

5 ZUSAMMENFASSUNG

Über den Genotyp hämatogen disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit einem Mammakarzinom ist nur wenig bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde daher ein experimentelles Design zur lasergestützten Anreicherung und molekularzytogenetischen Charakterisierung dieser Zellen mittels der Methode der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) erarbeitet.

Ausgehend von perioperativ gewonnenen Knochenmarkaspiraten von Patientinnen mit einem frühen Mammakarzinom wurden zunächst durch ein Primärkulturmodell vitale, nicht-apoptotische, Zytokeratin-exprimierende (CK⁺) Tumorzellen erfolgreich selektiert und expandiert. Das immunzytochemische Screening der Kulturen auf CK⁺-Zellen ergab hinsichtlich Zellmorphologie und Färbeverhalten ein sehr heterogenes Bild und führte zur Definition objektiver Evaluationskriterien.

Da für eine informative CGH-Analyse mindestens zehntausend CK⁺-Zellen mit einem Reinheitsgrad von mindestens 50% erforderlich sind, wurden in einem zweiten Schritt Versuche einer immunmagnetischen Anreicherung dieser Zellen unternommen, welche die genannten Bedingungen allerdings nicht erfüllen konnten.

Daher wurden schließlich jeweils fünfzig CK⁺-Zellen mit Hilfe der Technologie der Laser-Mikrodissektion und -druckkatapultation rein physikalisch isoliert und gesammelt. Um ausreichende DNA-Mengen für eine CGH-Analyse bereitzustellen, wurde die DNA der gesammelten Zellen einem Genomamplifikationsverfahren unterworfen. Dies geschah mit der Methode der DOP-PCR, die vor Anwendung auf Laser-isolierte Kulturzellen zunächst in Pilotversuchen hinsichtlich Polymeraseauswahl und Lyse-Pufferbedingungen ausgetestet und optimiert wurde.

Mit einer CGH-Analyse von derart aufbereitetem Ausgangsmaterial gelang es am Beispiel von Zellen der Mammakarziomlinie MCF-7 zuverlässig, die für diese Zellen in der Literatur beschriebenen chromosomalen Veränderungen zu detektieren. Eine zunächst eingeschränkte Hybridisierungsqualität („körniger Hybridisierungscharakter“) konnte unter Anwendung der MseI-Adapter-PCR, einer neueren Variante der Genomamplifikation, überwunden und das Verfahren so noch weiter verbessert werden.

Mit der hier beschriebenen Methode sollte in einem nächsten Schritt auch die CGH-Analyse von CK-positiven Zellen der in dieser Arbeit etablierten Primärkulturen möglich sein. Dies könnte einen neuen Weg zur Aufdeckung der molekularen Determinanten potentiell metastatischer Stammzellen beim Mammakarzinom eröffnen.