Gens, 15 MLPA-Sonden binden zentromerisch und 8 MLPA-Sonden telomerisch des *NF1*-Gens (Abbildung 2 der Einleitung). Zusätzlich enthält der MLPA-Kit 11 Referenzsonden, die größtenteils auf anderen Chromosomen binden.

Tabelle 1: Übersicht der 28 MLPA-Sonden des SALSA MLPA-Kit P122 Version C1 der *NF1*-Genregion. Es ist jeweils der Name der MLPA-Sonde, die Lokalisation im Exon des jeweiligen Gens, die Nukleotidabfolge (Sequenz) in 5'-3'-Richtung sowie die Position auf Chromosom (Chr) 17 angegeben. MLPA = Multiplex Ligation- dependant Probe Amplifikation; NF1 = Neurofibromatose Typ 1

Name	Lokalisation	Sequenz	Position auf Chr 17
TRAF4	Exon 02	ACTGCCAGGAAGAAGCCCAA	24098420 - 24098439
TRAF4	Exon 04	GCTTCAATGTCATTCCCTGC	24099181 - 24099200
SSH2	Exon 14	TACCAAAGAAAGAATGATCT	24987708 - 24987727
SSH2	Exon 04	AATGTTCAATTTACTCCGCC	25046623 - 25046642
BLMH	Exon 09	GCTGTGATGTTGGAAAACAC	25623740 - 25623759
BLMH	Exon 02	TGATACAGAACTGAATTCC	25642606 - 25642625
CPD	Exon 11	AGTGACTACTTACAAAACCTG	25795038 - 25795057
CPD	Exon 20	TGATAGTCTTTGACACAGAT	25813548 - 25813567
SUZ12P	VorExon 01	TCTAGACTCTCTAAACCGCT	26082519 - 26082538
SUZ12P	Exon 01	CAGGCGCTTACTCTCCGGGG	26082967 - 26082986
SUZ12P	Intron 4	ATGGAAATGACTTTCTTACT	26109273 - 26109292
CRLF3	Exon 03	TTGGTGGTGTGGGAGAAGAG	26148508 - 26148527
ATAD5	Exon 02	AGGTACGCTTTAAGACAGTT	26186172 - 26186191
CENTA2	Exon 03	AAGGCCAAGTTCGAAGCCAG	26278001 - 26278020
RNF135	Exon 02	AACATCTTGTAGACATTGTC	26335816 - 26335835
NF1 Ex. 1	Exon 1	AGAGATCCGCGCGCTGGGAG	26445726 - 26445745
NF1 Ex. 12B	Exon 12B	ATCATGAAGAATTACTACGT	26576330 - 26576349
NF1 Ex. 23	Exon 23-2	AGGAAAACCAGCGGAACCTC	26600151 - 26600170
NF1 Ex. 40	Exon 40	ACCTGCTATTGTTGCAAGAA	26700280 - 26700299
NF1 Ex. 48	Exon 48	GAATTGATGAAGAAACCAGT	26711704 - 26711723
UTP6	Exon 14	CCAGAGTCTCTAAACAATTC	27226463 - 27226482
SUZ12	Exon 10	ATGATAAATCTACGGCTCCT	27339525 - 27339544
LRRC37B	Exon 01	CCGCTTCTCAACCGGGATCA	27372684 - 27372703
ZNF207	Exon 09	TCTGTTTCTAGCACAGCAC	27717868 - 27717887
PSMD11	Exon 02	AAAACGATGAAGAGGCAGTG	27798094 - 27798113
PSMD11	Exon 06	GTACAGCTTTTAGAAAGCAA	27820186 - 27820205
MYO1D	Exon 07	GATGCCATGAAAGTCATTGG	28118825 - 28118844
MYO1D	Exon 02	GCCTCACCTTTTTGCTATTG	28131767 - 28131786

Für eine MLPA-Reaktion wurden 100 ng DNA, die in 5 µl TE gelöst sind, eingesetzt. Um eine bessere Denaturierung der DNA zu fördern, kann der TE Puffer 5 % Glycerol enthalten.

Eine MLPA Reaktion umfasst folgendes Programm des Thermocyclers

Hybridisierung	1.	30 Min bei 98°C
	2.	HOLD bei 25°C
	3.	1 Min bei 95°C
	4.	16 Std bei 60°C
	5.	HOLD bei 54°C
Ligation	6.	15 Min bei 54°C
	7.	5 Min bei 98°C
	8.	HOLD bei 60°C
PCR	9.	30 Sec bei 95°C
	10.	30 Sec bei 60°C
	11.	1 Min bei 72°C
	12.	34mal 9-11
	13.	20 min bei 72°C
	14.	HOLD bei 4°C

Es müssen 4 Master-Reaktionen für die Analyse einer DNA-Probe zusammenpipettiert werden. Alle verwendeten Puffer und Enzyme werden durch den MLPA-Kit P122 Version C1 zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2: Tabellarische Übersicht der 4 Master-Reaktionen, MLPA = Multiplex Ligation-dependant Probe Amplifikation, PCR = Polymerase Kettenreaktion, dNTP = Desoxyribonukleosidtriphosphate

Mastermix 1 (Angabe pro Probe)	
1,5 µl	MLPA-Sonden
1,5 µl	MLPA-Puffer

Mastermix 3 (Angabe pro Probe)	
4 µl	PCR Puffer
26 µl	H ₂ O

Mastermix 2 (Angabe pro Probe)	
3 µl	Ligasepuffer A
3 µl	Ligasepuffer B
25 µl	H ₂ O
1 µl	Ligase 65

Mastermix 4 (Angabe pro Probe)	
2 µl	PCRPrimer+dNTP's
2 µl	Enzympuffer
5,5 µl	H ₂ O
0,5 µl	Polymerase-Enzym

Während der Denaturierung bei 98 °C werden die DNA-Stränge der Templates zu Einzelsträngen getrennt. Nach dem Abkühlen auf 25°C werden jeder DNA Probe 3 µl des Mastermix 1, der die MLPA-Sonden enthält, hinzugegeben. Nach einer

weiteren einminütigen Denaturierung erfolgt eine 16-stündige Hybridisierungsphase bei 60°C, in der die beiden Hälften der MLPA-Sonden an ihre Zielsequenz binden.

Nach dem Abkühlen auf 54°C werden der Probe 32 µl des Mastermix 2, der die Ligase enthält, hinzugefügt. Bei 54°C fügt die Ligase die beiden Anteile der MLPA-Sonde zusammen. Nur direkt nebeneinander liegende und vollständig hybridisierte Oligonukleotide werden ligiert. Bei 98°C erfolgt dann innerhalb von 5 Minuten die Zerstörung der Ligase und die Dehybridisierung der MLPA-Sonden vom Template. In neue Eppendorf Gefäße werden anschließend pro Probe 30 µl des Mastermix 3 vorgelegt. Dieser besteht hauptsächlich aus PCR Puffer. Sobald der Thermocycler auf 60°C abgekühlt ist, werden 10 µl der Probe, die das Ligationsprodukt enthält in das neue Eppendorf Gefäß überführt. Die verbleibenden 30 µl des Ligationsgemisches können bei -20°C gelagert und für weitere Untersuchungen genutzt werden.

Nach einer einminütigen Inkubation bei 60°C werden der Probe 10 µl des Mastermix 4 hinzugegeben. Der Mastermix 4 enthält die SALSA Polymerase, den Forward und Backward Primer (universelles Primerpaar x und y, Abbildung 5) sowie die Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP's). Der Forward-Primer ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Nun findet die Polymerase Kettenreaktion statt. Nach einem weiteren Denaturierungsschritt binden die Primer bei 60°C an ihre Zielsequenz. Die Elongation findet bei einem Temperaturoptimum der SALSA Polymerase von 72 °C statt. Ihre Aufgabe ist es, an die Primer anzuknüpfen und den restlichen Einzelstrang des Templates wieder zum Doppelstrang zu vervollständigen. Diese Schritte wiederholen sich insgesamt 35 mal. Pro Zyklus verdoppelt sich also die Template DNA. Durch eine längere Elongationsphase von 20 Minuten wird die PCR Reaktion beendet. Die amplifizierten PCR Produkte kühlen auf 4°C ab.

Tabelle 3: Universelles Primerpaar zur Amplifizierung der MLPA-Sonden. Es ist der Name des Primers und die Nukleotidabfolge (Sequenz) in 5'-3'-Richtung angegeben. MLPA = Multiplex Ligation- dependant Probe Amplifikation

Name	Sequenz
Forward Primer	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA
Backward Primer	GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA

Anschließend erfolgt die elektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte und Intensitätsmessung des Signals der Bande im ABI PRISM® 3100 Genetic Analyser. Dazu müssen die amplifizierten PCR Produkte in einen 96 Well Schlitten überführt werden. Pro Well bzw. Probengefäß werden zuvor 20 µl eines internen Standards vorgelegt. Anschließend wird 1 µl des PCR Produktes in eine 1:10 Verdünnung mit HPLC Wasser (High pressure liquid chromatography) gebracht. Dann muss 1 µl dieser Verdünnung in das entsprechende Reaktions-Well überführt werden. Die Elektrophorese kann beginnen. Die Darstellung des Ergebnisses, die Intensität einer Bande, die sich in einem Peak wiedergibt, erfolgt mit dem Programm GeneScan. Die Daten werden dann mit einem speziellen Excel-Sheet der Firma MRC Holland ausgewertet, um MLPA-Werte zu erhalten.

Tabelle 4: Anleitung zur Herstellung des internen Standards pro Well

Interner Standard (Angabe pro Well)	
20 µl	Hi-Di-Formamide
0,2 µl	Standard GeneScan500Rox

2.2.3 Statistik

In dieser Arbeit wurden keine statistischen Verfahren angewendet, da dies im Rahmen der Fragestellung nicht notwendig erschien.

Zudem ist wegen der kleinen Probenzahl eine statistische Auswertung nicht möglich.

3 Ergebnisse

Die Fragestellung meiner Doktorarbeit war es, zu überprüfen, wie effizient die MLPA-Technik Mosaik aus Zellen mit Typ-I *NF1* Deletion und Zellen ohne Deletion nachweisen kann. Es gilt herauszufinden, wie stark sich das Mosaikverhältnis in seinen Anteilen an Zellen ohne und mit *NF1* Deletion unterscheiden muß, um eindeutig unterschiedliche MLPA-Werte zu ergeben. Auch das Verhalten der einzelnen MLPA-Sonden sollte näher untersucht werden, um die Stabilität und Zuverlässigkeit der sich ergebenden MLPA-Werte der Sonden besser einschätzen zu können. Darüber hinaus war es das Ziel meiner Arbeit, generell versuchsinterne Schwankungen der MLPA-Resultate zu überprüfen und zu ermitteln, inwieweit der MLPA-Kit P122 Version C1 zwischen den beiden häufigsten, rekurrenten *NF1* Deletionen vom Typ-I und Typ-II unterscheiden kann.

Um diese Fragestellung zu bearbeiten, sollte folgender Versuchsaufbau realisiert werden: Die resultierenden MLPA-Werte eines Neurofibromatose Typ 1 Patienten ohne große Deletion (Patient E) und einer Neurofibromatose Typ 1 Patientin, die eine 1.4 Mb Typ-I Deletion in der *NF1*-Region aufweist (Patientin K) sowie künstlich hergestellte Zellmischungen (Mosaik) dieser beiden Personen, sollen verglichen werden. Dabei gilt besonderes Interesse den Werten der 15 MLPA-Sonden im Deletionsbereich der Patientin K mit der konstitutionellen *NF1* Deletion. Die Lage dieser Sonden in Relation zur *NF1*-Genregion ist in Abbildung 2 der Einleitung dargestellt.

Zu beachten gilt, dass sich alle Mosaikangaben im Text auf das Verhältnis der Zellen ohne Deletion und den Zellen mit *NF1* Deletion beziehen. Das Zellverhältnis ist nicht gleichzusetzen mit dem Chromosomenverhältnis des Mosaiks bzw. der Zellmischung. Da es sich bei der untersuchten Typ-I *NF1* Deletion um eine heterozygote Deletion auf dem Chromosom 17 handelt, enthält jede Zelle der Neurofibromatose Patientin K auch ein gesundes, nicht-deletiertes Chromosom. Die daraus resultierenden Mengen bzw. Verhältnisse an Zellen mit Deletion und ohne Deletion bei verschiedenen Mischungen der Zellen der Patienten E und K sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Liste der zu erwartenden Chromosomen- bzw. Zellmengen bei Mischungen verschiedener Anteile der Zellen von Patientin K (Trägerin einer heterozygoten Typ-I *NF1* Deletion) und Patient E (ohne *NF1* Deletion), *NF1* = Neurofibromatose Typ 1

Zellverhältnis	Chromosomenverhältnis	Graphische Darstellung des Zell- und Chromosomenverhältnis	
NN:Nd	N:d	NN	Nd
90/10	95:5		
80/20	90:10		
70/30	85:15		
60/40	80:20		
50/50	75:25		
40/60	70:30		
30/70	65:35		
20/80	60:40		
10/90	55:45		

NN = Normal-Normal; Zelle mit zwei nicht-deletierten Chromosomen 17

Nd = Normal-deletiert; Zelle mit einem nicht-deletierten Chromosom 17 und einem deletierten Chromosom 17

N = Normal; nicht-deletiertes Chromosom 17

d = deletiert; deletiertes Chromosom 17

Zelle ohne *NF1* Deletion
 Zelle mit heterozygoter *NF1* Deletion

Um einen zuverlässigen Vergleich der MLPA-Werte sicherzustellen, müssen eventuell gegebene versuchsinterne Schwankungen erhoben werden. Diese können zum einen bei der Herstellung des jeweils gewünschten Zellmischungsverhältnisses entstehen. Zum anderen kann auch eine MLPA-reaktionsabhängige oder -gerätespezifische Schwankung bei gegebenem Mosaik die MLPA-Ergebnisse beeinflussen. Um diese Schwankungen zu eruieren wurden folgende Vorversuche durchgeführt.

3.1 Analyse der Schwankungen innerhalb des Versuchsaufbaus

3.1.1 Analyse der Schwankungen der einzusetzenden Zellzahlen für die Herstellung von Zellmischungen zur Mosaik-Analyse bedingt durch Ungenauigkeiten bei der Zellzählung

Multiple, von mir durchgeführte Zellzählungen mit dem Cellcounter-Gerät ergaben eine maximale Schwankungsbreite des Messwerts von 30.000 Zellen je

Zellsuspension mit 200.000 - 800.000 Zellen. Ein hergestelltes Mosaik soll insgesamt 2 Millionen Zellen enthalten. Bei der Herstellung einer Zellmischung aus 2 x 500.000 Zellen der Patientin K und 2 x 500.000 Zellen des Patienten E in einem Mischungsverhältnis 50%:50% ergibt sich unter Berücksichtigung einer Schwankungsbreite des Messwerts von jeweils 30.000 Zellen eine größtmögliche Differenz des Mischungsverhältnis von 47%:53% bzw. 53%:47% an Zellen ohne Deletion zu Zellen mit *NF1* Deletion. Diese Rechnung ist in Abbildung 6 anschaulicher dargestellt.

	<u>Anzahl der Zellen mit heterozygoter Deletion</u>		<u>Anzahl der Zellen ohne Deletion</u>
Messfehler:	$\begin{array}{r} 500.000 \\ + 30.000 \\ \hline 530.000 \end{array}$	$\begin{array}{r} 500.000 \\ + 30.000 \\ \hline 530.000 \end{array}$	$\begin{array}{r} 500.000 \\ - 30.000 \\ \hline 470.000 \end{array}$
	$\underbrace{\hspace{10em}}$		$\underbrace{\hspace{10em}}$
Summe:	1.060.000		940.000
Anteile in %:	53%		47%
	$\uparrow \hspace{10em} \uparrow$		
	$\hspace{10em} \text{6,0\%}$		

Abbildung 6: Darstellung der größtmöglichen Schwankungsbreite von 6% bei der Herstellung einer Mischung aus 50% der Zellen des Patienten E (ohne *NF1* Deletion) und 50% Zellen der Patientin K (mit heterozygoter *NF1* Deletion) bedingt durch Ungenauigkeiten bei der Zellzählung. *NF1* = Neurofibromatose Typ 1

Die Erhebung des Messfehlers bei der Zellzählung zeigt also, dass bei der Herstellung einer Zellmischung mit dem Verhältnis 50%:50% eine größtmögliche Schwankungsbreite von 6% zu erwarten ist, was einem tatsächlichen Mischungsverhältnis von 47%:53% bzw. 53%:47% an Zellen ohne Deletion zu Zellen mit *NF1* Deletion entspricht.

Eine vergleichbare, theoretische Analyse basierend auf einem Messfehler von 30.000 Zellen habe ich für Zellmischungen im Verhältnis 10%:90% angestellt. Bei der Herstellung einer Mischung aus Zellen im Verhältnis 10%:90%, wobei 10% der Zellen keine *NF1* Deletion haben (Zellen des Patienten E) und 90% der Zellen die heterozygote *NF1* Deletion aufweisen (Zellen der Patientin K) ist bei einem Fehler von 30.000 Zellen bedingt durch Ungenauigkeiten bei der Zellzählung eine Fehlerschwankungsbreite von 3,6% zu erwarten. Dies ist in der nachfolgenden Abbildung 7 rechnerisch dargestellt.

	<u>Anzahl der Zellen mit heterozygoter Deletion</u>			<u>Anzahl der Zellen ohne Deletion</u>
Messfehler:	500.000 + 30.000 530.000	500.000 + 30.000 530.000	800.000 + 30.000 830.000	200.000 - 30.000 170.000
Summe:	1.890.000 91,75%			170.000 8,25%
3,6 %	500.000 - 30.000 470.000	500.000 - 30.000 470.000	800.000 - 30.000 770.000	200.000 + 30.000 230.000
	1.710.000 88,14%			230.000 11,86%

Abbildung 7: Darstellung der größtmöglichen Schwankungsbreite von 3,6% bei der Herstellung einer Mischung aus 10% der Zellen des Patienten E (ohne *NF1* Deletion) und 90% Zellen der Patientin K (mit heterozygoter *NF1* Deletion) bedingt durch Ungenauigkeiten bei der Zellzählung. *NF1* = Neurofibromatose Typ 1

Entsprechend ergibt sich für das Mosaik 20%:80% eine Schwankungsbreite des Mischungsverhältnis von 4,2% (Abbildung 8). Bei einem Mischungsverhältnis der Zellen von 30%:70% ist mit einer Schwankungsbreite von 4,8% zu rechnen (Abbildung 9). Die Schwankungsbreite des Mischungsverhältnis des Mosaiks 40%:60% beträgt 5,4% (Abbildung 10).

	<u>Anzahl der Zellen mit heterozygoter Deletion</u>			<u>Anzahl der Zellen ohne Deletion</u>
Messfehler:	500.000 + 30.000 530.000	500.000 + 30.000 530.000	600.000 + 30.000 630.000	400.000 - 30.000 370.000
Summe:	1.690.000 82,04%			370.000 17,96%
4,2%	500.000 - 30.000 470.000	500.000 - 30.000 470.000	600.000 - 30.000 570.000	400.000 + 30.000 430.000
	1.510.000 77,84%			430.000 22,16%

Abbildung 8: Darstellung der größtmöglichen Schwankungsbreite von 4,2% bei der Herstellung einer Mischung aus 20% der Zellen des Patienten E (ohne *NF1* Deletion) und 80% Zellen der Patientin K (mit heterozygoter *NF1* Deletion) bedingt durch Ungenauigkeiten bei der Zellzählung. *NF1* = Neurofibromatose Typ 1

	<u>Anzahl der Zellen mit heterozygoter Deletion</u>			<u>Anzahl der Zellen ohne Deletion</u>
Messfehler:	500.000 + 30.000 530.000	500.000 + 30.000 530.000	400.000 + 30.000 430.000	600.000 - 30.000 570.000
Summe:	1.490.000 72,33%			570.000 27,67%
4,8%	500.000 - 30.000 470.000			600.000 + 30.000 630.000
	1.310.000 67,53%			630.000 32,47%

Abbildung 9: Darstellung der größtmöglichen Schwankungsbreite von 4,8% bei der Herstellung einer Mischung aus 30% der Zellen des Patienten E (ohne *NF1* Deletion) und 70% Zellen der Patientin K (mit heterozygoter *NF1* Deletion) bedingt durch Ungenauigkeiten bei der Zellzählung. *NF1* = Neurofibromatose Typ 1

	<u>Anzahl der Zellen mit heterozygoter Deletion</u>			<u>Anzahl der Zellen ohne Deletion</u>
Messfehler:	500.000 + 30.000 530.000	500.000 + 30.000 530.000	200.000 + 30.000 230.000	800.000 - 30.000 770.000
Summe:	1.290.000 62,62%			770.000 37,38%
5,4%	500.000 - 30.000 470.000			800.000 + 30.000 830.000
	1.110.000 57,22%			830.000 42,78%

Abbildung 10: Darstellung der größtmöglichen Schwankungsbreite von 5,4% bei der Herstellung einer Mischung aus 40% der Zellen des Patienten E (ohne *NF1* Deletion) und 60% Zellen der Patientin K (mit heterozygoter *NF1* Deletion) bedingt durch Ungenauigkeiten bei der Zellzählung. *NF1* = Neurofibromatose Typ 1

Eine Übersicht über alle möglichen Schwankungsbreiten bei der Herstellung der Zellmischungen bedingt durch den größtmöglichen Messfehler bei der Zellzählung zeigt folgende Tabelle 6.

