

4. Diskussion

Die Analyse von Veränderungen in den Kopienzahlen einzelner Bereiche des Genoms ist wichtig, um molekulare Grundlagen z.B. der Tumorgenese zu erforschen, sowie um präzisere Diagnosen zu ermöglichen. Hierbei hat die molekular-zytogenetische Methode der *Vergleichenden Genomischen Hybridisierung (Comparative Genomic Hybridization, CGH)* große Dienste geleistet (Übersicht: Lichter et al 2000). Als Weiterentwicklung der chromosomalen CGH basiert die Matrix- oder Microarray-CGH (mCGH) auf einer Hybridisierung, die nicht auf vollständigen Chromosomen, sondern auf einzelne Spots definierter chromosomaler Loci stattfindet (Solinas-Toldo et al 1997, Pinkel et al 1998). Die für die jeweilige Untersuchung interessanten Bereiche des Genoms werden in hoher Konzentration als geordnete Matrix auf einer (Glas-) Oberfläche fixiert. Die Probe aus unterschiedlich fluoreszenz-markierter Test- bzw. Referenz-DNA hybridisiert kompetitiv auf diese Bereiche. Das Verhältnis der Stärke der beiden Signale (Ratio) spiegelt die vorhandene Kopienzahl des jeweiligen chromosomalen Bereiches im getesteten Genom wieder. Eine weitgehende Automatisierungsmöglichkeit von Herstellungs- und Analyse-Prozesses lassen die Anwendung von Microarrays besonders attraktiv erscheinen.

Als Hybridisierungsziele wurden in bisherigen Protokollen meist in PACs oder YACs klonierte Sequenzabschnitte eingesetzt. Die Nutzung von cDNAs auf mCGH-DNA-Chips wurde erstmalig 1999 beschrieben (Pollack et al 1999). Die technischen Vorteile, die sich hierbei ergeben liegen auf der Hand:

- Information über Sequenzen aus elektronischen Datenbanken
- Leichte Präparation und Amplifikation der Ziel-Sequenzen
- Parallele Anwendung für Expressions-Untersuchungen
- höhere Auflösung bei der Detektion von chromosomalen Imbalancen

Konnte die mCGH bisher mit eine Auflösung von ca. 100 kbp (Solinas-Toldo et al 1997) gegenüber 2 – 10 Mbp der chromosomalen CGH (Joos et al. 1993, Piper et al. 1995, Bentz et al. 1998, Kirchhoff et al. 1999) aufwarten, so wurde in der Untersuchung von Imbalancen mittels einer Matrix von cDNA-Molekülen von Ziel-Sequenzen in der Größe von 0,5 - 2 kbp berichtet (Pollack et al 1999). Letzteres konnte jedoch bislang von keiner anderen Arbeitsgruppe bestätigt werden.

In dieser Arbeit wurden Unterschiede analysiert, die sich aus der Nutzung von Zielsequenzen unterschiedlicher Komplexität ergeben. Dazu wurden sechs verschiedene Microarrays hergestellt, die PACs, YACs und cDNAs als Ziele trugen. In einer Reihe von Hybridisierungsexperimenten konnten die resultierenden Fluoreszenz-Intensitäten und Ratios verglichen werden.

Herstellung der Microarrays

Bei der Präparation von DNA, die als Zielstelle auf Microarrays aufgebracht werden sollte, zeigten sich deutliche Unterschiede bzgl. der Eignung für einen optimalen Durchsatz. Die Herstellung der cDNA-Moleküle über PCR-Amplifikation und ggf. einer vorgeschalteten Reversen Transkription verlief deutlich unkomplizierter und schneller, als die Isolierung von DNA aus PACs. Letztere war ferner relativ großen Schwankungen hinsichtlich der Ausbeute unterworfen. Die Amplifikation von YAC-Insertionen war wiederum einfacher. Hier, wie auch im Falle der PACs, sollte jedoch die im Vorfeld nötige Arbeit mit den Klonen berücksichtigt werden. Kommerziell erhältliche YAC- oder PAC-Klone müssen durch *in situ*-Hybridisierung vor der Anwendung auf ihre Bindungsspezifität und genomische Reihenfolge überprüft werden. Tatsächlich sind im Durchschnitt 50% der YAC-Klone chimärisch, d.h. sie sind Fusionsprodukte von zwei oder mehreren Fragmenten unterschiedlicher Herkunft im Genom (M. Nessling, pers. Mitteilung) und sind damit unbrauchbar. cDNAs können bei Bedarf zur Identifikation leicht sequenziert werden, wie es auch in dieser Arbeit durchgeführt wurde (Abschn. 3.2.). Der Ablauf von *Polymerase-Ketten-Reaktionen* und anschließender Aufreinigung kann gut durch den Einsatz von Pipetier-Robotern automatisiert werden - ein System, das zur Zeit in unserem Labor etabliert wird.

Die Unterschiede der Präparationsprotokolle hatten außerdem einen Einfluß auf die chemische Zusammensetzung der Ziel-DNA-Lösung, was sich wiederum in der Morphologie der *Spots* auf den Microarrays zeigte. Dieses Phänomen ist auch auf den Abbildungen der Arrays in Abschnitt 3.4. sichtbar.

