

1 Zusammenfassung

Eine Reihe von genetisch bedingten Erkrankungen liegt in Gendosisunterschieden begründet. Dazu zählen zum Beispiel das Down-, das Prader- Willi- , das Angelman- und das Cri du Chat Syndrom. Auch die Tumorprogression ist durch eine Akkumulation von Aberrationen gekennzeichnet, die mit einer Amplifikation von Onkogenen und einer Deletion von Tumorsuppressorgenen einhergehen können. Alle diese Mutationen äußern sich als ein detektierbarer Kopienzahlunterschied zu einem Kontrollgenom. Die Methode der Wahl, solche Amplifikationen und Deletionen genomweit in der Patienten-DNS zu untersuchen, ist die Komparative Genomhybridisierung (CGH). Aufgrund technischer Limitationen ist diese Methode jedoch nicht geeignet, die gefundenen Mutationen näher zu charakterisieren. Geringe Abweichungen, bezogen auf die Größe der betroffenen Regionen und den Dosisunterschied, vermag die CGH gar nicht aufzulösen. Die Entwicklung einer Alternative mit erweiterten Möglichkeiten, höherer Auflösung und besserem Detektionsvermögen für kleine Kopienzahlunterschieden, ist deshalb erforderlich. Mit der Einführung der Hybridisierung im Mikromaßstab auf Glasobjektträgern zur Expressionsanalyse von Genen stand die geeignete Technik bereit, diese Alternative zu etablieren. Zwei Probleme traten auf, die eine einfache Umsetzung dieser Methodik zur Matrix- oder Array- CGH verhinderten: die sehr viel höhere Komplexität des humanen Genoms im Vergleich zum Transkriptom und das Vorhandensein von repetitiven Sequenzen. Ein Ansatz, diese Schwierigkeiten zu umgehen, ist die selektive Amplifikation einer Auswahl genomischer Sequenzen und deren komparative Hybridisierung auf korrespondierende Sonden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode durch den Einsatz von *In Silico* generierten Sonden abgewandelt. Dabei konnte gezeigt werden, daß diese Methode der Sondenerzeugung mit konkurrierenden Ansätzen vergleichbare Ergebnisse zuläßt und gegenüber dem ursprünglichen Protokoll (Geschwind *et al.*, 1998) bessere Werte ermöglicht. Durch die Auswahl von geeigneten Primerpaaren aus Datenbanksequenzen wird der Aufwand zur Erzeugung eines dichten Rasters von genomischen Klonen bedeutend vereinfacht und erlaubt durch die Integration von Sequenzdaten bei der Auswertung die schnelle

Identifikation von Genen oder genomischen Markern, für die sonst noch weitere Zwischenschritte nötig wären.

Im einzelnen konnte anhand von drei Patienten- DNS- Proben, die Deletionen in der Xq21- Region aufwiesen, gezeigt werden, daß vollständige (hier hemizygote) Deletionen genau kartiert werden können. Die Identifikation des Lippen- Kiefer- Gaumenspalten- Kandidatengens TBX22 bestätigte die Plausibilität der erhaltenen Ergebnisse.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, welche Kopienzahlunterschiede mit der vorgestellten Methode detektiert werden können. Anhand von komparativen Hybridisierungen von IA- Amplikons, die von Genomen mit unterschiedlicher Anzahl von X- Chromosomen erhalten wurden, konnte gezeigt werden, daß die Detektion solcher Dosisunterschiede vom numerischen Unterschied der Kopienzahl abhängt. Dosisunterschiede vom Faktor fünf können mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit aufgelöst werden. Die Detektion eines zusätzlichen oder fehlenden Allels stellt die derzeitige Auflösungs-grenze der Methode dar.

Aufgrund der Flexibilität bei der erreichbaren Auflösung (Veränderungen der PCR- Bedingungen) und bei der Auswertung (Einführung eines gleitenden Durchschnitts über die Meßwerte) kann die Methode den jeweiligen Erfordernissen angepaßt werden.

1.1 Summary

A number of inherited diseases is caused by gene dosage abnormalities. Examples include among others the Prader- Willi-, Angelman, or the Cri-du-Chat syndrome. Also the tumor progression is characterized by an accumulation of such aberrations, leading to amplification of oncogenes or the deletion of tumor suppressor genes. All these mutations express themselves as a detectable copy number difference compared to a reference genome. The method of the choice for a genome wide examination of such amplifications and deletions in DNA of patients is the Comparative Genomic Hybridization (CGH). Due to technical limitations however this method is not suitable to characterize the found mutations in detail. The CGH is not adequate to dissolve small aberrations, in terms of size of the regions concerned and the dosage difference. The

development of an alternative with improved possibilities, namely higher resolution and better detection ability for small copy number differences, is therefore necessary. With the introduction of micro scale hybridizations on glass slides for the expression analysis of genes a suitable technology was available to establish this alternative. Two problems arose, which prevented the simple transfer of this methodology to the field of matrix or array CGH: a) the much higher complexity of the human genome in comparison to the transcriptome and b) the presence of repetitive sequences. An approach to avoid these difficulties is the selective amplification of genomic sequences and their comparative hybridization to corresponding probes. In the presented work this method was modified by the employment of probes generated *in silico*. It could be demonstrated that this method of probe generation yields comparable results to competing technologies and bests the outcome in relation to the original protocol (Geschwind et al., 1998). The effort for the generation of a dense array of genomic clones is importantly reduced by the selection of suitable primer pairs from data base sequences. Additionally, further steps otherwise necessary to map the genomic clones do not apply. Based on the analysis of three DNS- samples of patients, which exhibited deletions in the Xq21 region, that complete (i.e. hemizygote) deletions can be mapped exactly. The identification of candidate gene TBX22 for the X-chromosomal form of cleft lip palate confirmed the plausibility of the received results. In a further attempt it was determined, which copy number differences can be distinguished by use of the presented method. The analysis of cell lines containing one to five X-chromosomes per cell revealed that the detection of such dose differences depends on the numeric difference of the copy number. Dosage differences of the factor five can be dissolved with very high significance. The detection of one extra or missing allele represents the present limiting resolution of the method. Due to the flexibility with the attainable resolution (changes of the PCR- conditions) and during the evaluation (introduction of a moving average over the measured values) the method can be adapted to respective requirements.