Tabelle 6: Schwankungsbreiten bei der Herstellung der Mischungen der Zellen (Mosaik) des Patienten E (ohne *NF1* Deletion) und der Patientin K (mit heterozygoter *NF1* Deletion) durch Ungenauigkeiten bei der Zellzählung. *NF1* = Neurofibromatose Typ 1

Mosaik aus Zellen ohne <i>NF1</i> Deletion zu Zellen mit heterozygoter <i>NF1</i> Deletion	Schwankungsbreite in %
50% : 50%	6,0
40% : 60%	5,4
30% : 70%	4,8
20% : 80%	4,2
10% : 90%	3,6

Diese mögliche Schwankungsbreite der Zellmengen bei der Herstellung einer Zellmischung (Mosaik) wird in der graphischen Darstellung der MLPA-Ergebnisse in den Abbildungen 13-27 der Ergebnisdarstellung (Kapitel 3.2.2) jeweils als horizontale Schwankungsbreite der einzelnen MLPA-Messwerte dargestellt.

3.1.2 Analyse der Schwankungen der MLPA-Ergebnisse bedingt durch die elektrophoretische Auftrennung der MLPA-Proben im ABI Analyser

Die im Rahmen der MLPA-Reaktion amplifizierten PCR-Produkte werden im ABI PRISM 3100 Genetic Analyser analysiert. Dabei ist es dem Gerät möglich, bis zu 16 Proben gleichzeitig elektrophoretisch aufzutrennen und auszuwerten. Dieser Vorgang wird als ABI-Lauf bezeichnet. Eine Probe entspricht den amplifizierten PCR-Produkten aller MLPA-Sonden der DNA der Zellen des Patienten E ohne *NF1* Deletion, der Patientin K mit heterozygoter *NF1* Deletion oder eines Mosaiks hergestellt aus Mischungen der Zellen beider Patienten in definierten Verhältnissen. Um die gerätespezifische Schwankung des ABI Analysers innerhalb eines ABI-Laufs festzustellen, wurden die amplifizierten PCR-Produkte zweier Mosaik jeweils zweimal zur elektrophoretischen Trennung und Bandenstärkeanalyse aufgetragen und im selben Lauf ausgewertet. Im Ergebnis zeigt sich eine größtmögliche MLPA-Wertdifferenz von 0,02 (Tabelle 7).

Tabelle 7: Schwankungen der MLPA-Werte bei Doppelanalyse desselben Versuchsansatzes in ein und demselben Analyser- Lauf. MLPA = Multiplex Ligation-dependant Probe Amplifikation, NF1 = Neurofibromatose Typ 1

Name der MLPA-Sonde	MLPA-Werte bei einem Mosaik-verhältnis von 50:50 ^a		Differenz der MLPA-Werte bei 50:50 ^a	MLPA-Werte bei einem Mosaik-verhältnis von 10:90 ^b		Differenz der MLPA-Werte bei 10:90 ^b
SUZ12PvorExon1	0,88	0,87	0,01	0,67	0,67	0
SUZ12PExon1	0,7	0,69	0,01	0,39	0,37	0,02
SUZ12Pintron5	0,99	0,97	0,02	0,75	0,74	0,01
ATAD5	0,79	0,79	0	0,61	0,61	0
CRLF3	0,87	0,87	0	0,66	0,67	0,01
CENTA2	0,95	0,95	0	0,65	0,64	0,01
RNF135	0,83	0,83	0	0,67	0,65	0,02
NF1-Exon1	0,88	0,89	0,01	0,65	0,67	0,02
NF1-Exon12B	0,87	0,86	0,01	0,6	0,59	0,01
NF1-Exon23	0,88	0,87	0,01	0,67	0,68	0,01
NF1-Exon40	0,87	0,87	0	0,64	0,63	0,01
NF1-Exon48	0,91	0,91	0	0,66	0,67	0,01
UTP6	0,78	0,79	0,01	0,61	0,6	0,01
SUZ12	0,67	0,66	0,01	0,55	0,56	0,01
LRRC37B	0,75	0,76	0,01	0,56	0,55	0,01

a: Ein Mosaik-Verhältnis von 50:50 bedeutet ein Mischungsverhältnis von 50% der Zellen ohne *NF1* Deletion (Patient E) und 50% der Zellen mit heterozygoter *NF1* Deletion (Patientin K)

b: Ein Mosaik-Verhältnis von 10:90 bedeutet ein Mischungsverhältnis von 10% der Zellen ohne *NF1* Deletion (Patient E) und 90% der Zellen mit heterozygoter *NF1* Deletion (Patientin K)

Diese größtmögliche laufinterne Schwankung des ABI Analysers des MLPA-Wertes von 0,02 wird in der graphischen Darstellung der MLPA-Ergebnisse in den Abbildungen 13-27 der Ergebnisdarstellung (Kapitel 3.2.2) jeweils als vertikale Schwankungsbreite der einzelnen MLPA-Messwerte dargestellt.

3.1.3 Analyse der Reproduzierbarkeit der hergestellten Zellmischungen für die Mosaik-Untersuchungen

Um zu gewährleisten, dass die hergestellten Zellmischungen dem gewünschten Mosaikverhältnis entsprechen, wurde das Mosaik 50%:50% sowie das Mosaik 10%:90% nicht-deletierter zu deletierter Zellen, zweimal hergestellt. Durch das Vergleichen der einzelnen MLPA-Werte der Sonden im Deletionsbereich konnte eine Reproduzierbarkeit der Mosaikverhältnisse sichergestellt werden, wie es im Folgenden ausführlich erläutert werden soll.

3.1.3.1 Doppelanalyse der Zellmischung 50%:50%

Die beiden Zellmischungen 50%:50% wurden innerhalb einer MLPA-Reaktion amplifiziert und im selben ABI-Lauf ausgewertet, um zusätzliche Schwankungen

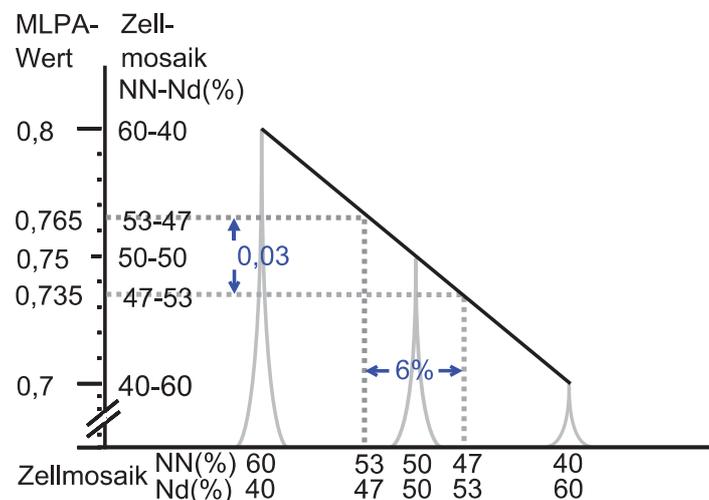
zwischen verschiedenen MLPA-Ansätzen auszuschließen. Die Tabelle 8 zeigt das MLPA-Ergebnis.

Tabelle 8: Ergebnis der MLPA-Untersuchung zweier unabhängig voneinander hergestellten Zellmischungen (Mischung 1 und 2) aus 50% Zellen mit *NF1* Deletion (Patientin K) und 50% Zellen ohne *NF1* Deletion (Patient E). MLPA = Multiplex Ligation-dependant Probe Amplifikation, *NF1* = Neurofibromatose Typ 1

Name der MLPA-Sonde	MLPA-Wert		Differenz der MLPA-Werte
	Mischung 1	Mischung 2	
SUZ12PvorExon1	0,88	0,83	0,05
SUZ12PExon1	0,71	0,72	0,01
SUZ12Pintron4	0,86	0,82	0,04
ATAD5	0,85	0,82	0,03
CRLF3	0,83	0,84	0,01
CENTA2	0,8	0,83	0,03
RNF135	0,85	0,81	0,04
NF1Exon1	0,77	0,78	0,01
NF1Exon12B	0,82	0,83	0,01
NF1Exon23	0,84	0,78	0,06
NF1Exon40	0,75	0,8	0,05
NF1Exon48	0,81	0,75	0,06
UTP6	0,86	0,81	0,05
SUZ12	0,68	0,64	0,04
LRRC37B	0,81	0,75	0,06

Die zuvor geschilderten Analysen zu versuchsintern bedingten Schwankungsbreiten der Messwerte sprechen dafür, dass sich die MLPA-Werte der Zellmischungen 50%:50% (Mischung 1 und 2, Tabelle 8) zu 0,05 unterscheiden können. Diese Zahl setzt sich zusammen aus einer MLPA-Wertdifferenz von 0,02, die sich durch die gerätespezifische Schwankung innerhalb eines ABI-Laufs ergeben kann (Kapitel 3.1.2). Des Weiteren kommt eine MLPA-Wertdifferenz von 0,03 hinzu, die sich durch eine mögliche Schwankung bei der Herstellung des Mosaiks 50%:50% ergibt. Wie Abbildung 11 zeigt, kommt die MLPA-Wertdifferenz von 0,03 aufgrund der größtmöglichen Differenz bei der Herstellung des Mosaikverhältnisses von 6% zustande, die sich durch die Schwankungsbreite des Cellcountermesswerts bei der Zellzählung ergibt (Kapitel 3.1.1). Unter vorausgesetzter Linearität der Peakhöhen bewirkt eine Differenz von 6% des Mosaikverhältnisses, die durch Fehler bei der Zellzählung entsteht, eine MLPA-Wertdifferenz von 0,03, da das Mosaik 53%:47% nicht-deletierter zu

deletierter Zellen einem MLPA-Wert von 0,765 entspricht, das Mosaik 47%:53% aber zu einem MLPA-Wert von 0,735 führt (Abbildung 11).



NN=Normal-Normal, Zelle ohne *NF1* Deletion, Nd=Normal-deletiert, Zelle mit heterozygoter *NF1* Deletion
MLPA=Multiplex Ligation- dependant Probe Amplifikation, *NF1* = Neurofibromatose Typ 1

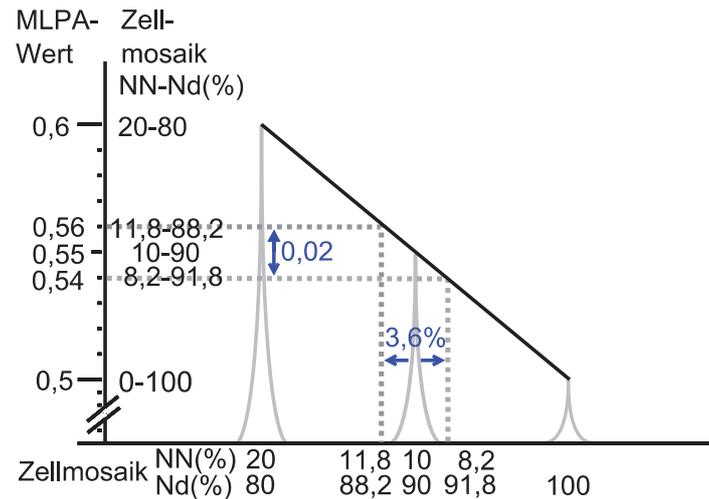
Abbildung 11: Schematische Darstellung der vorausgesetzten Linearität der Peakhöhen, bei der sich bei einem Mischungsverhältnis (Mosaik) aus 50% Zellen mit *NF1* Deletion (Patientin K) und 50% Zellen ohne *NF1* Deletion (Patient E), bei eventuell gegebener Differenz des Zellmischungsverhältnis von 6%, eine MLPA-Wertdifferenz von 0,03 ergibt.

3.1.3.2 Doppelanalyse der Zellmischung 10%:90%

Auch die Zellmischung aus 10% Zellen ohne *NF1* Deletion und 90% Zellen mit *NF1* Deletion wurde zweimal hergestellt und die sich ergebenden MLPA-Ergebnisse miteinander verglichen. Es stellte sich heraus, dass durch versuchsinterne Schwankungen die Differenz der MLPA-Werte bis zu 0,04 betragen kann.

Diese MLPA-Wertdifferenz von 0,04 ergibt sich aus der Schwankungsbreite von 0,02, die sich innerhalb eines ABI-Laufs zeigen kann. Zusätzlich beläuft sich die Schwankungsbreite des Mosaikverhältnisses, aufgrund des Messfehlers des Cellcounters, auf 3,6%, (Kapitel 3.1.1), die eine MLPA-Wertdifferenz von 0,02 bewirken kann, wie folgende Abbildung 12 zeigt.

Das MLPA-Ergebnis zeigt mit Ausnahme von 4 MLPA-Sonden eine MLPA-Wertdifferenz bis zu 0,04, womit eine Reproduzierbarkeit des Mosaiks 10%:90% bewiesen ist (Tabelle 9).



NN=Normal-Normal, Zelle ohne *NF1* Deletion, Nd=Normal-deletiert, Zelle mit heterozygoter *NF1* Deletion
MLPA=Multiplex Ligation- dependant Probe Amplifikation, *NF1* = Neurofibromatose Typ 1

Abbildung 12: Schematische Darstellung der vorausgesetzten Linearität der Peakhöhen, bei der sich bei einem Mischungsverhältnis (Mosaik) aus 90% Zellen mit *NF1* Deletion (Patientin K) und 10% Zellen ohne *NF1* Deletion (Patient E), bei eventuell gegebener Differenz des Zellmischungsverhältnis von 3,6%, eine MLPA-Wertdifferenz von 0,02 ergibt.

Tabelle 9: Ergebnisse der MLPA-Untersuchungen zweier unabhängig voneinander hergestellten Mischungsverhältnissen (Mischung 1 und 2) aus 90% Zellen mit *NF1* Deletion (Patientin K) und 10% Zellen ohne *NF1* Deletion (Patient E). MLPA-Wertdifferenzen >0,04 sind gelb markiert. MLPA = Multiplex Ligation- dependant Probe Amplifikation, *NF1* = Neurofibromatose Typ 1

Name der MLPA-Sonde	MLPA-Wert		Differenz der MLPA-Werte
	Mischung 1	Mischung 2	
SUZ12PvorExon1	0,64	0,67	0,03
SUZ12PExon1	0,42	0,39	0,03
SUZ12PIntron4	0,66	0,75	0,09
ATAD5	0,6	0,61	0,01
CRLF3	0,67	0,66	0,01
CENTA2	0,53	0,65	0,12
RNF135	0,64	0,67	0,03
NF1Exon1	0,66	0,65	0,01
NF1Exon12B	0,52	0,6	0,08
NF1Exon23	0,69	0,67	0,02
NF1Exon40	0,54	0,64	0,1
NF1Exon48	0,67	0,66	0,01
UTP6	0,63	0,61	0,02
SUZ12	0,52	0,55	0,03
LRRC37B	0,59	0,56	0,03

Die Tatsache, dass 4 MLPA-Sonden eine MLPA-Wertdifferenz >0,04 aufweisen, kann durch sondenspezifische Schwankungen während der PCR Reaktion erklärt werden. Aus experimentellen Gründen wurden die DNA-Proben der beiden

Zellmischungen (Mosaik) in unterschiedlichen MLPA-Reaktionen amplifiziert und in verschiedenen ABI Läufen analysiert. Durch diesen Umstand können sich zusätzliche Schwankungen in den einzelnen MLPA-Ergebnissen ergeben, die die MLPA-Wertdifferenz zusätzlich beeinflussen. Es stellt sich die Frage, ob diese 4 Sonden, NF1Exon40, NF1Exon12B, CENTA2 und SUZ12Pintron4 in besonderem Maße MLPA-reaktionsabhängigen Schwankungen unterworfen sind. Auf diese Frage soll an anderer Stelle (Kapitel 4.2) nochmals eingegangen werden.

3.2 Ergebnisse der Untersuchung des individuellen Verhaltens der MLPA-Sonden im Deletionsbereich

3.2.1 Erläuterungen zur Auswertung des MLPA-Ergebnisses als graphische Darstellung der einzelnen MLPA-Werte der MLPA-Sonden

Ein Ziel meiner Arbeit war es, die einzelnen Sonden des MLPA-Tests an DNA-Proben unterschiedlicher Zellmischungen (Mosaik) auszuwerten, um zu ermitteln, ob diese MLPA-Sonden Werte liefern, die von den theoretisch erwarteten Werten abweichen oder nicht. Diese Auswertungen sind im Folgenden graphisch dargestellt (Abbildungen 13-27). Dabei ist das MLPA-Ergebnis, alle MLPA-Werte einer MLPA-Sonde, der DNA-Probe des Patienten E (ohne *NF1* Deletion), der Patientin K (Trägerin einer heterozygoten Typ-I *NF1* Deletion) und allen Zellmischungen dieser beiden Personen in einer Graphik als blaue Punkte wiedergegeben. Als vertikale Linie ausgehend von diesem Punkt (MLPA-Wert) habe ich die Schwankungsbreite von 0,02 angegeben, die sich innerhalb eines ABI-Laufs ergeben kann (Kapitel 3.1.2). Bei den MLPA-Werten der Mosaik ist zusätzlich als horizontale Linie die Schwankungsbreite von 3,6%-6% angegeben, die durch Ungenauigkeiten bei der Zellzählung während der Herstellung der Mosaik entsteht und entsprechend berücksichtigt werden muss (Kapitel 3.1.1). Durch diese vertikale und horizontale Schwankungsbreite wird ein Feld vorgegeben, in dem sich der experimentell ermittelte MLPA-Wert befinden sollte. Dieses Feld ist in den Abbildungen 13-27 als blauer Punkt mit Linienkreuz dargestellt. Zusätzlich sind die theoretisch erwarteten MLPA-Werte als graue Peaks dargestellt. Die graue Peakhöhe des Patienten E, entspricht 100% Zellen ohne *NF1* Deletion, sollte für alle MLPA-Sonden einen Wert von 1,0 betragen.

Entsprechend sollten die Peakhöhen aller MLPA-Sonden der Patientin K, entspricht 100% Zellen mit heterozygoter *NF1* Deletion, im Deletionsbereich einen MLPA-Wert von 0,5 entsprechen.

Erwartungsgemäß sollten sich je MLPA-Sonde die MLPA-Werte der Mosaik linear zwischen dem MLPA-Wert des Patienten E und dem MLPA-Wert der Patientin K befinden. Dieser Bereich ist in den Abbildungen 13-27 durch einen grauen Bereich hervorgehoben. Unter der Voraussetzung, dass die MLPA-Werte des Patienten E und der Patientin K dem wahren Wert entsprechen und keinen weiteren undefinierten Schwankungen unterliegen, sollten alle MLPA-Werte der dazwischen liegenden, hergestellten Mosaik im grauen Bereich liegen.

3.2.2 Graphische Darstellung der 15 MLPA-Sonden im Deletionsbereich

Anhand der Anzahl der MLPA-Werte, die im erwarteten grauen Bereich liegen, läßt sich ein Qualitätsranking der MLPA-Sonden erstellen.

Tabelle 10: Auflistung aller MLPA-Sonden im Deletionsbereich anhand der Anzahl der MLPA-Werte, die sich im erwarteten grauen Bereich befinden. MLPA = Multiplex Ligation-dependant Probe Amplifikation

Anzahl der MLPA-Werte innerhalb des erwarteten grauen Bereichs					
0	1	2	3	4	5
NF1Exon12b	NF1Exon23	SUZ12PExon1	ATAD5	SUZ12PvorExon1	SUZ12Pintron4
	SUZ12	UTP6	CRLF3		
	LRRC37b		CENTA2		
			RNF135		
			NF1Exon1		
			NF1Exon40		
			NF1Exon48		

Somit läßt sich eine grobe Einteilung der MLPA-Sonden in 2 Gruppen vornehmen. In der ersten Gruppe mit 9 der 15 MLPA-Sonden im Deletionsbereich befinden sich mindestens 3 der 5 möglichen MLPA-Werte der Mosaik innerhalb des grauen Bereichs (gelb markierte Sonden in Tabelle 10). Die zweite Gruppe mit 6 der 15 MLPA-Sonden zeigt mindestens 3 MLPA-Werte der Mosaik außerhalb des grauen Bereichs (Tabelle 11).

Tabelle 11: Einteilung der MLPA-Sonden in die erste Gruppe, bei der ≥ 3 MLPA-Werte innerhalb des erwarteten grauen Bereichs liegen oder in die zweite Gruppe, bei der ≥ 3 MLPA-Werte außerhalb des grauen Bereichs liegen. MLPA = Multiplex Ligation-dependant Probe Amplifikation

Erste Gruppe		Zweite Gruppe	
SUZ12P vorExon1	SUZ12P Intron4	SUZ12P Exon1	NF1 Exon12B
ATAD5	CRLF3	NF1 Exon23	UTP6
CENTA2	RNF135	SUZ12	LRRC37B
NF1 Exon1	NF1 Exon40		
NF1 Exon48			

3.2.2.1 Erste Gruppe der MLPA-Sonden

Wie in Tabelle 11 zu sehen ist, entsprechen die MLPA-Werte von 9 der insgesamt 15 MLPA-Sonden im Deletionsbereich tatsächlich der erwarteten Linearität und liegen mit mindestens 3 MLPA-Werten der Mosaik im grauen Bereich, wie hier am Beispiel der MLPA-Sonde SUZ12Pintron4 gezeigt. Unter Berücksichtigung des vorgegebenen Feldes der einzelnen MLPA-Werte, die durch die vertikale und horizontale Schwankungsbreite vorgegeben wird, liegen auch die MLPA-Werte des Mosaiks 20%:80% und 10%:90% innerhalb des grauen Bereichs.