Spot-Morphologie

Die Morphologie der *Spots* kann auf indirektem Weg einen nicht zu vernachlässigbaren Einfluß auf den Ausgang des Experiments haben. Eine ungleichmäßige Form erschwerte die automatische Erkennung der Zielstellen durch die Bildverarbeitungs-Software, daraufhin nötige Korrekturen durch den Benutzer könnten leicht zu subjektiven Messvorgängen führen. Zur optimalen vollautomatischen Erfassung der *Spots* könnte eine unspezifische Gegenfärbung der fixierten und gebundenen Nukleinsäuren (nach der Hybridisierung) hilfreich sein, wie sie z.B. bei der chromosomalen CGH zur Identifizierung der Chromosomen durchgeführt wird. Problematisch ist dabei allenfalls, daß durch zusätzliche „Naß-Schritte“ (Waschen, etc.) ein erhöhter Verlust von DNA auftreten könnte. Die auf dem Array vorhandene Ziel-DNA über Intensitätsmeßreihen zu quantifizieren, würde generell wichtige Informationen zur Versuchsoptimierung liefern.

Untersuchungen zur Signalintensität

Nachdem es im Verlauf einiger Hybridisierungsexperimente zu einem starken Verlust an Ziel-DNA gekommen war, was zu schwachen Fluoreszenz-Intensitäten führte, wurde das Protokoll der **Post-Hybridisierungsschritte** insofern modifiziert, als die Inkubationsschritte in den Waschlösungen sowie die anschließende Alkoholreihe zeitlich verkürzt wurden.

Die Fluoreszenzausbeute nach einer Hybridisierung ließ sich außerdem durch die schrittweise Erhöhung der **Ziel-DNA-Konzentration** von 0,5 auf 2 µg/µl stark erhöhen. Innerhalb dieses Konzentrationsbereiches bewirkte die Verdopplung der Ziel-DNA-Menge eine zweifach erhöhte Fluoreszenzintensität. Bei einer Konzentration von 4 µg/µl setzte dagegen ein Intensitätsverlust ein. Diese Beobachtung lässt sich evt. durch eine verschlechterte Haftungsfähigkeit der Nukleinsäuren auf der Glasoberfläche in zu stark konzentrierten Lösungen erklären. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Durchführung von Experimenten mit Konzentrationsreihen der Ziel-DNA auf Microarrays mit anderen Oberflächen als den benutzten *Superfrost+* -Objektträgern. Hierzu könnten z.B. Poly- (L-) Lysin beschichtete Objektträger eingesetzt werden, versuchsweise auch Corning GAPS-Träger, die von der beobachteten Morphologie her auf eine bessere Haftung der Nukleinsäuren schließen ließen.

Der Einsatz einer **Proben-Lösung** mit höherer DNA-Konzentration konnte die Intensität erhöhen, problematisch ist jedoch die parallel ansteigende Hintergrundfluoreszenz.

Unterschiedliche **Markierungs-Methoden** der Proben-DNA konnten keine deutliche Verbesserung der Intensität bewirken. Die gute Ergebnisse liefernde Markierung durch Zufalls-Primer-Verlängerung sollte jedoch weiter getestet werden, um z.B. durch den vorgeschalteten Restriktionsverdau, bei Bedarf in Kombination mit einem zusätzlichen Einsatz von DNase-Enzym, die Größe der Probenfragmente zu reduzieren. Die Bindungseigenschaft dieser Moleküle mit kurzen cDNA-Zielen könnte dann weniger starke Unterschiede zu den PAC-Zielen zeigen, als in den Untersuchungen in dieser Studie zu sehen waren, da ähnliche Größenverhältnisse eine Hybridisierung erleichtern sollten. Für dieses Protokoll müßte die Markierungsprozedur auf eine höhere Einbaurrate in der Proben-DNA hin optimiert werden.

Ein Problem der erwähnten Markierungsmethode, die auch in der einzigen veröffentlichten erfolgreichen Anwendung der cDNA-mCGH benutzt wurde (Pollack et al 1999), kann die Amplifikation der Proben-DNA während de Einbaus der markierten Nukleotide sein. Es werden hierzu zwar sogenannte Zufalls- (Hexanukleotid-) Primer benutzt, sollte jedoch eine ungleichmäßig Bindungsspezifität auftreten, so sind hier die quantitativen Auswirkungen wesentlich gravierender als bei einer möglicherweise

ungleichmäßigen DNase-Aktivität während der Nick-Translation. Eine Aussage über Imbalancen wäre dann verfälscht.

Das im Folgenden beschriebene Problem der geringen Komplexität der cDNA-Ziele, wurde durch die **Kombination verschiedener cDNA-Moleküle** zu einem Hybridisierungs-Ziel analysiert. Bezüglich der Fluoreszenz-Intensität wurde durch cDNA-Pools eine leichte Verbesserung erreicht. Diese korrelierte nicht direkt mit der Gesamtkomplexität der Kombinationen.

