

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 Hybridisierungs-Eigenschaften 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 genomische 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.