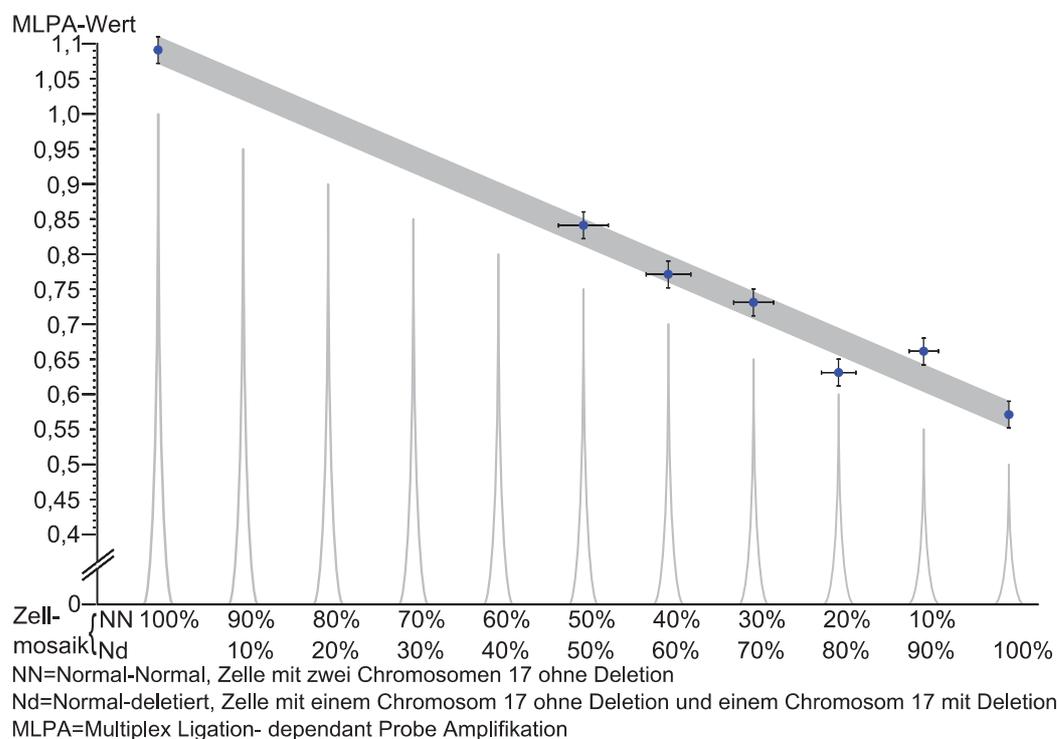


Abbildung 13: graphische Darstellung aller MLPA-Werte der MLPA-Sonde **SUZ12Pintron4**. Die Y-Achse gibt die MLPA-Werte an, die X-Achse zeigt die prozentualen Anteile der Mischung an Zellen ohne Deletion und mit *NF1* Deletion. In dieser Grafik sind die MLPA-Werte des Patienten E (100% Zellen ohne Deletion), der Patientin K (100% Zellen mit *NF1* Deletion) sowie die MLPA-Werte eingetragen, die mit verschiedenen Zellmischungen (Mosaik) erhalten wurden. Der graue Balken zeigt den Bereich an, in dem die MLPA-Werte der Mosaik liegen sollten. Die Spitze der grauen Peaks gibt die theoretisch zu erwartenden MLPA-Werte vor.

Allerdings sind bei manchen dieser 9 MLPA-Sonden bis zu 2 MLPA-Werte außerhalb des grauen Bereichs zu finden, wie hier am Beispiel der MLPA-Sonde CRLF 3 dargestellt.

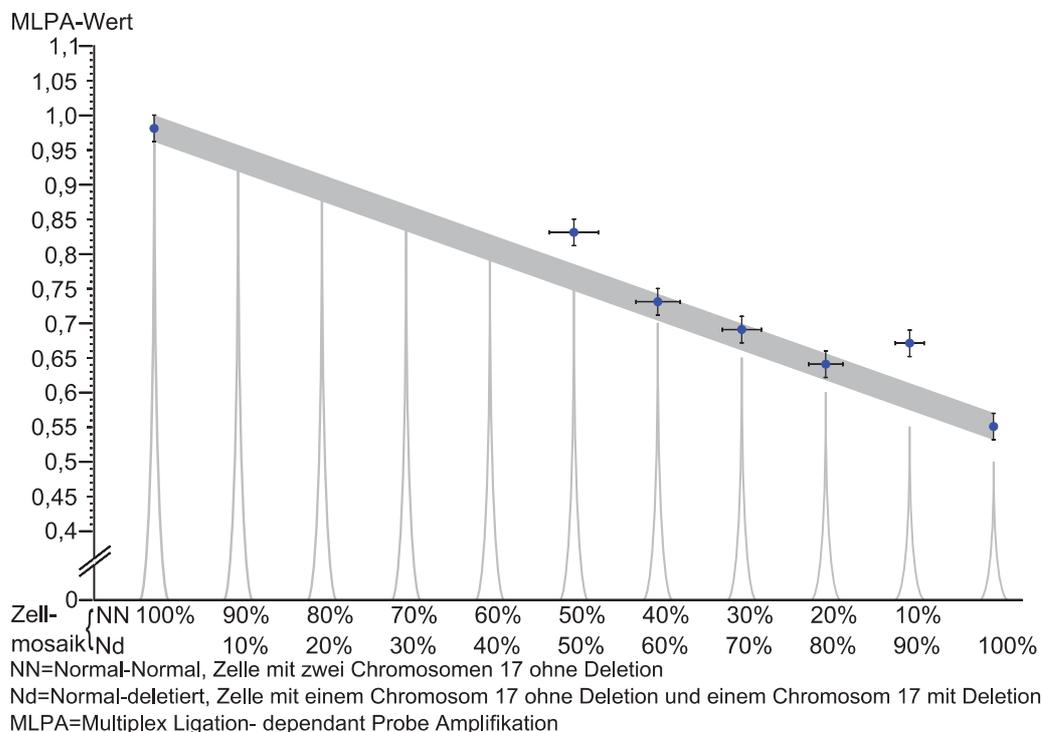


Abbildung 14: graphische Darstellung aller MLPA-Werte der MLPA-Sonde **CRLF3**. Die Y-Achse gibt die MLPA-Werte an, die X-Achse zeigt die prozentualen Anteile der Mischung an Zellen ohne Deletion und mit *NF1* Deletion. In dieser Grafik sind die MLPA-Werte des Patienten E (100% Zellen ohne Deletion), der Patientin K (100% Zellen mit heterozygoter *NF1* Deletion) sowie die MLPA-Werte eingetragen, die mit verschiedenen Zellmischungen (Mosaik) erhalten wurden. Der graue Balken zeigt den Bereich an, in dem die MLPA-Werte der Mosaik liegen sollten. Die Spitze der grauen Peaks gibt die theoretisch zu erwartenden MLPA-Werte vor. *NF1* = Neurofibromatose Typ 1

Die zu hoch erscheinenden MLPA-Werte der Zellmischung (Mosaik) 50%:50% bzw. 10%:90%, nicht-deletierter zu deletierter Zellen, könnten auf ein ungenaues Zellmischungsverhältnis hinweisen. Theoretisch wäre bei einem Mosaik 50%:50% ein MLPA-Wert von 0,75 zu erwarten, tatsächlich aber ergab sich ein MLPA-Wert von 0,83 (Tabelle 12). Ein MLPA-Wert von 0,83 würde theoretisch einem Zellmischungsverhältnis von ca. 75%:35%, nicht-deletierter zu deletierter Zellen entsprechen. Diese mögliche Fehlerquelle eines ungenauen Zellmischungsverhältnis (75%:35% statt 50%:50%) ist jedoch auszuschließen, da andere MLPA-Sonden in derselben MLPA-Reaktion für die DNA des Mosaiks 50%:50% zutreffendere MLPA-Werte, lokalisiert im grauen Bereich, lieferten. Dies trifft in der ersten Gruppe für die MLPA-Sonden ATAD5, *NF1*Exon40, *NF1*Exon1, RNF 135 und SUZ12PvorExon1 zu (Abbildungen 15-19). Damit ist ein grober Fehler bei der Herstellung eines bestimmten Mosaiks ausgeschlossen. Ein

weiteres Indiz dafür, dass die zusätzlichen Schwankungen einiger MLPA-Werte nicht auf ein mißlungenes Zellmischungsverhältnis zurückzuführen sind, ist der MLPA-Wert des Mosaiks 10%:90%, der in der graphischen Darstellung der MLPA-Sonde CRLF3 und NF1Exon48 (Abb. 14 und 21) zu hoch, aber in der graphischen Darstellung der MLPA-Sonde ATAD5 und CEN2A2 (Abb. 15 und 20) als zu niedrig erscheint. Konsequenterweise müßte ein mißlungenes Zellmischungsverhältnis in den graphischen Darstellungen aller MLPA-Sonden gleichermaßen, verglichen zu anderen Mosaiken, einen zu hohen oder zu niedrigen MLPA-Wert ergeben. Eine mögliche Erklärung für die zusätzliche Schwankung dieser MLPA-Werte könnte in sondenspezifischen Reaktionsunterschieden während des MLPA-Verfahrens zu finden sein.

Die graphische Darstellung der restlichen 7 MLPA-Sonden der ersten Gruppe ist im Folgenden gezeigt.

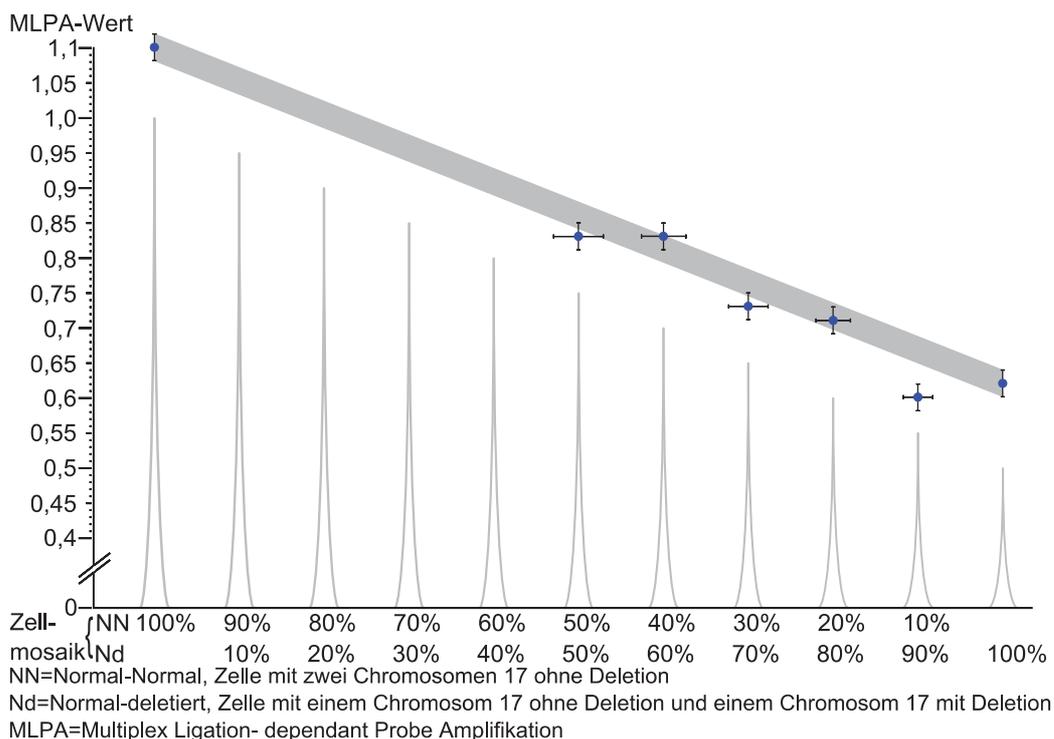


Abbildung 15: graphische Darstellung aller MLPA-Werte der MLPA-Sonde **ATAD5**. Die Y-Achse gibt die MLPA-Werte an, die X-Achse zeigt die prozentualen Anteile der Mischung an Zellen ohne Deletion und mit *NF1* Deletion. In dieser Grafik sind die MLPA-Werte des Patienten E (100% Zellen ohne Deletion), der Patientin K (100% Zellen mit heterozygoter *NF1* Deletion) sowie die MLPA-Werte eingetragen, die mit verschiedenen Zellmischungen (Mosaiken) erhalten wurden. Der graue Balken zeigt den Bereich an, in dem die MLPA-Werte der Mosaiken liegen sollten. Die Spitze der grauen Peaks gibt die theoretisch zu erwartenden MLPA-Werte vor. *NF1* = Neurofibromatose Typ 1

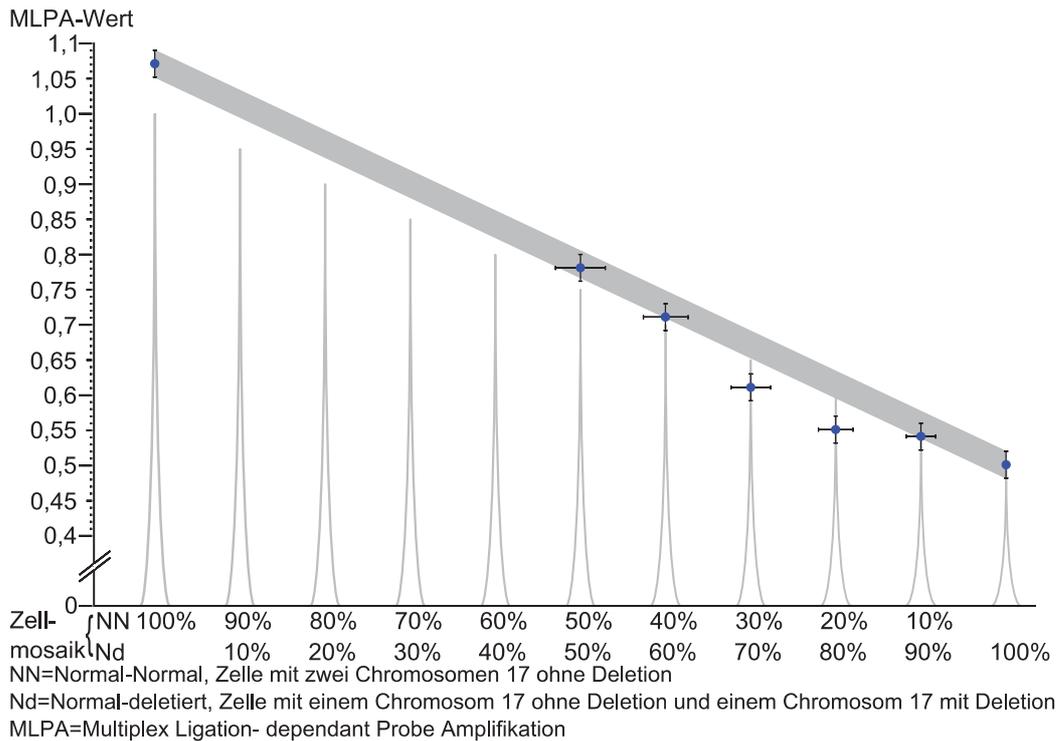


Abbildung 16: graphische Darstellung aller MLPA-Werte der MLPA-Sonde **NF1Exon40**. Die Y-Achse gibt die MLPA-Werte an, die X-Achse zeigt die prozentualen Anteile der Mischung an Zellen ohne Deletion und mit *NF1* Deletion. In dieser Grafik sind die MLPA-Werte des Patienten E (100% Zellen ohne Deletion), der Patientin K (100% Zellen mit *NF1* Deletion) sowie die MLPA-Werte eingetragen, die mit verschiedenen Zellmischungen (Mosaik) erhalten wurden. Der graue Balken zeigt den Bereich an, in dem die MLPA-Werte der Mosaik liegen sollten. Die Spitze der grauen Peaks gibt die theoretisch zu erwartenden MLPA-Werte vor.

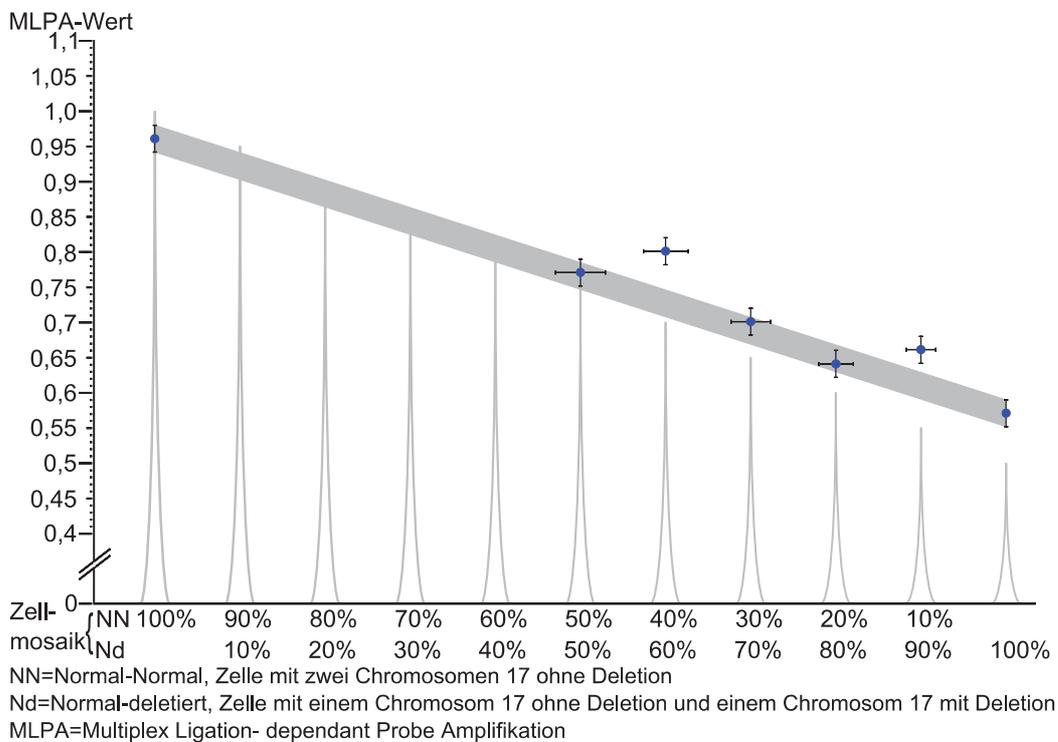


Abbildung 17: graphische Darstellung aller MLPA-Werte der MLPA-Sonde **NF1Exon1**. Die Y-Achse gibt die MLPA-Werte an, die X-Achse zeigt die prozentualen Anteile der Mischung an Zellen ohne Deletion und mit *NF1* Deletion. In dieser Grafik sind die MLPA-Werte des Patienten E (100% Zellen ohne Deletion), der Patientin K (100% Zellen mit *NF1* Deletion) sowie die MLPA-Werte eingetragen, die mit verschiedenen Zellmischungen (Mosaik) erhalten wurden. Der graue Balken zeigt den Bereich an, in dem die MLPA-Werte der Mosaik liegen sollten. Die Spitze der grauen Peaks gibt die theoretisch zu erwartenden MLPA-Werte vor.

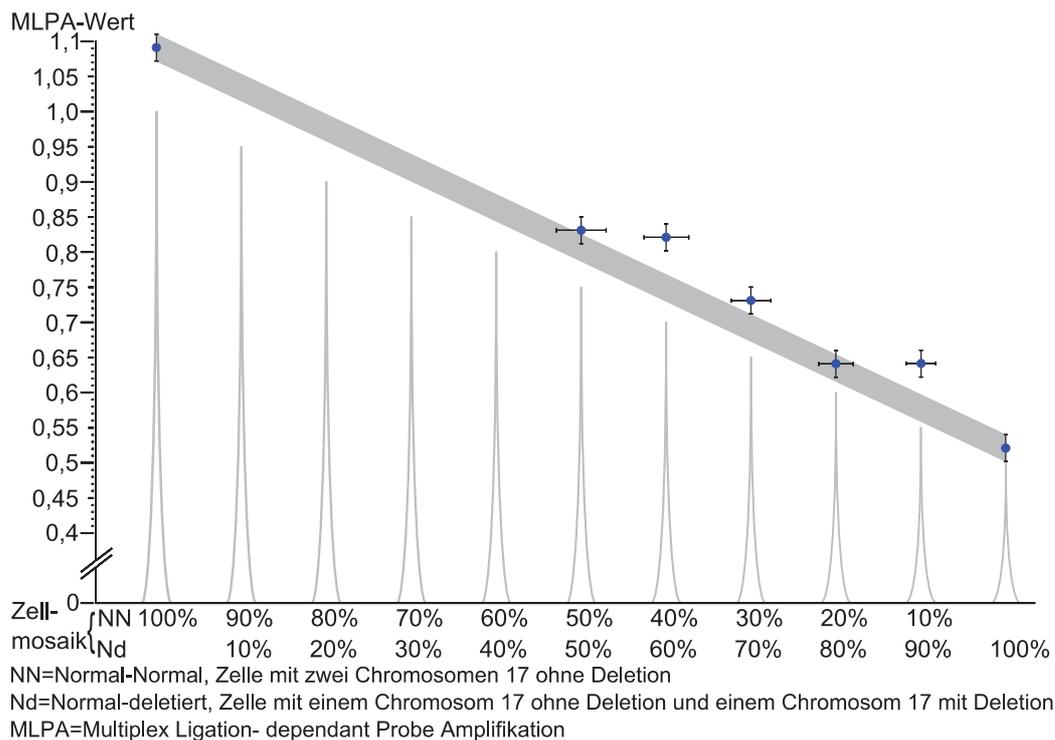


Abbildung 18: graphische Darstellung aller MLPA-Werte der MLPA-Sonde **RNF135**. Die Y-Achse gibt die MLPA-Werte an, die X-Achse zeigt die prozentualen Anteile der Mischung an Zellen ohne Deletion und mit *NF1* Deletion. In dieser Grafik sind die MLPA-Werte des Patienten E (100% Zellen ohne Deletion), der Patientin K (100% Zellen mit heterozygoter *NF1* Deletion) sowie die MLPA-Werte eingetragen, die mit verschiedenen Zellmischungen (Mosaik) erhalten wurden. Der graue Balken zeigt den Bereich an, in dem die MLPA-Werte der Mosaik liegen sollten. Die Spitze der grauen Peaks gibt die theoretisch zu erwartenden MLPA-Werte vor. *NF1* = Neurofibromatose Typ 1

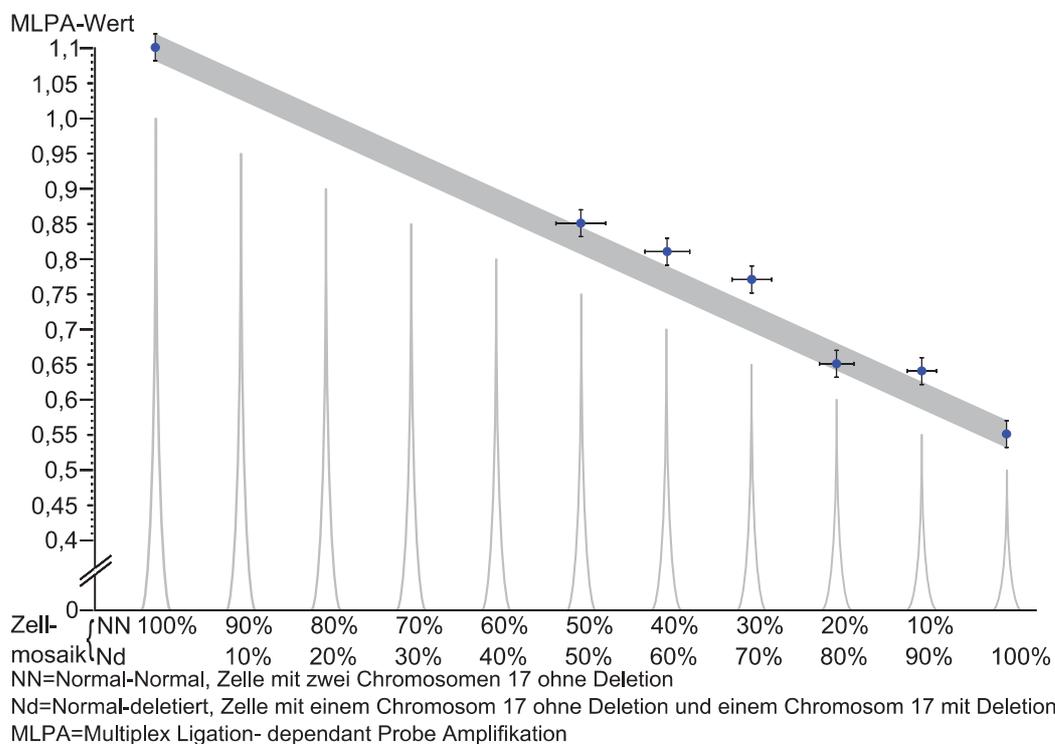


Abbildung 19: graphische Darstellung aller MLPA-Werte der MLPA-Sonde **SUZ12PvorExon1**. Die Y-Achse gibt die MLPA-Werte an, die X-Achse zeigt die prozentualen Anteile der Mischung an Zellen ohne Deletion und mit *NF1* Deletion. In dieser Grafik sind die MLPA-Werte des Patienten E (100% Zellen ohne Deletion), der Patientin K (100% Zellen mit *NF1* Deletion) sowie die MLPA-Werte eingetragen, die mit verschiedenen Zellmischungen (Mosaik) erhalten wurden. Der graue Balken zeigt den Bereich an, in dem die MLPA-Werte der Mosaik liegen sollten. Die Spitze der grauen Peaks gibt die theoretisch zu erwartenden MLPA-Werte vor.