Komplexität der Ziel-DNA

Eine Besonderheit bei der Nutzung von cDNA-Microarrays zur Detektion von genomischen Imbalancen liegt in der geringen Größe dieser Ziel-Moleküle. Im Vergleich zu PACs bieten sie den markierten Proben-DNA-Fragmenten eine 1000fach geringere Komplexität bei der Hybridisierung. Zu beachten ist ferner die Struktur der Nukleinsäure-Moleküle: Während die Proben-DNA die kompletten genomischen Sequenzen trägt, bestehen die cDNA-Ziele lediglich aus der Intron-losen exprimierten Abfolge. Beide Eigenschaften können die Hybridisierungseffizienz beeinflussen und damit zu geringeren Signalintensitäten führen, während sie zugleich aber auch die gewünschte verbesserte Auflösung bei der Detektion chromosomaler Imbalancen bewirken sollen.

Im Vergleich der Signalintensitäten von YACs, PACs und einzelnen cDNAs auf den hybridisierten Microarrays wurde in dieser Studie eine direkte Korrelation mit der Komplexität der jeweiligen DNA-Ziele-Gruppe deutlich (Abschn. 3.6.4.). Offensichtlich bedingt die geringe Länge der cDNA-Ziele eine relativ „instabile“ Hybridisierung, sodaß sich nur eine kleine Menge der markierten Proben-Moleküle an den entsprechenden *Spots* anlagern kann. Da die Fluoreszenz linear abhängig von der Menge vorhandener Fluorochrome ist, bleibt die Intensität schwach.

Problematisch ist ferner, daß die einzelnen Sequenzabschnitte aus der hochkomplexen genomischen DNA in der Probenlösung in nicht ausreichenden Mengen enthalten sind. Die komplementären Nukleinsäuren für die auf den Microarrays aufgebrachten Spleiss-Varianten des *BCMS*-Gens sind in der genomischen Probe identisch, diese Zielstellen konkurrieren also in der Hybridisierungs-Reaktion um die markierten DNA-Abschnitte. Eine höhere Probenkonzentration (zugleich mit einer Anpassung der Hybridisierungsbedingungen z.B. bzgl. Diffusion und zeitlicher Dauer) sollte in diesem Fall zur vollen Absättigung möglicher Bindungsstellen und zu einer Erhöhung der Intensität führen. Das Problem hierbei ist, daß es dabei parallel zu einer Verstärkung der Hintergrundfluoreszenz kommt.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist, daß die Bindungseigenschaften der kurzen Sequenzen auf dem Array verändert sind. Die DNA-Stränge sind nach dem Trocknen evtl. räumlich nicht in gleichem Maße zugänglich wie längere Abschnitte und damit einer Hybridisierung entzogen.

Nicht auszuschließen ist schließlich, daß es bei kürzeren DNA-Abschnitten leichter zu einer Renaturierung der - vor der Hybridisierung idealerweise einzelsträngig vorliegenden - DNA-Ziele kommt, da die Komplexität gering ist. Auch hierdurch wären die Nukleinsäuren einer Anlagerung der markierten Probe nicht mehr zugänglich.

Problematisch bleibt bei diesen Überlegungen die Tatsache, daß auch die YAC-Ziele der Microarrays durch die Amplifikations-Methode der ALU-PCR aus einer Ansammlung unterschiedlich langer Fragmente bestehen und trotzdem sehr starke Fluoreszenz-Signale generieren können (Diagr.9 und Tab. 13, Abschn. 3.6.4.). Eine exakte Quantifizierung der YAC-Fragmente ist nicht möglich, sie liegt jedoch deutlich über der Komplexität der benutzten cDNA-Sequenzen. Zu beachten ist weiterhin der erwähnte Einfluß der unterschiedlichen Strukturen zwischen exprimierten cDNA- und genomischen PAC- und YAC-Sequenzen als weiteres Hindernis einer idealen Hybridisierung. Zur Beurteilung dieses Zusammenhangs kann das Ergebnis der Expressions-Hybridisierung herangezogen werden.

Expressionsanalyse

Trotz eines grundsätzlich höheren Hintergrunds auf den Microarrays, ermöglichte eine Expressions-Hybridisierung, spezifische Signale zu generieren: Ein Parallelexperiment bestätigte die Ergebnisse (Diagramm 18, Abschn. 3.9.).

Die Normalisierung der Ratio-Werte hätte hier analog zum Vorgehen bei der mCGH mit Ratios bekanntermaßen gleich-exprimierter Gene erfolgen können. Bei diesem Vorgehen bleiben jedoch meist Zweifel, da eine differentielle Expression einzelner Gene in den Zellen nie ganz ausgeschlossen werden kann. Als Alternative bietet sich an, die Ratio-Werte von sämtlichen auf den Chip aufgebrachten DNA-Zielen zu mitteln und als Normalisierungsfaktor zu benutzen.

Um die mittels *Northern-Blot*-Experimenten beschriebene differentielle Expression der Spleiss-Variante W53, bzw. des Leu1-Exons in Pankreas, bzw. Herzgewebe (D. Mertens, pers. Mitteilung) bestätigen zu können, wäre ein erhöhtes Ratio des W 53 Wertes und ein verringertes Ratio der W 1-, Pool 1- und Pool 3-Zielstellen zu erwarten gewesen. Diese differentielle Expression wurde jedoch hier nicht bestätigt.

