

Jürgen Kraus
Dr.sc.hum.

Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungsexperimente auf extendierten DNA-Fibern

Geboren am 21.02.1968 in Aschaffenburg
Reifeprüfung am 26.06.1987 in Aschaffenburg
Studiengang der Fachrichtung Biologie vom WS 1987 bis WS 1993
Vordiplom am 12.03.1990 an der Universität Würzburg
Diplom am 18.11.1993 an der Universität Würzburg

Promotionsfach: Humangenetik
Doktorvater: Prof.Dr.med. Thomas Cremer

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungstechnik ist in ihrem leistungsfähigen Spektrum seit Beginn der 90er Jahre um zwei wesentliche Methoden erweitert worden. Die als Fiber-FISH bezeichnete Methode ermöglicht eine physikalische Auflösung im kb-Bereich durch Hybridisierung auf entweder aus dem Zellkern extendierte Chromatinfibern oder auf "gekämmte" DNA-Fibern. Die Methode der vergleichenden genomischen Hybridisierung erlaubt eine genomweite Analyse numerischer Imbalancen von Tumor-DNA in einem einzigen Experiment und hat bereits weite Verbreitung in der Tumorzytogenetik und Pathologie gefunden. Im Rahmen dieser Dissertation wurde an der Kombination beider Techniken als Ausgangsbasis für die Entwicklung einer hochauflösenden vergleichenden genomischen Hybridisierung gearbeitet.

„Molecular Combing“ als hochauflösende Fiber-FISH-Technik gewährte eine reproduzierbare Elongation und parallele Ausrichtung geklonter und linearisierter Cosmid-DNA-Moleküle auf silanisierten Deckgläsern. Die Orientierung der Moleküle sowie ihre Vollständigkeit konnte durch Zweifarben *in situ* Hybridisierung von Vektor-DNA und Gesamtcosmid-DNA erfolgreich definiert werden.

Ein Modellsystem für eine hochauflösende komparative genomische Hybridisierung auf „gekämmten“ DNA-Fibern konnte etabliert werden. In zwei Experimentreihen wurden Hybridisierungen mit unterschiedlich hapten-markierter Cosmid-DNA in verschiedenen Mengenverhältnissen auf den entsprechend identischen, gekämmten Cosmid-Fibern durchgeführt. Es konnte eine eindeutig lineare Korrelation zwischen eingesetztem Haptenverhältnis und gemessenem Fluoreszenzquotienten, basierend auf der Auswertung von insgesamt 651 DNA-Fibern, nachgewiesen werden.

In Fiber-CGH Experimenten konnte die Amplifikation von MYCN in der Neuroblastom-Zelllinie Kelly auf dem MYCN-Cosmid dargestellt werden. Wegen zu geringer Repräsentation von MYCN in der Referenz-DNA waren quantitativ-vergleichende Auswertungen nicht möglich.

Um die Repräsentation von Einzelkopiesequenzen zu erhöhen wurden mittels PCR-unterstützter Affinitätschromatographie repetitive Sequenzen aus genomischer DNA bzw. PAC-DNA entfernt. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen auf Metaphasechromosomen konnten mit diesen depletierten DNAs ohne Cot-1 Kompetitor-DNA erfolgreich durchgeführt werden. Das Ziel einer

Durchführung von quantitativen FISH-Experimenten ohne Suppressionsbedingungen konnte mit Einschränkungen erreicht werden. Die CGH-Analyse einer Neuroblastomzelllinie mit zweifach wiederholungssequenz-depletierter Tumor- und Referenz-DNA, die ohne Einsatz von Cot-1-DNA hybridisiert wurde, ermöglichte die Detektion von einem Drittel der Imbalancen, die mit nicht-depletierter Neuroblastom-DNA unter Suppressionsbedingungen gefunden wurden. Die Möglichkeit der Verwendung depletierter PAC-DNA als Ziel-DNA in einem Matrix-CGH Experiment konnte durch den Nachweis einer bekannten etwa 20-fachen c-myc Amplifikation in der promyelotischen Zelllinie HL-60 demonstriert werden. Eine Erhöhung des Fluoreszenzquotienten gegenüber dem Experiment mit nicht-depletierter DNA als Ziel-DNA wurde aber bislang nicht erreicht.

Zur Bestimmung des Umfangs der MYCN-Amplifikation in der Neuroblastom-Zelllinie Kelly wurden zwei unterschiedlich hapten-markierte Cosmide [pNb101(Testcosmid) / cAW7(Referenzcosmid)] simultan auf herkömmlich präparierte gekämmte genomische Neuroblastom-DNA bzw. genomische Referenz-DNA hybridisiert. Über eine vergleichende Längenmessung der Hybridisierungssignalketten wurde die Amplifikation zu 101-fach bestimmt. Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit der autoradiographischen auf 100-fach geschätzten Amplifikation. Diese Methode stünde somit als Alternative zur Amplifikationsbestimmung mittels Southern-Blot zur Verfügung.

Hochauflösende CGH-Methoden (Fiber-CGH / Matrix-CGH) vereinigen zwei Vorteile in sich, die es erlauben werden, die Methode der vergleichenden genomischen Hybridisierung künftig einer routinemäßigen Anwendung in der Tumorzytogenetik und der klinischen Diagnostik zugänglich zu machen: zum einen die Möglichkeit einer Automatisierung des Verfahrens und zum anderen das Wegfallen arbeitsaufwendiger Karyotypisierungen. Bei Auswahl geeigneter Proben-DNA kann durch Hybridisierung auf „gekämmte“ genomische Test-DNA zusätzlich das Ausmaß von Deletionen und Amplifikationen im kb-Bereich physikalisch kartiert und der Umfang der Amplifikation bestimmt werden. Somit steht ein geeignetes hochauflösendes Genomanalysesystem zur Verfügung, dessen Sensitivität sich bei Verbesserung des Depletionsprotokolls noch erhöhen wird. In Kombination mit Multicolor-FISH sollten die meisten numerischen und strukturellen Aberrationen mit der FISH-Technik erfaßt werden können. Sie wird somit in Kombination mit bereits etablierten genomweiten Expressions- und Sequenzanalyse-Systemen wesentlich zur Untersuchung der Biologie des Genoms beitragen.