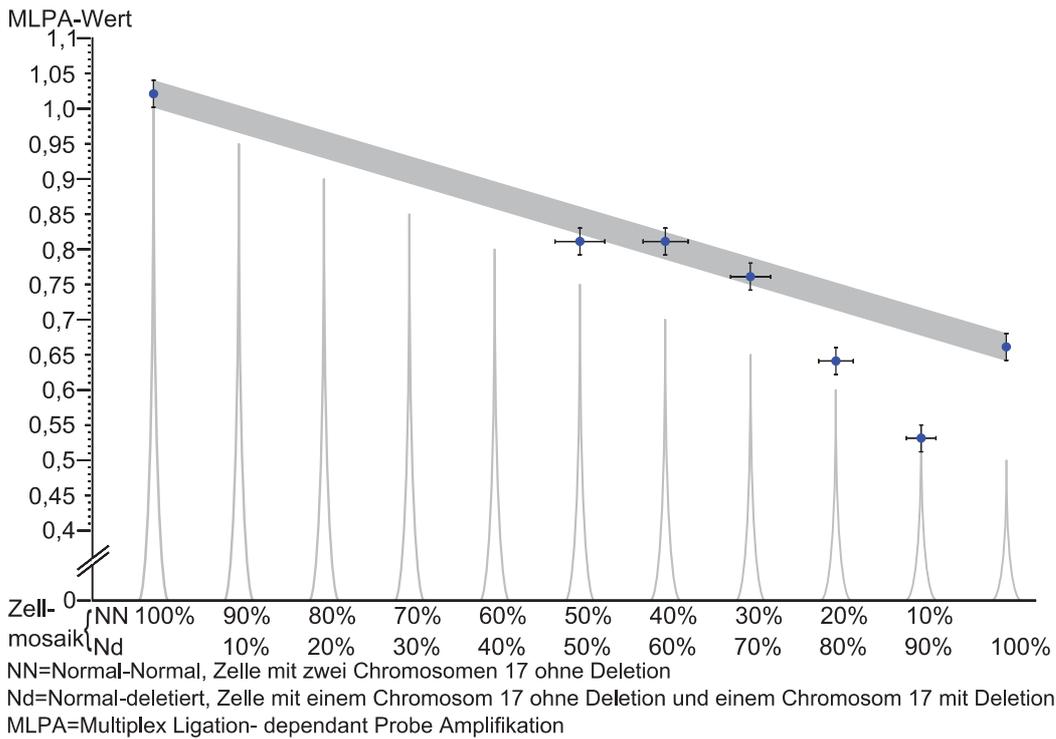


Abbildung 20: graphische Darstellung aller MLPA-Werte der MLPA-Sonde **CEN2A2**. Die Y-Achse gibt die MLPA-Werte an, die X-Achse zeigt die prozentualen Anteile der Mischung an Zellen ohne Deletion und mit *NF1* Deletion. In dieser Grafik sind die MLPA-Werte des Patienten E (100% Zellen ohne Deletion), der Patientin K (100% Zellen mit *NF1* Deletion) sowie die MLPA-Werte eingetragen, die mit verschiedenen Zellmischungen (Mosaik) erhalten wurden. Der graue Balken zeigt den Bereich an, in dem die MLPA-Werte der Mosaik liegen sollten. Die Spitze der grauen Peaks gibt die theoretisch zu erwartenden MLPA-Werte vor.

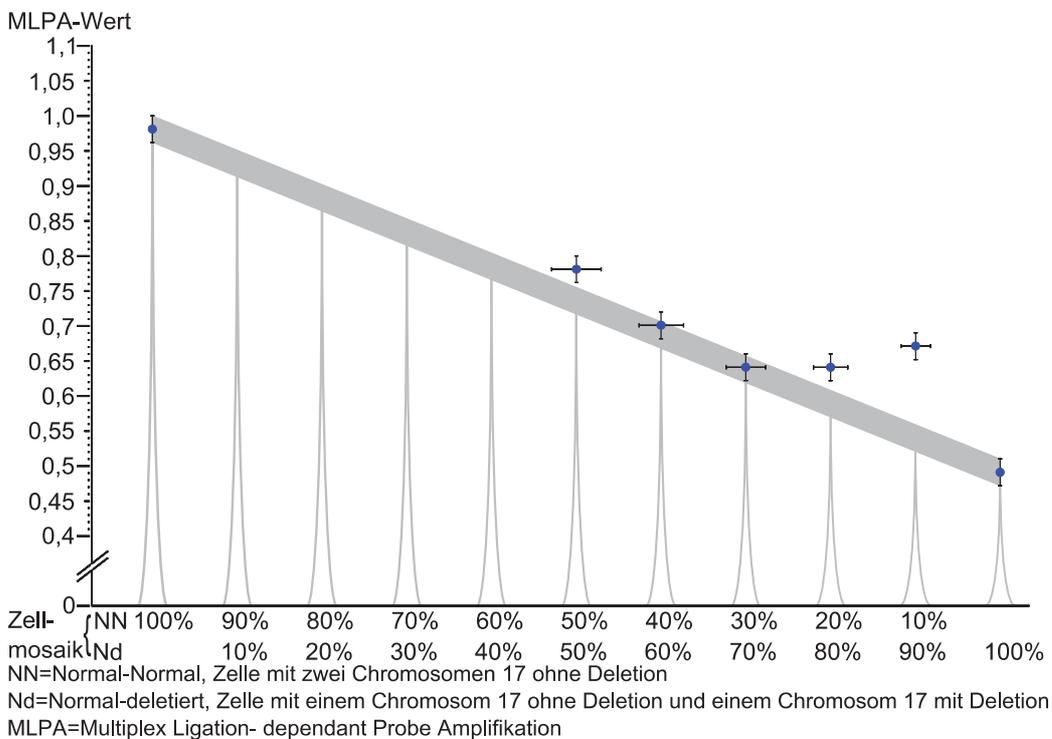


Abbildung 21: graphische Darstellung aller MLPA-Werte der MLPA-Sonde **NF1Exon48**. Die Y-Achse gibt die MLPA-Werte an, die X-Achse zeigt die prozentualen Anteile der Mischung an Zellen ohne Deletion und mit *NF1* Deletion. In dieser Grafik sind die MLPA-Werte des Patienten E (100% Zellen ohne Deletion), der Patientin K (100% Zellen mit *NF1* Deletion) sowie die MLPA-Werte eingetragen, die mit verschiedenen Zellmischungen (Mosaik) erhalten wurden. Der graue Balken zeigt den Bereich an, in dem die MLPA-Werte der Mosaik liegen sollten. Die Spitze der grauen Peaks gibt die theoretisch zu erwartenden MLPA-Werte vor.

3.2.2.2 Zweite Gruppe der MLPA-Sonden

Bei den restlichen 6 der 15 MLPA-Sonden im Deletionsbereich zeigen sich ≥ 3 MLPA-Werte der Mosaik außerhalb des grauen Balkens.

Bei diesen MLPA-Sonden müssen reaktionsabhängige sondenspezifische Schwankungen angenommen werden, die Abweichungen von MLPA-Werten außerhalb des theoretisch zu erwartenden Bereichs (grauer Bereich in den Abbildungen 13-27) verursachen. Sehr drastische Abweichungen sind bei der MLPA-Sonde NF1Exon12B zu beobachten, bei welcher kein MLPA-Wert der Zellmischungen im grauen Bereich liegt (Abbildung 22).

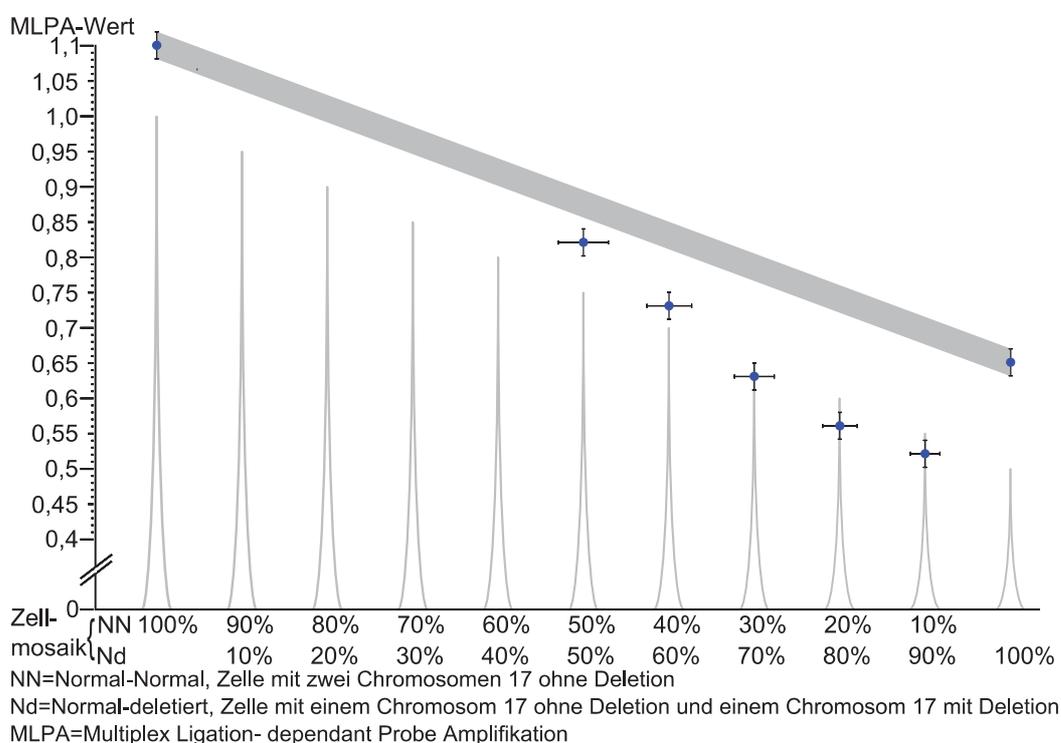


Abbildung 22: graphische Darstellung aller MLPA-Werte der MLPA-Sonde **NF1Exon12B**. Die Y-Achse gibt die MLPA-Werte an, die X-Achse zeigt die prozentualen Anteile der Mischung an Zellen ohne Deletion und mit *NF1* Deletion. In dieser Grafik sind die MLPA-Werte des Patienten E (100% Zellen ohne Deletion), der Patientin K (100% Zellen mit heterozygoter *NF1* Deletion) sowie die MLPA-Werte eingetragen, die mit verschiedenen Zellmischungen (Mosaik) erhalten wurden. Der graue Balken zeigt den Bereich an, in dem die MLPA-Werte der Mosaik liegen sollten. Die Spitze der grauen Peaks gibt die theoretisch zu erwartenden MLPA-Werte vor. *NF1* = Neurofibromatose Typ 1

Bei der MLPA-Sonde NF1Exon12B liegt der MLPA-Wert der Patientin K mit 100% Zellen mit *NF1* Deletion bei 0,65. Dieser Wert weicht drastisch von dem theoretisch zu erwartenden MLPA-Wert von 0,5 ab, wie er in derselben Reaktion für andere MLPA-Proben zu erhalten war. In einem Folgeversuch, bei dem dasselbe PCR-Produkt dieser MLPA-Reaktion der Patientin K nochmals im ABI Analyser aufgetragen und analysiert wurde, ergab sich ein MLPA-Wert von 0,55

(Kapitel 3.2.3, Tabelle 13). Daher kann bei dem hier vorliegenden MLPA-Wert von 0,65 der Patientin K von einem Ausreißer ausgegangen werden.

Auch bei der MLPA-Sonde LRRC37B kommt es bei 3 MLPA-Werten zu starken Abweichungen außerhalb des erwarteten grauen Bereichs.

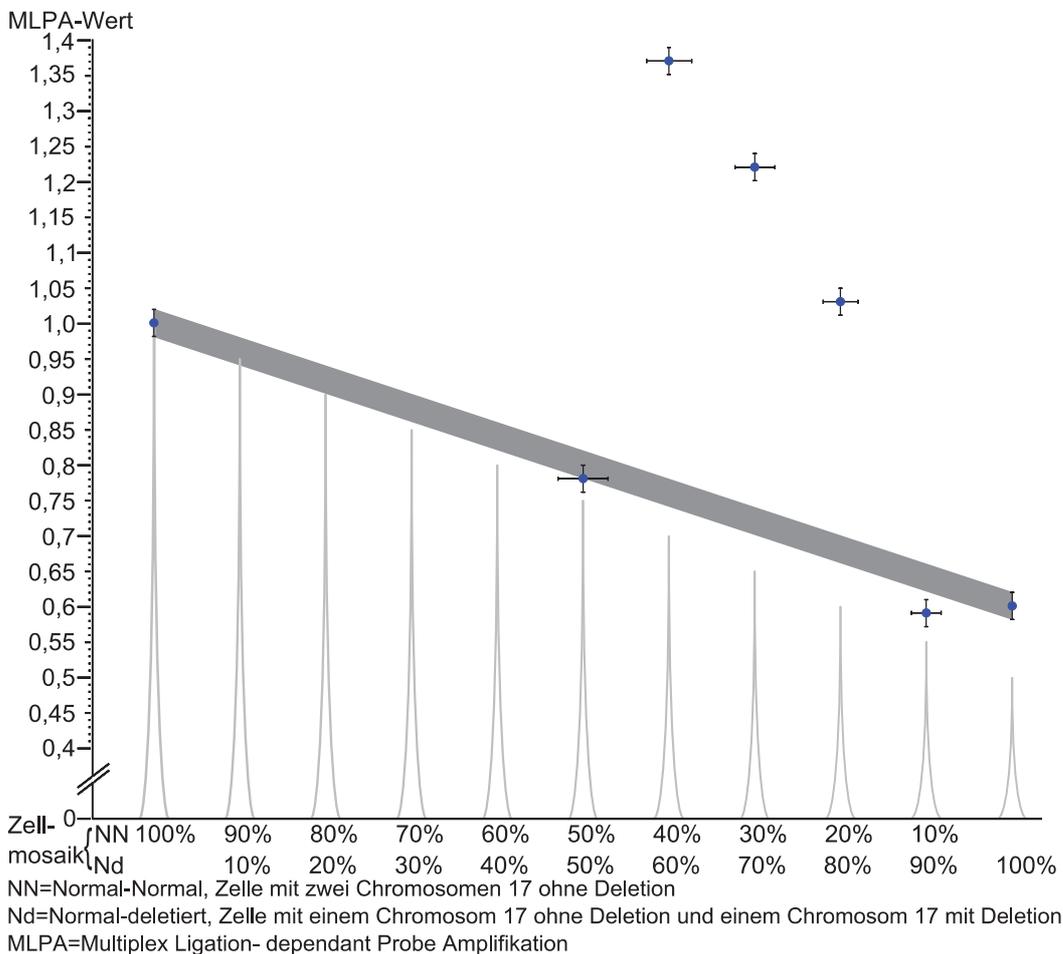


Abbildung 23: graphische Darstellung aller MLPA-Werte der MLPA-Sonde **LRRC37B**. Die Y-Achse gibt die MLPA-Werte an, die X-Achse zeigt die prozentualen Anteile der Mischung an Zellen ohne Deletion und mit *NF1* Deletion. In dieser Grafik sind die MLPA-Werte des Patienten E (100% Zellen ohne Deletion), der Patientin K (100% Zellen mit heterozygoter *NF1* Deletion) sowie die MLPA-Werte eingetragen, die mit verschiedenen Zellmischungen (Mosaik) erhalten wurden. Der graue Balken zeigt den Bereich an, in dem die MLPA-Werte der Mosaik liegen sollten. Die Spitze der grauen Peaks gibt die theoretisch zu erwartenden MLPA-Werte vor. *NF1*=Neurofibromatose Typ 1

Das starke Abweichen der MLPA-Werte der Zellmischungen 40%:60%, 30%:70% und 20%:80% ist sehr schwer zu erklären. Ein MLPA-Wert über 1,3 hinaus deutet auf eine Duplikation der DNA hin. Eine Kontamination der Probe mit zusätzlichem DNA-Material kann ausgeschlossen werden, da sich alle MLPA-Sonden gleichzeitig in der jeweiligen DNA-Probe der Zellmischung befinden und die MLPA-Werte der Mosaik 40%:60%, 30%:70% und 20%:80% der anderen MLPA-Sonden realistische Werte ergaben.

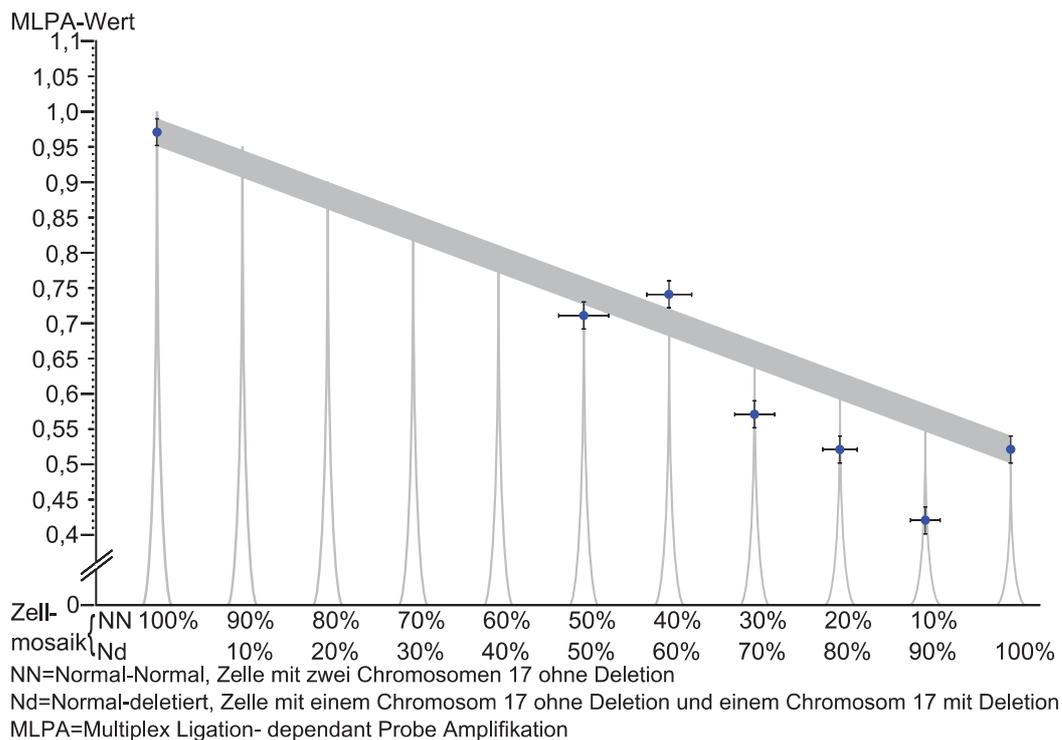


Abbildung 24: graphische Darstellung aller MLPA-Werte der MLPA-Sonde **SUZ12PExon1**. Die Y-Achse gibt die MLPA-Werte an, die X-Achse zeigt die prozentualen Anteile der Mischung an Zellen ohne Deletion und mit *NF1* Deletion. In dieser Grafik sind die MLPA-Werte des Patienten E (100% Zellen ohne Deletion), der Patientin K (100% Zellen mit *NF1* Deletion) sowie die MLPA-Werte eingetragen, die mit verschiedenen Zellmischungen (Mosaik) erhalten wurden. Der graue Balken zeigt den Bereich an, in dem die MLPA-Werte der Mosaik liegen sollten. Die Spitze der grauen Peaks gibt die theoretisch zu erwartenden MLPA-Werte vor.