Bei den Expressions-Experimenten wurde jedoch eine relative Überexpression des *c-MYC*-Gens in den Herz-Zellen festgestellt, was an einem cDNA-*Target* abgelesen werden

konnte (cMYC2, Diagramm 18, Abschn. 3.9.). Ratios der PAC- und YAC-Ziele haben bei der Untersuchung der Genaktivität offensichtlich nur wenig Spezifität und Aussagekraft, da hier genomische Sequenzen vorliegen, welche im Gegensatz zur prozessierten Proben-DNA, nicht-kodierende Bereiche enthalten – Entgegengesetzt dem Problem der cDNAs bei genomischen Hybridisierungen.

Über die Möglichkeit einer relativen Überexpression des *ATM*-Gens in Herz- gegenüber Pankreas-zellen - wie das Ratio der *PAC ATM*-Zielstelle andeutet - liegen keine weiteren Informationen vor. Um die Expression und die mögliche Überexpression des *ATM*- und des *c-MYC*-Gens zu verifizieren, wäre die Durchführung einer quantitativen PCR notwendig, die aus Zeitgründen nicht mehr abgeschlossen werden konnte.

Wichtig zur Beurteilung der Methodik war bei diesem Experiment, daß die Intensitätswerte von cDNA-Zielstellen nicht hinter die der PAC- und YAC-Zielen zurückfielen und diese z.T. übertrafen (Diagramm 17, Abschn. 3.9.). Trotz geringer Länge waren damit gute Hybridisierungseigenschaften zu beobachten. Dies deutet auf den nicht zu unterschätzenden Einfluß der veränderten Struktur der exprimierten Nukleinsäuren im Vergleich zu den nicht-kodierenden Sequenzen beinhaltenden genomischen Zielen (YACs, PACs) in Hybridisierungs-Experimenten hin. Die Spezifität der Bindung und damit die Aussagekraft der Experimente sollte durch die Nutzung der kodierenden cDNA-Sequenzen zugleich verbessert sein.

Charakterisierung von Imbalancen der Zelllinie COLO-320

Um die Spezifität und die Sensitivität der Microarray-Ergebnisse der genomischen Hybridisierungen vor allem über die exemplarisch untersuchte chromosomale Region 13q14 einer Verifizierung unterziehen zu können, wurde zunächst eine chromosomale CGH mit der eingesetzten Kolon-Karzinom-Zelllinie COLO-320 durchgeführt.

Die Überrepräsentation des chromosomalen Bereiches 13q14 konnte mit dieser Methode dargestellt werden. Wichtig war außerdem die Bestätigung der hohen Kopienzahl des *c-Myc*-Lokus bei 8q24 und der balancierte Zustand der *ATM*-Region bei 11q22.

Potential der cDNA-mCGH

Die durch die chromosomale CGH gezeigt Überrepräsentation der Region 13q14 in der Kolon-Karzinom-DNA konnte durch die Methode der Matrix-CGH nicht signifikant für alle eingesetzten Ziel-Molekül-Varianten bestätigt werden, jedoch ist in den vorgestellten Ergebnissen eine verstärkte Repräsentation des Bereiches mit Hilfe von einzelnen

Spleiss-Varianten des Gens *BCMS*, Kombinationen davon und dem Retinoblastoma1-DNA-Ziel angezeigt worden, deren Ratios über dem gewählten Schwellwert lagen (zweifache Standardabweichung des Mittelwertes der Kontroll-Ziele; Abschn. 3.7.). Die Möglichkeit der Detektion dieser Imbalancen mittels einer Matrix von PACs der Region ist bereits in unserem Labor gezeigt worden (S. Lampel, pers. Mitteilung).

Die starke Amplifikation des *cMYC*-Onkogens konnte mit mCGH sowohl mit PAC- als auch mit cDNA-Zielen leicht detektiert werden. Die Signale der PAC-Zielstelle waren erwartungsgemäß sowohl quantitativ (Intensität) als auch qualitativ (höherer Ratio-Wert) besser.

Interessant ist die beobachtete Tendenz, daß geringe Konzentrationen den zu erwartenden Ratios besser entsprechen. Ebenso scheint die Kombination einer größeren Anzahl von cDNAs bessere Ratios zu bewirken als geringere. Bei der Betrachtung der Intensitätswerte war dagegen die Tendenz aufgefallen, daß gerade die höheren Konzentrationen und auch die Kombination von weniger Nukleinsäuren als Zielstellen höhere Fluoreszenzen lieferten.

Hieraus läßt sich schließen, daß trotz geringer Intensitätswerte eine Detektion von Imbalancen, zumindest von *high copy number amplifications* wie der *c-MYC*-Lokus in dieser Studie, durch cDNA-Microarrays möglich ist. Durch die Kombination von einer noch höheren Anzahl von cDNA-Molekülen (vergrößerte Komplexität) und, wenn möglich, einer Erhöhung der redundanten Mess-Zielpunkte eines Lokus, sollte eine Annäherung an die Detektionsmöglichkeiten mittels YACs möglich sein, während die Auflösung weit unter den ca. 1 Mbp der YAC-Fragmente bleiben kann.