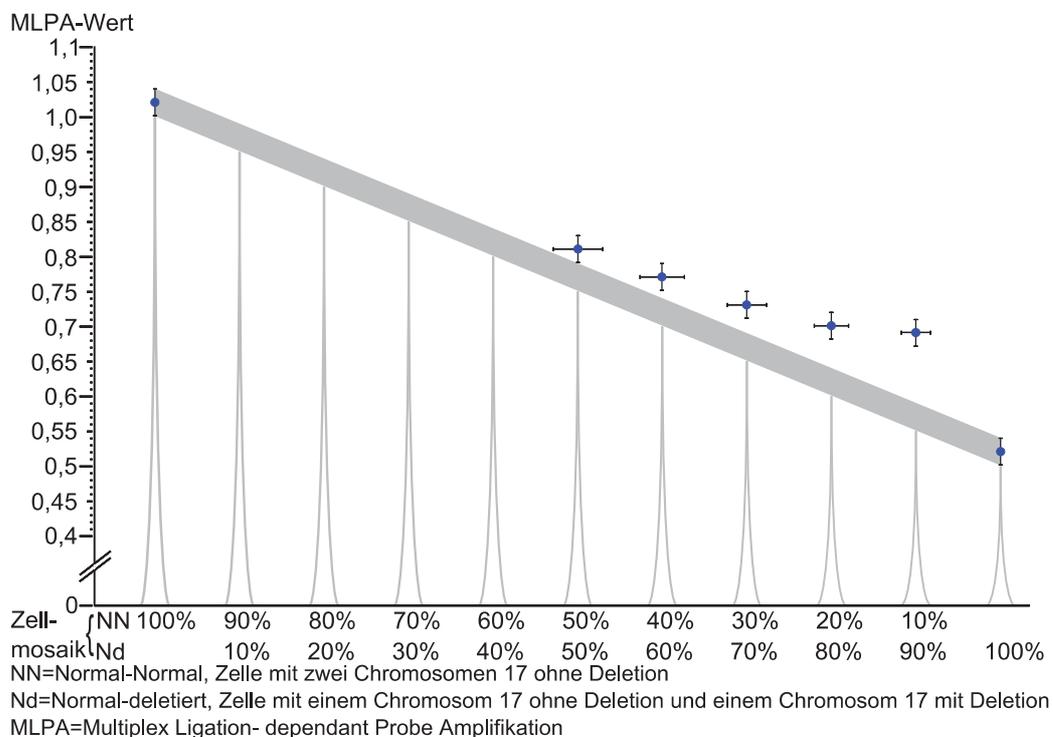


Abbildung 25: graphische Darstellung aller MLPA-Werte der MLPA-Sonde **NF1Exon23**. Die Y-Achse gibt die MLPA-Werte an, die X-Achse zeigt die prozentualen Anteile der Mischung an Zellen ohne Deletion und mit *NF1* Deletion. In dieser Grafik sind die MLPA-Werte des Patienten E (100% Zellen ohne Deletion), der Patientin K (100% Zellen mit *NF1* Deletion) sowie die MLPA-Werte eingetragen, die mit verschiedenen Zellmischungen (Mosaik) erhalten wurden. Der graue Balken zeigt den Bereich an, in dem die MLPA-Werte der Mosaik liegen sollten. Die Spitze der grauen Peaks gibt die theoretisch zu erwartenden MLPA-Werte vor.

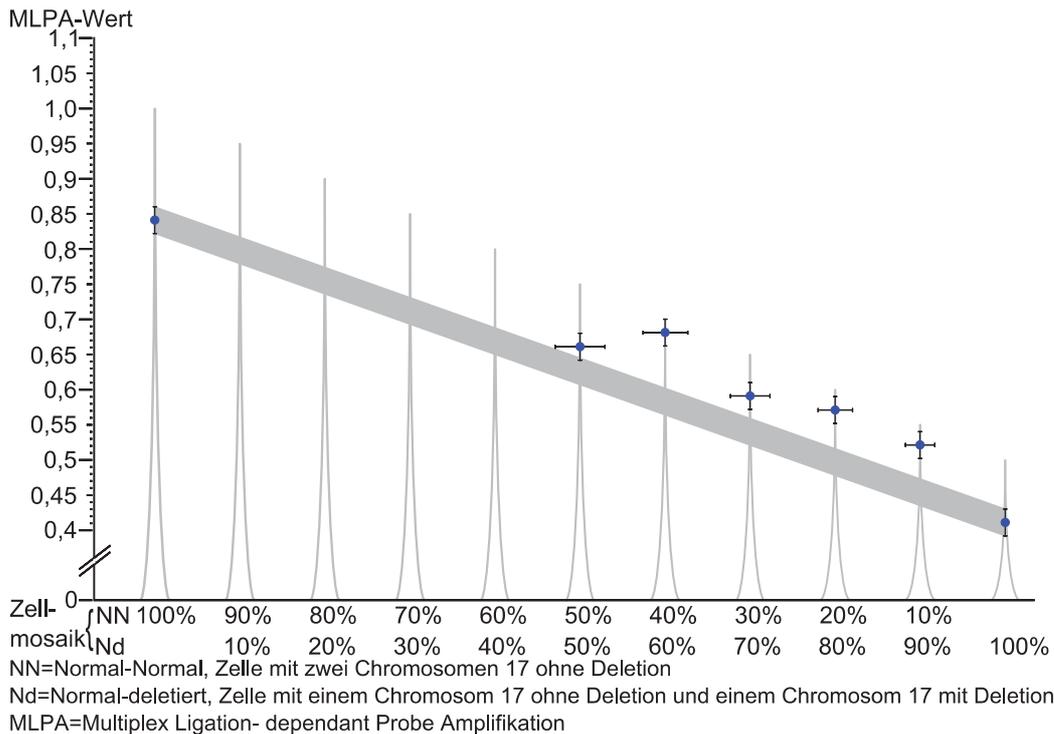


Abbildung 26: graphische Darstellung aller MLPA-Werte der MLPA-Sonde **SUZ12**. Die Y-Achse gibt die MLPA-Werte an, die X-Achse zeigt die prozentualen Anteile der Mischung an Zellen ohne Deletion und mit *NF1* Deletion. In dieser Grafik sind die MLPA-Werte des Patienten E (100% Zellen ohne Deletion), der Patientin K (100% Zellen mit *NF1* Deletion) sowie die MLPA-Werte eingetragen, die mit verschiedenen Zellmischungen (Mosaik) erhalten wurden. Der graue Balken zeigt den Bereich an, in dem die MLPA-Werte der Mosaik liegen sollten. Die Spitze der grauen Peaks gibt die theoretisch zu erwartenden MLPA-Werte vor.

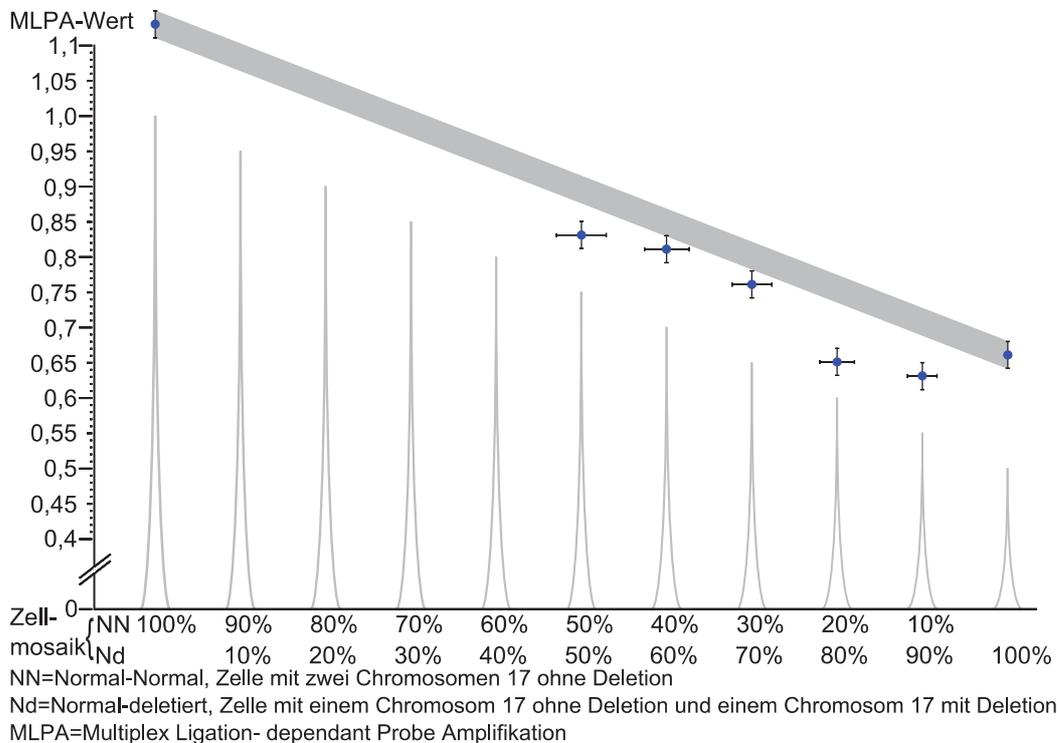


Abbildung 27: graphische Darstellung aller MLPA-Werte der MLPA-Sonde **UTP6**. Die Y-Achse gibt die MLPA-Werte an, die X-Achse zeigt die prozentualen Anteile der Mischung an Zellen ohne Deletion und mit *NF1* Deletion. In dieser Grafik sind die MLPA-Werte des Patienten E (100% Zellen ohne Deletion), der Patientin K (100% Zellen mit *NF1* Deletion) sowie die MLPA-Werte eingetragen, die mit verschiedenen Zellmischungen (Mosaik) erhalten wurden. Der graue Balken zeigt den Bereich an, in dem die MLPA-Werte der Mosaik liegen sollten. Die Spitze der grauen Peaks gibt die theoretisch zu erwartenden MLPA-Werte vor.

Die MLPA-Werte der Patientin K, des Patienten E sowie aller Zellmischungen dieser beiden Personen, die den graphischen Darstellungen der 15 MLPA-Sonden im Deletionsbereich zugrunde liegen, sind in der folgenden Tabelle 12 aufgestellt.

Tabelle 12: MLPA-Ergebnis aller MLPA-Sonden im Deletionsbereich bei Patientin K (100% Zellen mit heterozygoter *NF1* Deletion) sowie bei Patient E (100% Zellen ohne *NF1* Deletion). Die Zellmischung (Mosaik) 10-90 besteht aus 10% Zellen ohne *NF1* Deletion und 90% Zellen mit heterozygoter *NF1* Deletion. Auf der Basis dieses MLPA-Ergebnisses wurde die graphische Darstellung der MLPA-Sonden (Abbildungen 13-27) erstellt. MLPA= Multiplex Ligation-dependant Probe Amplifikation, *NF1*= Neurofibromatose Typ 1

Name der MLPA-Sonde	MLPA-Werte			
	Patientin K	Mosaik 10-90	Mosaik 20-80	Mosaik 30-70
SUZ12PvorExon1	0,55	0,64	0,65	0,77
SUZ12PExon1	0,52	0,42	0,52	0,57
SUZ12PIntron4	0,57	0,66	0,63	0,73
ATAD5	0,62	0,6	0,71	0,73
CRLF3	0,55	0,67	0,64	0,69
CENTA2	0,66	0,53	0,64	0,76
RNF135	0,52	0,64	0,64	0,73
NF1Exon1	0,57	0,66	0,64	0,7
NF1Exon12B	0,65	0,52	0,56	0,63
NF1Exon23	0,52	0,69	0,7	0,73
NF1Exon40	0,5	0,54	0,55	0,61
NF1Exon48	0,49	0,67	0,64	0,64
UTP6	0,66	0,63	0,65	0,76
SUZ12	0,41	0,52	0,57	0,59
LRRC37B	0,6	0,59	1,03	1,22

Name der MLPA-Sonde	MLPA-Werte		
	Mosaik 40-60	Mosaik 50-50	Patient E
SUZ12PvorExon1	0,81	0,85	1,1
SUZ12PExon1	0,74	0,71	0,97
SUZ12PIntron4	0,77	0,84	1,09
ATAD5	0,83	0,83	1,1
CRLF3	0,73	0,83	0,98
CENTA2	0,81	0,81	1,02
RNF135	0,82	0,83	1,09
NF1Exon1	0,8	0,77	0,96
NF1Exon12B	0,73	0,82	1,1
NF1Exon23	0,77	0,81	1,02
NF1Exon40	0,71	0,78	1,07
NF1Exon48	0,7	0,78	0,98
UTP6	0,81	0,83	1,13
SUZ12	0,68	0,66	0,84
LRRC37B	1,37	0,78	1

3.2.3 Doppelbestimmungen der MLPA-Werte im ABI-Analyser innerhalb eines MLPA-Versuchsansatzes zur Eruiierung zusätzlicher sondenabhängiger Schwankungen

Um das MLPA-Ergebnis eines Patienten auf einen eventuell vorliegenden Mosaikstatus zu beurteilen, ist die Kenntnis der MLPA-Sonden nötig, die häufig vom theoretisch zu erwartenden MLPA-Wert abweichen. Bei diesem theoretisch zu erwartenden MLPA-Wert sind Schwankungen, die durch Ungenauigkeiten bei der Zellzählung auftreten sowie ABI-Lauf spezifische Schwankungen bereits berücksichtigt. Es stellt sich die Frage, ob der MLPA Kit P122 Version C1 „unzuverlässige“ MLPA-Sonden enthält, die häufiger MLPA-Werte liefern, die vom zu erwartenden Wert abweichen.

Da die einzelnen Reaktionsschritte des MLPA-Verfahrens selbst hinsichtlich möglicher Fehlerquellen experimentell nicht zu differenzieren sind, kann daher, um zusätzliche sondenspezifische Schwankungen zu untersuchen, nur der letzte Schritt, die Analyse der PCR-Produkte im ABI Analyser wiederholt werden. Dabei enthält ein MLPA-Ansatz bzw. eine MLPA-Reaktion die amplifizierten PCR-Produkte aller 28 MLPA-Sonden des MLPA-Kits einer DNA-Probe. Da für die Analyse im ABI Analyser nur ein Anteil der MLPA-Reaktionen gebraucht werden, konnten diese Reaktionen für Doppelbestimmungen in aufeinanderfolgenden ABI-Läufen eingesetzt werden. Dies führte ich mit den MLPA-Reaktionen des Patienten E (100% Zellen ohne *NF1* Deletion), der Patientin K (100% Zellen mit *NF1* Deletion) sowie des Mosaiks 20%:80% nicht-deletierter zu deletierter Zellen durch. Diese Doppelanalysen derselben Reaktionsansätze sind im Nachfolgenden beschrieben und wurden gemacht, um Schwankungen der MLPA-Werte aus verschiedenen ABI-Läufen bei gleichem MLPA-Ansatz aufzuzeigen. Dabei ist eine Differenz der MLPA-Werte von 0,02 als laufinterne Schwankung des ABI-Analysers (Kapitel 3.1.2) tolerabel.

Das Ergebnis dieser Doppelanalysen zeigt vor allem bei den MLPA-Werten der Patientin K deutlich höhere Differenzen. Am auffälligsten waren die MLPA-Werte der MLPA-Sonden SUZ12PExon1, NF1Exon12B, SUZ12 sowie LRRC37B, deren Differenz der beiden MLPA-Werte aus 2 unabhängigen ABI-Läufen ≥ 0.1 betrug (Tabelle 13).

Tabelle 13: Übersicht der MLPA-Werte sowie deren Differenz aus zwei unabhängigen ABI-Läufen derselben MLPA-Reaktion, für welche DNA der Patientin K eingesetzt wurde. Patientin K weist in der DNA aus peripherem Blut 100% Zellen mit *NF1* Deletion auf. MLPA-Wertdifferenzen ≥ 0.1 sind gelb markiert. MLPA = Multiplex Ligation- dependant Probe Amplifikation, *NF1* = Neurofibromatose Typ 1

MLPA-Sonde	Patientin K		Differenz
	MLPA-Wert 1.ABI-Lauf	MLPA-Wert 2.ABI-Lauf	
SUZ12PvorExon1	0,55	0,57	0,02
SUZ12PExon1	0,52	0,4	0,12
SUZ12Pintron4	0,57	0,58	0,01
ATAD5	0,62	0,58	0,04
CRLF3	0,55	0,6	0,05
CENTA2	0,66	0,59	0,07
RNF135	0,52	0,53	0,01
NF1Exon1	0,57	0,63	0,06
NF1Exon12B	0,65	0,55	0,1
NF1Exon23	0,52	0,56	0,04
NF1Exon40	0,5	0,45	0,05
NF1Exon48	0,49	0,53	0,04
UTP6	0,66	0,63	0,03
SUZ12	0,41	0,57	0,16
LRRC37B	0,6	0,5	0,1

Tabelle 14: Übersicht der MLPA-Werte sowie deren Differenz aus zwei unabhängigen ABI-Läufen derselben MLPA-Reaktion, für welche DNA des Patienten E eingesetzt wurde. Patient E weist in der DNA aus peripherem Blut 100% Zellen ohne *NF1* Deletion auf. MLPA-Wertdifferenzen ≥ 0.1 sind gelb markiert. MLPA = Multiplex Ligation- dependant Probe Amplifikation, *NF1* = Neurofibromatose Typ 1

MLPA-Sonde	Patient E		Differenz
	MLPA-Wert 1.ABI-Lauf	MLPA-Wert 2.ABI-Lauf	
SUZ12PvorExon1	1,1	1,04	0,06
SUZ12PExon1	0,97	0,95	0,02
SUZ12Pintron4	1,09	1,05	0,04
ATAD5	1,1	1,06	0,04
CRLF3	0,98	0,97	0,01
CENTA2	1,02	0,99	0,03
RNF135	1,09	1,05	0,04
NF1Exon1	0,96	0,92	0,04
NF1Exon12B	1,1	1,08	0,02
NF1Exon23	1,02	1	0,02
NF1Exon40	1,07	1,08	0,01
NF1Exon48	0,98	0,96	0,02
UTP6	1,13	1,08	0,05
SUZ12	0,84	1,09	0,25
LRRC37B	1	0,91	0,09

Tabelle 15: Übersicht der MLPA-Werte sowie deren Differenz aus zwei unabhängigen ABI-Läufen derselben MLPA-Reaktion, für welche DNA der Zellmischung (Mosaik) aus 20% Zellen ohne *NF1* Deletion (Patient E) und 80% Zellen mit *NF1* Deletion (Patientin K) eingesetzt wurde. MLPA-Werte ≥ 0.1 sind gelb markiert. MLPA = Multiplex Ligation-dependant Probe Amplifikation, NF1 = Neurofibromatose Typ 1

MLPA-Sonde	Mosaik 20-80		Differenz
	MLPA-Wert 1.ABI-Lauf	MLPA-Wert 2.ABI-Lauf	
SUZ12PvorExon1	0,65	0,68	0,03
SUZ12PExon1	0,52	0,55	0,03
SUZ12Pintron4	0,63	0,65	0,02
ATAD5	0,71	0,73	0,02
CRLF3	0,64	0,65	0,01
CENTA2	0,64	0,66	0,02
RNF135	0,64	0,66	0,02
NF1Exon1	0,64	0,61	0,03
NF1Exon12B	0,56	0,57	0,01
NF1Exon23	0,7	0,69	0,01
NF1Exon40	0,55	0,56	0,01
NF1Exon48	0,64	0,64	0
UTP6	0,65	0,67	0,02
SUZ12	0,57	0,81	0,24
LRRC37B	1,03	1,03	0

Um die Ergebnisse der Doppelanalyse des PCR-Produkts in zwei unabhängigen ABI-Läufen zusammenzufassen, gibt folgende Tabelle 16 eine Übersicht der 15 MLPA-Sonden im Deletionsbereich mit ihrer jeweils größten Differenz des MLPA-Werts zwischen dem ersten und zweiten ABI-Lauf wieder. Dabei werden die beiden MLPA-Ergebnisse (Tabellen 13-15) der Patientin K (100% Zellen mit heterozygoter *NF1* Deletion), des Patienten E (100% Zellen ohne Deletion) sowie des Mosaiks 20%:80%, nicht-deletierter zu deletierter Zellen, zusammengefasst.

Tabelle 16: Übersicht der Differenz der MLPA-Werte der MLPA-Sonden aus zwei unabhängigen ABI-Läufen derselben MLPA-Reaktion, für welche DNA der Patientin K (100% Zellen mit *NF1* Deletion), des Patienten E (100% Zellen ohne *NF1* Deletion) und des Mosaiks 20%:80% eingesetzt wurde. Für die Zellmischung wurden 20% Zellen des Patienten E und 80% Zellen der Patientin K eingesetzt. MLPA-Sonden der zweiten Gruppe sind gelb markiert (Kapitel 3.2.2 - Tabelle 11). MLPA = Multiplex Ligation-dependant Probe Amplifikation, NF1 = Neurofibromatose Typ 1

Differenz der MLPA-Werte				
>0,1	0,07	0,06	0,05	0,04
SUZ12PExon1	CENTA2	SUZ12vorExon1	UTP6	SUZ12Pintron4
NF1Exon12B		NF1Exon1	CRLF3	ATAD5
SUZ12			NF1Exon40	RNF135
LRRC37B				NF1Exon1
				NF1Exon23
				NF1Exon48

Besonders auffällig sind die MLPA-Sonden SUZ12PExon1, NF1Exon12B, SUZ12 sowie LRRC37B, die MLPA-Wertdifferenzen >0.1 aufweisen.

Es zeigt sich, dass diese 4 MLPA-Sonden zur zweiten Gruppe der MLPA-Sonden gehören, welche bei der individuellen Betrachtung der MLPA-Werte einer Sonde bei unterschiedlichen Zellmischungen über 3 MLPA-Werte zeigte, die nicht im erwarteten Bereich lag. Zusätzlich zur zweiten Gruppe gehören zwei weitere MLPA-Sonden, UTP6 und NF1Exon23, welche bei den Doppelbestimmungen eines MLPA-Ansatzes bei unterschiedlichen ABI-Läufen MLPA-Wertedifferenzen bis zu 0,05 zeigen.

Fazit: Die Richtigkeit der Einteilung der 15 MLPA-Sonden im Deletionsbereich in 2 Gruppen scheint sich durch die Doppelanalyse des PCR-Produkts in 2 unabhängigen ABI-Läufen zu bestätigen, da 4 von 6 MLPA-Sonden der zweiten Gruppe MLPA-Wertdifferenzen $>0,1$ zeigten. Diese 4 MLPA-Sonden eignen sich nicht zur Beurteilung eines MLPA-Ergebnisses auf einen eventuell vorliegenden Mosaikstatus. Um einen eventuell vorliegenden Mosaikstatus zu erkennen, sollten die MLPA-Werte der MLPA-Sonden der ersten Gruppe analysiert werden (Kapitel 3.2.2, Tabelle 11), die reproduzierbare MLPA-Werte lieferten.

Desweiteren schließe ich aus meinen Beobachtungen, dass das zweifache Testen von MLPA-Reaktionen, die das erneute Einfrieren der MLPA-Reaktionen notwendig machen, da die ABI-Läufe nicht parallel auszuführen sind, zu Schwankungen der MLPA-Werte bzw. Messfehler führen können und daher vermieden werden sollte.

3.3 Auswirkungen der unterschiedlichen Mosaikanteile auf die MLPA Werte

Eine Aufgabenstellung war, zu untersuchen, wie sich unterschiedliche Mosaikanteile der Zellmischung auf die MLPA-Werte auswirken und ob es möglich ist, das MLPA-Ergebnis auf ein bestimmtes Mosaikverhältnis zurückzuführen. Zudem stellte sich die Frage, welches Zellmischungsverhältnis eines Mosaiks vorliegen muß, um sicher von Zellen mit 100% heterozygoter *NF1* Deletion unterscheidbar zu sein.

Im Folgenden sollen die MLPA-Werte der Patientin K mit den MLPA-Werten der Zellmischungen 20%:80% und 30%:70%, nicht-deletierter zu deletierter Zellen, verglichen werden. Zum Vergleich wurden die Werte der 9 MLPA-Sonden im Deletionsbereich genutzt, die sich bei der individuellen Betrachtung der einzelnen MLPA-Sonden als stabil und zuverlässig gezeigt haben (Kapitel 3.2.2, Tabelle 11).

Tabelle 17: Übersicht der MLPA-Werte der MLPA-Sonden der Patientin K (100% Zellen mit heterozygoter *NF1* Deletion) und der Zellmischung (Mosaik) aus 20% Zellen ohne *NF1* Deletion (Patient E) und 80% Zellen mit *NF1* Deletion (Patientin K) sowie der Differenz der beiden MLPA-Werte. MLPA = Multiplex Ligation- dependant Probe Amplifikation, *NF1* = Neurofibromatose Typ 1

Name der MLPA-Sonde	MLPA-Wert		Differenz
	Patientin K	Mosaik 20-80	
SUZ12PvorExon1	0,55	0,65	0,1
SUZ12PIntron4	0,57	0,63	0,06
ATAD5	0,62	0,71	0,09
CRLF3	0,55	0,64	0,09
CENTA2	0,66	0,64	0,02
RNF135	0,52	0,64	0,12
NF1Exon1	0,57	0,64	0,07
NF1Exon40	0,5	0,55	0,05
NF1Exon48	0,49	0,64	0,15

Alle MLPA-Werte dieser 9 betrachteten MLPA-Sonden im Deletionsbereich (mit Ausnahme der MLPA-Sonde CENTA2) zeigte eine Erhöhung des MLPA-Werts bei Zugabe von 20% nicht-deletierten Zellen. Diese Erhöhung des MLPA-Werts sollte theoretisch genau 0,1 betragen. Tatsächlich liegt die Erhöhung bei 6 der 9 MLPA-Sonden um die 0,1 (0,07-0,15). Daraus schließe ich, dass die MLPA-Methode den Anteil von 20% Zellen ohne Deletion (Mosaik 20%:80%) von 100% Zellen mit *NF1* Deletion (Patientin K) unterscheiden kann.

Fraglich bleibt allerdings, ob bei alleinigem Vorliegen des MLPA-Ergebnisses bei einem Mosaik 20%:80% die MLPA-Werte an sich zweifelsfrei als Zellmischung (Mosaik) erkannt werden. Theoretisch sollten alle MLPA-Werte der MLPA-Sonden im Deletionsbereich der Patientin K, entspricht 100% Zellen mit heterozygoter *NF1* Deletion dem Wert 0,5 entsprechen und die MLPA-Werte der Zellmischung aus 20% Zellen ohne *NF1* Deletion (Zellen des Patienten E) und 80% Zellen mit *NF1* Deletion (Zellen der Patientin K) einen Wert von 0,6 annehmen.

Im Ergebnis der MLPA zeigt sich aber eine gewisse Schwankungsbreite der MLPA-Werte bis zu 0,1 um den erwarteten MLPA-Wert herum. Die

Schwankungsbreite der einzelnen MLPA-Werte der Patientin K (0,49 bis 0,66) lässt sich nur schwer von der Schwankungsbreite des Mosaiks 20%:80% (0,55 bis 0,71) differenzieren. Um einen eventuell vorliegenden Mosaikstatus zu erkennen, kann daher der Mittelwert aller MLPA-Werte zu Hilfe genommen werden. Dieser beträgt bei den MLPA-Werten der Patientin K 0,56 und dem Mosaik 20%:80% 0,64. Wenn man bedenkt, dass einzelne MLPA-Werte des MLPA-Ergebnisses der Patientin K bis 0,6 schwanken, ist das MLPA-Ergebnis des Mosaiks 20%:80% mit einem Mittelwert von 0,64 wohl kaum einwandfrei als Mosaik zu erkennen.

Deutlicher jedoch wird die Unterscheidung im Vergleich der MLPA-Werte der Patientin K mit den MLPA-Werten der Zellmischung 30%:70% nicht-deletierter zu deletierter Zellen (Tabelle 18).

Tabelle 18: Übersicht der MLPA-Werte der MLPA-Sonden der Patientin K (100% Zellen mit heterozygoter *NF1* Deletion) und der Zellmischung (Mosaik) aus 30% Zellen ohne *NF1* Deletion (Patient E) und 70% Zellen mit *NF1* Deletion (Patientin K). MLPA = Multiplex Ligation- dependant Probe Amplifikation, NF1 = Neurofibromatose Typ 1

Name der MLPA-Sonde	MLPA-Wert	
	Patientin K	Mosaik 30-70
SUZ12PvorExon1	0,55	0,77
SUZ12PIntron4	0,57	0,73
ATAD5	0,62	0,73
CRLF3	0,55	0,69
CENTA2	0,66	0,76
RNF135	0,52	0,73
NF1Exon1	0,57	0,7
NF1Exon40	0,5	0,61
NF1Exon48	0,49	0,64

Theoretisch sollten alle MLPA-Werte der Zellmischung (Mosaik) 30%:70% einen Wert von 0,65 annehmen. Der tatsächliche Mittelwert der MLPA-Werte ergibt 0,71. Dass die MLPA-Werte des Mosaiks 30%:70% im Durchschnitt eher 0,7 entsprechen, liegt an den Ausgangs- MLPA-Werten der Patientin K, die in ihrer Gesamtheit über dem erwarteten Wert von 0,5 liegen.

Bei einem MLPA-Ergebnis mit vorherrschenden MLPA-Werten der als zuverlässig geltenden MLPA-Sonden von um die 0,7 lässt sich auf einen vorliegenden Mosaikstatus schließen. Allerdings bleibt es schwierig, anhand eines MLPA-Ergebnisses den vorliegenden Mosaikstatus in seinen prozentualen Anteilen an Zellen mit *NF1* Deletion und ohne Deletion exakt zu bestimmen, da die theoretisch erwarteten MLPA-Werte nur richtungsweisend sind. Da allein die

Schwankungsbreite der MLPA-Werte eines MLPA-Ergebnis bis zu 0,1 betragen kann, was theoretisch einen Unterschied von 20% Zellanteil ausmacht, bleibt der Rückschluss eines MLPA-Wertes auf ein bestimmtes Zellmischungsverhältnis problematisch.

Bei einem Anteil von über 30% Zellen ohne Deletion an einem Mosaik lassen sich die MLPA-Werte noch besser von den MLPA-Werten des Ergebnisses von 100% Zellen mit *NF1* Deletion unterscheiden. So weisen in meinem Experiment die Mittelwerte der Zellmischungen 40%:60% von 0,78 und 50%:50% von 0,82 deutlich auf das Vorliegen eines Mosaikstatus hin (Tabelle 21).

Tabelle 19: Übersicht der MLPA-Werte der MLPA-Sonden der Zellmischung (Mosaik) aus 10% Zellen ohne *NF1* Deletion (Patient E) und 90% Zellen mit *NF1* Deletion (Patientin K) sowie 40% Zellen ohne *NF1* Deletion (Patient E) und 60% Zellen mit *NF1* Deletion (Patientin K). MLPA = Multiplex Ligation- dependant Probe Amplifikation, *NF1* = Neurofibromatose Typ 1

Name der MLPA-Sonde	MLPA-Wert	
	Mosaik 10-90	Mosaik 40-60
SUZ12PvorExon1	0,64	0,81
SUZ12PIIntron4	0,66	0,77
ATAD5	0,6	0,83
CRLF3	0,67	0,73
CENTA2	0,53	0,81
RNF135	0,64	0,82
NF1Exon1	0,66	0,8
NF1Exon40	0,54	0,71
NF1Exon48	0,67	0,7

Tabelle 20: Übersicht der MLPA-Werte der MLPA-Sonden der Zellmischung (Mosaik) aus 50% Zellen ohne *NF1* Deletion (Patient E) und 50% Zellen mit *NF1* Deletion (Patientin K) sowie 100% Zellen des Patienten E (Zellen ohne *NF1* Deletion). MLPA = Multiplex Ligation- dependant Probe Amplifikation, *NF1* = Neurofibromatose Typ 1

Name der MLPA-Sonde	MLPA-Wert	
	Mosaik 50-50	Patient E
SUZ12PvorExon1	0,88	1,1
SUZ12PIIntron4	0,86	1,09
ATAD5	0,85	1,1
CRLF3	0,83	0,98
CENTA2	0,8	1,02
RNF135	0,85	1,09
NF1Exon1	0,77	0,96
NF1Exon40	0,75	1,07
NF1Exon48	0,81	0,98

Zusammenfassend gibt folgende Übersicht die erwarteten MLPA-Werte, die tatsächlich ermittelten Mittelwerte und die Streuungsbreite der MLPA-Werte aller untersuchten Zellen bzw Zellmischungen an.

Tabelle 21: Übersicht der Mittelwerte und der Streuung der MLPA-Werte der MLPA-Sonden im Deletionsbereich aller hergestellten Zellmischungen sowie der Patientin K (100% Zellen mit heterozygoter *NF1* Deletion) und des Patienten E (100% Zellen ohne *NF1* Deletion). Das Mosaik 10-90 setzt sich zusammen aus 10% ohne *NF1* Deletion (Patient E) und 90% Zellen mit heterozygoter *NF1* Deletion (Patientin K). MLPA = Multiplex Ligation- dependant Probe Amplifikation, *NF1* = Neurofibromatose Typ 1

Untersuchtes Material	Erwarteter MLPA-Wert	Mittelwert	Streuung
Patientin K	0,5	0,56	0,49 - 0,66
Mosaik 10-90	0,55	0,62	0,53 - 0,67
Mosaik 20-80	0,6	0,64	0,55 - 0,71
Mosaik 30-70	0,65	0,71	0,61 - 0,77
Mosaik 40-60	0,7	0,78	0,7 - 0,83
Mosaik 50-50	0,75	0,82	0,75 - 0,88
Patient E	1,0	1,04	0,96 - 1,1

Fazit: Abschließend ist zu sagen, dass die MLPA-Methode eine Veränderung der Zellanteile von 20% Zellen erkennt. Mit anderen Worten, 20% Zellen ohne *NF1* Deletion werden in einer Mischung mit 80% Zellen mit *NF1* Deletion durch die MLPA-Methode erkannt. Dies bestätigte der Vergleich des MLPA-Ergebnisses des Mosaiks 20%:80%, nicht-deletierter zu deletierter Zellen mit dem MLPA-Ergebnis der Patientin K (100% Zellen mit *NF1* Deletion), indem sich die meisten MLPA-Werte um den theoretisch erwarteten Wert von 0,1 erhöhten (Tabelle 17).

Allerdings ist die Schwankungsbreite der MLPA-Werte höher als erwartet und beträgt teilweise um 0,1. Daher kann eine sichere Unterscheidung eines Mosaiks von 20% Zellen ohne Deletion und 80% Zellen mit Deletion (MLPA-Werte um die 0,6) von 100% Zellen mit Deletion (MLPA-Werte um die 0,5) nicht unternommen werden.

Das Erkennen eines Mosaikstatus anhand des MLPA-Ergebnisses scheint ab einem Anteil von 40% Zellen ohne Deletion, welches theoretisch einen Mittelwert der MLPA-Werte von 0,7 zeigen sollte, möglich. In meinem Experiment zeigte sich schon bei der Zellmischung 30%:70% ein Mittelwert von 0,71, welches schon deutlich auf ein vorliegendes Mosaikstatus hinweist. Diese Tendenz zur relativ großen Schwankungsbreite der MLPA-Werte zeigt, dass der Rückschluss eines MLPA-Ergebnisses auf ein bestimmtes Zellmischungsverhältnis nicht möglich ist.

4 Diskussion

4.1 Erkennen eines Mosaiks aus nicht-deletierten Zellen und solchen mit einer *NF1* Deletion anhand des MLPA-Ergebnisses

Eine der Fragestellungen meiner Doktorarbeit war, zu überprüfen, wie effizient die MLPA-Technik Mosaik von Zellen mit Typ-I *NF1* Deletion und Zellen ohne Deletion nachweisen kann.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde DNA der Zellen eines Neurofibromatose Patienten ohne große Deletion (Patient E) und einer Neurofibromatose Patientin, die eine 1.4 Mb Typ-I Deletion in der *NF1*-Region aufweist (Patientin K) sowie 5 künstlich hergestellte Zellmischungen (Mosaik) dieser beiden Personen in mehreren MLPA-Tests untersucht und die resultierenden MLPA-Werte miteinander verglichen. Es wurde der MLPA-Kit P122 Version C1 angewendet, der insgesamt 28 MLPA-Sonden enthält. Davon binden 5 MLPA-Sonden innerhalb des *NF1*-Gens, 15 MLPA-Sonden binden zentromerisch und 8 MLPA-Sonden telomerisch des *NF1*-Gens (Abbildung 2 der Einleitung). Dabei galt besonderes Interesse den Werten der 15 MLPA-Sonden im Deletionsbereich der Patientin K mit der konstitutionellen *NF1* Deletion.

Es sollte untersucht werden, wie sich unterschiedliche Mosaikanteile der Zellmischung auf die MLPA-Werte auswirken und wie stark sich das Mosaikverhältnis in seinen Anteilen an Zellen ohne Deletion und mit *NF1* Deletion unterscheiden muß, um durch das Vergleichen der MLPA-Werte deutlich von 100% Zellen mit *NF1* Deletion unterscheidbar zu sein. Mit der Frage, ob es möglich ist, einen Mosaikanteil von nur 20% ohne *NF1* Deletion durch das MLPA-Verfahren zu detektieren, habe ich mich insbesondere beschäftigt. Zudem stellte sich die Frage, ob es möglich ist, das MLPA-Ergebnis auf ein bestimmtes Mosaikverhältnis zurückzuführen.

Durch Vergleichen der MLPA-Werte zweier MLPA-Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die MLPA-Methode eine Veränderung der Zellanteile von 20% Zellen erkennt. Dies zeigte sich in der Erhöhung der einzelnen MLPA-Werte der MLPA-Sonden im Deletionsbereich um die erwarteten 0,1 zwischen dem MLPA-Ergebnis des Mosaiks 20%:80%, nicht-deletierter zu deletierter Zellen und dem

MLPA-Ergebnis der Patientin K (entspricht 100% Zellen mit *NF1* Deletion) (Kapitel 3.3, Tabelle 17). Dabei wurden allerdings nur die 9 MLPA-Sonden zum Vergleich herangezogen, die sich in der individuellen Betrachtung der MLPA-Sonden als zuverlässig und stabil gezeigt haben (Kapitel.3.2.2, Tabelle 11). Dies bedeutet allerdings nicht, dass das alleinige MLPA-Ergebnis des Mosaiks 20%:80% als Mosaikstatus erkannt wird, da mit einer unerwartet großen Schwankungsbreite der MLPA-Werte zu rechnen ist. Treten solche Schwankungen auf, ist es schwierig, das MLPA-Ergebnis des Mosaiks 20%:80% als Mosaikstatus ganz zweifelsfrei zu erkennen.

Theoretisch sollten die MLPA-Werte aller MLPA-Sonden im Deletionsbereich der Patientin K den MLPA-Wert 0,5 ergeben und alle MLPA-Werte der Zellmischung aus 20% Zellen ohne *NF1* Deletion und 80% Zellen mit *NF1* Deletion einen Wert von 0,6 annehmen. Da sich im Ergebnis der MLPA eine unerwartet hohe Streuungsbreite der MLPA-Werte bis zu 0,1 um den erwarteten MLPA-Wert herum zeigte, ist es problematisch, das Mosaik 20%:80% mit einem, in meinem Experiment ermittelten Mittelwert von 0,64, von dem MLPA-Ergebnis der Patientin K (100% mit *NF1* Deletion) mit einem Mittelwert von 0,56 zweifelsfrei zu erkennen. Bei Verdacht auf ein Mosaik mit 20% normalen, nicht-deletierten Zellen müsste also unbedingt eine zweite, unabhängige Analyseverfahren herangezogen werden, um den Mosaikstatus zu verifizieren.

Das Mosaikverhältnis von 30%:70%, nicht-deletierter zu deletierter Zellen mit einem Mittelwert der MLPA-Werte von 0,71 war dagegen deutlich von den MLPA-Werten der Patientin K (100% Zellen mit Deletion) zu unterscheiden und wies dadurch auf ein Mosaikstatus hin. Allerdings gilt zu beachten, dass die in meinem Experiment ermittelten Mittelwerte höher lagen als theoretisch erwartet. Ein Mittelwert von 0,7 wird theoretisch erst ab einem Mosaik von 40% Zellen ohne *NF1* Deletion erwartet.

Auffallend ist, dass die MLPA-Werte der Patientin K, die in 100% der Zellen eine heterozygote *NF1* Deletion aufweist und somit MLPA-Werte von 0,5 im Deletionsbereich aufzeigen sollte, eine Streuung von 0,49 bis 0,66 zeigte. MLPA-Ergebnisse anderer Patienten mit *NF1* Deletion zeigten im Deletionsbereich ein homogeneres Ergebnis der MLPA-Werte um die 0,5. Eventuell spielte hierbei die DNA-Qualität der Patientin K eine Rolle. Dass allerdings die MLPA-Werte bei

Vorliegen eines Mosaikstatus eine größere Streubreite um 0,1 aufzeigen können, bestätigt sich in einer Studie, in der bei 3 NF1 Patienten mit bekanntem Mosaik eine MLPA-Analyse durchgeführt wurde (Wimmer et al., 2006). Alle 3 Patienten wiesen Multiexon Deletionen innerhalb des *NF1*-Gens auf. Um diese intragenetischen Deletionen zu erfassen wurde der MLPA Kit P081/P082 verwendet. Zwei der Patienten, deren Mittelwert der MLPA-Werte im Deletionsbereich 0,6 bzw. 0,65 ergab, zeigten eine Streuung der MLPA-Werte zwischen 0,5-0,7 bzw. 0,6-0,7 und wären wohl allein durch das MLPA-Ergebnis nicht als Mosaik erkannt worden. Zudem sind keine Angaben über die Anteile des Mosaikverhältnisses an Zellen mit *NF1* Deletion und Zellen ohne Deletion gemacht worden. Der dritte Patient, dessen Mittelwert der MLPA-Werte im Deletionsbereich 0,8 ergab, zeigte eine Streuung der MLPA-Werte zwischen 0,6-0,9. Der Mittelwert von 0,8 weist deutlich auf das Vorliegen eines Mosaikstatus hin. Es stellt sich die Frage, ob sich der Mittelwert von 0,8 auf ein bestimmtes Mosaikverhältnis zurückführen lässt. Theoretisch sollte ein MLPA-Wert von 0,8 einem Mosaikanteil von 40% Zellen mit *NF1* Deletion entsprechen. Die Untersuchung des Mosaikverhältnisses dieses Patienten ergab aber einen Anteil von 20,5 % Zellen mit *NF1* Deletion (Vandenbroucke et al., 2004). Allerdings wurde für die Untersuchung des Mosaikverhältnisses an peripheren Blutlymphozyten das Verfahren der real-time quantitativen PCR herangezogen. Bei dieser Art der Analyse ist keine Untersuchung von einzelnen Zellen möglich, was eventuell zu Ungenauigkeiten führt. Somit konnte in diesem Beispiel der Mittelwert der MLPA-Werte im Deletionsbereich von 0,8 nicht exakt auf ein theoretisch zu erwartendes Mosaikverhältnis von 40% Zellen mit *NF1* Deletion zurückgeführt werden. Es ist jedoch möglich, dass diese Abweichung durch Ungenauigkeiten bei der real-time quantitativen PCR bedingt ist.