Ausblick

Die noch relativ junge Microarray-Technik beherbergt weitere unterschiedliche sehr effiziente Anwendungen. Die direkte Weiterentwicklung der DNA-Chips wird zur Repräsentation kompletter Genome auf wenigen Arrays führen. Mit Chips dieser Art wird es möglich sein, einerseits die Expression sämtlicher Gene eines Gewebes gleichzeitig überprüfen zu können und andererseits die Analyse von genomischen Imbalancen in großem Maßstab durchführen zu können. Mit der weiter zu optimierenden Methode der cDNA-mCGH werden diese Experimente parallel mit gleichartigen DNA-Chips möglich sein, was eine optimale Korrelationsanalyse von genomischen Veränderungen und entsprechenden Expressionsmustern erlauben wird. Die Entwicklungsschritte auf dem Weg zu Chips dieser Art

könnten Microarrays sein, die zur Analyse spezifischer Fragestellungen entwickelt werden, wie z.B. zur

- Analyse einzelner definierter Loci
- Chromosomenweiten Überprüfung
- Darstellung krankheitsspezifischer Veränderungen
- Verfolgung von Stoffwechselwegen (mit Expressionschips)

Darüber hinaus ist die Entwicklung von Chips mit alternativen Zielen, wie z.B. Proteinen oder Antikörpern denkbar. Mit Werkzeugen dieser Art wird sowohl die Grundlagen-, wie auch die klinische Forschung in der Lage sein, Zusammenhänge aufzuklären, die zuvor nicht zugänglich waren. Sofern parallel die Entwicklung von leistungsstarken Datenanalyse-Systemen durch die Bioinformatik vorangetrieben wird, kann es zu einer enormen Beschleunigung der Forschung kommen.

Bei aller Euphorie über die Weiterentwicklung hocheffizienter Methoden wie der Microarray-Technologie sollte nicht vergessen werden, daß diese Art von Techniken v.a. aus dem Bereich der medizinischen Forschung auch gewisse Risiken sozial-ethischer Art mit sich bringen. Die Möglichkeit, ein Genom mit wenig Aufwand und Kosten vollständig auf Veränderungen hin analysieren zu können, erfordert ein hohes Maß an Verantwortungsbewußtsein. Einerseits muß eine absolute Vertraulichkeit der Daten erwartet werden können, andererseits muß aber auch die Gesellschaft aufgeklärt werden, wie mit Erkenntnissen aus Untersuchungen dieser Art umzugehen ist. Die vorurteilsfreie Toleranz auch von Unterschieden genetischer Art sollte eine Voraussetzung werden, um das große Potential der DNA-Chiptechnologie in all ihren Facetten zum Einsatz zu bringen.

Zusammenfassung

Die Analyse von Veränderungen der Kopienzahlen einzelner Bereiche des Genoms ist wichtig bei der Untersuchung von Krebserkrankungen, um einerseits molekulare Grundlagen der Tumorgenese zu erforschen und andererseits eine präzisere Diagnose durchführen zu können. Hierbei hat die zytogenetische Methode der *Vergleichenden Genomischen Hybridisierung (Comparative Genomic Hybridization, CGH)* große Dienste geleistet. Um ein höheres Auflösungsvermögen bei der Detektion genomischer Imbalancen zu erreichen, basiert die *Matrix- oder Microarray-CGH (mCGH)* als Weiterentwicklung der chromosomalen CGH auf Hybridisierungs-Reaktionen, die nicht auf vollständigen Chromosomen, sondern auf einzelnen Fragmente definierter chromosomaler Loci stattfinden. Als Hybridisierungsziele der Fluoreszenz-markierten genomischen Proben wurden in bisherigen Protokollen der mCGH meist in PACs oder YACs klonierte Sequenzabschnitte genutzt. Der Einsatz von Microarrays mit fixierten cDNA-Fragmenten würde einige Vorteile mit sich bringen. Zu nennen sind hier vor allem das weiter verbesserte Auflösungsvermögen und die Möglichkeit, in Parallel-Experimenten Studien zur Expression der betrachteten Loci durchführen zu können.

In dieser Arbeit wurden Hybridisierungs-Experimente auf Microarrays durchgeführt, auf denen sowohl humane DNA-Sequenzen aus YAC- und PAC-Klonen, als auch cDNA-Fragmente als Zielstellen fixiert waren. Um den Einfluß der geringen Komplexität der cDNA-Moleküle auf die Hybridisierungseigenschaften zu analysieren, wurden diese zusätzlich in unterschiedlichen Kombinationen eingesetzt.

Exemplarisch wurde die chromosomale Region 13q14 untersucht, in der u.a. das Gen *BCMS* lokalisiert ist. Es handelt sich hierbei um ein mögliches Tumorsuppressor-Gen, das in dieser Arbeit mit seinen unterschiedlichen Spleiss-Varianten als cDNA-Hybridisierungsziele benutzt wurde.

Um einen methodischen Vergleich zu ermöglichen, wurde mit Hilfe der chromosomalen CGH eine Charakterisierung der Kolonkarzinom-Zelllinie *COLO-320* angefertigt. Mit der Matrix-CGH konnte eine Bestätigung von hiermit beschriebenen Imbalancen erreicht werden. Die Detektion des in der Zelllinie sehr stark überrepräsentierten *c-MYC*-Onkogens war sowohl mit PAC- als auch mit cDNA-Hybridisierungszielen leicht möglich, die weniger stark ausgeprägte Überrepräsentation des Bereiches 13q14 konnten mit einzelnen Varianten von Ziel-Molekülen und Kombinationen von cDNA-Sequenzen auf den Microarrays gezeigt werden.