In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass ein Mittelwert der MLPA-Werte von 0,8 auf ein Mosaik mit 60% Zellen ohne Deletion und 40% Zellen mit Deletion hinweist (Kozlowski et al., 2007). In dieser Studie wurden unter anderem 6 Tuberoöse Sklerose Patienten mit bekanntem Mosaikstatus mit Hilfe des MLPA Kit P046 untersucht. Alle diese Patienten wiesen Multiexon Deletionen des *TSC2*-Gens auf Chromosom 16 auf. Einer dieser Patienten zeigte einen Mittelwert der MLPA-Werte im Deletionsbereich von 0,84, welches dem Mosaikverhältnis von

34% Zellen mit Deletion entsprach. Die anderen Patienten zeigten Mittelwerte zwischen 0,66-0,74 und wiesen dementsprechend einen höheren Anteil von Zellen mit Deletion auf (Kozlowski et al., 2007).

Das Fazit, das ich aus meinen Untersuchungen ziehen muss, ist, dass ein exakter Rückschluß auf die prozentualen Anteile an Zellen mit *NF1* Deletion und Zellen ohne Deletion anhand der MLPA-Werte der Sonden im Deletionsbereich aufgrund der gegebenen Streubreite der MLPA-Werte bis 0,1 nicht möglich ist. Der Mittelwert der MLPA-Werte kann lediglich eine Tendenz vorgeben, der auf das Vorliegen eines Mosaikstatus hinweist. Diese Signalfunktion des MLPA-Tests wird ab einem Mittelwert der MLPA-Sonden im Deletionsbereich von 0,7 bis 0,8 deutlich, bei dem es sich theoretisch um ein Mosaik von 40% bzw. 60% Zellen ohne *NF1* Deletion handeln müßte. Ein Mosaikanteil von nur 30% Zellen ohne Deletion, der theoretisch einen mittleren MLPA-Wert von 0,65 ergibt, ist aufgrund der Streuung der MLPA-Werte unwahrscheinlich eindeutig als Mosaik zu erkennen. Genauso verhält es sich bei 20% Zellen ohne Deletion, der theoretisch einen mittleren MLPA-Wert von 0,6 ergibt.

4.2 Stabilität und Zuverlässigkeit der MLPA-Werte der einzelnen MLPA-Sonden

Eine weitere Aufgabenstellung war, das Verhalten der einzelnen MLPA-Sonden näher zu untersuchen, um die Stabilität und Zuverlässigkeit der MLPA-Werte untereinander zu vergleichen.

Dazu wurden alle resultierenden MLPA-Werte des MLPA-Ergebnisses der Patientin K (Zellen mit heterozygoter *NF1* Deletion) und des Patienten E (Zellen ohne Deletion) sowie aller 5 Zellmischungen im Ergebnisteil als graphische Darstellung der einzelnen MLPA-Sonde abgebildet. Im Idealfall sollte eine Linearität zwischen Peakhöhe bzw. MLPA-Wert und Mosaikverhältnis bestehen (Abbildung 3 der Einleitung).

MLPA-Sonden, deren Peakhöhe bzw. MLPA-Wert bei unterschiedlichen Mosaikverhältnissen der erwarteten Peakhöhe entsprachen und der erwarteten Linearität folgten, zeigten dadurch eine hohe Zuverlässigkeit auf und eignen sich im Besonderen dafür, ein bestehendes Mosaik zu detektieren (Kapitel 3.2).

Die zu ermittelnden MLPA-Werte der Mosaik sollten innerhalb eines erwarteten Bereichs liegen, der durch die MLPA-Werte der Patientin K und des Patienten E vorgegeben wurde und die gerätespezifische Schwankung berücksichtigte. Auch die Schwankung der einzelnen MLPA-Werte der Mosaik, die durch den Herstellungsprozess auftreten konnte, wurde berücksichtigt. Um keinen weiteren Schwankungen unterlegen zu sein, wurde die DNA der Patientin K und des Patienten E sowie aller 5 Mosaik innerhalb eines MLPA-Ansatzes amplifiziert und innerhalb eines ABI-Laufs ausgewertet (Kapitel 3.2.2, Tabelle 12 und Abbildungen 13-27)

Aufgrund der Lokalisation der MLPA-Werte der Mosaik innerhalb oder außerhalb des erwarteten Bereichs in den graphischen Darstellungen der MLPA-Sonden konnte eine Einteilung der MLPA-Sonden in 2 Gruppen vorgenommen werden. In der ersten Gruppe mit 9 der 15 MLPA-Sonden im Deletionsbereich befinden sich mindestens 3 der 5 möglichen MLPA-Werte der Mosaik innerhalb des erwarteten Bereichs. Die zweite Gruppe mit 6 der 15 MLPA-Sonden zeigt über 3 MLPA-Werte der Mosaik außerhalb des erwarteten Bereichs (3.2.2, Tabelle 11). Diese 6 MLPA-Sonden der 15 MLPA-Sonden im Deletionsbereich, die im MLPA-Ergebnis der 5 Mosaik teilweise unerwartet hohe oder niedrige MLPA-Werte zeigten, sind als unzuverlässig und instabil anzusehen.

Die Gründe dafür sind in zusätzlichen sondenspezifischen Schwankungen zu suchen. Da die einzelnen Reaktionsschritte des MLPA-Verfahrens selbst hinsichtlich möglicher Fehlerquellen experimentell nicht zu differenzieren sind, konnte daher, um zusätzliche sondenspezifische Schwankungen zu untersuchen, nur der letzte Schritt, die Analyse der PCR-Produkte im ABI-Analyser wiederholt werden. Dieser Schritt wird ABI-Lauf genannt. Da nur ein Anteil der MLPA-Reaktionen für die Analyse im ABI-Analyser gebraucht werden, konnten die Reaktionen der Patientin K, des Patienten E und des Mosaiks 20%:80% für Doppelbestimmungen in aufeinanderfolgenden ABI-Läufen eingesetzt werden (Kapitel 3.2.3, Tabellen 13-15). Die MLPA-Werte aus beiden ABI-Läufen wurden miteinander verglichen, wobei eine ABI-Lauf interne Schwankung von 0,02 tolerabel ist, wie meine Vorversuche zeigen (Kapitel 3.1.2). Das Ergebnis der Doppelanalyse desselben MLPA-Ansatzes in unterschiedlichen ABI-Läufen zeigte bei 4 MLPA-Sonden sehr hohe Differenzen der MLPA-Werte $>0,1$.

Diese 4 MLPA-Sonden SUZ12PExon1, NF1Exon12B, SUZ12 sowie LRRC37B gehören alle zur zweiten Gruppe, die sich schon bei der individuellen Betrachtung der einzelnen MLPA-Sonden als unzuverlässig gezeigt haben. Aber auch MLPA-Sonden der ersten Gruppe erreichten eine MLPA-Wertdifferenz bis zu 0,07 und zeigen damit die mangelnde Reproduzierbarkeit der MLPA-Werte auf (Kapitel 3.2.3, Tabelle 16).

Es ist erstaunlich, dass allein dieser letzte Schritt, die Analyse im ABI-Analyser eine starke Differenz der MLPA-Werte hervorrufen kann. Es ist schwer herauszufinden, wie es zu diesen großen Differenzen kommen kann. Die eigentliche MLPA-Reaktion war schon abgelaufen. Eine Degradation der PCR-Produkte aufgrund einer Kontamination mit Nukleasen kann ausgeschlossen werden, da dies alle MLPA-Proben betreffen müsste und eine Minderung des MLPA-Werts zur Folge hat. Teilweise haben sich jedoch MLPA-Werte im zweiten ABI-Lauf erhöht (Kapitel 3.2.3, Tabellen 13-15). Im ABI-Analyser findet die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte statt, eine laserinduzierte Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs sowie die Signalintensitätsmessung der Banden. Störungen in all diesen Schritten sowie Schwankungen in der Interaktion des Fluoreszenzfarbstoffs mit der MLPA-Sonde sind denkbar.

Auch zuvor in anderen MLPA-Untersuchungen zeigten sich einzelne unerwartete MLPA-Werte (Kapitel 3.1.3.2, Tabelle 9). Im Ergebnis einer MLPA Reaktion, bei der die Reproduzierbarkeit der Zellmischung (Mosaik) 10% Zellen ohne *NF1* Deletion und 90% Zellen mit *NF1* Deletion untersucht wurde, zeigten sich 4 MLPA-Sonden als auffällig. Im Versuch wurde die Zellmischung 10%:90% zweimal hergestellt und die sich ergebenden MLPA-Werte beider MLPA-Ergebnisse miteinander verglichen. Aufgrund der gerätespezifischen Schwankung des ABI-Analyser und der gegebenen Schwankung bei der Herstellung des Mosaiks war eine Differenz der MLPA-Werte bis zu 0,04 tolerabel (Kapitel 3.1.3). Vier MLPA-Sonden, NF1Exon40, NF1Exon12B, CEN2A2 und SUZ12PIntron4 zeigten jedoch eine größere Differenz der MLPA-Werte um 0,1. Nur eine (NF1Exon12B) dieser 4 MLPA-Sonden gehört nach dem Ergebnis der individuellen Betrachtung der einzelnen MLPA-Sonden zur zweiten Gruppe, die als unzuverlässig gilt.

Überraschend war, dass die 3 MLPA-Sonden der ersten Gruppe (NF1Exon40, CEN2A2 und SUZ12PIntron4) MLPA-Wertdifferenzen bis 0,12 zeigen. Dies

bestätigt jedoch die Beobachtung aus dem Versuch der Doppelanalyse der PCR-Produkte, dass MLPA-Werte der meisten MLPA-Sonden nicht exakt zu reproduzieren sind und eventuell jede Sonde zu „Ausreißern“ neigen kann.

Die Unzuverlässigkeit der MLPA-Werte mancher MLPA-Sonden bestätigt eine Studie, die 95 NF1 Patienten mit dem MLPA-Verfahren analysierte. Sie gibt an, im Deletionsbereich der *NF1*-Region öfters einzelne MLPA-Werte bis zu 0,8, die auf einen Mosaikstatus hinweisen, erzielt zu haben, ohne diese durch real-time PCR bestätigen zu können (Wimmer et al., 2006). Vor allem die MLPA-Werte der MLPA-Sonden RNF135 und NF1Exon23 des MLPA-Kits P122 Version A1 werden als unzuverlässig angegeben. Ein Grund, weshalb MLPA-Sonden unzuverlässige MLPA-Werte liefern, könnte an der Lokalisation der Bindungsstelle im Genom erklärt werden. So zeigt sich, dass die MLPA-Sonde RNF135 in einer repetitiven L1 Sequenz bindet. (Wimmer et al., 2006). Möglicherweise ist die Effektivität der Hybridisierung mancher MLPA-Proben in der DNA der zu untersuchenden Patienten beeinträchtigt.

In der Studie von Wimmer et al. (2006) wurde der MLPA-Kit P122 Version A1 benutzt, allerdings sind die MLPA-Sonden RNF135 und NF1Exon23 auch in Version C1, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, unverändert. Auch in meinen MLPA-Untersuchungen zeigte sich die MLPA Sonde NF1Exon23 als unzuverlässig, die RNF 135 zeigte jedoch reproduzierbare zuverlässige MLPA-Werte an.

In dieser Studie von Wimmer et al. (2006) wurde außerdem der Einfluß von sogenannten minor-lesion Mutationen innerhalb der Bindungsstelle der MLPA-Sonden auf den MLPA-Wert untersucht. Zu den minor-lesion Mutationen gehören Single-Nukleotid-Polymorphismen sowie Deletionen einzelner Basenpaare im Bereich der Bindungsstellen der MLPA-Sonden im Genom der Probanden.

Dazu wurden 7 NF1 Patienten mit bekannten minor-lesion Mutationen innerhalb des *NF1*-Gens mit dem MLPA Kit P081/082 untersucht. Die bekannten Mutationen innerhalb der Bindungsstelle der MLPA-Sonde Exon10B, Exon2 und Exon3, die sich nahe der Bindungsstelle der Ligase befanden, hatten dabei den größten Effekt auf den MLPA-Wert. Der MLPA-Wert betrug teilweise 0,6 oder 0,5 anstatt der erwarteten 1,0. Dies zeigt, dass eine einzelne Punktmutation die Hybridisierung der MLPA-Sonde verhindern kann und somit eine Deletion

vortäuscht bzw. zu unzuverlässigen MLPA-Werten führen kann. Mutationen sowie die Deletion von bis zu 4 Basenpaaren weiter entfernt der Bindungsstelle der Ligase zeigten keinerlei Einfluß auf den MLPA-Wert (Wimmer et al., 2006).

Eine weitere Studie, die den MLPA-Kit P081/082 benutzte, um intragenetische Single- und Multiexon Deletionen an 63 *NF1* Patienten zu untersuchen, bestätigt das Auftreten falsch positiver MLPA-Werte für Deletionen innerhalb des *NF1*-Gens (DeLuca et al., 2007). Trotz Vorhandensein beider Kopien der Bindungsstelle ergaben sich bei der MLPA-Sonde Exon13A, Exon18 und Exon27B MLPA-Werte um 0,7. Auch hier wurden Single-Nukleotid-Polymorphismen innerhalb der Bindungsstelle der MLPA-Sonden für die unzuverlässigen MLPA-Werte verantwortlich gemacht.

Fazit: In meinen Ergebnissen zeigten sich die MLPA-Sonden SUZ12PExon1, NF1Exon12B, NF1Exon23, UTP6, SUZ12 und LRRC37B als besonders unzuverlässig, da sie bei der individuellen Betrachtung der einzelnen MLPA-Sonde unerwartet hohe oder niedrige MLPA-Werte zeigten. Die 9 anderen MLPA-Sonden im Deletionsbereich des MLPA-Kits P122 Version C1, SUZ12PvorExon1, SUZ12PItron4, ATAD5, CRLF3, CENTA2, RNF135, NF1 Exon1, NF1 Exon40, NF1 Exon48 lieferten stabile MLPA-Werte und können zur Abschätzung eines eventuell vorliegenden Mosaikstatus herangezogen werden

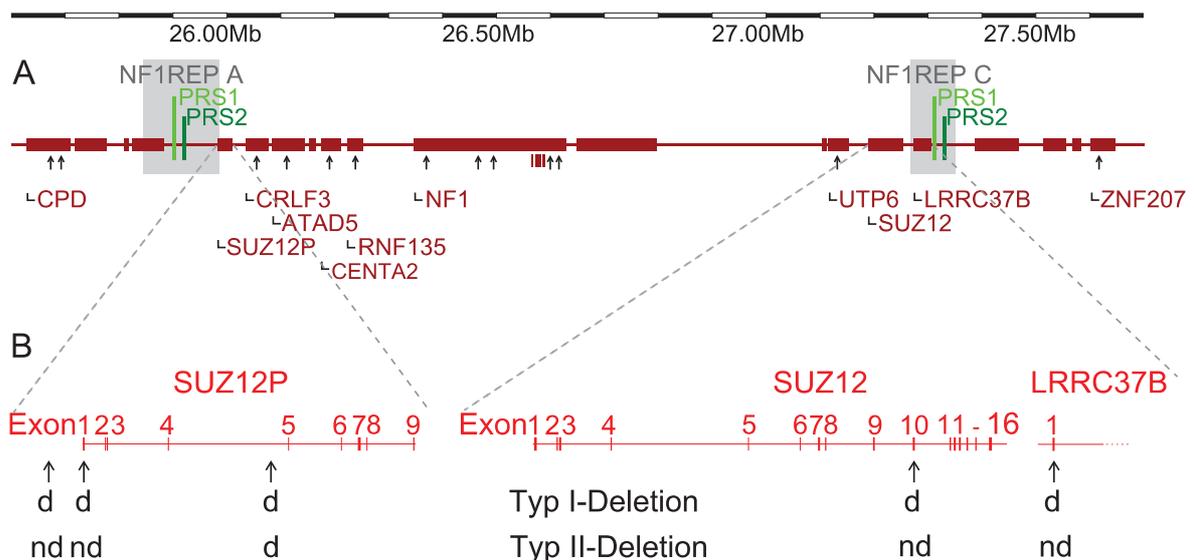
4.3 Unterscheidung der verschiedenen Deletionstypen durch den MLPA-Kit P122 Version C1

4.3.1 Unterscheidung der Typ-I und Typ-II Deletion

Eine weitere Fragestellung meiner Doktorarbeit war, inwieweit der MLPA-Kit P122 Version C1 zwischen den beiden häufigsten, rekurrenten *NF1* Deletionen vom Typ-I und Typ-II unterscheiden kann.

Die Typ-I Mikrodeletion umfasst 1.4 Mb und führt zu einem Verlust von 14 Genen, einschließlich dem *NF1*-Gen. Verursacht werden Typ-I Deletionen durch nicht-allelische homologe Rekombination (NAHR) zwischen sogenannten low-copy-repeats (*NF1*-REP A und C), die die *NF1*-Genregion flankieren (López-Correa et al. 2001; Dorschner et al. 2000; Jenne et al. 2001). In den *NF1*-REPs konnten 2

hotspot-Regionen, die paralogen Rekombinationsstellen PRS1 und PRS2 identifiziert werden, in denen bevorzugt NAHR stattfinden (Jenne et al. 2001; Lopéz-Correa et al. 2001; Forbes et al., 2004). Die Typ-II Mikrodeletion umfaßt 1.2 Mb und führt zum Verlust von 13 Genen, einschließlich dem *NF1*-Gen. Im Gegensatz zu den Typ-I Deletionen ist das *LRRC37B*-Gen von den Typ-II Deletionen ausgeschlossen. Verursacht werden Typ-II Deletionen durch nicht-allelische homologe Rekombination (NAHR) innerhalb des *SUZ12*-Gens und dessen Pseudogen *SUZ12P*, die beide nahe der NF1-REPs liegen. In der folgenden Abbildung 28 sind alle Gene der *NF1*-Region aufgeführt. Nur die Gene sind namentlich gekennzeichnet, an denen eine oder mehrere MLPA-Sonden des MLPA-Kits P122 Version C1 binden können. Zusätzlich ist die exakte Position der MLPA-Sonden innerhalb des *SUZ12P*-Pseudogens, *SUZ12*-Gens und *LRRC37B*-Gens hervorgehoben.



A Position der Gene der *NF1*-Region (dunkelrot) mit Position der MLPA-Sonden (†), sowie Position der paralogen Rekombinationsstellen PRS1 und PRS2 (grün) innerhalb der low-copy-repeats NF1REP A und NF1REP C (grau), Mb = Megabasen

B Ausschnitt des *SUZ12P*-Pseudogens, *SUZ12*-Gens und *LRRC37B*-Gens (hellrot), sowie Zustand der MLPA-Sonden bei Typ-I und Typ-II Deletion, d = deletiert, nd = nicht deletiert
MLPA = Multiplex Ligation- dependent Probe Amplifikation

Abbildung 28: Schematische Darstellung der *NF1*-Region, NF1 = Neurofibromatose Typ 1
Eine Unterscheidung zwischen Typ-I und Typ-II Deletion mit Hilfe des MLPA-Verfahrens entscheidet sich an den 3 MLPA-Sonden des *SUZ12P*-Pseudogens zu Beginn der *NF1*-Region und der MLPA-Sonde des *LRRC37B*-Gens am Ende der *NF1*-Region. Bisher konnten Typ-I und Typ-II Deletionen nur anhand der MLPA-Sonde des *LRRC37B*-Gens unterschieden werden, da die 3 MLPA-Sonden des

SUZ12P-Pseudogens erst seit kurzem in Version C1 des MLPA-Kits P122 zur Verfügung stehen.

Das *LRRC37B*-Gen ist bei Typ-I Deletion deletiert, wenn sich die Bruchstelle distal des *LRRC37B*-Gens innerhalb der paralogen Rekombinationsstellen PRS1 oder PRS2 befindet. Bei Typ-II Deletion, bei denen die Bruchstelle innerhalb des *SUZ12*-Gens zu liegen kommt, bleibt das *LRRC37B*-Gen vorhanden. Dadurch ist eine Unterscheidung durch den MLPA-Kit P122 Version C1 möglich.

Bisher konnte bei Typ-II Deletion keine hotspot-Region der Bruchstelle innerhalb des *SUZ12*-Gens auffindig gemacht werden. Allerdings konnte eine Anhäufung der Bruchstellen zwischen Intron 4 und Intron 5 aufgezeigt werden (Kehrer-Sawatzki et al., 2004; Steinmann et al. 2007).

In diesem Fall sollte bei Vorliegen einer Typ-II Deletion die MLPA-Sonde *SUZ12*, die auf Exon 10 bindet sowie die MLPA-Sonde *LRRC37B* auf Exon 1 binden können und damit einen nicht-deletierten Zustand anzeigen (Abbildung 28).

Diese Überlegung bestätigt eine Studie, in der DNA von 6 NF1 Patienten mit Typ-II Deletion einer MLPA-Analyse mit dem MLPA-Kit P122 Version A1 unterzogen wurde (Wimmer et al., 2006). Die Typ-II Deletionen waren zuvor durch verschiedene alternative Verfahren der Deletionsdiagnostik bestätigt worden. Das MLPA-Ergebnis von 5 dieser Patienten zeigte das erwartete Vorhandensein beider Kopien der MLPA-Sonde *LRRC37B* und *SUZ12*.

Ein Patient zeigte zwar das Vorhandensein beider Kopien der MLPA-Sonde *LRRC37B*, aber eine heterozygote Deletion der MLPA-Sonde *SUZ12*. Wie anschließende Diagnostik zeigte, befand sich die distale Bruchstelle der Deletion dieses Patienten auf Intron 10 des *SUZ12*-Gens, so daß die *SUZ12* MLPA-Sonde, die auf Exon 10 bindet, nicht binden konnte. Dadurch zeigte sich ein atypisches MLPA-Ergebnis einer Typ-II Deletion. Aufgrund des Vorhandenseins beider Kopien des *LRRC37B*-Gens war das MLPA-Ergebnis dennoch von einer Typ-I Deletion zu unterscheiden (Wimmer et al., 2006).

Auch im proximalen Bereich der *NF1*-Region ist durch den MLPA-Kit P122 Version C1 eine klare Unterscheidung zwischen Typ-I und Typ-II Deletion möglich geworden. Die 3 MLPA-Sonden des *SUZ12P*-Pseudogens binden vor Exon 1, auf Exon 1 und auf Intron 4. Sollte sich bei Vorliegen einer Typ-II Deletion die Bruchstelle zwischen Intron 4 und Intron 5 befinden, müssten die MLPA-Sonden

vor Exon 1 und auf Exon 1 einen nicht-deletierten Zustand anzeigen, die MLPA-Sonde auf Intron 4 aber, da sie nicht binden kann, einen deletierten Zustand anzeigen.

Bei einer Typ-I Deletion sollte das MLPA-Ergebnis bei allen 3 MLPA-Sonden des *SUZ12P*-Pseudogens einen deletierten Zustand anzeigen, da die Bruchstelle proximal des *SUZ12P* in der NF1 REP A Region liegt (Abbildung 28).

Um diese Überlegungen zu bestätigen, ist in folgender Tabelle 22 das MLPA-Ergebnis der MLPA-Sonden im Deletionsbereich der NF1 Patientin K, die eine heterozygote Typ-I Deletion aufweist sowie das MLPA-Ergebnis der NF1 Patientin D, die eine heterozygote Typ-II Deletion aufweist, gegenübergestellt. Das MLPA-Ergebnis zeigt die MLPA-Werte der 15 MLPA-Sonden im Deletionsbereich der Typ-I Deletion sowie der angrenzenden *CPD*- und *ZNF107*-Gene (Abbildung 28).

Tabelle 22: MLPA-Ergebnis der MLPA-Sonden im Deletionsbereich der Patientin K (100% Zellen mit *NF1* Typ-I Deletion) und der Patientin D (100% Zellen mit *NF1* Typ-II Deletion). MLPA-Werte, die einen heterozygot deletierten Zustand (= MLPA-Wert um 0,5) anzeigen sind gelb markiert. MLPA = Multiplex Ligation- dependant Probe Amplifikation, NF1 = Neurofibromatose Typ 1

Name der MLPA-Sonde	Patientin K	Patientin D
CPD Exon11	1	0,94
CPD Exon20	1,06	0,94
SUZ12P vorExon1	0,55	0,98
SUZ12P Exon1	0,52	1,03
SUZ12P Intron4	0,57	0,53
ATAD5	0,62	0,52
CRLF3	0,55	0,57
CENTA2	0,66	0,56
RNF135	0,52	0,56
NF1 Exon1	0,57	0,53
NF1 Exon12B	0,65	0,5
NF1 Exon23	0,52	0,54
NF1 Exon40	0,5	0,53
NF1 Exon48	0,49	0,55
UTP6	0,66	0,52
SUZ12	0,41	1,08
LRRC37B	0,6	1,03
ZNF107	1,02	0,94

4.3.2 Unterscheidung der Typ-I Deletion und atypischen Deletion

Eine weitere Frage ist, ob der MLPA-Kit P122 Version C1 zwischen Typ-I Deletion und atypischer Deletion unterscheiden kann. Atypische Deletionen weisen keine rekurrenten Bruchpunkte auf und sind zumeist größer als 1.4 Mb. Am MLPA-Kit P122 Version C1 gilt zu bemängeln, dass zu Beginn der *NF1*-Region zwischen der ersten MLPA-Sonde des *SUZ12P*-Pseudogens und der zweiten Sonde des *CPD*-Gens auf einer Strecke von ca 269 Kb keine MLPA-Sonde bindet. Auf dieser Strecke liegen 3 Gene, die Gene *GOSR1*, *TBC1D29* und *LRRC37B2*.

Auch am Ende der *NF1*-Region liegen zwischen dem *LRRC37B*- und *ZNF207*-Gen 3 weitere Gene auf einer Strecke von 345 Kb, auf denen keine MLPA-Sonde bindet. Diese 3 Gene heißen *RHOT1*, *RHBDL3* und *C17orf75*.

Sollte sich in diesen Bereichen die Bruchstelle einer atypischen Deletion befinden, wäre diese nicht von einer Typ-I Deletion zu unterscheiden. Daher ist es wünschenswert, zusätzliche MLPA-Sonden für diese Bereiche herzustellen, um atypische Deletionen von Typ-I Deletionen unterscheidbar zu machen.

5 Zusammenfassung

Die Neurofibromatose Typ 1 (NF1) ist eine hereditäre Erkrankung, bei der sich Chromosomenveränderungen auf dem Chromosom 17q11.2 finden lassen. 5% der NF1 Patienten weisen große Deletionen der *NF1*-Genregion auf, die weiterhin zu Typ-I und Typ-II Deletion bzw. atypischer Deletion differenziert werden. Auch Mosaikbildungen kommen vor. Patienten mit einem Mosaikstatus weisen neben Zellen mit *NF1* Deletion auch gesunde, nicht-deletierte Zellen auf. Die Aufgabenstellung meiner Doktorarbeit war es, mit Hilfe des Verfahrens der MLPA (Multiplex Ligation- dependant Probe Amplifikation) künstlich hergestellte Mosaike aus Zellen mit *NF1* Deletion und Zellen ohne Deletion zu untersuchen und herauszufinden, wie sensitiv die MLPA-Methode unterschiedliche Mosaike unterscheiden kann. Die künstlich hergestellten Zellmischungen (Mosaike) setzten sich aus den Zellen einer NF1 Patientin, die eine heterozygote Typ-I *NF1* Deletion aufweist und den Zellen eines NF1 Patienten ohne große *NF1* Deletion zusammen. Zur Gewinnung der DNA (Desoxyribonukleinsäure) wurden EBV-immortalisierte (Epstein Barr Virus) Blutlymphozyten verwendet. Für meine Untersuchungen verwendete ich den MLPA-Kit P122 Version C1, der 28 MLPA-Sonden enthält, die in der *NF1*-Region binden. Auch das Verhalten der einzelnen MLPA-Sonden sollte näher untersucht werden, um die Zuverlässigkeit der sich ergebenden MLPA-Werte der MLPA-Sonden besser einschätzen zu können. Zudem war es meine Aufgabe, generell versuchsinterne Schwankungen der MLPA-Resultate zu überprüfen und zu ermitteln, inwieweit der MLPA-Kit P122 Version C1 zwischen den beiden häufigsten, rekurrenten *NF1* Deletionen vom Typ-I und Typ-II sowie der atypischen Deletion unterscheiden kann.

Aufgrund meiner MLPA-Ergebnisse konnten aus den 15 MLPA-Sonden im Deletionsbereich der Typ-I *NF1* Deletion 6 MLPA-Sonden ermittelt werden, die in den Mosaikuntersuchungen durch verstärkte Schwankungen wiederholt instabile und damit unzuverlässige MLPA-Werte lieferten. Diese 6 MLPA-Sonden eignen sich daher nicht zur Beurteilung eines MLPA-Ergebnisses auf das eventuelle Vorliegen eines Mosaikstatus. Gründe für die verstärkten Schwankungen der MLPA-Werte können durch sondenspezifische Schwankungen, aber auch der Lokalisation der Bindungsstelle der MLPA-Sonde im Genom erklärt werden. So können minor-lesion Mutationen innerhalb der Bindungsstelle, dazu gehören

Single-Nukleotid- Polymorphismen sowie Deletionen einzelner Basenpaare eine Hybridisierung der MLPA-Sonde verhindern.

Durch die Mosaik-Analysen konnte ich zeigen, dass die MLPA-Methode sensitiv genug ist, eine Veränderung der Zellanteile des Mosaiks von 20% Zellen ohne *NF1* Deletion zu 100% Zellen mit *NF1* Deletion im MLPA-Ergebnis anzuzeigen. Allerdings bedeutet dies nicht, dass das MLPA-Ergebnis des Mosaiks 20%:80% zweifelsfrei als Mosaikstatus erkannt wird. Auch eine exakte Rückführung auf die Zellanteile eines Mosaiks aufgrund eines MLPA-Ergebnisses ist nicht möglich. Der Grund dafür liegt in der unerwartet hohen Schwankungsbreite der MLPA-Werte des MLPA-Ergebnisses bis 0,1. Der Mittelwert der MLPA-Werte kann lediglich einen Hinweis liefern, der auf das Vorliegen eines Mosaikstatus hinweist. Dies wird ab einem Mittelwert der MLPA-Sonden im Deletionsbereich von 0,7 bis 0,8 deutlich, bei dem es sich theoretisch um ein Mosaik von 40% bzw. 60% Zellen ohne *NF1* Deletion handeln müsste. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der MLPA-Kit P122 Version C1 im Gegensatz zur Version B1 noch besser zwischen der Typ-I und Typ-II Mikrodeletion unterscheiden kann, da durch die Neuaufnahme der 3 MLPA-Sonden, die im *SUZ12P*-Pseudogen (*SUZ12* = Homo sapiens suppressor of zeste 12 homolog) binden, nun auch eine Unterscheidung im proximalen Bereich des Deletionsbereichs der Typ-I und Typ-II Deletion möglich geworden ist. Eine Unterscheidung zwischen Typ-I und atypischer Deletion bleibt allerdings weiterhin problematisch, da an den Flanken des Typ-I Deletionsbereichs auf relativ großer Strecke (~300 Kb) keine MLPA-Sonde bindet, in der sich aber die Bruchstelle der atypischen Deletion befinden könnte. Mit der Version C1 des MLPA-Kits P122 ist es also nicht möglich, zu beurteilen, ob die Gene, die die *NF1*-REPs (low-copy Repeat Regionen der *NF1*-Region) flankieren auch von der Deletion betroffen sind oder nicht.

6 Literaturverzeichnis

1. Akesson HO, Axelsson R, Samuelsson B.
Neurofibromatosis in monozygotic twins: a case report. Acta Genet Med Gemellol. 32: 245-249 (1983)
2. Ars E, Serra E, García J, Kruyer H, Gaona A, Lázaro C, Estivill X.
Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. Hum Mol Genet. 9: 237-247 (2000)
3. Bader JL, Miller RW.
Neurofibromatosis and childhood leukaemia. J Pediatr. 92: 925-929 (1978)
4. Borberg A.
Clinical and genetic investigations into tuberous sclerosis and Recklinghausen's neurofibromatosis; contribution to elucidation of interrelationship and eugenics of the syndromes. Acta Psychiatr Neurol Scand Suppl. 71: 1-239 (1951)
5. Cnossen MH, van der Est MN, Breuning MH, van Asperen CJ, Breslau-Siderius EJ, an der Ploeg AT, de Goede-Bolder A, van den Ouweland AM, Halley DJ, Niermeijer MF.
Deletions spanning the neurofibromatosis type 1 gene: implications for genotype-phenotype correlations in neurofibromatosis type 1? Hum Mutat. 9: 458-464 (1997)
6. De Luca A, Bottillo I, Dasdia MC, Morella A, Lanari V, Bernardini L, Divona L, Giustini S, Sinibaldi L, Novelli A, Torrente I, Schirinzi A, Dallapiccola B.
Deletions of NF1 gene and exons detected by multiplex ligation-dependent probe amplification. J Med Genet. 44: 800-808 (2007)

7. De Raedt T, Brems H, Wolkenstein P, Vidaud D, Pilotti S, Perrone F, Mautner V, Frahm S, Sciot R, Legius E.
Elevated risk for MPNST in NF1 microdeletion patients. Am J Hum Genet. 72: 1288-1292 (2003)
8. De Raedt T, Stephens M, Heyns I, Brems H, Thijs D, Messiaen L, Stephens K, Lazaro C, Wimmer K, Kehrer-Sawatzki H, Vidaud D, Kluwe L, Marynen P, Legius E.
Conservation of hotspots for recombination in low-copy repeats associated with the NF1 microdeletion. Nat Genet. 38: 1419-1423 (2006)
9. Descheemaeker MJ, Roelandts K, De Raedt T, Brems H, Fryns JP, Legius E.
Intelligence in individuals with a neurofibromatosis type 1 microdeletion. Am J Med Genet A. 131: 325-326 (2004)
10. Dorschner MO, Sybert VP, Weaver M, Pletcher BA, Stephens K.
NF1 microdeletion breakpoints are clustered at flanking repetitive sequences. Hum Mol Genet. 9: 35-46 (2000)
11. Ducatman BS, Scheithauer BW, Piepgras DG, Reiman HM, Ilstrup DM.
Malignant peripheral nerve sheath tumors. Cancer. 57: 2006-2021 (1986)
12. Fahsold R, Hoffmeyer S, Mischung C, Gille C, Ehlers C, Kucukceylan N, Abdel-Nour, Gewies A, Peters H, Kaufmann D, Buske A, Tinschert S, Nürnberg P.
Minor Lesion Mutational Spectrum of the Entire NF1 Gene Does Not Explain Its High Mutability but Points to a Functional Domain Upstream of the GAP-Related Domain. Am J Hum Genet. 66: 790-818 (2000)
13. Forbes SH, Dorschner MO, Le R, Stephens K.
Genomic context of paralogous recombination hotspots mediating recurrent NF1 region microdeletion. Genes Chromosomes Cancer. 41: 12-25 (2004)

14. Friedman JM.
Epidemiology of neurofibromatosis type 1. Am J Med Genet. 89: 1-6 (1999)
15. Huson SM, Harper PS, Compston DAS.
Von Recklinghausen neurofibromatosis: A clinical and population study in South East Wales. Brain. 111: 1355-1381 (1988)
16. Huson SM, Compston DA, Clark P, Harper PS.
A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in south east Wales. I Prevalence, fitness, mutation rate, and effect of parental transmission on severity. J Med Genet. 26: 704-711 (1989)
17. Jenne DE, Tinschert S, Reimann H, Lasinger W, Thiel G, Hameister H, Kehrer-Sawatzki H.
Molecular characterization and gene content of breakpoint boundaries in patients with neurofibromatosis type 1 with 17q11.2 microdeletions. Am J Hum Genet. 69: 516-527 (2001)
18. Kehrer-Sawatzki H, Kluwe L, Sandig C, Kohn M, Wimmer K, Krammer U, Peyrl A, Jenne DE, Hansmann I, Mautner VF.
High frequency of mosaicism among patients with neurofibromatosis type 1 (NF1) with microdeletions caused by somatic recombination of the JJAZ1 gene. Am J Hum Genet. 75: 410-423 (2004)
19. Kehrer-Sawatzki H, Cooper DN.
Mosaicism in sporadic neurofibromatosis type 1: variations on a theme common to other hereditary cancer syndromes? J Med Genet. 45 :622-631 (2008)
20. Kluwe L, Siebert R, Gesk S, Friedrich RE, Tinschert S, Kehrer-Sawatzki H, Mautner VF.
Screening 500 unselected neurofibromatosis 1 patients for deletions of the NF1 gene. Hum Mutat. 23: 111-116 (2004)

21. Korf BR.
Plexiform neurofibromas. Am J Med Genet. 89: 31-37 (1999)
22. Kozlowski P, Roberts P, Dabora S, Franz D, Bissler J, Northrup H, Au KS, Lazarus R, Domanska-Pakiela D, Kotulska K, Jozwiak S, Kwiatkowski DJ.
Identification of 54 large deletions/duplications in TSC1 and TSC2 using MLPA, and genotype-phenotype correlations. Hum Genet. 121: 389-400 (2007)
23. Lammert M, Friedman JM, Kluwe L, Mautner VF.
Prevalence of neurofibromatosis 1 in German children at elementary school enrollment. Arch Dermatol. 141: 71–74 (2005)
24. Listernick R, Mancini AJ, Charrow J.
Segmental neurofibromatosis in childhood. Am J Med Genet A. 121: 132-135 (2003)
25. López-Correa C, Brems H, Lázaro C, Marynen P, Legius E.
Unequal meiotic crossover: a frequent cause of NF1 microdeletions. Am J Hum Genet. 66: 1969-1974 (2000)
26. López-Correa C, Dorschner M, Brems H, Lázaro C, Clementi M, Upadhyaya M, Dooijes D, Moog U, Kehrer-Sawatzki H, Rutkowski JL, Fryns JP, Marynen P, Stephens K, Legius E.
Recombination hotspot in NF1 microdeletion patients. Hum Mol Genet. 10: 1387-1392 (2001)
27. Messiaen LM, Callens T, Mortier G, Beysen D, Vandenbroucke I, Van Roy N, Speleman F, Paepe AD.
Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. Hum Mutat. 15: 541-555 (2000)

28. Petek E, Jenne DE, Smolle J, Binder B, Lasinger W, Windpassinger C, Wagner K, Kroisel PM, Kehrer-Sawatzki H.
Mitotic recombination mediated by the JJAZF1 (KIAA0160) gene causing somatic mosaicism and a new type of constitutional NF1 microdeletion in two children of a mosaic female with only few manifestations. J Med Genet. 40: 520-525 (2003)
29. Rasmussen SA, Colman SD, Ho VT, Abernathy CR, Arn PH, Weiss L, Schwartz C, Saul RA, Wallace MR.
Constitutional and mosaic large NF1 gene deletions in neurofibromatosis type 1. J Med Genet. 35: 468-471 (1998)
30. Riccardi VM, Lewis RA.
Penetrance of von Recklinghausen neurofibromatosis: a distinction between predecessors and descendants. Am J Hum Genet. 42: 284-289 (1988)
31. Ruggieri M, Huson SM.
The clinical and diagnostic implications of mosaicism in the neurofibromatoses. Neurology. 56: 1433–1443 (2001)
32. Schouten J.P, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwinjnenburg D, Diepvens F, Pals G.
Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Research. 30, 12 e57 (2002)
33. Schultz ES, Kaufmann D, Tinschert S, Schell H, von den Driesch P, Schuler G.
Segmental neurofibromatosis. Dermatology. 204: 296–297 (2002)
34. Steinmann K, Cooper DN, Kluwe L, Chuzhanova NA, Senger C, Serra E, Lazaro C, Gilaberte M, Wimmer K, Mautner VF, Kehrer-Sawatzki H.
Type 2 NF1 deletions are highly unusual by virtue of the absence of nonallelic homologous recombination hotspots and an apparent preference for female mitotic recombination. Am J Hum Genet. 81: 1201–1220 (2007).

35. Stiller CA, Chessells JM, Fitchett M.
Neurofibromatosis and childhood leukaemia/lymphoma: a population-based UKCCSG study. Br J Cancer. 70: 969-972 (1994)
36. Tucker T, Wolkenstein P, Revuz J, Zeller J, Friedman JM.
Association between benign and malignant peripheral nerve sheath tumors in NF1. Neurology. 2005 65: 205-211 (2005)
37. Upadhyaya M, Ruggieri M, Maynard J, Osborn M, Hartog C, Mudd S, Penttinen M, Cordeiro I, Ponder M, Ponder BA, Krawczak M, Cooper DN.
Gross deletions of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene are predominantly of maternal origin and commonly associated with a learning disability, dysmorphic features and developmental delay. Hum Genet. 102: 591-597 (1998)
38. Vandenbroucke I, van Doorn R, Callens T, Cobben J, Starink TM, Messiaen L.
Genetic and clinical mosaicism in a patient with neurofibromatosis type 1. Hum Genet. 114: 284-290 (2004)
39. Venturin M, Gervasini C, Orzan F, Bentivegna A, Corrado L, Colapietro P, Friso A, Tenconi R, Upadhyaya M, Larizza L, Riva P.
Evidence for non-homologous end joining and non-allelic homologous recombination in atypical NF1 microdeletions. Hum Genet. 115: 69-80 (2004)
40. Wimmer K, Yao S, Claes K, Kehrer-Sawatzki H, Tinschert S, De Raedt T, Legius E, Callens T, Beiglböck H, Maertens O, Messiaen L.
Spectrum of single- and multiexon NF1 copy number changes in a cohort of 1,100 unselected NF1 patients. Genes Chromosomes Cancer. 45: 265-276 (2006)
41. Wu BL, Schneider GH, Korf BR.
Deletion of the entire NF1 gene causing distinct manifestations in a family. Am J Med Genet. 69: 98-101 (1997)

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Walther Vogel für die Möglichkeit bedanken, in seiner Abteilung Humangenetik promovieren zu dürfen.

Ein ganz besonders herzliches Dankeschön gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Hildegard Kehrer-Sawatzki für ihren unermüdlichen Einsatz und ihre stete Ausdauer. Ohne ihre umfassende, sehr gute und zügige Betreuung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Vielen Dank!

Auch bei Herrn PD Dr. Werner Melzer möchte ich mich herzlich für seinen Einsatz als Wahlprüfer bedanken.

Weiter möchte ich dem gesamten Laborteam danken, ohne deren freundliche Unterstützung und rege Hilfestellung das tägliche Arbeiten im Labor nicht möglich gewesen wäre.

Außerdem gilt mein sehr herzlicher Dank meinem Mann Zoran Colak für seine Geduld und den Rückhalt, den er mir während der ganzen Arbeit immer wieder gegeben hat.