Eine Reihe experimenteller Parameter wurde im Detail untersucht. Für die verminderten Intensitäten der Fluoreszenzsignale der cDNA-Fragmente, konnte eine direkte Abhängigkeit der Signalstärke von der Komplexität der jeweiligen Ziel-Moleküle gezeigt werden.

Um den Einfluß der unterschiedlichen Organisation von kodierenden Sequenzen bei genomischer Proben-DNA (und den genomische Fragmente enthaltenden PACs und YACs) sowie der Intron-freien cDNA zu analysieren, wurde eine Expressions-Hybridisierung mit mRNA aus Pankreas- und Herzgewebe auf die gleiche Art von Microarrays durchgeführt. Die cDNA-Moleküle zeigten sich hier als weit besser geeignete Hybridisierungs-Ziele.

Die Studie konnte zeigen, daß trotz verringerter Intensitätswerte eine Detektion von genomischen Imbalancen mit cDNA-Microarrays möglich ist. Durch die Kombination einer großen Anzahl von Lokus-spezifischen cDNA-Molekülen (Erhöhung der Komplexität) und einer erhöhten Redundanz von Einzel-Hybridisierungszielen sollte die genomischen Analyse auch von weniger stark amplifizierten Bereichen des Genoms möglich sein. Unter diesen Voraussetzungen kann die cDNA-basierte mCGH als *high-throughput*-Methode mit hoher Auflösung in einer Vielzahl von Fragestellungen eingesetzt werden.

6. Literaturverzeichnis

- Bentz, M, Döhner, H, Huck, K, Schütz, B, Ganser, A, Joos, S, Du Manoir, S, Lichter, P (1995) Comparative Genomic Hybridization in the Investigation of Myeloid Leukemias. *Genes, Chromosomes & Cancer* 12: 193-200.
- Bentz, M, Plesch, A., Stilgenbauer, S., Döhner, Lichter, P (1998) Minimal size of deletions detected by comparative genomic hybridization *Genes, Chromosomes & Cancer* 21: 172-175.
- Buselmaier, W. & Tariverdian, G. (1999) Humangenetik, 2.Aufl., Springer-Verl. Heidelberg
- DeRisi, J.L., Iyer, V.R., Brown, P.O. (1997) Exploring the Metabolic and Genomic Control of Gene Expression on a Genomic Scale *Science* 278: 680-686
- Duggan, D.J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P., Trent, J.M. (1999) Expression profiling using cDNA microarrays *Nature Genetics* 21, supplement: 10-14
- Du Manoir, S., Schrock, E., Bentz, M., Speicher, M.R., Joos, S., Ried, T., Lichter, P., Cremer, T. (1995) Quantitative analysis of comparative genomic in situ hybridization *Cytometry* 19 : 27-41
- Ermantraut, E., (1999) Herstellung von biomolekularen Arrays - eine technologische Herausforderung, *medgen* 11: 6-11
- Gerhold, D., Rushmore, T., Caskey, C.T. (1999) DNA chips: promising toys have become powerful tools *TIBS* 24: 168-173
- Gray, J.W & Collins, C. (2000) Genome changes and gene expression in human solid tumors *Carcinogenesis* 21,3: 443-452
- Haugland, R.P.: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6th ed. Molecular Probes Inc. Eugene, USA, 1996
- Idler, Irina (1999) Mutation analysis of the ATM gene in mantle cell lymphoma, Diplomarbeit Universität Heidelberg, Fakultät für Biologie

Iwabuchi, H., Sakamoto, M., Sakunaga, H, Ma, Y.Y., Carcangiu, M.L., Pinkel, D., Yang-Feng, T.L., Gray, J.W. (1995) Genetic analysis of benign, low-grade and high-grade ovarian tumors. *Cancer Res.* 55: 6172-6180

Joos, S., Scherthan, H., Speicher, M.R., Schlegel, J., Cremer, T., Lichter, P. (1993) Detection of amplified DNA sequences by reverse chromosome painting using genomic tumor DNA as probe. *Human Genetics* 90: 584-589.

Kalachikov, S. et al. (1997) Cloning and Gene Mapping of the Chromosome 13q14 Region deleted in Chronic Lymphocytic Leukemia, *Genomics* 42: 369-377

Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.-P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., Pinkel, D. (1992) Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors. *Science* 258: 818-821.

Kallioniemi, O.-P., Kallioniemi, A., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., Pinkel, D. (1993) Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. *Cancer Biology* 4: 41-46.

Kapanadze, B. et al (1998) A cosmid and cDNA fine physical map of a human chromosome 13q14 region frequently lost in B-cell chronic lymphocytic leukemia and identification of a new putative tumor suppressor gene, Leu5 *FEBS letters* 426: 266-270

Kirchhoff, M., Gerdes, T., Maahr, J., Rose, H., Bentz, M., Döhner, H., Lundsteen, C. (1999) Deletions below 10 megabasepairs are detected in comparative genomic hybridization by standard reference intervals *Genes, Chromosomes, Cancer* 25: 410-413

Knipper, R. (1999) *Molekulare Genetik*, 7.Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart

Knudson, A.G. Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 68: 820-823.

- Lampel, S., Nessling, M., Soder, A., Hopman, A., Bock, D., Göttel, D., Solinas-Toldo, S., Stilgenbauer, S., Döhner, H., Lichter, P. (2000) Disease-specific microarrays for the automated analysis of genetic imbalances by matrix-CGH, unveröffentlicht
- Langer, P.R., Waldrop, A.A., Ward, D.C. (1981) Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 78 (11): 6633-6637.
- Lichter, P., Bentz, M., Du Manoir, S., Joos, S. (1994) Comparative Genomic Hybridization, 191-210, In: Verma RS, Babu A (Hrsg): *Human Chromosomes*. McGraw-Hill, New York
- Lichter, P., Bentz, M., Joos, S. (1995) Detection of chromosomal aberrations by means of molecular cytogenetics: painting of chromosomes and chromosomal subregions and comparative genomic hybridization. *Methods in Enzymology* 254: 334-359.
- Lichter, P., S. Joos, M. Benz, S. Lampel: (2000) Compararative genomic hybridization. Uses and limitations *Seminars in Hematology*, im Druck
- Loeb, L.A. und Christians, F.C. (1996) Multiple mutations in human cancers. *Mutat. Res.* 350: 279-286
- Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74: 560-564.
- Mertens, D., Wolf, S., Bullinger, L., Ohl, S., Schaffner, C., Döhner, H., Stilgenbauer, S., Lichter, P. (2000) *BCMSUN*, a candidate gene for b-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle-cell lymphoma, has an independently expressed homolog on 1p22-p31, *BCMSUN-LIKE* Int. J. Cancer 88
- Mülhardt, Cornel (1999) *Der Experimentator: Molekularbiologie*, 1.Auflage, Gustav-Fischer-Verlag Stuttgart
- Nessling, M., (2000) Dissertation, unveröffentlicht

- Paithankar, K.R. & Prasad, K.S. (1991) Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Research* 19 (6): 1346.
- Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SP (1994) Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(11):5022-6
- Piper, J., Rutovitz, D., Sudar, D., Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Waldman, F.M., Gray, J.W., Pinkel, D. (1995) Computer image analysis of comparative genomic hybridization *Cytometry* 19(1):10-26
- Pinkel, D., Se Graves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., Collins, C., Kuo, W.L., Chen, C., Zhai, Y. Dairkee, S.H., Ljung, b., Gray, J.W., Albertson, D.G. (1998) High resolution analysis of DNA copy-number variations using comparative genomic hybridization to microarrays, *Nature Genetics* 20: 207-211
- Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO. (1999) Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays *Nature Genetics* 23: 41-46
- Press, W.H., Teukolski, S.A., Vetterling, W.T., Flannery, B.P. (1994) Numerical Recipes in C: The art of scientific computing, 636-639, 2. Aufl., Cambridge University Press, Cambridge
- Rous, P. (1979) A transmissible avian neoplasm. (Sarcoma of the common fowl) by Peyton Rous, M.D., *Experimental Medicine* for Sept. 1, 1910, Vol. 12, pp. 696-705, *Journal of Experimental Medicine* 150: 738-753.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1355.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H. et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491

Sambrook, J., Fritsch, E.F. et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA.

Sanger, F. (1981) Determination of nucleotide sequences in DNA *Science* 214: 1205-1210

Shena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray *Science* 270: 467-470

Shena, M. *DNA-Microarrays, A practical approach* (1999) Oxford University Press, New York

Schröck, E., Thiel, G., Lozanova, T., et al. (1994) Comparative genomic hybridization of human malignant gliomas reveals multiple amplification sites and nonrandom chromosomal gains and losses. *American Journal of Pathology* 144: 1203-1218.

Shalon, D., Smith, S.J., Brown, P.O. (1996) A DNA Microarray System for Analysing Complex DNA Samples Using Two-color Fluorescent Probe Hybridization, *Genome Research* 639: 639-645

Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Kickolenko, J., Benner, A., Döhner, H., Cremer, T., Lichter, P. (1997) Matrix-Based Comparative Genomic Hybridization: Biochips to Screen for Genomic Imbalances Genes, *Genes, Chromosomes & Cancer* 20: 399-407

Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98: 503-518.

Southern, E.M., Maskos, U., Elder, J.K. (1992) Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models *Genomics* 13: 1008-1017

Southern, E.M., Case, G.S., Elder, J.K., Johnson, M., Mir, K.U., Wang, L., William, J.C. (1994) Arrays of complementary oligonucleotides for analysing the hybridisation behaviour of nucleic acids *Nucleic Acids Res.* 22: 1368,

Stilgenbauer S., Nickolenko, J., Wilhelm, J., Wolf, S., Weitz, S., Döhner, C., Boehm, T., Döhner, H., Lichter, P. (1998) Expressed sequences as candidates for a novel tumor suppressor gene at band 13q14 in B-cell chronic lymphotoxic leukemia and mantle cell lymphoma, *Oncogene* 16

Tatusova, T.A., Madden, T.L. (1999), Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences *FEMS Microbiol Lett.* 174: 247-250

Wilgenbus, K.K., Mincheva, A., Korn, B., Lichter, P., Poustka, A. (1995) IRS-Long Range (LR) PCR: A Simple Method for Efficient Amplification of Human Genomic DNA from Complex Sources. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5: 214-221.

Wilgenbus, K.K., Lichter, P. (1999) DNA chip technology *ante portas*; *J Mol Med* 77: 761-768

Wolf, S. (2000) Dissertation, unveröffentlicht

7. Anhang

7.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
bp	Basenpaare
BSA	Rinder- (Bovines-) Serumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre (copy) DNA
cm	Zentimeter
CGH	Vergleichende Genomische Hybridisierung
H ₂ O _{dd}	zweifach destilliertes Wasser
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	dATP, dCTP, dGTP (bzw. dUTP) und dTTP Mix
dCTP	3'-Desoxycytosin-5'-Trisphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-Trisphosphat
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-Trisphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanin-5'-Trisphosphat
dUTP	2'-Desoxyuracil-5'-Trisphosphat
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	Expressed Sequence Tags: Aktive (abgelesene) Bereiche des Genoms
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
FA	Formamid
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton

LB-Medium	Luria Broth-Medium
Lsg.	Lösung
M	molar
max.	maximal
Mbp	Megabasenpaare
mCGH	Matrix- oder Microarray CGH
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
mRNA	Boten RNA
n.a.	not applicable (hier nicht anwendbar)
ng	Nanogramm
NIH	National Institute of Health
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAC	<i>P1 artificial chromosome</i> , eine E.coli-Vektorsystem
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ Ionen-Konzentration
PHA	Phytohämagglutinin
rfU	relative Fluoreszenz-Units
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
sog.	sogenannt
ss	einzelsträngig
SSC	Natriumchlorid/-Citrat-Lösung
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris/HCl – Borsäure- EDTA- Puffer
TE	Tris/HCl – EDTA - Puffer

Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
u.a.	unter anderem
u.ä.	und ähnliches
UCSF	University of California, San Francisco
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen/Volumen-Verhältnis
w/v	Gewicht/ Volumen-Verhältnis
YAC	<i>Yeast artificial chromosome</i> , ein Hefe-Vektorsystem
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

7.2. Worterklärungen

Allel: Ausprägungsform eines Gens

Epigenetisch: Ein Einfluß auf das Verhalten einer Zelle, welcher nicht direkt auf der Sequenz der DNA beruht (z.B. Methylierung der DNA oder Umwelteinflüsse)

Fluoreszenz: Eigenschaft einiger (meist aus mehreren Ringsystemen bestehender) Moleküle, bei Bestrahlung mit Licht einer definierten Wellenlänge, Licht einer leicht reduzierter Wellenlänge (*Stokes Schiff*) zu emittieren

Fluorochrom: Molekül mit fluoreszierenden Eigenschaften, Fluoreszenzfarbstoff

Genexpression: Aktivierung der in den Genen gespeicherten Information durch Übersetzen in mRNA und ggf. in Proteine

Genom: Das gesamte Erbgut eines Organismus

Hybridisierung: Eigenschaft von einzelsträngigen Nukleinsäuren, reversible Bindungen mit in ihrer Basenabfolge komplementären Nukleinsäuren eingehen zu können

Kontroll-DNA-Ziele: Zielstellen auf dem Microarray, die aus DNA-Sequenzabschnitten bestehen, welche in Test- und Referenz-DNA in gleichen Kopienzahlen (also balanciert) vorliegen. Sie dienen zur Überprüfung der Hybridisierung und zur Normalisierung der gemessenen Ratios.

Polymorphismus: Unterschiede in der genomischen Sequenz von verschiedenen Individuen, die nicht notwendigerweise mit einem veränderten Phänotyp assoziiert sind

Probe: DNA-Lösung, welche für die Hybridisierung auf DNA-Chips präpariert wird. Sie besteht aus Referenz, bzw. Test-DNA, welche zunächst mit unterschiedlichen

Fluoreszenzfarbstoffen markiert und dann zu gleichen Gewichtsanteilen gemischt werden.

Ratio: Zahlenwert, welcher das Verhältnis zweier Größen zueinander beschreibt, im Falle der Matrix-CGH z.B. der Signalintensität der Probe mit Patienten-DNA gegenüber derer mit Referenz-DNA-Probe. Ein Wert von 1,0 entspricht einem ausgeglichenen Verhältnis, ein Wert signifikant über, bzw. unter eins ($\pm 0,25$) einem Zugewinn, bzw. einem Verlust im Test-Genom, z.B. der Tumorzellen.

Referenz-DNA: DNA aus (zumindest in Bezug auf die betrachtete Region) gesunden Zellen, welche fluoreszenzmarkiert wird und mit der Test-DNA auf dem Microarray kohybridisiert.

Test-DNA: DNA, die aus dem zu untersuchenden (Tumor-) Gewebe des Patienten isoliert und fluoreszenzmarkiert wird. Sie wird als Probe mit der Referenz-DNA auf den Microarray zur Kohybridisierung aufgebracht.